

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 transfecção 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.

1. INTRODUÇÃO

Durante o seu ciclo de vida os protozoários flagelados pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, sofrem uma série de modificações morfológicas e fisiológicas reguladas durante o desenvolvimento, particularmente, para sobreviver dentro dos hospedeiros inseto e mamífero.

Para estabelecer a infecção e persistir no hospedeiro vertebrado, os tripanosomatídeos precisam resistir as barreiras de defesa do hospedeiro. Uma das linhas de defesa primárias é a ativação do sistema complemento, que pode agir diretamente na eliminação dos microorganismos juntamente com a ação das células fagocíticas (Fischer *et al.*, 1988). Em contrapartida, muitos patógenos, especialmente aqueles que se estabelecem na corrente sanguínea dos organismos ou que se disseminam do sítio inicial de infecção para outros órgãos, tem desenvolvido elaborados mecanismos para evitar os efeitos deletérios da ativação do complemento.

As formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, por exemplo, evitam a lise através da produção de glicoproteínas de superfície que interferem na ativação do complemento (Fischer *et al.*, 1988; Joiner *et al.*, 1988). Uma destas glicoproteínas de massa molecular de 160-kDa é chamada de proteína reguladora do complemento (**CRP**) e tem como função restringir as vias, clássica e alternativa de ativação do complemento através da ligação com componentes do complemento, C3b e C4b; desta maneira, interrompe a formação e ação proteolítica da C3 convertase. Em oposição, a forma epimastigota do parasita é sensível aos efeitos do complemento e as moléculas CRP não são detectáveis. A conversão de epimastigota para tripomastigota coincide com a expressão de CRP na superfície celular e aquisição de resistência ao complemento (Norris *et al.*, 1997).

Em *Leishmania* moléculas como gp-63, LPG e PPG presentes nas superfícies dos parasitas parecem estar relacionadas aos mecanismos de evasão da lise nas

formas promastigotas metacíclicas e amastigotas, mas os estudos relacionados a este tema, ainda não estão bem esclarecidos.

Um outro exemplo de mecanismo de resistência à lise pelo complemento, descrito em *Schistosoma spp*, é mediado pela proteína de superfície **Sh-CRIT** (Inal, 1999). Sh-CRIT é um receptor que se liga ao complemento C2 especificamente, resultando na inibição da via clássica de ativação do sistema complemento, provavelmente interferindo na formação de C3 convertase, C4b2a.

A compreensão dos mecanismos através dos quais os parasitas desenvolvem resistência a resposta primária do hospedeiro, mediada por lises originadas pela ativação do sistema complemento é de nosso interesse. Provavelmente esses mecanismos estariam relacionados com a presença das moléculas de superfície dos parasitas. Uma possibilidade de estudo é gerar parasitas transgênicos que carregam genes sobreexpressando proteínas de superfície celular que teriam como função tolerar os efeitos líticos do soro, tais como o gene que expressa as moléculas **Sh-CRIT** e **CRP** de *Schistosoma hematobium* e *Trypanosoma cruzi*, respectivamente.

A utilização destes parasitas transfectados permitiria avaliar funcionalmente estas moléculas e direcionar a procura de possíveis genes homólogos nos tripanosomatídeos em estudo, relacionados com os mecanismos de resistência do parasita. Esses genes podem estar envolvidos com eventos importantes na vida parasitária como sua disseminação no organismo, desde a invasão do parasita no hospedeiro até o agravamento das formas clínicas.

O conhecimento desses mecanismos poderia oferecer alternativas imuno profiláticas como novos fármacos ou vacinas, que possam aperfeiçoar as poucas alternativas terapêuticas existentes contra a doença.

Utilizando vetores que facilitam a expressão de genes exógenos em parasitas, foi avaliado se os genes envolvidos na resistência a lise pelo complemento presentes em outros organismos eram funcionais em *Leishmania* e *T. cruzi*, proporcionando proteção contra a lise nas formas promastigotas e epimastigotas respectivamente.

Foram estabelecidos os seguintes objetivos:

GERAL:

Determinar os mecanismos que mediam a resistência à lise pelo complemento em *Leishmania* e em *T. cruzi*, caracterizando o papel funcional dos genes CRIT e CRP como potenciais inibidores dos componentes do complemento através da utilização de parasitas transgênicos.

ESPECÍFICOS:

1. Avaliar a lise pelo complemento em tripanosomatídeos, determinando qual a principal via de ativação do complemento.
2. Transfectar formas promastigotas de *Leishmania* e epimastigotas de *T. cruzi* com os vetores pTEX, pTEXCRIT, p33CRIT, pTEXCRP.
3. Detectar a presença de genes exógenos em parasitas transfectados através de Southern blotting.
4. Analisar a expressão do gene CRIT nos parasitas transgênicos através de RT-PCR.
5. Analisar funcionalmente os parasitas transgênicos através da determinação da resistência à lise mediada pelo complemento.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. TRIPANOSOMATIDEOS

Parasitas pertencentes à família Trypanosomatidae e incluídos nos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* são potenciais agentes etiológicos causadores de doenças infecciosas humanas, tais como Leishmanioses e doença de Chagas, respectivamente. Algumas das infecções causadas por estes protozoários são endêmicas em países da América Latina, África, Ásia e países Mediterrâneos, sendo consideradas um grave problema de saúde pública.

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, as leishmanioses visceral e cutânea acometem cerca de 12 milhões de pessoas em 88 países, com aproximadamente mais de 2.000.000 de novos casos anuais, provocando mais ou menos 59.000 mortes/ano. A doença de Chagas acomete em torno de 600.000 pessoas/ano em 18 países, ocasionando estimadamente 13.000 mortes por ano, sendo o cone Sul a principal zona de incidência dos insetos vetores da doença pertencente à família Reduviidae (WHO, 2003).

Os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* pertencem à ordem Kinetoplastida que representa um grupo de protozoários flagelados, caracterizados por uma organela única que diferencia o grupo, o cinetoplasto, que contém DNA (deoxyribonucleic acid) mitocondrial. Todos os kinetoplastidas conhecidos apresentam outros dois aspectos peculiares ao grupo: compartimentalização interna de glicolises, em uma organela chamada glicosomo e o trans-splicing, mecanismo onde se adiciona uma curta seqüência de RNA (ribonucleic acid), altamente conservada - o spliced leader ou miniexon - encontrado em todos os RNAs mensageiros (Stevens *et al.*, 2001).

2.1.1. Gênero *Trypanosoma*

O Gênero *Trypanosoma* está constituído por protozoários heteroxenos, ou seja, durante seu ciclo de vida, desenvolve-se alternadamente em invertebrados e

vertebrados, ou naqueles e em plantas. Os membros da família evoluem através dos estágios: amastigota, epimastigota e/ou tripomastigota.

Membros do gênero *Trypanosoma* são parasitas de todas as classes de vertebrados. Muitos deles vivem na corrente sanguínea e em tecidos fluidos, mas alguns, tais como *T. cruzi* ocupam convenientemente habitats intracelulares. Embora existam outros meios de transmissão, a principal ocorre, via invertebrados hematófagos.

Dentro do gênero, destaca-se *Trypanosoma cruzi*, agente causal da doença de Chagas, que pode provocar a letalidade dos indivíduos infectados. O parasita apresenta ciclo biológico heteroxeno, sendo seu hospedeiro invertebrado insetos pertencentes à família Reduviidae, onde os gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* são os de maior importância epidemiológica.

São identificados três estágios de diferenciação dentro do ciclo evolutivo do parasita:

amastigotas (habitam o interior das células dos vertebrados multiplicando-se por fissão binária) ;

epimastigotas (habitam o intestino do inseto vetor e se dividem por fissão binária) ;

tripomastigotas (vivem na corrente sanguínea do hospedeiro invertebrado, sendo incapaz de se dividir. O tripomastigota é resultado da diferenciação da forma amastigota intracelular). Tripomastigotas metacíclicos encontrados no vetor são resultado da diferenciação de formas epimastigotas.

O ciclo do *T. cruzi* se inicia quando o vetor, durante o repasto sanguíneo, ingere do hospedeiro vertebrado infectado formas tripomastigotas. No intestino médio do inseto, os parasitas multiplicam-se sob a forma epimastigota e após algumas semanas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos no intestino posterior do inseto. (Brener and Alvarenga, 1975).

A infecção nos vertebrado se inicia quando o vetor triatomíneo infectado com *T. cruzi* pica o hospedeiro mamífero e durante a ingestão de sangue o inseto pode

liberar formas tripomastigotas metacíclicas através das fezes ou urina, que penetram no novo hospedeiro através de lesões na pele ou pelas mucosas. Dentro do hospedeiro os parasitas invadem o interior das células e diferenciam-se em amastigotas. Intracelularmente os amastigotas se multiplicam provocando o rompimento celular e a liberação de formas tripomastigotas sanguíneas, que irão invadir novos órgãos e tecidos reiniciando o ciclo. Esta fase inicial de multiplicação intracelular e circulação parasitária corresponde à fase aguda da doença. A etapa seguinte, onde os parasitas circulantes e teciduais são difíceis de detectar corresponde à fase crônica da infecção. As respostas imune celular e humoral controlam a proliferação do parasita e modulam a relação parasita – hospedeiro (Kretzli and Brener , 1976; Brener, 1980; Teixeira *et al.*, 1978; Teixeira, 1987). Alterações cardíacas (cardiomiopatias) e digestivas (megacólon e megaesôfago) podem ocorrer como as principais manifestações clínicas da doença em alguns indivíduos infectados.

2.1.2. Gênero *Leishmania*

Compreende espécies heteroxenas compostas por organismos unicelulares parasitas de plantas, insetos, aracnídeos e vários vertebrados, com apenas duas fases durante seu ciclo de vida: amastigota e promastigota. O estágio amastigota é parasita intracelular obrigatório de macrófagos no hospedeiro vertebrado e o estágio promastigota habita o trato digestivo do inseto vetor extracelularmente.

Os protozoários do gênero *Leishmania* são os responsáveis pelas leishmanioses e pertencem a família Trypanosomatidae. Leishmanioses são parasitoses que apresentam duas formas clínicas básicas bastante diferenciadas e cuja evolução depende da interação entre o parasita envolvido, o vetor e a resposta imune do hospedeiro. A endemia é causada por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos entre os hospedeiros vertebrados através da picada de insetos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae). As leishmanioses podem ser classificadas em

dois grandes grupos: as leishmanioses tegumentares (cutânea e muco-cutânea) e a leishmaniose visceral ou calazar (Handman, 2000).

Nas leishmanioses o parasita se multiplica por divisão binária no interior do citoplasma dos macrófagos, no hospedeiro vertebrado, sob a forma intracelular do protozoário denominada amastigota (sem flagelo livre), até o rompimento da célula parasitada e invasão de outras células do sistema fagocítico monocitário.

O flebotomíneo, ao picar a pele do hospedeiro infectado, ingere os macrófagos da derme contendo as formas amastigotas de *Leishmania* em seu citoplasma. No intestino médio do flebótomo, as formas amastigotas se transformam em promastigotas (com flagelo livre) que aderem ao epitélio do tubo digestivo, onde se multiplicam por divisão binária. Posteriormente, estas formas migram para a parte anterior do tubo digestivo do inseto onde se tornam infectantes. O flebótomo ao realizar um novo repasto sangüíneo, inocula junto com sua saliva as formas infectantes no interior da derme de outro hospedeiro com conseqüente invasão de macrófagos.

2.2. SISTEMA COMPLEMENTO

Os parasitas precisam invadir as células para progredir na infecção. A partir do primeiro contato com os hospedeiros, os parasitas enfrentam uma série de mecanismos físicos e biológicos que correspondem à imunidade inata do hospedeiro e representam uma proteção contra patógenos invasores. Entre estes mecanismos, os mais relevantes seriam: imunidade local, células NK (natural killer) e o sistema complemento.

Os componentes do complemento estão entre os principais integrantes da imunidade inata frente a protozoários invasores.

O sistema complemento é formado por um conjunto de proteínas séricas funcionalmente ligadas, que interagem entre si de maneira regulada, executando muitas funções efetoras da imunidade humoral e da inflamação. Os componentes solúveis do complemento do soro incluem múltiplas enzimas proteolíticas, que são sequencialmente ativadas somente quando elas próprias são proteoliticamente clivadas por outras enzimas do sistema complemento previamente ativadas (Roitt, 1999). As proteínas do sistema complemento presentes na circulação sanguínea estão naturalmente inativadas ou em um baixo nível de ativação espontânea. A ativação do sistema complemento normalmente ocorre quando proteínas deste sistema ligam-se a complexos imunes formados pela ligação de anticorpos fixadores do sistema complemento (IgG e IgM) aos seus antígenos específicos, desta maneira, o complemento participa como um dos mecanismos efetores principais para a imunidade humoral específica.

Quando uma sequência de proteínas do complemento é ativada através de complexos antígeno-anticorpo denomina-se **via clássica** (Roitt, 1999). De maneira distinta, alguns componentes do complemento podem ser diretamente ativados por ligação à superfície de organismos invasores, participando também da imunidade natural. A sequência de ativação do complemento que ocorre pela ligação entre o componente C3 do complemento e a superfície de organismos infecciosos é

chamada **via alternativa** (Abbas, 2000). Uma outra via chamada **via das lectinas**, assim como a via alternativa independe de anticorpos para sua ativação. Contudo, o mecanismo é mais semelhante ao da via clássica, pois depois de iniciado, o processo de ação de C4 e C2 leva à formação C5 convertase (Turner, 1998). A via das lectinas é ativada pela ligação de MBL (mannose-binding lectin), uma proteína de fase aguda da inflamação, a resíduos de manose em glicoproteínas ou carboidratos na superfície de microorganismos.

O sistema complemento pode ser diretamente ativado em resposta aos patógenos invasores. Esta ativação pode ocorrer através da via alternativa ou através da via das lectinas. Em ambos, a presença de resíduos presentes na superfície dos microorganismos, tais como manose, contribuem para ativação do sistema complemento diante da presença do microorganismo (Matsushita, 1996).

O complemento é um importante componente da imunidade inata. Embora já conhecido, o conceito de que as funções do complemento estão entre os principais mecanismos efetores do sistema imune inato tem emergido gradualmente.

Em termos gerais, a imunidade inata abrange um grande número de mecanismos passivos e ativos que formam as defesas do hospedeiro contra a infecção. Entre eles estão barreiras físicas tais como: pele e superfícies mucosas do sistema digestivo e respiratório e baixos níveis de pH estomacal. Dois principais componentes da imunidade inata são células fagocíticas, tais como neutrófilos e macrófagos e células NK. Tanto os neutrófilos como os macrófagos podem reconhecer diretamente patógenos invasores através de estruturas conservadas tais como manose e lipopolissacarídeos (LPS) (Stahl and Ezekowitz, 1998; Ulevitch and Tobias, 1999).

A ativação do sistema complemento faz parte de um dos diversos mecanismos do sistema imune responsável pela eliminação de antígenos, onde certos tipos de anticorpos podem ativar a via do complemento quando estão ligados a antígenos. Se o anticorpo estiver ligado à superfície da célula, tal como a membrana celular bacteriana, a cascata de reações enzimáticas do complemento

podem conduzir à lise celular, favorecendo a morte dos organismos invasores. Alguns produtos da cascata do complemento também agem como opsoninas quando ligadas a um complexo antígeno anticorpo, permitindo a entrada em macrófagos, enquanto outras são quimioatrativas para os neutrófilos, favorecendo o processo de inflamação (Goodman, 2000).

2.2.1. FILOGENIA E EVOLUÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO

Componentes do complemento [C3, fator B e manose-binding-lectin-associated serine protease 1 (MASP-1)] têm sido descritos em espécies de invertebrados tais como equinodermos e tunicatos, ambos deuterostomos e ancestrais de todas as espécies de vertebrados. O sistema complemento é, portanto, um antigo mecanismo de defesa que emergiu entre 600 e 700 milhões de anos atrás, muito antes do surgimento das Igs. A presença do C3 e moléculas semelhantes ao fator B em equinóides sugerem que a via alternativa é tão antiga quanto a via das lectinas, que está presente em tunicados, mas ainda não tem sido bem mostrada em equinodermos (Ji *et al.*, 1997). Curiosamente, tem sido mostrado que moléculas MASP estão presentes em lampréias, tubarões e *Xenopus*, sugerindo que a via das lectinas também está presente em todas estas espécies também (Matsushita *et al.*, 1998). A atividade do complemento (via alternativa) e componentes do complemento (C3 e fator B) têm sido caracterizados em muitos dos antigos vertebrados, dentre eles os agnatas; entretanto estes peixes são carentes da via clássica e do complexo de ataque da membrana (MAC-membrane attack complex). Peixes cartilagosos (os condrictes) parecem ter moléculas funcionais em todas as vias de ativação do complemento, incluindo o MAC. Todos os outros vertebrados, incluindo peixes teleósteos, anfíbios, répteis, pássaros e mamíferos, apresentam um desenvolvido sistema complemento que envolve todas as vias de ativação do complemento e o MAC (Sunyer *et al.*, 1998).

2.2.2 ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO

O componente central do sistema complemento é uma proteína denominada **C3**, crítica para as funções efetoras deste sistema (Campbell *et al.*,1986).

C3 é a proteína do complemento melhor caracterizada e a mais versátil de todo o sistema complemento, interage com diferentes soros, superfícies celulares e proteínas externas; representa um importante papel em todas as três vias de ativação do complemento. A ativação do sistema complemento resulta da clivagem do C3 em C3b, que expõe um grupo tioéster fortemente reativo que pode reagir com material externo (vírus, bactérias, fungos) carboidratos complexos ou complexos imunes (Lambris,1988).

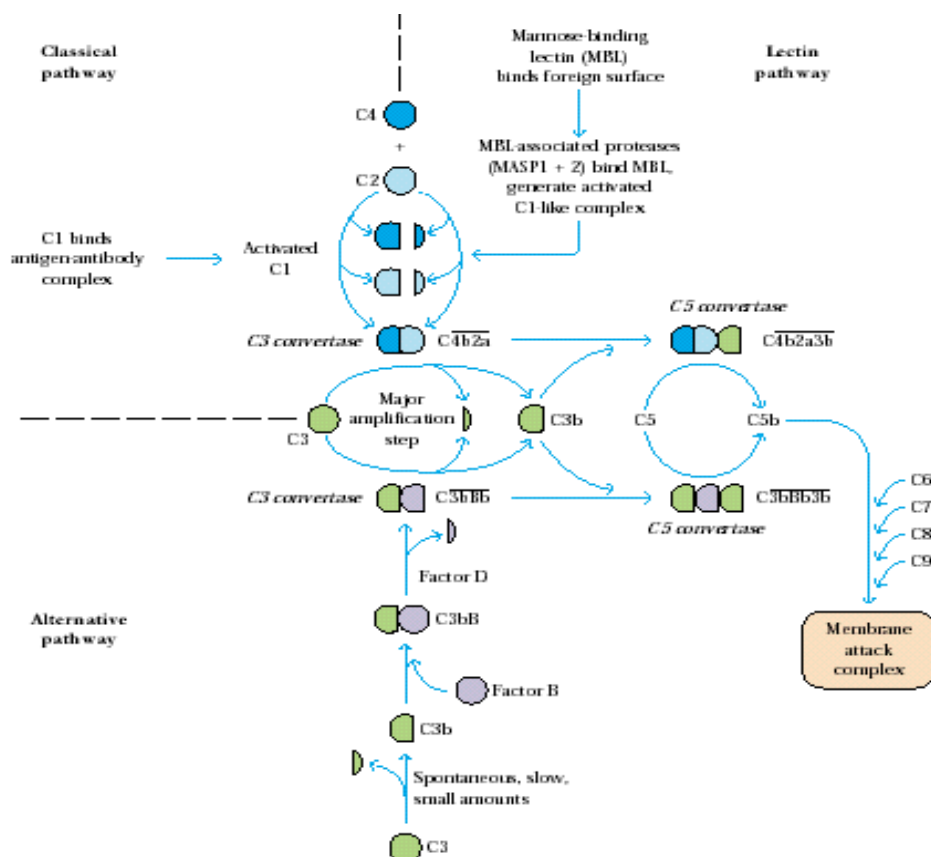


Figura 1. Vias de ação do sistema complemento. Fonte: Kuby (2003)

As formas biologicamente ativas de C3 são seus produtos de clivagem proteolítica. As convertases de C3 são componentes protéicos pertencentes à via clássica e alternativa que são gerados após ativação do sistema; essas convertases têm função enzimática e clivam C3 produzindo C3a e C3b. Na fase inicial da via clássica o complexo antígeno-anticorpo ativa proteoliticamente e seqüencialmente três proteínas do complemento **C1**, **C4** e **C2**, levando a formação de um complexo C4b2a que funcionalmente cliva C3 e denomina-se convertase de C3 da via clássica. A proteína C1, especificamente, é formada por uma subunidade C1q associada a duas moléculas C1r e duas C1s. A subunidade C1q liga-se a moléculas de Ig e os componentes C1r e C1s são zimogênios de esterases de serina necessários para a progressão da cascata proteolítica (Abbas, 2000).

Na via alternativa o C3b é fornecido pela via clássica ou é gerado espontaneamente. O C3b liga-se a um componente protéico gerado por clivagem proteolítica de uma proteína chamada **fator B**; este fragmento gerado denomina-se Bb. O complexo C3bBb é a convertase de C3 da via alternativa. Na fase seguinte, em ambas as vias o C3b liga-se às convertases de C3, gerando convertases de C5 (C4b2a3b ; C3bBb3b) que catalisam a clivagem proteolítica de C5. Após clivagem da proteína C5, as vias compartilham as mesmas fases terminais que envolvem ligação seqüencial de outras proteínas do complemento: C6, C7, C8 e C9 presentes na superfície ativadora o que leva a formação de uma estrutura lipossolúvel o MAC que lisa o patógeno por ação do tipo perforina (Kuby, 2003).

A via das lectinas é ativada através da ligação da proteína MBL a resíduos de manose presentes nas moléculas de superfície presente na membrana de patógenos invasores.

2.2.3. REGULAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO

Muitos elementos do sistema complemento são capazes de lesar tanto células saudáveis do hospedeiro quanto microorganismos invasores. Nesse sentido,

mecanismos reguladores estão envolvidos na regulação do sistema complemento, restringindo a ativação do sistema apenas para alvos específicos.

A reação catalisada por enzimas C3 convertase das vias clássica, alternativa e das lectinas é uma importante etapa na ativação do sistema complemento que leva a formação de moléculas C3b. Moléculas C3b têm potencial capacidade de mediar danos a células saudáveis, provocando opsonização por células fagocíticas ou indução da formação do MAC. A possível destruição de células saudáveis do hospedeiro através de moléculas C3b é fortemente limitada por uma família de proteínas relacionadas, que regulam a atividade da C3 convertase nas vias clássica e alternativa (Lindahl *et al.*, 2000).

Estas proteínas reguladoras do complemento (RCA-regulators of complement activation) são codificadas por uma região localizada no cromossomo 1 em humanos e apresentam repetições de seqüências de aminoácidos denominadas SCRs (short consensus repeats) (Nielsen *et al.*, 2000).

Nas vias clássica e das lectinas três proteínas do RCA atuam similarmente para evitar a formação de C3 convertase. Estes reguladores incluem a proteína C4b-binding protein (C4bp) e duas proteínas de membrana: receptor de complemento tipo 1 (CR1- complement receptor type 1) e um cofator proteico de membrana (MCP-membrane cofactor protein). Estes reguladores ligam-se a C4b e evitam a associação com C2a. Uma vez que C4BP, CR1 ou MCP encontra-se ligado a C4b, um outro regulador, o fator I, cliva C4b em C4d e C4c solúvel (Ahearn and Fearon, 1989). Na via alternativa uma seqüência de acontecimentos semelhantes evitam a formação da C3 convertase C3bBb. Neste caso CR1, MCP ou fator H ligam-se a C3b para evitar a ligação com o fator B. O fator I, também pode clivar C3b no fragmento iC3b e no fragmento solúvel C3f. Outras proteínas RCA também agem na dissociação da C3 convertase. O DAF (decay accelerating factor) ou CD55 é uma glicoproteína ancorada covalentemente a um glicofosfolipídio de membrana que tem a habilidade de dissociar a C3 convertase (Lindahl, 2000).

Proteínas reguladoras também operam ao nível de MAC. A proteína S pode ligar-se ao complexo C5b67 induzindo a transição hidrofílica e evitando a inserção do C5b67 à membrana de células próximas. Outras proteínas que bloqueiam a formação do MAC são denominadas HRF (homologous restriction factor) e o MIRL (membrane inhibitor of active lysis) ou CD59 que protegem células não específicas, da lise mediada pelo complemento através da ligação ao C8, evitando a formação do poli-C9 e inserção do complexo à membrana plasmática de células (Kuby, 2003).

2.2.4. INTERAÇÃO ENTRE O SISTEMA COMPLEMENTO E TRIPANOSOMATIDEOS

O primeiro obstáculo que tripanosomatídeos, de fase promastigota metacíclicos em *Leishmania* e tripomastigotas metacíclicos em *T. cruzi*, encontram no novo ambiente é o efeito lítico do sistema complemento presente no soro. Desta forma alguns microorganismos patogênicos têm desenvolvido mecanismos para escapar dos efeitos deletérios do complemento.

Os primeiros estudos em *Leishmania*, sugeriram que muitos promastigotas introduzidos no hospedeiro morrem rapidamente. Estudos recentes, sugerem que a morte do parasita ocorre através da ativação da via alternativa do complemento (Alexander and Russel, 1992). Estudos *in vitro* mostraram que estes parasitas apenas ativam a via alternativa (Mosser and Edelson, 1984). Vários trabalhos sugerem que o estágio infeccioso, o metacíclico, é mais resistente à lise que o procíclico imaturo apesar do fato de que ambas as formas ligam-se a quantidades significantes de C3b (Joiner *et al.*, 1988; Puentes *et al.*, 1988). A resistência ao complemento parece ser devida a incapacidade do complexo de ataque à membrana para penetrar na densa cobertura de fosfoglicano presente na superfície do parasita (Puentes, *et al.*, 1989, 1990).

Durante a invasão da *Leishmania* no hospedeiro, a lise mediada pelo complemento, pode comprometer a sobrevivência do parasita no hospedeiro. A

identificação de processos de opsonização do promastigota pelo soro do hospedeiro é essencial para o entendimento da estratégia de infecção da *Leishmania*. Os primeiros estudos sobre opsonização de promastigotas em soro normal humano (SNH) indicaram que anticorpos IgM anti-*Leishmania* eram responsáveis pela aglutinação dos promastigotas, ativação da via clássica e morte do parasita (Pearson, 1980; Navin *et al.*, 1989). Apesar destes dados, o entendimento do mecanismo de opsonização de promastigotas tem sido influenciado pelo conceito de que, espécies de *Leishmania* na fase promastigota ativam o sistema de complemento no SNH através da via alternativa, sem envolvimento de qualquer anticorpo (Mosser and Edelson, 1984; Puentes *et al.*, 1989). Exceções a este princípio têm sido mostradas em promastigotas de *Leishmania danovani* (Mosser, 1986) e em formas metacíclicas de *Leishmania major* axênica, aglutinina-negativas (Puentes *et al.*, 1988), mas o que prevalece é que as leishmanias ativam o sistema complemento através da via alternativa (Nunes and Ramalho, 1996; Noronha *et al.*, 1998).

Além das vias clássica e alternativa para opsonização do promastigota via C3, existem duas proteínas que se ligam a carboidratos específicos no soro, conhecidas como MBL (mannan-binding lectin) e a proteína C-reativa (CRP), que se ligam aos parasitas de *Leishmania*; elas poderiam iniciar o processo de opsonização do promastigota através de um novo anticorpo e independente da ativação da proteína C1 do complemento, seria a via de ativação mediada por lectinas (Dominguez *et al.*, 2002).

Em *T. cruzi* formas tripomastigotas são resistentes à lise direta pelo sistema complemento; assim, eles são capazes de sobreviver no hospedeiro vertebrado. Esta resistência parece depender do estágio do parasita, já que o *T. cruzi* é susceptível à lise pelo sistema complemento quando se encontra na fase epimastigota, forma multiplicativa do hospedeiro invertebrado (Nogueira, 1975). É conhecido que a lise promovida pelo sistema complemento ocorre a partir da deposição de C3 nas formas epimastigotas sensíveis ao complemento, enquanto que o fragmento inativo C3b (C3bi) é depositado nas formas tripomastigotas resistentes à lise (Krettli and Pontes

de Carvalho, 1985). Os componentes C3 e fator B da cascata do complemento têm sido detectados na superfície de tripomastigotas tratados com tripsina (Kipnis, 1981). C3b tem sido detectado na superfície de tripomastigotas sanguíneos. Estes estudos sugerem que tripomastigotas contêm aceptores de proteínas do complemento em sua superfície para evitar a lise através do soro. Assim, estes aceptores representam importantes alvos para o desenvolvimento de vacinas, pois podem representar um importante papel na evasão do sistema imune (Krautz, *et al.*, 2000).

2.3. EVASÃO DA LISE POR TRIPANOSOMATÍDEOS

Protozoários são particularmente especializados em escapar dos efeitos da imunidade celular e da imunidade humoral. A solução para escapar da resposta imune e evitar a ação de anticorpos é penetrar em diferentes tipos de células, permanecendo intracelularmente; como acontece com *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* e com os estágios sanguíneos do *Plasmodium falciparum*.

A resistência inata contra protozoários é mediada, em parte, por fatores solúveis pré-existentes que podem potencialmente reconhecer e destruir parasitas invasores ou seus alvos por meio de células efetoras. A ativação da via alternativa do complemento fornece a primeira linha de defesa contra parasitas extracelulares que pode ser burlada procedendo-se à infecção. Para produzir ou estabelecer a infecção o parasita invasor deve atravessar as defesas inatas do hospedeiro presentes principalmente no sangue ou no tecido, as quais são as primeiras barreiras contra protozoários patogênicos humanos. Estas defesas inatas incluem a barreira epitelial da pele, a ativação da cascata do complemento e outros componentes líticos do soro, hidrolases lisossomais, metabólitos tóxicos de oxigênio originados de fagócitos mononucleares, funções imunoreguladoras de células dendríticas e células NK (Sacks and Sher, 2002).

Considerando que o parasitismo intracelular é uma das formas mais evoluídas entre os parasitas é provável que eles tenham desenvolvido mecanismos para escapar da resposta imune humoral e evitar a ação dos componentes do sistema de complemento. (López, 1993). O estudo de moléculas de superfície é fundamental para determinar os mecanismos envolvidos na invasão celular e para compreender alguns dos mecanismos de virulência.

As moléculas presentes na superfície celular dos tripanossomatídeos parecem facilitar a interiorização do parasita no macrófago e funcionalmente o protegem da resposta inata do hospedeiro.

Leishmania, apresenta majoritariamente na superfície da membrana glycosilfosfatidilinositol (GPI). A molécula GPI tem o papel de ancorar proteínas ou permanecer livre na superfície da membrana plasmática, formando uma cobertura de superfície protetora e mediando as interações parasita/hospedeiro (Ilgoutz and McConville, 2001). Estudos bioquímicos têm revelado que esta cobertura inclui GPIs ancoradoras de glicoproteínas (gp-63) em *Leishmania*, GPIs ancoradoras de proteofosfoglicanos (PPG) (Ilg *et al.*, 1999) e um complexo lipofosfoglicano (LPG) (McConville and Ferguson, 1993).

Coletivamente, estas moléculas formam uma barreira de difusão macromolecular que protege os promastigotas de processos microbicidas tais como: lises mediadas por complemento, radicais oxigênio e hidrolases que são desenvolvidos pelos hospedeiros vertebrados e invertebrados (Alexander and Russel, 1992; McConville and Ferguson, 1993; Descoteaux and Turco, 1999).

Leishmania evita a lise mediada pelo complemento, enquanto utiliza a ativação do complemento como mecanismo de interação com as células hospedeiras. Quando o parasita se diferencia do estágio promastigota procíclico para as formas metacíclicas infectivas, sua membrana é alterada para evitar a inserção dos componentes C5b-C9 do complemento e formação do MAC (Puentes, *et al.*, 1990). Isto indica que a expressão de uma modificada superfície de lipofosfoglicano (LPG), aproximadamente duas vezes maior que na forma promastigota procíclica, pode

atuar como uma barreira para inserção do MAC na superfície da membrana do parasita (McConville *et al.*, 1992). LPG é a mais abundante macromolécula presente na superfície de promastigotas de *Leishmania* (McConville and Blackwell, 1991). As cadeias de LPG são geralmente muito longas e apresentam adição de monossacarídeos ou glicano e um cap terminal formado de oligossacarídeos (McConville and Ferguson, 1993). Tanto o tamanho quanto a natureza das cadeias de LPG se modificam durante o desenvolvimento do promastigota no intestino médio do inseto e as modificações na estrutura da cadeia de LPG em formas promastigotas é um importante processo de regulação que permite a interação do parasita com células epiteliais do intestino médio do inseto. (Sacks *et al.*, 1995).

Em *T. cruzi*, o estágio epimastigota encontrado em insetos vetores é susceptível à via alternativa do complemento, sendo os estágios infectivos metacíclicos e tripomastigotas sanguíneos resistentes. As bases da resistência dos tripomastigotas à lise mediada pelo complemento parece ser multifatorial. Várias glicoproteínas de membrana participam efetivamente evitando a ativação do sistema complemento na superfície do parasita. Existem três distintas glicoproteínas em tripomastigotas que apresentam atividade reguladora do complemento. Estas glicoproteínas têm sido identificadas com base na habilidade de inibir a formação e/ou acelerar a decomposição da C3 convertase, a enzima central da cascata do complemento. Cada uma destas proteínas presentes em tripomastigotas foi isolada de uma mesma cepa de parasita e cada uma apresenta uma conformação estrutural distinta. Duas destas proteínas – gp160 (Norris and Schimpf, 1994) e uma proteína denominada T-DAF (trypomastigota decay-accelerating factor) (Joiner *et al.* 1988; Tambourgi, 1993) – inibem a formação e aceleram a decomposição da C3 convertase nas vias clássica e alternativa pela ligação ao C3b e C4b, a terceira proteína (58-68 kDa) apenas inibe a formação da C3 convertase na via alternativa e não apresenta atividade DAF (Fischer *et al.*, 1988).

2.4. GENES ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA A LISE PELO COMPLEMENTO

2.4.1. CRP – (Complement Regulatory Protein)

Dentre as glicoproteínas de *T. cruzi* já comentadas merece destaque a proteína reguladora do complemento (**CRP**) que restringe as vias clássica e alternativa de ativação do complemento através da ligação com o C3b e C4b; desta maneira a proteína CRP, interrompe a ligação e ação proteolítica da C3 convertase. Entretanto, as moléculas CRP não estão presentes nas formas epimastigotas do parasita as quais são sensíveis a ação lítica do complemento. (Norris *et al.*, 1989). A conversão de epimastigota para tripomastigota coincide com a expressão de CRP na superfície celular e aquisição de resistência ao complemento (Norris *et al.*, 1998).

O papel do CRP como fator de virulência tem sido avaliado através de estudos que utilizam anticorpos para bloquear a interação CRP-C3b. O anticorpo anti-CRP que inibe a ligação CRP-C3b é capaz de suportar altos níveis de lise mediada pelo complemento (Norris *et al.*, 1991). Recentemente, isolou-se o cDNA que codifica CRP, e o segundo passo foi avaliar seu potencial como fator de virulência na forma epimastigota do parasita (Norris *et al.*, 1997). Com os avanços da manipulação genética de tripanossomatídeos foi possível obter através de transfecções, epimastigotas estáveis contendo um plasmídeo que codifica o gene CRP tripomastigota específico. Os parasitas transgênicos produziram um CRP recombinante a níveis capazes de converter a forma epimastigota sensível ao complemento para uma forma resistente ao complemento (Norris *et al.*, 1998).

Recentemente, experimentos de vacinação com DNA mostraram que CRP é capaz de conferir proteção parcial contra a fase aguda da doença em animais experimentais (Sepulveda, *et al.*, 2000).

2.4.2.CRIT (Complement C2 Receptor Inhibitor Trispanning)

Outra proteína capaz de inibir a atividade do sistema complemento é denominada CRIT, ela está presente em formas adultas de *Schistosoma* e vem sendo caracterizada como um receptor que se liga ao complemento C2 especificamente, resultando na inibição da via clássica de ativação do sistema complemento, provavelmente interferindo na formação de C3 convertase, C4b2a.

Inicialmente o CRIT foi descrito como um receptor trispanning órfão encontrado na superfície da membrana plasmática e no interior do tegumento da membrana de formas adultas de *Schistosoma* (Inal,1999). Mais tarde foi mostrado que o receptor trispanning órfão era um receptor da proteína C2 do sistema de complemento humano, (sendo chamada de CRIT - complement C2 receptor inhibitor trispanning) (Inal and Sim, 2000). CRIT não se liga intimamente ao fator B. Através da ligação com C2 especulou-se que CRIT seria capaz de evitar a ligação entre C2 e C4b na superfície do parasita e formar a C3 convertase. CRIT apresenta dois domínios extracelulares, o primeiro deles (ed1) apresenta uma região N-terminal composta de 27 resíduos que constitui o domínio de ligação do receptor. Dentro da região de ligação do ed1 com C2 existe um segmento com 11 aminoácidos (H17-Y27), que ficou conhecido como H17 e constitui o sítio de ligação (Inal e Schifferli, 2002).

A função reguladora do complemento através do CRIT é sugerida através de ensaios de lise com o uso de eritrócitos de carneiro, nos quais o peptídeo CRIT-ed1 que contém a região de ligação ao C2, causa inibição da lise (Inal e Schifferli, 2002).

Ensaio hemolítico com o uso de peptídeos inibidores (CRIT) pré incubados com C2 foram realizados para demonstrar que a inibição da via clássica ocorre devido a interação entre C2 e os peptídeos utilizados. Após incubação foi observado

os efeitos na atividade do complemento: Considerando os peptídeos CRIT (CRIT-based peptides) foi verificada redução nas hemólises de 90% (sem uso de peptídeo) para 40%, indicando que a fração H17 liga-se ao C2 e mais efetivamente, evita a formação de C3 convertase (Inal, 2002).

Parasitas usam várias estratégias para evadir o sistema do complemento. Uma destas estratégias é evitar a ativação do complemento na superfície da membrana. Acredita-se que CRIT protege o parasita do ataque do complemento por ligar-se ao C2 inativando-o. A presença do CRIT no tegumento da membrana plasmática da superfície das formas adultas de *Schistosoma* compete com C4b por C2, limitando assim a formação de C3 convertase na superfície do parasita. A partir da descrição do CRIT como um receptor de schistosoma capaz de ligar-se a C2 humano, tem-se buscado analisar a seqüência de homologia entre CRIT e o C4 humano, o qual liga-se a C2, para tentar definir como se caracteriza o sitio de ligação em C4 (Inal and Schifferli, 2002).

Recentes trabalhos (Oh *et al.*, 2003; Inal *et al.*, 2003) têm mostrado a importância do CRIT como uma possível alternativa quimioterápica de ação antiinflamatória em desordens associadas ao sistema complemento.

2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K, LICHTMAN A.H., POBER J.S. *Imunologia Celular e Molecular*, 3nd., Rio de Janeiro, Revinter, 2000 544 p.

ALEXANDER, J. and RUSSELL, D.G. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Adv. in Parasitol.*, 31: 175-254, 1992.

AHEARN, J. M. and FEARON, D. T. Structure and function of the complement receptors CR1 (CD35) and CR2 (CD21). *Adv. Immunol.* 46:183, 1989.

BRENER, Z. and ALVARENGA, N.J. Life cycle of *T. cruzi* in the vector. In: New approaches in American trypanosomiasis research. Proceeding of an international symposium. *Pan american health Organization. Scientific Publication* Belo Horizonte. 318, p. 83-88, 1975.

BRENER, Z. Immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Adv. Parasitology* 18: 247-292, 1980.

CAMPBELL, R. D.; CARROLL, M. C.; and PORTER, R.R. The molecular genetics of components of complement. *Advances in Immunology*. 38: 203-244, 1986.

DESCOTEAUX, A. and TURCO, S.J. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim. Biophys. Acta*, 1455: 341-52, 1999.

DOMÍNGUEZ, M.; MORENO, I.; LÓPEZ-TRASCASA, M. and TORAÑO, A. Complement interaction with trypanosomatid promastigotes in normal human serum. *J. Exp. Med.*, 195: 451-459, 2002.

FISCHER, E.M.; OUASSI, P.; VELGE, J. CORNETTE, and KAZATCHKINE, M. gp58/68, a parasite component that contributes to the escape of the trypomastigote form of *T. cruzi* from the human alternative complement pathway. *Immunology*, 65: 299-303, 1988.

GOODMAN, J. W. The Immune Response, 2.ed. UK: W.H. Freeman, 1999. 234p.

HANDMAN, E. Cell biology of leishmania. *Adv. in Parasitol.*, v.44, 5-8, 2000.

ILGOUTZ S. C., and MCCONVILLE M. J. Function and assembly of *Leishmania* surface coat. *Inter. J. Parasitology* 31: 899-908, 2001.

INAL, J. M. *Schistosoma* TOR (trispinning orphan receptor), a novel, anti-genic surface receptor of the blood-dwelling, *Schistosoma* parasite, *Biochim.Biophys. Acta* 1445: 283-298, 1999.

INAL, J. M. and SCHIFFERLI, Complement C2 receptor trispinning and the β -chain of C4 share a binding site for complement C2. *J. Immunol.* 168: 5213-5221, 2002.

INAL, J. M. and SIM, R. B. A *Schistosoma* protein, Sh-TOR, is a novel inhibitor of complement which binds human C2. *FEBS Letters*. 470: 131-134, 2000.

INAL, J. M.; PASCUAL, M.; LESAVRE, P. and SCHIFFERLI, J. A. Complement inhibition in renal diseases. *Nephrol. Dial. Transplant.* 18: 237-240, 2003.

KIPNIS, T. L. Enzymatic treatment transforms trypomastigotes of *T. cruzi* into activators of alternative complement pathway and potentiates their uptake by macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78:602-605, 1981.

KRAUTZ, G. M.; KISSINGER, J. C. and KRETTLI, A. U. The targets of the lytic antibody response against *T. cruzi*. *Parasitol. Today*, 16:(1) 31-34, 2000.

KRETTLI, A.U. and BRENER, Z. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.* 116: 755-760, 1976.

KRETTLI, A.U. and PONTES DE CARVALHO, L.C. Binding of C3 fragments to the *T. cruzi* surface in the absence of specific antibodies and without activation of the complement cascade. *Clin. Exp. Immunol.* 62:270-277, 1985.

KUBY, J., GOLDSBY, R. A., KINDT, T. J. and OSBORNE, B. A. Immunology, 5.ed., UK, W.H. Freeman, 2003.

LAMBRIS, J. D., The third components of complements. *Chem. and biol.* 15: 124-128, 1990.

LINDAHL, G., SJOBRING, U. AND JOHNSON, E. Human complement regulators: a major target for pathogenic microorganisms. *Curr. Opin. Immunol.* 12:44, 2000.

LÓPEZ, L. R. and LÓPEZ, M. C. L. Parasitología Molecular. Nuevas Tendencias. Madrid. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 1993, 430p.

JI, H.; AZUMI, K.; SAZAKI, M. and FUJITA, T. Ancient origin of the complement lectin pathway revealed by molecular cloning of mannan binding protein-associated serine protease from a urochordate, the Japanese ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 6340-6345, 1997.

JOINER, K., W. DIAS DA SILVA, M. RIMOLDI, C. HAMMER, AQ. SHER, and T. KIPNIS. Biochemical characterization of the factor produced by trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* the accelerates the decay of complement C3 convertases. *J. Biol. Chem.* 263: 11327-11335, 1988.

MATSUSHITA, M., The lectin pathway of the complement system. *Microbiol. Immunol.* 40: 887-893, 1996.

MATSUSHITA, M., ENDO, Y., NONAKA, M. and FUJITA, T. Complement-related serine proteases in tunicates and vertebrates. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 29–35, 1998.

McCONVILLE, M.J and BLACKWELL, J. M. Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *L. donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. *J. Biol. Chem.*, 266:15170-15179, 1991.

McCONVILLE, M.J. and FERGUSON, M.A. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem. J.* 294, 305-24, 1993.

McCONVILLE, M.J.; TURCO, S. J.; FERGUSON; M. A. and SACKS, D. L. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *L. major* promastigotes to an infectious stage. *EMBO J.*, 11:3593-3600, 1992.

MOSSER, D.M., and BRITTINGHAM, A. *Leishmania*, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. *Parasitology.* 115: S9–S23, 1997.

MOSSER, D. M. and EDELSON, P. J. Activation of the alternative complement pathway by *Leishmania* promastigotes: parasite lysis and attachment to macrophages. *J. Immunol.*, 132:1501-1505, 1984.

MOSSER, D.M.; BURKE, S.K.; COUTAVAS, E.E.; WEDGWOOD, J.F. and EDELSON, P.J. *Leishmania* species: mechanisms of complement activation by five strains of promastigotes. *Exp.Parasitol.* 62:394–404,1986.

NAVIN, T.R., KRUG, E.C. and PEARSON,R.D. Effect of immunoglobulin M from normal human serum on *Leishmania donovani* promastigote agglutination, complement-mediated killing, and phagocytosis by human monocytes. *Infect. Immun.* 57:1343–1346. 1989.

NIELSEN, C. H.; FISHER, E. M. and LESLIE, R. G. K. The role of complement in the acquired immune response, *Immunology*, 100:4, 2000.

NOGUEIRA, N. Studies on the selective lysis and purification of *T. cruzi*. *J. Exp. Med.*, 142:224-229, 1975.

NORONHA, F.S.M.; NUNES, A.C.; SOUZA, K.T.; MELO, M. N. and RAMALHO-PINTO, F. J. Differential sensitivity of new world *Leishmania* spp prosmatigotes to complement-mediated lysis: correlation with the expression of three parasite polypeptides. *Acta Trop.* 69: 17-29, 1998.

NORRIS, K. A. Stable transfection of *Trypanosoma cruzi* epimastigota with the trypomastigote-specific complement regulatory protein cDNA confers complement resistance. *Infect Immun.* 66(6): 2460-2465, 1998.

NORRIS, K. A. and SCHRIMPF, J. E. Biochemical analysis of the membrane and soluble forms of the complement regulatory protein of *T. cruzi*. *Infect. Immun.*, 62:236-243, 1994.

NORRIS, K. A.; HARTH, G. and SO, M. Purification of a *T. cruzi* membrane glycoprotein which elicits lytic antibodies. *Infect. Immun.* 57: 2372-2377, 1989.

NORRIS, K. A.; SCHRIMPF, J. E.; SZABO, M. J. Identification of the gene family encoding the 160-kilodalton *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein. *Infect. Immun.*, 65: 349-357, 1997.

NORRIS, K. A.; BRADT, B.; COOPER, N. and SO, M. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the complement regulatory protein with functional and genetic similarities to the complement regulatory protein, decay accelerating factor. *J. Immunol.* 147: 2240-2247, 1991.

NUNES, A.C., and RAMALHO-PINTO, F.J. Complement resistance of *Leishmania amazonensis* promastigotes is independent of parasite proteases and lysis of sensitive forms is not due to natural antibodies in normal human serum. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29:1633-1640, 1996.

OH, K.S.; NA, D.K.; KWEON, M. H. and SUNG, H. C. Expression and purification of the anticomplementary peptide Sh-CRIT-ed1 (formerly Sh-TOR-ed1) as a tetramultimer in *Escherichia coli*. *Prot. Expre. & Purif.*, 2003 (Article in press).

PEARSON, R.D., and STEIGBIGEL, R.T. Mechanism of lethal effect of human serum upon *Leishmania donovani*. *J. Immunol.*, 125:2195–2201, 1980.

PUNTES, S. M.; DWYER, D. M.; BATES, P. A. and JOINER, K. A. Biding and release of C3 from *Leishmania donovani* promastigotes during incubation in normal human serum. *J. Immunol.*, 143:3743-3749, 1989.

PUNTES, S.M.; SACKS, D.L.; DA SILVA, R.P.; and JOINER, K.A. Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. *J. Exp. Med.* 167:887–902, 1988.

PUNTES, S.M.; DA SILVA, R.P.; SACKS, D.L.; HAMMER, C.H. and JOINER, K. A. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *J. Immunol.*, 145:4311-4316, 1990.

ROITT, I. *Imunologia*. 5 ed. São Paulo. Ed. Manole. LTDA, 1999.

SACKS, D.L. and SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat. Immunol.* 3:(11)1041-1047, 2002.

SACKS, D. L.; PIMENTA, P.F.; McCONVILLE, M. J.; SHCNEIDER, P. and TURCO, S. J. Stage-specific binding of *L. donovani* to the sandfly vector midgut is

regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *J. Exp. Med.* 181:685-697, 1995.

SEPULVEDA, P.; HONEBEYRIE, M. LIEGEARD, P.; MASCILLI, A. and NORRIS, K. A. DNA-Based immunization with *T.cruzi* complement regulatory protein elicits complement lytic antibodies and confers protection against *T. cruzi* infection. *Infect. Immun.* 68 (9): 4986-4991, 2000.

STAHL, P.D. and EZEKOWITZ, R.A. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 50–55, 1998.

STEVENS, J.R; NOYES, H.A.; SCHOFIELD, C.J. and GIBSON, W. The molecular Evolution of trypanosomatidae. *Adv. in Parasitol.* 48: 3- 4, 2001.

SUNYER, J.O., ZARKADIS, I.K. and LAMBRIS, J.D. Complement diversity: a mechanism for generating immune diversity? *Immunol. Today* 19, 519–523, 1998.

TAMBOURGI, D. V. A partial cDNA clone of trypomastigote the decay accelerating factor (T-DAF), a developmentally regulated complement inhibitor of *T. cruzi*, has genetic and functional similarities to the human complement inhibitor DAF. *Infect. immun.* 61:3656-3663, 1993.

TEXEIRA, A.R. L. Doenças de Chagas e outras doenças causadas por tripanosomas. P. 15-26 Brasilia, ed. Universidade de Brasília, 1987.

TEXEIRA, A.; TEIXEIRA, G.; MACEDO, V. and PRATA, A. Acquired cell-mediated immunodepression in acute Chagas disease. *J. Clin. Immunol.* 62: 1132-1144, 1978.

TURNER, M. W. Mannose-binding lectin (MBL) in health and disease. *Immunobiol.* 199:327, 1998.

ULEVITCH, R. J. and TOBIAS P. S. Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Curr.Opin. Immunol.*11:19-22, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - The Leishmaniasis and Chagas disease. Fact Sheet n° 116, february 2003. WHO, Geneva, <http://www.who.int/inf-fs/en/fact116.html>.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Manuscrito a ser enviado à revista
Brazilian Journal of Medical and
Biological Research

Envolvimento do gene CRIT com a resistência a lise pelo complemento em *T. cruzi*

Juliana Côrtes de Freitas¹, Igor dos Santos Cestari¹, Jamel M. Inal², Marcel Ivan Ramirez A¹.

1. Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Dept. de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz.

2. University Hospital Basel, Department of Research, Basel, Switzerland.

Palavras chave: complemento, genes de resistência à lise, tripanosomatídeos.

Correspondência:

Marcel Ivan Ramirez Araya.

Dept. de Imunologia – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz

Av. Professor Moraes Rego s/n, Campus UFPE, 50670420, Recife, Pernambuco, Brasil

e-mail: marcelr@cpqam.fiocruz.br

INTRODUÇÃO

Para estabelecer a infecção e persistir no hospedeiro mamífero, as gentes de infecções crônicas são particularmente adeptos a evitar mecanismos efetores da resposta imune. Uma das primeiras linhas de defesa do hospedeiro é a ativação do sistema complemento, que pode resultar em uma direta morte de microorganismo e aumento do processo de opsonização. Com a multiplicação muitos patógenos, especialmente os que vivem na corrente sanguínea e aqueles que se disseminam a partir do local inicial da infecção, tem desenvolvido elaborados mecanismos para evitar os efeitos deletérios da ativação do complemento.

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário, parasita celular obrigatório e agente causador da doença de Chagas, um importante problema de saúde pública na América Latina. Durante seu ciclo de vida o parasita sofre uma série de modificações morfológicas e fisiológicas reguladas através do desenvolvimento para sobreviver dentro do inseto vetor e do hospedeiro mamífero (Norris *et al.*, 1998). Tripomastigotas metacíclicos penetram no hospedeiro mamífero através da picada do inseto ou através de membranas de mucosas. Os Tripomastigotas entram nas células e se diferenciam para o estágio amastigota multiplicativo. Antes de romper a célula infectada as formas amastigotas se convertem em tripomastigotas, as quais sobrevivem extracelularmente na corrente sanguínea se disseminando para outros tecidos, infectando novas células. A sobrevivência extracelular e a disseminação do estágio tripomastigota sanguíneo em um hospedeiro vertebrado é potencializada pela capacidade dos tripomastigotas de resistir a lises mediadas pelo complemento (Budzko, 1975; Mota and Umekita, 1989). Os Tripomastigotas evitam a lise através da expressão de glicoproteínas de superfície que interferem na ativação do complemento. (Fischer *et al.*, 1988; Joiner *et al.*, 1988). Uma destas glicoproteínas de massa molecular de 160-Kda é chamada proteína reguladora do complemento (**CRP**) e tem como função restringir as vias clássica e alternativa de ativação do complemento através da ligação com componentes do complemento, C3b e C4b; desta maneira, esta glicoproteína interrompe a ligação e ação proteolítica da C3 convertase. Em oposição, a forma epimastigota do parasita é sensível aos efeitos do complemento e as moléculas de CRP não são detectáveis. A conversão de epimastigota para tripomastigota coincide com a expressão

de CRP na superfície celular e aquisição de resistência ao complemento (Norris *et al.*, 1997).

Além do *T. cruzi*; outros parasitas como *Schistosoma spp* também apresentam mecanismos de resistência a lise pelo complemento, mediado pela proteína de superfície **Sh-CRIT** (Inal, 1999). Sh-CRIT é um receptor que se liga ao componente C2 especificamente, resultando na inibição da via clássica de ativação do sistema complemento, provavelmente interferindo na formação de C3 convertase, C4b2a. Genes homólogos ao gene CRIT poderiam estar presentes em *T. cruzi* e atuar também inibindo a formação da C3 convertase. Para determinar se o gene CRIT pode conferir um possível efeito na resistência a lise pelo complemento gerou-se parasitas transgênicos sobreexpressando o gene CRIT e o gene CRP.

A utilização destes parasitas transfectados poderia avaliar funcionalmente a expressão destas moléculas e direcionar a procura de possíveis genes homólogos relacionados com mecanismos de resistência do parasita, nos tripanosomatídeos em estudo.

Neste trabalho pretende-se entender os mecanismos de ação do sistema complemento em *T. cruzi* e avaliar através de parasitas geneticamente modificados, o papel do CRIT na resistência a lise pelo complemento.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Parasitas, Manutenção e curva de crescimento parasitário

Parasita utilizado neste estudo: Epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*: cepa “y”.

As formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* foram mantidas em meio de cultura axênico LIT e mantidas a 28°C. Os repiques das culturas foram realizados a cada 72 horas.

As curvas de crescimento iniciadas com 1×10^6 parasitas/ml foram quantificadas diariamente através de contagem em hemocítômetro.

2. Meios de Cultura, Soluções

LIT (Liver Infusion Tryptose): infusão de fígado bovino 36,0 g/l, triptose 10,0 g/l, sacarose 20 g/l, hemina 10 mg/l, soro fetal bovino 20%, streptomina/penicilina (100ug/ml) 0,1%.

LB (Luria Bertani), pH 7,3: bactotripton 10 g/l, extrato de levedura 5 g/l e NaCl 5g/l. **LB sólido**: LB contendo 2,0 % de agar bacteriológico.

PBS: Na₂HPO₄ 13,49 g/l, NaH₂PO₄ . 2 H₂O 0,74 g/l e NaCl 14,25 g/l, pH 8,2. **SORO NORMAL HUMANO** (SNH): Sangue

total coletado através de punção venal e deixado à temperatura ambiente por 30 min. para formação da cascata de coagulação. O soro era obtido por centrifugação da amostra a 1300 x g por 10 min. **SORO NORMAL HUMANO INATIVADO (SNHI)**: soro humano normal inativado a 65°C por 30 minutos. **SOL. INIBIDORA DA VIA CLÁSSICA DO COMPLEMENTO**: 10mM EGTA, 7mM MgCl, SNH e meio LIT. **TAMPÃO DE ELETROPORAÇÃO**: 137 mM NaCl, 21 mM HEPES, 5 mM KCl, 5,5 mM Na₂HPO₄, 0,77 glucose, pH 7. **TRIPAN BLUE**: 10%.

3. Bactérias

Em todos os experimentos foram utilizadas linhagens de *Escherichia coli* DH5 α (Hanahan, 1985) que apresenta o genótipo: F-, f80dlacZdelta M15, delta-(lac ZYA-arg F) U169, end A1, rec A1, hsd R17 (rK-mK+), deo R, thi-1, sup E44, lambda-, gyrA96, rel A1.

No cultivo das bactérias foram utilizados os seguintes meios de cultura: LB (Luria Bertani), pH 7,3 e LB sólido (2% agar).

4. Plasmídeos

Foram utilizados os plasmídeos: pcDNA3 (Invitrogen, USA), pTEX (Kelly et al., 1992), p33 (Ramirez, et al., 2000).

5. Eletroforese de DNA

As moléculas de DNA íntegras ou digeridas por enzimas de restrição foram submetidas à eletroforese unidirecional em gel de agarose (concentração de 0,8-1,5%) em tampão TBE 1x (Tris-borato 50 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0) com adição de solução de brometo de etídio (0,05g/ml). Foram utilizados como referência os fragmentos do bacteriófago λ digerido com *Hind*III cujo tamanho varia de 23 kb a 0,5 kb. As amostras de DNA foram aplicadas no gel após adição de tampão de amostra (TBE 1x; xileno-cianol 0,83 mg; azul de bromofenol 0,83 mg; glicerol 6%) para diluição final de 1x. As corridas eletroforéticas foram realizadas em voltagem constante a 100 V. Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta com filme Polaroid 667.

6. Construção de vetores

6.1 Subclonagem do gene CRIT nos vetores pTEX e pTEX rib (p33).

O clone recombinante pcDNA3-CRIT, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. J. Inal (Kanton Bassel Hospital-Swiss), foi utilizado para subclonar o gene CRIT no vetor pTEX e no vetor p33 através de digestão enzimática com as enzimas *Bam*HI / *Xho*I. O produto da digestão do pcDNA3-CRIT foi extraído do gel através do kit de purificação Concert Matrix-Gel extraction system (Invitrogene, Life Technologies) resultando em um fragmento de 1.2 kb que corresponde ao gene CRIT com adição de uma região 3' não traduzida (3' UTR). Os plasmídeos pTEX e p33 que apresentavam 5.6 kb e 6.0 kb respectivamente, também tiveram seus fragmentos linearizados com *Bam*HI / *Xho*I sendo extraídos do gel com kit de purificação. O fragmento de 1,2 Kb contendo o gene CRIT foi ligado aos vetores por 16 h a 16°C com a enzima T4 DNA ligase gerando as construções: pTEXCRIT e p33CRIT.

6.2 Construção pTEX CRP

A construção pTEXCRP contendo a região codificadora do gene CRP de 1,1 kb foi gentilmente cedida pela Prof. Dra. Karen A. Norris da University of Pittsburgh School of Medicine-Pensylvania.

7. Ensaios de lise pelo complemento

7.1 Ensaio de lise pelo complemento por diluição seriada do SNH

O SNH foi diluído em meio de cultura nas seguintes proporções: 1:32, 1:16: 1:8, 1:4, 1:2 e sem diluição que correspondem as concentrações de 3,12%; 6,25%; 12,5%; 25%; 50% e 100% respectivamente. Culturas de *T. cruzi* (epimastigotas) na fase exponencial de crescimento foram centrifugadas a 720 x g por 5 minutos, lavadas com PBS, novamente centrifugadas e ressuspensas em meio LIT com concentração ajustada para 5×10^6 parasitas/ml. Nesta concentração 100µl da cultura foi adicionado a 100µl de SNH diluído e não-diluído, com posterior incubação de 30 minutos a 37° C. A interrupção do ensaio foi realizada com adição de 800 µl de meio de cultura a 4° C. Após a reação o número de parasitas viáveis foram visualizados e contados em hemocitômetro (câmara de Neabawer) ao microscópio. A integridade da membrana foi verificada com o uso de tripan blue.

7.2. Mecanismos de ativação do complemento por *T. cruzi*

Culturas axênicas de epimastigotas de *T. cruzi* iniciadas com 1×10^6 parasitas/ml foram crescidas em meio LIT e incubadas a 28°C por 72 h. Após este período, amostras foram

ajustadas à concentração de 5×10^6 parasitas/ml e submetidas a um ensaio de lise pelo complemento com uso de inibidores da via clássica. 100 µl da suspensão de parasitas eram incubados a 37°C com 100 µl de solução: 10mM EGTA (o EGTA tem função quelante de cálcio, elemento requerido na via clássica do complemento, e diminui a concentração de magnésio no meio) 7mM MgCl₂, 50% de SNH e meio LIT por 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 e 30 min. Após a incubação 800 µl de meio de cultura a 4°C eram adicionados as amostras para interromper a reação. Uma alíquota era usada para calcular através de hemocítmetro a porcentagem de parasitas sobreviventes.

8. Transfecção de formas epimastigotas de *T. cruzi*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram crescidas a uma densidade de 1×10^7 /ml em meio LIT contendo 20% de soro bovino fetal. Os parasitas foram lavados em PBS e ressuspensos para 2×10^8 /ml em tampão de eletroporação (137 mM NaCl, 21 mM HEPES, 5.0 mM de KCl, 5.5 mM Na₂HPO₄, 0.77 mM de Glucose, pH 7.0). Os parasitas eram colocados em cuvetas descartáveis de 0,2 mm (Bio-Rad) contendo 25µg de plasmídeo pTEX, pTEX-CRIT, p33-CRIT, pTEX-CRP e eletroporados usando o Cellject duo (HYBAID) a 300V e 525µF com 2 pulsos consecutivos. Os parasitas eletroporados foram incubados a 28°C e selecionados em meio LIT contendo 200 µg/ml de G418 para *T. cruzi*.

9. Transferência de DNA para filtros de náilon (“Southern blotting”)

Os fragmentos de restrição de DNA foram transferidos para membranas de Nylon, segundo Southern (1975) e Sambrook et al. (1989). O gel foi incubado em solução de depuração 0,25 M HCl por 15 min, depois em solução desnaturante contendo 1,0 mM NaCl e 0,5 M NaOH por 30 minutos. A incubação final foi realizada em tampão neutralizante (0,5 M NaCl, 1M de Tris HCl, pH 8,0) por 30 minutos a temperatura ambiente. para depuração. As transferências eram feitas com 10xSSC, por toda noite de acordo com o esquema descrito em Sambrook et al. (1989). Os DNAs foram fixados à membrana por exposição à luz ultravioleta no aparelho GS Gene Linker da BioRad.

10. Hibridização da membrana com sonda fria

Após transferência a membrana foi pré-hibridizada por 30 min a 60°C em tampão de hibridização (5xSSC, 0,1% SDS, 5% sulfato de dextran, 1/20 de volume de líquido de

bloqueio). Foi então adicionado 10ng/ml da sonda (CRIT ou neo^R) marcada com fosfatase alcalina e a hibridização procedeu-se durante 16 horas. Após incubação com sonda a membrana foi lavada (com agitação) 2 vezes com solução pré aquecida de 1X SSC/0,1% SDS por 15 min. e duas vezes com solução pré aquecida de 0,5 X SSC/0,1% SDS por 15 min. Após lavagens, a membrana foi incubada em tampão de bloqueio [líquido de diluído 1:10 em tampão A (100mM tris-HCl, 300mM NaCl pH 9,5-autoclavado)] por 1 h a temperatura ambiente, sendo descartada após o período. A membrana foi incubada com anticorpo conjugado, diluído 1:7.500 em tampão A com 0,5% BSA a temperatura ambiente por 1 h, descartou-se a solução. A membrana foi lavada por 3 vezes com 0,3% de Tween em tampão A, a temperatura ambiente. Após lavagem a membrana foi colocada em um filme plástico e foi adicionado internamente o reagente de detecção. Por fim a membrana foi colocada no cassete e exposto ao filme (HiperFilm-FUJI) permanecendo durante 20 mim. O filme foi revelado em revelador Decktol diluído 1:2 em água.

11.Extração de RNA (Trizol)

Formas promastigotas de *L. major* e epimastigotas de *T. cruzi* foram crescidas a uma densidade de 1×10^7 /ml em meio LIT para extração do RNA por trizol. 2 ml de cultura foram precipitadas por centrifugação por 5 min. a 1300 x g, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso com 1 ml de trizol. A amostra foi incubada a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente foram adicionados 200 µl de clorofórmio, a amostra foi homogenizada por inversão por 15 seg. e incubando por 3 min. a temperatura ambiente Após este período, a amostra foi centrifugada por 15 min. a 8.000 x g a 4 °C, e a fase aquosa transferida para um novo tubo no qual foram adicionados 500 µl de isopropanol e incubado por 10 min. a temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada por 10 min. a 8.000 x g, a 4°C e o sobrenadante foi removido. O precipitado foi lavado com 1 ml de etanol 70% frio e centrifugado por 5min. a 2900 x g. O sobrenadante foi removido e amostra seca por 15 min. Por fim, a amostra foi ressuspenso em 20 µl de água mili-q autoclavada. A qualidade do RNA foi checada ao correr 1µl da amostra em gel de agarose/TBE 0,8%.

12. PCR

Nas reações de PCR foram utilizados 5 µl de 10x PCR buffer, 4µl de mix de DNTP, 1µl de primer sense 10 mM, 1µl de primer antisense 10 mM, 0,5 µl de *Taq* DNA polimerase, 2 µl de cloreto de magnésio 50mM, DNA template e água mili-q (q.s.p) As condições dos ciclos de PCR foram: 35 ciclos de 94°C por 0.5min, 50°C por 0.5 min, 72°C por 2 min e para extensão final 72°C por 10 min. As condições de temperatura, número de ciclos e volume das soluções foram modificadas de acordo com os resultados das ampliações. Foram utilizadas as seguintes combinações de oligos: sense (5'CCCAGATCTCTATGTCTCCAAGT-3') e antisense (5'CCCGGATCCTTAACAAGAGTG-3'). que correspondem a fase de leitura aberta do CRIT. Sense (5'CCCGGATCCGCCTATTTGTCTTGGTAT-3') e antisense (5'CCCCTCGAGTTACACACTAGTTGTAGT-3') que correspondem a amplificação do bloco central do gene situado entre os nucleotídeos 1032 e 1420.

13. RT-PCR

Amostras de RNA extraídas dos parasitas foram submetidas à síntese de cDNA através da metodologia de RT-PCR (SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® *Taq* – Invitrogen life technologies) sendo utilizadas para cada reação: 25µl de 2x Mix de Reação, 1µl do RNA template, 1µl de primer: sense (5'-CCCAGATCTCTATGTCTCCAAGT-3') com incorporação do sítio *Bgl*II, 1 ul de primer anti-sense (poli T), 1 µl de RT/Platinum® *Taq* Mix, água destilada autoclavada para completar 50 µl. As condições do RT-PCR foram: 1 ciclo de 50°C por 30 min. e 94 °C por 2 min. (síntese de cDNA e pré-denaturação) 35 ciclos de 94°C por 15seg, 50°C por 30 seg, 72°C por 1min (amplificação por PCR) e 1 ciclo de 72°C por 10 min (extensão final).

RESULTADOS

I.SISTEMA COMPLEMENTO EM *T. cruzi*

1.1 Características do crescimento em cultura

Inicialmente formas epimastigotas de *T. cruzi* cepa y foram testadas quanto às características de crescimento em cultura com relação aos níveis máximos alcançados pelas populações nas fases logarítmica e estacionária. Parasitas de *T. cruzi* cepa y alcançaram populações máximas após 72 horas, entretanto estes parasitas apresentavam uma fase estacionária mais duradoura (graf.1).

1.2 Sistema complemento em *T. cruzi*

O interesse inicial foi caracterizar a ação do sistema do complemento diante da presença de espécies de tripanossomatídeos. Inicialmente foi determinado se o soro humano normal (SHN) era capaz de lisar formas epimastigotas de *T. cruzi* em fase logarítmica de crescimento em cultura axênica.

Os parasitas foram totalmente lisados na concentração máxima de SHN (100%), ou seja, sem qualquer diluição.

Foi também investigado se o parasita apresentava capacidade diferencial de ser lisado com diferentes concentrações de SNH. Para isso foi determinada a diluição limite de SNH (diluição mínima de soro, na qual os parasitas são lisados pela ação do sistema complemento presente no soro humano) e realizados ensaios de lise pelo complemento por diluição seriada do SNH com culturas de *T. cruzi* na fase logarítmica de crescimento.

O gráfico 2, mostra que formas epimastigotas de *T. cruzi* apresentaram maior sensibilidade à lise na concentração de 25% de soro, e que 60% dos parasitas foram lisados. Os resultados indicam que concentrações de SNH superiores a 50% provocaram lise total nos parasitas.

1.3 Ativação do sistema complemento

Uma vez determinada às diluições limites do parasita foi estudada a ativação das vias clássica e alternativa em *T. cruzi* para avaliar o papel do sistema complemento. Foram

realizados ensaio de lise hipotetizando as condições fisiológicas da infecção para determinar o tempo mínimo de ativação do complemento diante da presença do parasita. Os experimentos mediam a ação lítica das vias clássica e alternativa do complemento, e apenas da via alternativa (inibição da via clássica) para observar os efeitos letais provocados pelo SNH diante do parasita.

O ensaio de lise pelo complemento com inibição da via clássica foi realizado através da presença de EGTA e de MgCl₂. Como a via clássica é dependente dos íons Ca⁺ e Mg⁺ fica bloqueada na presença do EGTA e a via alternativa permanece funcional.

O gráfico 3 A, mostra que com o bloqueio da via clássica, os parasitas de *T. cruzi* sofreram menos lise entre 0,5 e 2,5 minutos. Aos 5 min 50% dos parasitas haviam sido lisados. Aos 10 min de incubação 65% dos parasitas, já haviam sido lisados. Após 30 min de incubação todos os parasitas encontravam-se completamente lisados.

Os resultados da lise com ação das duas vias do complemento no gráfico 3B mostram que os parasitas de *T. cruzi* são pouco lisados entre 0.5 e 1 min. 60% dos parasitas de *T. cruzi* haviam sido lisados ao se completar 2,5 min. Aos 5 min de incubação 72% dos parasitas foram lisados. Após 10 min de incubação todos os parasitas haviam sido lisados.

2. ESTRATÉGIAS DE TRANSFEÇÃO E ANÁLISE DE PARASITAS TRANSGÊNICOS E SUBCLONAGEM EM VETORES DE TRANSFEÇÃO

2.1 Genes envolvidos na resistência à lise

As diferenças observadas na lise dos parasitas podem envolver múltiplos fatores. Nesse estudo avaliou-se a hipótese de que a presença de moléculas de superfície poderia estar envolvida na resistência a lise pelo complemento. A idéia inicial foi caracterizar um gene descrito recentemente como responsável pela resistência à lise em formas adultas de *Schistosoma*, denominado CRIT (Complement C2 Receptor Inhibitor Trispanning) (Inal, 2002).

Diante disto tentou-se expressar o gene CRIT em formas epimastigotas de *T. cruzi*. Para isso foi utilizado o plasmídeo pTEX. O pTEX tem tamanho de 5.6 Kb e apresenta um múltiplo sítio de clonagem flanqueado pelas regiões 5' e 3'-UTRs (Untranslated Regions) do gene GADPH, gene de resistência a ampicilina (amp^r) para seleção em bactérias do tipo

E. coli e gene de resistência a neomicina (neo^r) (fig. 1A) que permite seleção dos parasitas transfectados. A construção pTEXCRIT foi gerada a partir do vetor pTEX (fig. 1B).

Para melhorar a expressão do CRIT foi realizada uma nova construção a partir do vetor p33 (fig. 2A), que apresenta um promotor ribossomal de cepa CL, para transfecção em *T. cruzi*, denominado p33CRIT (fig. 2B).

2.3 ANALISE DOS PARASITAS TRANSGÊNICOS

ANALISE FUNCIONAL:

Uma vez obtidos parasitas resistentes à droga o primeiro intuito foi analisar a atividade do gene CRIT nos parasitas transgênicos. Para isso, foi realizado um ensaio para determinar se a população pTEXCRIT em *T. cruzi* era resistente à lise pelo complemento em SNH na concentração de 50%. Anteriormente foi observado que parasitas transgênicos foram totalmente lisados em soro total, 100% de concentração (dados não mostrados).

Como mostrado no gráfico 4, foi possível observar valores médios das lises entre parasitas selvagens e transgênicos de *T. cruzi*. Após 1 minuto de incubação o processo de lise é iniciado, sendo que 20% dos parasitas selvagens já haviam sido lisados com SNH enquanto apenas 8% dos parasitas transgênicos sofreram lise. Aos 2,5 min. 28% dos parasitas transgênicos foram lisados, enquanto 40% dos selvagens sofreram lises. Aos 5 minutos 85% dos parasitas selvagens e 55% dos transgênicos haviam sido lisados. Após 10 minutos os parasitas selvagens já haviam sido completamente lisados enquanto 18% dos parasitas transgênicos sobreviveram. Após 30 minutos não havia parasitas sobreviventes nos dois casos.

Diante do resultado anterior se caracterizou a resposta em *T. cruzi* ficando definido analisar se a presença de um promotor (promotor ribossomal) poderia favorecer a transcrição do gene e aumentar a resistência à lise em *T. cruzi*. Para isso gerou-se transgênicos na cepa y com a construção p33CRIT.

Transgênicos em *T. cruzi* com a construção pTEXCRP foram utilizados como controle, para comparar a resistência à lise pelo complemento adquirida pela sobreexpressão dos genes em estudo.

O seguinte objetivo foi comparar se houve diferenças entre as lises dos parasitas transgênicos a partir da expressão das construções: pTEXCRIT, p33CRIT, pTEXCRP e

plasmídeo pTEX, sendo estas comparadas com parasitas selvagens em *T. cruzi*. Para isto realizamos ensaio de lise com 50% de soro em diferentes intervalos de tempo, para avaliar a ativação do complemento. O resultado mostrou que parasitas transgênicos expressando o gene CRIT ou gene CRP apresentaram semelhante capacidade de resistir a lise pelo complemento (graf.5).

Para verificar se os genes exógenos estavam sendo expressas nos parasitas transgênicos, foi realizado Southern blotting na tentativa de detectar o DNA plasmidial.

Para detecção do pTEXCRIT, foi obtido DNA genômico das diferentes populações parasitárias transgênicas de *T. cruzi*, as amostras corridas em gel TBE/agarose 0,8% e transferido para membrana de nylon para execução de Southern blotting, onde não foi possível obter hibridização positiva (resultado não mostrado). Então procurou-se uma metodologia mais sensível, sendo realizado PCR (reaction chain polymerase) com oligos do gene CRIT, que amplificam a ORF (open read frame) do gene através de PCR. A partir da amplificação foi possível obter produtos de amplificação com tamanho de 800 pB que corresponde ao tamanho do gene. Na hibridização das amostras utilizamos sonda fria derivada do gene CRIT para hibridização em membrana de nylon. A figura 3 mostra a detecção, através de sonda, do produto da amplificação com oligonucleotídeos do gene CRIT a partir de DNA genômico de parasitas transgênicos.

DISCUSSÃO

Genes envolvidos com resistência a lise em *T. cruzi*

Os resultados mostraram que o CRIT é funcional em formas epimastigotas de *T. cruzi*. O gráfico 5, indica uma resistência entre 20-30 % dos parasitas pTEXCRIT a lise mediada pelo complemento se comparados aos dados de parasitas selvagens. É possível pensar que existam semelhanças na eficiência entre receptores para C3 (CRP) e para C2 (CRIT). Os resultados mostraram que formas epimastigotas de *T. cruzi* transfectados com CRP apresentam uma resistência similar à dos transgênicos que expressam o CRIT (graf. 5). O papel de CRP na resistência a lise pelo complemento em *T. cruzi* já foi mostrado por Norris et al. (1998).

A conversão de epimastigota para tripomastigota coincide com a expressão de CRP na superfície celular e aquisição de resistência ao complemento. Foram usados parasitas transgênicos para mostrar função de CRP. Formas epimastigotas de *T. cruzi* cepa y sensíveis ao complemento tornaram-se resistentes quando expressaram CRP episomalmente (Norris, 1998).

Outras moléculas relacionadas com a evasão da lise em outros parasitas poderiam ter homólogos em *T. cruzi*.

Segundo Norris (1998), a proteína **CRP** (160 Kda) tem como função restringir as vias, clássica e alternativa de ativação do complemento através da ligação com componentes do complemento, C3b e C4b; que desta maneira, interrompe a ligação e ação proteolítica da C3 convertase.

Além de CRP, tripomastigotas expressam em sua superfície várias glicoproteínas ligadas à membrana através de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Shenkman *et al.*, 1988; Guther *et al.*, 1992; Cardoso de Almeida and Heise, 1993) estas proteínas possuem massa molecular entre 82 e 90 kDa e pertencem à família das glicoproteínas gp 85. Outra glicoproteína de superfície muito estudada é a Tc-85 que pertence à uma família de moléculas heterogêneas no que diz respeito ao tamanho, ponto isoelétrico e glicosilação (Zingales *et al.*, 1982; Abuin *et al.*, 1989) Tem sido descrito a sua participação na adesão e penetração dos tripomastigotas em células de mamíferos (Alves *et al.*, 1986).

Na superfície de epimastigotas e formas tripomastigotas metacíclicas há um alto número de cópias de moléculas de mucinas, que correspondem a o-gliconjugados com um alto teor de açúcares o-ligados. As mucinas de *T. cruzi* estariam organizadas em uma família com mais de 484 membros (Di Noia, *et al.*, 1995; Salazar *et al.*, 1996; Freitas-Junior *et al.*, 1995). Estas moléculas de superfície também poderiam de certa maneira estar envolvidas em mecanismos de evasão da lise, mas não há evidências diretas descrevendo os mecanismos.

O CRIT foi descrito como um receptor trispanning órfão encontrado na superfície da membrana plasmática e no interior do tegumento da membrana de formas adultas de *Schistosoma*. Através da ligação com C2 o CRIT é capaz de evitar a ligação entre C2 e C4b na superfície do parasita e formar a C3 convertase.

A função reguladora do complemento através do CRIT é sugerida através de ensaios de lise nos quais o peptídeo CRIT-ed1 que contém a região de ligação ao C2, causa inibição da lise (Inal, 2002).

Ensaio hemolítico com o uso de peptídeos inibidores (CRIT) pré incubados com C2 foram realizados para demonstrar que a inibição da via clássica ocorre devido a interação entre C2 e os peptídeos utilizados. Após incubação foram observados os efeitos da atividade do complemento: Considerando os peptídeos CRIT (CRIT-based peptides) foi verificada redução nas hemólises dos eritrócitos de 90% (sem uso de peptídeo) para 40%, indicando que a fração H17 liga-se ao C2 e mais efetivamente, evita a formação de C3 convertase (Inal, 2002).

Estratégias de genética clássica em tripanosomatídeos para avaliar a função dos genes tem limitações devido a complexa regulação gênica destes organismos. Não há promotores de RNA Pol II descritos que permitam sobreexpressar genes, nem em mutantes termosensíveis que facilitem a análise do gene como em *Saccharomyces cerevisiae*.

Sistemas induzíveis com promotor T7 e tetraciclina ainda não tem sido mostrado como satisfatório em *T. cruzi*. Vários estudos, atualmente, vêm tentando aprimorar o sistema de RNA-antisense que permita avaliar a função de um gene específico.

O fato de que organismos evolutivamente distantes apresentem genes homólogos em função, sugere que eles estariam submetidos à mesma pressão adaptativa nos mamíferos.

Alguns estudos mostram uma alta homologia entre fatores do complemento em diferentes eucariotos, sendo que a cascata efetora é similar entre, os componentes do complemento e os efeitos provocados pela sua ativação. Por exemplo os componentes C2, C3 entre outros são similares entre eucariotos superiores, assim como também poderiam ser conservadas as moléculas receptoras presentes na superfície dos parasitas que poderiam conduzir, a também conservadas, estratégias de evasão da lise. Segundo Sunyer *et al.*, (1998) Peixes parecem ter moléculas funcionais em todas as vias de ativação do complemento, incluindo o MAC. Todos os outros vertebrados incluindo peixes, anfíbios, répteis, pássaros e mamíferos apresentam um desenvolvido sistema complemento que envolve todas as vias de ativação do complemento e o MAC.

Experimentos preliminares (não mostrado) nos indicam a presença do gene CRIT em *T. cruzi*, ao ser amplificada uma região central do gene com o uso de oligonucleotídeos construídos em relação ao gene CRIT de *Schistosoma*. Atualmente, estamos sequenciando os produtos obtidos através de PCR (não mostrado).

Ativação do complemento

A ativação do sistema complemento normalmente ocorre por ligação de imunoglobulinas (Ig) a antígenos específicos que podem ativar a via clássica e, por esta razão, o complemento participa como mecanismo efetor principal para a imunidade humoral específica (Matsushita, 1996).

Esta ativação pode ocorrer através da via alternativa ou através da via das lectinas. Em ambos os casos a presença de resíduos presentes na superfície dos microorganismos, tais como manose, contribui para ativação do sistema complemento diante da presença do microorganismo.

Os nossos resultados mostram que a via alternativa é importante como mecanismo de ativação de lise pelo complemento em *T. cruzi*. No entanto, o seu papel no controle da infecção seria sinérgico ao da via clássica e da via das lectinas. Ensaios de inibição da via clássica mostram que a via alternativa é menos efetiva na lise dos parasitas principalmente nos primeiros 10 minutos de contato com o soro (graf.3A e 3B).

Quando em contato com o sangue normal humano, parasitas de *T. cruzi* provocam ativação do sistema complemento e opsonização por C3 (Mosser, 1997). Análises de interações entre parasitas e células hospedeiras usando modelos *in vitro* de infecções com uso de sangue humano indicam que depois do processo de opsonização, tripomastigotas sofrem uma reação de imune aderência ligando-se a receptores CR1 em eritrócitos. Infecções humanas provocadas por *T. cruzi* são processos extremamente rápidos e as formas tripomastigotas podem dispor de várias estratégias de evasão da resposta imune imediatamente após inoculação evitando lises pelo complemento.

Experimentos referentes à ativação do complemento são relevantes para entender a fisiopatologia da doença. Os parasitas precisam invadir células para produzir a infecção. Nossos experimentos *in vitro* mostraram que parasitas expressando CRIT apresentam uma resistência à lise nos primeiros 10 minutos de incubação (graf. 4 e 5). Segundo Dominguez (2002), a deposição de C3 em formas epimastigotas de parasitas, o que acarreta a lise da

membrana, é extremamente rápida sendo que a reação se completa entre 2 e 3 minutos e que 86-93% do C3 fixado tem sido ativado através da via clássica.

Desta maneira, para um sistema *in vivo* períodos superiores a 10 min. representaria um tempo mais que suficiente para invadir um grande número células e progredir a infecção.

Se considerarmos os mecanismos propostos de evasão da lise em *Trypanosoma cruzi*, a expressão de CRP inibiria a formação de C3 convertase, desta maneira afetando a ativação da via clássica e diminuindo a eficiência da via alternativa com a menor presença de C3b no sistema.

O efeito da expressão do CRP é um mecanismo eficiente para permitir ao parasita evadir da lise. Os nossos resultados utilizando um CRIT heterólogo indicam uma possível função de resistência à lise em *Trypanosoma cruzi*. A possibilidade de CRIT estar presente no genoma de *T. cruzi* abre grandes perspectivas de entender um outro mecanismo de evasão que potencializaria a resistência a lise pelo complemento. O sequenciamento do gene e análise da expressão em diferentes estágios de *T. cruzi*, são experimentos chaves para avaliar o possível papel do receptor de C2 (CRIT) na resistência a lise pelo complemento em tripanosomatídeos.

Sendo o sistema complemento a primeira barreira contra patógenos infecciosos, a imunização de animais experimentais com CRIT parece ser um interessante alvo quimioterápico. Sepúlveda (2000), mostrou recentemente que a imunização com o gene CRP era capaz de proteger parcialmente animais de infecção. Uma estratégia utilizando CRP e CRIT poderia produzir um efeito sinérgico e maiores índices de proteção.

Trabalhos recentes (Inal *et al.*, 2003 e Oh, 2003) estão mostrando o potencial do CRIT como quimioterápico de ação antiinflamatória em desordens do sistema do complemento.

LEGENDA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Curva de crescimento de formas epimastigotas de *T. cruzi* cepa Y. As culturas foram iniciadas com 1×10^6 parasitas/ml e contadas diariamente através de hemocítômetro. Os resultados representam uma média de pelo menos dois experimentos realizados independentemente.

Gráfico 2. Lise pelo complemento em *T. cruzi* por diluição seriada do SNH. Os resultados representam uma média de pelo menos dois experimentos realizados independentemente.

Gráfico 3. Ensaio de lise pelo complemento em *T. cruzi* para determinação da cinética de ativação do complemento. Com inibição da via clássica pela adição de EGTA (A) e sem inibição das vias do complemento com 50% de SNH (B) realizados entre 30 seg. e 30 min. Os resultados representam uma média de pelo menos dois experimentos realizados independentemente.

Gráfico 4. Valores comparativos de lise pelo complemento em diferentes períodos de tempo entre parasitas transgênicos (*T. cruzi* pTEXCRIT) e selvagens (*T. cruzi* WT). Os resultados representam uma média de pelo menos dois experimentos realizados independentemente.

Gráfico 5. Valores comparativos dos ensaios de lise com SHN 50% , entre parasitas de *T. cruzi* transgênicos e selvagens através do tempo. Os resultados representam uma média de pelo menos dois experimentos realizados independentemente.

LEGENDA DE FIGURAS

Figura 1. (A) Mapa do plasmídeo pTEX, apresentando o múltiplo sítio de clonagem e os genes de resistência a ampicilina e a neomicina. (B) Construção direcional pTEXCRIT

Figura. 2 (A) Mapa do plasmídeo P33. contendo o promotor ribossomal, o múltiplo sítio de clonagem e os genes de resistência a ampicilina e a neomicina. (B) Construção direcional P33CRIT

Figura 3. Southern blotting de parasitas transfectados com a construção pTEXCRIT. (1) 2ug da amostra do produto de PCR do gene CRIT, amplificado a partir de DNA de *T. cruzi* pTEXCRIT (2) 2ug de produto de PCR de *T. cruzi* pTEX, (3) 2ug de produto de PCR de *T. cruzi* selvagem, formas promastigotas. As amostras foram aplicadas em TBE/Agarose 0.8%, transferidas para uma membrana de nylon e hibridizadas com sonda CRIT. A seta mostra a detecção da banda com tamanho correspondente ao gene CRIT com 860 Pb. (4) controle positivo pTEXCRIT.

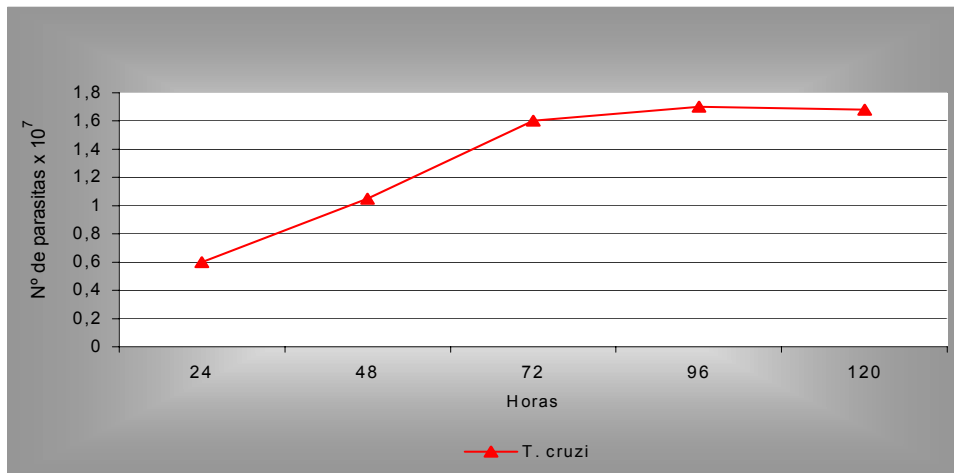
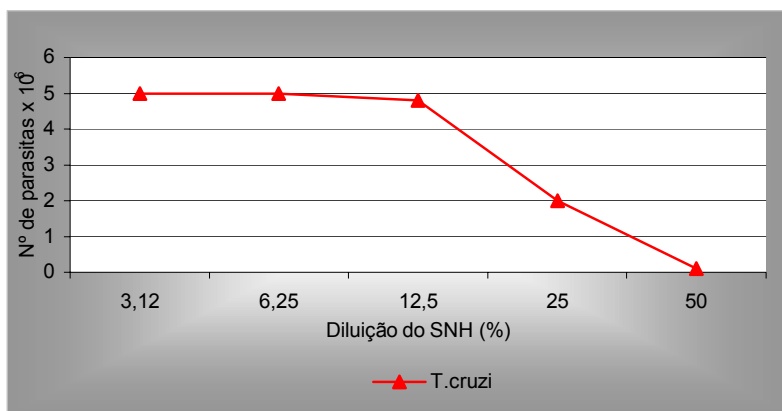
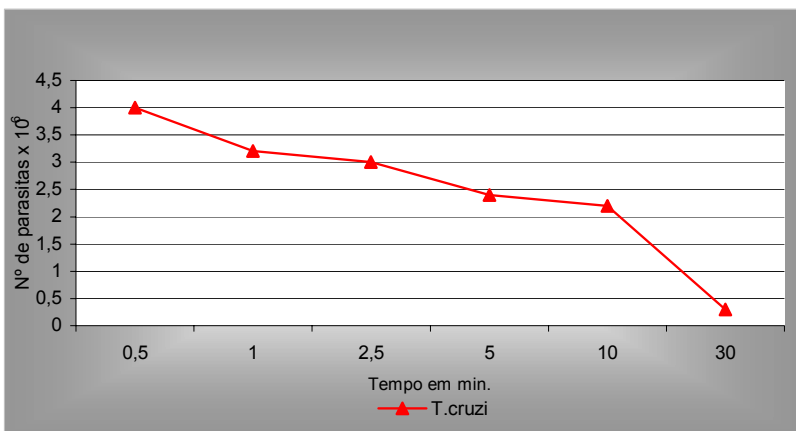


GRÁFICO 1



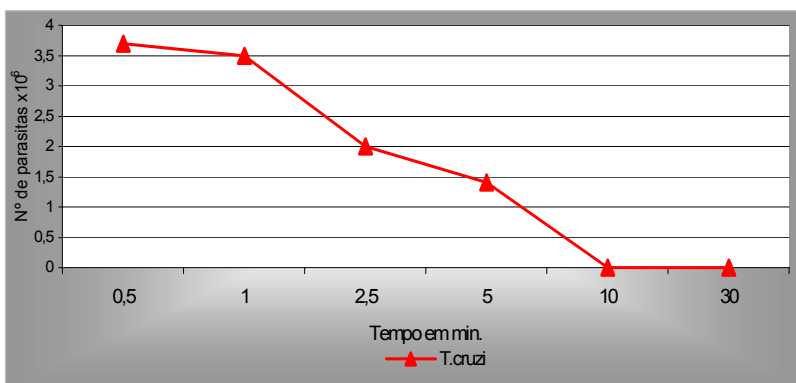
Diluição de SHN %	% de sobrevivida
3,12	100
6,25	100
12,5	95
25	40
50	0

GRÁFICO 2



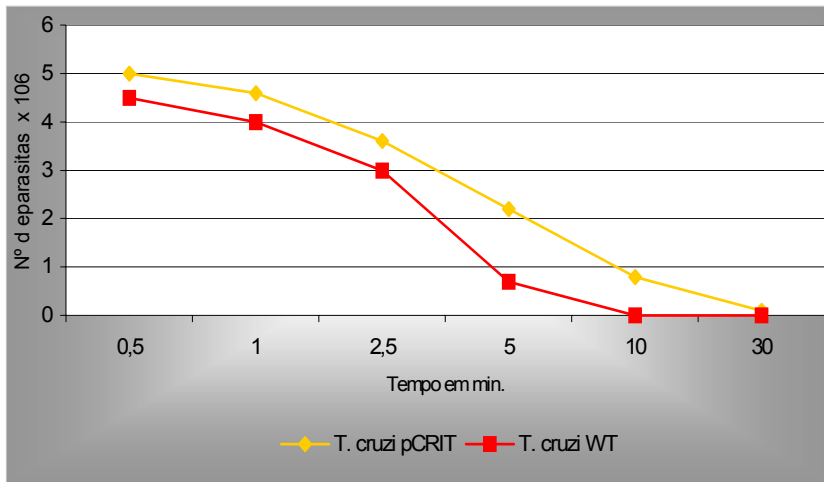
Tempo em min.	% de sobrevida
0,5	80
1	64
2,5	60
5	48
10	44
30	6

GRÁFICO 3A



Tempo em min.	% de sobrevida
0,5	74
1	70
2,5	60
5	28
10	0
30	0

GRÁFICO 3B



Tempo em min.	% de sobrevivida (CRIT)	% de sobrevivida (WT)
0,5	100	90
1	92	80
2,5	72	60
5	45	15
10	18	0
30	0	0

GRAFICO 4

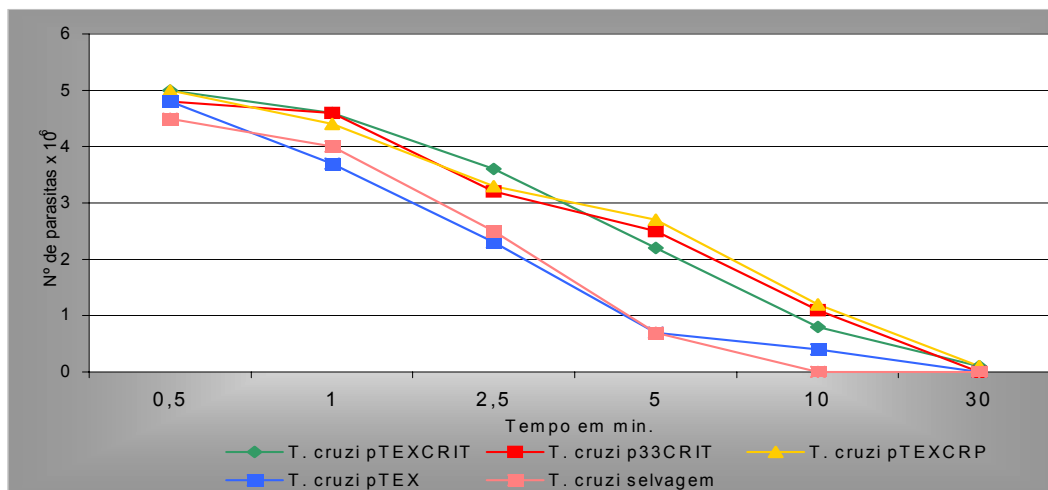
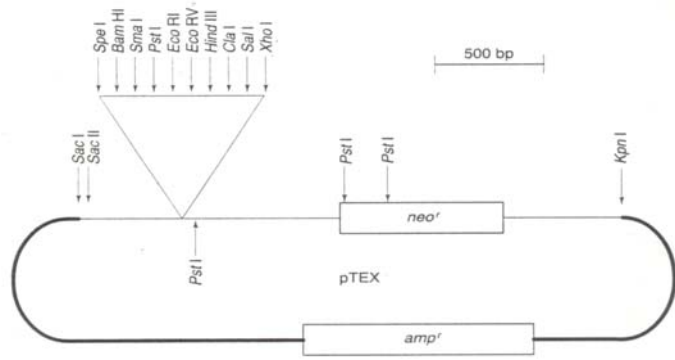
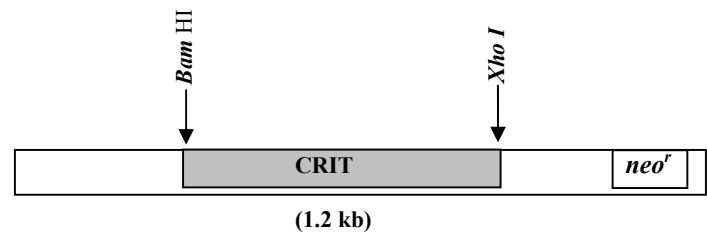


GRÁFICO 5

Tempo em min.	% de sobrevivida CRIT	% de sobrevivida p33CRIT	% de sobrevivida CRP	% de sobrevivida pTEX	% de sobrevivida WT
0,5	100	96	100	96	90
1	92	92	88	74	80
2,5	72	64	66	46	50
5	44	50	54	14	14
10	16	22	24	8	0
30	0	0	2	0	0

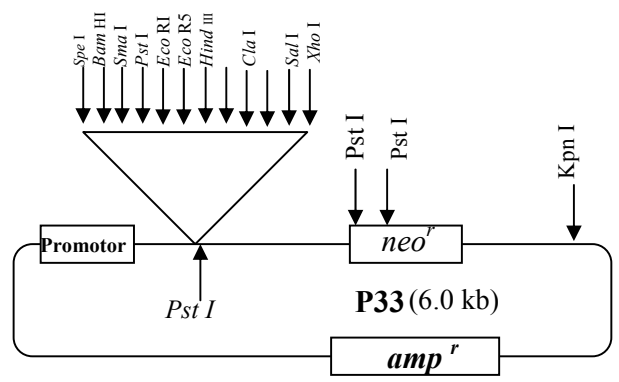


A

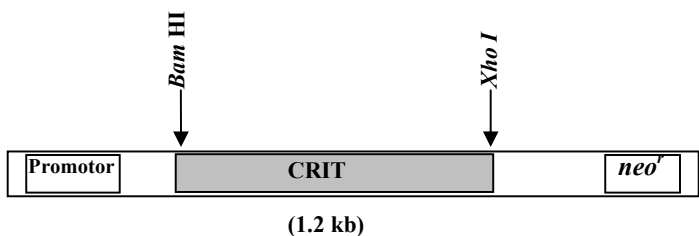


B

FIGURA 1



A



B

FIGURA 2

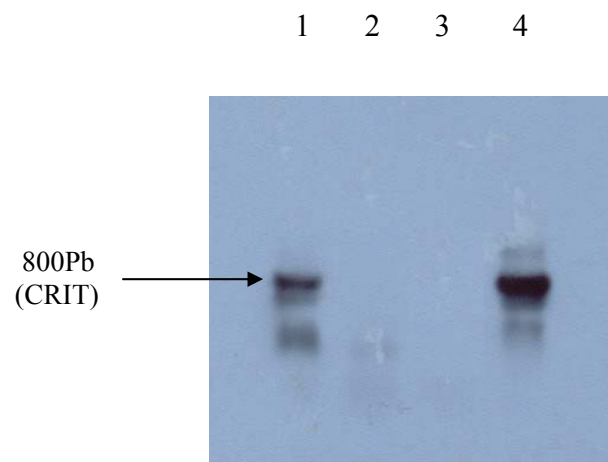


FIGURA 3

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUIN, G.; COLLI, W.; DE SOUZA, W. and ALVES, A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* involved in cell invasion (Tc-85) is heterogeneous in expression and molecular constitution. *Mol. Biochem. Parasitol.* 35: 229-237, 1989.

ALVES, M.J.M.; ABUIN, G.; KUWAJIMA, V. Y. and COLLI, W. Partial inhibition of trypomastigotes entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 21: 75-82, 1986.

BUDZKO, D. B.; PIZZIMENTI, M. C. and KIERSZENBAUM, F. Effects of complement depletion in experimental Chagas disease: immune lysis of virulent blood forms of *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 11:86-89, 1975.

CARDOSO DE ALMEIDA, M. L. AND HEISE, N. Proteins anchored via glycosylphosphatidylinositol and solubilizing phospholipases in *T. cruzi*. *Biol. Research* 26:285-312, 1993.

DI NOIA, J. M.; SACHEZ, D. and FRASCH, C. The protozoan *T. cruzi* has a family of genes resembling the mucin genes of mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 270: 24146-24149, 1995.

DOMÍNGUEZ, M.; MORENO, I.; LÓPEZ-TRASCASA, M. and TORAÑO, A. Complement interaction with trypanosomatid promastigotes in normal human serum. *J. Exp. Med.*, 195: 451-459, 2002.

FISCHER, E.M.; OUASSI, P.; VELGE, J. CORNETTE, and KAZATCHKINE, M. gp58/68, a parasite component that contributes to the escape of the trypomastigote form of *T. cruzi* from the human alternative complement pathway. *Immunology*, 65: 299-303, 1988.

FREITAS-JUNIOR, L. H.; BRIONES, M. R., SCHENKMAN, S. Two distinct groups of mucin-like genes are differentially expressed in the developmental stages of *T. cruzi*. *Mol. Biochem Parasitol.* 93: 101-114, 1998.

GUTHER, M.L.S. CARDOSO DE ALMEIDA, M. L. YOSHIDA, N. AND FERGUSON, M.A.J. Structural studies on glycosylphosphatidyl inositol membrane anchor of T. Cruzi 1G17-antigen. *J. Biol. Chem.* 267: 6820-6828, 1992.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids *J Mol Biol.* Jun 5;166(4):557-80, 1983.

INAL, J. M. and SCHIFFERLI, Complement C2 receptor inhibitor trispanning and the β -chain of C4 share a binding site for complement C2. *J. Immunol.* 168: 5213-5221, 2002.

INAL, J. M. and SIM, R. B. A Schistosoma protein, Sh-TOR, is a novel inhibitor of complement which binds human C2. *FEBS Letters* 470: 131-134, 1999.

INAL, J. M.; PASCUAL, M.; LESAVRE, P. and SCHIFFERLI, J. A. Complement inhibition in renal diseases. *Nephrol Dial Transplant.* 18: 237-240, 2003.

KELLY, J. M., WARD, H. M., MILES, M. A., KENDALL, G. A shuttle vector wich facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Nucleic Acids Res.* 20: 3963-9, 1992.

LÓPEZ, L. R., M. C. L. LÓPEZ. Parasitologia Molecular. Nuevas Tendencias. Madrid. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 1993, 430p.

JOINER, K., W. DIAS DA SILVA, M. RIMOLDI, C. HAMMER, AQ. SHER, AND T. KIPNIS. Biochemical charecterization of the factor produced by trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* the accelerates the decay of complement C3 convertases. *J. Biol. Chem.* 263: 11327-11335, 1988.

MATSUSHITA, M., The lectin pathway of the complement system. *Microbiol. Immunol.* 40: 887-893, 1996.

MOSSER, D.M., and BRITTINGHAM, A. *Leishmania*, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. *Parasitology.* 115: 9-23, 1997.

MOTA, I., and UMEKITA, L. The effect of C3 depletion on the clearance of *Trypanosoma cruzi* induced by IgG antibodies. *Immunol. Lett.* 21:223–226, 1989.

NEVES, D. P. Parasitologia Humana. 9ª edição. São Paulo. Editora Atheneu, 1997.

NORRIS, K. A. Stable transfection of *Trypanosoma cruzi* epimastigota with the trypomastigote-specific complement regulatory protein cDNA confers complement resistance. *Infect Immun.*, 66: 2460-2465, 1998.

NORRIS, K. A., J. E. SCHRIMPF, M. J. SZABO. Identification of the gene family encoding the 160-kilodalton *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein. *Infect. Immun.*, 65: 349-357, 1997.

OH, K.S.; NA, D.K.; KWEON, M. H. and SUNG, H. C. Expression and purification of the anticomplementary peptide Sh-CRIT-ed1 (formerly Sh-TOR-ed1) as a tetramultimer in *Escherichia coli*. *Protein Expression & Purification*, 2003 (Article in press).

RAMIREZ, M. I., L. M. YAMAUCHI, L. H. G. FREITAS JR., H. UEMURA, S. SCHENKMAN. The use of the fluorescent protein to monitor and improve transfection in *T. Cruzi*. *Mol. Bioch. Parasitology*. 111: 235-240, 2000.

SALAZAR, N.A., MONDRAGON, A. and KELLY, J.M. Mucin-like glycoprotein genes are closely linked to members of the trans-sialidase super-family at multiple sites in the *T. cruzi* genome. *Mol. Biochem. Parasitol.* 78: 127-136, 1995.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. AND MANIATIS, T. Molecular cloning. *A laboratory manual*. 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press. 1989.

SCHENKMAN S, YOSHIDA N, CARDOSO DE ALMEIDA M L. Glycophosphatidylinositol-anchored proteins in metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* *Mol Biochem Parasitol.* 29: 141-151, 1988.

SEPULVEDA, P.; HONEBEYRIE, M. LIEGEARD, P.; MASCILLI, A. and NORRIS, K. A. DNA-Based immunization with *T.cruzi* complement regulatory protein elicits

complement lytic antibodies and confers protection against *T. cruzi* infection. *Infect. Immun.* 68 :4986-4991, 2000.

SOUTHERN, E. M., Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503, 1975.

SUNYER, J.O., ZARKADIS, I.K., LAMBRIS, J.D. Complement diversity: a mechanism for generating immune diversity? *Immunol. Today* 19, 519–523, 1998.

ZINGALES, B. KATZIN, A. M. ARRUDA, M.A. and COLLI, W. Correlation of tunicamycin-sensitive surface glycoproteins from *T. cruzi* with parasite interiorization into mammalian cells. *Mol. Biochem. Parasitol.* 16: 21-34, 1982.

4.ANEXO

**Avaliação do sistema complemento em tripanosomatídeos
utilizando ferramentas de Biologia Molecular**

JUSTIFICATIVA

Através deste anexo pretendemos complementar os dados apresentados no artigo, dando uma idéia geral da linha de trabalho originada a partir da presente tese que representa um esforço em consolidar áreas de pesquisas não exploradas anteriormente por parasitologistas da nossa região.

Na tese, basicamente enfrentamos dois desafios metodológicos para responder a nossa pergunta central do trabalho, o primeiro foi: como estudar lise mediada pelo complemento em tripanosomatídeos e o segundo, era estabelecer e padronizar a metodologia de geração de transgênicos em tripanosomatídeos com o intuito de analisar a função gênica dos genes em estudo.

No formato de resultados e discussão, apresentamos aqui o nosso racional de trabalho, e as decisões que tomamos para direcionar a nossa pesquisa que esta em pleno andamento.

Ainda, colocamos a metodologia completa para permitir ser uma guia para quem pretenda continuar ou iniciar trabalhos nesta área.

Esperamos que este anexo permita enriquecer a discussão e ajude a futuros estudantes.

METODOLOGIA

1. PARASITAS

Promastigotas de *Leishmania chagasi* : linhagem MA2 - clone P5

Promastigotas de *Leishmania major* : linhagem 13331

Epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*: cepa Y

2. MEIOS DE CULTURA, SOLUÇÕES

LIT (Liver Infusion Tryptose): infusão de fígado bovino 36,0 g/l, triptose 10,0 g/l, sacarose 20 g/l, hemina 10 mg/l, soro fetal bovino 20%, streptomina/penicilina (100ug/ml) 0,1%. **LB** (Luria Bertani), pH 7,3: bactotripton 10 g/l, extrato de levedura 5 g/l e NaCl 5g/l. **LB sólido**: LB contendo 2,0 % de agar bacteriológico

PBS: Na₂HPO₄ 13,49 g/l, NaH₂PO₄ . 2 H₂O 0,74 g/l e NaCl 14,25 g/l, pH 8,2.

SORO NORMAL HUMANO (SNH): Sangue total era coletado através de punção venal e deixado à temperatura ambiente por 30 min. para coagulação. O soro era obtido por centrifugação da amostra a 1300 x g por 10 min. **SORO NORMAL HUMANO INATIVADO (SNHI)**: soro humano normal inativado a 65°C por 30 minutos.

SOL. INIBIDORA DA VIA CLÁSSICA DO COMPLEMENTO: 10mM EGTA, 7mM MgCl, SNH e meio LIT. **TAMPÃO DE ELETROPORAÇÃO**: 137 mM NaCl, 21 mM HEPES, 5 mM KCl, 5,5 mM Na₂HPO₄, 0,77 glucose, pH 7.

3. MANUTENÇÃO E CURVA DE CRESCIMENTO PARASITÁRIA

Formas promastigotas de *Leishmania chagasi* e *Leishmania major* e formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* foram mantidas em meio de cultura axênico, LIT mantidas a 28°C. Os repiques das culturas foram realizados a cada 72 horas. Curvas de crescimento iniciadas com 1x10⁶ parasitas/ml foram quantificadas diariamente através de contagem em hemocítômetro.

4. BACTÉRIAS

Em todos os experimentos foram utilizadas linhagens de *Escherichia coli* DH5 α (Hanahan, 1985) que apresenta o genótipo: F-, f80dlacZdelta M15, delta-(lac ZYA-arg F) U169, end A1, rec A1, hsd R17 (rK-mK+), deo R, thi-1, sup E44, lambda-, gyrA96, rel A1.

No cultivo das bactérias foram utilizados os seguintes meios de cultura: LB (Luria Bertani), pH 7,3 e LB sólido (2% agar).

5. PLASMÍDEOS

Foram utilizados os plasmídeos: pcDNA3 (Invitrogen, USA), pTEX (Kelly et al., 1992), p33 (Ramirez, et al., 2000).

6. ELETROFORESE DE DNA

As moléculas de DNA íntegras ou digeridas por enzimas de restrição foram submetidas à eletroforese unidirecional em gel de agarose (concentração de 0,8-1,5%) em tampão TBE 1x (Tris-borato 50 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0) com adição de 8 μ l da solução de brometo de etídio (0,01g/ml). Sendo utilizados como referência os fragmentos do bacteriófago λ digerido com *Hind*III cujo tamanho varia de 23 kb a 0,5 kb. As amostras de DNA foram aplicadas no gel após adição de tampão de amostra (TBE 1x; xileno-cianol 0,83 mg; azul de bromofenol 0,83 mg; glicerol 6%) para diluição final de 1x. As corridas eletroforéticas foram realizadas em voltagem constante a 100 V. Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta com filme Polaroid 667.

7. CONSTRUÇÃO DE VETORES

7.1 Subclonagem do gene CRIT nos vetores pTEX e pTEX rib (p33).

O clone recombinante pcDNA3-CRIT, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. J. Inal do Kanton Basel Hospital-Swiss, foi utilizado para subclonar o gene CRIT no vetor

pTEX e no vetor p33 através de digestão enzimática com as enzimas *Bam*HI / *Xho*I. O produto da digestão do pcDNA3-CRIT foi extraído do gel através do kit de purificação Concert Matrix-Gel extraction system (Invitrogene, Life Technologies) resultando em um fragmento de 1.2 kb que corresponde ao gene CRIT com adição de uma região 3' não traduzida (3' UTR). Os plasmídeos pTEX e p33 que apresentavam 5.6 kb e 6.0 kb respectivamente, também tiveram seus fragmentos linearizados com *Bam*HI / *Xho*I sendo extraídos do gel com kit de purificação. O gene CRIT (1.2kb) foi ligado aos vetores por 16 h a 16°C com a enzima T4 DNA ligase gerando as construções: pTEXCRIT e p33CRIT.

7.2 Construção pTEX –CRP

A construção pTEX-CRP contendo a região codificadora do gene CRP de 1,1 kb foi gentilmente cedido pela Prof. Dra. Karen A. Norris da University of Pittsburgh School of Medicine-Pensylvania.

8. TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS *E. coli* DH 5 α

Para obtenção de clones recombinates: pTEXCRIT, p33CRIT, ptexCRP, 100 μ l de bactérias competentes de linhagem *E. coli* DH5 α (Hanahan,1985) eram colocados em um tubo ependorff e adicionados 5 μ l do DNA plasmidial (durante este procedimento as bactérias devem permanecer no gelo). Após permanecer 30 min. em gelo os tubos eram aquecidos a 42°C por 1 min. e imediatamente no gelo por 5 min. Após acréscimo de 900 μ l de meio LB, os tubos foram incubados a 37°C no shaker a 200 rpm por 1 hora. 500 μ l da cultura foi semeado em placas de Petri contendo LB/Agar/ampicilina (100 μ g/ml). As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas.

9. EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL POR LISE ALCALINA (MINI-PREP)

As colônias crescidas LB/Agar/ampicilina (100 µg/ml) foram coletadas da placa, adicionadas em 2ml de meio LB/ ampicilina (100 µg/ml) e incubadas a 37°C por 16 horas. Para extração do DNA plasmidial 2ml das culturas crescidas em LB/amp (100µg/ml) foram vertidas em tubo eppendorf e centrifugadas por 2' a 15.800 x g. O sobrenadante foi desprezado deixando o precipitado seco. O precipitado era ressuspenso com 100 µl de solução: glucose 50mM, EDTA 10mM, Tris-HCl 25mM e posterior adição de 200 µl de solução: NaOH 0,2M, SDS 1% e 150 µl de solução: C₂H₄KO₂ 5M, C₂H₄O₂. As soluções foram misturadas por inversão e os tubos depositados no gelo por 5 min. As amostras foram centrifugadas por 5min. a 15.800 x g e o sobrenadante (que contém o DNA) recolhido em um novo tubo eppendorf e o precipitado foi desprezado. 400µl de isopropanol foram adicionados para precipitar o DNA após centrifugação por 5min. a 15.800x g. O sobrenadante foi desprezado e 1 ml de etanol 70 % era adicionado para lavar o DNA, a amostra foi centrifugada por 2 min. a 15.800x g. Depois de seco o DNA ressuspenso com 20 µl de H₂O ou T.E.

10. ENSAIOS DE LISE PELO COMPLEMENTO

10.1 Ensaio de lise pelo complemento por diluição seriada do SNH

O SNH foi diluído em meio de cultura nas seguintes proporções: 1:32, 1:16: 1:8, 1:4, 1:2 e sem diluir que correspondem as concentrações de 3,12% 6,25% 12,5%, 25%, 50% e 100% respectivamente. Culturas de *L. chagasi* e *L. major* (promastigotas) e de *T. cruzi* (epimastigotas) na fase exponencial (após 72h) de crescimento foram centrifugados a 720 x g por 5 minutos, lavadas com PBS, novamente centrifugadas e ressuspenso em meio LIT com concentração ajustada para 5x10⁶ parasitas/ml. Nesta concentração 100µl da cultura foi adicionado a 100µl de SNH diluído e não-diluído, com posterior incubação de 30 minutos a 37°C. A interrupção do ensaio foi realizada com adição de 800 µl de meio de cultura a 4°C

ao volume da reação. A reação foi observada ao microscópio e o número de parasitas vivos foi contado em hemocitômetro.

10.2 Mecanismos de ativação do complemento por *L. chagasi*, *L. major* e *T. cruzi*

Culturas axênicas de promastigotas de *L. chagasi*, *L. major* e epimastigotas de *T. cruzi* iniciadas com 1×10^6 parasitas/ml foram crescidas em meio LIT e incubadas a 28°C por 72 h. Após este período, amostras foram ajustadas à concentração de 5×10^6 parasitas/ml e submetidas a um ensaio de lise pelo complemento com uso de inibidores da via clássica. 100 µl da suspensão de parasitas (5×10^5 par./ml) foram incubados a 37°C com 100 µl de solução 10mM EGTA, 7mM MgCl₂, 50% e 12,5% SHN e meio LIT por 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 e 30 min. Após a incubação 800µl de meio de cultura a 4°C foram adicionados as amostras para interromper a reação. Uma alíquota de 10 µl foi usada para calcular através de hemocitômetro a porcentagem de parasitas sobreviventes.

11. TRANSFECCÃO EM PARASITAS

11.1 Curva de tolerância à droga G 418

Amostras de culturas axênicas de *L. chagasi*, *L. major* e *T. cruzi* iniciadas com 1×10^6 parasitas/ml em LIT a 28°C por 72 h. foram ajustadas à concentração de 1×10^5 parasitas/ml e distribuídas em placa de cultura de célula de 24 poços. 1 ml da suspensão era depositado por poço e diferentes volumes de uma solução 50 mg/ml de G418 (análogo da neomicina) foram adicionados para determinar a DL 50 que corresponde a concentração onde 50% dos parasitas estão vivos e 50% mortos. Para *L. chagasi* e *L. major* foram utilizadas as seguintes concentrações de G 418: 0, 5µg/ml, 10µg/ml, 15 µg/ml, 20µg/ml e 25 µg/ml e para *T. cruzi*: 0,50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml. O ensaio foi incubado a 28°C por 160 horas e a

quantidade de parasitas sobreviventes contadas em hemocitômetro a cada 48 horas. A concentração ideal de droga a ser utilizada para selecionar parasitas transfectados deve manter uma média entre parasitas vivos e mortos.

11.2 Transfecção de formas promastigotas de *Leishmania major* e epimastigotas de *T. cruzi*.

Formas promastigotas de *L. major* e epimastigotas de *T. cruzi* foram crescidas a uma densidade de 1×10^7 /ml em meio LIT contendo 20% de soro bovino fetal. Os parasitas foram lavados em PBS e ressuspensos para 2×10^8 /ml em tampão de eletroporação (137 mM NaCl, 21 mM HEPES, 5.0 mM de KCl, 5.5 mM Na_2HPO_4 , 0.77 mM de Glucose, pH 7.0). Os parasitas foram colocados em cuvetas descartáveis de 0,2 mm (Bio-Rad) contendo 25 μ g de plasmídeo pTEX, pxg-GFP-C26, pTEX-CRIT, p33-CRIT, pTEX-CRP e eletroporados usando o Cellject duo (HYBAID) a 300V e 525 μ F com 2 pulsos consecutivos. Os parasitas eletroporados foram incubados a 28°C e selecionados em meio LIT contendo 5,0 μ g /ml de G418 para *L. major* e 200 μ g/ml de G418 para *T. cruzi*.

12. EXTRAÇÃO DE DNA

Formas promastigotas de *L. major* e epimastigotas de *T. cruzi* foram crescidas a uma densidade de 1×10^7 /ml em meio LIT para extração do DNA. 2 ml da cultura foram centrifugados em tubo eppendorf por 10 min a 2.000 x g. O sedimento foi ressuspensão em 150 μ l de tampão TELT (Tris-HCl 1M, pH 8.0; EDTA 0,5 M pH 9.0; LiCl 5M; Triton X-100) e misturado por inversão, sendo incubado por 5 min. Foi adicionado 150 μ l de fenol:clorofórmio, agitando-se suavemente por 5 min. A amostra foi centrifugada por 5 min a 15.800 x g. O sobrenadante foi colocado em um novo tubo e a ele foi adicionado 300 μ l de etanol, misturado por 15 seg e incubado 5 min e após este período centrifugado por 10 min a 15.800 x g. O

sobrenadante foi desprezado e o sedimento lavado com 1ml de etanol absoluto por 10 seg. A amostra foi centrifugada por 5 min a 15.800 x g, retirado todo o sobrenadante, deixando o precipitado secar. O precipitado foi ressuspensão em 50 µl de TE contendo 20µg/ml de Rnase A.

13. TRANSFERÊNCIA DE DNA PARA FILTROS DE NYLON (“SOUTHERN BLOTTING”)

Os fragmentos de restrição de DNA foram transferidos para membranas de Nylon, segundo Southern (1975) e Sambrook et al. (1989). O gel foi incubado em solução de depurinação 0,25 M HCl por 15 min, depois em solução desnaturante contendo 1,0 mM NaCl e 0,5 M NaOH por 30 minutos. A incubação final foi realizada em tampão neutralizante (0,5 M NaCl, 1M de Tris HCl, pH 8,0) por 30 minutos, a temperatura ambiente. para depurinação. As transferências foram feitas com 10xSSC de acordo com o esquema descrito em Sambrook et al. (1989) por toda a noite. Os DNAs foram fixados à membrana por exposição à luz ultravioleta no aparelho GS Gene Linker da BioRad.

14. HIBRIDIZAÇÃO DA MEMBRANA COM SONDA FRIA

Após transferência over night a membrana já pré-hibridizada por 30 min a 60°C em tampão de hibridização (5xSSC, 0,1% SDS, 5% sulfato de dextran, 1/20 de volume de líquido de bloqueio). 10ng/ml da sonda (CRIT ou neo^R) marcada com fosfatase alcalina, foi adicionada e a hibridização procedeu-se durante 16 horas. Após incubação, a membrana foi lavada (com agitação) 2 vezes com solução pré aquecida de 1X SSC/ 0,1% SDS por 15 min. e duas lavagens com solução pré aquecida de 0,5X SSC/ 0,1% SDS por 15 min. Após lavagens, a membrana foi incubada em tampão de bloqueio [líquido diluído 1:10 em tampão A (100mM tris-HCl, 300mM NaCl pH 9,5-autoclavado)] por 1 h a temperatura ambiente, sendo o tampão, descartado após o período. A membrana foi incubada com anticorpo conjugado, diluído 1:7.500 em tampão A com 0,5% BSA a temperatura ambiente por 1 h, Por

fim a solução foi descartada e a membrana foi lavada por 3 vezes com 0,3% de Tween em tampão A a temperatura ambiente. Após lavagem a membrana foi colocada em um filme plástico e foi adicionado internamente o reagente de detecção. Por fim a membrana foi colocada no cassete e exposto ao filme (HiperFilm-FUJI) permanecendo durante 20 min. O filme foi revelado em revelador Decktol diluído 1:2 em água.

15. EXTRAÇÃO DE RNA (TRIZOL)

Formas promastigotas de *L. major* e epimastigotas de *T. cruzi* foram crescidas a uma densidade de 1×10^7 /ml em meio LIT para extração do RNA total por trizol. 2 ml de cultura foram precipitadas por centrifugação por 5 min. a $1300 \times g$, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense com 1 ml de trizol para ressuspender. A amostra foi incubada a temperatura ambiente por 5 min. e foram adicionados 200 μ l de clorofórmio; agitou-se por inversão por 15 seg. incubou-se logo após por 3 min. A amostra foi centrifugada por 15 min. a $8.000 \times g$ a $4^\circ C$, e a fase aquosa transferida para um novo endorff. Foram adicionados 500 μ l de isopropanol e incubado por 10 min. a temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada por 10 min., a $8.000 \times g$, a $4^\circ C$ e removido o sobrenadante. O precipitado foi lavado com 1 ml de etanol 70% frio e centrifugado por 5 min. a $2.900 \times g$. O sobrenadante foi removido e amostra seca por 15 min. Após este período, a amostra foi ressuspensa em 20 μ l de água mili-q autoclavada. A qualidade do RNA foi checada em gel de agarose /TBE 0,8%.

16. PCR

Nas reações de PCR foram utilizados 5 μ l de 10x PCR buffer, 4 μ l de mix de DNTP, 1 μ l de primer sense 10 mM, 1 μ l de primer antisense 10 mM, 0,5 μ l de *Taq* DNA polimerase, 2 μ l de cloreto de magnésio 50mM, DNA template e água mili-q (q.s.p) As condições dos ciclos de PCR foram: 35 ciclos de $94^\circ C$ por 0.5min, $50^\circ C$ por 0.5 min, $72^\circ C$ por 2 min e para extensão final $72^\circ C$ por 10 min. As condições de

temperatura, número de ciclos e volume das soluções foram modificadas de acordo com os resultados das ampliações. sense (5'-CCCAGATCTCTATGTCTCCAAGT-3') e antisense (5'CCCGGATCCTTAACAAGAGTG-3'). Que correspondem a fase de leitura aberta do CRIT; sense (5'CCCGGATCCGCCTATTTGTCTTGGTAT-3') e antisense(5'CCCCTCGAGTTACACACTAGTTGTAGT-3'). que correspondem a amplificação do bloco central do gene situado entre os nucleotídeos 1032 e 1420.

17. RT-PCR

Amostras de RNA extraídas dos parasitas foram submetidas à síntese de cDNA através da metodologia de RT-PCR (SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® *Taq* –Invitrogen life technologies). Foram utilizadas para cada reação: 25µl de 2x Mix de Reação, 1µl do RNA template, 1µl de primer: sense (5'-CCCAGATCTCTATGTCTCCAAGT-3') com incorporação do sítio *Bg*III, 1 µl de primer anti-sense (poli T), 1 µl de RT/Platinum® *Taq* Mix, água destilada autoclavada para completar 50 µl. As condições do RT-PCR foram: 1 ciclo de 50°C por 30 min. e 94 °C por 2 min. (síntese de cDNA e pré-denaturação) 35 ciclos de 94°C por 15seg, 50°C por 30 seg, 72°C por 1min (amplificação por PCR) e 1 ciclo de 72°C por 10 min (extensão final).

RESULTADOS

1. SISTEMA COMPLEMENTO EM TRIPANOSOMATIDEOS

1.1 CARACTERÍSTICAS DO CRESCIMENTO EM CULTURA

Inicialmente formas promastigotas de *L. major* e *L. chagasi* e formas epimastigotas de *T. cruzi* cepa y foram testadas quanto às características de crescimento em cultura com relação aos níveis máximos alcançados pelas populações nas fases logarítmica e estacionária. As diferenças observadas foram comparadas entre as curvas de crescimento de *L. major*, *L. chagasi* e *T. cruzi*.

L. chagasi alcançou população máxima em um menor período de tempo do que *L. major* e *T. cruzi*, entretanto estes parasitas apresentavam uma fase estacionária mais duradoura (graf.1).

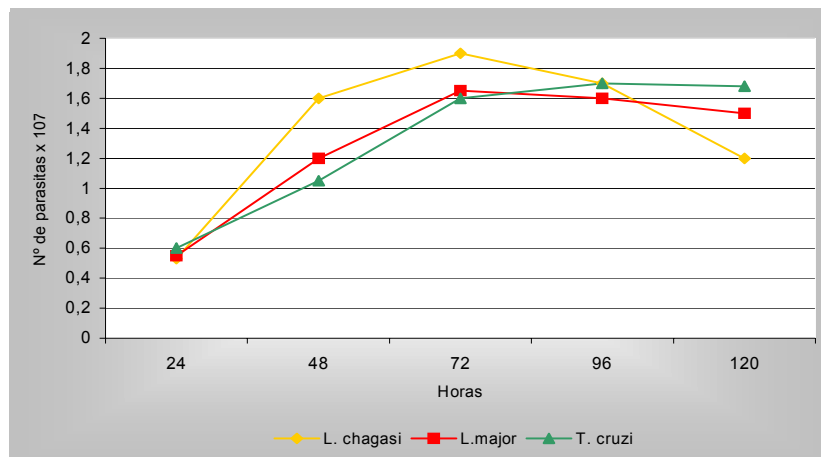


Gráfico 1. Curva de crescimento de formas promastigotas de *L. chagasi* e *L. major* e formas epimastigotas de *T. cruzi* Y. Culturas com 1×10^6 parasitas/ml, foram incubadas a 28°C por 5 dias e contadas diariamente através de hemocítômetro. Os resultados representam uma média de pelo menos dois experimentos realizados independentemente.

1.2. LISE MEDIADA PELO COMPLEMENTO EM TRIPANOSOMATIDEOS

Inicialmente, foi de interesse caracterizar a ação do sistema do complemento diante da presença de diferentes espécies de tripanossomatídeos. A abordagem inicial foi determinar se o soro humano normal (SNH) era capaz de lisar formas evolutivas de diferentes tripanossomatídeos em fase logarítmica de crescimento em cultura axênica (tab. 1).

FORMA EVOLUTIVA	TRIPANOSOMATIDEO	% de LISE (100% de SHN)
PROMASTIGOTA	<i>L. chagasi</i>	100%
	<i>L. major</i>	100%
EPIMASTIGOTA	<i>T. cruzi</i>	100%

Tabela 1. Ensaio de lise com tripanossomatídeos em cultura axênica e utilizando 100% de SHN (soro humano normal) a 37°C por 30 min. A lise dos parasitas observados foi verificada ao corar os parasitas com tripan blue.

Os parasitas foram totalmente lisados na concentração máxima de SNH (100%), ou seja sem qualquer diluição.

O próximo objetivo foi determinar se os diferentes tripanossomatídeos apresentavam capacidade diferencial de serem lisados com diferentes concentrações de SNH. Para isso foi determinada a diluição limite de SNH (diluição mínima de soro, na qual os parasitas são lisados pela ação do sistema complemento presente no soro humano). Desta maneira, foram realizados ensaios de lise pelo complemento por diluição seriada do SNH com culturas de *L. chagasi*, *L. major* e *T. cruzi* na fase

logarítmica de crescimento, para determinar a sensibilidade dos parasitas em relação à concentração do soro.

Como mostrado no gráfico 2, formas promastigotas de *L. chagasi* e *L. major* apresentaram maior sensibilidade ao SNH nas concentrações entre 6,25% e 12,5% de soro. Foi observado que mais de 50% dos parasitas de *L. chagasi* e *L. major* sofreram lise total quando em contato com concentrações até 12,5%; após 30min de contato com 25% de SNH 94% dos parasitas foram totalmente lisados. 60% das formas epimastigotas de *T. cruzi* foram lisadas na concentração de 25% do SNH. Concentrações de SNH superiores a 50% ou iguais, provocaram lise total em todos os parasitas deste ensaio.

Desta maneira, observou-se que, promastigotas de *L. chagasi* e *L. major* são mais sensíveis aos efeitos líticos do soro quando comparados a epimastigotas de *T. cruzi*.

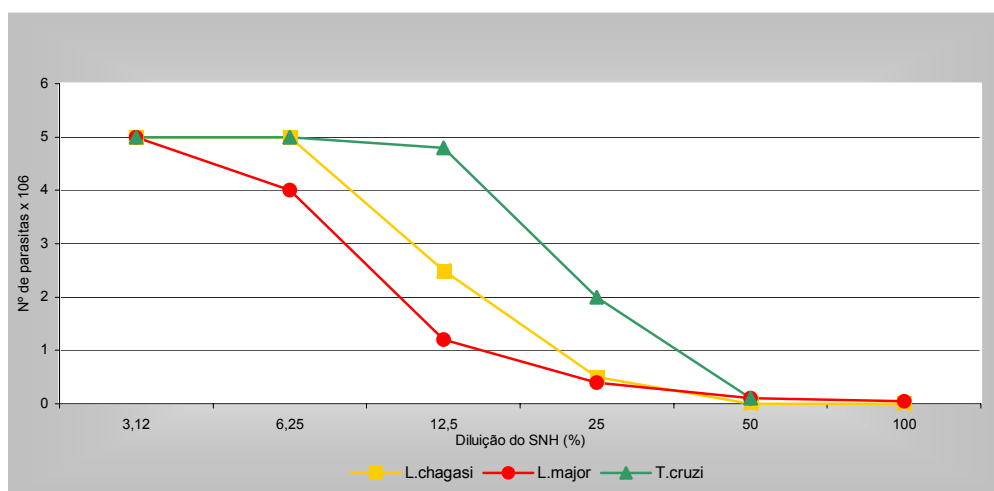


Gráfico 2. Lise pelo complemento de *L. chagasi*, *L. major* e *T. cruzi* y através de diluição seriada do SNH. Os resultados representam uma média de pelo menos dois experimentos realizados independentemente.

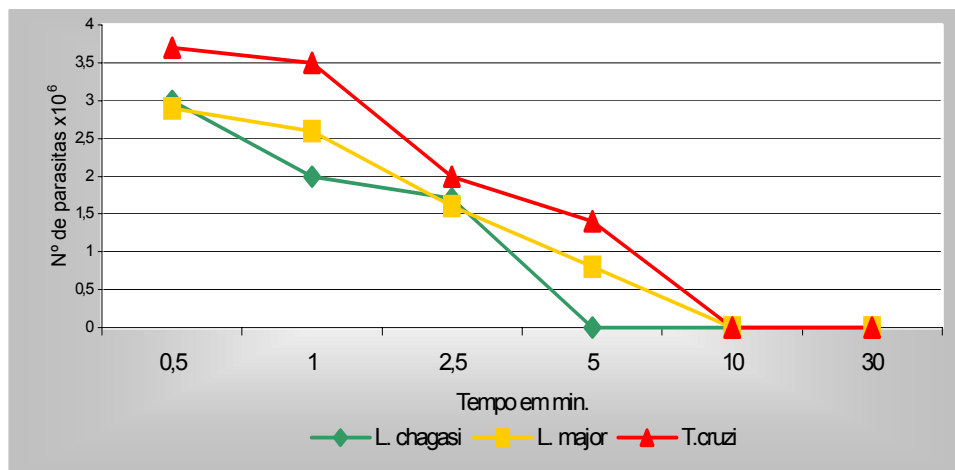
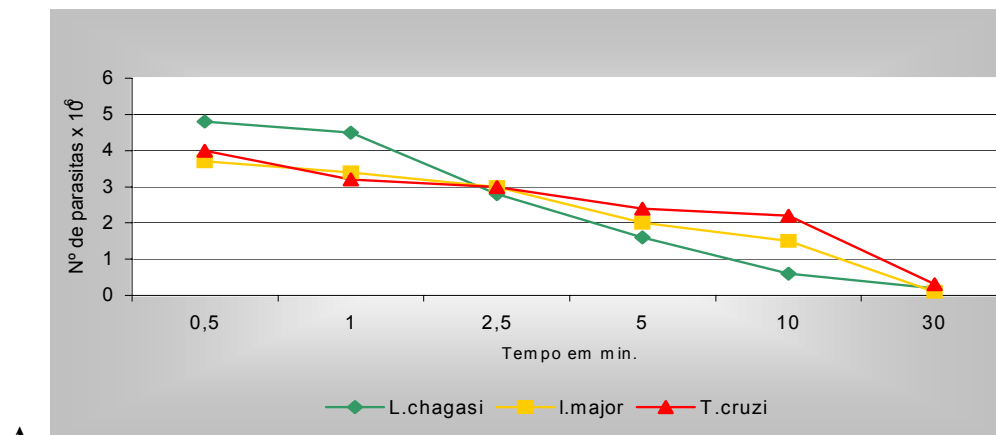
1.3 ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO

Uma vez determinada às diluições limites entre os parasitas, foram estudadas possíveis diferenças nas vias de ativação do complemento nos diferentes tripanossomatídeos para avaliar o papel do sistema complemento. Foi realizado

ensaio de lise hipotetizando as condições fisiológicas da infecção com a finalidade de determinar o tempo mínimo de ativação do complemento diante da presença dos tripanosomatídeos. Os experimentos mediam a soma da ação das vias clássica e alternativa do complemento, e apenas da via alternativa (inibição da via clássica) para observar os efeitos letais provocados pelo SNH.

O ensaio de lise pelo complemento com inibição da via clássica foi realizado através da presença de EGTA (o EGTA é um agente quelante de cálcio, que é requerido na via clássica do complemento e diminui a concentração de magnésio do meio) e de $MgCl_2$ (o magnésio é adicionado devido à necessidade desse íon para ativação da via alternativa). Como a via clássica é dependente dos íons Ca^{+} e Mg^{+} fica bloqueada na presença do EGTA e a via alternativa permanece funcional.

Conforme observado no gráfico 3A, onde a via clássica foi bloqueada, parasitas de *L. chagasi* sofreram menos lise entre 0.5 e 2,5 minutos quando comparados aos parasitas de *L. major* e *T. cruzi*. Aos 2.5 min 40% dos parasitas das três linhagens haviam sido lisados. Entre 5 e 10 min de incubação parasitas de *T. cruzi* foram menos susceptíveis a lise e em média 65% estavam lisados, enquanto que 90% e 75% dos parasitas, de *L. chagasi* e *L. major*, respectivamente. Após 30 min. de incubação todos os parasitas encontravam-se completamente lisados. Ao analisar os resultados da lise com ação das duas vias do complemento, no gráfico 3B, pode-se observar que parasitas de *T. cruzi* são menos lisados entre 0.5 e 2,5 min quando comparados aos resultados dos outros parasitas. Entre 60% dos epimastigotas de *T. cruzi* e 70% dos parasitas de *L. major* e *L. chagasi* haviam sido lisados aos 2.5 min. Aos 5 min de incubação foi observado lise total dos parasitas de *L. chagasi*, 85% e 70% foram lisados em *L. major* e *T. cruzi* respectivamente. Após 10 min de incubação todos os parasitas haviam sido lisados.



B

Gráfico 3. Avaliação da cinética de ativação das vias clássica e alternativa em relação ao tempo através da lise pelo complemento em *L.chagasi*, *L.major* e *T.cruzi*. (A) com inibição da via clássica pela adição de EGTA (B) e sem inibição das vias do complemento com 50% de SNH. Os resultados representam uma média de pelo menos dois experimentos realizados independentemente.

2. USO DE PARASITAS GENETICAMENTE MODIFICADOS PARA AVALIAR RESISTÊNCIA A LISE PELO COMPLEMENTO EM TRIPANOSOMATIDEOS.

2.1 GENES ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA A LISE. SUBCLONAGEM EM VETORES DE TRANSFEÇÃO

As diferenças observadas na lise em diferentes parasitas podem se dever a múltiplos fatores. Nesse estudo avaliou-se a hipótese de que a presença de algumas moléculas de superfície poderiam estar envolvidas na resistência à lise pelo complemento. A idéia inicial foi caracterizar um gene descrito recentemente como responsável pela resistência à lise em formas adultas de *Schistosoma*, denominado CRIT (Complement C2 Receptor Inhibitor Trispanning) (Inal, 2002).

Diante disto tentou-se expressar o gene CRIT em formas promastigotas de *Leishmania* e epimastigotas de *T. cruzi*. Para isso utilizamos o plasmídeo pTEX, um vetor que possibilita a geração de transgênicos em tripanosomatídeos. O pTEX tem tamanho de 5.6 Kb e apresenta um múltiplo sítio de clonagem flanqueado pelas regiões 5' e 3'-UTRs (Untranslated Regions) do gene GADPH (gliceroldeído 3-fosfato desidrogenase), gene de resistência a ampicilina (amp^r) para seleção em bactérias do tipo *E.coli* e gene de resistência a neomicina (neo^r) (fig. 1A), que permite seleção dos parasitas transfectados. A construção pTEXCRIT (fig. 1B) foi gerada a partir do vetor pTEX.

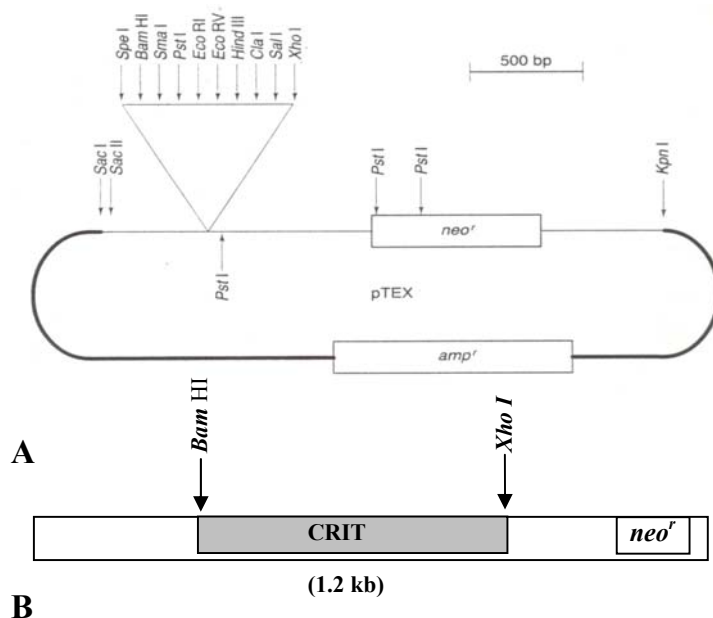


Figura 1. (A) Mapa do plasmídeo pTEX, apresentando o múltiplo sítio de clonagem e os genes de resistência a ampicilina e a neomicina. (B) Construção direcional pTEXCRIT

Para melhorar a expressão do CRIT em *T. cruzi* foi realizada uma nova construção a partir do vetor p33 (fig. 2A), que apresenta um promotor ribossomal de cepa CL, para transfecção em *T. cruzi*, denominado p33CRIT (fig. 2B).

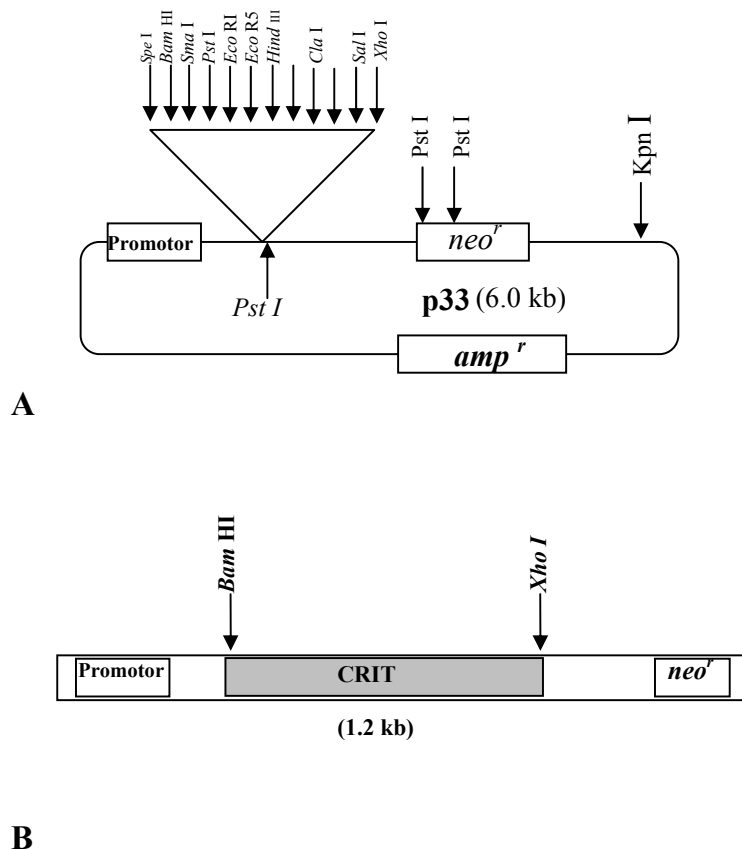


Figura. 2 (A) Mapa do plasmídeo P33. Pode ser verificados o promotor ribossomal, o múltiplo sítio de clonagem e os genes de resistência a ampicilina e a neomicina. (B) Construção direcional P33CRIT

2.2 ESTABELECIMENTO DE CONDIÇÕES DE TRANSFEÇÃO: CURVA DE TOLERÂNCIA À DROGA G 418 EM DIFERENTES TRIPANOSSOMATÍDEOS E ESTRATÉGIAS DE SELEÇÃO

A concentração ideal da droga G418, análogo da neomicina, a ser utilizada para selecionar parasitas transfectados foi determinada a DL₅₀ ou dose letal média. A DL₅₀ representa o padrão para a toxicidade de uma substância, ou seja a dose na qual 50% dos parasitas tratados morrem. No gráfico 4 pode-se observar que se

comparados ao controle sem droga, após 24 h, entre 50% e 80% dos parasitas de *L. chagasi* permaneciam vivos a concentrações até 15µg/ml. Concentrações superiores a 5µg/ml após 72 h de crescimento não eram bem toleradas, e os parasitas morriam quando incubados a concentração de 10µg/ml de droga ou acima desta. Após 120 horas nenhum parasita resistiu a qualquer concentração de G418.

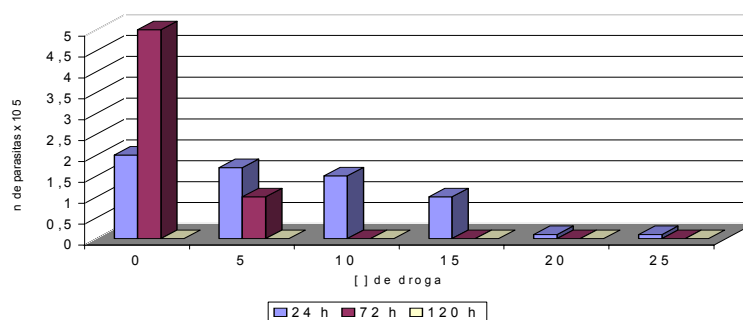


Gráfico 4. Ensaio de tolerância à droga (G418) testada em *L. chagasi* (início: 1×10^5 par./ml). Diferentes concentrações de droga forma testadas durante o período de 120 h.

Como mostrado no gráfico 5 é possível observar diferenças na resistência a lise entre leishmanias, sendo mais resistente à droga (G418) *L. major* quando comparada a *L. chagasi* no período de 24 h. 40% dos parasitas resistiram a altas concentrações de droga (20µl /ml) e com 5 µg/ ml de droga foi observada uma inibição de apenas 10% quando comparados ao controle sem droga. Depois de 72h de incubação os parasitas toleravam até 15 µg/ml de droga, apresentando 15% de resistência, 45% dos parasitas eram resistentes a concentrações até 10µg/ml, em concentrações superiores a 20 µg/ml não havia resistência parasitaria a droga. Após 120 h mais de 90% dos parasitas resistiram a concentrações de droga entre até 10µg/ml, entretanto, 40% dos parasitas não resistiram a concentrações de 15µg/ml de droga. Os parasitas não foram resistentes a concentrações superiores a 20µg/ml após 72h . A partir dos dados mostrados nos gráficos 4 e 5 foi definida a DL_{50} de *L. chagasi* e *L. major* como 5µg/ml e 10µg/ml respectivamente.

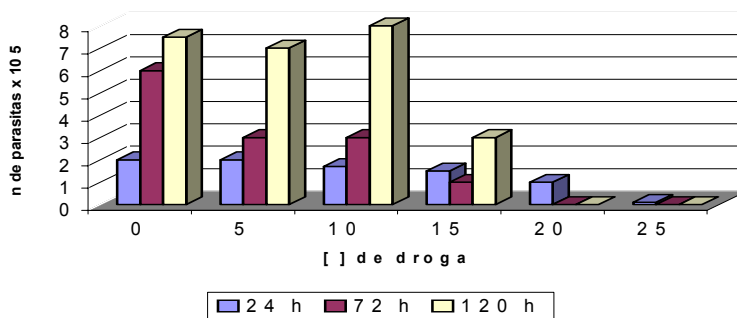


Gráfico 5. Ensaio de tolerância à droga (G418) testada em *L. major* (início: 1×10^5 par./ml). Diferentes concentrações de droga forma testadas durante o período de 120 h.

Em *T. cruzi* a tolerância à droga G418 foi muito superior se comparada com parasitas de *Leishmania*. Os dados do gráfico 6 mostram que no período de 24 h entre 50% e 85% de parasitas resistiram a concentrações entre 400 $\mu\text{g/ml}$ e 50 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Após 72 h, 80% dos parasitas toleravam concentrações até 50 $\mu\text{g/ml}$, 65% dos parasitas resistiram a concentrações de 100 $\mu\text{g/ml}$ e 200 $\mu\text{g/ml}$ e 40% mostrou-se resistente a 400 $\mu\text{g/ml}$ de droga. Após 120 horas cerca de 75% dos parasitas foram resistentes a concentrações entre 50 $\mu\text{g/ml}$ e 400 $\mu\text{g/ml}$ de G 418. A partir dos dados definiu-se a DL_{50} para *T. cruzi* de 200 $\mu\text{g/ml}$.

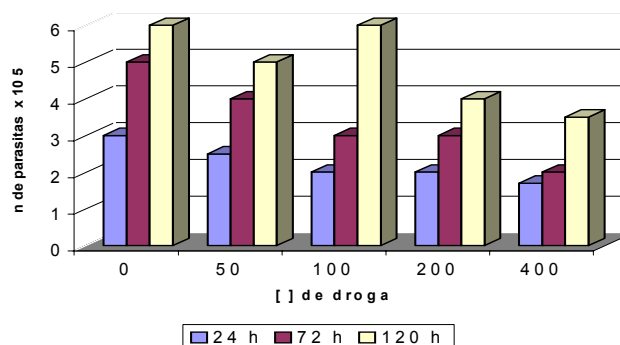


Gráfico 6- Ensaio de tolerância à droga (G418) testada em *T. cruzi* (início: 1×10^5 par./ml) Diferentes concentrações de droga forma testadas durante o período de 120 h.

Como observado no gráfico 4, a manutenção de promastigotas de *L. chagasi* por 5 dias a 28° C tornou os parasitas inviáveis, diante disto foram gerados, unicamente,

transgênicos em *L. major* e *T. cruzi*. Ficando então estabelecidas com relação aos resultados da sensibilidade a droga, as estratégias de seleção para parasitas transfectados por eletroporação que estão descritos na tabela 2.

PARASITA	PULSOS	TAMPÃO DE ELETROPORAÇÃO	CONCENTRAÇÃO DE DROGA G418	REPIQUE	TEMPO DE OBTENÇÃO DE TRANSFECTANTES
T. cruzi	2	A *	200µg/ml	Semanal	2 meses
L. major	2	A	10µg/ml	Semanal	1 mês
L. chagasi	2	A	5µg/ml	Semanal	--0--

Tabela 2. Condições de eletroporação e seleção definidas para parasitas de Leishmania e Trypanosoma, após período de seleção em G418. * Tampão A (137mM NaCl, 21mM HEPES, 5 mM KCl, 5,5mM Na₂HPO₄, 0,77mM glucose).

2.3 ANÁLISE DOS PARASITAS TRANSGÊNICOS

2.3.1 ANÁLISE FUNCIONAL:

Uma vez obtidos parasitas resistentes à droga o primeiro intuito foi analisar a atividade do gene CRIT nos parasitas transgênicos. Para isso, foi realizado um ensaio para determinar se as populações pTEXCRIT em *T. cruzi* e em *L. major* eram resistentes à lise pelo complemento em SHN na concentração de 50%. Anteriormente foi observado que parasitas transgênicos foram totalmente lisados em soro total (100%).

Como mostrado no gráfico 7A, é possível observar valores médios das lises entre parasitas selvagens e transgênicos de *T. cruzi*. Após 1 minuto de incubação o processo de lise tinha sido iniciado, sendo que 20% dos parasitas selvagens já haviam sido lisados com SNH enquanto apenas 4% dos parasitas transgênicos sofreram lise. Aos 2,5 min. a diferença entre parasitas transgênicos e selvagens permaneceu semelhante. Aos 5 minutos 85% dos parasitas selvagens e 56% dos transgênicos haviam sido lisados. Após 10 minutos os parasitas selvagens já haviam sido completamente lisados enquanto 18% dos parasitas transgênicos sobreviveram. Após 30 minutos não haviam parasitas sobreviventes nos dois casos.

No gráfico 7B são mostrados valores da lise pelo complemento entre *L. major* selvagem e *L. major* pTEXCRIT. Após 1 min. de lise, apenas 6% dos parasitas transgênicos haviam sido lisados enquanto 30% dos parasitas selvagens sofreram lises. Após 5 min. de exposição 55% e 66% dos parasitas transgênicos e selvagens haviam sido lisados, respectivamente. Após 10 min. 90% dos selvagens foram lisados enquanto 80% dos transgênicos sofreram lises.

Nos gráficos 7A e 7B foi observado um maior efeito da resistência a lise em torno de 5 min. em parasitas de *T. cruzi* quando comparados aos valores obtidos nas lises sofridas pelos parasitas de *L. major*

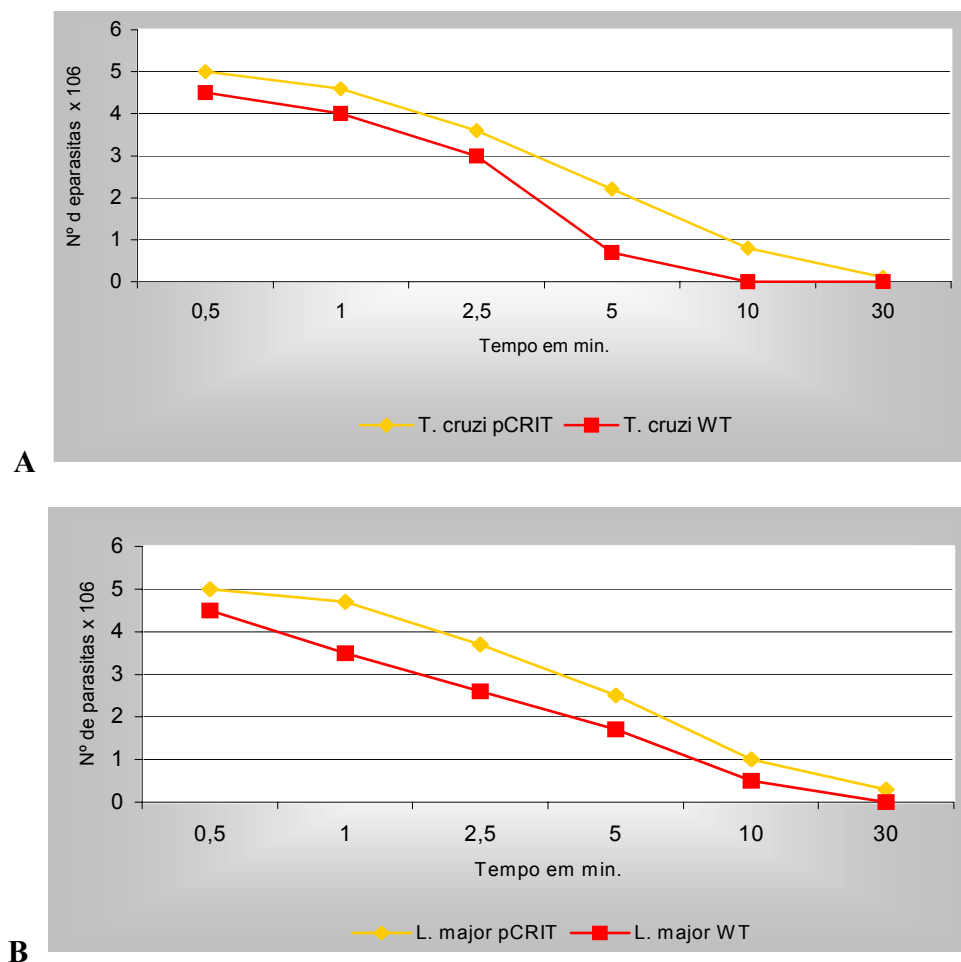


Gráfico 7. Valores comparativos de lise pelo complemento em diferentes períodos de tempo entre parasitas transgênicos e selvagens. (A) Lise pelo complemento entre *T. cruzi* pCRIT e *T. cruzi* selvagem. (B) Lise pelo complemento entre *L. major* pCRIT e *L. major* selvagem. Os resultados representam uma média de pelo menos dois experimentos realizados independentemente.

A partir dos resultados se estabeleceu a caracterização da resposta em *T. cruzi*. Para aumentar a expressão do gene CRIT que permitiria aumento da resistência a lise foi utilizado o vetor p33CRIT. A presença de um promotor ribossomal poderia favorecer a transcrição do gene e aumentar a resistência à lise em *T. cruzi*.

Foram estabelecidos como controle, transgênicos em *T. cruzi* com a construção pTEXCRP para comparar a resistência à lise pelo complemento adquirida pela sobreexpressão dos genes em estudo.

O seguinte objetivo foi comparar as lises dos parasitas transgênicos a partir da expressão das construções: pTEXCRIT, p33CRIT, pTEXCRP e plasmídeo pTEX, sendo estas comparadas com parasitas selvagens em *T. cruzi*. Para isto realizamos ensaio de lise com 50% de soro em diferentes intervalos de tempo, para avaliar a ativação do complemento. Os resultados apresentados no gráfico 8 mostram que os parasitas p33CRIT, pTEXCRIT, pTEXCRP apresentam resistência a lise pelo complemento a partir de 2,5 min. até 5 min, entretanto não houve diferença entre os parasitas transfectados com os diferentes plasmídeos.

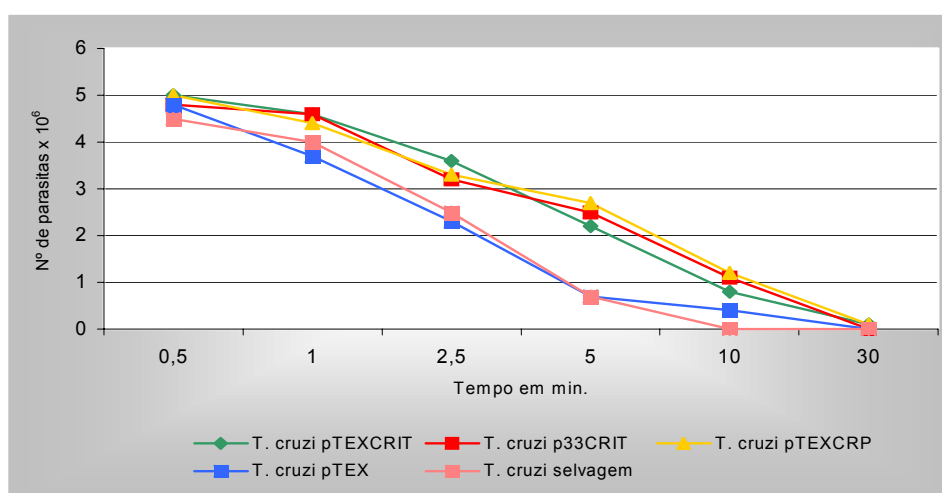


Gráfico 8. Valores comparativos dos ensaios de lise com SHN 50% em diferentes períodos de tempo entre diferentes parasitas transgênicos e selvagens de *T. cruzi*.

2.3.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Para caracterizar molecularmente os parasitas transgênicos realizamos Southern blotting e RT-PCR

A. Southern blotting

Partindo do pressuposto que as populações de *T. cruzi* e *Leishmania* resistentes à droga G418 e funcionalmente resistentes à lise pelo complemento correspondiam de fato a populações de parasitas transgênicos foi realizada detecção de DNA plasmidial através de Southern blotting.

Para detecção do DNA plasmidial (pTEXCRIT) foi obtido DNA genômico de parasitas transgênicos de *Leishmania*, corrido em gel TBE/agarose 0,8% e transferido para membrana de nylon. Para marcação em membrana de nylon utilizamos sonda fria derivada do gene neo^R marcada com fosfatase alcalina. A figura 3 mostra a detecção, através da sonda, do plasmídeo pTEXCRIT em DNA genômico de parasita transgênico, através de sonda neo^R.

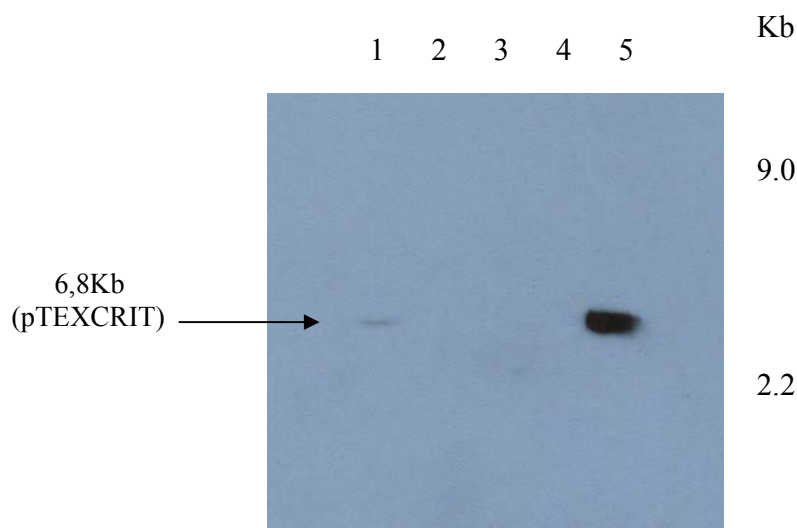


Figura 3. Southern blotting de parasitas transfectados com a construção pTEXCRIT. 2ug de DNA de formas promastigotas de *L. major* pTEXCRIT e 2ug de DNA de formas promastigotas de *L. major* selvagem, foram digeridos (1 e 3) e não digeridos (2 e 4) com enzima *XbaI*. As amostras foram aplicadas em TBE/Agarose 0.8%, transferidas para uma membrana de nylon e hibridizadas com sonda neo^R. A seta mostra a detecção episomal do plasmídeo pTEXCRIT com 6,8. (5) controle positivo pTEXCRIT digerido com *XbaI*.

Para detecção do DNA plasmidial (pTEXCRIT) em *T. cruzi* foi repetido o procedimento anterior por obtenção de DNA genômico de parasitas transgênicos de *T. cruzi*, as amostras corridas em gel TBE/agarose 0,8% e transferido para membrana de nylon para execução de Southern blotting, onde não foi possível obter hibridização positiva quando utilizada a sonda neo^R (resultado não mostrado). Diante disto foi realizado PCR com oligos do gene CRIT, que amplificam a ORF (quadro de leitura aberta) do gene através de PCR (reação em cadeia de polimerase) A partir da amplificação foi possível obter produtos de amplificação com tamanho de 800 pB que corresponde ao tamanho do gene. Na hibridização das amostras utilizamos sonda fria derivada do gene CRIT para hibridização em membrana de nylon. A figura 4 mostra a detecção, através de sonda, do produto da amplificação com oligonucleotídeos do gene CRIT em DNA de parasitas pTEXCRIT. Produtos de PCR entre 500 Pb e 1 Kb (não mostrado) que amplificaram a partir do DNA da população pTEX (2) e selvagem (3) não foram hibridizados.

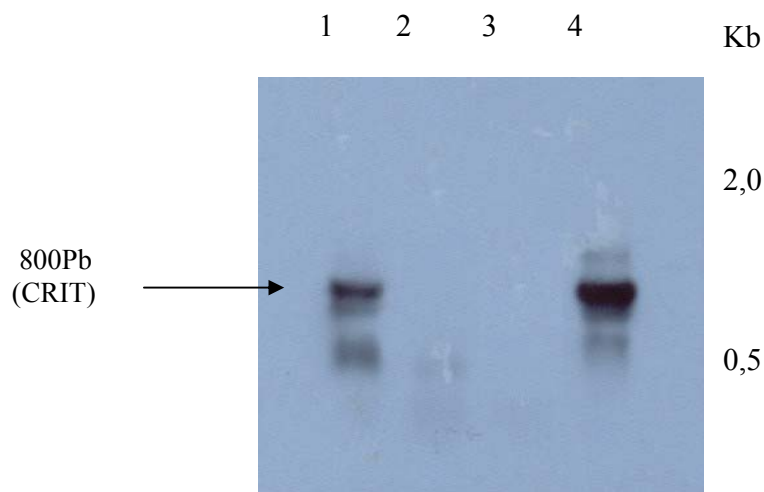


Figura 4. Southern blotting de parasitas transfectados com a construção pTEXCRIT. (1) 2ug de amostra do produto de PCR do gene CRIT, amplificado a partir de DNA de *T. cruzi* pTEXCRIT (2) 2ug de produto de PCR de *T. cruzi* pTEX, (3) 2ug de produto de PCR de *T. cruzi* selvagem. As amostras foram aplicadas em TBE/Agarose 0.8%, transferidas para uma membrana de nylon e hibridizadas com sonda CRIT. A seta mostra a detecção da banda com tamanho correspondente ao gene CRIT com 860 Pb. (4) controle positivo pTEXCRIT.

B. RT – PCR

Com o objetivo de determinar se o aumento na resistência a lise pelo complemento nos parasitas transgênicos correspondia à expressão do gene CRIT, nas formas promastigotas, foi realizado RT-PCR para análise da transcrição do gene.

Os resultados mostraram uma banda correspondente ao tamanho do gene CRIT, quando hibridizados com a sonda do mesmo gene (fig. 5).

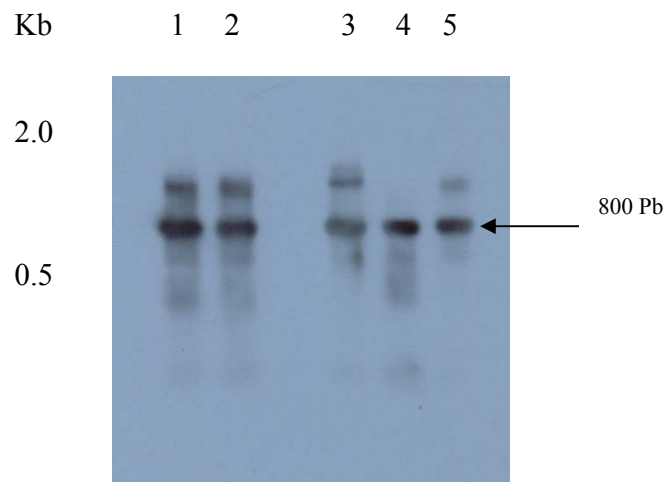


Figura 5. Southern blotting de amostras originárias de RT-PCR. (1) 2ug da amostra *L. major* selvagem (2)2ug da amostra *L. major* pTEXCRIT (3) 2ug da amostra *T. cruzi* selvagem (4) 2ug da amostra *T. cruzi* pTEXCRIT(5) controle positivo pTEXCRIT. As amostras foram aplicadas em TBE/Agarose 0.8%, transferidas para uma membrana de nylon e hibridizadas com sonda CRIT. Observa-se a detecção de bandas com tamanho igual de 800 Pb, correspondente ao tamanho do gene CRIT.

Os resultados das amplificações através de RT-PCR, mostraram um resultado inesperado, houve amplificação de produto correspondente ao tamanho do gene CRIT nos parasitas selvagens, que caracteriza a primeira evidência do gene em tripanosomatídeos.

Para verificar se o transcrito de fato correspondia ao gene CRIT, foram desenvolvidos dois oligonucleotídeos que amplificam um bloco central do gene CRIT situado entre os nucleotídeos 1032 e 1420.

Ao realizar um PCR com DNA de diferentes amostras foi possível amplificar no parasita selvagem e nos controles pTEXCRIT, um produto de 400 pb (fig. 6) que ao ser hibridizado com sonda CRIT resultava em detecção positiva.

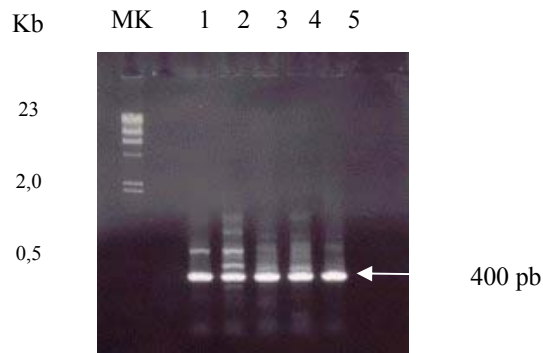


Figura 6. PCR de DNA genômico com uso de oligos para amplificação de um bloco central do gene CRIT corrido em TBE/agarose 0,8% (1) 2 ug de DNA *L. major* pTEXCRIT (2) 2 ug de DNA *L. major* selvagem (3) 2 ug de DNA *T. cruzi* pTEXCRIT (4) 2 ug de DNA *T. cruzi* selvagem (5) controle positivo pTEXCRIT

Esse resultado junto com o RT-PCR do gene CRIT, levantou a hipótese que o gene CRIT poderia estar presente de maneira endógena no genoma de *T. cruzi* e os resultados negativos (southern de DNA genômico) seriam produto de uma baixa sensibilidade do sistema de hibridização diante do uso de sonda fria.

Para determinar a sensibilidade de detecção do gene CRIT utilizando sonda fria marcada com fosfatase alcalina, foi realizado um ensaio de quantificação usando amostras de PCR amplificado a partir de DNA genômico de *T. cruzi* cepa y selvagem, com oligonucleotídeos que amplificam a ORF completa do gene CRIT gerando um produto de 800 pb e amostras de produto de PCR amplificado do genoma de *T. cruzi* com oligonucleotídeos que amplificam uma região interna da ORF, gerando um produto de 400pb. Para essa finalidade realizamos um Southern blotting, o qual foi hibridizado com a sonda do gene CRIT marcada com fosfatase alcalina.

Para determinar a sensibilidade da sonda foi analisado o autoradiograma com a detecção dos produtos CRIT hibridizados com a sonda fria. Foi detectada hibridização positiva até 0,8 ng quando foi usado o produto de 400 pbe apenas detectou-se 100ng de amostra quando usamos o gene CRIT completo (fig.7). Através de estimativas, considerando o tamanho do genoma de *T. cruzi* e supondo hipoteticamente que o gene CRIT estaria em cópia única no genoma realizamos os seguintes cálculos:

1. Utilizando 1×10^7 parasitas para extração de DNA genômico, obtemos 10 μ g de DNA então,



$10 \mu\text{g de DNA} \div 1 \times 10^7 \text{ parasitas} = 1 \times 10^{-8} \mu\text{g de DNA/parasita}$
que representa a quantidade de DNA presente em cada parasita.

2. Sabendo que o tamanho do DNA genômico de *T. cruzi* é de 40 Mb, e que o gene CRIT apresenta 800 pb calculamos:



$$800 \text{ pb} \div 40 \text{ Mb} = 0,00002$$

esse resultado representa $2,0 \times 10^{-5}$ do gene CRIT no genoma total de um parasita temos,



$$2,0 \times 10^{-5} \times 10 \mu\text{g de DNA} = 2,0 \times 10^{-4} \mu\text{g}$$

que representa a quantidade do gene em 1×10^7 parasitas, ou seja, 10 μ g de DNA genômico de *T. cruzi* y contém $2,0 \times 10^{-4}$ μ g do gene CRIT.

3. De acordo com o resultado do Southern blotting (fig.8) verificou-se que sensibilidade mínima de detecção da sonda foi de 0,8 ng (8×10^{-4} μ g) de DNA da amostra, então:

$$\begin{array}{l} 2,0 \times 10^{-4} \mu\text{g de CRIT} \longrightarrow 10 \mu\text{g de DNA genômico} \\ 8 \times 10^{-4} \mu\text{g de CRIT} \longrightarrow X \end{array}$$

X= 40ug de DNA

Diante do resultado, concluímos que seria necessário utilizar pelo menos 40 ug de DNA genômico de *T. cruzi* cepa y selvagem, para realizar um Southern blotting e obter sinal de hibridização positiva quando for usada a sonda CRIT de *Schistosoma*, o que representa 8 vezes mais DNA que o utilizado em nossos southern o que justificou a ausência de hibridização nos southern com DNA genômico de *T. cruzi*.

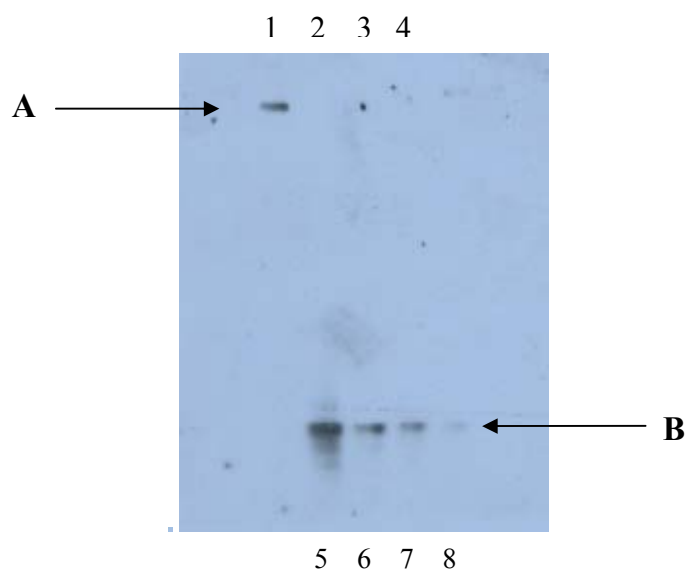


Figura 7. Southern para detecção da sensibilidade da sonda CRIT aos produtos de PCR com oligos de CRIT. A seta “A” indica a sensibilidade da sonda CRIT marcada com fluoresceína aos produtos de PCR amplificados com oligos de CRIT, que amplificam a ORF completa. (1) 100 ng da amostra amplificada, (2) 20 ng de amostra, (3) 4 ng de amostra, (4) 0,8 ng de amostra. A seta “B” indica a sensibilidade da sonda CRIT aos produtos de PCR amplificados com oligos que amplificam uma região interna da ORF. (5) 100 ng de amostra, (6) 20 ng de amostra, (7) 4 ng de amostra, (8) 0,8 ng de amostra.

Assim ficou estabelecido, como prioridade, analisar o gene CRIT amplificado do genoma de *T. cruzi* e atualmente está sendo seqüenciado o produto de PCR

amplificado com oligonucleotídeos do gene. A detecção do gene CRIT e o estabelecimento do mapa físico do genoma parasitário dependerá de experimentos que serão realizados no futuro com uso de sonda radioativa (P^{32}).

DISCUSSÃO

I Sistema do complemento em tripanosomatídeos

Através do presente trabalho, foram avaliadas as características da ativação e o papel do sistema complemento em diferentes tripanosomatídeos.

Utilizando cinéticas de lise do parasita pelo sistema complemento presente no SNH e ensaios de inibição da ativação da via clássica foi possível observar diferenças entre *T. cruzi* e *Leishmania* (graf. 2, 3 A e 3B).

Diante da presença do SNH, tripanosomatídeos de maneira geral, são lisados a concentrações superiores a 50% (SNH).

Nos nossos resultados observamos que parasitas de *Leishmania* são mais sensíveis a lise mediada pelo complemento que *T. cruzi*, sendo lisados inicialmente à concentrações entre 6, 25% e 12,5% de SNH. Em *T. cruzi* foi observado lise inicial quando o parasita foi incubado em concentrações superiores a 12, 5% resistindo até 25% de soro (graf. 2). As diferenças na resistência a lise observadas em *Leishmania* e *Trypanosoma* pode estar ligada a diferenças no padrão da expressão de moléculas de superfície nos parasitas, que podem estar ligadas as modificações bioquímicas na natureza das cadeias, tamanho, modelo, estrutura etc. das moléculas expressas nos diferentes parasitas o que pode conduzir a distintas estratégias de evasão da lise.

Segundo Lopez (1993), é provável que os parasitas tenham desenvolvido mecanismos para escapar da resposta imune humoral e evitar a ação dos componentes do sistema complemento. As moléculas de superfície seriam o principal recurso dos tripanosomatídeos para mediar a invasão celular e desenvolver a infecção.

Neves (1997), define que moléculas específicas da superfície da membrana plasmática dos promastigotas de *Leishmania* tais como gp 63 e LPG são importantes nos processos de opsonização e endocitose pelo macrófago.

Segundo Sacks (1995) e Puentes (1990), modificações bioquímicas na estrutura das moléculas de LPG podem aumentar a espessura da superfície do glicocalix o que confere adicional resistência à lise mediada pelo complemento.

De acordo com Fischer (1988), formas tripomastigotas de *T. cruzi* evitam a lise através da produção de glicoproteínas de superfície que interferem na ativação do complemento. Para Norris (1998), Uma glicoproteína de superfície de 160 kDa – CRP (proteína reguladora do complemento) poderia restringir ativação das vias clássica e alternativa do complemento através da ligação a componentes C3b e C4b, evitando a ação proteolítica da C3 convertase).

Além de CRP tripomastigotas expressam em sua superfície várias glicoproteínas ligadas à membrana através de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Shenkman *et al.*, 1988; Guther *et al.*, 1992; Cardoso de Almeida and Heise, 1993) estas proteínas possuem massa molecular entre 82 e 90 kDa e pertencem à família das glicoproteínas gp 85. Outra glicoproteína de superfície muito estudada é a Tc-85 que pertence à uma família de moléculas heterogêneas no que diz respeito ao tamanho, ponto isoelétrico e glicosilação (Zingales *et al.*, 1982; Abuin *et al.*, 1989) Tem sido descrito a sua participação na adesão e penetração dos tripomastigotas em células de mamíferos (Alves *et al.*, 1986).

Na superfície de epimastigotas e formas tripomastigotas metacíclicas há um alto número de cópias de moléculas de mucinas, que correspondem a oligonjugados com um alto teor de açúcares o-ligados. As mucinas de *T. cruzi* estariam organizadas em uma família com mais de 484 membros (Di Noia, *et al.*, 1995; Salazar *et al.* 1995; Freitas *et al.* 1995).

De certa maneira a superfície celular entre diversas formas evolutivas de *T. cruzi* e *Leishmania* não são similares e as diferenças na sensibilidade ao soro

humano podem estar relacionadas à participação de distintas moléculas, fenômenos que envolvem plasticidade, acessibilidade ou efeitos físico-químicos de diferentes membranas na interação entre moléculas e possíveis receptores.

As diferenças entre *T. cruzi* e *Leishmania* também são vistas nas diferentes estratégias de seleção de parasitas transfectados. A sensibilidade a G418 é extremamente diferente, sendo necessários para selecionar parasitas com episomas concentrações 20 vezes maiores em *T. cruzi* que em *Leishmania* (graf. 4, 5 e 6).

Ensaio com inibição da via clássica mostraram que a ação da via alternativa sobre os tripanosomatídeos é mais lenta quando comparada à ação via clássica, já que após 10 minutos de incubação são encontrados parasitas resistentes a lise. Para Puentes (1989), a contribuição da via alternativa para o mecanismo opsonização é mínima onde, em torno de 7,1 a 13,7% das lises ocorre ativação desta via.

Quando incubados em SHN na presença das vias clássica e alternativa, os tripanosomatídeos ativam as vias quase que simultaneamente entre 0,5 e 2 minutos, sendo que parasitas de *L. major* e *L. chagasi* apresentaram maior tendência a sofrer lises quando comparados a parasitas de *T. cruzi* que podem estar diretamente ligadas a diferenças nos padrões de moléculas de superfície expressas de maneira distinta nos dois grupos (graf. 3B). Segundo Dominguez (2002), a deposição de C3 em parasitas, o que acarreta a lise da membrana, é extremamente rápida sendo que a reação se completa entre 2 e 3 minutos e que 86-93% do C3 fixado tem sido ativado através da via clássica.

II Avaliação do sistema complemento usando parasitas transgênicos com gene CRIT e CRP

Parasitas transgênicos que expressam o gene CRIT são em média 20-30% mais resistentes que parasitas selvagens tanto para parasitas transgênicos de *L. major* como parasitas de *T. cruzi* (graf. 7). Os nossos resultados mostram funcionalidade do CRIT em *T. cruzi*. A utilização de pTEXCRP nos ensaios funcionais e a

obtenção de resultados similares de resistência com transgênicos CRIT (Gráfico 8), reforçam a idéia do receptor de C2 (CRIT) ser um possível mecanismo de evasão em *T. cruzi*.

Ensaio preliminares (fig. 5 e 6) mostram presença do gene CRIT no genoma de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania*. Sequenciamento dos produtos de PCR amplificados com oligos derivados da seqüência do CRIT de *Schistosoma* e uma posterior caracterização da expressão do gene nos diferentes estágios de *T. cruzi* y *Leishmania* permitirão entender se CRIT participa de um outro mecanismo de evasão da lise em tripanosomatídeos, não descrito anteriormente. Ensaio de Southern blotting utilizando sonda fria marcada com fosfatase alcalina mostrou limitações de sensibilidade, sendo de difícil detecção de genes com baixo número de cópias no genoma parasitário (fig. 7).

Segundo Inal (1999), A proteína expressa pelo CRIT está caracterizada como um receptor que se liga ao complemento C2 especificamente, resultando na inibição da via clássica de ativação do sistema complemento, provavelmente interferindo na formação de C3 convertase, C4b2a. Segundo Oh (2003), em ensaio hemolítico com células de *E. coli* recombinantes pGEX-sh-CRIT-ed1, mostraram aproximadamente 38,5% de inibição a hemólises provocadas pelo complemento

Segundo Norris (1998), epimastigotas transfectados com CRP quando incubados com soro normal de porco guinea (como fonte de complemento) com diluição final de 1:2 exibiram altos níveis de resistência a lise mediada pelo complemento, quando comparados a epimastigotas transfectados com o vetor vazio.

A conversão de epimastigota para tripomastigota coincide com a expressão de CRP na superfície celular e aquisição de resistência ao complemento. Outras moléculas relacionadas com a evasão da lise em outros parasitas poderiam ter homólogos em *T. cruzi*.

A proteína **CRP** (160 Kda) tem como função restringir as vias, clássica e alternativa de ativação do complemento através da ligação com componentes do

complemento, C3b e C4b; que desta maneira, interrompe a ligação e ação proteolítica da C3 convertase.

O CRIT foi descrito como um receptor trispanning órfão encontrado na superfície da membrana plasmática e no interior do tegumento da membrana de formas adultas de *Schistosoma*. Através da ligação com C2 o CRIT é capaz de evitar a ligação entre C2 e C4b na superfície do parasita e formar a C3 convertase.

A função reguladora do complemento através do CRIT é sugerida através de ensaios de lise nos quais o peptídeo CRIT-ed1 que contém a região de ligação ao C2, causa inibição da lise.(Inal, 2002).

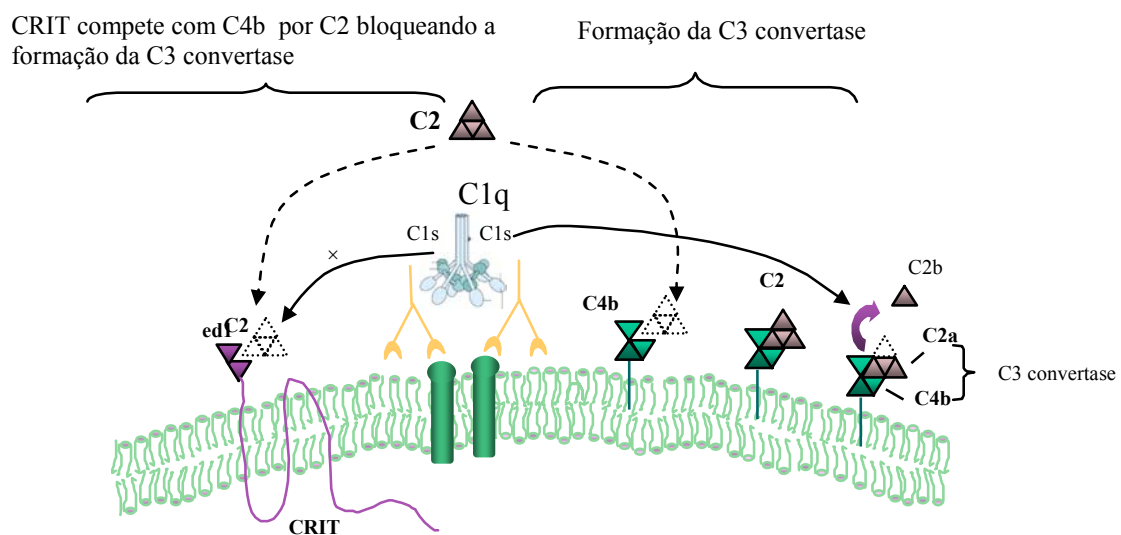


Figura1. Modelo de inibição da formação da C3 convertase pelo CRIT na superfície parasitária. Fonte: Inal, (2002).

Ensaio hemolítico com o uso de peptídeos inibidores (CRIT) pré incubados com C2 foram realizados para demonstrar que a inibição da via clássica ocorre devido a interação entre C2 e os peptídeos utilizados. Após incubação foi observado os efeitos na atividade do complemento: Considerando os peptídeos CRIT (CRIT-based peptides) foi verificada redução nas hemolises de 90% (sem uso de peptídeo)

para 40%, indicando que a fração H17 liga-se ao C2 e mais efetivamente, evita a formação de C3 convertase.

É possível pensar que existam semelhanças na eficiência entre receptores para C3(CRP) e para C2 (CRIT). Os resultados mostraram que formas epimastigotas de *T. cruzi* transfectados com CRP apresentam uma resistência similar a dos transgênicos que expressão o CRIT (graf. 8).

Sendo o sistema complemento a primeira barreira contra patógenos infecciosos, a imunização de animais experimentais com CRIT parece ser um interessante alvo quimioterápico. Sepúlveda (2000), mostrou recentemente que a imunização com o gene CRP era capaz de proteger parcialmente animais de infecção. Uma estratégia utilizando CRP e CRIT poderia produzir um efeito sinérgico e maiores índices de proteção.

Trabalhos recentes (Inal, 2003 e Oh, 2003) estão mostrando o potencial do CRIT como quimioterápico de ação antiinflamatória em desordens do sistema do complemento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUIN, G.; COLLI, W.; DE SOUZA, W. and ALVES, A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* involved in cell invasion (Tc-85) is heterogeneous in expression and molecular constitution. *Mol. Biochem. Parasitol.* 35: 229-237, 1989.

ALVES, M.J.M.; ABUIN, G.; KUWAJIMA, V. Y. and COLLI, W. Partial inhibition of trypomastigotes entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 21: 75-82, 1986.

CARDOSO DE ALMEIDA, M. L. AND HEISE, N. Proteins anchored via glycosylphosphatidylinositol and solubilizing phospholipases in *T. cruzi*. *Biol. Research* 26:285-312, 1993.

DI NOIA, J. M.; SACHEZ, D. and FRASCH, C. The protozoan *T. cruzi* has a family of genes resembling the mucin genes of mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 270 : 24146-24149, 1995.

DOMÍNGUEZ, M.; MORENO, I.; LÓPEZ-TRASCASA, M. and TORAÑO, A. Complement interaction with trypanosomatid promastigotes in normal human serum. *J. Exp. Med.*, 195: 451-459, 2002.

FISCHER, E.M.; OUASSI, P.; VELGE, J. CORNETTE, and KAZATCHKINE, M. gp58/68, a parasite component that contributes to the escape of the trypomastigote form of *T. cruzi* from the human alternative complement pathway. *Immunology*, 65: 299-303, 1988.

FREITAS-JUNIOR, L. H.; BRIONES, M. R. and SCHENKMAN, S. Two distinct groups of mucin-like genes are differentially expressed in the developmental stages of *T. cruzi*. *Mol. Biochem Parasitol.* 93: 101-114, 1998.

GUTHER, M.L.S. CARDOSO DE ALMEIDA, M. L. YOSHIDA, N. and FERGUSON, M.A.J. Structural studies on glycosylphosphatidyl inositol membrane anchor of *T. cruzi* 1G17-antigen. *J. Biol. Chem.* 267: 6820-6828, 1992.

HANAHAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids *J Mol Biol.* Jun 5;166:557-80, 1983.

INAL, J. M. and SIM, R. B. A Schistosoma protein, Sh-TOR, is a novel inhibitor of complement which binds human C2. *FEBS Letters* 470: 131-134, 1999.

INAL, J. M. and Schifferli, Complement C2 receptor trispanning and the β -chain of C4 share a binding site for complement C2. *J. Immunol.* 168: 5213-5221, 2002.

KELLY, J. M., WARD, H. M., MILES, M. A. and KENDALL, G. A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Nucleic Acids Res.* 20: 3963-9, 1992.

LÓPEZ, L. R. and LÓPEZ, M. C. L. Parasitología Molecular. Nuevas Tendencias. Madrid. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 1993, 430p.

NEVES, D. P. Parasitologia Humana. 9ª edição. São Paulo. Editora Atheneu, 1997.

NORRIS, K. A. Stable transfection of *Trypanosoma cruzi* epimastigota with the trypomastigote-specific complement regulatory protein cDNA confers complement resistance. *Infect Immun.*, 66(6): 2460-2465, 1998.

OH, K.S.; NA, D.K.; KWEON, M. H. and SUNG, H. C. Expression and purification of the anticomplementary peptide Sh-CRIT-ed1 (formerly Sh-TOR-ed1) as a tetramultimer in *Escherichia coli*. *Prot. Expre. & Purif.*, 2003 (Article in press).

PUNTES, S.M.; DA SILVA, R.P.; SACKS, D.L.; HAMMER, C.H. and JOINER, K. A. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *J. Immunol.* 145:4311-4316, 1990.

RAMIREZ, M. I., YAMAUCHI, L. M; FREITAS JR., L. H. G. UEMURA, H. and SCHENKMAN, S. The use of the fluorescent protein to monitor and improve transfection in *T. Cruzi*. *Mol. Bioch. Parasitology.* 111: 235-240, 2000.

SALAZAR, N.A., MONDRAGON, A. and KELLY, J.M. Mucin-like glycoprotein genes are closely linked to members of the trans-sialidase super-family at multiple sites in the *T. cruzi* genome. *Mol. Biochem. Parasitol.* 78(1-2): 127-136, 1996.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. AND MANIATIS, T. Molecular cloning. *A laboratory manual*. 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press. 1989.

SCHENKMAN S, YOSHIDA N, CARDOSO DE ALMEIDA M L. Glycophosphatidylinositol-anchored proteins in metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* *Mol Biochem Parasitol.* 29:141-151,1988.

SEPULVEDA, P.; HONEBEYRIE, M. LIEGEARD, P.; MASCILLI, A. and NORRIS, K. A. DNA-Based immunization with *T.cruzi* complement regulatory protein elicits complement lytic antibodies and confers protection against *T. cruzi* infection. *Infect. Immun.* 68 : 4986-4991, 2000.

SOUTHERN, E. M., Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503, 1975.

SACKS, D. L.; PIMENTA, P.F.; McCONVILLE, M. J.; SHCNEIDER, P. and TURCO, S. J. Stage-specific binding of *L. donovani* to the sandfly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *J. Exp. Med.*, 181:685-697, 1995.