

JULIANA CÔRTEZ DE FREITAS

**USO DE PARASITAS TRANSGÊNICOS PARA CARACTERIZAR O
PAPEL FUNCIONAL DE GENES ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA A
LISE PELO COMPLEMENTO EM TRIPANOSOMATÍDEOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-
graduação em Genética da Universidade Federal
de Pernambuco, como parte dos requisitos para
obtenção do grau de Mestre em Genética.

Recife - 2003

*Aos meus pais, Luiz Arthur e Marli
Freitas, que com simplicidade dedicaram-
me sabedoria e amor.*

Haverá um dia em que a ciência traduzirá o conhecimento apenas para a paz, conduzindo com a supremacia dos homens a emersão das relações humanas.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo incentivo fundamental na minha educação e pela formação magistral que me permitiu caminhar com os próprios passos.

Ao meu orientador Marcel Ramirez pelo seu apoio em diferentes momentos, por seu comprometimento profissional e por mostrar-me o verdadeiro conhecimento científico.

Ao Jameel Inal pela seriedade para cooperação e auxílio na execução deste trabalho.

Ao Departamento de Genética – UFPE, pelo apoio prestado durante o mestrado.

Ao Aggeu Magalhães- FIOCRUZ, pelo suporte técnico e institucional.

Ao Departamento de Imunologia-CPqAM, pela constante cooperação e permeabilidade.

Aos companheiros do LBBM-CPqAM, que se mostraram sempre aptos e atenciosos

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia pela cordialidade e presteza.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular-UFPE, pela troca de conhecimentos, apoio e afeto.

Ao Igor Cestari que não foi apenas um companheiro de bancada e experimentos, mas um amigo solícito em vários momentos.

Ao JIRC que favoreceu grandes e bons instantes nesta minha trajetória, em especial a Rute Gueiros e Francisco Eudes.

Aos atuais companheiros de bancada, Ingrid Evans, Debora Carvalho e André Carvalho.

A minha especial família pela vivacidade que manteve minha placidez, sendo suas lembranças minha maior alegria.

A Rita Freitas pelas correções ortográficas e gramaticais da tese e pelo constante apoio.

Aos colegas de turma, hoje estimados amigos; Luciane Duarte, Cheila Bedor, David Moraes e Daiane Antunes.

Ao Pierry Gibran pelo apoio incondicional nos meus momentos de angústia sempre devolvendo alegria e passividade ao meu semblante.

Aos amigos que compreenderam minhas ausências e estimaram minha vitória. Obrigada por fazerem parte da minha vida.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para mais esta etapa vencida em minha vida.

SUMÁRIO

Resumo

1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	5
2.1. Tripanosomatídeos	6
2.1.1. Gênero <i>Trypanosoma</i>	6
2.1.2. Gênero <i>Leishmania</i>	8
2.2. Sistema Complemento	10
2.2.1. Filogenia e Evolução do Sistema Complemento	12
2.2.2. Ativação do Sistema Complemento	12
2.2.3. Regulação do Sistema Complemento	14
2.2.4. Interação entre Sistema Complemento e Tripanosomatídeos	15
2.3. Evasão da Lise por Tripanosomatídeos	18
2.4. Genes Envolvidos na Resistência a Lise pelo Complemento	21
2.4.1. Gene CRP	21
2.4.2. Gene CRIT	22
2.5. Referências Bibliográficas	24
3. Artigo	32
4. Anexo	59

RESUMO

Trypanosoma cruzi e *Leishmania* são parasitas intracelulares obrigatórios em células de hospedeiros mamíferos. A infecção humana mediada por parasitas é um processo extremamente rápido e estes devem dispor de estratégias de evasão da lise imediatamente após a inoculação para escapar dos efeitos deletérios do soro após ativação do sistema complemento. Distintas moléculas da superfície celular em diferentes organismos estão envolvidas nos processos de resistência a lise pelo complemento. Em *T. cruzi* foi identificada uma molécula envolvida com a resistência a lise pelo complemento. Uma proteína de 160 kDa denominada CRP (complement regulatory protein) de *T. cruzi* restringe a ativação das vias clássica e alternativa evitando a ação proteolítica da C3 convertase. Em *Leishmania* moléculas tais como gp-63, LPG parecem ser responsáveis pela evasão da lise, mas os mecanismos ainda não estão claros. Um outro exemplo de mecanismo de resistência a lise pelo complemento é conferido por uma proteína de 32 kDa chamada CRIT (C2 receptor inhibitor trispaning) expressa na superfície de formas adultas de *Schistosoma* que se liga ao componente C2 evitando a formação da C3 convertase. Neste trabalho pretende-se entender a ativação do sistema complemento por parasitas e identificar moléculas envolvidas com a lise pelo complemento em tripanosomatídeos. Através de procedimentos de transfecção e sobreexpressão de CRP e CRIT em *T. cruzi* e *Leishmania* analisamos a função destes genes, diferenciando-os de parasitas selvagens. Foram realizadas cinéticas de ativação do complemento em diferentes tripanosomatídeos com o uso de soro humano normal para avaliar o efeito do complemento sobre os parasitas. A aquisição de resistência à lise pelo complemento com o uso de parasitas transgênicos favorece a compreensão dos mecanismos que determinam a infecção e possibilita o desenvolvimento de medidas quimioterápicas.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi and *Leishmania* are obligated intracellular parasites in cells of hosts mammals. However the parasites can be found in three different habitats during its cycle of life: the intestine of the insect vector, the extracellular space of the vertebrate host and in cells of the fagocítico system. After inoculation of metacyclic trypomastigotas forms and promastigotas forms of *T. cruzi* and *Leishmania* respectively, the parasites are displayed to the potential líticas effect of the normal serum and lyses mediated by the complement can compromise the survival of the parasite. The infection human being mediated for parasites is a process extremely fast and the parasites must make use of strategies of evasion of lyse immediately after the inoculation to escape of the deleterious effect of the serum after activation of the system complement. Distinct molecules of the cellular surface in different organisms are involved in the resistance processes lyse for the complement. In *Trypanosoma cruzi* was identified a molecule involved with the resistance lyse for the complement. A protein of 160 kDa called CRP (complement regulatory protein) of *T. cruzi* restricts the activation of the classic and alternative pathways preventing the proteolitics action of the C3 convertase. In *Leishmania* molecules such as gp-63, LPG seem to be responsible for the evasion of lyse, but the mechanisms still are not clear. One another example of resistance mechanism lyse for the complement is conferred by a protein of 32 kDa called CRIT (C2 receptor inhibitor trispaning) express in the surface adult forms of *Schistosoma* that if binds to the C2 component preventing the formation of the C3 convertase. The goal of this work is to understand the activation of the complement system for parasites and to identify molecules involved with lyse for the complement in tripanosomatideos. Through procedures of transfeção and overexpresion of CRP and CRIT in *T. cruzi* and *Leishmania* we analyze the function of these genes in transgenics and wild parasites. For this purpose we have made differents constructions with CRP and CRIT genes using these vectors. They had been carried through kinetic of activation of the complement in different tripanosomatideos with the use of normal human serum to evaluate the effect of the complement on the parasites. The acquisition of resistance to lyse mediated by the complement with the use of different transgenics parasites favored the understanding of the mechanisms that determine the infection and opens possibilities of development of chemotherapeutics measures for control of the illnesses.