

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Leandro Leme Neto

Caracterização de inibidores de complemento liberados pelas formas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi* e sua função na evasão da imunidade inata.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em biologia celular e molecular.

Orientador: Prof. Dr. Marcel Ivan Ramirez.

RIO DE JANEIRO

2013

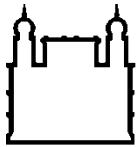
Neto, Leandro Leme

Caracterização de inibidores de complemento liberados pelas formas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi* e sua função na evasão da imunidade inata./ Leandro Leme Neto. – Rio de Janeiro: 2013.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e Molecular, 2013.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Inibidores de serino proteases. 3. Doença de Chagas.
4. Sistema complemento. Caracterização de inibidores de serino proteases em *Trypanosoma cruzi* e sua função na evasão do sistema do complemento.

CDD: 616.99419



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: Leandro Leme Neto

Caracterização de inibidores de complemento liberados pelas formas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi* e sua função na evasão da imunidade inata.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcel Ivan Ramirez

Aprovada em: 20/12/2013

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos **Presidente**

Prof. Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral

Prof. Dr. Salvatore Giovanni de Simone

Rio de Janeiro, de dezembro de 2013

Dedico essa dissertação
à minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS.

Primeiramente, agradeço à minha família, em especial meus pais Tereza e Leandro que sempre estiveram ao meu lado para me ver crescer navida, dando conselhos, ensinamentos e amor a todo o tempo, incondicionalmente.

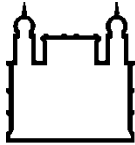
Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcel I Ramirez que com competência me guiou para a conclusão do meu mestrado.

Ao grupo do meu laboratório pelo apoio durante a execução do mestrado. Em especial a Dra. Poliana Deolindo.

Ao Dr. ProfJ ameel M. Inal pela oportunidade de trabalhar em seu grupo na London Metropolitan University, que certamente foi de suma importância para a minha formação científica e para a realização deste trabalho.

Aos amigos da pós-graduação Luiz André, Bruno, Henrique, Renata, Daiana, Sheila, Rhagner, Ellen, Bianca, Tatiana, Marina, Rodrigo, Andrés, Rafael, Joana, Katia, Sinara, Patrícia, Cintia, Paloma, Davi.

Aos professores da pós-graduação, principalmente, Andrea Henriques, Rubem Mena Barreto, Alexandre Peixoto.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Caracterização de inibidores de complemento liberados pelas formas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi* e sua função na evasão da imunidade inata.

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Leandro Leme Neto

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, constitui um grave problema de saúde pública que afeta 18 milhões de pessoas na América latina. Para produzir a infecção formas tripomastigotas metacíclica de *T. cruzi*, liberadas durante a picada do inseto vetor, precisam evadir o sistema imune inato do hospedeiro vertebrado para infectar as células. O sistema complemento, devido à sua capacidade para rapidamente reconhecer e eliminar microrganismos constitui a principal linha de defesa do sistema imune inato. O sistema do complemento é composto por várias proteínas, ativadas em cascata por serino proteases, que culmina com a formação do complexo de ataque a membrana e lise do patógeno. Todavia, muitos organismos patogênicos desenvolveram formas de escapar do ataque do sistema do complemento por meio de diversos mecanismos. Visando à melhor caracterização dos fatores de virulência do *T. cruzi*, o grupo foi verificar se os sobrenadantes de formas metacíclicas apresentam atividade inibitória de complemento. Devido às vias do complemento serem ativadas por serino proteases, foi realizada uma busca no banco genômico de *T. cruzi* atrás de motivos de SERPINAS (inibidores de serino protease) que o parasito poderia estar liberando no primeiro contato parasito-hospedeiro. Foram realizados experimentos de lise mediada pelo complemento com sobrenadantes das formas metacíclicas de *T. cruzi*. Observou-se, ainda, que os sobrenadantes das formas metacíclicas do *T. cruzi* são capazes de inibir a lise mediada pelo complemento de formas epimastigotas.

ABSTRACT

The *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease, is a serious public health concern that affects 18 million people in Latin America. To produce the infection, metacyclic trypomastigotes of *T. cruzi* released during the bite of the insect vector must evade the innate immune system of the vertebrate host to infect cells. The complement system, due to its ability to rapidly recognize and eliminate microorganisms is the major line of innate immune system defense. The complement system is composed of various proteins, activated by serine proteases cascade that culminates in the formation of the membrane attack complex and lysis of the pathogen. However, many pathogens have developed ways to evade the attack of the complement system through several mechanisms. Aiming to better characterize the virulence factors of *T. cruzi*, the team was to verify whether the supernatants of metacyclic forms exhibit inhibitory activity of complement. Due to the complement pathways are activated by serine proteases, we seek in genomic library of *T. cruzi* motifs related to serpin (serine protease inhibitors), a protein that the parasite could be releasing at the first parasite-host contact. Experiments were carried out to complement-mediated lysis with supernatants of metacyclic forms of *T. cruzi*. Furthermore, it was observed, that the supernatants of metacyclic forms of *T. cruzi* are capable of inhibiting the complement mediated lysis of epimastigotes.

Lista de Figuras:

Figura 1.2 Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
Figura 1.3 Primeiros passos da ativação do complemento pelas vias clássica, das lectinas e alternativa.....	16
Figura 1.31 Etapas finas da ativação do complemento.....	18
Figura 1.4 Maneiras de evadir o complemento.....	19
Figura 1.6 Principais tipos de inibidores de serino proteases.....	25
Figura 4.1 Determinação dos parâmetros para a realização dos ensaios de lise mediada pelo complemento.....	32
Figura 4.2 Morfologia e grau de incorporação de PI dos parasitos epimastigotas durante o período de geração dos sobrenadantes.....	33
Figura 4.21 Morfologia e grau de incorporação de PI dos parasitos metacíclicos durante o período de geração dos sobrenadantes.....	34
Figura 4.3 Atividade inibitória da lise mediada pelo complemento dos sobrenadantes de formas metacíclicas obtidos através de diferentes tempos de incubação a 37° C.....	35
Figura 4.4 Inibição da lise mediada pelo complemento utilizando benzamidina.....	36
Figura 4.5 Sobrenadantes de formas metacíclicas possuem atividade inibitória de complemento.....	37
Figura 4.6 Estabilidade dos produtos inibitórios a diferentes temperaturas.....	38
Figura 4.7 Atividade inibitória de lise mediada pelo complemento por sobrenadantes de formas metacíclicas filtrado por membrana de .22µm e não filtrado (cepa Y).....	39
Figura 4.8 Inibição da lise mediada pelo complemento utilizando extratos proteicos totais de formas metacíclicas e epimastigotas nas concentrações de 2 x 10 ² a 2 x 10 ⁵ parasitos por ml.....	40
Figura 4.9 Sobrenadantes das cepas Y e Silviox10/6 com atividade inibitória de complemento previamente caracterizados foram utilizados para avaliar a atividade inibitória de quimiotripsina.....	40
Figura 4.10 Ensaio de lise com inibição das vias de ativação do complemento para determinar qual das principais vias é inibida pelos produtos secretados pelas formas metacíclicas de <i>T. cruzi</i> cepa Y.....	41
Figura 4.11 Deposição de fatores do complemento na presença do sobrenadante.....	45
Figura 4.12 Análise de similaridade das sequências de aminoácidos do gene selecionado para clonagem (PTc00.1047053508533.40) juntamente com a sequência de aminoácidos do inibidor Ecotina e do inibidor ISP2 presente em <i>Leishmania</i>	45
Figura 4.13 Amplificação e clonagem do gene em vetor pTEX.....	46

Lista de abreviaturas:

SERPINAS: Inibidores de serino protease.

NHS: Soro normalhumano.

MASP: Manose associada a serino protease.

MBL: Lectina ligadora de manose.

MAC: Complexo de ataque a membrana.

VSG: Glicoproteína variante de superfície.

CRIT: Complement C2 receptor inhibitor trispanning.

CRT: Calreticulina.

RCL: Laço reativo central

PCR: Reação em cadeia da polimerase.

RT-PCR: Transcrição reversa pela reação em cadeia da polimerase.

LIT: Liver infusion tryptose.

EGTA: Ácidoetileno glicoltetra-acético.

NHSMgEGTA: Soro normal humano contendo 7mM de MgCl₂ e 10mM de EGTA

ÍNDICE

I Introdução	1
1.1 A doença de Chagas e o <i>T. cruzi</i>	1
1.2 O ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	2
1.3 O sistema do complemento e a imunidade inata.....	3
1.4 Estratégias de evasão do complemento por patógenos.....	4
1.41 Mecanismos de ativação do complemento por tripanossomatídeos.....	9
1.42 Resistência a lise mediada pelo complemento por tripanossomatídeos.....	10
1.5 Importância das serino proteases nos sistemas em cascata.....	11
1.6 Inibidores de serino proteases.....	12
II- Objetivos	23
2.1 Geral	23
2.2 Específicos	23
III- Materiais e Métodos	24
3.1 Cultura de células.....	24
3.2 Metaciclogênese.....	24
3.3 Purificação das formas metacíclicas de <i>T. cruzi</i>	24
3.4 Sobrenadante das formas metacíclicas.....	24
3.5 Soro normal humano.....	24
3.6 Lise mediada pelo complemento.....	24
3.7 Lise mediada pelo complemento com bloqueio da via das lectinas e via clássica.....	25
3.71 Lise mediada pelo complemento com potencialização da via das lectinas.....	25
3.8 RT-PCR.....	26
3.9 Western blotting.....	26
3.10 Geração de formas transgênicas.....	27
3.11 Análise por citometria de fluxo.....	27
3.12 Análise estatística.....	28
3.13 Tampões e soluções.....	28

IV- Resultados	29
4.1 Ensaio de lise mediada pelo complemento.....	29
4.2 Viabilidade dos parasitos epimastigotas durante a geração do sobrenadante.....	30
4.2.1 Viabilidade dos parasitos metacíclicos durante a geração do sobrenadante.....	32
4.3 Tempos de incubação dos parasitos para gerar o sobrenadante.....	32
4.4 Inibidores de serino protease são capazes de inibir o complemento.....	32
4.5 Sobrenadantes de formas metacíclicas e não de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> possuem atividade inibitória de complemento.....	33
4.6 Análise do sobrenadante das formas tripomastigotas metacíclicas de <i>T. cruzi</i>	35
4.7 Análise do sobrenadante: Tamanho dos produtos inibitórios.....	36
4.8 Inibição da lise mediada pelo complemento através de extratos proteicos totais de formas metacíclicas e epimastigotas.....	36
4.9 Análise do sobrenadante: Determinação da atividade inibitória sobre serino protease.....	38
4.10 Ensaio de lise mediada pelo complemento com inibição das vias da lectina e clássica.....	39
4.11 Caracterização do efeito inibitório dos sobrenadantes por intermédio da deposição de fatores do complemento.....	40
4.12 Caracterização e análise de similaridades das sequencias dos genes que codificam para inibidores de serino proteases ou reguladores do sistema do complemento em <i>Trypanosoma cruzi</i>	43
4.13 Amplificação do gene PTc00.1047053508533.40 por PCR e subclonagem em vetor pTEX e sua posterior transfecção em epimastigotas.....	43
V- Discussão	46
VII- Referências Bibliográficas	48

1. Introdução

1.1 A doença de Chagas e o *T. cruzi*

O *Tripanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas ou tripanossomíase americana é um protozoário hemoflagelado intracelular obrigatório. A doença de Chagas é transmitida ao homem por insetos vetores da família *Reduviidae* (triatomíneo / “barbeiro”). Os insetos tornam-se vetores do parasito após picarem hospedeiros (animais ou humanos) infectados por *T. cruzi*. A infecção ocorre principalmente através da picada do inseto vetor. Porém, a doença pode ser transmitida de forma oral pelo consumo de alimentos contaminados com parasitos, de forma congênita ou por meio de transfusões sanguíneas. (1)

Os principais insetos vetores da doença de Chagas são: *Rhodnius prolixus*, *Panstrongylus megistus* e *Triatoma infestans*.(2)No norte da América do Sul e América Central a infecção ocorre através do *Rhodnius prolixus* da família *Triatominae* enquanto que no Brasil, Argentina, Bolívia, Chile, Paraguai e Uruguai a doença é transmitida principalmente pelo *Triatoma infestans*. (3)

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a doença de Chagas afeta entre 16 a 18 milhões de pessoas e mais de 100 milhões se encontram em áreas suscetíveis a infecção. A doença pode ser dividida em duas fases: A fase aguda pode ser sintomática ou assintomática, de acordo com estado imunológico do hospedeiro. A fase aguda sintomática é caracterizada pela presença de sintomas clínicos como febre, dores musculares, hepato-esplenomegalia, linfadenopatia, derrame pericárdico, reação inflamatória no local da picada do inseto (chagoma) e inchaço ganglionar podendo durar cerca de 1 a 2 meses. Durante essa fase o *T. cruzi* é capaz de infectar vários tecidos do hospedeiro, incluindo músculo esquelético, tecidos linfóides, tecido nervoso e glândulas. A fase aguda é caracterizada pela alta parasitemia no sangue, devido ao alto grau de multiplicação dos parasitos no interior das células infectadas, o que possibilita a detecção dos parasitos pelo método da gota espessa ou esfregaço sanguíneo. Após a fase aguda, os sobreviventes passam por um longo período assintomático que pode variar entre 10 e 30 anos ou durante toda sua vida. Essa fase é denominada indeterminada ou latente. Certo número de Chagásicos após permanecerem assintomáticos por vários anos, com o decorrer do tempo passam a apresentar sintomatologia relacionada com o sistema cardiocirculatório, digestivo ou ambos. Nessa fase pode ser observada uma mudança na fisiologia anatômica do miocárdio e do tubo digestivo, esôfago e cólon,

principalmente. Observa-se reativação intensa do processo inflamatório, com dano tecidual nesses órgãos, nem sempre estando relacionado com a presença do parasito que é extremamente difícil de ser detectado na fase crônica.

A terapêutica contra a doença de Chagas continua parcialmente ineficaz, apesar dos grandes esforços que vem sendo desenvolvidos por vários laboratórios e pesquisadores. A quimioterapia contra a doença de Chagas é feita através dos fármacos nifurtimox e benzonidazol, sendo somente eficazes na fase aguda da doença. Ademais, o tratamento provoca efeitos colaterais indesejáveis como reações alérgicas, vômitos e náuseas e não existe vacina contra a doença de Chagas.

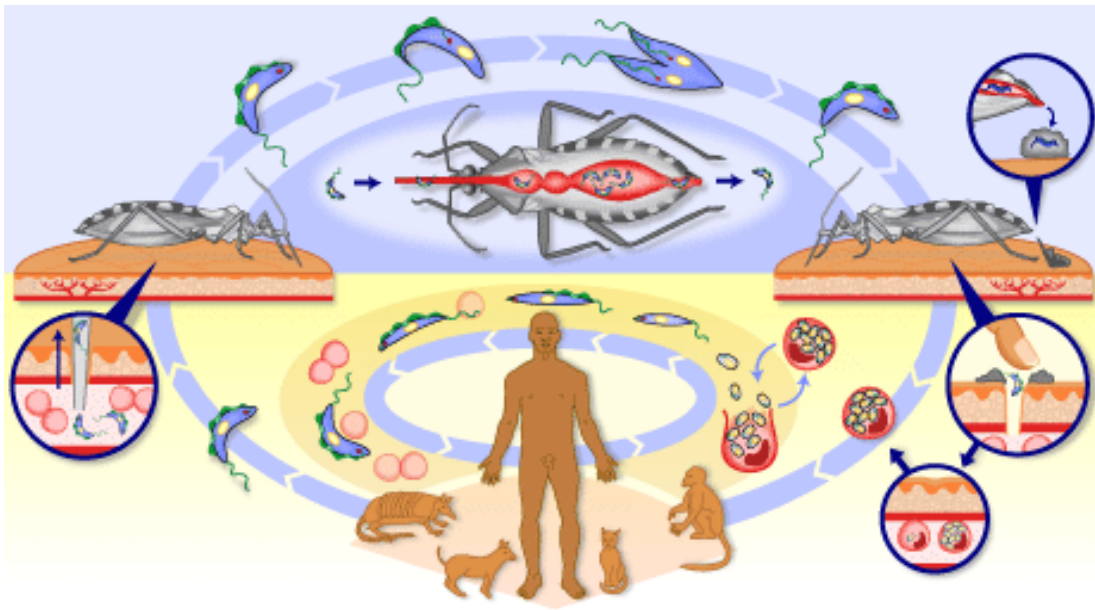
1.2 O ciclo de vida do *T. cruzi*.

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado que pertence ao sub-reino Protozoa da ordem Kinetoplastidae e família Trypanosomatidae. (4)

O ciclo biológico do *T. cruzi* é do tipo heteroxênico, passando por uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado e extracelular no inseto vetor.

No intestino médio do inseto vetor, encontramos os parasitos na forma epimastigota que é uma forma replicativa e não infectiva. Essa forma se diferencia para forma infectiva e não replicativa denominada tripomastigota metacíclico, que migra para a porção distal do intestino do inseto. O inseto deposita no local da picada as fezes juntamente com os tripomastigotas metacíclicos durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado (**Fig 1.2**).

Os tripomastigotas metacíclicos precisam evadir a resposta imune inata do hospedeiro para poder infectar as células e produzir a infecção.



(Retirado de: http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/life_cycle_trypanosoma/en/index.html)

Fig 1.2: Ciclo de vida do *T. cruzi*.

De acordo com a figura 1.2 os tripomastigotas metacíclicos são liberados nas fezes pelo inseto vetor durante a picada, os parasitos então penetram na corrente sanguínea e infectam células hospedeiras onde se diferenciam em amastigotas. As amastigotas se multiplicam criando pseudocistos que se rompem, levando à reação inflamatória e induzindo a fibrose. Através da ruptura destes pseudocistos, novas formas tripomastigotas sanguíneas são liberadas e passam a circular pelo organismo, invadindo novas células. Os tripomastigotas sanguíneos podem infectar novas células ou serem ingeridos pelo inseto vetor durante a hematofagia. No intestino do inseto os tripomastigotas sanguíneos se diferenciam na forma replicativa extracelular denominada epimastigotas, as formas epimastigotas se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas que vão reiniciar o ciclo.

1.3 O sistema do complemento e a imunidade inata

Talvez um dos pontos mais importantes, enquanto se estuda a evolução clínica da doença de Chagas, é descobrir o que determina que pacientes infectados por *T. cruzi* progridam em distintas formas clínicas. Vários fatores podem contribuir para determinar o resultado final da doença, como cepa parasitária e tropismo pelo tecido, carga parasitária, tempo de infecção, exposição para reinfecção, natureza da resposta imune montada pelo hospedeiro e o “background” genético do hospedeiro, todos funcionando como fatores muito importantes.

Durante o primeiro contato parasito célula hospedeira, os parasitos enfrentam uma série de barreiras físicas e biológicas que correspondem à imunidade inata. Essas barreiras constituem uma proteção dificultando a entrada de patógenos invasores. (5) Em termos gerais, a imunidade inata é constituída de vários mecanismos passivos e ativos que compõe as defesas do hospedeiro contra infecções. Dentre esses mecanismos estão as barreiras físicas como pele, superfícies mucosas dos sistemas digestivo e respiratório, como também o baixo pH estomacal. Das barreiras biológicas, as mais relevantes seriam: o sistema complemento, imunidade local e células Natural Killer(5).

O sistema de complemento é um dos principais mecanismos efetores da imunidade humoral e também é um importante mecanismo efector da imunidade inata que tem como principal função eliminar os microrganismos patogênicos(5). Inicialmente, pensava-se que o complemento desempenhava um papel importante na imunidade inata, onde uma resposta robusta e rápida é armada contra a invasão de organismos patogênicos. No entanto, está se tornando cada vez mais evidente que o complemento também desempenha um papel importante em vários ramos do sistema imunológico, incluindo a coagulação e sistemas fibrinolíticos, vias de formação de cininas, produção de citocinas e na imunidade adaptativa, envolvendo a maturação de células B e T, que ajudam na eliminação de agentes patogênicos e na manutenção da memória imunológica impedindo a reinfecção (6-8). Não somente o complemento está envolvido na imunidade inata e adaptativa, mas também está presente na regeneração de tecidos, crescimento de tumores e estados patológicos humanos como a síndrome hemolítica urêmica atípica e degeneração macular associada à idade (9, 10). Ativação do complemento resulta na opsonização dos patógenos e sua remoção por fagócitos como também em lise celular. Evitar o ataque do sistema imunológico é um fator determinante para a sobrevivência dos patógenos dentro de seus hospedeiros. Durante a coexistência e evolução de seres humanos em contato com microrganismos patogênicos, os microrganismos adquiriram uma grande variedade de mecanismos atenuantes para poder escapar dos ataques do sistema imune (11). Devido ao sistema do complemento ser a primeira linha de defesa contra patógenos invasores, o mesmo constitui o principal alvo dos mecanismos de evasão dos microrganismos patogênicos.

O sistema do complemento é uma rede sofisticada composta por aproximadamente 30 componentes, alguns dos quais são proteínas solúveis circulantes no plasma sanguíneo e outras ligadas à superfície celular (12, 13). O complemento é composto por nove serino proteases, sendo que oito delas estão envolvidas na iniciação

e propagação da cascata (C1r, C1s, MASP-1, MASP-2, MASP-3, fator D, C2, fator B) e o fator I é uma protease reguladora da cascata (14). Todas as proteases do complemento, com exceção do fator D, possuem diversos domínios não catalíticos. Esses domínios não catalíticos são responsáveis pela formação das interações proteína-proteína com outros componentes do complemento contribuindo assim para a formação da alta especificidade que as proteases do complemento possuem para os seus substratos. Ativação do complemento leva a uma cascata de reações enzimáticas sequenciais resultando na formação das potentes anafilatoxinas C3a e C5a que provocam uma grande variedade de respostas fisiológicas que variam de quimiotaxia a apoptose. O complemento combate microrganismos infecciosos através da ligação de moléculas de reconhecimento e subsequente ativação conduzindo a uma variedade de eventos destinada a eliminar o agente infeccioso. A ativação do complemento é conhecida por ocorrer através de três principais vias: Via clássica, a qual é ativada por certos isotipos de anticorpos ligados a antígenos; via alternativa, a qual é ativada na superfície das células patogênicas na ausência de anticorpos; via das lectinas, que é ativada por uma lectina presente no plasma que se liga a resíduos de manose nos patógenos. As três vias envolvem proteínas que existem principalmente como zimógenos inativos que são então sequencialmente clivados e ativados sequencialmente (**Fig 1.3**).

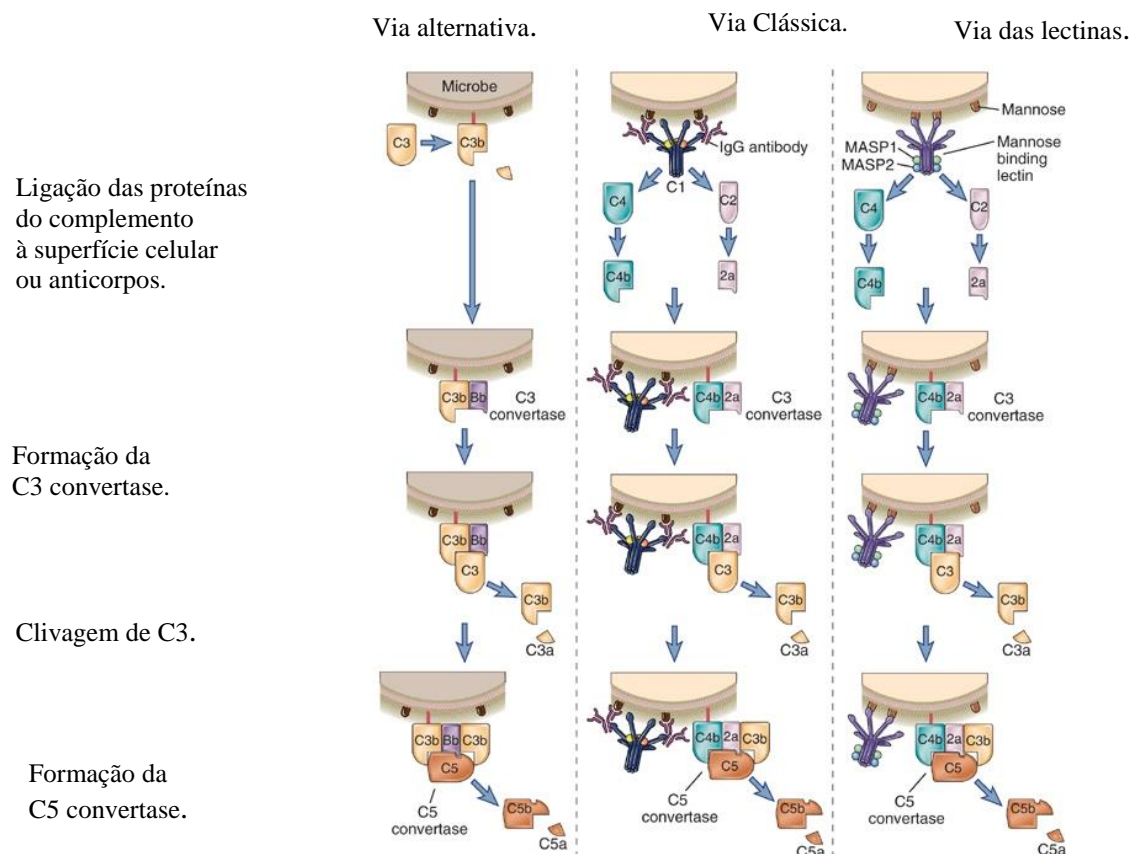


Fig 1.3: As três diferentes vias de ativação do complemento: via alternativa, clássica e via das lectinas. Reproduzido de Abbas et al imunologia celular e molecular 7ed 2012.

Embora as vias de ativação do complemento difiram de como elas são iniciadas, todas elas resultam na geração de complexos enzimáticos que são capazes de clivar C3, a proteína do complemento mais abundante no sangue. O evento central da ativação do complemento é a clivagem da proteína C3 para gerar produtos biologicamente ativos C3a e C3b e da subseqüente ligação covalente do C3b a superfície das células microbianas ou a complexos de antígeno-anticorpo.

Via alternativa.

A via alternativa é desencadeada por carboidratos, lipídios e proteínas encontrados em superfícies estranhas e não próprias. (9) C3 é constantemente hidrolisado para formar C3b que se liga a alvos tais como bactérias. Fator B então se liga ao C3b onde será clivado por uma serino protease encontrada no plasma chamada de fator D para formar a C3 convertase da via alternativa C3bBb.

Via das lectinas.

A via das lectinas ocorre na ausência de anticorpos através do reconhecimento de resíduos de carboidratos como manose e N-acetilglucosaminas pela lectina ligadora de manose (MBL) ou L-ficolinas e H-ficolinas nas superfícies de agentes patogênicos, incluindo leveduras, bactérias, parasitas e vírus. Tanto a MBL como as ficolinas circulam no plasma na forma livre e como complexos associados a serino protease associada à MBL (MASPs). (15, 16) A ligação da MASP2 com patógenos induz uma modificação conformacional resultando em sua auto ativação, MASP2 cliva então C4 e C2 para formar C4bC2a que é a C3 convertase da via das lectinas e clássica (17).

Via clássica.

A via clássica é iniciada quando as imunoglobulinas, IgG ou IgM se ligam a patógenos ou antígenos estranhos e não próprios. Após a formação das ligações antígeno-anticorpo, o complexo enzimático C1 que é composto pelas moléculas C1q, C1r e C1s se liga as porções Fc das IgG ou IgM. C1s então cliva C4 e C2 para formar a C3 convertase da via clássica C4bC2a.(12, 18)

As C3 convertases C4bC2a da via clássica e via das lectinas e C3bBb da via alternativa promovem a clivagem de C3 em C3a e C3b e possuem uma meia vida de aproximadamente 60 segundos. C3b atua como uma opsonina promovendo a fagocitose e ajuda a propagar a ativação do complemento. Além disso, C3b se liga as C3 convertases para formar as C5 convertases. As C5 convertases clivam C5 para formar C5a e C5b. C5a é uma proteína quimiotática enquanto C5b permanece ligado a membrana e inicia a montagem do complexo de ataque a membrana (MAC) que é

composto pelas proteínas C5b, C6, C7, C8 e poli C9. O poro formado pelo MAC possui aproximadamente 100 Å de diâmetro, e forma canais que permitem a passagem de água e íons livremente. A entrada de água resulta em desequilíbrio osmótico e ruptura das células em cuja superfície o MAC esta formado (19). **Fig 1.31**

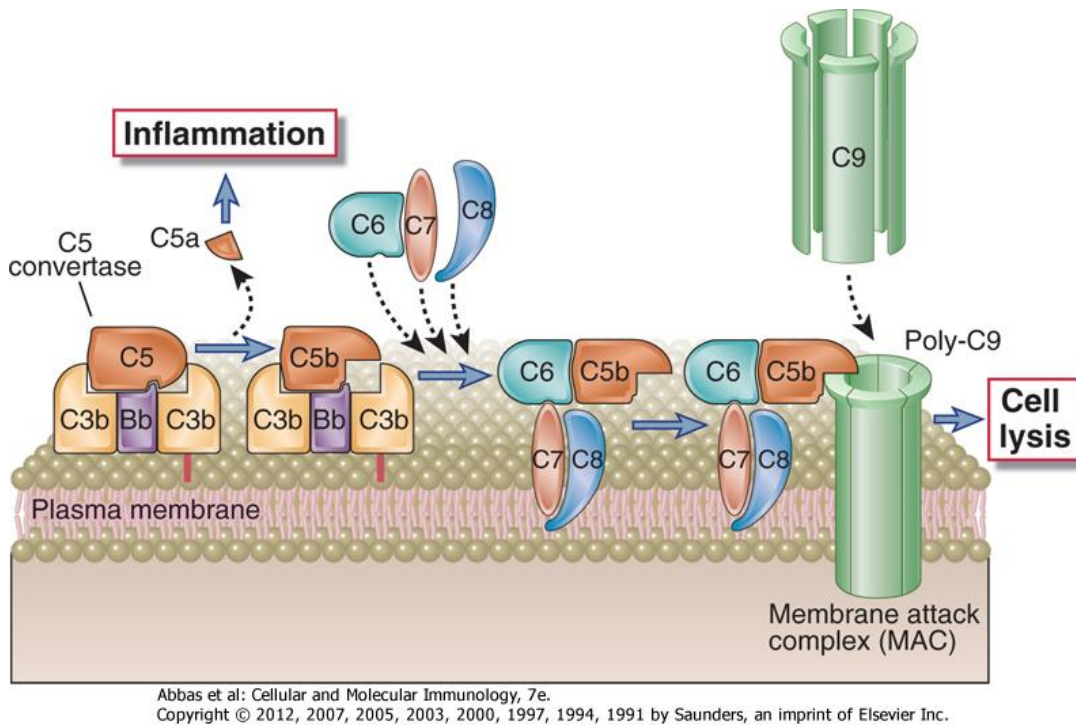


Fig 1.31: Etapas finais da ativação do complemento. C5 convertase cliva C5 e gera C5b que fica ligado a convertase, C6 e C7 se ligam sequencialmente e o complexo C5bC6C7 se insere na bi camada lipídica, seguido pela inserção de C8. Aproximadamente 15 moléculas de C9 se polimerizam anexo ao complexo para formar o MAC, que cria poros na membrana e induz a lise celular. C5a que é liberado durante a proteólise de C5 é um estimulador inflamatório.

1.4 Estratégias de evasão do complemento por patógenos.

A habilidade de escapar do elaborado e complexo sistema imunológico humano é um fator determinante na virulência dos patógenos. Na verdade as estratégias de evasão imune são muitas vezes focadas no sistema do complemento que compõe a peça central da imunidade inata e é considerado a primeira linha de defesa contra microrganismos patogênicos. Muitos patógenos parecem ter desenvolvido rotas paralelas para fugir do complemento, e vários mecanismos de evasão são compartilhados não somente entre os membros do mesmo gênero, mas também entre diversos organismos, tais como bactérias, leveduras, vírus, fungos e parasitas (11). O nosso conhecimento de como esses mecanismos de evasão funcionam a um nível

molecular têm aumentado notavelmente nos últimos anos. Identificação de proteínas dos patógenos que têm como alvo proteínas do complemento humano tem sido uma etapa crucial para elucidar tais mecanismos e a lista de proteínas patogênicas e proteínas alvo do complemento têm estado em constante crescimento. Apesar do grande número de proteínas dos patógenos capazes de reconhecer componentes do complemento, seus mecanismos de ação podem ser condensados a algumas estratégias bem sucedidas: mimetizar ou recrutar reguladores do complemento, inibir ou modular por meio da interação direta com proteínas do complemento e inativar por meio de degradação enzimática. **Fig 1.4**

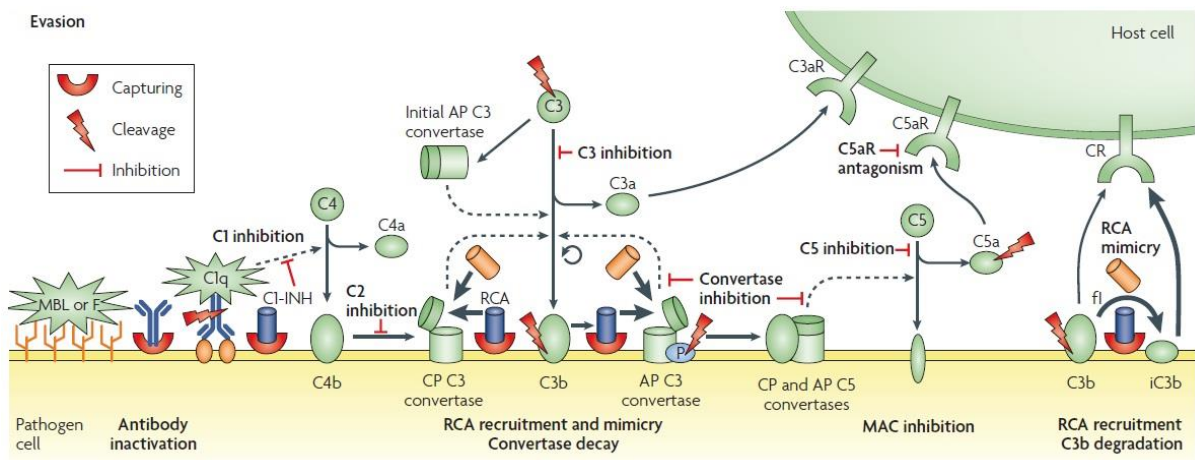


Fig 1.4: Maneiras de evadir o complemento. Supressão da ativação da via clássica pode ser conseguida por meio da captura do inibidor C1e também por inativação dos anticorpos através da captura de suas regiões Fc. Recrutamento e deposição de reguladores do complemento na superfície dos patógenos. Inibição direta de C3 como também da C3 e C5 convertases além dos receptores para C5 e C5a. Finalmente, um conjunto de diferentes proteases microbianas pode degradar muitos dos componentes cruciais do sistema do complemento.

Retirado de: Lambris JD 2008. Complement evasion by human pathogens(11).

Além de tais estratégias, muitos microrganismos também possuem medidas evasivas passivas. Um exemplo notável é a parede celular de bactérias gram-positivas que inibe a lise por não permitir a formação do complexo de ataque a membrana MAC (20).

Uma das áreas de pesquisa que têm recebido atenção considerável é a capacidade que os patógenos possuem de se ligar a inibidores do complemento para poder escapar da lise direta através da formação de MAC ou pela opsonização e consequente fagocitose. De fato, de todos os mecanismos de evasão do complemento que são utilizados por vários agentes patogênicos, a aquisição de inibidores do complemento circulantes no plasma é, de longe, a estratégia mais amplamente

disseminada para evitar o ataque complemento (21). Sendo comum em bactérias, fungos, mas também tem sido descrito para vírus e parasitos (22, 23).

A estratégia de aquisição tem vantagens importantes: os reguladores naturais do complemento são evolutivamente ajustados para cumprir as suas funções, são produzidos pelo hospedeiro, e estão disponíveis em concentrações relativamente elevadas, e eles compartilham características estruturais comuns, permitindo assim que uma mesma proteína de um patógeno recrute diferentes fatores reguladores do complemento.

A deposição eficiente de fatores do complemento na superfície da maioria dos patógenos requer a ativação da via clássica e da lectinas. A fim de inibir a via clássica e das lectinas, muitos micróbios têm desenvolvido a capacidade de se ligar a proteína do complemento C4bP, que é um inibidor chave de fase fluida destas vias. Proteção contra a via alternativa é proporcionada devido à captura do principal inibidor desta via, o fator H, e suas proteínas relacionadas enquanto MAC pode ser inibido pela vitronectina. O número de agentes patogênicos que são capazes de se ligar ou produzir inibidores do complemento está em constante crescimento e pode se especular que a maioria dos patógenos que sobrevivem em contato com superfícies mucosas e no sangue são capazes de se proteger por este mecanismo (24, 25). Outra estratégia de evasão do complemento por patógenos que têm se mostrado muito eficaz é a de capturar e inativar C3, que é a molécula central de todas as três vias de ativação do complemento.

A degradação dos componentes do complemento em fragmentos menores e não funcionais é a principal tarefa de proteases ativas do complemento.

Os patógenos também inativam o complemento por intermédio da ação de proteases que degradam componentes do complemento cruciais como C3 e C5. Dessa forma, alguns patógenos como *S. pyogenes* produz uma cisteino protease denominada SepB que cliva C3 e proteína properidina que estabiliza a C3 convertase da via alternativa. *S. pyogenes* também produz a peptidase C5a do complemento que cliva C5a e, portanto, impede a sua capacidade de atrair e ativar neutrófilos (26).

1.41 Mecanismos de ativação do complemento por tripanossomatídeos.

O sistema do complemento é um dos principais mecanismos da imunidade inata dos hospedeiros que reagem contra patógenos circulantes no sangue. Compreender como parasitos protozoários ativam o complemento é crucial para desvendar os seus mecanismos de evasão imune. Os primeiros trabalhos de ativação das vias do complemento em *T. cruzi* mostraram que a forma epimastigota é lisada pela via alternativa do complemento, sendo a ativação da via clássica dependente de anticorpos (27-29). Os primeiros estudos sobre opsonização de *Leishmania* na presença de soro normal humano (NHS) mostraram que anticorpos IgM anti *Leishmania* eram responsáveis pela aglutinação dos promastigotas, ativação da via clássica e morte dos parasitos (30, 31). O entendimento do mecanismo de opsonização de promastigotas, foi influenciado pelo conceito de que as espécies de *Leishmania* na forma promastigota ativam o complemento através da via alternativa, sendo desnecessária a presença de anticorpos (32). No entanto observou-se que promastigotas de 4 espécies de *Leishmania* (*L. Infantum*, *L. donovani*, *L. amazonensis* *L. major*.) e tripanossomatídeos das espécies *Critidia fasciculata* e *Phytomonas characias*, Ativam rapidamente a via das lectinas e clássica e lentamente a via alternativa nas condições próximas as fisiológicas (NHS 25%) (33). Diferente de *T. cruzi* e *Leishmania spp.*, o parasito *T. brucei* não invade as células hospedeiras e permanece na corrente sanguínea do hospedeiro e através de um mecanismo de variação antigênica denominado VSG (*Variant Surface Glycoprotein*) consegue evitar o reconhecimento dos sistema imune do hospedeiro (34-36). Experimentos realizados para detectar a deposição de C3 e fator B na superfície do *T. brucei* mostraram que ele ativa a via alternativa do complemento. Entretanto os componentes C5b, C6, C7, C8 e C9 não foram detectados na superfície do parasito propondo que a cascata do complemento não continua além da deposição de C3 na superfície do parasito (37).

1.42 Resistência a lise mediada pelo complemento por tripanossomatídeos.

O parasitismo intracelular é uma das formas mais evoluídas de interação entre parasitos e célula hospedeira. Desse modo os parasitos desenvolveram métodos de escape do sistema imune dos hospedeiros para infectar as células e proceder com seu ciclo de vida.

Várias moléculas foram descritas como sendo envolvidas na inibição da cascata do complemento em bactérias, fungos e protozoários (11).

Existem pelo menos três mecanismos distintos de evasão do complemento pelos tripanossomatídeos sendo o mais comum deles a expressão de receptores do complemento que inibem a formação da C3 convertase. As formas tripomastigotas metacíclicas apresentam em sua superfície o receptor CRIT (Complement C2 receptor inhibitor trispanning) que interage com o componente C2 não permitindo a formação da C3 convertase (38). O receptor CRIT é altamente conservado em *Schistosoma sp.* Outra molécula envolvida na inibição do complemento por *T. cruzi* é a calreticulina (CRT) (39). A calreticulina está localizada na superfície dos tripomastigotas (40). Dessa forma ela inibe a via clássica por se ligar a caudas de colágeno presente na molécula de C1q e interfere na via das lectinas, pois impede o reconhecimento de manose pela MBL (41). A proteína GP160 é encontrada nas formas tripomastigotas de *T. cruzi* e é conhecida como uma proteína reguladora do complemento. A GP160 dissocia as C3 convertases da via clássica e da via alternativa por se ligar a C3b e C4b (42). Outra estratégia empregada pelo *T. cruzi* para evasão do complemento se baseia na estabilização e inibição das C3 convertases por intermédio de microvesículas derivadas da membrana plasmática de células do hospedeiro. Essas microvesículas se ligam a C4bC2a e impedem sua atividade na superfície do parasito (43). A via das lectinas tem um papel importante nos primeiros minutos de contato do *T. cruzi* com soro normal humano, ocorrendo uma rápida deposição de MBL e ficolinas na superfície do parasito. Quando se utiliza soro depletado de MBL e ficolinas para ensaio de lise é observada uma redução de aproximadamente 70% dos fatores C3b e C4b na superfície dos parasitos, mostrando que ambas as lectinas são importantes para a rápida ativação do complemento (44). De acordo com estas observações, MASP2 e C2 são requeridos para ativação da via das lectinas e lise do *T. cruzi* em soro não imune. Em contrapartida a depleção de C1q (que é importante para ativação da via clássica) de soro não imune não teve qualquer efeito significativo na ativação do complemento e lise do parasito, (44, 45) demonstrando que na ausência de anticorpos, a via clássica não desempenha papel importante na ativação do complemento pelos parasitos.

Devido às cascatas enzimáticas do complemento serem ativadas por intermédio da atividade proteolítica de serino proteases, tem-se a hipótese de que as formas metacíclicas do *T. cruzi* poderiam liberar SERPINAS nas fezes e na urina do inseto vetor, que após a picada estas SERPINAS liberadas juntamente com os parasitos, teriam

um papel fundamental no primeiro contato com o parasito-hospedeiro. No presente trabalho temos caracterizado sobrenadantes, gerados através da incubação das formas metacíclicas infectivas em RPMI sem soro a 37°C, na sua capacidade de inibir parcialmente a lise mediada pelo complemento de formas epimastigotas de *T. cruzi*.

Uma busca no genoma do *T. cruzi* revelou putativos genes com motivos de SERPINAS e sugere que possam ser moléculas que estejam sendo liberadas pelos parasitos.

1.5 Importância das serino proteases nos sistemas em cascata.

Proteases, conhecidas também como peptidases e proteinases, são enzimas capazes de degradar proteínas ou substratos peptídicos catalisando a hidrólise da ligação peptídica. As proteases são encontradas em todas as formas de vida, desde mamíferos a bactérias. Geralmente entre 2 a 4% dos genes em um genoma codificam para proteases (46). Embora algumas proteases possuam uma ampla capacidade de reconhecer diferentes substratos e estão envolvidas na degradação de proteínas desnecessárias ou proteínas encontradas nos alimentos, a exemplo a tripsina e o proteasoma, muitas proteases participam de diversos processos biológicos através da clivagem específica de certas proteínas (47).

As proteases podem ser divididas em seis distintas classes de acordo com seu mecanismo de ação: metaloproteases, serina, cisteína, aspártica, treonina, e glutâmica, e seus nomes derivam do resíduo do amino ácido encontrado no sítio catalítico (48). A classe das serino proteases corresponde a mais de um terço de todas as proteases conhecidas (49). O mecanismo de catálise das serino proteases é baseado na tríade catalítica composta por resíduos de serina, histidina e aspartato (50).

A força motriz por trás das cascatas de sinalização é a ativação sequencial de zimogênios de serino proteases. Quando em estado de repouso, as serino proteases das cascatas enzimáticas são encontradas em uma forma quase inativa conhecida como pró-enzimas ou zimogênios que se tornam ativas através da clivagem proteolítica no resíduo N-terminal. O primeiro evento de ativação enzimática usualmente é casado por uma auto ativação, onde a primeira pró-enzima da cascata ativa a si própria através da auto clivagem. Então a protease iniciadora ativada cliva subsequentemente os membros da cascata tornando a cascata enzimática ativa. A partir desse ponto cada zimogênio sucessivo é proteoliticamente ativado pelo seu membro anterior da cascata. Cascatas

proteolíticas permitem uma amplificação de sinal tremenda, uma vez que cada molécula de protease ativada em uma etapa da cascata pode ativar muitos zimogênios subsequentes na etapa seguinte, ao final da reação em cascata uma enorme amplificação do sinal ocorre. Consequentemente, a ativação de cascatas proteolíticas deve ser muito bem regulada em espaço e tempo, através da inibição das proteases iniciadoras que é muito eficiente em regular toda a cascata enzimática, evitando assim dano tecidual (51).

1.6 Inibidores de serino proteases.

Os inibidores de serino proteases constituem a maior superfamília de inibidores de proteases envolvidos em muitos processos biológicos críticos como coagulação do sangue, fibrinólise, morte celular programada, desenvolvimento e inflamação (52). A sigla SERPINA (**serine protease inhibitors**) foi originalmente criada porque muitas SERPINAS agem inibindo serino proteases do tipo quimotripsina. As SERPINAS são proteínas estruturalmente diversas e heterogêneas, mais de 400 tipos diferentes de SERPINAS têm sido identificados em organismos incluindo vírus, plantas, animais, fungos e procariontos (53, 54). Se presume que as SERPINAS tenham evoluído por meio da duplicação de genes e acontecimentos diversos, dando origem a um grande número de genes que codificam para serpinas dentro de um organismo, cada um codificando para uma proteína com uma região única reativa e determinada função fisiológica (55). É de certa forma paradoxal que os inibidores de protease endógenos sejam eles próprios proteínas (56). Existem dois grupos principais de inibidores de serino proteases. (**Fig 1.6a e b**) (57). Os inibidores do primeiro grupo, passam por grandes mudanças conformacionais durante o processo inibitório e são formados complexos irreversíveis com as proteases alvos (58). As duas classes deste grupo de inibidor são os inibidores de serino protease e as macroglobulinas, (58, 59) sendo estes inibidores de protease de grande tamanho e abundantes no sangue. O segundo grupo importante de inibidores de serino protease é composto por pequenas proteínas que formam complexos reversíveis com as proteases alvos (**Fig 1.6c**) (60). Embora, neste caso, nenhuma ligação covalente se forme entre as duas proteínas, a afinidade de ligação inibidor-protease é tão elevada que a interação é praticamente irreversível(61). Há duas classes importantes de inibidores de ligação forte: os inibidores canônicos e não canônicos. Ambos bloqueiam o sítio ativo da enzima, embora de maneira diferente (61). Os inibidores canônicos são usualmente proteínas pequenas menores que 100 aminoácidos expondo um domínio inibitório que mostra sempre praticamente a mesma conformação (62). O domínio

inibitório imita um substrato peptídico que se encaixa perfeitamente no sítio ativo da protease. Os inibidores não canônicos não imitam o substrato. Em vez de um domínio inibitório, o seguimento N-terminal do inibidor se liga ao sítio ativo da protease formando uma pequena folha beta. Estes inibidores não canônicos altamente especializados são muito menos abundantes que outros tipos de inibidores de proteases uma vez que podem ser encontrados somente em organismos hematófagos (sanguessugas e insetos) inibindo duas enzimas do sangue que são chave da coagulação, o fator Xa e trombina.

As enzimas proteolíticas do corpo humano são controladas principalmente por SERPINAS e inibidores canônicos. Curiosamente, as cascatas de sinalização no plasma sanguíneo são controladas principalmente por SERPINAS, e em menor escala, pelas macroglobulinas. Uma vez que as SERPINAS são os inibidores de protease mais importantes presentes no soro, não é surpreendente que a maioria das SERPINAS iniba serino proteases tipo tripsina. SERPINAS nativas intactas adotam uma conformação “estressada” que é um pré-requisito para sua atividade inibitória (63, 64). A estrutura conservada das SERPINAS possui um tamanho de 350 a 500 aminoácidos com pesos moleculares correspondentes a 40-60 kDa e são constituídas de três folhas betas que contêm de 7 a 9 alfa hélices (65). O laço reativo central (RCL) é composto por aproximadamente 17 aminoácidos e está localizado entre as folhas beta A e C e apresenta a ligação que é clivada durante a atividade enzimática. A especificidade das SERPINAS é determinada primariamente pela sequência de aminoácidos do laço reativo central (RCL). Já que o RCL é bastante flexível, não é surpreendente que a maioria das SERPINAS iniba diversas proteases. O exemplo do inibidor C1, que além de inibir a via clássica e a via das lectinas do sistema complemento, também regula a atividade de proteases do sistema de coagulação. A antitrombina que inibe trombina tem demonstrado bloquear de forma eficiente a atividade da protease do complemento MASP-1. (66) A principal força envolvida no processo inibitório é a transição do estado estressado para o relaxado que fornece energia para a rápida distorção da protease. O complexo protease-SERPINA será então removido da circulação muito antes que algum decaimento significativo possa ocorrer.

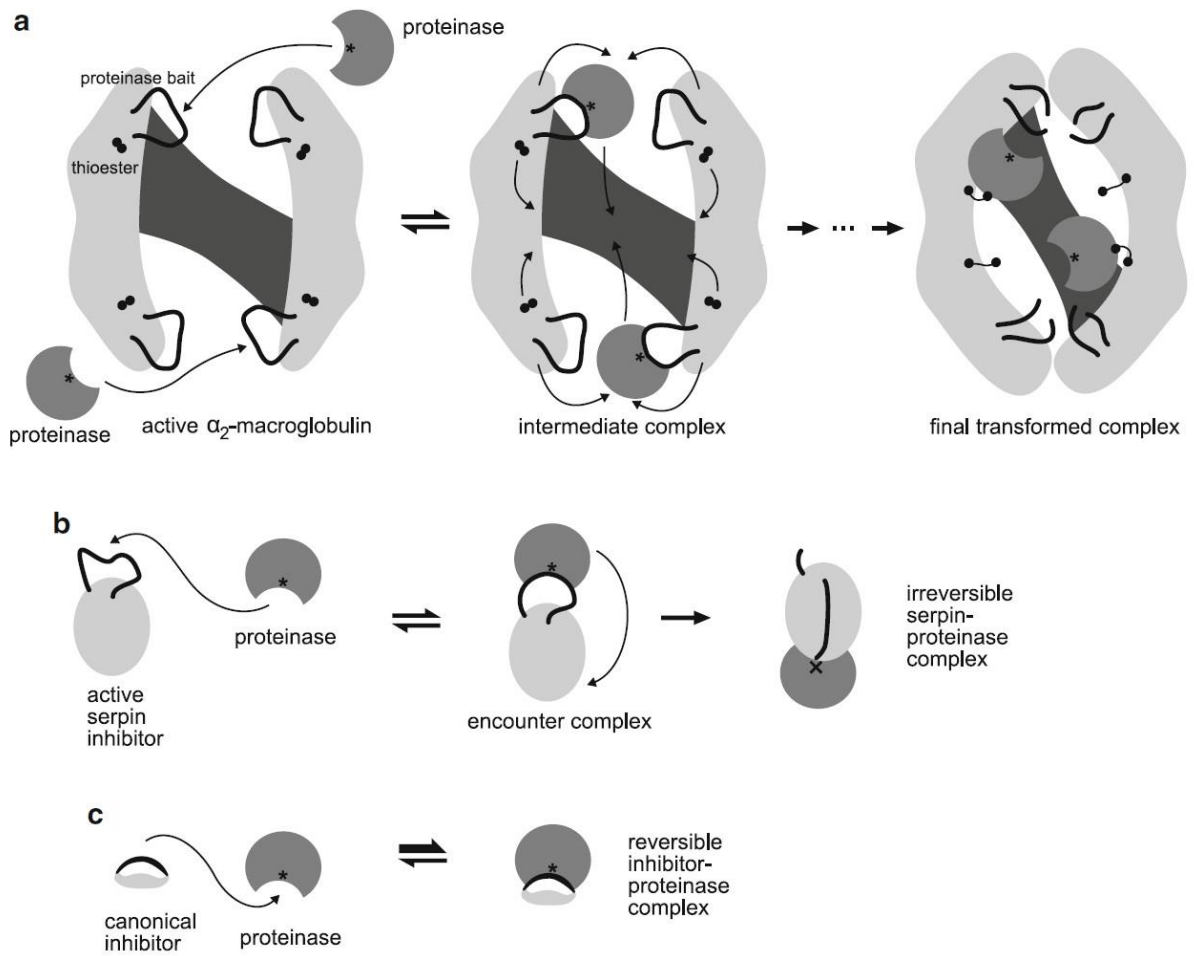


Fig1.6: Principais tipos de inibidores de serino proteases. Macroglobulinas **a** e SERPINAS **b** são grandes proteínas que passam por extensas conformações durante o processo de inibição, formando complexos irreversíveis com as proteases alvo. Os inibidores canônicas **c** são pequenas proteínas que formam complexos reversíveis ao se ligam ao sitio ativo da protease alvo. Reproduzido de (67).

2. Objetivos.

2.1 Geral:

Análise da capacidade de inibição do complemento pelos produtos encontrados nos sobrenadantes de formas metacíclicas do *T. cruzi*.

2.2 Específicos:

- Determinação da atividade inibitória de lise mediada pelo complemento por sobrenadantes de formas metacíclicas de *T. cruzi*.
- Comparar a capacidade inibitória dos sobrenadantes de formas metacíclicas e epimastigotas de *T. cruzi*.
- Determinar a estabilidade e tamanho dos produtos inibitórios presentes no sobrenadante das formas metacíclicas de *T. cruzi*.
- Verificar qual é a principal via de inibição do complemento pelos produtos secretados pelos tripomastigotas metacíclicos do *T. cruzi*.
- Analisar por citometria de fluxo se o sobrenadante de formas metacíclicas do *T. cruzi* altera a deposição de fatores do complemento na superfície de epimastigotas.
- Buscar no banco genômico de Tripanossomatídeos genes contendo motivos de serpinas.
- Análise por PCR da presença dos putativos genes de SERPINAS nas cepas do *T. cruzi*.

Materiais e métodos.

3.1 Cultura de células.

Parasitas: Foram utilizadas formas epimastigotas de *T. cruzi* cepa Y e Silvio X10/6 obtida do banco de Tripanossomatídeos do IOC, sendo cultivadas em meio de infusão de fígado com triptose LIT suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidos a 28°C.(68)

3.2 Diferenciação de epimastigota para tripomastigota, metaciclogênese.

Para a metaciclogênese *in vitro*, epimastigotas de 5 dias de cultura (5 a 6×10^7 cels/ml) foram recolhidos por centrifugação a 30000 RPM por 10 minutos a 10°C. 1×10^8 epimastigotas foram ressuspendidos em 5 ml de meio LIT juntamente com 35 ml de meio graces (meio de inseto pH 6.0 da marca SIGMA) em garrafas médias (75cm²), incubados a 28°C por 10 dias.

3.3 Purificação das formas metacíclicas de *T. cruzi*.

Os tripomastigotas metacíclicos foram obtidos da cultura por purificação por coluna de troca iônica DEAE celulose marca SIGMA. 50g de DEAE celulose foram lavados várias vezes com água destilada para remover os pós finos. Após a lavagem a celulose foi novamente lavada seis vezes com tampão PSG pH 8.0 para atingir o equilíbrio. Posteriormente à lavagem, foram montadas as colunas contendo 10 ml de resina. Os parasitos foram colhidos por centrifugação a 3000 RPM a 4°C e ressuspendidos em 5ml de tampão PSG pH 8.0 a 4°C e foram inoculados nas colunas contendo DEAE celulose previamente equilibradas com tampão PSG pH 8.0 (69). As formas tripomastigostas metacíclicas passam pela coluna enquanto que as formas epimastigotas ficam retidas. As formas metacíclicas foram contabilizadas através de contagem em microscópio ótico.

3.4 Sobrenadante das formas metacíclicas.

Parasitas tripomastigotas metacíclicos foram purificados como descrito em (69). Os parasitos foram incubados em meio RPMI sem soro na concentração de 1×10^8 e 1×10^7 por ml a 37° e 28° C por 1h e centrifugados a 3000 RPM por 10 min. Os sobrenadantes foram removidos dos tubos de centrifuga, concentrados utilizando membranas de diálise com poros de 0.10µm da marca PIERCE, e dialisados por 8h a 4°

C utilizando PBS ou meio RPMI pH 7,4. Os sobrenadantes foram normalizados em um volume de 2ml.

3.5 Soro normal humano

Soro normal humano foi obtido por meio de doação de voluntários saudáveis. Sangue total dos voluntários recém colhido foi centrifugado a 5000 RPM por 15 minutos a 4°C na ausência de qualquer tipo de anticoagulante ou quelante de íons. O soro foi distribuído em eppendorfs estéreis. As alíquotas de soro foram guardadas a -80° C até a utilização (Estocagem a -20° C não preserva o soro).

3.6 Lise mediada pelo complemento.

As concentrações de soro normal humano (NHS) foram escolhidas experimentalmente antes da realização de qualquer experimento, baseado na diluição limite (mínima diluição de soro normal humano capaz de lizar os parasitos) de forma de utilizar uma diluição que lise 50% dos parasitos nos tempos preestabelecidos. Formas epimastigotas de *T. cruzi* em crescimento logarítmico foram lavadas em PBS e ressuspensas em RPMI sem soro na concentração de $5,0 \times 10^6$ por ml. Antes da incubação com os parasitos, o soro normal humano foi diluído em RPMI a uma concentração de 12,5%. Como controle negativo foi utilizado RPMI. Os parasitos ($5,0 \times 10^5$ em 100ul) foram então incubados juntamente com 100ul de soro normal humano em RPMI ou soro normal humano na presença do sobrenadante, nos tempos de 15 e 30 minutos a 37° C. As reações foram paradas por intermédio da adição de 800ul de RPMI gelado. Os parasitos foram quantificados em uma câmara de Neubauer em microscópio ótico. A lise obtida na ausência do sobrenadante foi definida como 100% da atividade lítica do complemento.

3.7 Lise mediada pelo complemento com bloqueio da via das lectinas e via clássica.

A via clássica e das lectinas do complemento são ambas dependente de Ca^{2+} e Mg^{2+} , enquanto a via alternativa é dependente somente de Mg^{2+} .

Para avaliar a atividade da via alternativa parasitos ($5,0 \times 10^5$ em 100ul) foram incubados por 30, 60 e 90 minutos a 37°C em RPMI contendo 25% de soro normal humano ou 25% de soro normal humano contendo 10 mM de um quelante de cálcio, ácido etileno glicol tetra-acético (EGTA) e 7mM de cloreto de magnésio

(MgCl₂).As reações foram paradas, conforme descrito anteriormente. A via alternativa é conhecida por requerer um maior tempo de incubação para funcionar adequadamente. A lise obtida na ausência do sobrenadante foi definida como 100% da atividade lítica da via alternativa do complemento.

3.7B Lise mediada pelo complemento com potencialização da via das lectinas.

Para avaliar a atividade da via das lectinas parasitos ($5,0 \times 10^5$ em 100ul) foram previamente incubados em RPMI contendo 12,5% de soro normal humano ou 12,5% de soro normal humano contendo 10 mM de ácido etileno glicol tetra-acético (EGTA) e 7mM de cloreto de magnésio (MgCl₂) a 4°C por 30 minutos, para pre-ativar a via.Parasitos foram recolhidos e incubados a 37° C por 30 a 60 minutos na presença de 12,5% de soro normal humano ou 12,5% de soro normal humano mais MgEGTA (10mM EGTA/7mM MgCl₂) diluídos em RPMI ou sobrenadante das formas metacíclicas. As reações foram paradas, conforme descrito anteriormente. A lise obtida na ausência do sobrenadante foi definida como 100% da atividade lítica da via das lectinas do complemento.

3.8 Geração de formas transgênicas.

A partir da sequencia do DNA do putativo gene de serpinas de *T. cruzi* (TriTrypDB- Tc00.1047053508533.40) foram desenhados os primers: Oligosense CCCGGATCCATGTCCACGGCTCCG e oligoanti-sense CCCGTCGACTTACCGTTCGCCGGC utilizados para amplificar um fragmento de 0,44 kb, através do DNA genômico de *T. cruzi* cepa Y, pelo método de reação em cadeia da polimerase PCR conforme (44).

O produto do PCR foi clonado no vetor de expressão de Tripanossomatídeos pTEX (44), usando as enzimas de restrição BamHI e Sall.

3.9 Análise por citometria de fluxo.

$1,0 \times 10^6$ formas epimastigotas crescidos logaritmicamente foram ressuspendidos em 900ul de RPMI ou em mesmo volume de sobrenadantes. Posteriormente foram adicionados 100ul de soro normal humano para obter uma concentração final de 10% e os parasitos foram então incubados por 20 minutos a 4° C com agitação. Após lavagem em PBS, foram fixados utilizando PBS com 4% de PFA e incubados com anticorpos diluídos em PBS 3% BSA (Anti-MBL (1:200), Anti-C3

(1:200) e Anti-H-ficolinas (1:200)) a temperatura ambiente por 1h. Desse modo, os parasitos foram incubados com anticorpo anti-rabbit IgG-FITC (1:500) por 1h a temperatura ambiente, lavados em PBS e analisados por citômetro FACS Calibur. Anticorpo anti IgG FITC foi utilizado como controle isotipo.

3.10 Análise estatística.

Todos os experimentos foram realizados pelo menos três vezes, em triplicata. A significância estatística foi determinada usando o teste t de Studente com 95% de confiança no Graph Pad Prism versão 5.00 para Windows.

3.11 Tampões e soluções.

PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7.4

TBS (Tris Buffered Saline)

Tampão de Lise:

TBS 1x + CHAPS 1% + Coquetel de inibidores de proteases (ROCHE) 1x.

TAMPÃO DE AMOSTRA PARA GEL DE POLIACRILAMIDA 5X:

Tris-HCl (pH 6,8) 250 mM

SDS 10 %

Azul de bromofenol 0,5 %

Glicerol 50 %

β -mercaptoetanol 500 mM

PSG pH 8.0:

KH_2PO_4 0,52g/l

Na_2HPO_4 8,12g/l

NaCl 2,62g/l

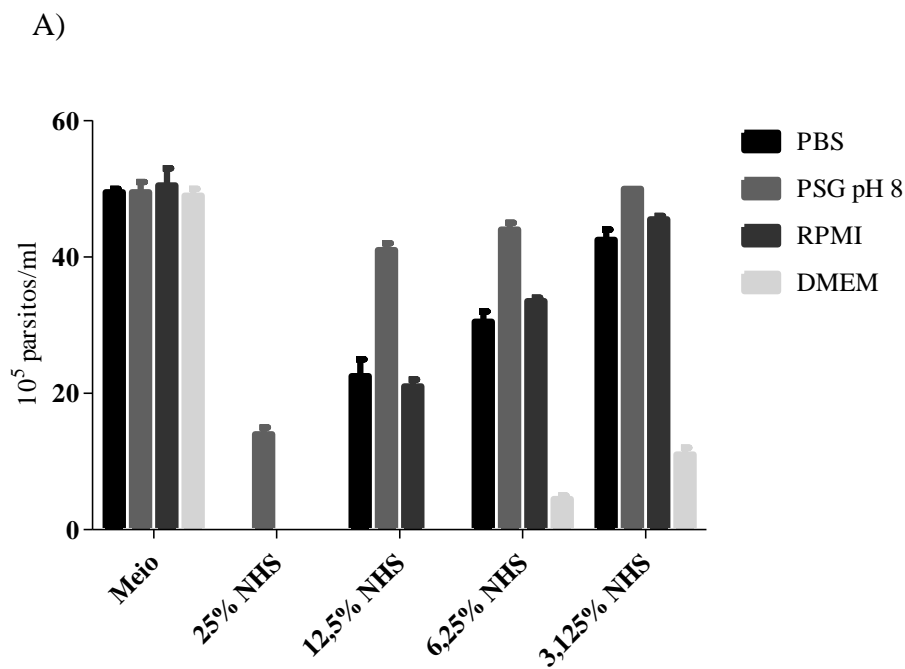
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 10g/l

H_2O QSP 1000 ml

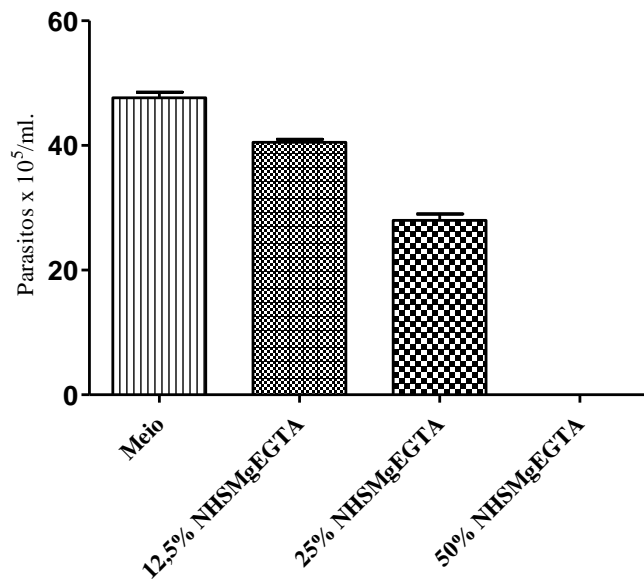
4. Resultados:

4.1 Ensaios de lise mediada pelo complemento.

Primeiramente, foi avaliada a capacidade do Soro normal humano (NHS) de lisar formas epimastigotas de *T. cruzi* crescidas logaritmicamente através da lise mediada pelo complemento utilizando diferentes meios de cultura e tampões. Foram realizadas também titulações do NHS para determinar quais seriam as condições ideais para os ensaios de lise tanto para as três vias quanto para a via alternativa somente. (Figura 4.1 A, B e C)



B)



C)

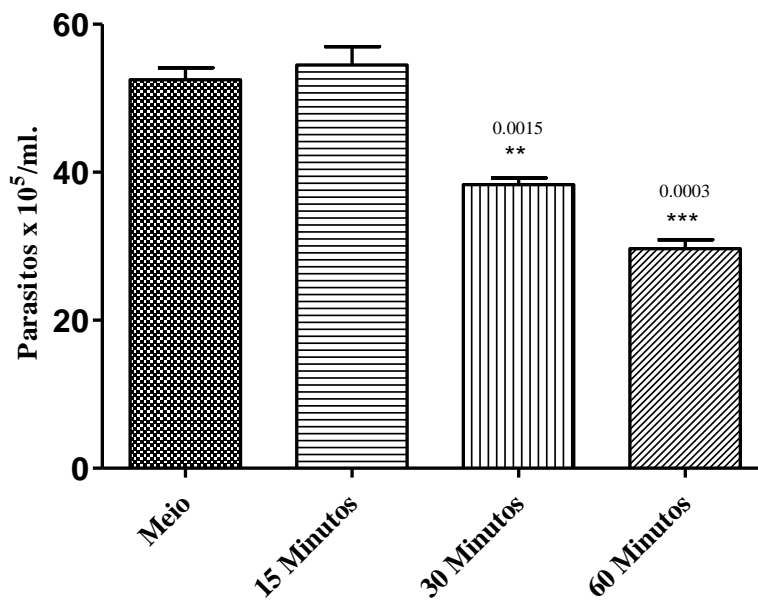


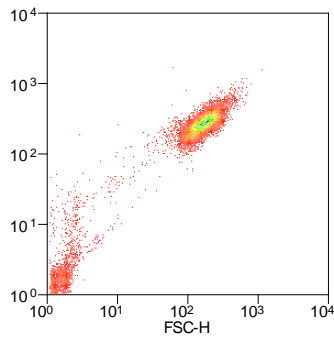
Fig 4.1: Determinação dos parâmetros para a realização dos ensaios de lise mediada pelo complemento. A: Ensaios de lise com formas epimastigotas em diversos tipos de meios de cultura com titulação das concentrações de soro normal humano (NHS). B: Titulação de NHS para ensaio de lise do complemento pela via alternativa. Foi utilizado soro normal humano com 10mM EGTA e 7mM MgCl₂ (NHSMgEGTA) por 30 minutos a 37°C. C: Cinética de lise mediada pela via alternativa do complemento utilizando 25% de NHS.

Com base nos resultados obtidos, padronizamos o meio RPMI e 12,5% de soro normal humano para serem utilizados nos futuros ensaios de lise. Com exceção da via alternativa onde foi utilizado 25% de soro normal humano, devido a pouca lise com 12.5% de soro normal humano

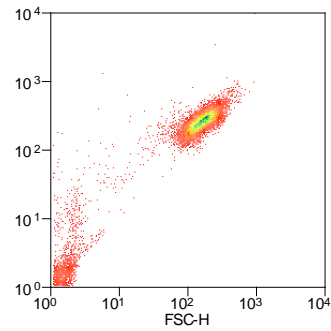
4.2 Viabilidade dos parasitos epimastigotas durante a geração do sobrenadante.

Foram realizados ensaios de viabilidade dos parasitos utilizados para gerar o sobrenadante a 37°C por 1h. Foi observado que os parasitos permanecem viáveis após o período de incubação para gerar o sobrenadante. Como controle positivo, utilizamos os parasitos tratados com Triton X-100. (Figura 4.2 A, B, C e D) e (Figura 4.21)

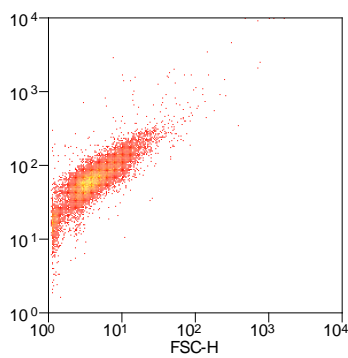
A)



B)



C)



D)

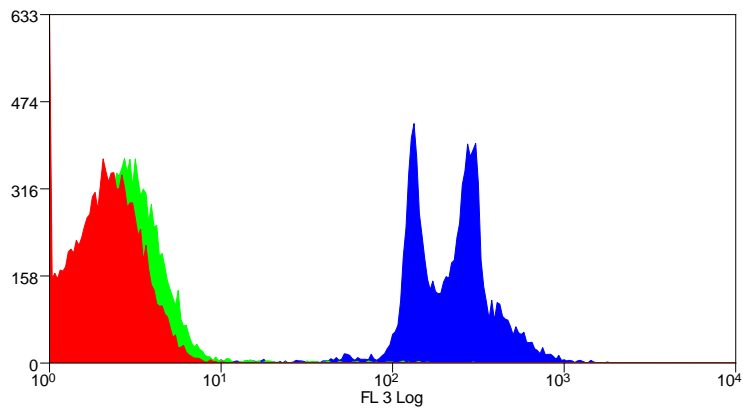
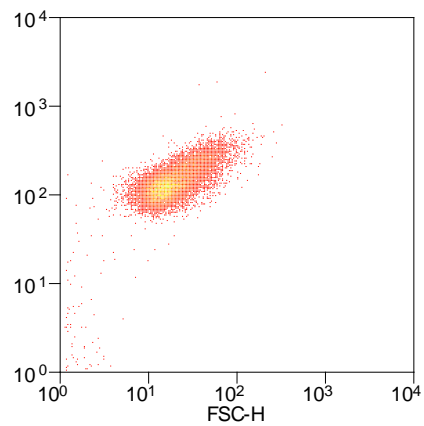


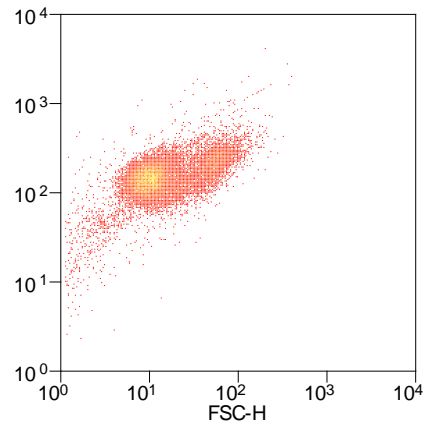
Figura 4.2: Morfologia e grau de incorporação de PI dos parasitos epimastigotas durante o período de geração dos sobrenadantes. A: Epimastigotas utilizados para gerar o sobrenadante (10^8 /ml) não corados. B: Epimastigotas incubados a 28°C por 1h em RPMI (10^8 /ml). C: Epimastigotas tratados com TRITON X-100. D: Incorporação de PI, Vermelho: parasitos após o tempo de incubação não corados, Verde: parasitos após o tempo de incubação marcados com PI por 5 minutos e Azul: parasitos após o tempo de incubação tratados com TRITON X-100 e marcados com PI por 5 minutos.

Figura 4.21.

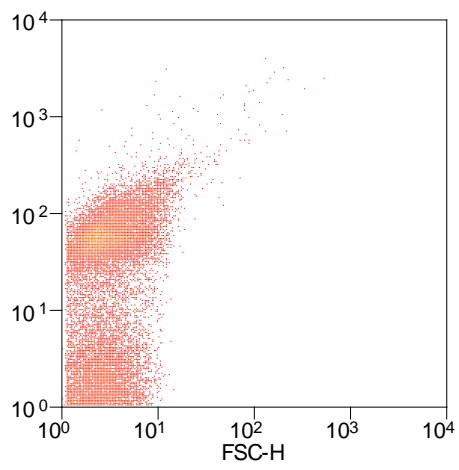
A)



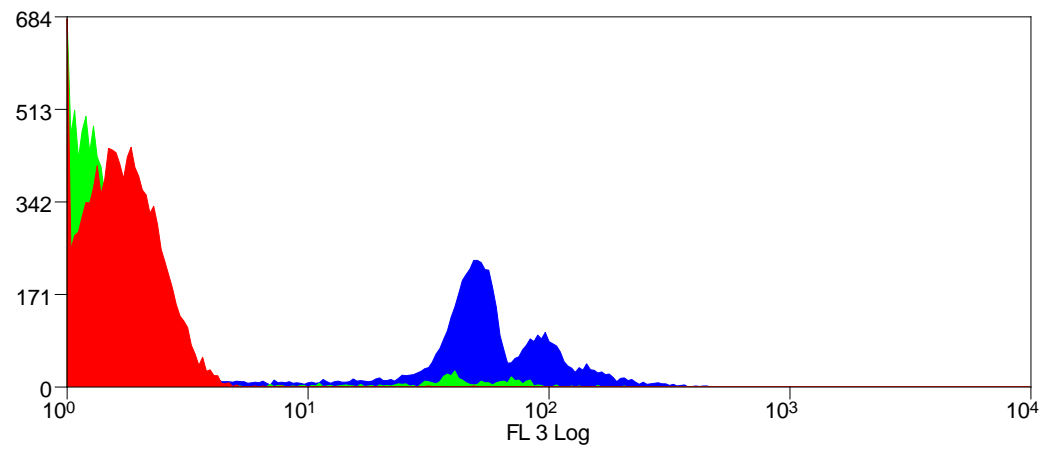
B)



C)



D)



E)

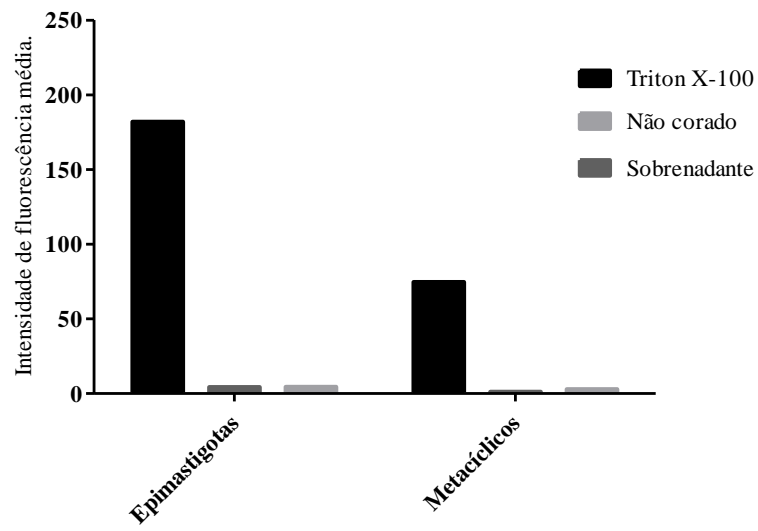


Figura 4.21: Morfologia e grau de incorporação de PI dos parasitos metacíclicos durante o período de geração dos sobrenadantes. A: Metacíclicos utilizados para gerar o sobrenadante (10^8 /ml) não corados. (10^8 /ml) B: Metacíclicos utilizados para gerar o sobrenadante (10^8 /ml) a 28°C por 1h em RPMI. C: Metacíclicos utilizados para gerar o sobrenadante (10^8 /ml) tratados com TRITON X-100. D: Incorporação de PI: Vermelho: parasitos após o tempo de incubação não corados, Verde: parasitos após o tempo de incubação marcados com PI por 5 minutos e Azul: parasitos após o tempo de incubação tratados com TRITON X-100 e marcados com PI por 5 minutos. E: Resumo dos valores das intensidades de fluorescência média das figuras 4.2 e 4.21.

4.3 Tempos de incubação dos parasitos para gerar o sobrenadante.

Visando caracterizar a cinética de liberação dos produtos inibitórios secretados pelos parasitos, sobrenadantes foram gerados com diferentes tempos de incubação, 30 e 60 minutos, a 37°C e analisados em ensaio de lise mediada pelo complemento. (Figura 4.3) Pôde-se observar que os sobrenadantes apresentam similares atividades inibitórias aos 30 e 60 minutos.

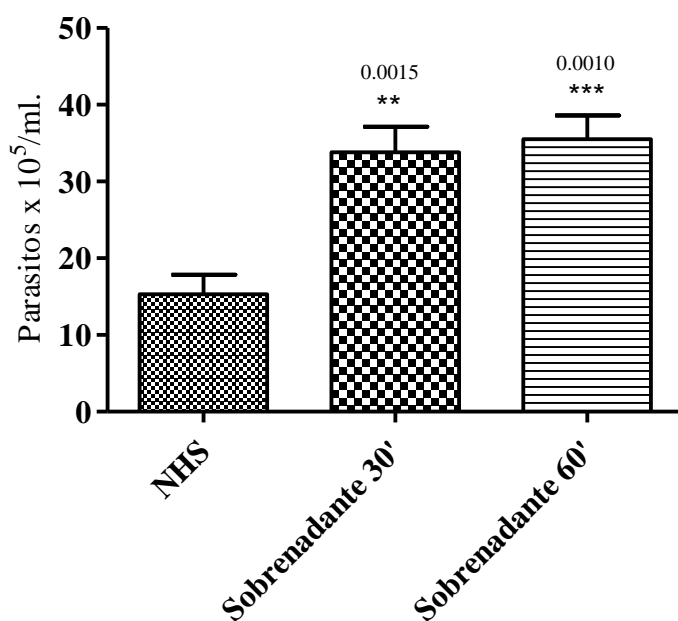


Fig 4.3 Atividade inibitória da lise mediada pelo complemento dos sobrenadantes de formas metacíclicas obtidos através de diferentes tempos de incubação com 12,5% de NHS a 37°C por 30 minutos.

4.4 A benzamidina, um inibidor de serino protease, é capaz de inibir o complemento.

Foram realizados experimentos para analisar a capacidade de um inibidor comercial de serino proteases (benzamidina) de inibir o complemento. Verificou-se que a benzamidina tem a capacidade de inibir a lise mediada pelo complemento de formas epimastigotas de uma maneira dose dependente. (Figura 4.4)

A)

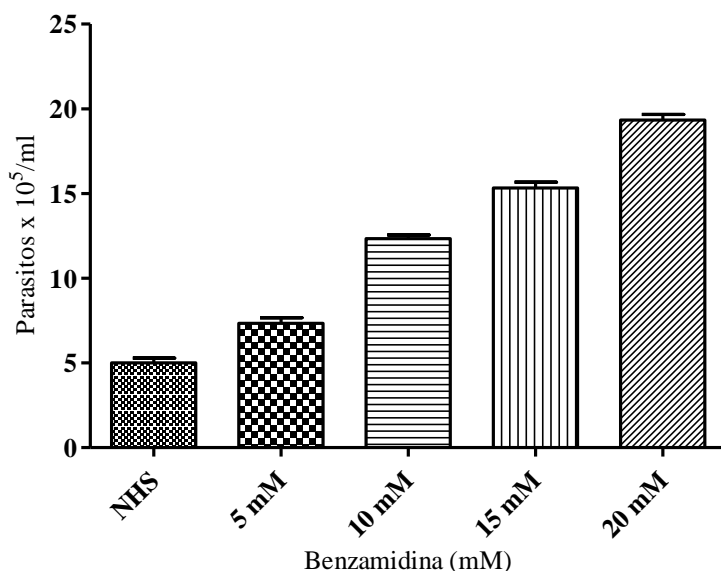
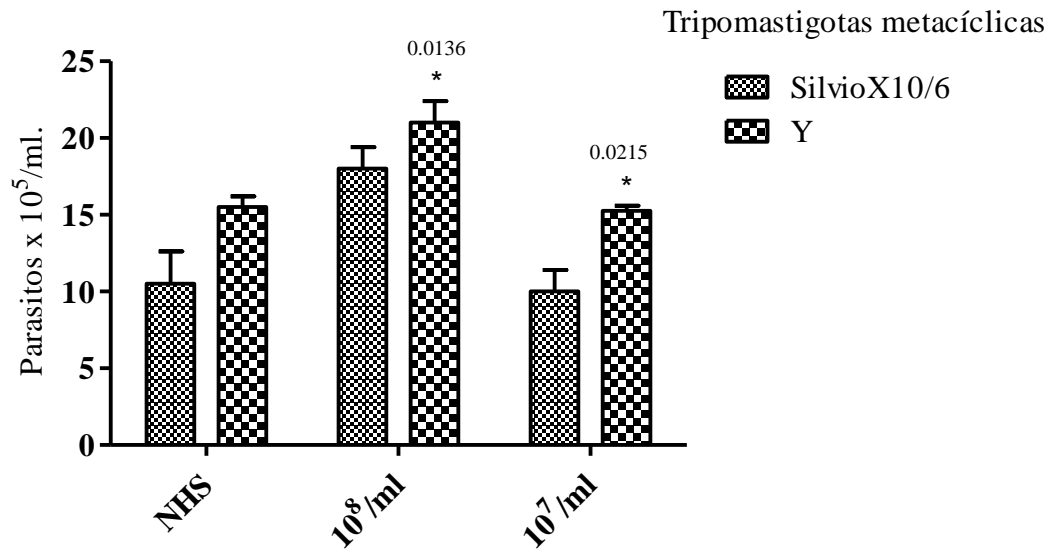


Fig 4.4: Inibição da lise mediada pelo complemento utilizando benzamidina. Parasitos epimastigotas foram incubados na presença de RPMI contendo 12,5% de NHS por 30 minutos a 37°C com diferentes concentrações de benzamidina.

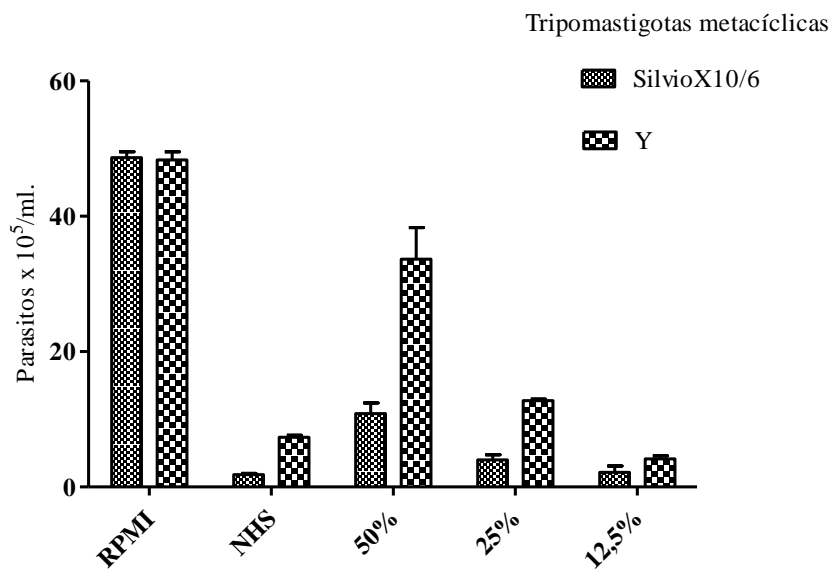
4.5 Sobrenadantes de formas metacíclicas e não de formas epimastigotas de *T. cruzi* possuem atividade inibitória de complemento.

Foi determinada a presença de atividade inibitória de complemento pelos produtos secretados encontrados nos sobrenadantes de formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*. Sobrenadantes de distintas cepas de *T. cruzi* (Cepa Y e Silvio X10/6) inibem o complemento de maneira dose dependente da concentração de parasitos presentes no meio. Os sobrenadantes das formas epimastigotas não apresentam atividade inibitória de complemento. (Figuras 4.5 A, B e C).

A)



B)



C)

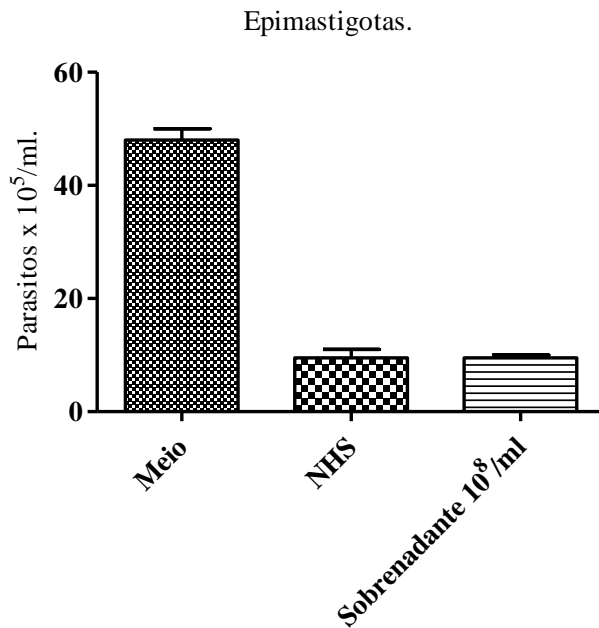


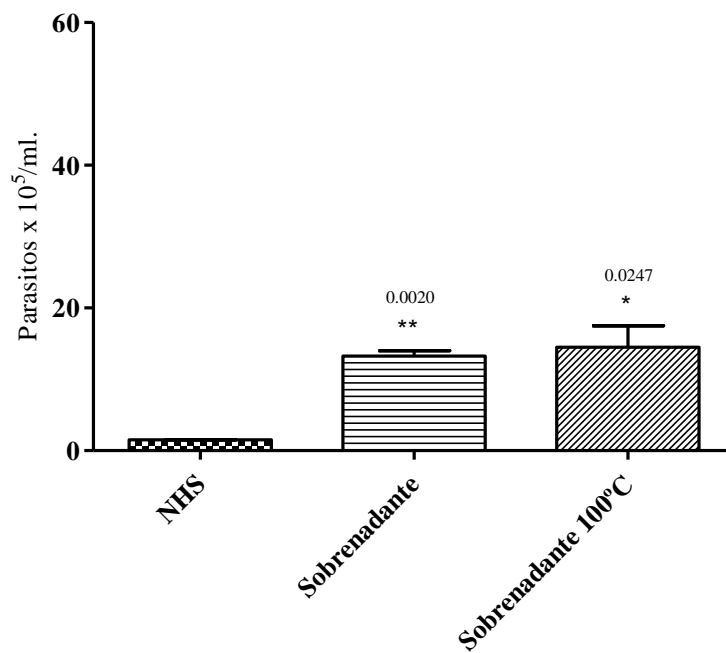
Figura 4.5: Sobrenadantes de formas metacíclicas possuem atividade inibitória de complemento. A: Sobrenadantes das cepas SilvioX10/6 e Y possuem atividade inibitória de complemento e essa atividade é dependente da concentração de parasitos presentes no meio. B: Titulação dos sobrenadantes gerados pelas duas cepas contendo 1×10^8 parasitos por ml. C: Sobrenadantes das formas epimastigotas não apresentam atividade inibitória de complemento. Foram utilizados para esses experimentos 12,5% de NHS em meio RPMI com incubação a 37°C por 30 minutos.

4.6 Análise do sobrenadante das formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*.

Fomos analisar a estabilidade da atividade inibitória presente no sobrenadante em relação a temperatura.

A atividade inibitória dos sobrenadantes das formas metacíclicas é mantida mesmo após a inativação por calor (100°C por 10 minutos). Mas perdem sua atividade quando submetidos a baixas temperaturas (-20°C). (Figura 4.6 A e B).

A)



B)

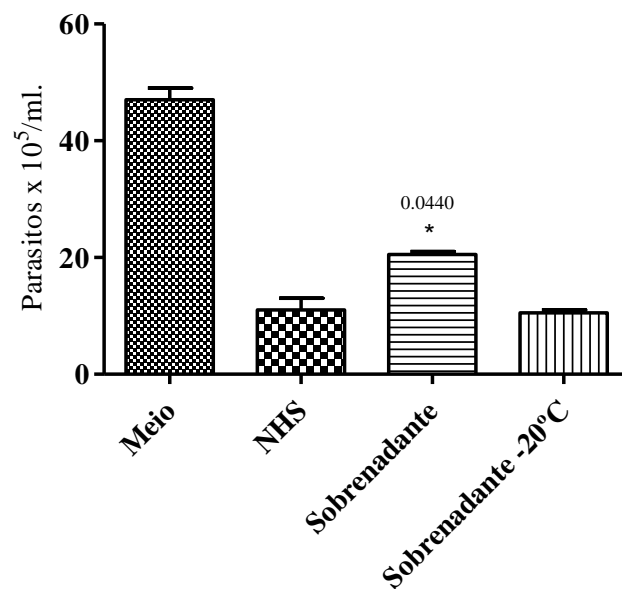


Figura 4.6. Estabilidade dos produtos inibitórios a diferentes temperaturas. A: Ensaio de lise media pelo complemento utilizando sobrenadantes de formas metacíclicas cepa Y submetidos a 100°C por 10 minutos e sobrenadantes não submetidos à alta temperatura. B: Ensaio de lise pelo complemento utilizando sobrenadantes de formas metacíclicas cepa Y submetidos ao resfriamento a -20° C. Para esses experimentos foram utilizados 12,5% de NHS em meio RPMI com incubação a 37° C por 30 minutos.

4.7 Análise do sobrenadante: Tamanho dos produtos inibitórios.

Os produtos inibitórios de complemento presentes nos sobrenadantes das formas metacíclicas de *T. cruzi* são filtráveis por membrana PVDF de 0.22 μm com alta capacidade de ligação a proteínas, perdendo sua atividade inibitória da lise mediada pelo complemento. (Figura 4.7)

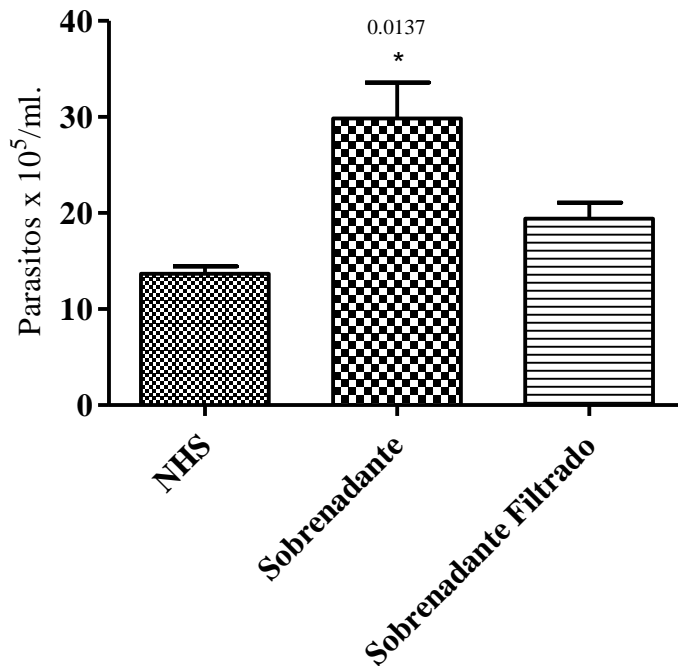


Figura 4.7: Atividade inibitória de lise mediada pelo complemento por sobrenadantes de formas metacíclicas filtrado por membrana de .22 μm em comparação ao sobrenadante não filtrado.

4.8 Inibição da lise mediada pelo complemento através de extratos proteicos totais de formas metacíclicas e epimastigotas.

Para determinar que a inibição da lise pelo complemento seja devido a presença de produtos secretados pelos parasitos viáveis, e não por produtos derivados da morte parasitaria, extratos totais de formas epimastigotas e metacíclicas obtidos através de congelamento e descongelamento, foram utilizados para inibir a lise mediada pelo complemento (Fig 4.8).

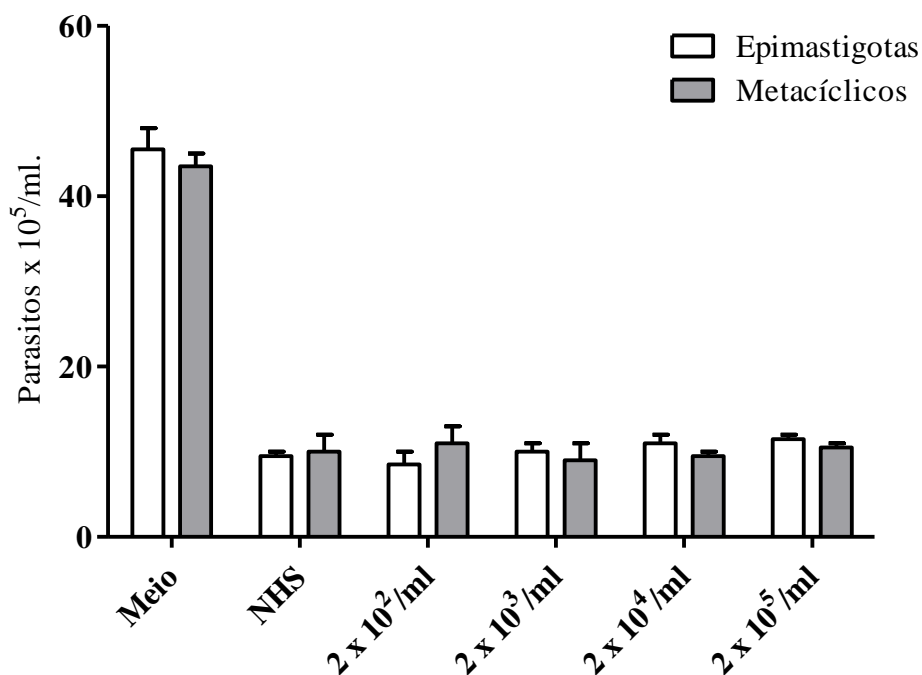


Figura 4.8: Inibição da lise mediada pelo complemento utilizando extratos proteicos totais obtidos através da lise por congelamento e descongelamento de formas metacíclicas e epimastigotas nas concentrações de 2×10^2 a 2×10^5 parasitos por ml.

Foram utilizados para esses experimentos 12,5% de NHS em meio RPMI com incubação a 37° C por 30 minutos.

4.9 Análise do sobrenadante: Determinação da atividade inibitória sobre serino protease (quimiotripsina).

A atividade inibitória do sobrenadante sobre quimiotripsina foi avaliada através da medida da quimiluminescência obtida com formação de produtos derivados da atividade proteolítica de quimiotripsina sobre seus substratos (Fig 4.9).

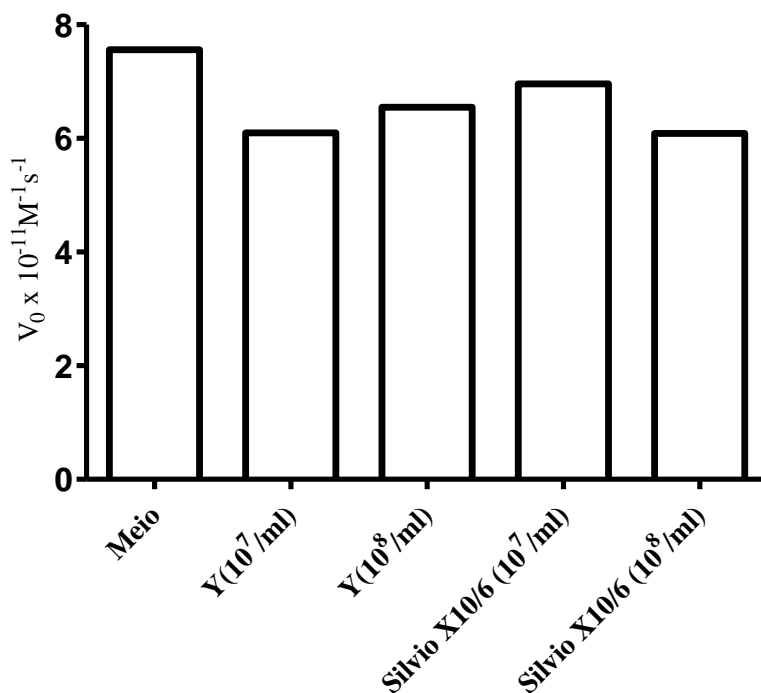


Fig 4.9: Sobrenadantes das cepas Y e Silviox10/6 com atividade inibitória de complemento previamente caracterizados foram utilizados para avaliar a atividade inibitória de quimiotripsina. Pode-se observar que o grau de inibição de quimiotripsina é dependente da concentração de parasitos e esta presente em ambas as cepas.

4.10 Ensaio de lise mediada pelo complemento com inibição das vias da lectina e clássica para determinar qual a principal via do complemento é inibida pelos produtos encontrados nos sobrenadantes das formas metacíclicas.

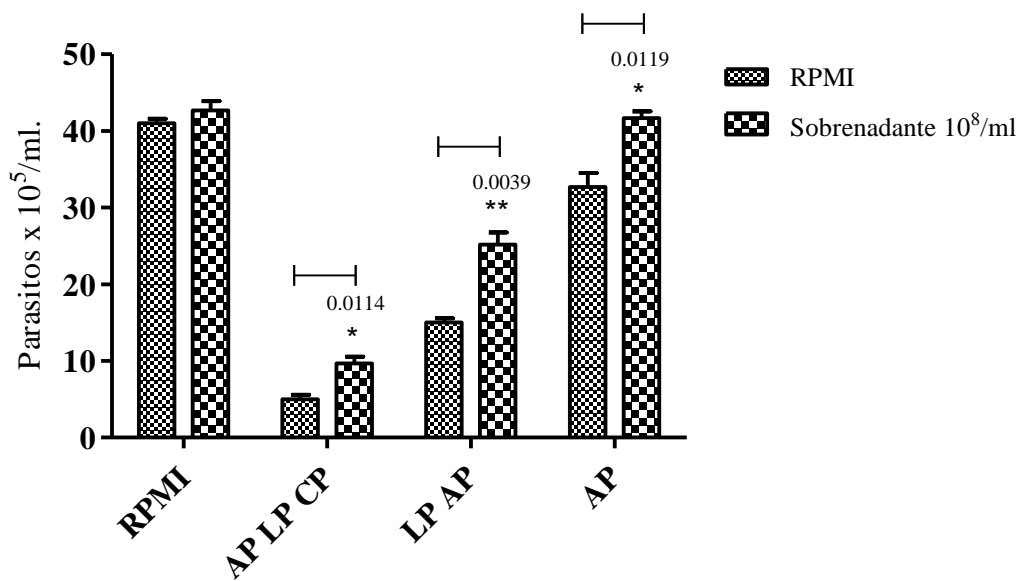
A via clássica e das lectinas do complemento são ambas dependentes de Ca^{2+} e Mg^{2+} , enquanto a via alternativa é dependente somente de Mg^{2+} . Os experimentos foram realizados pre-incubando os parasitos a 4° C em NHS ou NHS tratado com 10mM de EGTA e 7mM de $MgCl_2$ que previne a ligação de moléculas dependentes de íons Ca^{2+} , e o cloreto de magnésio potencializa a via alternativa. Após a pré-incubação, o complemento é ativado a 37° C na presença de NHS para as vias alternativa e das lectinas (AP e LP) ou NHS-MgEGTA somente para a via alternativa (AP).

Visando melhor caracterização de qual das vias do complemento estaria sendo inibida pelos produtos encontrados nos sobrenadantes de formas metacíclicas do *T. cruzi*, ensaios com bloqueio das vias das lectinase clássica foram realizados. A deposição de fatores das vias clássica e a ativação da via das lectinas só ocorre na

presença de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} enquanto a via alternativa depende unicamente de íons Mg^{2+} .

Foi visto que o sobrenadante das formas metacíclicas de *T. cruzi* têm habilidade de inibir parcialmente a via alternativa em comparação com as outras vias. (Figura 4.10 A) Observamos ainda um maior grau de inibição da presente via do complemento quando o sobrenadante é concentrado por diálise. (Figura 4.10 B)

A)



B)

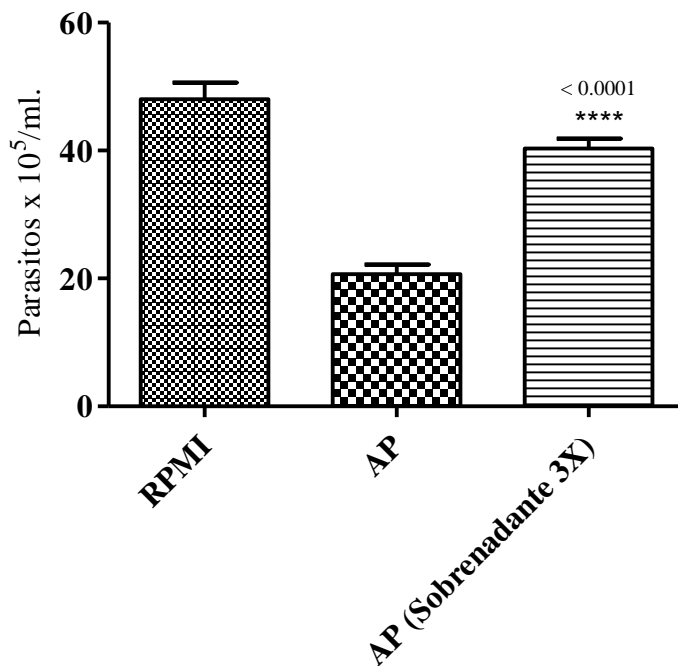


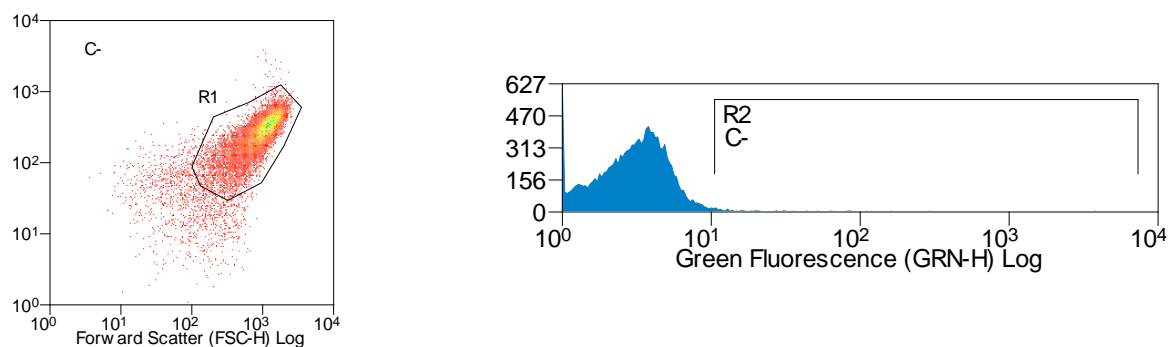
Fig 4.10: A: Ensaio de lise com inibição das vias lectina e clássica do complemento para determinar qual das principais vias é inibida pelos produtos secretados pelas formas metacíclicas de *T. cruzi* cepa Y. **AP**: Via alternativa **CP**: Via clássica **LP**: Via das lectinas. Os experimentos foram realizados utilizando 12,5% de NHS em RPMI para as demais vias e 25% de NHS em RPMI para a via alternativa. B: Ensaio de lise com inibição das vias das lectinas e clássica do complemento utilizando sobrenadante das formas metacíclicas concentrado três vezes através de dialise. Foi utilizado 25% de NHS em RPMI por 1h a 37° C.

4.11 Caracterização do efeito inibitório dos sobrenadantes por intermédio da deposição de fatores do complemento.

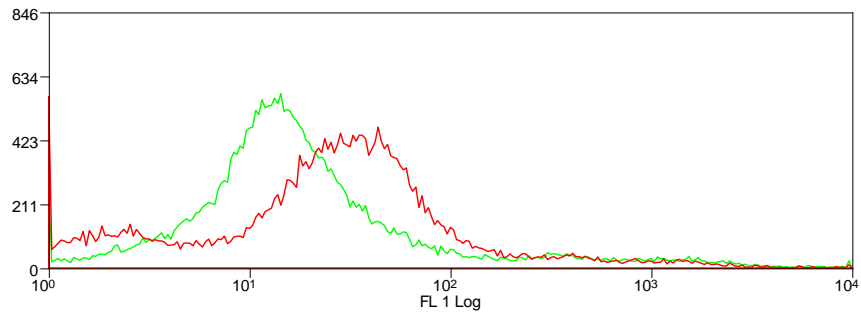
Análise da deposição de fatores do complemento na superfície de epimastigotas na presença de sobrenadantes das formas tripomastigotas metacíclicas.

Conforme demonstrado anteriormente constatamos que os sobrenadantes das formas metacíclicas possuem a habilidade de inibir parcialmente a lise mediada pelo complemento de formas epimastigotas. Desta maneira, utilizando a técnica de citometria de fluxo, fomos verificar as alterações na deposição dos fatores do complemento na superfície de epimastigotas devido à presença dos sobrenadantes. Uma deposição diminuída dos fatores C3, C4, MBL e H-Ficolinas na superfície dos epimastigotas foi observada, sugerindo que os produtos inibitórios presentes no sobrenadante estão de alguma maneira afetando a ativação do complemento. (Fig 4.11 A, B, C, D, E e F Vermelho: PBS Verde: Sobrenadante)

A)

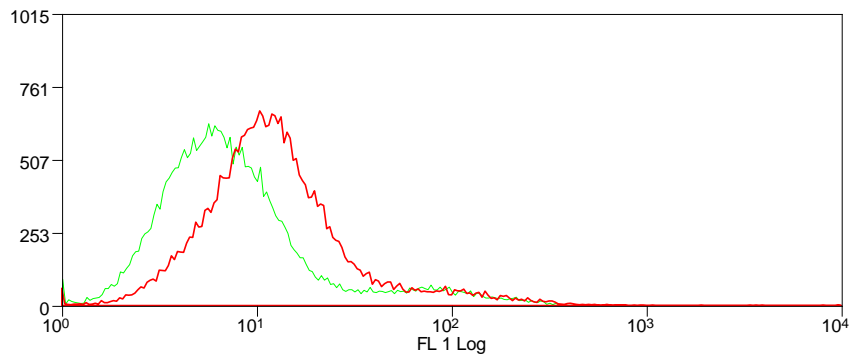


B)

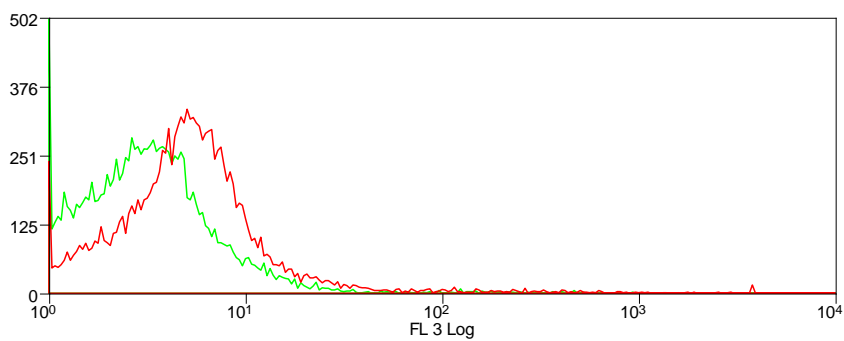


Vermelho: parasitos incubados com PBS Verde: parasitos na presença do Sobrenadante

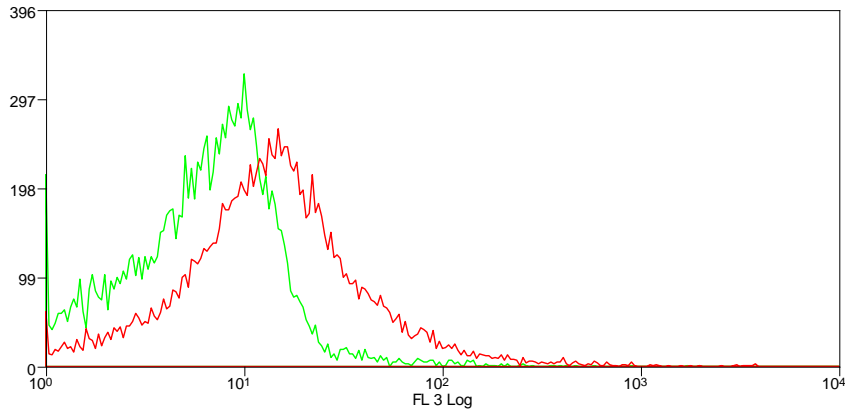
C)



D)

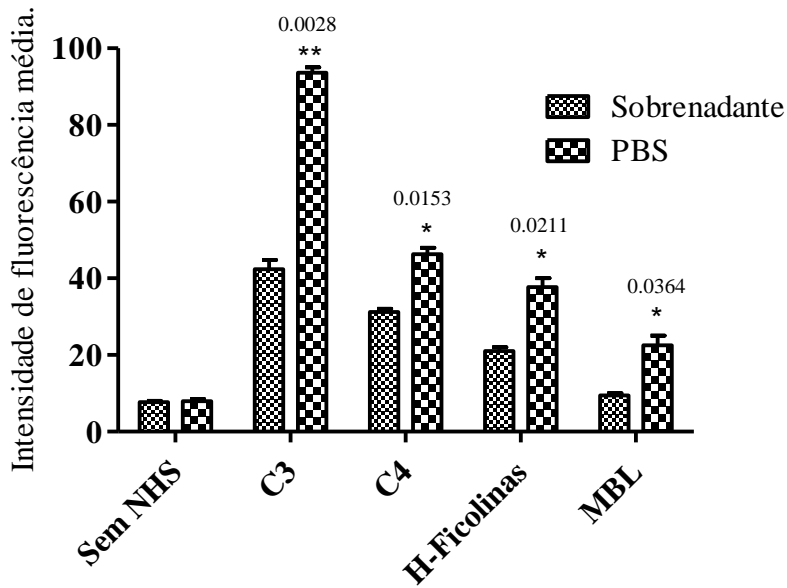


E)



F)

Deposição de fatores do complemento
na presença do sobrenadante.



Fatores do complemento.

Fig 4.11: Deposição de fatores do complemento na presença do sobrenadante. A: Morfologia das formas epimastigotas e histograma mostrando epimastigotas incubados com anticorpo secundário Alexa 488. B: Histograma da deposição de C3 C: Histograma da deposição de C4 D: Histograma da deposição de MBL E: Histograma da deposição de H-Ficolinas F: Gráfico comparativo das intensidades de deposição. (Vermelho: parasitos incubados com PBS Verde: parasitos na presença do Sobrenadante).

4.12 Caracterização e análise de similaridades das sequencias dos genes que codificam para inibidores de serino proteases ou reguladores do sistema do complemento em *Trypanosoma cruzi*.

Devido as cascatas do sistema do complemento serem ativadas por intermédio da atividade proteolítica de serino proteases, fomos investigar se os produtos inibitórios de complemento liberados pelas formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* poderiam ser inibidores de serino proteases.

Foi realizada uma busca por motivos de SERPINAS no Genedb, TriTrypDB e UniprotKb. As sequências de proteínas dos genes selecionados foram examinadas pelo programa Clustalw2 para encontrar regiões de similaridade entre sequências. Foi utilizado como modelo duas sequencias de aminoácidos de inibidores de serino proteases já descritas na literatura. (Figura 4.12) Com base nesse resultado realizamos a escolha de do gene que posteriormente seria utilizado na geração de parasitos transgênicos. Selecionamos o gene PTc00.1047053508533.40 que possui uma similaridade considerável com genes que codificam para inibidores de serino protease já caracterizado em *Leishmania sp.* (LmjF15.0300)E em *Escherichia coli* gene denominado ecotina (ECOT_ECOLI). O gene selecionado PTc00.1047053508533.40 codifica para uma proteína de 147 aa de 16.82 kDa.

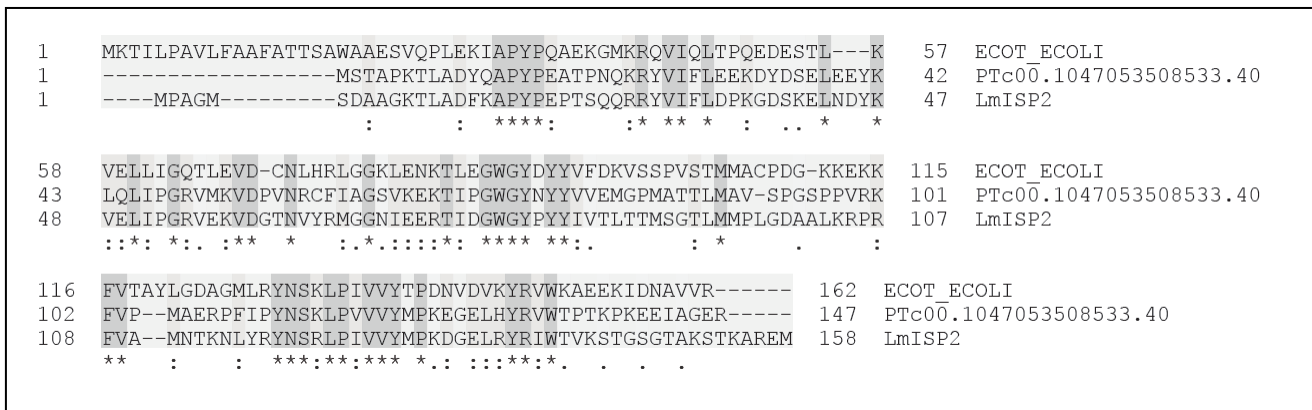
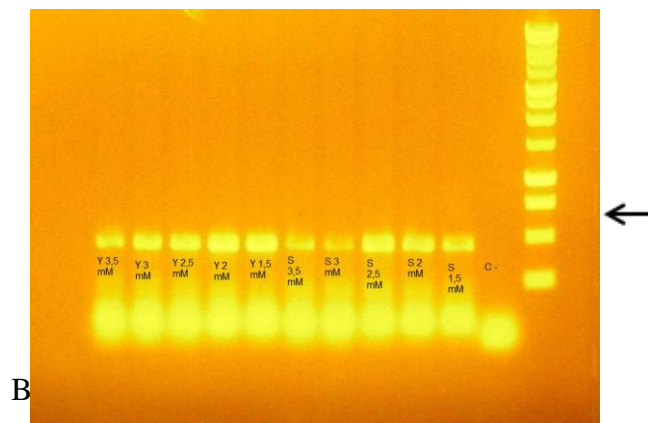


Fig 4.12: Análise de similaridade das sequências de aminoácidos do gene selecionado para clonagem (PTc00.1047053508533.40) juntamente com a sequência de aminoácidos do inibidor Ecotina e do inibidor ISP2 presente em *Leishmania*.

4.13 Amplificação do gene PTc00.1047053508533.40 por PCR e subclonagem em vetor pTEX e sua posterior transfecção em epimastigotas.

Ambos DNAs genômicos das cepas utilizadas (Y e SilvioX10/6) em nossos ensaios amplificam o fragmento de 444 pares de bases correspondente ao gene de interesse Fig 4.13 A.

Posteriormente esse fragmento foi subclonado em vetor pTEX e a confirmação foi obtida através da digestão do vetor com as enzimas de restrição BamHI e SalI Fig 4.13 B A)



B

M ND D1 D2

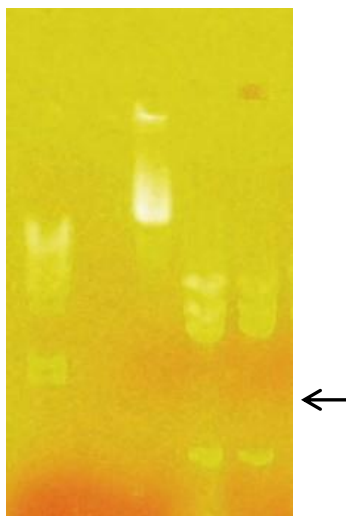


Figura 4.13: Amplificação e clonagem do gene em vetor pTEX.

A: Titulação da PCR em diferentes concentrações de magnésio com os DNAs genômicos das duas cepas Y e Silvio X10/6 B: Subclonagem em vetor Ptex mostrando a digestão enzimática e liberação do gene. M: Marcador ND: Não digerido D1: Digerido 1 D2: Duplicata do digerido 1.

5. DISCUSSÃO

Enquanto existem estudos moleculares acerca da interação de parasitas com insetos vetores, poucos são os trabalhos a respeito do primeiro contato do parasito vindo do inseto vetor no hospedeiro mamífero. Estudos desse tipo são fundamentais para o melhor entendimento do processo de infecção e desenvolvimento da doença de chagas.

Na presente dissertação, estudamos um dos mecanismos envolvidos na evasão a lise mediada pelo complemento pelo *T. cruzi* no estágio tripomastigota metacíclico, mostrando que os sobrenadantes de cultura de formas infectivas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* possuem atividade inibitória da lise mediada pelo complemento.

Durante a infecção em hospedeiros vertebrados, os tripomastigotas metacíclicos são liberados após a picada do inseto vetor, juntamente com as fezes e urina do inseto. Esses parasitos penetram na corrente sanguínea do hospedeiro devido a lesão causada pelo inseto. Nesse momento os parasitos sofrem uma intensa mudança fisiológica, do intestino do inseto a 28°C a corrente sanguínea do hospedeiro a 37°C.

No sangue do hospedeiro, os parasitos entram em contato com as linhas de defesa, constituídas principalmente por macrófagos, células NK e o sistema do complemento.

O sistema do complemento é um dos principais, se não o principal mecanismo de defesa imune inata de vertebrados contra infecções por patógenos. As moléculas dos hospedeiros envolvidas na ativação do sistema do complemento são capazes de identificar uma ampla gama de patógenos, sem a necessidade de um contato prévio com os mesmos.

Em muitos casos, durante o primeiro contato parasito hospedeiro, o patógeno *T. cruzi* têm de evadir a elaborada maquinaria do sistema imune, que é um fator determinante para a sobrevivência dos patógenos e o progresso da infecção dentro de seus hospedeiros para progredir no seu ciclo de vida(38, 43, 45, 70)e revisado recentemente pelo nosso grupo (43).

Estudos realizados anteriormente pelo nosso grupo e outros, mostram que a resistência a lise mediada pelo complemento seja um mecanismo multifatorial, principalmente associado a expressão de moléculas de superfície que interrompem a cascata enzimática do complemento. Essas moléculas podem atuar na inibição das cascatas enzimáticas e deposição dos fatores do complemento na superfície dos parasitos.

Em *Leishmania* spp. foi identificada e caracterizada a glicoproteína gp63 que bloqueia a lise mediada pelo complemento através da clivagem de C3b (71). Em *T. cruzi*, já foram identificados vários mecanismos de resistência a lise associados a expressão de moléculas de superfície. CRIT (Complement C2 receptor inhibitor trispanning) se liga ao fator C2 e impede sua clivagem pela enzima MASP-2, e consequentemente, inibe a formação de C3 convertase. DAF (Decay-Accelerating Factor) se liga aos fatores C3b e C5b dissociando a C3 convertase e inibindo tanto a via clássica quanto a via alternativa (38, 72)(73). A calreticulina (TcCRT) que se liga a C1q da via clássica e MBL impedindo a interação da MBL aos resíduos de manose, e a proteína reguladora do complemento (CRP) que se liga a C3 e C4 e inibe a via clássica e das lectinas (42)(39, 40). Por outro lado a inibição do sistema do complemento pode se dar através do uso de moléculas solúveis do hospedeiro envolvidas na regulação do complemento. Por exemplo, o fator H se liga ao ácido siálico na superfície de tripomastigotas levando a conversão de C3b para sua forma inativa iC3b.

Entretanto, não foram realizados estudos analisando se formas metacíclicas eram capazes de liberar produtos inibitórios do complemento.

Através de ensaios de inibição da lise mediada pelo complemento de formas epimastigotas, utilizando sobrenadantes das formas metacíclicas gerados por exposição dos parasitos por 1h a 37° C, constatamos que os sobrenadantes possuem a habilidade de inibir parcialmente a lise mediada pelo complemento de formas epimastigotas (Figuras 4.5 A e B) enquanto os sobrenadantes das formas epimastigotas não apresentam essa atividade inibitória (Figura 4.5 C). Todavia, com base na taxa de sobrevivência em ensaios de lise mediada pelo complemento podemos concluir que há cepas altamente resistentes, com resistência moderada e cepas sensíveis a lise pelo soro humano (45). Esses resultados indicam que só parte dos parasitos liberados pelo inseto durante a infecção seriam capazes de sobreviver ao ataque do complemento para causar a infecção. Essa hipótese foi confirmada no presente trabalho onde observamos que o grau de inibição que o sobrenadante possui sobre o complemento é cepa dependente (Figura 4.5 A).

Os produtos inibitórios presentes nos sobrenadantes são resistentes à alta temperatura (Figura 4.6 A) e sensíveis a baixas temperaturas (Figura 4.6B) . Isto poderia indicar que os produtos inibitórios não seriam proteínas ou não dependem da estrutura terciária e quaternária.

Foi observado também que quando o sobrenadante das formas metacíclicas é filtrado por membrana PVDF de 0.22µm, sua capacidade de inibir o complemento é perdida, mostrando que os produtos inibitórios são biomoléculas acima de .22 µm (Figura 4.7 A).

Quando o parasito passa da forma replicativa epimastigota que se encontra a 28°C para a forma infectiva tripomastigota metacíclica e a mesma entra em contato com o hospedeiro a 37° poderia estar ocorrendo uma maior expressão dos genes que codificam para os inibidores de serino proteases, já que os sobrenadantes dessas formas parasitárias possuem a habilidade de inibir parcialmente a quimiotripsina (Figura 4.9 A). A determinação da expressão diferenciada de genes de serpina poderia confirmar o achado (em andamento).

Uma outra ideia levantada no nosso trabalho era que os produtos dos sobrenadantes inibiriam a deposição de fatores do complemento na superfície parasitária.

Foi constatado que quando os parasitos são incubados na presença de soro normal humano juntamente com os sobrenadantes, ocorre uma menor deposição dos fatores do complemento na superfície das formas epimastigotas em comparação aos parasitos que foram incubados na presença de soro normal humano (Figura 4.11). Uma das hipóteses seria que alguns dos compostos encontrados no sobrenadante possuem a habilidade de estabilizar determinados fatores do complemento, já que durante a ativação do complemento, os fatores se ligam a superfície do patógeno, são ativados e se dissociam para prosseguir com a cascata de ativação do complemento como já foi mostrado em (43).

Embora nosso grupo tenha mostrado anteriormente mecanismos de resistência das formas metacíclicas associadas a via das lectinas (44) , os nossos resultados mostram que os produtos inibitórios afetam a via alternativa (Figura 4.10) . Esses achados confirmam a menor deposição de C3 observada nos experimentos de deposição anteriores (Figura 4.10). Experimentos de invasão em células eucarióticas na presença de soro humano mostraram que a invasão celular pelas cepas sensíveis é restrita aos primeiros minutos de contato com os parasitos e as células em presença de soro, confirmando que o sistema do complemento poderia facilmente conter a infecção. (45). Por outro lado, as cepas mais resistentes devem inibir o complemento para poderem invadir as células hospedeiras através da liberação de produtos inibitórios de complemento e expressão de moléculas reguladoras do complemento em suas superfícies.

Esses resultados sugerem que outros mecanismos, independentes da expressão de moléculas de superfície reguladoras do complemento pelos parasitos, poderiam estar envolvidos na evasão a lise mediada pelo complemento. Como foi mostrado nessa dissertação que componentes encontrados nos sobrenadantes de formas tripomastigotas metacíclicas e não de formas epimastigotas são capazes de inibir a lise mediada pelo complemento.

Compreender os mecanismos envolvidos na ativação do complemento e resistência por patógenos é um meio essencial para desenvolver novas quimioterapias e vacinas. A quimioterapia contra a doença de Chagas, assim como de outras doenças parasitárias, está principalmente associada às drogas que atuam nas vias metabólicas dos parasitas. Contudo, o entendimento dos mecanismos de evasão imune poderá revelar novos aspectos da biologia parasitária que por sua vez poderão ser utilizados futuramente no controle das doenças. Essa dissertação contribuiu mostrando novos aspectos da interação do parasito e o hospedeiro, revisando e reestabelecendo novos conceitos dos mecanismos de ativação e resistência a lise mediada pelo complemento. Acreditamos que esse trabalho possa contribuir para o desenvolvimento ou delineamento de novas estratégias quimioterápicas contra a doença de Chagas.

PERSPECTIVAS

Futuramente o mesmo experimento de deposição de fatores na superfície de epimastigotas na presença ou não dos sobrenadantes será repetido com novos anticorpos específicos para outros fatores do complemento, para realmente avaliar qual ou quais fatores do complemento estão sendo inibidos, ou se o produto inibitório dos sobrenadantes possui especificidade para alguma das três vias de ativação.

Logo, com o intento de melhor caracterizar se a inibição do complemento se dá realmente por inibidores de serino protease, a resistência a lise de parasitos transgênicos sobre-expressando genes de SERPINAS será comparada com a resistência a lise de parasitos selvagens, e a capacidade de inibição de seus sobrenadantes serão avaliados contra uma gama de inibidores serino proteases.

6. Referencias Bibliográficas.

1. Gurtler RE, Ceballos LA, Ordonez-Krasnowski P, Lanati LA, Stariolo R, Kitron U. Strong host-feeding preferences of the vector *Triatoma infestans* modified by vector density: implications for the epidemiology of Chagas disease. *PLoS neglected tropical diseases*. 2009;3(5):e447. PubMed PMID: 19478849. Pubmed Central PMCID: 2682203.
2. Kollien AH, Schaub GA. The development of *Tripanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitology today*. 2000 Sep;16(9):381-7. PubMed PMID: 10951597.
3. O. WH. <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/info/en/index.html>. 2006.
4. Levine ND, Corliss JO, Cox FE, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, et al. A newly revised classification of the protozoa. *The Journal of protozoology*. 1980 Feb;27(1):37-58. PubMed PMID: 6989987.
5. Wurzner R. Complement and infectious diseases. *Contributions to microbiology*. 2003;10:1-17. PubMed PMID: 12530318.
6. Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell research*. 2010 Jan;20(1):34-50. PubMed PMID: 20010915.
7. Molina H, Holers VM, Li B, Fung Y, Mariathasan S, Goellner J, et al. Markedly impaired humoral immune response in mice deficient in complement receptors 1 and 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996 Apr 16;93(8):3357-61. PubMed PMID: 8622941. Pubmed Central PMCID: 39612.
8. Amara U, Flierl MA, Rittirsch D, Klos A, Chen H, Acker B, et al. Molecular intercommunication between the complement and coagulation systems. *Journal of immunology*. 2010 Nov 1;185(9):5628-36. PubMed PMID: 20870944. Pubmed Central PMCID: 3123139.
9. Qu H, Ricklin D, Lambris JD. Recent developments in low molecular weight complement inhibitors. *Molecular immunology*. 2009 Dec;47(2-3):185-95. PubMed PMID: 19800693. Pubmed Central PMCID: 2788007.
10. Wagner E, Frank MM. Therapeutic potential of complement modulation. *Nature reviews Drug discovery*. 2010 Jan;9(1):43-56. PubMed PMID: 19960015.
11. Lambris JD, Ricklin D, Geisbrecht BV. Complement evasion by human pathogens. *Nature reviews Microbiology*. 2008 Feb;6(2):132-42. PubMed PMID: 18197169. Pubmed Central PMCID: 2814840.
12. Walport MJ. Complement. First of two parts. *The New England journal of medicine*. 2001 Apr 5;344(14):1058-66. PubMed PMID: 11287977.
13. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature immunology*. 2010 Sep;11(9):785-97. PubMed PMID: 20720586. Pubmed Central PMCID: 2924908.
14. Sim RB, Tsiftoglou SA. Proteases of the complement system. *Biochemical Society transactions*. 2004 Feb;32(Pt 1):21-7. PubMed PMID: 14748705.
15. R W. Interactions between mannose-binding lectin and MASPs during complement activation by the lectin pathway. *Immunobiology*. 2007;212:289-99.
16. Sorensen R, Thiel S, Jensenius JC. Mannan-binding-lectin-associated serine proteases, characteristics and disease associations. *Springer seminars in immunopathology*. 2005 Nov;27(3):299-319. PubMed PMID: 16189649.

17. Kocsis A, Kekesi KA, Szasz R, Vegh BM, Balczer J, Dobo J, et al. Selective inhibition of the lectin pathway of complement with phage display selected peptides against mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 and -2: significant contribution of MASP-1 to lectin pathway activation. *Journal of immunology*. 2010 Oct 1;185(7):4169-78. PubMed PMID: 20817870.
18. Walport MJ. Complement. Second of two parts. *The New England journal of medicine*. 2001 Apr 12;344(15):1140-4. PubMed PMID: 11297706.
19. Sarma JV, Ward PA. The complement system. *Cell and tissue research*. 2011 Jan;343(1):227-35. PubMed PMID: 20838815. Pubmed Central PMCID: 3097465.
20. Joiner K, Brown E, Hammer C, Warren K, Frank M. Studies on the mechanism of bacterial resistance to complement-mediated killing. III. C5b-9 deposits stably on rough and type 7 *S. pneumoniae* without causing bacterial killing. *Journal of immunology*. 1983 Feb;130(2):845-9. PubMed PMID: 6848598.
21. Kraiczy P, Wurzner R. Complement escape of human pathogenic bacteria by acquisition of complement regulators. *Molecular immunology*. 2006 Jan;43(1-2):31-44. PubMed PMID: 16011850.
22. Inal JM. Parasite interaction with host complement: beyond attack regulation. *Trends in parasitology*. 2004 Sep;20(9):407-12. PubMed PMID: 15324730.
23. Bernet J, Mullick J, Singh AK, Sahu A. Viral mimicry of the complement system. *Journal of biosciences*. 2003 Apr;28(3):249-64. PubMed PMID: 12734404.
24. Mark L, Spiller OB, Villoutreix BO, Blom AM. Kaposi's sarcoma-associated herpes virus complement control protein: KCP--complement inhibition and more. *Molecular immunology*. 2007 Jan;44(1-3):11-22. PubMed PMID: 16905191.
25. Blom AM, Hallstrom T, Riesbeck K. Complement evasion strategies of pathogens-acquisition of inhibitors and beyond. *Molecular immunology*. 2009 Sep;46(14):2808-17. PubMed PMID: 19477524.
26. Terao Y, Mori Y, Yamaguchi M, Shimizu Y, Ooe K, Hamada S, et al. Group A streptococcal cysteine protease degrades C3 (C3b) and contributes to evasion of innate immunity. *The Journal of biological chemistry*. 2008 Mar 7;283(10):6253-60. PubMed PMID: 18160402.
27. Nielsen K, Sheppard J. Activation of complement by trypanosomes. *Experientia*. 1977 Jun 15;33(6):769-71. PubMed PMID: 330194.
28. Nogueira N, Bianco C, Cohn Z. Studies on the selective lysis and purification of *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of experimental medicine*. 1975 Jul 1;142(1):224-9. PubMed PMID: 807672. Pubmed Central PMCID: 2189871.
29. Anziano DF, Dalmaso AP, Lelchuk R, Vasquez C. Role of complement in immune lysis of *Trypanosoma cruzi*. *Infection and immunity*. 1972 Nov;6(5):860-4. PubMed PMID: 4564786. Pubmed Central PMCID: 422621.
30. Navin TR, Krug EC, Pearson RD. Effect of immunoglobulin M from normal human serum on *Leishmania donovani* promastigote agglutination, complement-mediated killing, and phagocytosis by human monocytes. *Infection and immunity*. 1989 Apr;57(4):1343-6. PubMed PMID: 2925255. Pubmed Central PMCID: 313275.
31. Pearson RD, Steigbigel RT. Mechanism of lethal effect of human serum upon *Leishmania donovani*. *Journal of immunology*. 1980 Nov;125(5):2195-201. PubMed PMID: 7430624.
32. Mosser DM, Edelson PJ. Activation of the alternative complement pathway by *Leishmania* promastigotes: parasite lysis and attachment to macrophages. *Journal of immunology*. 1984 Mar;132(3):1501-5. PubMed PMID: 6363545.

33. Dominguez M, Moreno I, Lopez-Trascasa M, Torano A. Complement interaction with trypanosomatid promastigotes in normal human serum. *The Journal of experimental medicine*. 2002 Feb 18;195(4):451-9. PubMed PMID: 11854358. Pubmed Central PMCID: 2193616.
34. Borst P. Antigenic variation and allelic exclusion. *Cell*. 2002 Apr 5;109(1):5-8. PubMed PMID: 11955440.
35. Rudenko G. Maintaining the protective variant surface glycoprotein coat of African trypanosomes. *Biochemical Society transactions*. 2005 Nov;33(Pt 5):981-2. PubMed PMID: 16246026. Pubmed Central PMCID: 3381281.
36. Rudenko G, Blundell PA, Taylor MC, Kieft R, Borst P. VSG gene expression site control in insect form *Trypanosoma brucei*. *The EMBO journal*. 1994 Nov 15;13(22):5470-82. PubMed PMID: 7957113. Pubmed Central PMCID: 395505.
37. Devine DV, Falk RJ, Balber AE. Restriction of the alternative pathway of human complement by intact *Trypanosoma brucei* subsp. *gambiense*. *Infection and immunity*. 1986 Apr;52(1):223-9. PubMed PMID: 3633873. Pubmed Central PMCID: 262223.
38. Cestari Idos S, Evans-Osses I, Freitas JC, Inal JM, Ramirez MI. Complement C2 receptor inhibitor trispanning confers an increased ability to resist complement-mediated lysis in *Tripanosoma cruzi*. *The Journal of infectious diseases*. 2008 Nov 1;198(9):1276-83. PubMed PMID: 18781865.
39. Ferreira V, Molina MC, Valck C, Rojas A, Aguilar L, Ramirez G, et al. Role of calreticulin from parasites in its interaction with vertebrate hosts. *Molecular immunology*. 2004 Mar;40(17):1279-91. PubMed PMID: 15128045.
40. Ferreira V, Valck C, Sanchez G, Gingras A, Tzima S, Molina MC, et al. The classical activation pathway of the human complement system is specifically inhibited by calreticulin from *Tripanosoma cruzi*. *Journal of immunology*. 2004 Mar 1;172(5):3042-50. PubMed PMID: 14978109.
41. Ramirez G, Valck C, Molina MC, Ribeiro CH, Lopez N, Sanchez G, et al. *Tripanosoma cruzi* calreticulin: a novel virulence factor that binds complement C1 on the parasite surface and promotes infectivity. *Immunobiology*. 2011 Jan-Feb;216(1-2):265-73. PubMed PMID: 20472323.
42. Norris KA. Stable transfection of *Tripanosoma cruzi* epimastigotes with the trypanomastigote-specific complement regulatory protein cDNA confers complement resistance. *Infection and immunity*. 1998 Jun;66(6):2460-5. PubMed PMID: 9596703. Pubmed Central PMCID: 108225.
43. Cestari I, Ansa-Addo E, Deolindo P, Inal JM, Ramirez MI. *Tripanosoma cruzi* immune evasion mediated by host cell-derived microvesicles. *Journal of immunology*. 2012 Feb 15;188(4):1942-52. PubMed PMID: 22262654.
44. Cestari Idos S, Krarup A, Sim RB, Inal JM, Ramirez MI. Role of early lectin pathway activation in the complement-mediated killing of *Tripanosoma cruzi*. *Molecular immunology*. 2009 Dec;47(2-3):426-37. PubMed PMID: 19783051.
45. Cestari I, Ramirez MI. Inefficient complement system clearance of *Tripanosoma cruzi* metacyclic trypanomastigotes enables resistant strains to invade eukaryotic cells. *PloS one*. 2010;5(3):e9721. PubMed PMID: 20300530. Pubmed Central PMCID: 2838796.
46. Puente XS, Sanchez LM, Gutierrez-Fernandez A, Velasco G, Lopez-Otin C. A genomic view of the complexity of mammalian proteolytic systems. *Biochemical Society transactions*. 2005 Apr;33(Pt 2):331-4. PubMed PMID: 15787599.
47. Neurath H. Evolution of proteolytic enzymes. *Science*. 1984 Apr 27;224(4647):350-7. PubMed PMID: 6369538.

48. Lopez-Otin C, Bond JS. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *The Journal of biological chemistry*. 2008 Nov 7;283(45):30433-7. PubMed PMID: 18650443. Pubmed Central PMCID: 2576539.
49. Page MJ, Di Cera E. Serine peptidases: classification, structure and function. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2008 Apr;65(7-8):1220-36. PubMed PMID: 18259688.
50. Hedstrom L. Serine protease mechanism and specificity. *Chemical reviews*. 2002 Dec;102(12):4501-24. PubMed PMID: 12475199.
51. Krem MM, Di Cera E. Evolution of enzyme cascades from embryonic development to blood coagulation. *Trends in biochemical sciences*. 2002 Feb;27(2):67-74. PubMed PMID: 11852243.
52. Gettins PG. Keeping the serpin machine running smoothly. *Genome research*. 2000 Dec;10(12):1833-5. PubMed PMID: 11116079.
53. Patston PA. Serpins and other serine protease inhibitors. *Immunology today*. 2000 Jul;21(7):354. PubMed PMID: 10871878.
54. Potempa J, Korzus E, Travis J. The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *The Journal of biological chemistry*. 1994 Jun 10;269(23):15957-60. PubMed PMID: 8206889.
55. Hunt LT, Dayhoff MO. A surprising new protein superfamily containing ovalbumin, antithrombin-III, and alpha 1-proteinase inhibitor. *Biochemical and biophysical research communications*. 1980 Jul 31;95(2):864-71. PubMed PMID: 6968211.
56. Bode W HR. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur J Biochem*. 1992;204(204):433-51.
57. Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *The Biochemical journal*. 2004 Mar 15;378(Pt 3):705-16. PubMed PMID: 14705960. Pubmed Central PMCID: 1224039.
58. Gettins PG. Serpin structure, mechanism, and function. *Chemical reviews*. 2002 Dec;102(12):4751-804. PubMed PMID: 12475206.
59. Sottrup-Jensen L. Alpha-macroglobulins: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation. *The Journal of biological chemistry*. 1989 Jul 15;264(20):11539-42. PubMed PMID: 2473064.
60. Krowarsch D, Cierpicki T, Jelen F, Otlewski J. Canonical protein inhibitors of serine proteases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2003 Nov;60(11):2427-44. PubMed PMID: 14625687.
61. Laskowski M, Jr. Protein inhibitors of serine proteinases--mechanism and classification. *Advances in experimental medicine and biology*. 1986;199:1-17. PubMed PMID: 3541508.
62. Jackson RM, Russell RB. The serine protease inhibitor canonical loop conformation: examples found in extracellular hydrolases, toxins, cytokines and viral proteins. *Journal of molecular biology*. 2000 Feb 18;296(2):325-34. PubMed PMID: 10669590.
63. Pike RN, Bottomley SP, Irving JA, Bird PI, Whisstock JC. Serpins: finely balanced conformational traps. *IUBMB life*. 2002 Jul;54(1):1-7. PubMed PMID: 12387568.
64. Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PG, et al. The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *The Journal of biological chemistry*. 2001 Sep 7;276(36):33293-6. PubMed PMID: 11435447.

65. van Gent D, Sharp P, Morgan K, Kalsheker N. Serpins: structure, function and molecular evolution. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2003 Nov;35(11):1536-47. PubMed PMID: 12824063.
66. Dobo J, Harmat V, Beinrohr L, Sebestyen E, Zavodszky P, Gal P. MASP-1, a promiscuous complement protease: structure of its catalytic region reveals the basis of its broad specificity. *Journal of immunology*. 2009 Jul 15;183(2):1207-14. PubMed PMID: 19564340.
67. Gal P, Dobo J, Beinrohr L, Pal G, Zavodszky P. Inhibition of the serine proteases of the complement system. *Advances in experimental medicine and biology*. 2013;734:23-40. PubMed PMID: 22990693.
68. Camargo EP. Growth and Differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of Metacyclic Trypanosomes in Liquid Media. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 1964 May-Jun;6:93-100. PubMed PMID: 14177814.
69. MA S. A simple method to purify biologically and antigenically preserved bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* using DEAE-cellulose columns. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1983;78:317-33.
70. Cestari I, Evans-Osses I, Schlapbach LJ, de Messias-Reason I, Ramirez MI. Mechanisms of complement lectin pathway activation and resistance by trypanosomatid parasites. *Molecular immunology*. 2013 Apr;53(4):328-34. PubMed PMID: 23063472.
71. Brittingham A, Morrison CJ, McMaster WR, McGwire BS, Chang KP, Mosser DM. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *Journal of immunology*. 1995 Sep 15;155(6):3102-11. PubMed PMID: 7673725.
72. Joiner KA. Complement evasion by bacteria and parasites. *Annual review of microbiology*. 1988;42:201-30. PubMed PMID: 3059994.
73. Tambourgi DV, Kipnis TL, da Silva WD, Joiner KA, Sher A, Heath S, et al. A partial cDNA clone of trypomastigote decay-accelerating factor (T-DAF), a developmentally regulated complement inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, has genetic and functional similarities to the human complement inhibitor DAF. *Infection and immunity*. 1993 Sep;61(9):3656-63. PubMed PMID: 7689538. Pubmed Central PMCID: 281061.