

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

YOHANA CAMILA ANTUNES FREDERICO

EPSINA EM *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909): IDENTIFICAÇÃO DO GENE E  
LOCALIZAÇÃO CELULAR

CURITIBA

2014

YOHANA CAMILA ANTUNES FREDERICO

EPSINA EM *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909): IDENTIFICAÇÃO DO GENE E  
LOCALIZAÇÃO CELULAR

Trabalho apresentado como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina no curso de graduação em Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Sonia Regina Grötzner

CURITIBA

2014

## TERMO DE APROVAÇÃO

YOHANA CAMILA ANTUNES FREDERICO

EPSINA EM *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909): IDENTIFICAÇÃO DO GENE E LOCALIZAÇÃO CELULAR

Trabalho apresentado como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina no curso de graduação em Biomedicina, pela seguinte banca examinadora:

---

Profa. Dra. Sonia Regina Grötzner

Orientadora – Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, UFPR.

---

Prof. Dr. Rubens Bertazzoli Filho

Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, UFPR.

---

Mestre Fernando Matsubara

Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, UFPR.

Curitiba 11, de dezembro de 2014

## RESUMO

A Doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, compromete funções gastrointestinais e cardíacas de seus pacientes. Seus sintomas são altamente debilitantes e podem levar ao falecimento do indivíduo. Sua alta incidência em países da América Latina gera danos inestimáveis à economia dos países endêmicos. As dificuldades no diagnóstico bem como o insucesso das estratégias de combate à endemia em erradicar a doença resultam em um número elevado de pessoas infectadas. A ocorrência de transmissão por transfusões sanguíneas e transplante de órgãos levaram à disseminação dessa doença a nível mundial, devido à migração de pessoas contaminadas. As terapias atuais são ineficazes em 50% dos casos, apresentam efeitos colaterais graves e não comportam o tratamento de pacientes crônicos. Por esse motivo, faz-se necessária a pesquisa por novas alternativas de prevenção e tratamento. Uma possível solução nesse âmbito é o desenvolvimento de medicamentos que bloqueiem o processo de endocitose nesses parasitas, eliminando-os. Entretanto, essa vertente é pouco explorada e o conhecimento acerca da endocitose em *Trypanosoma cruzi* é escasso. Assim sendo, esse estudo propôs a identificação da proteína epsina nesse protozoário, por se tratar de um componente importante na via endocítica. Para tanto, foram utilizadas ferramentas bioinformáticas que encontraram um gene hipotético para epsina em *T.cruzi*. Esse gene foi ligado a uma etiqueta de GFP e essa proteína recombinante foi expressa em formas epimastigotas do parasita. Por meio de microscopia confocal, foi possível encontrar a sublocalização celular dessa proteína na bolsa flagelar (onde ocorre a endocitose nesses organismos). A colocalização dessa epsina com a cadeia leve de clatrina (CLC), observada também por microscopia utilizando anticorpos anti-CLC, corroborou os resultados anteriores. A comprovação da identidade dessa proteína contribui para com a compreensão do mecanismo de endocitose em *T.cruzi* e pode, no futuro, servir como base para estudos que estabeleçam estratégias farmacêuticas no combate à Doença de Chagas. Adicionalmente foram produzidos anticorpos policlonais anti-epsina em camundongos BALBc. Estes poderão ser utilizados em pesquisas pósteras que contribuam para com a elucidação da biologia do parasita.

Palavras-chave: Doença de Chagas, Endocitose, *Trypanosoma cruzi*, produção de anticorpos, localização celular.

## ABSTRACT

Chagas Disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, compromises gastrointestinal and cardiac functions of the infected victims. Its symptoms are highly debilitating and can lead to death of the individual. The great incidence in Latin America generates inestimable economic damage to endemic countries. Difficulties in diagnosis and the failure of combat strategies to eradicate the endemic disease result in a high number of infected people. The occurrence of transmission through blood transfusions and organ transplantations led to worldwide spread of this disease, due to immigration of contaminated subjects. The current therapies are ineffective in 50% of the cases; they present serious side effects and do not reach chronic patients, making it necessary to search for new alternatives regarding prevention and treatment. A possible strategy in this scope is to develop drugs that block endocytosis process in these parasites, eliminating them. However, this aspect is little explored and the knowledge on *T. cruzi*'s endocytosis is scarce. Therefore, this study was aimed in identifying the epsin protein in this protozoa, due to its importance in the endocytic pathway. Bioinformatics tools were applied to find a hypothetical gene to epsin in *T. cruzi*. This gene was fused to a GFP tag and the recombinant protein was expressed in epimastigote forms of the parasite. Through confocal microscopy, it was possible to find the cellular sublocation of this protein in the flagellar pocket (where endocytosis of those organisms takes place). The epsin colocalization with clathrin light chain (CLC), visualized also through microscopy by using antibodies anti-CLC, corroborates the previous results. The confirmation of the identity of this protein contributes to the knowledge on *T. cruzi* endocytosis mechanisms and can, in the future, provide backgrounds to further studies that will establish pharmaceutical strategies to combat Chagas disease. Additionally, polyclonal antibodies anti-epsin were produced in BALBc mice. Those antibodies may be applied in future research projects contributing to the parasite's biology elucidation.

Keywords: Chagas Disease, Endocytosis, *Trypanosoma cruzi*, production of antibodies, cellular localization.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|   |    |
|---|----|
| FIGURA 1 - MAPA DA DISTRIBUIÇÃO DAS DIFERENTES ESPÉCIES DE TRIATOMÍNEOS NA AMÉRICA LATINA. ....   | 13 |
| FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DA BOLSA FLAGELAR EM TRIPANOSOMATÍDEOS. ....  | 15 |
| FIGURA 3 – POSIÇÃO DO CINETOPLASTO (kt) EM RELAÇÃO AO NÚCLEO (N) E À BOLSA FLAGELAR (MARCADA COM SETA) NAS DIFERENTES FORMAS EVOLUTIVAS DO PARASITA. ....           | 18 |
| FIGURA 4 - SINAIS CUTÂNEOS DA INFECÇÃO POR CHAGAS. ....   | 19 |
| FIGURA 5 – ASPECTO MACROMORFOLÓGICO DO CORAÇÃO CHAGÁSICO. ....  | 21 |
| FIGURA 6 – DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DA DOENÇA DE CHAGAS EM PAÍSES ENDÊMICOS E NÃO ENDÊMICOS. ....   | 31 |
| FIGURA 7 - VETOR pDONR™221. ....  | 46 |
| FIGURA 8 – ESQUEMA DO PLASMÍDEO pDEST. ....   | 50 |
| FIGURA 9 - SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DO GENE HIPOTÉTICO TcCLB.506925.70. ....   | 58 |
| FIGURA 10 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DIRETO E REVERSO (F e R, RESPECTIVAMENTE) DO GENE TcCLB.506925.70 ADAPTADOS PARA O SISTEMA GATEWAY® DE RECOMBINAÇÃO. .... | 61 |
| FIGURA 11 - AMPLIFICAÇÃO POR PCR DO GENE CODIFICANTE PARA A PROTEÍNA HIPOTÉTICA DE EPSINA. ....   | 61 |
| FIGURA 12 - ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA SELEÇÃO NEGATIVA QUE A PROTEÍNA CCDB EXERCE NO SISTEMA GATEWAY® DE RECOMBINAÇÃO. ....   | 63 |
| FIGURA 13 - PCR DE COLÔNIA COM CÉLULAS DH5α TRANSFORMADAS COM O VETOR pDONR™221 LIGADO À EPSINA. ....   | 64 |
| FIGURA 14 - ANÁLISE POR PCR PLASMIDIAL DA RECOMBINAÇÃO DE EPSINA COM O VETOR pTc GFP C-TERMINAL (COLUNA 1) E N-TERMINAL (COLUNA 2). ....                            | 66 |
| FIGURA 15 - IMAGEM DE MICROSCOPIA DA LOCALIZAÇÃO DA EPSINA EM FORMAS EPIMASTIGOTAS DE <i>T. cruzi</i> . ....  | 68 |
| FIGURA 16 - IMAGEM DE MICROSCOPIA CONFOCAL DA LOCALIZAÇÃO DA EPSINA EM FORMAS EPIMASTIGOTAS DE <i>T. cruzi</i> PÓS SORTING. ....                                    | 69 |
| FIGURA 17 – IMUNOCOLOCAÇÃO DE EPSINA E CADEIA LEVE DE CLATRINA EM FORMAS EPIMASTIGOTAS DE <i>T. cruzi</i> . ....  | 70 |

|   |    |
|---|----|
| FIGURA 18 – ANÁLISE POR PCR PLAMIDIAL DA RECOMBINAÇÃO DE EPSINA COMO VETOR pDEST. ....                                  | 72 |
| FIGURA 19 – TESTE DE EXPRESSÃO E SOLUBILIDADE DE EPSINA RECOMBINANTE EM CEPAS DH5 $\alpha$ DE <i>E. coli</i> . ....     | 73 |
| FIGURA 20 – CONFIRMAÇÃO DA INSOLUBILIDADE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE EM <i>WESTERN BLOT</i> .....                         | 74 |
| FIGURA 21 – ANÁLISE POR <i>WESTERN BLOT</i> DA PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE COM ANTICORPOS ANTI-HISTIDINA. .... | 75 |
| FIGURA 22 – TESTE DO SORO PRÉ-IMUNE. ....   | 76 |
| FIGURA 23 – TESTE DO SORO IMUNE. ....   | 77 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS

- BCIP – *5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate*
- CLASP – *Clathrin associated sorting protein*
- CLC – Cadeia leve de clatrina
- Dm28c - Clone de *T. cruzi*, isolado do mamífero *Didelphis marsupialis*
- DNA - *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)
- dNTP - Desoxiribunucleotídeos
- ECA – Enzima de conversão da angiotensina
- ECG – Eletroencefalograma
- EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid* (ácido etilenodiamino tetra-acético)
- ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*
- ENTH – *Epsin N-terminal homology*
- EpsinaR – Proteína relacionada à epsina
- FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
- g - Aceleração da gravidade
- GFP – *Green fluorescent protein* (Proteína verde fluorescente)
- HIP1r - *huntingtin interacting protein 1 related*
- Ig - Imunoglobulina
- INCOSUR – *Iniciativa del Cono Sur*
- IPTG - Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactosídeo
- kb - Kilo-base
- kDa - Kilo-Dalton
- LB – Meio Luria-Bertani
- LDL – *Low-density lipoprotein* (Lipoproteína de baixa densidade)
- LIT – Meio de cultura *Liver infusion tryptose*
- M - Molar
- NBT - *Nitro-blue tetrazolium*
- pb - Pares de bases
- PBS - *Phosphate buffered saline* (Tampão fosfato salino)
- PCR – *Polimerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase)
- PEG – Polietilenoglicol

pH – Potencial de hidrogênio

Qsp – Quantidade suficiente para

SDS – Sódio dodecil sulfato

SDS-PAGE - *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

SNARE – *Soluble NSF attachment receptor*

TbEpsinR – Proteína relacionada à epsina em *Trypanosoma brucei*

TcEpsina – Proteína epsina de *Trypanosoma cruzi*

TBE – Tampão Tris/Borato/EDTA

TE – Tampão Tris/EDTA

TGN – Trans Golgi

UFPR – Universidade Federal do Paraná

UIM - Ubiquitina

EUA – Estados Unidos da América

UVP – *Ultra violet product* (Produtos ultra-violeta)

V – Volt

# SUMÁRIO

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b>   | <b>11</b> |
| 1.1      | O VETOR   | 12        |
| 1.2      | O PARASITA  | 13        |
| 1.2.1    | <i>Cinetoplasto</i>   | 14        |
| 1.2.2    | <i>Flagelo e bolsa flagelar</i>   | 14        |
| 1.2.3    | <i>Complexo citóstoma-citofaringe</i>                                       | 15        |
| 1.2.4    | <i>Ciclo de vida do parasita</i>  | 16        |
| 1.3      | A DOENÇA  | 18        |
| 1.3.1    | <i>Fase Aguda</i>   | 18        |
| 1.3.2    | <i>Fase crônica</i>   | 19        |
| 1.3.2.1  | <i>Alterações cardíacas</i>   | 20        |
| 1.3.2.2  | <i>Alterações gastrointestinais</i>   | 21        |
| 1.4      | DIAGNÓSTICO   | 22        |
| 1.4.1    | <i>Diagnóstico na fase aguda</i>  | 23        |
| 1.4.2    | <i>Diagnóstico na fase intermediária</i>                                    | 23        |
| 1.4.3    | <i>Diagnóstico durante a fase crônica</i>                                   | 24        |
| 1.5      | TRANSMISSÃO E ESTRATÉGIAS DE COMBATE À ENDEMIAS                             | 24        |
| 1.5.1    | <i>Vetorial</i>   | 25        |
| 1.5.2    | <i>Transfusão sanguínea e doação de órgãos</i>                              | 25        |
| 1.5.3    | <i>Oral</i>   | 26        |
| 1.5.4    | <i>Congênita e por amamentação</i>  | 27        |
| 1.5.5    | <i>Acidentes laboratoriais</i>  | 28        |
| 1.6      | EPIDEMIOLOGIA   | 28        |
| 1.6.1    | <i>Em áreas endêmicas</i>   | 29        |
| 1.6.2    | <i>Em áreas não endêmicas</i>   | 30        |
| 1.6.3    | <i>Aspectos socioeconômicos</i>   | 31        |
| 1.7      | IMPACTO DO CONTROLE   | 32        |
| 1.8      | TRATAMENTOS ATUAIS  | 32        |
| 1.8.1    | <i>Problemas nos tratamentos atuais</i>                                     | 34        |
| 1.9      | ENDOCITOSE EM TRIPANOSOMATÍDEOS   | 34        |
| 1.9.1    | <i>Endocitose em <i>T. cruzi</i></i>  | 35        |
| 1.9.1.1  | <i>Epsina</i>   | 36        |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS</b>  | <b>39</b> |
| 2.1      | OBJETIVO GERAL  | 39        |
| 2.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS   | 39        |
| <b>3</b> | <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>  | <b>40</b> |
| 3.1      | REAGENTES E SOLUÇÕES  | 40        |
| 3.1.1    | <i>Tampões e soluções</i>   | 40        |
| 3.1.2    | <i>Meios de cultura</i>   | 40        |
| 3.1.3    | <i>Procedência dos reagentes</i>  | 41        |
| 3.2      | SELEÇÃO DO GENE   | 44        |
| 3.3      | AMPLIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO GENE  | 44        |
| 3.4      | CLONAGEM DO GENE DA EPSINA EM VETOR DE ENTRADA PDONR™221 DO SISTEMA GATEWAY | 45        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 3.5      | IMUNOLocalização de epsina por microscopia .....   | 46        |
| 3.5.1    | Transformação dos plasmídeos pDONR™221 ligados à epsina .....                              | 46        |
| 3.5.2    | Seleção dos clones recombinantes.....  | 46        |
| 3.5.3    | Obtenção dos plasmídeos recombinantes.....   | 47        |
| 3.5.4    | PCR da miniprep.....   | 47        |
| 3.5.5    | Recombinação LR do gene da epsina em vetor pTc GFP do sistema Gateway.....                 | 48        |
| 3.5.6    | Transfecção do vetor pTc GFP-epsina em <i>T. cruzi</i> .....                               | 48        |
| 3.5.7    | Imunolocalização por microscopia confocal.....   | 49        |
| 3.6      | PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-EPSINA.....  | 50        |
| 3.6.1    | Recombinação da proteína recombinante com pDEST.....                                       | 50        |
| 3.6.2    | Transformação da proteína recombinante epsina ligada ao vetor pDEST.....                   | 51        |
| 3.6.3    | Expressão da proteína recombinante em <i>Escherichia coli</i> e teste de solubilidade..... | 52        |
| 3.6.4    | Purificação da proteína recombinante expressa em <i>E. coli</i> .....                      | 53        |
| 3.6.5    | Teste da purificação da proteína recombinante expressa em <i>E. coli</i> .....             | 53        |
| 3.6.6    | Teste pré-imune do soro de camundongos BALBc.....  | 53        |
| 3.6.7    | Produção de anticorpos policlonais.....  | 54        |
| 3.6.8    | Análise de especificidade do antissoro.....  | 54        |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>   | <b>55</b> |
| 4.1      | IDENTIFICAÇÃO DOS GENES PARA EPSINA EM <i>T. CRUZI</i> .....                               | 56        |
| 4.2      | AMPLIFICAÇÃO DO GENE .....   | 60        |
| 4.3      | CLONAGEM DO GENE EM VETOR pDONR™221 E SELEÇÃO EM CÉLULAS DH5A DE <i>E. COLI</i> 62         |           |
| 4.4      | LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE EPSINA RECOMBINADA COM GFP.....                                  | 64        |
| 4.4.1    | Extração das construções contendo o vetor pDONR™221 e recombinação em vetor pTc GFP 64     |           |
| 4.4.2    | Seleção dos clones contendo a proteína recombinante.....                                   | 65        |
| 4.4.3    | Localização subcelular da epsina.....  | 66        |
| 4.4.4    | Colocalização de epsina e cadeia leve de clatrina .....                                    | 69        |
| 4.5      | PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS .....   | 70        |
| 4.5.1    | Recombinação de epsina em pDEST e transformação em <i>E. coli</i> .....                    | 71        |
| 4.6      | EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE EM <i>E. COLI</i> E TESTE DE SOLUBILIDADE .....         | 72        |
| 4.7      | PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE .....   | 74        |
| 4.8      | IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS BALBC.....   | 76        |
| 4.9      | ANÁLISE DO ANTICORPO .....   | 77        |
| <b>5</b> | <b>CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....</b>   | <b>79</b> |

## 1 Introdução

Em 1909 o pesquisador brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro Chagas descreveu pela primeira vez a Doença de Chagas (NUNES *et al.*, 2013). De acordo com estudos paleoparasitológicos, entretanto, os primeiros casos de infecção teriam ocorrido há cerca de 9000 anos atrás (AUFDERHEIDE *et al.*, 2004). Essa enfermidade, que tem por agente etiológico o parasita *Trypanosoma cruzi*, é endêmica na América Latina, sendo uma das principais causadoras de mortes súbitas no Brasil (RASSI *et al.*, 2001).

Ao longo dos anos, a Doença de Chagas teve relevante impacto na economia do Brasil. Estima-se que, entre 1979 e 1981, a moléstia teria causado ao país um prejuízo de 259.152 anos em capacidade produtiva, devido à debilidade física dos pacientes infectados, que os impossibilitava de trabalhar (MUÑOZ-SARAIVA *et al.*, 2012). Ainda hoje, essa endemia se caracteriza pelo elevado custo social, principalmente em decorrência da sua incidência sobre os trabalhadores agrícolas (VINHAES e DIAS, 2000). Além disso, segundo cálculos mais recentes realizados por Alvaro Moncayo, publicados em 2003, para realizar cirurgia corretiva em todos os pacientes crônicos com complicações cardíacas, seria necessário desembolsar aproximadamente 750 milhões de dólares por ano.

Estudos discutem as deficiências no sistema de notificação de óbitos nacionais. A falta de acesso das populações carentes ao atendimento médico, erros de diagnóstico e diferenças regionais estão entre as principais causas de erros estatísticos que comprometem a fidedignidade dos dados (FRIAS *et al.*, 2008). Acredita-se que haja subnotificação de casos da Doença de Chagas, o que indica que os prejuízos causados por essa enfermidade seriam ainda maiores que os calculados (RODRIGUES *et al.*, 2013). Assim sendo, os danos que essa endemia causa à economia e à saúde são, na realidade, inestimáveis.

Diante desse quadro, é possível compreender a importância de projetos que pesquisem maneiras para prevenir a transmissão da doença, pesquisas básicas para compreensão da biologia do parasita, iniciativas que conscientizem a população a respeito dos riscos e sintomas. Além disso, é essencial que haja estudos que investiguem drogas para o tratamento para indivíduos já infectados.

## 1.1 O VETOR

Acredita-se que, inicialmente, a tripanossomíase americana tenha surgido como uma moléstia zoonótica. São conhecidas mais de 100 espécies de vertebrados passíveis de contaminação pelo parasita. Com o desmatamento de florestas para construção de casas em áreas rurais, triatomíneos passaram a se adaptar ao ambiente doméstico, vivendo principalmente em frestas de moradias de pau a pique. Esses insetos se alimentam de sangue de vertebrados e, ocasionalmente, ingerem *T. cruzi* presente no sangue de animais contaminados. Assim, o homem passou a fazer parte do ciclo de vida do *T. cruzi*, que é transmitido durante o repasto sanguíneo do inseto infectado com o subsequente depósito de parasitas na corrente sanguínea do indivíduo (FERNANDES e ANDREWS, 2013).

Os principais triatomíneos transmissores na América Latina são: o *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis* e *Panstrongylus megistus* no Cone Sul; *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* nos Andes e na América Central; *Triatoma dimidiata* e *Triatoma barberi* no México (Figura 1). Todos esses organismos são pertencentes à família *Reduviidae*, subfamília *Triatominae*, ordem *Hemiptera*, subfilo *Hexapoda*, filo *Arthropoda* (GORLA e NOREAU, 2010).



FIGURA 1 - MAPA DA DISTRIBUIÇÃO DAS DIFERENTES ESPÉCIES DE TRIATOMÍNEOS NA AMÉRICA LATINA. FONTE: WESTPHALEN, BISUGO e ARAÚJO (2012, p.24)

## 1.2 O PARASITA

O *Trypanosoma cruzi* é um tripanosomatídeo flagelado pertencente ao reino Protista, família Trypanosomatidae. Por se tratar de um organismo unicelular eucarionte, o *T. cruzi* compartilha de muitas organelas encontradas em mamíferos, possuindo adicionalmente cinetoplasto, acidocalcisomo, reservossomo e glicosomo. Esse protozoário apresenta uma peculiar camada de microtúbulos que acompanha a membrana celular e confere rigidez à célula. Essa rede de proteínas é tão estável que resiste a altas temperaturas, estresse mecânico e a drogas como taxol e nocodazole, que despolimerizam microtúbulos de mamíferos (RODRIGUES *et al.*, 2014).

A membrana plasmática dos tripanosomatídeos pode ser dividida em três principais domínios: o corpo da célula, o flagelo e a bolsa flagelar. Diferentemente de outros organismos da família Trypanosomatidae, o *T. cruzi* apresenta também

um canal chamado complexo citóstoma-citofaringe, através do qual realiza trocas nutricionais com o ambiente (PORTO-CARREIRO *et al.*, 2000).

### 1.2.1 Cinetoplasto

Estrutura característica da ordem Kinetoplastida, à qual pertence o *T. cruzi* (Figura 2). Surge como uma ramificação das cristas mitocondriais e tem como função alojar o DNA mitocondrial. Uma vez que cada forma evolutiva do parasita apresenta um cinetoplasto de morfologia e posição características, essa organela é utilizada para identificação de diferentes fases do ciclo parasítico em microscopia de fluorescência (BRENER, 1997).

### 1.2.2 Flagelo e bolsa flagelar

O flagelo tem início em uma estrutura denominada corpo basal e passa por uma invaginação na membrana conhecida como bolsa flagelar. Ele permanece conectado à membrana ao longo de uma grande extensão do corpo celular. Apenas nas formas tripomastigota e epimastigota, a ponta distal do flagelo encontra-se livre do corpo celular. Dessa maneira, movimentos do flagelo resultam no deslocamento do tripanosomatídeo. Na forma amastigota o flagelo é muito curto e, algumas vezes, conserva-se dentro da bolsa flagelar (DE SOUZA, 2002).

Na região da bolsa flagelar a rede de microtúbulos é descontínua, permitindo o intercâmbio de moléculas e a endocitose (Figura 2). Acredita-se, inclusive, que toda a endocitose mediada pela proteína clatrina ocorra através dela (KALB, 2011).

Essa estrutura está presente em todas as formas evolutivas do *T. cruzi* e é preservada entre os tripanosomatídeos. A presença de hemidesmossomos entre a bolsa flagelar e o flagelo restringe o acesso de materiais extracelulares ao corpo celular. Por essa região penetram apenas vesículas revestidas pela proteína

clatrina, que se fundem com endossomos no interior da célula (WEBSTER e RUSSEL, 1993).

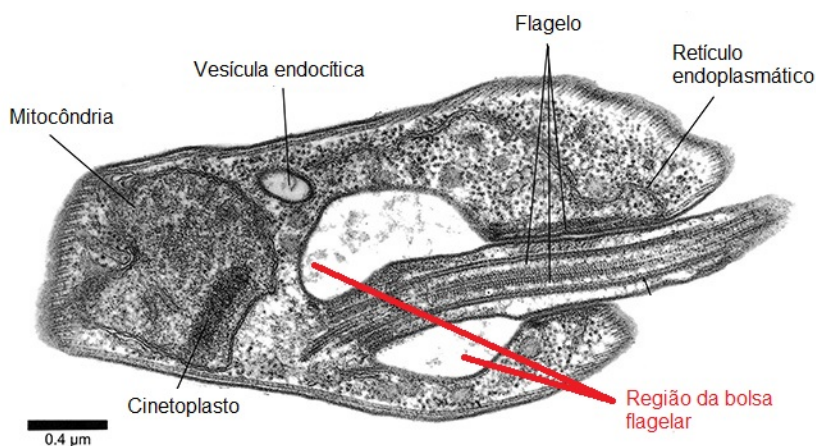


FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DA BOLSA FLAGELAR EM TRIPANOSOMATÍDEOS. EM DESTAQUE (VERMELHO), A BOLSA FLAGELAR. ADAPTAÇÃO DE WEBSTER E RUSSEL (1993, p. 202).

### 1.2.3 Complexo citóstoma-citofaringe

É uma invaginação da membrana que penetra o citoplasma e termina na porção posterior da célula, após a região nuclear. Em sua morfologia, apresenta uma abertura circular (de 0,3 µm de diâmetro aproximadamente) próxima à bolsa flagela e ao Golgi, afunilando à medida em que se aprofunda (RODRIGUES *et al.*, 2014). Estudos de morfologia indicam que a invaginação tem forma espiral e que sua dimensão varia entre diferentes organismos. De forma global, parasitas com citofaringe diminuta apresentam menor capacidade endocítica (RAMOS *et al.*, 2011).

Em 1999, Okuda e colaboradores confirmaram a interação entre bolsa flagelar e complexo citóstoma-faringe através de conexões do citoesqueleto. Essa conexão foi melhor descrita em 2014 por Alcantara e colaboradores. O vínculo entre as duas estruturas foi demonstrado nesse estudo, sendo estabelecido que o mesmo ocorre por intermédio de microtúbulos citoplasmáticos. Esses microtúbulos não abrangem o córtex subpelicular, permitindo a endocitose.

Esse aparelho diferencia o *T. cruzi* dos tripanosomatídeos africanos (MILDER e DEANE, 1969) e está presente apenas na forma epimastigota e amastigota do parasita, participando de processos endocíticos (PORTO-CARREIRO *et al.*, 2000).

#### 1.2.4 Ciclo de vida do parasita

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário capaz de infectar uma ampla gama de células nucleadas. Para poder se propagar entre seus hospedeiros vertebrados (dentre eles, o ser humano), utiliza-se de vetores supracitados da família *Reduviidae* como *Triatoma infestans* e *Rhodnius prolixus* (FERNANDES e ANDREWS, 2013).

Assim sendo, esse organismo precisa conseguir se adaptar aos vários habitats encontrados em seus diversos hospedeiros e células alvo. Utilizando-se do maquinário celular, o *T. cruzi* regula sua expressão gênica de acordo com o ambiente ao seu redor. A cada etapa do seu ciclo de vida, ele consegue se reorganizar estruturalmente entre suas diferentes formas evolutivas (ARAÚJO e TEIXEIRA, 2011).

O ciclo é composto por dois hospedeiros: o vetor, também conhecido como barbeiro, e o hospedeiro mamífero, por exemplo, o ser humano (CHAGAS, 1909).

Na circulação sanguínea do indivíduo o parasita se encontra na fase tripomastigota sanguínea. Nessa etapa, o parasita tem por objetivo encontrar e invadir células. Para tanto, apresenta flagelos emergindo da bolsa flagelar, que auxiliam em sua locomoção através do sangue do hospedeiro. Para facilitar a penetração celular, a forma tripomastigota sanguínea tem por característica o corpo longo e delgado, entre 16,3 e 21,8  $\mu\text{m}$  de comprimento (HORAIE, 1972). A presença de um grande cinetoplasto circular na parte posterior do flagelo, em posição terminal ou subterminal, caracteriza os espécimes sanguíneos (SOUZA, 1999; BRENER, 1997).

Esses protozoários circulantes encontram uma célula e entram por intermédio de um vacúolo parasitóforo. Segundo Mortara e colaboradores (2005),

eles são capazes de induzir fagocitose até mesmo em células não fagocíticas. Intracelularmente, o *T. cruzi* abandona o vacúolo parasitóforo e se diferencia em amastigota, uma forma com alta capacidade de multiplicação. Nessa etapa, o tripanosomatídeo apresenta um corpo oval, de aproximadamente 3-5 µm de diâmetro, e um curto flagelo, de difícil visualização (Figura 3A) (RODRIGUES *et al.*, 2014 e TYLER e ENGMAN, 2001). A replicação dentro da célula do hospedeiro é um mecanismo do parasita para driblar seu reconhecimento pelo sistema imune (SOUZA, 1999). Após aproximadamente nove ciclos de divisão binária, ocorre diferenciação para a forma tripomastigota sanguínea, que através do intenso movimento do flagelo rompe a célula e é liberada novamente na circulação (DVORAK e HYDE, 1973).

Eventualmente, a pessoa infectada tem o sangue ingerido pelo barbeiro durante o repasto. Juntamente com o sangue, esses tripomastigotas são ingeridos pelo inseto. No tubo digestório do Triatomíneo o *T. cruzi* se diferencia para a forma epimastigota, que é altamente replicativa (LÓPEZ-ORDÓÑEZ *et al.*, 2009). Para tanto, o corpo do parasita se alonga e o flagelo se estende. O cinetoplasto fica junto à bolsa flagelar, anterior ao núcleo (Figura 3B). Nesse estágio, o protozoário chega a atingir 30 µm de comprimento (TYLER e ENGMAN, 2001).

No final do tubo digestivo as formas epimastigotas encontram um ambiente de estresse nutricional, com baixos níveis de glicose e aderem ao tecido da superfície do intestino (ALVES *et al.*, 2007). Assim, o *T. cruzi* se diferencia novamente, formando tripomastigotas metacíclicos infectivos, de aproximadamente 17-22 µm de comprimento e um corpo alongado e delgado (HORAE, 1972) com um largo e arredondado cinetoplasto subterminal (Figura 3C) (SOUZA, 1999). Agora, no intestino do vetor, são eliminados pelo aparelho excretor do inseto durante o repasto sanguíneo e penetram o organismo do mamífero através das discontinuidades na pele do indivíduo. O ato de coçar as feridas da picada do barbeiro facilita ainda mais a entrada de tripomastigotas metacíclicos na corrente sanguínea, reiniciando o ciclo (TYLER e ENGMAN, 2001).

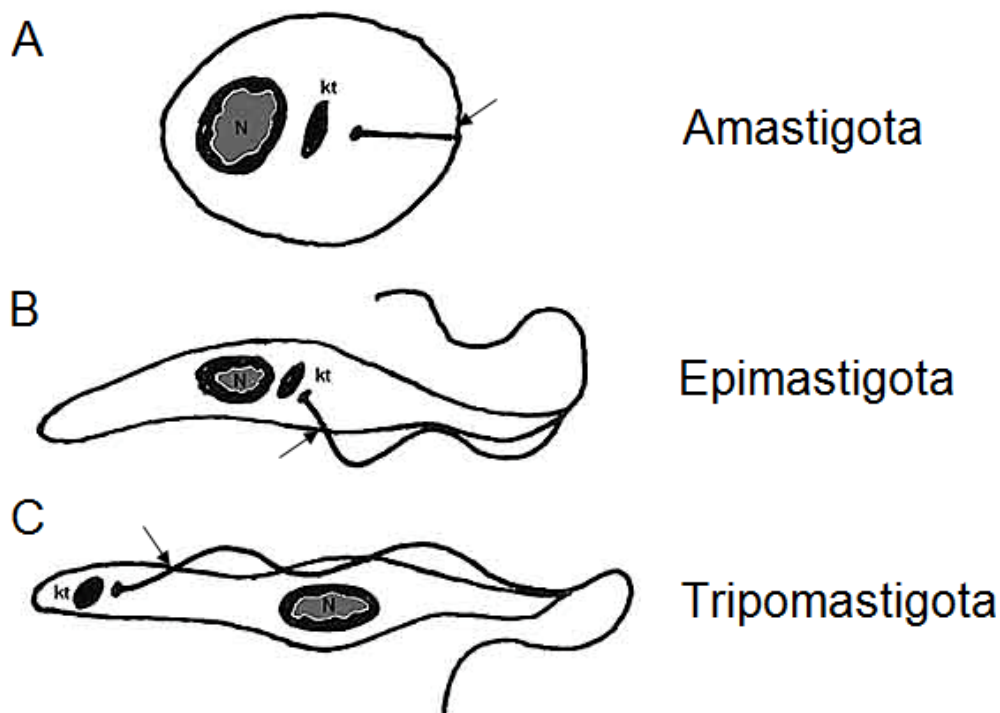


FIGURA 3 – POSIÇÃO DO CINETOPLASTO (kt) EM RELAÇÃO AO NÚCLEO (N) E À BOLSA FLAGELAR (MARCADA COM SETA) NAS DIFERENTES FORMAS EVOLUTIVAS DO PARASITA. A) AMASTIGOTA B) EPIMASTIGOTA C) TRIPOMASTIGOTA METACÍCLICA. ADAPTADO DE ROSSI *et al.* (2003).

### 1.3 A DOENÇA

#### 1.3.1 Fase Aguda

Essa etapa ocorre, geralmente, logo após a entrada do *T. cruzi* no organismo. É sintomática em apenas 5% dos indivíduos. Nesses casos atípicos, geralmente há febre, dores musculares, diarreia, cólicas, cianose e distúrbios respiratórios com início entre a primeira e segunda semana após a exposição (TEIXEIRA *et al.*, 2006). Quando a entrada do parasita ocorre através da pele, frequentemente há formação do chagoma, um inchaço característico acompanhado por eritema (Figura 4A). Em casos em que o parasita penetra por via das membranas da mucosa ocular, surge o sinal de Romanã, um edema unilateral na pálpebra e no tecido periocular (Figura 4B) (HEMMIGE *et al.*, 2013).

Adicionalmente, em menos de 1% dos casos de infecção aguda sintomática há manifestações graves, com miocardite, efusão pericárdica e/ou meningoencefalite (NUNES *et al.*, 2013).

Em aproximadamente 5% dos casos graves o indivíduo vai a óbito. Entretanto, a grande maioria evolui para uma remissão espontânea dos sinais clínicos, mesmo quando não há intervenção farmacêutica (TEIXEIRA *et al.*, 2006).

Após, em média, 3 a 4 meses os pacientes assintomáticos e sintomáticos que sobreviveram à fase aguda passam para a fase crônica. Nesse período, 40% permanecem assintomáticos por décadas sendo que alguns jamais virão a apresentar sinais clínicos da doença (DIAS, 1989).

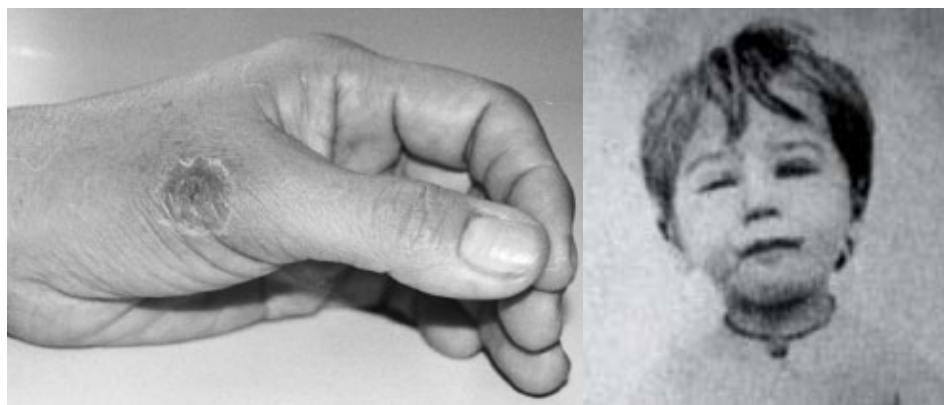


FIGURA 4 - SINAIS CUTÂNEOS DA INFECÇÃO POR CHAGAS. A) CHAGOMA. B) SINAL DE ROMANÃ. ADAPTADO DE KINOSHITA-YANAGA *et al.* (2009, p. 296) E COURA (2007, p. 118).

### 1.3.2 Fase crônica

Conforme supracitado, a etapa crônica é a que sucede a aguda. Caracteriza-se pelo surgimento de lesões irreversíveis em órgãos e tecidos ligados ao sistema cardíaco e gastrointestinal (MADRID *et al.*, 2004).

Um terço dos indivíduos chagásicos em fase crônica são sintomáticos (SILVEIRA, 1999): 94,5% apresentam complicações cardíacas como arritmia e insuficiência cardíaca e 4,5% sofrem de problemas gastrointestinais. Muitas dessas desordens evoluem vagarosamente, podendo-se viver anos sem que os danos aos tecidos sejam percebidos clinicamente (MENEHELLI *et al.*, 1982).

Os mecanismos envolvidos no tropismo do parasita, que se estabelece primordialmente no tecido cardíaco e gastrointestinal, ainda não foram completamente elucidados.

### 1.3.2.1 Alterações cardíacas

Após a fase aguda, mesmo quando desaparecem os sintomas, o processo inflamatório persiste, ainda que de maneira silenciosa. A persistência do parasita no tecido cardíaco desencadeia uma infiltração de linfócitos. Como consequência das reações imunes, há perda celular e até mesmo o surgimento de fibrose reparativa (HIGUCHI *et al.*, 1987). Estudos apontam que a agressão direta do parasita é menos danosa que os efeitos dos processos inflamatórios (PONUKOLLU *et al.*, 2007 e MARIN-NETO *et al.*, 2007).

A hipótese mais válida para o desenvolvimento de patologias cardíacas é a de que haja reação cruzada entre os antígenos do protozoário e os presentes em células do organismo humano. Dessa maneira, reações autoimunes, causadas pela similaridade estrutural dos epítomos das duas espécies, levaria a danos teciduais e subsequente falência do miocárdio (MARIN-NETO *et al.*, 2007 e CUNHA-NETO *et al.*, 2006).

Adicionalmente, há evidências de que haja danos ganglionares e perda de inervação no coração de pacientes chagásicos através de mecanismos de autoimunidade e inflamação. O comprometimento do sistema nervoso parassimpático nesse órgão foi evidenciado por estudos farmacológicos e fisiológicos. Como consequência, ações de regulação autonômica são prejudicadas. Além disso, danos às terminações parassimpáticas podem facilitar o aparecimento de arritmias e a ocorrência de morte súbita (BAROLDI *et al.*, 1997).

Assim sendo, o portador da doença apresenta dificuldades na resposta a mudanças de pressão cardíaca e no retorno venoso (RIBEIRO *et al.*, 2007). Reações inadequadas do coração a esses eventos levam a uma compensação morfológica do organismo: para que haja maior dilatação ventricular e maior força de contração, o coração aumenta em tamanho (Figura 5) (MARIN-NETO, 2007).

Por fim, o conjunto desses processos implica em diminuição no fluxo sanguíneo, isquemia focal, formação de trombos e agregamento de plaquetas, necrose e fibrose. Em muitos casos, em longo prazo, esses distúrbios culminam na morte do indivíduo (ROSSI *et al.*, 1984).

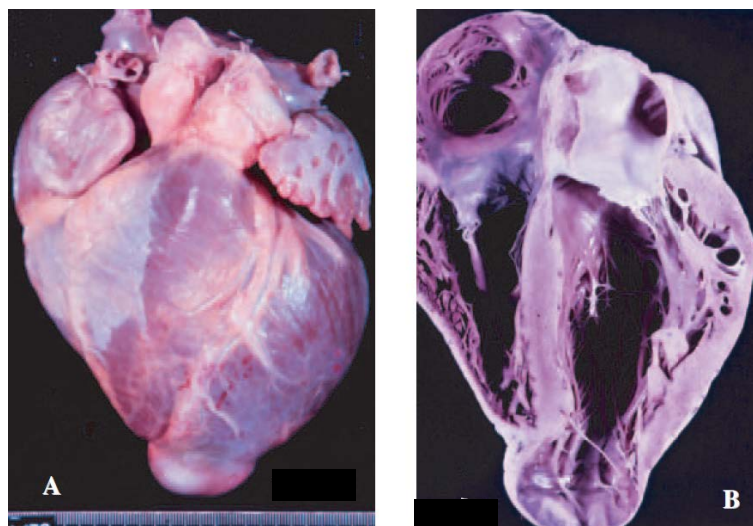


FIGURA 5 – ASPECTO MACROMORFOLÓGICO DO CORAÇÃO CHAGÁSICO. A) É POSSÍVEL OBSERVAR O AUMENTO EXACERBADO DO ÓRGÃO DE UM PORTADOR DA TRIPANOSSOMÍASE. B) SECÇÃO FRONTAL DO MESMO CORAÇÃO, EVIDENCIANDO O ALARGAMENTO DAS QUATRO CÂMARAS CARDÍACAS. FONTE: MARIN-NETO *et al.* (2007, p. 1110).

### 1.3.2.2 Alterações gastrointestinais

Assim como ocorre no tecido cardíaco, com o intuito de combater ao parasita alojado no organismo, o sistema imune desencadeia um processo inflamatório no tecido gastrointestinal. Esse mecanismo de defesa muitas vezes resulta em comprometimento dos plexos intramurais, células ganglionares e fibras nervosas submucosas e mioentéricas, por intermédio de uma reação auto imune (KOBBERLE, 1961 e ECKARDT *et al.*, 1995), que interfere na sinalização inibitória e excitatória do sistema digestório (OLIVEIRA *et al.*, 1995). Adicionalmente, estudos recentes apontam para uma diminuição nas células de Cajal, que participam da geração de atividade mioelétrica, importante para a motilidade intestinal (MADRID *et al.*, 2004). Como resultado dessas alterações, há

comprometimento da atividade esofágica (acalasia) e do trânsito intestinal (manifestado pela constipação severa e crescimento exagerado de bactérias) (TRONCON e IAZIGI, 1992). As lesões neuronais degenerativas afetam a produção de óxido nítrico e peptídeo vasoativo intestinal, alterando a capacidade de relaxamento do músculo liso da parede gastrointestinal (TRONCON *et al.*, 1993).

Existem também relatos de disfunções na acomodação frente a estiramentos: pacientes chagásicos apresentam menor capacidade de se adaptar a distensões causadas por ar e alimentos (TRONCON e IAZIGI, 1992). A descoordenação dos esfíncteres causa exacerbada dilatação nos órgãos digestórios e resulta na perda da capacidade contrátil, favorecendo hiperplasias e displasias (REZENDE *et al.*, 1985).

A presença de fibrose no plexo mioentérico e a infiltração de linfócitos desencadeiam um mecanismo compensatório de hipertrofia (TRONCON *et al.*, 1993). O crescimento anômalo de órgãos do aparelho digestório está entre uma das manifestações mais comuns de alteração gastrointestinal, exemplificadas pelo megacolon, megaesôfago, megaestômago, megaduodeno e megajejuno (BERN *et al.*, 2007). Necrose do cólon e câncer de esôfago estão entre as principais complicações que causam morte em pacientes de Chagas com manifestação gastrointestinal da doença (ROCHA *et al.*, 2003).

#### 1.4 DIAGNÓSTICO

Mais de cem anos após a descrição da doença por Carlos Chagas, o diagnóstico de Chagas permanece limitado. Os obstáculos não são apenas no âmbito técnico: aspectos socioeconômicos interferem na detecção da enfermidade. Primeiramente, é necessário que o indivíduo tenha acesso a unidades de saúde e esteja disposto a procurá-las quando houver suspeita da doença. Em segundo lugar, é indispensável que o profissional de saúde saiba reconhecer a endemia e seus sintomas, estando habilitado para sua identificação. É preciso, também, aplicar o método diagnóstico correto, de acordo com a fase da doença em que se encontra o paciente. Com frequência o mal de Chagas é confundido com outras

doenças de sintomas semelhantes, levando à aplicação de um tratamento ineficaz (MONCAYO, 2003).

Acredita-se que a baixa sensibilidade e especificidade de alguns testes somadas ao alto índice de reatividade cruzada dos exames atuais compromete a detecção da doença (PEREZ *et al.*, 2014; FRANK *et al.*, 2003)

#### 1.4.1 Diagnóstico na fase aguda

A ausência de sintomas na maioria dos pacientes dificulta o diagnóstico durante a fase aguda. Em contrapartida, nesse estágio inicial de infecção os parasitas podem ser encontrados circulando na corrente sanguínea. Assim sendo, é possível detectá-los através de exames sorológicos, hemocultura, PCR ou visualização do parasita em lâminas de sangue (MOROCOIMA *et al.*, 2012 e CABALLERO *et al.*, 2007).

#### 1.4.2 Diagnóstico na fase intermediária

Durante a fase silenciosa da doença, há sinais de infecção, que podem ser confirmados por testes sorológicos ou parasitológicos, mas a normalidade nas radiografias do peito, eletrocardiogramas e ausência de sinais clínicos/sintomas dificulta em muito o diagnóstico da Doença de Chagas. Assim sendo, raramente a doença é detectada neste estágio, o que leva à evolução da tripanossomíase e à fase crônica (RIBEIRO e ROCHA, 1998).

### 1.4.3 Diagnóstico durante a fase crônica

Geralmente, pacientes infectados pelo tripanosomatídeo *T. cruzi* voltam a procurar assistência médica apenas na fase crônica da Doença, quando apresentarão arritmia cardíaca, tromboembolismo, contrações ventriculares prematuras, dentre outras manifestações graves, que denotam lesões e comprometimento irreversíveis em um ou mais órgãos (ANDRADE *et al.*, 2005).

A fase crônica possui uma ampla gama de possíveis manifestações clínicas. Assim sendo, é recomendado recorrer às análises bioquímicas para confirmação do diagnóstico. Exames que detectam anticorpos contra o *T. cruzi* podem ser aplicados como, por exemplo, ELISA, imunofluorescência e hemoaglutinação (MS, 2005).

Se confirmado o diagnóstico, podem-se realizar exames de eletrocardiografia, que revelam anormalidades típicas da manifestação cardíaca do mal de Chagas. Por esse processo é possível avaliar o grau de comprometimento do indivíduo e determinar a severidade da doença (RIBEIRO *et al.*, 2012). Pacientes com ECG normal, geralmente, possuem um bom prognóstico e raramente são vítimas de morte súbita ou disfunção global do ventrículo esquerdo (RIBEIRO e ROCHA, 1998).

Em casos avançados de Chagas, é possível realizar exames de radiografia para detectar cardiomegalias (RASSI *et al.*, 2007; PEREZ *et al.*, 2003) e ecocardiografias para estudar a função ventricular. Esses exames complementares ajudam a determinar a melhor estratégia para tratamento (BARRAL *et al.*, 2010).

## 1.5 TRANSMISSÃO E ESTRATÉGIAS DE COMBATE À ENDEMIAS

A tripanossomíase americana dispõe de uma ampla gama de vias para a transmissão da doença, conforme descrito a seguir.

### 1.5.1 Vetorial

Conforme discutido anteriormente, o triatomíneo barbeiro pode participar como vetor na transmissão da Doença de Chagas. Quando o inseto hematófago infectado pica um indivíduo com o intuito de se alimentar, surge uma descontinuidade na pele da pessoa, que serve como porta de entrada para os tripanosomatídeos presentes nas fezes do barbeiro. O prurido causado pela picada leva o sujeito a coçar a ferida, facilitando ainda mais a chegada do *T. cruzi* à circulação sanguínea.

Essa via é considerada o principal meio de propagação da endemia, chegando a ser responsável por 80% dos casos segundo dados de 1987 (TAFURI, 1987). Por esse motivo, o inseto foi alvo das medidas preventivas governamentais e regionais nos últimos anos (GUTIERREZ *et al.*, 2009). Fundou-se a *Iniciativa del Cono Sur* (INCOSUR), que planejou o uso de inseticidas em mais de 2,5 milhões de residências (LOPÉZ-ORDÓÑEZ *et al.*, 2009).

Aspectos socioeconômicos também foram determinantes. O crescimento financeiro e a modernização permitiram que o ser humano deixasse as moradias de pau a pique e passassem a construir casas mais modernas, diminuindo a presença doméstica do vetor (SCHOFIELD *et al.*, 2006).

### 1.5.2 Transfusão sanguínea e doação de órgãos

A presença de tripanosomatídeos na corrente sanguínea de indivíduos infectados fez de Chagas um problema de saúde pública ainda maior em países endêmicos (ASSAL e CORBI, 2011). Conforme mencionado anteriormente, muitos pacientes chagásicos permanecem assintomáticos por muitos anos. Assim sendo, uma grande parcela de pessoas contaminadas carrega formas tripomastigotas sanguíneas no sangue sem ter consciência disso. Esses carreadores da doença podem, acidentalmente, transmitir a moléstia ao doar sangue ou durante transplante de órgãos (BERN *et al.*, 2011).

A grande problemática dessa via de transmissão é o longo período de incubação do parasita, que pode levar até quatro meses, e os fatores envolvidos nesses procedimentos, que podem agravar o quadro clínico (como, por exemplo, a imunossupressão e a debilidade do paciente) (BERN *et al.*, 2011).

Com a popularização de campanhas pró-doação de sangue, aumentaram os casos de contaminação por transfusão sanguínea. Foram então implementados testes de triagem, obrigatórios em bancos de sangue e hospitais. Esses exames realizam uma busca por anticorpos reativos contra proteínas do *T. cruzi* no sangue de doadores para identificar os que foram expostos ao parasita. O mesmo foi aplicado para doadores de órgãos (ASSAL e CORBI, 2011).

A presença de imigrantes latinos em países não endêmicos levou à propagação da moléstia em outros continentes, além da América Latina, principalmente pela transfusão de sangue e transplante de órgãos infectados. Por esse motivo, foi necessário implantar esses testes em diversos países, incluindo USA e Canadá (DODD, 2007).

### 1.5.3 Oral

Com o surgimento de campanhas de combate ao inseto vetor e a implantação de triagens no sangue de doadores, outras formas de transmissão da Doença de Chagas cresceram em relevância. Dentre elas, a contaminação por via oral tem tido enfoque nos últimos anos (TOSO *et al.*, 2011).

Devido à alta resistência do *T. cruzi* ao suco gástrico (SILVEIRA, 2006), é possível adquirir a Doença ao ingerir alimentos contendo fezes do vetor ou ao comer carne crua de animais silvestres, que funcionam, nesse caso, como reservatórios de tripanosomatídeos. A presença de tribos indígenas que utilizam sangue animal como fonte de nutrientes demonstra a dificuldade em se controlar a difusão por essa via (GUHL *et al.*, 2014).

Mais recentemente, houve também relatos no Paraná de pessoas que contraíram a endemia ao beber caldo de cana com pedaços triturados do inseto vetor (PINTO *et al.*, 1990).

Infelizmente, a única maneira de prevenir a disseminação da tripanossomíase por esse meio é o controle do processamento de alimentos. A aplicação de boas técnicas de armazenamento e transporte de perecíveis podem ser promissoras nesse âmbito (SILVEIRA, 2006). Entretanto, a alta resistência do *T. cruzi* a variações de temperatura e pH e o envolvimento de animais silvestres no hábito alimentar de certas populações dificultam a contenção da transmissão por essa via (TOSO *et al.*, 2011). Há carência de estudos que investiguem maneiras práticas e baratas para eliminação do parasita presente em alimentos.

#### 1.5.4 Congênita e por amamentação

O primeiro relato da presença dos parasitas no leite materno ocorreu em 1936, por Mazza e colaboradores. Entretanto, essa publicação foi controversa, uma vez que não foi possível comprovar que o leite não estava contaminado pelo sangue da mãe. Todavia, estudos posteriores como os de Shikanai-Yasuda e colaboradores (1990) indicavam essa via como a mais provável forma de contaminação em dois casos estudados. O conteúdo protéico presente no leite bem como a temperatura ao qual é submetido dentro do corpo seriam, segundo Norman e López-Vélez (2013), indícios de que a transmissão pela amamentação seria possível e seriam necessários estudos posteriores para comprovação dessa teoria.

Quando a mãe é portadora da doença, pode ocorrer contágio através da placenta, conforme reportado na Espanha e Suíça (MUÑOZ *et al.*, 2009; MUÑOZ *et al.*, 2007). O risco de transmissão congênita de uma mãe infectada para o filho é de 0,13 a 17% de acordo com a densidade de parasitas materna (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Essa via tem um forte impacto, uma vez que a maioria das crianças segue um curso clínico assintomático, resultando na falta de diagnóstico e tratamento, progredindo para a fase crônica da doença durante a vida adulta (SICURI *et al.*, 2009).

Ainda não foi desenvolvida nenhuma medida preventiva para a transmissão congênita. Entretanto, quando detectada a parasitemia na mãe, é necessário impedir que ela amamente a criança, evitando, assim, a transmissão pelo

aleitamento (CARLIER *et al.*, 2011). Em casos em que os benefícios nutricionais da amamentação sobreponham os riscos de transmissão da doença, pode haver aleitamento, desde que o estado de saúde da criança seja acompanhado e o tratamento seja administrado aos menores sinais de manifestação de sintomas (NORMAN e LÓPEZ-VÉLEZ, 2013).

#### 1.5.5 Acidentes laboratoriais

Esse meio de transmissão já havia feito mais de 50 vítimas em 1980. Considera-se que esse número seja subestimado uma vez que, nessa via, o contágio pode passar despercebido e não ser diagnosticado. Adicionalmente, não há interesse na divulgação desses casos, pois contaminação laboratorial denota inaptidão técnica e falta de preparo/segurança em centros de pesquisa (BRENER, 1984). Dados atuais são escassos, mas com a criação de diversos institutos de pesquisas focados no estudo da Doença (como é o caso da FIOCRUZ), há inúmeros cientistas sob risco de acidentes. Assim sendo, é primordial o treinamento desses profissionais e a oferta de condições adequadas de trabalho (DIAS e NETO, 2011).

### 1.6 EPIDEMIOLOGIA

A transmissão através do vetor tem área relativamente delimitada, ocorrendo em grande parte entre 42°N a 40°S de latitude nas Américas, abrangendo desde o sul dos Estados Unidos da América até o sul da Argentina, acompanhando o padrão de distribuição do triatomíneo vetor. Entretanto, outras vias de contágio conferem à doença um perfil ainda mais amplo de transmissão (MONCAYO, 2013).

### 1.6.1 Em áreas endêmicas

Acredita-se que, no princípio, o mal de Chagas acometia, majoritariamente, populações rurais e periurbanas, cujas habitações eram construídas próximas a matas e animais silvestres, conforme discutido anteriormente. Entretanto, com o êxodo rural entre as décadas de 1970 a 1980, intensificou-se o número de casos na área urbana. Esse fenômeno foi relacionado principalmente à transmissão por meio de transfusão sanguínea (LEVY *et al.*, 2014).

Os países endêmicos de maior prevalência da doença são: Bolívia (6,8%), Argentina (4,1%), El Salvador (3,4%), Honduras (3,1%) e Paraguai (2,5%). Entretanto, controversamente, três países detêm, em conjunto, 60% de todos os casos de Chagas. São eles: Brasil, México e Argentina (MONCAYO, 2003).

No Brasil, em 1975, a área endêmica atingia 36% da extensão total do país, incluindo 2493 municípios em 12 estados, principalmente entre a caatinga e o cerrado (MONCAYO, 2003; COSTA *et al.*, 2003). Estima-se que, atualmente, mais de 4 milhões de brasileiros estariam infectados pela endemia, com até 6% de prevalência (CAROD-ARTAL, 2014). Somente em São Paulo esse número chega a 300 mil e no Rio de Janeiro, mais de 200 mil casos (DIAS, 2011). A maior parte dos casos de infecção ocorreu por meio de vetores ou transfusões sanguíneas. Entretanto, há casos esporádicos de contaminação oral que são relevantes, principalmente na Amazônia brasileira (MONCAYO e SILVEIRA, 2009 e YOSHIDA, 2008).

No Peru e na região do Chaco, a transmissão vetorial ainda é marcante, provavelmente pela infestação do parasita em materiais de construção e animais domésticos (MADY *et al.*, 1994; MONCAYO, 2009). No Peru, estima-se que haja aproximadamente 394 mil casas infestadas por *Triatoma infestans* e 24 mil pessoas infectadas.

Segundo dados de 1991, aproximadamente 16 a 18 milhões de pessoas em áreas endêmicas são portadoras da enfermidade (WHO, 2007). Nesses locais, 20% da população está exposta ao risco de contrair a moléstia.

Maiores detalhes a respeito da distribuição da doença podem ser observados na Figura 6.

### 1.6.2 Em áreas não endêmicas

Com a migração de pessoas infectadas por *T. cruzi*, a moléstia atingiu localidades não endêmicas como, por exemplo, Canadá e países europeus (GUERRI-GUTTENBERG *et al.*, 2008; SCHMUNIS, 2007), sendo que os mais afetados são EUA e Espanha. Contágio através da transfusão sanguínea é a maior causa de disseminação de Chagas nesses países (STRASEN *et al.*, 2014). Em 2011, Basile e colaboradores reportaram 4290 casos na Europa, com 3821 pacientes na Espanha (Figura 6).

A proporção de latino-americanos infectados que migraram para EUA, Canadá e Europa também é significativa, chegando a 5,2% em alguns casos (BASILE *et al.*, 2011). Em 2007, nos EUA, 2% dos 17 milhões de imigrantes eram carreadores da doença, enquanto no Canadá essa proporção chegava a 3,5% (número que representa 157 mil pessoas). Além disso, acredita-se que esses números estejam abaixo da realidade, uma vez que levam em consideração apenas imigrantes legalizados e que tiveram acesso a métodos diagnósticos (BERN *et al.*, 2011).

Outra via comum de transmissão nesses países é a congênita. Em Barcelona, por exemplo, a seroprevalência de Chagas em mulheres bolivianas grávidas foi de 27,7%, sendo que a taxa de transmissão vertical atingia 7,3% (MUNOZ *et al.*, 2009).

Esses dados indicam que qualquer país em que há imigração de latino-americanos está sujeita a casos da doença e ao contágio por transfusão de sangue, transplante de órgãos, dentre outras vias de contaminação.

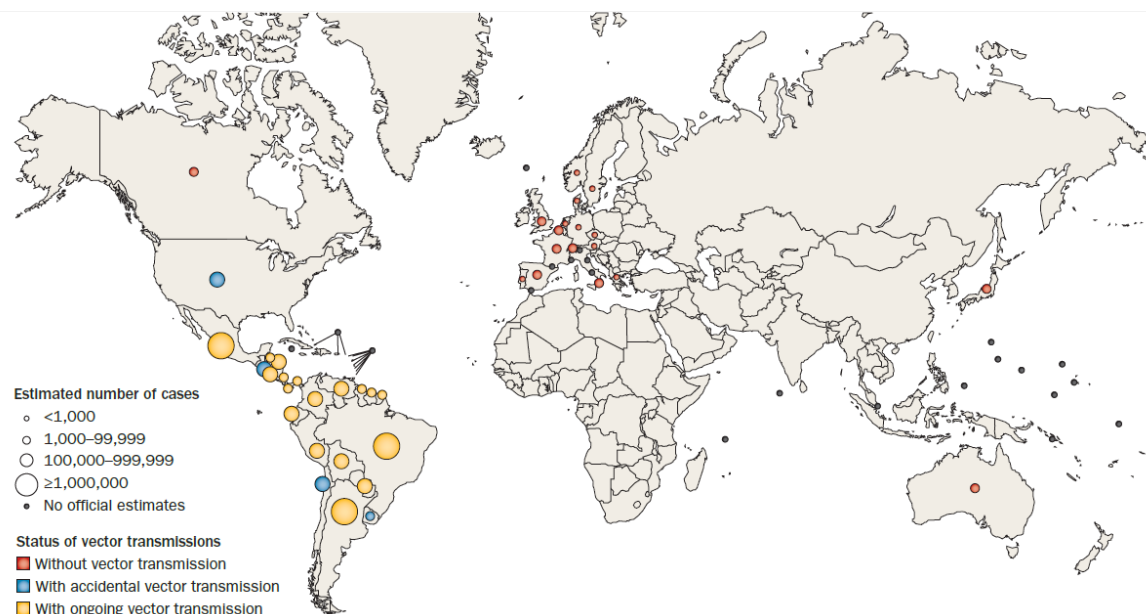


FIGURA 6 – DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DA DOENÇA DE CHAGAS EM PAÍSES ENDÊMICOS E NÃO ENDÊMICOS. FONTE: RIBEIRO *et al.* (2012, p. 576).

### 1.6.3 Aspectos socioeconômicos

A Doença de chagas ainda é considerada uma enfermidade negligenciada, pois está associada à pobreza e a países em desenvolvimento (WHO, 2010). Conforme já ressaltado, os primeiros registros de contágio ocorreram devido à coexistência entre o homem e o vetor em residências humildes, que davam vazão à sobrevivência do inseto dentro de frestas da construção (MAC CORD *et al.*, 1983).

Por muitos anos essa tripanossomíase não recebeu a devida atenção de programas de saúde e causou morte de muitos habitantes de zonas rurais (WHO, 2010). Mesmo hoje, o atendimento médico nos países mais afetados não é capaz de alcançar algumas áreas mais afastadas, onde vivem pessoas carentes, no interior de pequenas cidades. A falta de acesso ao diagnóstico e ao tratamento ainda estão entre os fatores que contribuem para com a morte de pacientes chagásicos.

## 1.7 IMPACTO DO CONTROLE

Iniciativas governamentais e regionais de combate aos triatomíneos reduziram em 70% a incidência de Chagas na América Latina, em conjunto com a triagem sanguínea em bancos de sangue (MONCAYO, 2003).

Em países não endêmicos, entretanto, não há programas de controle vetorial. Além disso, o exame de sangue para detecção de pessoas infectadas não é obrigatório em muitos países não-endêmicos. Assim sendo, é possível que haja transmissão através da transfusão sanguínea nessas localidades (SCHOFIELD *et al.*, 2006; PETHERICK, 2010).

Adicionalmente, regiões que, anteriormente, haviam sido consideradas livres da doença, hoje em dia relatam regressão nesse quadro, com relatos de contaminação oral e através de animais selvagens (SHIKANAY-YASUDA e CARVALHO, 2012; COURA e JUNQUEIRA, 2012; AGUIAR *et al.*, 2007). Assim sendo, Chagas permanece entre as maiores causas de doenças cardíacas e morte em pessoas acima de 60 anos nas regiões endêmicas (MARTINS-MELO *et al.*, 2012). A enfermidade ainda é a maior causadora de insuficiência cardíaca na América Latina (ANDRADE *et al.*, 2011).

## 1.8 TRATAMENTOS ATUAIS

Quando há identificação de pacientes em fase aguda, o procedimento padrão é a administração de Nifurtimox, entre o 50° e o 120° dia de infecção, ou Benzonidazol, após o 60° dia da contaminação. Esses medicamentos têm como princípio a redução de grupos nitro através da nitroreductase, gerando espécies citotóxicas que danificam DNA, lipídeos e proteínas, com o intuito de combater o parasita (DOCAMPO e MORENO, 1986). Ambos compostos são associados a frequentes efeitos colaterais que incluem alergias, neuropatias e, em alguns casos, até mesmo leucopenia, granulocitopenia e agranulocitose (MANOEL-CAETANO e SILVA, 2007).

Em 50% dos pacientes, o *T. cruzi* desenvolve resistência às drogas, indicando que o tratamento quimioterápico é ineficiente em boa parte dos casos. O alto risco desses medicamentos associado à baixa eficácia são fatores limitantes no tratamento da Doença de Chagas (MUÑOZ-SARAVA *et al.*, 2012).

No caso de pacientes crônicos não é possível medicar o paciente com drogas anti-tripanosomais, pois a terapia em longo prazo seria altamente tóxica ao organismo (ANDRADE *et al.*, 2011). Além disso, as lesões causadas aos tecidos nessa etapa são irreversíveis e comprometem o bem estar do hospedeiro. Assim sendo, o único recurso atualmente disponível para indivíduos em fase crônica não abrange o combate ao parasita nem à doença: consiste meramente em amenizar os sintomas para que o portador de Chagas tenha uma melhor qualidade de vida e uma expectativa de vida maior. Em outras palavras, nessa etapa, essa moléstia é incurável: seus efeitos podem ser apenas remediados (RIBEIRO *et al.*, 2012).

Os procedimentos mais comuns na etapa crônica são:

- administração de  $\beta$ -bloqueadores, bloqueadores dos receptores de angiotensina II e enzima de conversão da angiotensina (ECA). Os três compostos têm como objetivo atenuar os episódios de manifestação clínica dos problemas cardíacos, diminuindo a possibilidade de insuficiência cardíaca e morte súbita (BOTONI *et al.*, 2007).

- transplante cardíaco é uma opção em casos de grave comprometimento do coração (ANDRADE *et al.*, 2011). Essa opção deve ser bem estudada, pois o uso de imunossupressores, comumente aplicados após a cirurgia, pode reativar a doença (BOCCHI e FIORELLI, 2001).

- administração de anticoagulantes em sujeitos sob risco de desenvolver tromboembolismo (ANDRADE *et al.*, 2011).

- marca-passos apresentam um bom prognóstico em indivíduos com bradicardia (de PAOLA *et al.*, 1995).

### 1.8.1 Problemas nos tratamentos atuais

Os tratamentos vigentes são limitados, sendo que a maior parte se ocupa estritamente em remediar as consequências da Doença (GUTIERREZ *et al.*, 2009). As quimioterapias são utilizadas apenas nos primeiros dias de infecção da Doença e apresentam baixa eficácia associada à ocorrência de efeitos colaterais.

Sobretudo, é crucial o desenvolvimento de uma terapia que possa abranger também os pacientes em fase crônica da doença.

## 1.9 ENDOCITOSE EM TRIPANOSOMATÍDEOS

Endocitose é o processo essencial de internalização do material extracelular através de invaginações na membrana. Essas invaginações dão origem a vesículas individuais no citoplasma. Esse processo possui grande importância para a fisiologia da célula e do organismo como um todo. A endocitose está presente no transporte de proteínas da mãe para o filho, na internalização de nutrientes por uma célula, no metabolismo do colesterol, na remoção de células senescentes, transdução e dispersão de sinais dentro da célula e entre células, eliminação de organismos patogênicos, dentre outras atividades vitais (BESTERMAN e LOW, 1983; SAMAJ *et al.*, 2004).

Existem vários tipos de endocitose como, por exemplo, endocitose dependente de caveolina, endocitose dependente de clatrina, macropinocitose, fagocitose e endocitose independente de clatrina e caveolina. Geralmente, esse procedimento envolve diversas proteínas que auxiliam na identificação das moléculas a serem internalizadas (como é o caso dos receptores de membrana), facilitam a invaginação da membrana (por exemplo, a clatrina), atuam como adaptadoras entre proteínas (proteínas adaptadoras), dentre outras (SAMAJ *et al.*, 2004). Drogas que bloqueiam/alteram a atividade dessas proteínas comprometem sistemas de captação importantes nesses patógenos, levando à morte desses parasitas (SILVERSTEIN *et al.*, 1977).

### 1.9.1 Endocitose em *T. cruzi*

Os tripanosomatídeos são protozoários flagelados que apresentam algumas particularidades na sua arquitetura celular, quando comparados com as demais células eucarióticas, que se refletem nas vias de captação de nutrientes por estes organismos. Nos tripanosomatídeos a membrana plasmática, que limita o citoplasma da célula, está disposta sobre um arcabouço de microtúbulos, estabilizados por ligações cruzadas e associados com a própria membrana (LANDFEAR e IGNATUSCHENKO, 2001; MORGAN *et al.*, 2002). Devido à presença deste arcabouço, invaginações de membrana são dificultadas na maior parte da superfície do protozoário. No entanto, este arranjo de microtúbulos é descontínuo na porção anterior da célula, onde há uma grande invaginação da membrana plasmática, a bolsa flagelar, de onde o flagelo emerge da célula. Em tripanosomatídeos, todas as modalidades da endocitose, bem como a exocitose, ocorrem exclusivamente neste local, com exceção das espécies que apresentam citóstoma/citofaringe (como o *Trypanosoma cruzi*), cuja endocitose pode ocorrer por estes dois portais (SOARES e DE SOUZA, 1991; WEBSTER e RUSSEL, 1993; OVERATH *et al.*, 1997; De SOUZA, 2002; MORGAN *et al.*, 2002).

O *T. cruzi*, ao contrário dos tripanosomas africanos, apresenta uma estrutura típica diretamente envolvida na captação de macromoléculas (além da bolsa flagelar): o citóstoma. Esta estrutura é uma invaginação especializada na membrana plasmática que se origina na porção anterior da célula e penetra profundamente no citoplasma, terminando na porção posterior da célula após o núcleo. A invaginação (citofaringe) apresenta sua abertura para o meio externo (citóstoma) localizada lateralmente ao corpo da célula, próximo à região da bolsa flagelar (MILDER e DEANE, 1969; De SOUZA, 2002).

O citóstoma está presente apenas em formas epimastigotas e amastigotas, sendo uma região de grande interesse, uma vez que a maior parte da atividade endocítica no *T. cruzi* ocorre a partir desta estrutura, ao invés de ocorrer via bolsa flagelar (PORTO-CARREIRO *et al.*, 2000; VATARUNAKAMURA *et al.*, 2005).

Assim, o *T. cruzi* se apresenta como uma célula polarizada, com duas estruturas relacionadas à endocitose: o citóstoma e a bolsa flagelar.

Diversos estudos anteriores mostraram morfológicamente a capacidade de formas epimastigotas de *T. cruzi* de captar proteínas do meio extracelular por endocitose. Diferentes abordagens demonstraram que a captação de LDL e transferrina ocorrem por endocitose mediada por receptor e que estas moléculas uma vez no interior do corpo celular, se acumulam em uma organela denominada reservosomo, considerada um compartimento pré-lisossomal (SOARES e DE SOUZA, 1991; De FIGUEIREDO e SOARES, 2000; PORTO-CARREIRO *et al.*, 2000).

Correa e colaboradores (2007) identificaram em base de dados genômicos do *T. cruzi* a presença de genes necessários à expressão das principais proteínas que mediam o brotamento de vesículas revestidas por clatrina nesse parasita. Além dos dados computacionais, dados experimentais identificaram a expressão e localização da proteína clatrina (cadeia pesada) em formas epimastigotas do parasita. Análises ultraestruturais de albumina marcada com ouro coloidal permitiram identificar o brotamento de vesículas contendo o típico revestimento externo que em outros modelos celulares têm sido descritos como clatrina. Foi demonstrado que estas vesículas estão majoritariamente associadas à bolsa flagelar, não sendo observadas associadas ao fundo do citóstoma, sugerindo que os receptores envolvidos na captura de albumina estejam restritos à bolsa flagelar no *T. cruzi*. Além disso, a visualização de vesículas revestidas associadas à região do complexo de Golgi sugere que o brotamento de vesículas mediado por clatrina (e proteínas do complexo adaptador AP1) possa fazer parte de uma das vias exocíticas em *T. cruzi* (SANT'ANNA *et al.*, 2004; CORREA *et al.*, 2007).

#### 1.9.1.1 Epsina

A endocitose mediada por clatrina é responsável pela captação de moléculas essenciais, permitindo a internalização rápida de uma grande variedade de moléculas. A associação da clatrina à membrana promove o revestimento

citoplasmático das vesículas, desencadeando um rápido brotamento da vesícula endocítica. À medida que a clatrina vai se associando à membrana plasmática o revestimento formado gera a força necessária para curvar a membrana (SCHEKMAN e ORCI, 1996; COSSON E LETOURNEUR, 1997). Um grupo de proteínas chamado proteínas de interação Eps15 (epsina), definido pela presença de domínios N-terminais homólogos à Epsina (ENTH), contem proteínas que se associam a clatrina (*clathrin-associated sorting proteins* - CLASPs) (CHEN *et al.*, 1998).

Estudos iniciais em células de mamíferos, levaram à classificação dos membros desta família como epsinas ou proteínas relacionadas à epsina (epsinaR), com base na sua função, arquitetura do domínio de ligação e localização celular. A função pode ser dividida em endocitose de cargas ubiquitinadas (epsinas) ou triagem/reciclagem de cargas dentro de compartimentos celulares (epsinaR); a arquitetura pode ser dividida entre as que tem uma porção de interação com ubiquitina na porção C-terminal de sua sequência (epsina) ou não (epsinaR); enquanto que a localização celular pode ocorrer na membrana plasmática (epsina) ou em compartimentos intracelulares (epsinaR) (MILLS *et al.*, 2003; HAWRYLUK *et al.*, 2006). Epsinas estão envolvidas com endocitose tanto em células de mamíferos quanto em fungos (CHEN *et al.*, 1998; WENDLAND *et al.*, 1999) enquanto que a epsinaR foi associada com transporte retrógrado apenas em células de mamíferos (SAINT-POL *et al.*, 2004).

Em *Arabidopsis*, proteínas com domínios ENTH estão envolvidas no tráfego vacuolar (SONG *et al.*, 2006) e transporte a partir da rede *trans*-Golgi (TGN) por interagir especificamente com SNAREs atuando na fusão das vesículas na TGN (função esta que também foi observada em leveduras e mamíferos) (CHIDAMBARAM *et al.*, 2004). Em *Dictyostellium*, a epsina interage diretamente com outra proteína também associada à clatrina, chamada HIP1r (REPASS *et al.*, 2007), que desempenha um papel de regulação da actina. O citoesqueleto de actina também é um componente vital do processo endocítico, regulando tanto eventos iniciais de endocitose por facilitar a deformação da membrana interna, quanto por participar do transporte de vesículas endocitadas até os compartimentos intracelulares de destino (ROTH, 2007). Curiosamente, um trabalho recente mostrou uma interação de adaptadores do tipo epsina com fatores que regulam o

citoesqueleto de actina, sugerindo um papel importante da epsina também neste processo (REPASS *et al.*, 2007; MALDONADO-BAEZ *et al.*, 2008).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo central deste trabalho é identificar o gene para a Epsina em *T. cruzi* e avaliar sua localização subcelular.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Clonar o gene da epsina de *T. cruzi* e expressar a proteína recombinante em *E. coli*;

- Produzir anticorpos específicos para a epsina de *T. cruzi*;

- Avaliar a localização celular da epsina em formas epimastigotas de *T. cruzi* por imunofluorescência através de microscopia confocal;

- Constatar, por imunofluorescência, a colocalização de epsina com clatrina.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

##### 3.1.1 Tampões e soluções

**PBS:** NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4,3 mM e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM

**Solução de bloqueio para imunofluorescência:** PBS e BSA 1%

**Solução de coloração para géis de proteína:** Coomassie blue R-250 0,1% em metanol/ácido acético (45%/10%)

**Solução para descoloração de géis de proteína:** Metanol 4%, ácido acético 7,5%

**Tampão da Fosfatase alcalina:** Tris-HCl pH 9,5 1M, NaCl 5M, MgCl<sub>2</sub> 5M

**Tampão de amostra para DNA 10X:** Ficoll 400 25%, azul de bromofenol 0,25% e xileno cianol FF 0,25%

**Tampão de amostra para proteína 4X:** Tris-HCl 40 mM pH 6,8, SDS 1%, β-mercaptoetanol 2,5%, glicerol 6% e azul de bromofenol 0,005%

**Tampão de eletroporação:** 140 mM NaCl; 25 mM Hepes ácido; 0,74 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

**Tampão de eletroforese para SDS-PAGE:** Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%

**Tampão Taq DNA polimerase 1x:** Marca *Amersham-Parmacia Biotech*

**Tampão TBE:** Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM

**TE:** Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM

##### 3.1.2 Meios de cultura

**LB:** Triptona 1%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 1%

Meio LB ágar - Meio LB suplementado com 15 g/l de ágar

**LIT:** infuso de fígado 0,5%, NaCl 75,3 mM, KCl 5,4 mM, glicose 10 mM, bacto-triptose 0,5%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 56,4 mM, hemina 0,0025%, soro fetal bovino 10% e extrato de levedura 15 g/l

### 3.1.3 Procedência dos reagentes

#### *Amersham-Parmacia Biotech:*

- Anti-histidina
- Anti-IgG de camundongo
- dNTPs
- *Hybond C*
- Taq DNA polimerase

#### *Appligene:*

- IPTG

#### *Bioagency:*

- Xileno cianol

#### *Bio Rad:*

- Acrilamida
- Agarose
- Azul de bromofenol
- Bis-acrilamida

#### *Cult-lab:*

- Soro fetal bovino

#### *Difco:*

- Bacto-triptona
- Extrato de levedura
- Infuso de fígado

- Triptose

*Electron Microscopy Science*

- poli-L-lisina

*Invitrogen:*

- Alexa Flúor 488
- *Benchmark*
- EDTA
- Gateway® BP Clonase™ II
- Gateway® LR Clonase™
- Gateway® pDEST™17
- Gateway® pDONR™221
- *Hoechst 33342 DNA staining*
- Marcador de massa molecular
- 30% PEG 8000/30 mM MgCl<sub>2</sub>
- Proteinase K

*MERCK:*

- Ácido acético
- Ácido clorídrico
- Cloreto de magnésio
- Cloreto de potássio
- Cloreto de sódio
- Fosfato diabásico de sódio
- Glicose
- Metanol
- SDS

*Microbiológica:*

- Hemina

*New England Biolabs:*

- *1 kb Plus DNA Ladder.*

*Promega:*

- Tripsina
- NBT
- BCIP

*Qiagen:*

- *QIA filter plasmid mini kit*
- *QIA filter plasmid mid kit*

*Sigma:*

- Ácido bórico
- Adjuvante completo de Freund
- Ágar
- Ampicilina
- $\beta$ -mercaptetanol
- Brometo de etídio
- BSA
- Canamicina
- *Coomassie blue R-250*
- Estreptomicina
- Ficoll
- Formaldeído
- Fosfato monopotássico
- G418
- Glicerol
- Glicogênio
- Hepes
- N-propil-galato
- Penicilina

- Triton x 100

*USB Corporation:*

- Tris

*Whatman:*

- Papel 3MM
- Membrana de nitrocelulose

### 3.2 SELEÇÃO DO GENE

Foi realizada uma busca em bancos de dados genômicos (GeneDB) com o intuito de identificar a existência do gene para a epsinaR no genoma de *T. cruzi*, utilizando uma proteína relacionada à epsina com domínio ENTH em *T. brucei* (TbEpsinR - Tb11.50.0006) como molde.

### 3.3 AMPLIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO GENE

Oligonucleotídeos foram construídos com base na sequência codificante do gene selecionado de *T. cruzi* disponível no GeneDB ([www.genedb.org](http://www.genedb.org)) com adição de sítios de recombinação às extremidades, que serão identificados por clonases específicas para clonagem no vetor de expressão em *E. coli* do sistema Gateway®.

As amplificações por PCR foram realizadas com a enzima Taq DNA polimerase somada ao tampão Taq DNA polimerase 1x, extrato de DNA total de *T. cruzi*, 10 pmol de cada oligonucleotídeo, 200 µM de cada dNTP, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, água qsp 100 µl.

Foram realizados 35 ciclos de PCR com 30 segundos de desnaturação a 94°C, 3 minutos de anelamento dos iniciadores a 55°C e polimerização por 1 minuto

a 72°C. Antes do primeiro ciclo, as amostras eram mantidas a 94°C por 4 minutos. As reações ocorreram em termociclador *Eppendorf Mastercycler*.

Foi realizada a purificação dos produtos da PCR com extração PEG/MgCl<sub>2</sub>. Para tanto, foram utilizados 200µl da PCR, 1µl de glicogênio, 600µl de água ultrapura, 400µl de PEG/MgCl<sub>2</sub> (conforme o protocolo fornecido pelo sistema Gateway®). A mistura foi vortexada e, na sequência, centrifugada por 2 minutos a 13000 x g. Após o descarte do sobrenadante, foi adicionado 10µl de água ultrapura para diluir a amostra.

A amplificação foi verificada por meio de eletroforese de DNA em matriz de agarose horizontal, conforme descrito por Sambrook *et al.* (1989). Houve diluição das amostras em tampão de amostra de DNA 10x, com subsequente aplicação em matriz de agarose 1% em TBE, utilizando padrão de massa molecular *1 Kb Plus*. As amostras foram então submetidas à tensão de 100V e, após isso, o DNA foi marcado com brometo de etídeo (5µg.ml<sup>-1</sup>) e analisado sob luz ultravioleta em transiluminador. O perfil eletroforético foi registrado em um sistema de fotodocumentação UVP (Biorad).

### 3.4 CLONAGEM DO GENE DA EPSINA EM VETOR DE ENTRADA pDONR™221 DO SISTEMA GATEWAY

O gene foi ligado ao vetor pDONR™221 (Figura 7), por meio de recombinação em sistema *Gateway*®. Para tanto, foram utilizados 150 fmol do amplicon, 150 fmol do vetor pDONR™221 e 8 µl de TE. A mistura foi incubada com 2 µl de BP clonasse, enzima fornecida pelo kit *Gateway*® de recombinação da Invitrogen. A reação foi mantida à 25°C por 16 horas. Logo após essa incubação, foram adicionados 4 µg da enzima Proteinase K, fornecida pelo kit *Gateway*® de recombinação, por 10 minutos a 37°C.

As ligações foram usadas para transformar cepas DH5α de *E. coli* eletrocompetentes.

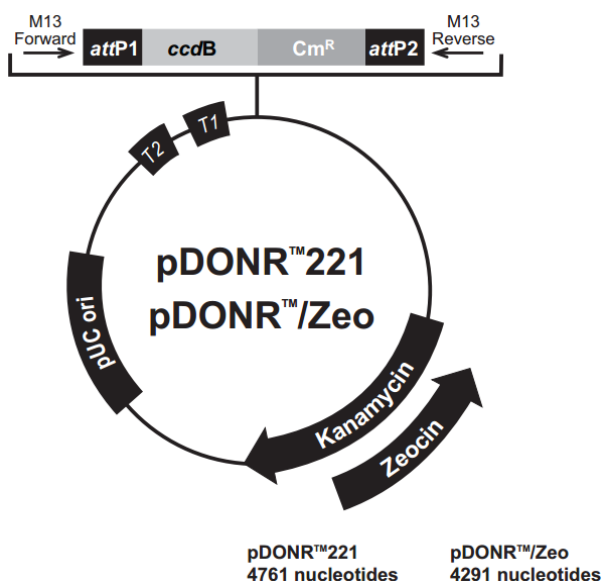


FIGURA 7 - VETOR pDONR™221. NA IMAGEM ESTÁ ESQUEMÁTICAMENTE REPRESENTADO O SÍTIO PARA GENES QUE CODIFICAM PROTEÍNAS DE RESISTÊNCIA À CLORAFENICOL E CANAMICINA; OS SÍTIOS PARA RECONHECIMENTO DA ENZIMA BP CLONASE (*attB*) RESPONSÁVEL PELA RECOMBINAÇÃO; O GENE CODIFICANTE PARA A PROTEÍNA CcdB, ALTAMENTE TÓXICA EM BACTÉRIAS.

### 3.5 IMUNOLocalização DE EPSINA POR MICROSCOPIA

#### 3.5.1 Transformação dos plasmídeos pDONR™221 ligados à epsina

As reações de ligação foram incubadas com bactérias competentes e em seguida foi realizada a eletroporação com os seguintes parâmetros: tensão = 2500V, resistência = 0200  $\Omega$ , capacitor = 0025 mF. Após a emissão de pulso pelo eletroporador BioRad (*GenePulser II Electroporator*), meio LB foi adicionado ao tubo e as células foram incubadas a 37°C por 1 hora e depois plaqueadas em placas de Petri contendo meio de cultura seletivo (LB, ágar 15% e canamicina).

#### 3.5.2 Seleção dos clones recombinantes

Clones contendo plasmídeos recombinantes foram selecionados mediante a técnica de PCR de colônia. Para tanto, foram testadas 7 colônias da placa de Petri,

crecidas em meio seletivo (LB, ágar 15% e canamicina). Cada uma foi transferida para um tubo de centrifuga e diluída em 10 µl de água ultrapura. Para a reação de PCR, 1 µl de cada diluição foram adicionados 7 µl de Taq mix (0.05 U.µl<sup>-1</sup> Taq DNA polimerase, 3µl de tampão de reação, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM de cada dNTP), 0,1 µl dos oligonucleotídeos construídos anteriormente e 9,8 µl de água ultrapura. Foram realizados 35 ciclos de PCR, cada um contendo etapas de 5 minutos a 94°C para desnaturação do DNA, 30 segundos a 55°C para anelamento dos oligonucleotídeos e 72° por 3 minutos para polimerização das fitas de DNA.

As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1%, usando o plasmídeo original como controle. Ao fim da eletroforese o gel foi marcado com brometo de etídeo (0,5 µg.ml<sup>-1</sup>), lavado com água ultrapura e analisado em luz ultravioleta. O gel foi fotografado no sistema de foto-documentação UVP (Biorad).

### 3.5.3 Obtenção dos plasmídeos recombinantes

As colônias selecionadas foram inoculadas em meio LB contendo o antibiótico de resistência (canamicina) e cultivadas por 18 horas a 37°C sob constante agitação. As células obtidas foram centrifugadas a 12.000 x g por 1 minuto e o sedimento obtido foi utilizado para a extração dos plasmídeos através do sistema “*QIAprep spin miniprep kit*” (QIAGEN). Nestas condições, cerca de 5 a 10 µg de DNA dos plasmídeos foram recuperados e foi realizada uma PCR dessas amostras para confirmar a presença do inserto de epsina no plasmídeo.

### 3.5.4 PCR da *miniprep*

Cada amostra foi diluída pela adição de 9 µl de TE a 1 µl de cada amostra da *miniprep* separadamente. Para a PCR, foi utilizado 1 µl de cada diluição adicionado a 5 µl de Taq Mix 3X, 2 µl da solução contendo os oligonucleotídeos e 7 µl de água ultrapura. Os ciclos realizados no termociclador *Eppendorf*

*Mastercycler* foram idênticos aos utilizados para o PCR de colônia e a análise da reação foi feita em gel de agarose, conforme descrito anteriormente.

### 3.5.5 Recombinação LR do gene da epsina em vetor ptc GFP do sistema *Gateway*

Com a tecnologia *Gateway*<sup>®</sup> de recombinação, foi realizada a fusão do gene codificante para epsina ao vetor contendo a proteína GFP. 3,27 µl da solução contendo o vetor ptc GFP C-terminal (BATISTA, 2008) (o equivalente a 150 ng) foram adicionados a 4,89 µl de TE, 1 µl de LR Clonase e 0,84 µl da solução contendo os plasmídeos portadores da epsina (o equivalente a 150 ng). Separadamente, 7 µl da solução contendo o vetor ptc GFP N-terminal (BATISTA, 2008) (o equivalente a 150 ng) foram adicionados a 1,16 µl de TE, 1 µl de LR Clonase e 0,84 µl da solução contendo os plasmídeos portadores da epsina (o equivalente a 150 ng).

A reação foi mantida à 25°C por 16 horas. Logo após essa incubação, foram adicionados a 4 µg da enzima Proteinase K, fornecida pelo kit *Gateway*<sup>®</sup> de recombinação por 10 minutos a 37°C.

As ligações foram usadas transformar cepas DH5α de *E. coli* eletrocompetentes conforme descrito anteriormente. Os clones foram selecionados por intermédio de uma PCR de colônia com as células transformadas. Em seguida, os plasmídeos contendo as sequências codificantes das proteínas recombinantes foram obtidos através do sistema “*QIAprep spin miniprep kit*” (QIAGEN). Houve confirmação da presença da proteína recombinante nos plasmídeos pela realização de um PCR da *miniprep*. A PCR foi analisada em gel de agarose 1%.

### 3.5.6 Transfecção do vetor ptc GFP-epsina em *T. cruzi*

Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa Dm28c foram mantidas em cultura a 28°C em meio LIT, com passagens semanais. A obtenção dos

parasitas ocorreu no terceiro dia de cultivo (que corresponde à fase logarítmica de crescimento) por centrifugação do meio de cultura a 7000 x g por 5 minutos com subsequente descarte do sobrenadante.

Cerca de  $2,4 \times 10^8$  tripanosomatídeos foram ressuspensos em 1,2 ml de tampão de eletroporação. Volumes iguais a 400  $\mu$ l dessa suspensão foram transferidos para 3 cubetas de eletroporação estéreis (0,2 cm de GAP) (BioAgency). Na primeira cubeta, foram adicionadas 40  $\mu$ g do plasmídeo contendo epsina fusionada a GFP-C terminal. Na segunda, foram adicionadas 40  $\mu$ g do plasmídeo contendo epsina fusionada a GFP-N terminal. A terceira cubeta contendo apenas a suspensão de parasitas foi utilizada como controle. As cubetas foram resfriadas a 0°C por 10 minutos.

O processo de eletroporação ocorreu em eletroporador *GenePulser® II Apparatus* (BioRad) com os seguintes parâmetros: 2 pulsos de 450 V e 500  $\mu$ F. As amostras foram incubadas novamente por 10 min no gelo e em seguida foram transferidas para garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup>, contendo 10 ml de meio LIT (suplementado com 10.000 U.ml<sup>-1</sup> de penicilina e estreptomicina a 10  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>). As culturas foram incubadas a 28°C. Após 24 horas, foi adicionado o antibiótico G418 a uma concentração de 300  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>.

### 3.5.7 Imunolocalização por microscopia confocal

Para os ensaios de imunofluorescência, formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT até a concentração de  $1 \times 10^7$  células.ml<sup>-1</sup>. As células foram coletadas por centrifugação a 6.000 g por 1 min., lavadas em PBS pH 7,2 e novamente coletadas por centrifugação nas mesmas condições descritas acima. As células foram então ressuspensas em uma concentração final de  $5 \times 10^6$  células.ml<sup>-1</sup> e depositadas em lamínulas tratadas com poli-L-lisina a 0,01% diluída em PBS. O material foi fixado em paraformaldeído a 4% diluído em PBS durante 5 minutos. A fixação foi interrompida por duas lavagens com glicina 0,1 M por 3 minutos. As lamínulas foram então lavadas duas vezes por 5 minutos (cada lavagem) com PBS e incubadas com Triton X-100 (Sigma) a 0,1% diluído em PBS

por 3 minutos a temperatura ambiente. As lamínulas foram novamente lavadas com PBS, incubadas em tampão de bloqueio por 16 horas e em seguida incubadas por 1 hora com o antissoro policlonal anti-GFP (produzido em camundongo) para reforçar a fluorescência da amostra quando analisada por microscopia confocal. O anticorpo foi diluído em tampão de bloqueio na proporção 1:150. Posteriormente as lamínulas foram lavadas com PBS e incubadas por 30 minutos com anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488 (Sigma), diluído 1:400 em tampão de bloqueio. Após este tempo, as lamínulas foram incubadas com *Hoechst* a  $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  em PBS por 5 minutos, lavadas em PBS e montadas com N-propil-galato sobre uma lâmina de microscopia ótica, para posterior análise em microscópio confocal laser Leica SP5.

### 3.6 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-EPSINA

#### 3.6.1 Recombinação da proteína recombinante com pDEST

Após a entrada do gene que codifica para TcEpsina em pDONR<sup>TM</sup>221, foi feita recombinação LR para entrada no vetor de destino pDEST. Este plasmídeo insere uma etiqueta contendo 6 histidinas na porção N-terminal da proteína. (Figura 8).

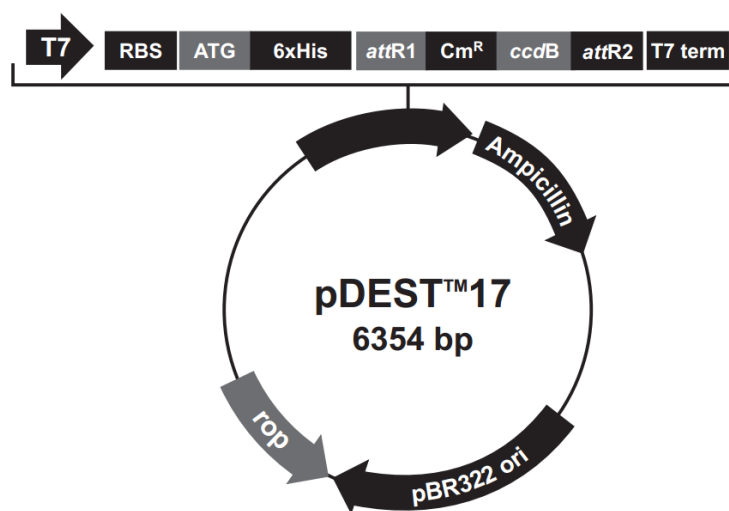


FIGURA 8 – ESQUEMA DO PLASMÍDEO pDEST. O pDEST POSSUI UMA SEQUÊNCIA CODIFICADORA PARA 6 HISTIDINAS E PARA UM GENE QUE CONFERE RESISTÊNCIA À AMPICILINA.

Para esse procedimento, 150 fmol de vetor pDONR™221 (ligado a epsina) foram adicionados a 150 fmol de vetor pDEST 17, 1 µl de LR Clonase e 7 µl de TE. A reação foi mantida à 25°C por 16 horas. Logo após essa incubação, foram adicionadas 4 µg da enzima Proteinase K, fornecida pelo kit *Gateway*®, por 10 minutos a 37 °C.

O produto dessa reação foi transformado em células DH5α e plaqueado em meio seletivo contendo ampicilina (LB, ágar 15% e ampicilina), seguindo o mesmo protocolo utilizado para transformação de plasmídeos pDONR™221. Em seguida, os clones foram purificados pelo sistema “*QIAprep spin miniprep kit*” (QIAGEN) e a presença do inserto nos plasmídeos foi confirmada por meio de uma PCR da *miniprep*.

### 3.6.2 Transformação da proteína recombinante epsina ligada ao vetor pDEST

As reações de ligação (150 fmol) foram incubadas com bactérias DH5α cálcio competentes e, em seguida, foi realizado um choque térmico para inserção das reações de ligação. Meio LB foi adicionado ao tubo e as células incubadas a 37°C por 1 hora e depois plaqueadas em placas de Petri contendo meio de cultura seletivo (LB, ágar 15% e ampicilina). Clones contendo plasmídeos recombinantes foram selecionados por PCR de colônia (com 5 µl de Taq mix, 0,2 µl de oligonucleotídeos, 9 µl de água ultrapura). As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1%, usando o plasmídeo original como controle. Ao fim da eletroforese o gel foi marcado com brometo de etídeo (0,5 µg.ml<sup>-1</sup>), lavado com água ultrapura e analisado em luz ultravioleta. O gel foi fotografado no sistema de foto-documentação UVP (Biorad).

### 3.6.3 Expressão da proteína recombinante em *Escherichia coli* e teste de solubilidade

Colônias recombinantes foram inoculadas em meio LB com o antibiótico de resistência do plasmídeo (ampicilina) e cultivadas durante 16 horas a 37°C (pré-inóculo). Uma alíquota de 20 ml de cada pré-inóculo foi inoculada em 180 ml de meio LB e antibiótico, com duplicata. As culturas foram incubadas por uma hora a 37°C. Após esse período foi adicionado IPTG na concentração final de 1 mM a uma das culturas (cultura induzida). A cultura sem adição de IPTG (não induzida) serviu de controle negativo da expressão. Foi coletada uma amostra de 1 ml de cada cultura para ser utilizada como controle (fração total) no teste de solubilidade. Ambas as culturas foram incubadas a 37°C por mais três horas. As bactérias foram obtidas por centrifugação a 12.000 x g por 2 minutos e ressuspensas em tampões apropriados. A suspensão bacteriana foram lisada por ultrassom (*Ultrasonic Homogenizer 4710 Series, Cole-Parmer Instrument Co.*). Por centrifugação foi separada a porção solúvel e insolúvel de cada amostra (Tabela 1).

TABELA 1 – AMOSTRAS FINAIS.

| Colônia 1        | Colônia 2        | Colônia 3        |
|------------------|------------------|------------------|
| Fração total     | Fração total     | Fração total     |
| Fração solúvel   | Fração solúvel   | Fração solúvel   |
| Fração insolúvel | Fração insolúvel | Fração insolúvel |

Vinte microlitros dessas amostras (contendo o extrato proteico de aproximadamente  $1 \times 10^7$  células. $\mu\text{l}^{-1}$ ) foram adicionados a 5  $\mu\text{l}$  de tampão de amostra, sendo em seguida foram incubados por 5 minutos a 100°C. Cada amostra foi submetida à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida, com SDS (SDS-PAGE) a 30 mA, como descrito por Laemmli (1970). Após a eletroforese as proteínas foram coradas com solução de Coomassie Blue R-250 e descoradas com trocas sucessivas de solução de descoloração para géis de proteína.

#### 3.6.4 Purificação da proteína recombinante expressa em *E. coli*

À fração insolúvel foi adicionado 1 ml de tampão de amostra e houve purificação por eletroforese em gel preparativo de poliacrilamida a 8%, com 15 cm de largura por 10 cm de altura. O gel foi submetido à eletroforese por 16 horas a 20 mA e marcado com solução de KCl 100 mM, a banda correspondente foi cortada e eletroeluída por 2 horas a 60 Volts em tampão de SDS-PAGE.

#### 3.6.5 Teste da purificação da proteína recombinante expressa em *E. coli*

Para avaliação da purificação da proteína recombinante, foi realizado um ensaio de *Western Blot*. Nesse ensaio, foram submetidos à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida as seguintes amostras: 10 µl de extrato proteico de *E. coli*, 10 µl da fração total, 10 µl da fração solúvel e 10 µl da eluição da proteína recombinante (cada um contendo o extrato proteico de aproximadamente  $1 \times 10^7$  células.µl<sup>-1</sup>; às amostras foram somados 5 µl de tampão de amostra para proteína 4x e foram incubadas a 100°C por 5 minutos). Após a eletroforese, as amostras foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (*Hybond C, Amersham Biosciences*), seguindo o protocolo de Towbin (1979). Essa membrana foi submetida a uma reação com anticorpos anti-histidina na proporção 1:3000. Os anticorpos ligados foram visualizados por meio da reação com fosfatase alcalina utilizando como substratos o BCIP (50 µg.µL<sup>-1</sup>) e o NBT (50 µg.µL<sup>-1</sup>) (Promega).

#### 3.6.6 Teste pré-imune do soro de camundongos BALBc

O teste pré-imune foi realizado por *Western Blot*. O soro de 4 camundongos BALBc foram testados em membrana de nitrocelulose (*Hybond C, Amersham*

*Biosciences*) contendo extrato proteico de *T.cruzi* ( $1 \times 10^7$  células. $\mu\text{L}^{-1}$ ), transferidos seguindo o protocolo de Towbin, 1979. Após isso, a análise foi realizada através da reação da fosfatase alcalina na presença de BCIP ( $50 \mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ ) e o NBT ( $50 \mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ ) (Promega). O uso de animais seguiu as normas do Comitê de Ética para Utilização de Animais da Fiocruz (Anexo I e II).

### 3.6.7 Produção de anticorpos policlonais

A proteína recombinante purificada foi inoculada via intraperitoneal em camundongos da linhagem BALBc, por via intraperitoneal, com 5 aplicações de aproximadamente  $50 \mu\text{g}$  de antígeno em intervalos de 15 dias. O antígeno foi emulsificado em adjuvante completo de Freund na primeira inoculação, e em adjuvante incompleto (adjuvante a base de hidróxido de alumínio - Alu-Gel, Serva) nas inoculações subsequentes. A obtenção do soro uma semana após a última inoculação ocorreu por punção cardíaca logo após a anestesia dos animais com quetamina e xilazina via intraperitoneal ( $100$  e  $10 \text{ mg/kg}$  respectivamente).

### 3.6.8 Análise de especificidade do antissoro

A especificidade do anti soro produzido foi verificada por ensaio *Western Blot*, que consistiu em submeter extratos proteicos da forma epimastigotas *T. cruzi* (cada um contendo o conjunto de proteínas de aproximadamente  $1 \times 10^7$  células. $\mu\text{L}^{-1}$ ) à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida e posteriormente transferir para uma membrana de nitrocelulose (*Hybond C, Amersham Biosciences*) de acordo com protocolo padrão (Towbin *et al.*, 1979). Após a transferência, a membrana foi incubada com o anti soro na proporção 1:200, e os anticorpos ligados visualizados através da reação da fosfatase alcalina utilizando como substratos o BCIP ( $50 \mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ ) e o NBT ( $50 \mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ ) (Promega).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme abordado anteriormente, a Doença de Chagas acomete populações da América Latina há alguns séculos. Por se tratar de uma enfermidade debilitante, que pode levar à morte, essa moléstia tem desfalcado a força produtiva dessas comunidades, gerando prejuízos econômicos e sociais. Atualmente, essa endemia compreende uma ampla extensão territorial, afetando não apenas áreas endêmicas, mas também países europeus e norte-americanos. As medidas de prevenção e combate ao vetor vêm diminuindo o número de casos de Chagas ao longo dos anos. Entretanto, essas ações não têm sido suficientes para erradicar a doença. Ainda não se sabe, por exemplo, como impedir que haja transmissão transgênica.

Não obstante, o parasita possui um complexo mecanismo de regulação da expressão gênica, permitindo que ele alterne entre suas formas replicativa e infectivas. Sua adaptação ao organismo humano favorece que esse tripanosomatídeo resista a ambientes stress nutricionais dribles o sistema imune, estabelecendo-se de forma duradoura em alguns tecidos. Sua ação inicial muitas vezes é assintomática, fazendo com que a doença passe despercebida pelo indivíduo, dificultando o diagnóstico.

Mesmo na ausência de manifestações clínicas, a tripanossomíase americana pode se estabelecer de forma crônica no organismo, evoluindo para um quadro de lesões cardíacas e gastrointestinais irreversíveis. Geralmente, quando identificada, já há comprometimento desses tecidos, o que interfere com a qualidade de vida do paciente.

Quanto ao tratamento, as opções são limitadas e ineficazes. Muitas vezes o *T. cruzi* desenvolve resistência ao tratamento e, com frequência, há necessidade de interromper-se a medicação devido a efeitos colaterais. Quando há formação de lesões nos tecidos, os danos são irreparáveis sendo necessário o uso de recursos paliativos focados apenas na diminuição dos sintomas. Essas medidas não proporcionam a cura ao paciente, apenas visam melhorar a qualidade de vida da pessoa.

O conjunto desses fatores enfatiza a necessidade de se desenvolver novas terapias para a Doença de Chagas, que sejam mais eficazes, menos tóxicas e que ofereçam melhor prognóstico aos pacientes crônicos.

As proteínas participantes do processo de endocitose tem sido alvo de quimioterapias contra diversos patógenos. Parte-se da premissa de que a endocitose é um procedimento vital em organismos vivos. O desenvolvimento de drogas que interfiram com a atividade de proteínas dessa via, bloqueando/dificultando mecanismos de endocitose pode ser uma estratégia promissora na eliminação dos parasitas. Microrganismos incapazes de captar nutrientes do meio têm seus recursos energéticos esgotados e morrem.

Assim sendo, a elucidação do processo endocítico em *T. cruzi* pode servir de base para o desenvolvimento de novos tratamentos. O passo inicial é a identificação das proteínas envolvidas, principalmente as essenciais para que o processo aconteça, como é o caso da clatrina e da epsina.

#### 4.1 IDENTIFICAÇÃO DOS GENES PARA EPSINA EM *T. cruzi*

Uma análise genômica comparativa mostrou que o domínio ENTH é conservado nos genomas de representantes de todos os principais supergrupos eucarióticos (FIELD *et al.*, 2007). Em linhagens de fungos e metazoários que produzem subtipos não-redundantes de epsina e epsinaR, parece ter ocorrido uma duplicação e conseqüente especialização, cujo principal ganho foi a inclusão de uma porção de interação com ubiquitina (UIM), além dos domínios ENTH e de reconhecimento de clatrina. A presença de uma porção de interação com ubiquitina parece ser essencial para a separação das cargas ubiquitinadas e, potencialmente está envolvida no acoplamento da endocitose à dinâmica de actina. A análise genômica comparativa também sugeriu que a endocitose dependente de caveolina é uma aquisição recente. A endocitose independente de clatrina em *T. cruzi* foi sugerida em 2014, por Kalb e colaboradores. Entretanto, a endocitose dependente de clatrina e os complexos adaptadores associados estão significativamente mais conservados em todos os eucariotos (FIELD *et al.*, 2007).

Tripanosomatídeos estão filogeneticamente muito distantes dos organismos-modelo nos quais as proteínas com domínios ENTH foram mais bem estudadas (animais e fungos). *T. brucei* tem um único domínio ENTH relacionado a epsina codificado no genoma (Tb11.50.0006). Gabernet-Castello e colaboradores (2009) mostraram que esse domínio ENTH relacionado à epsina em *T. brucei* (TbEpsinR) tem uma localização celular semelhante a epsina e epsinaR, isto é, tanto em regiões de brotamento de vesículas de clatrina na membrana plasmática quanto em compartimentos endossômicos, e são capazes de se associar a clatrina (como demonstrado através de ensaios de imunoprecipitação). TbEpsinR mantém um papel semelhante ao da epsina na endocitose em metazoários e participa deste processo como um adaptador associado à clatrina. Devido à falta de uma porção de interação com ubiquitina, os autores sugerem que esta porção de ligação à ubiquitina não é essencial para a participação da TbEpsinR na endocitose de moléculas ubiquitinadas e é, presumivelmente, uma inovação específica restrita a eucariotas superiores.

Por intermédio de ferramentas de bioinformática, utilizando uma proteína relacionada à epsina em *Trypanosoma brucei* como molde, foi encontrado em bancos de dados genômicos um gene (TcCLB.506925.70) que codificaria uma epsinaR (Figura 9).

Tc00.1047053506925.70 / TcCLB.506925.70  
 epsin, putative

ATGAGTATTCCAACCTCCATTTCATGCCGCGCGGGAGATGATCCGTGTGATGGCATCTGGC  
 AATGAGTTTGTGTGCTTGTTACGAGGCAACCAACGAGGACCCTTGGGGGCCAACGGGT  
 GCACAGATGGATGAAGTCTGTTCGAGCCTTTGCCCGCGGGTCATTTGATATTATGGAGGAG  
 ATAAAACCTGCGTCTCAAACACCGTGAAAAGGCGTGGCGACCTTGTTACAAAAGCCTACTT  
 CTTCTTGACCATCTTGCTCGCAACGTGCCGGAGTCGGGACTGCCGGCCATTTGTACTGTA  
 ATCCCCACTCTTCGTACCATATCTCAGTCGTTCTATTACACGGGGAGTAAGGGGACAGAT  
 CACGGTTTGTCTGTGAGAGAACGCGCAAAGAAGCTCTGTGATCTTCTCAGCGATGGCACC  
 TTAICTCCGTGAGGAGCGCGAGAAGGCGGCCTTGACACGCTTCAAGCTCTCTGGCGCGTCT  
 GCGGTTGGCGGTGGCGGTTACCCAACTTCGCACTACCAGGGCTACTTAAACAGCCCCGATG  
 CCGCCATCGCTTTCGCCACACGATGCGTACGAAAATAAGACCCATTTTGGTCGCACGAGG  
 GAGGAACAGGAGCGGTACGATATGGAACCTGCACTCGACTGCAACACGAAGAAGAGGTC  
 CGTTCTGGTGTCTGCTGGGGATGCAGAAAAGGATGTTTAAACGGCAAGTTCAACGGCAA  
 CCCACGTGAGTGAACAGGCGGCTCGCAATTCTGACCTTGAGTTAGCACGTGCCTTCAG  
 GAGGAAGAGGAAAAGAAGCGTCAAATGAATTTTGCCAATGAGGCCTTGCCCTCCGCACAG  
 AGCGCACCCACTCCAAAGCCAGCAAATTCTCCGCCCCCTGCGTCTGCCGCCCTCTCTGTC  
 AAGCCAGAACCCCCAAAGAAAGATTTCTTGATGACTTATTTGCTCCAGCACCTGTAATG  
 ACGGCTAACACCTCTGCTCAACAACCTGGTTGGACGAAAGCGCACCGTTTCATCAGCAA  
 AAACCGGCTTCTGTGGATCCTTTTGATGCGTTTTTGGACACACGTATTCGGCAACAACAA  
 CAGCAGCAGCAAATGCTGTGAGCACAATTTCCACAGCAGCCGCCACAGCAGCAGCAGCAG  
 CAGCAAATGGCATAACGGTAGTTATTACCGTCGATGGCCCCACCACAGCAGTATACTGGC  
 ATGGTGGCAGGTGGCGGAGGTGGATGGACCGGTGCGACACAACCATCGATGATGATTCGG  
 CCTGGCGCAGGAGGGAGTGGGTGGTTCGAGTGGGGTCCCTACACAAGCGTCGTATGGAGGG  
 CCCCCAATTCAAACTTCTTGGGGTGTGCCGTCTCGACAAGCAATGCCGGCGCCTCAAGT  
 GGAACACAAAAGGCGACCATTTTTTTCTAATGGAATAGCGATATGCAAGGGAAAGGCTTCC  
 TTTACAAATGTGAGTGAAGGTGCGAAAAACATGAGCCTAATTGAACAGCAAATGGCTCAG  
 TTTGCCGGACAAGTGAAGTGGCCAGCCTCAGCAACAGCCGAAGTCGCTGAACGCCCTGATG  
 GCGGAGCGCCGACAGTCTGAGTAG

FIGURA 9 - SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DO GENE HIPOTÉTICO TcCLB.506925.70.

Uma comparação do gene para epsina identificado em *T. cruzi* com aqueles presentes em *Homo sapiens*, *Leishmania major*, *Leishmania braziliensis* e *T. brucei* comprovou relevante similaridade entre eles (Tabela 2). Simultaneamente, as diferenças entre as sequências em *T. cruzi* e *H. sapiens* favorecem o desenvolvimento de fármacos que antagonizem a ação da proteína epsina em *T. cruzi* sem que haja comprometimento da atividade da epsina humana.

|                        | Identidade | Similaridade | ID da sequência   |
|------------------------|------------|--------------|-------------------|
| <i>T. brucei</i>       | 71%        | 37,57%       | emb   FN554974.1  |
| <i>L. major</i>        | 65%        | 33,96%       | emb   FR799000.1  |
| <i>L. braziliensis</i> | 67%        | 32,06%       | emb   FR796421.1  |
| <i>H. sapiens</i>      | 83%        | 26,19%       | ref   NG_022988.2 |

TABELA 2 – PORCENTAGEM DE IDENTIDADE E SIMILARIDADE DO GENE HIPOTÉTICO DE EPSINA EM *T. cruzi* COMPARADO COM O GENE DE EPSINA EM *T. brucei*, *L. major*, *L. braziliensis* E *H. sapiens*.

A presença de genes codificantes para epsina em organismos evolutivamente e filogeneticamente tão distantes, como é o caso do ser humano e do *T. brucei* preconiza a importância dessa proteína no decurso das espécies. Isso ocorre devido à função dessa proteína no processo vital que é a endocitose. Portanto, é possível inferir que a epsina esteja também presente no genoma do *T. cruzi*. Essa análise bioinformática levou à descoberta de um possível gene da epsina nesse parasita. Para corroborar com essa hipótese, ferramentas de biologia molecular foram utilizadas para investigar a sublocalização celular da proteína encontrada.

Por bioinformática (GeneDB) foi realizada a conversão *in silico* da sequência de nucleotídeos de TcEpsina em sequência de aminoácidos:

```
MSIPTSIIHAAREMIRVMASGNEFVVLVHEATNEDPWGPTGAQMDEVCRAFARSGFDIMEEIKLRLKHREK
AWRPCYKSLLLLDHLARNVPESGLPAICTVIPTLRTISQSFFYYTGSKGTDHGLSVRERAKKCDLLSDGTLREE
REKAALTRFKLSGASGVGGGGYPTSHYQGYLNSPMPSPSLPHDAYENKTHFGRTREEQERYDMELAARLQ
HEEEVRSQVSAAGDAERMFNRQVQRQPTSVEQAARNSDLELARRLQEEEEKKRQMNMFANEALPSAQSAPT
PKPANSPPASAAPPVKPEPPKDFLDDLAFAPAPVMTANTSAAQPGWTESAPFHQQKASVDPFDFALDT
RIRQQQQQQMLSAQFPQQPPQQQQQQMAYGSYSPSMAPPQYTGMVAGGGGGWTGATQPSM
MIPPGAGSGWSSGVPTQASYGGPPIQTSWGVPSSTSNAGASSGTQRAPFFSNGNSDMQGKASFTNVSE
GAKNMSLIEQQMAQFAGQVSGQPQQPKSLNALMAERRQSE
```

A partir dessa sequência, foi possível detectar um motivo ENTH que a classifica como epsina (Pfam) e sítios para glicosilação da proteína (YinOYang *Predictions*) (Tabela 3).

| SeqName     | Residue | O-GlcNAc<br>result | Potential | Thresh.<br>(1) | Thresh.<br>(2) |        |
|-------------|---------|--------------------|-----------|----------------|----------------|--------|
| gi_71659691 | 2       | S                  | ++        | 0.6173         | 0.4242         | 0.5222 |
| gi_71659691 | 106     | T                  | +         | 0.5761         | 0.4699         | 0.5838 |
| gi_71659691 | 170     | S                  | +         | 0.5278         | 0.4646         | 0.5766 |
| gi_71659691 | 242     | T                  | ++        | 0.5541         | 0.4077         | 0.5000 |
| gi_71659691 | 243     | S                  | +++       | 0.6144         | 0.4167         | 0.5120 |
| gi_71659691 | 281     | S                  | +         | 0.3944         | 0.3849         | 0.4692 |
| gi_71659691 | 284     | T                  | ++        | 0.4449         | 0.3628         | 0.4394 |
| gi_71659691 | 290     | S                  | ++        | 0.4490         | 0.3567         | 0.4312 |
| gi_71659691 | 295     | S                  | +++       | 0.6183         | 0.3921         | 0.4790 |
| gi_71659691 | 321     | T                  | ++        | 0.6018         | 0.4600         | 0.5705 |
| gi_71659691 | 324     | T                  | ++        | 0.6019         | 0.4326         | 0.5335 |
| gi_71659691 | 332     | T                  | +         | 0.4570         | 0.4226         | 0.5200 |
| gi_71659691 | 387     | S                  | +         | 0.5057         | 0.4592         | 0.5693 |
| gi_71659691 | 399     | T                  | +         | 0.4803         | 0.4551         | 0.5638 |
| gi_71659691 | 430     | S                  | +         | 0.4729         | 0.4439         | 0.5488 |
| gi_71659691 | 437     | S                  | +         | 0.4386         | 0.4256         | 0.5241 |
| gi_71659691 | 445     | T                  | +++       | 0.6806         | 0.4393         | 0.5425 |
| gi_71659691 | 446     | S                  | +         | 0.5412         | 0.4531         | 0.5611 |
| gi_71659691 | 451     | S                  | +         | 0.4893         | 0.4296         | 0.5295 |
| gi_71659691 | 452     | S                  | ++        | 0.6164         | 0.4243         | 0.5224 |
| gi_71659691 | 453     | T                  | +++       | 0.6424         | 0.4142         | 0.5087 |
| gi_71659691 | 454     | S                  | +         | 0.4730         | 0.4116         | 0.5052 |
| gi_71659691 | 459     | S                  | +         | 0.4259         | 0.4197         | 0.5162 |
| gi_71659691 | 460     | S                  | ++        | 0.5646         | 0.4150         | 0.5098 |
| gi_71659691 | 469     | S                  | ++        | 0.5820         | 0.4424         | 0.5467 |
| gi_71659691 | 485     | S                  | +         | 0.5198         | 0.4418         | 0.5459 |
| gi_71659691 | 506     | S                  | +++       | 0.6418         | 0.4263         | 0.5250 |
| gi_71659691 | 526     | S                  | ++        | 0.4653         | 0.3307         | 0.3962 |

TABELA 3 – PREDIÇÃO DE POSSÍVEIS SÍTOS DE GLICOSILAÇÃO NA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA HIPOTÉTICA.

Utilizando a ferramenta ProDom ([prodom.prabi.fr](http://prodom.prabi.fr)), um domínio de ligação à proteína cadeia pesada de clatrina também foi encontrado.

#### 4.2 AMPLIFICAÇÃO DO GENE

Foram desenhados iniciadores diretos e reverso com base na sequência encontrada. A esses oligonucleotídeos foram adicionados sítios de recombinação *attB*, que são sequências de recombinação de DNA designadas pela plataforma Gateway® (Invitrogen, EUA) (Figura 10). Esses sítios permitem a ligação de proteínas necessárias para que ocorra a recombinação.

epsin F - 5' - GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAGTATTCCAACCTCCATTCA 3'

epsin R - 5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCCTCAGACTGTCGGCGCT 3'

FIGURA 10 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DIRETO E REVERSO (F e R, RESPECTIVAMENTE) DO GENE TcCLB.506925.70 ADAPTADOS PARA O SISTEMA GATEWAY® DE RECOMBINAÇÃO. EM PRETO É POSSÍVEL OBSERVAR AS SEQUÊNCIAS QUE CODIFICAM PARA SÍTIOS DE RECOMBINAÇÃO *attB*. TM = F = 52°C/ R = 49°C.

Esses iniciadores foram utilizados na amplificação da sequência do gene hipotético TcCLB.506925.70. Por intermédio de purificação com o sistema PEG/MgCl<sub>2</sub> foi possível separar o amplicon dos oligonucleotídeos e demais reagentes da PCR. O resultado da reação de PCR pôde ser observado através do perfil eletroforético das amostras (Figura 11).

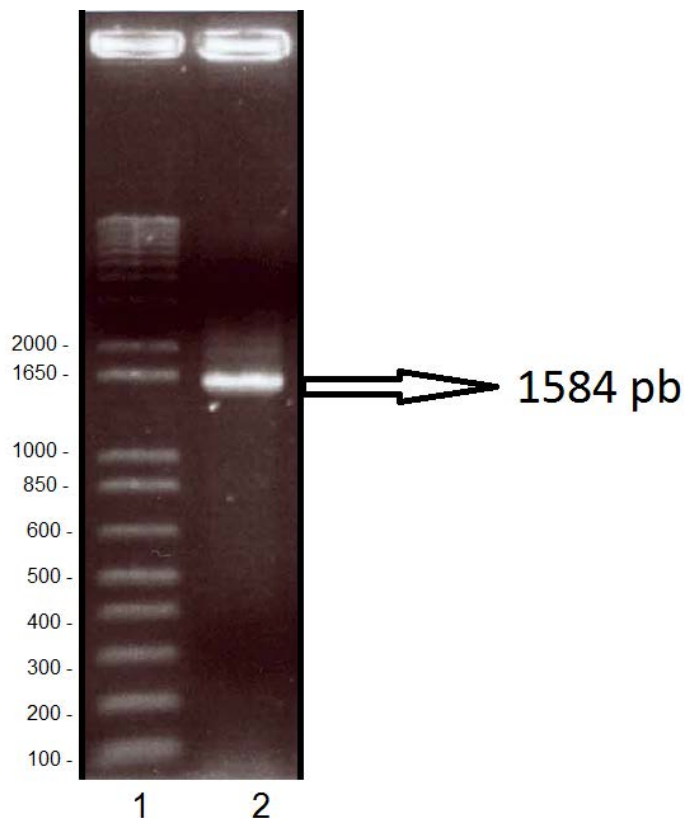


FIGURA 11 - AMPLIFICAÇÃO POR PCR DO GENE CODIFICANTE PARA A PROTEÍNA HIPOTÉTICA DE EPSINA. ELETROFORESE EM MATRIZ DE AGAROSE 1%. CONTROLE POSITIVO: PADRÃO DE MASSA MOLECULAR 1 KB PLUS (BANDA1). É APRESENTADA A BANDA CORRESPONDENTE AO GENE DE INTERESSE À ALTURA DE 1584 pb, CONFORME PREVISTO, INDICANDO O SUCESSO NA AMPLIFICAÇÃO DA PROTEÍNA HIPOTÉTICA.

#### 4.3 CLONAGEM DO GENE EM VETOR pDONR™221 E SELEÇÃO EM CÉLULAS DH5A DE *E. coli*

O gene hipotético de epsina amplificado por técnica de PCR foi clonado em vetor pDONR™221 utilizando a enzima BP Clonase do sistema de recombinação Gateway®. Esse sistema de clonagem possui alta eficiência utilizando dois mecanismos de seleção para distinção das células que receberam o inserto. Primeiramente, a presença do gene *ccdB* realiza a seleção negativa, conforme ilustrado na Figura 12. Em seguida, o gene de resistência ao clorafenicol atua como seletor positivo. Assim sendo, as colônias de células DH5α transformadas com o vetor ligado à epsina foram submetidas a um rígido processo de triagem. Somente os clones contendo o inserto foram capazes de crescer em cultura. Os demais foram eliminados pela toxicidade da proteína *ccdB* ou em razão de sua incapacidade de sobreviver ao meio seletivo (que contém o antibiótico canamicina).

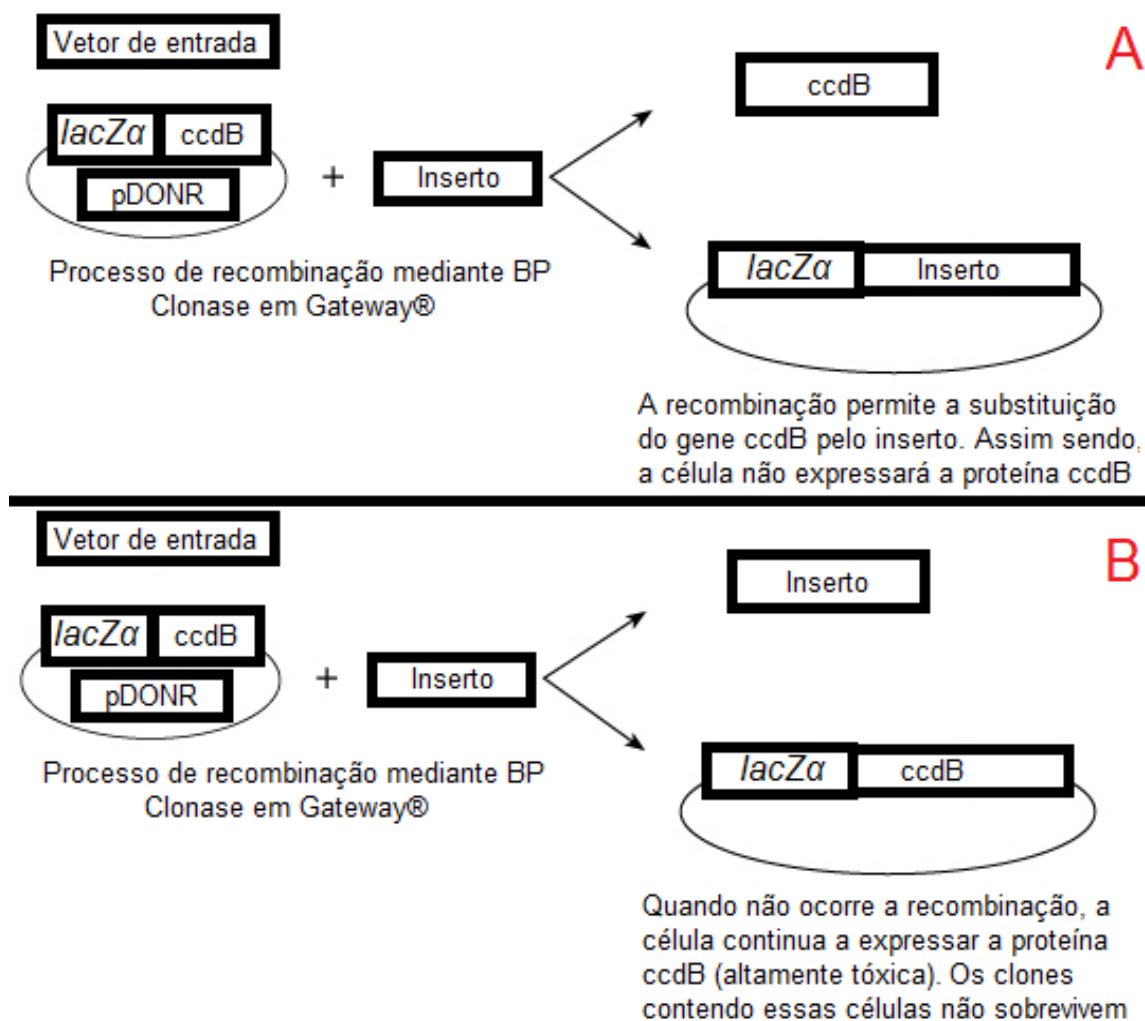


FIGURA 12 - ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA SELEÇÃO NEGATIVA QUE A PROTEÍNA CCDB EXERCE NO SISTEMA GATEWAY® DE RECOMBINAÇÃO. A) O VETOR DE ENTRADA RECEBE O INSERTO, QUE SUBSTITUI OS GENES CODIFICANTES PARA A PROTEÍNA TÓXICA CCDB. ASSIM SENDO, A CÉLULA QUE RECEBE ESSE VETOR SOBREVIVE, POIS NÃO EXPRESSARÁ CCDB E, PORTANTO, NÃO SOFRERÁ SEUS EFEITOS CITOTÓXICOS. B) QUANDO O VETOR DE ENTRADA NÃO RECEBE O INSERTO, A CÉLULA TRANSFORMADA CONTINUA A EXPRESSAR A PROTEÍNA CCDB CUJA TOXICIDADE TERMINA POR IMPEDIR SEU CRESCIMENTO.

Entretanto, para assegurar o sucesso da reação de recombinação, foi realizada uma PCR de colônia com os clones crescidos no meio seletivo utilizando oligonucleotídeos específicos para a sequência de epsina. O resultado da PCR confirmou a presença de bandas à altura correspondente à do gene de interesse, indicando a presença do inserto nos clones testados (Figura 13).

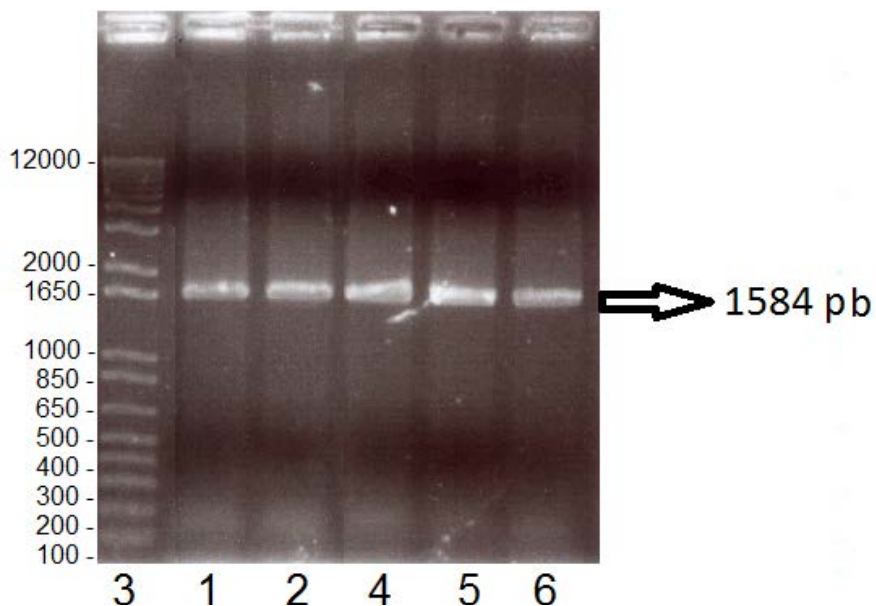


FIGURA 13 - PCR DE COLÔNIA COM CÉLULAS DH5 $\alpha$  TRANSFORMADAS COM O VETOR pDONR<sup>TM</sup>221 LIGADO À EPSINA. ELETROFORESE EM MATRIZ DE AGAROSE 1%. CONTROLE POSITIVO: PADRÃO DE MASSA MOLECULAR *KB PLUS* (COLUNA 3). A AMPLIFICAÇÃO DOS CLONES SELECIONADOS (COLUNAS 1,2,4,5,6) RESULTOU EM PRODUTOS CUJAS BANDAS CORRESPONDEM AO TAMANHO DO INSERTO DE EPSINA FUSIONADO A *attB*.

As amostras foram sequenciadas (Macrogen, Coreia do Sul, Seul). O resultado do sequenciamento confirmou a presença da sequência para epsina no vetor pDONR<sup>TM</sup>221.

#### 4.4 LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE EPSINA RECOMBINADA COM GFP

##### 4.4.1 Extração das construções contendo o vetor pDONR<sup>TM</sup>221 e recombinação em vetor pTc GFP

Para a extração plasmidial das células selecionadas por PCR de colônia com o kit “*QIAprep spin miniprep*” (QIAGEN). Com o intuito de assegurar novamente a presença do vetor pDONR<sup>TM</sup>221 ligado ao inserto, foi conduzida uma reação de PCR de plasmídeo empregando novamente os oligonucleotídeos desenhados para amplificação do gene de epsina. O perfil eletroforético da reação permitiu a corroboração dessa predição.

Por conseguinte, o inserto clonado foi transferido para o vetor pTc GFP C-terminal e pTc GFP N-terminal, que contém a sequência codificante para a proteína GFP, empregando, novamente, o sistema *Gateway*®. Esse vetor foi escolhido devido às características da proteína bioluminescente GFP, extraída da água viva *Aequoria victoria*, capaz de emitir fluorescência quando excitada (CHALFIE, 1995). A sequência codificante para essa proteína é frequentemente utilizada para formar proteínas recombinantes fluorescentes, permitindo que a localização celular das mesmas seja mapeada através da microscopia. Assim, a adição de uma sequência que codifica GFP à sequência gênica da epsina permite que a posição dessa proteína na célula seja rastreada.

#### 4.4.2 Seleção dos clones contendo a proteína recombinante

Após a recombinação da epsina no vetor pTc GFP e transformação dessa construção em células DH5 $\alpha$  os clones foram selecionados por PCR de colônia utilizando os oligonucleotídeos desenhados para a proteína TcEpsina. Através desse ensaio, foi verificado que a clonagem no vetor foi bem sucedida pois apresentou bandas com tamanho previsto para o gene hipotético, demonstrando sua presença no DNA das colônias testadas (Figura 14).

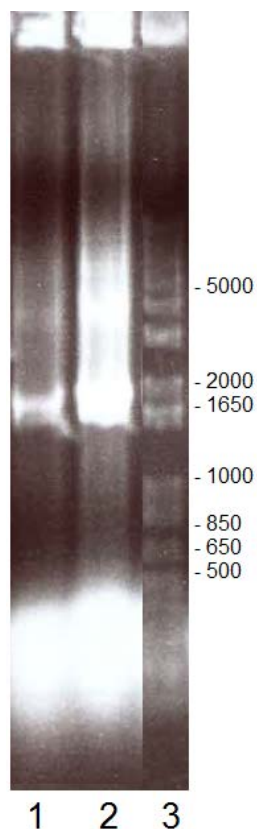


FIGURA 14 - ANÁLISE POR PCR PLASMIDIAL DA RECOMBINAÇÃO DE EPSINA COM O VETOR pTc GFP C-TERMINAL (COLUNA 1) E N-TERMINAL (COLUNA 2). ELETROFORESE EM MATRIZ DE AGAROSE 1%. PADRÃO DE MASSA MOLECULAR 1 KB PLUS (COLUNA 3). É POSSÍVEL OBSERVAR QUE AS BANDAS AMPLIFICADAS CORRESPONDEM AO TAMANHO PREVISTO (RELATIVA AO GENE HIPOTÉTICO DE EPSINA FUSIONADO A *attB*), INDICANDO A PRESENÇA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE NO PLASMÍDEO.

#### 4.4.3 Localização subcelular da epsina

Depois da extração das construções contendo a proteína epsina ligada à GFP foi realizado o processo de transfecção, que permite que a proteína recombinante seja expressa em *T. cruzi*. Por esse método, a célula do parasita passou a expressar epsina com um sinal de fluorescência rastreável. Após a tradução da sequência codificante para a proteína em estudo, o tripanosomatídeo realizou um processo de endereçamento celular, permitindo que a epsina fosse enviada ao seu sítio nativo na célula. A posição dessa localização pôde ser observada por microscopia de luz (Figura 15). O ensaio com tripanosomatídeos

*Wild type* (ou seja, não transformados com a proteína recombinante) também foi executado como controle negativo e não obteve marcação, como esperado.

As análises bioinformáticas revelavam diferenças biomoleculares entre a proteína hipotética de epsina em *T. cruzi* quando comparada à epsina em outras espécies. Foi necessário utilizar estratégias diferentes para investigar outras propriedades dessa proteína, que pudessem confirmar sua identidade. O método utilizado foi averiguação da localização subcelular da epsina nesse parasita. Com esse ensaio, esperava-se comprovar a presença da epsina em região compatível com a de endocitose em *T. cruzi*. Na figura 14 (abaixo), pode se observar que a marcação fluorescente ocorre no sítio correspondente à bolsa flagelar em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* – a região anterior ao cinetoplasto. Isso corrobora a hipótese de que essa proteína hipotética participe do processo de endocitose da célula, pois está presente em uma região de alta atividade endocítica.

Somente os parasitas contendo a proteína GFP na região N-terminal exibiram fluorescência. Os parasitas transfectados com a construção contendo a proteína GFP na região C-terminal foram descartados.

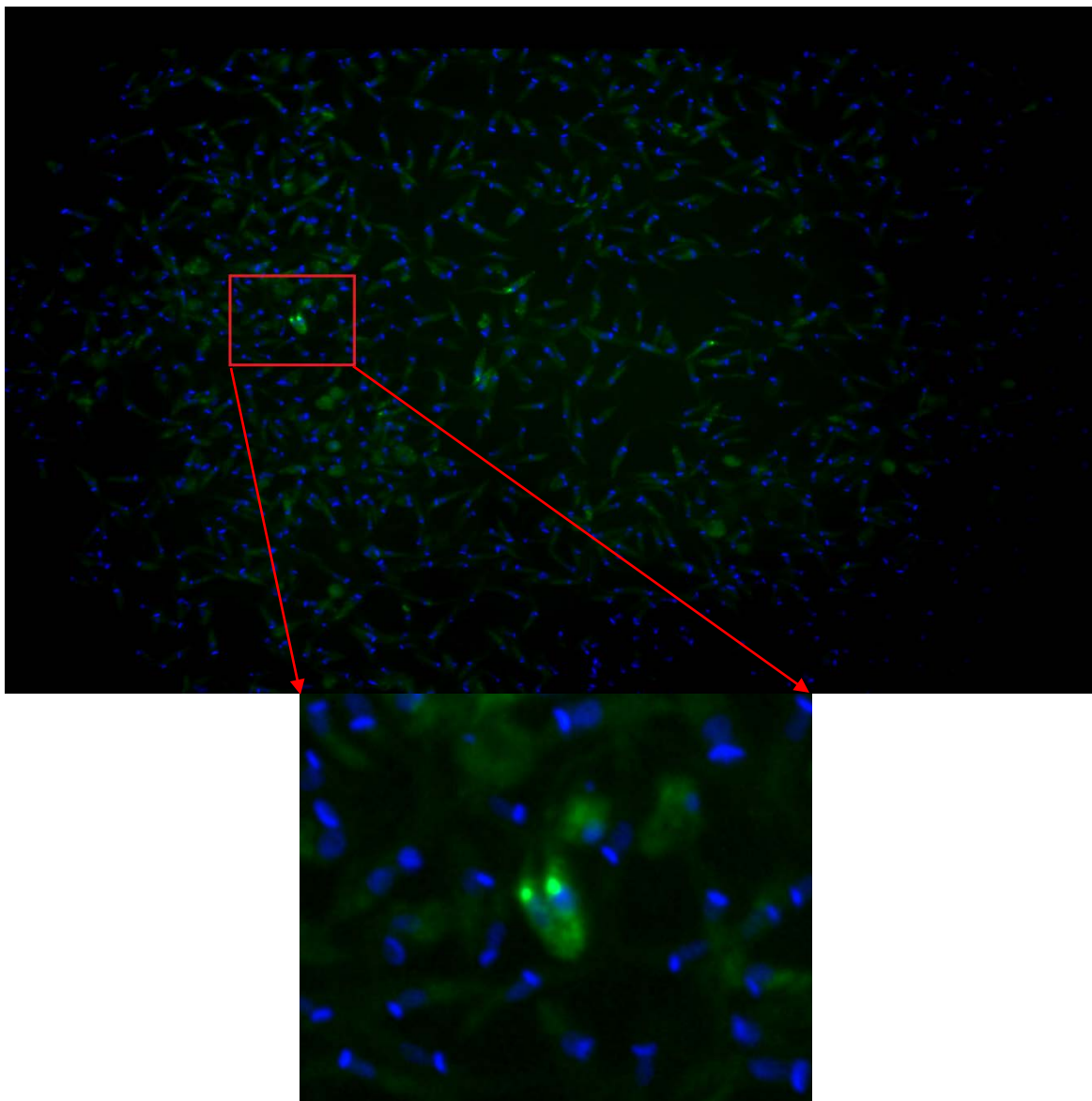


FIGURA 15 - IMAGEM DE MICROSCOPIA DA LOCALIZAÇÃO DA EPSINA EM FORMAS EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi*. A PROTEÍNA GFP FOI MARCADA COM ANTISSORO POLICLONAL ANTI-GFP E MARCADA COM UM ANTICORPO SECUNDÁRIO CONJUGADO A ALEXAFLUOR 488 (SIGMA). A EXCITAÇÃO DESSE FLUORÓFORO COM LASER RESULTA NA EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA VERDE, PERMITINDO A VISUALIZAÇÃO DE SUA LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR. EM AZUL, É POSSÍVEL OBSERVAR O NÚCLEO E O CINETOPLASTO, MARCADOS COM HOECHST 33342.

Entretanto, conforme pôde ser observado, poucas células de parasitas emitiram fluorescência. Isso indica que nem todos os tripanosomatídeos da cultura estão expressando a proteína GFP. Por esse motivo, foi necessário realizar uma triagem nessas células, para que fossem selecionadas apenas as que expressam a proteína recombinante. Para tanto, houve colaboração com o doutorando Rafael

Luis Kessler do Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ que realizou o *sorting* dos parasitas fluorescentes utilizando o aparelho citofotômetro.

A eficácia da triagem foi analisada em microscopia confocal. Para tanto, foi repetido o ensaio de imunolocalização utilizando uma cultura contendo apenas os parasitas selecionados. O resultado desse experimento pode ser observado na Figura 16.

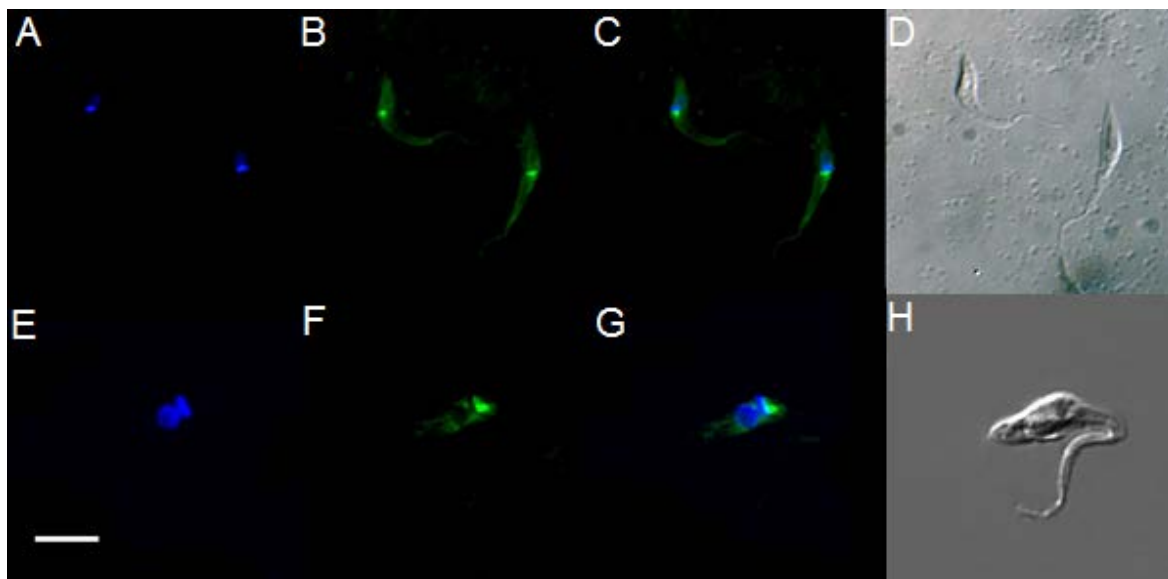


FIGURA 16 - IMAGEM DE MICROSCOPIA CONFOCAL DA LOCALIZAÇÃO DA EPSINA EM FORMAS EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi* PÓS SORTING. A e) O NÚCLEO E O CINETOPLASTO ESTÃO MARCADOS EM AZUL COM HOECHST 33342. B e F) LOCALIZAÇÃO DA EPSINA MARCADA EM VERDE PELO ANTICORPO SECUNDÁRIO CONJUGADO A ALEXAFLUOR 488 (SIGMA). C e G) SOBREPOSIÇÃO DAS IMAGENS DE HOECHST E ALEXAFLUOR 488 (MERGED). D e H) IMAGEM DO CORPO DOS PARASITAS POR CONTRASTE INTERFERENCIAL (DIC). BARRA = 5  $\mu$ M.

#### 4.4.4 Colocalização de epsina e cadeia leve de clatrina

Conforme descrito anteriormente, é na bolsa flagelar que ocorre o processo de endocitose mediado por clatrina. A cadeia leve de clatrina foi descrita por Kalb *et al.* (2013) como biomarcador para a bolsa flagelar em formas epimastigotas de *T. cruzi*. Para que essa proteína desempenhe seu papel no curvamento da membrana, é preciso que haja interação da mesma com diversas outras proteínas como, por exemplo, a epsina (CORREA *et al.*, 2007).

De acordo com Garbenet-Castello (2009), a epsina em tripanosomatídeos tem localização próxima à da clatrina na bolsa flagelar. Assim, para confirmar os resultados anteriores, que indicam a presença da epsina na região da bolsa flagelar, foi realizada uma análise da posição subcelular de epsina em relação à clatrina (Figura 17).

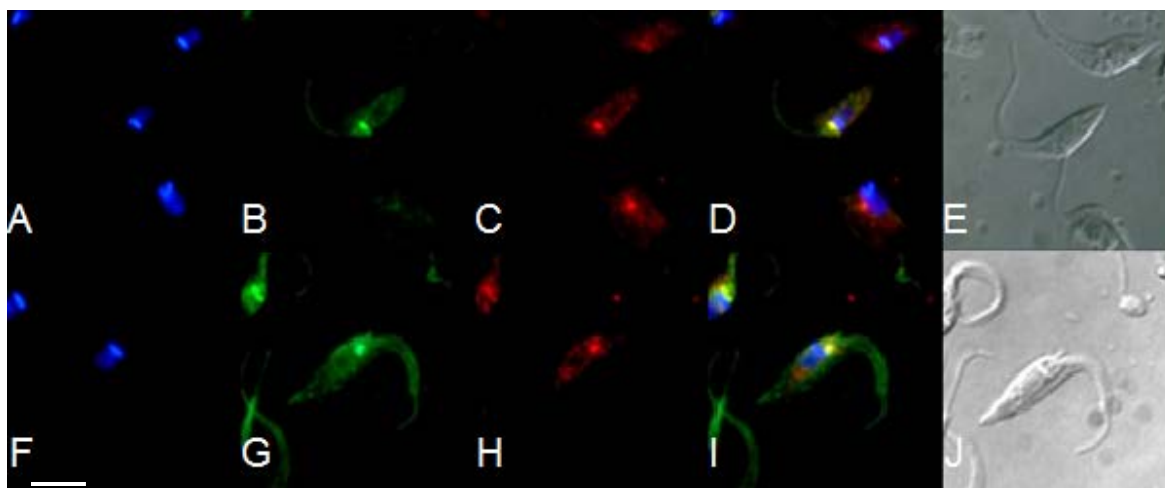


FIGURA 17 – IMUNOCOLOCAÇÃO DE EPSINA E CADEIA LEVE DE CLATRINA EM FORMAS EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi*. A e F) NÚCLEO E CINETOPLASTO FORAM MARCADOS COM HOECHST 33342. B e G) LOCALIZAÇÃO DA EPSINA MARCADA EM VERDE PELO ANTICORPO SECUNDÁRIO CONJUGADO A ALEXAFLUOR 488 (SIGMA). C e H) COLOCALIZAÇÃO DA EPSINA MARCADA EM VERDE PELO ANTICORPO SECUNDÁRIO CONJUGADO A ALEXAFLUOR 594 (SIGMA) E DA CLATRINA MARCADA EM VERMELHO (ALEXA FLUOR 594). D e I) SOBREPOSIÇÃO DAS IMAGENS DE HOECHST, ALEXAFLUOR 488 E ALEXAFLUOR 594 (MERGED). E e J) IMAGEM DO CORPO DOS PARASITAS POR CONTRASTE INTERFERENCIAL (DIC). BARRA = 5  $\mu$ M.

Com base nesse experimento foi possível concluir que epsina e cadeia leve de clatrina ocupam a mesma posição subcelular no corpo do *T. cruzi* evidenciando o possível papel dessa proteína na endocitose nesse organismo. Ambas colocalizam na região da bolsa flagelar.

#### 4.5 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS

Estudos a respeito do processo endocítico em *Trypanosoma cruzi* são escassos. Análises recentes indicam a participação de componentes como clatrina e proteínas adaptadoras (KALB, 2012), de maneira semelhante à que ocorre em

outros organismos eucariontes. Apesar disso, diversos elementos essenciais para a endocitose nessas espécies ainda não foram encontrados em *T. cruzi*. Pesquisas nesse âmbito são importantes para a compreensão da biologia celular desse parasita.

Com o intuito de aperfeiçoar o conhecimento a respeito da endocitose em *Trypanosoma cruzi* foram produzidos anticorpos policlonais anti-epsina em camundongos BALBc. O objetivo principal foi utilizar esses anticorpos para confirmar a localização de epsina nesses organismos. Adicionalmente, eles poderão ser aplicados futuramente como ferramenta em projetos relacionados à biologia de tripanosomatídeos, contribuindo para com a elucidação dos processos vitais em protozoários.

#### 4.5.1 Recombinação de epsina em pDEST e transformação em *E. coli*

A fim de desenvolver anticorpos policlonais anti-epsina, foi realizada a recombinação de epsina com o plasmídeo pDEST, um vetor de expressão em *E. coli*. O vetor pDEST é capaz de adicionar uma etiqueta contendo 6 histidinas à proteína de interesse.

A sequência poli-histidina compreende várias aplicações a nível de biologia molecular. Ela foi escolhida para esse ensaio pois possui apenas 6 kDa de mobilidade aparente, podendo ser utilizada em experimentos que envolvem purificação de proteínas sem que haja, obrigatoriamente, necessidade de removê-la após a purificação. Com o uso de soluções tampão adequadas, essa sequência pouco interfere com as propriedades físico-químicas da epsina.

Através de uma PCR de *miniprep*, realizada após a extração da construção, foi possível analisar a ocorrência de recombinação. Utilizando oligonucleotídeos da Figura 9, foram detectadas bandas de DNA com o tamanho previsto para a proteína recombinante, indicando sucesso na fusão da epsina com pDEST (Figura 18).

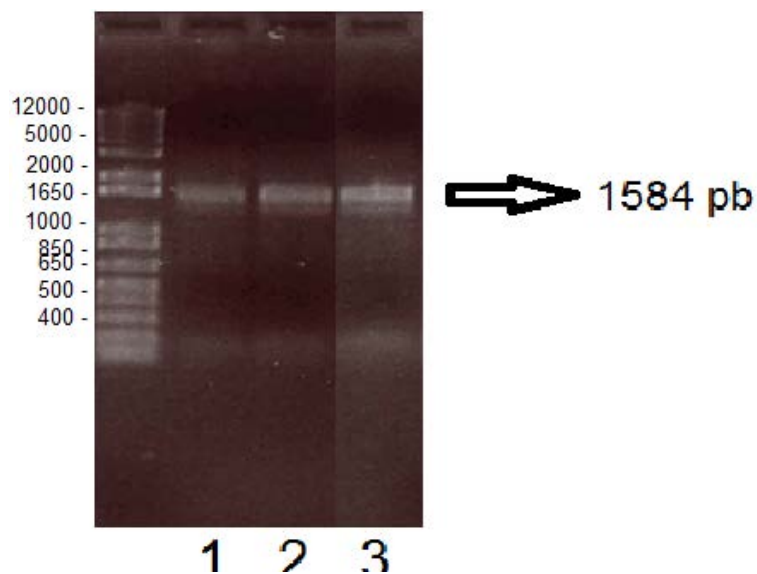


FIGURA 18 – ANÁLISE POR PCR PLAMIDIAL DA RECOMBINAÇÃO DE EPSINA COM O VETOR pDEST. ELETROFORESE EM MATRIZ DE AGAROSE 1%. CONTROLE POSITIVO: PADRÃO DE MASSA MOLECULAR 1 KB PLUS (BANDA 2). AS BANDAS 1, 3 E 4 DEMONSTRAM A AMPLIFICAÇÃO DE TRÊS CLONES DE EPSINA EM pDEST (APROXIMADAMENTE 1584 pb).

#### 4.6 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE EM *E. coli* E TESTE DE SOLUBILIDADE

Os clones em pDEST, cuja fusão com epsina foi confirmada por PCR, foram expressos em *E. coli* DH5 $\alpha$ . A análise do perfil eletroforético em gel de poliacrilamida das expressões heterólogas permitiu demonstrar que a proteína foi expressa majoritariamente na fração insolúvel (Figura 19). O tamanho das proteínas expressas foi correspondente ao esperado (aproximadamente 60 kDa).

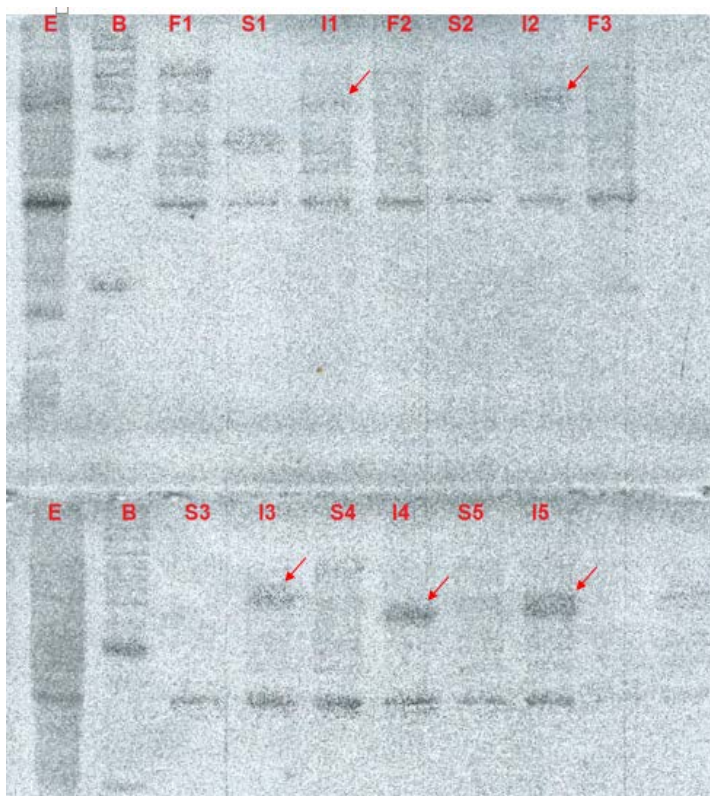


FIGURA 19 – TESTE DE EXPRESSÃO E SOLUBILIDADE DE EPSINA RECOMBINANTE EM CEPAS DH5 $\alpha$  DE *E. coli*. O PERFIL ELETROFORÉTICO DA EXPRESSÃO DE *E. coli* SEM INDUÇÃO POR IPTG FOI UTILIZADO COM CONTROLE NEGATIVO (E); COMO PADRÃO DE MASSA MOLECULAR FOI UTILIZADO *BENCH MARK* (INVITROGEN) (B); AS FRAÇÕES TOTAIS, CONTENDO AS PROTEÍNAS EXPRESSAS PELA BACTÉRIA NA FASE SOLÚVEL E INSOLÚVEL FORAM REPRESENTADAS PELO PERFIL ELETROFORÉTICO EM F1, F2 E F3 (OS NÚMEROS REPRESENTAM AS DIFERENTES COLÔNIAS ANALISADAS); AS FRAÇÕES SOLÚVEIS FORAM RETRATADAS EM S1, S2, S3, S4 E S5; AS FRAÇÕES INSOLÚVEIS CORRESPONDEM A I1, I2, I3, I4 E I5 COM TAMANHO DE APROXIMADAMENTE 60 kDa É POSSÍVEL RECONHECER A BANDA CORRESPONDENTE À PROTEÍNA RECOMBINANTE PRESENTE, SOBRETUDO, NA FRAÇÃO INSOLÚVEL DAS AMOSTRAS, CONFORME INDICADO PELAS SETAS.

Esse resultado foi confirmado por *Western Blot*, com anticorpos anti-histidina, que reconheceram a etiqueta de histidina inserida na proteína recombinante (Figura 20). Novamente, a proteína foi reconhecida no tamanho esperado. A disponibilidade comercial desses anticorpos reitera a importância da adição de histidina à sequência: por intermédio dela, foi possível detectar indiretamente a presença de epsina na porção insolúvel do extrato proteico de *E. coli*, na ausência de anticorpos contra a proteína de interesse. Essa abordagem só foi possível devido à recombinação de epsina com o vetor pDEST.

A análise da solubilidade foi importante para que fosse estabelecida a estratégia apropriada à purificação da proteína recombinante. Com base nesses resultados, foi resolvido obter a epsina a partir da fração insolúvel.

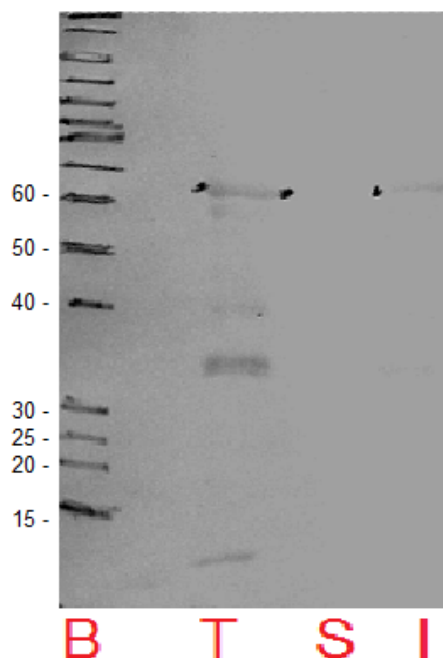


FIGURA 20 – CONFIRMAÇÃO DA INSOLUBILIDADE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE EM *WESTERN BLOT*. B) MARCADOR DE MASSA MOLECULAR *BENCH MARK* (INVITROGEN). T) AMOSTRA DA FRAÇÃO TOTAL CONTENDO AS PROTEÍNAS EXPRESSAS PELA BACTÉRIA NA FASE SOLÚVEL E INSOLÚVEL. S) AMOSTRA DA FRAÇÃO SOLÚVEL. I) AMOSTRA DA FRAÇÃO INSOLÚVEL. O ANTICORPO ANTI-HISTIDINA REVELOU A PRESENÇA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE NA FRAÇÃO INSOLÚVEL, CONTENDO O TAMANHO ESPERADO (APROXIMADAMENTE 60 kDa). REVELAÇÃO POR FOSFATASE ALCALINA.

#### 4.7 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Conforme demonstrado por *Western Blot* na Figura 20, a proteína fusionada à etiqueta de histidina está presente na fração insolúvel. Para que a proteína de interesse fosse separada das demais proteínas expressas em *E. coli*, foi realizado um processo de purificação dessa fração por eletroluição dessa banda a partir de um gel preparativo.

Mediante essa metodologia foi possível isolar a proteína recombinante, etapa crucial na obtenção de amostras para inoculação em camundongos. A fim de

que os animais experimentais produzam anticorpos específicos para a proteína epsina, é indispensável a realização de uma purificação de qualidade. Caso contrário, o animal passará a desenvolver anticorpos que reagem com outras proteínas presentes em bactérias, que podem apresentar reação cruzada com proteínas de *T.cruzi*. A presença desses anticorpos inespecíficos no soro do camundongo inviabiliza seu uso para determinados estudos de microscopia e expressão gênica, pois poderá haver marcação de outras proteínas, impossibilitando a distinção da proteína de interesse.

Para avaliar a eficiência do processo de purificação adotado, foi realizado um ensaio de *Western Blot*, testando as amostras purificadas com anticorpos anti-histidina (Figura 21). As amostras R2 e R3 possuem marcação em mais de uma banda, revelando degradação da proteína recombinante, indicando que R2 e R3 são inadequadas para a produção de anticorpos em animais experimentais.

Todavia, foi possível observar a presença de uma única banda na amostra 1, com o tamanho esperado para a proteína recombinante (aproximadamente 60 kDa). Dessa maneira, foi comprovada a eficácia do método, possibilitando o uso dessa solução para imunização dos camundongos.

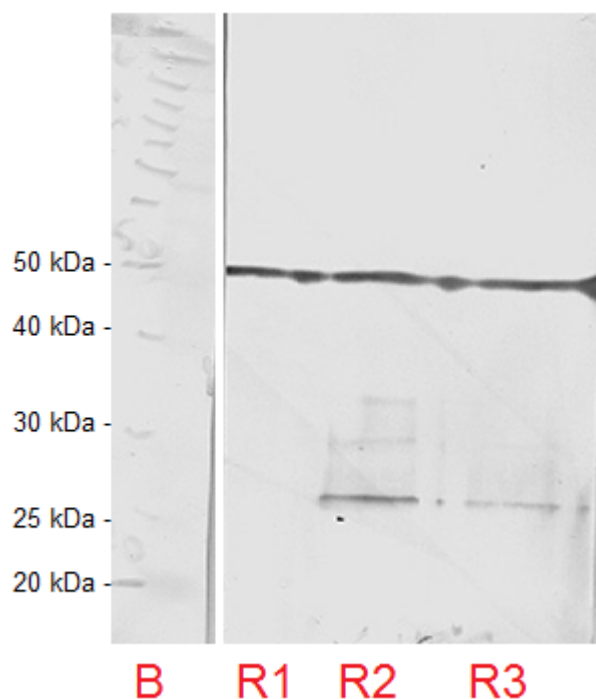


FIGURA 21 – ANÁLISE POR *WESTERN BLOT* DA PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE COM ANTICORPOS ANTI-HISTIDINA. FOI UTILIZADO O MARCADOR DE MASSA MOLECULAR *BENCH MARK* (INVITROGEN) (B). AS AMOSTRAS DA PURIFICAÇÃO DE

EPSINA ESTÃO REPRESENTADAS POR R1, R2 E R3. REVELAÇÃO POR FOSFATASE ALCALINA.

#### 4.8 IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS BALBC

Antes do início das imunizações, foram coletados os soros dos camundongos a fim de verificar se os mesmos estavam reagindo ou não com o extrato protéico de *T. cruzi*. Essa análise permite a certificação de que o camundongo não possui anticorpos produzidos previamente, que reajam contra proteínas do parasita. Animais previamente expostos ao parasita devem ser descartados, assim como os que apresentam anticorpos que interajam por reação cruzada com os antígenos de *T. cruzi*.

O resultado confirmou a falta de reconhecimento dos anticorpos dos camundongos por proteínas inespecíficas de *T. cruzi*, o que poderia comprometer os resultados de experimentos futuros (Figura 22).

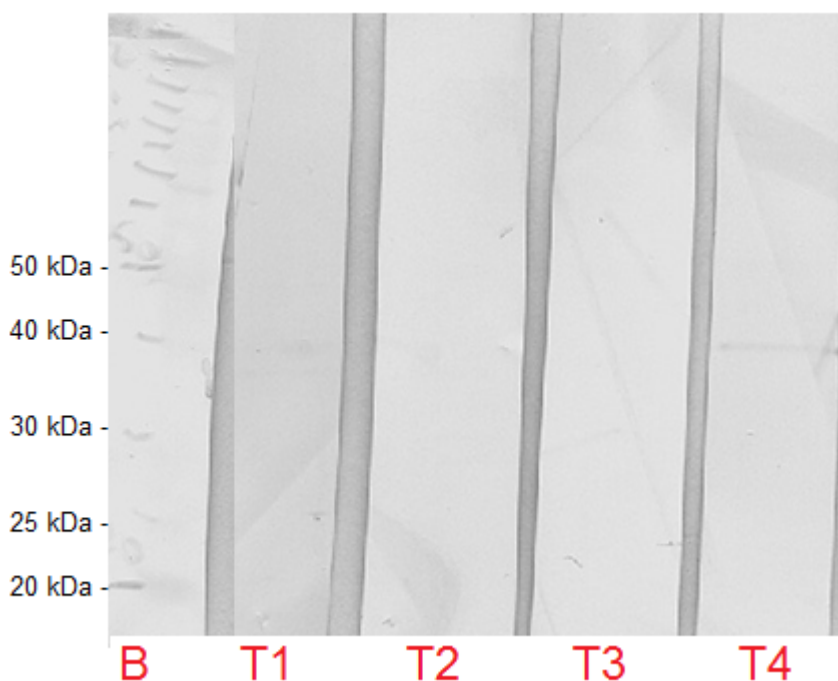


FIGURA 22 – TESTE DO SORO PRÉ-IMUNE. WESTERN BLOT DOS EXTRATOS PROTEICOS DE *T. cruzi* CONTRA O SORO DE CAMUNDONGOS ANTES DE SEREM IMUNIZADOS COM A PROTEÍNA RECOMBINANTE. B) PADRÃO DE MASSA MOLECULAR BENCH MARK (INVITROGEN). T1 A T4) O SORO DOS CAMUNDONGOS 1 A 4. REVELAÇÃO POR FOSFATASE ALCALINA. CADA AMOSTRA CONTINHA 15  $\mu$ L PREPARADOS COM TAMPÃO DE AMOSTRA 4X NA PROPORÇÃO 2:1.

Com base nesses dados, os quatro camundongos testados foram inoculados com a proteína recombinante.

#### 4.9 ANÁLISE DO ANTICORPO

Os camundongos imunizados foram anestesiados e seu soro foi coletado por punção cardíaca com subsequente sacrifício dos animais. Para avaliar a eficácia das imunizações, os anticorpos obtidos foram testados por *Western Blot* em membranas contendo a proteína recombinante e extrato proteico de formas epimastigotas de *T.cruzi* (Figura 23). Com essa abordagem foi possível verificar se houve produção de anticorpos e se os anticorpos desenvolvidos eram específicos para a proteína recombinante.

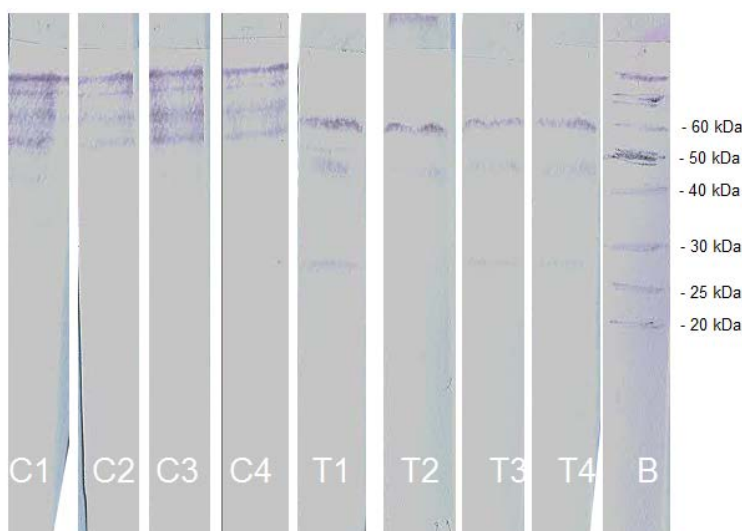


FIGURA 23 – TESTE DO SORO IMUNE. *WESTERN BLOT* UTILIZANDO O SORO DOS CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM A PROTEÍNA RECOMBINANTE EPSINA. A CADA CAMUNDONGO FOI AFERIDO UM NÚMERO DE 1 A 4. C) REAÇÃO CONTRA EPSINA RECOMBINANTE INSOLÚVEL. T) REAÇÃO CONTRA EXTRATO DE FORMAS EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi*. B) PADRÃO DE MASSA MOLECULAR *BENCH MARK* (INVITROGEN). REVELAÇÃO POR FOSFATASE ALCALINA.

Foi constatada a produção de anticorpos em todos os camundongos submetidos ao experimento. Os anticorpos produzidos apresentaram especificidade para com a proteína recombinante.

Em contrapartida, no teste utilizando extrato de formas epimastigotas de *T.cruzi* foi evidenciada a produção de anticorpos inespecíficos no camundongo 1, que realizam reação cruzada com outras proteínas do parasita. Assim, o soro do animal 1 foi descartado.

O soro dos demais camundongos foi armazenado à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  e poderá ser utilizado futuramente em experimentos concernentes à biologia de tripanosomatídeos.

## 5 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Métodos de bioinformática foram aptos na busca por um possível gene de epsina no genoma de *Trypanosoma cruzi*. A sequência encontrada apresenta semelhanças quando comparada às de outros tripanosomatídeos e à do ser humano. Essa análise, realizada pelo cálculo da identidade e similaridade, permitiu notabilizar a conservação desse gene ao longo do processo evolutivo, evidenciando sua importância para a sobrevivência das espécies.

Ferramentas em biologia molecular e celular complementaram esses dados e forneceram informações a respeito da localização celular dessa proteína. Foi possível constatar que essa proteína, em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, encontra-se na bolsa flagelar desses parasitas. Esta informação forneceu um indício adicional de que a sequência encontrada codifica, de fato, para a proteína epsina. Adicionalmente, sua colocalização com clatrina corroborou a hipótese de sua participação no processo endocítico.

Os resultados foram conexos e coerentes, enfatizando sua confiabilidade. Nesse âmbito, recomenda-se que, no futuro, sejam realizadas análises da expressão dessa proteína em outras formas evolutivas desse protozoário. Não obstante, a confirmação da localização desse polipeptídeo através de microscopia eletrônica poderá fornecer dados valiosos a nível tridimensional.

A imunização de camundongos BALBc, utilizando a proteína recombinante, permitiu o desenvolvimento de anticorpos policlonais específicos para a proteína epsina. Esses anticorpos poderão ser utilizados posteriormente em experimentos referentes à biologia de tripanosomatídeos. O soro desses animais poderá ser empregado como ferramenta em técnicas de imunolocalização para identificar a posição subcelular de epsina em formas tripomastigotas e amastigotas do parasita, bem como para confirmação dos resultados obtidos em formas epimastigotas. Sugere-se também a investigação das proteínas que interagem com epsina, pela adesão dos anticorpos a uma matriz, com subsequente cromatografia de afinidade.

Adicionalmente, os anticorpos poderão ter sua reatividade testada em outros tripanosomatídeos para determinar a ocorrência de reações cruzadas e a

aplicabilidade desses anticorpos em experimentos envolvendo diferentes espécies de protozoários.

Em conclusão, a identificação dessa proteína em *T.cruzi* propicia à ciência *insights* a respeito do processo endocítico nesse parasita. Os anticorpos gerados por este estudo poderão ser aplicados em estudos relativos à compreensão da maquinaria vital em tripanosomatídeos.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, H. M.; ABAD-FRANCH, F.; DIAS, J. C.; JUNQUEIRA, A. C.; COURA, J. R. Chagas disease in the Amazon Region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n.1, p. 47–56, out./ago. 2007.
- ALCANTARA, C. L.; VIDAL, J. C.; de SOUZA, W.; CUNHA E SILVA, N. L. The three-dimensional structure of the cytostome-cytopharynx complex of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Journal of Cell Science*, v. 127, 2227-2237, mar./mai. 2014.
- ALVES, C. R.; ALBUQUERQUE-CUNHA, J. M.; MELLO, C. B., GARCIA, E. S.; NOGUEIRA, N. F.; BOURGUINGNON, S. C.; *Trypanosoma cruzi*: attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. **Experimental Parasitology**, v.116, n. 1, p. 44-52, jan. 2007.
- ANDRADE, J. P.; MARIN NETO, J. A.; PAOLA, A. A.; VILAS-BOAS, F.; OLIVEIRA, G. M.; BACAL, F.; BOCCHI, E. A.; ALMEIDA, D. R.; FRAGATA FILHO, A. A.; MOREIRA, M. C.; XAVIER, S. S.; OLIVEIRA JUNIOR, W. A.; DIAS, J. C. Latin american guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas' heart disease: executive summary. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 96, n. 6, p. 434–442, 2011.
- ARAÚJO, P. R.; TEIXEIRA, S. M. Regulatory elements involved in the post-transcriptional control of stage-specific gene expression in *Trypanosoma cruzi* - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 6, p. 257-266, mai. 2011.
- ASSAL, A.; CORBI, C. Maladie de Chagas et transfusion sanguine: un problème parasitaire émergent dans les pays non endémiques. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 18, n. 2, p. 286-291, 2011.
- AUFDERHEIDE, A. C.; SALO, W.; MADDEN, M.; STREITZ, J.; BUIKSTRA, J.; GUHL, F.; ARRIAZA, B.; RENIER, C.; WITTMERS, L. E. Jr.; FORNACIARI, G.; ALLISON, M. A 9,000-year record of Chagas' disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 101, n. 7, p. 2034-2039, fev. 2004.
- BAROLDI, G.; OLIVEIRA, S. J.; SILVER, M. D. Sudden and unexpected death in clinically 'silent' Chagas' disease. A hypothesis. **International Journal of Cardiology**, v. 58, n. 3, p. 263-268, fev. 1997.
- BARRAL, M. M. ; NUNES, M. C.; BARBOSA, M. M.; FERREIRA, C. S.; TAVARES JR. W. C.; ROCHA, M. O. Echocardiographic parameters associated with pulmonary congestion in Chagas cardiomyopathy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 3, p. 244–248, mai./jun. 2010.
- BASILE, L.; JANSÁ, J. M.; CARLIER, Y.; SALAMANCA, D. D.; ANGHEBEN, A.; BARTOLONI, A.; SEIXAS, J.; VAN GOOL, T.; CAÑAVATE, C.; FLORES-

- CHÁVEZ, M.; JACKSON, Y.; CHIODINI, P. L.; ALBAJAR-VIÑAS, P. Working Group on Chagas Disease. Chagas disease in European countries: the challenge of a surveillance system. **Euro Surveillance**, v. 16, n. 37, 2011.
- BATISTA, M. Construção de vetores para caracterização de genes de *Trypanosoma cruzi* em um sistema para clonagem em alta demanda. 124f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- BERN, C.; MARTIN, D. L.; GILMAN, R. H. Acute and congenital Chagas disease. **Advances in Parasitology**, v. 75, p. 19–47, 2011.
- BERN, C.; MONTGOMERY, S. P.; HERWALDT, B. L.; RASSI, A. JR.; MARINETTO, J. A.; DANTAS, R. O.; MAQUIRE, J. H.; ACQUATELLA, H.; MORILLO, C.; KIRCHHOFF, L. V.; GILMAN, R. H.; REYES, P. A.; SALVATELLA, R.; MOORE, A. C. Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States: A systematic review. **JAMA**, v. 298, n. 18, p. 2171-2181, 2007.
- BESTERMAN, J. M.; LOW, R. B. Endocytosis: a review of mechanisms and plasma membrane dynamics. **Biochemical Journal**, v. 210, p. 1-13, 1983.
- BOCCHI, E. A.; FIORELLI, A. The paradox of survival results after heart transplantation for cardiomyopathy caused by *Trypanosoma cruzi*. First guidelines group for heart transplantation of the Brazilian Society of Cardiology. **Annals of Thoracic Surgery**, Great Britain, v. 71, p. 1833–1838, 2001.
- BOTONI, F. A.; POOLE-WILSON, P. A.; RIBEIRO, A. L.; OKONKO, D. O.; OLIVEIRA, B. M.; PINTO, A. S.; TEIXEIRA, M. M.; TEIXEIRA, A. L.; REIS, A.M.; DANTAS, J. B.; FERREIRA, C. S.; TAVARES, W. C.; ROCHA, M. O. A randomized trial of carvedilol after renin-angiotensin system inhibition in chronic Chagas cardiomyopathy. **American Heart Journal**, v. 153, n. 544, p. 1–8, 2007.
- BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' Disease. **International Archives of Allergy and Immunology**, Vienna, v. 114, n. 2, p. 103-110, 1997.
- BRENER, Z. Laboratory acquired Chagas' disease: endemic among parasitologists? In: Morel CM. **Genes and Antigens of Parasites, a Laboratory Manual**. Second Edition. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 1984. p. 3-9.
- CABALLERO, Z. C.; SOUSA, O. E.; MARQUES, W. P.; SAEZ-ALQUEZAR, A.; UMEZAWA, E. S. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. **Clinical Vaccine Immunology**, v. 14, n. 8, p. 1045–1049, ago. 2007.

- CARLIER, Y.; TORRICO, F.; SOSA-ESTANI, S.; RUSSOMANDO, G.; LUQUETTI, A.; FREILIJ, H.; ALBAJAR VINAS, P. Congenital Chagas disease: recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 1250, out. 2011.
- CAROD-ARTAL, F. J. Policy Implications of the Changing Epidemiology of Chagas Disease and Stroke. **American Heart Society**, v. 44, p. 2356-2360, 2014.
- CHAGAS, C. Nova tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova morbidade do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 1, p. 159-218, ago. 1909.
- CHEN, H.; FRE, S.; SLEPNEV, V. I.; CAPUA, M.R.; TAKEI, K.; BUTLER, M.H.; DI FIORE, P. P.; DE CAMILLI, P. Epsin is an EH-domain-binding protein implicated in clathrin-mediated endocytosis. **Nature**, v. 394, p. 793-797, 1998.
- CHIDAMBARAM, S.; MULLERS, N.; WIEDERHOLD, K.; HAUCKE, V.; VON MOLLARD, G. F. Specific interaction between SNAREs and epsin N-terminal homology (ENTH) domains of epsin-related proteins in trans-Golgi network to endosome transport. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 4175-4179, 2004.
- CORREA, J. R.; ATELLA, G. C.; MENNA-BARRETO, R. S. SOARES, M. J. Clathrin in *Trypanosoma cruzi*: in silico gene identification, isolation, and localization of protein expression sites. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 54, p. 297-302, 2007.
- COSSON, P.; LETOURNEUR, F. Coatamer (COPI)-coated vesicles: role in intracellular transport and protein sorting. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 9, p. 484-487, 1997.
- COSTA, J.; ALMEIDA, C. E.; DOTSON, E. M.; LINS, A.; VINHAES, M.; SILVEIRA, A. C.; BEARD, C. B. The epidemiologic importance of *Triatoma brasiliensis* as a Chagas disease vector in Brazil: a revision of domiciliary captures during 1993–1999. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 4, p.443–449, jun./ago. 2003.
- COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C. Risks of endemicity, morbidity and perspectives regarding the control of Chagas disease in the Amazon Region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 145–154, 2012.
- COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 1, p. 113-122, ago./set. 2007.

- CUNHA-NETO, E.; BILATE, A. M.; HYLAND, K. V.; FONSECA, S. C.; KALIL, J.; ENGMAN, D. M. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. **Autoimmunity**, v. 39, n.1, p. 41-54, 2006.
- DE FIGUEIREDO, R. C.; SOARES, M. J. Low temperature blocks fluid-phase pinocytosis and receptor-mediated endocytosis in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, v. 86, p. 413-418, 2000.
- DE PAOLA, A. A.; GONDIN, A. A.; HARA, V.; MENDONÇA, A. Medical treatment of cardiac arrhythmias in Chagas' heart disease. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 113, p. 858–861, 1995.
- DE SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, n. 4, p. 269-285, 2002.
- DIAS, J. C.; NETO, A. V. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil. **História sobre a Doença de Chagas no Brasil**, v. 44, n. 1, p. 68-72, 2011.
- DIAS, J. C. Epidemiology of Chagas' disease. In: WENDEL, S.; BRENER, Z.; CAMARGO, M. E.; RASSI, A. **Chagas' disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2011. p. 49–80.
- DIAS, J. C. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease: A clinical epidemiological review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 22, n. 3, p. 147-156, set. 1989.
- DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. J. Free-radical metabolism of antiparasitic agents. **Federation Proceedings**, v. 45, n. 10, p. 2471–2476, set. 1986.
- DODD, R. Y. Current risk for transfusion transmitted infections. **Current Opinion in Hematology**, v. 14, p. 671-676, 2007.
- DVORAK, J. A.; HYDE, T. P. *Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells in vitro. Individual interactions at the cellular and subcellular levels. **Experimental Parasitology**, v. 34, n. 1, p.268–283, 1973.
- ECKARDT, V. F.; STENNER, F.; LIEWEN, H.; RÖDER, R.; KOOP, H.; BERNHARD, G. Autonomic dysfunction in patients with Achalasia. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 7, n. 1, p. 55-61, mar. 1995.
- FERNANDES, M. C.; ANDREWS, N. W. Host Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi*: A Unique Strategy that Promotes Persistence. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 3, p. 74-747, mai. 2013.
- FIELD, M. C.; GABERNET-CASTELLO, C.; DACKS, J. B. Reconstructing the evolution of the endocytic system: insights from genomics and molecular cell

biology. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 607, p. 84-96, 2007.

FRANK, F. M. FERNÁNDEZ, M. M.; TARANTO, N. J., CAJAL, S. P.; CASTRO, E.; THOMAZ-SOCCOL, V.; MALCHIODI, E. L. Characterization of human infection by *Leishmania* spp. in the Northwest of Argentina: immune response, double infection with *Trypanosoma cruzi* and species of *Leishmania* involved. **Parasitology**, v.126, p. 31–39, jan. 2003.

FRIAS, P. G.; PEREIRA, P. M. H.; ANDRADE, C. L. T.; SZWARCOWALD, C. L. Sistema de Informações sobre Mortalidade: estudo de caso em municípios com precariedade dos dados. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 10, p. 2257-2266, out. 2008.

GABERNET-CASTELLO, C.; DACKS, J. B.; FIELD, M. C. The single ENTH-domain protein of trypanosomes; endocytic functions and evolutionary relationship with epsin. **Traffic**, v. 10, n. 7, p. 894-911, 2009.

GORLA, D., NOIREAU, F. Geographic distribution of Triatominae vectors in America. In: TELLERIA, J.; TIBAYRENC, M. **American trypanosomiasis (Chagas disease): One hundred years of research**. 1<sup>st</sup> ed. Burlington: Elsevier Insights, 2010. p. 817-873.

GUERRI-GUTTENBERG, R. A.; GRANA, D. R.; AMBROSIO, G.; MILEI, J. Chagas cardiomyopathy: Europe is not spared! **European Heart Journal**, v. 29, n. 21, p. 2587–2591, 2008.

GUHL, F.; AUDERHEIDE, A.; RAMÍREZ, J. D. From ancient to contemporary molecular eco-epidemiology of Chagas disease in the Americas. **International Journal for Parasitology**, vol. 44, n.9, p. 605-612, ago. 2014.

GUTIEREZ, F. R. S.; GUEDES, P. M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 11, p. 673-685, nov. 2009.

HAWRYLUK, M. J.; KEYEL, P. A.; MISHRA, S. K.; WATKINS, S. C.; HEUSER, J. E.; TRAUB, L. M. Epsin 1 is a polyubiquitin-selective clathrin-associated sorting protein. **Traffic**, v. 7, p. 262-281, 2006.

HEMMIGE, V.; TANOWITZ, H.; SETHI, A. *Trypanosoma cruzi* infection: a review with emphasis on cutaneous manifestations. **International Journal on Dermatology**, v. 51, n. 5, p. 501-508, jan. 2013.

HIGUCHI, M. L.; DE MORAIS, C. F.; PEREIRA BARRETO, A. C.; LOPES, E. A.; STOLF, N.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. The role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic Chagas' disease: a study based on endomyocardial biopsies. **Clinical Cardiology**, v. 10, n. 11, p. 665–670, nov. 1987.

- HORAE, C. A. The Trypanosomes of Mammals: A Zoological Monograph. **Blackwell Scientific Publication**, Oxford, v. 17, n. 16, p. 644-722, 1972.
- JUNIOR, A. R.; RASSI, A.; REZENDE, J. M. American trypanosomiasis Chagas disease). **Infectious Diseases Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 275-291, jun. 2012.
- KALB, L. C **Clatrina em *Trypanosoma cruzi***: Identificação do gene e localização celular. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
- KALB, L. C.; FREDERICO, Y. C. A.; BATISTA, C. M.; EGER, I.; FRAGOSO, S. P.; SOARES, M. J. Clathrin expression in *Trypanosoma cruzi*. **BMC Cell Biology**, v. 15, n. 23, p. 1-11, 2014.
- KINOSHITA-YANAGA, A. T.; TOLEDO, M. J. O.; ARAÚJO, S. M.; VIER, B. P.; COMES, M. L. accidental infection by *Trypanosoma cruzi* follow-up by the polymerase chain reaction: case report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 5, p. 295-298, set./out. 2009.
- KOBERLE, F. Patología y anatomía patológica de la enfermedad de Chagas. **Boletín de la Oficina of Sanitaria Panamericana**, v. 51, p. 405-28, 1961.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LANDFEAR, S. M.; IGNATUSHCHENKO, M. The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 115, p. 1-17, 2001.
- LEE, G. J.; KIM, H.; KANG, H.; JANG, M.; LEE, D. W.; LEE, S.; HWANG, I. EpsinR2 interacts with clathrin, adaptor protein-3, AtVTI12, and phosphatidylinositol-3-phosphate. Implications for EpsinR2 function in protein trafficking in plant cells. **Plant Physiology**, v. 143, p. 1561-1575, 2007.
- LEVY, M. Z.; BARBU, C. M.; CASTILLO-NEYRA, R.; QUISPE-MACHACA, V. R.; ANCCA-JUAREZ, J.; ESCALANTE-MEJIA, P.; BORRINI-MAYORI, K.; NIEMIERKO, M.; MABUT, T. S.; BEHRMAN, J. R.; NAQUIRLA-VELARDE, C. Urbanization, land tenure security and vector-borne Chagas disease. **Proceedings of the Royal Society**, v. 281, 2014.
- LÓPEZ-ORDÓÑEZ, T.; PANZERA, F.; TUN-KU, E.; FERRANDIS, I. R.; RAMSEY, J. M. Contribuciones de la genética y la proteómica al estudio de la enfermedad de Chagas. **Salud Publica del Mexico**, v. 51, n. 3, p. 410-423, jul./mar. 2009.
- MAC CORD, J. R.; JURBERG, P.; RAYMUNDO, J. S. Técnica para a observação do comportamento do *Triatoma infestans* (Kluq, 1834) em uma miniatura de casa de pau-a-pique e sapê. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 2, p. 153-163, abr./jun. 1983.

- MADRID, S. A. M.; QUERA, P. R.; DEFILIPPI, C. C.; DEFILIPPI, G. C.; GIL, L. L. C.; SAPUNAR, P. J.; HENRÍQUEZ, D. A. Alteraciones motoras gastrointestinales en la enfermedad de Chagas, **Revista médica del Chile**, v. 132, n. 8, p. 939-946, ago. 2004.
- MADY, C.; CARDOSO, R. H.; BARRETTO, A. C.; DA LUZ, P. L.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. Survival and predictors of survival in patients with congestive heart failure due to Chagas' cardiomyopathy. **Circulation**, v. 90, p. 3098–3102, 1994.
- MALDONADO-BAEZ, L.; DORES, M. R.; PERKINS, E. M.; DRIVAS, T. G.; HICKE, L.; WENDLAND, B. Interaction between Epsin/Yap180 adaptors and the scaffolds Ede1/Pan1 is required for endocytosis. **Molecular Biology of the Cell**, v. 19, p. 2936-2948, 2008.
- MANOEL-CAETANO, F. S.; SILVA, A. E. Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas disease. **Cadernos de Saude Publica**, v. 23, p. 2263–2274, 2007.
- MARIN-NETO, J. A.; CUNHA-NETO, E.; MACIEL, B. C.; SIMÕES, M. V. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 109-1123, mar./mai. 2007.
- MARTINS-MELO, F. R.; ALENCAR, C. H.; RAMOS, A. N. JR; HEUKELBACH, J. Epidemiology of mortality related to Chagas' disease in Brazil, 1999–2007. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. e1508, 2012.
- MAZZA, S.; MONTAÑA, A.; BENITEZ, C.; JANZI, E. C. Transmisión de *Schizotrypanum cruzi* al niño por leche de la madre con enfermedad de Chagas. **Misión de Estudios Patología Regional Argentina**, v. 28, p. 41-46, 1936.
- MENEGHELLI, U. G.; DE GODOY, R. A.; MACEDO, J. F.; Basal motility of dilated and non-dilated sigmoid colon and rectum in Chagas' disease. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 19, n. 3, p. 127-132, jul./set. 1982.
- MILDER, R.; DEANE, M. P. The cytostome of *Trypanosoma cruzi* and *T. conorhini*. **Journal of Protozoology**, v. 16, n. 4, p. 730-737, nov. 1969.
- MILLS, I. G.; PRAEFCKE, G. J.; VALLIS, Y.; PETER, B. J.; OLESEN, L. E.; GALLOP, J. L.; BUTLER, P. J.; EVANS, P. R.; MCMAHON, H. T. EpsinR: an AP1/clathrin interacting protein involved in vesicle trafficking. **Journal of Cell Biology**, v. 160, p. 213-222, 2003.
- Ministério da Saúde. Brazilian consensus on Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 38, n. 3, p. 7–29, 2005.

- MONCAYO, A. Chagas Disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the southern cone countries. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 5, p. 557-591, jul. 2003.
- MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 17-30, 2009.
- MORGAN, G. W.; HALL, B. S.; DENNY, P. W.; FIELD, M. C; CARRINGTON, M. The endocytic apparatus of the kinetoplastida. Part II: machinery and components of the system. **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 540-546, 2002.
- MOROÇOIMA, A.; SOCORRO, G.; AVILA, R.; HERNÁNDEZ, A.; MERCHÁN, S.; ORTIZ, D.; PRIMAVERA, G.; CHIQUÉ, J.; HERRERA, L.; URDANETA-MORALES, S. *Trypanosoma cruzi*: experimental parasitism in the central nervous system of albino mice. **Parasitology Research**, v. 111, n. 5, p. 2099–2107, ago. 2012.
- MORTARA, R. A.; ANDREOLI, W. K.; TANIWAKI, N. N.; FERNANDES, A. B.; SILVA, C. V.; FERNANDES, M. C. C. D.; L'ABBATE, C.; SILVA, S. Mammalian cell invasion and intracellular trafficking by *Trypanosoma cruzi* infective forms. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 1, p. 77-94, fev. 2005.
- MUNOZ, J.; GOMEZ I PRAT, J.; GALLEGO, M.; GIMENO, F.; TREVINO, B.; LOPEZ-CHEJADE, P.; RIBERA, O.; MOLINA, L.; SANZ, S.; PINAZO, M. J.; RIERA, C.; POSADA, E. J.; SANZ, G.; PORTUS, M.; GASCON, J. Clinical profile of *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic setting: immigration and Chagas disease in Barcelona (Spain). **Acta Tropica**, v. 111, p. 51-5, 2009.
- MUNOZ, J.; PORTUS, M.; CORACHAN, M.; FUMADO, V.; GASCON, J. Congenital *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic area. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, p. 1161-2, 2007.
- MUÑOZ-SARAIVA, S. G.; HABERLAND, A.; WALLUKAT, G.; SCHIMKE, I. Chronic Chagas' heart disease: a disease on its way to becoming a worldwide health problem: epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine. **Heart Failure Reviews**, v. 17, n. 1, p. 45-64, jan. 2012.
- NORMAN, F. F.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Chagas disease and breast-feeding. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 10, p. 1561-1566, out. 2013.
- NUNES, M. C. P.; DONES, W.; MORILLO, C. A.; ENCINA, J. J.; RIBEIRO, A.L. Chagas Disease: an overview of clinical and epidemiological aspects.

- Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 9, p. 767-776, jul./ago. 2013.
- OKUDA, K.; ESTEVA, M.; SEGURA, E. L.; BIJOSY, A. T. The cytostome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes is associated with the flagellar complex. **Experiental parasitology**, v. 92, p. 223-231, 1999.
- OLIVEIRA, I.; TORRICO, F.; MUÑOZ, J.; GASCON, J. Congenital transmission of Chagas disease: a clinical approach. **Expert Review of Anti Infective Therapy**, v. 8, p. 945–56, 2010.
- OLIVEIRA, R. B.; REZENDE FILHO, J.; DANTAS, R.O.; IAZIGI, N. The spectrum of esophageal motor disorders in Chagas disease. **American Journal of Gastroenterology**, v. 90, n. 7, p. 1119-1124, jul. 1995.
- OVERATH, P.; STIERHOF, Y. D.; WIESE, M. Endocytosis and secretion in trypanosomatid parasites tumultuous traffic in a pocket. **Trends in Cell Biology**, v. 7, p. 27-33, 1997.
- PEREZ, A. A.; RIBEIRO, A. L. P.; BARROS, M. V. L.; SOUSA, M. R.; BITTENCOURT, R. J.; MACHADO, F. S.; ROCHA, M. O. C. Value of the radiological study of the thorax for diagnosing left ventricular dysfunction in Chagas' disease. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, Belo Horizonte, v. 80, n. 2, p. 208–213, 2003.
- PEREZ, J. C.; LYMBERY, A. J.; THOMPSON, A. Chagas disease: the challenge of polyparasitism? **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 4, abr. 2014.
- PETHERICK, A. Country by country. **Nature**, v. 465, p. S10–S11, 2010.
- PINTO, P. L. S.; AMATO NETO, V.; NASCIMENTO, S. A. B.; SOUZA, H. B. W. T.; MIYAMOTO, A.; MOREIRA, A. A. B.; BRAZ, L. M. A. Observações sobre a viabilidade de *Trypanosoma cruzi* no caldo de cana. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 32, n. 5, p. 325-327, set./out. 1990.
- PORTO-CARREIRO, I.; ATTIAS, M.; MIRANDA, K.; DE SOUZA, W.; CUNHA-E-SILVA, N. *Trypanosoma cruzi* epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes. **European Journal of Cell Biology**, v.79, n. 11, p. 858-869, nov. 2000.
- PONUKOLLU, G.; GOWDA, R. M.; KHAN, I. A.; NAVARRO, V. S.; VASAVADA, B. C. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. **International Journal of Cardiology**, v. 115, n. 3, p. 279-283, 2007.
- RAMOS, T. C.; FREYMULLER-HAAPALAINEN, E.; SCHENKMAN, S. Three-dimensional reconstruction of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes and organelle distribution along the cell division cycle. **Cytometry A**, v. 79, n. 7, p. 583-544, jul./mai. 2011.

- RASSI, A. Jr; RASSI, A.; RASSI, S. G. Predictors of mortality in chronic Chagas disease: a systematic review of observational studies. **Circulation**, v. 115, p. 1101–1108, 2007.
- RASSI, A. Jr; RASSI, S. G.; RASSI, A. Morte súbita na Doença de Chagas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, Goiânia, v. 76, n. 1, p. 75-85, jan./abr. 2001.
- REPASS, S. L.; BRADY, R. J.; O'HALLORAN, T. J. *Dictyostelium* Hip1r contributes to spore shape and requires epsin for phosphorylation and localization. **Journal of Cell Sciences**, v. 120, p. 3977-3988, 2007.
- REZENDE, J. M.; ROSA, H.; VAZ, M. J. M. Endoscopia no megaesofago: estudo prospectivo de 600 casos. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 22, n. 2, p. 53-62, abr./jun. 1985.
- RIBEIRO, A. L.; GIMENEZ, L. E.; HERNANDEZ, C.C.; de CARVALHO, A. C.; TEIXEIRA, M. M.; GUEDES, V. C.; BARROS, M. V.; LOMBARDI, F. ROCHA, M. O. Early occurrence of anti-muscarinic autoantibodies and abnormal vagal modulation in Chagas disease. **International Journal of Cardiology**, v. 117, n. 1, p. 59-63, abr./jul. 2007.
- RIBEIRO, A. L.; NUNES, M. P.; TEIXEIRA, M. M.; ROCHA, M. O. C. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. **Nature Reviews Cardiology**, v. 9, p. 576-589, jul. 2012.
- RIBEIRO, A. L.; ROCHA, M. O. Indeterminate form of Chagas disease: considerations about diagnosis and prognosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 31, p. 301–314, 1998.
- ROCHA, M. O.; RIBEIRO, A. L.; TEIXEIRA, M. M. Clinical management of chronic Chagas cardiomyopathy. **Frontiers in Bioscience**, v. 8, n. e44–e54, jan. 2003.
- RODRIGUES, J. C. F.; GODINHO, J. L. P.; SOUZA, W. Biology of human pathogenic Trypanosomatids: epidemiology, lifecycle and ultrastructure. In: SANTOS, A. L. S.; BRANQUINHA, M. H.; d'ÁVILA-LEVY, C. M.; KNEIPP, L. F.; SODRÉ, C. L. **Proteins and Proteomics of Leishmania and Trypanosoma**. Mainz: Subcellular Biochemistry, 2014. p. 1-42.
- RODRIGUES, J. R. A.; SILVA-JUNIOR, J. L. R.; PAREDES, A. O.; REIS, A. S.; SILVA, L. A. C. Doença de Chagas aguda no estado do Maranhão, Brasil: uma comparação entre os bancos de dados do SINAN e da FUNASA. **Journal Management and Primary Health Care**, v. 4, n. 1, p. -9, fev./mar. 2013.
- ROSSI, M. A.; GONCALVES, S.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. Experimental *Trypanosoma cruzi* cardiomyopathy in BALB/c mice. The potential role of

- intravascular platelet aggregation in its genesis. **American Journal of Pathology**, v. 114, n. 2, p. 209-216, 1984.
- ROSSI, M. A.; RAMOS, S. G.; BESTETTI, R. B. Chaga's heart disease: clinical-pathological correlation. **Frontiers in Bioscience**, v. 8, p. 94-109, jan. 2003.
- ROTH, M. G. Integrating actin assembly and endocytosis. **Developmental Cell**, v. 13, p. 3-4, 2007.
- SAINT-POL, A.; YELAMOS, B.; AMESSOU, M.; MILLS, I. G.; DUGAST, M.; TENZA, D.; SCHU, P.; ANTONY, C.; MCMAHON, H. T.; LAMAZE, C.; JOHANNES, L. Clathrin adaptor epsinR is required for retrograde sorting on early endosomal membranes. **Developmental Cell**, v. 6, p. 525-538, 2004.
- SAMAJ, J.; BALUSKA, F.; VOIGT, B.; SCHLICHT, M. ; VOLKMAN, D. ; MENZEL, D. Endocytosis, Actin Cytoskeleton, and Signaling. **Plant Physiology**, v. 135, p. 1150-161, jul. 2004.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: A laboratory manual. **Cold Spring Harbor**, New York, 1989.
- SANT'ANNA, C.; DE SOUZA, W.; CUNHA-E-SILVA, N. Biogenesis of the reservosomes of *Trypanosoma cruzi*. **Microscopy and Microanalysis**, v. 10, p. 637-646, 2004.
- SCHEKMAN, R.; ORCI, L. Coat protein and vesicle budding. **Science**, v. 271, p. 1526-1533, 1996.
- SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non endemic countries: the role of international migration. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 1, p.75–85, 2007.
- SCHOFIELD, C. J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. The future of Chagas Disease control. **TRENDS in Parasitology**, v. 22, n. 12, 2006.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of Chagas disease. **Clinical of Infectious Diseases**, v. 54, p. 845–852, 2012.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A.; LOPES, M. H.; TOLEZANO, J.E.; UMEZAWA, E.; AMATO NETO, V.; BARRETO, A. C.; HIGAKI, Y.; MOREIRA, A. A.; FUNAYAMA, G.; BARONE, A. A. Acute Chagas' disease: transmission routes, clinical aspects and response to specific therapy in diagnosed cases in an urban centre. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, Sao Paulo, v. 32, n.1, p. 16-27, jan./fev. 1990.
- SILVEIRA, A. C. Current situation with the control of vector-borne Chagas disease transmission in the Americas. **Atlas of Chagas disease vector in the Americas**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 1, p. 1161-1181, 1999.

- SILVEIRA, A. Factores de riesgo implicados en la transmisión oral de la enfermedad de Chagas. In: **Informe Final Consulta Técnica e Epidemiología, Prevención y Manejo de la Transmisión de la Enfermedad de Chagas como Enfermedad Transmitida por Alimentos (ETA)**. Rio de Janeiro: Unidad de Salud Pública Veterinaria, mai. 2006. p. 16-9.
- SILVERSTEIN, S. C.; STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. Endocytosis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 46, p. 669-722, 1977.
- SOARES, M. J.; DE SOUZA, W. Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, v. 77, p. 461-468, 1991.
- SONG, J.; LEE, M. H.; LEE, G. J.; YOO, C. M.; HWANG, I. Arabidopsis EPSIN1 plays an important role in vacuolar trafficking of soluble cargo proteins in plant cells via interactions with clathrin, AP-1, VT111, and VSR1. **Plant Cell**, v. 18, p. 2258-2274, 2006.
- SOUZA, M. A. Morphobiological Characterization of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 and its Distinction from other Trypanosomes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 1, 205-210, jun./ago. 1999.
- STRASEN, J.; WILLIAMS, T.; ERTL, G.; ZOLLER, T.; STICH, A.; RITTER, O. Epidemiology of Chagas disease in Europe: many calculations, little knowledge. **Clinical Research Cardiology**, v. 103, p. 1-10, jul./ago. 2014
- TAFURI, W. L. Pathogenesis of Chagas' disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 194-199, jul./ago. 1987.
- TEIXEIRA, A. L.; NITZ, N.; GUIMARO, M. C.; GOMES, C.; SANTOS-BUCH, C. A. Chagas disease. **Postgraduate Medical Journal**, v. 82, n. 974, p. 788-798, dez. 2006.
- TOSO, M. A.; VIAL, U. F.; FELIPE y GALANTE, N. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. **Revista de medicina del Chile**, vol. 139, n. 2, p. 258-266, fev. 2011.
- TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 76, p. 4350-4. 1979.
- TRONCON, L. E. A.; IAZIGI, N. Scintigraphic study of the gastrointestinal transit of liquid meal in patients with chronic Chagas disease. **Brazilian Journal of Medicine and Biology Research**, v. 25, n. 2, p. 145-148, 1992.
- TRONCON, L. E.; OLIVEIRA, R. B.; ROMANELLO, L. M.; ROSA-E-SILVA, L.; PINTO, M. C.; IAZIGI, N. Abnormal progression of a liquid meal through the stomach and small intestine in patients with Chagas disease. **Digestive Diseases and Science**, v. 38, n. 8, p. 1511-1517, ago. 1993.

- TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 5-6, p. 472-481, out./jan. 2001.
- VATARUNAKAMURA, C.; UEDA-NAKAMURA, T.; DE SOUZA, W. Visualization of the cytostome in *Trypanosoma cruzi* by high resolution field emission scanning electron microscopy using secondary and backscattered electron imaging. **FEMS Microbiology Letters**, v. 242, p. 227-230, 2005.
- VINHAES, M. C.; DIAS, J. C. P. Doença de Chagas no Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 2, p. 7-12, 2000.
- WEBSTER, P.; RUSSEL, D. G. The flagellar pocket of trypanosomatids. **Parasitology Today**, v. 9, p. 201-206, 1993.
- WENDLAND, B.; STEECE, K. E.; EMR, S. D. Yeast epsins contain an essential N-terminal ENTH domain, bind clathrin and are required for endocytosis. **EMBO Journal**, v. 18, p. 4383-4393, 1999.
- WESTPHALEN, E. V. N.; BISUGO, M. C.; ARAÚJO, M. F. L. Aspectos epidemiológicos e históricos do controle da doença de Chagas no Continente Americano. **BEPA**, São Paulo, v. 9, n. 105, p. 18-35, set. 2012.
- WHO, 2007. World Health Organization Global health atlas. Disponível em: <<http://www.who.int/globalatlas/>>. Acesso: 10/11/2014.
- WHO, 2010. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. First WHO report on neglected tropical diseases. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090>. Acesso em 10/11/2014.
- YOSHIDA, N. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: How the interplay between parasite and host components modulates infectivity. **Parasitology Institute**, v. 57, p. 105-109, 2008.

## ANEXO I



## ANEXO II



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e  
Laboratórios de ReferênciaComissão de Ética  
no Uso de Animais

## LICENÇA

LW-15/13

Certificamos que o protocolo (P-47/12-3), intitulado "Caracterização de proteínas de tripanossomatídeos", sob a responsabilidade de DANIELA PARADA PAVONI, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 11/03/2017 e inclui o uso total de :

***Mus musculus***

- 200 Machos de BALB/c, Idade: 45 Dia(s), Peso: 20,0000 Grama(s).
- 200 Fêmeas de BALB/c, Idade: 45 Dia(s).

***Mus musculus***

- 600 Machos de Swiss Webster, Idade: 45 Dia(s), Peso: 20,0000 Grama(s).
- 600 Fêmeas de Swiss Webster, Idade: 45 Dia(s), Peso: 20,0000 Grama(s).

Rio de Janeiro, 11 de março de 2013

Octavio Augusto França Presgrave  
Coordenador da CEUA