

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RODRIGO JAHN SOARES

**CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE ANTICORPO
RECOMBINANTE ANTI-GP35/50 DE *Trypanosoma cruzi***



CURITIBA

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

**CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE ANTICORPO
RECOMBINANTE ANTI-GP35/50 DE *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Área de Concentração em Biologia Molecular, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Wanderson Duarte da Rocha

Co-orientadora. Profa. Dra. Larissa Magalhães Alvarenga

CURITIBA

2014

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Soares, Rodrigo Jahn

Clonagem e caracterização funcional de anticorpo recombinante anti-GP35/5D de *Trypanosoma cruzi*. / Rodrigo Jahn Soares. – Curitiba, 2014. 82 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Wanderson Duarte da Rocha

Co-orientadora: Larissa Magalhães Alvarenga

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. *Trypanosoma cruzi* 2. Clonagem 3. Anticorpos I. Título II. Rocha, Wanderson Duarte da III. Alvarenga, Larissa Magalhães IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 616.9363



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

**“CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE ANTICORPO
RECOMBINANTE ANTI-GP35/50 DE *TRYPANOSOMA CRUZI*”**

Por

RODRIGO JAHN SOARES

**Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos
professores:**

Prof. Dr. Wanderson Duarte da Rocha (presidente)

Dr. Stenio Perdigão Fragoso

Dr. Marcel Ivan Ramirez Araya

Curitiba, 14 de maio de 2014.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Marlise e Eduardo, que desde o dia em que nasci batalharam arduamente para me dar condições de chegar onde estou. Pelo amor e carinho que fizeram de mim uma pessoa de bem e me ensinaram a importância de perseguir um objetivo mesmo que o caminho seja árduo. À minha irmã Camila que mesmo tão distante fisicamente se faz presente na minha vida com palavras de carinho, amor e sabedoria.

Aos meus orientadores Wanderson Duarte da Rocha e Larissa Magalhães Alvarenga, por abrir as portas de seus laboratórios e permitir o desenvolvimento deste trabalho, sempre dispostos e dedicados a me ensinar e orientar.

À Dra. Nobuko Yoshida e seu aluno Cristian Plaza por me receber em seu laboratório e contribuir nas primeiras etapas do projeto.

Ao Dr. Philippe Billiald por compartilhar seu conhecimento e experiência, fundamentais para a realização deste trabalho.

À Juliana Ferreira de Moura pela colaboração na execução deste projeto.

Aos meus colegas de laboratório, Monica, Normanda, Letícia, Laiane e Geison, pelas discussões, ideias, ajudas e convívio diário nesses últimos quatro anos, sem os quais este trabalho jamais seria concluído com sucesso.

Ao Grupo de Fixação Biológica de Nitrogênio e aos colegas do Laboratório de Imunoquímica por toda a ajuda e atenção.

À CAPES, Fundação Araucária e UFPR pelo apoio financeiro e estrutural.

E ao departamento de Patologia Básica e ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

“A universe without purpose should neither depress us nor suggest that our lives are purposeless. Through an awe-inspiring cosmic history we find ourselves on this remote planet in a remote corner of the universe, endowed with intelligence and self-awareness. We should not despair, but should humbly rejoice in making the most of these gifts, and celebrate our brief moment in the sun.”

— Lawrence M. Krauss

RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, é uma doença parasitária que afeta em torno de 12 a 14 milhões de indivíduos, causando um importante impacto econômico. Uma vez que as formas de tratamento disponíveis apresentam eficiência questionáveis e sérios efeitos colaterais, a busca de formas alternativas à terapêutica atual se faz necessária. A melhoria na “entrega” de fármacos pode ser uma estratégia interessante para redução dos efeitos colaterais dos tratamentos utilizados. Além disso, os fármacos ideais são aqueles que interferem em mecanismos específicos do parasito, que são essenciais para sua sobrevivência no hospedeiro mamífero. Nesse sentido, foi demonstrado previamente que as mucinas denominadas gp35/50 participam no processo de adesão e invasão celular possibilitando o estabelecimento da infecção, tornando-se candidatos interessantes para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas no tratamento desta parasitose. Adicionalmente, anticorpos monoclonais anti-gp35/50 (mAb-10D8) são capazes de interferir com o mecanismo de virulência de formas tripomastigotas metacíclicas. Conciliando todas as características, decidimos obter anticorpo recombinante anti-gp35/50 (scFv-10D8) para fins terapêuticos, uma vez que estas moléculas são específicas e tem sido utilizadas com sucesso em outras patologias. Desta forma, a tecnologia de anticorpos recombinantes a partir RNA total de hibridoma (mAb-10D8) foi utilizada aqui para obtenção das regiões variáveis das cadeias leves e pesada de mAb-10D8 por RT-PCR utilizando iniciadores específicos. Os fragmentos obtidos foram sequenciados e utilizados para síntese de um gene sintético de scFv (scFv-10D8) otimizado para expressão em *E. coli*. O gene de scFv-10D8 foi subclonado em vetor de expressão procariótico fusionado à cauda de histidinas (pET22b). Após otimização das condições de indução e enriquecimento de uma fração contendo scFv-10D8, foi demonstrado que a proteína recombinante é capaz de reconhecer as mesmas proteínas identificadas pelo mAb-10D8. Diante destes resultados, especula-se que esse anticorpo recombinante anti-gp35/50 de *T. cruzi* manterá as mesmas propriedades descritas para o mAb-10D8 e seu fragmento Fab na redução da virulência. Sendo assim, é provável que o scFv-10D8 poderá ser utilizado sozinho ou associado a outras moléculas tóxicas ao parasito.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, scFv-10D8, gp35/50, anticorpos recombinantes.

ABSTRACT

Chagas disease is a parasitic disease caused by *Trypanosoma cruzi*, and affects approximately 10 million individuals causing a major economic impact. Since the available therapeutic approaches have questionable effectiveness and serious side effects, the search for alternatives to the current therapeutic strategies is required. The improvement on drug delivery can reduce the side effects caused by the treatment. Moreover, the ideal drugs are the ones that interfere with specific mechanisms from the parasite that is essential for its survival in the mammalian host. Thus, it was previously shown that the mucins called gp35/50 are involved in cell adhesion and invasion processes enabling the establishment of infection and become interesting candidates for the development of new chemotherapeutic agents. Additionally, it was published that anti-gp35/50 monoclonal antibodies (mAb-10D8) are capable of interfering with the virulence mechanisms of trypomastigotes. Combining all the features we decided to obtain anti-gp35/50 recombinant antibody (scFv-10D8) for therapeutic purposes, since these molecules are specific and have been successfully used in other pathologies. Here, the technology of recombinant antibodies was used to obtain the regions encoding the variable light and heavy chains of mAb-10D8 by RT-PCR using specific primers and total RNA from hybridoma cells. The fragments were sequenced and used for the synthesis of a synthetic gene of scFv (scFv-10D8) optimized for *E. coli* expression. The scFv-10D8 gene was subcloned fused to a histidine tag into a prokaryotic expression system (pET22b). After testing some induction conditions and enriching a fraction containing scFv-10D8, it was demonstrated that the recombinant antibody is able to recognize in the same fashion as mAb-10D8 the parasite protein. These results encourage us to speculate that this scFv anti-*T. cruzi* gp35/50 can be used in a new therapeutic strategy for Chagas disease, since it may retain the features previously described for mAb-10D8 and its Fab fragment. Thus, scFv-10D8 may be used alone or conjugated to a known drug against *T. cruzi*.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, scFv-10D8, Recombinant antibodies, gp35/50

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
FIGURA 2: Domínios componentes da estrutura de um anticorpo e seus fragmentos.	28
FIGURA 3: Fluxograma representando o processo passo a passo que conduz à expressão e purificação de moléculas de fragmentos de anticorpos a partir de linhagens celulares de hibridoma.	31
FIGURA 4: Modelo ilustrativo do plasmídeo pGEM-T Easy.	35
FIGURA 5: Modelo ilustrativo do plasmídeo Puc57-scFv-10D8.	36
FIGURA 6: Modelo ilustrativo do plasmídeo pET22b(+).	37
FIGURA 7: Modelo ilustrativo do plasmídeo utilizado na expressão do scFv-10D8. .	38
FIGURA 8: Modelo ilustrativo do plasmídeo utilizado para a geração de parasitos fluorescentes.	39
FIGURA 9: Reatividade de mAb-10D8 em extratos de <i>T. cruzi</i> em ensaios de <i>Western blotting</i>	53
FIGURA 10: Extração de RNA e amplificação das regiões variáveis leve e pesada de mAb-10D8.	54
FIGURA 11: Esquema dos anticorpos recombinantes em diferentes configurações.	56
FIGURA 12: Confirmação de clones transformados com o vetor contendo o scFv- 10D8.	56
FIGURA 13: Representação bidimensional no formato colar de pérolas IMGT do gene do scFv-10D8 destacando as regiões hipervariáveis (CDRs) de cada cadeia. .	58
FIGURA 14: Estrutura tridimensional do scFv-108.	59
FIGURA 15: Subclonagem de scFv-10D8 em pET22b.	60
FIGURA 16: Efeito da composição do meio de cultura na taxa de expressão de scFv- 10D8 no periplasma.	61
FIGURA 17: Efeito do tempo de indução na taxa de expressão de scFv-10D8 no periplasma.	62
FIGURA 18: Comparação da reatividade do anticorpo recombinante scFv-10D8 e mAb-10D8.	63
FIGURA 19: Estruturas dos carboidratos utilizados nos experimentos <i>in silico</i> de acoplamento.	65

FIGURA 20: Provável sítio de interação entre o scFv-10D8 e a β -D-galactofuranose(1-4)n-acetilglucosamina.....	66
FIGURA 21: Padrão de fluorescência dos parasitos carregando pTREXn-RFP Neo.	68

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Iniciadores utilizados para amplificar e sequenciar as cadeias variáveis leve e pesada do anticorpo monoclonal 10D8.....	41
TABELA 2: Energias de acoplamento <i>in silico</i> entre moléculas glicídicas e scFv-10D8.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

- Amp – Ampicilina
- cDNA – DNA complementar
- DEPC – Dietilpirocarbonato
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- dNTP Desoxirribonucleosídeo trifosfato
- DTT – Ditioneitol
- EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- Fab – Fragment antigen binding ou fragmentos ligadores de antígeno
- FACS – do inglês, *Fluorescence-Activated Cell Sorting*
- Fv – Fragment variable ou fragmento variável
- g – Força-g
- GFP – *Green Fluorescent Protein* - Proteína Fluorescente Verde
- GIPLs – Glicoinositolfosfolípidios
- GPI – Glicosilfosfatidilinositol
- HeLa – Linhagem celular humana, sua nomenclatura é proveniente do nome de Henrietta Lacks
- kDa – Kilo Daltons
- LA – Meio de cultura Luria Bertani acrescido de ágar
- LB – Meio de cultivo Luria Bertani
- LIT – Meio de cultura infuso de fígado triptose
- mAb – Anticorpo monoclonal
- ORF – *Open Reading Frame* - Fase de leitura de uma molécula de RNA
- PBS – Tampão fosfato-salina
- PCR – Reação em cadeia da polimerase
- RFP – *Red Fluorescent Protein* - Proteína Fluorescente Vermelha
- RNA – Ácido ribonucleico
- RPM – Rotações por minuto
- scFv – *Single chain fragment variable* - anticorpo de cadeia única
- SDS – Dodecil sulfato de sódio
- SFB – Soro fetal bovino

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1.	Tripanossomíase americana e seu agente etiológico	16
2.2.	Biologia do <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
2.3.	Aspectos relacionados à interação parasito-hospedeiro	20
2.4.	Tecnologia de anticorpos recombinantes	26
3.	JUSTIFICATIVA	32
4.	OBJETIVOS	33
4.1.	Geral	33
4.2.	Específicos	33
5.	MATERIAL E MÉTODOS	34
5.1.	Estirpes bacterianas utilizadas	34
5.2.	Condições de cultivo bacteriano	34
5.3.	Plasmídeos utilizados	35
5.3.1.	pGEM-T easy	35
5.3.2.	pUC57-scFv-10D8	36
5.3.3.	pET22B(+)	37
5.3.4.	pET22b-scFv-10D8	38
5.3.5.	pTREX RFP	39
5.4.	Hibridoma 10D8	40
5.5.	Extração de RNA do hibridoma 10D8	40
5.6.	Síntese do cDNA a partir do RNA total do hibridoma 10D8	41
5.7.	Amplificação dos genes da cadeia variável leve e pesada do anticorpo monoclonal 10D8	41
5.8.	Sequenciamento dos genes da cadeia variável leve e pesada do anticorpo monoclonal 10D8	42
5.9.	Planejamento e síntese do scFv-10D8	42
5.10.	Representação bidimensional e predição da estrutura tridimensional do sítio de ligação ao antígeno do anticorpo monoclonal 10D8	43
5.11.	Ensaio de restrição enzimática do DNA	44
5.12.	Eletroforese em gel de agarose	44

5.13.	Purificação de fragmentos de DNA a partir de gel de agarose.....	44
5.14.	Ligação de fragmentos de DNA.....	44
5.15.	Preparação de células de <i>E. coli</i> competentes e transformação	45
5.16.	Obtenção de DNA plasmidial.....	45
5.17.	Expressão do scFv-10D8	46
5.18.	Extração do conteúdo periplasmático e citoplasmático de bactérias que expressam o scFv-10D8.....	47
5.19.	Separação de proteínas por peso molecular por SDS-PAGE e coloração de gel.....	47
5.20.	<i>Western blotting</i> do perfil de expressão do scFv-10D8 e reatividade do scFv-10D8 com extratos proteicos totais de parasitos	48
5.21.	Cepas e clones de parasitos utilizados.....	49
5.22.	Cultivo de parasitos	49
5.23.	Transfecção de pTREXn-RFP e clonagem de <i>T. cruzi</i>	50
5.24.	Análise de fluorescência por citometria de fluxo e microscopia.....	51
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
6.1.	Confirmação da reatividade do anticorpo monoclonal 10D8	52
6.2.	Obtenção dos fragmentos correspondentes as regiões variáveis dos genes que codificam as cadeias leve e pesada de mAb-10D8.....	53
6.3.	Sequenciamento dos fragmentos de cadeia leve e pesada do mAb-10D8 e síntese do scFv-10D8.....	55
6.4.	Análise da sequência deduzida do scFv-10D8.....	57
6.5.	Subclonagem do gene do scFv-10D8 e expressão em vetor pET22b.....	59
6.6.	Identificação do provável sítio de ligação de scFv-10D8 e gp35/50	64
6.7.	Obtenção de parasitos fluorescentes para avaliação do reconhecimento e bloqueio da infecção por scFv-10D8	67
7.	CONCLUSÕES	69
8.	PERSPECTIVAS	70
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1. INTRODUÇÃO

A tripanossomíase americana, ou mal de Chagas, é uma doença parasitária causada pelo *Trypanosoma cruzi*, um protozoário hemoflagelado da família Trypanosomatidae pertencente à ordem Kinetoplastida. A doença humana resulta da interferência pelo homem nos ecótopos naturais e estabelecimento do inseto triatomíneo, vetor da doença, nas habitações humanas. A forma clássica de transmissão ocorre pelo contato dos dejetos infectados com a conjuntiva, mucosas ou lesões na pele, inclusive o local de picada do inseto.

A doença de Chagas é endêmica nos países da América latina, onde se estima que existam entre 12 e 14 milhões de pessoas infectadas, com mais de 60 milhões sob risco de infecção em cerca de 18 países. Em média, cada pessoa portadora da Doença de Chagas custa 4.660 dólares por ano ao sistema de saúde, resultando num custo global de \$7.19 bilhões de dólares ao ano.

O curso natural da doença de Chagas é variável, com sintomas que se estendem entre infecção assintomática a anomalias severas do coração e do trato digestório. As atuais quimioterapias para tratamento da infecção por *T. cruzi*, assim como as drogas atualmente em pesquisa e desenvolvimento, tem eficiência questionáveis. Além disso, as duas drogas disponíveis comercialmente, benzonidazol (Roche Pharmaceuticals) e nirfutimox (Bayer HealthCare), apresentam efeitos colaterais severos, requerem longos períodos de tratamento, apresentam eficácia variável, sendo mais eficientes na fase aguda ou no início da fase crônica quando desaparecem os sintomas apresentados na fase aguda, acompanhado de uma drástica redução na parasitemia.

Agravando este quadro, existem vários trabalhos reportando a existência de parasitos resistentes às drogas usadas no tratamento da doença de Chagas, reforçando ainda mais a necessidade de geração de formas mais eficientes de tratamento. O desenvolvimento de sistemas que permitam uma “entrega” mais eficiente de drogas poderá melhorar a terapia, além de minimizar efeitos colaterais associados ao tratamento. Sendo assim a obtenção de anticorpos monoclonais com capacidade de reconhecimento de formas infectantes (extracelulares) deste parasito, bem como, a construção de anticorpos recombinantes associados ou em fusão a moléculas tóxicas, gerando as *magic bullets*, constituem uma excelente alternativa,

que é pouco explorada no tratamento de doenças negligenciadas incluindo a doença de Chagas.

Neste contexto, existe uma série de anticorpos monoclonais (mAb) gerados contra moléculas de superfície de formas infectantes de *T. cruzi* previamente caracterizados. Dentre estes anticorpos, destaca-se o mAb-10D8, que reconhece proteínas do tipo mucina chamadas gp35/50, glicoproteína de superfície rica em treoninas e ancoradas à membrana por glicofostatidilinositol (GPI). O tratamento com mAb-10D8 reduz a infectividade em camundongos por formas tripomastigotas pré-tratadas com mAb-10D8 ou fragmentos Fab de mAb-10D8, sugerindo que o tratamento com anticorpo monoclonal por si só pode reduzir o desempenho do parasito durante a infecção aguda.

Recentemente nosso grupo de pesquisa em colaboração com os grupos de pesquisa da Profa. Dra. Nobuko Yoshida, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), iniciou os trabalhos de clonagem, expressão e caracterização funcional de anticorpos recombinantes anti-*T. cruzi* a partir de hibridomas previamente caracterizados. Tais anticorpos tem potencial biotecnológico para desenvolvimento de tratamentos alternativos para a doença de Chagas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Tripanossomíase americana e seu agente etiológico

A tripanossomíase americana, ou mal de Chagas, é uma doença parasitária causada pelo *Trypanosoma cruzi*, um protozoário hemoflagelado da família *Trypanosomatidae* pertencente à ordem Kinetoplastida. O nome popular da doença deriva do médico brasileiro Carlos Chagas, que, em 1909, descobriu simultaneamente o parasito, o vetor e a doença que ele causa nos humanos (CHAGAS, 1909). A doença de chagas é uma zoonose sendo os reservatórios naturais do *T. cruzi* mamíferos placentários e marsupiais característicos do continente sul americano e o protozoário transmitido entre eles por insetos triatomíneos hematófagos. A doença humana resulta da invasão pelo homem desses ecótopos naturais e estabelecimento do inseto vetor nas habitações humanas. A forma clássica de transmissão ocorre pelo contato de dejetos do inseto infectados com a conjuntiva, mucosas ou lesões na pele, inclusive o local de picada do inseto (REY, 2008; URBINA, 2009; HOTEZ *et al.*, 2006). Além da forma descrita por Chagas, a transmissão também pode ocorrer de forma alternativa por transfusão de sangue contaminado, congenitamente e pela ingestão de alimentos contaminados (TARLETON, 2007; HOTEZ *et al.*, 2006).

A tripanossomíase americana é endêmica nos países da América Latina, onde se estima que existam entre 12 e 14 milhões de pessoas infectadas, com mais de 60 milhões sob risco de infecção em cerca de 18 países (DIAZ, 2007). Nos últimos 15 anos, a intensa migração internacional, combinada com as formas alternativas de transmissão, levou à difusão da doença para regiões não endêmicas, incluídos os Estados Unidos da América e o oeste europeu (BERN *et al.*, 2007; DIAZ, 2007; GASCON *et al.*, 2007; PIRON *et al.*, 2008).

Considerando a redução da capacidade laboral, estima-se que em média uma pessoa portadora da doença de Chagas incorra num custo econômico de 4,660 dólares anualmente e 27,684 ao longo de sua vida. Os custos globais são de aproximadamente 7,19 bilhões por ano e 188,80 bilhões ao longo da vida dos portadores da doença. O impacto econômico da doença de Chagas é similar ao de doenças como câncer cervical e rotavírus, sugerindo um argumento econômico para atrair mais atenção e esforços para o controle desta patologia (LEE *et al.*, 2013).

O curso natural da doença de Chagas é variável, com sintomas que se estendem entre infecção assintomática a anomalias severas do coração e do trato digestório. Essa característica da afecção tem sido atribuída tanto à constituição genética variada da população humana exposta quanto ao extensivo polimorfismo genético detectados dentre os diferentes isolados de *T. cruzi*. (BUSCAGLIA E DI NOIA, 2003; MACEDO *et al.*, 2004).

Após a infecção, a fase aguda inicial da doença apresenta baixa mortalidade e em geral sintomas brandos e inespecíficos (BRENER E GAZZINELLI, 1997; RASSI JR *et al.*, 2009; PRATA, 2001). Esta fase pode durar entre algumas semanas a alguns meses, com parasitos livres na corrente sanguínea. A infecção então permanece em geral assintomática por anos ou décadas, com poucos ou nenhum parasito encontrado na circulação, até que em torno de 30% dos pacientes desenvolvem a fase crônica sintomática da doença, a qual sem tratamento é severamente debilitante e, em muitos casos, fatal (PRATA, 2001).

Pacientes que se encontram na fase crônica assintomática podem apresentar a reativação da doença quando imunossuprimidos. Dentre as condições clínicas que podem desencadear a reativação da doença estão: transplantes, doenças sanguíneas malignas e quimioterapia. Os sintomas manifestados nessas condições incluem miocardite, meningite e paniculite. Pacientes portadores de HIV também estão sob risco de reativação, podendo desenvolver meningite, encefalite e neoplasia cerebral. A reativação da doença de Chagas é, portanto, um importante fator de risco em pacientes imunossuprimidos (CAMPOS *et al.*, 2008; MARCHIORI *et al.*, 2007).

Até o momento, apenas duas drogas, nifurtimox e benznidazol, têm sido utilizadas no tratamento desta doença, contudo a eficácia do tratamento continua controversa (URBINA, 2003) e ainda apresenta importantes efeitos colaterais, tais como: toxidez ao sistema nervoso central; leucopenia; fraqueza muscular e dermatite severa, podendo apresentar também efeito carcinogênico (revisado por ALSFORD *et al.*, 2013). Além disso, existem vários trabalhos reportando a existência de parasitos resistentes às drogas usadas no tratamento da doença de Chagas (VILLARREAL *et al.*, 2005, MURTA *et al.*, 2008), reforçando ainda mais a necessidade de geração de formas mais eficientes de tratamento. O desenvolvimento de sistemas que permitam uma “entrega” mais eficiente de drogas poderá melhorar a terapia, além de poder minimizar efeitos colaterais associados ao

tratamento. Sendo assim, a obtenção de anticorpos monoclonais com capacidade de reconhecimento de formas infectantes (extracelulares) deste parasito, bem como a construção de anticorpos recombinantes associados ou em fusão a moléculas tóxicas, gerando as *magic bullets* (WRIGHT E LAPI, 2013; SAYLOR *et al.*, 2009), constituem uma excelente alternativa, que é pouco explorada em doenças negligenciadas incluindo a doença de Chagas.

2.2. Biologia do *Trypanosoma cruzi*

Ao longo do seu ciclo biológico, detalhado na Figura 1, *T. cruzi* parasita tanto mamíferos como numerosas espécies de hemípteros hematófagos da família Reduviidae. Ele pode assumir basicamente quatro formas durante seu ciclo de vida: tripomastigotas sanguíneas (forma presente no sangue do hospedeiro mamífero e que é adquirida pelo inseto durante a ingestão de sangue); epimastigotas (forma na qual as tripomastigotas se diferenciam no intestino médio do inseto); tripomastigotas metacíclicas (forma na qual a epimastigota se diferencia ao migrar para o intestino posterior e é eliminada nos dejetos podendo causar a infecção no mamífero); e amastigota (forma presente no interior das células do hospedeiro e responsável pela replicação no hospedeiro) (REY, 2008).

A espécie *T. cruzi* é bastante heterogênea, sendo composta por várias subpopulações de organismos que podem divergir bastante na morfologia e virulência. A diversidade da população do parasito já é conhecida desde os primeiros trabalhos de Carlos Chagas em 1909. Essas variações intra-espécie já foram observadas no âmbito do comportamento da infecção em animais de laboratório, características bioquímicas e características moleculares (DEVERA *et al.*, 2003). A diversidade genética da espécie já foi analisada com marcadores enzimáticos, restrição de fragmentos polimórficos (RFLP) do cinetoplasto, cariótipos moleculares, DNA *fingerprint*, DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD). A partir dessas análises é possível dividir as populações de *T. cruzi* em seis grupos principais, nomeados *TcruzI* a *TcruzVI* (ZINGALES *et al.*, 2009).

Essa classificação leva em conta estudos prévios de vários marcadores em vários isolados e cepas conhecidas. Entretanto, um protocolo de teste para classificar novos isolados ainda não foi padronizado. A meta principal na classificação do *T. cruzi* em grupos é estabelecer uma correlação entre a cepa

infectante e a imunologia, patologia, clínica, terapêutica e epidemiologia da doença de Chagas (ANDRADE, 2005; ANDRADE *et al.*, 1975; BRENER, 1979).

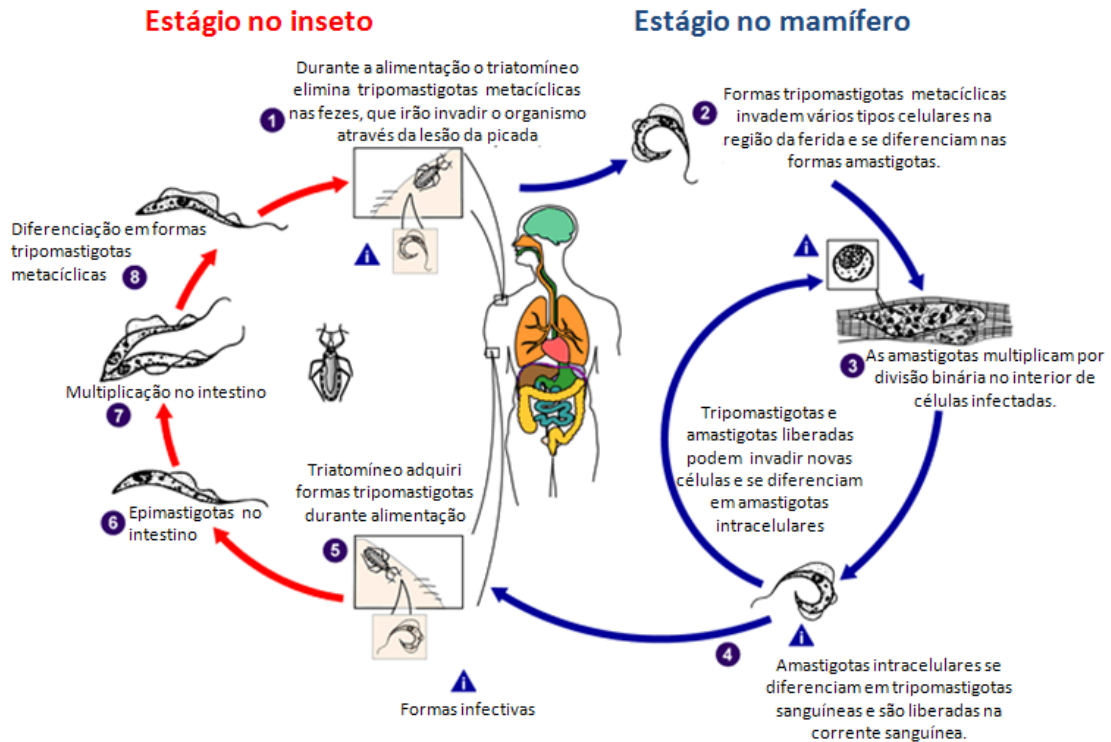


FIGURA 1: Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*.

FONTE: Adaptado de *Centers for Disease Control & Prevention / Division of Parasitic Diseases* <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm> (acesso em 31/05/2012)

NOTA: O inseto triatomíneo infectado ao sugar o sangue do mamífero libera pelas fezes formas tripomastigotas metacíclicas próximo ao local da picada. Estas formas adentram o organismo hospedeiro pela lesão ocasionada pela picada do barbeiro ou por mucosas intactas, como a conjuntiva (1). Dentro do mamífero, as tripomastigotas metacíclicas invadem as células próximas ao local de incursão, onde se diferenciam em formas amastigotas (2). As amastigotas se multiplicam por fissão binária (3) e diferenciam-se em formas tripomastigotas e são então liberadas na corrente sanguínea como tripomastigotas sanguíneas (4). Estas formas infectam diversos tecidos e transformam-se em amastigotas intracelulares, nos locais de infecção. As manifestações clínicas podem ser resultado deste ciclo infeccioso. Diferentemente de *T. brucei* as formas tripomastigotas sanguíneas não se replicam. A replicação ocorre somente quando o parasito adentra uma célula ou é ingerido pelo inseto. O hospedeiro invertebrado contamina-se ao sugar sangue de mamíferos que contenham parasitas circulantes (5). As formas tripomastigotas ingeridas diferenciam-se em epimastigotas no intestino médio do inseto (6). Os parasitos multiplicam-se no intestino médio (7) e diferenciam-se em formas tripomastigotas metacíclicas (infectantes) no intestino posterior (8). O *T. cruzi* também pode ser transmitido por transfusões sanguíneas, transplante de órgãos, infecção transplacentária, acidentes laboratoriais e alimentos contaminados.

A membrana plasmática do *T. cruzi* é composta por uma bicamada lipídica, na qual várias proteínas estão submersas. Seus principais componentes são: proteínas – distribuídas irregularmente, fosfolípidios – sendo fosfatidilcolina,

fosfatidiletanolamina e fosfatidilinositol os três mais abundantes, e glicocálix (REY, 2008; SIQUEIRA-BATISTA, 2007).

Na superfície externa da membrana do parasito está presente uma película celular desenvolvida, três vezes mais espessa em tripomastigota do que em epimastigota. Também se observa ácido siálico associado à glicopeptídeos com papel importante na interação entre o parasito e macrófagos do hospedeiro (MARTINEZ-DIAZ *et al.*, 2001).

A compreensão dos mecanismos e estruturas que se apresentam como potenciais fatores de virulência pode não somente fornecer uma visão mais detalhada das relações parasito-hospedeiro, mas também identificar novos alvos para a intervenção terapêutica. Neste contexto, genes que codificam proteínas de que revestem a superfície do parasito se apresentam como tópicos relevantes para investigação e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, pois constituem a primeira linha de interação com o hospedeiro, participando nos processos de estabelecimento da infecção e evasão da resposta imune.

Podem ser observadas quatro formas evolutivas principais no *T. cruzi*: tripomastigotas sanguíneos e amastigotas intracelulares, presentes no hospedeiro mamífero, e epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos, presentes no vetor hematófago. A transição entre essas formas evolutivas é acompanhada pela mudança na composição das proteínas que recobrem a superfície do parasito. Essas moléculas interagem com componentes do hospedeiro e propiciam o desenvolvimento da infecção e invasão celular.

2.3. Aspectos relacionados à interação parasito-hospedeiro

As primeiras etapas de interação entre o *T. cruzi* e a célula do hospedeiro podem ser divididas em três: reconhecimento e adesão, sinalização e invasão. Considerando que tais interações são influenciadas pela cepa do parasito, o estágio evolutivo e a célula hospedeira alvo, pode-se concluir que os mecanismos empregados nessas etapas são complexos (YOSHIDA E CORTEZ, 2008; ROSESTOLATO *et al.*, 2002).

Adesão e invasão são processos distintos e podem ser separados. A etapa de adesão ocorre com o reconhecimento de moléculas integrantes das superfícies tanto do parasito como do hospedeiro. Quando a interação entre o parasito e a

célula hospedeira ocorre em baixas temperaturas ocorre a adesão mas não a invasão (De MEIRELES *et al.*, 1982). A adesão, portanto, é um processo que depende unicamente de receptores restritos a domínios de membrana e sua ocorrência não significa que haverá invasão da célula hospedeira. Os mecanismos pelos quais as formas infectantes do *T. cruzi* utilizam para acessar o meio intracelular têm sido gradualmente elucidados. Na etapa de invasão, o parasito induz a elevação de Ca^{2+} intracelular através de interações de sinalização ou causando lesão na membrana celular o que leva a exocitose de lisossomos e liberação localizada de esfingomielinase ácida. A ação dessa enzima gera micro domínios de ceramida e invaginação da membrana celular, promovendo a internalização do parasito em um vacúolo parasitóforo rico em ceramida. Esse vacúolo recém-formado se funde a lisossomos, retendo o parasito dentro da célula (FERNANDES e ANDREWS, 2012). O envolvimento de ligantes do parasito e de receptores do hospedeiro nesse processo têm sido extensivamente investigados (YOSHIDA, 2006; MAGDESIAN *et al.*, 2001; SCHARFSTEIN E MORROT, 1999).

Dentre as glicoproteínas de superfície do *T. cruzi*, destacam-se várias moléculas cujas funções na interação com o hospedeiro já foram descritas. Algumas proteases do *T. cruzi* participam no processo de estabelecimento da infecção, como a cruzipaína e Tc80. A cruzipaína é uma cisteína proteinase lisossômica expressa em todas as formas evolutivas e é encontrada no reservossoma do parasito (PAIVA *et al.*, 1998). A cruzipaína é secretada pela bolsa flagelar e tem ação lítica sobre cininogênio de alto peso molecular do hospedeiro, gerando cininas que se ligam ao receptor de bradicinina para estimular a liberação de Ca^{2+} mediada por inositol trifosfato (SCHARFSTEIN *et al.*, 2000). A Tc80 é uma proliloligopeptidase de 80 kDa pertencente à família das serino proteases. Ela é capaz de hidrolisar os colágenos humanos tipo I e IV e também a fibronectina, o que é importante para facilitar a movimentação do parasito na matriz extracelular (BASTOS *et al.*, 2005). A invasão celular pelo parasito é bloqueada pela utilização de inibidores da Tc80, indicando que essa molécula poderia ser um alvo interessante para a quimioterapia na Doença de Chagas (GREILER *et al.*, 2001).

Encontrada em todas as cepas de *T. cruzi*, a Gp83 é uma proteína utilizada pelo parasito para aderir e invadir células fagocitárias e não fagocitárias, expressa apenas nas formas infectantes (VILLALTA *et al.*, 2008). Outra molécula, conhecida como penetrina, é uma proteína de 60 kDa que possui afinidade por elementos da

matriz extracelular e se liga seletivamente a heparina, sulfato de heparan e colágeno, promovendo a adesão de fibroblasto e invasão celular (HERRERA *et al.*, 1994).

Uma família importante de moléculas presentes na superfície de tripomastigotas é o das trans-sialidasas. Essa família gênica compreende pelo menos 1400 membros, que podem ser divididos em quatro grupos de acordo com a estrutura e função do produto proteico (FRASCH, 2000). As trans-sialidasas são expressas por tripomastigotas e ancoradas à membrana do parasito por glicosilfosfatidilinositol (GPI). Pertencente ao grupo I da família, a trans-sialidase é uma enzima singular do *T. cruzi*, ligada à superfície do parasito e liberada no meio extracelular. Ela é uma sialidase modificada, que ao invés de liberar ácido siálico, pode transferi-lo de sialoglicoconjugados do hospedeiro para β -galactoses da porção n-terminal dos glicoconjugados do parasito, o qual é incapaz de sintetizar ácido siálico (PREVIATO *et al.*, 1985). A adição desse monossacarídeo às moléculas de superfície do parasito é essencial para a sua propagação no hospedeiro mamífero (BUSCAGLIA *et al.*, 2006). Ensaios de invasão celular utilizando formas tripomastigotas de cepas que apresentam alta taxa de expressão de trans-sialidasas (TS+) e baixa taxa de expressão (TS-), demonstraram que a população TS+ apresentava boa capacidade de invasão celular enquanto a população TS- era extremamente ineficiente em infectar células não fagocitárias (PRIOLI *et al.*, 1990; PEREIRA *et al.*, 1996). O processo de sialilação em *T. cruzi* confere resistência ao sistema complemento humano (PEREIRA-CHIOCCOLA *et al.*, 2000), o que pode ser considerado um pré-requisito para o sucesso da infecção.

O grupo II da família das trans-sialidasas compreende glicoproteínas como Tc85, TSA-1 e gp90 expressas na superfície do parasito de forma diferenciada de acordo com a forma do ciclo evolutivo (ALVES E COLLI, 2008), participantes nos processos de adesão e invasão celular. A Tc85 forma uma população heterogênea de glicoproteínas ancoradas a GPI com massas moleculares semelhantes, mas pontos isoelétricos distintos (GIORDANO *et al.*, 1994). A utilização de anticorpos monoclonais que reconhecem as proteínas Tc85 inibe a invasão celular em 50%–96% (ALVES *et al.*, 1986). A família Tc85 é capaz de se ligar à diferentes moléculas receptoras pertencentes tanto a superfície celular, como a citoqueratina 18

(MAGDESIAN *et al.*, 2001) quanto a componentes da matriz extracelular, como fibronectina (OUAISSI *et al.*, 1986) e laminina (GIORDANO *et al.*, 1999).

A gp90, expressa nas formas evolutivas encontradas no hospedeiro mamífero, apresenta efeito anti-fagocitário demonstrado através da utilização de macrófagos como célula hospedeira (MARTINS *et al.*, 2011). A capacidade da gp90 de inibir a invasão da célula hospedeira tem sido associada à ausência de indução de sinais de Ca^{2+} por essa molécula, uma vez que a ligação dessa glicoproteína às células de mamíferos não ativa essa via de sinalização (RUIZ *et al.*, 1998). A molécula da gp90 é rapidamente digerida por pepsina, o que explica os dados relatados de que cepas ricas dessa glicoproteína podem invadir células do trato gastrointestinal quando ingeridas acidentalmente (COVARRUBIAS *et al.*, 2007).

A gp82 é uma glicoproteína ancorada à membrana celular por GPI e está presente somente na forma tripomastigota metacíclico, uma vez que anticorpos contra essa proteína não foram capazes de reconhecê-la quando testados contra as outras formas evolutivas do parasito (ARAYA *et al.*, 1994). A adesão de formas tripomastigotas metacíclicos mediada por gp82 dispara a via de sinalização de Ca^{2+} nas células do hospedeiro. A gp82 atua como receptor de sinalização que medeia a fosforilação proteica em resíduos de tirosina, o que é necessário para a invasão celular (FAVORETO *et al.*, 1998). A fosfolipase C e o inositol trifosfato também participam de cascata de sinalização iniciada pela gp82 na superfície parasitária que leva a mobilização de Ca^{2+} necessária à invasão da célula do hospedeiro (YOSHIDA E CORTEZ, 2008; FAVORETO *et al.*, 1998).

Outro grupo importante de proteínas são as chamadas de mucinas. Elas são glicoproteínas de superfície cujas cadeias de oligossacarídeos são ligadas aos resíduos de treonina ou serina por O-glicosilação através de unidades de N-acetilglucosaminas. Essas proteínas estão entre os principais componentes da superfície do parasito, participando nos processos de defesa e evasão do sistema imune do hospedeiro (BUSCAGLIA *et al.*, 2006). Elas são os principais aceptores de ácido siálico transferidos de glicoconjugados do hospedeiro na reação catalisada pela trans-sialidase (YOSHIDA, 2006), e seus resíduos de açúcares interagem com as células do hospedeiro mamífero (YOSHIDA *et al.*, 1989). Muitas mucinas estão relacionadas ao processo de invasão celular ou ainda podem atuar como ligantes (Di NOIA *et al.*, 1995; BUSCAGLIA *et al.*, 2006).

As mucinas do *T. cruzi* compreendem um grande repertório de elementos que podem ser divididos em duas famílias gênicas, chamadas *TcMUC* e *TcSMUG*, diferenciadas por comparação de sequências (BUSCAGLIA *et al.*, 2006; Di NOIA *et al.*, 2000). A *TcMUC* inclui mais de 1000 genes que apresentam um extenso polimorfismo, o que sugere que esses genes estão sob pressão seletiva significativa que favorece a diversificação das proteínas codificadas (CAMPO *et al.*, 2004). Além disso, a expressão dos genes de *TcMUC* parece estar restrita às formas que infectam o hospedeiro mamífero (BUSCAGLIA *et al.*, 2004; CAMPO *et al.*, 2006). A segunda família de mucinas, *TcSMUG*, apresenta uma diversidade significativamente menor e seus genes codificam ORFs (*open reading frames*) pequenas com um peptídeo sinal putativo na porção N-terminal e um sinal para ancoragem por GPI na porção C-terminal. Se as duas porções forem de fato processadas, o peso molecular médio previsto para essas apo-mucinas é de aproximadamente 7 kDa, com resíduos de treonina compreendendo até 50% do produto total. No clone de referência, CL Brener, as *TcSMUGs* podem ser divididas em dois grupos de genes, chamados de L e S, organizados em arranjos *em tandem* independentes diferindo na estrutura de seus *loci* genômicos (Di NOIA *et al.*, 2000). Dentro da região codificadora, as sequências deduzidas das *TcSMUG S* e *TcSMUG L* apresentam identidade média de 80% (URBAN *et al.*, 2011).

Dentre as mucinas do *T. cruzi*, o grupo das gp35/50, expressas na superfície de tripomastigotas metacíclicos, também está envolvido nos processos que compreendem a invasão celular (TEIXEIRA E YOSHIDA, 1986). Essas proteínas constituem as principais moléculas que compõe a membrana celular das formas metacíclicas de diferentes cepas de *T. cruzi*, e aparentam ser altamente imunogênicas, uma vez que camundongos imunizados com parasitos metacíclicos inativados por calor produzem anticorpos que reconhecem predominantemente esses antígenos e são capazes de lisar tripomastigotas metacíclicos em reações dependentes de complemento (TEIXEIRA E YOSHIDA, 1986). Análises recentes de espectrometria de massa de proteínas ancoradas por GPI na superfície do *T. cruzi* identificaram que os produtos da família *TcSMUG S* compõem a base das mucinas gp35/50 expressas nas formas epimastigota e tripomastigota, encontradas no inseto vetor (NAKAYASU *et al.*, 2009). As gp35/50 ligam-se às células alvo através de receptores e induzem sinalização bidirecional de Ca^{2+} o que provavelmente contribui para a invasão celular pelas formas tripomastigotas metacíclicas (YOSHIDA, 2006),

contudo, é menos eficiente que gp82 em promover a invasão celular, provavelmente por sua menor capacidade de indução da via de sinalização de Ca^{2+} . As mucinas gp35/50 resistentes a proteases, abundantes na superfície do parasito, são responsáveis pela proteção das formas tripomastigotas metacíclicas durante a infecção por via oral (YOSHIDA, 2009).

Nas cepas que preferencialmente utilizam gp35/50 para invasão celular, a cascata de sinalização ativada no parasito é distinta daquela produzida por gp82. Tirosina quinase e fosfolipase C não são empregadas, em vez disso, AMP cíclico possivelmente é utilizado, como deduzido a partir do aumento da infectividade parasitária quando a cultura é tratada com *forskolin*, um ativador de adenilil ciclase (NEIRA *et al.*, 2002). O Ca^{2+} necessário à invasão celular parece ser liberado pelos acidocalcissomos, que são vacúolos detentores de um sistema de trocas de Ca^{2+} e H^+ (DOCAMPO *et al.*, 1995), uma vez que o tratamento de tripomastigotas metacíclicos com uma combinação de ionomicina e NH_4Cl , que libera Ca^{2+} desses compartimentos ácidos, reduz de maneira significativa a invasão celular (NEIRA *et al.*, 2002). O mecanismo pelo qual as gp35/50, moléculas ancoradas por GPI, transmitem o sinal externo ao interior do parasito, e os componentes necessários para esse processo permanecem desconhecidos.

Diversos grupos de pesquisa empenharam esforços no intuito de produzir anticorpos monoclonais (mAb) que reconhecem as várias proteínas de superfície do *T. cruzi*. Dentre os mAbs obtidos que reconhecem resíduos de oligossacarídeos, destacam-se o mAb-2B10, que reconhece epítomos contendo resíduos de galactopiranoose, presentes nas mucinas de todas as cepas de *T. cruzi* e o mAb-10D8, que reconhece epítomos contendo resíduos de galactofuranose, restritos aos isolados do grupo *Tcruzil* (YOSHIDA, 2006). Ensaio de *western blot* utilizando o mAb-10D8 contra extratos totais de tripomastigotas metacíclicos derivados de diferentes cepas, mostram um perfil de duas bandas dependendo da cepa testada (MORTARA *et al.*, 1992). O tratamento com mAb-10D8 reduz a infectividade em camundongos por formas tripomastigotas da cepa Tulahen pré-tratadas com mAb-10D8 ou fragmentos Fab (YOSHIDA *et al.*, 1989), sugerindo que o tratamento com anticorpo monoclonal (mAb) pode reduzir o desempenho do parasito durante a infecção aguda.

Tratamentos baseados em anticorpos recombinantes estão se tornando cada vez mais disponíveis e mostrando resultados clínicos promissores. Anticorpos

de cadeia única (scFv) (KESHET E BEN-SASSON, 1999) consistem da união das regiões variáveis pesada (V_H) e leve (V_L), representando o menor fragmento de anticorpo retentor da capacidade de reconhecimento de antígeno. Comparados aos anticorpos inteiros, os scFvs apresentam muitas vantagens, tais como: um scFv é composto das regiões variáveis de ligação ao antígeno sem a porção Fc, a qual pode interagir com receptores Fc em determinados tecidos (LUK E WONG, 2006); scFvs têm maior capacidade de penetração em tecidos e menor tempo de meia vida no organismo (KUAN *et al.*, 2010).

2.4. Tecnologia de anticorpos recombinantes

Sendo componentes significantes do sistema imune, os anticorpos representam uma ferramenta poderosa na defesa do organismo contra agentes não-próprios. Contudo, para interagir com tantas estruturas de origem externa, é necessário um número incontável de anticorpos portando especificidades diferentes. Essa diversidade é obtida através de recombinações somáticas e hipermutagênese de um conjunto de genes variantes (ROGOZIN *et al.*, 1991).

Os avanços da tecnologia de anticorpos recombinantes nas últimas décadas facilitaram a manipulação de fragmentos de anticorpos. A manipulação genética de anticorpos recombinantes por sua vez aperfeiçoou o entendimento da estrutura e organização funcional das imunoglobulinas. Esses avanços levaram à obtenção de uma enorme variedade de moléculas utilizadas em pesquisa e diagnóstico que possuem especificidades que vão além daquelas que a tecnologia convencional de anticorpos permitia. Uma vez clonado, é possível aumentar a afinidade e especificidade de ligação à antígeno mimetizando as mutações somáticas que ocorrem durante a resposta imune (KONTERMANN E MÜLLER, 1999; GRAM *et al.*, 1992).

A introdução da tecnologia de hibridoma (KOHLENER E MILSTEIN, 1975) permitiu a produção laboratorial de anticorpos monoclonais com especificidade definida, qualidade consistente e em grande quantidade. Desde então, a técnica tem sido muito empregada, uma vez que podem ser produzidos anticorpos em quantidade ilimitada capazes de se ligar a praticamente qualquer tipo de antígeno (KLIMKA *et al.*, 2000; WATKINS E OUWEHAND, 2000). Entretanto, o uso dos anticorpos monoclonais enfrentam algumas dificuldades, pois são praticamente

exclusivamente de origem murina e por isso podem levar à produção de anticorpos anti-camundongo quando introduzidos inteiros em humanos, o que limita sua aplicação clínica (KLIMKA *et al.*, 2000; WATKINS E OUWEHAND, 2000).

O primeiro estudo visando à produção de anticorpos recombinantes em bactéria foi dificultado devido ao enovelamento incorreto e agregação dos polipeptídios no citoplasma (BOSS *et al.*, 1984; CABILLY *et al.*, 1984). Uma estratégia empregada para superar essas dificuldades foi a tentativa de expressão de partes do anticorpo como fragmentos Fab ou Fv com o objetivo de reduzir o tamanho da proteína expressa (SKERRA E PLÜCKTHUN, 1988). Um grande avanço na produção de anticorpos recombinantes em *Escherichia coli* foi possível com a introdução de vetores que permitem a secreção dos anticorpos expressos para o periplasma, ambiente oxidante que contribui para a correta formação das ligações dissulfídicas entre os domínios das proteínas, o que possibilita seu enovelamento correto (SKERRA E PLÜCKTHUN, 1988; BETTER *et al.*, 1998).

O aperfeiçoamento das tecnologias de DNA recombinante e engenharia de anticorpos possibilitaram que os genes de anticorpos sejam clonados e expressos como fragmentos em bactérias (SKERRA E PLÜCKTHUN, 1988), células de mamífero, leveduras (HO *et al.*, 2006) plantas (GALEFFI *et al.*, 2006), e células de inseto (CHOO *et al.*, 2002). Uma vantagem dessa nova tecnologia é que ela permite manter a integridade do sítio de ligação ao antígeno, enquanto se diminui o tamanho da molécula do anticorpo. Comparados aos anticorpos monoclonais de origem, essas moléculas menores apresentam várias vantagens na prática clínica, incluindo melhor penetração tumoral, depuração plasmática mais rápida, menor retenção em tecidos não alvos e menor imunogenicidade. Além disso, a combinação dessas pequenas moléculas de anticorpo com um sistema de produção microbiano eficiente pode permitir a obtenção de grandes quantidades de anticorpos de forma homogênea para o uso em diagnóstico e terapia (HUSTON *et al.*, 1996; DANA E MARASCO, 1998; COLCHER *et al.*, 1998).

Deste modo, com os avanços da engenharia genética, uma grande variedade de anticorpos geneticamente manipulados foi produzida, incluindo fragmentos Fab (HUST *et al.*, 2007), fragmentos Fv cujos domínios são unidos por forças não covalentes (SKERRA E PLÜCKTHUN, 1988), e os chamados anticorpos de cadeia única ou scFv (*single chain fragment variable*), nos quais os genes das cadeias pesada (V_H) e leve (V_L) são unidos por pequeno peptídeo flexível (*linker*)

(GLOCKSHUBER *et al.*, 1990) (Figura 2). De forma alternativa, as moléculas de anticorpos minimizados também podem servir de base para a construção de novas proteínas recombinantes com diferentes propósitos. Por exemplo, anticorpos com a mesma especificidade foram fusionados produzindo moléculas bivalentes (KIM *et al.*, 2008) ou multivalentes (CUESTA *et al.*, 2010; PEREZ *et al.*, 2006), enquanto fragmentos de anticorpos de diferentes especificidades foram fusionados em moléculas biespecíficas (LIU *et al.*, 2009).

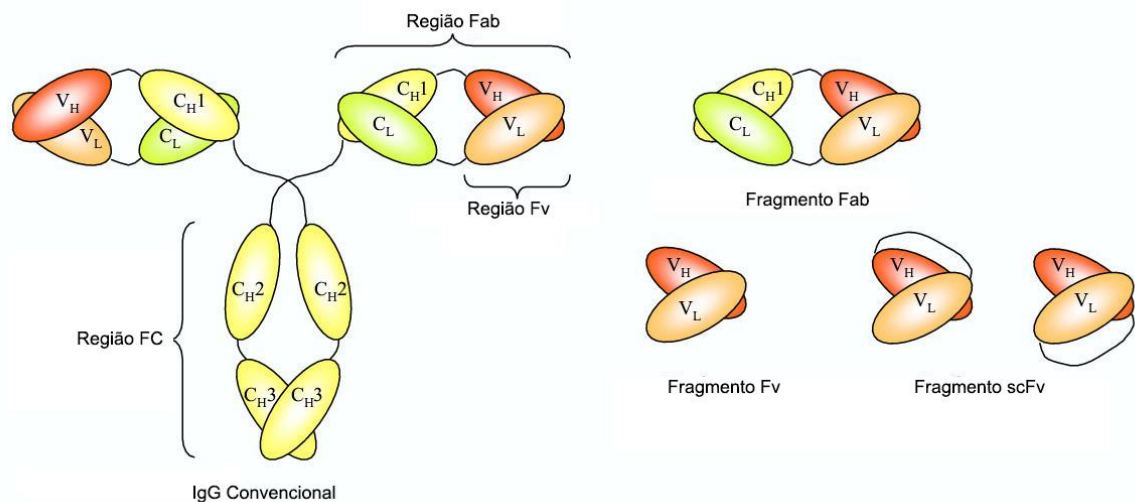


FIGURA 2: Domínios componentes da estrutura de um anticorpo e seus fragmentos.

FONTE: Adaptado de <http://www.labome.com/method/Antibody-Structure-and-Fragments.html> (acesso em 20/03/2014).

NOTA: Modelo de anticorpo mostrando a composição de suas subunidades e distribuição dos domínios ao longo das cadeias de polipeptídios.

Um fragmento Fv é a menor unidade de imunoglobulina com capacidade de ligação a antígeno. Um anticorpo em formato scFv (Figura 2) consiste na união das cadeias leve e pesada por um peptídeo flexível, que pode ser facilmente expresso na sua forma funcional em *E. coli*, possibilitando sua manipulação a fim de buscar melhorias de suas propriedades, como o aumento de afinidade e alteração de especificidade (GRIFFITHS E DUNCAN, 1998).

O comprimento do peptídeo flexível que liga as cadeias leve e pesada é crítico na obtenção da conformação correta da cadeia polipeptídica. Ele deve ter aproximadamente 3,5 nm entre a extremidade carboxilterminal de uma cadeia até a extremidade aminoterminal da outra cadeia para permitir o enovelamento correto e a formação do sítio de ligação ao antígeno funcional (HUSTON *et al.*, 1991). Além de fragmentos projetados *de novo*, sequências peptídicas baseadas em estruturas proteicas conhecidas de tamanho adequado já foram empregadas para unir os

fragmentos variáveis de um scFv sem que isso causasse alguma interferência estérica considerável (TAKKINEN *et al.*, 1991; SMALLSHAW *et al.*, 1999). Além do comprimento, a composição aminoacídica também tem papel importante no desenvolvimento de um peptídeo ligante viável. Eles devem ter uma sequência hidrofílica, a fim de evitar a intercalação do peptídeo dentro ou entre os domínios das cadeias variáveis durante o enovelamento da proteína (ARGOS, 1990). As sequências mais utilizadas compreendem intercalações entre resíduos de serina e glicina, que objetivam a flexibilidade, e/ou resíduos de ácido glutâmico e lisina, para aumentar a solubilidade (WHITLOW *et al.*, 1993).

As matérias primas utilizadas para a construção de scFv são principalmente hibridomas (GALEFFI *et al.*, 2006; DENG *et al.*, 2003), esplenócitos de camundongos imunizados (CLACKSON *et al.*, 1991; FINLAY *et al.*, 2006), e linfócitos B humanos (SHADIDI E SIOUD, 2001; ZHANG *et al.*, 2006). Os genes dos domínios variáveis são obtidos extraíndo-se o mRNA do material de origem, o qual em seguida é transcrito em cDNA por transcriptase reversa. Esse cDNA serve de modelo para a amplificação dos genes do anticorpo por PCR. Esse método permite a construção de vastas bibliotecas de anticorpos (FIELDS *et al.*, 2013).

Na construção de um scFv, a ordem dos domínios pode ser tanto V_H -*linker*- V_L como V_L -*linker*- V_H e ambas as orientações já foram empregadas (DAI *et al.*, 2003; HU *et al.*, 2005; SHEIKHOLVAEZIN *et al.*, 2006). A maioria dos scFv são construídos na orientação V_H -*linker*- V_L , apesar de a expressão de scFvs no sistema *Pichia pastoris* ser dependente da orientação V_L -*linker*- V_H (LOU *et al.*, 1995). Um dos métodos mais empregados é o de montagem por PCR (CLACKSON *et al.*, 1991; LAKE *et al.*, 1994), que foi primeiramente descrito por Horton e colaboradores (HORTON *et al.*, 1989). Neste método, é possível a clonagem dos domínios sem a necessidade de se conhecer a sequência de nucleotídeos ou aminoácidos de um anticorpo em particular. Ademais, os domínios do anticorpo podem ser combinados em plasmídeos diretamente após a reação de PCR dos genes V_H e V_L (LILLEY *et al.*, 1994).

Recentemente, Fields e colaboradores descreveram um método para o planejamento e desenvolvimento de anticorpos recombinantes monovalentes derivados de anticorpos monoclonais através da identificação e clonagem das regiões variáveis leve e pesada e o planejamento e clonagem de uma sequência de DNA sintética otimizada para a expressão em bactérias (FIELDS *et al.*, 2013). Esse

método, resumido na figura 3, permite a produção de anticorpos de cadeia única funcionais em até 50 dias.

Uma grande quantidade de scFvs já foi construída contra haptenos (KOBAYASHI *et al.*, 2005), proteínas (DAI *et al.*, 2003; GUO *et al.*, 2003), carboidratos (RAVN *et al.*, 2004; SAKAI *et al.*, 2007), receptores (GALEFFI *et al.*, 2006), antígenos tumorais (ZHANG *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2014), e vírus (POUNGPAIR *et al.*, 2014). Todos esses scFvs apresentam potencial para uso em vários campos, incluindo terapias e métodos diagnósticos.

Vários trabalhos têm mostrado a utilização de anticorpos conjugados a radioisótopos no tratamento de câncer, células infectadas, e doenças causadas por agentes infecciosos como fungos e HIV. (DADACHOVA *et al.*, 2003; MILENIC *et al.*, 2004; DADACHOVA *et al.*, 2006). Uma aplicação potencial da engenharia de anticorpos de cadeia simples na doença de Chagas seria a construção de imunolipossomas, ou seja, associação de scFvs à superfície de lipossomos (NELLIS *et al.*, 2005), preenchidos com drogas tripanosomicidas, de forma semelhante ao que já tem sido feito para tratamento do câncer, por exemplo (XIN *et al.*, 2013). É importante destacar, que a utilização de lipossomos carregados com drogas no tratamento da doença de Chagas dependendo do tipo de lipossomo e da droga utilizada tem se mostrado promissor (CENCIG *et al.*, 2011).

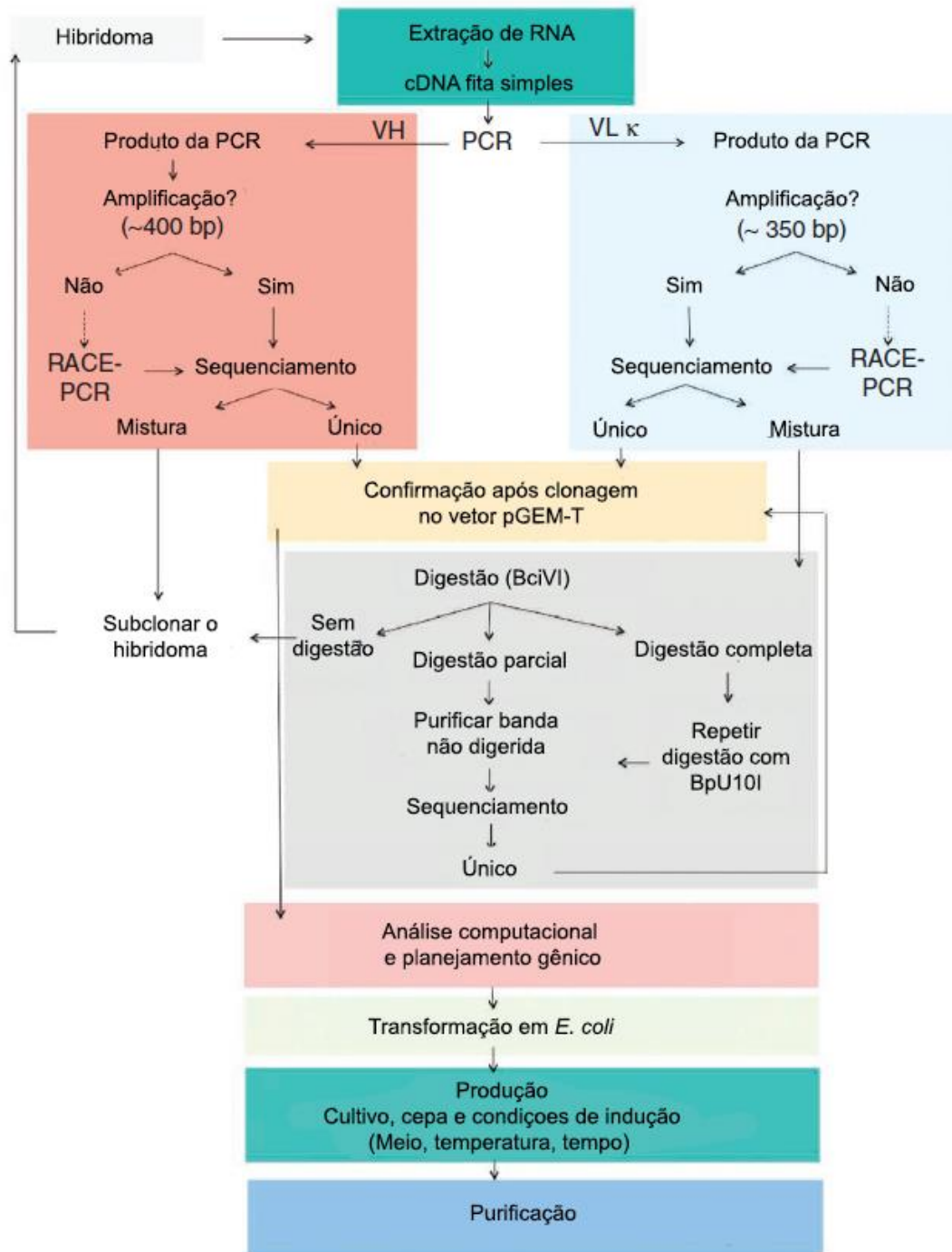


FIGURA 3: Fluxograma representando o processo passo a passo que conduz à expressão e purificação de moléculas de fragmentos de anticorpos a partir de linhagens celulares de hibridoma.

FONTE: adaptado de FIELDS *et al.*, 2013

3. JUSTIFICATIVA

A tripanossomíase americana é hoje a doença parasitária que mais atinge o continente americano, produzindo um impacto econômico significativo. Apesar de passado um século de estudos desta patologia, ainda não há cura definitiva e o tratamento se mostra problemático, com efeitos colaterais severos e baixa eficácia.

Proteínas de superfície do parasito despertam interesse para a genômica funcional, pois podem desempenhar funções importantes na interação parasito-hospedeiro, como adesão, percepção de sinais e manipulação do ambiente. Dentre as proteínas de superfície do *T. cruzi* descritas, destacam-se as glicoproteínas que participam no processo de adesão e invasão celular possibilitando o estabelecimento da infecção. Proteínas essenciais para a realização do ciclo biológico se apresentam como bons candidatos a alvos para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Nesse contexto, as gp35/50 despertam o interesse para a obtenção de anticorpos recombinantes, uma vez que já foram descritos anticorpos monoclonais que reconhecem diferenciadamente.

A tecnologia de anticorpos recombinantes é um campo promissor que permite o estudo e a melhoria das propriedades de anticorpos por meio de engenharia genética. A expressão funcional de fragmentos de anticorpo em *E. coli* forma a base para a produção e seleção de bibliotecas de anticorpos, sendo este um importante método para a produção de anticorpos destinados à terapia. Devido às várias vantagens que os anticorpos gerados *in vitro* oferecem sobre os anticorpos monoclonais produzidos tradicionalmente, tais moléculas são agora cada vez mais utilizadas para ensaios imunológicos e desenvolvimento de terapias. Apesar do seu crescente uso em estratégias terapêuticas e métodos de diagnóstico, a tecnologia de anticorpos recombinantes tem sido pouco explorada na doença de Chagas.

Diante deste quadro, propõe-se a produção e caracterização funcional de um anticorpo de cadeia única recombinante anti-gp35/50 de *T. cruzi*. Os resultados obtidos até o momento são encorajadores, de modo que um número maior de alvos será estudado no futuro objetivando o desenvolvimento de novas terapias.

4. OBJETIVOS

4.1. Geral

Obter anticorpo recombinante anti-gp35/50 de *T. cruzi*.

4.2. Específicos

- Testar a reatividade do anticorpo monoclonal 10D8 em diferentes cepas;
- Amplificar e clonar os genes que codificam as cadeias leve e pesada do anticorpo monoclonal 10D8;
- Realizar análises *in silico* da reatividade do scFv obtido com resíduos glicídicos;
- Expressar e purificar o anticorpo de cadeia única (scFv) 10D8;
- Avaliar a funcionalidade do scFv-10D8 no reconhecimento de gp35/50;
- Obter parasitos expressando gene marcador da proteína vermelho fluorescente a fim de usá-los posteriormente em ensaios de avaliação do scFv-10D8.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Estirpes bacterianas utilizadas

As estirpes bacterianas e suas características estão descritas a seguir:

- XL1 blue (Stratagene) – As células XL1-Blue são deficientes em endonuclease (*endA*), o que aumenta a qualidade do DNA extraído por *miniprep*, e são deficientes em recombinação (*recA*), aumentando a estabilidade do inserto. A mutação *hsdR* previne a clivagem do DNA clonado pelo sistema de endonuclease EcoK.
- BL21 (Sigma-Aldrich) - BL21(DE3)-T1^R é apropriada para alta indução e expressão de genes regulados por vetores contendo promotor T7. Ela não expressa íon proteases e protease de membrana (*ompT*), o que previne a degradação de proteínas heterólogas expressas em sistema de expressão com vetores T7. Esta cepa possui o genótipo *tonA* que confere resistência a bacteriófagos como T1 e T5. Ela também possui uma T7 RNA polimerase induzível regulada por promotor *lacUV5*.

5.2. Condições de cultivo bacteriano

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio Luria Bertani (LB) (SAMBROOK *et al.*, 1989) (triptona 1%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 171 mM; pH 7,0), sob agitação de 150 RPM a uma temperatura de 37°C ou em meio sólido LA (meio LB acrescido de 1,5% ágar p/v), em estufa a 37°C, levando-se em consideração o antibiótico de seleção para a resistência de cada bactéria ou plasmídeo introduzido.

Para o ensaio de expressão foram utilizados ainda os meios de cultura 2xTY (triptona 1,6%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 171 mM; pH 7,0), e *Terrific Broth* (triptona 1,2%; extrato de levedura 2,4%; glicerol 0,4%; KH₂PO₄ 17 mM; K₂HPO₄ 72 mM), (SAMBROOK *et al.*, 1989).

5.3. Plasmídeos utilizados

Foram utilizados cinco plasmídeos para manipulação e clonagem de DNA: pGEM-T easy, pUC57-scFv-10D8, pET22B(+), pET22b(+)-scFv-10D8 e pTREXn-RFP, conforme descrição a seguir:

5.3.1. pGEM-T easy

O pGEM-T easy (Promega) é um vetor linearizado com uma timidina 3'terminal nas duas fitas de DNA. Essa timidina excedente no sítio de inserção aumenta a eficiência de ligação prevenindo a recircularização do vetor e fornece uma extremidade compatível para a ligação de produtos de PCR obtidos com determinadas polimerases (figura 4).

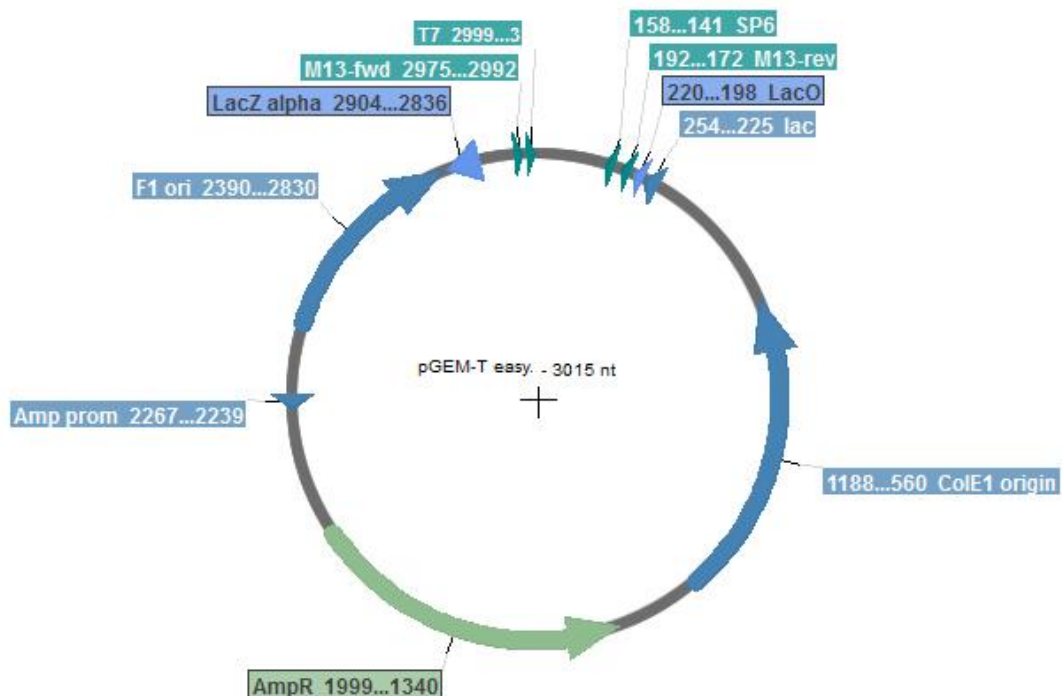


FIGURA 4: Modelo ilustrativo do plasmídeo pGEM-T Easy.

FONTE: O Autor, 2014

NOTA: As flechas coloridas se referem aos genes a qual codificam ou simplesmente a uma sequência de DNA não necessariamente traduzida. Os comprimentos em que as flechas estão representadas são proporcionais ao número de pares de nucleotídeos da sequência, além disso, a direção da mesma aponta o sentido em que a sequência é transcrita.

5.3.2. pUC57-scFv-10D8

O pUC57 é um vetor contendo gene de resistência a ampicilina adequado para clonagem de genes. O vetor pUC57-scFv-10D8 foi construído pela empresa GenScript que inseriu a sequência do gene de interesse no vetor pUC57 utilizando os sítios e *NcoI* e *NotI* (figura 5).

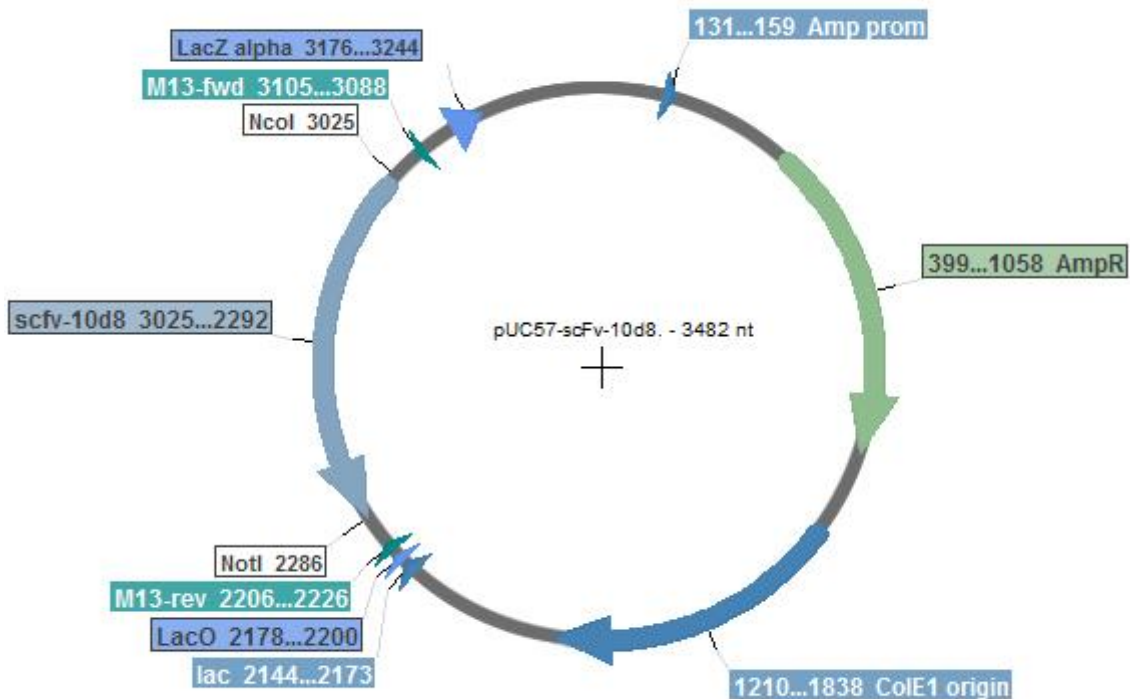


FIGURA 5: Modelo ilustrativo do plasmídeo Puc57-scFv-10D8

FONTE: O Autor, 2014

NOTA: as flechas coloridas se referem aos genes a qual codificam ou simplesmente a uma sequência de DNA não necessariamente traduzida. Os comprimentos em que as flechas estão representadas são proporcionais ao número de pares de nucleotídeos da sequência, além disso, a direção da mesma aponta o sentido em que a sequência é transcrita.

5.3.3. pET22B(+)

Vetor de expressão derivado dos vetores comerciais pET usados para a expressão heteróloga de várias proteínas em *E. coli*. Em geral os fragmentos de anticorpos são secretados no citoplasma em estado não enovelado com alto rendimento por esse vetor, utilizando um promotor *T7*. É adicionada uma sequência *pelB* líder que direciona os fragmentos para o periplasma, onde eles assumem a conformação tridimensional adequada (figura 6).

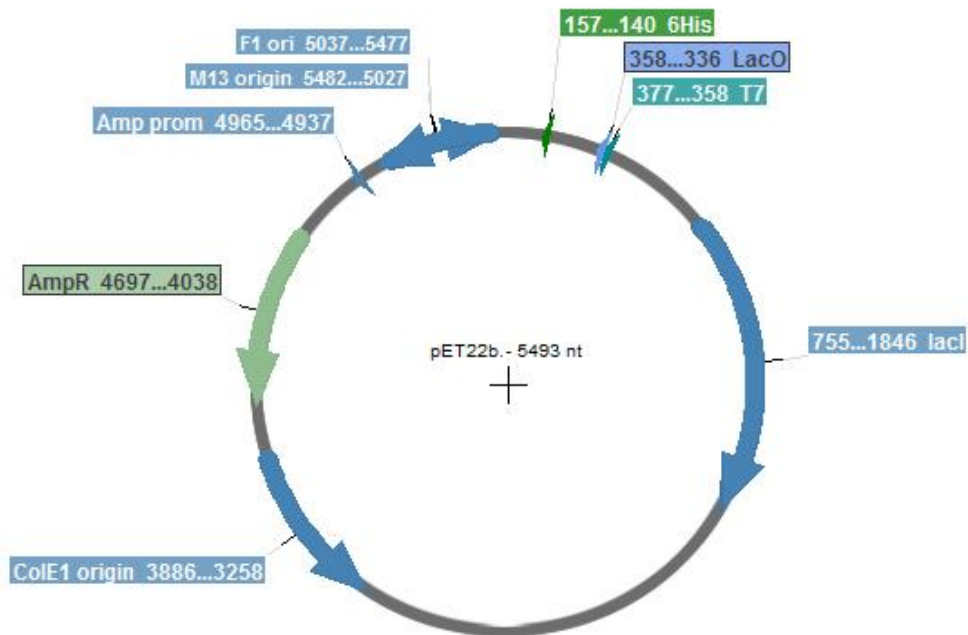


FIGURA 6: Modelo ilustrativo do plasmídeo pET22b(+).

FONTE: O Autor, 2014

NOTA: As flechas coloridas se referem aos genes a qual codificam ou simplesmente a uma sequência de DNA não necessariamente traduzida. Os comprimentos em que as flechas estão representadas são proporcionais ao número de pares de nucleotídeos da sequência, além disso, a direção da mesma aponta o sentido em que a sequência é transcrita.

5.3.4. pET22b-scFv-10D8

Este vetor foi construído através da clonagem do gene do scFv-10D8 purificado do pUC57-scFv-10D8 nos sítios de NcoI e NotI. A figura 7 mostra a orientação da inserção do gene do scFv-10D8 no vetor de expressão.

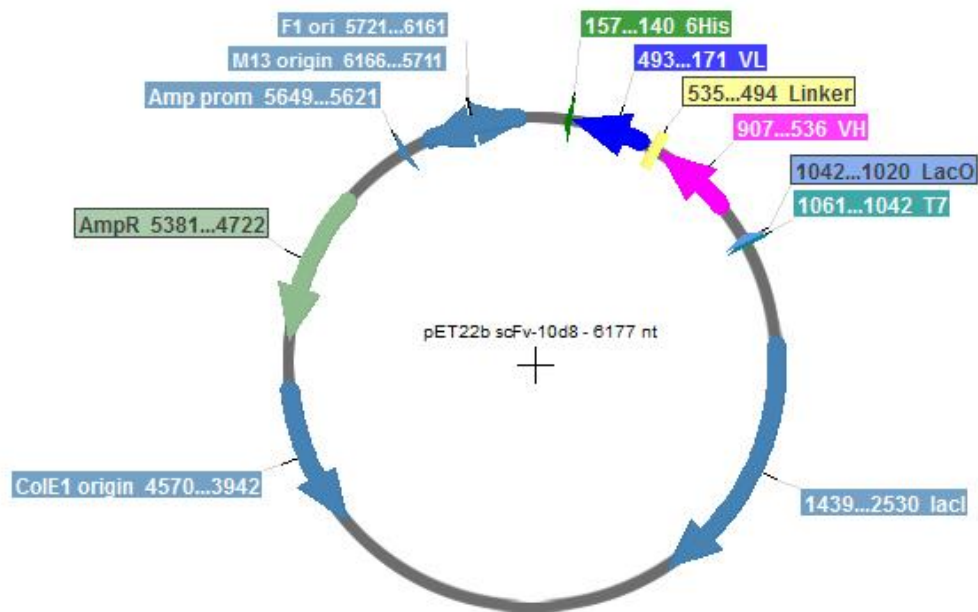


FIGURA 7: Modelo ilustrativo do plasmídeo utilizado na expressão do scFv-10D8.

FONTE: O autor, 2014

NOTA: A figura mostra a orientação do gene no vetor e a região de inserção da tag de histidina. As flechas coloridas se referem aos genes a qual codificam ou simplesmente a uma sequência de DNA não necessariamente traduzida. Os comprimentos em que as flechas estão representadas são proporcionais ao número de pares de nucleotídeos da sequência, além disso, a direção da mesma aponta o sentido em que a sequência é transcrita.

5.3.5. pTREX RFP

O vetor pTREX é largamente utilizado na expressão epissomal em *T. cruzi*. Ele possui um promotor ribossomal à montante do sitio de clonagem gênica. A presença desse promotor aumenta a expressão e seleção dos parasitos transfectados. O gene da proteína vermelho fluorescente foi inserido neste vetor para a geração de parasitos fluorescentes (figura 8).

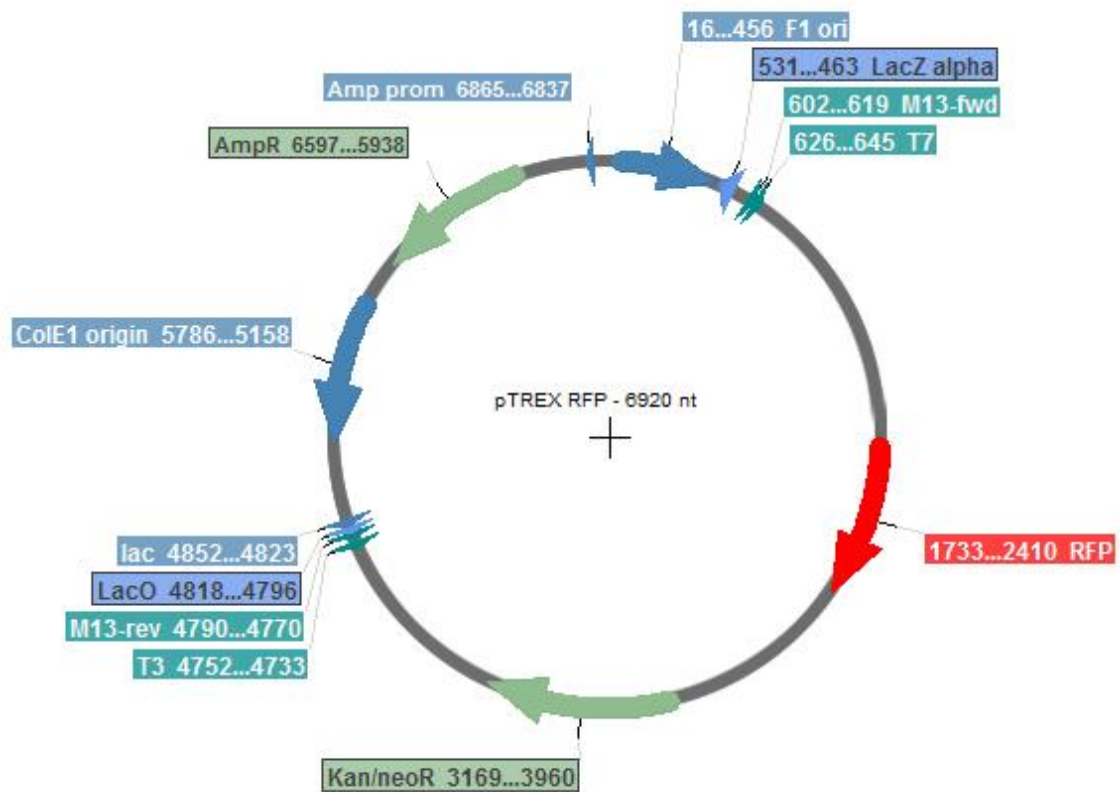


FIGURA 8: Modelo ilustrativo do plasmídeo utilizado para a geração de parasitos fluorescentes.

FONTE: O Autor, 2014

NOTA: As flechas coloridas se referem aos genes a qual codificam ou simplesmente a uma sequência de DNA não necessariamente traduzida. Os comprimentos em que as flechas estão representadas são proporcionais ao número de pares de nucleotídeos da sequência, além disso, a direção da mesma aponta o sentido em que a sequência é transcrita.

5.4. Hibridoma 10D8

O hibridoma secretor do anticorpo monoclonal 10D8 foi gentilmente cedido pela Dra. Nobuko Yoshida. Este hibridoma foi obtido através imunização de camundongos BALB/C com parasitos mortos da cepa G de *T. cruzi*. Os esplenócitos dos camundongos foram fusionados com células de plasmacitoma P3U1. Os sobrenadantes de hibridoma foram testados por imunofluorescência indireta com parasitos da cepa G utilizados como antígeno. Os hibridoma produtores de anticorpos foram clonados duas vezes por diluição limitante.

5.5. Extração de RNA do hibridoma 10D8

A cultura de células do hibridoma 10D8 foi lavada três vezes com PBS, centrifugando a 1789 força-g (g) por 5 minutos em cada lavagem. Foram feitas alíquotas de $5,3 \times 10^6$ células em microtubos de 1,5 ml e centrifugadas a 1789 g, descartando o sobrenadante. O sedimento de cada alíquota foi suspenso em 20 μ L de PBS e homogeneizado com 200 μ L de reagente TRIzol (Invitrogen). Em seguida cada alíquota teve o volume completado para 1 ml com TRIzol e novamente homogeneizada para maior eficiência da lise celular e depois incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Foram adicionados 200 μ L de clorofórmio em cada tubo e estes foram agitados em vórtex por 15 segundos. Os tubos foram centrifugados a 11180 g por 15 minutos a 4 °C para a separação das fases aquosa e orgânica. Foram coletados 500 μ L da fase aquosa de cada tubo e transferidos para novos tubos. Foi feita a precipitação do material genético adicionando 500 μ L de isopropanol nos tubos, incubando por 10 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 11180 g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado. O sedimento foi lavado com 500 μ L de etanol 70%, novamente centrifugado a 11180 g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado. O sedimento foi incubado a temperatura ambiente para secar suspenso em 50 μ L de água tratada com DEPC. O material extraído foi dosado em espectrofotômetro NANODROP 2000 (Thermo Scientific) em comprimento de onda na faixa de 260 nm e analisado por eletroforese em gel de agarose 2% não desnaturante.

5.6. Síntese do cDNA a partir do RNA total do hibridoma 10D8

Previamente à síntese do cDNA, cerca de 3 µg de RNA foram adicionados a uma reação contendo 2 µL de DNase 1 U/µL, 2 µL de tampão DNase I 10X, 2 µL de RNaseOUT 40 U/µL e 14 µL água DEPC. Essa reação foi incubada a 37 °C por 30 minutos e em seguida a 93 °C por 5 minutos. Para a síntese do cDNA foi utilizado o kit ThermoScript RT-PCR system (Invitrogen), adicionando 5 µL da reação de digestão com DNase I a uma nova reação contendo 1 µL oligo dT 50 mM, 2 µL dNTPs 10 mM e 9 µL água DEPC. Essa reação foi incubada a 65 °C por 5 minutos e em seguida foi adicionado 4 µL de tampão de síntese 5x, 1 µL DTT 100 mM, RNaseOUT 40 U/µL, 1 µL água DEPC e 1 µL ThermoScript 15 U/µL. Essa reação foi incubada a 60 °C por 60 minutos e em seguida a 85 °C por 5 minutos. O cDNA foi armazenado em freezer a -80 °C.

5.7. Amplificação dos genes da cadeia variável leve e pesada do anticorpo monoclonal 10D8

Os genes das cadeias leve e pesada do mAb-10D8 foram amplificados a partir do cDNA utilizando o protocolo descrito por Fields e colaboradores (FIELDS *et al.*, 2013). Para a amplificação da cadeia pesada, uma única reação de PCR utilizando os iniciadores VhRevU e VhForU é necessária. Para a amplificação da cadeia leve, o iniciador universal VkForU deve ser combinado com outros 9 iniciadores reversos, denominados VkRev1–9 para determinar o melhor par para amplificação desta cadeia. Cada uma das cadeias amplificadas foi clonada no vetor pGEM-T Easy e então sequenciada. Os iniciadores utilizados nas reações de PCR estão descritos na tabela 1.

TABELA 1: Iniciadores utilizados para amplificar e sequenciar as cadeias variáveis leve e pesada do anticorpo monoclonal 10D8.

Nome	Sequência	Nota
Para amplificação da cadeia pesada:		
VhRevU	GAG GTS MAR CTG CAG SAG TCW GG	Anela na região V _h e é utilizado para amplificar e sequenciar o domínio V _h da IgG.

VhForU GAC AGT GGA TAR ACM GAT GG

Para amplificação da cadeia leve-k:

VkRev1	GAG GTS MAR CTG CAG SAG TCW GG	Anelam nas extremidades da região V _h da cadeia leve-k e são utilizados para amplificar e sequenciar a cadeia leve-k.
VkRev2	GAT ATT GTG ATG ACG CAG GCT	
VkRev3	GAT ATT GTG ATA ACC CAG	
VkRev4	GAC ATT GTG CTG ACC CAA TCT	
VkRev5	GAC ATT GTG ATG ACC CAG TCT	
VkRev6	GAT ATT GTG CTA ACT CAG TCT	
VkRev7	GAT ATC CAG ATG ACA CAG ACT	
VkRev8	GAC ATC CAG CTG ACT CAG TCT	
VkRev9	CAA ATT GTT CTC ACC CAG TCT	
VkForU	GGA TAC AGT TGG TGC AGC ATC	

Para amplificar toda a cadeia leve:

KappaFor	ATT AAC ACT CAT TCC TGT TGA A	Anela na extremidade 3' da região CI da cadeia leve-k e é utilizado para amplificar e sequenciar o domínio V _I da IgG.
----------	-------------------------------	---

5.8. Sequenciamento dos genes da cadeia variável leve e pesada do anticorpo monoclonal 10D8

O sequenciamento dos genes das cadeias leve e pesada foi realizado segundo método de Sanger *et al.* (1977), utilizando-se iniciadores M13 *Forward* e M13 *Reverse*, que anelam flanqueando o sítio múltiplo de clonagem do vetor pGEM T Easy. As reações com dideoxynucleotídeos fluorescentes presentes do *dye terminator kit* (AMERSHAN PHARMACIA BIOTECH) foram realizadas de acordo com instruções do fabricante e analisadas no sequenciador ABI *Prism 377* (Applied Biosystems).

5.9. Planejamento e síntese do scFv-10D8

A sequência dos fragmentos dos genes de cadeias leve e pesada do mAb-10D8 foi submetida à empresa GenScript que a otimizou o gene sintético para a expressão heteróloga com base na tabela de uso de códons da *E. coli*, ou seja, substituindo os códons raros por códons sinônimos presentes em alta frequência nos genes dessa espécie. Além disso, foi inserida entre os genes uma sequência que codifica um peptídeo flexível composto por três repetições de quatro glicinas e

uma serina (GGGGSGGGGSGGGGS). Essa sequência otimizada foi sintetizada, clonada no vetor pUC57, e sequenciada pela empresa.

5.10. Representação bidimensional e predição da estrutura tridimensional do sítio de ligação ao antígeno do anticorpo monoclonal 10D8

As sequências de aminoácidos das cadeias leve e pesada do mAb-10D8 foram alinhadas e numeradas de acordo com o padrão IMGT (International Immunogenetics Information System - IMGT/DomainGapAlign). Os dados do alinhamento foram utilizados para a predição das regiões hipervariáveis (CDRs ou sítios de combinação do anticorpo) e a representação bidimensional da estrutura, ou “colar de pérolas”, foi obtida com a ferramenta IMGT/Collier-de-Perles utilizando o resultado da predição das CDRs.

A predição da estrutura tridimensional foi feita utilizando o algoritmo WAM (Web Antibody Modelling) (WHITELEGG E REES, 2000). As estruturas foram visualizadas no software PyMol - (DeLano Scientific, San Carlos, Calif., USA).

Os modelos de interações entre o scFv-10D8 e as várias moléculas glicídicas, como galactopiranosose e galactofuranose, foram obtidos utilizando o software Hex 8.0. (GHOORAH *et al.*, 2013) com os seguintes parâmetros:

- Tipo de correlação – Forma+Electro+DARS
- Modo FFT – 3D
- Dimensão da grade – 0.6
- Alcance do receptor – 180
- Alcance do ligante – 180
- Faixa de torção – 360
- Faixa de distância – 40

5.11. Ensaios de restrição enzimática do DNA

Os plasmídeos foram submetidos a ensaios de restrição enzimática com as enzimas apropriadas, seguindo as recomendações especificadas no catálogo do fabricante (Fermentas).

5.12. Eletroforese em gel de agarose

Os procedimentos de eletroforese em gel de agarose seguiram descrição de Sambrook *et al.* (1989), utilizando-se tampão TBE 1X (Tris-borato 40 mM; EDTA 1 mM, pH 8,3). As amostras de DNA foram misturadas a 5 µL de Fsduds (azul de bromofenol 0,8%, ficol 10%, xileno cianol 0,4%, SDS 1%, EDTA 1,8 mM) com posterior aplicação nos poços do gel de agarose previamente preparado. A corrida eletroforética ocorreu a 80 mV no sistema de eletroforese Horizon 58 (Gibco-BRL) e o gel foi tratado em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) por aproximadamente 15 minutos. A revelação do gel ocorreu sob incidência de luz ultravioleta em transiluminador EC3 System – UVP Biolumaging Systems (UVP, Inc. Upland, CA/USA).

5.13. Purificação de fragmentos de DNA a partir de gel de agarose

Para a obtenção de fragmentos de DNA após corrida de eletroforese em gel de agarose foi utilizado um kit de purificação (GE Healthcare) seguindo orientação do fabricante.

5.14. Ligação de fragmentos de DNA

Para a ligação dos fragmentos de DNA (vetores e insertos) foram utilizados de 50 ng do DNA do vetor previamente linearizado e razão molar de 5:1 do DNA do inserto em relação ao vetor, em reação contendo 10% de tampão de enzima T4 ligase e 1% de enzima T4 ligase (Fermentas), incubados a 4 °C durante a noite.

5.15. Preparação de células de *E. coli* competentes e transformação

As células competentes das cepas de *E. coli* XL1 Blue foram preparadas como descrito abaixo. Uma colônia isolada foi inoculada em 5 mL de meio LB e incubada a 37 °C sob agitação de 150 RPM por 12 horas. Após este período 1 mL da pré-cultura foi transferido para 200 mL de meio SOB (bacto triptona 2%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 8,56mM, KCl 2,5mM , MgCl₂ 10 mM) com subsequente incubação a 30°C sob agitação de 150 RPM até atingir OD_{600nm}= 0,3 – 0,4. As bactérias foram coletadas por centrifugação refrigerada (4°C) por 10 minutos a 5031 g (Eppendorf Centrifuge 5804 R) e suspensas em 50 ml de MgCl₂ resfriado. Posteriormente as células foram centrifugadas sob refrigeração (4°C) por 10 minutos a 3220 g (Eppendorf Centrifuge 5804 R), ressuspensas em 90 mL de CaCl₂ gelado e mantidas em gelo durante 30 minutos. Novamente a suspensão foi centrifugada sob refrigeração (4°C) por 10 minutos a 3220 g (Eppendorf Centrifuge 5804 R) e a este sedimento adicionou-se 2 mL de CaCl₂ (85 mM em glicerol 15% p/v) estéril e refrigerado, com subsequente distribuição em alíquotas de 100 µL que foram mantidas em freezer a -80°C.

As alíquotas das células competentes foram transformadas com volumes de 1-4 µL de reação de ligação ou do plasmídeo desejado e mantidas em gelo por 30 minutos. Após este tempo, procedeu-se um choque térmico nas bactérias, as quais do gelo passaram a banho-maria a 37°C por 1 minuto e posteriormente voltaram ao gelo por 3 minutos. A recuperação das células ocorreu adicionando-se 800 µL de meio SOC (meio SOB acrescido de 20 mM de glucose) e incubação em estufa a 37°C por 1 hora com subsequente plaqueamento em meio LA, contendo antibiótico apropriado, e incubação a 37°C por um período de 16-24 horas.

5.16. Obtenção de DNA plasmidial

Miniprep: As colônias de bactérias crescidas em meio líquido, conforme descrito no item 5.1, foram incubadas por 12 horas e em seguida direcionadas ao isolamento do DNA plasmidial segundo método de lise alcalina modificado (SAMBROOK *et al.*, 1989), com exclusão da etapa de extração com fenol e

clorofórmio. Quatro mililitros de cultura crescida foram centrifugadas a 21913 g durante 1 minuto, descartando-se o sobrenadante e suspendendo as células em 250 μ L de solução P1 (Glicose 55 mM, Tris-HCl 25 mM e EDTA 10 mM). Em seguida foram adicionados 250 μ L de solução P2 (SDS 1% e NaOH 0,2 M), homogeneizando-se gentilmente a amostra com posterior adição de solução P3 (60 ml de KOAc 5 M em 11,5 ml de ácido acético glacial e 28,5 ml de água), seguida de nova homogeneização e centrifugação a 21913 g por 25 minutos. O resíduo insolúvel foi descartado, enquanto os ácidos nucleicos presentes no sobrenadante foram precipitados com igual volume de isopropanol (~750 μ L), e levados à centrifugação a 21913 g por 20 minutos, descartando-se, em seguida o sobrenadante. Após ser lavado com etanol 70% (v/v) e seco, o sedimento foi dissolvido em TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM) contendo RNase a 10 μ g/ μ L.

A quantificação das soluções de DNA foi feita em espectrofotômetro NANODROP 2000 (Thermo Scientific) em comprimento de onda na faixa de 260 nm.

5.17. Expressão do scFv-10D8

As culturas de bactérias BL21, selecionadas de placas transformadas, foram cultivadas em meio LB com ampicilina 100 μ g/mL durante a noite em agitador. No dia seguinte, foram feitos repiques de 1:50 em 40 mL de meios de cultura variados. Após duas horas, em média, de incubação no agitador foram obtidas leituras de densidade óptica de aproximadamente 0,5 unidades por análise espectrofotométrica a 600 nm. Nesse momento foi adicionado a cada cultura IPTG (1 mM final) e as culturas foram novamente incubadas em agitador por 6 horas. Ao fim desse período foram obtidas novas leituras de densidade óptica e as células coletadas por centrifugação para extração dos conteúdos periplasmático e citoplasmático. Também foi realizado um ensaio variando o tempo de expressão em meio LB, que procedeu da mesma forma, mas retirando alíquotas nos tempos de 3; 6 e 9 horas para a análise do melhor tempo de expressão.

5.18. Extração do conteúdo periplasmático e citoplasmático de bactérias que expressam o scFv-10D8

Cada 100 mL de cultura de bactérias coletadas após a expressão foram ressuspensos em 1 mL de tampão TSE (TRIS-HCl 50 mM, pH 8; EDTA 40 mM, pH 8; sucrose 0.75 M) e incubados a 4 °C por 10 minutos. Em seguida, para cada 100 ml de cultura inicial, foram adicionados 1,5 mL de tampão TSE diluído 1:4 causando choque osmótico nas células, e novamente incubado a 4 °C por 30 minutos. As suspensões foram centrifugadas a 3220 g por 30 minutos e o sobrenadante referente ao periplasma recuperado e separado do sedimento. Os sedimentos foram suspensos em PBS no mesmo volume inicial de cultura e destinado a lise celular por pressão a 20.000 PSI utilizando o French Pressure Press Cell (American Instrument Company). As suspensões foram centrifugadas a 3220 g por 30 minutos e o sobrenadante referente ao citoplasma recuperado e separado do sedimento. As amostras foram então destinadas à análise por eletroforese em gel de poliacrilamida e *Western blotting*.

5.19. Separação de proteínas por peso molecular por SDS-PAGE e coloração de gel

Às amostras contendo quantidade conhecida de proteínas foi adicionado a igual volume de tampão de amostra (glicerol 10%, DTT 5 mM, SDS 2,3%, Tris-HCl pH 6,8, 62,5 mM), fervidas por 5 minutos e aplicadas no gel. Os géis de 12% de poliacrilamida contendo SDS (SAMBROOK *et al.*, 1989) foram submetidos a uma corrente de 30 mA, com uma voltagem constante em sistema de eletroforese Mini-PROTEAN Tetra System (BIO-RAD).

Os géis corados com azul de comassie foram incubados em uma solução de Azul de Comassie 0,1% em solução de metanol 55% e ácido acético 22,5% por 3 h, seguido de descoloramento em solução de metanol 30% e ácido acético 10%.

5.20. *Western blotting* do perfil de expressão do scFv-10D8 e reatividade do scFv-10D8 com extratos proteicos totais de parasitos

Após a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 12%, as amostras escolhidas foram transferidas para membranas de nitrocelulose, também por eletroforese a 100 V durante 1:20 h em tampão de transferência (Tris base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%), com o aparato imerso em gelo.

Após a transferência, a membrana foi corada com corante de Ponceau (Ponceau S 26 mM, ácido acético 5%) e depois bloqueada com PBS-T (Na_2HPO_4 25 mM; NaH_2PO_4 10 mM; Tween 20 0,3%) suplementado com 5% de leite em pó, sob leve agitação em temperatura ambiente, durante 1h. Feito o bloqueio, procedeu-se a três etapas de lavagem de 5 minutos cada com PBS-T.

A fim de analisar o perfil de reconhecimento do mAb-10D8, foram aplicados em cada canaleta os extratos proteicos totais de 2×10^6 parasitos de duas culturas da cepa G, uma em fase logarítmica de crescimento e outra em fase estacionária, envelhecida por 15 dias sem repique, condição que propicia a diferenciação das formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas. Também foram testados os parasitos em fase estacionária da cepa Y e dos clones CL Brener e Sylvio X10. A membrana foi incubada com o mAb-10D8, gentilmente cedido pela Dra. Nobuko Yoshida, na diluição 1:40 por uma hora, seguida de 3 lavagens de 5 minutos com tampão PBS-T. Em seguida a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-camundongo conjugado à *horseradish* peroxidase (HRP) na diluição 1:5000 por uma hora, seguido de 3 lavagens de 5 minutos com tampão PBS-T e duas lavagens de 5 minutos com tampão PBS.

Para a análise de expressão do scFv-10D8 em *E. coli* foram aplicados extratos proteicos totais de cultivos de *E. coli* expressando o scFv-10D8 suspensos em tampão de amostra de forma proporcional considerando-se a densidade óptica da cultura. A membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-histidina (Bio-Rad) na diluição 1:3000 por uma hora, seguida de 3 lavagens de 5 minutos com tampão PBS-T. Em seguida a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-camundongo conjugado à HRP na diluição 1:5000 por uma hora, seguido de 3 lavagens de 5 minutos com tampão PBS-T e duas lavagens de 5 minutos com tampão PBS.

Para testar a funcionalidade do scFv-10D8 expresso em *E. coli*, foram aplicados em cada canaleta os extratos proteicos totais de 2×10^6 parasitos da cepa G em fase estacionária, envelhecida por 15 dias. A membrana foi incubada com frações periplasmáticas e citoplasmáticas obtidas da expressão do scFv-10D8 na diluição 1:2, seguido de 3 lavagens de 5 minutos com tampão PBS-T. Em seguida a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-*His* (Bio-Rad) na diluição 1:3000 por uma hora, seguida de 3 lavagens de 5 minutos com tampão PBS-T. Em seguida a membrana foi incubada com o anticorpo anti-camundongo conjugado à HRP na diluição 1:5000 por uma hora, seguido de 3 lavagens de 5 minutos com tampão PBS-T e duas lavagens de 5 minutos com tampão PBS.

A detecção colorimétrica foi feita por solução de DAB (Diaminobenzidina) e Cloronaftol ou com kit *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Lifesciences).

5.21. Cepas e clones de parasitos utilizados

As cepas e clones classificadas de acordo com Zingales *et al.* (2009) utilizados neste trabalho estão relacionados no quadro abaixo:

Quadro 1: Origem e classificação das cepas e clones utilizados

Cepa/Clone	Grupo	Local de origem	Organismo do qual foi isolado
G	<i>Tcruzil</i>	Amazonas, Brasil	<i>Opossum sp.</i>
Sylvio X10/cl1	<i>Tcruzil</i>	Pará, Brasil	<i>Homo sapiens</i>
Y	<i>Tcruzil</i>	Rio Grande do Sul, Brasil	<i>Triatoma infestans</i>
CL Brener	<i>Tcruzil</i>	São Paulo, Brasil	<i>Homo sapiens</i>

5.22. Cultivo de parasitos

Os parasitos na forma epimastigotas foram cultivados em meio LIT (Infuso de fígado 1%; NaCl 68 mM; Na₂HPO₄ 56 mM; KCl 5 mM; Glicose 5,5 mM; Triptose 5 g/L; Hemina 0,2%, preparada em NaOH 0,05 M, 10 mL/L) mantendo-os em fase exponencial de crescimento (até 2×10^7 parasitos/mL). Também foram feitos cultivos

de parasitos sem repique por cerca de 15 dias para que atingissem fase estacionária de crescimento, condição na qual ocorre a diferenciação de formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos.

5.23. Transfecção de pTREXn-RFP e clonagem de *T. cruzi*

Parasitos da forma epimastigota do clone CL Brener de *T. cruzi* foram cultivados mantendo-os em fase de crescimento exponencial (até 2×10^7 parasitos/mL) e coletadas por centrifugação a 447 g por 5 minutos. Em seguida foram suspensas em tampão de eletroporação para concentração de 1×10^8 parasitos/mL (KCl 120 mM; CaCl_2 0,15 mM; KH_2PO_4 10 mM; HEPES 25 mM; EDTA 2 mM; MgCl_2 5 mM; sacarose 69 mM; pH 7,6) e transferidas para cubetas de eletroporação de 0,2 cm de modo a atingirem concentração de 4×10^7 parasitos/mL em um volume de 400 μL para cada cubeta, adicionando-se 50 μg de DNA plasmidial, seguido de 3 pulsos (intervalados por um tempo de 10 segundos) de 0,3 KV a 500 μF e 800 ohms em eletroporador BioRad Gene Pulser. Após este procedimento todo o volume da solução foi transferido para 5 ml de meio LIT (Infuso de fígado 1%; NaCl 68 mM; Na_2HPO_4 56 mM; KCl 5 mM; Glicose 5,5 mM; Triptose 5 g/L; Hemina 0,2%, preparada em NaOH 0,05 M, 10 mL/L) contendo antibiótico desejado para a seleção dos parasitos que receberam o plasmídeo de interesse, e incubou-se a 28°C por cerca de 30 dias, realizando-se quando necessário repiques das culturas quando estas atingiam fase estacionária do crescimento do parasito.

Para a obtenção de clones dos parasitos geneticamente modificados, culturas em fase exponencial de crescimento foram submetidas a diluição limitante até a concentração final de 0,5 parasitos/mL em meio LIT suplementado com 10% de soro fetal bovino e os antibióticos de seleção. Em seguida, a cultura foi distribuída em placa de 24 poços, a 1 mL por poço. As placas foram incubadas a 25-27 °C em câmara úmida até que foi observado crescimento em alguns poços da placa. Os parasitos foram transferidos para garrafas de cultura contendo meio LIT suplementado com 10% de soro fetal bovino e os antibióticos de seleção.

5.24. Análise de fluorescência por citometria de fluxo e microscopia

A leitura da atividade de RFP foi realizada por citometria de fluxo (FACS, do inglês, Fluorescence-Activated Cell Sorting) em citômetro FACSCALibur (BD Biosciences). A atividade obtida provém da leitura de 20,000 eventos (células). O processamento dos dados obtidos foi feito utilizando-se *software* WinMDI versão 2.9.

Os parasitos expressando o gene repórter RFP foram lavados 2 vezes com PBS suplementado com 3% de soro fetal bovino (SFB) e fixados com paraformaldeído 4% em PBS à temperatura ambiente por cerca de 10 minutos. Posteriormente as amostras foram novamente lavadas 2 vezes em PBS suplementado com 3% de SFB e tratadas por 15 minutos a 37 °C e lavadas mais duas vezes em PBS. Em seguida, o DNA das células foi corado por 10 minutos a temperatura ambiente com 0,1 µg/mL DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma) e montadas sobre lâminas de vidro contendo uma gota de 90% de glicerol e 10% de Tris-HCl 0,5 M; pH 9,0. As lâminas foram observadas ao microscópio de fluorescência e fotografadas.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Confirmação da reatividade do anticorpo monoclonal 10D8

Como teste preliminar para avaliar a qualidade do anticorpo monoclonal (mAb-10D8) produzido pelo hibridoma escolhido, a reatividade do mAb-10D8 foi testada frente a extratos de parasitos de diferentes cepas/clones de *T. cruzi*. A partir do hibridoma de camundongo secretor do anticorpo 10D8 anti gp35/50, gentilmente cedido pela Dra. Nobuko Yoshida, foi feito o teste de reatividade do anticorpo utilizando-se extrato proteico total de parasitos de duas culturas da cepa G, uma em fase logarítmica de crescimento e outra em fase estacionária (envelhecida por 15 dias). Na fase estacionária espera-se observar uma maior reatividade do mAb-10D8, uma vez que nessas condições ocorre a diferenciação da forma epimastigota para a forma tripomastigota metacíclica, estágio de maior expressão do de gp35/50. Também foi feito o teste da reatividade utilizando culturas de parasitos em fase estacionária de quatro diferentes cepas/clones, sendo o clone Sylvio X10 e a cepa G pertencentes ao grupo *Tcruzil*, a cepa Y pertencente ao grupo *Tcruzil* e o clone CL Brener ao grupo *TcruzVI*. O diferenciado perfil de reconhecimento apresentado pelo mAb-10D8 tanto dos parasitos coletados na fase estacionária (Figura 9-A) quanto entre as diferentes cepas testadas está de acordo com o esperado (Figura 9-B). Segundo dados previamente publicados, gp35/50 é mais expressa na forma tripomastigota metacíclica, e o mAb-10D8 reconhece epítomos de carboidratos específicos presentes em cepas do grupo *Tcruzil* (MORTARA *et al.*, 1992).

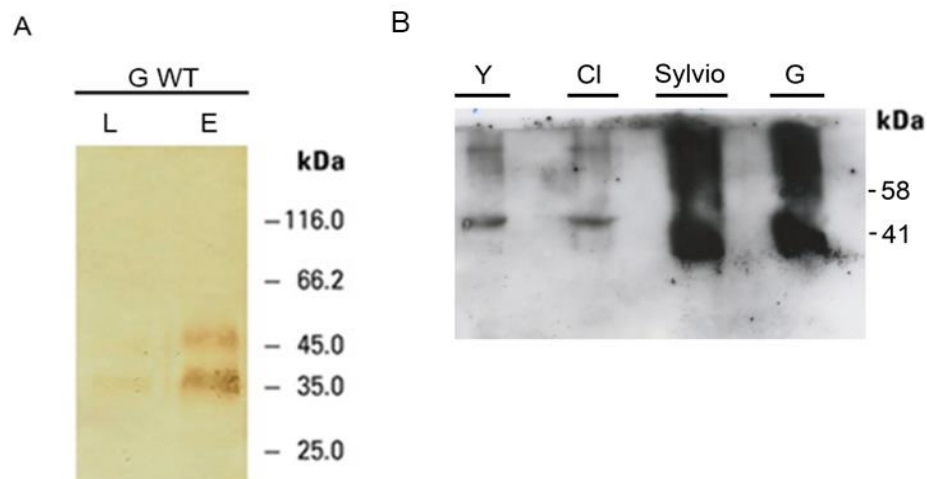


FIGURA 9: Reatividade de mAb-10D8 em extratos de *T. cruzi* em ensaios de *Western blotting*.

FONTE: O autor, 2014

NOTA: A: Avaliação do reconhecimento pelo mAb-10D8 em extratos proteicos totais de parasitos da cepa G mantidos em fase logarítmica de crescimento (L) e parasitos em fase estacionária (envelhecidos por 15 dias sem repique – E) por *Western blot*. **B:** Avaliação da reatividade do mAb-10D8 em extratos proteicos totais de epimastigotas em fase estacionária das cepas/clones Y, CL Brener (Cl), Sylvio X10 (Sylvio) e G por *Western blot*.

6.2. Obtenção dos fragmentos correspondentes as regiões variáveis dos genes que codificam as cadeias leve e pesada de mAb-10D8.

Após a confirmação da reatividade do mAb-10D8, foi feita a extração do RNA total do hibridoma secretor deste anticorpo. A fim de avaliar a qualidade do material extraído, foram realizadas reações de PCR utilizando iniciadores direcionados à amplificação do gene de actina. As três alíquotas extraídas apresentaram boa amplificação na reação de PCR (dados não mostrados). A amostra de RNA total com melhores indicadores de qualidade por espectrofotometria (nanodrop – absorvância e relação 260/280) foi analisada por eletroforese em gel desnaturante de agarose 2% (Figura 10-A), e em seguida destinada para a síntese de cDNA. Como pode ser visto na figura 10A, o RNA está parcialmente degradado, mas não comprometeu as próximas etapas.

Para obtenção das porções variáveis leves e pesadas de IgG2b anti-gp35/50 do mAb-10D8, o cDNA sintetizado foi utilizado em uma série de reações de PCR para a amplificação das porções variáveis leve e pesada do mAb-10D8, seguindo as condições de amplificação descritas por Fields *et al.*, (2013). A Figura 10-B mostra a

corrida eletroforética dos produtos de PCR em géis de agarose, sendo que os tamanho esperado para a cadeia leve é de aproximadamente 350 pares de base, enquanto a cadeia pesada se aproxima de 400 pb (Figura 3, FIELDS *et al.*, 2013). A análise dos géis indicou que os tamanhos dos produtos de PCR são compatíveis com o esperado. Os fragmentos amplificados foram clonados separadamente em vetor pGEM-T Easy.

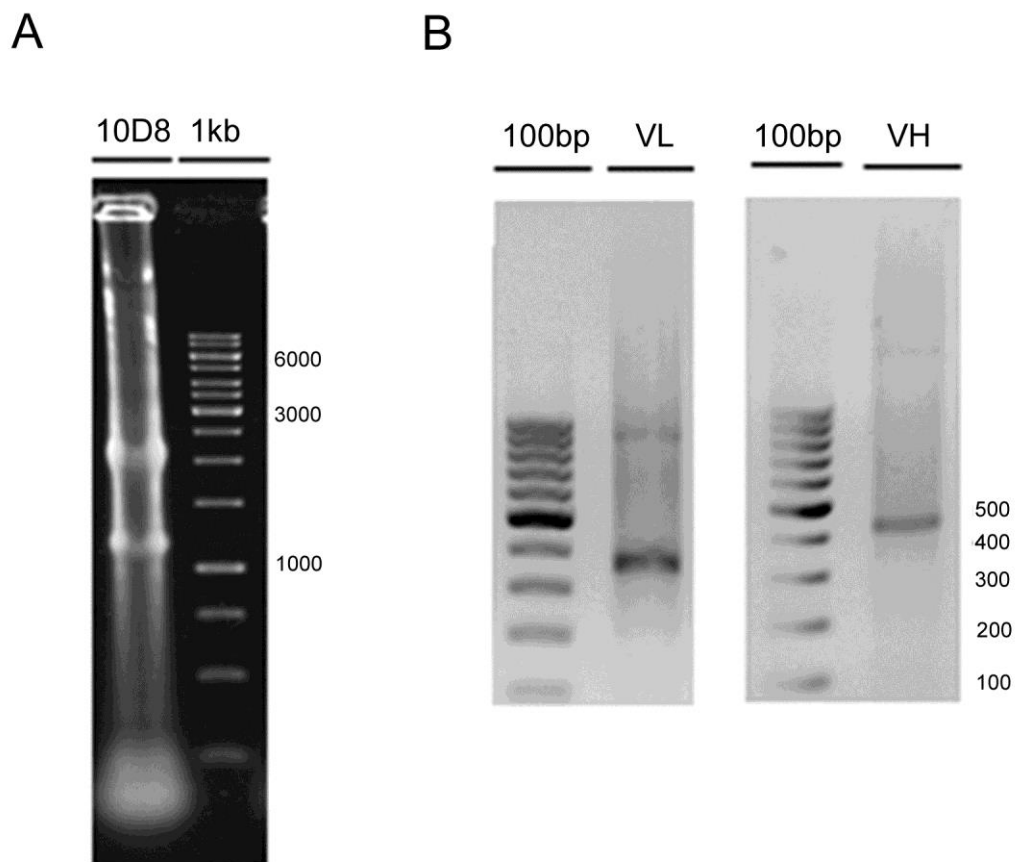


FIGURA 10: Extração de RNA e amplificação das regiões variáveis leve e pesada de mAb-10D8.

FONTE: O autor, 2014

NOTA: A: RNA total extraído do hibridoma 10D8. **B:** Produtos de amplificação das porções variáveis leve de aproximadamente 350 pares de base, e pesada de aproximadamente 400 pares de base, referentes aos genes que codificam mAb-10D8. Os produtos de PCR foram obtidos a partir de cDNAs.

6.3. Sequenciamento dos fragmentos de cadeia leve e pesada do mAb-10D8 e síntese do scFv-10D8

Em vista da possibilidade da amplificação de uma cadeia variável kappa aberrante que possui uma mutação que introduz um códon de parada prematuro na posição 105, presente nas células sp20 utilizadas na construção do hibridoma (DUAN E POMERANTZ, 1994), os fragmentos clonados no vetor pGEM-T Easy foram submetidos a reações de sequenciamento com os iniciadores adequados descritos por Fields *et al* (2013). Tal cadeia aberrante não foi encontrada nos fragmentos amplificados do cDNA e os dados do sequenciamento foram então utilizados para a montagem do scFv-10D8 *in silico*.

As sequências das cadeias variáveis foram arranjadas na configuração V_h -*linker*- V_l , que é a mais comumente utilizada. O peptídeo flexível composto de glicina e serina contendo dois sítios de restrição *Bam*HI foi inserido entre os genes das cadeias leve e pesada. Neste trabalho, foi realizada a expressão da forma monomérica do scFv-10D8. Contudo, os sítios de restrição inserido no peptídeo ligante permitirão no futuro a alteração do tamanho do peptídeo flexível, que resultará em uma conformação alternativa para a expressão do scFv na forma dimérica. Ainda há a possibilidade de clonar o gene no vetor pDAP102 que insere uma cauda de fosfatase alcalina, permitindo ainda uma terceira conformação para a expressão. Moléculas bivalentes tendem a apresentar uma performance melhor comparadas às monovalentes (MARTIN *et al.*, 2006). A figura 11 resume as diferentes estratégias para a expressão do scFv-10D8.

Em seguida, a sequência do scFv-10D8 foi submetida à empresa GenScript que a otimizou para expressão em *E. coli* levando em consideração a tabela de códons usuais desta espécie. Essa sequência otimizada foi sintetizada e clonada no vetor pUC57 utilizando os sítios de *Nco*I e *Not*I. Esse vetor contendo o gene do scFv-10D8 foi transformado em células XL1Blue e 5 clones foram isolados. Esses clones tiveram o DNA extraído por *miniprep* e foram confirmados pela restrição com a enzima *Bam*HI (Figura 12).

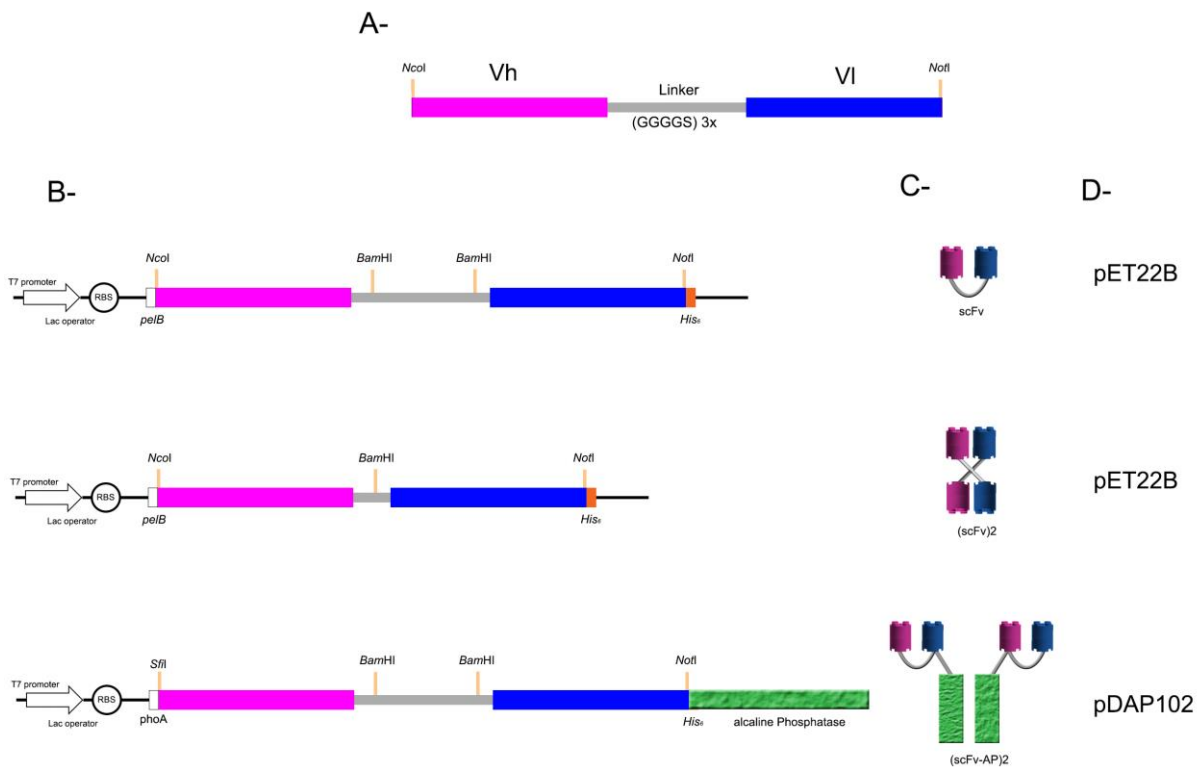


FIGURA 11: Esquema dos anticorpos recombinantes em diferentes configurações.

FONTE: O autor, 2014

NOTA: A: Representação do gene do scFv sintetizado detalhando a disposição dos genes e composição do peptídeo ligante. **B:** Conformações de expressão de anticorpos recombinantes. Foram idealizadas as seguintes construções (painel B) para expressão de scFv-10D8 fusionado a diferentes caudas em diferentes formatos (painel C). No painel D estão indicados os vetores de origem para as construções, sendo pET22b um vetor comercial e pDAP102 vetor publicado por Mousli *et al* (1998).

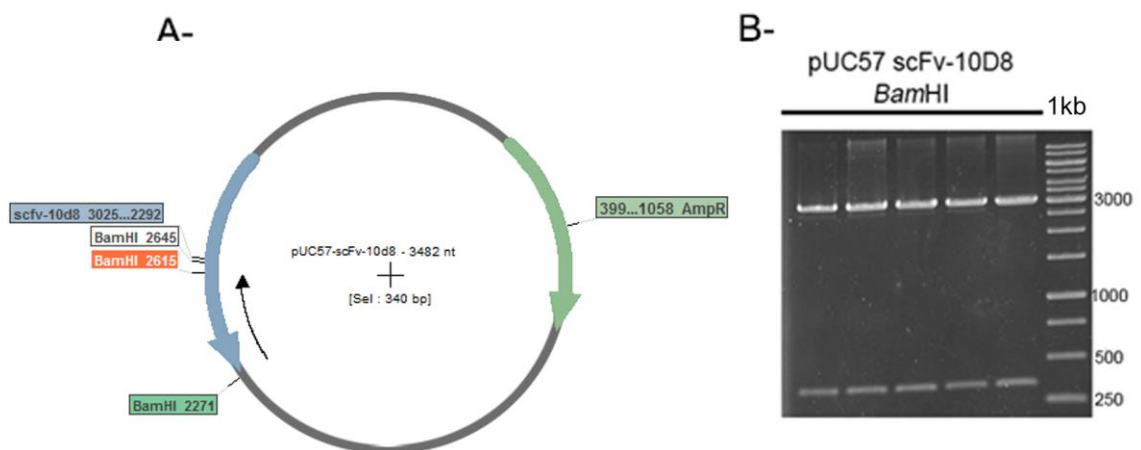


FIGURA 12: Confirmação de clones transformados com o vetor contendo o scFv-10D8.

FONTE: O autor, 2014

NOTA: A: Mapa de restrição do vetor pUC57-scFv-10D8 mostrando os sítios de *Bam*HI utilizados no corte do vetor contendo o gene do scFv-10D8. **B:** Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando o perfil esperado em todos os 5 clones analisados após o ensaio de restrição com *Bam*HI.

6.4. Análise da sequência deduzida do scFv-10D8

A sequência deduzida de aminoácidos do scFv-10D8 foi comparada e alinhada por homologia com sequências do banco de dados do IMGT e em seguida analisada com a ferramenta IMGT/Collier-de-Perles, que permite ao usuário analisar e desenhar representações gráficas bidimensionais de domínios variáveis de imunoglobulinas. Foram desenhadas as representações bidimensionais das cadeias leve e pesada e adicionado o peptídeo flexível na representação (Figura 13). De forma a preservar o interesse do nosso grupo de pesquisa no requerimento de patente, optou-se por ocultar as sequências de aminoácidos das regiões hipervariáveis (CDRs). Contudo, este fato não prejudica o andamento/conclusão do estudo.

Em seguida, a sequência de aminoácidos do scFv-10D8 foi analisada pelo algoritmo WAM (WHITELEGG E REES, 2000), ferramenta capaz de construir modelos tridimensionais de sequências variáveis de anticorpos usando uma combinação de métodos teóricos estabelecidos em conjunto com as informações estruturais de anticorpos mais recentes do banco de dados. Estes dados foram analisados e visualizados com o *software* PyMol (DeLano Scientific, San Carlos, Calif., USA). A estrutura tridimensional resultante é semelhante à de outros scFvs descritos na literatura, sendo possível observar a formação do sítio de ligação ao antígeno pelas CDRs e os resíduos de cisteínas conservados realizando ligações dissulfídicas, o que auxilia no correto enovelamento e estabilização da estrutura (Figura 14). Estes resultados sugerem que este anticorpo recombinante seja funcional.

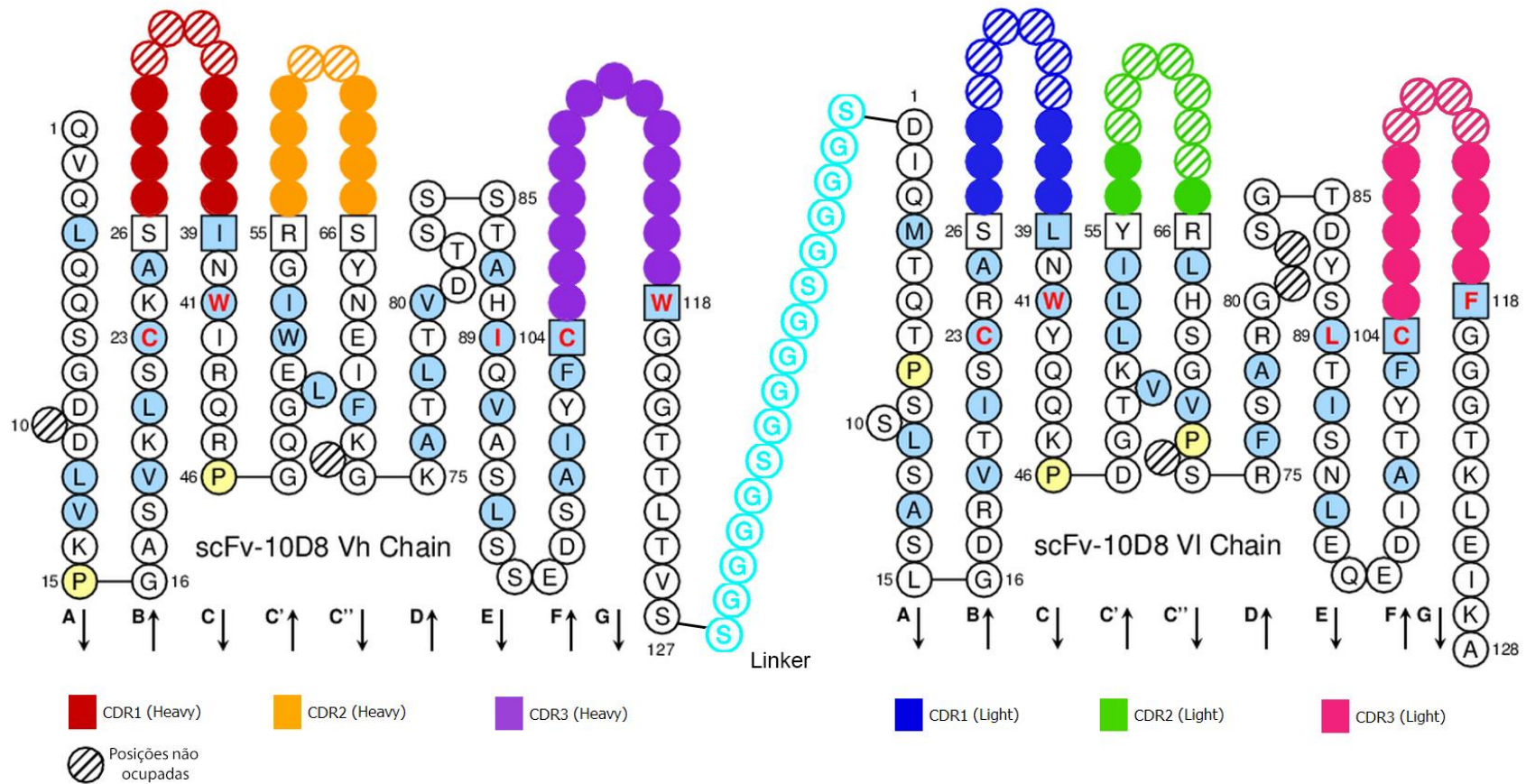


FIGURA 13: Representação bidimensional no formato colar de pérolas IMGT do gene do scFv-10D8 destacando as regiões hipervariáveis (CDRs) de cada cadeia.

FONTE: O autor, 2014

NOTA: Os resíduos de aminoácidos foram numerados de acordo com o padrão IMGT. Os resíduos destacados nas posições 23; 41; 89; 104 e 118 são conservados entre os domínios dos anticorpos. As esferas completamente preenchidas nas CDR correspondem a aminoácidos que foram ocultados e as esferas hachuradas são *gaps* que foram introduzidos para melhor alinhamento com as sequências de regiões variáveis depositadas.

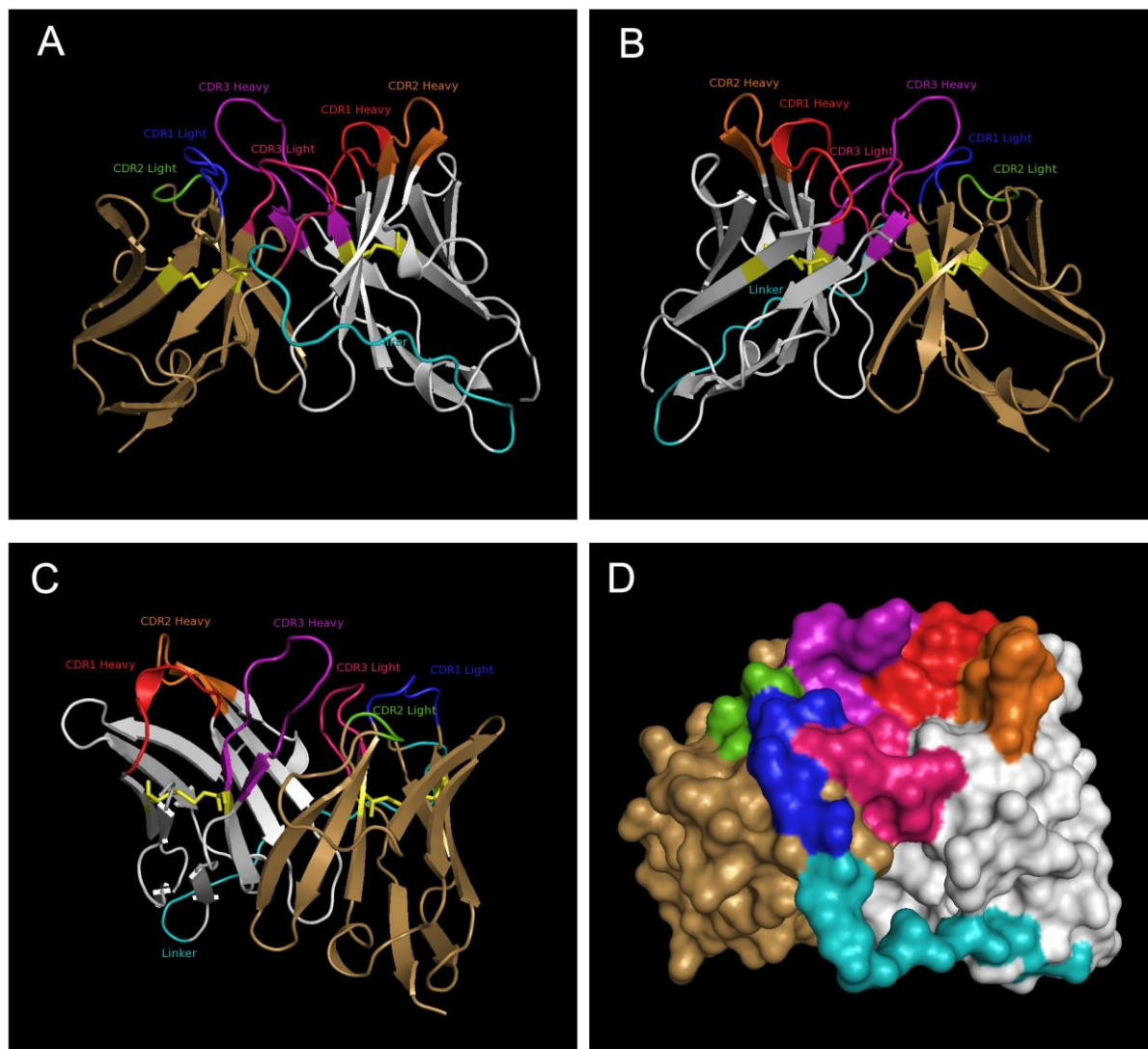


FIGURA 14: Estrutura tridimensional do scFv-10D8.

FONTE: O autor, 2014

NOTA: Em **A**, **B** e **C** estão representadas as estruturas destacando-se as α -hélices e folhas- β do scFv-10D8 em diferentes pontos de visão. Em amarelo estão representados os resíduos de cisteínas e as ligações dissulfídicas. **D**: Representação da superfície molecular do scFv-10D8.

6.5. Subclonagem do gene do scFv-10D8 e expressão em vetor pET22b

Após a síntese do fragmento correspondente ao scFv-10D8 no vetor pUC57, o fragmento foi transferido para o vetor pET22b nos sítios *Nco*I e *Not*I, de forma a gerar uma proteína de fusão com a sequência sinal pelB na porção terminal N e a cauda de 6xHis na porção terminal C. A confirmação dos clones obtidos em XL1Blue, foi feita por restrição enzimática com as enzimas *Nco*I e *Not*I (Figura 15). O vetor obtido foi denominado pET22b-scFv-10D8.

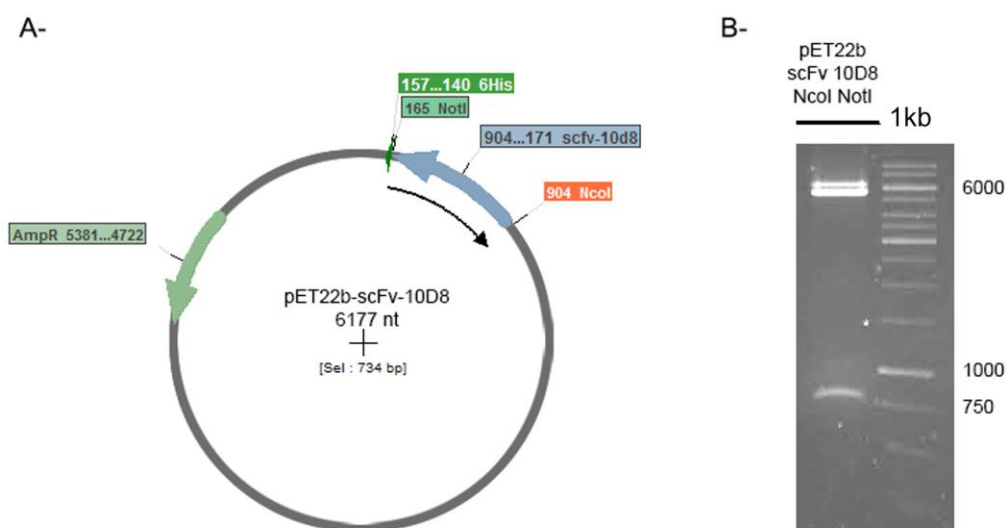


FIGURA 15: Subclonagem de scFv-10D8 em pET22b.

FONTE: O autor, 2014

NOTA: **A:** Esquema do vetor de expressão procariótico pET22b contendo a sequência de scFv-10D8. Os sítios de *NcoI* e *NotI* estão destacados no esquema. **B:** Diagnóstico da colônia transformante obtida. O DNA do clone obtido foi analisado por restrição enzimática utilizando as enzimas de restrição utilizadas na clonagem. O tamanho do fragmento *NcoI/NotI* é 734 pb.

A fim de realizar a análise funcional do scFv-10D8, foram conduzidos ensaios para a otimização da expressão utilizando o vetor pET22b-scFv-10D8. Nesses ensaios de expressão do scFv-10D8 visaram determinar as melhores condições para a obtenção desta molécula em condições de analisar sua funcionalidade, ou seja capacidade de ligação à gp35/50. Para tal, foram testados três diferentes meios de cultura para a expressão, sendo que o que apresentou melhor resultado foi a indução realizada em meio de cultura Luria Bertani, ou seja, o produto expresso foi detectado em maior quantidade no conteúdo periplasmático pelo anticorpo anti-histidina (Figura 16). Também foi feito um ensaio variando o tempo de expressão em meio LB (Figura 17), no qual é possível observar que entre os tempos de 3 e 6 horas há um maior acúmulo de produto expresso. Como controle negativo no ensaio de expressão variando os meios de cultura, foram feitos inóculos que não receberam o IPTG. Contudo, em todos os três controles negativos foram detectadas duas bandas proteicas correspondentes a um provável vazamento na expressão nesse sistema de indução. O tamanho dessas bandas corresponde à molécula do scFv-10D8 com e sem o peptídeo sinal que direciona o produto expresso ao periplasma da bactéria, local onde a proteína adquire a sua correta

conformação e o peptídeo sinal é removido. Nas amostras correspondentes ao citoplasma, a detecção do scFv-10D8 expresso foi mais forte que na fração do periplasma, observando-se a presença de duas bandas proteicas, sendo a mais forte a de menor peso molecular. Estes níveis de expressão têm sido relatados em outros trabalhos (LIM *et al.*, 2004; RIPPAMAN *et al.*, 1998).

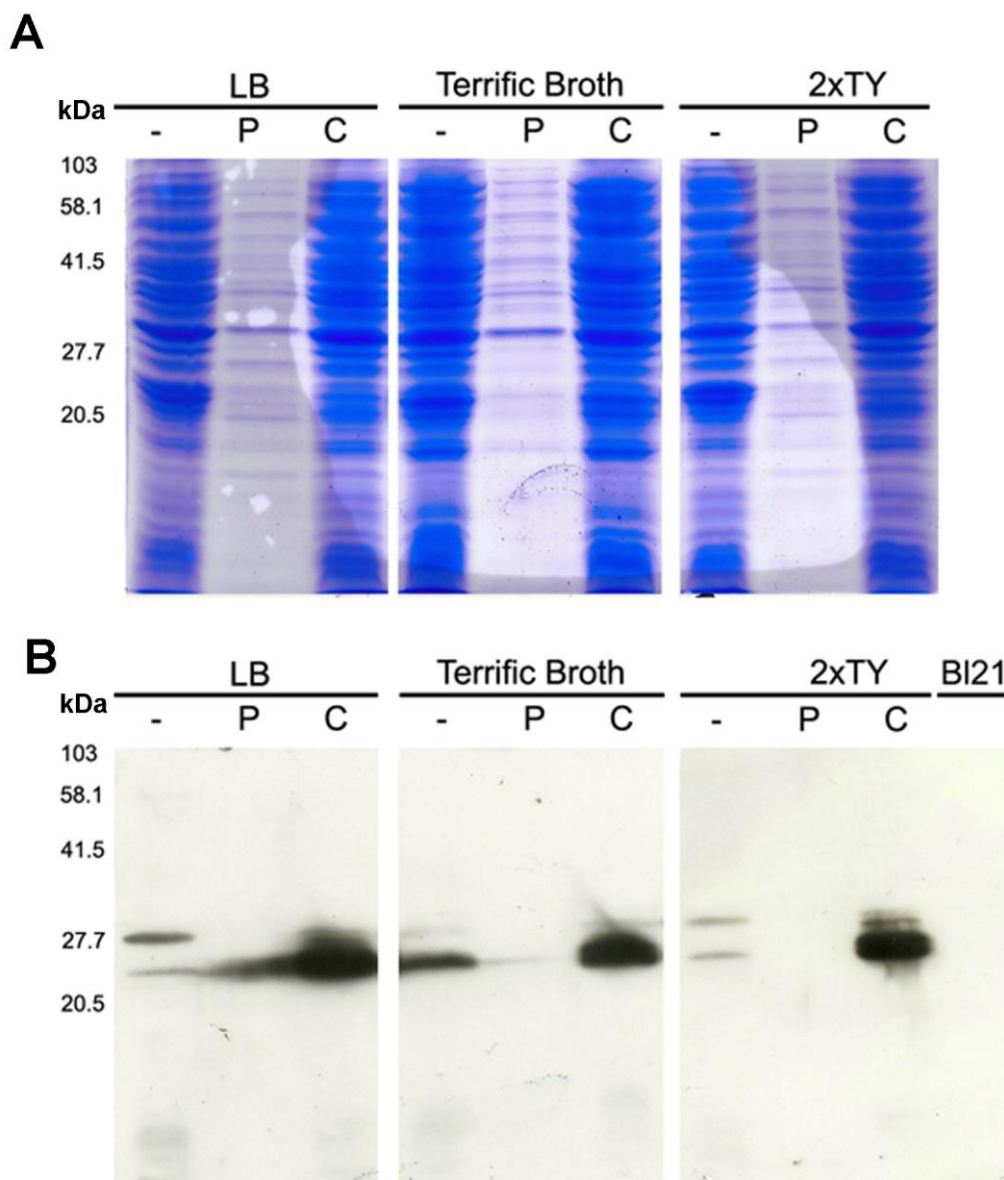


FIGURA 16: Efeito da composição do meio de cultura na taxa de expressão de scFv-10D8 no periplasma.

FONTE: O autor, 2014

NOTA: Coloração de Comassie (A) e *Western blotting* (B) do perfil de expressão do scFv-10D8 em 3 meios diferentes nas frações de periplasma (P), citoplasma (C), controle negativo sem agente indutor (-) e extrato total de uma cepa BL21 selvagem (BL21).

É possível que o método de extração do conteúdo periplasmático não tenha sido efetivo em causar a lise da parede bacteriana e grande parte do periplasma não tenha sido extraído. Portanto, decidimos realizar a lise das células bacterianas por pressão utilizando uma prensa francesa para a extração de todo o conteúdo solúvel, mesmo que parte do scFv-10D8 expresso seja possivelmente não funcional. Esses extratos foram destinados a ensaios funcionais no reconhecimento de proteínas do *T. cruzi*.

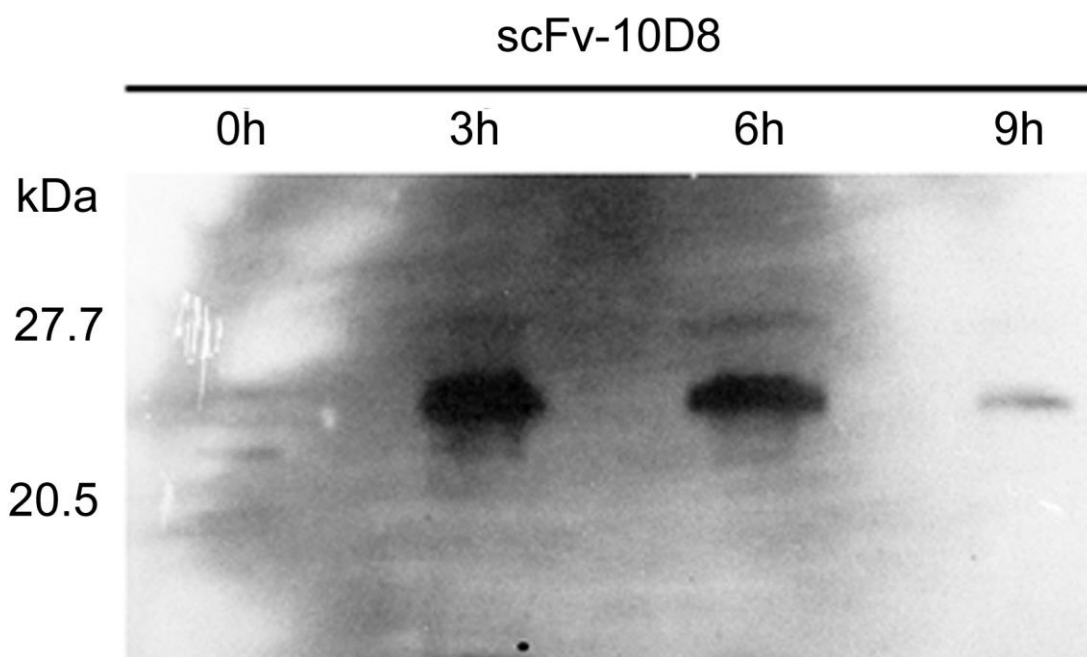


FIGURA 17: Efeito do tempo de indução na taxa de expressão de scFv-10D8 no periplasma

FONTE: O autor, 2014

NOTA: *Western blotting* do perfil de expressão do scFv-10D8 em meio Luria Bertani variando o tempo de indução.

Os extratos de periplasma e citoplasma obtidos após a expressão do scFv-10D8 foram testados quanto a capacidade de reconhecer glicoproteínas de superfície do *T. cruzi*. Semelhante ao descrito no item 6.1, foram utilizados parasitos da cepa G em fase estacionária, obtidos de culturas envelhecidas por 12 dias sem repique. Como controle positivo foi utilizado o anticorpo monoclonal 10D8 e como controles negativos foram utilizados o extrato de periplasma da expressão de um scFv direcionado a toxinas do veneno de *Loxocles sp.* (gentilmente cedido pela Profa. Larissa A. Magalhães) e somente anticorpo monoclonal anti-6xHis. O scFv-10D8 extraído do periplasma demonstrou um comportamento semelhante ao

monoclonal 10D8 (Figura 18) e maior do que o extrato do citoplasma, embora o scFv-10D8 extraído do periplasma tenha um reconhecimento menor pelo anticorpo anti-*His* comparado ao extraído do citoplasma (Figura 16). Os controles negativos não apresentaram reatividade frente às proteínas do *T. cruzi*.

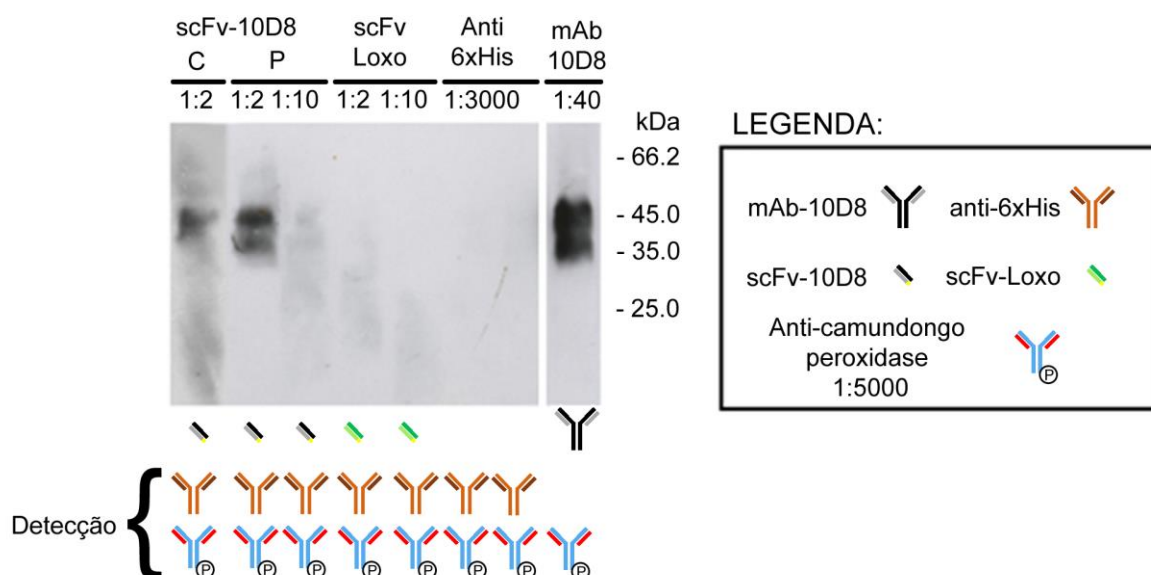


FIGURA 18: Comparação da reatividade do anticorpo recombinante scFv-10D8 e mAb-10D8.

FONTE: O autor, 2014

NOTA: *Western blotting* do perfil de reatividade do scFv-10D8 frente ao extrato proteico de parasito da cepa G de *T. cruzi* como descrito no item 5.20. As letras C e P indicam os extratos de citoplasma e periplasma da expressão do scFv-10D8, respectivamente. O controle negativo scFv *Loxo* reconhece toxinas de veneno de *Loxocles sp.*

O comportamento demonstrado pelo scFv-10D8 extraído do conteúdo periplasma em contraste com o controle negativo anti-toxina específico para *Loxocles* sugere que este seja realmente funcional e específico contra proteínas gp35/50 de *T. cruzi*, embora as diluições de mAb e scFv utilizadas tenham sido consideravelmente diferentes. A comparação da intensidade da reatividade de mAb-10D8 e o scFv-10D8 é dificultada, nesse momento, por se desconhecer as concentrações de ambos. Além disso, como destacado na parte inferior da figura 18, a detecção do reconhecimento tem uma diferença importante que é o uso de um e dois anticorpos na avaliação da atividade no mAb e scFv, respectivamente. Não se descarta ainda que mesmo que se teste a reatividade utilizando concentrações iguais dos dois, o nível de reatividade seja diferente. Ainda que o sistema de expressão em *E. coli* possa resultar em moléculas de scFv com eficiências *in vitro*

semelhantes aos mAbs de origem (MALEMBIC *et al.*, 2002), existem alternativas para a expressão com maior rendimento de scFvs funcionais em outros sistemas (RIPPMAN *et al.*, 1998). Estas alternativas poderão ser exploradas posteriormente, caso o scFv-10D8 demonstre atividade *in vivo* semelhante ou melhor ao mAb de origem.

6.6. Identificação do provável sítio de ligação de scFv-10D8 e gp35/50

Uma diferença estrutural entre as gp35/50 dos parasitos do grupo *Tcruzil* e os demais grupos é a presença de resíduos de galactofuranose na porção glicídica. Observando o reconhecimento diferencial do anticorpo monoclonal 10D8 dos parasitos do grupo *Tcruzil*, é provável que esses resíduos de galactofuranose participem no processo de interação entre anticorpo e antígeno (YOSHIDA, 2006). Segundo Acosta-Serrano *et al.*, (1995), os resíduos de galactopirranose e galactofuranose da mucina gp35/50 estão ligados a resíduos de n-acetilglucosamina pelos carbonos 4 e 6 desta molécula, respectivamente. Apesar de não termos a estrutura definida da porção glicídica de gp35/50, decidimos fazer testes preliminares de acoplamento *in silico* entre o scFv-10D8 e algumas moléculas construídas com esses resíduos glicídicos presentes na proteína gp35/50 (Figura 19). Várias interações preditas ocorreram em regiões que seriam espacialmente inacessíveis ou inexistentes no anticorpo monoclonal, como o espaço entre o *linker* e as cadeias leve e pesada do scFv-10D8. Entre as 10 ligações mais estáveis preditas para cada ligante e o scFv-10D8, estão listadas na tabela 2 aquelas que ocorrem no sítio de ligação ao antígeno por ordem de estabilidade. Comparando as predições de acoplamento com estudos similares, os resultados indicam boa estabilidade de ligação entre o scFv-10D8 e os ligantes testados (MATHEW e RAJ, 2009; PATEL *et al.*, 2012; KALADHAR *et al.*, 2011). Como as estruturas utilizadas no acoplamento não estão no contexto químico real, os resultados aqui apresentados são especulações quanto à interação. Experimentos adicionais precisam ser conduzidos para o correto refinamento dessas análises.

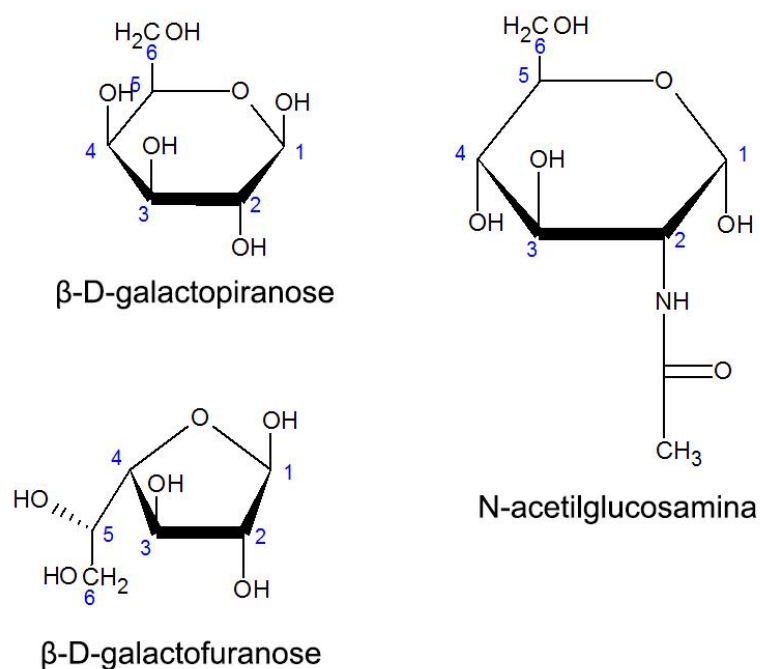


FIGURA 19: Estruturas dos carboidratos utilizados nos experimentos *in silico* de acoplamento.

FONTE: O autor, 2014

NOTA: Estas estruturas correspondem aos monossacarídeos utilizados na construção de ligantes para o ensaio de acoplamento *in silico* com o scFv-10D8, com base nas informações estruturais de gp35/50 publicadas por Acosta-Serrano *et al* (1995).

TABELA 2: Energias de acoplamento *in silico* entre moléculas glicídicas e scFv-10D8

Molécula	Energia total					
	1	2	3	4	5	6
Gal f	-184.6	-161.1	-159.3	-158.4	-152.2	-151.0
Gal f (β 1 \rightarrow 4)Nac	-229.8					
Gal p	-153.9	-153.5				
Gal p (β 1 \rightarrow 4)Nac	-204.0					
Gal p (β 1 \rightarrow 6)Nac	-208.4					
Gal f (β 1 \rightarrow 4) Gal p (β 1 \rightarrow 6)Nac	-216.3					

Legenda:

Gal p : β -D-galactopirranose;

Gal f : β -D-galactofuranose;

Nac : n-acetilglucosamina;

(β 1 \rightarrow 6) – ligação β 1-6; (β 1 \rightarrow 4) – ligação β 1-4

Cabe ressaltar que as 4 ligações mais estáveis entre β -D-galactofuranose e o scFv-10D8 ocorrem no sítio de ligação ao antígeno, e a interação de β -D-galactofuranose(1 \rightarrow 4)n-acetilglucosamina [Gal f (β 1 \rightarrow 4)Nac] com o sítio de ligação ao antígeno do scFv-10D8 foi a mais estável entre todas as moléculas testadas(Tabela 2). É importante salientar que houveram outras duas ligações mais estáveis para a Gal f (β 1 \rightarrow 4)Nac, entretanto estas ocorreram no espaço entre o *linker* e as cadeias pesadas do scFv-10D8. Caso esta interação exista *in vivo* pode ser dada por outros resíduos presentes na molécula nativa do anticorpo que foram aqui mimetizadas pelo *linker*. Os dados das interações entre o scFv-10D8 e as moléculas glicídicas indicam que o mAb-10D8 aparenta ter afinidade por oligossacarídeos contendo resíduos de galactofuranose e reforça os dados da literatura sobre a composição estrutural da gp35/50. A figura 20 mostra o provável sítio de interação do scFv-10D8 e a Gal f (β 1 \rightarrow 4)Nac.

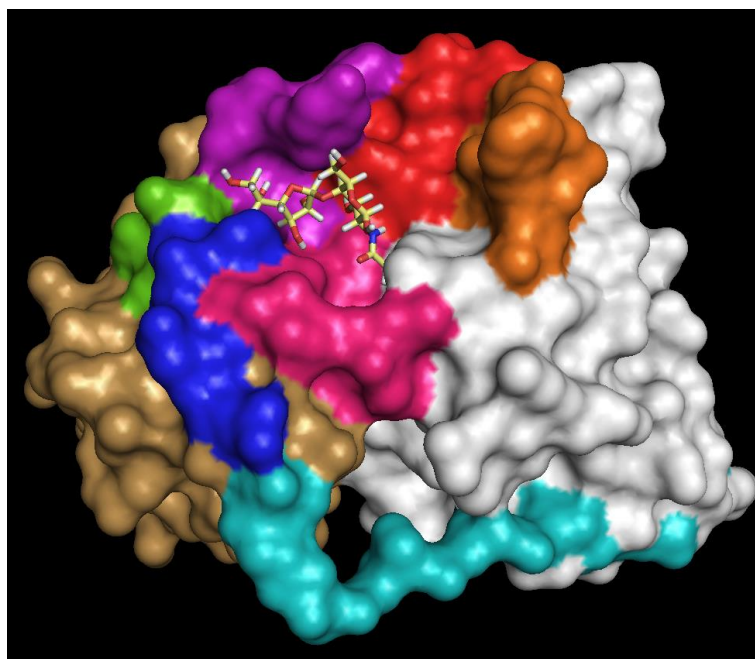


FIGURA 20: Provável sítio de interação entre o scFv-10D8 e a β -D-galactofuranose(1-4)n-acetilglucosamina.

FONTE: O autor, 2014

NOTA: Modelo obtido *in silico* com a ligação mais estável entre as duas moléculas no software Hex 8.0. A molécula glicídica está representada pelo modelo de esferas e varetas, enquanto o scFv-10D8 está representado pelo modelo de superfície para melhor visualização do sítio de ligação ao antígeno.

6.7. Obtenção de parasitos fluorescentes para avaliação do reconhecimento e bloqueio da infecção por scFv-10D8

Para facilitar as futuras análises de eficiência do scFv-10D8 no bloqueio de invasão celular do *T. cruzi in vivo*, decidimos obter parasitos que expressam o gene repórter da proteína vermelho fluorescente (RFP) e proteína fluorescente verde (GFP). Para tanto, parasitos do clone CL Brener foram transfectados com o vetor pTREXn-RFP Neo e selecionados para a resistência a G418. Após a seleção com o antibiótico dos parasitos transfectados, o perfil de fluorescência da população foi quantificado em aproximadamente 50% por citometria de fluxo. Diante da baixa taxa de fluorescência foi realizada a clonagem por diluição limitante e três clones foram obtidos. Esses clones apresentaram valores de fluorescência satisfatórios (>90%). Os parasitos foram visualizados em microscópio de fluorescência (Figura 21).

Nosso grupo já havia obtido anteriormente parasitos das cepas/clones G, Y e Sylvio X10 que expressam a proteína verde fluorescente. Esses parasitos em conjunto permitirão a rápida análise/quantificação de ensaios de bloqueio de função da gp35/50 na invasão celular, favorecendo a avaliação da seletividade do scFv-10D8 num mesmo ensaio. Será interessante comparar diferentes cepas, uma vez que o mAb-10D8 reconhece diferencialmente as gp35/50 da cepa Y e do clone CL Brener.

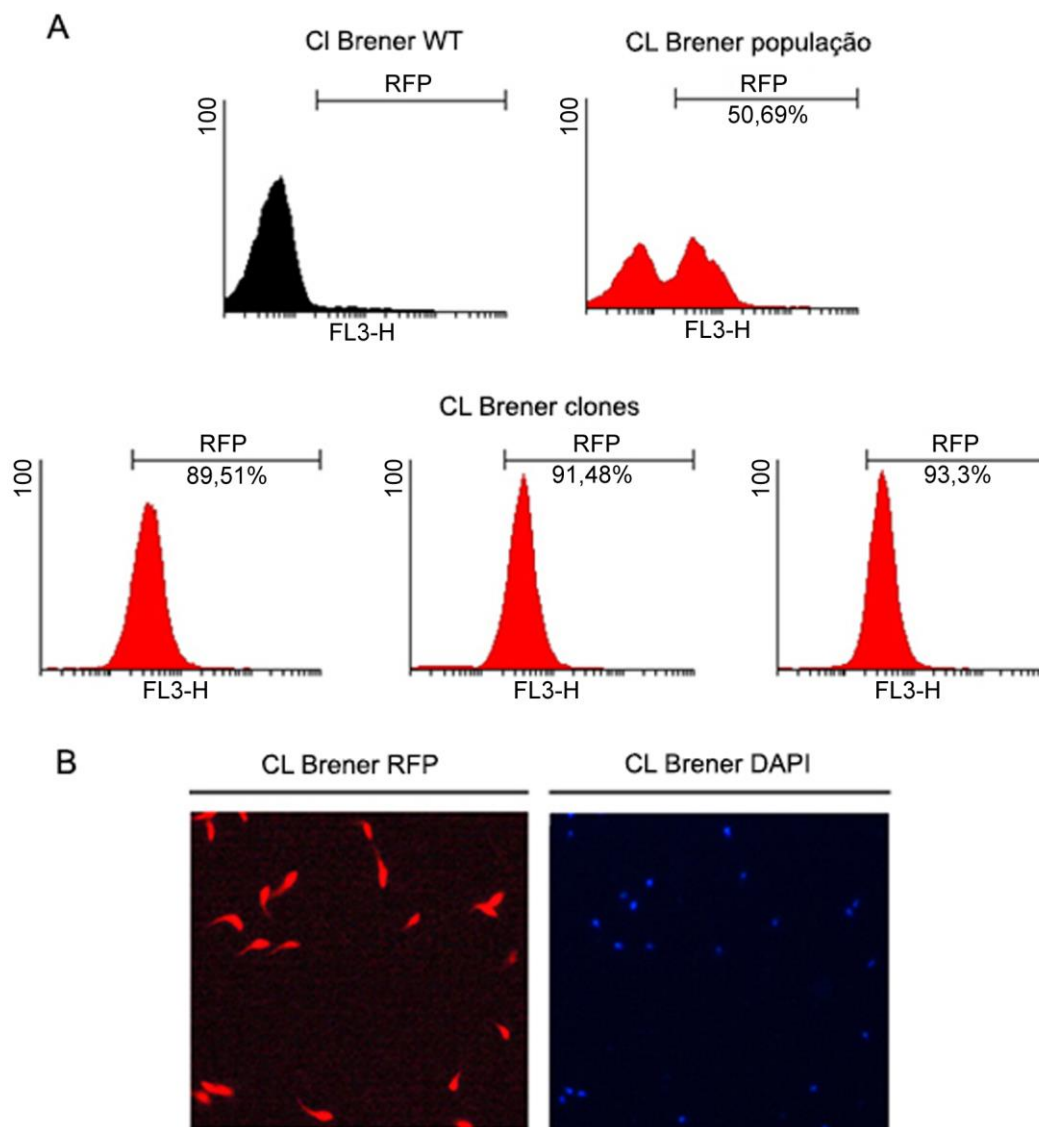


FIGURA 21: Padrão de fluorescência dos parasitos carregando pTREXn-RFP Neo.

FONTE: O autor, 2014

NOTA: A: Histograma mostrando a fluorescência parcial de parasitos do clone CL Brener transfectados com o gene da proteína vermelho fluorescente (RFP) não clonados e aumento da fluorescência após a clonagem. Parasitos da cepa CL selvagens (CL WT) foram utilizados como branco para determinar a taxa de fluorescência. **B:** Microscopia de fluorescência mostrando um dos clones obtidos após a clonagem.

7. CONCLUSÕES

- Neste trabalho foi obtido pela tecnologia de anticorpos recombinantes, a partir RNA total de hibridoma 10D8, um anticorpo de cadeia única anti-gp35/50 de *T. cruzi*. Após algumas variações nas condições de expressão, foi possível obter o scFv-10D8 que demonstrou atividade funcional *in vitro* semelhante ao anticorpo monoclonal de origem em ensaios de *Western blotting*.
- As análises *in silico* permitiram obter informações sobre o sitio de interação dos anticorpos e inferir quais resíduos participam da ligação do antígeno ao anticorpo.
- Os níveis de expressão da molécula do scFv-10D8 no sistema escolhido são semelhantes aos descritos na literatura. Contudo, sistemas de expressão alternativos devem ser explorados com intuito de promover uma maior eficiência na produção deste anticorpo.
- O scFv-10D8 poderá ser empregado no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e de diagnósticos caso esta molécula matenha as características apresentadas pelo mAb-10D8 *in vivo*.
- Por fim, foram obtidos parasitos que expressam gene repórter da proteína vermelho fluorescente, que servirão na avaliação funcional do scFv-10D8 na invasão celular pelo *T. cruzi*.

8. PERSPECTIVAS

Os resultados deste trabalho poderão ser enriquecidos com uma série de experimentos, alguns dos quais já estão em execução, como a caracterização funcional *in vivo* do scFv-10D8 em ensaios de bloqueio de invasão de monocamadas de células e expressão do scFv em outras configurações.

Existe o interesse também na avaliação do scFv-10D8 na redução da parasitemia em camundongos, semelhante ao que já foi realizado com o mAb-10D8.

O scFv-10D8 poderá ainda ser conjugado à superfície de lipossomas carreadores de drogas tripanosomicidas na criação de um sistema de “entrega” semelhante ao que vem sendo realizado em outras patologias.

Por fim, já estão sendo obtidos em colaboração com a Dra. Nobuko Yoshida, os extratos de RNA totais de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais que reconhecem outras glicoproteínas de superfície do *T. cruzi* para a produção de outros anticorpos de cadeia única.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUIN, G. *et al.* A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* involved in cell invasion (Tc-85) is heterogeneous in expression and molecular constitution. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 35, n. 3, p. 229–237, jul. 1989.
- ALEX, M. J.; NIXON, R. N. Docking Studies on Anticancer Drugs for Breast Cancer Using Hex. **Proceedings of the International MultiConference of Engineers and Computer Scientists**, v. I, p. 18–21, 2009.
- ALSFORD, S. *et al.* Genetic dissection of drug resistance in trypanosomes. **Parasitology**, v. 140, n. 12, p. 1478–1491, out. 2013.
- ALVES, M. J. *et al.* Partial inhibition of trypomastigote entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 21, n. 1, p. 75–82, out. 1986.
- ALVES, M. J. M.; COLLI, W. Role of the gp85/trans-sialidase superfamily of glycoproteins in the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host structures. **Sub-cellular biochemistry**, v. 47, p. 58–69, 2008.
- ANDRADE, S. G. *et al.* [Reaction of the *Trypanosoma cruzi* strain to the experimental therapeutical response to Bay 2502 (results of long term treatment)]. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 17, n. 6, p. 380–389, 1975.
- ANDRADE, S, G. Biodemas, zimodemas e esquizodemas: sua relação com a Patologia da doença de Chagas. In: Coura JR (editor). *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.
- ARAYA, J. E. *et al.* Cloning and characterization of a gene for the stage-specific 82-kDa surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 65, n. 1, p. 161–169, maio 1994.
- ARGOS, P. An investigation of oligopeptides linking domains in protein tertiary structures and possible candidates for general gene fusion. **Journal of molecular biology**, v. 211, n. 4, p. 943–958, fev. 1990.
- BASTOS, I. M. D. *et al.* Molecular, functional and structural properties of the prolyl oligopeptidase of *Trypanosoma cruzi* (POP Tc80), which is required for parasite entry into mammalian cells. **The Biochemical journal**, v. 388, n. Pt 1, p. 29–38, maio 2005.
- BERN, C. *et al.* Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review. **JAMA**, v. 298, n. 18, p. 2171–2181, nov. 2007.
- BETTER, M. *et al.* Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment. **Science (New York, N.Y.)**, v. 240, n. 4855, p. 1041–1043, maio 1988.

BOSS, M. A. *et al.* Assembly of functional antibodies from immunoglobulin heavy and light chains synthesised in *E. coli*. **Nucleic acids research**, v. 12, n. 9, p. 3791–3806, maio 1984.

BRENER, Z. Present status of chemotherapy and chemoprophylaxis of human trypanosomiasis in the Western Hemisphere. **Pharmacology & therapeutics**, v. 7, n. 1, p. 71–90, 1979.

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **International archives of allergy and immunology**, v. 114, n. 2, p. 103–110, out. 1997.

BUSCAGLIA, C. A. *et al.* The surface coat of the mammal-dwelling infective trypomastigote stage of *Trypanosoma cruzi* is formed by highly diverse immunogenic mucins. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 16, p. 15860–15869, abr. 2004.

BUSCAGLIA, C. A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nature reviews. Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 229–236, mar. 2006.

BUSCAGLIA, C. A.; DI NOIA, J. M. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 5, n. 5, p. 419–427, abr. 2003.

CABILLY, S. *et al.* Generation of antibody activity from immunoglobulin polypeptide chains produced in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 11, p. 3273–3277, jun. 1984.

CAMPO, V. *et al.* Differential accumulation of mutations localized in particular domains of the mucin genes expressed in the vertebrate host stage of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 133, n. 1, p. 81–91, jan. 2004.

CAMPOS, S. V. *et al.* Risk factors for Chagas' disease reactivation after heart transplantation. **The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation**, v. 27, n. 6, p. 597–602, jun. 2008.

CAZZULO, J. J. *et al.* Further characterization and partial amino acid sequence of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 33, n. 1, p. 33–41, fev. 1989.

CAZZULO, J. J. *et al.* Some kinetic properties of a cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1037, n. 2, p. 186–191, fev. 1990.

CENCIG, S. *et al.* Parasitic loads in tissues of mice infected with *Trypanosoma cruzi* and treated with AmBisome. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 6, p. e1216, jun. 2011.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 1909.

CHOO, A. B. H. *et al.* Soluble expression of a functional recombinant cytolytic immunotoxin in insect cells. **Protein expression and purification**, v. 24, n. 3, p. 338–347, abr. 2002.

CLACKSON, T. *et al.* Making antibody fragments using phage display libraries. **Nature**, v. 352, n. 6336, p. 624–628, ago. 1991.

COLCHER, D. *et al.* Pharmacokinetics and biodistribution of genetically-engineered antibodies. **The quarterly journal of nuclear medicine : official publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN) [and] the International Association of Radiopharmacology (IAR)**, v. 42, n. 4, p. 225–241, dez. 1998.

COVARRUBIAS, C. *et al.* Interaction with host factors exacerbates *Trypanosoma cruzi* cell invasion capacity upon oral infection. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 14, p. 1609–1616, dez. 2007.

CUESTA, A. M. *et al.* Multivalent antibodies: when design surpasses evolution. **Trends in biotechnology**, v. 28, n. 7, p. 355–362, jul. 2010.

DADACHOVA, E. *et al.* Ionizing radiation delivered by specific antibody is therapeutic against a fungal infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 19, p. 10942–10947, set. 2003.

DADACHOVA, E. *et al.* Targeted killing of virally infected cells by radiolabeled antibodies to viral proteins. **PLoS medicine**, v. 3, n. 11, p. e427, nov. 2006.

DAI, K.; ZHU, H.; RUAN, C. Generation and characterization of recombinant single chain Fv antibody that recognizes platelet glycoprotein Iba α . **Thrombosis research**, v. 109, n. 2-3, p. 137–144, jan. 2003.

DE MEIRELLES, M. N.; DE ARAUJO JORGE, T. C.; DE SOUZA, W. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with macrophages in vitro: dissociation of the attachment and internalization phases by low temperature and cytochalasin B. **Zeitschrift für Parasitenkunde (Berlin, Germany)**, v. 68, n. 1, p. 7–14, 1982.

DENG, X. K.; NESBIT, L. A.; MORROW, K. J. J. Recombinant single-chain variable fragment antibodies directed against *Clostridium difficile* toxin B produced by use of an optimized phage display system. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 10, n. 4, p. 587–595, jul. 2003.

DEVERA, R.; FERNANDES, O.; COURA, J. R. Should *Trypanosoma cruzi* be called “cruzi” complex? a review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 1, p. 1–12, jan. 2003.

DI NOIA, J. M. *et al.* AU-rich elements in the 3'-untranslated region of a new mucin-type gene family of *Trypanosoma cruzi* confers mRNA instability and modulates translation efficiency. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 14, p. 10218–10227, abr. 2000.

DI NOIA, J. M.; SANCHEZ, D. O.; FRASCH, A. C. The protozoan *Trypanosoma cruzi* has a family of genes resembling the mucin genes of mammalian cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 41, p. 24146–24149, out. 1995.

DIAZ, J. H. Chagas disease in the United States: a cause for concern in Louisiana? **The Journal of the Louisiana State Medical Society: official organ of the Louisiana State Medical Society**, v. 159, n. 1, p. 21–23, 25–29, 2007.

DOCAMPO, R. *et al.* Intracellular Ca²⁺ storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. **The Biochemical journal**, v. 310 (Pt 3, p. 1005–1012, set. 1995.

DUAN, L.; POMERANTZ, R. J. Elimination of endogenous aberrant kappa chain transcripts from sp2/0-derived hybridoma cells by specific ribozyme cleavage: utility in genetic therapy of HIV-1 infections. **Nucleic acids research**, v. 22, n. 24, p. 5433–5438, dez. 1994.

FAVORETO, S. J.; DORTA, M. L.; YOSHIDA, N. *Trypanosoma cruzi* 175-kDa protein tyrosine phosphorylation is associated with host cell invasion. **Experimental parasitology**, v. 89, n. 2, p. 188–194, jun. 1998.

FIELDS, C. *et al.* Creation of recombinant antigen-binding molecules derived from hybridomas secreting specific antibodies. **Nature protocols**, v. 8, n. 6, p. 1125–1148, jun. 2013.

FINLAY, W. J. J. *et al.* Generation of high-affinity chicken single-chain Fv antibody fragments for measurement of the *Pseudonitzschia pungens* toxin domoic acid. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 5, p. 3343–3349, maio 2006.

FRASCH, A. C. Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology today (Personal ed.)**, v. 16, n. 7, p. 282–286, jul. 2000.

FURUTA, M. *et al.* Construction of mono- and bivalent human single-chain Fv fragments against the D antigen in the Rh blood group: multimerization effect on cell agglutination and application to blood typing. **Protein engineering**, v. 11, n. 3, p. 233–241, mar. 1998.

GALEFFI, P. *et al.* Functional expression of a single-chain antibody to ErbB-2 in plants and cell-free systems. **Journal of translational medicine**, v. 4, p. 39, 2006.

GASCON, J. *et al.* [Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' heart disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic]. **Enfermedades infecciosas y microbiología clinica**, v. 26, n. 2, p. 99–106, fev. 2008.

GHOORAH, A. W. *et al.* Protein docking using case-based reasoning. **Proteins**, v. 81, n. 12, p. 2150–2158, dez. 2013.

GIORDANO, R. *et al.* Cloning of a surface membrane glycoprotein specific for the infective form of *Trypanosoma cruzi* having adhesive properties to laminin. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 6, p. 3461–3468, fev. 1999.

GIORDANO, R. *et al.* *Trypanosoma cruzi* binds to laminin in a carbohydrate-independent way. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]**, v. 27, n. 9, p. 2315–2318, set. 1994.

GLOCKSHUBER, R. *et al.* A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments. **Biochemistry**, v. 29, n. 6, p. 1362–1367, fev. 1990.

GRAM, H. *et al.* In vitro selection and affinity maturation of antibodies from a naive combinatorial immunoglobulin library. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 8, p. 3576–3580, abr. 1992.

GRELLIER, P. *et al.* *Trypanosoma cruzi* prolyl oligopeptidase Tc80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 50, p. 47078–47086, dez. 2001.

GRIFFITHS, A. D.; DUNCAN, A. R. Strategies for selection of antibodies by phage display. **Current opinion in biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 102–108, fev. 1998.

GUO, J.-Q. *et al.* Construction and high-level expression of a single-chain Fv antibody fragment specific for acidic isoferritin in *Escherichia coli*. **Journal of biotechnology**, v. 102, n. 2, p. 177–189, abr. 2003.

HERRERA, E. M. *et al.* Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by heparan sulfate receptors on host cells and penetrin counter-receptors on the trypanosomes. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 65, n. 1, p. 73–83, maio 1994.

HO, M.; NAGATA, S.; PASTAN, I. Isolation of anti-CD22 Fv with high affinity by Fv display on human cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 25, p. 9637–9642, jun. 2006.

HORTON, R. M. *et al.* Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. **Gene**, v. 77, n. 1, p. 61–68, abr. 1989.

HOTEZ, P. J. *et al.* The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 2, n. 9, p. e300, 2008.

HUDSON, P. J.; KORTT, A. A. High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies. **Journal of immunological methods**, v. 231, n. 1-2, p. 177–189, dez. 1999.

HUST, M. *et al.* Single chain Fab (scFab) fragment. **BMC biotechnology**, v. 7, p. 14, 2007.

HUSTON, J. S. *et al.* Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins. **Methods in enzymology**, v. 203, p. 46–88, 1991.

HUSTON, J. S. *et al.* Single-chain Fv radioimmunotargeting. **The quarterly journal of nuclear medicine : official publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN) [and] the International Association of Radiopharmacology (IAR)**, v. 40, n. 3, p. 320–333, set. 1996.

JACOBS, T.; ERDMANN, H.; FLEISCHER, B. Molecular interaction of Siglecs (sialic acid-binding Ig-like lectins) with sialylated ligands on *Trypanosoma cruzi*. **European journal of cell biology**, v. 89, n. 1, p. 113–116, jan. 2010.

KALADHAR, D. S. *et al.* Predicting Molecular Interactions in Silico: Hhex - Drug Docking Approaches in D2M. **Journal of Advanced Bioinformatics Applications and Research**, v. 2, n. 3, p. 177–182, 2011.

KESHET, E.; BEN-SASSON, S. A. Anticancer drug targets: approaching angiogenesis. **The Journal of clinical investigation**, v. 104, n. 11, p. 1497–1501, dez. 1999.

KIM, K. M. *et al.* Anti-CD30 diabody-drug conjugates with potent antitumor activity. **Molecular cancer therapeutics**, v. 7, n. 8, p. 2486–2497, ago. 2008.

KLEIN, M. *et al.* Procaryotic Expression of Single-Chain Variable-Fragment (scFv) Antibodies: Secretion in L-Form Cells of. **Applied and environmental microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4862–4869, 1998.

KLIMKA, A. *et al.* Human anti-CD30 recombinant antibodies by guided phage antibody selection using cell panning. **British journal of cancer**, v. 83, n. 2, p. 252–260, jul. 2000.

KOBAYASHI, N. *et al.* Generation of a single-chain Fv fragment for the monitoring of deoxycholic acid residues anchored on endogenous proteins. **Steroids**, v. 70, n. 4, p. 285–294, abr. 2005.

KONTERMANN, R. E.; MULLER, R. Intracellular and cell surface displayed single-chain diabodies. **Journal of immunological methods**, v. 226, n. 1-2, p. 179–188, jun. 1999.

KUAN, C.-T. *et al.* Recombinant single-chain variable fragment antibodies against extracellular epitopes of human multidrug resistance protein MRP3 for targeting malignant gliomas. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 127, n. 3, p. 598–611, ago. 2010.

LAKE, D. F. *et al.* Molecular cloning, expression and mutagenesis of an anti-insulin single chain Fv (scFv). **Molecular immunology**, v. 31, n. 11, p. 845–856, ago. 1994.

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

LILIA ROMERO, E.; MORILLA, M. J. Topical and mucosal liposomes for vaccine delivery. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 3, n. 4, p. 356–375, 2011.

LILLEY, G. G. *et al.* Recombinant single-chain antibody peptide conjugates expressed in *Escherichia coli* for the rapid diagnosis of HIV. **Journal of immunological methods**, v. 171, n. 2, p. 211–226, maio 1994.

LIM, K.-P.; LI, H.; NATHAN, S. Expression and purification of a recombinant scFv towards the exotoxin of the pathogen, *Burkholderia pseudomallei*. **Journal of microbiology (Seoul, Korea)**, v. 42, n. 2, p. 126–132, jun. 2004.

LIU, J. *et al.* Improvement of tumor targeting and antitumor activity by a disulphide bond stabilized diabody expressed in *Escherichia coli*. **Cancer immunology, immunotherapy : CII**, v. 58, n. 11, p. 1761–1769, nov. 2009.

LUK, J. M.; WONG, K.-F. Monoclonal antibodies as targeting and therapeutic agents: prospects for liver transplantation, hepatitis and hepatocellular carcinoma. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 33, n. 5-6, p. 482–488, 2006.

LUO, D. *et al.* VI-linker-Vh orientation-dependent expression of single chain Fv-containing an engineered disulfide-stabilized bond in the framework regions. **Journal of biochemistry**, v. 118, n. 4, p. 825–831, out. 1995.

MACEDO, A. M. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 1, p. 1–12, fev. 2004.

MAGDESIAN, M. H. *et al.* Infection by *Trypanosoma cruzi*. Identification of a parasite ligand and its host cell receptor. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 22, p. 19382–19389, jun. 2001.

MALEMBIC, S. *et al.* Effect of polyclonal, monoclonal, and recombinant (single-chain variable fragment) antibodies on in vitro morphology, growth, and metabolism of the phytopathogenic mollicute *Spiroplasma citri*. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2113–2119, maio 2002.

MARASCO; S, D. J. Antibodies for targeted gene therapy: extracellular gene targeting and intracellular expression. **Advanced drug delivery reviews**, v. 31, n. 1-2, p. 153–170, abr. 1998.

MARCHIORI, P. E. *et al.* Late reactivation of Chagas' disease presenting in a recipient as an expansive mass lesion in the brain after heart transplantation of chagasic myocardopathy. **The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation**, v. 26, n. 11, p. 1091–1096, nov. 2007.

MARTIN, C. D. *et al.* A simple vector system to improve performance and utilisation of recombinant antibodies. **BMC biotechnology**, v. 6, p. 46, 2006.

MARTÍNEZ-DÍAZ, R. A. *et al.* Biological Characterization of *Trypanosoma cruzi* Strains. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. January, p. 53–59, 2001.

MCCAFFERTY, J. *et al.* Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. **Nature**, v. 348, n. 6301, p. 552–554, dez. 1990.

MEJIA, A. M. *et al.* Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi* is a readily acquired trait that can arise independently in a single population. **The Journal of infectious diseases**, v. 206, n. 2, p. 220–228, jul. 2012.

MILENIC, D. *et al.* Radioimmunotherapy of human colon carcinoma xenografts using a ²¹³Bi-labeled domain-deleted humanized monoclonal antibody. **Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals**, v. 19, n. 2, p. 135–147, abr. 2004.

MORTARA, R. A. *et al.* Polymorphism of the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes. **Infection and immunity**, v. 60, n. 11, p. 4673–4678, nov. 1992.

MURTA, S. M. F. *et al.* Differential gene expression in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. **Acta tropica**, v. 107, n. 1, p. 59–65, jul. 2008.

NEIRA, I.; FERREIRA, A. T.; YOSHIDA, N. Activation of distinct signal transduction pathways in *Trypanosoma cruzi* isolates with differential capacity to invade host cells. **International journal for parasitology**, v. 32, n. 4, p. 405–414, abr. 2002.

NELLIS, D. F. *et al.* Preclinical manufacture of an anti-HER2 scFv-PEG-DSPE, liposome-inserting conjugate. 1. Gram-scale production and purification. **Biotechnology progress**, v. 21, n. 1, p. 205–220, 2005.

NOGUEIRA, N. Host and parasite factors affecting the invasion of mononuclear phagocytes by *Trypanosoma cruzi*. **Ciba Foundation symposium**, v. 99, p. 52–73, 1983.

OUAISSI, M. A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection inhibited by peptides modeled from a fibronectin cell attachment domain. **Science (New York, N.Y.)**, v. 234, n. 4776, p. 603–607, out. 1986.

PAIVA, C. N. *et al.* High expression of a functional cruzipain by a non-infective and non-pathogenic *Trypanosoma cruzi* clone. **Parasitology**, v. 117 (Pt 5, p. 483–490, nov. 1998.

PATEL, U. . *et al.* Docking studies of pyrrole derivatives using Hex. **International Journal of Environmental Sciences**, v. 2, n. 3, p. 1765–1770, 2012.

PEREIRA, M. E. *et al.* Invasive phenotype of *Trypanosoma cruzi* restricted to a population expressing trans-sialidase. **Infection and immunity**, v. 64, n. 9, p. 3884–92, 1996.

PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. *et al.* Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti-alpha-galactosyl antibodies. **Journal of cell science**, v. 113 (Pt 7, p. 1299–1307, 2000.

PEREZ, L. *et al.* A multivalent recombinant antibody fragment specific for carcinoembryonic antigen. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 43, n. 1, p. 39–48, 2006.

POUNGPAIR, O. *et al.* Generation of human single-chain variable fragment antibodies specific to dengue virus non-structural protein 1 that interfere with the virus infectious cycle. **mAbs**, v. 6, n. 2, p. 474–482, 2014.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 1, n. 2, p. 92–100, set. 2001.

PREVIATO, J. *et al.* Incorporation of sialic acid into *Trypanosoma cruzi* macromolecules. A proposal for a new metabolic route. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 16, n. 1, p. 85–96, jun. 1985.

PRIOLI, R. P.; MEJIA, J. S.; PEREIRA, M. E. Monoclonal antibodies against *Trypanosoma cruzi* neuraminidase reveal enzyme polymorphism, recognize a subset of trypomastigotes, and enhance infection in vitro. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 144, n. 11, p. 4384–4391, jun. 1990.

RAMIREZ, M. I. *et al.* Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. **Infection and immunity**, v. 61, n. 9, p. 3636–41, 1993.

RASSI, J. *et al.* Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease. **Heart**, v. 95, p. 524–534, 2009.

RAVN, P. *et al.* Multivalent scFv display of phagemid repertoires for the selection of carbohydrate-specific antibodies and its application to the Thomsen-Friedenreich antigen. **Journal of molecular biology**, v. 343, n. 4, p. 985–96, 29 out. 2004.

REY L. Parasitologia. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

ROBINSON, D. R.; GULL, K. Basal body movements as a mechanism for mitochondrial genome segregation in the trypanosome cell cycle. **Nature**, v. 352, n. 6337, p. 731–733, 22 ago. 1991.

ROGOZIN, I. B.; SOLOVYOV, V. V.; KOLCHANOV, N. A. Somatic hypermutagenesis in immunoglobulin genes. I. Correlation between somatic mutations and repeats. Somatic mutation properties and clonal selection. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression**, v. 1089, n. 2, p. 175–182, jun. 1991.

ROSESTOLATO, C. T. F. *et al.* Participation of host cell actin filaments during interaction of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* with host cells. **Cell structure and function**, v. 27, n. 2, p. 91–98, 2002.

RUIZ, R. C. *et al.* Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity. **The Biochemical journal**, v. 330 (Pt 1, p. 505–11, 1998.

RUIZ, R. DE C. *et al.* The 35/50 kDa surface antigen of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes, an adhesion molecule involved in host cell invasion. **Parasite Immunology**, v. 15, n. 2, p. 121–125, 1993.

SAKAI, K. *et al.* Isolation and Characterization of Phage-Displayed Single Chain Antibodies Recognizing Nonreducing Terminal Mannose Residues. 1. A New Strategy for Generation of Anti-Carbohydrate Antibodies†. **Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 253–262, 1 jan. 2007.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. [s.l: s.n.].

SANTANA, J. M. *et al.* A *Trypanosoma cruzi*-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. **The Biochemical Journal**, v. 325 (Pt 1, p. 129–137, 1997.

SAYLOR, C.; DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A. Monoclonal antibody-based therapies for microbial diseases. **Vaccine**, v. 27 Suppl 6, n. Suppl 6, p. G38–46, 2009.

SCHARFSTEIN, J. *et al.* Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors. **The Journal of experimental medicine**, v. 192, n. 9, p. 1289–1300, 2000.

SCHARFSTEIN, J.; MORROT, A. A Role for Extracellular Amastigotes in the Immunopathology of Chagas Disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. SUPPL. 1, p. 51–63, 1999.

SCHENKMAN, S. *et al.* Mucin-like glycoproteins linked to the membrane by glycosylphosphatidylinositol anchor are the major acceptors of sialic acid in a reaction catalyzed by trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 59, n. 2, p. 293–303, 1993.

SCHENKMAN, S.; DIAZ, C.; NUSSENZWEIG, V. Attachment of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to receptors at restricted cell surface domains. **Experimental Parasitology**, v. 72, p. 76–86, 1991.

SERRANO, A. A. *et al.* The lipid structure of the glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like sialic acid acceptors of *Trypanosoma cruzi* changes during parasite differentiation from epimastigotes to infective metacyclic trypomastigote forms. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 45, p. 27244–27253, nov. 1995.

SHEIKHOLVAEZIN, A. *et al.* Optimizing the generation of recombinant single-chain antibodies against placental alkaline phosphatase. **Hybridoma (2005)**, v. 25, n. 4, p. 181–92, 2006.

SIQUEIRA-BATISTA R, GELLER M, MARTINS AV, BASTOS OMP. *Trypanosoma cruzi*. In: Siqueira Batista R, Gomes AP, Corrêa AD, Geller M (editores.). Moléstia de Chagas. 2ª edição. Rio de Janeiro: Rúbio; 2007.

SKERRA, A; PLÜCKTHUN, A. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 240, n. 4855, p. 1038–1041, 1988.

SOUTO-PADRÓN, T. *et al.* Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. **Journal of cell science**, v. 96 (Pt 3), n. 2, p. 485–490, 1990.

TAKKINEN, K. *et al.* An active single-chain antibody containing a cellulase linker domain is secreted by *Escherichia coli*. **Protein Engineering**, v. 4, n. 7, p. 837–841, 1 out. 1991.

TARLETON, R. L. *et al.* The challenges of Chagas disease - Grim outlook or glimmer of hope? **PLoS Medicine**, v. 4, n. 12, p. 1852–1857, 2007.

TEIXEIRA, M. M.; YOSHIDA, N. Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* identified by monoclonal antibodies. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 18, p. 271–282, 1986.

URBAN, I. *et al.* Molecular diversity of the *Trypanosoma cruzi* TcSMUG family of mucin genes and proteins. **The Biochemical journal**, v. 438, p. 303–313, 2011.

URBINA, J. A. New advances in the management of a long-neglected disease. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 49, n. 11, p. 1685–7, 2009.

URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 495–501, 14 jan. 2016.

VILLALTA, F. *et al.* Molecular analysis of early host cell infection by *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 13, p. 3714–3734, 1 maio 2008.

VILLARREAL, D.; NIRDE, P.; TIBAYRENC, M. Differential Gene Expression in Benzimidazole-Resistant. **Society**, v. 49, n. 7, p. 2701–2709, 2005.

WANG, X. *et al.* Towards effective and safe thrombolysis and thromboprophylaxis: Preclinical testing of a novel antibody-targeted recombinant plasminogen activator directed against activated platelets. **Circulation Research**, v. 114, p. 1083–1093, 2014.

WATKINS, N. A.; OUWEHAND, W. H. Introduction to Antibody Engineering and Phage Display. **Vox Sanguinis**, v. 78, n. 2, p. 72–79, 2000.

WHITELEGG, N. R.; REES, A R. WAM: an improved algorithm for modelling antibodies on the WEB. **Protein engineering**, v. 13, n. 12, p. 819–24, 2000.

WHITLOW, M. *et al.* An improved linker for single-chain Fv with reduced aggregation and enhanced proteolytic stability. **Protein Engineering**, v. 6, n. 8, p. 989–995, 1 nov. 1993.

WRIGHT, B. D.; LAPI, S. E. Designing the magic bullet? The advancement of immuno-PET into clinical use. **Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine**, v. 54, n. 8, p. 1171–4, 2013.

XIN, L. *et al.* Stealth Cationic Liposomes Modified with Anti-CAGE Single-Chain Fragment Variable Deliver Recombinant Methioninase for Gastric Carcinoma Therapy. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, 2013. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/asp/jnn/2013/00000013/00000001/art00022>>

YOSHIDA, N. *et al.* Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. **Infection and immunity**, v. 57, n. 6, p. 1663–7, 1989.

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 1, p. 87–111, 2006.

YOSHIDA, N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl, p. 101–7, 2009.

YOSHIDA, N. Surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Infection and immunity**, v. 40, n. 2, p. 836–9, 1983.

YOSHIDA, N.; CORTEZ, M. *Trypanosoma cruzi*: Parasite and Host Cell Signaling during the Invasion Process. In: BURLEIGH, B.; SOLDATI-FAVRE, D. (Eds.). **Molecular Mechanisms of Parasite Invasion SE - 6**. Subcellular Biochemistry. [s.l.] Springer New York, 2008. v. 47p. 82–91.

ZANIELLO, B. A *et al.* Seroprevalence of Chagas infection in the donor population. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 7, p. e1771, 2012.

ZHANG, J.-L. *et al.* Screening and evaluation of human single-chain fragment variable antibody against hepatitis B virus surface antigen. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int**, 2006.

ZHANG, Z.-L. *et al.* Suppression of angiogenesis and tumor growth in vitro and in vivo using an anti-angiopoietin-2 single-chain antibody. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 7, n. 3, p. 543–552, 2014.

ZINGALES, B. *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051–1054, 2009.