



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DANIELLE KIAN

**LOCALIZAÇÃO DIFERENCIAL DE UM ANTÍGENO
CODIFICADO PELO GENE *TC8.2* DE *TRYPANOSOMA
CRUZI***

Londrina
2013

DANIELLE KIAN

**LOCALIZAÇÃO DIFERENCIAL DE UM ANTÍGENO
CODIFICADO PELO GENE *TC8.2* DE *TRYPANOSOMA
CRUZI***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Lucy Megumi Yamauchi Lioni

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

K46L Kian, Danielle.
Localização diferencial de um antígeno codificado pelo gene *Tc8.2*
de *Trypanosoma cruzi* / Danielle Kian. – Londrina, 2013.
51 f.: il.

Orientador: Lucy Megumi Yamauchi Lioni.
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) □□ Universidade Estadual
de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia, 2013.
Inclui bibliografia.

1. *Trypanosoma cruzi* – Teses. 2. Antígenos parasitários – Teses. 3.
Genes – Sequência de nucleotídeos – Teses. 4. Genética – Expressão –
Teses. I. Lioni, Lucy Megumi Yamauchi. II. Universidade Estadual de
Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós -Graduação
em Microbiologia. III. Título.

CDU 579.61

DANIELLE KIAN

**LOCALIZAÇÃO DIFERENCIAL DE UM ANTÍGENO CODIFICADO
PELO GENE *TC8.2* DE *TRYPANOSOMA CRUZI***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dra Lucy Megumi Yamauchi Lioni
UEL – Londrina – PR

Dra. Érika Izumi
ICC – Curitiba – PR

Prof. Dr. Emerson José Venâncio
UEL – Londrina – PR

Londrina, 22 de Março de 2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço à prof. Dra. Lucy Megumi Yamauchi Lioni pela oportunidade ao aceitar-me como orientada durante todos esses anos, pela dedicação e conhecimento compartilhado durante a realização deste trabalho.

À prof. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta, que sempre foi prestativa me ajudando com a realização dos experimentos. E, principalmente, por todo ensinamento que me foi passado no laboratório.

Aos integrantes do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, obrigada pela colaboração e amizade.

À Juliana Cogo e Danielle Lazarin, membros do Laboratório de Microbiologia Aplicada aos Produtos Naturais e Sintéticos da UEM, pela ajuda na microscopia eletrônica e imunofluorescência.

Aos professores, funcionários técnicos e administrativos do Programa de Pós Graduação em Microbiologia da UEL, pela ajuda durante o processo de formação.

Ao César pelo companheirismo e por estar sempre presente e disposto a me ajudar, principalmente para realização deste trabalho. Obrigada por fazer parte da minha vida e me apoiar, principalmente quando os momentos não são os melhores.

Aos meus pais que sempre acreditaram em mim e estiveram ao meu lado em todas as minhas escolhas. Sem eles nada disso seria possível. Muito obrigada por não medirem esforços durante toda minha caminhada.

E as minhas irmãs, melhores amigas pra tudo, que mesmo longe, sempre me fazem seguir em frente. Obrigada por serem responsáveis pelas minhas melhores lembranças.

KIAN, Danielle. *Análise da organização e expressão da região C-terminal do gene Tc8.2 que codifica um antígeno expresso diferencialmente em Trypanosoma cruzi*. 2013. 51 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

Trypanosoma cruzi é um parasito que exhibe formas de vida com diferenças morfológicas e funcionais, alternando entre formas replicativas (epimastigota e amastigota) e infectantes (tripomastigota). De fato, a expressão gênica é a chave dessas diferenças. Ao contrário de outros eucariotos, as sequências que codificam proteínas estão organizadas em unidades de transcrição policistrônicas, que são convertidos em RNAm monocistrônicos por *trans splicing* no terminal 5' e poliadenilação na extremidade 3' do transcrito primário. Embora *trans splicing* seja um mecanismo preciso, existem casos em que são utilizados mais de um local aceptor de *splicing* no interior de uma região intergênica, podendo, portanto, gerar diferentes proteínas a partir de um mesmo gene, ou seja, ocorre um processamento alternativo do transcrito. Aqui, nós descrevemos o gene *Tc8.2*, que foi isolado de uma biblioteca de cDNA de formas tripomastigota em vetor lambda Zap. A sequência desse gene foi analisada em bancos de dados e a região C terminal foi clonada e expressa em sistema Gateway. O soro obtido da imunização de camundongos com a proteína recombinante foi utilizado para reagir com extratos proteicos de *T. cruzi* e houve o reconhecimento de polipeptídios de 70 kDa nas formas epimastigotas e de 80 kDa nas formas tripomastigotas. Além disso, pôde ser observada uma imunolocalização diferencial da proteína *Tc8.2* nestas duas formas. Na forma epimastigota a proteína foi encontrada distribuída em todo citoplasma, enquanto que em tripomastigota essa distribuição ocorreu no núcleo e cinetoplasto. Estes resultados sugerem que as proteínas derivadas do gene *Tc8.2* têm funções diferentes e possam estar relacionadas com a fase de desenvolvimento do parasito. Para caracterizar esse gene, foi realizado ensaios de *Southern blot*, indicando que se trata de um gene único ou em poucas cópias e o *Northern blot* havendo o reconhecimento de transcritos de tamanhos diferentes nas três formas de vida de *T. cruzi* (4,4 kb em epimastigotas e amastigotas e 3,0 kb em tripomastigotas), o que sugere a ocorrência de *splicing* alternativo na formação do RNA do gene *Tc8.2*.

Palavras Chave: *Trypanosoma cruzi*. *Tc8.2*. *Splicing* alternativo.

Klan, Danielle. *Analysis of the organization and expression of the C-terminal region of Tc8.2 gene encoding an antigen differentially expressed in Trypanosoma cruzi*. 2013. 51 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is a parasite that displays life forms with morphological and functional differences, alternating between replicative (epimastigote and amastigote) and infective (trypomastigote) forms. Indeed, gene expression is the key to these differences. Unlike other eukaryotes, the sequences encoding proteins are arranged in polycistronic transcription units, which are converted to monocistronic mRNAs by trans-splicing the 5' end and polyadenylation at the 3' end of the primary transcript. Although trans-splicing mechanism is precise, there are cases where they are used more than one splice acceptor site within an intergenic region can therefore generate different proteins from the same gene, or an alternative processing occurs transcript. Here, we describe the TC8.2 gene, which was isolated from a cDNA library trypomastigote forms in vector lambda Zap. The sequence of this gene was analyzed in databases and the C-terminal region was cloned and expressed in Gateway system. From mice immunized with the recombinant protein was used to react with protein extracts of *T. cruzi* was recognized polypeptides of 70 kDa in epimastigotes and 80 kDa in trypomastigotes. In addition, a differential immunolocalization of Tc8.2 protein could be observed in these two ways. In order to epimastigote protein was found distributed throughout the cytoplasm, whereas this distribution in trypomastigote occurred in the nucleus and kinetoplast. These results suggest that protein derived from the gene Tc8.2 have different functions and may be related to the stage of development of the parasite. To characterize this gene was performed Southern blot assays, indicating that it is a single gene or a few copies and Northern blot analysis of transcripts there recognition of different sizes in the three forms of life of *T. cruzi* (4.4 kb for epimastigotes and amastigote and trypomastigote to 3.0 kb), suggesting the occurrence of the formation of alternative splicing of RNA Tc8.2 gene.

Key words: *Trypanosoma cruzi*. Tc8.2. Alternative splicing.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
1.1	<i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> E DOENÇA DE CHAGAS.....	7
1.2	CICLO DE VIDA.....	9
1.3	VETORES E RESERVATÓRIOS	10
1.4	FASES DA DOENÇA DE CHAGAS.....	12
1.5	FORMAS DE TRANSMISSÃO	13
1.6	CONTROLE DA DOENÇA	15
1.7	DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO.....	16
1.8	GENOMA DE <i>T. CRUZI</i>	17
1.9	EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSSOMATÍDIOS	18
1.10	QUIMIOCINA MCP-1/JE E ORIGEM DO CLONE 8.2	21
2	OBJETIVOS	24
	REFERÊNCIAS	25
3	ARTIGO: TWO DIFFERENTIAL LOCATION OF AN ANTIGEN CODED BY <i>TC8.2</i> GENE IN <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	31
4	CONCLUSÃO	49
	ANEXO	50
	ANEXO A	51

1 INTRODUÇÃO

1.1 *TRYPANOSOMA CRUZI* E A DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* também conhecida como tripanossomíase americana foi descrita por Carlos Chagas em 1909, que estudou o parasito, seu ciclo de vida, os vetores e vários aspectos epidemiológicos, clínicos e sociais.

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2012), aproximadamente 10 milhões de pessoas estão infectadas em áreas endêmicas. Cerca de 15 mil morrem por ano devido à doença e mais de 25 milhões correm o risco de contraí-la. Essas áreas endêmicas correspondem a mais de 20 países da América Central e América do Sul, do México até o norte da Argentina. Já as áreas que oferecem risco de infecção se estendem do sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina (Clayton, 2010; Muñoz-Saravia *et al.*, 2010).

É uma doença distribuída em áreas rurais, urbanas e periurbanas do continente americano, sendo considerada um grave problema de saúde pública e socioeconômico (PAHO, 2009).

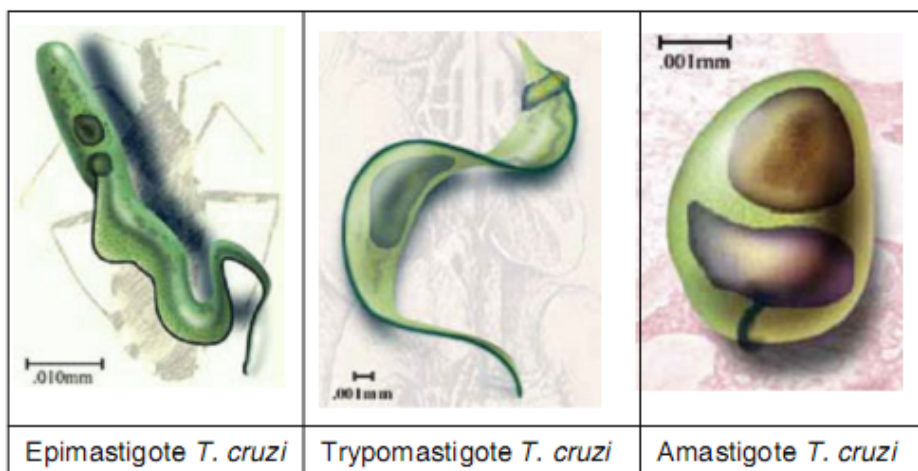
T. cruzi é um protozoário flagelado pertencente ao reino Protista e subreino Protozoa, filo Sarcomastigophora e ordem Kinetoplastida. Esta ordem compreende protozoários que apresentam uma estrutura especial localizada na mitocôndria única no parasito, denominado cinetoplasto, constituído por moléculas de DNA do cinetoplasto (kDNA) organizadas em maxicírculos e minicírculos formando uma rede complexa. Dentro desta ordem, encontra-se a família Trypanosomatidae, na qual está presente o gênero *Trypanosoma* (Levine *et al.*, 1980).

Este gênero constitui um dos mais importantes da família Trypanosomatidae, pois inclui além de *T. cruzi*, espécies que causam doenças de importância médica, veterinária e agrônômica. Por exemplo, *Trypanosoma brucei* que causa doenças em humanos (doença do sono) e *Trypanosoma equiperdum* que afeta animais (Barrett *et al.*, 2003).

O parasito apresenta diferentes morfologias durante o ciclo biológico (Fig. 1). A classificação de suas formas baseia-se na posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e do local de onde emerge o flagelo (Teixeira *et al.*, 2012). As

formas epimastigotas medem entre 20 e 40 μm de comprimento e possui o cinetoplasto posicionado anteriormente em relação ao núcleo. As tripomastigotas medem aproximadamente 25 μm de comprimento, possuem o cinetoplasto posterior ao núcleo e flagelo que percorre todo o corpo formando uma membrana ondulante, que é a principal característica de sua morfologia. As formas amastigotas são arredondadas ou ovóides e apresentam flagelo que não se exterioriza (Tyler e Engman, 2001; De Souza, 2002).

Figura 1 – Formas evolutivas de *T. cruzi*



Fonte: Muñoz-Saravia *et al.*, (2010).

T. cruzi apresenta considerável diversidade biológica, bioquímica e genética entre suas linhagens, e estas diferenças vêm sendo estudadas e utilizadas para caracterizar a estrutura da população desse parasito (Zingales *et al.*, 2009).

Desde a década de 70, estas observações levaram a busca de marcadores moleculares que pudessem correlacionar o genótipo do parasito com as manifestações clínicas da doença de Chagas (Zingales, 2011).

Diferentes isolados e clones de *T. cruzi* foram inicialmente agrupados em duas principais linhagens filogenéticas, *T. cruzi* I e *T. cruzi* II de acordo com marcadores bioquímicos e moleculares (Souto *et al.*, 1996). Estes marcadores, juntamente com os hábitos alimentares dos insetos vetores e o conjunto de hospedeiros vertebrados presentes em um determinado ambiente, foram utilizados para propor a relação com dois ciclos de transmissão de *T. cruzi*: o ciclo silvestre, no qual há a participação de marsupiais, roedores ou outros mamíferos silvestres, e o ciclo doméstico, do qual o homem e outros animais do ambiente peridomiciliar fazem parte.

De acordo com estudos realizados neste aspecto, foi observado inicialmente que *T. cruzi* I predominava nos reservatórios silvestres, enquanto que *T. cruzi* II era responsável pela doença de Chagas no ciclo doméstico. No entanto, outros estudos mostraram que os dois grupos circulavam tanto no ciclo doméstico como no silvestre, a ligação entre os dois ciclos é feita por insetos vetores que transportam *T. cruzi* II para o domicílio (Zingales *et al.*, 1998).

Atualmente, essa classificação foi modificada a fim de padronizar mais uma vez a nomenclatura e incluir os grupos híbridos de *T. cruzi*, como a cepa CL Brener (El-Sayed *et al.*, 2005).

Basicamente, foi proposto que *T. cruzi* fosse dividido em seis grupos (*T. cruzi* I–VI), e que cada um fosse denominado DTU (“*discrete typing unit*”), o qual é definido como um conjunto de isolados geneticamente semelhantes e que podem ser identificados por marcadores moleculares ou imunológicos comuns. De acordo com essa nova classificação, as DTUs de III à VI correspondem a organismos híbridos, originados a partir de diferentes eventos de trocas genéticas, enquanto que as DTUs I e II correspondem aos dois grupos originalmente definidos na primeira classificação proposta (Zingales *et al.*, 2009).

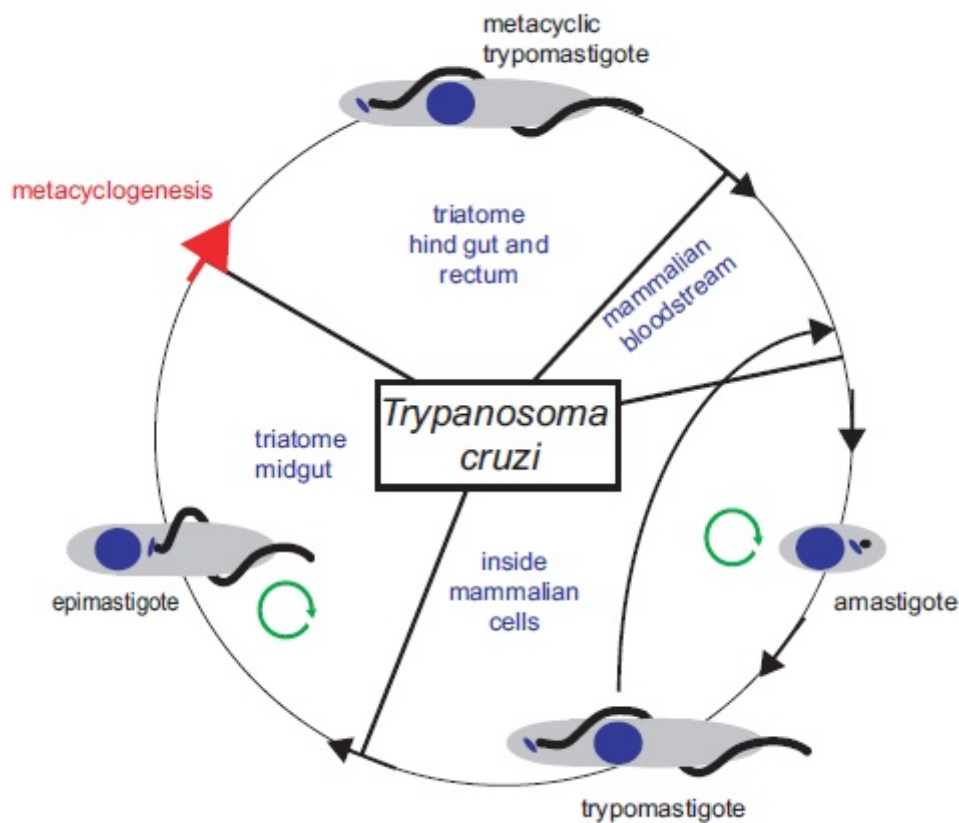
1.2 CICLO DE VIDA

T. cruzi apresenta diferentes estágios de desenvolvimento durante seu ciclo de vida (Fig. 2), alternando entre um hospedeiro vertebrado (mamífero) e um invertebrado (triatomíneo) (Coura e Borges-Pereira, 2010).

No estômago de insetos hematófagos da família *Reduviidae*, responsáveis pela transmissão natural do parasito, as formas epimastigotas proliferam por divisão celular. No reto, os parasitos se aderem ao epitélio intestinal onde ocorre a diferenciação em tripomastigota metacíclico, em um processo conhecido como metaciclogênese. Durante o repasto sanguíneo, o inseto pode defecar próximo ao local da picada liberando os tripomastigotas que penetram pelas mucosas ou descontinuidades da pele de mamíferos e invadem as células. Após a invasão, os parasitos são internalizados no vacúolo parasitóforo formado pela fusão dos lisossomos com a membrana plasmática da célula. Com o rompimento do vacúolo, os parasitos são liberados no citoplasma e se diferenciam na forma amastigota intracelular (Andrews, 2002). Estas formas se replicam por fissão binária

e se diferenciam em tripomastigota, que após a lise da célula, podem infectar outras células do hospedeiro ou atingir a corrente sanguínea disseminando-se para diferentes órgãos. Quando o triatomíneo ingere sangue de animais ou do homem infectado por *T. cruzi* durante o hematofagismo, o ciclo é reiniciado (Junqueira *et al.*, 2010).

Figura 2 – Ciclo de vida de *T. cruzi*



Fonte: Kramer (2012).

1.3 VETORES E RESERVATÓRIOS

T. cruzi tem um ciclo de vida complexo, sofrendo multiplicação extracelular no hospedeiro invertebrado e se multiplicando intracelularmente em hospedeiros vertebrados (Teixeira *et al.*, 2009). É um protozoário mantido na natureza por numerosas espécies de vetores e de hospedeiros mamíferos, distribuídos em quase todos os biomas e habitats nas Américas (Noireau *et al.*, 2009).

Triatoma infestans, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata* e *Panstrongylus megistus* são os vetores mais importantes na transmissão de *T. cruzi*

para o homem. *T. infestans* têm sido o mais importante vetor e foi o primeiro encontrado em regiões endêmicas da Amazônia e, juntamente com *P. megistus*, se encontra amplamente distribuído por todo Brasil (Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2012). *R. prolixus* é tipicamente encontrado no norte da América do Sul e América Central, assim como *T. dimidiata* que ocupa uma área similar, mas se estende até o norte do México (Rassi Jr. *et al.*, 2010).

De acordo com trabalho de Gurgel-Gonçalves e colaboradores (2012) foi realizado um estudo em relação à distribuição geográfica de 62 espécies de triatomíneos no Brasil. Essa análise revelou que o Cerrado e a Caatinga são os biomas que apresentam a maior diversidade de espécies desse vetor e a espécie que apresenta a maior distribuição no país é *P. megistus*. Além disso, o hábitat dessa espécie está associado com marsupiais (*Didelphis* spp), que frequentemente estão infectados com *T. cruzi*, explicando os altos níveis de infecção natural de *P. megistus* quando comparados com outras espécies de triatomíneos. Além disso, nesse estudo, verificou-se a baixa ocorrência de *T. infestans*, o que indica uma forte evidência da redução dessa espécie devido a programas de controle no país.

Os resultados obtidos pelo controle do *Triatoma infestans* no Brasil foram atestados em 2006 pela OPAS/OMS que certificou formalmente a interrupção da transmissão de *T. cruzi* pela espécie. Mesmo que ainda fossem encontrados alguns focos de *T. infestans*, considerou-se a transmissão improvável, já que há baixíssima infestação e densidade das populações (Silveira e Dias, 2011).

Apesar da ação predatória do homem que invadiu o ecótopo silvestre destruindo florestas e eliminando animais (Schmunis, 2007; Wolfe *et al.*, 2007; Coura e Borges-Pereira, 2010), os triatomíneos conseguiram se adaptar a esse novo ambiente buscando fontes de alimento. Sendo assim, estabeleceram três tipos de ciclos: o ciclo silvestre, o peridomiciliar e o doméstico (Coura, 2007).

Embora todas as espécies sejam consideradas vetores potenciais do parasito, só algumas estão relacionadas com o ciclo doméstico, outras são relevantes apenas no ciclo silvestre (Kollien e Schaub, 2000). Algumas espécies, como *T. infestans*, são adaptadas ao ambiente doméstico, enquanto que outras espécies como *P. megistus*, *Triatoma braziliensis*, *T. sordida* e *T. pseudomaculata* no Brasil, podem estar relacionadas ao ciclo silvestre, doméstico ou peridomiciliar (Coura e Borges-Pereira, 2010).

Além de humanos, mais de 150 espécies de mamíferos podem ser reservatórios do parasito. Mamíferos tipicamente envolvidos em ciclos silvestres de transmissão incluem gambás, tatus, quatis, macacos, ratos, entre outros. Em algumas situações, cães, gatos e coelhos têm sido associados à manutenção do ciclo doméstico e, conseqüentemente, a transmissão aos seres humanos (Herrera *et al.*, 2008).

Geralmente a transmissão do parasito para pequenos mamíferos pode ocorrer via oral quando ingerem vetores infectados (Schofield, 2000; Herrera *et al.*, 2008). Algumas das principais espécies que além de atuar como reservatórios ajudam a dispersar o parasito são: *Didelphis marsupialis*, *Philander opossum*, *Holochilus brasiliensis*, *Nasua nasua*, *Bradypus torquatus*, entre outras (Coura *et al.*, 2002).

1.4 FASES DA DOENÇA DE CHAGAS

A evolução da doença de Chagas depende da interação parasito-hospedeiro. Assim, são cruciais as características relacionadas ao parasito como: cepa e virulência; e ao hospedeiro como: idade, perfil genético e imunidade. (Andrade *et al.*, 2006; Zingales *et al.*, 2009; Marcon *et al.*, 2011).

Na fase aguda, os pacientes geralmente desenvolvem uma infecção assintomática, mas em alguns casos podem apresentar características clínicas após uma semana da inoculação do parasito como febre, cefaléia, mal-estar geral, astenia e hiporexia. Podem apresentar também sinais de porta de entrada da infecção, do tipo ocular (sinal de Romaña) ou cutâneo (chagoma de inoculação) (Muñoz *et al.*, 2011).

O óbito, nesta fase é pouco frequente e está relacionado, na maioria das vezes, com insuficiência cardíaca decorrente da miocardite aguda ou a meningoencefalite aguda (Teixeira *et al.*, 2006).

Durante esta fase, tripomastigotas aparecem no sangue e se espalham para qualquer tipo de célula nucleada do hospedeiro humano, podendo se multiplicar principalmente no interior de macrófagos ou células do baço, fígado ou miocárdio (Coura, 2003). Com o desenvolvimento da resposta imune, a concentração e o número de parasitos nos tecidos diminuem, sinalizando o fim da fase aguda. Contudo, o parasito não está completamente eliminado, e pode ser

encontrado, por exemplo, em tecidos específicos como músculos, persistindo ao longo da vida do hospedeiro (Rassi Jr. *et al.*, 2012).

Por isso, aproximadamente dez semanas após a infecção ocorre um período de latência, chamada também de fase indeterminada, na qual há baixa parasitemia apresentando manifestações como pequena inflamação no coração e degeneração do tecido muscular esquelético. Compreende um período longo, geralmente sem manifestações clínicas, eletrocardiográficas e radiológicas de acometimento cardíaco ou digestivo, porém com resultados positivos em exames sorológicos (Muratore e Baranchuk, 2010). A maioria dos indivíduos infectados permanece nesta fase que pode durar a vida inteira ou evoluir para a fase crônica sintomática (Teixeira *et al.*, 2006).

Em relação à fase crônica sintomática, estima-se que cerca de um terço das pessoas infectadas, apresentam manifestações clínicas envolvendo o coração, sistema digestório ou ambos (Gascón *et al.*, 2007). O tipo cardíaco da doença consiste em uma forma progressiva de cardiomiopatia, chamada também de Cardiomiopatia Chagásica Crônica, que pode levar à morte 5 anos após a identificação das primeiras falhas cardíacas (Teixeira *et al.*, 2006).

Também podem ocorrer alterações hipertróficas no esôfago e colón intestinal, chamadas de megaesôfago e megacólon, respectivamente (Coura, 2003). No megaesôfago ocorrem sintomas como aumento da salivação, regurgitação e soluço. O principal sintoma do megacólon é a constipação que produz a dilatação e compromete o cólon sigmóide e o reto, outras complicações podem incluir oclusão intestinal, fecalomas e ulceração (Teixeira *et al.*, 2006).

1.5 FORMAS DE TRANSMISSÃO DA DOENÇA

A forma mais conhecida de transmissão é a via vetorial, na qual o parasito é liberado nas fezes de insetos triatomíneos que penetraram pelo local da picada. Por isso, para a infecção ocorrer de forma natural, deve haver o contato inicial entre triatomíneos infectados e no caso, humanos. Outros fatores devem ser levados em conta nesse processo como: o tempo decorrido entre a picada e a defecação, o número de parasitos eliminados e sua capacidade de penetração (Coura e Borges-Pereira, 2010). No Brasil, com o controle na eliminação dos vetores

em áreas endêmicas, este tipo de transmissão foi consideravelmente reduzido (Dias *et al.*, 2011).

No caso da transmissão congênita, no Brasil, sua incidência oscila em torno de 1% das gestantes infectadas, ampliando-se esta proporção para 4% e até 12% em outras áreas latino-americanas. De acordo com o Consenso Brasileiro em doença de Chagas (2005) são considerados casos de infecções congênitas aqueles em que há a confirmação do parasito no sangue do recém-nascido e/ou a detecção de anticorpos na criança após aproximadamente sete meses de idade, desde que excluídos outros mecanismos de transmissão (Dias *et al.*, 2011).

Outras formas de transmissão da doença são transfusão de sangue, transplante de órgãos, acidentes de laboratório e por via oral (Coura, 2006; Martins *et al.*, 2011).

A transmissão de *T. cruzi* por via oral tem caráter habitual no ciclo enzoótico primitivo deste parasito, através da ingestão de vetores e reservatórios infectados. No caso do homem, esta transmissão ocorre através de alimentos contaminados com triatomíneos infectados ou suas dejeções (Yoshida, 2008). Também, pode ocorrer pela ingestão de alimentos contaminados por urina de marsupiais infectados, ou, carne de caça mal cozida (Dias, 2006; Yoshida, 2009).

Os surtos de doença de Chagas relacionados à ingestão acidental de alimentos contaminados com *T. cruzi* foram registrados em várias regiões do Brasil, como Rio Grande do Sul, Paraíba, Ceará e Amazonas (Nóbrega *et al.*, 2009; Cavalcanti *et al.*, 2009).

Em 2005, no estado de Santa Catarina, um surto de doença de Chagas foi associado à ingestão de caldo de cana. Durante a preparação dessa bebida, provavelmente houve a contaminação com o inseto vetor infectado com *T. cruzi*. Nesse episódio, mais de trinta pessoas foram afetadas e houve a ocorrência de seis mortes (Steindel *et al.*, 2008).

No ano seguinte, outro caso foi relatado no estado do Pará, agora envolvendo o consumo de açaí, uma fruta consumida diariamente nesta região (Nóbrega *et al.*, 2009).

Por isso, ao mesmo tempo em que o Brasil caminhava para erradicar os casos de doença de Chagas por via vetorial, os focos por via oral continuavam existindo.

No caso das transfusões sanguíneas, a transmissão está relacionada principalmente com a migração de pessoas doadoras de sangue de áreas endêmicas para áreas não endêmicas, uma vez que nestas áreas geralmente não é comum a realização de exames sorológicos nos bancos de sangue para a detecção de *T. cruzi* (Schmunis, 2007; Schmunis e Yadon, 2010). Este tipo de transmissão ocorre principalmente em países não endêmicos como Austrália, Canadá, Espanha e Estados Unidos ou em países com avanços na erradicação do vetor (Moraes-Souza e Ferreira-Silva, 2011).

Já os acidentes laboratoriais consistem na infecção por contato com materiais contaminados com parasitos ou até mesmo na captura do vetor em áreas endêmicas e trabalhos com mamíferos infectados (Dias *et al.*, 2011).

1.6 CONTROLE DA DOENÇA

Dentre as ferramentas utilizadas para interromper o ciclo doméstico de transmissão de *T. cruzi*, estão o controle químico e a melhoria da habitação. De fato, a prevalência de infecção diminuiu nos países que têm aplicado consistentemente medidas de controle. Por exemplo, no Brasil, a transmissão vetorial foi interrompida em todo estado de São Paulo desde os anos setenta (Moncayo e Silveira, 2009).

Entretanto, sem uma vigilância contínua e intervenção seletiva contra focos remanescentes de *T. infestans* domésticos e peridomiciliares, este será sempre um risco de propagação desta espécie, e, portanto, da Doença de Chagas.

Estudos da distribuição geográfica das espécies de vetores e reservatórios são cruciais na compreensão dos aspectos epidemiológicos de *T. cruzi*. Por isso, devem ser considerados no controle e monitoramento da doença, para se entender as dimensões geográficas de risco de transmissão. (Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2012).

A transmissão por transfusão sanguínea também pode ser evitada, uma vez que o sangue seja testado sorologicamente e as amostras positivas descartadas. Na maioria dos países endêmicos, a sorologia para *T. cruzi* é obrigatória para os doadores de sangue. No Brasil, partir dos anos oitenta foi implementado progressivamente o controle dos bancos de sangue, hoje cobrindo mais de 98% dos bancos no País (Dias *et al.*, 2011). Além disso, o tratamento de

pacientes na fase aguda também é útil como medida de controle (Cruz-Pacheco *et al.*, 2012).

Apesar desses programas adotados, o controle da doença de Chagas possui limitantes como: prevalência da transmissão no ciclo silvestre, elevado número de reservatórios, transmissão congênita não prevenível e baixas condições socioeconômicas das comunidades endêmicas.

1.7 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

O diagnóstico da doença de Chagas na fase aguda está baseado na detecção do parasito. Para isso, pode ser realizado um exame microscópico do sangue do paciente para procura das formas tripomastigotas, que também podem ser visualizados pela coloração de Giemsa (Kinoshita-Yanaga *et al.*, 2009).

Na fase crônica da doença, devido a baixa e intermitente parasitemia, o diagnóstico baseia-se na detecção sorológica de anticorpos IgG específicos que se ligam a antígenos de *T. cruzi* (Moncayo e Silveira, 2009). Ensaio de ELISA, imunofluorescência indireta e hemaglutinação indireta são os métodos mais utilizados nesse caso (Coura e Borges-Pereira, 2012). Além disso, no caso de alterações cardíacas, exames como eletrocardiograma e raio X podem ser utilizados para identificar alterações na função e morfologia do órgão (Punukollu *et al.*, 2007).

O objetivo do tratamento, consiste basicamente em eliminar o parasito e diminuir os sinais e sintomas da doença (Rassi Jr. *et al.*, 2010), já que, não há vacina ou tratamento quimioterápico eficiente para doença de Chagas.

Na fase aguda, o tratamento diminui a parasitemia, como mostrado pela conversão em testes parasitológicos negativos, reduz a gravidade e duração dos sintomas, e reduz a mortalidade. As taxas de cura relatadas são de até 81%, e o tratamento é obrigatório para todos os pacientes com infecção aguda (por vetores, oral ou acidental), infecção congênita, ou infecção reativada por tratamento imunossupressor, por exemplo, após transplante de órgãos (Coura *et al.*, 2002).

Os medicamentos utilizados atualmente para eliminação do parasito são: Nifurtimox e o Benzonidazol (Parker e Sethi, 2011). No entanto, esses compostos apresentam graves efeitos colaterais, requerem longos períodos de tratamento e a eficácia de cura é variável, já que algumas cepas de *T. cruzi* apresentaram resistência a essas substâncias (Muñoz-Saravia *et al.*, 2010).

O mecanismo de ação do Nifurtimox e Benzonidazol está relacionado com a produção de compostos eletrofílicos e/ou radicais livres que o sistema de detoxificação do parasito não pode eliminar, então, estes radicais se ligam a proteínas e lipídios do parasito, danificando sua estrutura (Temperton *et al.*, 1998).

A eficácia desses fármacos é dependente de vários fatores como: fase da doença, período de tratamento, dose e idade dos pacientes. Em relação aos efeitos colaterais, no caso do Nifurtimox, podem ocorrer náuseas, alergias, alterações psíquicas, perda de peso e de apetite (Murcia *et al.*, 2012), já o Benzonidazol produz dermatites, dor muscular, febre, depressão na medula óssea, agranulocitose e polineuropatia (Coura e De Castro, 2002).

1.8 GENOMA DE *T. CRUZI*

T. cruzi possui um genoma nuclear de 60,3 Mb organizado em 41 cromossomos que têm a característica de não se condensarem durante a divisão celular, o que inviabilizou seu estudo por métodos convencionais de citogenética (El-Sayed *et al.*, 2005; Weatherly *et al.*, 2009; Kramer, 2012).

Além disso, os genes estão organizados em grandes grupamentos gênicos policistrônicos, ou seja, centenas de genes codificadores de proteínas dispostas na mesma fita de DNA sob o controle de uma única região promotora (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010).

Apesar desta organização, genes individuais pertencentes à mesma unidade policistrônica podem exibir diferentes padrões de expressão, evidenciando que a regulação da expressão gênica geralmente ocorre a nível pós-transcricional (Kramer, 2012).

Assim como acontece com muitos parasitos, as fases do ciclo de vida de *T. cruzi* diferem bastante na morfologia e metabolismo sem, necessariamente ocorrer uma mudança genética. Existe evidência de um rearranjo global da cromatina e dos cromossomos durante estas transformações, e a ultraestrutura do núcleo também muda. Até o momento, pouco se sabe sobre a extensão destes rearranjos e os mecanismos por trás deles, mas demonstram que a arquitetura nuclear não é estática (Daniels *et al.*, 2010). Em epimastigotas e amastigotas, que são as formas replicativas do parasito, o núcleo é esférico, contém

um nucléolo grande e pequenas quantidades de heterocromatina. Em contraste, nas formas tripomastigotas, não replicativas, o núcleo é alongado, o nucléolo desaparece e a heterocromatina é dispersa pelo citoplasma (Elias *et al.*, 2001).

Outra característica marcante é que o DNA apresenta sequências repetidas, que totalizam 18% dos genes codificadores de proteínas e até 50% de todo genoma. Esse é o caso dos genes que codificam proteínas de superfície como as mucinas e os integrantes da superfamília das *trans*-sialidases, além de repetições subteloméricas e elementos de transposição (El-Sayed *et al.*, 2005).

Além do DNA nuclear, *T. cruzi* possui o DNA do cinetoplasto, que representa cerca de 20-25% do DNA total e é composto por dois tipos de moléculas circulares que diferem em tamanho e função, os minicírculos e os maxicírculos (Klingbeil e Englund, 2004).

As sequências variáveis presentes nos minicírculos codificam pequenos RNAs denominados RNAs guia (RNAg), envolvidos no processo de edição dos RNAm dos genes presentes nos maxicírculos, que são responsáveis por manter as funções da mitocôndria. Neste processo, a molécula de RNAm sofre adição ou remoção de uma ou mais moléculas de uridina (Liu *et al.*, 2005).

1.9 EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSSOMATÍDIOS

Os tripanossomatídios estão expostos ao estímulo extracelular e ao estresse, já que o parasito precisa alternar entre diferentes hospedeiros durante seu ciclo de vida. Assim, estão sujeitos a mudança de temperatura e pH, disponibilidade de nutrientes e oxigênio, entre outras. Por isso, sua habilidade em adaptar sua expressão gênica a uma nova condição é crucial para sua sobrevivência (Kramer, 2012).

Ao contrário da maioria dos eucariotos, a transcrição em tripanossomatídios é policistrônica, por isso, na transcrição de RNAm, após a formação de um transcrito primário, é necessário que este seja processado para originar um RNA mensageiro maduro. Este processo reflete um dos primeiros níveis da regulação pós-transcricional, no qual ocorre a adição da cauda poli-A na região 3'e da sequência líder na região 5' (Günzl, 2010).

O *trans-splicing* é a reação na qual a sequência líder, de 39 nucleotídeos, presente na extremidade 5' de um RNA precursor (SL-RNA) contendo

entre 110-140 nucleotídeos é transferida para a extremidade 5' do RNAm monocistrônico. Uma característica observada nessa reação é que o sítio acceptor de *splicing*, presente na região intergênica, é geralmente um dinucleotídeo AG imediatamente a jusante a uma sequência polipirimídica (Siegel *et al.*, 2005).

A segunda reação de clivagem está associada à adição de uma cauda de poliadeninas (A), contendo aproximadamente 30 resíduos de adenina, no terminal 3' de cada RNAm. Os sítios de poliadenilação são localizados de 100 a 400 nucleotídeos a montante da sequência polimirimídica e é dependente do *splicing* a jusante (Benz *et al.*, 2005).

Estudos realizados em vários tripanossomatídeos proporcionaram uma forte evidência de que adição da sequência líder e a poliadenilação não são eventos independentes (Teixeira, 1998). Em vez disso, estes mecanismos ocorrem simultaneamente ou imediatamente após a transcrição.

A organização geral de genes nos tripanossomatídeos em unidades policistrônicas significa que a maioria deles é transcrito e processado continuamente. Consequentemente, deve haver um mecanismo pós-transcricional para controlar a expressão gênica, como a seleção das sequências de RNAm que serão traduzidas, como por exemplo, através de um mecanismo de mobilização polissomal diferencial (Alves *et al.*, 2010).

A síntese constitutiva do transcriptoma e seleção das mensagens certas apenas na fase de maturação, provavelmente, permitem que o parasito mude a expressão do gene rapidamente para sobreviver e se adaptar a um novo ambiente (Gomez *et al.*, 2010).

Estudos relacionados com a estabilidade de certos RNAm propõem possíveis mecanismos de regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos. Esta estabilidade diferencial, de acordo com a forma evolutiva do parasito, pode estar em parte, associada à presença de sequências reguladoras nas regiões não traduzidas (Haile e Papadopoulou, 2007). Grande parte dos estudos se concentram em demonstrar a função da região 3'- não codificante (3'-UTR) na estabilidade dos transcritos de RNA.

Outras evidências sobre um possível controle traducional também foram demonstradas em algumas proteínas expressas por *T. cruzi*, tais como, a cruzipaina (Tomás e Kelly, 1996). Foi observado que, apesar de níveis similares de

RNA_m estarem presentes em todas as formas evolutivas do parasito, os níveis de proteínas eram maiores nas formas epimastigotas em relação às outras formas.

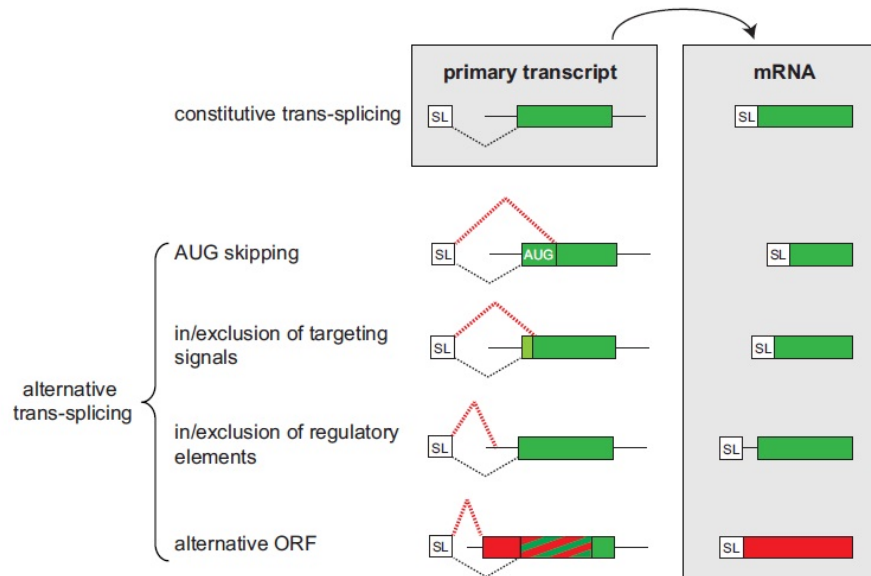
Assim, os mecanismos envolvidos na regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos parecem ser distintos daqueles comumente encontrados em eucariotos superiores sendo que a maior parte dos eventos de regulação da expressão gênica parecem ser pós-transcricionais.

Outro fenômeno que ocorre em *T. cruzi* é o *splicing* alternativo que é resultado da adição da sequência líder em diferentes posições do RNA_m, podendo resultar em proteínas com diferentes propriedades, mas que derivam do mesmo gene, o que expande a diversidade protéica do parasito (Rettig *et al.*, 2012). A mudança mais comum observada no trans *splicing* alternativo é o ganho ou perda de sinais de marcação, conduzindo à localização diferencial das proteínas (Nilsson *et al.*, 2010).

Então, o *splicing* alternativo diferencial em tripanossomatídeos pode ser uma maneira de produzir proteínas duplamente localizadas do mesmo gene por inclusão ou exclusão da sequência líder ou para a produção de RNA_m que diferem na estabilidade devido a diferenças nos comprimentos da região UTR (Kramer, 2012).

O processamento dos genes LYT1 (Manning-Cella *et al.*, 2002; Benabdellah *et al.*, 2007) e TcPRAC (Chamond *et al.*, 2005) de *T. cruzi* são exemplos deste mecanismo. Nestes dois casos, a partir do mesmo gene, há a expressão de duas proteínas que diferem nos aminoácidos da sua região N-terminal, devido à alternância entre os sítios aceptores de *splicing*. Essa diferença levou a uma mudança na função e localização dessas proteínas no parasito.

Figura 3 – *Trans splicing* alternativo e possíveis consequências funcionais.



Fonte: Preußner *et al.*, (2012).

Exemplos de resultados decorrentes de *splicing* alternativo em tripanossomatídeos (Fig. 3) são: o uso de outro códon de iniciação, inclusão ou exclusão de sinais de direcionamento e elementos regulatórios, e o uso de uma alternativa fase de leitura aberta.

1.10 QUIMIOCINA MCP-1/JE E ORIGEM DO CLONE 8.2

As quimiocinas são citocinas quimiotáticas de baixo peso molecular (8-12 kDa) e podem ser consideradas os principais fatores envolvidos na migração de leucócitos durante o processo inflamatório. Além disso, estão envolvidas em outras funções como, por exemplo, desenvolvimento de linfócitos T e B, maturação de células dendríticas e crescimento de tumores (Guerreiro *et al.*, 2011).

São moléculas produzidas essencialmente por monócitos e macrófagos, células endoteliais e fibroblastos e, uma vez induzida ocorrerá a migração dirigida de células que expressem os receptores para essa quimiocina.

Suas atividades biológicas são mediadas por interações com seus receptores de superfície celular que pertencem à superfamília dos receptores transmembranais acoplados a proteínas G. A partir desta ligação desencadeia-se uma cascata de eventos a nível intracelular que promove desde a transcrição de genes até ao rearranjo do citoesqueleto e à quimiotaxia.

As quimiocinas são classificadas de acordo com o número de aminoácidos existentes entre os dois primeiros resíduos de cisteína na extremidade N-terminal. Sendo assim, podem ser divididas em quatro grupos: CXC, CC, CX3C e C, nos quais, C representa cisteína e X representa o aminoácido (Ransohoff, 2009).

Alguns receptores se ligam a mais de uma quimiocina e uma mesma quimiocina pode se ligar a mais de um receptor. Mas geralmente, os receptores se restringem a um único tipo de quimiocina, fazendo com que sua nomenclatura esteja relacionada com essa especificidade.

CCL2 é uma quimiocina pertencente à família de quimiocinas CC, que também é conhecida como proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) descrito em humanos e seu homólogo JE em camundongos. É produzida por células endoteliais, células do músculo liso e macrófagos (Deshmane *et al.*, 2009).

Aliberti (1998) realizou um estudo experimental utilizando camundongos no pico da parasitemia. Esses animais receberam um estímulo quimiotático numa cavidade artificial estéril criada pela injeção de ar, no qual se mostrou que após o inóculo de MCP-1/JE (β -quimiocina) ocorria um acúmulo de formas do tipo amastigotas de *T. cruzi* nesta cavidade. Mais tarde, verificou-se que este acúmulo resultou da ação direta das quimiocinas nas formas tripomastigotas circulantes, levando à mudança morfológica do parasita. Esta transição morfológica para amastigota (esferomastigota) foi inibida *in vitro* pelo tratamento com a toxina pertussis que bloqueia a ativação do receptor de quimiocina.

A partir desses resultados, se sugeriu que as formas tripomastigotas possuam receptor para as quimiocinas MCP-1/JE, e que estas possam estar atuando nos processos de migração do parasita no hospedeiro. Ou seja, poderia explicar os diferentes tropismos teciduais presente na infecção por *T. cruzi*, sendo que algumas cepas se direcionariam para diferentes órgãos de acordo com o padrão de quimiocinas produzidas no local (Yamauchi, 2003).

Por isso, no doutorado da Profa. Dra. Lucy M. Y. Lioni realizado na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Universidade de São Paulo) foi avaliada e caracterizada a interação da quimiocina MCP-1/JE murina nas diferentes formas de *T. cruzi*. Com o objetivo de isolar genes que codificariam o suposto ligante de MCP-1/JE foi construída uma biblioteca de cDNA de formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Para hibridação, utilizou-se como sonda um fragmento do gene receptor de quimiocina CCR2.

Dentre os clones isolados, estava o 8.2. Inicialmente não se sabia por que este gene havia sido isolado, uma vez que não possui homologia com os genes de receptores de quimiocinas. Então, foi feito o alinhamento entre as sequências do clone e da sonda utilizada no programa ClustalW. O resultado indicou que o isolamento não foi ao acaso, existindo cerca de 43% de alinhamento, o que talvez seja o suficiente para que se justifique o isolamento deste clone de uma biblioteca de genes por rastreamento com sondas radioativas.

Este clone foi parcialmente sequenciado e analisado pela similaridade com outros genes depositados nos bancos de dados do GeneBank e verificou-se que ele ainda não havia sido descrito em *T. cruzi*.

2 OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi analisar e caracterizar o gene *Tc8.2*, tendo, portanto, como objetivos específicos:

- Clonagem do gene *Tc8.2*, amplificado a partir do DNA genômico das formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, no vetor pDONR e pDEST (Sistema Gateway).
- Expressão do gene *Tc8.2*, para a produção e purificação de proteínas recombinantes em *Escherichia coli*.
- Produção de anticorpos policlonais anti-proteína recombinante em camundongos
- Análise da reatividade do soro com extratos totais de proteínas das diferentes formas de *T. cruzi*.
- Imunolocalização da proteína nas diferentes formas dos parasitos através de Imunofluorescência e Microscopia eletrônica de transmissão.
- Caracterização do gene por ensaios de *Northern blot* e *Southern blot*

REFERÊNCIAS

- ALIBERTI, J.C.S. (1998). O envolvimento de quimiocinas e de fator ativador de plaquetas (PAF) na resistência e na patogênese da infecção experimental por *Trypanosoma cruzi* em Camundongos. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Ribeirão Preto.
- ALVES, L.R., AVILA, A.R., CORREA, A., *et al.* (2010). Proteomic analysis reveals the dynamic association of proteins with translated mRNAs in *Trypanosoma cruzi*. *Gene* 452:72-78.
- ANDRADE, S.G., CAMPOS, R.F., SOBRAL, S.C., *et al.* (2006). Reinfections with strains of *Trypanosoma cruzi*, of different biotopes as a factor of aggravation of myocarditis and myosites in mice. *Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical* 39:1-8.
- ANDREWS, N.W. (2002). Lysosomes and the plasma membrane: trypanosomes reveal a secret relationship. *The Journal of Cell Biology* 158:389-394.
- BARRETT, M.P., BURCHMORE, R.J., STICH, A., *et al.* (2003). The trypanosomiases. *The lancet* 362:1469-80.
- BENABDELLAH, K., GONZÁLEZ-REY, E., GONZÁLEZ, A. (2007). Alternative trans-splicing of the *Trypanosoma cruzi* LYT1 gene transcript results in compartmental and functional switch for the encoded protein. *Molecular Microbiology* 65(6):1559-67.
- BENZ, C., NILSSON, D., ANDERSSON, B., *et al.* (2005). Messenger RNA processing sites in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 143(2):125-34.
- CAVALCANTI, L.P.G., ROLIM, D.B., DA JUSTA, R. *et al.* (2009). Microepidemia de doença de Chagas aguda por transmissão oral no Ceará. *Caderno Saúde*, Rio de Janeiro, 17(4):911-921.
- CHAGAS, C. (1909). New human trypanosomiasis. Morphology and life cycle of *Schizotrypanum cruzi*, the cause of a new human disease. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz* 1:159-218.
- CHAMOND, N., GOYTIA, M., COATNOAN, N., *et al.* (2005). *Trypanosoma cruzi* proline racemases are involved in parasite differentiation and infectivity. *Molecular Microbiology* 58(1):46-60.
- CLAYTON, J. (2010). Chagas disease. *Nature* 465:S4-S5.
- CONSENSO BRASILEIRO EM DOENÇA DE CHAGAS (2005). Ministério da saúde. Secretaria de vigilância em saúde. *Revista Brasileira de Medicina Tropical* 38:1-29.
- COURA, J.R. (2003). Tripanosomose, Doença de Chagas. *Ciência e Cultura* 55:1.

- COURA, J.R. (2006). Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas' disease. *Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical* 39(3):113-117.
- COURA, J.R. (2007). Chagas disease: what is known and what is needed. A background article. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102:113-122.
- COURA, J. R., BORGES-PEREIRA, J. (2010). Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Tropica* 115:5-13.
- COURA, J. R., BORGES-PEREIRA, J. (2012). Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 45(3):286-296.
- COURA, J.R., DE CASTRO, S. (2002). A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97:3-24.
- COURA, J.R., JUNQUEIRA, A.C., FERNANDES, O., VALENTE, S.A., MILES, M.A. (2002). Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends in Parasitology* 18:171-175.
- CRUZ-PACHECO, G., ESTEVA, L., VARGAS, C. (2012). Control measures for Chagas disease. *Mathematical Biosciences* 237:49-60.
- DANIELS, J.P., GULL, K., WICKSTEAD, B. (2010). Cell biology of the trypanosome genome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 552-569.
- DE SOUZA, W. (2002). From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. *Kinetoplastid Biology and Disease* 1(1):3.
- DESHMANE, S.L., KREMLEV, S., AMINI, S. (2009). Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *Journal of interferon & cytokine research* 29:6.
- DIAS, J.P.C. (2006). Notas sobre *Trypanosoma cruzi* e suas características bioecológicas como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39:4.
- DIAS, J.P.C., NETO, V.A., LUNA, E.J.A. (2011). Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 44(3):375-379.
- ELIAS, M. C., MARQUES-PORTO, R., FREYMULLER, E., SCHENKMAN S. (2001). Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organization. *Molecular and Biochemical Parasitology* 112:79-90.
- EL-SAYED, N. M., MYLER, P. J., BARTHOLOMEU, D. C. *et al.* (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309:409-415.

- GASCÓN, J., ALBAJAR, P., CAÑAS, E., *et al.* (2007). Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' heart disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. *Revista Española de Cardiología* 60, 285-293.
- GOMEZ, C., RAMIREZ, E., CALIXTO-GALVEZ, M. (2010). Regulation of Gene Expression in Protozoa Parasites. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010:726045.
- GUERREIRO, R., SANTOS-COSTA, Q., AZEVEDO-PEREIRA, J.M. (2011). As quimiocinas e os seus receptores: características e funções fisiológicas. *Acta Medica Portuguesa* 24: 967-976.
- GÜNZL, A. (2010). The Pre-mRNA Splicing machinery of trypanosomes: Complex or simplified? *Eukaryotic cell* 1159-1170.
- GURGEL-GONÇALVES, R., GALVÃO, C., COSTA, J., PETERSON, A.T. (2012). Geographic distribution of Chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. *Journal of Tropical Medicine* 2012:705326.
- HAILE, S., PAPADOPOULOU, B. (2007). Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Current Opinion in Microbiology* 10:569-577.
- HERRERA, H.M., LISBOA, C.V., PINHO, A.P., *et al.* (2008). The coati (*Nasua nasua*, Carnivora, Procyonidae) as a reservoir host for the main lineages of *Trypanosoma cruzi* in the Pantanal region, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 102:1133-39.
- JUNQUEIRA, C., CAETANO, B., BARTHOLOMEU, D. C., *et al.* (2010). The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert reviews* 12:29.
- KINOSHITA-YANAGA, A.T., TOLEDO, M.J., ARAÚJO, S.M. *et al.* (2009). Accidental infection by *Trypanosoma cruzi* follow-up by the polymerase chain reaction: case report. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 51(5):295-298.
- KLINGBEIL, M.M., ENGLUND, P.T. (2004). Closing the gaps in kinetoplast DNA network replication. *PNAS*. 101: 4333-4334.
- KOLLIEN, A.H., SCHAUB, G.A. (2000). The Development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. *Parasitology Today* 16:381-387.
- KRAMER, S. (2012). Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: The case of kinetoplastids. *Molecular and Biochemical Parasitology* 181:61-72.
- LEVINE, N.D., CORLISS, J.O., COX, F.E., *et al.* (1980). A newly revised classification of the protozoa. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 27:37-58.
- LIU, B., LIU, Y., MOTYKA, S.A., *et al.* (2005). Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. *Trends in Parasitology* 21:8.

- MANNING-CELA, R., GONZALEZ, A., SWINDLE, J. (2002). Alternative splicing of LYT1 transcripts in *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity* 70:4726-4728.
- MARCON, G. B., ALBUQUERQUE, M., BATISTA, A. M., *et al.* (2011). *Trypanosoma cruzi*: parasite persistence in tissues in chronic chagasic Brazilian patients. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz* 106(1):85-91.
- MARTÍNEZ-CALVILLO, S., VIZUET-DE-RUEDA, J. C., FLORENCIO-MARTÍNEZ, L. E., *et al.* (2010). Gene Expression in Trypanosomatid Parasites. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010:525241.
- MARTINS, L. P. A., CASTANHO, R. E. P., NOGUEIRA, A. B., *et al.* (2011). Incidence of *Trypanosoma cruzi* transmission through breastfeeding during acute experimental Chagas disease. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 15(2):116-118.
- MONCAYO, A., SILVEIRA, A. C. (2009). Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104(1):17-30.
- MORAES-SOUZA, H., FERREIRA-SILVA, M.M. (2011). O controle da transmissão transfusional. *História sobre a Doença de Chagas no Brasil* 44: Suplemento II.
- MUÑOZ, M. J., MURCIA, L., SEGOVIA, M. (2011). The urgent need to develop new drugs and tools for the treatment of Chagas disease. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 9(1):5-7.
- MUÑOZ-SARAVIA, S. G., HABERLAND, A., WALLUKAT, G., *et al.* (2010). Chronic Chagas' heart disease: a disease on its way to becoming a worldwide health problem: epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine. *Heart Failure Reviews* 17(1):45-64.
- MURATORE, C.A., BARANCHUK, A. (2010). Current and emerging therapeutic options for the treatment of chronic chagasic cardiomyopathy. *Vascular Health and Risk Management* 6:593-601.
- MURCIA, L., CARRILERO, B., VIÑA, P.A. *et al.* (2012). Nifurtimox chemotherapy: colateral effects in treated *Trypanosoma cruzi* infected patients. *Revista Española de Quimioterapia* 25(1):74-75.
- NILSSON, D., GUNASEKERA, K., MANI, J., *et al.* (2010). Spliced leader trapping reveals widespread alternative splicing patterns in the highly dynamic transcriptome of *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathogens* 6(8):e1001037.
- NÓBREGA, A.A., GARCIA, M.H., TATTO, E. *et al.* (2009). Oral transmission of Chagas Disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 15:4.
- NOIREAU, F., DIOSQUE, P., JANSEN, A. M. (2009). *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Veterinary Research* 40:26.
- PAHO (2009). Pan American Health Organization. <www.paho.org>.

- PARKER, E. R., SETHI, A. (2011). Chagas disease: coming to a place near you. *Dermatologic Clinics* 29:53-62.
- PREUßER, C., JAÉ, N., BINDEREIF, A. (2012). mRNA splicing in trypanosomes. *International Journal of Medical Microbiology* 302:221-224.
- PUNUKOLLU, G., GOWDA, R. M., KHAN, I. A., *et al.* (2007). Clinical aspects of the Chagas' heart disease. *International Journal of Cardiology* 115: 279-283.
- RANSOHOFF, R.M. (2009). Chemokines and chemokine receptors: Standing at the crossroads of immunobiology and neurobiology. *Immunity* 31: 711–721.
- RASSI Jr, A., RASSI, A., MARIN-NETO, J. (2010). Chagas disease. *Lancet* 375:1388-402.
- RASSI Jr, A., RASSI, A., REZENDE, J. M. (2012). American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America* 26:275-291.
- RETTIG, R., WANG, Y., SCHNEIDER, A., *et al.* (2012). Dual targeting of isoleucyl-tRNA synthetase in *Trypanosoma brucei* is mediated through alternative trans-splicing. *Nucleic Acids Research* 3:1299-1306.
- SCHMUNIS, G.A. (2007). Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102:75-85.
- SCHMUNIS, G.A., YADON, Z.E. (2010). Chagas disease: a Latin America health problem becoming a world health problem. *Acta Tropica* 115:14-21.
- SCHOFIELD, C.J. (2000). *Trypanosoma cruzi*: The vector-parasite paradox. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95:535-544.
- SIEGEL, T.N., TAN, K.S., CROSS, G.A. (2005). Systematic study of sequence motifs for RNA trans splicing in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Cellular Biology* 25:9586-9594.
- SILVEIRA, A.C., DIAS, J.C.P. (2011). O controle da transmissão vetorial. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 44:2.
- SOUTO, R., FERNANDES, O., MACEDO, A.M., *et al.* (1996). DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 83:141-152.
- STEINDEL, M., PACHECO, L.K., SCHOLL, D., *et al.* (2008). Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 60:25-32.
- TEIXEIRA, A. R. L., GOMES, C., LOZZI, S. P. *et al.* (2009). Environment, interactions between *Trypanosoma cruzi* and its host, and health. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro 25(1):S32-S44.

- TEIXEIRA, A.R.L., NASCIMENTO, R.J., STURM, N.R. (2006). Evolution and pathology in Chagas disease - A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 101:463-491.
- TEIXEIRA, D.E., BENCHIMOL, M., CREPALDI, P.H., *et al.* (2012). Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 6(8):e1749.
- TEIXEIRA, S.M.R. (1998). Control of gene expression in Trypanosomatidae. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 31:1503-1516.
- TEMPERTON, N.J., WILKINSON, S.R., MEYER, D.J., *et al.* (1998). Overexpression of superoxide dismutase in *Trypanosoma cruzi* results in increased sensitivity to the trypanocidal agents gentian violet and benznidazole. *Molecular Biochemistry Parasitology*. 96:167-176.
- TOMÁS, A.M., KELLY, J.M. (1996). Stage-regulated expression of cruzipain, the major cysteine protease of *Trypanosoma cruzi* is independent of the level of RNA1. *Molecular Biochemistry Parasitology* 76:91-103.
- TYLER, K. M., ENGMAN, D. M. (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology* 31:472-481.
- WEATHERLY, D. B., BOEHLKE, C., TARLETON, R. L. (2009). Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi* genome. *BMC Genomics* 10:255.
- WOLFE, N.D., DUNAVAN, C.P., DIAMOND, J. (2007). Origins of major human infectious diseases *Nature* 447:279-283.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. (2012). Chagas disease. Site: http://www.who.int/topics/chagas_disease/en/. Acessado em 21 de Novembro de 2012.
- YAMAUCHI, L.M. (2003). Avaliação da ligação de MCP-1/JE em *Trypanosoma cruzi* e análise molecular de genes que participam do processo de transcrição no parasita. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Ribeirão Preto.
- YOSHIDA, N. (2008). *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. *Parasitology International* 57:105-109.
- YOSHIDA, N. (2009). Molecular mechanism of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104(suppl I):101-107.
- ZINGALES, B. (2011). *Trypanosoma cruzi*: one parasite, two parasites or several parasites of chagas disease?. *Revista da Biologia* 6b:44-48.
- ZINGALES, B., ANDRADE, S.G., BRIONES, M.R.S. *et al.* (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104:1051-1054.
- ZINGALES, B., SOUTO, R. P., MANGIA, R. H., *et al.* (1998). Molecular epidemiology of american trypanosomiasis in Brazil based on dimorphism of rRNA and mini-exon gene sequences. *International Journal for Parasitology* 28:105-112.

3 ARTICLE:

TWO DIFFERENTIAL LOCATION OF AN ANTIGEN CODED BY *TC8.2* GENE IN *TRYPANOSOMA CRUZI*

Danielle Kian^a, César Armando Contreras Lancheros^a; Igor Alexandre Campos Damiani^a, Priscila Mazzocchi Hiraiwa^a, Danielle Lazarin^b, Juliana Cogo^b, Phileno Pinge Filho^c, Márcia Regina Machado dos Santos^d, José Franco da Silveira Filho^e, Celso Vataru Nakamura^b, Sueli Fumie Yamada-Ogatta^a, João Santana da Silva^f, Lucy Megumi Yamauchi^a

ABSTRACT: *Trypanosoma cruzi* is a heteroxenous parasite that develops a complex life cycle involving vertebrate and invertebrate hosts. It displays several life forms with functional and morphological differences, alternating between replicative (epimastigote and amastigote) and infective (trypomastigote) forms. Unlike other eukaryotes, the sequences encoding proteins are arranged in polycistronic transcription units, which are converted into monocistronic mRNA by trans-splicing in the 5' end and polyadenylation at the 3' end of the primary transcript. Although trans-splicing is a precise mechanism, there are cases where another acceptor splice site were used this process within an intergenic region, and therefore can generate different proteins from the same gene. Here, we describe the Tc8.2 gene, which was cloned and expressed in *Escherichia coli*. The serum against recombinant protein obtained by immunization of mice was used to react with protein extracts of *T. cruzi* and resulted in recognition of 70 and 80 kDa polypeptides in epimastigotes and trypomastigotes, respectively. Tc8.2 immunolocalization in these two forms also showed a differential pattern recognition, suggesting that these proteins could have different functions. The genomic organization analysis suggest a single or a few gene

^a D. Kian, C. A. C. Lancheros, I. A. C. Damiani, P. M. Hiraiwa, S. F. Yamada-Ogatta, L. M. Yamauchi*
Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina,
Rodovia Celso Garcia Cid s/n, km 380 PR445 Campus Universitário, Londrina, Paraná, 86057-970,
Brazil.

Tel: +55-43-3371-5503; fax: +55-43-3371-4788. *E-mail address: lionilmy@uel.br

^b D. Lazarin, J. Cogo, C. V. Nakamura
Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências
Básicas da Saúde. Av. Colombo, 5790, Maringá, PR, 87020-900, Brazil.

^c P. Pinge Filho
Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de
Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid s/n, km 380 PR445 Campus Universitário, Londrina, Paraná,
86057-970, Brazil.

^d M. R. M. Santos
Universidade Bandeirante de São Paulo, Conselho de Pós-graduação e Pesquisa. Rua Maria
Cândida, 1813, Vila Guilherme, São Paulo, SP, 02071-013, Brazil.

^e J. F. Silveira Filho
Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Microbiologia Imunobiologia e Parasitologia.
Rua Botucatu, 862. Vila Clementino, São Paulo, SP, 04023-062, Brazil.

^f J. S. Silva
Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de
Parasitologia Microbiologia e Imunologia. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento
de Imunologia, Ribeirão Preto, SP, 14049-900, Brazil.

copies in the *T. cruzi* genome, and the Northern blot analysis showed two different sizes of transcripts in all three forms of parasite, in the infective one, there is a higher transcript than in the replicative forms, overall our results suggest the hypothesis of the gene being processed alternatively.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Alternative splicing. Expression. *Tc8.2*

INTRODUCTION

Trypanosoma cruzi is the etiologic agent of Chagas' disease, also known as American trypanosomiasis. It is a disease found mostly in the Americas, and is considered a serious public health and socioeconomic problem (PAHO 2009). It is estimated that at least 10 million people are infected and that 10-14 thousand deaths occur each year due to this disease (WHO 2012). *T. cruzi* is a protozoan parasite that infects diverse hosts, mammals and insects, and causes Chagas' disease. This parasite has four different forms, the epimastigote and metacyclic trypomastigote, located in the insect digestive tract, the amastigote and bloodstream trypomastigote presented in the mammalian host. This characteristic showed the complexity of the life cycle and the capacity of adapt to changes in the hosts, allowing multiplying in the insect gut, invade the nucleated host cells, multiply on it, and also evade the immune system (Rassi et al. 2012). Therefore, the gene expression is the key to control all changes that these parasites overcome, for example, the changes in environment and in the nutrients disponibility within each host (Schwede et al. 2012). These mechanisms are controlled by the gene expression that has peculiar characteristics in trypanosomatids, as the genes organization into polycistronic units and processing of transcripts by *trans*-splicing (Sutton and Boothroyd 1986; Gomes et al. 2010; Teixeira et al. 2012).

The genome, therefore, is transcribed as a large polycistronic immature RNA, that is processed by addition of a spliced leader in the 5' terminal by a *trans*-splicing mechanism and a poly(A) tail in the 3' terminal by a polyadenilation reaction (Haile and Papadopoulou 2007). The *trans*-splicing mechanisms is influenced by the length and nucleotide composition of the tract of polypyrimidine, as well as the distance of this tract to the acceptor site of the spliced leader (SL) and poly(A) site. The presence of *trans*-splicing sites definitely contributes to better characterization of the untranslated region (UTR) (Benz et al. 2005; Campos et al. 2008). This regions may control translation, mRNA half-life, interactions to proteins,

and communication among UTR themselves (Nozaki and Cross 1995), some example, such as FL160 and amastin genes has been seen in *T. cruzi*, (Weston et al. 1999; Coughlin et al. 2000).

Another phenomenon that can occur in *T. cruzi* is the alternative *trans*-splicing which results from the addition of the leader sequence of the mRNA in different positions and it can result in proteins with different properties, but derives from the same gene, expanding the diversity of the parasite protein (Rettig et al. 2012). The change observed in alternative *trans*-splicing most common is the gain or loss of target signals, leading to differential localization of proteins (Nilsson et al. 2010).

In this work we characterized a gene of *T. cruzi*, isolated from a trypomastigotes cDNA λ Zap library. The cDNA termed *Tc8.2* was sequenced and through analysis of the contigs deposited in the database TcruziDB (<http://www.tcruzidb.org>) was performed cloning the gene and expression in *Escherichia coli*. The antiserum was used for analyzes the *Tc8.2* native protein by immunolocalization in epimastigotes and trypomastigotes. These images showed a dual localization of the protein in these two forms. Furthermore, characterization of this novel gene was made from Southern blot and Northern blot assays.

MATERIALS AND METHODS

PARASITES

Epimastigote forms of *T. cruzi* strain Y (Silva and Nussenzweig 1953) were maintained in LIT medium (Liver Infusion Tryptose) (Camargo 1964) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, USA) at 28 °C. Trypomastigote forms were obtained from the supernatant of LLCMK₂ cells in culture, 120 h post-infection with parasite and amastigote forms by lysis of these cells cultured in RPMI (Gibco, USA) supplemented with 10% (v/v) inactivated FBS, 2 mM L-glutamine, 100 UI/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Gibco, USA) and 2.5 µg/ml Tylosin (Sigma-Aldrich, USA) and 5% CO₂ at 37°C.

EXTRACTION OF NUCLEIC ACIDS

Epimastigotes (1×10^7 cells) were collected by centrifugation, washed in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.0 and then resuspended in TELT buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 62.5 mM EDTA, pH 9.0, 2.5 M LiCl₂, 4% Triton X-100). The sample was incubated for 5 min at room temperature and DNA was then extracted with 1 volume of phenol/chloroform (1:1) (Medina-Acosta and Cross 1993). The DNA was precipitated with absolute ethanol and recovered by centrifugation. The pellet was washed with 70% ethanol and resuspended in TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0). For extraction of RNA were used amastigote, tripomastigote and epimastigote forms of *T. cruzi* (1×10^8 cells). Parasites were centrifuged, washed in PBS buffer (pH 7.0), resuspended in TRIzol solution and processed according to the method recommended by the manufacturer (Invitrogen, USA).

CLONING AND EXPRESSION OF THE GENE Tc8.2

The amplicon was amplified by PCR using the follow oligonucleotides:

5'-

GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGGAAGGAGATAATGTCTTTGAATGCG
AACG-3' (forward) and 5'-

GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTAACGACTGGACTTTTCGCC-3'
(reverse). Genomic DNA of *T. cruzi* Y strain was used as a template. Both oligonucleotides contain recombination sites for cloning the *Tc8.2* into the entrance pDONR vector (Gateway®-Invitrogen, USA). This ORF was recombined into the expression vector pDEST™17, in accordance with the manufacturer's protocol for production of His₆-tagged recombinant protein in the *Escherichia coli* BL21 (DE) strain. The recombinant protein was produced in *E. coli* BL21 (DE) after induction with 1mM IPTG (Invitrogen, USA) for 3 h at 37 °C. The protein was separated by SDS-PAGE (13%), excised from the gel and eluted with PBS pH 8.0. Protein concentration was determined by Bradford assay (1976). For production of polyclonal antiserum against recombinant protein Tc8.2 were utilized BALB/c mice, wich were immunized subcutaneously once a week for a month, with 10 µg of Tc8.2 protein in Freund's complete adjuvant (Sigma-Aldrich, USA) for the first inoculation and followed by inoculation with incomplete adjuvant. The use of animals was in

accordance with the Ethics Committee on Animal Experiments of Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP number 13/2006.

IMMUNOBLOTTING ASSAY

Cell lysates from 5×10^6 parasites were loaded into SDS-PAGE and the proteins were transferred onto nitrocellulose membrane (Hybond C, Amersham Biosciences, England) using standard protocols. The membrane was incubated with blocking solution (5% of nonfat powdered milk, 0.1% Tween-20 in PBS (pH 7.4) for 1 h. After the membrane was incubated with polyclonal anti-Tc8.2 antiserum diluted 1:100 in blocking solution. Then incubated for 45 min at room temperature with anti-mouse horseradish peroxidase conjugated IgG (Invitrogen, USA) (1:8.000) diluted in PBS/Tween 0.5%. After three additional washes with PBS/Tween 0.5% the substrate (0.05% H_2O_2 and 0.3% 4-chloro-1-naphthol methanol dissolved in PBS) was added. The color was allowed to develop at room temperature.

IMMUNOFLUORESCENCE

Approximately 1×10^7 parasites were washed in PBS (pH 8.0) and resuspended in 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min. Parasites were washed with PBS and deposited on glass slides pretreated with poly-L-lysine and permeabilized by incubation with 0.1% Triton X100 in PBS (pH 8.0) for 10 min. The slides were placed in blocking solution (4% BSA/PBS) for 16 h and then incubated with anti-Tc8.2 (1:100) in PBS for 1 h. The samples were then washed and incubated for 45 min with AlexaFluor-488 conjugated anti-mouse IgG (Invitrogen, USA) (1:400). For staining of cellular material was added DAPI (4'6-diamino-2-phenylindole) (Invitrogen, USA) (1:1000) in PBS and incubated for 10 min at room temperature. Slides were mounted with N-propyl-gallate (Sigma-Aldrich, USA) and the images acquired at Olympus BX51 fluorescence microscope.

ELECTRON MICROSCOPY AND IMMUNOLOCALIZATION

Parasites were fixed in 0.3% glutaraldehyde, 4% formaldehyde and 1% picric acid diluted in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) and then dehydrated in a

graded series of ethanol solutions. The material was progressively infiltrated with Unicryl at lower temperatures and resin polymerization was carried out in BEEM capsules at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 days under UV light. Ultrathin sections were obtained with a Leica ultramicrotome and grids containing the sections were incubated with 50 mM NH_4Cl for 30 min. They were then incubated with blocking solution (3% BSA in PBS, pH 8.0) for 30 min. This was followed by 1 h incubation with anti-Tc8.2 serum diluted 1:100 in blocking solution. The grids were then incubated for 1 h with gold-labeled goat anti- mouse IgG (Sigma-Aldrich, USA) diluted 1:200 in blocking solution. Grids were washed and stained with uranyl acetate and lead citrate for further observation in a Jeol JEM 1400 transmission electron microscope.

PREPARATION OF RADIOACTIVE PROBE, NORTHERN BLOT AND SOUTHERN BLOT

The DNA fragment (*Tc8.2*) being labeled with radioactive nucleotide was prepared according to the protocol Radprime DNA Labeling system kit (Invitrogen, USA). Total RNA (12 μg), isolated from different developmental stages of *T. cruzi*, was separated by electrophoresis on 1% agarose/formaldehyde gel and blotted on to nylon Hybond N membranes (Amersham Biosciences, England) using a vacuum blotter (Bio-Rad Laboratories, USA). Hybridization was performed overnight at $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ in a solution containing 50% formamide, 5x SSC (1x SSC is 0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate), 5x Denhardt's solution and 0.1 mg/mL sonicated herring sperm DNA, 0.1% sodium dodecil sulphate. After hybridization, the membranes were washed once with 1x SSC/0,5% SDS for 20 min at room temperature and then three times with 0.2x SSC/0,5% SDS for 20 min each time at $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. They were then exposed to X-ray film. Southern blot was performed with epimastigote genomic DNA (10 μg) digested by the following restriction enzymes: *Bam*HI, *Eco*RI, *Sma*I, *Hind*III e *Pst*I (Invitrogen, USA), according to the manufacturer. DNA was separated by electrophoresis in a 0.8% agarose gel, transferred to nylon membrane and hybridized as described for Northern blot.

RT-PCR

For the reaction was used 1 μg of total RNA from epimastigotes and trypomastigotes of *T. cruzi*, reverse transcriptase buffer, 0.175 mM dNTP, specific

primers (20 pmoles), DTT (Invitrogen, USA). The samples were incubated in a thermocycler (Veriti® Applied biosystems, USA) at 65 °C for 5 min, 4 °C for 5 min and then 200 U of reverse transcriptase (MMLV – Invitrogen, USA) was added. The reactions were then incubated for 1 h at 42 °C, 5 min at 4 °C and 95 °C for 5 min. For PCR amplification, 2.5 ng of cDNA samples from epimastigotes and trypomastigotes, reaction buffer, 0.175 mM dNTPs, 2.5 mM MgCl₂, 1.25 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, USA) and oligonucleotides designed to gene *Tc8.2*: 5'-CGGGATCCATGTCTTTGAATGCGAACGC-3' (forward) and 5'-CCCAAGCTTCTAACGACTGGACTTTTCGCC-3' (reverse). The samples were subjected to the following incubations: 3 min at 95 °C, 1 min at 94 °C, 1 min at 58 °C, 3 min at 72 °C, whereas the last three steps were repeated for 30 cycles.

RESULTS

CLONING AND EXPRESSION OF *Tc8.2* GENE

The gene *Tc8.2* was isolated from a trypomastigote forms cDNA λZap library. After sequencing this clone, the gene was compared to genes deposited in the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and TcruziDB (<http://www.tcruzidb.org>). The contigs obtained were aligned with the sequence of *Tc8.2* on ClustalW program (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>), it resulted in a consensus sequence of approximately 1800 nucleotides in which was observed a single open reading frame of 592 amino acids. Based on this the amino acid sequence analysis showed similarity (44%) to putative transporter protein of *Leishmania major*. Indeed, the *Tc8.2* amino acid sequence analysis at the SOSUI - Prediction of transmembrane regions (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui>) also showed that in the C-terminal coding region there is a transmembrane helix (SSLALVAPVVGSVLCVFMTAFIL).

Based on the consensus sequence, the primers were delineated, the gene was amplified, cloned and expressed in the pDEST, to allow studies of immunolocalization of the native protein. The gene amplified has 1.8 kb and produced an approximately 80 kDa recombinant protein in *Escherichia coli* BL21 (DE) strain (data not shown).

IMMUNOLocalIZATION OF A Tc8.2 NATIVE PROTEIN

The polyclonal antibodies against recombinant Tc8.2 produced in mice were used to immunolocalize proteins in the western blot analysis. It recognized single protein in the epimastigote and trypomastigote extract (Fig. 1); however, the size of both proteins is different. In the epimastigote extract, the antibody recognized a 70 kDa protein and in the trypomastigote, it recognized a higher molecular weight protein of 80 kDa. When immunofluorescent assays were performed, the results in the epimastigotes showed that the Tc8.2 native protein has cytoplasmatic distribution, and in the trypomastigote forms the fluorescence is observed in the nucleous and kinetoplast (Fig. 2). These results were confirmed in the ultrastructural analysis, the antibodies were found in the nucleous and kinetoplast in the trypomastigote and a cytoplasm distribution in the epimastigote (Fig. 3). It suggested that there are two proteins expressed by one gene or two genes that shared partially the C-terminal amino acid sequence.

GENOME ORGANIZATION AND TRANSCRIPTION ANALYSIS

Southern blot results showed that *Tc8.2* presented as single or few copies gene in the *Trypanosoma cruzi* genome (Fig. 4B). The Northern blot analysis showed that it has two transcript sizes, in the epimastigote and amastigote, a 3.3 kb RNA and in the trypomastigote a 4.4 kb transcript (Fig. 4D). The RT-PCR of epimastigote and trypomastigote RNA analyses showed that both forms presented the same C-terminal gene (data not shown), suggesting an alternative processing of the same RNA that results in two transcripts with two different size and compartmentalized protein.

DISCUSSION

The dual localizations of a same protein due an alternative *trans*-splicing processing have been reported in trypanosomatids (Benabdellah et al. 2007; Rettig et al. 2012). Here we describe a gene that is also differentially expressed in the life stages of *Trypanosoma cruzi*. Initially, we cloned and expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE) a fragment of 1.8 kb and the 80 kDa recombinant protein

obtained were used to produce the serum against Tc8.2. Interestingly, this serum recognized proteins with different molecular weights in the total extracts of epimastigotes and trypomastigotes, a 70 and 80 kDa protein, respectively. The differential recognition in both parasite forms was also observed by immunofluorescence and ultrastructure microscopy assays. According to the obtained images, in epimastigote forms, the labeled protein is distributed throughout the cell, indicating a cytoplasmic protein. This pattern seen is a punctuated labeling, which is also observed in other cytoplasmic proteins, such as cytosolic protein kinase arginine of *T. cruzi* (Miranda et al. 2009) and malate dehydrogenase isoforms of *Leishmania* and *Trypanosoma brucei* which are located in the cytoplasm and glycosomes (Leroux et al. 2006; Aranda et al. 2006). In trypomastigotes, however, the images showed that the Tc8.2 is a protein related to the nucleus and kinetoplast of the parasite. Additionally, immunocytochemical analysis was performed in ultrathin sections of epimastigotes and trypomastigotes and results confirmed the previous data, in trypomastigote sections, few gold particles were visualized in the nucleus and kinetoplast, whereas in epimastigotes these particles were distributed throughout the cytoplasm.

In trypanosomatids few examples of proteins with double cellular localization are known. *T. cruzi* LYT1 protein was an example of this phenomenon; the protein can be observed both in the mitochondrion and in the plasma membrane and it has different functions depending on this location (Benabdellah et al. 2007). Another example is the isoleucyl-tRNA synthetase protein of *T. brucei*, which catalyze the aminoacylation of tRNAs, its location is seen in mitochondria and the cytoplasm (Rettig et al. 2012). A common feature of these two proteins is that although the double location, they are encoded by a single gene. The main question addressed in our work was if there are two proteins expressed by one gene or two genes that shared the C-terminal amino acid sequence. We first analyzed by Southern blot hybridization the genomic organization. It showed that the gene *Tc8.2* has a simple pattern, suggesting a single or a few copies gene, differently from multicopy gene family pattern such as gp85/sialidase (Tonelli et al. 2010). Based on our result, we discarded the hypothesis of the multicopy genes sharing amino acid sequence. Next, we performed the Northern blot assay to address if both proteins were generated by two different transcripts. The results showed that *Tc8.2* gene hybridized different size transcripts, 4.4 kb (in trypomastigotes) and 3 kb (in

epimastigote and amastigote forms). These results support our prior data; overall it is possible that this difference in the transcript sizes found is the product of alternative *trans*-splicing. Manning-Cella et al. (2002) showed that the *LYT1* gene of *T. cruzi* presents distinct transcripts during their life cycle and that these mRNAs are generated due to alternative *trans*-splicing of pre-RNA. The possible functional consequences of alternative *trans*-splicing are inclusion and exclusion of targeting signals or regulatory elements, which results in formation of a different protein (Preußner et al. 2012). We evaluated the possible alternative splicing, however our results suggest that the alternative splicing site is in the upstream region of our designed forward primer. Further studies should be performed to address the upstream alternative splicing site used by trypomastigotes.

T. cruzi *TcPRACA* (proline racemase) gene also has two alternative *trans*-splicing signals and appropriate acceptor sites downstream of the leader sequence to create alternative translation initiation codons (Chamond et al. 2005). These characteristics can theoretically generate proteins with different roles in the parasite. According to their data, there is the formation of a cytoplasmic protein and another secreted expressed only in the trypomastigotes, suggesting that its production is related to the development stage of the parasite, as well as the gene *LYT1* (Manning-Cella et al. 2001). While the largest *LYT1* mRNA is expressed mainly in stages found in mammals, the smaller is more abundant in epimastigotes and are related to the hemolytic activity and mitochondrial metabolism, respectively (Benabdellah et al. 2007). Manning-Cella et al. (2002) demonstrated that through alternative splicing in the primary transcript of *LYT1* gene, the translation is constrained to a second open reading frame where the initial AUG codon is in a posterior position, leading to a different protein expression, which lacks the initial 28 amino acids, but with identical C-terminal composition. The 5' region flanking site preceding the initiator ATG of the gene *LYT1* includes two polypyrimidine tracts in which it can be directed splicing; hence this gene has two end products.

Studies revealed generalized event of alternative *trans*-splicing in trypanosomatids including *T. brucei*, *T. cruzi* and *Leishmania* (Siegel et al. 2011). This happens because the minimum requirements for *trans*-splicing are the presence of polypyrimidine tract followed by a splicing acceptor dinucleotide (mainly AG) (Siegel et al. 2005). So, considering these data is possible to predict the locations on that might be occurring the addition of leader sequence and poly(A) tail of the mRNA

processing (Ziccardi and Brandão 2011). Unfortunately, we were unable to characterize the N-terminal of the *Tc8.2* gene. Further, analysis of the sequence should be performed to search for these splice acceptor sites, which could prove the occurrence of alternative splicing of the transcript.

Moreover, the identification of these two proteins reinforces the fact of occurrence of alternative splicing, since the same gene produced different peptides in trypomastigote and epimastigote forms. This difference may be related to the role of these proteins during biological cycle, thus all forms exhibit distinct morphology and function. The alternative splicing provides a wide and powerful approach to increase the diversity of mRNA and consequently, the capacity of encoding a genome (Preußner et al. 2012). Unfortunately, the function of *Tc8.2* is still remained unknown; however the performed bioinformatics analysis was conducted with the retrieved sequences. Based on the information of a presence of a transmembrane helix (SSLALVAPVVGSLCVFMTAFIL) in the C-terminal region; and the similarity (44%) to a putative transporter protein of *Leishmania major*, we suggest that this gene also encoded a putative transporter protein. This characteristic could be related to a metabolite transport, important to cellular growth in the replicative form. On the other hand, the trypomastigote, which is infective and non-replicative form, may have another signal sequence allowing the protein be located in the nucleus and mitochondria.

Further studies need to be done to determine what role this *Tc8.2* protein has in different forms of *T. cruzi*, and if this difference has to do really with the stage of development where they are. Studies of new generation sequencing, such as RNAseq, can provide more complete information about the structure and its mRNA expression levels, as well as the standard addition of leader sequence and poly(A) tail and compared with alternative splicing. The characterization of this gene *Tc8.2* aligned with this type of study can generate important information that will help to better understand the mechanism of gene expression in *T. cruzi*.

REFERENCES

- ARANDA, A., MAUGERI, D., UTTARO, A.D., OPPERDOES, F., CAZZULO, J.J., NOWICKI, C. (2006). The malate dehydrogenase isoforms from *Trypanosoma brucei*: Subcellular localization and differential expression in bloodstream and procyclic forms. *International Journal for Parasitology* 36:295-307.
- BENABDELLAH, K., GONZÁLEZ-REY, E., GONZÁLEZ, A. (2007). Alternative trans-splicing of the *Trypanosoma cruzi* LYT1 gene transcript results in compartmental and functional switch for the encoded protein. *Molecular Microbiology* 65(6):1559-1567.
- BENZ, C., NILSSON, D., ANDERSSON, B., CLAYTON, C., GUILBRIDE, D.L. (2005). Messenger RNA processing sites in *Trypanosoma brucei*. *Molecular & Biochemical Parasitology* 143:125-134.
- BRADFORD, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.
- CAMARGO, E.P. (1964). Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 6:93-100.
- CAMPOS, P.C., BARTHOLOMEU, D.C., DAROCHA, W.D., CERQUEIRA, G.C., TEIXEIRA, S.M.R. (2008). Sequences involved in mRNA processing in *Trypanosoma cruzi*. *International Journal for Parasitology* 38:1383-1389.
- CHAMOND, N., GOYTIA, M., COATNOAN, N., BARALE, J.C., COSSON, A., DEGRAVE, W.M., MINOPRIO, P. (2005). *Trypanosoma cruzi* proline racemases are involved in parasite differentiation and infectivity. *Molecular Microbiology* 58(1):46-60.
- COUGHLIN, B.C., TEIXEIRA, S.M., KIRCHHOFF, L.V., *et al.* (2000). Amastin mRNA abundance in *Trypanosoma cruzi* is controlled by a 3'-untranslated region position-dependent cis-element and an untranslated region-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry* 275:12051-60
- GOMEZ, C., RAMIREZ, M. E., CALIXTO-GALVEZ, M., MEDEL, O., RODRIGUEZ, M. A. (2010). Regulation of gene expression in Protozoa parasites. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* Volume, Article ID 726045, 24 pages.
- HAILE, S., PAPADOPOULOU, B. (2007). Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic Protozoa. *Current Opinion in Microbiology* 10:569-577.
- LEROUX, A., FLEMING-CANEPA, X., ARANDA, A., MAUGERI, D., CAZZULO, J.J., S'ANCHEZ, M.A., NOWICKI, C. (2006). Functional characterization and subcellular localization of the three malate dehydrogenase isozymes in *Leishmania spp.* *Molecular & Biochemical Parasitology* 149:74-85.

- MANNING-CELA, R., CORTÉS, A., GONZÁLES-REY, E., VAN BORIS, W.C., SWINDLE, J., GONZÁLEZ, A. (2001). LYT1 protein is required for efficient *in vitro* infection by *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity* 69:3916-3923.
- MANNING-CELA, R., GONZALEZ, A., SWINDLE, J. (2002). Alternative splicing of LYT1 transcripts in *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity* 70:4726-4728.
- MEDINA-ACOSTA, E., CROSS, G.A.M. (1993). Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. *Molecular and Biochemical Parasitology* 59:327-329.
- MIRANDA, M.R., BOUVIER, L.A., CANEPA, G.E., PEREIRA, C.A. (2009). Subcellular localization of *Trypanosoma cruzi* arginine kinase. *Parasitology* 136:1201-1207.
- NILSSON, D., GUNASEKERA, K., MANI, J., OSTERAS, M., FARINELLI, L. (2010). Spliced leader trapping reveals widespread alternative splicing patterns in the highly dynamic transcriptome of *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathogens* 6(8):e1001037.
- NOZAKI, T., CROSS G.A. (1995). Effects of 3' untranslated and intergenic regions on gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular Biochemical Parasitology* 75:55-67
- PAHO (2009). Pan American Health Organization. www.paho.org.
- PREUßER, C., JAÉ, N., BINDEREIF, A. (2012). mRNA splicing in trypanosomes. *International Journal of Medical Microbiology* 302:221-224.
- RASSI, A. JR., RASSI, A., REZENDE, J.M. (2012). American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America* 26:275-291.
- RETTIG, R., WANG, Y., SCHNEIDER, A., OCHSENREITER, T. (2012). Dual targeting of isoleucyl-tRNA synthetase in *Trypanosoma brucei* is mediated through alternative trans-splicing. *Nucleic Acids Research* 3:1299-1306.
- SCHWEDE, A., KRAMER, S., CARRINGTON, M. (2012). How do trypanosomes change gene expression in response to the environment? *Protoplasma* 249:223-238.
- SIEGEL, T.N., GUNASEKERA, K., CROSS, G.A., OCHSENREITER, T. (2011). Gene expression in *Trypanosoma brucei*: lessons from high throughput RNA sequencing studies. *Trends Parasitology* 27:434-441.
- SIEGEL, T.N., TAN, K.S., CROSS, G.A. (2005). Systematic study of sequence motifs for RNA trans splicing in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Cellular Biology* 25:9586-9594.
- SILVA, L.H.P., NUSSENZWEIG, V. (1953). Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para camundongo branco. *Folia Clinica Biológica* 20:191-207.
- SUTTON, R.E., BOOTHROYD, J.C. (1986). Evidence for trans splicing in trypanosomes. *Cell* 47:527-535.

TEIXEIRA, S.M.R., DE PAIVA, R.M.C., KANGUSSU-MARCOLINO, M.M., DAROCHA, W.D. (2012). Trypanosomatid comparative genomics: Contributions to the study of parasite biology and different parasitic diseases. *Genetics and Molecular Biology* 35:1-17.

TONELLI, R.R., GIORDANO, R., BARBU, E.M. *et al.* (2010). Role of the gp85/Trans-Sialidases in *Trypanosoma cruzi* tissue tropism: Preferential binding of a conserved peptide motif to the vasculature *in vivo*. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 4(11): e864.

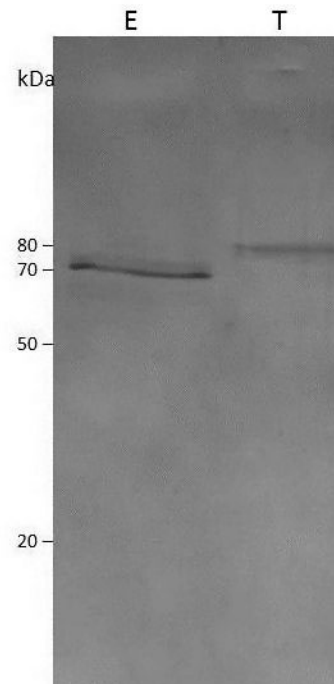
WESTON, D., LA FLAMME, A.C., VAN VOORHIS, W.C. (1999). Expression of *Trypanosoma cruzi* surface antigen FL-160 is controlled by elements in the 3' untranslated, the 3' intergenic, and the coding regions. *Molecular Biochemical Parasitology* 102:53–66

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. (2012). Chagas disease. Site: http://www.who.int/topics/chagas_disease/en/. Acessado em 21 de Novembro de 2012.

ZICCARDI, M., BRANDÃO, A. (2011). Transcription of long hypothetical orfs in *Trypanosoma cruzi*: The epimastigote stage uses trans-splicing sites that generate short 5'UTRs. *Experimental Parasitology* 129:203-206.

LEGENDS

Fig. 1 – Polyclonal antibodies against recombinant protein Tc8.2 recognize different polypeptides in *T. cruzi* parasite extracts. Epimastigote and trypomastigote of *T. cruzi* Y strain were separated in the SDS-PAGE 13% and transferred into nitrocellulose membrane. Polyclonal antibodies against the protein Tc8.2 recognize peptides of 70 kDa protein in the extract of epimastigotes (E) and a peptide of 80 kDa protein in the extract trypomastigotes (T)



Kian *et al.*, 2013

Fig. 2 – Immunolocalization of native Tc8.2 by fluorescence microscopy. Epimastigote and trypomastigote of *T. cruzi* Y strain were fixed and the permeabilized. The polyclonal antibodies against the protein Tc8.2 recognize proteins differentially compartmentalized in *T. cruzi*. (A, B and C): epimastigotes, (D, E and F): trypomastigotes. (A and D): Microscopy showing the morphology of parasites. (B and E): cells stained with DAPI showing the nucleus and kinetoplast. (C and F): fluorescence of Alexa-Fluor 488 indicating Tc8.2 protein in the parasite. Bars: 10 μ m

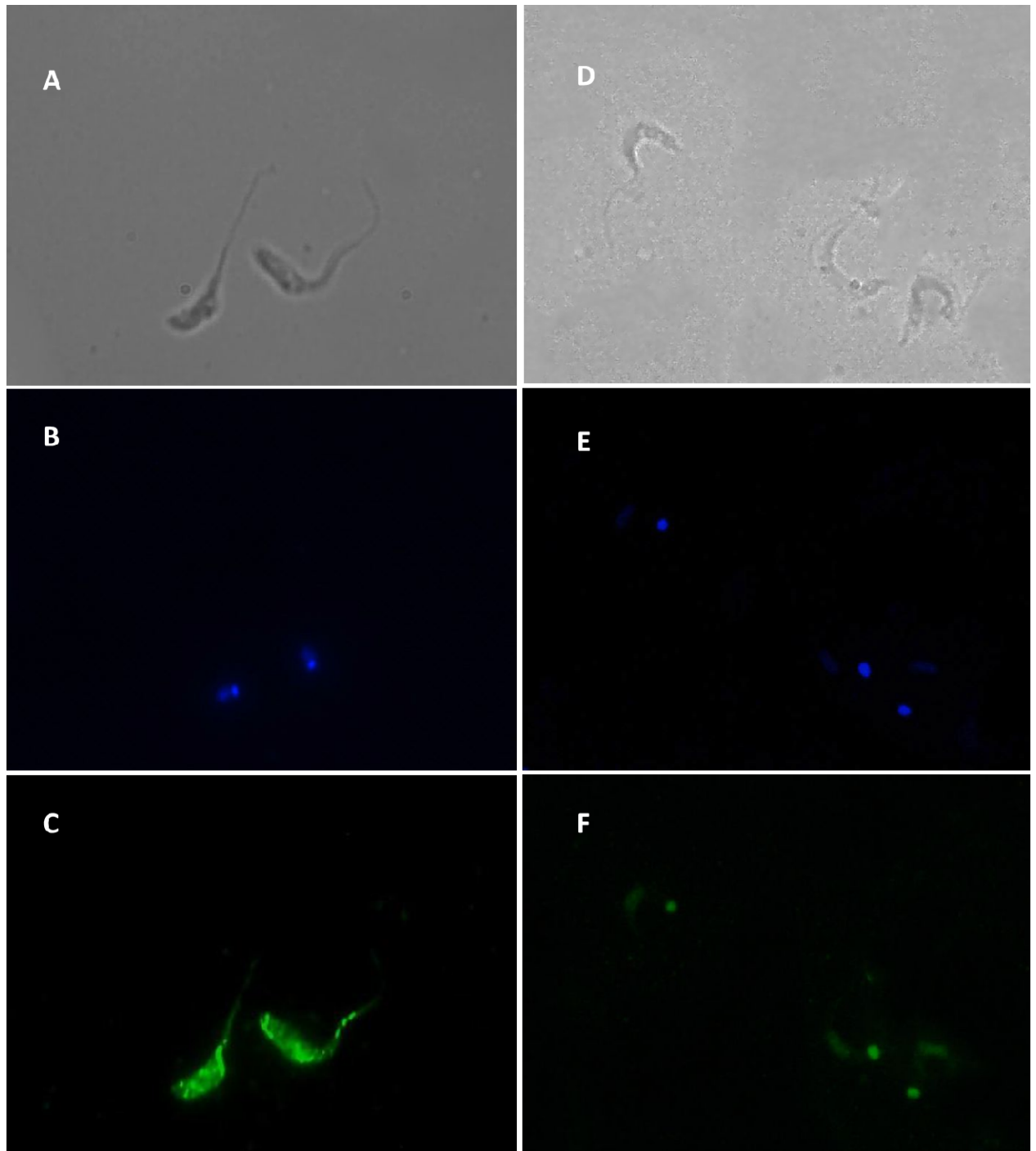


Fig. 3 – Ultrastructural detection of Tc8.2 protein in *T. cruzi*. Distribution of gold particles in epimastigotes (A) was observed throughout the cytoplasm of the parasite. In trypomastigotes (B and C), the Tc8.2 protein could be observed in the kinetoplast and nucleus, respectively. (k) kinetoplast (N) nucleus (F) flagellum. Magnification 20.000x Bars: 0,2 μ m (A) Magnification 30.000x Bars: 100 nm (B) Magnification 60.000x Bars: 100 nm (C). Arrows show the gold particles

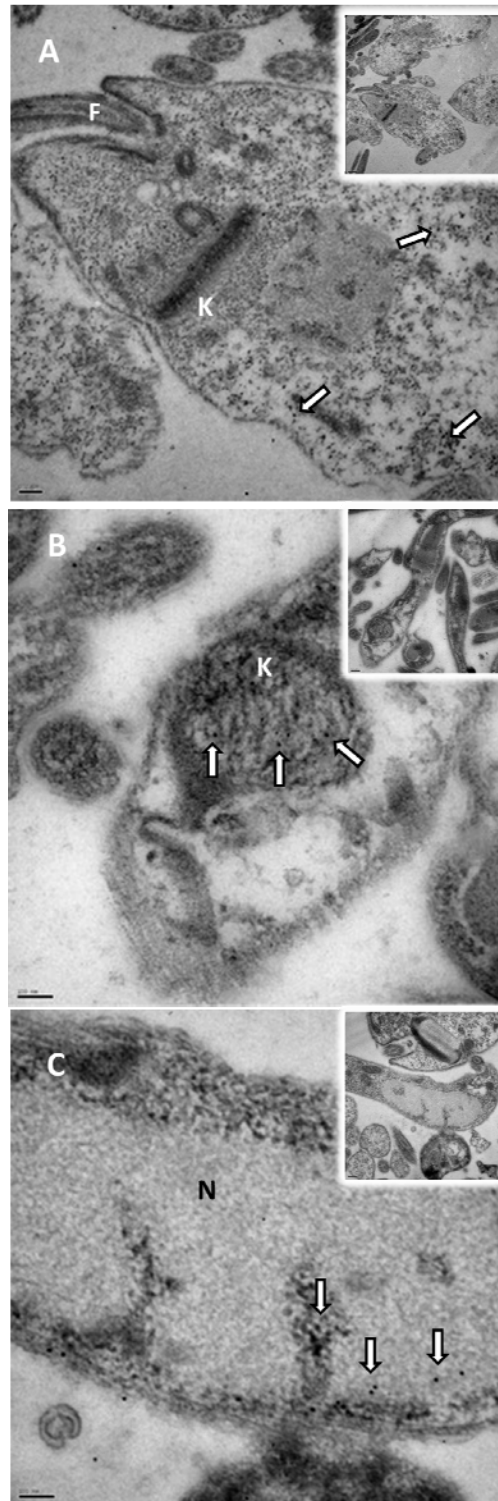
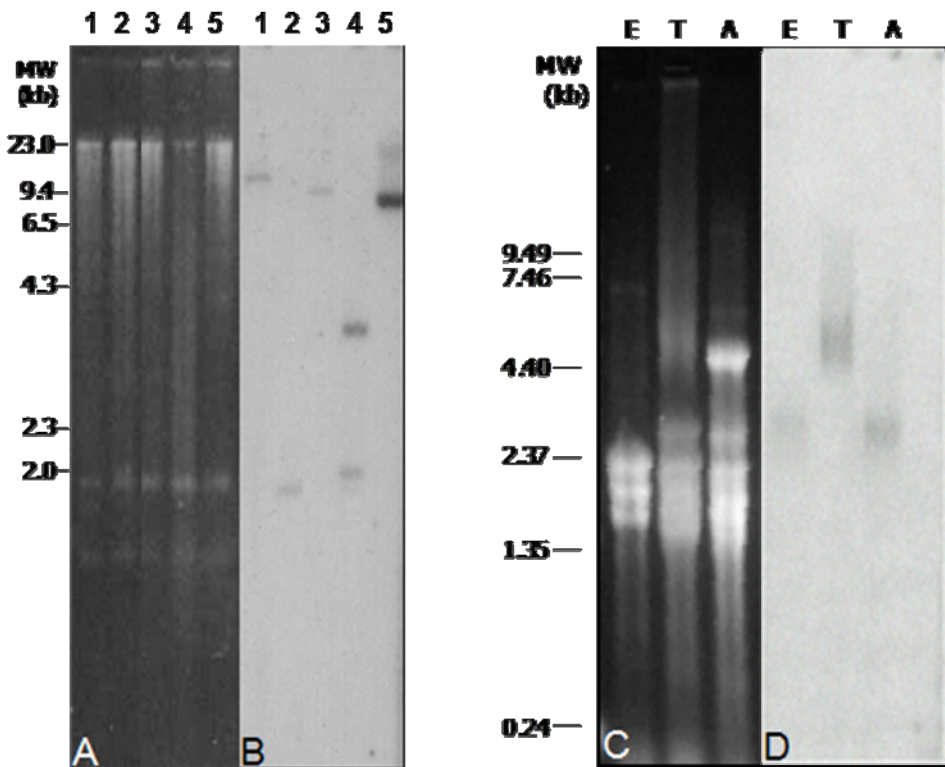


Fig. 4 – Genomic organization and transcript analysis of the gene *Tc8.2*. Panel A and B: Southern blot of genomic DNA from *T. cruzi* digested with restriction enzymes, lines: 1. *Bam*HI, 2. *Eco*RI, 3. *Hind*III, 4. *Pst*I, 5. *Sma*I. Electrophoresis in agarose-TBE gel 0.8%, stained with ethidium bromide. Panel C and D: Northern blot analysis of total RNA of epimastigote (E), trypomastigote (T) and amastigote (A) of *T. cruzi*. Electrophoresis in 1% agarose-MOPS stained with ethidium bromide. Panel B and D: Hybridization of labeled *T.c8.2* ³²P



Kian *et al.*, 2013

4 CONCLUSÃO

Inicialmente, foi realizado um estudo de bioinformática com a sequência do gene *Tc8.2*. Essa análise resultou em uma sequência consenso de aproximadamente 1800 nucleotídeos, a partir da qual foram sintetizados os iniciadores senso e antisenso que amplificavam a região C terminal do gene. Essa região foi clonada e expressa no vetor pDEST pelo sistema Gateway. A partir da imunização de camundongos com a proteína recombinante, obteve-se o soro anti-Tc8.2 para ensaios de reatividade com extratos proteicos de duas formas de *T. cruzi* e posterior imunolocalização da proteína no parasito. O soro reconheceu polipeptídios de massas moleculares diferentes nas formas tripomastigotas (80 kDa) e epimastigotas (70 kDa). E quanto a localização, observou-se que em tripomastigota a proteína Tc8.2 estava presente no núcleo e cinetoplasto e nas formas epimastigotas, distribuída pelo citoplasma. Para verificar a organização genômica do Tc8.2, a análise de *Southern blot* revelou que tratava-se de um gene único ou em poucas cópias e pelo ensaio de *Northern blot* o reconhecimento de transcritos distintos nas três formas de *T.cruzi* (4,4 kb em tripomastigota e 3 kb em epimastigota e amastigota). Esses dados mostram que as duas proteínas localizadas em compartimentos diferentes de acordo com a forma evolutiva do parasito provêm de um único gene e que essa diferença pode estar relacionada com o processamento dos transcritos.

ANEXO

ANEXO A



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

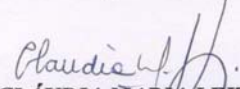


CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação n° 013/2006, intitulado: “*Análise da ligação CCL2 ao parasita T. cruzi e caracterização de genes que codificam proteínas que participam do processo de transcrição no parasita*”, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. João Santana da Silva**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de **27 de março de 2006**.

(We certify that the protocol n° 013/2006, about “*Analysis of chemokine CCL2 binding to T. cruzi parasite and characterization of genes that encode proteins that participate of transcription process in the parasite*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the COLLEGE OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO – ETHICAL COMMISSION OF ETHICS IN ANIMAL RESEARCH (CETEA) in 03/27/2006 meeting).

Ribeirão Preto, 28 de março de 2006.


Prof. Dra. CLÁUDIA MARIA LEITE MAFFEI
Vice-Presidente da Comissão
de Ética em Experimentação Animal