



Universidade de Brasília
Departamento de Biologia Celular

Anderson Rodrigues Araújo Vieira

ESTUDO DAS PROTEÍNAS CRUZIPAÍNA E METACASPASE DE
TRYPANOSOMA CRUZI: POTENCIAL IMUNOGÊNICO E EFEITOS NAS VIAS DE
APOPTOSE E AUTOFAGIA DA CÉLULA HOSPEDEIRA

Brasília-DF

2019

ANDERSON RODRIGUES ARAÚJO VIEIRA

**ESTUDO DAS PROTEÍNAS CRUZIPAÍNA E METACASPASE DE
TRYPANOSOMA CRUZI: POTENCIAL IMUNOGÊNICO E EFEITOS NAS VIAS DE
APOPTOSE E AUTOFAGIA DA CÉLULA HOSPEDEIRA**

Tese
apresentada como requisito parcial para a
obtenção do Título de Doutor em Biologia
Microbiana pelo Programa de Pós-Graduação
em Biologia Microbiana pela Universidade de
Brasília.

Orientador: Dr. Vicente de Paulo Martins

Brasília-DF

2019

Anderson Rodrigues Araújo Vieira

ESTUDO DAS PROTEÍNAS CRUZIPAÍNA E METACASPASE DE TRYPANOSOMA
CRUZI: POTENCIAL IMUNOGÊNICO E EFEITOS NAS VIAS DE APOPTOSE E
AUTOFAGIA DA CÉLULA HOSPEDEIRA

Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do Título de Doutor em Biologia microbiana
pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia
Microbiana pela Universidade de Brasília.

Aprovado em: 01 /08 /2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Vicente de Paulo Martins (UnB)

Prof. Dr. Luís Henrique Ferreira do Vale (UnB)

Dr. Agenor de Castro Moreira dos Santos Júnior (Fundação Hemocentro de Brasília)

Prof. Dr. Marcos Takashi Obara (UnB)

Prof^a. Dr^a. Carla Nunes Araújo (UnB-FCE)

Dedicatória

À minha família, pelo apoio incondicional e companheirismo ao longo desses quatro anos. Ao meu filho Ravi, amor da minha vida, que me impulsiona a buscar sempre o melhor. E amigos, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço o apoio de todos, e em caráter especial:

Ao meu orientador Prof. Dr. Vicente de Paulo Martins pela oportunidade, confiança, ajuda, encorajamento, ensinamentos e pela sua valorosa amizade.

À Adriana Canavaci pelas dicas preciosas que contribuíram para este trabalho.

À Prof^ª Dr^ª Beatriz Dolabela pela ajuda e apoio nos experimentos.

À Prof^ª Dr^ª Tatiana Amabile pelas contribuições pontuais.

Ao Prof. Dr. Bergmann Ribeiro pela ajuda e contribuição no experimento com baculovirus.

Ao Leonardo Assis pela grande ajuda no experimento com baculovirus e na tese.

Ao Herik Muller pela contribuição e auxílio nos ensaios de ELISA e amizade.

Ao Luis Janssen pelos artigos fornecidos e pelas considerações e amizade.

À IC Ketlin Cristina pela sua dedicação aos experimentos que contribuíram valiosamente para essa tese.

Ao George Louis pelo apoio técnico prestado nos experimentos e amizade.

Ao Agnelo Rodrigues pelo fornecimento das células HeLa e pelas conversas produtivas e boas risadas.

Ao Fernando Fonseca pela valiosa ajuda nos experimentos de PCR em tempo real e orientações e amizade.

Ao Gabriel Alves pelas valiosas conversas, idéias, ajuda e amizade.

À Amanda Rocha pelo auxílio na microscopia de fluorescência e amizade.

Ao Allan Mascarenhas pela ajuda material e amizade.

A todos aqueles não mencionados mas que, de alguma forma contribuíram para a concretização dessa tese.

“Enquanto houver vontade de lutar haverá
esperança de vencer.”

Santo Agostinho

Lista de figuras

Figura 1: Carlos Justiniano Ribeiro Chagas (1879-1934).	26
Figura 2: Distribuição dos principais vetores invertebrados da doença de Chagas no continente americano.....	29
Figura 3: Moradia rustica, os principais vetores da DC e alguns reservatórios naturais do <i>T. cruzi</i>	30
Figura 4: Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
Figura 5: Demonstração das lesões iniciais e manifestações clínicas da DC. A) Sinal de Romanã (Rey, 2002); B) Chagoma; C) Cardiomegalia; D) Digestiva; E) Mista. Acessos disponíveis em 16/06/2019:.....	33
Figura 6: Mapa do plasmídeo pGEM®-T Easy utilizado para a clonagem dos produtos de PCR.....	42
Figura 7: Mapa do plasmídeo pEGFP-N3 utilizado para a expressão em células HeLa.....	43
Figura 8: Mapa do pET28a.....	46
Figura 9: Esquema mostrando a ligação entre as extremidades coesivas criadas pelas enzimas BgIII e BamHI.	47
Figura 10: Processador ultrassônico (sonicador).....	48
Figura 11: Montagem da coluna utilizada para purificar as proteínas.	50
Figura 12: O esquema mostra a geração do baculovírus recombinante	53
Figura 13: Placa de cultura de células HeLa..	55
Figura 14: Predição dos epítopos para células B para Metacaspase-3 e Cruzipaína.....	59
Figura 15: Alinhamento da sequência de resíduos de aminoácidos da Metacaspase-3 de <i>Trypanosoma cruzi</i> com <i>Leishmania brasiliensis</i> , <i>L. infatum</i> , <i>Trypanosoma rangeli</i> . As caixas	

vermelhas com caracteres brancos indicam resíduos idênticos. Caracteres vermelhos indicam resíduos similares.	60
Figura 16: Alinhamento da sequência de resíduos de aminoácidos da cruzipaína de <i>Trypanosoma cruzi</i> com outros tripanosomatídeos.....	61
Figura 17: Alinhamento da sequência de resíduos de aminoácidos da Cruzipaína de <i>Trypanosoma cruzi</i> com proteínas de mamíferos.....	62
Figura 18: Amplificação dos genes alvos do genoma de <i>Trypanosoma cruzi</i> da cepa CI Brener.....	63
Figura 19: Confirmação da clonagem dos fragmentos ao vetor de clonagem pGEM-T Easy.....	63
Figura 20: Confirmação da ligação dos insertos ao vetor de expressão (pET28a).....	64
Figura 21: Gel representativo da análise do tempo de indução da <i>E.coli</i> (Rosetta).....	64
Figura 22: Eletroforese em gel de SDS-PAGE	65
Figura 23: Confirmação da clonagem dos insertos em pGEM-T Easy.	66
Figura 24: Confirmação da construção do bacmídeo recombinante.	66
Figura 25: Confirmação da expressão das proteínas recombinantes.....	66
Figura 26: Confirmação da ligação dos insertos ao vetor de expressão (pEGFP-N3 em células de mamíferos.	67
Figura 27: Análise geral da transfecção das células Hela por microscopia de fluorescência. .	68
Figura 28: Análise da transfecção das células Hela por microscopia de fluorescência.	68
Figura 29: Confirmação da expressão das proteínas em células HeLa.	69
Figura 30: Níveis de IgG anti- <i>T. cruzi</i> em amostras de soro de indivíduos chagásicos (Positivos) e não-chagásicos (Negativos) avaliados por ELISA. O gráfico mostra o valor de absorbância dos anticorpos IgG de soros de pacientes chagásicos crônicos 0,96 (0,8 -1,4) e de	

pacientes não chagásico 0,74 (0,4 - 0,87) adsorvidos a Metacaspase-3 expressa em *E.coli* (rosetta). As barras representam a mediana e a faixa de 25% a 75% da amostra..... 70

Figura 31: Níveis de IgG anti-*T. cruzi* em amostras de soros de indivíduos chagásicos crônicos e não-chagásicos (Negativos) separados pelas manifestações clínicas avaliados por ELISA. O gráfico mostra a resposta dos anticorpos IgG dos soros de pacientes com forma Indeterminada 1,15 (±0,11); Cardíaca 1,16 (±0,13); Digestiva 1,09 (±0,19) e Mista 0,80 (±0,11) em comparação a resposta dos anticorpos de pacientes não chagásico 0,69(± 0,07) adsorvidos a Metacaspase-3 expressa em Rosetta. As barras representam a Média e o (±EP). 70

Figura 32: Níveis de IgG anti-*T. cruzi* em amostras de soro de indivíduos chagásicos (Positivos) e não-chagásicos (Negativos) avaliados por ELISA. O gráfico mostra a resposta dos anticorpos IgG dos soros de pacientes chagásicos crônicos 0,87(0,68-1,13) em comparação a de pacientes não chagásico 0,60(0,53-0,63) adsorvidos a Metacaspase-3 expressa em baculovírus. As barras representam a mediana e a faixa de 25% a 75% da amostra..... 71

Figura 33: Níveis de IgG anti-*T. cruzi* em amostras de soros de indivíduos chagásicos crônicos e não-chagásicos (Negativos) separados por manifestações clínicas avaliados por ELISA. O gráfico mostra a resposta dos anticorpos IgG dos soros de pacientes com forma Indeterminada 0,88 (0,72-0,98); Cardíaca 0,79 (0,51-1,11); Digestiva 1,01 (0,68-1,32) e Mista 0,86 (0,65-1,26) em comparação a de pacientes não chagásico 0,60 (0,53-0,63) adsorvidos a Metacaspase-3 expressa em baculovírus. As barras representam a mediana e a faixa de 25% a 75% da amostra..... 72

Figura 34: Níveis de IgG anti-*T. cruzi* em amostras de soro de indivíduos chagásicos (Positivos) e não-chagásicos (Negativos) avaliados por ELISA. Os gráficos mostram em: A) O valor da absorbância dos anticorpos IgG anti- *T.cruzi* de soros de pacientes chagásicos crônicos 0,53 (0,41-0,69) e de pacientes não chagásico 0,21 (0,17-0,27) adsorvidos à metacaspase-3/GFP expressa em HeLa; B) Soros de pacientes chagásicos crônicos 0,37 (0,27-0,48) e de pacientes não chagásico 0,18 (0,16-0,24) adsorvidos à cruzipaína/GFP; C) Soros de pacientes chagásicos crônicos 0,29 (0,21-0,37) e de pacientes não chagásico 0,20 (0,16 - 0,27) adsorvidos à GFP . As barras representam a mediana e a faixa de 25% a 75% da amostra. ... 73

Figura 35: Níveis de IgG anti-*T. cruzi* em amostras de soros de indivíduos chagásicos crônicos e não-chagásicos (Negativos) separados pelas manifestações clínicas avaliados por ELISA. O gráfico mostra a resposta dos anticorpos IgGs dos soros de pacientes com forma Indeterminada 0,43 (±0,03); Cardíaca 0,31 (±0,03); Digestiva 0,46 (±0,06) e Mista 0,36 (±0,06) em comparação a resposta dos anticorpos de pacientes não chagásico 0,20(± 0,01) adsorvidos a Cruzipaina/GFP expressa em células Hela. As barras representam a Média e o (±EP).....74

Figura 36: Níveis de IgG anti-*T. cruzi* em amostras de soros de indivíduos chagásicos crônicos e não-chagásicos (Negativos) separados por manifestações clínicas avaliados por ELISA. O gráfico mostra a resposta dos anticorpos IgG dos soros de pacientes com forma Indeterminada 0,62 (0,50-0,89); Cardíaca 0,42 (0,31-0,60); Digestiva 0,60 (0,54-0,81) e Mista 0,36 (0,24-0,43) em comparação a de pacientes não chagásico 0,21 (0,17-0,27) adsorvidos a Metacaspase-3/GFP expressa em célula Hela. As barras representam a mediana e a faixa de 25% a 75% da amostra.....74

Figura 37: Níveis de IgG anti-*T. cruzi* em amostras de soros de indivíduos chagásicos crônicos e não-chagásicos (Negativos) separados por manifestações clínicas avaliados por ELISA. O gráfico mostra a resposta dos anticorpos IgG dos soros de pacientes com forma Indeterminada 0,28 (0,21-0,36); Cardíaca 0,19(0,14-0,30); Digestiva 0,29 (0,25-0,47) e Mista 0,35 (0,22-0,40) em comparação a de pacientes não chagásico 0,20 (0,16-0,27) adsorvidos a GFP expressa em célula Hela. As barras representam a mediana e a faixa de 25% a 75% da amostra.....75

Figura 38: Esquema mostrado as vias de ativação da apoptose.84

Figura 39: Complexo receptor de TNF (TRADD) associado à membrana plasmática é o principal responsável pela ativação do NF-κB.....86

Figura 40: A autofagia é iniciada pela ativação do complexo ULK1/288

Figura 41: Crosstalk entre autofagia e apoptose.....91

Figura 42: Eletroforese em gel de agarose mostrando as amplificações dos genes alvos a partir do cDNAs. 1) Caspase 8 com 85pb; 2) Caspase 9 não específico; 3) Caspase 8 com 91

pb; 4) Bcl2 não específico; 5) Bax com 70 pb; 6) ATG7 com 108 pb; 7) ATG5 não específico;
8) GAPDH com 94 pb; 9) TBP com banda não específica. 98

Figura 43: Gráficos obtidos de dados logaritmizados da expressão gênica das células HeLa com metacaspase-3, ou cruzipaina ou o plasmídeo fechado (GFP). 100

Lista de tabelas

Tabela 1: Iniciadores utilizados para a amplificação dos genes do genoma do <i>T.cruzi</i>	40
Tabela 2: Iniciadores utilizados para a amplificação dos genes e clonagem em pGEM-T-Easy e pFastBAC.....	40
Tabela 3: Sequencias de primers empregados na reação de qPCR	94
Tabela 4: Expressão dos genes ATG5, ATG7, Bax, Bcl2, Caspase 9, Caspase 8 e Caspase 3 e	99

Lista de siglas

ATG5 -*Autophagy related 5*

ATG7-*Autophagy related 7*

ANOVA- *Analysis of variance*

BCIP- 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate

cDNA- *Complementary Deoxyribonucleic acid*

DAMPs- *Damage-associated molecular patterns*

DC- Doença de Chagas

dNTP- Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

DMEM- *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DISC- *Death signaling inducing signaling complex*

DNA- *Deoxyribonucleic acid*

ELISA- *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ERK1/2- *Extracellular signal–regulated kinases 1 and 2*

GFP- *Green fluorescent protein*

IgG- Imunoglobulina G

IPTG- Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

kDa- Quilodalton

M- Molar

mTor- *Mammalian target of rapamycin*

NF-kB- *Nuclear Factor kappa B*

NBT- *Nitro blue tetrazolium*

PBS- *Phosphate buffered saline*

PBS-T- *Phosphate buffered saline tween*

PCR- *Polymerase Chain Reaction*

qPCR- *Quantitative polymerase chain reaction*

RIPK1- *Receptor-interacting protein kinase 1*

RNA- *Ribonucleic acid*

SDS- *Sodium dodecyl sulfate*

SAP- *Shrimp Alkaline Phosphatase*

TNF- *Tumor necrosis factor*

ULK1/2- *Unc-51 like autophagy activating kinase 1/2*

Sumário

Capítulo I- Potencial imunogênico da metacaspase-3 e cruzipaina em pacientes chagásicos.....	23
1.1 Introdução	26
1.1.1. Doença de Chagas.....	26
1.1.2. Epidemiologia da doença de Chagas	27
1.4. Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> e principais vetores.....	28
1.1.3. Manifestações Clínicas	31
1.1.4. Diagnóstico	33
1.1.5. Potenciais alvos a serem estudados	35
1.2. Justificativa	37
1.3. OBJETIVO	38
1.4. Material e métodos.....	39
1.4.3. Análise <i>in silico</i> dos genes.....	39
1.4.4. Desenhos dos iniciadores.....	39
1.4.5. PCR-Reação em cadeia da polimerase	40
1.4.6. Preparo de células termo competentes.....	41
1.4.7. Análises dos produtos de PCR em gel de agarose.....	42
1.4.8. Clonagem dos produtos de PCR em plasmídeo pGEM-T EASY	42

1.4.9. Transformação bacteriana.....	43
1.4.10. Seleção de bactérias recombinantes.....	44
1.4.11. Protocolo de Isolamento plasmidial.....	44
1.4.12. Quantificação de DNA plasmidial.....	45
1.4.13. Digestão e sub-clonagem dos plasmídeos pGEM-T EASY e pET28a.....	45
1.4.14. Expressão heteróloga em <i>E. coli</i> Rosetta.....	47
1.4.15. Extração proteica de <i>E.coli</i>	48
1.4.16. Purificação da proteína heteróloga por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de níquel.....	49
1.4.17. Expressão heteróloga em baculovírus (Bac to Bac).....	50
1.4.18. Expressão de proteína de <i>T.cruzi</i> em células de mamífero (HeLa).....	54
1.4.19. Análises de proteínas em eletroforese desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	57
1.4.20. <i>Western Blot</i>	57
1.4.21. Amostras de soro.....	58
1.4.22. ELISA.....	58
1.4.23. Análises estatísticas.....	59
1.5. Resultados.....	59
1.6. Discussão.....	75
1.7. Conclusão.....	78

Capítulo II-Efeito da metcaspase e cruzipaína na expressão de genes ligados à apoptose e autofagia	79
2.1.1. Apoptose	82
2.1.2 Necrose e Necroptose	84
2.1.3 Autofagia	87
2.1.4 <i>Trypanosoma cruzi</i> vs apoptose e autofagia	89
2.2. JUSTIFICATIVA	92
2.3. OBJETIVO	93
2.4. Material e Métodos	94
2.4.1. Desenhos dos iniciadores.....	94
2.4.2. Isolamento do RNA (método Trizol® (Invitrogen))	94
2.4.3. Síntese da primeira cadeia de cDNA (GoScript™ Reverse Transcription System)	95
2.4.4 Teste de validação dos primers para qPCR	96
2.4.5. PCR em tempo real (qPCR).....	96
2.4.6 Análises estatísticas	97
2.5. Resultados e Discussão.....	97
2.6. Conclusão.....	102
3. Referências Bibliográficas	103
4. ANEXO A- Meios, soluções e tampões	121
5. ANEXO B- Predição de epitopo da GFP.....	125

6. ANEXO C-Sequencias completas dos genes alvos	126
7. ANEXO D-TABELAS DA PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS DE CÉLULAS B	128
8. ANEXO E- SEQUÊNCIAMENTO	130
9. ANEXO F- PERFIL DE HIDROFOBICIDADE PRODUZIDO PELA ESCALA DE KYTE & DOOLITTLE	133
10. ANEXO G- PEPTIDEO SINAL.....	134

**CAPITULO I- POTENCIAL IMUNOGÊNICO DA METACASPASE-3 E
CRUZIPAINA EM PACIENTES CHAGÁSICOS**

Resumo

A doença de Chagas (DC) ou Tripanossomíase americana é uma doença negligenciada que afeta cerca de 8 milhões de pessoas no mundo, sendo um milhão somente no Brasil. Os diagnósticos laboratoriais da DC em pacientes na fase aguda são realizados através de testes parasitológicos diretos, enquanto em pacientes crônicos, devido à baixa parasitemia, dependem de testes sorológicos. Recentemente um grupo de trabalho, através de metodologias de proteômica e espectrometria de massas, identificou proteínas secretadas/excretadas ou localizadas na superfície das formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*. Desse trabalho foram selecionadas duas proteínas: a metacaspase-3 e a cruzipaína. O objetivo deste trabalho foi avaliá-las em testes sorológicos (ELISA) contra soros de pacientes crônicos da DC. Para isto, foram realizadas expressões heterólogas em 3 sistemas diferentes: bactéria, baculovírus e células de mamífero. Foram produzidas predições de epítomos para células B e de similaridade com *Leishmania infantum*, *Leishmania brasiliensis* e *T. rangeli*. Somente a metacaspase-3 foi obtida nos três sistemas de expressão, a cruzipaína só foi expressa em células de mamíferos. Nas avaliações por ELISA, a metacaspase-3 expressa em *E. coli*, apresentou níveis de IgGs mais elevados em pacientes crônicos do que em pacientes com sorologia negativa. Pacientes com os quadros clínicos indeterminados e cardíacos também diferiram do grupo negativo. A metacaspase-3 expressa em baculovírus também mostrou diferença, no entanto só pacientes com a forma digestiva apresentaram níveis de IgGs maiores do que pacientes negativos. Nos ensaios de ELISA com as proteínas expressas em células HeLa os soros dos pacientes crônicos reagiram às proteínas metacaspase-3, cruzipaína e GFP (controle negativo), sendo que os grupos indeterminado e digestivo, testados com a cruzipaína, mostraram diferenças significativas em relação ao negativo. No grupo testado com metacaspase-3 somente a forma mista não mostrou diferença significativa. Também foi observada uma reação imunogênica do controle GFP. Testes sorológicos que possam diferenciar pacientes pelas manifestações clínicas podem abrir novas expectativas nos tratamentos de pacientes chagásicos, principalmente aqueles com a forma indeterminada. Dessa forma as proteínas aqui testadas apresentaram um perfil de um diagnóstico diferencial. Porém estudos mais aprofundados sobre as eficácias para exames sorológicos são necessários.

Palavras-chaves: ELISA. Metacaspase-3. Cruzipaína. Baculovírus. doença de Chagas.

Abstract

Chagas disease (CD) or American Trypanosomiasis is a neglected disease that affects about 8 million people worldwide. The diagnoses of CD in patients in the acute phase are performed through direct parasitological tests, whereas in chronic patients, due to the low parasitemia, they depend on serological tests such as the ELISA test. Recently a working group, through proteomics and mass spectrometry methodologies, identified proteins secreted/excreted or located on the surface of trypomastigote and amastigote forms of *T. cruzi*. From this study were selected two proteins: metacaspase-3 and cruzipain. The objective of the present study was to evaluate them in serological tests (ELISA) against blood samples from chronic patients with CD. For this, heterologous expressions were performed in 3 different systems: bacterium, baculovirus, and mammalian cells. Predictions of B cell epitopes and of similarity with *Leishmania infantum*, *Leishmania brasiliensis* and *T. rangeli* were performed. Only metacaspase-3 was obtained in all three expression systems, cruzipain was only expressed in mammalian cells. In the ELISA evaluations, the metacaspase-3 expressed in *E. coli* presented higher IgGs levels in chronic patients than patients with negative serology and patients with Indeterminate and Cardiac also differed from the negative group. Metacapse 3 expressed in baculovirus also showed a difference; however, only patients with the digestive form showed higher IgGs levels than negative patients. In the ELISA assays with proteins expressed in HeLa; sera from chronic patients reacted with metacaspase-3, cruzipain and GFP, and the Indeterminate and digestive groups tested with cruzipain showed a significant difference in relation to the negative control. In the group tested with metacaspase-3 only the mixed form showed no significant difference. An immunogenic reaction of the GFP control was also observed. Serological tests that may differentiate patients by clinical manifestations may open new expectations in the treatment of chagasic patients. Thus, the proteins tested here presented profiles of a differential diagnosis. Further studies on the efficacy of serological tests are required.

Keywords: ELISA. Metacaspase-3. Cruzipain. Baculovirus. Chagas disease.

1.1 Introdução

1.1.1. Doença de Chagas

A doença de Chagas (DC) ou Tripanossomíase americana é a infecção causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* descrita há 110 anos por Carlos Justiano Chagas (Figura 1). É uma doença negligenciada que continua sendo um importante problema na saúde pública, afetando principalmente a população pobre dos países endêmicos (Molina, 2018). Estima-se que na América Latina, a DC leve à perda de aproximadamente US\$ 1.2 bilhões à economia devido aos afastamentos do trabalho para tratamento ou morte, e o impacto na saúde é da ordem de cerca de US\$ 46 milhões com pacientes (Molina, 2018).

Lee e colaboradores (Lee et al, 2013) desenvolveram um modelo de simulação para estimar os custos da morbidade na economia regional e global anual da DC a partir da perspectiva social dos países, esse modelo mostrou que na América Latina, os maiores custos anuais com a DC estavam no Brasil (US\$ 1,760 bilhões) seguido pela Argentina (US\$ 1,462 bilhões) e México (US\$ 1,01 bilhões). Nos EUA a perda foi de US\$ 860 milhões enquanto na Europa, a Espanha teve o custo mais elevado, US\$ 780 milhões, em comparação com outros países (Lee et al, 2013). Esses dados mostram a importância da implementação de políticas públicas de saúde para diminuição da morbidade da DC.



Figura 1: Carlos Justiniano Ribeiro Chagas (1879-1934).

Disponível em: https://pt.wikipedia.org/wiki/Carlos_Chagas Acesso em Julho de 2019.

1.1.2. Epidemiologia da doença de Chagas

A DC é endêmica em países latino americanos, sua abrangência vai do sul dos EUA até o norte de Argentina e Chile (Molina, 2018). Estima-se em 7 milhões o número de pessoas infectadas por *Trypanosoma cruzi* em todo o mundo (WHO, 2019). Sendo que deste quantitativo pelo menos um milhão encontra-se no Brasil segundo o Ministério da Saúde (2019), causando a incapacidade dos indivíduos infectados e levando ao óbito 10 mil pessoas por ano.

A presença da DC fora da América Latina deve-se a um conjunto de fatores como a mobilidade de latinos americanos para Europa, de europeus que retornam da América Latina e até mesmo entre crianças adotadas (WHO, 2019). A transmissão subsequente (autóctone) decorre principalmente de transfusão de sangue, transmissão congênita, transplantes de órgãos e acidentes de laboratório. O número de casos da DC nos países endêmicos é mais alto na Bolívia (6,1 casos por 100 habitantes), Argentina (3,6 casos por 100 habitantes), Paraguai (2,1 casos por 100 habitantes), Equador (1,4 casos por 100 habitantes), El Salvador (1,3 casos por 100 habitantes) e Guatemala (1,2 casos por 100 habitantes). Nos EUA, ciclos enzoóticos de transmissão do *T. cruzi* são estabelecidos em áreas dos estados do sul, embora apenas algumas infecções autóctones foram relatadas. Calcula-se que existam 300.000 infectados nos EUA advindos de diversas partes da América Latina (Molina, 2018).

Por décadas, a DC foi uma doença estritamente confinada às áreas rurais, onde a transmissão vetorial é a principal rota de contágio, todavia, as mudanças socioeconômicas, a migração rural, o desmatamento e a urbanização transformaram o perfil epidemiológico da doença, tornando-a em um fenômeno mais urbano e peri-urbano (WHO, 2019). Essas alterações no quadro epidemiológico da DC no Brasil, promoveram novas formas de transmissão além da vetorial, como por exemplo a transmissão por via oral. A ocorrência de casos e surtos por transmissão oral pela ingestão de alimentos contaminados (caldo de cana, açaí, carne de caça entre outros), deve-se ao estabelecimento vetorial domiciliar sem colonização, principalmente na Amazônia Legal onde há a manipulação de alimentos

tradicionais, como o açaí, mostrando a versatilidade de transmissão da DC (Nóbrega et al., 2009, Shikanai-yasuda & Carvalho, 2012; Santos et al., 2018).

Entre o período de 2008 a 2017, foram registrados 2174 casos confirmados de DC aguda na maioria dos estados brasileiros. Sendo, a maior distribuição cerca de 95%, concentrado na região Norte. Destes, o estado do Pará é responsável por 83% dos casos. Em relação às principais formas prováveis de transmissão ocorridas no país, 72% foram por transmissão oral, 9% por transmissão vetorial e em 18% não foi identificada a forma de transmissão segundo dados do Ministério da Saúde (2019).

1.4. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* e principais vetores

O *T. cruzi* é um protozoário que apresenta ciclo heteroxênico que se caracteriza pela alternância entre hospedeiros invertebrado e vertebrado. O estágio em hospedeiros vertebrado inclui as formas sanguínea tripomastigota e a intracelular amastigota, enquanto que nos invertebrados têm as formas replicativa epimastigota e a metacíclica tripomastigota (Guarner, 2019).

As diferentes linhagens de *T. cruzi* são classificadas em 7 unidades discretas de tipagem (Discrete Typing Units-DTUs) TcI a TcVI, e a recente TcBat segundo Lima, 2014. Essas unidades são amplamente distribuídas nos biomas brasileiro e na América Latina. Apesar de análises por espectrometria de massas mostrar diferenças entre as DTUs (de Oliveira et al, 2018) e haver uma alta diversidade genética entre elas, há grandes similaridades na patogenicidade e resistência aos tratamentos (Guarner,2019; Lima,2014).

O *T. cruzi* é um parasita bastante diversificado, sendo transmitido em uma rede parasitária bem definida: o ciclo silvestre e sinantrópicos, em que a transmissão do parasita ocorre entre animais silvestres, incluindo a grande diversidade de triatomíneos e várias espécies de mamíferos, e o ciclo doméstico, em que animais domésticos, humanos e triatomíneos peri-domicílio (Araújo *et al.*, 2009).

Os vetores da DC são hemípteros hematófagos, com exceção ao gênero *Linshcosteus* e do *Triatoma rubrofasciata*, são encontrados em vasta área do continente americano, desde o sul dos Estados Unidos da América e norte do México até a Argentina e

Chile, fazendo parte da subfamília Triatominae (Hemíptera, Família Reduviidae) como as espécies *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius prolixus* e *Rhodnius pallescens* (Grayson, 2010; Dias, 2016; Rabelo et al., 1998). Várias espécies de animais podem ser infectadas pela forma tripomastigota de *T. cruzi* servindo assim como hospedeiros reservatórios deste protozoário (Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012). Acrescenta-se a isso, o trabalho de Mesa-Arciniegas et al., 2018 que relatou a infecção natural de cachorros por *T. cruzi* em área rural e peri-domicílio, e devido a mobilidade rural e urbana esses animais podem contribuir ainda mais para a transmissão da DC nessas áreas. Enquanto que em áreas na fronteira do México com Arizona (EUA) a soropositividade em cães é de 4,4%, nas áreas rurais brasileiras a soropositividade atinge 11% (Guarner, 2019).

Insetos triatomíneos são encontrados em muitas áreas da América do Sul e Central, bem como partes da América do Norte. No passado, o contato de pessoas com o vetor era mais frequentemente observado nas comunidades rurais, onde as casas têm telhados de sapé ou pau a pique (Figura 2), contudo esse cenário tem mudado devido as migrações e ações já citadas.

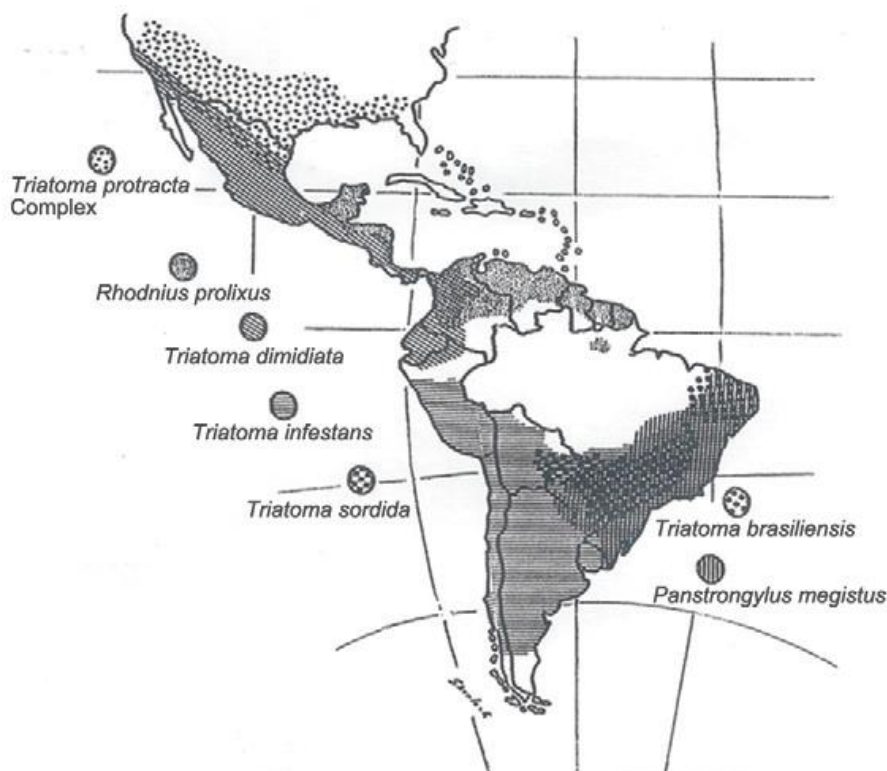


Figura 2: Distribuição dos principais vetores invertebrados da doença de Chagas no continente americano. (Figura adaptada de Coura, 2015).

Com o controle nas últimas décadas da transmissão vetorial nas regiões endêmicas para a DC no Brasil, as populações de *T. infestans* foram reduzidas com sucesso, e com isso o *Triatoma brasiliensis* tornou-se um dos mais importantes vetores de *T. cruzi* nas áreas semiáridas, do Nordeste, assim como em outros nove estados do Brasil (Guarneri et al. 2000; Panzera et al. 2000; Molina, 2018). A distribuição geográfica do gênero *Panstrongylus* (por exemplo, *P. megistus*) é mais esporádico, com remanescentes de populações encontradas principalmente em Pernambuco e Alagoas (Dias et al. 2000). A região amazônica, no entanto, tem tomado a atenção com os últimos surtos da DC com infecção por via oral muitas vezes associados à triatomas do gênero *Rhodnius* (Araújo, 2009). Isso se deve ao progressivo crescimento da população nessa região cujo ambiente natural é continuamente alterado pelas atividades humanas e soma-se a isso, o crescente comportamento sinantrópico de animais silvestres, como Gambá comum (*D. marsupialis*), Tamanduá-mirim (*Tamanduá tetradactyla*) e Macaco-de-cheiro ou Boca-preta (*Saimiri sciureus*), sendo muitos desses reservatórios naturais de *T. cruzi* (Coura, 2015)(Figura 3).

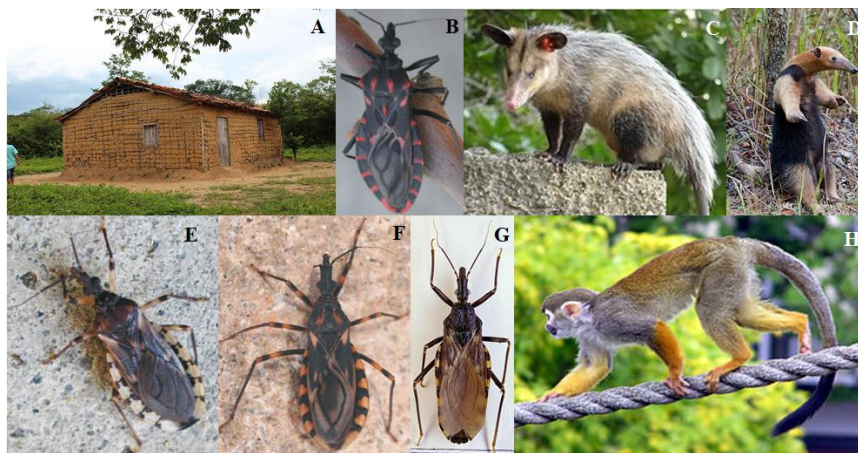


Figura 3: Moradia rustica, os principais vetores da DC e alguns reservatórios naturais do *T. cruzi*. A) Casa de pau a pique; B) *P. megistus*; C) Gambá comum (*D. Marsupialis*); D) Tamanduá-mirim (*Tamanduá tetradactyla*); E) *T. Sordida*; F) *T. brasiliensis*; G) *Triatoma infestans*; H) Macoco-de-cheiro ou Boca-preta (*Saimiri sciureus*). Acessos disponíveis em 16/06/2019: https://pt.wikipedia.org/wiki/Pau_a_pique; <https://pt.wikipedia.org/wiki/Gambá-comum>; <https://pt.wikipedia.org/wiki/Tamanduá-mirim>; https://pt.wikipedia.org/wiki/Saimiri_sciureus;

A transmissão de *T. cruzi* via hospedeiro invertebrado ocorre quando triatomíneos infectados excretam o parasito através de suas fezes durante o repasto sanguíneo nos

hospedeiros vertebrados, nos quais pode se incluir o homem. Parasitos presentes nas fezes podem atingir a corrente sanguínea humana através de lesões na pele, ou ainda penetrar através de mucosas, mesmo que íntegras (Figura 4).

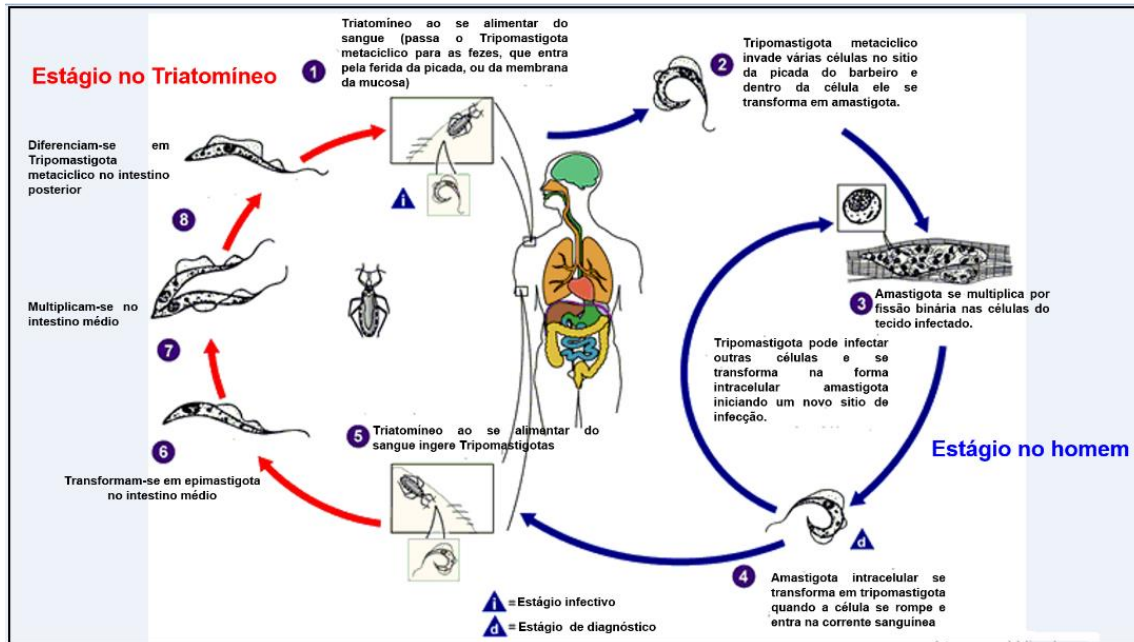


Figura 4: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Figura adaptada disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>. Acesso em Abril de 2018.

No Brasil e em outros países da América Latina, programas multicêntricos para o controle da transmissão vetorial, iniciados a partir das décadas de 1960 e 1970, assim como a implantação progressiva de programas de controle de bancos de sangue na década de 1980, como o enfretamento da epidemia de HIV com o alargamento da oferta de exames sorológicos, conseguiram reduzir em até 70% o número de novas pessoas infectadas com DC (Dias & Schofield, 1999; Dias et al, 2002; Grayson, 2010; Dias & Amato-Neto, 2011; Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012; Simões, 2018).

1.1.3. Manifestações Clínicas

A lesão inicial formada pela entrada do *T.cruzi*, é caracterizada pela reação inflamatória, que algumas vezes pode passar despercebida, forma uma tumoração cutânea

chamada de **Chagoma** ou quando localizada na face perto dos olhos **sinal de Romanã** (Figura 5) (Guarner et al., 2019). As manifestações da infecção podem apresentar três fases: a aguda, indeterminada e crônica. Na infecção aguda, é tipicamente assintomática mas quando sintomática, o paciente apresenta febre alta, mal-estar, aumento do fígado, baço e gânglios linfáticos, enquanto em pacientes infectados por via oral, podem ter náuseas e vômitos, diarreia, icterícia, dor abdominal e hemorragia gastrointestinal. Menos de 1% dos pacientes na fase aguda infectados com a forma vetorial de transmissão evoluirá para as formas severas como miocardite e a meningoencefalite levando ao óbito, sendo a maior frequência entre as crianças. Nos casos de pacientes infectados por via oral, 60% dos relatos desenvolveram a forma aguda devida a alta carga parasitária, a taxa de mortalidade nesses casos chegaram em até 20% (Kirchhoff, 1996; Fujita et al., 2019; Xavier et al., 2014). Após esta fase aguda, o paciente entra na fase indeterminada que é caracterizada pela forma crônica assintomática da infecção e soropositividade para *T.cruzi*. Pelo menos de 50-70% dos pacientes crônicos permanecerão na fase indeterminada por toda vida sem apresentar qualquer alteração cardíaca ou digestiva (Molina., 2018). Pacientes classificados como indeterminados podem apresentar alguma alteração a longo prazo, manifestações que geralmente aparecem depois de 10 a 20 anos (Molina., 2018; Guarner et al., 2019). Desses pacientes indeterminados, de 14 a 45% apresentará a alteração **cardíaca** da infecção e com isso, desenvolverá insuficiência cardíaca, arritmias, e tromboembolismo. Finalmente, 10 a 20% dos casos apresentarão alterações **digestivas** incluindo megaesôfago e megacólon. Enquanto que a forma **mista** corresponde à evolução mais rara de 5 a 20% dos pacientes (Molina, 2018).

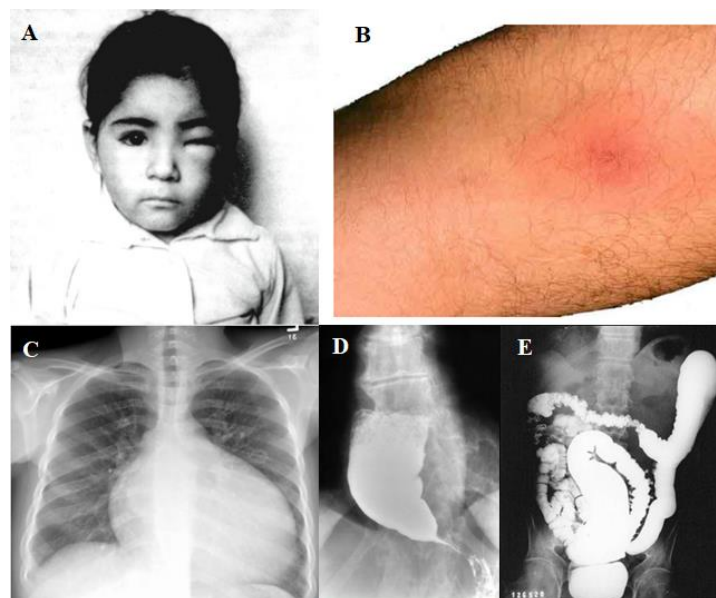


Figura 5: Demonstração das lesões iniciais e manifestações clínicas da DC. A) Sinal de Romanã (Rey, 2002); B) Chagoma; C) Cardiomegalia; D) Digestiva; E) Mista. Acessos disponíveis em 16/06/2019: https://www.researchgate.net/figure/Inoculationchagoma_fig4_11014346; <http://lamoreabio2.blogspot.com/2014/04/radiografia-de-torax-cardiomegalia.html>; <https://www.misodor.com/MEGAESOFAGO%20CHAGASICO.html>; https://www.cdc.gov/parasites/cme/chagas/lesson_2/19.html.

1.1.4. Diagnóstico

O diagnóstico mais adequado depende do estágio clínico da infecção. Na fase aguda, ou na reativação da doença crônica devido a imunossupressão da doença de Chagas, o diagnóstico laboratorial é baseado na observação do parasito presente no sangue dos indivíduos infectados, através de testes parasitológicos diretos como exame de sangue periférico, esfregaço e gota espessa ou outros fluidos corporais, como cerebrospinal segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS). Na infecção congênita, o diagnóstico também pode ser baseado em resultados sorológicos positivos após 8 meses do nascimento (Pérez-Molina, 2018; Antinori et al., 2017). Para aumentar a detecção de tripomastigotas, os métodos de concentração como o micro-hematócrito e o método Strout aumentam a sensibilidade do diagnóstico para mais de 90%, são recomendados no caso de forte suspeita de doença de Chagas aguda e negatividade do teste direto a fresco. Principalmente quando os sintomas persistem por mais de 30 dias quando a parasitemia começa a baixar. Caso estes testes sejam negativos, métodos parasitológicos diretos que incluem a PCR, que é mais sensível que a

amplificação *in vitro* (hemocultura e xenodiagnóstico), pode ser utilizado e provou ser muito útil no diagnóstico da transmissão de mãe para filho, onde é mais sensível que as técnicas de concentração (Bua et al., 2013; Murcia et al., 2012; Pérez-Molina, 2018)

Na fase crônica da doença o diagnóstico parasitológico direto torna-se comprometido devido a parasitemia baixa. Os métodos parasitológicos indiretos (xenodiagnóstico – ou hemocultivo) que podem ser utilizados, porém apresentam baixa sensibilidade (20-50%). Métodos diagnósticos como a PCR, também não são tão confiáveis nessa fase, cuja sensibilidade varia de 50% a 90%, enquanto na Europa relatam-se menores sensibilidades (28% a 68%) em pacientes crônicos de DC (Pérez-Molina, 2018; Antinori et al., 2017). Devido a baixa parasitemia, a técnica pode produzir resultados falsamente negativos em pacientes crônicos de DC. Todavia o seu uso pode ser bastante útil para monitorar a resposta terapêutica do benznidazol ou nifurtimox nesses pacientes, ou o tratamento de pacientes imunossuprimidos, até mesmo para confirmar resultados sorológicos quando estes são inconclusivos (Antinori et al., 2017 Pérez-Molina, 2018).

Diagnóstico de infecção crônica, portanto, depende de testes sorológicos através da detecção de anticorpos (OMS). Esses testes sorológicos são baseados em antígenos parasitários e extratos purificados (testes convencionais) e em antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos (testes não convencionais). Os testes mais comuns são o ensaio fluorescente indireto, hemaglutinação indireta, e ELISA (Pérez-Molina, 2018). A detecção de anticorpos IgG é o método de escolha para o diagnóstico de pacientes crônicos, enquanto em pacientes com sintomas da fase aguda buscam-se a detecção de anticorpos IgM. Durante surtos de doença adquirida por via oral, no entanto, anticorpos IgM e IgG contra *T. cruzi* têm sido usado. Contudo apenas um teste sorológico não é suficiente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda dois métodos diferentes ou a detecção de anticorpos para diferentes antígenos inteiros ou recombinantes para a confirmação (Antinori et al., 2017; Guarner, 2019).

Teste de última geração que detecta anticorpos séricos por quimiluminescência dirigido contra uma mistura de antígenos recombinantes de *T. cruzi* (Abbott ARCHITECT Chagas) com sensibilidade de 100% e especificidade de 97,6% tem demonstrado ser muito promissor, embora continue havendo reatividade cruzada com amostras de pacientes com leishmaniose (Abras et al., 2016; Antinori et al., 2017; Guarner, 2019).

1.1.5. Potenciais alvos a serem estudados

Recentemente foram concluídos dois projetos no departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília, nos quais, através de metodologias de proteômica e espectrometria de massas, foram identificadas proteínas secretadas/excretadas ou localizadas na superfície das formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* (Queiroz RML, 2013; Machado MO, 2013). Dois grupos se destacaram dentre as diferentes proteínas identificadas, um grupo composto por proteínas com funções catalíticas ainda desconhecidas sem anotações em bancos de dados e outro grupo de proteínas conhecidamente localizadas na membrana plasmática devido à presença de regiões e sequências peptídicas características. Foram identificadas proteínas exclusivas da forma tripomastigota e outras proteínas exclusivas da forma amastigota, assim como, proteínas presentes em ambas as formas do parasito.

A cruzipaina é uma cisteína peptidase do *T. cruzi*, constituída por um domínio catalítico N-terminal semelhante à papaína e outro C-terminal altamente manoseglicosilada, conhecido por ser imunogênico (CAMPO et al., 2016; Ferrão et al., 2015). A cruzipaina é expressa em todos os estágios do ciclo de vida do *T. cruzi*, sendo mais abundante nas formas replicantes, especialmente, no estágio epimastigota do inseto (Ferrão et al., 2015). Em relação às epimastigotas, a cruzipaina é localizada em organelas semelhantes a lisossomos designadas reservossomas. Nos tripomastigotas, localiza-se próximo ao bolso flagelar, e no amastigota intracelular é deslocado para a superfície da célula, onde provavelmente funciona em contato com o citoplasma da célula hospedeira (CAMPO et al., 2016). A cruzipaina também tem papel essencial na fuga do *T. cruzi* dos fagolisossomos, evitando a sua destruição por macrófagos, bem como na invasão de parasitas em células não fagocíticas (CAMPO et al., 2016). Estudos mostram também uma possível função moduladora desempenhada pela cruzipaina na expressão de citocinas, como o TGF- β , IL12, IFN- γ e na resposta humoral, fazendo com que a cruzipain seja um dos mais proeminentes alvos do *T. cruzi* para o desenvolvimento de drogas para DC devido à sua ampla gama de envolvimento na biologia do parasita (Ferrão et al., 2015).

Assim como a cruzipaina, a metacaspase-3 é uma cisteína peptidase com similaridade estrutural a caspases com uma díade de cisteína-histidina catalítica. A caspases e

metacaspase-3s são membros da família C14, clã CD, com prováveis diferenças na especificidade do substrato (Meslin et al., 2011). O *T. cruzi* não possui codificação de genes para caspases, mas tem dois genes ativos homólogos: metacaspase-3 (TcMCA3) e metacaspase-3-5 (TcMCA5) (De Castro et al., 2017). O TcMCA3, presente em 16 cópias, e o TcMCA5, em cópia única. A proteína TcMCA3 é expressa nos quatro principais estágios de desenvolvimento do parasita (epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos, tripomastigotas e amastigotas celulares), enquanto o TcMCA5 é expresso apenas em epimastigotas (Kosecet al., 2006). Ambas as metacaspase-3s estavam localizadas no citoplasma das epimastigotas em cultura; entretanto, sua translocação para o núcleo foi detectada após a indução da morte celular programada dos parasitas com soro humano fresco, o que sugere uma função nuclear. Além disso, a super-expressão de TcMCA5 em epimastigotas produziu um aumento na sensibilidade desses parasitas à indução de morte celular com soro humano, quando comparados com parasitas que expressaram a proteína em níveis fisiológicos (Kosecet al., 2006). Esses resultados são evidências indiretas do possível papel das metacaspase-3s do *T. cruzi* na morte celular programada (González, 2009). Embora informações interessantes tenham sido obtidas sobre semelhanças entre as metacaspase-3s de *T. cruzi* e as famílias de caspases, dados sobre o seu potencial imunogênico ainda são escassos.

1.2. Justificativa

O uso da expressão heteróloga ainda é o meio mais eficiente de produzir novos antígenos para testes sorológicos no diagnóstico da doença de Chagas. Proteínas secretadas e superficiais do *T.cruzi* são os principais alvos como potenciais antígenos. Uma característica dessas proteínas é a alta taxa de modificações pós-traducionais como glicosilações e acilações. O uso de sistemas de expressão eucarióticos como o baculovírus em células de insetos tem despontado como promissor, para geração de antígenos recombinantes com modificações pós-traducionais. Outros sistemas de expressão heteróloga tradicionais como bactérias ainda são muito utilizados para o desenvolvimento de terapias quimioterápicas ou vacinais para combater a doença de Chagas e outras doenças infecto-contagiosas. A obtenção de métodos mais sensíveis e específicos para o diagnóstico desta enfermidade que afeta o país e compromete não apenas a saúde pública, mas também a economia do Brasil, representará uma perspectiva de melhoria no tratamento da doença de Chagas e, portanto, da expectativa e qualidade de vida da nossa população.

1.3. OBJETIVO

Avaliar o potencial da metacaspase-3 e cruzipaina de *Trypanosoma cruzi*, para o uso em testes sorológicos em pacientes chagásicos crônicos.

Objetivos Específicos

1. Realizar as análises *in silico* das sequências de DNA e aminoácidos da metacaspase-3 e cruzipaina;
2. Realizar a clonagem heteróloga dos genes em sistemas de expressão em bactéria, baculovírus e células de mamífero;
3. Purificar as proteínas recombinantes ou usar os extratos totais nos ensaios;
4. Comparar a imunogenicidade das proteínas recombinantes produzidas pelos três sistemas de expressão em ensaios de ELISA com soros de humanos com doença de Chagas.

1.4. Material e métodos

1.4.3. Análise *in silico* dos genes

Foram avaliados o potencial imunogênico e a similaridade entre a metacaspase-3 (Xm_799145.1) e cruzipaina (Xm_815803.1) com resíduos de aminoácidos de outros tripanosomatídeos (*Leishmania brasiliensis*, *L.infantum*, *Trypanosoma rangeli*) e mamíferos (*Homo sapiens*, *Mus musculus*). Para a predição dos epítomos lineares de células B foi utilizado a ferramenta online BepiPred (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>) que prevê epítomos em sequência de proteínas por meio de algoritmo de floresta aleatório que analisa estruturas de epítomos e não-epítomos de proteínas já cristalizadas, que resulta em uma sequência predita mais refinada. Enquanto que para o alinhamento das sequências de aminoácidos foi utilizada as ferramentas ESPrpt, 'Easy Sequencing in PostScript' (<http://esprpt.ibcp.fr/ESPrpt/ESPrpt/>), que é um programa que processa as semelhanças das sequências e as informações de estrutura secundária alinhadas (Robert, X. and Gouet, P, 2014).

1.4.4. Desenhos dos iniciadores

Para amplificação dos genes alvos, foram construídos primers com base nas sequências depositadas no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), cujos os números de acesso encontram-se nas tabelas abaixo. O primer complementar reverso foi construído com o web site (<http://arep.med.harvard.edu/labgc/adnan/>) e os sítios das enzimas de restrição criados depois das análises com a ferramenta online NEBcutter V2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) e para a análise dos parâmetros foi utilizado o web software OligoAnalyzer 3.1 (<http://www.idtdna.com/calc/analyzer>).

Tabela 1: Iniciadores utilizados para a amplificação dos genes do genoma do *T. cruzi*.

GENE	N. de acesso	Sequência(5'-3')	N	Tm	ENZ	GC%
Metacaspase(F)	Xm_799145.1	AGATCT ATGGGCTTTGATTTGGC	24	55.7	BglII	41.7
Metacaspase(R)	Xm_799145.1	GGTACC TGTGGCGACGGCTGGATC	24	65.5	KpnI	66.7
Cruzipaina (F)	XM_815803.1	AGATCT ATGTCTGGCTGGGCGCGT	24	64.2	BglII	58.3
Cruzipaina (R)	XM_815803.1	GGTACC CGAAGCGCAGGGCGCGG	24	72.2	KpnI	79.2

**O destaque em vermelho representa os sítios das enzimas de restrição

Tabela 2: Iniciadores utilizados para a amplificação dos genes e clonagem em pGEM-T-Easy e pFastBAC

GENE	N. de acesso	Sequência(5'-3')	N	Tm	ENZ	CG%
METACASPASE(F)	Xm_799145.1	CC ATGGGCTTTGATTTGGC	20	55,3	NCOI	50
METACASPASE(R)	Xm_799145.1	CCATGGTCTGCCCTCAAT TGTGGCGACG	36	70,3	NCOI	61
(PROTEASE)	1	GCTGGATC				
METACASPASE(R)	Xm_799145.1	CCATGGT CA T TGTGGCGACGGCTGGATC	27	66,6	NCOI	63
(STOP CODON)	1					

**O destaque em vermelho representa os sítios das enzimas de restrição, em verde o sítio de protease e em azul o stop códon

1.4.5. PCR-Reação em cadeia da polimerase

Para amplificação dos genes alvos para a clonagem, foram realizadas reações em cadeia da polimerase a partir do DNA genômico de *T. cruzi* CL Brener. As reações constituíram-se em um volume final de 30 µL composto por Tampão 1X; 0,33 µM de cada primer (Tabela 1 e 2), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 2 unidades de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen/Life Technologies) e 10 ng de DNA de *T. cruzi* ou 1 µL de cultura no caso de PCR para confirmação de inserto. As amostras foram amplificadas em um termociclador (Life Touch Bioer) e os parâmetros de amplificação de cada alvo foram:

Metacaspase-3 (tamanho do gene 1078 pb):

1. Pré-desnaturação: 95°C por 5 min;

2. Desnaturação: 95°C por 45 seg;
3. Anelamento: 66°C por 30 seg;
4. Extensão: 72 °C por 2 min;
5. Repetição das etapas de 2 a 4 por 40 vezes;
6. Extensão final: 72 °C por 7 minutos;

Cruzipaina (tamanho do gene 721 pb):

1. Pré-desnaturação: 95°C por 5 min;
2. Desnaturação: 95 °C por 45 seg;
3. Anelamento: 69°C por 30 seg;
4. Extensão: 72 °C por 2 min;
5. Repetição das etapas de 2 a 4 por 40 vezes;
6. Extensão final: 72 °C por 7 minutos

1.4.6. Preparo de células termo competentes

As linhagens bacterianas utilizadas para as transformações foram One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E. coli* e *E. coli* Rosetta pLYss™. O preparo de células dessas linhagens para a transformação foi feito de acordo com o protocolo descrito por Inoue (Sambrook & Russel, 2001). Uma cultura de 25 mL em meio de lisogenia foi mantida em crescimento por 12 horas a 37°C, sob agitação de 180 rpm. Após esse período, volumes de 10 mL, 4 mL e 1 mL dessa cultura foram inoculadas em 150 mL de meio LB e essas foram deixadas sob agitação de 200 rpm a temperatura de 18°C overnight. No dia seguinte, assim que uma dessas culturas atingisse densidade óptica de 0,6 a 600 nm (aferida por espectrofotometria no aparelho Ultrospec 1.000 da Pharmacia Biotec), essa foi transferida para incubação em gelo por 10 minutos. Após isso, a cultura foi centrifugada a 2.500xg por 10 minutos a 4°C. A seguir, o precipitado foi ressuspensão em 48 mL de tampão TB. Após nova centrifugação como descrita acima, o precipitado foi ressuspensão em 12 mL de tampão TB acrescido de DMSO na concentração de 7% do volume final. Finalmente, a solução resultante foi incubada em gelo por 10 minutos e então distribuída em alíquotas para congelamento a -80°C.

1.4.7. Análises dos produtos de PCR em gel de agarose

Os produtos das PCRs, as confirmações de inserto, as extrações de DNA plasmidial e as digestões com enzimas de restrição foram visualizadas em gel de agarose 1% (p/v) com brometo de etídio em concentração de 0,5 µg/mL e tampão SB) 1x.

1.4.8. Clonagem dos produtos de PCR em plasmídeo pGEM-T EASY

Após a obtenção dos produtos de PCR com tamanho esperado, esses foram ligados por ação da enzima T4 DNA ligase à 4°C overnight. As concentrações dos reagentes foram de 50 ng de plasmídeo pGEM-tEASY e 1,5 unidades de enzima T4DNA ligase, em um volume final de 10 µL, contendo tampão de ligação 2x e os amplicons, conforme instruções do fabricante (Promega) (Figura 6).

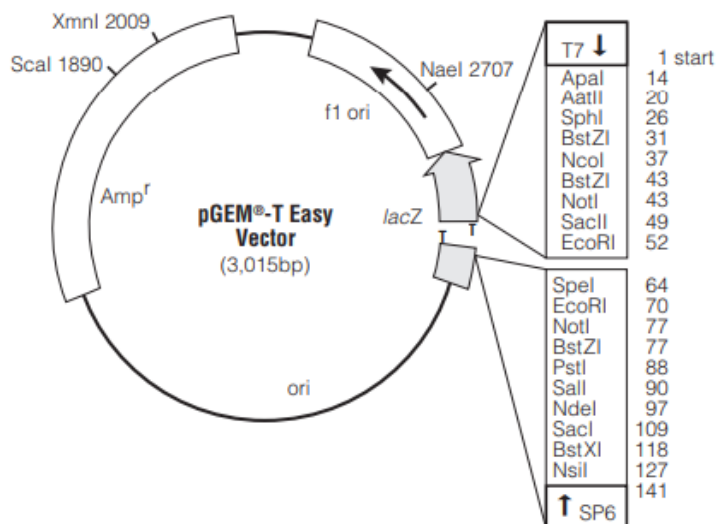


Figura 6: Mapa do plasmídeo pGEM®-T Easy utilizado para a clonagem dos produtos de PCR.

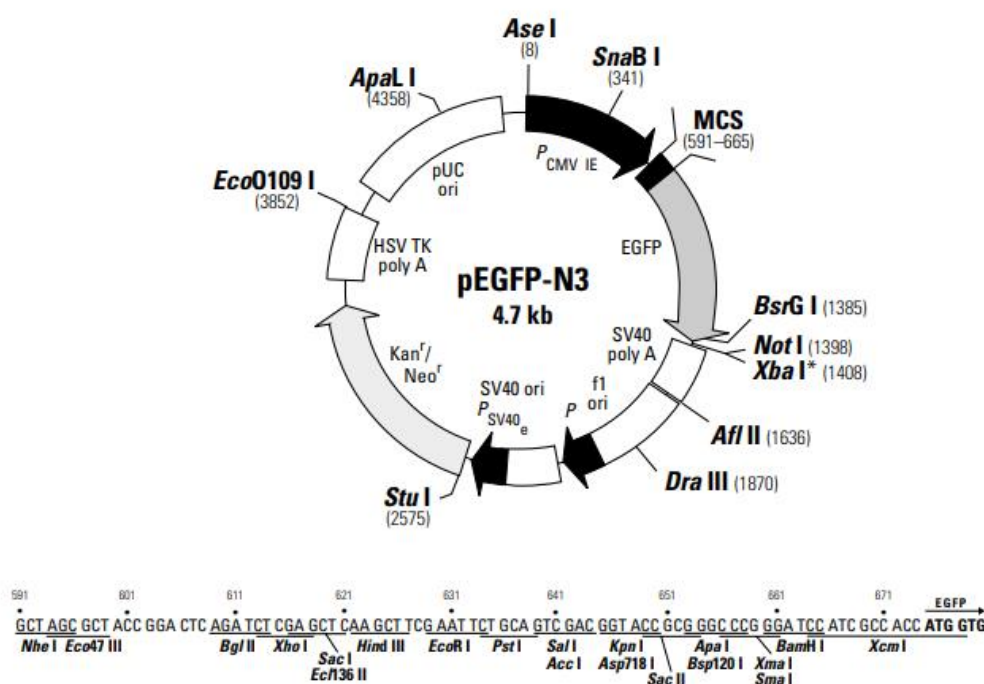


Figura 7: Mapa do plasmídeo pEGFP-N3 utilizado para a expressão em células HeLa.

1.4.9. Transformação bacteriana

A transformação bacteriana foi realizada como descrito por DOYLE & MILES (1996): Para 45 μ L de One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E. coli*, acrescentou-se 5 μ L do produto de ligação entre o inserto e o vetor (pGEM-T Easy ou pET28a ou pEGFP-N3) (Figuras 6, 7 e 8), deixou-se a mistura por 30 min no gelo. Em seguida, os transformantes foram levados ao banho-maria a 42°C por 90 seg e incubados imediatamente em gelo por 5 min. Adicionou-se 250 μ L de meio SOC ao tubo e as células transformadas foram deixadas crescendo no agitador a 37°C por 1 h e 30 min. Após este período, as células foram centrifugadas a 2500xg por 1 min a temperatura ambiente e plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina no caso de transformações com pGEM-T Easy e pEGFP-N3 ou canamicina em pET28a, ou canamicina e clorafenicol para o plaqueamento de pET28a em Rosetta™ 40 μ L de X-gal [20 mg/mL] e 40 μ L de IPTG [100 mM] foram espalhadas nas

placas para a seleção das células resistentes que receberam os insertos nas transformações com pGEM-T Easy. As placas foram mantidas na estufa a 37°C por 24 h.

1.4.10. Seleção de bactérias recombinantes

Para as bactérias transformadas com plasmídeos pGEM-T EASY, foram selecionadas colônias brancas para o repique em meio LB líquido contendo 50 µg/mL de ampicilina. Após esse inóculo, as culturas foram cultivadas sob agitação de 180 rpm a 37°C *overnight*. Após isso, a presença do inserto nas bactérias transformadas foi confirmada por PCR, conforme descrito anteriormente, com 1 µL de cultura no lugar do DNA molde. Para bactérias transformadas com os outros plasmídeos, apenas o cultivo seguido de PCR foi utilizado para confirmação da presença de inserto.

1.4.11. Protocolo de Isolamento plasmidial

As extrações dos plasmídeos pGEM-TEASY, pEGFP-N3 e pET28a com os insertos foram realizadas segundo Ausubel et al (2003) com adaptações. Para isso, a cultura de *E. coli* transformada foi centrifugada a 14.000xg por 1 minuto para a obtenção do pellet em tubo(s) de 1,5 mL e ressuspenso(s) em 100 µL de tampão de ressuspensão com 1% de RNase (5 mg/mL) e acrescentado(s) de 200 µL de tampão de lise e reservado por 5 minutos. Depois foi adicionado 150 µL de tampão de neutralização e em procedendo a mistura em um vórtex por 2 segundos. Após essa etapa, as amostras foram colocadas em repouso no gelo por 5 minutos e centrifugadas logo após esse tempo a 14.000xg por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi coletado em novos tubos 1,5 mL e adicionado 400 µL de clorofórmio gelado a 4°C e agitadas em vórtex por 3 segundos e deixados no gelo por 5 minutos. E posteriormente centrifugadas a 11.000xg por 5 minutos à 4°C, e a fase superior foi coletada em novos tubos nos quais foram adicionados 800 µL de etanol 90% e deixados em repouso a temperatura ambiente por 2 minutos, e imediatamente centrifugados a 14.000xg por 10 minutos a 4°C e logo depois desse passo, o sobrenadante foi removido e o pellet foi lavado,

cuidadosamente sem ressuspendê-lo, com etanol 70% e centrifugado a 14.000xg por 2 minutos, após a lavagem do pellet, os tubos foram deixados para secar a temperatura ambiente e os plasmídeos foram ressuspensos em H₂O milliQ e estocados a 4°C.

1.4.12. Quantificação de DNA plasmidial

As amostras resultantes das preparações de DNA plasmidial e as amostras de DNA submetidas à digestão por enzimas de restrição e purificação foram quantificadas por meio de espectrofotometria, no aparelho NanoDrop LITE®spectrophotometer (Thermo scientific), utilizando 2 µL de amostra.

Após as preparações do DNA e quantificação de seus produtos, esses foram diluídos para uma concentração final de 60 ng/µL, e foram enviados para sequenciamento no centro de genômica de alto desempenho do DF, da Universidade Católica de Brasília, em aparelho Sequence Scanner (Applied Biosystems). Para o sequenciamento pelo método de Sanger, foram utilizados os *primers* T7 (forward) e SP6 (reverse), e na análise do sequenciamento foi utilizado o programa Chromas (<http://www.techneysium.com.au/chromas2.html>). Após a seleção de sequenciamentos cujos cromatogramas não apresentavam mutações do tipo inserção ou deleção, a sequência resultante foi comparada com a sequência depositada no banco de dados NCBI, por meio do programa nBLAST.

1.4.13. Digestão e sub-clonagem dos plasmídeos pGEM-T EASY e pET28a

A princípio os primers da Tabela 1 foram desenhados para a expressão em sistema da *Leishmania tarentolae*, sendo a digestão do pGEM-T Easy para liberação do inserto clonado e a abertura do pLEXSY foram realizadas pelas mesmas enzimas de restrição BgIII e KpnI (Anza™Thermo scientific). De forma a utilizar esse mesmo conjunto de primers da tabela1 para a sub-clonagem em pET28a; o pGEM-T Easy foi digerido com BgIII e NotI para a liberação do inserto enquanto o pET28a foi aberto com BamHI e NotI (Anza™ Thermo

scientific), conforme a Figura 9. Essas digestões foram feitas com aproximadamente 26 µg de DNA plasmidial e 10 unidades de cada enzima, em um volume final de 60 µL, e incubadas a 37°C *overnight* no aparelho termociclador do modelo LifeTouch Bioer. As ligações foram realizadas em proporções molares de 8:1 inserto-plasmídeo para pET28a, de forma que o excesso de insertos em relação aos plasmídeos torne improvável a ligação de plasmídeos sem inserto.

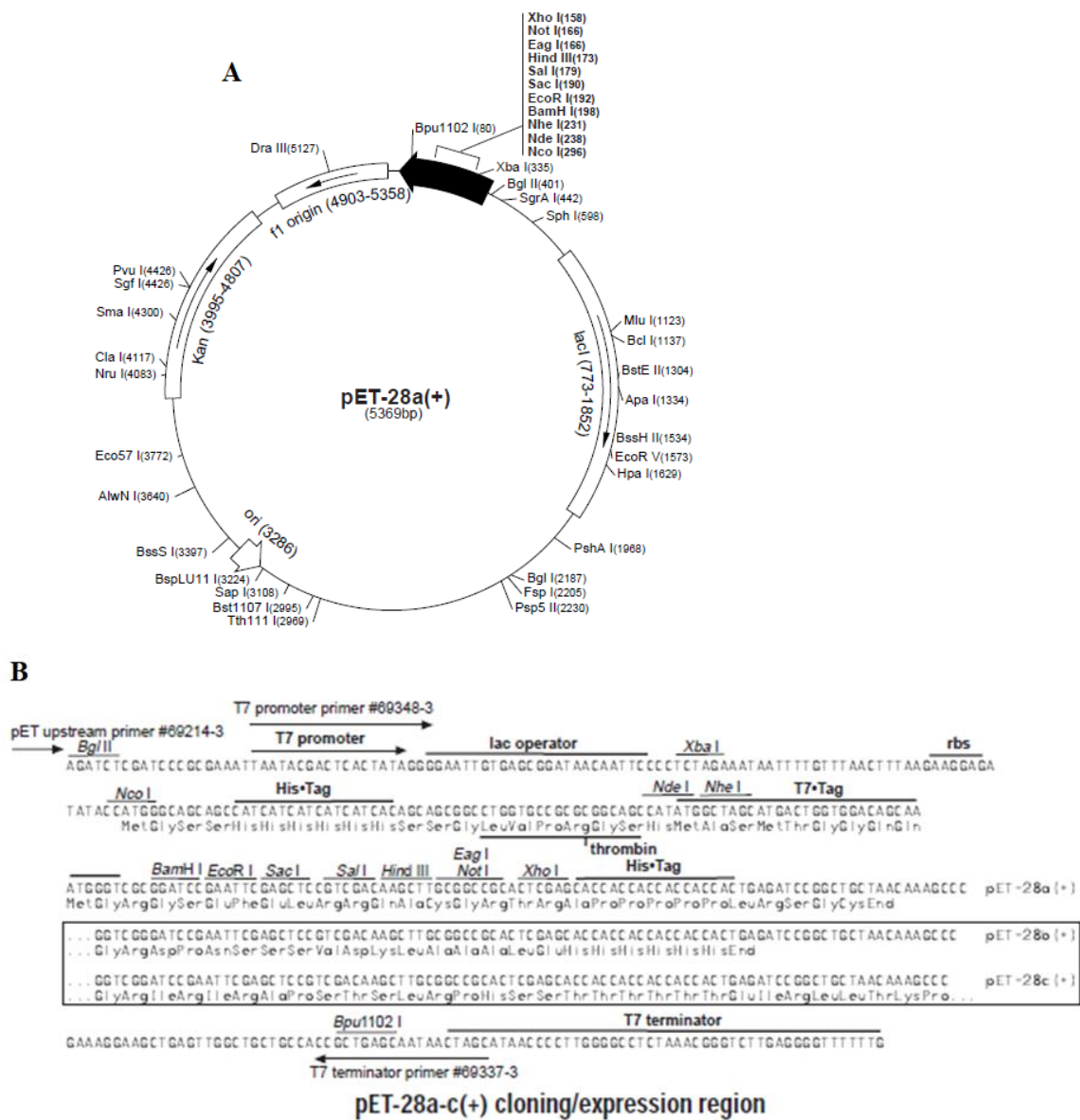


Figura 8: Em A é apresentado o Mapa do pET28a e B Sítio de clonagem disponível para o plasmídeo. Fonte: manual Novagen®.

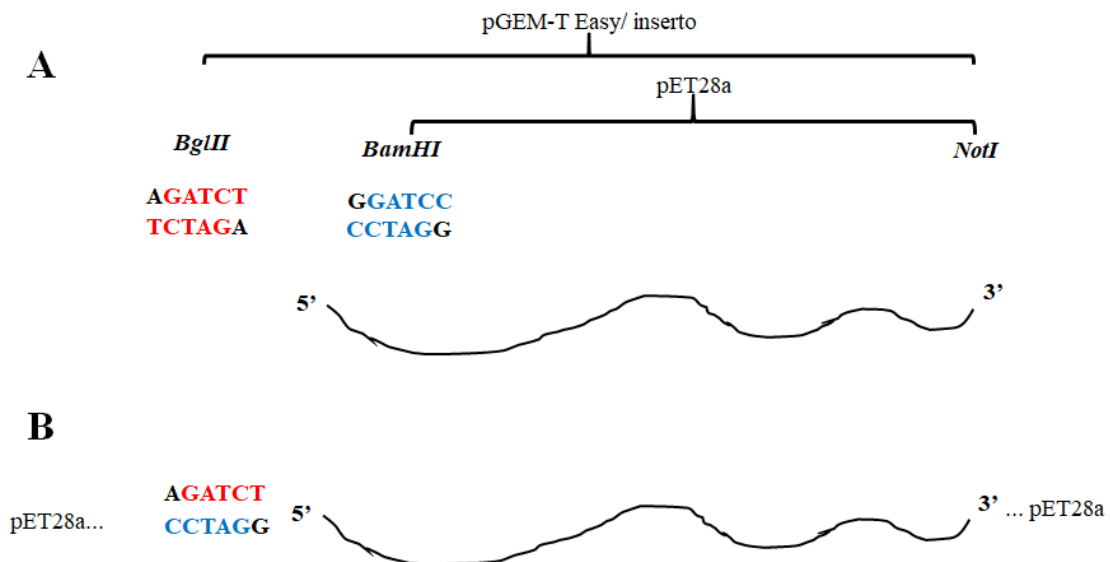


Figura 9: Esquema mostrando a ligação entre as extremidades coesivas criadas pelas enzimas *BglIII* e *BamHI*. Em A o plasmídeo pGEM-T Easy contendo o inserto (Metacaspase-3, Cruzipaina) foi liberado com *BglIII* e *NotI* e o pET28a foi aberto com *BamHI* e *NotI*. Em B é apresentado como a ligação entre as extremidades *BglIII* e *BamHI* foi realizada. Fonte: elaborada pelo autor

1.4.14. Expressão heteróloga em *E. coli* Rosetta

Após a transformação de *E. coli* da cepa Rosetta com plasmídeos pET28a ligados aos insertos, foram cultivadas em meio LB com 35 µg/mL de canamicina e 33 µg/mL de cloranfenicol, mantida a 180 rpm e a 37°C, de 5mL dessas bactérias foi feita como pré-inóculo. Essa cultura foi mantida *overnight* e 1 mL dela foi inoculada em 15 mL de meio LB. Após aproximadamente duas horas, quando atingida a densidade óptica de 0,6 em análise de comprimento de onda de 600 nm, a cultura foi induzida para expressar a proteína, pela adição de 0,5 mM de IPTG. Paralelamente, o mesmo procedimento foi aplicado a uma cultura de *E. coli* Rosetta cujo plasmídeo pET28a não continha inserto, como controle negativo. Após a indução, amostras das culturas correspondentes aos tempos de 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas foram coletadas, para avaliação do melhor tempo de indução para produção da proteína. Essas amostras foram mantidas a -20°C até análise por SDS-PAGE. Após a determinação do tempo ótimo de indução, foi determinada a solubilidade da proteína em meio hidrofílico utilizando o método a seguir.

1.4.15. Extração proteica de *E.coli*

Após a indução de uma cultura de 15 mL com o plasmídeo pET28a com o inserto, conforme descrito acima (1.4.14), durante um período de 3h, a cultura foi centrifugada a 5.000xg por 15 minutos. O pellet de cada uma das alíquotas foi ressuspenso em 10 mL de solução de lise (12,5 mM Na₂HPO₄; 12,5 mM NaH₂PO₄; 0,5M NaCl e 40 mM de Imadazol) e homogeneizado por inversão e, após isso, cada tubo do homogeneizado foi incubado em gelo e sonicado em processador ultrassônico (Biolab) (Figura 10) aplicando amplitude de 90%, com valor mínimo de 40%. Esse processo se deu em três períodos de 30 segundos, intercalados por intervalos de 30 segundos. Depois disso, as amostras foram centrifugadas a 12.000xg por 30 minutos a 4°C para separar os extratos solúveis de insolúveis e o sobrenadante foi coletado e assinalado como extrato de proteínas solúveis em meio aquoso. O precipitado foi ressuspenso em solução de lise, acrescido de 6M de uréia, e então foi coletado e assinalado como extrato de proteínas insolúveis em meio aquoso. Os extratos foram mantidos a -20°C até serem purificados por cromatografia de afinidade.

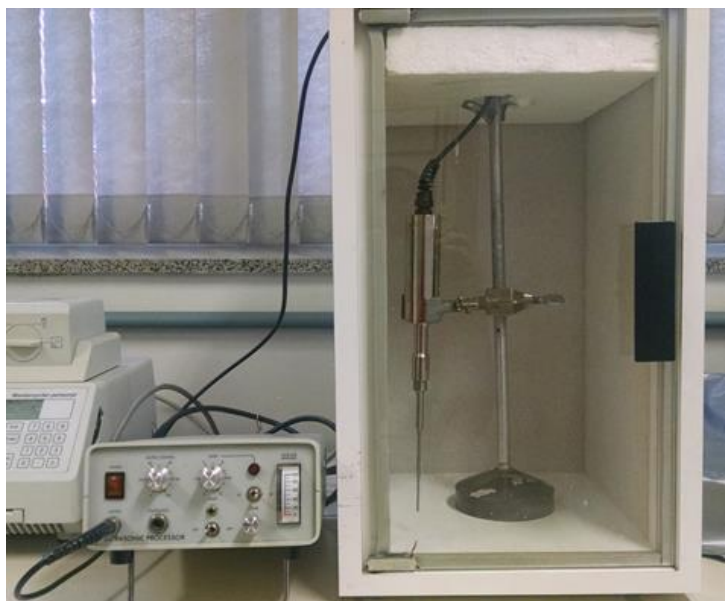


Figura 10: Processador ultrassônico (sonicador). Equipamento utilizado para romper as células para obtenção dos extratos celulares.

1.4.16. Purificação da proteína heteróloga por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de níquel

Para a purificação da proteína, foi utilizado o kit Ni-NTA agarose baseado na cauda de histidina (Qiagen) (Figura 11), conforme instruções do fabricante, com pequenas alterações. O volume de culturas bacterianas utilizadas para a purificação das proteínas foram de 250 mL. Todos os volumes de soluções mencionados a seguir foram aplicados na coluna em partes de 1 mL. A purificação começou com a adição de 1 mL da matriz Ni-NTA agarose em duas minis-coluna de 3 mL, permitindo a passagem do meio aquoso por gravidade. Em seguida, à uma coluna, foi adicionado 2 mL de solução de lise I (12,5 mM Na₂HPO₄; 12,5 mM NaH₂PO₄; 0,5 M NaCl e 10 mM de Imadazol) para purificação da proteína do extrato solúvel e em outra 2 mL de solução de lise II (12,5 mM Na₂HPO₄; 12,5 mM NaH₂PO₄; 0,5 M NaCl; 6M de Uréia e 10 mM de Imadazol) para purificação de proteínas insolúveis em meio aquoso para ativação das colunas. Depois, foi adicionada a amostra proveniente da sonicação da cultura à coluna e coletado a fração não ligada. Posteriormente, as colunas foram lavadas por quatro vezes utilizando 1 mL de solução de lavagem I (12,5 mM Na₂HPO₄; 12,5 mM NaH₂PO₄; 0,5 M NaCl e 40 mM de Imadazol) e solução de lavagem II (12,5 mM Na₂HPO₄; 12,5 mM NaH₂PO₄; 0,5 M NaCl; 6M de Uréia e 40 mM de Imadazol) por vez e os volumes resultantes da lavagem foram coletados. E por fim, as proteínas foram eluídas, com 1 mL de solução de eluição I (12,5 mM Na₂HPO₄; 12,5 mM NaH₂PO₄; 0,5 M NaCl e 250 mM de Imadazol) e solução de eluição II (12,5 mM Na₂HPO₄; 12,5 mM NaH₂PO₄; 0,5 M NaCl; 6M uréia e 250 mM de Imadazol) também por quatro vezes, da coluna após as eluições, as amostras coletadas foram quantificadas pelo kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Scientific™) seguindo as recomendações do fabricante e posteriormente analisadas e avaliadas em SDS-PAGE e *Western blot*.

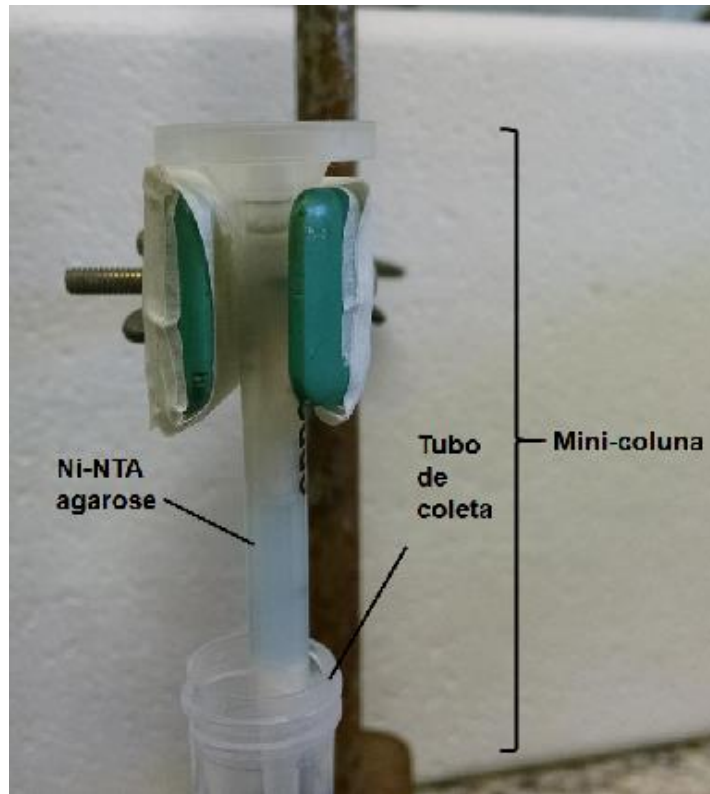


Figura 11: Montagem da coluna utilizada para purificar as proteínas. A amostra é passada pela coluna e a proteína que estiver com a cauda de histidina é retida na resina, que após as lavagens é eluída com aplicação de tampão de eluição.

1.4.17. Expressão heteróloga em baculovírus (Bac to Bac)

Esta parte experimental foi conduzida em parceria com o laboratório de virologia do professor Bergmann da UnB que forneceu todo o suporte para sua realização.

1.4.17.1 Vírus, células de insetos

Os vírus *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), derivados do bacmídeo bMON14272 (Bac-to-Bac “Baculovirus Expression System”, Invitrogen) foram utilizados nesse trabalho. Os vírus foram propagados em cultura de

Spodoptera frugiperda (IPLB-Sf21AE). Essas células foram mantidas em meio TC-100 (Gibco-BRL) com 10% de soro fetal bovino a 28°C.

Células de *Escherichia coli* DH10 β (Invitrogen) foram utilizadas como hospedeiras para o plasmídeo utilizado no presente trabalho. No entanto, experimentos envolvendo Bac-to-Bac “Baculovirus Expression System” (Invitrogen), foram utilizadas células *Escherichia coli* DH10Bac (Invitrogen).

1.4.17.2 Obtenção e clonagem do gene metacaspase-3

Foram inseridos, por meio de oligonucleotídeos específicos (Tabela 2), sítios para a enzima de restrição *NcoI* em ambas as extremidades do gene de interesse, de modo a permitir a fusão do gene metacaspase-3 na porção amino-terminal da poliedrina. As reações de PCR foram realizadas em termociclador marca (Life Touch-Bioer), analisadas por eletroforese em gel de agarose e fotografadas em um fotodocumentador (LAB TRADE). O fragmento observado foi cortado do gel com auxílio de uma lâmina e purificado utilizando-se ‘GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit’ (GE Healthcare). O fragmento purificado foi clonado no vetor pGem®-T easy (Promega) de acordo com instruções do fabricante. Posteriormente, os plasmídeos foram enviados para sequenciamento no centro de genômica de alto desempenho do DF, da Universidade Católica de Brasília, em aparelho Sequence Scanner (Applied Biosystems) usando primers T7 e SP6 que se anelam em regiões presentes no plasmídeo comercial usado.

1.4.17.3 Clonagem da metacaspase-3 na porção 5’ do gene polh de AcMNPV

Um plasmídeo doador, previamente construído, foi utilizado para clonagem do gene de metacaspase-3. Esse plasmídeo é derivado do vetor comercial pFastBac1® (Invitrogen), que permitem fusão de genes de interesse à região 5’ (pFastBac1-6xHis-AcPH) do gene polh do AcMNPV (Araujo, 2011). Este vetor apresenta o gene polh com o códon de terminação natural deletado, um sítio de restrição para *NcoI* e uma cauda de hexa-histidina em fase, ambos na região 5’ do gene. O plasmídeo pGem- metacaspase-3 contendo o gene de

interesse foi digerido com *NcoI*, submetido a separação por eletroforese em gel de agarose e a banda correspondente ao gene de interesse foi purificada, como descrito anteriormente e utilizada para clonagem no plasmídeo doador pFastBac1-6xHis-AcPH previamente digeridos com a mesma enzima e defosforilado (Sambrook & Russell, 2001). O plasmídeo resultante foi confirmado por PCR com primers específicos, por digestão e sequenciamento (Macrogen, Coreia do Sul).

1.4.17.4 Obtenção de baculovírus recombinante para expressão da matacaspase-3 fusionada à poliedrina

Os plasmídeos de fusão gerados contendo os genes quiméricos (genes de interesse fusionados na região 5' do polh) foi utilizado para construção de baculovírus recombinante via sistema Bac-to-bac (Invitrogen), conforme instruções do fabricante.

1.4.17.5 Produção in vitro da proteína quimérica poliedrina-metacaspase-3

Um μg do DNA plasmidial dos bacmídeos recombinantes gerados, foram utilizados para transfectar 10^6 células de inseto Tn5B. Foi adicionado um volume de 10 μL de DNA plasmidial dos bacmídeos (1 μg) em 90 μL de meio de cultura TC-100 sem soro em placas de 35 mm e misturado, posteriormente foi adicionado 6 μL de lipossomos catiônicos da marca FuGENE® HD Transfection Reagent (Promega). A mistura contendo os lipossomos/DNA de cada bacmídeo foram misturados e incubados por 15 min à temperatura ambiente.

Placas com 10^6 células em 2 mL foram incubadas com a mistura lipossomos/DNA de cada bacmídeo por 4 horas a 28°C. Após 4 h, a placa foi recomposta com mais dois mL de meio de cultura TC-100 contendo 10% de soro fetal bovino e incubada a 28°C por sete dias. As células de inseto que foram transfectadas com o DNA do baculovírus recombinante que foram capazes de produzir vírus, pois como é sabido que o DNA nu do baculovírus é infectivo (Burand et al, 1980). Em uma nova placa de 100 mm, contendo 5×10^6 células de inseto Tn5B foram adicionados 500 μL do sobrenadante da transfecção para amplificação dos vírus recombinantes.

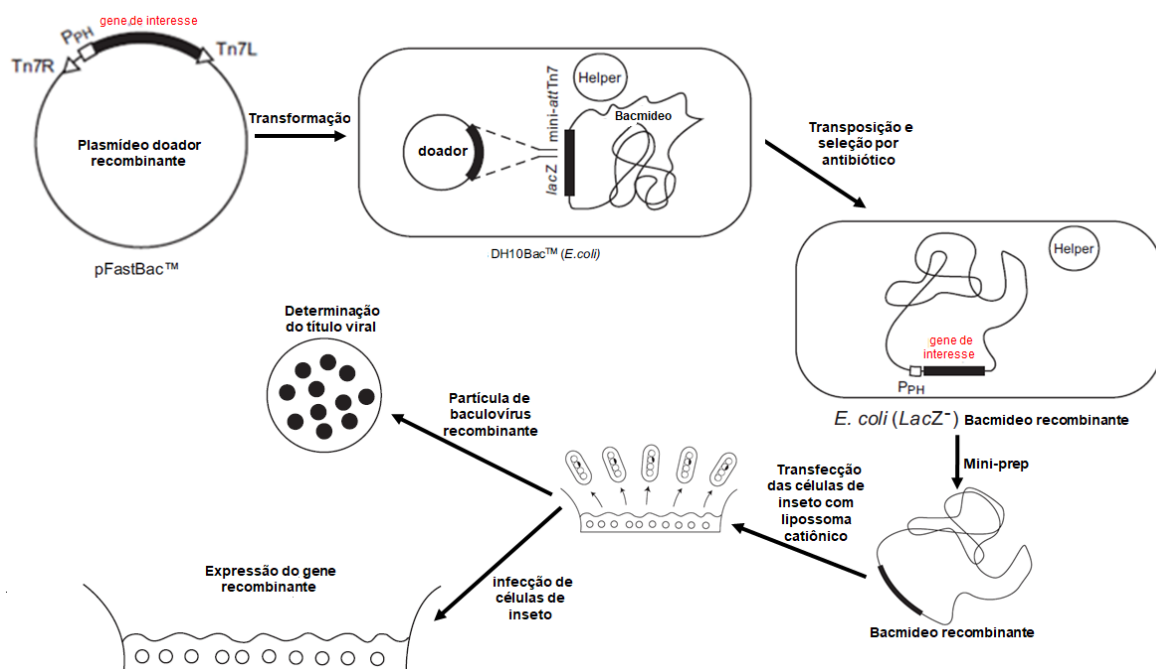


Figura 12: O esquema mostra a geração do baculovírus recombinante e a expressão do gene de interesse usando o Sistema de Expressão Baculovírus Bac to Bac[®]. Figura adaptada do manual da Invitrogen.

1.4.17.6 Análises da produção da proteína recombinante em células de inseto

Monocamadas de células Tn5B (aproximadamente 10^5 células) foram incubadas com 10 vírus/célula com os vírus recombinantes. As células infectadas foram observadas a 72 h p.i. em um microscópio de luz invertida Axiovert 100 (Zeiss). Posteriormente, o sobrenadante das células *Trichoplusia ni* (Tn5B) infectadas, foram coletadas e submetidas a centrifugação e o extrato celular e sobrenadante das células infectadas com o vírus recombinante foram quantificados pelo kit Pierce[™] BCA Protein Assay (Thermo Scientific[™]) seguindo as recomendações do fabricante e depois analisados por gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e *Western-blot*.

1.4.18. Expressão de proteína de *T.cruzi* em células de mamífero (HeLa)

As células de mamífero utilizadas neste experimento são da linhagem HeLa, que são células humanas epiteliais, não imunes e aneuploides isoladas de adenocarcinoma de útero. As células HeLa ($8,0 \times 10^4$ células/cm²) foram cultivadas em meio DMEM (Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino e adicionado de antibióticos (Estreptomicina 50 µg/mL e Ampicilina 100 µg/mL) a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ até a confluência ficar entre 70 e 90% ($1,0 \times 10^5$ células/cm²).

Os plasmídeos pGEM-metacaspase-3, pGEM-Cruzipaina e pEGFP-N3 foram digeridos com as enzimas de restrição *Bgl*III e *Kpn*I Anza™ (Invitrogen) (40 ng/µL de DNA plasmidial, 1U de cada enzima, 6 µL de 10X Red buffer e água milliQ para um volume final de 60 µL) à 37°C overnight em termociclador. O vetor pEGFP-N3 depois foi digerido e desfosforilado utilizando: 40 ng/µL de DNA plasmidial digerido e 2 U da enzima SAP (USB® Shrimp Alkaline Phosphatase- Affymetrix) e água milliQ para um volume final de 20 µL. Essa reação foi incubada por 60 minutos à 37°C e em seguida aquecida para 65°C por 15 minutos.

O plasmídeo pEGFP-N3 digerido e desfosforilado foi utilizado para a reação de ligação com os insertos metacaspase-3 e cruzipaina, após esses serem purificados com o kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) seguindo as recomendações do fabricante. Para a transformação foram utilizadas as células *Escherichia coli* TOP, e os clones foram selecionados pela resistência ao antibiótico canamicina (35 µg/mL). Após o crescimento de 5 mL das culturas selecionadas foi realizada a purificação plasmidial conforme o Item 1.4.11, a confirmação do gene foi feita por PCR e o produto foi analisado por gel de eletroforese a 1% (p/v).

Depois de confirmar os plasmídeos-recombinantes pEGFP-N3-metacaspase-3 e pEGFP-N3-cruzipaina, esses foram utilizados para transfecção em uma placa de 24 poços contendo 2×10^5 células Hela por poço. Para realizar essa transfecção, foram misturados 282 µL de Opti-MEM™ (Invitrogen) com 18 µL de Lipofectamine™ 3000 Reagent em um tubo de 1,5 mL (**Lipossomo diluído**). E em outros 3 tubos (**plasmídeo diluído**) de 1,5 mL contendo 100 µL em cada:

Tubo 1 (52 μL de Opti-MEMTM “Invitrogen”, 16 μL de PEGFP-metacaspase-3 (50 ng/ μL) e 32 μL de P3000TM Reagent);

Tubo 2 (44 μL de Opti-MEMTM “Invitrogen”, 16 μL de PEGFP-cruzipaina (~50 ng/ μL) e 40 μL de P3000TM Reagent) e

Tubo 3 (38,4 μL de Opti-MEMTM “Invitrogen”, 24 μL de PEGFP-N3 (50 ng/ μL) e 37,6 μL de P3000TM Reagent).

Esses três tubos receberam 100 μL cada um do tubo contendo o **Lipossomo diluído**, formando uma mistura plasmídeo-lipossomo na razão de 1:1 e incubada por 15 minutos. Após esse período, 25 μL do complexo **plasmídeo-lipossomo** de cada tubo foram distribuídos para 4 poços da placa contendo 2×10^5 células e incubada a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ por 4h (Figura 13). Logo após esse período, esses poços foram completados com 600 μL de meio DMEM (Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 24h depois foram adicionados 400 $\mu\text{g/mL}$ de G418, e as células foram mantidas por seis dias nas condições acima mencionadas, posteriormente a transfecção foi analisada por microscopia de fluorescência (EVOSTM M7000, Invitrogen).

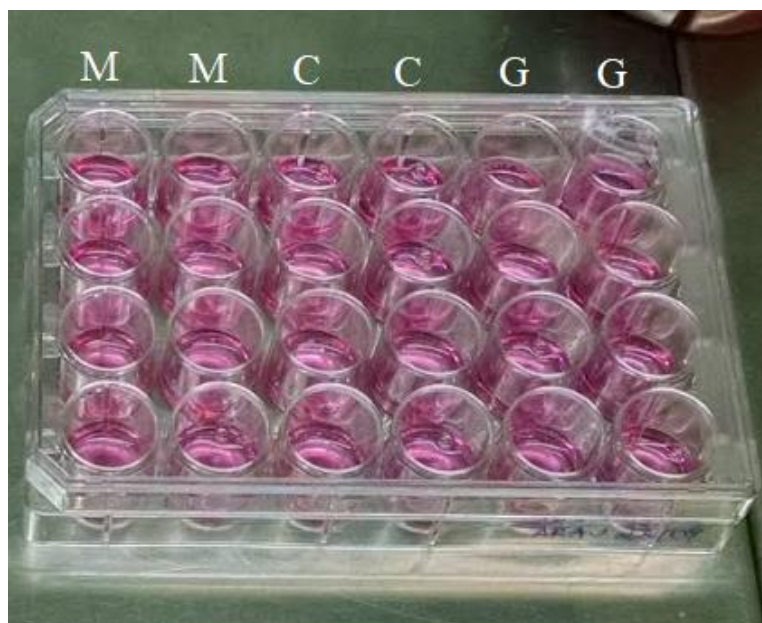


Figura 13: Placa de cultura de células HeLa. As células foram transfectadas em duplicatas, M) metacaspase-3, C) cruzipaina e G) para o plasmídeo fechado (GFP).

1.4.18.1. Extração das Proteínas (Trizol[®] 'Invitrogen') de células HeLa

Para a extração das proteínas foram adicionados 300 µL de Trizol[®] (Invitrogen) nos poços para lise das células e transferidos para tubos de 1,5 mL e incubados por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 60 µL de clorofórmio nos tubos e incubados por 3 minutos. Após esse período, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 12000xg a 4°C. A mistura foi separada em uma fase superior aquosa e incolor, interfase e a inferior vermelha (fenol-clorofórmio). Foi removido a fase superior aquosa incolor dos tubos e adicionando a eles, 90 µL de etanol 100% e misturados invertendo-os diversas vezes e incubados por 3 minutos. Depois centrifugados por 5 minutos a 2000xg a 4°C e os sobrenadantes (Fenol-etanol) transferidos para novos tubos. Para precipitar as proteínas, foram adicionados aos tubos 450 µL de isopropanol e incubados por 10 minutos e em seguida centrifugados por 10 minutos a 12000xg a 4°C para formar o pellet de proteína e descartar o sobrenadante. Posteriormente, o pellet foi ressuspensionado por 600 µL de solução wash (0,3 M de Hidroclorato de Guanidina em etanol 95%) e incubados por 20 minutos. Em seguida, centrifugados por 5 minutos a 7500xg a 4°C e descartado o sobrenadante. Essa etapa de lavagem foi realizada duas vezes antes de seguir. Após essa etapa, foram adicionados aos tubos 2 mL de etanol 100%, brevemente misturados por vórtex e incubados por 20 minutos. Depois os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 7500xg a 4°C, descartados os sobrenadantes e os tubos com os pellets de proteína total foram deixados secando por 10 minutos. Posteriormente, os pellets foram ressuspensionados em 200 µL de SDS 1% pipetando gentilmente, e a seguir centrifugados 10 minutos a 10000xg a 4°C para remover os materiais insolúveis e os sobrenadantes transferidos para novos tubos, depois quantificados pelo kit Pierce[™] BCA Protein Assay (Thermo Scientific[™]) seguindo as recomendações do fabricante e estocados em -20°C para posteriores análises em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e *Western-blot*.

1.4.19. Análises de proteínas em eletroforese desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As análises da expressão, solubilidade e purificação da proteína foram feitas por SDS-PAGE desnaturante unidimensional, como descrito a seguir. Amostras provenientes destas etapas foram coletadas, homogeneizadas em tampão de amostra concentrado 2x e fervidas durante cinco minutos, antes de serem aplicadas nos géis. Os géis possuíram 1 mm de espessura e suas fases separadoras foram feitas com 15% ou 12% de poliacrilamida. Foram aplicados 90V durante a eletroforese da fase concentradora e 180V durante a eletroforese da fase separadora. Após o término da eletroforese, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue (Sigma).

1.4.20. Western Blot

Amostras oriundas da purificação foram submetidas a SDS-PAGE, conforme descrito acima (sessão 1.4.19) e, em vez de coradas, foram transferidas a membranas de nitrocelulose, utilizando o sistema miniprotean cell® (Bio-Rad) e o marcador pré-marcado Novex®sharp Pre-Stained (invitrogen). Essa transferência se deu por 55 minutos em uma corrente de 300 mA. Após a transferência, a membrana foi incubada em solução tampão PBST, adicionados a leite desnatado 5,0% p/v overnight a 4°C. Depois, a membrana foi lavada três vezes em PBS-T e incubada em PBS-T com anticorpo Mouse Anti-his (Life Technologies) diluído 1:500 (v/v), para a detecção de caudas de histidina por uma hora, sob agitação constante, a temperatura ambiente. Após isso, a membrana foi novamente lavada três vezes com PBS-T e incubada em PBS-T com anticorpo secundário Goat Anti-mouse IgG Whole molecule – Alkaline phosphatase antibody (Novex, Life Technologies), diluído 1:1000 (v/v) por uma hora, sob agitação constante, a temperatura ambiente. Depois, a membrana foi lavada três vezes com tampão PBS-T e então revelada em BCIP/NBT (Sigma), na concentração indicada pelo fabricante. A revelação foi interrompida com água destilada.

1.4.21. Amostras de soro

Amostras de soro de 114 pacientes chagásicos do Hospital Universitário de Brasília utilizados no projeto “Novas Tecnologias aplicadas ao diagnóstico e identificação de marcadores genéticos para o diagnóstico e prognóstico da doença de Chagas crônica”, parecer CEP-FM/UnB número 151.680, foram cedidas para experimentos deste trabalho cujo objetivos já estavam previsto no projeto original.

1.4.22. ELISA

Microplacas de alta afinidade de ligação com fundo plano de 96 cavidades (Greiner bioone) foram sensibilizadas separadamente com 100 µL/poço, contendo 5 µg/mL das proteínas purificadas ou extrato total, em tampão de revestimento (carbonato-bicarbonato) pH 9,6 (0.03 M NaHCO₃; 0.015 M Na₂CO₃) e incubadas por 12h a 4°C. Em seguida, os excessos de antígenos foram removidos por meio de três lavagens com PBS pH 7,4 contendo 0,05% de *Tween*-20 (PBS-T). Os sítios de adesão livres foram bloqueados com 100 mL/poço de PBS pH 7,4 acrescidos de 10% de SFB (soro fetal bovino) da Gibco, seguido por incubação de 1h a temperatura ambiente. Ao final, repetiu-se o procedimento de lavagem. Os soros dos pacientes foram diluídos a 1:500 em PBS/SFB 10% e adicionados 100 µL/poço, em duplicata. Após incubação de 1h a temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas com PBS-T. O conjugado, composto por anticorpos anti-IgG humano marcado com HRP (Novex – Life Technologies) foi diluído 1:5000 em PBS/SFB 10% e, em seguida, 100 µL/poço foram adicionados às placas seguida por incubação de 1h a temperatura ambiente, sendo envolvidas por papel alumínio durante essa etapa. Após incubação, o excesso do conjugado foi retirado através de cinco lavagens com PBS-T. A revelação da reação foi feita pela adição de 50 µL/poço de H₂O₂ (Dinâmica) em tampão fosfato-citrato pH 5,0 adicionado de cromógeno OPD (*o*-Phenylenediamine dihydrochloride - Sigma). A reação foi feita em local sob proteção de luz, passados 10 minutos, essa foi interrompida pelo acréscimo de 50 µL/poço de H₂SO₄ (2N). A leitura foi feita em espectrofotômetro (*BioTeK-Synergy HT*) a 492 nm.

1.4.23. Análises estatísticas

Todos os dados obtidos nos experimentos de ELISA foram submetidos às análises de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade de variância pelo teste de Levene; e os grupos foram comparados por teste-T ou Wilcoxon-Mann-Whitney e Kruskal-Wallis ou ANOVA one-way seguido por teste post hoc de Tukey ou Bonferroni. O nível de confiança adotado no estudo foi de 95% ($p < 0,05$). Os softwares usados para os cálculos foram GraphPad Prism, versão 4.0, para Windows (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) e SPSS, versão 25.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) para Windows.

1.5. Resultados

1.5.1 Análise *in silico* dos genes

Na análise da predição de epítomos lineares para células B, a metacaspase-3 apresentou os epítomos mais uniformemente distribuídos ao longo da proteína, enquanto que na cruzipaina a maior parte dos epítomos estavam na porção C terminal (Figura 14).

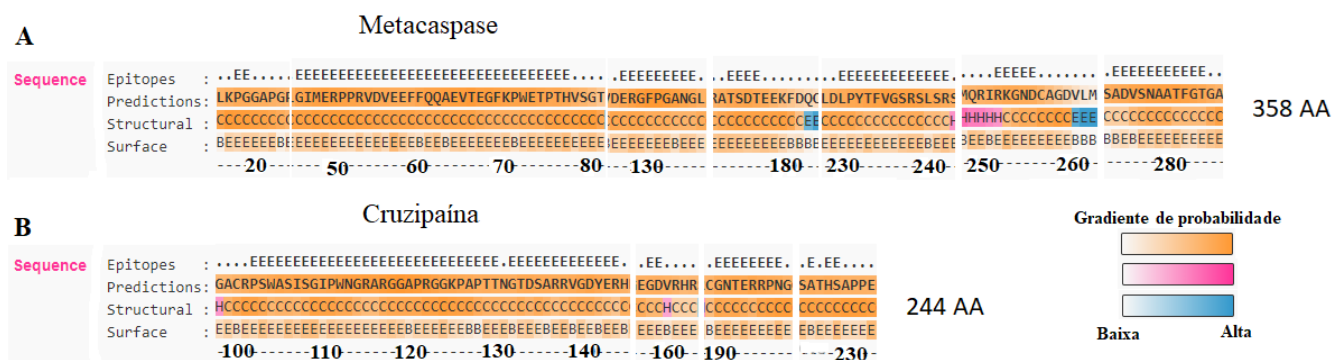


Figura 14: Predição dos epítomos para células B para Metacaspase-3 e Cruzipaina. Estruturas secundária são representadas da seguinte forma: alfa-hélice em rosa (H), folha em azul (E) e bobina em laranja (C). As tonalidades das cores estão correlacionadas com os altos valores da predição (Gradiente de probabilidade). Epitopes: Posições para epítomos para células B; Predictions: Sequência da proteína que exibe as predições; Surface: não exposta (B) e exposta (E).

Analisando os alinhamentos múltiplos, a metacaspase-3 de *Trypanosoma cruzi* apresentou 66 regiões de resíduos idênticos e 39 regiões similares com as metacaspase-3s de outros Tripanosomatídeos como o *Trypanosoma rangeli*, *Leishmania brasiliense* e *L. infantum* (Figura 15), revelando sequências 1 a 9 resíduos distribuídos ao longo da proteína, enquanto que a Cruzipaína teve 28 regiões idênticas e 6 similares, sendo a maioria de um único resíduo. A metacaspase-3 não apresentou qualquer similaridade com proteínas de mamífero. Na Figura 16 mostra que o alinhamento da proteína cruzipaína de *T.cruzi* apresentou 21 resíduos idênticos e 18 similares com proteínas de mamíferos (Figura 17).

metacaspase-3



Figura 15: Alinhamento da sequência de resíduos de aminoácidos da Metacaspase-3 de *Trypanosoma cruzi* com *Leishmania brasiliensis*, *L. infantum*, *Trypanosoma rangeli*. As caixas vermelhas com caracteres brancos indicam resíduos idênticos. Caracteres vermelhos indicam resíduos similares.

cruzipaína

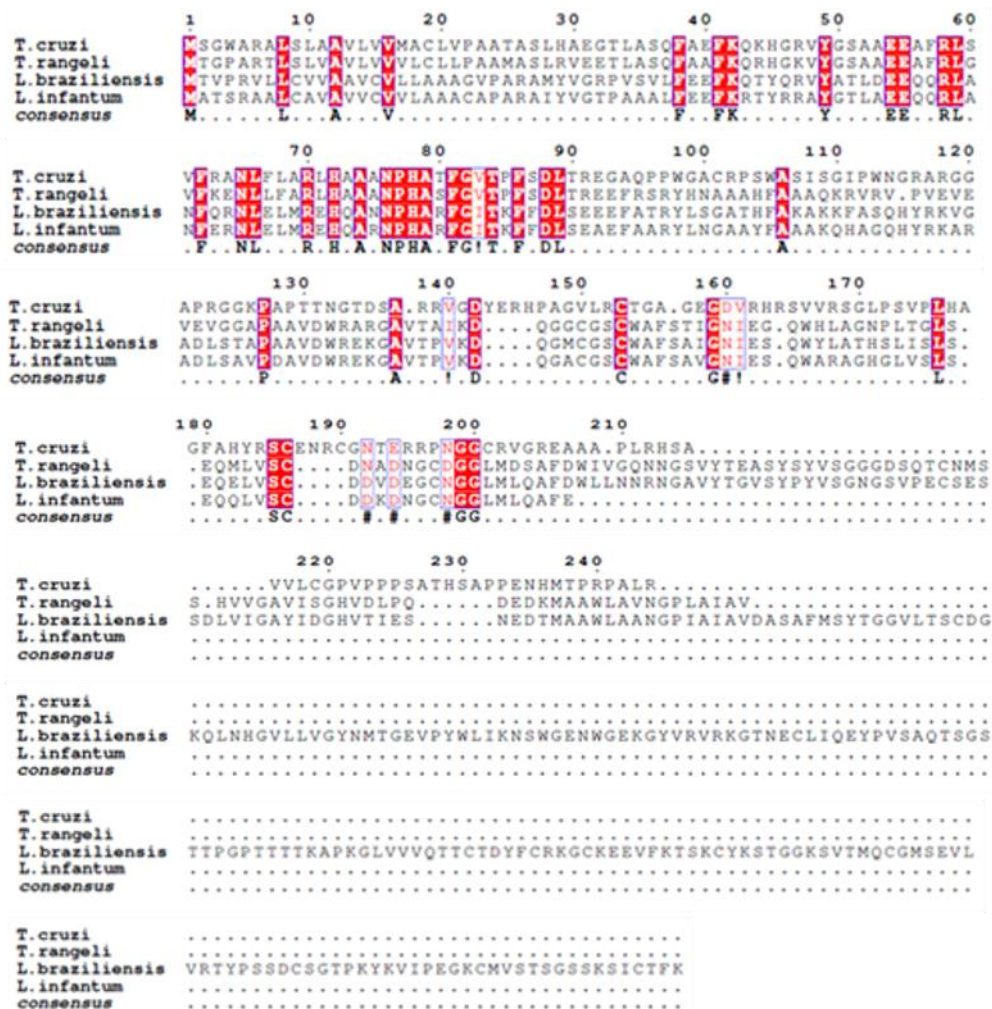


Figura 16: Alinhamento da seqüência de resíduos de aminoácidos da cruzipaína de *Trypanosoma cruzi* com outros tripanosomatídeos. As caixas vermelhas com caracteres brancos indicam resíduos idênticos. Caracteres vermelhos indicam resíduos similares.

cruzipaína

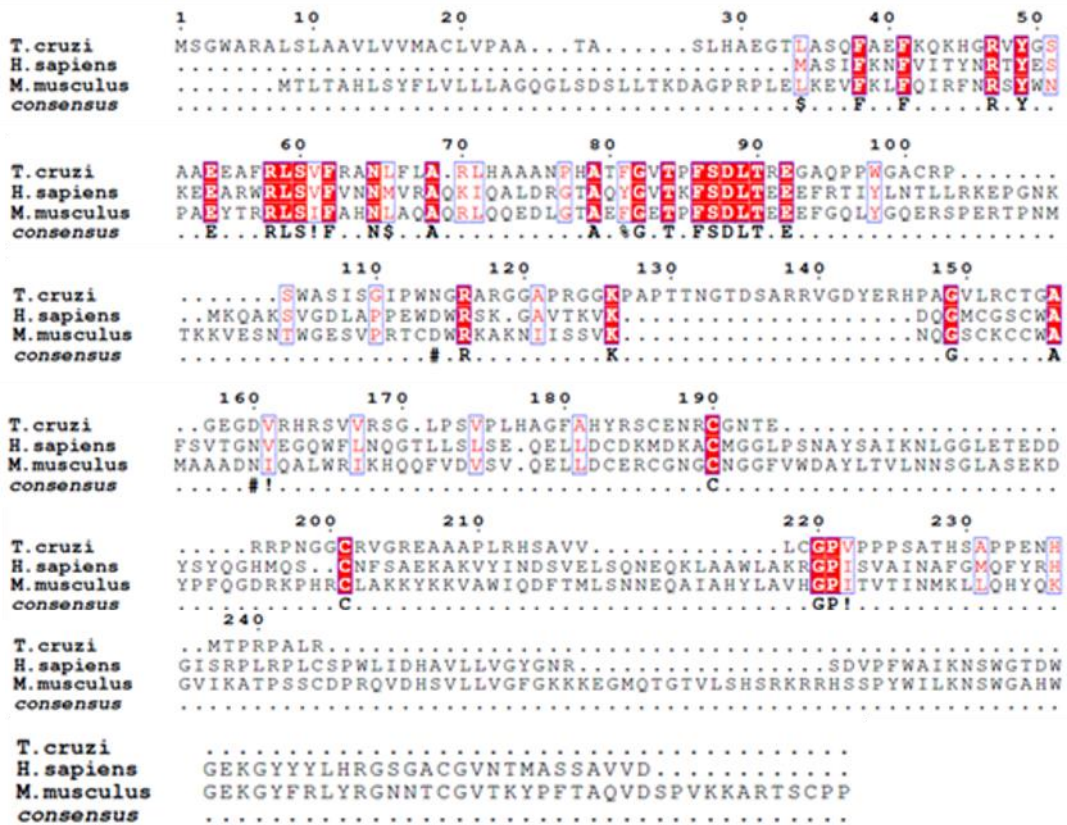


Figura 17: Alinhamento da sequência de resíduos de aminoácidos da Cruzipaína de *Trypanosoma cruzi* com proteínas de mamíferos. As caixas vermelhas com caracteres brancos indicam resíduos idênticos. Caracteres vermelhos indicam resíduos similares.

1.5.2 Resultado das ampliações por PCR dos genes metacaspase-3 e cruzipaína e da confirmação da clonagem em pGEM-T Easy

As ampliações dos genes selecionados foram bem sucedidas como mostrado na Figura 18, a partir desses resultados, os produtos foram clonados em pGEM-T Easy e posteriormente as ligações foram confirmadas por PCR (Figura 19). As amostras foram sequenciadas e os resultados analisados pelos softwares Chromas e Blastn (Anexo C), os clones que apresentaram o maior índice de identidade (99% a 100%) foram digeridos com as

enzimas de restrição (*Bgl*III e *Kpn*I, *Bam*HI e *Not*I) para a clonagem em plasmídeos de expressão e as ligações confirmadas por PCR em TOP 10. Posteriormente, conforme o caso, os plasmídeos isolados da TOP 10, foram transformados em Rosetta, DH10Bac e transfectados em HeLa.

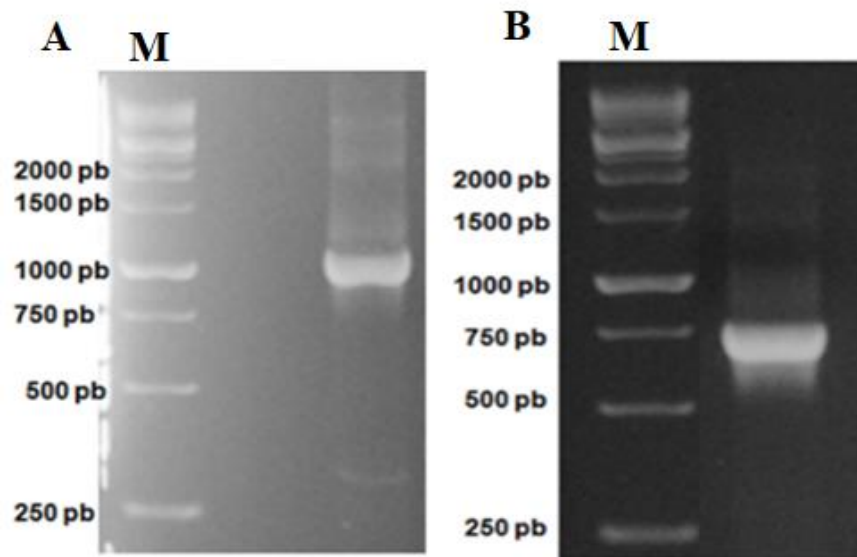


Figura 18: Amplificação dos genes alvos do genoma de *Trypanosoma cruzi* da cepa Cl Brener. Eletroforese em gel de agarose 1%, mostrando em A, a metacaspase-3 com 1078 pb e em B a cruzipaína com 721pb. M) marcador 1 Kb plus (Kasv).

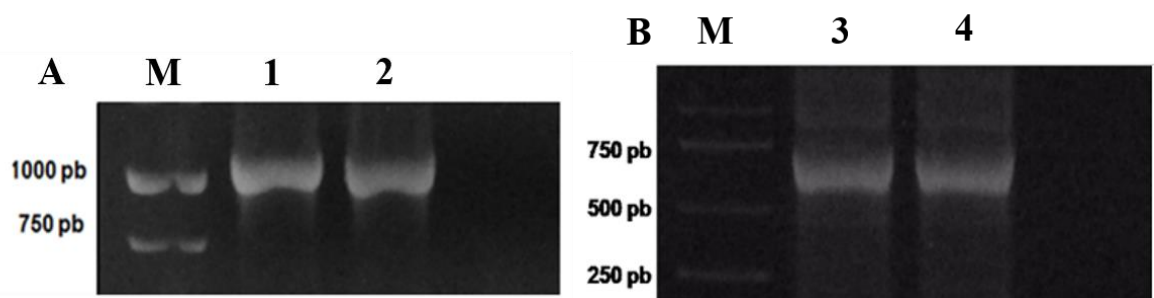


Figura 19: Confirmação da clonagem dos fragmentos ao vetor de clonagem pGEM-T Easy. Eletroforese de gel de agarose a 1% mostrando as ampliações dos clones. Em A de 1 a 2 é mostrada a metacaspase-3 com 1078 pb, e em B, 3 a 4 a cruzipaína com 721 pb. M) marcador 1 Kb plus (Kasv).

1.5.3 Resultado da expressão heteróloga em *E. coli* (Rosetta)

No sistema de expressão em bactéria, os insertos foram confirmados em pET28a (Figura 22) e em seguida foram transformados em *E. coli* Rosetta. Após a indução da cultura com IPTG verificou-se que o melhor tempo de indução foi de 6 horas (Figura 23). Depois 250 mL da cultura induzida por 6 horas foi purificada para obtenção da metacaspase-3. A proteína ficou mais concentrada na fração insolúvel do extrato total, enquanto que na fração solúvel a banda ficou com um maior peso molecular como demonstrada na Figura 24 A. Na fração insolúvel foi possível detectar a metacaspase-3 (40 kDa) com anticorpos anti-his Figura 22 B e C.

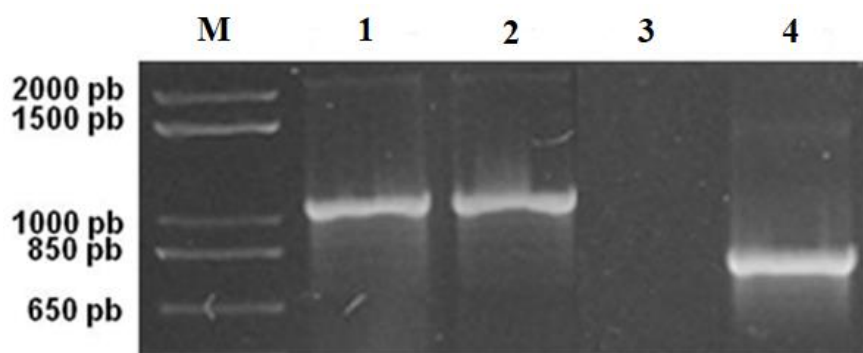


Figura 20: Confirmação da ligação dos insertos ao vetor de expressão (pET28a). Eletroforese em gel a 1% mostrando em 1 e 2, a metacaspase-3 (1078 pb) ligado ao pET28a e em 4 a cruzipaína (721 pb). M) marcador 1 Kb plus (Kasv).

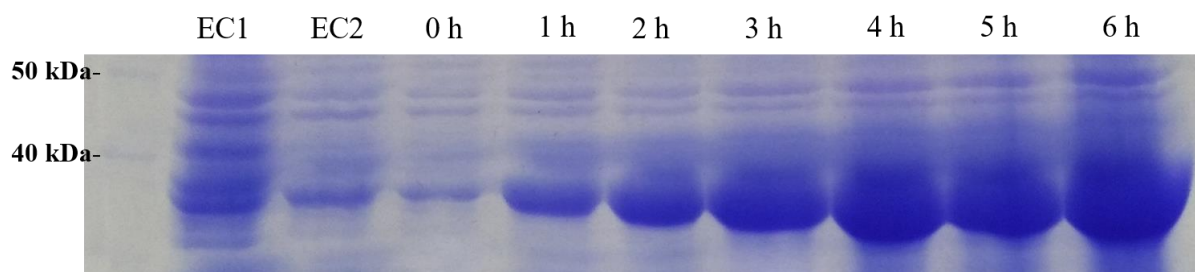


Figura 21: Gel representativo da análise do tempo de indução da *E. coli* (Rosetta) com pET28a/metacaspase-3. Essa análise foi feita em gel de SDS-PAGE a 12%; 6 horas foi o tempo máximo aferido para amostra. Em EC1 representa (*E. coli* sem o plasmídeo pET28a) e EC2 (*E. coli* com pET28a vazio).

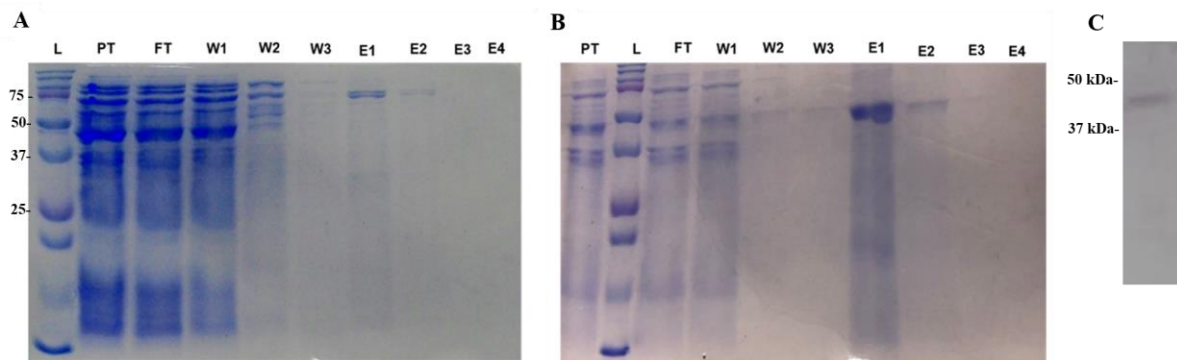


Figura 22: Eletroforese em gel de SDS-PAGE da purificação por cromatografia de afinidade das amostras eluídas Ni-NTA e o *Western blot*. L representa o marcador molecular, PT as proteínas totais depois do processo de sonicação, FT a fração do extrato não ligada a coluna, w1 a w3 representam as frações de lavagem e E1 a E4 as eluições. Em A) é representado o extrato solúvel; B) Fração insolúvel e C) O *Western blot* com a metacaspase-3 detectada na fração insolúvel.

1.5.4 Resultado da expressão heteróloga em sistema de Baculovírus

Foi usado como DNA molde o pGEM-T Easy/ metacaspase-3 (Figura 19 A) para amplificar os fragmentos com o stop códon ou sítio de protease na posição 3' do gene e ligados ao pGEM-T Easy o resultado dessa ligação é mostrado na Figura 24. Na Figura 24 A é demonstrada a ligação da Metacaspase-3 ao plasmídeo pFastBac1-6xHis-AcPH. Das duas construções feitas, a que conseguimos dar prosseguimento foi a que continha o sítio de protease na posição 3'. Na Figura 24 C mostra o resultado da transformação em DH10Bac (Bacmidio) com o plasmídeo pFastBac1-6xHis-AcPH/Metacaspase-3 e depois o resultado da purificação do Bacmideo com a metacaspase-3 (136 kb) (Figura 24 B).

Na Figura 26 A mostra o gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) com extrato total das células *Trichoplusia ni* (Tn5B) infectadas pelo Bacmídeo recombinante. A metacaspase-3 possui 40 kDa somados aos 29 kDa da poliedrina resulta em uma proteína híbrida de 69 kDa que pode ser visualizado no gel e no *Western-blot* revelado com anticorpo anti-his (Figura 26 B).

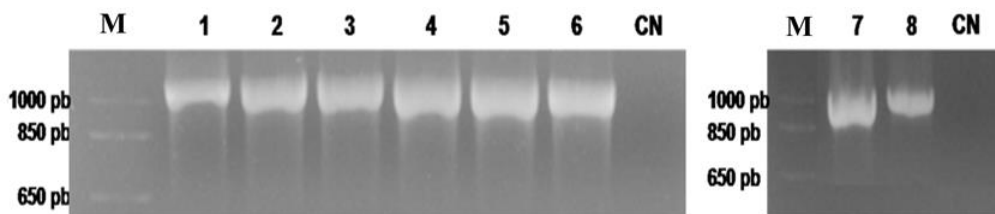


Figura 23: Confirmação da clonagem dos insertos em pGEM-T Easy. Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando os clones da Top 10 com pGEM- Metacaspase-3. De 1 a 6 são os clones em que a Metacaspase-3 tem um stop códon na porção 3' do gene; e 7 e 8 a Metacaspase-3 apresenta gene para o sítio de protease na porção 3'. M) marcador 1 Kb plus (Kasv).

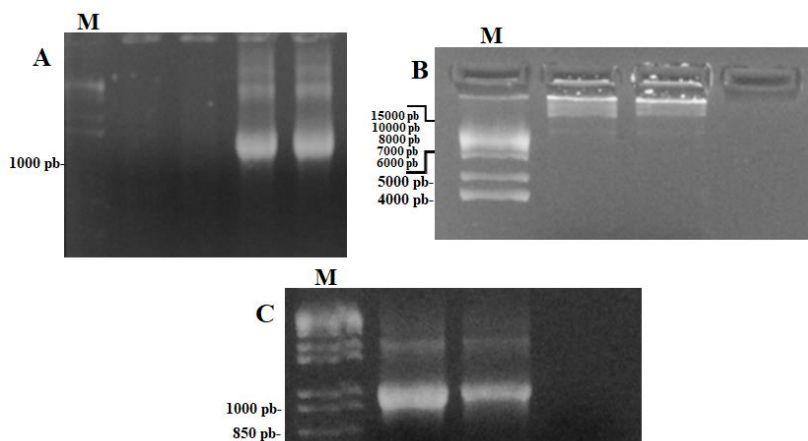


Figura 24: Confirmação da construção do bacmídeo recombinante. Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando em A) a amplificação clonagem da metacaspase-3 (1078 pb) em pFastBac1-6xHis-AcPH, B) a extração do Bacmideo (136kb) e C) amplificação da metacaspase-3 (1078 pb) confirmando a transferência do gene para o Bacmídeo (DH10Bac). M) marcador 1 Kb plus (Kasv).

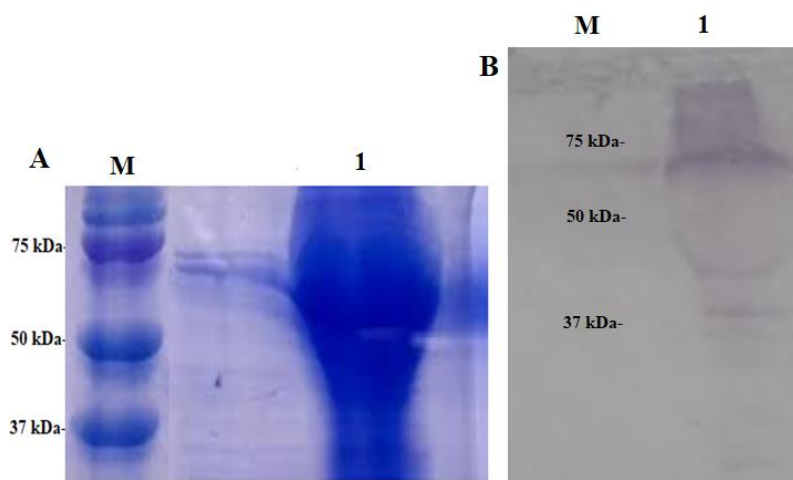


Figura 25: Confirmação da expressão das proteínas recombinantes. A) a eletroforese em gel de SDS-PAGE a 10% do extrato total das células infectadas com o vírus recombinantes, B) A confirmação da expressão por

Western blot, o extrato total incubado com anticorpo monoclonal de camundongo anti-his. M) marcador de massa molecular Precision plus protein Dual Color Standards (promega).

1.5.5 Resultado da expressão de proteína de *T.cruzi* em células de mamífero (HeLa)

Na Figura 26 são mostradas as amplificações por PCR dos genes metacaspase-3 (1078pb) e cruzipaína (721pb) no plasmídeo pEGFP-N3 confirmando as ligações. As transfecções das células HeLa com esses plasmídeos foram confirmadas após seis horas por microscopia de fluorescência como mostrada nas Figuras 27 e 28. Os extratos de proteínas totais das células HeLa resultantes das transfecções foram visualizados em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) onde é possível observar bandas na mesma altura (~60 kDa) que não é visualizada no poço (3) correspondente a célula HeLa intacta Figura 29 A. Na Figura 29 B, é mostrado o *Western blot* do gel de policrilamida, onde o resultado se demonstrou um pouco inespecífico porém é possível identificar as bandas correspondentes a metacaspase-3/GFP (67 kDa), Cruzipaina/GFP (72 kDa) e GFP (27 kDa).

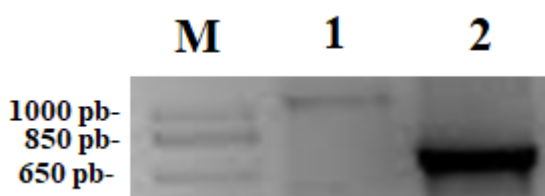


Figura 26: Confirmação da ligação dos insertos ao vetor de expressão (pEGFP-N3 em células de mamíferos. Eletroforese em gel a 1% mostrando em 1, a metacaspase-3 (1078 pb) ligado ao pEGFP-N3 e em 2 a cruzipaína (721 pb). M) marcador 1 Kb plus (Kasv).

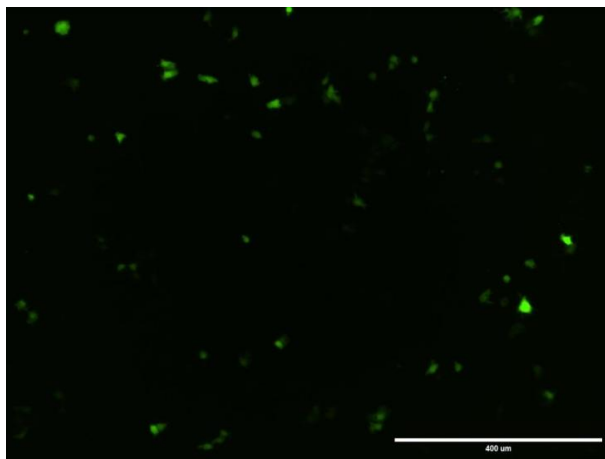


Figura 27: Análise geral da transfecção das células HeLa por microscopia de fluorescência (EVOS™ M7000, Invitrogen) seis dias após a transfecção em aumento de 20X.

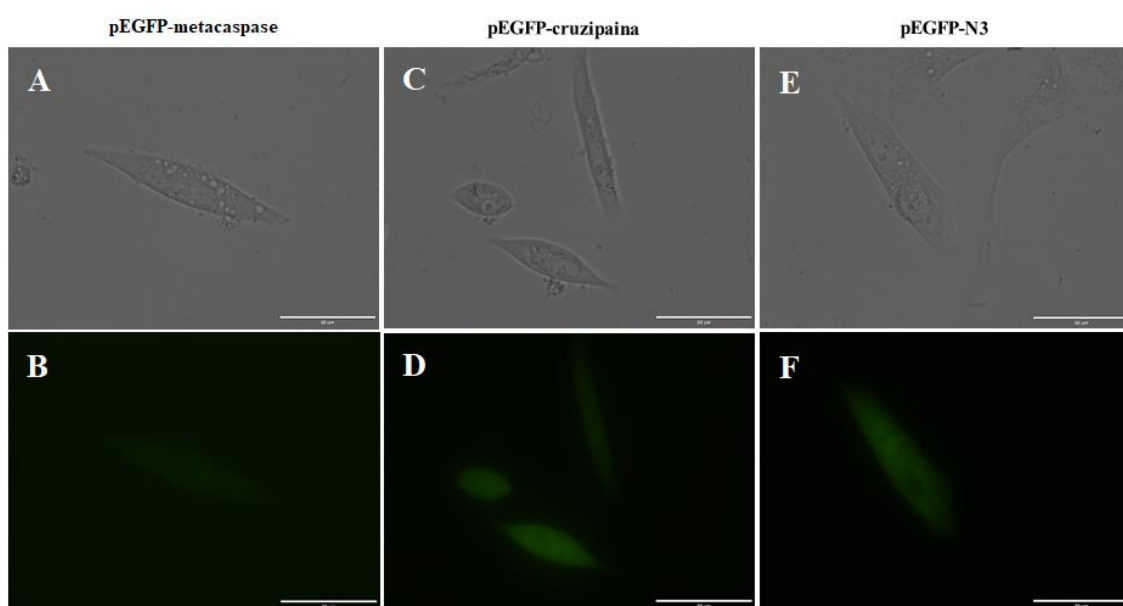


Figura 28: Análise da transfecção das células HeLa por microscopia de fluorescência (EVOS™ M7000, Invitrogen) seis dias após a transfecção. Em A e B, células HeLa transfetadas com pEGFP-metacaspase-3 com aumento 60X, em C e D, células transfetadas com pEGFP-cruzipaina e E e F com pEGFP-N3.

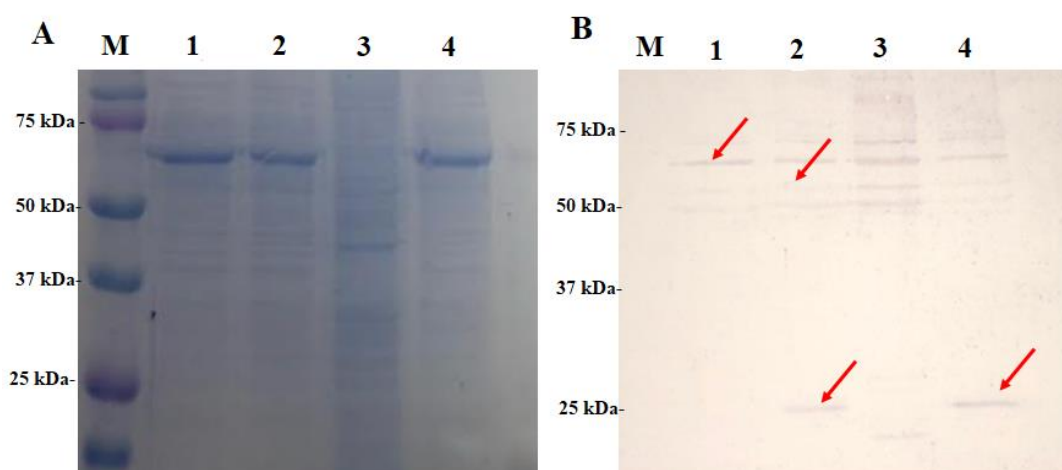


Figura 29: Confirmação da expressão das proteínas em células HeLa. A) a eletroforese em gel de SDS-PAGE a 10% do extrato total das células HeLa. 1) HeLa transfectada com pEGFP-metacaspase-3; 2) HeLa transfectada com pEGFP-cruzipaina; 3) extrato de HeLa; 4) HeLa transfectada com pEGFP-N3. B) A confirmação da expressão por *Western blot*, o extrato total incubado com anticorpo policlonal de coelho anti-GFP. As setas vermelhas indicam as posições das proteínas recombinantes, Metacaspase-3-GFP (67 kDa), Cruzipaina-GFP (72 kDa) e GFP (27 kDa). M) marcador de massa molecular Precision plus protein Dual Color Standards (promega).

1.5.6 Resultados dos ELISAS

Com o intuito de testar as proteínas expressas em ensaio de ELISA, soros de pacientes chagásicos crônicos foram divididos em 10 com manifestação clínica indeterminada, 10 com a cardíaca, 10 com a digestiva e 7 com a forma mista num total de 37 pacientes positivos. O teste U mostrou que o valor da absorbância dos soros de paciente crônicos de Chagas foi maior que a dos soros do grupo de pacientes com sorologia negativa quando testados contra a metacaspase-3-Rosetta [$U = 91.00$; $p < 0,01$] (Figura 30). O ANOVA one way mostrou que houve diferença também quando soros dos grupos com diferentes manifestações clínicas são comparados [$F(4,41) = 2,870$; $p < 0,05$] (Figura 31). O teste post hoc de Tukey mostrou que a média da absorbância dos soros do grupo dos pacientes negativos testados contra a metacaspase-3 diferiram da média aferida das absorbâncias dos soros dos pacientes crônicos Indeterminados ($p < 0,05$) e dos pacientes com a manifestação Cardíaca ($p < 0,05$), no entanto não houve diferença nas médias das absorbâncias dos grupos dos pacientes com a forma Digestiva ($p = 0,516$) e Mista ($p = 0,962$).

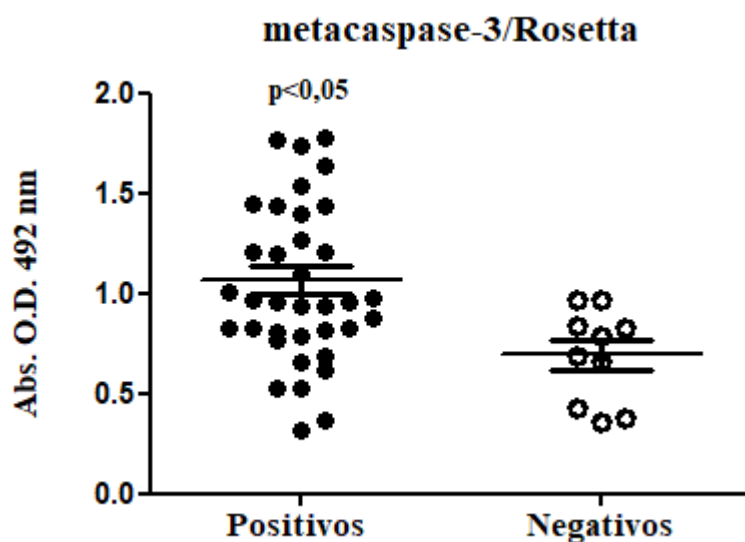


Figura 30: Níveis de IgG anti-*T. cruzi* em amostras de soro de indivíduos chagásicos (Positivos) e não-chagásicos (Negativos) avaliados por ELISA. O gráfico mostra o valor de absorvância dos anticorpos IgG de soros de pacientes chagásicos crônicos 0,96 (0,8 -1,4) e de pacientes não chagásico 0,74 (0,4 - 0,87) adsorvidos a Metacaspase-3 expressa em *E.coli* (rosetta). As barras representam a mediana e a faixa de 25% a 75% da amostra.

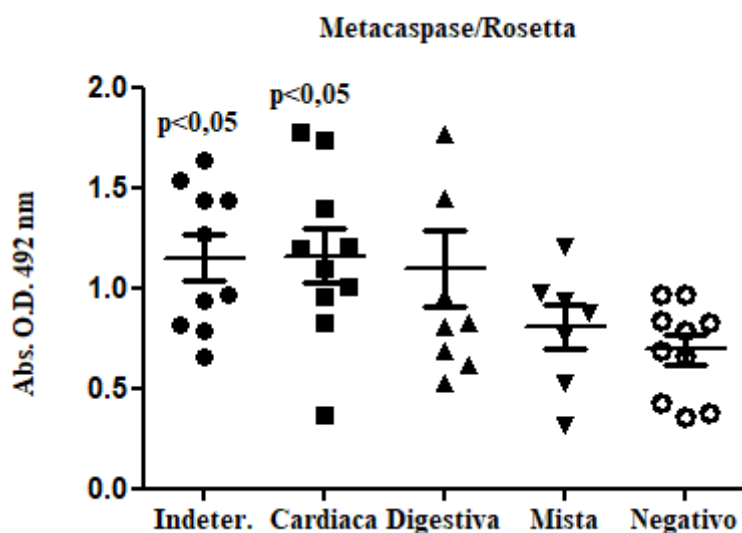


Figura 31: Níveis de IgG anti-*T. cruzi* em amostras de soros de indivíduos chagásicos crônicos e não-chagásicos (Negativos) separados pelas manifestações clínicas avaliados por ELISA. O gráfico mostra a resposta dos anticorpos IgG dos soros de pacientes com forma Indeterminada 1,15 ($\pm 0,11$); Cardíaca 1,16 ($\pm 0,13$); Digestiva 1,09 ($\pm 0,19$) e Mista 0,80 ($\pm 0,11$) em comparação a resposta dos anticorpos de pacientes não chagásico 0,69($\pm 0,07$) adsorvidos a Metacaspase-3 expressa em Rosetta. As barras representam a Média e o ($\pm EP$).

O valor médio (ranks) para a absorbância dos anticorpos dos pacientes crônicos positivos detectados contra a Metacaspase-3 expressa por baculovírus foi bastante significativas comparada ao valor médio dos pacientes com sorologia negativa ($U = 56,000$; $p < 0,01$) (Figura 32). Houve diferença também quando os grupos dos pacientes com diferentes formas clínicas foram comparados os pacientes negativos [$\chi^2(4) = 13,304$; $p < 0,05$] (Figura 33). O teste de comparações múltiplas mostrou que ELISA detectou mais anticorpos no grupo de pacientes com a manifestação digestiva da DC em comparação com os pacientes com sorologia negativa ($p < 0,01$), enquanto que as quantidade de anticorpos detectados nos grupos dos pacientes Indeterminados ($p = 0,131$), Cardíaca ($p = 0,421$) e Mista ($p = 0,158$) não diferiram dos pacientes negativos.

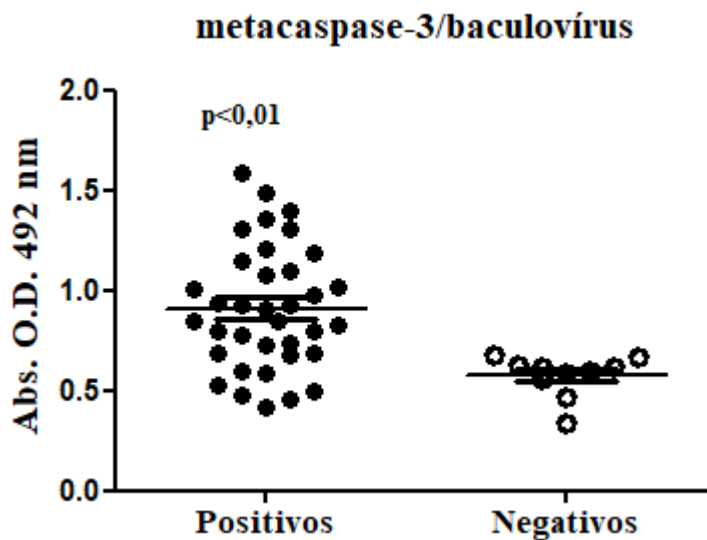


Figura 32: Níveis de IgG anti-*T. cruzi* em amostras de soro de indivíduos chagásicos (Positivos) e não-chagásicos (Negativos) avaliados por ELISA. O gráfico mostra a resposta dos anticorpos IgG dos soros de pacientes chagásicos crônicos 0,87(0,68-1,13) em comparação a de pacientes não chagásico 0,60(0,53-0,63) adsorvidos a Metacaspase-3 expressa em baculovírus. As barras representam a mediana e a faixa de 25% a 75% da amostra.

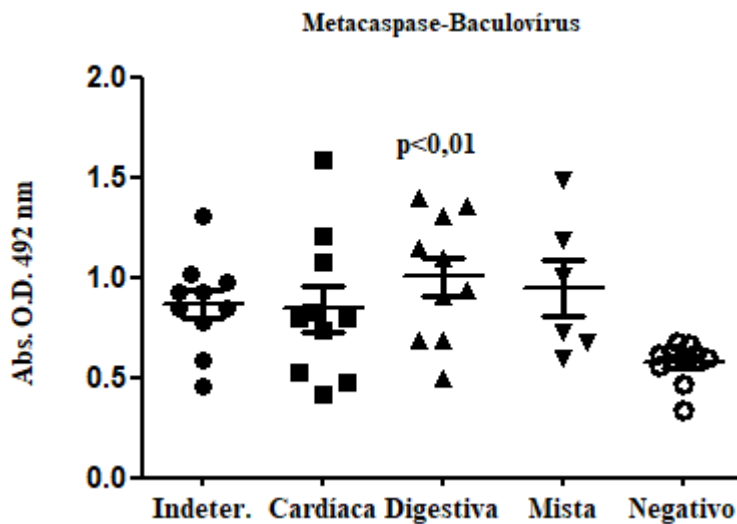


Figura 33: Níveis de IgG anti-*T. cruzi* em amostras de soros de indivíduos chagásicos crônicos e não-chagásicos (Negativos) separados por manifestações clínicas avaliados por ELISA. O gráfico mostra a resposta dos anticorpos IgG dos soros de pacientes com forma Indeterminada 0,88 (0,72-0,98); Cardíaca 0,79 (0,51-1,11); Digestiva 1,01 (0,68-1,32) e Mista 0,86 (0,65-1,26) em comparação a de pacientes não chagásico 0,60 (0,53-0,63) adsorvidos a Metacaspase-3 expressa em baculovírus. As barras representam a mediana e a faixa de 25% a 75% da amostra.

A Figura 34 mostra que os anticorpos IgG presentes nos soros de pacientes crônicos da DC, reagiram as proteínas de *T. cruzi* expressas em células HeLa, metacaspase-3 [U =11,00; $p < 0,0001$], cruzipaina [U =31,00; $p < 0,0001$] e GFP [U =2,337; $p = 0,06$]. Quando foi avaliada o potencial imunogênico da Cruzipaina em soros de pacientes separados por manifestações clínicas houve diferença nos níveis de IgGs detectados [$F(4,39) = 5,956$; $p < 0,001$] (Figura 35). A detecção dos anticorpos dos pacientes das formas digestiva ($p < 0,001$) e Indeterminada ($p < 0,01$) da DC foram mais significativas em relação as outras formas como mostrado na Figura 35.

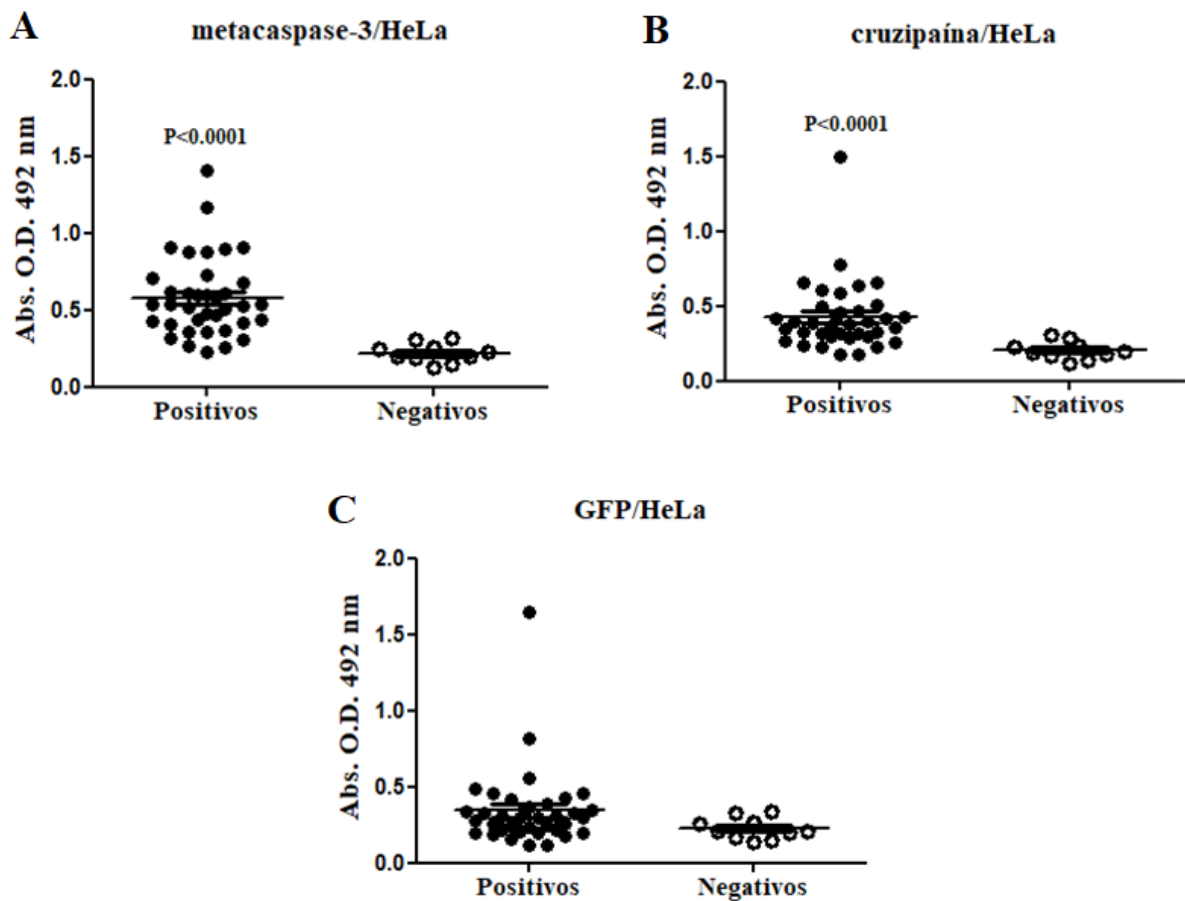


Figura 34: Níveis de IgG anti-*T. cruzi* em amostras de soro de indivíduos chagásicos (Positivos) e não-chagásicos (Negativos) avaliados por ELISA. Os gráficos mostram em: A) O valor da absorbância dos anticorpos IgG anti- *T.cruzi* de soros de pacientes chagásicos crônicos 0,53 (0,41-0,69) e de pacientes não chagásico 0,21 (0,17-0,27) adsorvidos à metacaspase-3/GFP expressa em HeLa; B) Soros de pacientes chagásicos crônicos 0,37 (0,27-0,48) e de pacientes não chagásico 0,18 (0,16-0,24) adsorvidos à cruzipaina/GFP; C) Soros de pacientes chagásicos crônicos 0,29 (0,21-0,37) e de pacientes não chagásico 0,20 (0,16 - 0,27) adsorvidos à GFP . As barras representam a mediana e a faixa de 25% a 75% da amostra.

Na Figura 36 demonstra que houve diferença na detecção dos anticorpos dos pacientes crônicos com diferentes quadros clínicos da DC [$\chi^2(4) = 30,539$; $p < 0,001$] contra a metacaspase-3, porém só a detecção dos anticorpos dos pacientes com a forma mista da DC não foi significativa. O controle como mostrado na Figura 37, também apresentou propriedade imunogênica, apesar do resultado do teste de ELISA ter mostrado que houve diferença [$\chi^2(4) = 11,29$; $p = 0,0235$] essa diferença não foi significativa para o teste de comparações múltiplas de Dunn.

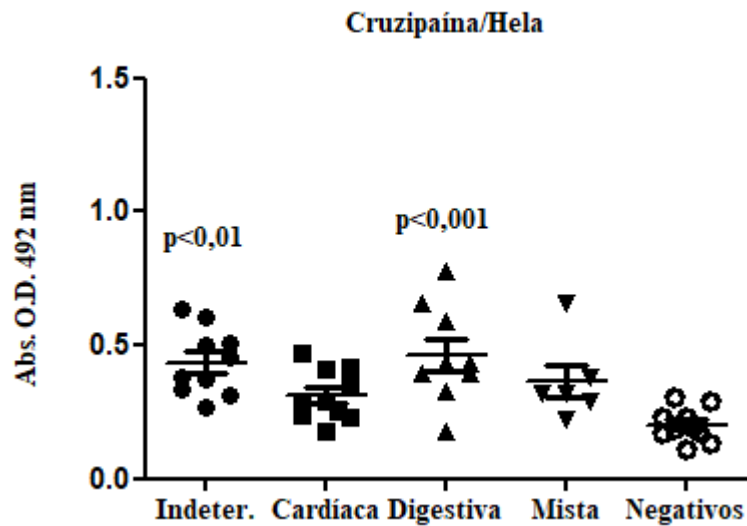


Figura 35: Níveis de IgG anti-T. cruzi em amostras de soros de indivíduos chagásicos crônicos e não-chagásicos (Negativos) separados pelas manifestações clínicas avaliados por ELISA. O gráfico mostra a resposta dos anticorpos IgGs dos soros de pacientes com forma Indeterminada 0,43 (±0,03); Cardíaca 0,31 (±0,03); Digestiva 0,46 (±0,06) e Mista 0,36 (±0,06) em comparação a resposta dos anticorpos de pacientes não chagásico 0,20(±0,01) adsorvidos a Cruzipaina/GFP expressa em células Hela. As barras representam a Média e o (±EP).

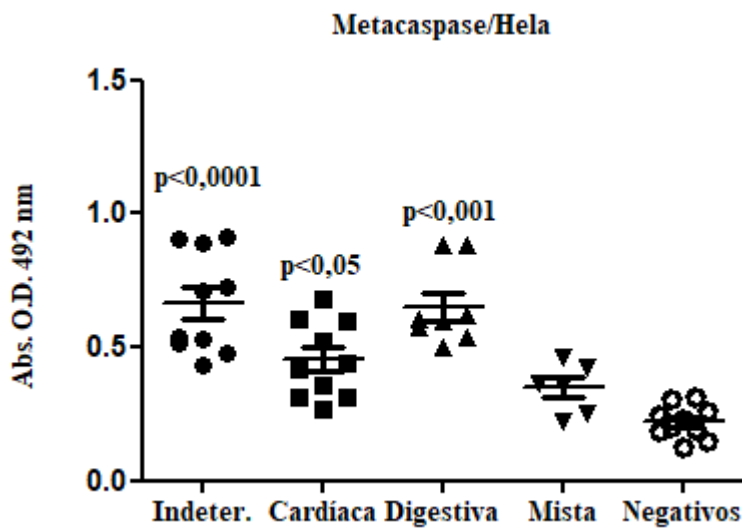


Figura 36: Níveis de IgG anti-T. cruzi em amostras de soros de indivíduos chagásicos crônicos e não-chagásicos (Negativos) separados por manifestações clínicas avaliados por ELISA. O gráfico mostra a resposta dos anticorpos IgG dos soros de pacientes com forma Indeterminada 0,62 (0,50-0,89); Cardíaca 0,42 (0,31-0,60); Digestiva 0,60 (0,54-0,81) e Mista 0,36 (0,24-0,43) em comparação a de pacientes não chagásico 0,21 (0,17-0,27) adsorvidos a Metacaspase-3/GFP expressa em célula Hela. As barras representam a mediana e a faixa de 25% a 75% da amostra.

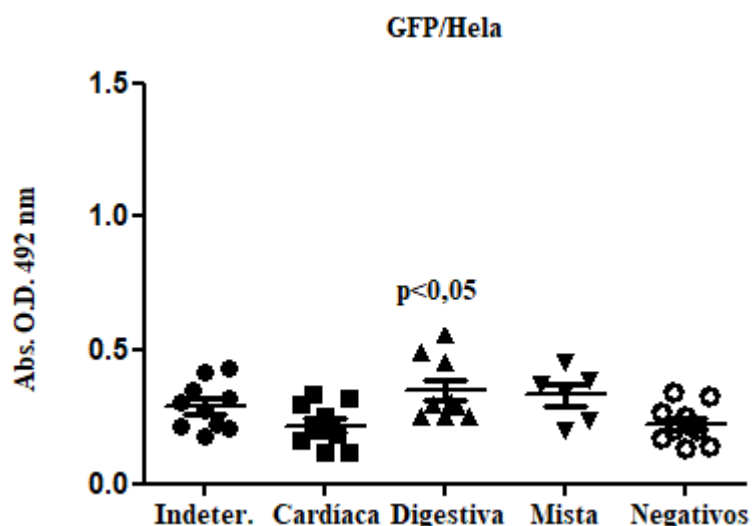


Figura 37: Níveis de IgG anti-T. cruzi em amostras de soros de indivíduos chagásicos crônicos e não-chagásicos (Negativos) separados por manifestações clínicas avaliados por ELISA. O gráfico mostra a resposta dos anticorpos IgG dos soros de pacientes com forma Indeterminada 0,28 (0,21-0,36); Cardíaca 0,19(0,14-0,30); Digestiva 0,29 (0,25-0,47) e Mista 0,35 (0,22-0,40) em comparação a de pacientes não chagásico 0,20 (0,16-0,27) adsorvidos a GFP expressa em célula Hela. As barras representam a mediana e a faixa de 25% a 75% da amostra.

1.6. Discussão

No presente estudo avaliamos as proteínas metacaspase-3 e cruzipaina de *Trypanosoma cruzi* obtidas em diferentes sistemas de expressão heteróloga como *Escherichia coli*, Baculovírus (em células de inseto) e células de mamífero. Estas proteínas foram utilizadas em ensaios imunoenzimáticos indiretos (ELISA), contra soros de pacientes crônicos de DC, com intuito de verificar o potencial uso em exames sorológicos para o diagnóstico e diferenciação das diferentes formas de manifestações da DC crônica. Todos os soros dos pacientes chagásicos testados contra a metacaspase-3 expressa nos três sistemas apresentaram reatividade diferencial comparados aos soros do grupo controle não infectado.

Os níveis de IgGs dos pacientes crônicos indeterminados e cardíacos foram os mais elevados quando testados contra a metacaspase-3 expressa em *E. coli*, enquanto os anticorpos dos soros de pacientes com a forma digestiva foram reativos contra a metacaspase-3 expressa em baculovírus. Já com a metacaspase-3/GFP expressa em HeLa apenas os

pacientes com a forma Mista não foram reagentes. Em razão de algumas limitações, a cruzipaína não pôde ser testada a tempo nos sistemas de expressão baculovírus e *E. coli*. Por isso, essa proteína foi somente expressa em células HeLa. Os soros de pacientes positivos foram bastante reativos contra a cruzipaína e sendo possível diferenciar os pacientes com a forma indeterminada e digestiva das demais. Pode-se cogitar de um possível efeito adjuvante da GFP sobre a metacaspase-3 ou cruzipaina, na adsorção dos anticorpos dos pacientes positivos da DC, quando se observa o resultado da GFP recombinante sozinha. Há trabalhos relatando a imunogenicidade da GFP e seu potencial gerador de resposta imune em camundongos e macacos rhesus (Skelton et al., 2001 e Stripecke et al., 1999). Anvar e colaboradores relataram em seu trabalho no qual utilizou a HMGB1, uma proteína que tem um papel importante como mediador da inflamação, fusionada a GFP para avaliar a resposta imune em camundongos. Os autores observaram que a proteína inflamatória potencializava a resposta imunológica produzida pela GFP, porém a GFP sozinha era menos eficaz em produzir essa resposta em camundongos. Esse efeito pode ser observado em nosso trabalho nas figuras 34 C e 37, onde observa-se valores de absorbâncias menores para GFP sozinha do que para outras proteínas fusionadas.

Apesar de a proteína GFP isoladamente apresentar certa imunogenicidade e baixa reação cruzada com anticorpos IgGs de soros de pacientes com DC, as quantidades de epítomos para célula B preditos para GFP foram bem menores do que os preditos em metacaspase-3 e cruzipaína (ANEXO B). Os epítomos preditos com 95% de especificidade para metacaspase-3 se apresentaram bem distribuídos pela proteína. Enquanto que na cruzipaina, esses epítomos ficaram restritos ao domínio C-terminal, uma região tida como potencialmente imunogênica devido às glicosilações. Apesar da metacaspase-3 não encontrar correspondente estrutural no proteoma de mamíferos, o seu uso como antígeno para imunodiagnóstico pode apresentar reações cruzadas devido as semelhanças com proteínas de outros tripanossomatídeos como *Leishmania brasiliensis* e *Leishmania infatum*. Contudo testes com soros de pacientes com leishmanios deverão ser realizados para avaliar essas reações cruzadas e para confirmá-las.

Para a DC e outras muitas doenças, o desenvolvimento de novos testes sorológicos baseados em ensaios imunoenzimáticos indiretos (ELISA) é parcialmente limitado pela disponibilidade de antígenos caracterizados contendo epítomos de células B

imunodominantes (Lopez et al., 2018). E não raro essas regiões de epitopos são similares entre diferentes organismos, desencadeando reações cruzadas afetando a interpretação e padronização dos resultados de ELISA. Para contornar essas limitações algumas abordagens tecnológicas como os microarranjos de peptídeos surgem como uma das alternativas mais proeminentes e revolucionárias para a triagem sorológica multiplexada (Pellois et al., 2002; Lopez et al., 2018), porém ainda é bastante dispendioso. Sendo assim o ELISA é o teste que ainda é mais acessível para as pesquisas de base (SANTOS et al., 2016).

A cruzipaína é uma proteína bastante explorada como alvo para o desenvolvimento de fármacos para DC, devido às funções desempenhadas no ciclo de vida do *T. cruzi*, porém dados na literatura sobre o seu uso em testes em ensaios imunoenzimáticos indiretos (ELISA) ainda são escassos apesar de ser bastante imunogênica. No nosso trabalho, exploramos o potencial imunogênico dessa proteína em amostras de soros de pacientes chagásicos (Ferrão et al., 2015; Duschak & Couto, 2009; Giordanengo et al., 2002; Uehara et al., 2012; Sbaraglini et al., 2016)

O diagnóstico da DC, na fase aguda, é baseada em febre prologada e outros sinais sugestivos da doença. Enquanto que na fase crônica, a suspeita diagnóstica é baseada nos achados clínicos e na história epidemiológica. É nessa fase que grande parte dos pacientes apresentam a forma indeterminada, que é caracterizada pela presença de infecção pelo *T. cruzi*, ausência de manifestações clínicas, radiológicas e eletrocardiográficas (Ribeiro & Rocha, 1998). Todavia, 45% desses pacientes podem vir a desenvolver a forma cardíaca, enquanto que a forma digestiva pode aparecer em 20% desse grupo, complicações que geralmente aparecem de 10 a 20 ano após a infecção. O monitoramento desses pacientes crônicos é imprescindível, nesse sentido testes sorológicos que possam indicar uma possível manifestação antes que ela evolua, pode nortear o tratamento desses pacientes. Nesse trabalho procuramos avaliar a metacaspase-3 e a cruzipaína para uso nesse diagnóstico diferencial, ou seja, conseguir separar os perfis sorológicos das manifestações clínicas da DC por meio de ensaios imunoenzimáticos indiretos (ELISA). Essas proteínas testadas aqui apresentaram esse potencial. Contudo, estudos com mais profundidade são fundamentais para melhor avalia-las.

1.7. Conclusão

- O sistema de expressão em baculovirus foi o mais eficiente para expressão heteróloga da proteína metacaspase-3 de *T. cruzi*;
- As proteínas metacaspase-3 e cruzipaína, quando expressas em células HeLa localizam-se no citoplasma da célula, assim como a proteína controle GFP;
- A expressão em sistemas eucarióticos, células de insetos e células HeLa aumentaram o potencial imunogênico da proteína metacaspase-3;
- A proteína metacaspase-3 apresenta maior potencial para aplicação no diagnóstico sorológico diferencial da doença de Chagas crônica comparada à proteína cruzipaína de *T. cruzi*.

**CAPÍTULO II-EFEITO DA METCASPASE E CRUZIPAÍNA NA EXPRESSÃO
DE GENES LIGADOS À APOPTOSE E AUTOFAGIA**

Resumo

T. cruzi é um parasita intracelular obrigatório que infecta uma variedade de células hospedeiras em mamíferos, e durante a infecção adota diferentes estratégias para modular a resposta imune do hospedeiro para estabelecer a parasitemia e a infecção permanente. Uma dessas estratégias é a indução da morte por apoptose das células da resposta imune e a outra é uma ação antiapoptótica nas demais células hospedeiras. A infecção constitui uma forma de estresse para a célula hospedeira, no entanto as células resistem e não ativam as vias de morte celular que poderiam auxiliar na eliminação do *T. cruzi* antes que ele possa se replicar. Para entender esses processos, nosso trabalho teve como objetivo avaliar os níveis de expressão de genes ligados à apoptose e à autofagia, e para isso, analisamos cinco genes apoptóticos: Caspase 9, Caspase 8, Caspase 3, Bax, Bcl2 e dois ligados à autofagia ATG5 e ATG7. Células HeLa foram utilizadas para a expressão heteróloga de duas proteínas de *T. cruzi*: a metacaspase-3 e a cruzipaina, células HeLa com o plasmídeo vazio (GFP) foram utilizadas como controle. Os RNAs totais dessas células foram coletados e convertidos em cDNAs. A técnica de PCR em tempo real foi empregada para avaliar as expressões dos genes-alvos. Não houve diferença na expressão dos genes analisados. No entanto, pesquisas tem mostrado que células HeLa tem apresentado padrões de expressão de vias importantes significativamente diferente de células humanas normais, o que pode levar a resultados inesperados. Todavia, os dados foram logaritmizados e reavaliados. As Células HeLa que expressavam metacaspase-3 tiveram um aumento de ATG7 e Bcl2, enquanto os níveis de expressão de Bax permaneceram próximos ao controle. A cruzipaina também apresentou aumento nos níveis de Bcl2. Os níveis de Bax tanto em células com metacaspase-3 quanto cruzipaina se mantiveram estáveis em relação ao controle. Pode se supor que essas proteínas estejam tendo um efeito antiapoptótico agindo pela via intrínseca, antes da cascata de caspases, sendo o efeito da cruzipaina mais evidente pelos baixos níveis de caspase 3 e caspase 9. Esses resultados reforçam o papel modulador dessas moléculas de *T. cruzi* sobre as vias de sobrevivência e morte da célula hospedeira.

Palavras-chaves: Apoptose. Doença de Chagas. *Trypanosoma cruzi*. HeLa.

Abstract

T. cruzi is an obligate intracellular parasite that infects a variety of host cells in mammals, and during infection adopts different strategies to modulate host immune response to establish parasitaemia and permanent infection. One such strategy is the induction of death by apoptosis of immune response cells and the other is an anti-apoptotic action in host cells. Infection constitutes a form of stress to the host cell, however the cells resist and do not activate the cell death pathways that could aid in the elimination of *T. cruzi* before it could replicate. To understand these processes, our work aimed to evaluate the expression levels of genes linked to apoptosis and autophagy, and for this, we analyzed five apoptotic genes: Caspase 9, Caspase 8, Caspase 3, Bax, Bcl2 and two linked to autophagy ATG5 and ATG7. HeLa cells were used for the heterologous expression of two *T. cruzi* proteins: metacaspase-3 and cruzipain, HeLa cells with the empty plasmid (GFP) were used as control expression. Total RNAs from these cells were collected and converted into cDNAs. The real-time PCR technique was used to evaluate target gene expressions. There was no difference in expression of the analyzed genes. However, data from other studies have shown that HeLa cells have displayed expression patterns of important pathways significantly different from normal human cells, which can lead to unexpected results. However, the data were converted to logarithmic and the data reassessed. HeLa cells expressing metacaspase-3 had an increase in ATG7 and Bcl2, while Bax expression levels remained close to control. The cruzipain also presented increase in the levels of Bcl2. The levels of Bax in both cells with metacaspase-3 and cruzipain remained stable in relation to the control group. It can be assumed that these proteins may have an antiapoptotic effect through the intrinsic pathway, acting before the caspase cascade, with the effect of cruzipain being more evident by the low levels of caspase 3 and caspase 9. These results reinforce the modulatory role of these *T. cruzi* molecules on the survival and death pathways of the host cell.

Keywords: Apoptosis. Chagas Disease. *Trypanosoma cruzi*. HeLa

2.1. Introdução

Tripanossomíase Americana ou doença de Chagas (DC) é a infecção causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* que foi descrita há um século por Carlos Justiano Chagas. Estima-se que 8 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas pelo *T. cruzi* (WHO), e aproximadamente 1 milhão de pessoas no Brasil segundo o Ministério da saúde (Brasil). *T. cruzi* é um parasita intracelular obrigatório que infecta uma variedade de células hospedeiras em mamíferos, mas mostra preferência por macrófago e células musculares lisas e cardíacas (Decote-Ricardo et al., 2017; Guarner, 2019; Molina & Molina, 2018). Após infectar essas células, os tripomastigotas escapam do vacúolo parasitóforo e se diferenciam em amastigotas no citoplasma das células hospederias e replicam-se por divisão binária (Molina & Molina, 2018). Posteriormente diferenciam-se em tripomastigotas e rompem a célula hospedeira reiniciando a infecção (Decote-Ricardo et al., 2017; Guarner, 2019). Trabalhos tem demonstrado a existência de diferentes estratégias do *T. cruzi* em modular a resposta imune do hospedeiro para se estabelecer uma infecção persistente. Uma dessas estratégias é a indução da morte por apoptose de linfócitos T e B (Decote-Ricardo et al., 2017; ZUÑIGA et al., 2001; Silva et al., 2007). Nos próximos parágrafos serão descritos com maiores detalhes os processos de apoptose e autofagia.

2.1.1. Apoptose

A apoptose é um conjunto de eventos moleculares e bioquímicos controlados para manutenção da homeostasia dos tecidos, ela se caracteriza por mudanças morfológicas, fragmentações inter nucleossômicas do DNA, formações dos corpos apoptóticos e intensa atividade fagocítica (Grivicich et al., 2007; Saraste et al., 2000). A apoptose é desencadeada por séries de clivagens realizadas por proteases, as caspases “cysteine-dependent aspartate-specific proteases” (Polcic *et al.*, 2017). Há duas categorias de caspases: as iniciadoras que iniciam a cascata proteolítica e as efetoras que clivam os substratos (Grivicich et al., 2007). Há vários fatores gerados por condições de estresse extra e intracelulares como patógenos, radicais livres, agentes oxidantes e baixas concentrações de nutrientes que podem desencadear

a apoptose (Rudel, Kepp & Kozjak-Pavlovic, 2010). E ela pode ser acionada de duas maneiras: pela via extrínseca (via receptores de morte celular) e pela via intrínseca (via mitocondrial) (Grivicich et al., 2007; Saraste et al., 2000; Carmen & Sinai, 2007). O mecanismo da via extrínseca consiste na indução externa por associação de outra célula que por meio de receptores localizados na membrana celular ou por proteínas sinalizadoras (CD95L), e os receptores pertencentes à superfamília dos receptores de necrose tumoral (rTNF). Esta ligação é capaz de ativar a cascata das caspases quando os receptores de morte celular reconhecem um ligante específico, como por exemplo, Fas-FasL. Essas moléculas têm a capacidade de recrutarem a caspase 8 que irá ativar a caspase 3, executando a morte por apoptose (Grivicich et al., 2007; Decote-Ricardo et al., 2017; Polcic *et al.*, 2017) (Figura 39). A via intrínseca é sinalizada por estresse intracelular/extracelular como fatores nutricionais, danos ao DNA ou patógenos intracelulares (Akarid, *et al.*, 2004; Carmen, Hardi, & Sinai, 2006; Goebel, Gross, & Luder, 2001; Aoki, *et al.*, 2004; Aoki, *et al.*, 2006; Nakajima-Shimada, *et al.*, 2000; Carmen, Hardi, & Sinai, 2006; Nakajima-Shimada, *et al.*, 2000; Hashimoto, *et al.*, 2005). Quando esses estímulos proapoptóticos são recebidos, as proteínas com domínios BH3- apenas sinalizam as proteínas Bax e Bak a formarem um poro na membrana externa da mitocôndria, levando ao desequilíbrio quimio-osmótico desencadeando a despolarização da membrana mitocondrial interna, e aumentando a permeabilidade mitocondrial levando à liberação de proteínas pró-apoptóticas para o citoplasma como o citocromo *c* onde participa da ativação da apoptose. O citocromo *c* forma um complexo com a APAF- 1 e a caspase 9, o chamado apoptossomo, que promove a clivagem da pró-caspase 9, liberando a caspase 9, que ativa a caspase 3 ocasionando a apoptose. Enquanto as proteínas Bax e Bak atuam na ativação da cascata das caspases. As antiapoptóticas Bcl2 e Bcl-XL tem a função de inativar as proteínas proapoptóticas, tanto na membrana mitocondrial, quanto no citoplasma, impedindo a formação de poros e consequentemente a saída do citocromo *c*, desativando a cascata apoptótica. (Grivicich et al., 2007; Polcic *et al.*, 2017)(Figura 38).

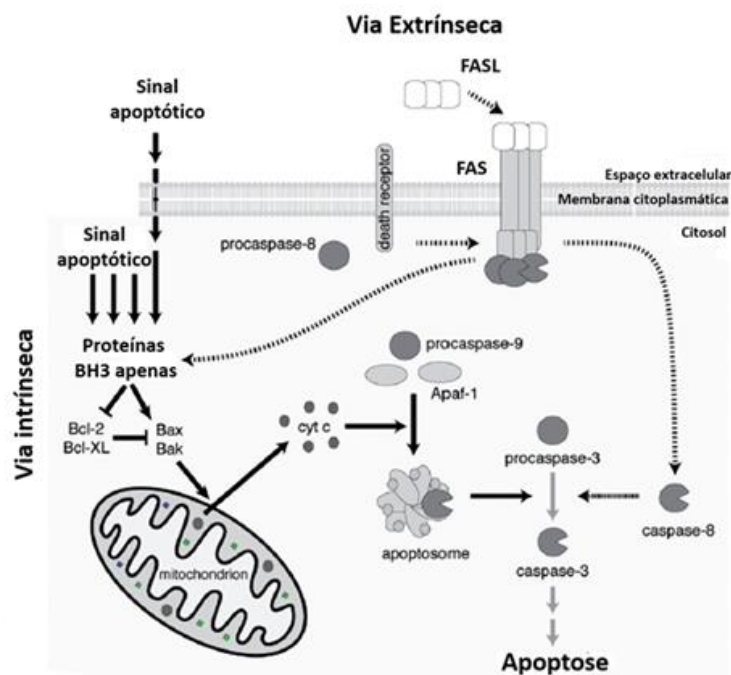


Figura 38: Esquema mostrado as vias de ativação da apoptose. A apoptose é um processo ativo em que a célula sofre uma série de alterações morfológicas no citoplasma e núcleo e pode ser ativada por duas vias de sinalização: a via extrínseca ou via intrínseca. A via extrínseca consiste na indução externa por meio de receptores localizados na membrana e proteínas sinalizadoras, enquanto que a via intrínseca da apoptose é aquela em que a própria célula deflagra o início do processo, quando há alterações internas severas. Sendo que qualquer uma das vias ativada, irá acionar proteínas proapoptóticas, tanto no citosol quanto na membrana mitocondrial liberando o citocromo C, e conseqüentemente, dando início a cascata apoptótica de ativação das caspases. As procaspases que atuam no início das cascata proteolítica, clivam e ativam as caspases executoras e outras proteínas na célula que clivam o DNA no núcleo e outros componentes do citoesqueleto e proteínas de adesão, levando a inativação da célula (Modificada de Polcic *et al.*, 2017).

2.1.2 Necrose e Necroptose

A necrose é um tipo de morte não programada na qual as células sofrem uma injúria que resulta no aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e extravasamento celular (Grivicich *et al.*, 2007). A necroptose é uma forma programada da necrose ou morte celular inflamatória. Ela atua como uma alternativa de morte celular nos casos em que os mecanismos da apoptose falham, como por exemplo, durante uma infecção viral (Saga *et al.*, 2015). A sinalização extrínseca necroptótica através do receptor de TNF pelo TNF α sinaliza o recrutamento do

domínio de morte associado ao receptor de TNF (TRADD) que por sua vez recruta o RIPK1 (Berghe et al., 2014). Na ausência de Caspase 8 ativa, RIPK1 e RIPK3 auto e trans fosforilam entre si, levando à formação de um complexo semelhante a um microfilamento chamado necrossoma. O necrossoma então ativa a proteína pró-necroptótica MLKL via fosforilação. A MLKL atua na necrose, inserindo-se nas membranas das organelas e da membrana plasmática, levando à liberação do conteúdo celular para o espaço extracelular incluindo os Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs) (Figura 39) (Wang et al., 2014; Vandenabeele et al., 2010). Estes DAMPs sinalizam o recrutamento de células imunológicas para o tecido danificado, eliminando os restos de células necróticas por macropinosomas (Berghe et al., 2014; Wang et al., 2014; Vandenabeele et al., 2010). Há estudos que relatam a interação entre as vias de apoptose e necroptose e muitas vezes autorregulando se, como a inibição da formação do necrossoma pela caspase 8. (Nikoletopoulou et al., 2013; Kharaziha et al., 2015; Goodall et al., 2016). Muitos componentes das duas vias são compartilhados como os receptores de necrose tumoral (rTNF), a proteína RIPK1 também pode sinalizar tanto apoptose quanto necroptose dependendo de modificações pós-traducionais mediadas por outras proteínas sinalizadoras. Além disso, o RIPK1 pode ser regulado pelo inibidor celular das proteases de apoptose 1 e 2 (cIAP1, cIAP2) que poliubiquitinam o RIPK1 conduzindo sobrevivência celular através da sinalização de NF- κ B downstream. O cIAP1 e o cIAP2 também podem ser regulados pela proteína pró-apoptótica SMAC (segundo ativador de caspases derivado de mitocôndrias) que pode clivar o cIAP1 e o cIAP2 levando a célula à morte por apoptose (Berghe et al., 2014; Chan *et al.*, 2015).

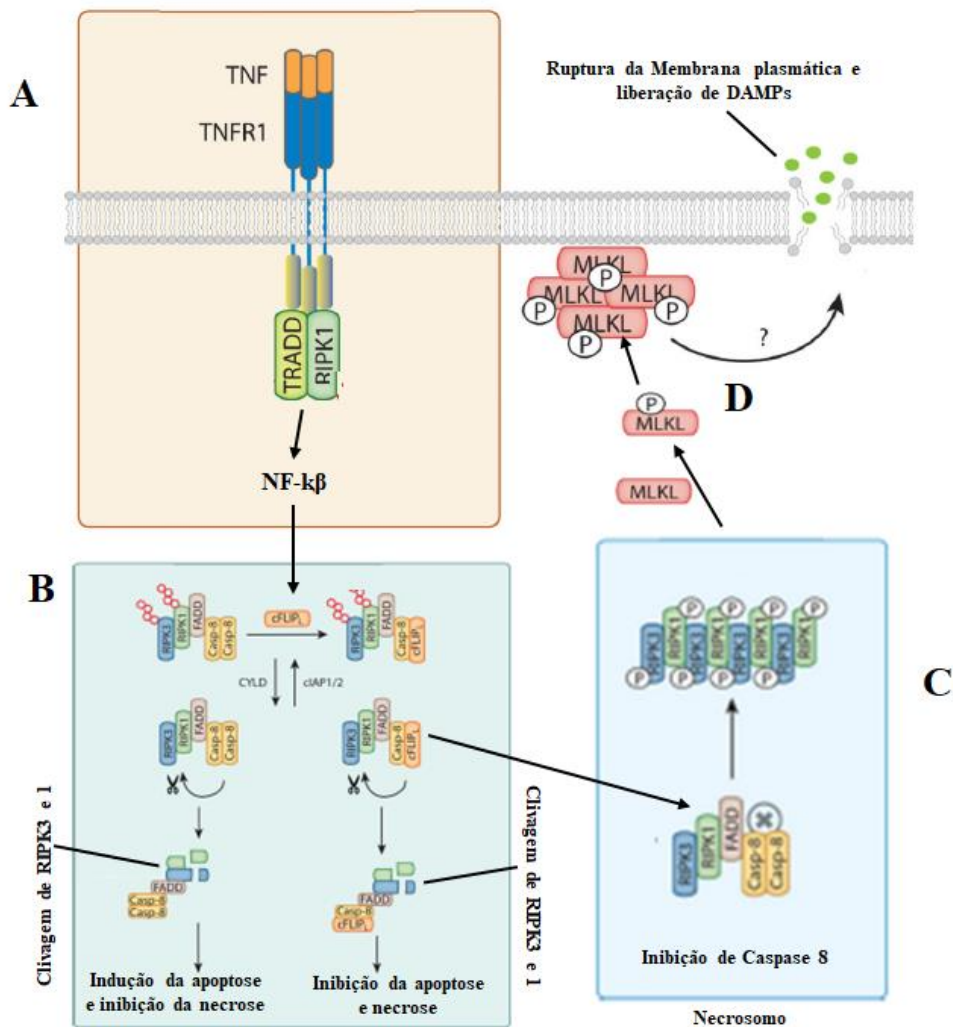


Figura 39: Em A o complexo receptor de TNF (TRADD) associado à membrana plasmática é o principal responsável pela ativação do NF-κB. As cadeias de ubiquitina são representadas pelos hexágonos vermelhos. A indução da expressão de cFLIP_L pelo NF-κB inibe a apoptose e a necroptose. A caspase 8 ativa no complexo B promove a apoptose e inibe a necroptose pela clivagem de RIPK1, RIPK3 e CYLD (enzima deubiquitinante). Quando a caspase 8 é inativa, RIPK1 e RIPK3 iniciam a montagem do complexo C; em D ocorre a conversão de amilóide e o recrutamento de MLKL (Proteínas com domínio tipo quinase de linhagem mista) que são fosforiladas por RIPK3 e direcionadas à membrana plasmática onde executa o programa de necrose que é caracterizada pelo influxo de cálcio e danos a membrana com liberação de DAMPs. O Complexo B e o Complexo C também são regulados por ubiquitinação. A CYLD atua promovendo a atividade do complexo B, removendo as cadeias de ubiquitina em RIPK1 e RIPK3 (Modificada de Chan *et al.*, 2015).

2.1.3 Autofagia

A autofagia é um processo catabólico e conservado em que a célula degrada o conteúdo intracelular ou extracelular no lisossoma e recicla os constituintes básicos e moleculares com a finalidade de manter a homeostase celular (Costas & Rubio, 2017; Mcewan, 2017; Münz, 2014; Saha et al., 2018; Polcic *et al.*, 2017). A autofagia pode ser dividida em três classes: A microautofagia, que é o envolvimento direto do substrato pelo lisossoma resultando na degradação do corpo intravesicular. A autofagia mediada por chaperona, que é o transporte proteínas citosólicas via peptídeos sinalizadores regulado por chaperonas. E por último a macroautofagia, que é aprisionamento do conteúdo citoplasmático envolto de uma vesícula formada por dupla membrana que se funde com os lisossomos formando um autolisossoma (Mcewan, 2017; Münz, 2014; Saha et al., 2018) (Figura 40).

Em mamíferos, o processo de autofagia se inicia com a sinalização da via mTOR (mammalian target of rapamycin) que é inativado (Saha et al., 2018). A via mTOR é composta por duas subvias: a mTOR1 e mTOR2, sendo que a mTOR 2 é responsável por controlar a actina do citoesqueleto da células definindo a forma que ela irá tomar e a mTOR 1 é responsável pelo controle da autofagia. Durante o processo de autofagia, a mTOR 1 forma um complexo que regula downstream por fosforilação / desfosforilação as proteínas quinase UKL1 / UKL2 (UNC-51 like kinase 1 e 2) que dão início ao processo de nucleação (Costas & Rubio, 2017; Saha et al., 2018). Grande parte desse processo é mediada pelas proteínas da família ATG (autophagy-related gene) (Costas & Rubio, 2017), além de outras quinases, como AMPK e PKA que por sua vez, regulam a atividade do complexo ULK1 / 2, FIP200 e ATG9 e ATG13. A quinase ULK1 fosforila Beclin, proteína que faz parte do complexo iniciador da nucleação, que ativa o complexo PIK3 (Phosphoinositide 3-kinase) e faz o recrutamento de ATG para a expansão da membrana lipídica para a formação do autofagossomo (Costas & Rubio, 2017; Mcewan, 2017; Münz, 2014; Saha et al., 2018). O complexo ATG5/ATG12/ATG16L é o responsável pelo alongamento do fagóforo e consequente interação com o autofagossomos (Ramírez-Sagredo et al., 2016). A conjugação desse complexo requer a ação da ATG7 que tem ação semelhante à enzima ativadora da ubiquitina E1. A ATG7 ativa primeiro ATG12, seguido pela conjugação da ATG5 por ATG10 e por último a ligação de ATG16 ao complexo que posteriormente permite a inserção

da LC3II à membrana do fagóforo. A proteína LC3 é sintetizada como pro-LC3, que é clivada por ATG4, gerando a forma ativa LC3-I no citosol. Subsequentemente, os lipídios são incorporados no LC3-I pela ação de ATG7 e ATG3 a membrana do fagóforo. A ligação de LC3-II ao fagóforo é necessária para o fechamento da vesícula. Após a formação do autofagossomo, o complexo ATG5 / ATG12 / ATG16 é dissociado e o LC3-II é liberado da membrana externa. Este autofagossoma nu é fundido com lisossomos pela ação das proteínas Rab7 e Lamp2. E por fim, os substratos são degradados pela ação das enzimas lisossomais no autofagolisossomo e os produtos liberados no citoplasma (Saraste et al., 2000; Codogno & Meijer, 2006; Mehrpou et al., 2010; Münz, 2014; Chan *et al.*, 2015; Ramírez-Sagredo et al., 2016; Mcewan, 2017; Saha et al., 2018). Há vários trabalhos mostrando a interação entre reguladores de autofagia e apoptose (Nikoletopoulou et al., 2013; Wang, 2015; Li et al., 2016; Goodall et al., 2016; Kasprowska-Liśkiewicz, 2017). Um exemplo desta interação é a ação de ATG5 que interagindo com Bcl-XL na mitocôndria ativa a cascata de caspases, assim como o efeito de ATG7 inibindo a ação de p53 e consequentemente Bax entre outras proteínas subsequentes na cadeia de efeitos apoptóticos (Codogno & Meijer, 2006; Mehrpou et al., 2010; Yonekawa & Thorburn, 2013) (Figura 41).

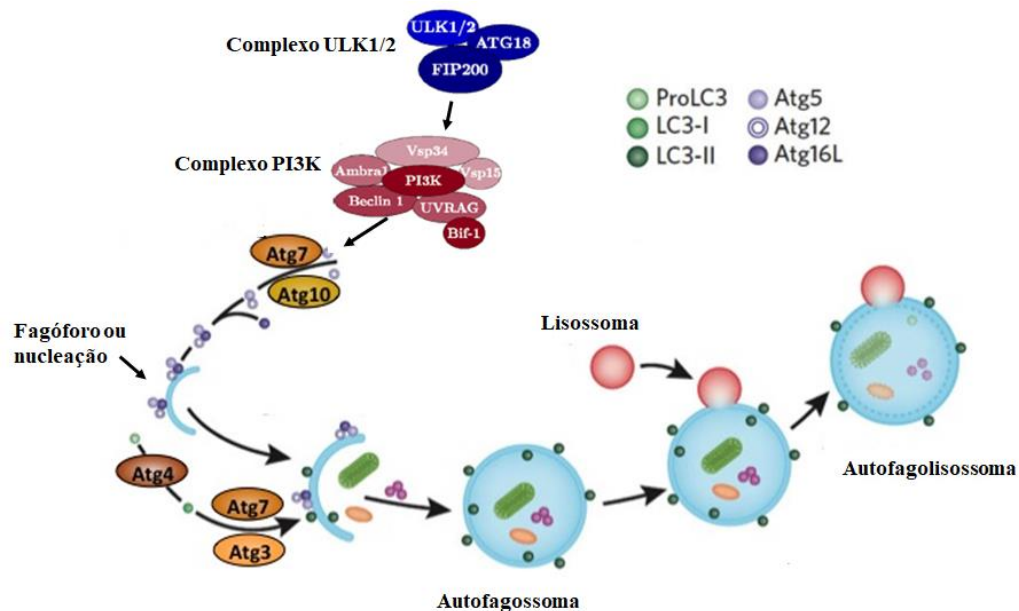


Figura 40: A autofagia é iniciada pela ativação do complexo ULK1/2, que ativa o complexo PI3K que faz o recrutamento de proteínas do complexo ATG5 / ATG12 / ATG16 para a formação do fagóforo ou nucleação. Após o processamento de LC3 por ATG4 e sua inserção na membrana do fagóforo pelas ATG7 e ATG3 produz

a formação do autofagossoma que é então fundida com o lisossomo formando o autofagolisossoma, onde ocorre a degradação do substrato, cujos produtos são liberados no citoplasma (modificada de Swart et al., 2016).

2.1.4 *Trypanosoma cruzi* vs apoptose e autofagia

Vários patógenos humanos intracelulares e extracelulares foram relatados como capazes de afetar as vias de morte celular das células infectadas, principalmente bactérias (Rudel, Kepp & Kozjak-Pavlovic, 2010). Há também descrições de alguns protozoários que podem de certa forma alterar a via apoptogênica (Carmen & Sinai, 2007). No entanto, a maioria dos estudos demonstraram o efeito ativador ou inibidor da morte celular, mas não conseguiram determinar precisamente os alvos que estavam sendo atingidos pelas proteínas oriundas dos patógenos (Rudel, Kepp & Kozjak-Pavlovic, 2010; Carmen & Sinai, 2007). Em relação aos alvos mitocondriais foram descritos a inibição da liberação da citocromo *c* por *Leishmania major* (Akarid, et al., 2004) e *Toxoplasma gondii* (Carmen, Hardi, & Sinai, 2006; Goebel, Gross, & Luder, 2001), o aumento de BCL-2 e BCL-XL em *Trypanosoma cruzi* (Aoki, et al., 2004; Aoki, et al., 2006; Nakajima-Shimada, et al., 2000) e em *T. gondii* (Carmen, Hardi, & Sinai, 2006; Goebel, Gross, & Luder, 2001), a inativação ou diminuição de BAD ou BAX em *T. gondii* (Carmen, Hardi, & Sinai, 2006) em *L. Major* e *amazonensis* (Aoki, et al., 2006) e em *T. Cruzi* (Nakajima-Shimada, et al., 2000; Hashimoto, et al., 2005).

Há vários relatos que mostram os diferentes mecanismos modulatórios do *T. cruzi* sobre as vias que controlam apoptose e autofagia (Decote-Ricardo et al., 2017). O *T. cruzi* secreta proteínas que podem interagir com vias de sinalização e promover a invasão celular, uma bastante estudada é a peptidase cruzipaina. O efeito dessa cisteino protease impedindo a ativação de macrófagos durante os estágios iniciais da infecção, interrompendo a via de sinalização mediada por NF-kB. Isso permite que o parasita sobreviva e se replique e pode contribuir para a disseminação da infecção na doença de Chagas aguda. (Gantt et al., 2003; Waghbi et al., 2005; Watanabe et al., 2016). Esses achados sobre a sobrevivência do *T. cruzi* no hospederio tem sugerido o efeito da cruzipaina regulando proteínas efetoras downstream de PI3K e MEK1. Além disso, durante a infecção por *T. cruzi*, a cruzipaina promove a fosforilação de ERK1/2 e Akt, e inibe a clivagem proteolítica de caspase 3 via PI3K e vias de

sinalização dependentes de MEK1 (Fujio et al., 2000; Aoki et al., 2006). Sugerindo atividade antiapoptótica.

Outro estudo mostrou que o efeito antiapoptótico da cruzipaina pela atividade da arginase e na expressão do Bcl-2 (Aoki et al., 2004; Watanabe et al., 2016). Trabalhos tem sugeridos um efeito deletério na infecção do hospedeiro causando uma diminuição da população de linfócitos T e B (Dos Reis, 2011). Em experimentos com camundongos deficientes em FasL infectados com *T. cruzi*, as células T CD4+ não sofreram morte por apoptose ao contrário dos camundongos controle em que houve um aumento da expressão e função do Fas / FasL em células T CD4 + (Lopes et al., 1999). Fato também observado em pacientes crônicos (Rodrigues et al. 2008). Trabalhos com inibidores de caspases 8 mostraram inibição na expansão de linfócitos T com um aumento da parasitemia de *T. cruzi*, em contraste quando utilizaram um pan inibidor de caspase ou anti-FasL reduziram as mortes por apoptoses de células T e uma redução da parasitemia fato comentado em Decote-Ricardo et al., 2017. Como na apoptose, o *T. cruzi* também pode manipular a autofagia em mamíferos em seu próprio benefício (Salassa et al., 2019). Onizuka e colaboradores demonstraram seu trabalho que células infectadas com *T. cruzi* aumentam o nível de LC3 e LC3-II, formando autofagossomos, porém não sendo detectado autolisossomos com o parasita sugerindo uma possível indução de uma forma incompleta de autofagia (Onizuka et al., 2017). Em outro trabalho, Casassa et al., 2019 trabalhando com um modelo agudo de infecção em camundongos knock-off heterozigotos autofágicos com deficiência de Beclin-1, mostraram que a infecção foi mais agressiva nos camundongos deficientes em autofagia, que apresentaram maior número de parasitemia, foi observado também que parasitas citossólicos livres recrutaram a proteína LC3 e outros marcadores de xenofagia (autofagia setetiva) no controle, sugerindo um papel protetor contra a infecção.

Contudo, pode-se depreender dos vários trabalhos que o *T. cruzi* modula vias de apoptose e autofagia de diferentes maneiras: uma é manter a célula infectada sob ações antiapoptóticas e a outra é reduzindo a resposta imune por estimular a apoptose em Linfócitos T e B garantindo o desenvolvimento da parasitemia e sua permanencia na fase crônica.

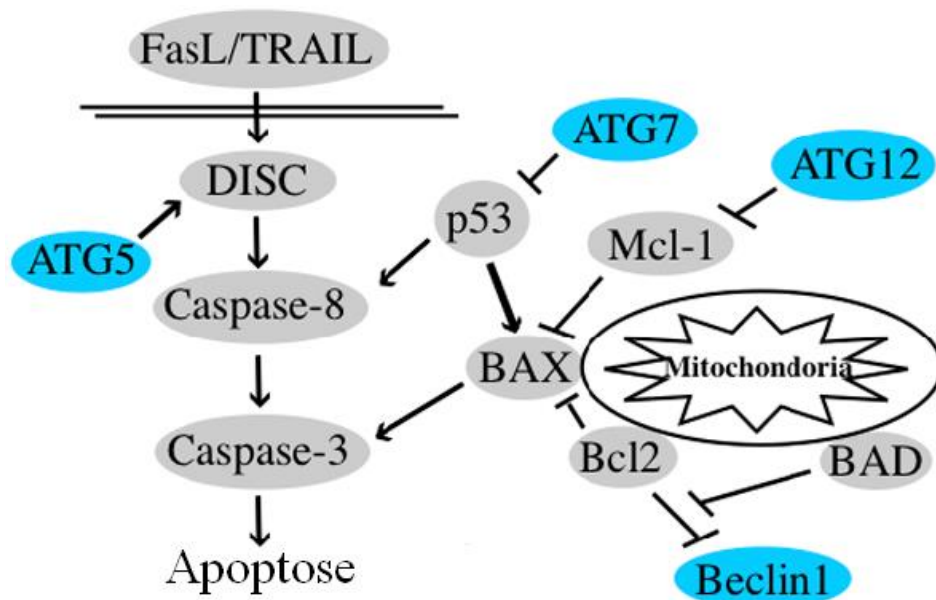


Figura 41: Crosstalk entre autofagia e apoptose. A interação regulador de autofagia (azul) com reguladores de apoptose (cinza). O ATG5 ajuda a ativação do DISC via interação com o FADD. ATG7 pode ligar e inibir os reguladores de apoptose, p53 e BAX respectivamente. O ATG12 liga-se a membros antiapoptóticos da família BCL-2, como a Mcl-1, e inibe sua atividade antiapoptótica. Por outro lado, BCL-2 (e BCL-xL) se liga e inibe um regulador positivo de autofagia, Beclin1 (Modificada de Yonekawa & Thorburn, 2013)

2.2. JUSTIFICATIVA

T. cruzi é um patógeno dotado de mecanismos de escape que possibilitam sua sobrevivência e replicação no interior de células hospedeiras e ao mesmo tempo a fuga dos sistemas de defesa hospedeiros. Apesar de patógenos intracelulares constituírem uma forma de estresse para a célula hospedeira, muitas vezes estas células resistem a este estresse e não ativam as vias de morte celular que poderiam auxiliar na eliminação dos patógenos antes que eles pudessem se replicar. Os mecanismos e as moléculas utilizadas por estes microrganismos para controlar os processos de morte celular da célula hospedeira são pouco compreendidos. No entanto, sabe-se que as mitocôndrias constituem um ponto crítico e também um elo comum às diferentes formas de morte/sobrevivência celulares. Dessa forma a identificação de moléculas capazes de modular estas vias ou mesmo a elucidação destes mecanismos abririam novas perspectivas para o tratamento e desenvolvimento de terapias quimioterápicas ou vacinais para esta doença que afeta o nosso país e compromete não apenas a saúde pública, mas também a economia do Brasil, representando uma perspectiva de melhoria no tratamento da doença de Chagas e, portanto, da expectativa e qualidade de vida da nossa população. Além disso, moléculas capazes de modular os processos de morte/sobrevivência celulares possuem também uma potencial aplicabilidade no combate às doenças relacionadas ao descontrole destes processos, como doenças degenerativas (Parkinson e Alzheimer), assim como as neoplasias.

2.3. OBJETIVO

Avaliar o papel modulador de proteínas metacaspase-3 e cruzipaina de *Trypanosoma cruzi*, sobre genes ligados a apoptose e autofagia da célula hospedeira.

Objetivos Específicos

- 1- Escolher os genes ligados a apoptose e autofagia;
- 2- Isolar o RNA total das células HeLa expressando as proteínas heterólogas de *T.cruzi*;
- 3- Produzir os cDNAs a partir dos RNAs para a PCR em tempo;
- 4- Avaliar os genes expressos em resposta as proteínas.

2.4. Material e Métodos

2.4.1. Desenhos dos iniciadores

Para amplificação dos genes alvos, foram desenhados primers com base nas sequências depositadas no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), cujos números de acesso encontram-se nos anexos e para a análise dos parâmetros foi utilizado o web software OligoAnalyzer 3.1 (<http://www.idtdna.com/calc/analyzer>), e também o Software Primer Express v3.0.1 (Applied Biosystems™) que permite que você crie seus primers usando os reagentes do TaqMan ou SYBR Green, para aplicações em qPCR.

Tabela 3: Sequências de primers empregados na reação de qPCR

Genes	Sequência (5'→3')	Tan	Tm	GC%	Produtos(pb)
Caspase 3 (F)	CCAAAGATCATAACATGGAAGCGA	23	59.9	43	85
Caspase 3 (R)	TAAACCCATCTCAGGATAATCCATT	26	59.1	35	85
Caspase 9 (F)	TATGATCGAGGACATCCAGCG	21	59.6	52	116
Caspase 9 (R)	CTAAGCAGGAGATGAACAAAGGAA	25	58.7	44	116
Caspase 8 (F)	TGACTGCACAGTAGAGCAAATCTAT	26	58.7	42	91
Caspase 8 (R)	GAGAGGATACAGCAGATGAAGCAG	24	58.3	50	91
Bcl2 (F)	GATCCAGGATAACGGAGGCTG	21	59.5	57	85
Bcl2 (R)	GAGACAGCCAGGAGAAATCAAAC	23	58	48	85
BAX (F)	TGTGACCTTGACTTGATTAGTGCC	24	59.2	46	70
BAX (R)	TGAACTTGAGCAATTCCAGAGG	22	58.1	45	70
ATG7(F)	GCATCCAGTGAACCTTCTCCAGTG	23	59.8	52	108
ATG7(R)	TGGTGCCATCAATAGGAAGACG	23	59.8	48	108
ATG5(F)	ACAAGCAACTCTGGATGGGATT	22	58.6	45	71
ATG5(R)	CCATGAGTTTCCGATTGATGG	21	58.8	48	71
GAPDH (F)	AGTCAGCCGCATCTTCTTTG	21	58.2	48	94
GAPDH (R)	AATACGACCAAATCCGTTGACTC	23	58.1	43	94
TBP (F)	GGCCCATAGTGATCTTTGCAGT	22	59.1	50	78
TBP (R)	CAACTTCCTCAATTCCTTGGGT	22	58.1	45	78

2.4.2. Isolamento do RNA (método Trizol® (Invitrogen))

Após a mistura ser separada em uma fase superior aquosa e incolor, interfase e a inferior vermelha (fenol-clorofórmio). A fase superior aquosa incolor (contendo o RNA) dos tubos foram transferidas para novos tubos de 1,5 mL, e em seguida adicionados 150 µL de isopropanol e incubados por 10 minutos. Depois desse período, os tubos foram centrifugados

por 10 minutos a 12000xg em 4°C. O RNA total precipitado forma um pellet branco gelatinoso no fundo do tubo. O supernadante dos tubos foram descartados com o auxílio da pipeta. Depois o pellet foi ressuspensionado com etanol 75% e agitados brevemente no vórtex, e então centrifugados por 5 minutos a 7500xg a 4°C. Os supernadantes foram descartados com o auxílio da pipeta e os pellets de RNA foram deixados para secar por no máximo 10 minutos. E por fim, os pellets foram ressuspensionados em 50 µL de água livre de RNase.

2.4.3. Síntese da primeira cadeia de cDNA (GoScript™ Reverse Transcription System)

Os RNAs totais isolados das réplicas biológicas, transfectadas com cruzipaina/GFP ou metcaspase/GFP ou GFP, como descrito no item 2.4.2 foram utilizados para a síntese dos cDNAs. Os mix de RNAs totais foram feitos da seguinte forma: RNA total de cada réplica biológica [0,25 µg/µL de reação]; Primers Oligo(dT) [25 ng/µL de reação] e H₂O Nuclease-Free para 5 µL de volume final. Em seguida, os tubos com as amostras de RNAs foram aquecidos a 70°C por 5 minutos e imediatamente colocados no gelo por 5 minutos. E logo após centrifugados para recuperar o volume inicial, e foram mantidos no gelo até serem adicionados ao mix da reação da Transcriptase reversa.

Para o preparo do mix da reação da Transcriptase reversa foram utilizados: 4 µL de tampão de reação GoScript™ 5X; MgCl₂ [5 mM]; PCR Nucleotide Mix (concentração final de 0.5 mM de cada dNTP); GoScript™ Reverse Transcriptase (1 µL) e H₂O Nuclease-Free para um volume final de 15 µL. Posteriormente, 15 µL de cada mix de reação da Transcriptase reversa foram somados aos 5 µL do mix de RNAs total de cada réplica biológica.

Os parâmetros para síntese de cDNAs foram:

1. Anelamento: 25°C por 5 minutos;
2. Extensão: 42°C por 1 hora;
3. Inativação da Transcriptase Reversa: 70°C por 15 minutos.

Os cDNAs foram utilizados para reações de PCR e qPCR.

2.4.4 Teste de validação dos primers para qPCR

Para testar os conjuntos dos primers desenhados foi realizado uma PCR convencional. As reações foram realizadas a partir do cDNA sintetizado no Item 2.4.3 na diluição de 1:20. As reações constituíram-se em um volume final de 30 μ L composto por Tampão 1X; 0,33 μ M de cada primer (Tabela 3), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 2 unidades de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen/Life Technologies) e 1 μ L de cDNA. As amostras foram amplificadas em um termociclador (LifeTouch Bioer) e os parâmetros de amplificação de cada alvo foram:

1. Pré-desnaturação: 95°C por 5 min;
2. Desnaturação: 95°C por 45 seg;
3. Anelamento: 60°C por 30 seg;
4. Extensão: 72 °C por 2 min;
5. Repetição das etapas de 2 a 4 por 30 vezes;
6. Extensão final: 72 °C por 7 minutos;

2.4.5. PCR em tempo real (qPCR)

As reações de qPCR foram realizadas no equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). As amplificações por qPCR foram realizadas em triplicatas e uma única reação era composta por 5 μ L (iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix, BIO-RAD) adicionados de 0,2 μ L de cada primer (10 μ M), e 1,3 μ L de cDNA (com diluição 1:20) e H₂O q.s.p 10 μ L. As condições das reações utilizadas na qPCR foram 95°C por 20 segundos, seguido de 40 ciclos com as seguintes etapas: desnaturação a 95°C por 3 segundos, anelamento e extensão do primer a 60°C por 30 segundos, seguido de uma curva de dissociação gerada a partir da desnaturação do produto amplificado pelo aumento gradativo da temperatura no fim da reação para verificar a especificidade do primer (95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos). Os dados brutos da expressão foram obtidos com o auxílio do software StepOne v.2.3, onde os valores de ΔR_n para cada poço da placa de PCR foram organizados em planilhas do Excel. Em seguida, esses dados

brutos foram analisados pelo software LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003), para determinação da eficiência de cada par de primer e a Cq (Ciclo de quantificação, que se refere ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal fluorescente atinja o limiar de detecção) correspondente para cada reação. A análise da expressão diferencial de cada gene foi determinada por meio do software qbase+ (HELLEMANS et al., 2007).

2.4.6 Análises estatísticas

Os dados obtidos nos experimentos de qPCR foram submetidos às análises de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade de variância pelo teste de Levene; e os valores de expressão relativa foram comparados por ANOVA two-way seguido por teste post hoc Bonferroni. O nível de confiança adotado no estudo foi de 95% ($p < 0,05$). Os softwares usados para os cálculos foram GraphPad Prism, versão 4.0, para Windows (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) e SPSS, versão 25.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) para Windows.

2.5. Resultados e Discussão

Nesse estudo foi avaliado se há alguma mudança na expressão dos genes ligados à apoptose e autofagia da célula hospedeira quando estas estão em contato com proteína secretadas por *T. cruzi*. Para isso, foram expressas as proteínas metacaspase-3 e cruzipaina em células HeLa e o RNA total dessas células foram extraídos e avaliados por qPCR a expressão relativa dos genes comparados com células transfectadas com plasmídeo vazio, ou seja expressando somente a GFP, utilizando como genes de referência, o GAPDH e o TBP para normalizar os dados de expressão gênica, sendo utilizado como controle endógeno na análise quantitativa de qPCR (Rebouças et al., 2013). Primeiramente os primers da Tabela 3 foram testados com cDNAs obtidos das células por PCR convencional. Na Figura 42 estão apresentados os resultados de amplificação por PCR dos alvos: a Caspase 3 (85pb) no poço 1, Caspase 8 (91 pb) no poço 3, Bax (70 pb) no poço 5, poço 6 com o gene ATG7 com banda amplificada em 108 pb e o GAPDH com 94pb no poço 8. No entanto foram verificados

amplificações de produtos inespecíficos no poço 2 referente a Caspase 9, onde esperava-se um fragmento de 116 pb; no poço 4 da Bcl2 cujo fragmento esperado era 85 pb, no poço 7 referente ao ATG5 também foi observado uma banda inespecífica e por último o gene TBP no poço 8 com fragmento inespecífico (Figura 42).

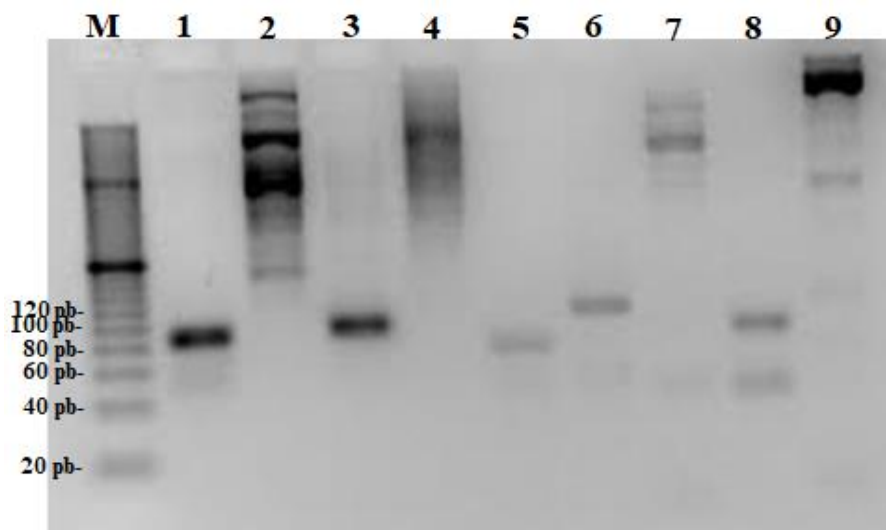


Figura 42: Eletroforese em gel de agarose mostrando as amplificações dos genes alvos a partir do cDNAs. 1) Caspase 8 com 85pb; 2) Caspase 9 não específico; 3) Caspase 8 com 91 pb; 4) Bcl2 não específico; 5) Bax com 70 pb; 6) ATG7 com 108 pb; 7) ATG5 não específico; 8) GAPDH com 94 pb; 9) TBP com banda não específica.

Estudos conduzidos por Landry e colaboradores fizeram o detalhamento do genoma e transcriptoma de uma linhagem de células HeLa, onde analisaram o perfil de expressão gênica. Estes autores verificaram um alto índice de aneuploidia e variantes estruturais comprometendo vias do ciclo celular e reparo de DNA e padrão de expressão significativamente diferente de células e tecidos humanos normais. Contudo nossos primers foram desenhados baseados em genes *Homo sapiens* depositados no GenBank. No trabalho de Landry et al., 2013 faz um alerta sobre possíveis resultados anômalos na utilização de células HeLa. Sendo assim, prosseguimos com as análises dos genes por qPCR.

Os valores de eficiência das amplificações de cada par de primers utilizados na qPCR obtidos com o programa LinRegPCR variaram de 90 a 100% (dados não mostrados). Na Tabela 4 são mostrados os valores da expressão relativa dos genes analisados mostrando que não houve diferença estatística em nenhum dos genes analisados [ATG5 ($p=0,35$), ATG7($p=0,39$), Bax ($p=0,76$), Bcl2 ($p=0,59$), Caspase 9 ($p=0,79$), Caspase 8 ($p=0,40$) e

Caspase 3 ($p=0,67$), os genes ATG5, Bax e Bcl2 em células HeLa expressando metacaspase-3 foram os que apresentaram maiores desvios em relação à média; seguidos por ATG7 e Bcl2 na presença de cruzipaina, e Bax e caspase 8 no controle (GFP). Para compreender esses dados, os valores foram logaritmizados e plotados (Figura 43).

Tabela 4: Expressão dos genes ATG5, ATG7, Bax, Bcl2, Caspase 9, Caspase 8 e Caspase 3 em células HeLa transfectadas com metacaspase-3 ou cruzipaina ou GFP

Genes	Proteínas expressas em HeLa					
	Metacaspase/GFP		Cruzipaina/GFP		GFP	
ATG5	4,97E-01	9,00E-02	4,41E-01	2,50E-01	9,18E-01	1,90E-01
ATG7	5,26E+00	2,35E+00	1,06E+01	6,13E+00	9,79E-01	5,20E-01
Bax	1,15E+00	5,70E-01	7,17E-02	4,00E-02	1,05E+00	6,00E-02
Bcl2	1,57E+00	4,70E-01	1,47E+00	8,40E-01	1,03E+00	1,10E-01
Casp9	1,11E+00	1,10E+00	3,33E-01	3,30E-01	3,33E-01	3,30E-01
Casp8	8,50E+00	6,16E+00	7,72E+00	2,76E+00	1,24E+00	2,20E-01
Casp3	1,24E+00	1,04E+00	4,32E-01	3,10E-01	9,45E-01	3,00E-02

Os dados referem-se aos valores médios da quantificação relativa \pm o erro padrão.

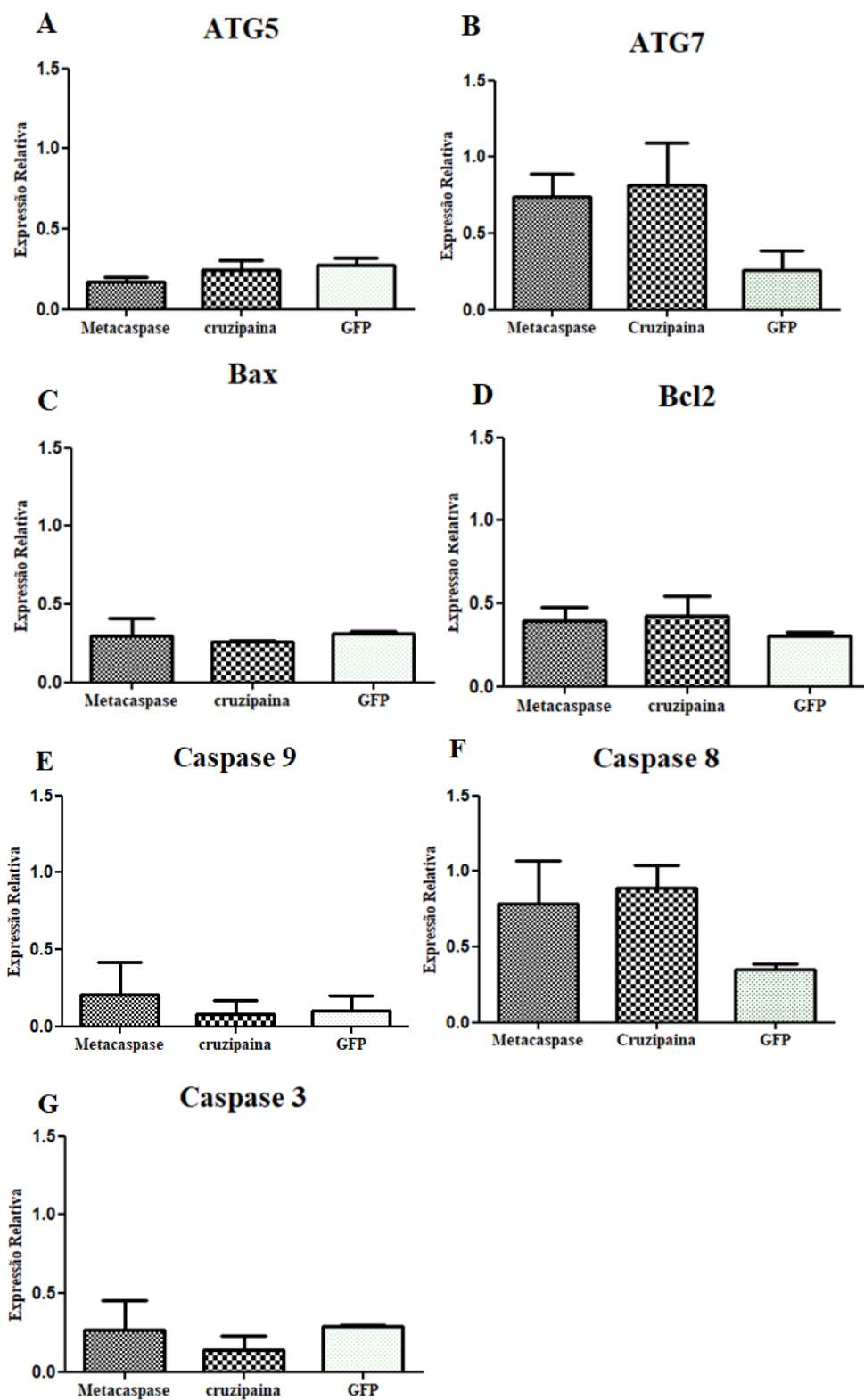


Figura 43: Gráficos obtidos de dados logaritmizados da expressão gênica das células HeLa com metacaspase-3, ou cruzipaina ou o plasmídeo fechado (GFP).

Apesar da não significância a logaritmização dos dados traz um melhor entendimento em níveis proporcionais dos resultados para a discussão. Isso pode ser nas células HeLa expressando metacaspase-3, que mostrou um aumento na expressão de ATG7, no entanto a ATG7 tem função ativadora da ubiquitina que normalmente inibe Bax e Caspase 8 pela via p53 (Yonekawa & Thorburn, 2013). E o efeito dela pode ser percebido pelos níveis de expressão de Bax reduzidos próximos aos níveis apresentados pelo controle GFP. Foi observado que houve um pequeno aumento dos níveis de expressão de Bcl2 tanto em células com metacaspase-3 quanto em células com cruzipaina comparados ao GFP. O que se sabe é que Bcl2, uma proteína com atividade antiapoptótica, age inibindo o complexo PI3K que recruta principalmente ATG5 para expansão lipídica do autofagossomo (Swart et al., 2016), o que é observado nos baixos níveis de expressão de ATG5 na Figura 43 A. No entanto, a metacaspase-3 apresentou uma menor expressão de ATG5 em relação a cruzipaina, talvez a metacaspase-3 tenha uma atividade antiapoptótica agindo sobre a Bcl2 conferindo ao *T. cruzi* um período na célula para estabelecer a parasitemia. A Bcl2 tem uma ação inibitória sobre a proteína apoptótica Bax que consequentemente exerce sua ação inibindo Caspase 3 na cascata de caspases da via intrínseca, que é observado nos níveis de expressão dessas proteínas nas Figuras 43 C, 43 D e 43 G em células com cruzipaina, os níveis de expressão de Bax pode estar sendo inibido também pela ação de ATG7 (Figura 43 B). Contudo tanto em células expressando metacaspase-3 quanto cruzipaina houve um aumento da expressão de caspase 8. Esses resultados corroboram dados de experimentos que mostram um aumento da atividade de caspase 8 em células infectadas com *T. cruzi* (Teixeira, et al., 2006; Farias-De-Oliveira et al., 2013; Carrillo et al., 2016).

Esses dados nos permitem especular que essas proteínas podem estar exercendo um efeito antiapoptótico agindo pela via intrínseca, dados os níveis de expressão de Bax estáveis, sendo que os níveis apresentados pela cruzipaina mais acentuados, quando se observa os níveis de caspase 3 e 9 em relação a metacaspase-3. Os níveis de caspase 8 elevado em ambos tratamentos pode estar relacionado a outras vias que podem estar sendo sinalizadas como a da necroptose por exemplo, no entanto é preciso o uso de outros marcadores moleculares para confirmar essa hipótese.

Embora os dados não tenham sido significativos, a literatura mostra que o *Trypanosoma cruzi* pode modular as vias de morte e sobrevivência da célula hospedeira. Após a transformação dos dados foi possível verificar uma possível modulação dessas vias. No entanto ajustes experimentais nas condições da qPCR e também a utilização de uma outra linhagem de células hospedeiras se faz necessário.

2.6. Conclusão

- A metacaspase-3 e cruzipaina podem modular as expressões dos genes ligados a apoptose e autofagia da célula hospedeira;
- A cruzipaina inibiu mais a expressão do gene da caspase 3 efetora que a metaspase;
- A caspase 8 teve o nível de expressão elevado tanto com metacaspase-3 quanto cruzipaína;
- As proteínas metacaspase-3 e cruzipaina modulam a apoptose pela via intrínseca quando expressas no citoplasma de células Hela.

3. Referências Bibliográficas

AKARID, Khadija et al. Leishmania major-mediated prevention of programmed cell death induction in infected macrophages is associated with the repression of mitochondrial release of cytochrome c. **Journal of leukocyte biology**, v. 76, n. 1, p. 95-103, 2004.

ANVAR, Ali et al. Generation of the Fluorescent HMGB1-GFP Fusion Protein in Insect Cells and Evaluation of its Immunogenicity in Two Mice Models. **Protein and peptide letters**, v. 24, n. 6, p. 545-550, 2017.

ARAÚJO, Catarina AC; WANIEK, Peter J.; JANSEN, Ana M. An overview of Chagas disease and the role of triatomines on its distribution in Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, n. 3, p. 227-234, 2009.

AUSUBEL FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith J a, et al. Current Protocols in Molecular Biology. Molecular Biology, Vol. 1, p.146-146, 2003.

AOKI, Maria P. et al. Cruzipain, a major Trypanosoma cruzi antigen, promotes arginase-2 expression and survival of neonatal mouse cardiomyocytes. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 286, n. 2, p. C206-C212, 2004.

ANTINORI, Spinello et al. Chagas disease in Europe: a review for the internist in the globalized world. **European journal of internal medicine**, v. 43, p. 6-15, 2017.

BUA, Jacqueline et al. How to improve the early diagnosis of Trypanosoma cruzi infection: relationship between validated conventional diagnosis and quantitative DNA amplification in congenitally infected children. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 10, p. e2476, 2013.

BURAND, John P.; SUMMERS, Max D.; SMITH, Gale E. Transfection with baculovirus DNA. **Virology**, v. 101, n. 1, p. 286-290, 1980.

BOLENDER, Natalia et al. Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins. **EMBO reports**, v. 9, n. 1, p. 42-49, 2008.

BERGHE, Tom Vanden et al. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 15, n. 2, p. 135, 2014.

BREITLING, Reinhard et al. Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production. **Protein expression and purification**, v. 25, n. 2, p. 209-218, 2002.

BRODY, Jonathan R.; KERN, Scott E. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. **Analytical biochemistry**, v. 333, n. 1, p. 1-13, 2004.

CASTRO, M. E. B. et al. Biologia molecular de baculovirus e seu uso no controle biológico de pragas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 10, p. 1733-1761, 1999.

CARMEN, John C.; SINAI, Anthony P. Suicide prevention: disruption of apoptotic pathways by protozoan parasites. **Molecular microbiology**, v. 64, n. 4, p. 904-916, 2007.

COSTAS, Monica Alejandra; RUBIO, Maria Fernanda. Autofagia, una estrategia de supervivencia celular. 2017.

CODOGNO, Patrice; MEIJER, Alfred J. Atg5: more than an autophagy factor. **Nature cell biology**, v. 8, n. 10, p. 1045, 2006.

CAMPO, Vanessa Leiria; MARTINS-TEIXEIRA, Maristela Braga; CARVALHO, Ivone. Trypanosoma cruzi invasion into host cells: a complex molecular targets interplay. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 16, n. 13, p. 1084-1097, 2016.

CARMEN, John C.; HARDI, Lucia; SINAI, Anthony P. Toxoplasma gondii inhibits ultraviolet light-induced apoptosis through multiple interactions with the mitochondrion-dependent programmed cell death pathway. **Cellular microbiology**, v. 8, n. 2, p. 301-315, 2006.

CHAGAS, C. J. R. Nova tripanossomíase humana. Estudos sobre a morfologia eo ciclo evolutivo de Schizotrypanum cruzi n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, p. 1,159-218, 1909.

CHAN, Francis Ka-Ming et al. A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 51, p. 51613-51621, 2003.

CHAN, Francis Ka-Ming; LUZ, Nivea Farias; MORIWAKI, Kenta. Programmed necrosis in the cross talk of cell death and inflammation. **Annual review of immunology**, v. 33, p. 79-106, 2015.

CARRILLO, Ileana et al. Caspase-8 activity is part of the BeWo trophoblast cell defense mechanisms against Trypanosoma cruzi infection. **Experimental parasitology**, v. 168, p. 9-15, 2016.

CASASSA, Ana Florencia et al. Autophagy plays a protective role against Trypanosoma cruzi infection in mice. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 151-165, 2019.

CHO, YoungSik et al. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. **Cell**, v. 137, n. 6, p. 1112-1123, 2009.

DE ALMEIDA, Leonardo A. et al. MyD88 and STING signaling pathways are required for IRF3-mediated IFN- β induction in response to *Brucella abortus* infection. **PLoS one**, v. 6, n. 8, p. e23135, 2011.

DE ARAUJO, Ana Carolina Oliveira. **Nova abordagem para expressão da partícula sSHbsAg do antígeno HBsAg do vírus da hepatite B em células de inseto**. 2011. Tese de Doutorado. Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília, Brasília.

DE OLIVEIRA, Gilberto Santos et al. Development of a *Trypanosoma cruzi* strain typing assay using MS2 peptide spectral libraries (Tc-STAMS2). **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 4, p. e0006351, 2018.

DEL PILAR AOKI, Maria et al. Different signaling pathways are involved in cardiomyocyte survival induced by a *Trypanosoma cruzi* glycoprotein. **Microbes and infection**, v. 8, n. 7, p. 1723-1731, 2006.

DOSREIS, G. A. Evasion of immune responses by *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 2, p. 84-90, 2011.

DE CASTRO, Emanuella et al. Pro-caspase-activating compound-1 induces apoptosis in *Trypanosoma cruzi*. **Apoptosis**, v. 22, n. 12, p. 1564-1577, 2017.

DIAS, João Carlos Pinto et al. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil. 2011.

DIAS, João Carlos Pinto et al. Esboço geral e perspectivas da doença de Chagas no Nordeste do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, p. S13-S34, 2000.

DIAS, J. C. P.; SCHOFIELD, Christopher J. The evolution of Chagas disease (American trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 103-121, 1999.

DIAS, João Victor Leite et al. Conhecimentos sobre triatomíneos e sobre a doença de Chagas em localidades com diferentes níveis de infestação vetorial. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 21, p. 2293-2304, 2016.

DAS CHAGAS XAVIER, Samanta Cristina et al. Distantiae transmission of *Trypanosoma cruzi*: a new epidemiological feature of acute Chagas disease in Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 5, p. e2878, 2014.

DE PAULO MARTINS, Vicente et al. Developmental expression of a *Trypanosoma cruzi* phosphoinositide-specific phospholipase C in amastigotes and stimulation of host phosphoinositide hydrolysis. **Infection and immunity**, v. 78, n. 10, p. 4206-4212, 2010.

DIAS, João Carlos Pinto; SILVEIRA, Antonio Carlos; SCHOFIELD, Christopher John. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 5, p. 603-612, 2002.

DECOTE-RICARDO, Débora et al. Implication of apoptosis for the pathogenesis of *Trypanosoma cruzi* infection. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 518, 2017.

DE PAULO MARTINS, Vicente et al. Acylation-dependent export of *Trypanosoma cruzi* phosphoinositide-specific phospholipase C to the outer surface of amastigotes. **Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 40, p. 30906-30917, 2010.

DIAS, Juarez Pereira et al. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 3, p. 296-300, 2008.

DEL PILAR AOKI, Maria et al. Different signaling pathways are involved in cardiomyocyte survival induced by a Trypanosoma cruzi glycoprotein. **Microbes and infection**, v. 8, n. 7, p. 1723-1731, 2006.

DUSCHAK, Vilma G.; COUTO, Alicia S. Cruzipain, the major cysteine protease of Trypanosoma cruzi: a sulfated glycoprotein antigen as relevant candidate for vaccine development and drug target. A review. **Current medicinal chemistry**, v. 16, n. 24, p. 3174-3202, 2009.

DOYLE, Ken; MILES, Julie; PROMEGA CORPORATION (MADISON). **Protocols and applications guide**. Promega Corporation, 1996.

EMANUELSSON, Olof et al. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. **Journal of molecular biology**, v. 300, n. 4, p. 1005-1016, 2000.

FARIAS-DE-OLIVEIRA, Désio Aurélio et al. Caspase-8 and caspase-9 mediate thymocyte apoptosis in Trypanosoma cruzi acutely infected mice. **Journal of leukocyte biology**, v. 93, n. 2, p. 227-234, 2013.

FUJIO, Yasushi et al. Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. **Circulation**, v. 101, n. 6, p. 660-667, 2000.

FUJITA, Dennis Minoru et al. THE ORAL TRANSMISSION OF CHAGAS DISEASE IN BRAZIL: NEW FOOD SUPPLIES AND TRAVEL EXPERIENCE. **Acta tropica**, 2019.

FERRÃO, Patrícia Mello et al. Cruzipain activates latent TGF- β from host cells during T. cruzi invasion. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0124832, 2015.

GUARNERI, Alessandra A. et al. Potencial biológico do *Triatoma brasiliensis*. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, p. S101-S104, 2000.

GIORDANENGO, Laura et al. Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, conditions the host immune response in favor of parasite. **European journal of immunology**, v. 32, n. 4, p. 1003-1011, 2002.

GUARNER, Jeannette. Chagas disease as example of a reemerging parasite. In: **Seminars in diagnostic pathology**. WB Saunders, 2019.

GRAYSON, Michelle. Chagas disease. **Nature**, v. 465, n. 7301_suppl, p. S3, 2010.

GONZÁLEZ, Iveth J. Las metacaspasas y su rol en la vida y muerte de los parásitos protozoarios humanos. **Biomédica**, v. 29, n. 3, p. 485-493, 2009.

GOUET, Patrice; ROBERT, Xavier; COURCELLE, Emmanuel. ESPript/ENDscript: extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins. **Nucleic acids research**, v. 31, n. 13, p. 3320-3323, 2003.

GANTT, Kira R. et al. Activation of TGF- β by *Leishmania chagasi*: importance for parasite survival in macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 5, p. 2613-2620, 2003.

GOODALL, Megan L. et al. The autophagy machinery controls cell death switching between apoptosis and necroptosis. **Developmental cell**, v. 37, n. 4, p. 337-349, 2016.

GALLUZZI, Lorenzo; KROEMER, Guido. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. **Cell**, v. 135, n. 7, p. 1161-1163, 2008.

GALLUZZI, Lorenzo et al. To die or not to die: that is the autophagic question. **CURRENT MOLECULAR MEDICINE-NETHERLANDS THEN UAE-**, v. 8, n. 2, p. 78, 2008.

GOEBEL, Stefan; GROSS, Uwe; LÜDER, Carsten GK. Inhibition of host cell apoptosis by *Toxoplasma gondii* is accompanied by reduced activation of the caspase cascade and alterations of poly (ADP-ribose) polymerase expression. **Journal of Cell Science**, v. 114, n. 19, p. 3495-3505, 2001.

GOLSTEIN, Pierre; KROEMER, Guido. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **Trends in biochemical sciences**, v. 32, n. 1, p. 37-43, 2007.

GREEN, Douglas R.; GALLUZZI, Lorenzo; KROEMER, Guido. Mitochondria and the autophagy–inflammation–cell death axis in organismal aging. **Science**, v. 333, n. 6046, p. 1109-1112, 2011.

GREEN, Douglas R. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. **Cell**, v. 121, n. 5, p. 671-674, 2005.

GRIVICICH, Ivana et al. Morte celular por apoptose. **Revista brasileira de cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

HELLEMANS, Jan et al. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome biology**, v. 8, n. 2, p. R19, 2007.

HASHIMOTO, Muneaki; NAKAJIMA-SHIMADA, Junko; AOKI, Takashi. *Trypanosoma cruzi* posttranscriptionally up-regulates and exploits cellular FLIP for inhibition of death-inducing signal. **Molecular biology of the cell**, v. 16, n. 8, p. 3521-3528, 2005.

HE, Sudan et al. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF- α . **Cell**, v. 137, n. 6, p. 1100-1111, 2009.

HITOMI, Junichi et al. Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. **Cell**, v. 135, n. 7, p. 1311-1323, 2008.

KOSEC, Gregor et al. Metacaspases of *Trypanosoma cruzi*: possible candidates for programmed cell death mediators. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 145, n. 1, p. 18-28, 2006.

KIRCHHOFF, Louis V. AMERICAN TRYPANOSOMIASIS (CHAGAS'DISEASE). **Gastroenterology Clinics**, v. 25, n. 3, p. 517-533, 1996.

KYTE, Jack; DOOLITTLE, Russell F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. **Journal of molecular biology**, v. 157, n. 1, p. 105-132, 1982.

KOZJAK-PAVLOVIC, Vera; ROSS, Katharina; RUDEL, Thomas. Import of bacterial pathogenicity factors into mitochondria. **Current opinion in microbiology**, v. 11, n. 1, p. 9-14, 2008.

KROGH, Anders. Prediction of transmembrane helices in proteins. **2006-05-21) <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>**, 2006.

KROEMER, Guido; LEVINE, Beth. Autophagic cell death: the story of a misnomer. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 9, n. 12, p. 1004, 2008.

KROEMER, Guido; GALLUZZI, Lorenzo; BRENNER, Catherine. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. **Physiological reviews**, v. 87, n. 1, p. 99-163, 2007.

KHARAZIHA, Pedram et al. Sorafenib-induced defective autophagy promotes cell death by necroptosis. **Oncotarget**, v. 6, n. 35, p. 37066, 2015.

KASPROWSKA-LIŚKIEWICZ, D. The cell on the edge of life and death: Crosstalk between autophagy and apoptosis. **Postepy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)**, v. 71, p. 825-841, 2017.

LEVINE, Beth; KROEMER, Guido. Autophagy in the pathogenesis of disease. **Cell**, v. 132, n. 1, p. 27-42, 2008.

LARSEN, Jens Erik Pontoppidan; LUND, Ole; NIELSEN, Morten. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. **Immunome research**, v. 2, n. 1, p. 2, 2006.

LI, Meng; GAO, Ping; ZHANG, Junping. Crosstalk between autophagy and apoptosis: potential and emerging therapeutic targets for cardiac diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 3, p. 332, 2016.

LANDRY, Jonathan JM et al. The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 3, n. 8, p. 1213-1224, 2013.

LOPES, Marcela F. et al. Increased susceptibility of Fas ligand-deficient gld mice to Trypanosoma cruzi infection due to a Th2-biased host immune response. **European journal of immunology**, v. 29, n. 1, p. 81-89, 1999.

LEE, Bruce Y. et al. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. **The Lancet infectious diseases**, v. 13, n. 4, p. 342-348, 2013.

LOPEZ, Maria Gabriela et al. Novel biotechnological platform based on baculovirus occlusion bodies carrying Babesia bovis small antigenic peptides for the design of a diagnostic enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, n. 2, p. 885-896, 2018.

MESLIN, Benoît et al. Are protozoan metacaspases potential parasite killers?. **Parasites & vectors**, v. 4, n. 1, p. 26, 2011.

MESA-ARCINIEGAS, Paola et al. Trypanosoma cruzi infection in naturally infected dogs from an endemic region of Cundinamarca, Colombia. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 14, p. 212-216, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doença de Chagas: o que é, causas, sintomas, tratamento e prevenção. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de-chagas#diagnostico>. Acesso em: 04/07/2019

MEHRPOUR, Maryam et al. Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. **Cell research**, v. 20, n. 7, p. 748, 2010.

MCEWAN, David G. Host–pathogen interactions and subversion of autophagy. **Essays in biochemistry**, v. 61, n. 6, p. 687-697, 2017.

MACHADO, Mara Olimpia. Análise do secretoma/excretoma da forma tripomastigota de Trypanosoma cruzi.

MEDINA-ACOSTA, Enrique; CROSS, George AM. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 59, n. 2, p. 327-329, 1993.

MARTINS, Vicente P. et al. Involvement of an alternative oxidase in oxidative stress and mycelium-to-yeast differentiation in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Eukaryotic cell**, v. 10, n. 2, p. 237-248, 2011.

MARTINS, Vicente P. et al. Mitochondrial function in the yeast form of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, v. 40, n. 4, p. 297, 2008.

MATSUMURA, Hirotaka et al. Necrotic death pathway in Fas receptor signaling. **The Journal of cell biology**, v. 151, n. 6, p. 1247-1256, 2000.

MONCAYO, Álvaro; SILVEIRA, Antonio Carlos. Current epidemiological trends of Chagas disease in Latin America and future challenges: Epidemiology, surveillance, and health policies. In: **American Trypanosomiasis Chagas Disease**. Elsevier, 2017. p. 59-88.

MEHRPOUR, Maryam et al. Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. **Cell research**, v. 20, n. 7, p. 748, 2010.

MÜNZ, Christian. Regulation of innate immunity by the molecular machinery of macroautophagy. **Cellular microbiology**, v. 16, n. 11, p. 1627-1636, 2014.

MCEWAN, David G. Host-pathogen interactions and subversion of autophagy. **Essays in biochemistry**, v. 61, n. 6, p. 687-697, 2017.

NIKOLETOPOULOU, Vassiliki et al. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 12, p. 3448-3459, 2013.

NAKAJIMA-SHIMADA, Junko et al. Inhibition of Fas-mediated apoptosis by Trypanosoma cruzi infection. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1475, n. 2, p. 175-183, 2000.

ONIZUKA, Yoko et al. Inhibition of autolysosome formation in host autophagy by Trypanosoma cruzi infection. **Acta tropica**, v. 170, p. 57-62, 2017.

PELLOIS, Jean Philippe et al. Individually addressable parallel peptide synthesis on microchips. **Nature biotechnology**, v. 20, n. 9, p. 922, 2002.

PÉREZ-MOLINA, José A.; MOLINA, Israel. Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82-94, 2018.

PANZERA, Francisco et al. Chromosome homogeneity in populations of Triatoma brasiliensis Neiva 1911 (Hemiptera-reduviidae-triatominae). **Cadernos de saude publica**, v. 16, p. S83-S88, 2000.

PÉREZ-MOLINA, José A.; MOLINA, Israel. Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82-94, 2018.

PESTANA, Cezar R. et al. Effects on mitochondria of mitochondria-induced nitric oxide release from a ruthenium nitrosyl complex. **Nitric oxide**, v. 20, n. 1, p. 24-30, 2009.

POLČIČ, P. et al. To keep the host alive-the role of viral Bcl-2 proteins. **Acta virologica**, v. 61, n. 3, p. 240-251, 2017.

PETERSEN, Thomas Nordahl et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature methods**, v. 8, n. 10, p. 785, 2011.

QUEIROZ, Rayner Myr Lauterjung. **Proteômica de Trypanosoma cruzi: variações em subproteomas durante a amastigogênese**. 2013. Tese de Doutorado. Tese–Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília.

REBÊLO, José Manuel Macário; BARROS, Vera Lúcia Lopes de; MENDES, Walter Araújo. Espécies de triatominae (Hemiptera: Reduviidae) do estado do Maranhão, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 14, p. 187-192, 1998.

RASSI JR, Anis; RASSI, Anis; MARIN-NETO, José Antonio. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, 2010.

ROBERT, Xavier; GOUET, Patrice. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. **Nucleic acids research**, v. 42, n. W1, p. W320-W324, 2014.

RUDEL, Thomas; KEPP, Oliver; KOZJAK-PAVLOVIC, Vera. Interactions between bacterial pathogens and mitochondrial cell death pathways. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 10, p. 693, 2010.

REBOUÇAS, Emanuela de Lima et al. Real time PCR and importance of housekeeping genes for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 1, p. 143-154, 2013.

RODRIGUES JR, Virmondes et al. Fas/Fas-L expression, apoptosis and low proliferative response are associated with heart failure in patients with chronic Chagas' disease. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 1, p. 29-37, 2008.

RAMÍREZ-SAGREDO, Andrea et al. Autofagia en el sistema cardiovascular: pasado, presente y futuro. **Revista chilena de cardiología**, v. 35, n. 3, p. 228-241, 2016.

RAMAKERS, Christian et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience letters**, v. 339, n. 1, p. 62-66, 2003.

SKELTON, D.; SATAKE, Noriko; KOHN, D. B. The enhanced green fluorescent protein (eGFP) is minimally immunogenic in C57BL/6 mice. **Gene therapy**, v. 8, n. 23, p. 1813, 2001.

STRIPECKE, R. et al. Immune response to green fluorescent protein: implications for gene therapy. **Gene therapy**, v. 6, n. 7, p. 1305, 1999.

SANTOS, Fred Luciano Neves et al. Performance assessment of four chimeric Trypanosoma cruzi antigens based on antigen-antibody detection for diagnosis of chronic Chagas disease. **PLoS One**, v. 11, n. 8, p. e0161100, 2016.

SBARAGLINI, María L. et al. Novel cruzipain inhibitors for the chemotherapy of chronic Chagas disease. **International journal of antimicrobial agents**, v. 48, n. 1, p. 91-95, 2016.

SANTOS, Valéria Regina Cavalcante dos et al. Acute Chagas disease in the state of Pará, Amazon Region: is it increasing?. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 5, 2018.

SAMBROOK, Joseph; RUSSELL, D. W. Molecular cloning: A laboratory manual, the third edition. 2001.

SIMÕES, Júlio Assis. Generations, changes and continuities in the social experience of male homosexuality and the HIV-AIDS epidemic. **Sexualidad, Salud y Sociedad (Rio de Janeiro)**, n. 29, p. 313-339, 2018.

SHIKANAI-YASUDA, Maria Aparecida et al. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, n. 5, p. 351-357, 1991.

SHIKANAI-YASUDA, Maria Aparecida; CARVALHO, Noemia Barbosa. Oral transmission of Chagas disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 6, p. 845-852, 2012.

SWART, Chrisna; DU TOIT, Andre; LOOS, Ben. Autophagy and the invisible line between life and death. **European journal of cell biology**, v. 95, n. 12, p. 598-610, 2016.

SARASTE, Antti; PULKKI, Kari. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular research**, v. 45, n. 3, p. 528-537, 2000.

SILVA, Elisabeth M. et al. Caspase inhibition reduces lymphocyte apoptosis and improves host immune responses to Trypanosoma cruzi infection. **European journal of immunology**, v. 37, n. 3, p. 738-746, 2007.

SALASSA, Betiana Nebaí; ROMANO, Patricia Silvia. Autophagy: A necessary process during the Trypanosoma cruzi life-cycle. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 460-469, 2019.

SWART, Chrisna; DU TOIT, Andre; LOOS, Ben. Autophagy and the invisible line between life and death. **European journal of cell biology**, v. 95, n. 12, p. 598-610, 2016.

SAHA, Sarbari et al. Autophagy in health and disease: A comprehensive review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 104, p. 485-495, 2018.

SAGA, Kotaro; KANEDA, Yasufumi. Oncolytic Sendai virus-based virotherapy for cancer: recent advances. **Oncolytic virotherapy**, v. 4, p. 141, 2015.

TEIXEIRA, P. C. et al. Proteomic inventory of myocardial proteins from patients with chronic Chagas' cardiomyopathy. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 39, n. 12, p. 1549-1562, 2006.

ULRICH, Paul N. et al. Identification of contractile vacuole proteins in Trypanosoma cruzi. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. e18013, 2011.

UEHARA, Lívia Almeida et al. Cruzipain promotes Trypanosoma cruzi adhesion to Rhodnius prolixus midgut. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 12, p. e1958, 2012.

VANDENABEELE, Peter et al. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 11, n. 10, p. 700, 2010.

WANG, Huayi et al. Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3. **Molecular cell**, v. 54, n. 1, p. 133-146, 2014.

WANG, Kewei. Autophagy and apoptosis in liver injury. **Cell cycle**, v. 14, n. 11, p. 1631-1642, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world health report 2006: working together for health**. World Health Organization, 2006.

WATANABE COSTA, Renata; DA SILVEIRA, Jose F.; BAHIA, Diana. Interactions between Trypanosoma cruzi secreted proteins and host cell signaling pathways. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 388, 2016.

WAGHABI, Mariana C. et al. Uptake of host cell transforming growth factor- β by *Trypanosoma cruzi* amastigotes in cardiomyocytes: potential role in parasite cycle completion. **The American journal of pathology**, v. 167, n. 4, p. 993-1003, 2005.

WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em:

[https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease0-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease0-(american-trypanosomiasis)). Acesso em: 26/07/2019

YONEKAWA, Tohru; THORBURN, Andrew. Autophagy and cell death. **Essays in biochemistry**, v. 55, p. 105-117, 2013.

ZUÑIGA, Elina et al. Regulated expression of galectin-1 during B-cell activation and implications for T-cell apoptosis. **Journal of leukocyte biology**, v. 70, n. 1, p. 73-79, 2001.

4.ANEXO A- Meios, soluções e tampões

Meio LB (Luria-Bertani)

Para o preparo de 1.000 mL de meio LB, foram dissolvidos 10 g de Triptona (Acumedia[®]), 5 g de extrato de levedura(Acumedia[®]) e 5 g de Cloreto de sódio (Dinâmica[®]) em 500 mL de água destilada em agitador, depois o volume foi completado para 1.000 mL com a proveta. Para o meio sólido, foi adicionado à solução 15 g de ágar e esterilizado em autoclave durante 20 minutos, a 1 atm de pressão (121°C),

Meio BHI (Brain-Heart Infusion)

Para o preparo de 1.000 mL de meio, foram dissolvidos 37 g do meio BRAIN-HEART INFUSION (Acumedia[®]) em 1.000 mL de H₂O destilada. Em seguida, procedeu-se o aquecimento com agitação frequente até dissolver completamente o meio, após isso o meio foi esterilizado em autoclave durante 20 minutos, a 1 atm de pressão (121°C),

Meio SOB e SOC

Para o preparo de 100 mL de meio SOB, 2 g de Triptona, 0,5 g de Extrato de Levedura e 0,5 g de NaCl foram adicionados a 50 mL de H₂O destilada sob agitação até dissolver. Em seguida, adicionamos 1 mL de KCL na concentração de 250 mM e o pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 5 M. O volume foi ajustado para 99 mL ou 99,5 mL e logo após autoclavado e quando esfriado foi adicionado 1 mL de MgCl₂ 1 M ou 0,5 mL de MgCl₂ 2 M. Para o preparo do meio SOC, foram adicionados 180 µL de glicose 20% estéril (preparada por filtração) em 10 mL de meio SOB, aliquotados em tubos de 1,5 mL e estocados à 4°C.

Tampão PBS 10X

Foram dissolvidos 80 g de NaCl, 2 g de KCl, 14,4 g de Na₂HPO₄ e 2,4 g de KH₂PO₄ em 800 mL de água destilada e o pH foi ajustado para 7,4. Em seguida o volume foi ajustado para 1.000 mL.

Tampão PBS 1X

Foi diluído 100 mL de PBS 10X em 900 mL de H₂O destilada.

IPTG (1M)

Para o preparo do IPTG, foram dissolvidos 2,383 g em 10 mL de H₂O milliQ, em seguida a solução foi esterilizada por filtração em membrana (0,22 µm) aliqüotada em tubos de 1,5 mL e estocados a 4°C.

X-gal (20mg/mL)

Para o preparo do X-gal, foram dissolvidos 0,2 g de 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosídeo em 10 mL de dimetilformamida (DMF) e aliqüotados em tubos de 1,5 mL, protegidos da luz com papel alumínio e estocados a 4°C.

Solução de brometo de etídio

Usando máscara e luva, 0,1 g de Brometo de etídio foram pesados e dissolvidos em 10 mL de H₂O milliQ estéril e aliqüotado em tubo de 1,5 mL e estocado no escuro a 4°C.

Tampão de amostra (10X)

Solução estoque: TBE 10X; Glicerol 50%; Azul de Bromofenol 0,01%; Xileno Cianol 0,01%. Para o preparo das amostras foram utilizados 2 µL de tampão de amostra e 8 µL de amostra de DNA genômico ou produtos de reações de PCR e aplicados nos géis de agarose para a eletroforese.

Tampão SB 20X

O preparo do tampão seguiu o descrito por Brody e Kern (2004). Foram dissolvidos 8 g de Hidróxido de sódio NaOH e 45 g de Ácido bórico H₂BO₃ (SIGMA®) em

1.000 mL de água deionizada. Para a realização de gel de agarose e eletroforese, o tampão SB foi utilizado na concentração de 1X. As soluções tanto de estoque quanto a de uso foram armazenadas à temperatura ambiente.

Gel de agarose

Para o preparo de gel de eletroforese, a agarose foi fundida em tampão SB 1X na concentração de 1% (P/V), em forno micro-ondas, e colocada em cuba de eletroforese horizontal.

Tampão TB

Para o preparo do Tampão TB1X, foram dissolvidos em 150 mL; 0,651 g de HEPES (10 mM), 0,551 g de CaCl_2 (15 mM) e 4,66 g de KCL (250 mM), depois o pH do tampão foi ajustado em 6,7. E em seguida, foi adicionado 2,8 g de MnCl_2 (55 mM) à solução e o volume ajustado para 250 mL. Por último, a mesma foi esterilizada por filtração (0,22 μm) e estocado a 4°C.

Gel separador 12%

Para o preparo do gel separador 12%, foram utilizados 1,6 mL de H_2O milliQ, 2,0 mL de solução de acrilamida 30%, 1,3 mL de TRIS 1,5M (pH 8,8), 0,05 mL de SDS 10%, 0,05 mL de persulfato de amônio 10% e 0,002 mL de TEMED.

Gel separador 15%

Para o preparo do gel separador 15%, foram utilizados 1,1 mL de H_2O milliQ, 2,5 mL de solução de acrilamida 30%, 1,3 mL de TRIS 1,5M (pH 8,8), 0,05 mL de SDS 10%, 0,05 mL de persulfato de amônio 10% e 0,002 mL de TEMED.

Gel concentrador

Para o preparo do gel concentrador, foram utilizados 1,4 mL de H_2O milliQ, 0,33 mL de solução de acrilamida 30%, 0,25 mL de TRIS 1,5M (pH 6,8), 0,02 mL de SDS 10%, 0,02 mL de persulfato de amônio 10% e 0,002 mL de TEMED.

Tampão de amostra SDS-PAGE 2X

Para o preparo do tampão de amostra 2X, foram misturados 10 mL de TRIS 1M (pH 6,8), 6 mL de SDS 20%, 30 mL de glicerol, 15 mL de β -Mercaptoetanol e 0,0018 g de azul de Bromofenol, depois o volume foi ajustado para 100 mL e aliquotado e estocado a 4°C.

Tampão de corrida 10X (Estoque)

Para o preparo do tampão de corrida 10X, foram dissolvidos sob agitação 10 g de SDS, 30,3 g de TRIS com 144,1 g de glicina em 500 mL, em seguida o pH foi ajustado para 8,3 e volume para 1.000 mL.

Tampão de corrida 1X de uso

Foi diluído 100 mL de tampão de corrida 10X em 900 mL de H₂O.

Tampão de transferência

Para o preparo do tampão de transferência, foram dissolvidos sob agitação 0,37 g de SDS, 5,8 g de TRIS com 2,9 g de glicina em 200 mL de metanol, em seguida volume foi ajustado para 1.000 mL.

Solução de Coomassie Blue

Foram dissolvidos 2,5 g de Coomassie Brilliant Blue na mistura de 450 mL de metanol, 100 mL de ácido acético e 400 mL de H₂O, depois o volume foi ajustado para 1.000 mL com H₂O e estocado em temperatura ambiente.

Solução descorante

Foram misturados 450 mL de metanol, 100 mL de ácido acético e 400 mL de H₂O, depois o volume foi ajustado para 1.000 mL com H₂O e estocado em temperatura ambiente.

Tampão PBS-T

Foram dissolvidos 100 μ L de Tween-20 em 100 mL de PBS 1X.

Solução Bloqueadora

Foram dissolvidos 100 μ L de Tween-20 e 1,25 g de Leite em pó desnatado em 100 mL de PBS 1X.

6. ANEXO C-Sequencias completas dos genes alvos

Metacaspase-3 (Xm_799145.1)

>gi|71402722:3988-5064 Trypanosoma cruzi strain CL Brener
tcruzi_1047053507297, whole genome shotgun sequence

```
ATGGGCTTTGATTTTGGCTGTCTGTAAAGCTGTGCAGCACAGTCTGAAGCCGGGTGGAGCCCCGGGCC
CAATCAACTACATGGAAATCGGACTGAACCTTATCAAGATTGCAGCCCCGTATATGTCCAGTATCTTGG
CATTATGGAACGCCACCGAGGGTTGACGTTGAGGAGTTCTTCCAGCAGGCGGAGGTGACGGAGGGTTTT
AAGCCGTGGGAGACACCAACCCATGTGAGCGGCACCTTTCGTGCCCTTTTCATCGGCATCAACTACTACG
GCACCAGTGCCGAGCTCTCCGGTTGTTGCAATGATGTGAAACAAATAATCGCCACACTACAAAGGAAAAG
AATTCATCGACGAGATGAGCATACTTGTGGATGAGAGGGGGTTCCCGGGGCCAACGGCTCCCCACA
CGTGACAACATTTGTGCGCTACATGGCGTGGCTTGTGGGGGTGCAAACCGGGTGATGTGCTCTTTCATGC
ACTATTCGGTACGGCAGCATAACCCGTGCGACGAGCGACACGGAGGAGAAATTTGATCAATGCCTTGC
CCCCGTCGACTTTTCGACTAAGGGCTGCATTCTTGACAACGACATTTTCAGAATTCTCCTCTCGGGACTG
CCACAAGGAGTGCGACTCACTGTCTATTTGACTGCTGCCACTCTGGCTCCATGCTTGACCTGCCGTACA
CGTTTGTGGGCAGCAGGAGTTTGTAGCAGAAGCGTCGCCGGTCACATGCAGCGTATTCGCAAGGGAACGA
CTGTGCCGGGGATGTGCTGATGATATCCGGTTGTGCTGACGAGCAGACGTCGGCTGACGTGAGCAACGG
GCCACATTTGGAACGGGCGCGTCAAGTGTGGTGGGGCAGCCACACAGTGTCTGGCGTACACAATACTCA
AAGTCAGTAATCTGTCGTACCAAGATATGCTTATTGCCACCCGTGACATGCTGAGAAGAAAGGGATTAC
TCAGGTGCCTCAGCTGAGTGCATCCAAGCCAATCAATTTACAGCAGAAGTTTTCGCTCATGACGACGTTT
GAGGTGGATCCAGCCGTCGCCACATGA
```

Cruzipaína (XM_815803.1)

>gi|164451071:c159885-159151 Trypanosoma cruzi strain CL Brener
1047053516941 genomic scaffold, whole genome shotgun sequence

```
ATGTCTGGCTGGGCGCGTGCCTGTCTGCTCGCGCCGTCCTGGTCTCATGGCGTGCCTCGTCCCCGCGG
CGACGGCGAGTCTGCATGCGGAGGGGACGCTGGCGTCGCAATTCGCGGAATTCAGCAGAAGCACGGCAG
GGTGTACGGGAGCGCCGCGGAGGAGGCGTTCCGCCTGAGCGTGTTCGGGGCAACCTGTTTCTTGCAGG
CTGCACGCCGCGCAAACCCACACGCGACCTTCGGCGTCACGCCCTTCTCGGACCTCACGCGGAGGGGG
```

CCCAGCCACCATGGGGCGCATGCCGACCTCCTGGGCGTCAATTTCCGGAATCCGTGGAATGGGCGCGC
GCGTGGCGGCGCTCCCCGAGGAGGCAAACCAGCGCCACCACGAATGGCACCGATTCCGCCCGCCGCGTG
GGGGACTATGAGAGACACCCTGCGGGCGTTCTGCGTTGCACCGGCGGGGCGAAGGCGATGTACGGCATC
GGAGTGTGGTGC GGAGTGGCCTTCCCAGCGTCCCCTCCACGCCGATTTCGCACATTACAGGTCGTGCGA
GAATCGTTGCGGGAATACCGAAAGCGGCCGAATGGAGGATGCCGTGTTGGACGTGAAGCCGCGGCCCT
CTCCGACACAGCGCGGTGGTGCTTTGCGGTCCGGTGCCTCCGCCGTCTGCCACCCACAGCGCCCCGCCAG
AAAACCACATGACCCCGGCCCTGCGCTTCGGTGA

7. ANEXO D-TABELAS DA PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS DE CÉLULAS B

Metacaspase-3

Predicted peptides:

No.	Start	End	Peptide	Length
1	16	27	LKPGGAPGINY	12
2	50	58	ERPPRVDE	9
3	60	81	FFQQAQEVTEGFKPWETPTHVSG	22
4	93	102	YGTSAEISGC	10
5	104	104	N	1
6	117	120	RIPI	4
7	130	143	RGFPGANGLPTRDN	14
8	153	159	GGAKPGD	7
9	167	183	GHGTHTRATSOTEKFD	17
10	189	193	VDFST	5
11	211	213	PQG	3
12	236	236	V	1
13	238	238	S	1
14	240	244	SLSRS	5
15	246	246	A	1
16	251	259	RIRKNDCA	9
17	268	295	CADEQTSADVSHAAATFGTGASGAGGAAT	28
18	326	340	FTQVPQLSASKPINL	15

Tabelas da predição de epítomos de células B

Cruzipáina

Predicted peptides:

No.	Start	End	Peptide	Length
1	27	29	SLH	3
2	47	54	RVYGSAAE	8
3	76	81	NPHATF	6
4	88	103	DLTREGAQPPIWGACRP	16
5	105	106	WA	2
6	108	108	I	1
7	111	146	IPWNGRARGGAPRGGKPAPTNGTDSARRVGDYERH	36
8	155	162	GAGEGDVR	8
9	171	171	L	1
10	173	173	S	1
11	189	206	RCGNTERRPNGGCRVGRE	18
12	208	210	AAP	3

8. ANEXO E- SEQUÊNCIAMENTO

Trypanosoma cruzi strain CL Brener metacaspase (Tc00.1047053507297.30) partial mRNA

Sequence ID: [XM_799145.1](#) Length: 1077 Number of Matches: 1

Range 1: 326 to 1074 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1338 bits(724)	0.0	745/754(99%)	6/754(0%)	Plus/Minus
Query 74	TGTGGCGACGGCTGGATCCACCTCAAACGTCGTCATGAGCGAAAACTTCTGCTGTA	133		
Sbjct 1074	TGTGGCGACGGCTGGATCCACCTCAAACGTCGTCATGAGCGAAAACTTCTGCTGTA	1015		
Query 134	GATTGGCTTGGATGCACTCAGCTGAGGCACCTGAGTGAATCCCTTTCTTCTCAGCATGTC	193		
Sbjct 1014	GATTGGCTTGGATGCACTCAGCTGAGGCACCTGAGTGAATCCCTTTCTTCTCAGCATGTC	955		
Query 194	ACGGGTGGCAATAAGCATATCTTGGTACGACAGATTACTGACTTTGAGTATTGTGTACGC	253		
Sbjct 954	ACGGGTGGCAATAAGCATATCTTGGTACGACAGATTACTGACTTTGAGTATTGTGTACGC	895		
Query 254	CAGACACTGTGTGGCTGCCCCACCAGCACCTGACGCGCCCGTTCCAAATGTGGCCGCGTT	313		
Sbjct 894	CAGACACTGTGTGGCTGCCCCACCAGCACCTGACGCGCCCGTTCCAAATGTGGCCGCGTT	835		
Query 314	GCTCACGTCAGCGGACGCTGCTCGTCAGCACAAACGGATGGCATCAGCACATCCCCGGC	373		
Sbjct 834	GCTCACGTCAGCGGACGCTGCTCGTCAGCACAAACGGATATCATCAGCACATCCCCGGC	775		
Query 374	ACAGTCGTTTCCCTTGCGAATACGCTGCATGTGACCGGCGACGCTTCTGCTCAAACCTCT	433		
Sbjct 774	ACAGTCGTTTCCCTTGCGAATACGCTGCATGTGACCGGCGACGCTTCTGCTCAAACCTCT	715		
Query 434	GCTGCCACAAACGTGTACGGCAGGTCAAGCATGGAGCCAGAGTGGCAGCAGTCAAATAC	493		
Sbjct 714	GCTGCCACAAACGTGTACGGCAGGTCAAGCATGGAGCCAGAGTGGCAGCAGTCAAATAC	655		
Query 494	GACAGTGAGTCGCACTCCTTGTGGCAGTCCCAGAGGAGAATTCTGAAAAATGTCGTTGTC	553		
Sbjct 654	GACAGTGAGTCGCACTCCTTGTGGCAGTCCCAGAGGAGAATTCTGAAAAATGTCGTTGTC	595		
Query 554	AAGAATGCAGCCCTTAGTCGAAAAGTCGACGGGGGCAAGGCATTGATCAAATTTCTCCTC	613		
Sbjct 594	AAGAATGCAGCCCTTAGTCGAAAAGTCGACGGGGGCAAGGCATTGATCAAATTTCTCCTC	535		
Query 614	CGTGTGCTCGTCGCACGGGTATGCGTGCCGTGACCGGAATAGTGCATGAAGAGCACATC	673		
Sbjct 534	CGTGTGCTCGTCGCACGGGTATGCGTGCCGTGACCGGAATAGTGCATGAAGAGCACATC	475		
Query 674	ACCCGGGTTTTGCACCCCAACAAGCCACGCCATGTAGCGCACAATGTTGTCACGTGTGG	733		
Sbjct 474	ACCCGG-TTTTGCACCCCAACAAGCCACGCCATGTAGCGCACAATGTTGTCACGTGTGG	416		
Query 734	GGAGGCCGTTGGGCCCCCGGGAACCCCTCTCATCCACAAGTATGCTCATCTCGTCGGAT	793		
Sbjct 415	GGAGGCCGTTGG-CCCCCGGGAACCCCTCTCATCCACAAGTATGCTCATCTCGTCG-AT	358		
Query 794	GGGAATTCCTTT-CCTTTGTAGGTGGTGGCGAATA	826		
Sbjct 357	GGGAATTCCTTTCTTTGTAG-TG-TGGCGATTA	326		

Trypanosoma cruzi strain CL Brener metacaspase (Tc00.1047053507297.30) partial mRNA

Sequence ID: [XM_799145.1](#) Length: 1077 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 770 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1408 bits(762)	0.0	770/773(99%)	3/773(0%)	Plus/Plus
Query 51	ATGGGCTTTGATTTTGGCTGTCTGTTAAAGCTGTGCAGCACAGTGTGAAGCCGGGTGGA			110
Sbjct 1	ATGGGCTTTGATTTTGGCTGTCTGTTAAAGCTGTGCAGCACAGTGTGAAGCCGGGTGGA			60
Query 111	GCCCCGGGCCAATCAACTACATGGAAATCGGACTGAACCTTATCAAGATTGCAGCCCCG			170
Sbjct 61	GCCCCGGGCCAATCAACTACATGGAAATCGGACTGAACCTTATCAAGATTGCAGCCCCG			120
Query 171	TATATTGTCCAGTATCTTGGCATTATGGAACGCCACCGAGGGTTGACGTTGAGGAGTTC			230
Sbjct 121	TATATTGTCCAGTATCTTGGCATTATGGAACGCCACCGAGGGTTGACGTTGAGGAGTTC			180
Query 231	TTCCAGCAGGCGGAGGTGACGGAGGGTTTTAAGCCGTGGGAGACACCAACCCATGTGAGC			290
Sbjct 181	TTCCAGCAGGCGGAGGTGACGGAGGGTTTTAAGCCGTGGGAGACACCAACCCATGTGAGC			240
Query 291	GGCACCTTTTCGTGCCCTTTTCATCGGCATCAACTACTACGGCACCAGTGCCGAGCTCTCC			350
Sbjct 241	GGCACCTTTTCGTGCCCTTTTCATCGGCATCAACTACTACGGCACCAGTGCCGAGCTCTCC			300
Query 351	GGTTGTTGCAATGATGTGAAACAAATAATCGCCACACTACAAAGGAAAAGAATCCCATC			410
Sbjct 301	GGTTGTTGCAATGATGTGAAACAAATAATCGCCACACTACAAAGGAAAAGAATCCCATC			360
Query 411	GACGAGATGAGCATACTTGTGGATGAGAGGGGGTCCCGGGGGCCAACGGCTCCCCACA			470
Sbjct 361	GACGAGATGAGCATACTTGTGGATGAGAGGGGGTCCCGGGGGCCAACGGCTCCCCACA			420
Query 471	CGTGACAACATTGTGCGCTACATGGCGTGGCTTGTGGGGGTGCAAAACCGGGTGATGTG			530
Sbjct 421	CGTGACAACATTGTGCGCTACATGGCGTGGCTTGTGGGGGTGCAAAACCGGGTGATGTG			480
Query 531	CTCTTCATGCACATTCCGGTCACGGCAGCGATACCCGTGCGACGAGCGACACGGAGGAG			590
Sbjct 481	CTCTTCATGCACATTCCGGTCACGGCAGCGATACCCGTGCGACGAGCGACACGGAGGAG			540
Query 591	AAATTTGATCAATGCCTTGCCCCGTCGACTTTTCGACTAAGGGCTGCATTCTTGACAAC			650
Sbjct 541	AAATTTGATCAATGCCTTGCCCCGTCGACTTTTCGACTAAGGGCTGCATTCTTGACAAC			600
Query 651	GACATTTTCAGAATTCTCCTCTCGGGACTGCCACAAAGGAGTGCAGTCACTGTCTGATT			710
Sbjct 601	GACATTTTCAGAATTCTCCTCTCGGGACTGCCAC-AAAGGAGTGCAGTCACTGTCTGATT			659
Query 711	TGACTGCTGCCACTCTGGCTCCATGCTTGACCTGCCGTACACGTTTGTGGGCAGCAGGAG			770
Sbjct 660	TGACTGCTGCCACTCTGGCTCCATGCTTGACCTGCCGTACACGTTTGTGGGCAGCAGGAG			719
Query 771	TTTGAGCAGAAGCGTCGCCCGGTACATGCAGCGTATTGCAAGGGAAAACGA			823
Sbjct 720	TTTGAGCAGAAGCGTCG-CCGGTCACATGCAGCGTATTGCAAGGGAAA-CGA			770

Trypanosoma cruzi strain CL Brener cruzipain precursor partial mRNA

Sequence ID: [XM_815803.1](#) Length: 735 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 123 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
198 bits(107)	2e-50	118/123(96%)	2/123(1%)	Plus/Plus
Query 73	ATGTCTGGCTGGGCACGTGCGCTGTCGCTCGCGACCGTCCTGGTCGTCATGGCGTGCCTC	132		
Sbjct 1	ATGTCTGGCTGGGCACGTGCGCTGTCGCTCGCGGCCGTCCTGGTCGTCATGGCGTGCCTC	60		
Query 133	GTCCCCGCGGCGACGGCGAGTCTGCATGCGGAGGGGACGCTGGCGTCTCAATTC-CG-AA	190		
Sbjct 61	GTCCCCGCGGCGACGGCGAGTCTGCATGCGGAGGGGACGCTGGCGTCGCAATTCGCGGAA	120		
Query 191	TTC 193			
Sbjct 121	TTC 123			

9.ANEXO F- PERFIL DE HIDROFOBICIDADE PRODUZIDO PELA ESCALA DE KYTE & DOOLITTLE

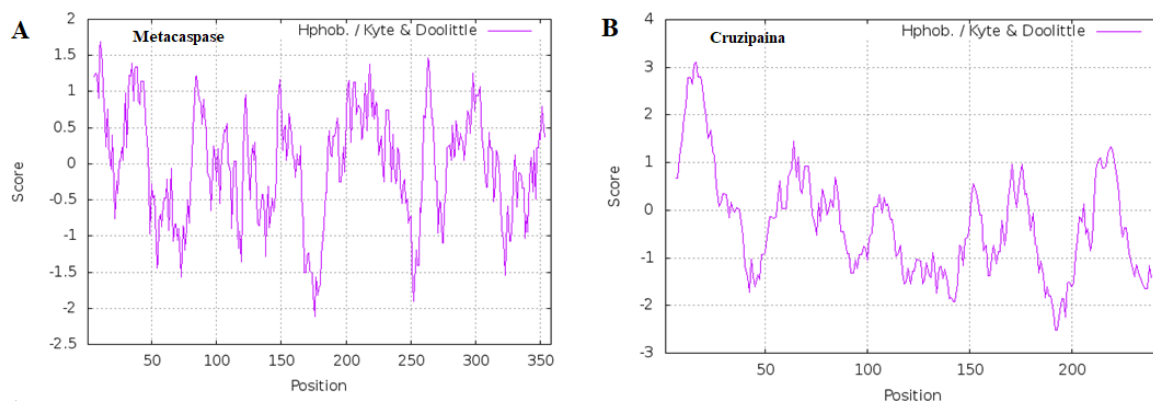


Figura. Perfil de hidrofobicidade produzido pela escala de Kyte & Doolittle, pela proteínas selecionadas. Os picos acima de 1 no eixo Y indica as regiões hidrofóbicas e o eixo X a posição na sequência de aminoácidos.

10.ANEXO G- PEPTÍDEO SINAL

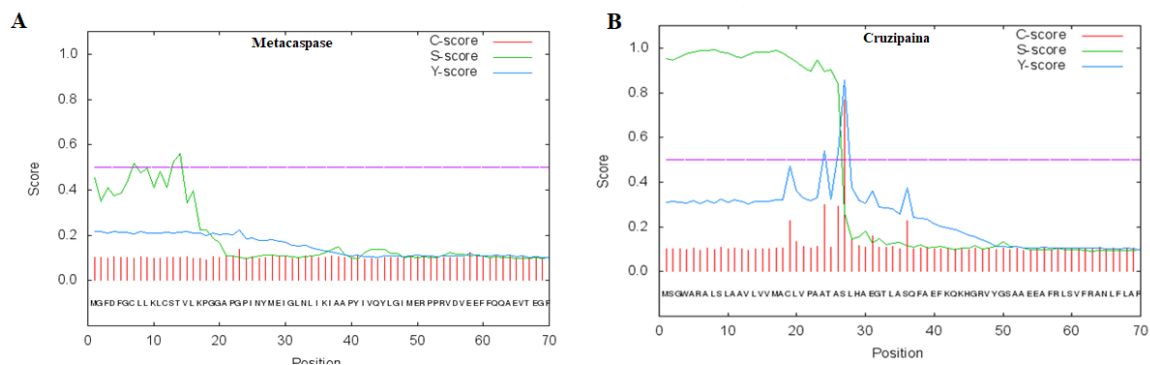


Gráfico da predição de peptídeo sinal para os alvos selecionados. O SinalP estabelece um D-cutoff de 0,450 e valores acima desse cutoff indicam que a proteína possui a presença de peptídeo sinal.