



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - RIO CLARO



---

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

---

**DANIEL OUTON QUINA**

**LECTINOMA DE TRYPANOSOMA CRUZI:  
NOVA FERRAMENTA PARA CARACTERIZAÇÃO  
DAS DISCRETE TYPING UNITS (DTUs)**

Rio Claro  
2017



DANIEL OUTON QUINA

**LECTINOMA DE TRYPANOSOMA CRUZI: NOVA  
FERRAMENTA PARA CARACTERIZAÇÃO DAS DISCRETE  
TYPING UNITS (DTUs)**

**Orientador:** Prof. Dr. Giuseppe Palmisano

**Co-orientador:** Prof. Dr. Mario Sérgio Palma

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas.

**Rio Claro  
2017**

574.23 Quina, Daniel Outon  
Q6L Lectinoma de Trypanosoma cruzi: nova ferramenta para  
caracterização das Discrete typing units (DTUs) / Daniel Outon Quina. -  
Rio Claro, 2017  
37 f. : il., figs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (licenciatura e bacharelado - Ciências  
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de  
Rio Claro

Orientador: Giuseppe Palmisano  
Coorientador: Mario Sérgio Palma

1. Parasitologia. 2. Lectin blotting. 3. Lectinoma. 4. Proteínas  
glicosiladas. 5. Doença de Chagas. 6. Discrete typing units. I. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Prof. Dr. Giuseppe Palmisano por todo o suporte, apoio e orientação durante o trabalho, ao Prof. Dr. Mario Sérgio Palma pela ajuda e coorientação, a chefe do departamento de parasitologia Prof. Dra. Sirlei Daffre por todo o apoio durante a IC, a Dra. Rebeca Kawahara por todo os ensinamentos e experiência compartilhada, que foram de grande valia. Ao Simon Ngao e Gilberto Plack por toda a ajuda, a todos os colegas do laboratório e amigos da graduação que foram essenciais e a Dra. Marta por ceder as cepas para a realização do trabalho.

## RESUMO

O *Trypanosoma cruzi* causa uma infecção conhecida como doença de chagas. Ele possui seis subdivisões genéticas, as *Discrete Typing Units* (DTUs Tc I a VI), que possuem características distintas como sua distribuição geográfica e manifestações clínicas. As DTUs podem ser diferenciadas por meio de marcadores genéticos, moleculares ou imunológicos. Também é conhecido que a membrana do *T. cruzi* possui uma vasta gama de proteínas glicosiladas envolvidos na sua relação com o hospedeiro, tornando-as bons alvos para a diferenciação das *Discrete Typing Units*. Neste trabalho, investigou-se a possibilidade de utilizar o padrão de glicosilação das proteínas de *T. cruzi*, determinada a partir da interação com lectinas específicas, para discriminar entre cepas de DTU diferentes do parasito: sylvio X10/4 (Tc I), G mucurae (Tc I), Y (Tc II), esmeraldo (Tc II), M-6241 CI 6 (Tc III), *T. cruzi* III (Tc III), Can III CI 1 (Tc IV), Jose Julio (Tc IV), NR CI 3 (Tc V), 92:80 CI 2 (Tc V), CL 14 (Tc VI), CL Brener CL 1 (Tc VI) e bat CI 1.1 (Tc bat). Como demonstrado por análises de cluster dos padrões de glicosilação das proteínas do parasita, a técnica desenvolvida neste trabalho foi de fato capaz de agrupar junto os parasitos pertencentes a cinco das seis DTU. A maior distância entre as duas cepas da DTU Tc IV talvez reflita uma diferença sutil no padrão de glicosilação das proteínas que não se manifestou na classificação DTU baseada na genética molecular. Esse estudo demonstra a capacidade do *lectin blotting* de complementar as técnicas moleculares na diferenciação das cepas de *T. cruzi*.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. OBJETIVOS	9
2.1. Objetivos Específicos	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS	10
3.1. Cepas	10
3.2. Cultivo Celular	10
3.3. Lectinas	10
3.4. Extração de Proteínas	11
3.5. SDS-PAGE	11
3.6. Lectin Blotting	12
3.7. Análise de Dados	12
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
4.1. Estudo Preliminar de Viabilidade	13
4.2. Estudo Principal	14
4.2.1. Grupo I	14
4.2.2. Grupo II	16
5. CONCLUSÕES	17
6. REFERÊNCIAS	18
7. APÊNDICE	21
7.1. Imagens de Membranas PVDF do Grupo I	21
7.2. Imagens de Membranas PVDF do Grupo II	27
7.3. Intensidades de Bandas das Membranas PVDF do Grupo I	33
7.4. Intensidades de Bandas das Membranas PVDF do Grupo II	35

## INTRODUÇÃO

O *Trypanosoma cruzi* é um parasita e protozoário que causa uma infecção conhecida como doença de chagas, que foi descoberta em 1909 por Carlos Chagas. Ela é principalmente transmitida por um vetor hematófago da família triatomínea e o seu genoma já foi sequenciado e descrito (EL-SAYED, 2005).

Atualmente aproximadamente de seis a sete milhões de pessoas no mundo são afetadas pela doença, principalmente em países da América Latina (WHO, 2017). Já em países que são considerados não endêmicos a doença vem crescendo devido a processos de migração e de globalização, além de existirem diversas formas indiretas de contaminação, como por transfusão de sangue ou por transplante de órgãos (GASCON et al. 2010; SCHMUNIS & YADON, 2010).

O ciclo de vida do parasita alterna entre o vetor triatomínea hematófago onde o *T. cruzi* encontra-se em duas fases: epimastigota que é replicativa e trypomastigota metacíclico que não se divide. Há também uma vasta gama de hospedeiros mamíferos, onde o parasita encontra-se nas fases trypomastigotas que não se multiplicam e ficam na corrente sanguínea e amastigotas intracelulares que são replicativos (RASSI et al. 2010).

A manifestação clínica da doença se caracteriza por três fases, uma aguda, uma latente e uma crônica. Inicialmente ocorre uma fase aguda da doença causada pela infecção primária ou reativação da fase crônica, em que os níveis de parasitemia são muito elevados, o que causa diversos sintomas físicos como febre, dores abdominais e musculares e algumas lesões cutâneas (ANDRADE et al. 2011; ANDRADE et al. 2014). Em seguida ocorre uma fase assintomática, que pode durar por vários anos sem nenhuma das complicações clínicas que a doença pode causar. Dependendo de fatores como a genética, tanto do parasita quanto do hospedeiro, além de fatores culturais e geográficos (CAMPBELL et al. 2004), a doença pode então evoluir para a fase crônica, em que se observa problemas cardíacos como cardiomiopatia e problemas no trato digestivo como megaesôfago ou megacólon (RASSI et al. 2010; BERN et al. 2011; ANDRADE et al. 2014).

O tratamento da doença causada pelo *T. cruzi* ainda não possui vacinas ou novas drogas. Atualmente consiste no uso das drogas benznidazol e nifurtimox, muito eficazes principalmente na fase aguda, porém nem tanto na fase crônica, que

demanda então um tratamento prolongado e pode levar a efeitos colaterais severos (DUMONTEIL et al. 2012). Isso mostra a necessidade por novos alvos terapêuticos para o tratamento da doença crônica (CHATELAIN, 2017).

O *T. cruzi* possui seis subdivisões genéticas, as *Discrete Typing Units* (DTUs) Tc-I a Tc-VI, que afetam humanos, e uma a Tc-bat que afeta morcegos (ZINGALES et al. 2009; ABRAS et al. 2017). A estrutura genética da sua população é bem estável e por tanto ocorre pouca hibridização (TIBAYRENC & AYALA, 2015). Cada uma das subdivisões genéticas possuem características distintas, envolvendo desde distribuição geográfica, eco epidemiologia a manifestações clínicas características (ZINGALES et al. 2012; BRENIERE et al. 2016). Além disso, cada DTU pode ser identificada e separada com precisão quando se utilizam marcadores genéticos, moleculares ou imunológicos (OLIVEIRA et al. 1998).

Para caracterizar cada uma das DTUs de *T. cruzi* a expressão genica é amplamente utilizada (TELLERIA et al. 2010). Porém alguns pontos negativos podem ser observados, como a necessidade de amplificação e sequenciamento, o que acaba por elevar os custos, e somado ainda a dificuldade de se encontrar protocolos reprodutíveis e padronizados (HIGUERA et al. 2013). Portanto, novos meios para a caracterização das DTUs são muito importantes, e podem ajudar a entender as relações entre parasita e hospedeiro e, possivelmente, melhorar o tratamento de pessoas infectadas (QUIJANO-HERNANDEZ & DUMONTEIL, 2011).

As interações entre o *T. Cruzi* e o hospedeiro são muito importantes para que o ciclo de vida do parasito seja completo e principalmente carboidratos são cruciais. Assim sendo, a glicosilação de proteínas mostram-se de grande importância nas interações entre parasito e hospedeiro (DE SOUZA et al. 2010; RODRIGUES et al. 2015).

A glicosilação de proteínas é uma importante modificação pós-translacional formada por uma ligação covalente entre uma cadeia de oligossacarídeos e a proteína. A glicosilação de proteínas pode ser classificada como N-ligadas, que envolve uma ligação na cadeia lateral da asparagina, e O-ligadas, que envolve uma ligação na cadeia lateral de serina/treonina. Glicoproteínas são principalmente localizadas na membrana das células e são secretadas no meio extracelular. As proteínas glicosiladas modulam vários processos fisiológicos e patológicos, além de representar um alvo interessante para tratamentos terapêuticos e imunológicos.

A membrana do *T. cruzi* possui uma vasta gama de proteínas glicosiladas e glicolípídios ligados a ela por meio de ancoras de Glicosilfosfatidilinositol (GPI) (DE LEDERKREMER & AGUSTI, 2009). Essas moléculas presentes na membrana são muito importantes na ativação do sistema imune inato e na ativação da resposta imune do hospedeiro (NARDI, 2016).

Alves e Colli (1974) foram um dos primeiros a mostrar que a superfície do *T. cruzi* é coberta por açúcares, eles demonstraram isso com a utilização de concanavalin A (Con A), que promovia aglutinação nas formas epimastigotas. Pereira et al. (1980) também olhou para a superfície da célula de *T. cruzi* por meio de ensaios de aglutinação e de ligação com lectinas, o que acabou mostrando que as lectinas possuem diferentes seletividades dependendo da forma do parasito, epimastigota ou triomastigota, além de mostrar a presença de resíduos de ácido sialico por meio da utilização de *wheat germ agglutinin* (WGA) (PEREIRA et al. 1980).

A diferença na glicosilação de proteínas nos estágios de vida do *T. cruzi* foi estudado por Souto-Padrón e Souza (1989) no contexto funcional de interação entre parasita-macrófago. Por meio da utilização de tunicamicina eles demonstraram que a modulação de proteínas N-glicosiladas aumentavam em 70% a infecção em epimastigotas e diminuíam em 27% em tripomastigotas, e no tratamento dos macrófagos aumentou em 65% a ingestão de epimastigotas e diminuiu em 45% a de tripomastigotas (SOUTO-PADRON & de SOUZA, 1989).

As moléculas mais abundantes na superfície celular das formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas são as glico inositol fosfolípídios (GIPLs) e uma família de proteínas muito O-glicosiladas e glicoproteínas da mesma família das mucinas, com ligação de glicosilfosfatidilinositol, (GPI-ancoradas) (COLLI & ALVES, 1999). A importância e função desses componentes encontrados em grande quantidade na membrana do *T. cruzi* foram discutidas em vários trabalhos (ALMEIDA et al. 1999; FERGUSON, 1999; FRASCH, 2000; ACOSTA-SERRANO, 2001; BUSCAGLIA et al. 2006; de LEDERKREMER & AGUSTI, 2009; GIORGI & de LEDERKREMER, 2011).

Previato et al. (2013) mostrou como é a glicosilação O-ligada em *T. cruzi*, que apresenta uma expressão de enzimas que não estão presentes no hospedeiro, como a pp- $\alpha$ -GlcNAcT e as trans-sialidases, que vem sendo exploradas como alvos para

tratamentos menos tóxicos e mais efetivos da doença de chagas. Também reforçou a importância da glicosilação de proteínas como uma ferramenta para entender o parasito, e os resultados clínicos que podem ser observados (MENDONÇA-PREVIATO et al. 2013).

Em uma análise do glicoproteoma de *T. cruzi* realizada em nosso grupo, foram identificados glicopeptídeos específicos em cada estágio do parasito. Além disso, também foi observada a expressão de proteínas associadas a vias metabólicas de síntese de glicoconjugados e metabolismo de carboidratos. As ligações N-glicosilada e O-glicosilada mostraram ser relacionadas ao estágio de vida do parasita Epimastigota e Tripomastigota, sendo que o segundo encontra-se em maior quantidade. Num total de 690 glicoproteínas foram encontrados 1306 sítios de N-glicosilação. (ALVES et al. 2017). O glicoproteoma expresso pelo parasita está intimamente ligado a relação entre o parasita, o vetor e o hospedeiro e, com isso, pode ser considerado um bom alvo para a diferenciação das DTUs (ALVES et al. 2017).

## **OBJETIVOS**

Avaliar a diferença na glicosilação de diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*.

### **Objetivos específicos**

O presente projeto tem como objetivos específicos:

- Implementar uma plataforma de identificação do padrão de glicosilação utilizando diferentes lectinas;
- Otimizar a utilização de lectinas na identificação de padrões de glicosilação;
- Avaliar a diferença de padrão de glicosilação mapeando o padrão de bandas das diferentes lectinas;
- Relacionar o padrão de glicosilação com a origem biológica da cepa.
- Validar o método baseado em lectinas para a identificação de diferentes cepas de *T. cruzi*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Cepas

As cepas de *T. cruzi* foram obtidas da *Trypanosomatid Culture Collection* (TCC) da Universidade de São Paulo (USP). Na tabela a seguir estão listadas as cepas utilizadas.

TRYPANOSOMATID CULTURE COLLECTION (TCC) OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO (USP)			
DTU	<i>Trypanosomatid</i>	Hospedeiro	Localidade
Tc I	<i>T. cruzi sylvio X10/4</i>	<i>Homo sapiens</i>	Belem, PA, BR
Tc I	<i>T. cruzi G mucurae</i>	<i>Didelphis marsupialis</i>	Manaus, AM, BR
Tc II	<i>T. cruzi Y</i>	<i>Homo sapiens</i>	Rio Grande do Sul, RS, BR
Tc II	<i>T. cruzi esmeraldo</i>	<i>Homo sapiens</i>	São Felipe, Bahia, BR
Tc III	<i>T. cruzi M-6241 Cl 6</i>	<i>Homo sapiens</i>	Belem, PA, BR
Tc III	<i>T. cruzi III</i>	<i>Homo sapiens</i>	Carauari, AM, BR
Tc IV	<i>T. cruzi Can III Cl 1</i>	<i>Homo sapiens</i>	Belem, PA, BR
Tc IV	<i>T. cruzi Jose Julio</i>	<i>Homo sapiens</i>	Amazonia, AM, BR
Tc V	<i>T. cruzi NR Cl 3</i>	<i>Homo sapiens</i>	Bolívia
Tc V	<i>T. cruzi 92:80 Cl 2</i>	<i>Homo sapiens</i>	Bolívia, Santa Cruz
Tc VI	<i>T. cruzi CL 14</i>	<i>Triatoma infestans</i>	Rio Grande do Sul, BR
Tc VI	<i>T. cruzi CL Brener CL 1</i>	<i>Triatoma infestans</i>	Rio Grande do Sul, BR
Tc bat	<i>T. cruzi bat Cl 1.1</i>	<i>Myotis levis</i>	São Paulo, SP, BR
-	<i>T. marinkellei</i>	<i>Carollia perspicillata</i>	Monte Negro, RO, BR
-	<i>T. dionisii</i>	<i>Epitesicus brasiliensis</i>	São Paulo, SP, BR
4-	<i>T. erneyi</i>	<i>Mops condylurus</i>	Moçambique, Chupanga, Sofala
Tr B	<i>T. rangeli AM-80</i>	<i>Homo sapiens</i>	Amazonia, AM, BR

Tabela 1. Cepas obtidas da *Trypanosomatid Culture Collection* (TCC) da Universidade de São Paulo (USP), e informações das respectivas DTU, hospedeiros e localidades.

### Cultivo Celular

As formas epimastigotas,  $1 \times 10^8$  células, das cepas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT (*Liver Infusion-Tryptose*) suplementado com 10% de soro fetal bovino, em pH 7,2 a 28°C. As formas epimastigotas foram lavadas duas vezes em PBS (*Phosphate-Buffered Saline*), pH 7.2, e centrifugadas a 8000xg por 10 minutos em temperatura ambiente (Camargo 1964).

### Lectinas

As lectinas que foram utilizadas no presente estudo estão listadas na tabela abaixo.

Lectina	Abreviação	Glicanos Reconhecidos
Concanavalin A	ConA	$\alpha$ -D-manose, $\alpha$ -D-glucose
Sambucus Nigra Agglutinin	SNA	( $\alpha$ -2,6) Ácido Siálico
Maackia Amurensis Lectin II	MALII	( $\alpha$ -2,3) Ácido Siálico
Wheat Germ Agglutinin	WGA	N-Acetilglucosamina
Aleuria Aurantia Lectin	AAL	Fucose ( $\alpha$ -1,6) a N-acetilglucosamina ou Fucose ( $\alpha$ -1,3) a N-acetilgalactosamina
Ricinus Communis Agglutinin I	RCAI	Galactose, N-acetilgalactosamina

Tabela 2. Lectinas utilizadas, e os respectivos glicanos que são reconhecidos.

### Extração de proteínas

As células ( $1 \times 10^8$ ) de cada cepa foram lisadas para a extração das proteínas totais utilizando 500 $\mu$ L de Ureia 8M, coquetel inibidor de fosfatase (Sigma-Aldrich) e coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich). Em sequência, foi realizada uma repetição de três ciclos de sonicação (Sonics Vibra Cell VCX 130; 30% da potência máxima) de quinze segundos, com intervalos de um minuto. A concentração de proteínas no sobrenadante foi então quantificada por meio do método Qubit (Thermo Fisher).

### SDS-PAGE

Para a separação das amostras, utilizamos eletroforese. O gel é dividido em duas partes, uma para a corrida e uma para o empacotamento da amostra. O gel para a corrida foi feito na concentração de 10%, com solução de acrilamida 30%, e o gel de empacotamento na concentração de 5%. Cada uma das amostras de proteína foi misturada com a devida quantidade de tampão laemmli para o SDS-PAGE a 95 °C, e foi aplicada no gel a quantidade de 10 $\mu$ g de proteína por canaleta.

As proteínas totais de cada amostra foram então separadas por peso molecular no SDS-PAGE 10%, com voltagem fixa em 100 volts, sendo que as proteínas maiores ficam mais ao topo do gel e as menores mais abaixo. Um dos géis foi revelado com Coomassie blue para confirmar a integridade e a separação das proteínas.

### **Lectin Blotting**

As proteínas, separadas por peso molecular no gel, foram transferidas do gel para uma membrana de PVDF. Nesse processo, o gel e a membrana ficam em contato e é aplicada uma corrente elétrica com amperagem mantida constante em 300mA por duas horas.

Para o *blotting*, a membrana foi bloqueada em BSA 5% e TBS-0.1% Triton X-100 (TBS-T) por 60 minutos. Em seguida a lectina dissolvida em BSA 3% e TBS-T foi adicionada em uma proporção de 1:2000 e incubada por 16 horas. Após este passo, foi incubado por uma hora com o anticorpo secundário, streptavidina conjugada com *horseradish peroxidase*, dissolvido em BSA 5% e TBS-T também na proporção de 1:2000. A membrana então foi revelada utilizando substrato para a enzima peroxidase conjugada ao anticorpo secundário.

Em sequência, incubou-se a membrana por 30 minutos com solução de stripping (25 mM glicina, SDS 1%, pH 2), que tem a finalidade de remover as lectinas previamente ligadas. Depois a membrana foi lavada exaustivamente com tampão TBS-T para remover qualquer presença do tampão anterior. Então repetiu-se o bloqueio da membrana para incubar a membrana com uma outra lectina.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

### **Análise de dados**

As imagens foram registradas utilizando o equipamento BioRad ChemiDoc XRS+ Molecular Imager. A análise das imagens foi realizada no software também da BioRad Image Lab Software 6.0.

A normalização foi feita a partir da concentração de proteína aplicada no gel. Cada região do gel foi dividida pelo seu respectivo peso molecular e a intensidade das bandas nas regiões foi medida, o que permitiu comparar as diferenças entre as cepas com cada lectina.

Para melhor entendimento dos dados obtidos foi realizada uma análise multivariada de *Principal Component Analysis* (PCA) para separar as cepas utilizando o programa Perseus versão 1.5.4.1.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Estudo Preliminar de Viabilidade

Primeiramente foi realizado um experimento com menos cepas, apenas *G mucuræ* (Tc I), Silvio X10/4 (Tc I), Esmeraldo (Tc II) e Jose Julio (Tc IV), que foram escolhidas por representarem três diferentes DTU com duas representarem a mesma DTU. Neste ensaio as seis lectinas foram utilizadas e leite em pó na concentração de 5% foi utilizado na solução de bloqueio e também na solução onde foi colocado o anticorpo secundário, ao invés de BSA. Também foi realizada análise multivariada de PCA.

Como mostrado na figura 1, a análise por PCA sugeria que o diferente perfil de glicosilação observados por meio das lectinas nas quatro cepas esta correlacionada mais ao hospedeiro em que o *Tripanossoma cruzi* foi obtido que em relação a DTU em que a cepa se encontra. Pois a cepa *G mucuræ*, que se encontra na Tc I, está mais distante das outras. A Jose Julio da Tc IV também se encontra distante, porém mais próxima às outras duas Esmeraldo (Tc II) e Silvio X10/4 (Tc I), que se mostraram ser as mais relacionadas.

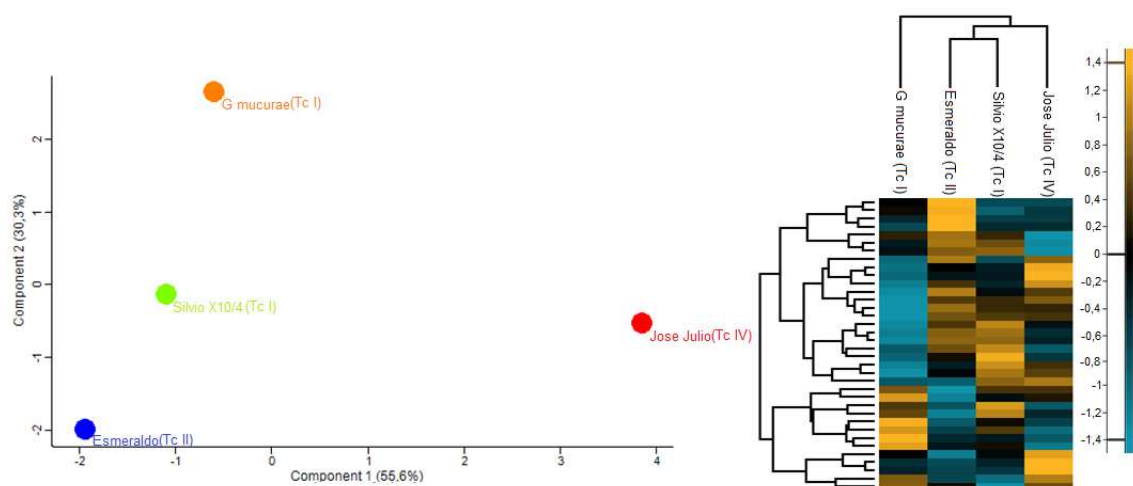


Figura 1. *Principal Component Analysis* e Cluster de quatro cepas de *Tripanossoma cruzi*, *G mucuræ* (Tc I), Silvio X10/4 (Tc I), Esmeraldo (Tc II) e Jose Julio (Tc IV), mostrando a relação estabelecida entre as quatro cepas em questão.

Esses resultados preliminares indicaram que seria possível separar as diferentes cepas, porém mais em relação ao seu hospedeiro. Portanto demos prosseguimento aos experimentos aumentando o número de cepas e novamente utilizando as mesmas lectinas. Nessa sequência, não obtivemos resultados aproveitáveis devida à utilização do leite, que possui muitas glicoproteínas em sua

composição, e causava muita interferência nas membranas. Por esses motivos, mudou-se para a utilização apenas do BSA em todas as soluções ao invés de leite, o que então favoreceu bons resultados.

### **Estudo Principal**

As cepas escolhidas foram separadas em dois grupos distintos. O primeiro seria composto por treze cepas, sendo duas de cada DTU totalizando doze, e mais a cepa Tc bat. Com isso, deve ser possível observar as relações de proximidade em uma mesma DTU e comparar as distâncias entre as diferentes DTU.

Para o segundo grupo foram selecionadas de maneira aleatória quatro cepas pertencentes as DTU, que possuem o homem como hospedeiro. Além disso foram selecionadas as cepas Tc bat, marinkellei, dionisii, erneyi e rangeli AM-80 que não possuem o homem como hospedeiro, e sim outros animais, o que permite uma comparação mais voltada ao hospedeiro em questão e, portanto, a glicoproteínas específicas a esses hospedeiros.

As lectinas foram escolhidas baseadas nos glicanos para os quais elas possuem afinidade. Assim sendo, foram selecionadas seis compondo um conjunto que poderia fornecer uma ampla gama de informações a respeito dos padrões de glicosilação encontrados nas proteínas totais das cepas. Com isso, cada uma das lectinas cobre importantes sítios de glicosilação e, quando somadas as seis, delineiam um bom perfil de glicosilação das proteínas.

### **Grupo I**

O experimento foi dividido em duas etapas. Na primeira, utilizou-se nove cepas. Quatro das cepas encontrados em humanos foram selecionadas de maneira aleatória entre os DTU: T. cruzi sylvio X10/4 (Tc I), T. cruzi Y (Tc II), T. cruzi III (Tc III) e T. cruzi NR Cl 3 (Tc V). As outras cinco cepas foram provenientes de outros animais hospedeiros: T. cruzi bat Cl 1.1, T. marinkellei, T. dionisii, T. erneyi e T. rangeli AM-80. Para cada duas lectinas foram utilizadas três membranas de PVDF.

As imagens das membranas de PVDF foram subdivididas seguindo intervalos de peso molecular como referência. A intensidade total em cada intervalo de peso molecular foi medida em cada lane e os valores tabelados (Tabelas X e Y do Apêndice). Esses valores foram utilizados como os dados de entrada para a análise de componentes principais (PCA). Os valores de intensidade foram transformados

por  $\log_2(x)$  e depois normalizados por Z score, para então realizar a análise de cluster.

O resultado da PCA (Figura 2) coloca Erneyi e T.cruzi III distante das outras cepas. NR CI3 e Y estão mais próximas e Bat CI 1.1 e Dionisii também. Entretanto, todas as cepas estão separadas na PCA demonstrando a diferente glicosilação nas várias amostras.

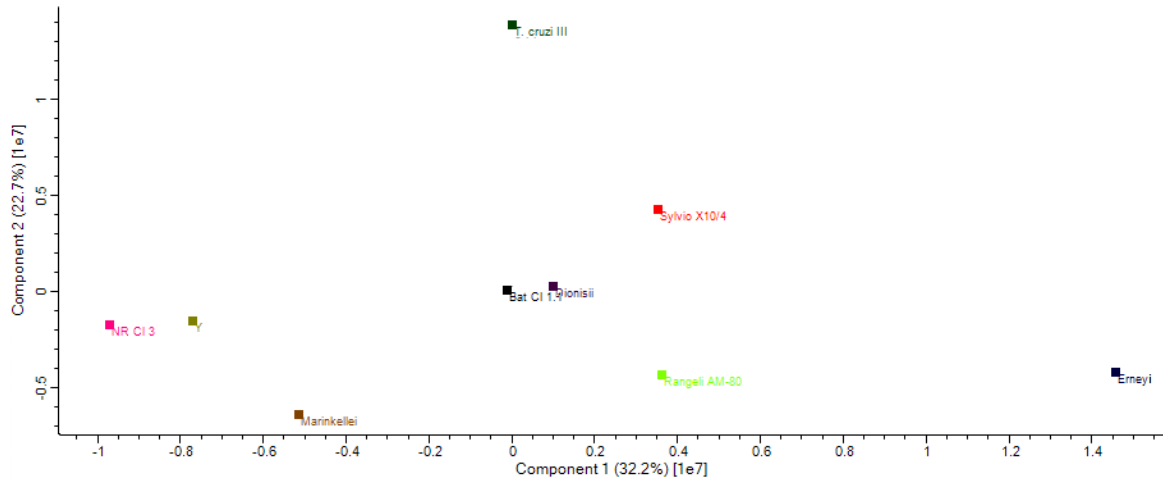


Figura 2. *Principal Component Analysis* com duas componentes, mostrando a relação entre as nove cepas: sylvio X10/4 (Tc I), Y (Tc II), T. cruzi III (Tc III), NR CI 3 (Tc V), bat CI 1.1 (Tc bat), marinkellei, dionisii, erneyi e rangeli AM-80.

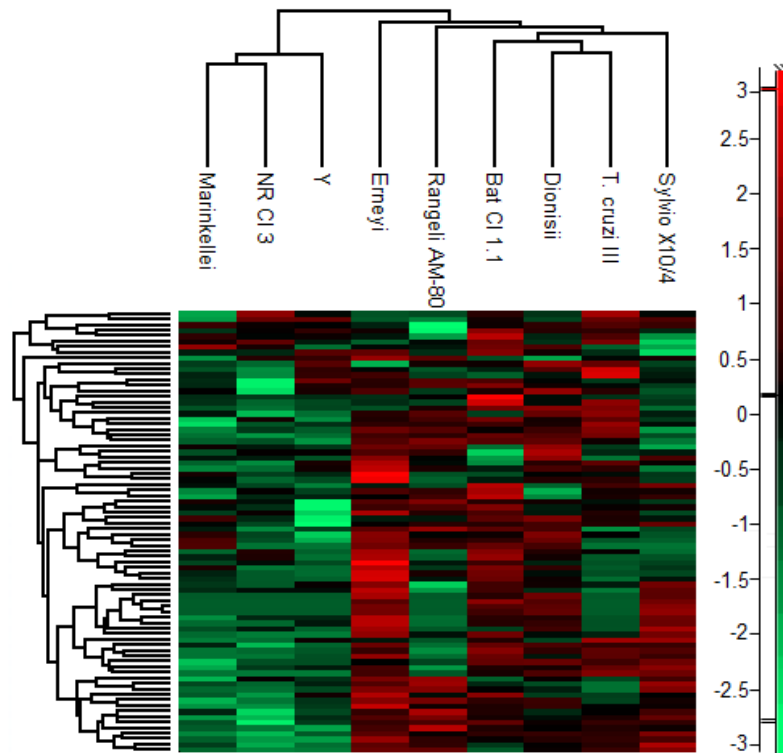


Figura 3. Cluster que mostra a relação entre as nove cepas sylvio X10/4 (Tc I), Y (Tc II), T. cruzi III (Tc III), NR CI 3 (Tc V), bat CI 1.1 (Tc bat), marinkellei, dionisii, erneyi e rangeli AM-80.

A análise de *cluster* (Figura 3) mostra a possível interrelação entre cada uma das amostras. Nesta análise, as cepas Erneyi, Rangeli AM-80, Bat CI 1.1, Dionisii, T. cruzi III e Sylvio X10/4 encontram-se próximas e separadas das cepas Y, NR CI 3 e Marinkellei.

## Grupo II

Na segunda etapa utilizou-se treze cepas, duas de cada uma das seis DTU mais a Tc bat. Como no caso do Grupo I, foram utilizadas três membranas para cada duas lectinas, as intensidades totais em cada faixa de peso molecular foram tabeladas para cada lane (Apêndice Tabela X) e as intensidades utilizadas como os dados de entrada para PCA. Nesse caso, o PCA (Figura 4) mostra uma proximidade entre as DTU II, III, IV e V. Também mostra uma proximidade entre a DTU I e a Tc bat, e um afastamento da DTU IV, que encontra-se bem mais distante.

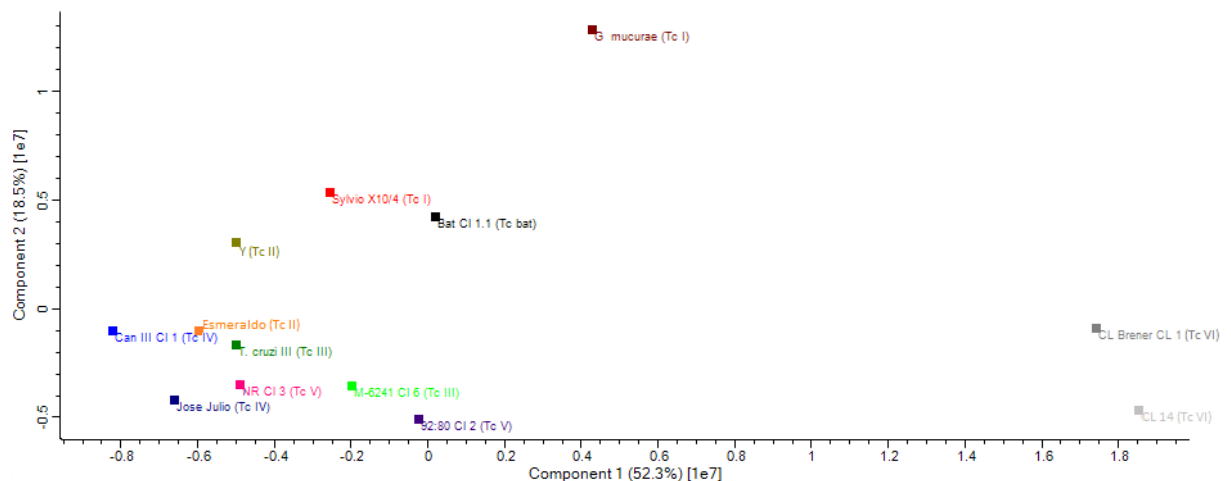


Figura 4. *Principal Component Analysis* com duas componentes, mostrando a relação entre as treze cepas: sylvio X10/4 (Tc I), G mucurae (Tc I), Y (Tc II), esmeraldo (Tc II), M-6241 CI 6 (Tc III), T. cruzi III (Tc III), Can III CI 1 (Tc IV), Jose Julio (Tc IV), NR CI 3 (Tc V), 92:80 CI 2 (Tc V), CL 14 (Tc VI), CL Brener CL 1 (Tc VI) e bat CI 1.1 (Tc bat).

A análise de cluster (Figura 5) mostra claramente uma separação de cada DTU e da Tc bat, considerando que as cepas da DTU I ficaram bem próximas e da DTU VI também ficaram próximas e ambas próximas a Tc bat. As DTU II, III, V e IV ficaram também próximas. A única que não seguiu a mesma tendência foi a José Julio da DTU IV, que não se agrupou com a outra amostra da DTU IV.

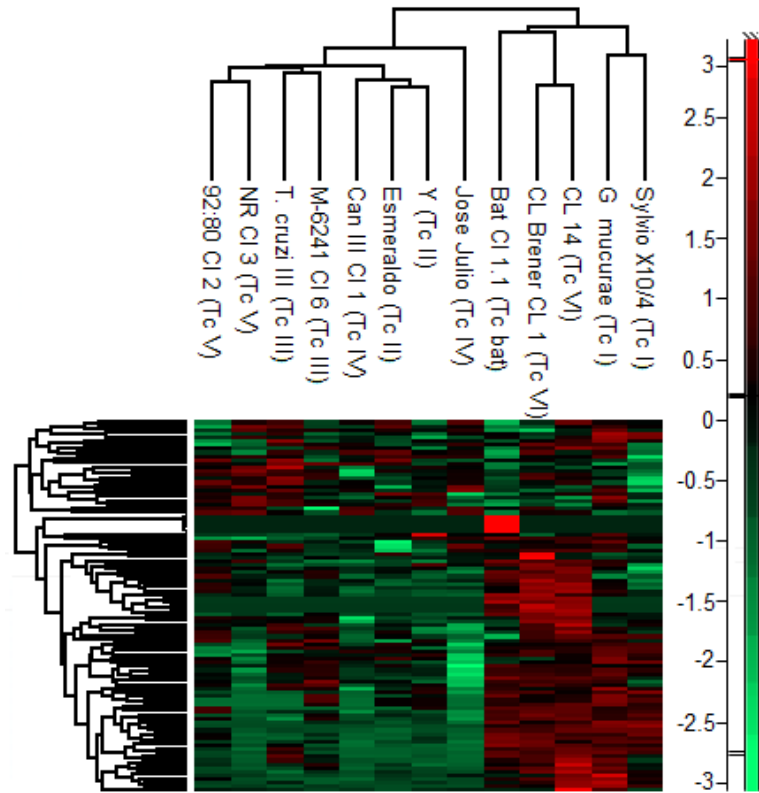


Figura 5. Cluster que mostra a relação entre cada uma das treze cepas quando comparadas, sendo elas sylvio X10/4 (Tc I), G mucuriae (Tc I), Y (Tc II), esmeraldo (Tc II), M-6241 CI 6 (Tc III), T. cruzi III (Tc III), Can III CI 1 (Tc IV), Jose Julio (Tc IV), NR CI 3 (Tc V), 92:80 CI 2 (Tc V), CL 14 (Tc VI), CL Brener CL 1 (Tc VI) e bat CI 1.1 (Tc bat).

## CONCLUSÕES

A hipótese inicial deste trabalho visava investigar a possibilidade de utilizar o padrão de glicosilação das proteínas de *T. cruzi*, determinada a partir da interação com lectinas específicas, para discriminar entre cepas de DTU diferentes do parasito. Como demonstrado pelas análises de cluster das Figuras 3 e 5, a técnica desenvolvida neste trabalho foi de fato capaz de agrupar junto os parasitos pertencentes a cinco das seis DTU mas não em função do hospedeiro de origem dos parasitos. No caso da DTU IV, a maior distância entre as cepas Can III CI 1 e José Julio talvez reflita uma diferença sutil no padrão de glicosilação das proteínas que não se manifestou na classificação DTU baseada na genética molecular. Esse estudo demonstra a capacidade do *lectin blotting* de complementar as técnicas moleculares na diferenciação das cepas de *T. cruzi*. Mais estudos estão sendo realizados para identificar as proteínas glicosiladas e os sítios de glicosilação das diferentes cepas e correlacionar com a genética evolutiva dessas cepas.

## REFERÊNCIAS

- Abras, A., M. Gallego, C. Munoz, N. A. Juiz, J. C. Ramirez, C. I. Cura, S. Tebar, A. Fernandez-Arevalo, M. J. Pinazo, L. de la Torre, E. Posada, F. Navarro, P. Espinal, C. Ballart, M. Portus, J. Gascon and A. G. Schijman (2017). "Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (DTUs) in Latin-American migrants in Barcelona (Spain)." *Parasitol Int* 66(2): 83-88.
- Acosta-Serrano, A., Almeida, I. C., Freitas-Junior, L. H., Yoshida, N., and Schenkman, S. (2001) The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: structure and biological roles. *Molecular and biochemical parasitology* 114, 143-150.
- Almeida, I. C., Gazzinelli, R., Ferguson, M. A., and Travassos, L. R. (1999) *Trypanosoma cruzi* mucins: potential functions of a complex structure. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 94 Suppl 1, 173-176.
- Alves, M. J., R. Kawahara, R. Viner, W. Colli, E. C. Mattos, M. Thaysen-Andersen, M. R. Larsen and G. Palmisano (2017). "Comprehensive glycoprofiling of the epimastigote and trypomastigote stages of *Trypanosoma cruzi*." *J Proteomics* 151: 182-192.
- Alves, M. J., Colli, W. (1974) Agglutination of *Trypanosoma cruzi* by concanavalin A. *The Journal of protozoology* 21, 575-578.
- Andrade, D. V., K. J. Gollob and W. O. Dutra (2014). "Acute chagas disease: new global challenges for an old neglected disease." *PLoS Negl Trop Dis* 8(7): e3010.
- Andrade, J. P. de, Marin Neto, J. A., Paola, A. A. V. de, Vilas-Boas, F., Oliveira, G. M. M., Bacal, F., Bocchi, E. A., Almeida, D. R., Fragata Filho, A. A., Moreira, M. da C. V., Xavier, S. S., Oliveira Junior, W. A. de, & Dias, J. C. P. (2011). I Diretriz Latino-Americana para o diagnóstico e tratamento da cardiopatia chagásica: resumo executivo. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 96(6): 434-442.
- Bern, C., D. L. Martin and R. H. Gilman (2011). "Acute and congenital Chagas disease." *Adv Parasitol* 75: 19-47.
- Breniere, S. F., Waleckx, E., and Barnabe, C. (2016) Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. *PLoS neglected tropical diseases* 10: e0004792.
- Buscaglia, C. A., Campo, V. A., Frasc, A. C., and Di Noia, J. M. (2006) *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nature reviews. Microbiology* 4, 229-236.
- Camargo, E. P. (1964). "Growth and Differentiation in *Trypanosoma Cruzi*. I. Origin of Metacyclic *Trypanosomes* in Liquid Media." *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 6: 93-100.
- Campbell, D. A., Westenberger, S. J., and Sturm, N. R. (2004). The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. *Current molecular medicine* 4: 549-562.
- Chatelain, E. (2017) Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel? *Computational and structural biotechnology journal* 15: 98-103.
- Colli, W., and Alves, M. J. (1999) Relevant glycoconjugates on the surface of *Trypanosoma cruzi*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 94 Suppl 1, 37-49.

- de Lederkremer, R. M., and Agusti, R. (2009) Glycobiology of *Trypanosoma cruzi*. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry* 62, 311-366.
- de Souza, W., de Carvalho, T. M., and Barrias, E. S. (2010) Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *International journal of cell biology* 2010.
- Dumonteil, E., Bottazzi, M. E., Zhan, B., Heffernan, M. J., Jones, K., Valenzuela, J. G., Kamhawi, S., Ortega, J., Rosales, S. P., Lee, B. Y., Bacon, K. M., Fleischer, B., Slingsby, B. T., Cravioto, M. B., Tapia-Conyer, R., and Hotez, P. J. (2012) Accelerating the development of a therapeutic vaccine for human Chagas disease: rationale and prospects. *Expert review of vaccines* 11: 1043- 1055.
- El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Bartholomeu, D. C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A. N., Ghedin, E., Worthey, E. A., Delcher, A. L., Blandin, G., Westenberger, S. J., Caler, E., Cerqueira, G. C., Branche, C., Haas, B., Anupama, A., Arner, E., Aslund, L., Attipoe, P., Bontempi, E., Bringaud, F., Burton, P., Cadag, E., Campbell, D. A., Carrington, M., Crabtree, J., Darban, H., da Silveira, J. F., de Jong, P., Edwards, K., Englund, P. T., Fazelina, G., Feldblyum, T., Ferella, M., Frasch, A. C., Gull, K., Horn, D., Hou, L., Huang, Y., Kindlund, E., Klingbeil, M., Kluge, S., Koo, H., Lacerda, D., Levin, M. J., Lorenzi, H., Louie, T., Machado, C. R., McCulloch, R., McKenna, A., Mizuno, Y., Mottram, J. C., Nelson, S., Ochaya, S., Osoegawa, K., Pai, G., Parsons, M., Pentony, M., Pettersson, U., Pop, M., Ramirez, J. L., Rinta, J., Robertson, L., Salzberg, S. L., Sanchez, D. O., Seyler, A., Sharma, R., Shetty, J., Simpson, A. J., Sisk, E., Tammi, M. T., Tarleton, R., Teixeira, S., Van Aken, S., Vogt, C., Ward, P. N., Wickstead, B., Wortman, J., White, O., Fraser, C. M., Stuart, K. D., and Andersson, B. (2005) The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309: 409-415.
- Ferguson, M. A. (1999) The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *Journal of cell science* 112 (Pt 17), 2799-2809.
- Frasch, A. C. (2000) Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology today* 16, 282-286.
- Gascon, J., C. Bern and M. J. Pinazo (2010). "Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries." *Acta Trop* 115(1-2): 22-27.
- Giorgi, M. E., and de Lederkremer, R. M. (2011) Trans-sialidase and mucins of *Trypanosoma cruzi*: an important interplay for the parasite. *Carbohydrate research* 346, 1389-1393.
- Higuera, S. L., F. Guhl and J. D. Ramirez (2013). "Identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (DTUs) through the implementation of a high-resolution melting (HRM) genotyping assay." *Parasit Vectors* 6: 112.
- Nardy, A. F., Freire-de-Lima, C. G., Perez, A. R., and Morrot, A. (2016) Role of *Trypanosoma cruzi* Trans-sialidase on the Escape from Host Immune Surveillance. *Frontiers in microbiology* 7, 348.
- Oliveira, R. P., N. E. Broude, A. M. Macedo, C. R. Cantor, C. L. Smith and S. D. Pena (1998). "Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(7): 3776-3780.
- Pereira, M. E., Loures, M. A., Villalta, F., and Andrade, A. F. (1980) Lectin receptors as markers for *Trypanosoma cruzi*. Developmental stages and a study of the

interaction of wheat germ agglutinin with sialic acid residues on epimastigote cells. The Journal of experimental medicine 152, 1375-1392.

Quijano-Hernandez, I. and E. Dumonteil (2011). "Advances and challenges towards a vaccine against Chagas disease." Hum Vaccin 7(11): 1184-1191.

Rassi, A., Jr., A. Rassi and J. A. Marin-Neto (2010). "Chagas disease." Lancet 375(9723): 1388-1402.

Rodrigues, J. A., Acosta-Serrano, A., Aebi, M., Ferguson, M. A., Routier, F. H., Schiller, I., Soares, S., Spencer, D., Titz, A., Wilson, I. B., and Izquierdo, L. (2015) Parasite Glycobiology: A Bittersweet Symphony. PLoS pathogens 11, e1005169.

Schmunis, G. A. and Z. E. Yadon (2010). "Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem." Acta Trop 115(1-2): 14-21.

Souto-Padron, T., and de Souza, W. (1989) The effect of tunicamycin and monensin on the association of *Trypanosoma cruzi* with resident macrophages. Parasitology research 76, 98-106.

Telleria, J., D. G. Biron, J. P. Brizard, E. Demettre, M. Seveno, C. Barnabe, F. J. Ayala and M. Tibayrenc (2010). "Phylogenetic character mapping of proteomic diversity shows high correlation with subspecific phylogenetic diversity in *Trypanosoma cruzi*." Proc Natl Acad Sci U S A 107(47): 20411-20416.

Tibayrenc, M. and F. J. Ayala (2015). "The population genetics of *Trypanosoma cruzi* revisited in the light of the predominant clonal evolution model." Acta Trop 151: 156-165.

Zingales, B., S. G. Andrade, M. R. Briones, D. A. Campbell, E. Chiari, O. Fernandes, F. Guhl, E. Lages-Silva, A. M. Macedo, C. R. Machado, M. A. Miles, A. J. Romanha, N. R. Sturm, M. Tibayrenc, A. G. Schijman and M. Second Satellite (2009). "A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI." Mem Inst Oswaldo Cruz 104(7): 1051-1054.

Zingales, B., Miles, M. A., Campbell, D. A., Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M., Schijman, A. G., Llewellyn, M. S., Lages-Silva, E., Machado, C. R., Andrade, S. G., and Sturm, N. R. (2012) The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases 12: 240-253.

Zingales, B., Miles, M. A., Moraes, C. B., Luquetti, A., Guhl, F., Schijman, A. G., Ribeiro, I., Drugs for Neglected Disease, I., and Chagas Clinical Research Platform, M. (2014) Drug discovery for Chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 109: 828-833.

## APÊNDICE

### Imagens de Membranas PVDF do Grupo I:

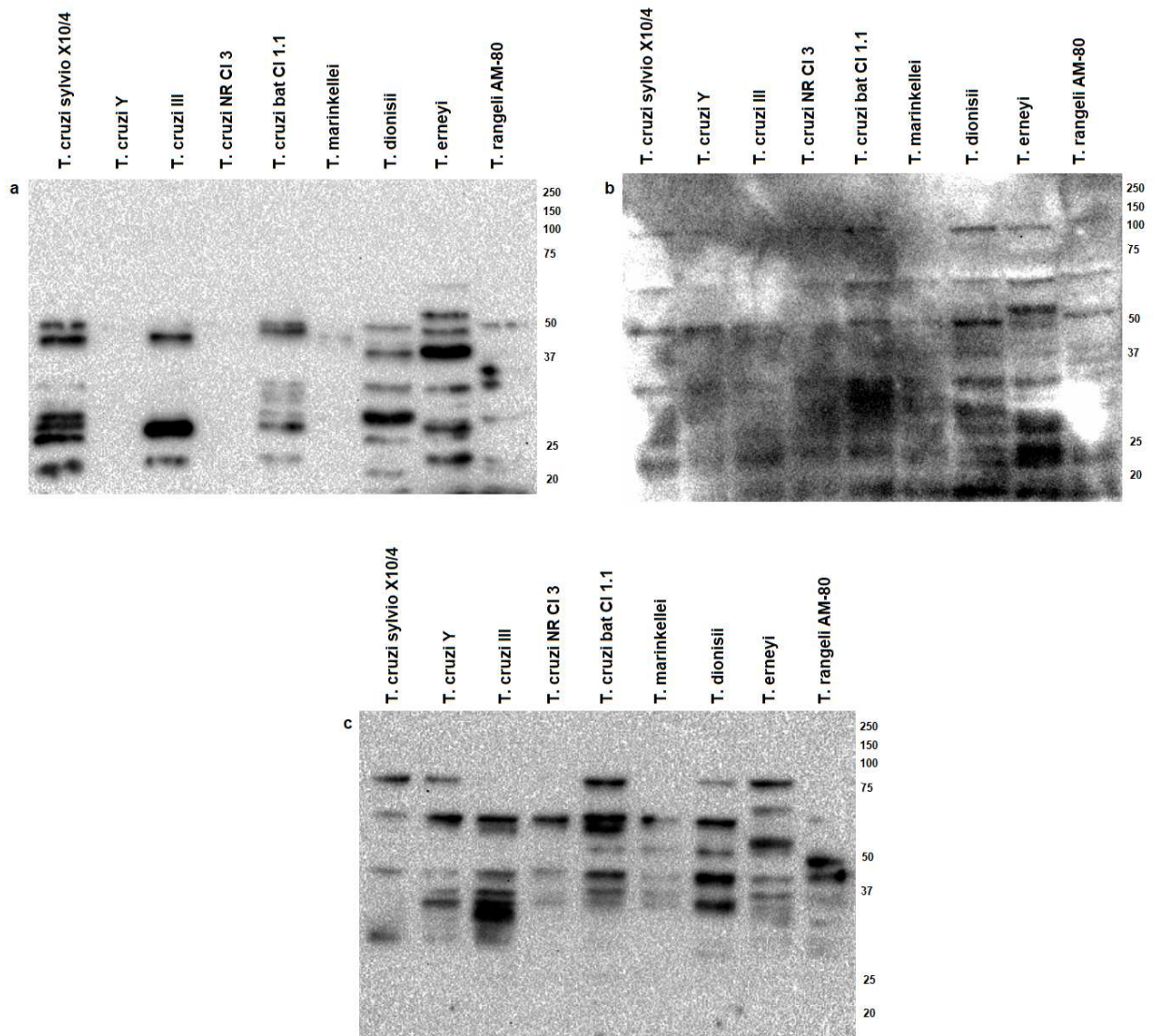


Figura 6. Resultados em triplicata (imagens **a**, **b** e **c**) de Membranas de PVDF incubadas com Maackia Amurensis Lectin II, para as 9 cepas, sendo que quatro delas pertencem as DTU e as outras cinco Tc bat, T. Marinkellei, T. Dionisii, T. Erneyi e T. rangeli AM-80. As regiões foram divididas pelo peso molecular de 250-150, 150-100, 100-75, 75-62, 62-50, 50-37, 37-31, 31-25, 25-20.

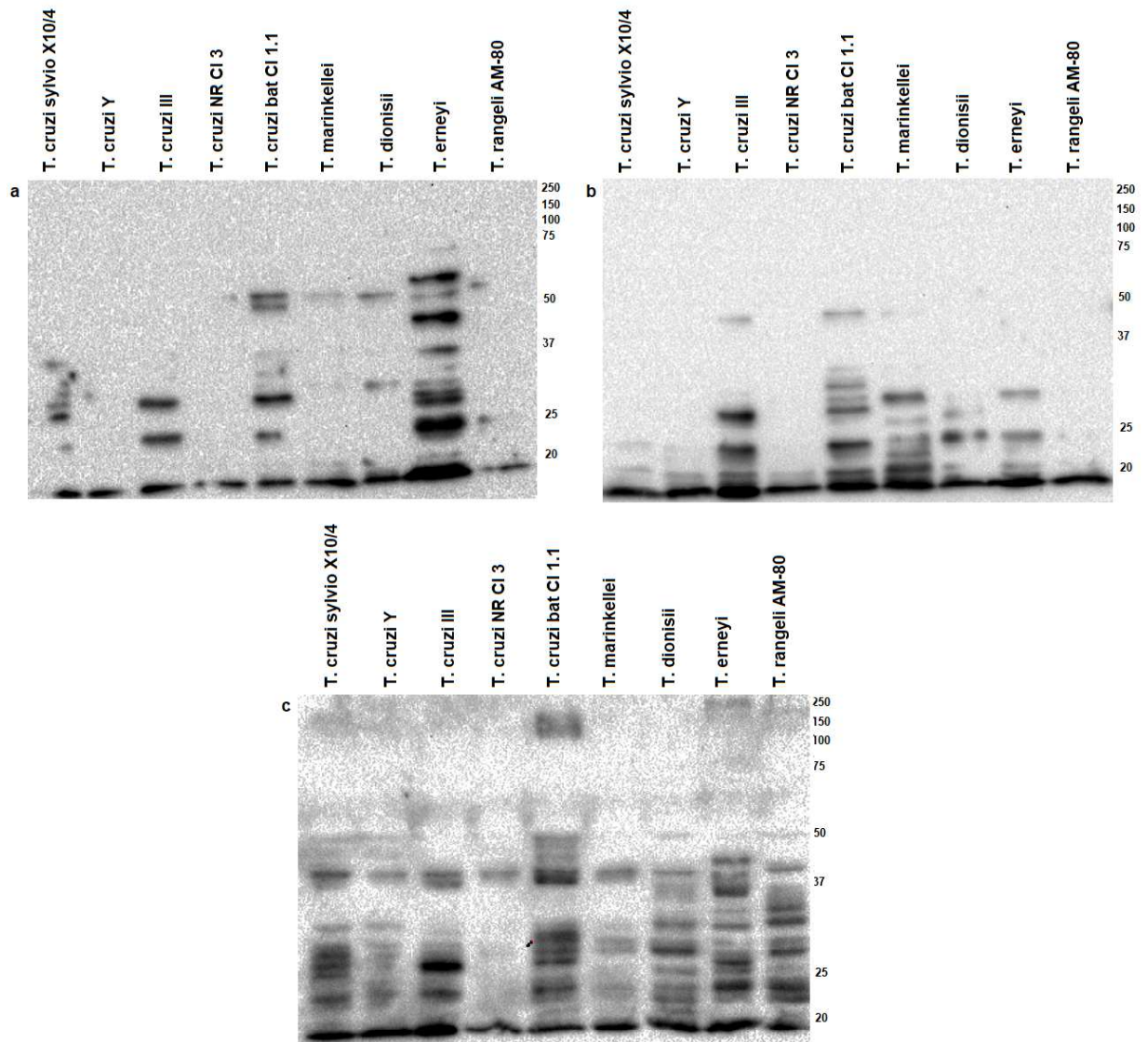


Figura 7. Resultados em triplicata (imagens **a**, **b** e **c**) de Membranas de PVDF incubadas com Ricinus Communis Agglutinin I, para as 9 cepas, sendo que quatro delas pertencem as DTU e as outras cinco Tc bat, T. Marinkellei, T. Dionisii, T. Erneyi e T. rangeli AM-80. As regiões foram divididas pelo peso molecular de 250-150, 150-100, 100-75, 75-62, 62-50, 50-37, 37-31, 31-25, 25-20.

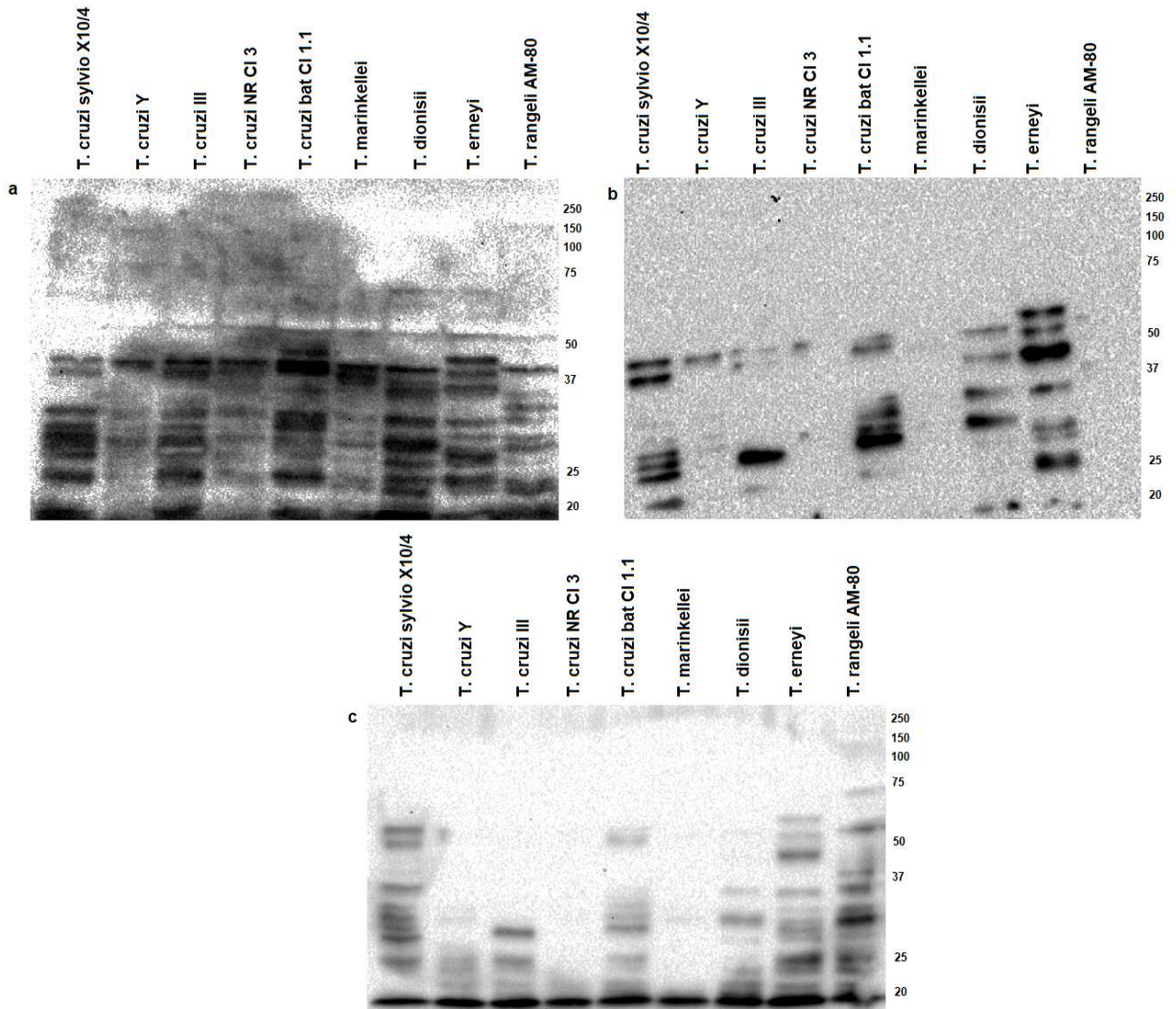


Figura 8. Resultados em triplicata (imagens **a**, **b** e **c**) de Membranas de PVDF incubadas com Wheat Germ Agglutinin, para as 9 cepas, sendo que quatro delas pertencem as DTU e as outras cinco Tc bat, *T. Marinkellei*, *T. Dionisii*, *T. Erneyi* e *T. rangeli AM-80*. As regiões foram divididas pelo peso molecular de 250-150, 150-100, 100-75, 75-62, 62-50, 50-37, 37-31, 31-25, 25-20.

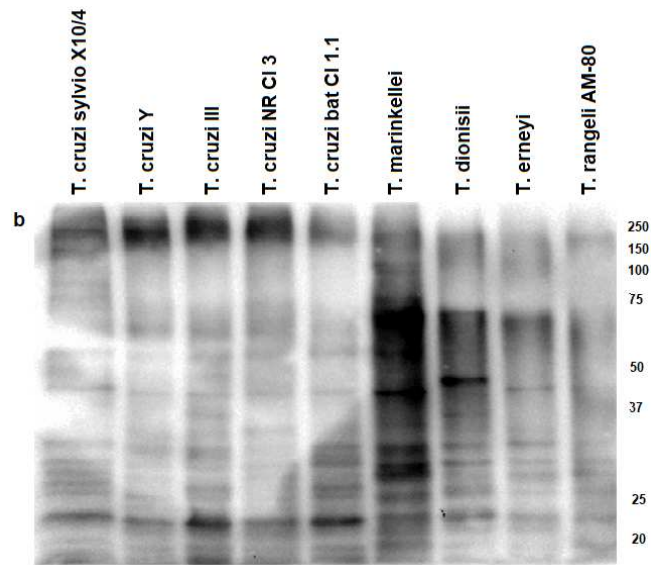


Figura 9. Resultado (imagem **a**) de Membrana de PVDF incubada com Concanavalin A, para as 9 cepas, sendo que quatro delas pertencem as DTU e as outras cinco Tc bat, T. Marinkellei, T. Dionisii, T. Erneyi e T. rangeli AM-80. As regiões foram divididas pelo peso molecular de 250-150, 150-100, 100-75, 75-62, 62-50, 50-37, 37-31, 31-25, 25-20.

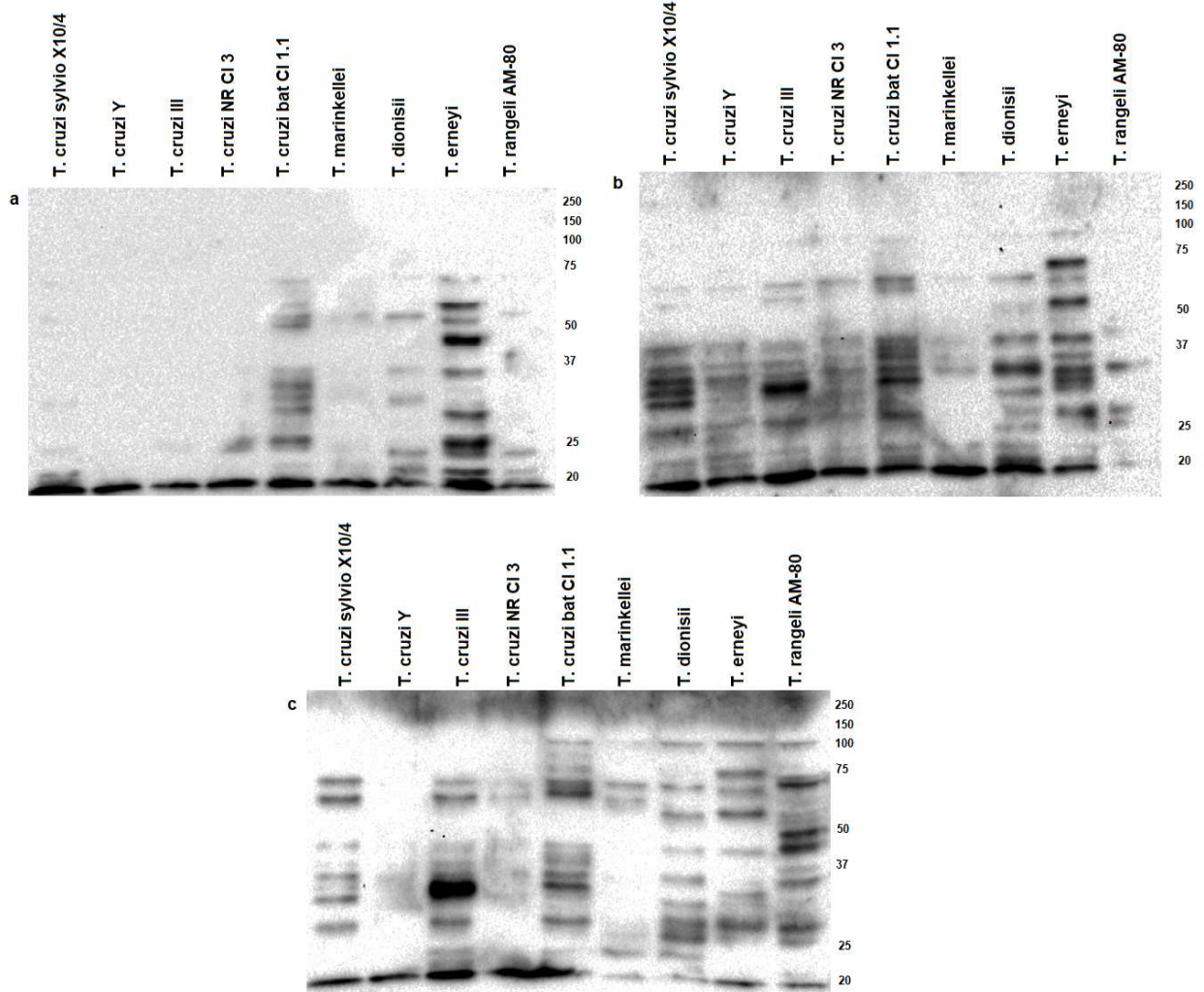


Figura 10. Resultados em triplicata (imagens **a**, **b** e **c**) de Membranas de PVDF incubadas com Aleuria Aurantia Lectin, para as 9 cepas, sendo que quatro delas pertencem as DTU e as outras cinco Tc bat, T. Marinkellei, T. Dionisii, T. Erneyi e T. rangeli AM-80. As regiões foram divididas pelo peso molecular de 250-150, 150-100, 100-75, 75-62, 62-50, 50-37, 37-31, 31-25, 25-20.

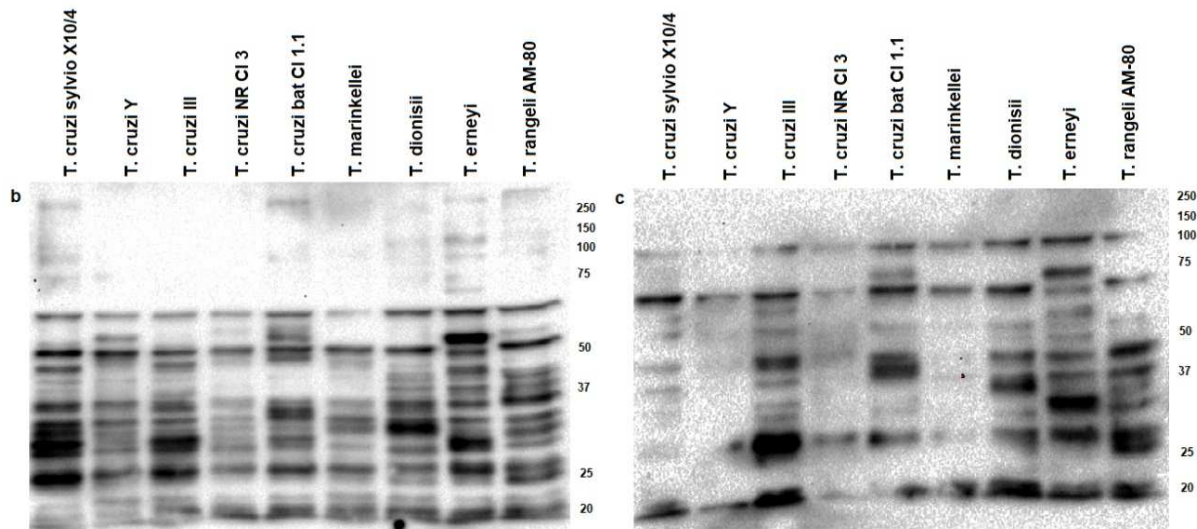


Figura 11. Resultados em duplicata (imagens **b** e **c**) de Membranas de PVDF incubadas com Ricinus Communis Agglutinin I, para as 9 cepas, sendo que quatro delas pertencem as DTU e as outras cinco Tc bat, T. Marinkellei, T. Dionisii, T. Erneyi e T. rangeli AM-80. As regiões foram divididas pelo peso molecular de 250-150, 150-100, 100-75, 75-62, 62-50, 50-37, 37-31, 31-25, 25-20.

## Imagens de Membranas PVDF do Grupo II:

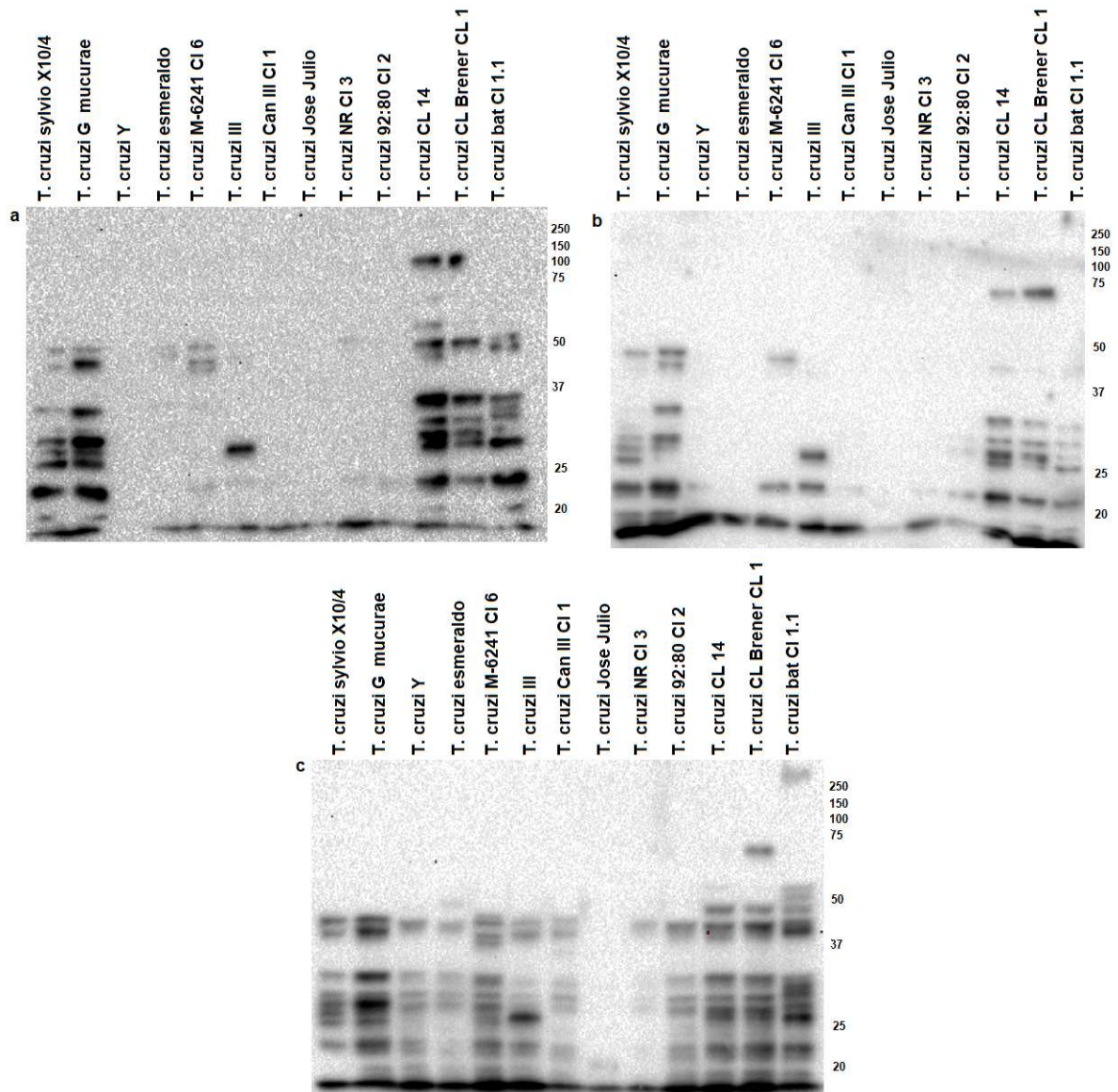


Figura 12. Resultados em triplicata (imagens **a**, **b** e **c**) de Membranas de PVDF incubadas com Ricinus Communis Agglutinin I, para as 13 cepas, sendo duas de cada DTU e a Tc bat. As regiões foram divididas pelo peso molecular de 250-150, 150-100, 100-75, 75-62, 62-50, 50-37, 37-31, 31-25, 25-20.

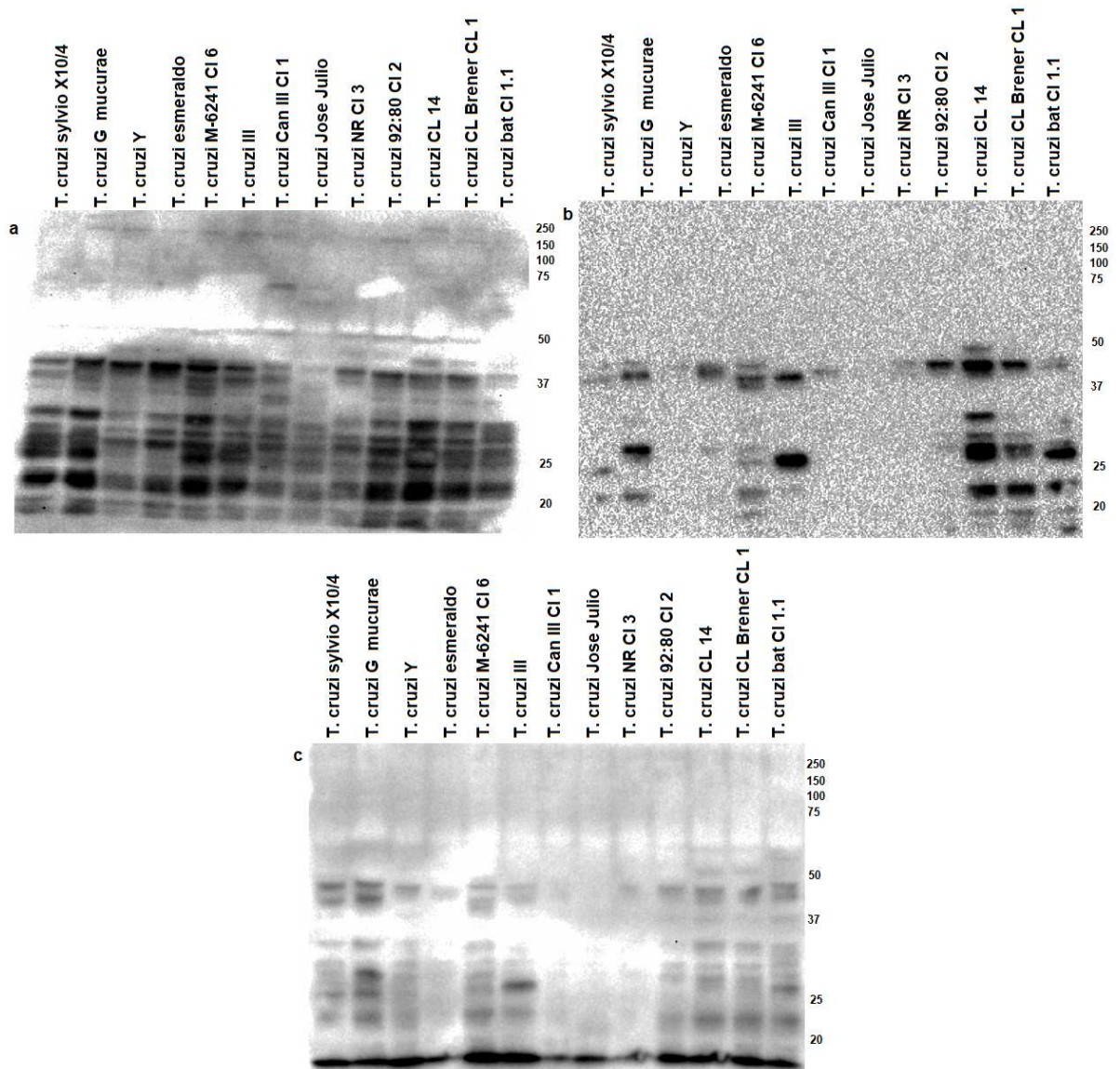


Figura 13. Resultados em triplicata (imagens **a**, **b** e **c**) de Membranas de PVDF incubadas com Wheat Germ Agglutinin, para as 13 cepas, sendo duas de cada DTU e a Tc bat. As regiões foram divididas pelo peso molecular de 250-150, 150-100, 100-75, 75-62, 62-50, 50-37, 37-31, 31-25, 25-20.

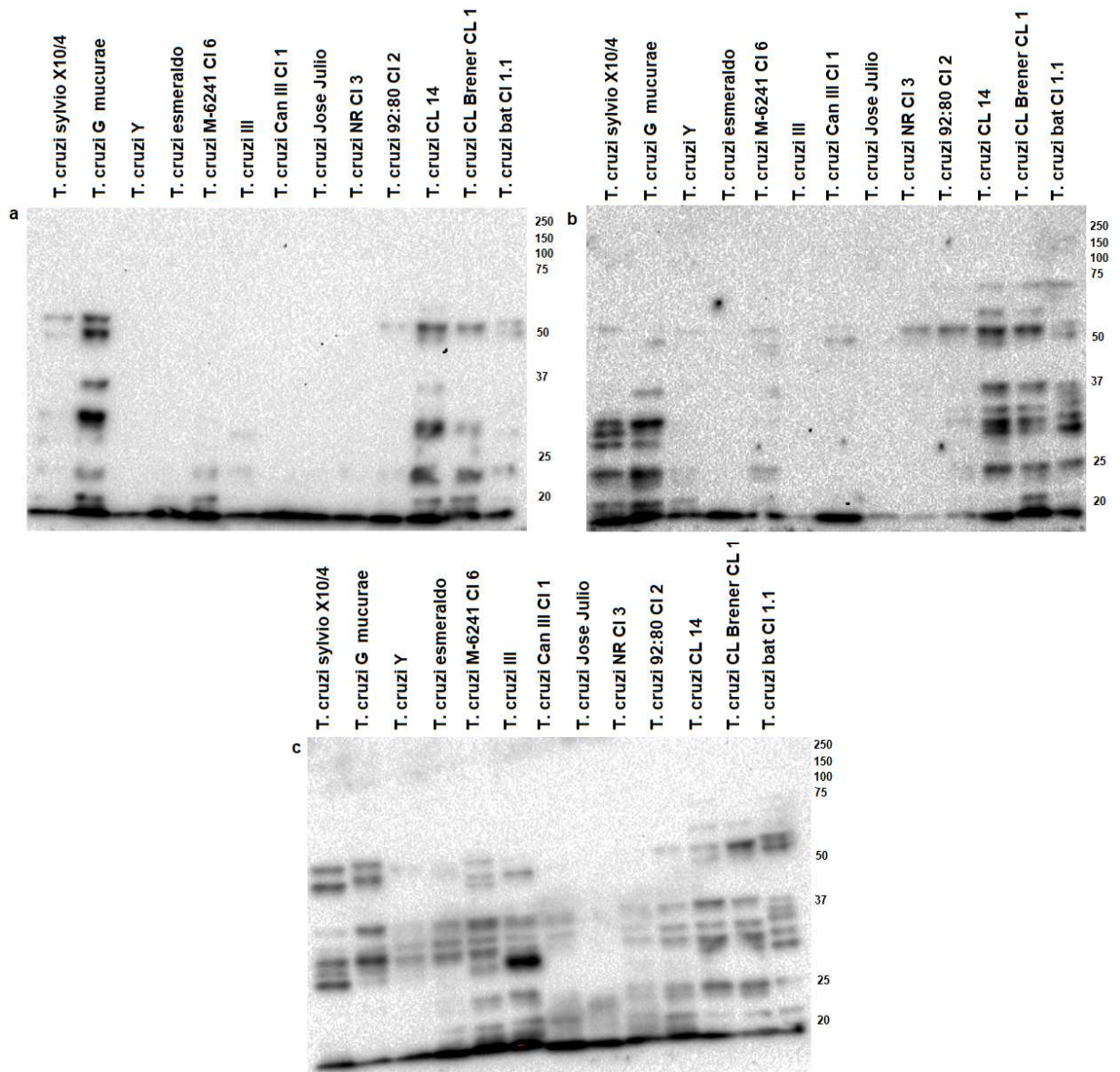


Figura 14. Resultados em triplicata (imagens **a**, **b** e **c**) de Membranas de PVDF incubadas com Aleuria Aurantia Lectin, para as 13 cepas, sendo duas de cada DTU e a Tc bat. As regiões foram divididas pelo peso molecular de 250-150, 150-100, 100-75, 75-62, 62-50, 50-37, 37-31, 31-25, 25-20.

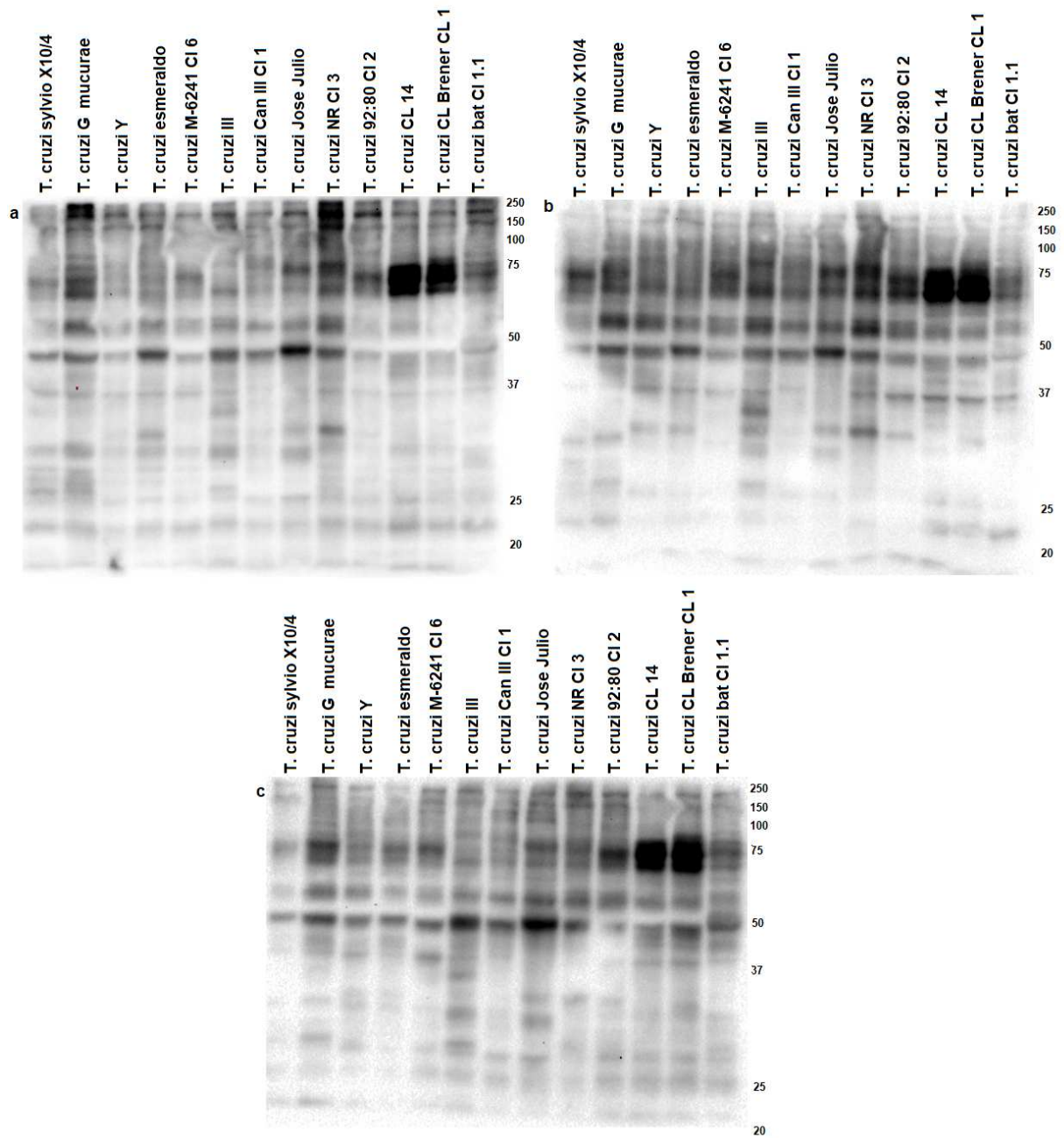


Figura 15. Resultados em triplicata (imagens **a**, **b** e **c**) de Membranas de PVDF incubadas com Concanavalin A, para as 13 cepas, sendo duas de cada DTU e a Tc bat. As regiões foram divididas pelo peso molecular de 250-150, 150-100, 100-75, 75-62, 62-50, 50-37, 37-31, 31-25, 25-20.

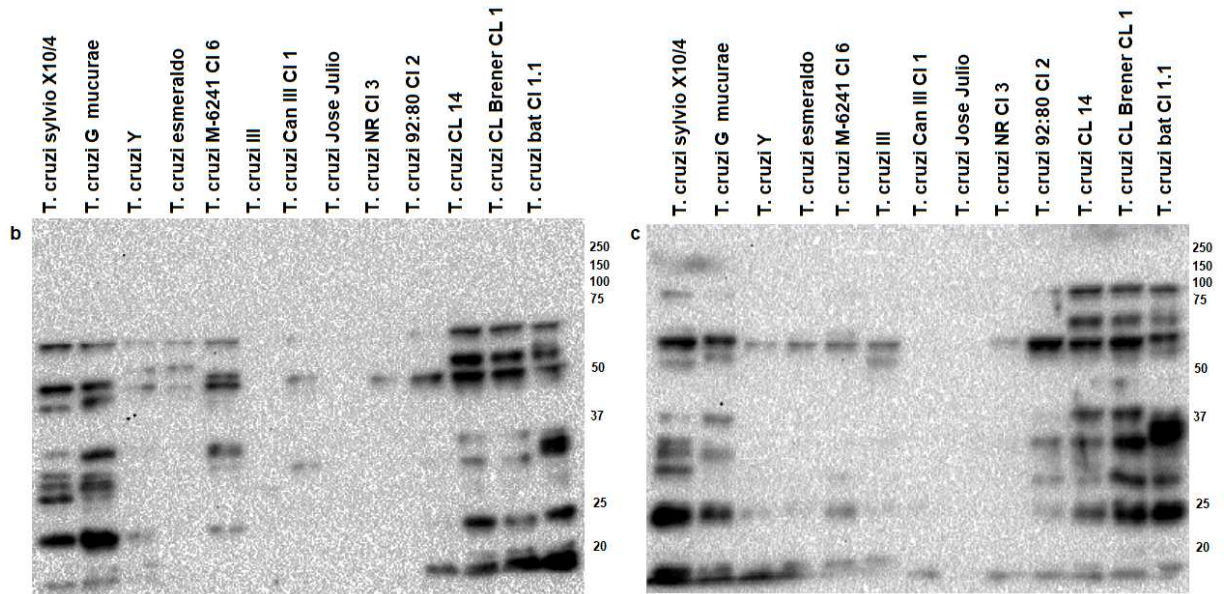


Figura 16. Resultados em duplicata (imagens **b** e **c**) de Membranas de PVDF incubadas com Sambucus Nigra Agglutinin, para as 13 cepas, sendo duas de cada DTU e a Tc bat. As regiões foram divididas pelo peso molecular de 250-150, 150-100, 100-75, 75-62, 62-50, 50-37, 37-31, 31-25, 25-20.

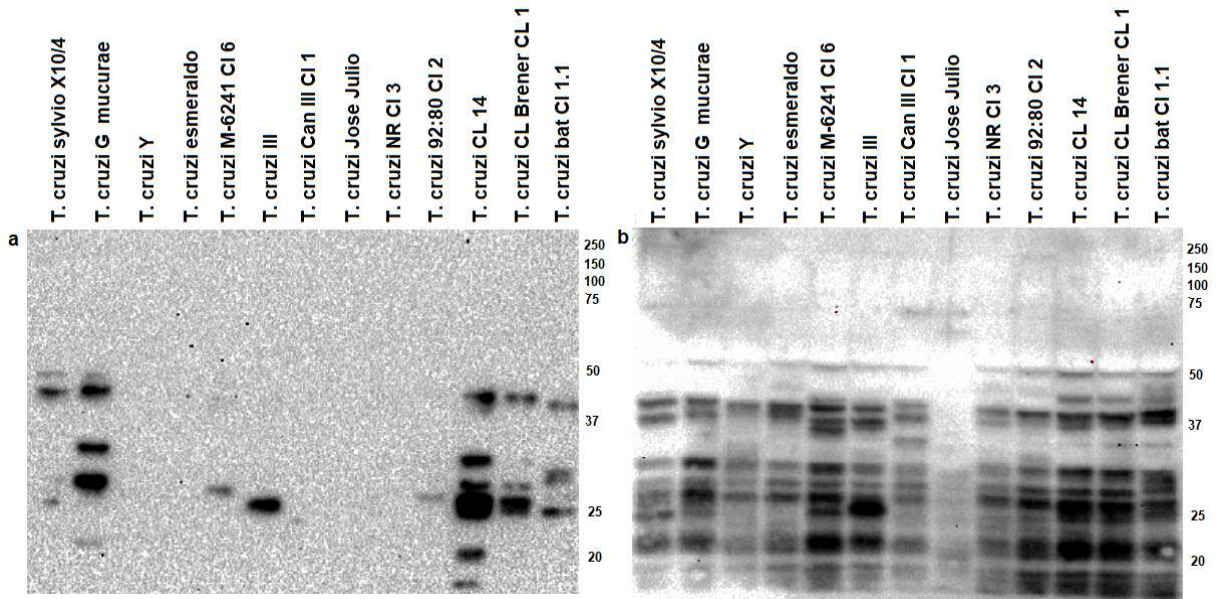


Figura 17. Resultados em duplicata (imagens **a** e **b**) de Membranas de PVDF incubadas com Maackia Amurensis Lectin II, para as 13 cepas, sendo duas de cada DTU e a Tc bat. As regiões foram divididas pelo peso molecular de 250-150, 150-100, 100-75, 75-62, 62-50, 50-37, 37-31, 31-25, 25-20.

## **Intensidades de Bandas das Membranas PVDF do Grupo I**

Tabela 3. Intensidades totais em cada faixa de peso molecular determinadas a partir da leitura das membranas de PVDF do Grupo I.

A 10W MALZ	-25-25-31		31-37		37-50		50-62		62-75		75-100		100-150		150-250	
2158	1629864	6516720	2308008	964512												
1320	91332	89244	72360													
844	710568	9330912	1578636	196632												
1561	83300	90216	80784	72396												
1994	135000	1315908	862884	927324												
344	115596	101376	193536	88452												
211	410616	3627144	1327500	247284												
1946	1220868	2870460	7239456	133512												
86	1159272	171648	158496	234144												

A 10W RCA	-25-25-31		31-37		37-50		50-62		62-75		75-100		100-150		150-250	
2158	921445	567700	160230	37310												
1320	818545	83405	63245	34580												
844	1994055	926345	55440	31850												
1561	658566	47215	68230	66780												
1994	1180165	1105810	710745	145455												
344	1402835	49525	116900	36295												
211	1880200	184310	233100	53900												
1946	9342445	2037525	2616075	1116745												
86	681835	54390	157255	60585												

A 10W WGA	-25-25-31		31-37		37-50		50-62		62-75		75-100		100-150		150-250	
2158	157773	1760979	571362	344883												
1320	13992	580998	179322	876183												
844	99594	1142757	725076	1275829												
1561	49055	353859	515130	798402												
1994	103059	1171170	1004091	2430153												
344	76494	460416	876249	1075272												
211	125697	1208196	1200045	658878												
1946	81906	1448502	547536	720918												
86	104923	952809	558723	325248												

A 10W AAL	-25-25-31		31-37		37-50		50-62		62-75		75-100		100-150		150-250	
2158	7339500	133280	117075	114555												
1320	4691120	86730	71225	57610												
844	295785	120330	105665	70430												
1561	4692745	668150	92065	48580												
1994	6496035	3753890	1321075	1086820												
344	4153065	270865	192955	332745												
211	4097975	564445	251370	423675												
1946	10970680	5290950	4954215	2241750												
86	2594766	110775	424620	109025												

B 10W MALZ	-25-25-31		31-37		37-50		50-62		62-75		75-100		100-150		150-250	
2158	410388	882387	481569	481371	218724	140151										
1320	301328	67541	704550	521433	133386	503646										
844	425733	842688	600369	752400	319671	1416987										
1561	438008	478566	221562	220770	294261	191861										
1994	716597	954030	1073853	223231	370788	1281423										
344	799128	472824	524205	274758	227733	698016										
211	897666	1051050	662871	564696	260601	433224										
1946	981255	1848297	731148	1158465	524568	308781										
86	678381	892848	912747	438570	323994	570339										

B 10W RCA	-25-25-31		31-37		37-50		50-62		62-75		75-100		100-150		150-250	
2158	4439052	131436	38952	40464												
1320	519968	72276	117878	285192	147322	17204										
844	11526516	4019076	44568	170244												
1561	4367592	35388	41184	28332												
1994	11084364	3045638	660564	282108												
344	4869336	68868	46980	42120												
211	11970000	2084508	60768	55440												
1946	4946688	1552680	44892	43740												
86	7679166	1094940	69084	36288												

B 10W WGA	-25-25-31		31-37		37-50		50-62		62-75		75-100		100-150		150-250	
2158	689652	1412388	1063008	384912												
1320	67644	120780	183852	86112												
844	76536	1714248	81838	54612												
1561	139329	91800	59544	86544												
1994	91332	3094848	411912	192420												
344	80100	77616	58032	30060												
211	282024	849456	503820	18232												
1946	665964	952272	3113028	815184												
86	73440	53712	56412	41586												

B 10W AAL	-25-25-31		31-37		37-50		50-62		62-75		75-100		100-150		150-250	
2158	5263236	607700	1627740	50508												
1320	3419640	1873800	668952	58464												
844	6241536	4637088	502056	211104												
1561	3713904	1493388	297108	295758												
1994	3808980	2804976	1079064	104504												
344	5280588	672300	395100	53964												
211	4796856	2643696	717300	302220												
1946	2704716	366572	1945620	1574784												
86	460296	757764	108432	51768												

B 10W SNA	-25-25-31		31-37		37-50		50-62		62-75		75-100		100-150		150-250	
2158	3082032	1709496	4848120	4829328	669816	313884										
1320	1431360	4298868	2017008	5181264	403344											
844	365008	887792	3205476	378538	363592											
1561	3665448	324924	813600	2666628	246132											
1994	4495896	5611104	3919608	8210664	42588	105804										
344	4295700	5476932	2549556	3390840	156960											
211	417266	7546932	2469924	3796452	894852	98532	143460									
1946	537248	11606292	4428828	9667368	1546380	147348	262728									
86	6457220	9333144	9426816	4613766	1387836											

B 10W CONA	-25-25-31		31-37		37-50		50-62		62-75		75-100		100-150		150-250	
2158	1482696	3994236	648000	2025216	264672	761328										
1320	2653416	1618956	1128060	549036	861732	997596										
844	2804408	318418	1229868	410220	812808	666900										
1561	1279512	1614600	324864	851472	1160424	995580										
1994	2014992	3811644	1167228	302292	479808	137664										
344	1510380	928008	1000548	921492	1709712	45586										

## **Intensidades de Bandas das Membranas PVDF do Grupo II**

Tabela 4. Intensidades totais em cada faixa de peso molecular determinadas a partir da leitura das membranas de PVDF do Grupo II.

A 15W MAL2	-25-25-31	31-37	37-50	50-62	62-75	75-100	100-150	150-250
2158	18607	85008	266915	84190				
874	66907	1953850	1039370	147430				
1320	21896	4482	3008	35765				
2188	15755	49588	38065	47035				
2123	17480	159689	51451	44712				
844	22402	862109	35972	23115				
2124	20102	5958	40917	32683				
85	24196	35719	37007	33166				
1561	24564	44413	4862	35838				
2121	27071	1079790	40135	34707				
476	39755	5709796	943667	378166				
2189	24541	1106024	123349	196029				
1994	23276	435183	183494	62997				

A 15W RCA	-25-25-31	31-37	37-50	50-62	62-75	75-100	100-150	150-250
2158	1324152	1086792	120792	59376				
874	1776240	2780184	1086048	88680				
1320	49536	49416	53400	27696				
2188	165504	43368	52032	50544				
2123	198672	60912	179256	88356				
844	287136	658632	52488	21912				
2124	272736	43152	32592	32592				
85	149112	40536	39720	23568				
1561	644136	57240	37296	38088				
2121	202566	74032	51600	24192				
476	459072	2748576	1838616	581004	500472			
2189	162528	1050432	730296	370008	456864			
1994	373296	2018112	493656	304176	159648	6624		

A 15W CONA	-25-25-31	31-37	37-50	50-62	62-75	75-100	100-150	150-250
2158	172314	2650384	1335136	2985796	1077230	3641352	52688	965074
874	1461350	657206	1784866	3210812	3255538	6577054	1429274	1442430
1320	1527966	37706	140424	129818	190088	1949904	4266922	
2188	1609190	1218602	2261930	4072310	1854600	2795276	695662	1560042
2123	1452506	680284	883762	2254670	1805122	3956370	1052788	1402346
844	1901526	1674970	2229370	3968470	1881890	2072444	558602	1948408
2124	1368234	867152	880308	3199636	1439812	1906806	1268696	1087152
85	1119888	1338116	1367696	4440000	1990758	2526766	1104708	495462
1561	1655810	971586	2697354	3410814	3017036	3708832	1289332	2599828
2121	1586948	600248	462176	181458	940586	6273498	1252614	1126554
476	2512840	1080838	1289310	4850824	11255644	16866828	3024604	451704
2189	191374	963644	243358	2549338	277068	13158178	4903118	766986
1994	1426436	1266276	618662	1321342	409354	4852628	2303114	385112

A 15W WGA	-25-25-31	31-37	37-50	50-62	62-75	75-100	100-150	150-250
2158	1570816	3903848	1320358	809302	35854	131300	70876	39650
874	1670656	425872	2136446	1653938	27534	209144	332176	92170
1320	653458	1517672	1156538	2028026	26884	140686	220610	83200
2188	926588	1770704	1599364	2732496	54210	268346	605852	505024
2123	1015274	2968732	1206686	1049464	38194	14274	134290	47918
844	6920124	2413528	1223898	1501084	94198	101374	373334	653926
2124	478140	2032706	1203540	631748	213148	457236	489840	139360
85	491400	904462	386360	206440	205504	515164	276510	63336
1561	642200	1388454	565266	839200	229696	329940	48022	946154
2121	1406470	2664246	1187238	1386346	222004	357890	125684	461526
476	1789580	2333760	1196962	1385700	115830	119444	151242	432380
2189	1405248	2275364	817778	989820	109382	392600	170872	297882
1994	274430	1773096	911716	141086	23634	199914	34424	137436

B 15W MAL2	-25-25-31	31-37	37-50	50-62	62-75	75-100	100-150	150-250
2158	566254	2459574	769392	1611792	48308	202748		
874	365430	3594466	1691456	1491152	108290	276380		
1320	509444	1167504	779038	960466	89752	341458		
2188	80074	2315908	1272024	1961440	161824	191828		
2123	1525420	4539938	2493348	2083884	241462	127972		
844	872144	4779762	1206660	1978184	186212	101842		
2124	475410	1986270	1254786	1027962	120172	206960		
85	692198	941356	497432	71422	55796	279500		
1561	910422	1641978	829686	1097200	95602	54210		
2121	2233738	3113370	1300572	1520306	206960	69784		
476	2761538	5349136	1840072	2467894	522132	329784		
2189	2929056	4496986	1772680	2331758	323804	326950		
1994	2461914	2759380	1710358	3813178	425256	501670		

B 15W RCA	-25-25-31	31-37	37-50	50-62	62-75	75-100	100-150	150-250
2158	6908572	1926034	100364	309606				
874	14012570	2308592	906048	1186048				
1320	7018726	63844	46816	41316				
2188	2907586	57354	35288	30844				
2123	1328554	139018	7424	30826				
844	4405000	1487266						
2124	3121338	53680						
85	262394	42130						
1561	1502512	42702						
2121	562188	148148						
476	457606	338208	563178	70378	20856	294250		
2189	9710404	1956122	229262	35926	13662	1187890		
1994	6966542	1086404	88418	89364	36872	22836		

B 15W CONA	-25-25-31	31-37	37-50	50-62	62-75	75-100	100-150	150-250
2158	318804	308620	417846	625066	840372	332424	4454866	626782
874	482978	63594	825006	375096	3215914	2513212	4355526	1263470
1320	145834	1027104	3078348	2744612	1800780	3077230	1748578	486460
2188	229580	186600	670670	3313128	1376336	3258902	2874716	1418170
2123	157274	147914	653718	1437852	2020356	3629522	6047886	3428700
844	256126	660662	3993574	2540466	2830386	3365652	4931498	3248466
2124	137828	231140	276458	2124642	1615666	1023178	824018	334802
85	132000	238498	806788	2920918	1334736	2058940	473304	2449850
1561	594932	124618	2071082	3062280	3694938	2957526	6128356	4748068
2121	6363974	99112	841802	2496390	2392312	3420248	6691880	1594970
476	713544	374764	417664	417664	1366040	7814676	13115648	2733744
2189	634668	272506	732108	2254200	1196130	7700600	13763958	3902002
1994	842924	148200	286936	100480	866236	2191124	4389040	1460654

B 15W WGA	-25-25-31	31-37	37-50	50-62	62-75	75-100	100-150	150-250
2158	105456	168620	107978	138066				
874	127738	54930	194480	263634				
1320	85468	9402	52884	65078				
2188	92820	67574	83824	293774				
2123	112034	230744	156858	327418				
844	85124	1063400	89336	377598				
2124	86814	65572	62166	107666				
85	8232	6398	58838	57038				
1561	113516	70642	65494	123734				
2121	102674	107094	88088	395174				
476	148112	1668706	520390	1044654				
2189	221416	820820	147446	416702				
1994	210288	1124994	1227296					

C 15W RCA	-25-25-31	31-37	37-50	50-62	62-75	75-100	100-150	150-250
2158	2583107	2137137	1065429	225584	16238	20585		
874	4326162	4288948	3395329	766498	13616	16192		
1320	4356728	68025	600392	161736	15387	21873		
2188	3458788	748719	469591	153985	35167	17917		
2123	7379512	2024960	1548736	444724	15736	28336		
844	6273966	2019528	631935	257982	19747	11826		
2124	2312431	433666	387498	194764	16762	19111		
85	1089119	38157	39330	36018	21919	22816		
1561	1545457	93932	206678	144302	24081	21965		
2121	4352184	680049	807931	293571	19305	17293		
476	5338684	1972273	1636404	327618	20861	22471		
2189	6944536	2319304	2078128	860262	12764	385528		
1994	5166522	2669069	2028764	1409105	22971	24335	20584	141639

C 15W CONA	-25-25-31	31-37	37-50	50-62	62-75	75-100	100-150	150-250
2158	199329	221036	65500	431425	542500	207350	974775	307050
874	307350	659575	332550	2680625	2774850	569450	3633800	1605800
1320	102125	28325	364725	1045525	1452150	581750	1784400	2234500
2188	64850	78975	188850	663625	1218225	528100	1945900	657550
2123	151450	322575	557900	1710300	1319075	537300	2933150	

A 15W		-25-25-31	31-37	37-50	50-62	62-75	75-100	100-150	150-250
AAL									
2158	2682836	238290	136500	255528					
874	7489274	517232	302108	160526					
1320	2500940	77922	43836	38896					
2188	4586166	50752	51168	58068					
2123	622044	35022	41652	32008					
844	3339570	110760	32942	32708					
2124	4795778	44928	31798	26390					
85	4415918	49608	84032	46358					
1561	3329222	48152	47008	40326					
2121	4629956	57694	53612	147134					
476	8592324	2757872	609102	1595264					
2189	5585060	374452	81718	566124					
1994	2660840	135642	65520	259324					

B 15W		-25-25-31	31-37	37-50	50-62	62-75	75-100	100-150	150-250
AAL									
2158	3398356	1942076	40274	67444					
874	4640974	2101762	165854	43446					
1320	1248546	70070	44850	35750					
2188	1906398	44018	44320						
2123	955570	74984	84760						
844	488774	86268	46150						
2124	2331602	58240	83460						
85	246096	52000	38376						
1561	140816	58136	134186						
2121	258232	194558	258778	134394					
476	3497026	1979614	1264770	258804					
2189	3497026	977912	868608	213096					
1994	1502904	1302184	224510	219466					

C 15W		-25-25-31	31-37	37-50	50-62	62-75	75-100	100-150	150-250
AAL									
2158	2583516	3481426	1453504	976638					
874	1482136	2969902	1609712	1002508					
1320	2750332	1349062	311948	110240					
2188	6457236	2203448	907166	80392					
2123	10121098	1541670	1345394	195442					
844	11055564	5960890	1003626	101998					
2124	8214414	676676	690040	38896					
85	5098990	111956	206232	35542					
1561	4317690	347334	297180	51480					
2121	5486026	635024	256412	97058					
476	4038066	1750814	1036152	302682					
2189	2647554	1656408	974116	1418482					
1994	1847196	1409252	940966	1513486					

B 15W		-25-25-31	31-37	37-50	50-62	62-75	75-100	100-150	150-250
SMA									
2158	972010	1423760	333658	1194388	174278				
874	1499680	1842776	1087502	858780	107016				
1320	155428	92378	166816	186212	40274				
2188	55640	54574	69498	123188	51012				
2123	88166	121638	591682	779662	78676				
844	53612	62400	45760	35256	24310				
2124	58552	96594	48516	116246	31980				
85	57148	37492	40144	31096	17420				
1561	65962	66092	43004	106028	26416				
2121	387296	62426	115102	519662	31252				
476	1361464	494156	278746	2488590	166868				
2189	1893736	269412	220090	1798608	223366				
1994	3242642	1235104	794222	1295598	143182				

C 15W		-25-25-31	31-37	37-50	50-62	62-75	75-100	100-150	150-250
SMA									
2158	3180044	3173924	258882	1371890	146848				
874	1212042	963664	329082	884078	83460				
1320	856648	107536	34632	116116					
2188	542698	64844	42666	190528					
2123	252954	173420	43628	265124					
844	124514	65260	154492	236106					
2124	110604	53846	28236	40924					
85	44902	50752	30914	39806					
1561	112684	49764	47554	116558					
2121	163308	411658	153608	1491126					
476	524352	103948	590096	2345512	38594				
2189	1372288	2633748	815334	2366546	18668				
1994	1264146	566576	1281150	1381770	9490				