

**VIVIAN MIRANDA LAGO**

**“EFEITO DA SUPEREXPRESSION DA PROTEÍNA P2 $\beta$  DE  
*TRYPANOSOMA CRUZI* EM CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS”**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO  
GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)**



Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

**2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**VIVIAN MIRANDA LAGO**

**“EFEITO DA SUPEREXPRESSÃO DA PROTEÍNA P2 $\beta$  DE  
*TRYPANOSOMA CRUZI* EM CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS”**



Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

**2008**

LAGO, Vivian Miranda

“Efeito da superexpressão da proteína P2 $\beta$  de *Trypanosoma cruzi* em camundongos transgênicos” / Vivian Miranda Lago - Rio de Janeiro: UFRJ-IBCCF, 2008.

xx, 96 f: il.; 27,94 cm

Orientador: Antonio Carlos Campos de Carvalho

Dissertação (Mestre em Ciências) - UFRJ/ IBCCF/ Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica)

Referências Bibliográficas: f. 66-75.

1. Proteína ribossomal P2 $\beta$
2. Camundongos Transgênicos
3. Mimetismo molecular
4. Doença de Chagas
5. *Trypanosoma cruzi*
6. Microinjeção pronuclear.

I Universidade Federal do Rio de Janeiro - Centro de Ciências da Saúde – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - Programa de Bioengenharia e Biotecnologia Animal. II.Título. III.

Este trabalho foi realizado em colaboração nos Laboratórios de Animais Transgênicos e no Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob orientação do Dr Antonio Carlos Campos de Carvalho e co-orientação da Dr<sup>a</sup> Irina Serova e da Dr<sup>a</sup> Luciene Pashoal Braga Dias e contou também com os seguintes suportes financeiros:

Capes - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

FAPERJ - Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro.

"A mente que se abre a uma nova  
idéia jamais voltará ao seu  
tamanho original."

Albert Einstein

Esta dissertação é dedicada a

À minha mãe, **Silvania Miranda**, pela dedicação, incentivo, amor e por compartilhar os meus sonhos.

meu pai, **Hamilton Couto Lago**, pelo carinho e amor.

minha avó, **Dagmar Lacerda Miranda**, pelo amor, iniciativa e preocupação com minha educação desde a infância.

meus tios, **Vanderlei Miranda e Lucia Helena de Castro Miranda**, pelo incentivo, amor e preocupações com os meus sonhos.

minha tia e Mãe, **Sueli Miranda**, pelo cuidado e amor desde sempre.

minha irmã, **Vaneiva Miranda Lago**, pela amizade, apoio e incentivo durante todos os momentos da minha vida.

minha prima querida, **Viviane de Castro Miranda**, por todo apoio, amor e incentivo durante nossas vidas. (*In memoriam*)

meu noivo, **Carlos Aguiar Hortêncio**, pelo cuidado, incentivo, dedicação e o amor incondicional.

meu tio, **Jorjão e família Mafra**, pela atenção, carinho, incentivo, amor e caronas repentinas.

## AGRADECIMENTOS

À **Deus** autor, princípio e fim de todas as coisas, luz para os meus passos, razão do meu viver.

À **Nossa Senhora**, minha mãe sagrada que sempre intercedeu por mim.

À **minha família**, por sempre apoiarem e incentivarem todas as minhas decisões, pela estabilidade emocional, carinho e compreensão. Sem vocês jamais teria chegado até aqui.

À **Irina Serova**, minha orientadora e mãe russa, pelos ensinamentos, confiança e o incentivo.

À **Luciene Paschol Braga Dias**, minha orientadora e fada madrinha, pela confiança, oportunidade, ensinamentos, incentivo e amor. Obrigada por tudo.

Ao meu orientador, **Antonio Carlos Campos de Carvalho**, pela oportunidade e aprendizado.

À **Bárbara Guerra**, amiga, inteligente, perseverante e companheira. Obrigado por ter me apoiado nessa jornada

Ao **Josuel Lessa**, amigo, curioso, paciente e inteligente. Obrigada por todo apoio nesta caminhada

Aos meus amigos **Maria, Terezinha e Alexandre**, pelo carinho, incentivo e grande apoio na manutenção das linhagens transgênicas. Com certeza, sem vocês esse trabalho não existiria.

À **Elaine Quintanilha**, pelos ensinamentos iniciais nesta caminhada.

À minha amiga **Márcia Abreu**, pelo incentivo e carinho.

À minha amiga **Norma Almeida**, pelos ensinamentos em eletrocardiograma, dicas e críticas que só me fizeram crescer como pessoa e pesquisadora.

À **Nazareth Rocha**, pela realização das imagens ecocardiográficas, amizade e discussões que contribuíram para o meu aprendizado.

As amigas, **Juliana Silva e Andreza Bastos**, pela amizade e ajuda neste período.

À amiga **Lílian Ayres**, pela ajuda com a técnica de “Western blot” e pela amizade.

À professora **Cristiane de Corso**, pelas críticas construtivas e revisão da tese.

À tia **Daizy Avanzi**, pelo apoio, ensinamentos, simpatia e amizade.

À **Sandra Brito e Diogo Cordeiro**, pela paciência e ajuda nos assuntos burocráticos.

Aos professores **José Hamilton, Regina Goldenberg e Mauro Costa**, pelos ensinamentos e a amizade.

À todos do Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular e do Laboratório de Eletrofisiologia Cardíaca Antonio Paes de Carvalho.

À todos que torcem pela realização dos meus sonhos.

## RESUMO

A doença de Chagas é uma das patologias de mais ampla distribuição no continente americano. A manifestação mais severa da doença ocorre na fase crônica, sendo representada pela Cardiopatia chagásica. Esta cardiopatia pode ter como uma de suas principais causas uma resposta imune do hospedeiro infectado. Vários antígenos de *Trypanosoma cruzi* têm sido descritos como epítomos similares a antígenos de mamíferos, incluindo a família de proteínas associadas a microtúbulos, antígenos cardíacos e membros da família de proteínas P ribossomais. A fim de testar o envolvimento das proteínas P ribossomais na etiopatogenia da doença de Chagas, neste trabalho criamos um camundongo transgênico que expressa uma proteína do parasito. Este animal sintetiza a proteína P2 $\beta$  do *Trypanosoma cruzi* controlada pela indução de doxiciclina. Os camundongos transgênicos foram obtidos pela microinjeção de DNA recombinante no pronúcleo masculino dos zigotos. A construção microinjetada contém o promotor mínimo P<sub>CMV</sub> responsivo à tetraciclina, o cDNA da P2 $\beta$  e o sinal de poli-adenilação de  $\beta$ -globina. Os camundongos transgênicos P2 $\beta$  foram cruzados com os camundongos STOCK Tg (rtTAhCMV)4Bjd/J do *Jackson Laboratory* para a produção de animais duplo transgênicos (binários). Os duplos transgênicos foram divididos em três grupos: A - binários induzidos com doxiciclina, B - binários não induzidos e C - P2 $\beta$  não induzido. Os animais induzidos foram tratados com doxiciclina diluída em sacarose e os não induzidos receberam apenas sacarose. Foram formados grupos de 2, 4, 8, 12, 20 e 30 semanas de indução. A determinação do RNAm do gene P2 $\beta$  no coração dos camundongos binários foi obtida pela técnica RT-PCR. A detecção da expressão da proteína foi realizada pela técnica de Western Blot. As análises fisiológicas foram realizadas através do ecocardiograma e eletrocardiograma. A herança do transgene nas gerações apresentou-se de forma mendeliana. O RNAm do gene TcP2 $\beta$  foi encontrado no coração de todos os camundongos binários e em todos os períodos de indução com a doxiciclina. Também foi encontrado o RNAm do gene TcP2 $\beta$  nos corações dos camundongos controles sem indução de doxiciclina (P2 $\beta$  e

binário). Esses dados mostram que a expressão do gene TcP2 $\beta$  está ocorrendo de forma basal mesmo na ausência da doxiciclina. No entanto, não foi observado expressão nos camundongos selvagens. A síntese da proteína TcP2 $\beta$  foi confirmada em todos os animais duplos transgênicos que foram induzidos pela doxiciclina, entretanto não foi observada nos outros grupos. Nenhuma alteração significativa foi encontrada nos parâmetros fisiológicos, sugerindo que provavelmente a proteína TcP2 $\beta$  não foi apresentada ao sistema imunológico, por se encontrar no meio intracelular. Entretanto, são necessárias novas análises para estabelecer as alterações fisiológicas e imunológicas desse modelo experimental.

## ABSTRACT

Chagas' disease is a pathologic of the large recurrency in the America. The most severe manifestation of the disease occurs in the chronic phase. The etiology of this heart disease can have its response in autoimmunity. Several antigens of *Trypanosoma cruzi* have been described as similar to antigen epitopes of mammals, including a family of proteins associated with microtubules, cardiac antigens and family members ribosomal P. In order to verify this hypothesis, this study proposed a transgenic model that expresses a single antigen of the parasite. The mouse synthesizes the protein P2 $\beta$  of *Trypanosoma cruzi* controlled by the induction of doxycycline. The transgenic mice were obtained by microinjection of recombinant DNA in male pronucleus of zygotes. The construction contains the promoter of PCMV least responsive to tetracycline, the cDNA of P2 $\beta$  and the sign  $\beta$ -globin. The P2 $\beta$  transgenic mice were crossed with of STOCK Tg (rtTAhCMV) 4Bjd / J of the Jackson Laboratory for the production of double-transgenic animals (binary). The double transgenic were divided into three groups: A- binary-induced with tetracycline, B- no induced binary and C-P2 $\beta$  not induced. The induced animals were treated with doxycycline diluted in sucrose and non-induced animals received only sucrose. The study involved groups of 2, 4, 8, 12, 20 and 30 weeks of treatment. Determination of mRNA of the gene P2 $\beta$  in the hearts of binary mice was obtained by RT-PCR technique. The expression of the protein was performed by Western blot technique. The physiological tests were performed by echocardiogram and electrocardiogram. The legacy of the transgene in generations showed up in a Mendelian. The mRNA of the gene TcP2 $\beta$  was found in the heart of all binary mice in all periods of induction with doxycycline. The mRNA of the gene TcP2 $\beta$  was also found in the hearts of mice controls without induction of doxicilina (P2 $\beta$  and binary). These data show that the expression of the gene TcP2 $\beta$  is occurring in a basement way in the absence of doxycycline. However, there was no expression observed in wild type mice. The synthesis of protein TcP2 $\beta$  was confirmed in all double transgenic animals that were induced by doxycycline, but it was not seen in other groups. No significant

changes were found in physiological parameters, suggesting that the protein TcP2 $\beta$  was probably not presented to the immune system, because it was in the middle transduction. However, further analysis are needed to establish the physiological and immunological changes of this experimental model.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

A – adenina  
A – alanina  
APC – célula apresentadora de antígeno.  
C – citosina  
C – cisteína  
cDNA – ácido desoxirribonucléico  
cChHD – doença de Chagas crônica.  
CCC – cardiopatia chagásica crônica  
D – aspartato ou ácido aspártico  
DEPC – dietil pirocarbonato  
DNA – ácido desoxirribonucléico  
dNTP – desoxiribonucleotídeo trifosfato  
E – glutamato ou ácido glutâmico  
EDTA – ácido etileno diamino tetraácido  
ECG – eletrocardiograma  
EUA – Estados Unidos das América  
F – fenilalanina  
G – guanina  
G – glicina  
GAPDH – gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase  
g/min – giros por minutos  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio  
hCG – gonadotrofina coriônica humana  
hCMV – Citomegalovírus humano  
H – histidina  
I – isoleucina  
K – lisina  
Kb – quilobase  
KCl – cloreto de potássio

kD – quilodalton  
L – leucina  
M – metionina  
mg – miligrama  
MgCl<sub>2</sub> – cloreto de magnésio  
mm – milímetros  
mRNA – ácido ribonucléico mensageiro  
N – aspargina  
NaCl – cloreto de sódio  
ng – nanograma  
nm – nanômetro  
OD – densidade ótica  
P – prolina  
pb – pares de base  
PBS – tampão salina-fosfato  
PCR – reação em cadeia de polimerase  
pg – picogramas  
pH – potencial de hidrogênio iônico  
PMSG – hormônio da égua prenhe  
P2 $\beta$  – proteína ribossomal P isoforma 2  $\beta$  de *Trypanosoma cruzi*  
P2 $\alpha$  – proteína ribossomal P isoforma 2 $\alpha$  de *Trypanosoma cruzi*  
P0 – proteína ribossomal P0 de *Trypanosoma cruzi*  
Q – glutamina  
R – arginina  
RNA – ácido ribonucleico  
RT-PCR – transcrição reversa seguida de reação em cadeia de polimerase  
S – serina  
SDS – dodecil sulfato sódio  
T – timina  
°C – grau Celsius  
 $\mu$ g – micrograma  
 $\mu$ l – microlitro

T – treonina

TAE – tampão Tris-acetato/ EDTA

TcP2 $\beta$  – proteína ribossomal de *Trypanosoma cruzi*

U – unidade internacional

V – valina

v/v – volume/volume

W – triptofano

Y – tirosina

1. Introdução .....	1
1.1. Doença de Chagas.....	3
1.2. Ciclo evolutivo do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	5
1.3. Auto imunidade na Doença de Chagas.....	9
1.3.1. Ativação bystander.....	9
1.3.2. Mimetismo molecular .....	10
1.4. Proteínas ribossomais de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	11
1.5. Objetivos e Metas.....	16
1.5.1. Objetivos gerais.....	16
1.5.1. Objetivos específicos .....	16
2. Materiais e Métodos .....	17
2.1. Obtenção do vetor de expressão pTcP2 $\beta$ .....	17
2.2. Preparação dos fragmentos de DNA para microinjeção .....	19
2.3. Microinjeção de DNA recombinante no pronúcleo de zigotos de camundongos .....	19
2.4. Preparação de amostras do DNA de camundongos para análise de PCR.....	23
2.4.1. Análise das amostras de DNA de camundongos por reação de polimerase em cadeia (PCR) com indicadores específicos .....	24
2.4.2. Identificação dos camundongos transgênicos para a construção STOCK Tg (rtTAhCMV) 4Bjd/J .....	25
2.5. Obtenção das linhagens de camundongos transgênicos .....	26
2.5.1. Obtenção das linhagens de camundongos transgênicos para o gene P2 $\beta$ .....	26
2.5.2. Expansão da linhagem STOCK Tg(rtTAhCMV)4Bj/j .....	27
2.5.3. Obtenção de camundongos duplos transgênicos (Binários).....	28
2.6. Indução dos camundongos Binários .....	29
2.7. Determinação do RNA do gene P2 $\beta$ no coração dos camundongos binários pela técnica RT-PCR .....	30
2.7.1. Extração do RNA total dos tecidos .....	30
2.7.2. Ensaio de RT-PCR.....	31

2.8. Análise da característica molecular da proteína P2 $\beta$ através do “Western blot” .....	32
2.9. Determinação de alterações fisiológicas através das técnicas de eletrocardiograma .....	34
2.10. Determinação de alterações fisiológicas através das técnicas de ecocardiograma .....	35
2.11. Análise estatística .....	37
3. Resultados.....	38
3.1. Análise da produção de camundongos transgênicos pela microinjeção do DNA do vetor pTcP2 $\beta$ .....	38
3.2. Herança dos transgenes pTcP2 $\beta$ na geração F1 e estabelecimento da linhagem de camundongos transgênicos.....	40
3.3. Herança dos transgenes pTcP2 $\beta$ e STOCK Tg (rtTAhCMV) 4Bj/j na geração F1 e estabelecimento da linhagem de camundongos transgênicos.....	43
3.4. Análise da expressão da proteína TcP2 $\beta$ no coração de camundongos duplos transgênicos pela técnica RT-PCR .....	49
3.5. Análise da proteína TcP2 $\beta$ produzida no coração de camundongos duplos transgênicos por “Western blot” .....	52
3.6. Avaliação eletrocardiográfica de camundongos conscientes, Binários e transgênicos.....	55
3.7. Avaliação ecocardiográfica de camundongos Binários e transgênicos.....	57
4. Discussão .....	59
5. Conclusões.....	65
6. Referências .....	66

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Esquema do ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	8
<b>Figura 2:</b> Seqüência de 321 nucleotídeos referente ao cDNA da proteína TcP2 $\beta$ .....	17
<b>Figura 3:</b> Seqüência de 430 nucleotídeos referente ao promotor mínimo P <sub>cmv</sub> responsivo a tetraciclina presente no plasmídeo pTRE2 .....	18
<b>Figura 4:</b> Esquema do fragmento clonado no vetor pTRE2 originando a construção pTcP2 $\beta$ , utilizada na microinjeção pronuclear de zigotos de camundongos .....	18
<b>Figura 5:</b> Técnica de microinjeção de DNA recombinante no pronúcleo do zigoto de camundongo .....	22
<b>Figura 6:</b> Esquema da ativação do promotor hCMV que possui o sítio responsivo a tetraciclina (TRE) .....	28
<b>Figura 7:</b> Modelo esquemático da metodologia usada na indução dos camundongos .....	30
<b>Figura 8:</b> Equipamento de ultra-som, modelo Visual Sonics Vevo 770 utilizados para as análises de ecocardiograma nos camundongos transgênicos .....	36
<b>Figura 9:</b> Análise eletroforética em gel de agarose a 1 % dos produtos dos produtos de PCR de amostras de DNA de camundongos transgênicos derivados da construção pTcP2 $\beta$ .....	39
<b>Figura 10:</b> Herança do transgene da fêmea transgênica F1 da construção pTcP2 $\beta$ .....	41
<b>Figura 11:</b> Herança do transgene de macho transgênico F1 da construção pTcP2 $\beta$ .....	42
<b>Figura 12:</b> Herança do transgene na sublinhagem 1 com as construções pTcP2 $\beta$ e STOCK Tg(rtTAhCMV)4Bjd/J .....	45
<b>Figura 13:</b> Herança do transgene na sublinhagem 2 com as construções pTcP2 $\beta$ e STOCK Tg(rtTAhCMV)4Bjd/J .....	46

<b>Figura 14:</b> Herança do transgene na sublinhagem 3 com as construções pTcP2 $\beta$ e STOCK Tg(rtTAhCMV)4Bjd/J .....	47
<b>Figura 15:</b> Análise eletroforética em gel de agarose a 1 % dos produtos dos produtos de PCR de amostras de DNA de camundongos duplos transgênicos derivados da construção pTcP2 $\beta$ e da construção STOCK Tg(rtTAhCMV)4Bjd/J.....	48
<b>Figura 16:</b> Análise eletroforética em gel de agarose a 1 % dos produtos dos produtos de PCR de amostras de DNA de camundongos duplos transgênicos derivados da construção STOCK Tg(rtTAhCMV)4Bjd/J e da pTcP2 $\beta$ .....	48
<b>Figura 17:</b> Análise eletroforética em gel de agarose 1% da expressão de P2 $\beta$ de <i>Trypanosoma cruzi</i> no coração de machos duplos transgênicos e de machos transgênicos pelo RT-PCR .....	50
<b>Figura 18:</b> Análise eletroforética em gel de agarose 1% da expressão de Beta-actina no coração de machos transgênicos pelo RT-PCR .....	51
<b>Figura 19:</b> Resultados da análise da proteína P2 $\beta$ de <i>Trypanosoma cruzi</i> no coração dos camundongos duplos transgênicos induzidos com doxiciclina. Utilizando o anticorpo Mab 17.2 .....	52
<b>Figura 20:</b> Resultados da análise da proteína P2 $\beta$ de <i>Trypanosoma cruzi</i> no coração dos camundongos duplos transgênicos não induzidos com doxiciclina. Utilizando o anticorpo Mab 17.2 .....	53
<b>Figura 21:</b> Resultados da análise da proteína P2 $\beta$ de <i>Trypanosoma cruzi</i> no coração dos camundongos transgênicos para o gene TcP2 $\beta$ não induzidos com doxiciclina. Utilizando o anticorpo Mab 17.2 .....	53
<b>Figura 22:</b> Resultados da análise da proteína GAPDH nos corações dos camundongos duplos transgênicos induzidos, não induzidos e P2 $\beta$ .....	54

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Seqüência completa da proteína TcP2 $\beta$ .....	12
<b>Tabela 2:</b> Comparação entre as proteínas P ribossomais do humano e do parasito Trypanosoma cruzi .....	13
<b>Tabela 3:</b> Seqüência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados na reação de polimerização em cadeia (PCR) .....	25
<b>Tabela 4:</b> Seqüência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados na reação de polimerização em cadeia (PCR) .....	26
<b>Tabela 5:</b> Seqüência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados na reação de polimerização em cadeia (PCR) .....	32
<b>Tabela 6:</b> Herança dos transgenes pTcP2 $\beta$ na geração F <sub>0</sub> e F <sub>1</sub> .....	39
<b>Tabela 7:</b> Herança dos transgenes pTcP2 $\beta$ nas gerações de camundongos transgênicos .....	40
<b>Tabela 8:</b> Herança dos transgenes pTcP2 $\beta$ e STOCK Tg(rtTAhCMV)4Bjd/J na geração F <sub>1</sub> na sublinhagem 1 .....	44
<b>Tabela 9:</b> Herança dos transgenes pTcP2 $\beta$ e STOCK Tg(rtTAhCMV)4Bjd/J na geração F <sub>1</sub> na sublinhagem 2 .....	44
<b>Tabela 10:</b> Herança dos transgenes pTcP2 $\beta$ e STOCK Tg(rtTAhCMV)4Bjd/J na geração F <sub>1</sub> na sublinhagem 3 .....	44
<b>Tabela 11:</b> Parâmetros eletrocardiográficos de camundongos machos duplos transgênicos induzidos e não induzidos .....	56
<b>Tabela 12:</b> Parâmetros ecocardiográficos de camundongos machos duplos transgênicos induzidos e não induzidos. ....	58

## 1. Introdução

A doença de Chagas foi descrita pelo pesquisador Carlos Chagas em 1909. Essa patologia é causada por infecção pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, que é o agente etiológico (CHAGAS, 1909) e normalmente resulta em uma longa associação parasito-hospedeiro podendo gerar principalmente, inflamação na musculatura cardíaca, dilatação do esôfago ou cólon e anormalidades no sistema nervoso central (TAFURI, 1970; 1987 MONCAYO, 1999).

Atualmente, a doença de Chagas ou tripanossomíase americana é conhecida como uma parasitose crônica, endêmica em toda a América Latina, onde afeta milhões de pessoas e deixa mais de 100 milhões (25% de todos os habitantes da América Latina) sob risco de contaminação, com aproximadamente 300.000 casos novos por ano (WHO, 2002; MONCAYO, 2003).

Nas últimas décadas, o controle vetorial nas áreas endêmicas foi determinante para a redução da transmissão vetorial pelo *Triatoma infestans*, o que proporcionou decréscimo substancial na incidência da doença de Chagas na América Latina (MONCAYO, 2003; WHO, 2002). Entretanto, 13 milhões de indivíduos nas Américas Central e do Sul ainda encontram-se infectados por esse parasito (WHO, 2005). Estima-se que no Brasil existam mais de 191.000 cardiopatas chagásicos, sendo que 19.100 com grave comprometimento cardíaco (SCHMUNIS, 2000).

A incidência da Doença de Chagas tem diminuído nas últimas duas décadas, com as campanhas de saúde pública para erradicação do vetor,

melhor controle de qualidade nas transfusões de sangue e derivados e da melhoria das condições de moradia (DIAS, 1987; DIAS e SCHOFIELD, 1998; WHO, 2002). Entretanto, a questão prioritária hoje está voltada para os indivíduos já infectados, dos quais uma parcela irá desenvolver a cardiopatia crônica chagásica que é a maior determinante de gravidade da doença. Mesmo quando a transmissão da doença Chagas fosse considerada totalmente erradicada, ainda teríamos milhares de pacientes cardiopatas necessitando de cuidados médicos durante 30 anos ou mais (DIAS, 2000).

Embora o Ministério da Saúde relate redução e até mesmo erradicação da doença de Chagas, recentemente foram descritos surtos com uma nova forma de transmissão, a oral, através de alimentos contaminados como carne, cana de açúcar ou suco de açaí (PACHECO *et al.*, 2005).

A doença de Chagas promove grandes despesas à saúde pública e impacto social nas áreas endêmicas, por afetar uma parcela da população economicamente ativa gerando aposentadorias precoces (SCHMUÑIS, 1994; WHO, 2002). Além do custo com a aposentadoria, o governo gasta aproximadamente 19,1 milhões de dólares por ano com a implantação de marcapasso nos pacientes chagásicos portadores de disfunção do nódulo sinusal (0,2% dos contaminados) e, o prejuízo devido às horas de trabalho perdidas já chegou a 625 milhões de dólares por ano, sem contar os custos do acompanhamento médico e dos benefícios previdenciários (DIAS, 1987; DIAS e COURA, 1997; SCHMUÑIS, 2000).

### 1.1. A Doença de Chagas

A doença de Chagas é uma zoonose, cujo agente etiológico é um parasito hemoflagelado, o *Trypanosoma cruzi*. A infecção pelo parasito ocorre com a picada do vetor, triatomídeo, conhecido como barbeiro. Outras formas de contaminação não vetorial são descritas, entre elas: a forma oral, transfusão sanguínea e a via congênita.

A doença apresenta duas fases distintas: a aguda e a crônica. A fase aguda que corresponde ao período inicial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* no homem e em vários mamíferos pode apresentar-se de forma sintomática ou assintomática. A primeira fase é caracterizada por alta parasitemia na corrente sanguínea e intracelularmente nas células musculares, no sistema nervoso e no sistema fagocítico mononuclear. Nesse período, a doença é detectável por exame sorológico no sangue (reação de Machado Guerreiro), e a sintomatologia é caracterizada por febre, hepatoesplenomegalia, alargamento do linfonodos e edema subcutâneo (RASSI, 1979). Nos casos de transmissão vetorial podem aparecer os chamativos sinais de porta de entrada, ou chagomas de inoculação, sendo o mais indicativo deles o “complexo oftalmo - ganglionar”, conhecido como “sinal de Romana”. Os chagomas estão presentes na maioria dos casos descritos, entretanto, o “sinal de Romana” não aparece com alta frequência, estando presente em apenas 10% dos casos agudos ocorridos (RASSI, 2000).

As alterações cardíacas observadas nesse momento são ocasionadas pela miocardite, como, por exemplo, a taquicardia sinusal, a baixa voltagem do complexo QRS e o bloqueio atrioventricular de primeiro grau (RASSI, 2000).

Esses sintomas são efêmeros e desaparecem gradualmente, mesmo sem tratamento terapêutico (CAMPOS DE CARVALHO, 1994).

Na fase crônica, os pacientes podem apresentar diferentes manifestações clínicas, dependentes tanto de fatores inerentes ao parasito quanto ao hospedeiro vertebrado. Os fatores relevantes inerentes ao parasito são: a variabilidade entre as cepas, a virulência, a antigenicidade, o tropismo e a quantidade do inóculo. Em relação ao hospedeiro vertebrado, fatores como idade, sexo e o perfil da resposta imune parecem modular diferenças nas manifestações clínicas (DIAS, 2000). Nesta fase, a maior parte dos pacientes chagásicos permanece assintomática por um longo período, o que caracteriza a forma indeterminada da doença. Entretanto, quando a doença se manifesta, os principais alvos são o sistema gastrointestinal e o coração. O coração é o órgão mais severa e freqüentemente afetado. A Cardiopatia Chagásica Crônica (CCC) constitui uma das principais causas de insuficiência cardíaca (IC) e é a maior causa de morbidade da doença de Chagas manifestando-se em cerca de 30 a 40% dos pacientes na faixa etária entre 20-50 anos. Estes podem apresentar prognóstico e evolução variáveis, desde pequenas alterações eletrocardiográficas até a insuficiência cardíaca ou progredindo para uma eventual morte súbita (COURA *et al.*, 1984; DIAS, 1992, ELIZARI e CHIALE, 1993). Ainda pode ser observado aumento global da área cardíaca, tendo como fatores determinantes a destruição direta do tecido muscular cardíaco devido ao parasitismo pelo *Trypanosoma cruzi*, fibrose e ação do sistema imune. Aproximadamente 10% dos pacientes infectados desenvolvem a forma digestiva, apresentando dilatações e alterações funcionais, principalmente, no

esôfago e no cólon por lesões no sistema nervoso autônomo intramural, parasitismo tecidual e ação do sistema imune (TAFURI, 1970; TAFURI, 1987; DIAS, 1992).

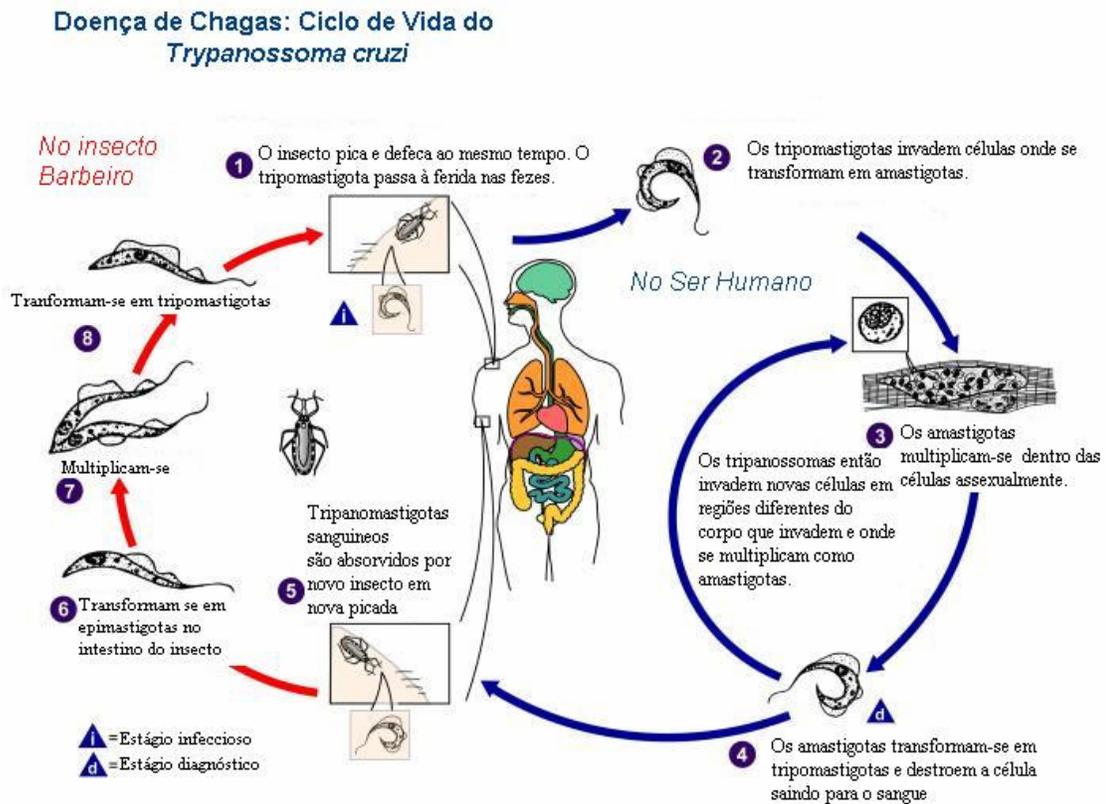
## **1.2. Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi***

O *Trypanosoma cruzi* apresenta um ciclo de vida complexo que envolve hospedeiros mamíferos e insetos da ordem Hemíptera, família Reduviidae. Como os ambientes apresentados ao *Trypanosoma cruzi* são muito diferentes em suas características físico-químicas, este desenvolveu ao longo da evolução estratégias que o habilitaram a lidar com essas variações. Muitas características do parasito como morfologia, ciclos metabólicos, expressão diferenciada de moléculas internas e de superfície, capacidade de infecção, de multiplicação, entre outras, devem ser adequadas a cada novo ambiente. Com base nestas mudanças, o *Trypanosoma cruzi* possui em seu ciclo de vida três estágios evolutivos: epimastigota, tripomastigota e amastigota. Com base nas três formas e na localização do cinetoplasto em relação ao núcleo, pode-se designar o parasito observado em um dos três estágios mencionados: epimastigotas, medindo entre 20 e 40  $\mu\text{m}$ , possui a maior parte do flagelo desprendida do corpo celular e o cinetoplasto posicionado anteriormente em relação ao núcleo; tripomastigotas, medindo aproximadamente 25  $\mu\text{m}$  de comprimento e 2  $\mu\text{m}$  de diâmetro, possuem o cinetoplasto posterior ao núcleo e a maior parte do flagelo correndo ao longo do corpo celular; amastigotas, apresentando forma arredondada e com flagelo muito curto, quase

imperceptível, medem cerca de 5 µm de diâmetro (TYLER E ENGMAN, 2001; DE SOUZA, 2002).

O ciclo do *Trypanosoma cruzi* ocorre quando o inseto, vetor, defeca e urina, depositando sobre a pele ou mucosa do mamífero a forma tripomastigota metacíclica, infectiva e não replicativa. Pelo reflexo de coçar dos mamíferos, os tripomastigotas metacíclicos atingem mais facilmente a circulação sanguínea, aderem e invadem células do hospedeiro. Inicialmente, o parasito é mantido em um compartimento denominado vacúolo parasitóforo, mas em seguida, escapa deste para o citoplasma, onde se diferencia na forma amastigota e se multiplica por fissão binária, podendo tomar todo o citoplasma. Em geral, os amastigotas se diferenciam na forma tripomastigota antes da célula hospedeira ser rompida pelo excesso de parasitas. Assim, há o surgimento de uma forma intermediária designada por alguns autores como *epimastigote-like*, por se assemelhar morfológicamente, e por outros critérios, à forma epimastigota, porém, de menor tamanho (FAUCHER *et al.*, 1995; ALMEIDA-DE-FARIA *et al.*, 1999). Esses tripomastigotas infectam novas células dando origem a um ciclo no hospedeiro mamífero. Eles também podem ser sugados pelo inseto vetor durante o repasto sangüíneo, indo parar na porção anterior de seu intestino. Neste novo ambiente, os tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas podendo passar pelos estágios amastigota e esferomastigota (TYLER e ENGMAN, 2001). Quando alcançam à porção posterior do intestino, começam a multiplicar-se por divisão binária, podendo aderir-se às células intestinais via hemidesmosomos (ZELEDON, 1997). Ao chegarem à ampola retal, os epimastigotas aderem-se por hidrofobicidade à cutícula cerosa que recobre a

parede desta região. Este evento tem sido considerado importante no disparo da metaciclogênese (BONALDO et al., 1988; KLEFFMANN *et al.*, 1998), assim como o estado nutricional do inseto vetor, a cepa de *Trypanosoma cruzi* em questão, o pH e a osmolaridade do meio, a presença de soro de mamífero e de componentes da hemolinfa, e o AMP cíclico (GONZALEZ-PERDOMO *et al.*, 1988). Uma vez completada a diferenciação, os tripomastigotas metacíclicos se soltam da cutícula, podendo ser eliminados na urina ou fezes do inseto em seu próximo repasto sangüíneo (Figura 1).



**FIGURA 1. Diferentes formas do *Trypanosoma cruzi* ao longo do seu ciclo evolutivo no hospedeiro vertebrado.** A contaminação ocorre quando o inseto hematófago infectado (barbeiro) pica o hospedeiro (mamífero) para se alimentar. 1- O inseto, quando se alimenta, deposita no hospedeiro através das fezes a forma tripomastigota. 2- o parasito é mantido dentro das células em um vacúolo, em seguida, escapa deste para o citoplasma. 3- Diferenciação para a forma amastigota e a multiplicação por fissão. 4- Rompimento celular e liberação das formas tripomastigota. 5- O inseto se alimenta de um hospedeiro infectado e ingere os protozoários, que se alojam no seu intestino. 6, 7 e 8 diferenciação e multiplicação do protozoário. Figura adaptada de Centers for Disease Control and Prevention – CDC.

### 1.3. Ação do sistema imune na Doença de Chagas

Os mecanismos imunopatológicos da doença de Chagas que promovem lesões nos tecidos ainda não estão bem elucidados. A dificuldade em detectar o parasito no miocárdio na fase crônica da doença, a existência de uma fase assintomática entre a fase aguda e a crônica, a ocorrência de reações imunes contra componentes de nervos e músculos, e o desenvolvimento das lesões inflamatórias miocárdicas levaram à postulação de teorias autoimunes (PETRY et al, 1991).

#### 1.3.1. Ativação *bystander*

Algumas hipóteses têm sido sugeridas para explicar estas lesões como, o resultado de reação de autoimunidade envolvendo autoanticorpos ou linfócitos T auto-reativos derivados de mimetismo molecular de antígenos do parasito e do hospedeiro, ou a ativação *bystander* não envolvendo antígenos do *Trypanosoma cruzi*, mas induzida por antígenos procedentes de lesões teciduais (ANSELMINI et al., 1966; COSSIO et al., 1974; KIERSZENBAUM, 1999; LEON et al., 2001).

O mecanismo *bystander* constitui a ativação de linfócitos autoreativos que não reconhecem antígenos microbianos, mas que no entanto, pode ser mediado por citocinas ou por células apresentadoras de antígenos (APC) (GIRONÈS et al., 2005). Dois mecanismos de ativação podem operar no ambiente inflamatório induzido pela infecção do *Trypanosoma cruzi* no tecido hospedeiro (TALVANI et al., 2000). Uma hipótese seria que o ambiente proinflamatório no tecido hospedeiro, rico em citocinas, óxido nítrico e

quimiocinas, seria suficiente para ativar células T autoreativas por reduzir o limiar de ativação (FEDOSEYEVA *et al.*, 1999). Essas células proliferariam em resposta a antígenos próprios apresentados por APC (células apresentadoras de antígenos) do hospedeiro. O outro componente seria a citólise de cardiomiócitos resultante da infecção chagásica, que levaria a liberação de proteínas do hospedeiro. O elevado nível de antígenos miocárdicos no ambiente proinflamatório levaria a uma apresentação aumentada de peptídeos próprios e estimularia a expansão de células T autoreativas (LEON & ENGMAN, 2001).

### 1.3.2. Mimetismo molecular

O mimetismo molecular refere-se à similaridade na seqüência de aminoácidos ou na conformação estrutural entre moléculas ou nos segmentos de moléculas do *Trypanosoma cruzi* e seu hospedeiro.

A detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* que tenham reação cruzada com os receptores cardíacos é comumente encontrada em humanos e em modelos de animais infectados (Engman, 2002; KIERSZENBAUM, 2003).

Na infecção pelo *Trypanosoma cruzi* muitos exemplos de mimetismo tem sido descritos, entretanto, pouco tem sido estudado extensivamente, principalmente em nível molecular (GIRONÈS *et al.*, 2005).

Em humanos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* o mimetismo molecular entre antígenos do parasito e do hospedeiro com formação de auto-anticorpos foi descrito para miosina cardíaca, proteína P ribossomal, queratina, receptores  $\beta$ -adrenérgicos e muscarínicos, proteínas associadas à microtúbulos do

citoesqueleto e proteínas neuronais (LEVIN *et al.*, 1989; PETRY & EISEN 1989; KERNER *et al.*, 1991; CUNHA-NETO *et al.*, 1996; LOPEZ-BERGAMI *et al.*, 2001).

Recentemente, foi demonstrada a reatividade contra o auto-antígeno Cha (fator de transcrição em mamíferos) em humanos e camundongos infectados com o *Trypanosoma cruzi* (GIRONES *et al.*, 2001b). Estes antígenos no soro de pacientes com cardiopatia chagásica crônica (CCC) reconheceram duas regiões de homologia com o *Trypanosoma cruzi*, a seqüência Tag do parasito (TENU2845) e o SAPA, antígenos da fase aguda de infecção, (ROWLAND *et al.*, 1992, 1995 e TIBBETTS *et al.*, 1994; GIRONES *et al.*, 2001).

A reação cruzada de antígenos do *Trypanosoma cruzi* com a miosina também tem sido muito estudada. Foram descritos diversos antígenos do *Trypanosoma cruzi* com reação cruzada com a miosina de músculo esquelético e cardíaco, sugerindo uma agressão ao tecido cardíaco por mimetismo molecular. Em estudos moleculares foi demonstrado que existe reação cruzada entre a seqüência de aminoácido AAALDK de miosina de cadeia pesada (CMhc) com a seqüência AAAGDK do peptídeo recombinante do *Trypanosoma cruzi*, chamado B13 (GRUBER e ZINGALES, 1993).

#### **1.4. Proteínas Ribossomais de *T. cruzi***

As proteínas P ribossomais do *Trypanosoma cruzi* são: P1, P2 $\alpha$ , P2 $\beta$  e a P0. A proteína TcP2 $\beta$  (proteína ribossomal de *Trypanosoma cruzi*) teve seu

seqüenciamento completado em 1990. Essa proteína contém 107 aminoácidos (Tabela 1) e é homóloga a proteína P2 humana de 11 KDa (BERGAMI,1997).

**Tabela 1.** Seqüência completa da proteína TcP2 $\beta$  .

1 MKYLAAYALV GLSGGTPSKS AVEAVLKAAG VPVDPSRVDA LFAEFAGKDF DTVCTEGKSK 61 LVGGVTRPNA ATASAPTAAA AASSGAAAPA AAAEEEEEDDD MGFGLFD
--

Os anticorpos anti-proteínas P foram detectados no soro de pacientes chagásicos e o título desses anticorpos está associado com o grau da miocardite, sugerindo a correlação da presença destes anticorpos com a patologia no coração (LEVIN *et al.*, 1990).

O principal epítipo linear da proteína TcP2 $\beta$  foi mapeado e tem uma seqüência C-terminal de 13 aminoácidos (EEEDDDMGFGLFD, R13), que possui grande homologia com a seqüência consenso da proteína P de mamíferos (EESDDDMGFGLD, H13), exceto pela substituição do aminoácido serina pelo ácido glutâmico (Tabela 2). A seqüência do parasito é mais ácida e determina reações imunológicas contra o epítipo do *Trypanosoma cruzi* em infecções humanas (KIERSZENBAUM, 2003).

**Tabela 2.** Comparação entre as proteínas P ribossomais humanas e do parasito *Trypanosoma cruzi*.

Proteínas P	Peso molecular (aproximadamente)	Seqüência 13-C terminal do
a- Humano		
P1	11 kDa	EESDDDMGFGLD
P2	11 kDa	EESDDDMGFGLD
P0	34 KDa	EESDDDMGFGLD
b- <i>T. cruzi</i>		
P1	11 kDa	EEEDDDMGFGLFD
P2 $\alpha$	11 kDa	EEEDDDMGFGLFD
P2 $\beta$	11 kDa	EEEDDDMGFGLFD
P0	34 KDa	EDDDDDFGMGALF]

A reatividade às proteínas ribossomais também foi encontrada em alguns pacientes com lupus erimatoso sistêmico (SLE), onde aproximadamente 15% dos pacientes apresentam autoanticorpos contra o epítopo (H13) localizado na região C-terminal das proteínas ribossomais, P0; P1 e P2 (ELKON *et al.*, 1986). Entretanto, os anticorpos contra proteínas ribossomais de pacientes com CCC e de pacientes com SLE reconheceram epítotos diferentes. O soro de pacientes com doença de Chagas crônica apresenta altos níveis de anti-R13 e baixos níveis de anticorpos anti-H13 (LOPEZ BERGAMI *et al.*, 1997).

O envolvimento das proteínas ribossomais no processo autoimune da doença de Chagas é sustentado por muitos autores, pois estas possuem homologia com seqüências peptídicas presente no hospedeiro. Esta hipótese esta baseada no fato que anticorpos contra a porção C-terminal da proteína P2 $\beta$  são capazes de ter reação cruzada com o receptor  $\beta$ -adrenérgico. Este efeito tem sido atribuído a alta antigenicidade do epítoto presente na porção C-

terminal da proteína P2 $\beta$ , chamado R13 EEEDDDMGFGLFD, o qual possui homologia com a seqüência peptídica AESDE, presente na segunda alça extracelular do receptor  $\beta$ -adrenérgico (SMULSKI *et al*, 2006).

Esta reação cruzada de anticorpos anti-P de pacientes com CCC causa *in vitro* um efeito cronotrópico positivo, sugerindo que estes anticorpos podem estar envolvidos na indução de arritmias e/ou distúrbios elétricos, que são características da infecção crônica (GIRONÈS *et al.*, 2005).

As proteínas ribossomais têm sido associadas à indução de disfunções cardíacas em modelos experimentais. Alguns modelos para a doença de Chagas foram baseados na administração sistêmica de proteínas ribossomais de *Trypanosoma cruzi* em coelhos e camundongos mostrando a indução de lesões inflamatórias no músculo cardíaco e distúrbios eletrocardiográficos semelhantes ao encontrados na fase crônica da doença de Chagas em humanos (TEIXEIRA *et al.*, 1975; RUIZ *et al.*, 1985).

LEVIN e seus colaboradores (1991) mostraram a presença de anticorpos que reconhecem a região carboxi-terminal da proteína P ribossomal do *Trypanosoma cruzi* no soro de pacientes chagásicos com acometimento cardíaco. Posteriormente, o mesmo grupo demonstrou que existe uma reação cruzada desse anticorpo, que não só reconhece a porção C-terminal da proteína P-ribossomal de *Trypanosoma cruzi*, mas também a região da segunda alça extracelular do receptor  $\beta$ 1-adrenérgico (LEVIN *et al*, 1989, LEVIN *et al*, 1991).

Em experimentos utilizando camundongos imunizados com a proteína recombinante P2 $\beta$  de *Trypanosoma cruzi* observou-se a presença de

anticorpos Anti-P e alterações elétricas no eletrocardiograma características da fase crônica da doença de Chagas, mas não foram observadas alterações inflamatórias cardíacas. Esses dados sugeriram alterações na atividade biológica dos anticorpos contra as proteínas P no músculo cardíaco (BERGAMI *et al.*, 1997). Em contrapartida, imunizações com DNA codificante da mesma proteína não produziram alterações eletrocardiográficas (LEVITUS *et al.*, 2003).

A demonstração dos mecanismos envolvidos na patogênese da doença de Chagas é relevante, para que se possa minorar os efeitos deletérios da doença. Visto que, se desconhece com precisão os mecanismos imunológicos que desencadeiam o dano cardíaco na fase crônica da infecção e os fatores que possam estar associados, se faz necessário concentrar esforços na busca de estratégias que esclareçam essas questões. O desenvolvimento de modelos que reproduzam a doença humana, utilizando moléculas do parasito é uma destas estratégias.

Diante dessa necessidade este projeto foi dedicado à criação de um camundongo transgênico que possui o gene da proteína ribossomal do *Trypanosoma cruzi* (P2 $\beta$ ), sob o controle de promotor indutível por doxiciclina, como possível modelo da doença de Chagas.

## 1.5. Objetivos e Metas

### 1.5.1. Objetivo geral

Criar um camundongo transgênico que possui um único antígeno de *Trypanosoma cruzi* que permitirá testar a participação deste antígeno na etiopatogenia da cardiopatia chagásica crônica.

### 1.5.2. Objetivos específicos

- Criar camundongos transgênicos, capazes de sintetizar a proteína ribossomal TcP2 $\beta$ ;
- Analisar a expressão do gene TcP2 $\beta$  exógeno no coração de camundongos transgênicos;
- Analisar a síntese da proteína ribossomal de *Trypanosoma cruzi* no coração de camundongos transgênicos;
- Caracterizar as possíveis alterações funcionais cardíacas nos camundongos transgênicos.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Obtenção do vetor de expressão pTcP2 $\beta$

O plasmídeo pCDNA3/P2 $\beta$  contém um fragmento de 321pb referente ao cDNA de *Trypanosoma cruzi* que codifica a proteína ribossomal P2 $\beta$  incluindo o códon de iniciação ATG e o códon de terminação TAA, que foi gentilmente cedido pelo pesquisador Mariano Levin (Figura 2). Este fragmento foi isolado por restrição com as endonucleases BamHI e XbaI e subclonado no vetor de transgenese condicional pTRE2 (Clontech, USA). Um fragmento de 2.368pb contendo o promotor mínimo P<sub>cmv</sub> responsivo a tetraciclina (Figura 3), o cDNA da proteína P2 $\beta$  e o sinal de poli-adenilação de  $\beta$ -globina foi isolado por restrição com enzima BsrBI do cassete de expressão pTRE2 que foi cedido pelo pesquisador Gennadyi A.Dvoryanchikov (Figura 4).

```

1  GTTTCTGTAC TATATTGTTG TCTTGTACAG A TGAAGTACCT TGCCGCTTAC GCTCTTGTTG
61  GCCTCTCAGG AGGGACCCCC TCAAAGTCTG CAGTTGAGGC CGTATTGAAG GCTGCCGGCG
121 TTCCTGTCGA TCCTTCTCGC GTGGATGCAC TTTTGGCCGA GTTTGCAGGC AAGGACTTTG
181 ATACGGTATG CACTGAAGGC AAATCGAAGC TTGTAGGAGG GGTTACACGT CCCAATGCTG
241 CCACCGCTTC TGCACCCACT GCCGCTGCCG CCGCCTCTAG TGGTGCCGCC GCG CCTGCTG
301 CAGCTGCGGA AGAGGAGGAG GACGATGACA TGGGATTTGG TCTTTTTGAC TAAAGACAAA
361 TGCTTATTTT ATTTTATTTT TGATTTTGTT TCTGTGTTGT CCATGAAGAG GCGC TAAAAA
421 AAAAAAAAAA AAAA

```

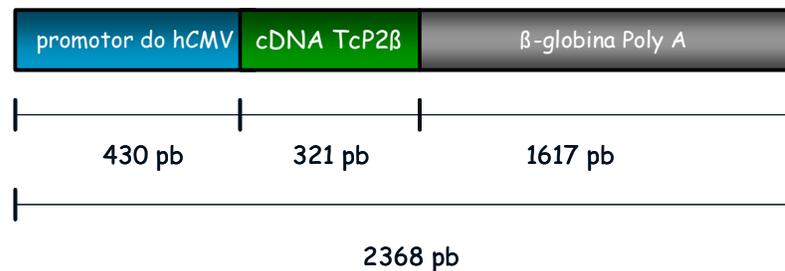
**Figura 2. Seqüência de 321 nucleotídeos referente ao cDNA da proteína TcP2 $\beta$ .** A marcação em vermelho indica o códon de iniciação ATG e o de terminação TAA. A marcação em verde corresponde a região de anelamento do iniciador antisense desenvolvido para a análise de genotipagem por PCR. A marcação em amarelo indica as regiões de anelamento dos iniciadores senso e antisense desenvolvidos para a análise de rt-PCR.

```

1   CTCGAGTTTA CCACTCCCTA TCAGTGATAG AGAAAAGTGA AAGTCGAGTT TACCACTCCC
61  TATCAGTGAT AGAGAAAAGT GAAAGTCGAG TTTACCACTC CCTATCAGTG ATAGAGAAAA
121 GTGAAAAGTCG AGTTTACCAC TCCCTATCAG TGATAGAGAA AAGTGAAAGT CGAGTTTACC
181 ACTCCCTATC AGTGATAGAG AAAAGTGAAA GTCGAGTTTA CCACTCCCTA TCAGTGATAG
241 AGAAAAGTGA AAGTCGAGTT TACCACTCCC TATCAGTGAT AGAGAAAAGT GAAAGTCGAG
301 CTCGGTACCC GGGTCGAGGT AGGCGTGTAC GGTGGGAGGC CTATATAAGC AGAGCTCGTT
361 TAGTGAACCG TCAGATCGCC TGGAGACGCC ATCCACGCTG TTTTGACCTC CATAGAAGAC
421 ACCGGGACCG ATCCAGCCTC CGCGGCCCCG AATTCGAGCT CGGTACCCGG GGATCCTCTA

```

**Figura 3. Seqüência de 430 nucleotídeos referente ao promotor mínimo  $P_{cmv}$  responsivo a tetraciclina presente no plasmídeo pTRE2. A marcação em verde corresponde a região de anelamento do iniciador senso desenvolvido para a análise de genotipagem por PCR.**



**Figura 4. Esquema do fragmento clonados no vetor pTRE2 originando a construção pTcP2β, utilizada na microinjeção pronuclear de zigotos de camundongos.**

## **2.2. Preparação dos fragmentos de DNA para microinjeção**

Os fragmentos de DNA foram diluídos em TE (10 mM Tris. Cl , pH 7.4 e 1mM EDTA, pH 7.8 ) a uma concentração final de 3-5 ng de DNA/ $\mu$ l. Esta concentração equivale a aproximadamente 500 a 1000 moléculas por picolitro do fragmento de expressão que foi microinjetado em pronúcleo masculino do zigoto.

## **2.3. Microinjeção de DNA recombinante no pronúcleo de zigotos de camundongos**

Os camundongos utilizados nesse experimento foram adquiridos do biotério central do Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro e mantidos no biotério de animais transgênicos do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho devidamente, registrado para trabalhar com camundongos transgênicos. Os animais foram alimentados com ração Nutrilab (Mogiana Alimentos S.A., Brasil), sementes de girassol, ovos, cenoura e água.

Como doadoras de zigotos foram utilizadas fêmeas F<sub>1</sub> (CBA x C57Bl/6) híbridas obtidas pelo cruzamento de fêmeas CBA com machos C57Bl/6.

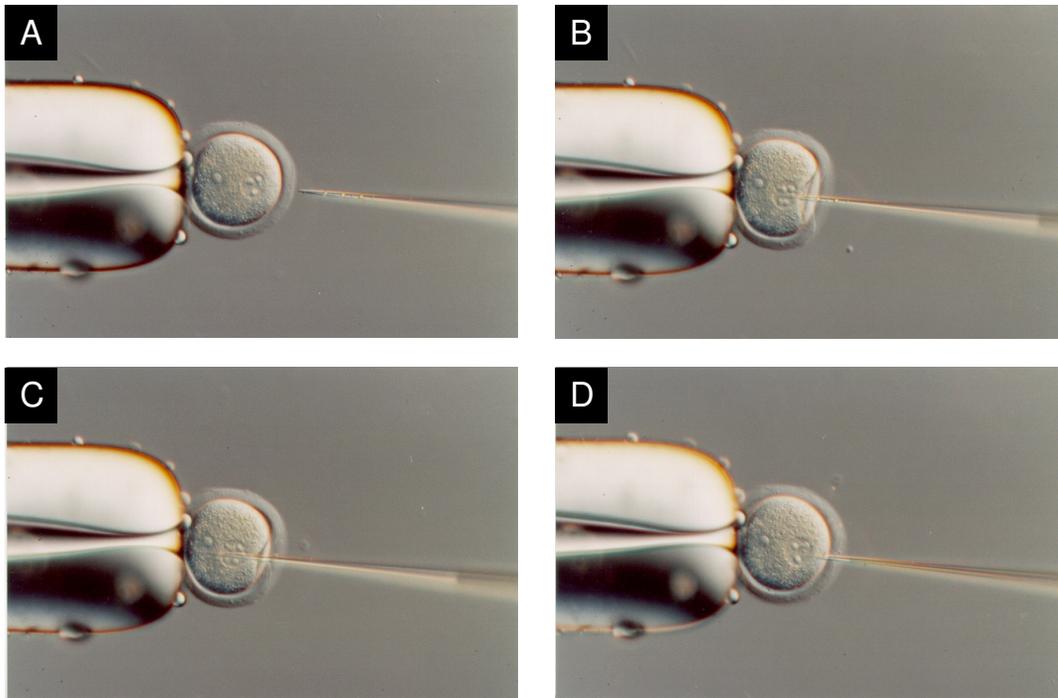
As fêmeas de 4-5 semanas de idade e com aproximadamente 20-25 gramas de peso foram superovuladas através da injeção intraperitoneal de dois hormônios gonadotrópicos. Primeiramente foram injetados 5 U (unidades) do hormônio PMSG (hormônio gonadotrófico da égua prenhe - número do catálogo: G4527 - Sigma, USA) e 46 horas após a primeira aplicação, foram injetadas 5 U do segundo hormônio hCG (gonadotrofina coriônica humana - número do catálogo: C8554 - Sigma, USA).

As fêmeas então foram colocadas em presença dos machos para que houvesse a cópula. Os zigotos foram retirados dos ovidutos 8-10 horas após a cópula, quando os pronúcleos tornavam-se visíveis. Os zigotos que não apresentavam pronúcleos visíveis foram cultivados em estufa a uma temperatura de 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por aproximadamente uma hora a duas horas. Todas as manipulações com os zigotos foram realizadas com o meio M-2 (número do catálogo: M5910 - Sigma, EUA), entre o pH 7.2 e 7.4 e os zigotos foram cultivados em meio M-16 (número do catálogo: M1285 - Sigma, EUA).

Todas as etapas foram realizadas segundo a técnica de Hogan e col. (1994). As microinjeções do DNA recombinante foram realizadas nos pronúcleos masculinos usando uma câmara construída no Instituto de Genética Molecular da Academia Russa de Ciências, especialmente desenvolvida para manipulações com embriões de mamíferos, sob microscópio. Esta câmara contém duas lamínulas de vidro de 24 x 5 mm colocadas uma sobre a outra a uma distância de 1,2 mm. Este espaço entre os vidros é preenchido com óleo de parafina (número do catálogo: M8410 - Sigma, EUA). Foi utilizada uma gota (40 µl) de M-2 de 4 mm de diâmetro colocada no centro da câmara, e de 10 a 30 zigotos foram colocados em uma das partes desta gota. A gota com a solução de DNA foi colocada na mesma câmara próxima a aquela que continha os zigotos. As microagulhas utilizadas nas injeções foram preparadas com capilares de vidro (GC 100-15 - Havard, Inglaterra) com o auxílio de um aparelho estirador de pipetas Narishige. A microagulha foi montada no micromanipulador (Narishige, Japão) e preenchida com óleo de parafina em

uma das extremidades e na outra extremidade livre com uma solução de DNA. A quantidade de solução do DNA aspirada pela agulha microinjetou de 3 a 7 zigotos por vez. Foram microinjetados em cada zigoto aproximadamente 500 a 1000 moléculas por picolitro de DNA. Todos os procedimentos foram realizados com um microscópio Olympus com ótica diferencial Nomarski (Figura 5).

Os zigotos microinjetados foram colocados em estufa incubadora a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> em meio M-16, onde permaneceram por uma hora. Após esse procedimento foram selecionados de 10 a 12 zigotos para a transferência aos ovidutos das fêmeas receptoras com o ciclo reprodutivo sincronizado com as doadoras.



**Figura 5. Técnica de microinjeção de DNA recombinante no pronúcleo do zigoto de camundongo.**

A – Do lado esquerdo o zigoto é fixado por uma pipeta de vidro e do lado direito a agulha de vidro com a ponta de  $1\mu\text{m}$  de diâmetro contendo DNA exógeno.

B – A agulha de microinjeção está penetrando no pronúcleo masculino.

C – A agulha de microinjeção está no interior do pronúcleo masculino.

D – O pronúcleo masculino se encontra aumentado pela injeção do conteúdo da pipeta.

Aumento de 300 vezes, utilizando Microscópio Olympus IX70 com óptica diferencial Nomarski e micromanipuladores (Narishige, Japão).

#### **2.4. Preparação de amostras do DNA de camundongos para análise de PCR**

O DNA foi extraído do tecido da cauda dos camundongos. Para isso, foi feita uma biopsia para retirada de aproximadamente 1 cm da ponta da cauda dos animais entre 3 e 4 semanas de vida e em seguida colocado em solução de lise celular (50 mM Tris-HCl - pH 8,0; 100 mM EDTA; 100 mM NaCl; 1% SDS; 0,1 mg/ml proteinase K) por 16 horas em banho Maria a 50 °C.

A purificação do DNA foi feita pelo método fenol/clorofórmio de acordo com Sambrook *et al.* (1989). Foram adicionados 700 µl de clorofórmio/fenol (1:1) ao tubo contendo a amostra ressuspensa no tampão de lise e a mistura foi agitada por 3 minutos e centrifugada por 5 minutos a 12 000 g.

Aproximadamente 600 µl do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo, onde foi acrescentado o mesmo volume de clorofórmio. A amostra foi centrifugada nas mesmas condições anteriores e o sobrenadante novamente transferido para um novo tubo. Foram adicionados 900 µl de álcool etílico absoluto e a mistura foi agitada até a precipitação do DNA. A amostra foi centrifugada por 3 minutos a 12.000 g, o sedimento foi lavado com 900 µl de álcool a 70 % e secado em temperatura ambiente. O DNA foi ressuspensa em 400 µl de água destilada.

#### 2.4.1. Análise das amostras de DNA de camundongos por reação de polimerase em cadeia (PCR) com iniciadores específicos.

A amostra de 1  $\mu$ l com DNA foi diluída em 1 ml de água destilada, colocada em cubeta de quartzo e quantificada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 260nm. Os valores em OD (densidade ótica) foram convertidos em  $\mu$ g/ml pela seguinte fórmula: concentração é igual a OD x diluição x 50 dividido por 1000. Para a reação de PCR foi utilizado entre 150 e 300 ng/  $\mu$ l de DNA genômico. O volume final da reação foi de 20  $\mu$ l contendo, 2,5 mM  $MgCl_2$ , 1  $\mu$ M de iniciadores senso e antisenso, 0,5 U Taq-polimerase (Promega, EUA), tampão (20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl), 0,2 mM de cada desoxiribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) e 1  $\mu$ l de solução contendo DNA.

As amostras foram amplificadas em termociclador com o seguinte protocolo: 95°C por 1 minuto, 35 vezes do ciclo  $\rightarrow$  95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e 72°C por 3 minutos. Após esse procedimento 10  $\mu$ l de cada amostra foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose a 1% em TAE 1 X (0,04 M Tris-acetato; 0,001M EDTA, pH 8,0 – Sambrook et. al., 1989).

A identificação dos camundongos portadores dos transgene P2 $\beta$  foi realizada utilizando-se na reação de PCR indicadores senso, complementar a seqüência do final do promotor do hCMV (375 pb a 395 pb) e o antisenso complementar a seqüência do cDNA da TcP2 $\beta$  (290 pb a 312 pb) Tabela 3. A amplificação do fragmento na construção P2 $\beta$  produziu um fragmento de 390 pb.

**Tabela 3. Seqüência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados na reação de polimerização em cadeia (PCR).**

<b>P2 <math>\beta</math></b>	
Senso (TRS)	5'- ATCGCCTGGAGACGCCATCCA -3'
Antisenso (TRA)	5'-TCTTCCGCAGCTGCAGCAGG -3'

#### 2.4.2. Identificação dos camundongos transgênicos para a construção STOCK Tg (rtTAhCMV) 4Bjd/J

Amostras do DNA cromossomal dos camundongos STOCK Tg (rtTAhCMV) 4Bjd/J, obtidos do *Jackson Laboratory* foram quantificado em espectrofotômetro com descrito anteriormente. Para a reação de PCR foi utilizado entre 150 e 300 ng/  $\mu$ l de DNA genômico. O volume final da reação foi de 20  $\mu$ l contendo, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ M de cada um dos iniciadores senso e antisenso, 0,5 U Taq-polimerase, tampão (20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl), 0,2 mM de cada desoxiribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) e 1  $\mu$ l de solução contendo DNA. As amostras foram amplificadas em termociclador com o seguinte protocolo: 95°C por 1 minuto, 35 vezes do ciclo  $\rightarrow$  95°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e 72°C por 3 minutos. Após esse procedimento 10  $\mu$ l de cada amostra foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose a 1% em TAE 1 X (0,04 M Tris-acetato; 0,001M EDTA, pH 8,0) (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Os iniciadores senso e antisenso do gene rtTA foram obtidos do *Jackson Laboratory*. Como controle interno da reação e da qualidade do DNA foram

utilizados iniciadores específicos para o receptor de célula T (Tcrd) também desenvolvidos pelo *Jackson Laboratory* (Tabela 4).

O produto final de amplificação para gene rtTA foi de 450 pb e do controle interno foi de 200 pb.

**Tabela 4. Seqüência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados na reação de polimerização em cadeia (PCR).**

<b>rtTA</b>	
Senso (TTA1)	5'-CGCTGTGGGGCATTCTTACTTTAG-3'
Antisenso (TTA2)	5'-CATGTCCAGATCGAAATCGTC-3'
<b>Receptor de célula T (controle interno)</b>	
Senso (C1)	5'-CAAATGTTGCTTGTCTGGTG -3'
Antisenso (C2)	5'-GTCAGTCGAGTGCACAGTTT-3'

## **2.5. Obtenção das linhagens de camundongos transgênicos**

### **2.5.1 Obtenção das linhagens de camundongos transgênicos para o gene P2 $\beta$**

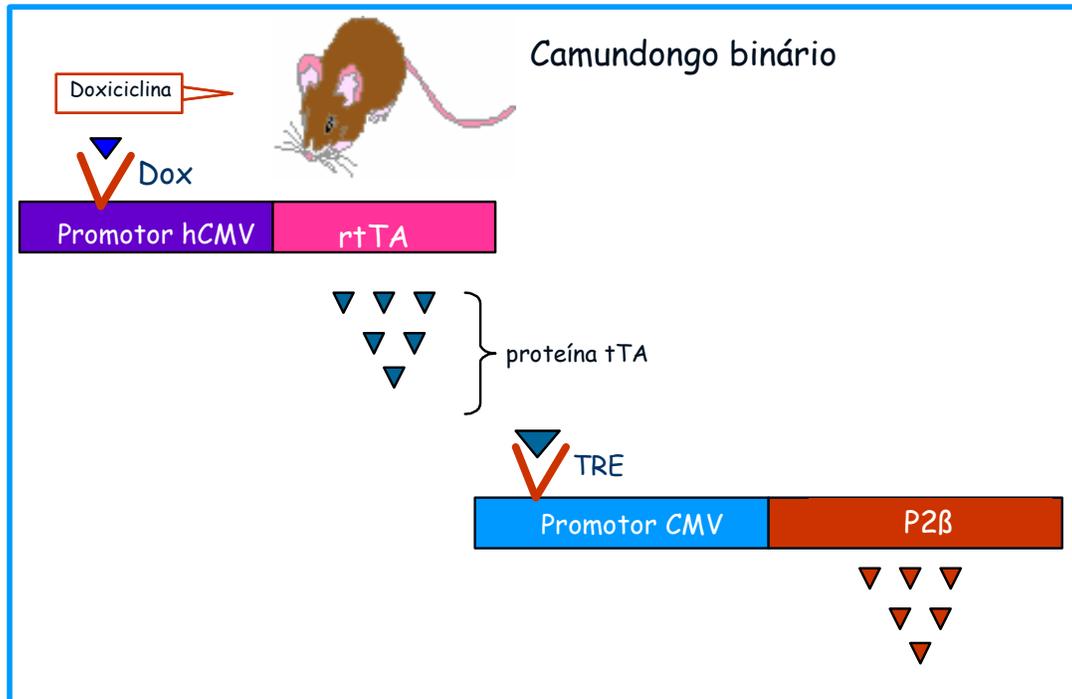
Após a identificação dos animais transgênicos, cada um fundou sua própria sublinhagem. Os camundongos fundadores foram considerados como F0 e cruzados com camundongos híbridos não transgênicos (CBA x C57Bl/6) criando a geração F1. Os camundongos transgênicos da geração F1 foram cruzados com camundongos não transgênicos e formaram a geração F2 e esse procedimento foi repetido em cada geração, com o propósito de aumentar a quantidade de animais transgênicos. Para o desenvolvimento deste projeto, os camundongos transgênicos foram cruzados com camundongos isogênicos

C57Bl/6, a fim de diminuir a variabilidade genética encontrada nos híbridos. Os camundongos P2 $\beta$  foram retrocruzados até que a linhagem dos animais transgênicos estivesse no fundo C57Bl/6, 10 retrocruzamentos. Os animais foram alimentados com ração Nutrilab (Mogiana Alimentos S.A., Brasil), sementes de girassol, ovos, cenoura e água.

#### 2.5.2. Expansão da Linhagem STOCK Tg (rtTA<sub>hCMV</sub>) 4Bjd/J

A linhagem transgênica homozigota STOCK Tg (rtTA<sub>hCMV</sub>)4Bjd/J foi obtida do *Jackson Laboratory*. Estes camundongos possuem o gene da proteína transativadora reversa (rtTA) da tetraciclina sob o controle do promotor mínimo do citomegalovírus humano (P<sub>hCMV</sub>). Estes camundongos quando cruzados com linhagens que possuam um gene de interesse ligado a um promotor que possua o sítio TRE (elemento responsivo a tetraciclina), dão origem a camundongos que podem ter o gene de interesse ativado quando se acrescenta doxiciclina na dieta hídrica dos mesmos (Figura 6). Os órgãos que são controlados por este promotor são músculo, rim, timo, pâncreas, estômago e coração.

Para a realização deste trabalho foram obtidos três casais da linhagem STOCK Tg(rtTA<sub>hCMV</sub>)4Bjd/J que fundaram sua própria sublinhagem no biotério de animais transgênicos do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. Os camundongos fundadores formaram 3 sublinhagens (sublinhagem 1, sublinhagem 2 e sublinhagem 3) que foram consideradas F0 e originaram a geração F1 que foi utilizada neste projeto. Os animais foram alimentados como descrito anteriormente.



**Figura 6. Esquema da ativação dos promotores através da indução por tetraciclina nos camundongos binários.** O camundongo ingere a doxiciclina diluída na água do bebedouro, ocorre a ativação do promotor hCMV e a síntese da proteína tTA, que liga no sítio responsivo a tetraciclina (TRE) no segundo promotor. Essa ativação leva a produção da proteína P2β.

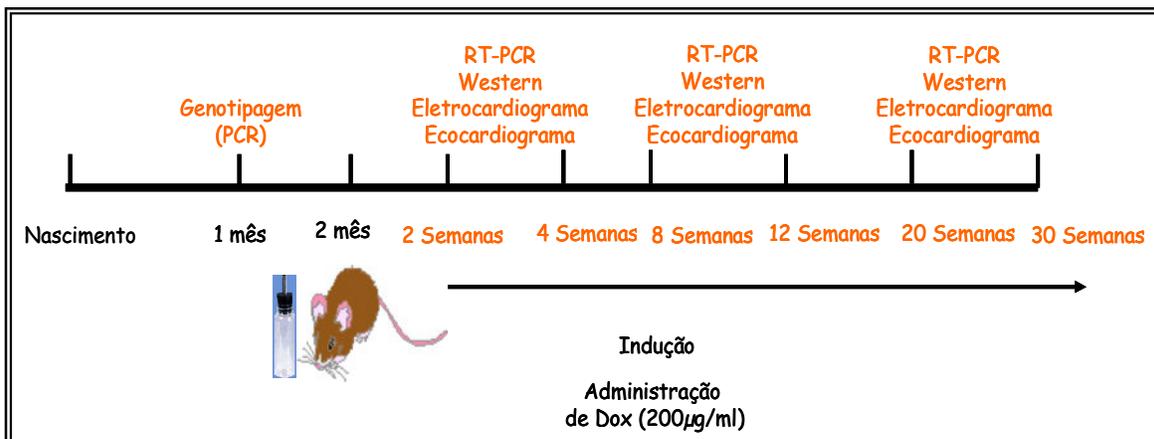
### 2.5.3. Obtenção de camundongos duplos transgênicos (Binários)

Os camundongos transgênicos P2β foram cruzados com os camundongos STOCK Tg(rtTAhCMV)4Bjd/J do *Jackson Laboratory* para a produção de animais duplo transgênicos (binários). O plano de acasalamentos constituiu-se principalmente de cruzamentos de fêmeas transgênicas heterozigotas P2β com machos transgênicos homozigotos STOCK Tg(rtTAhCMV)4Bjd/J para obtenção de F1. A fim de testar uma possível alteração no padrão genético, visto que as linhagens são heterogênicas, o

grupo de acasalamento foi subdividido em 3 sublinhagens. A sublinhagem 1 consistiu do cruzamento dos animais P $\beta$ 2 com os animais STOCK Tg(rtTAhCMV)4Bjd/J do casal 1 obtido do *Jackson Laboratory* e o mesmo aconteceu para as sublinhagens 2 e 3. Os camundongos machos F1 duplos transgênicos desses cruzamentos foram utilizados ao longo do experimento.

## **2.6. Indução dos camundongos binários**

A indução consistiu na substituição da água na dieta dos animais por doxiciclina diluída em sacarose (Sigma, USA). O início da indução foi realizado nos camundongos duplo transgênicos com 8 semanas de idade. A doxiciclina administrada foi diluída em sacarose a 5% na concentração de 200  $\mu$ g/ml e os não induzidos receberam apenas sacarose a 5% (KISTNER *et al.*, 1996). Os bebedouros contendo doxiciclina e a sacarose foram trocados 3 vezes na semana. Os animais foram divididos em três grupos A-binários induzidos com doxiciclina, B-binários não induzidos e C-P2  $\beta$  não induzidos. Os animais foram divididos em seis grupos de 2, 4, 8, 12, 20 e 30 semanas de indução (Figura 7). Em cada grupo experimental analisamos o RNAm pela técnica de RT-PCR, a expressão da proteína por Western blot e as possíveis alterações fisiológicas foram analisadas pelas técnicas de eletro e ecocardiografia.



**Figura 7. Modelo esquemático da metodologia usada na indução dos camundongos.** Em vermelho, o período de tratamento utilizado nos camundongos e as técnicas realizadas.

## 2.7. Determinação do RNA do gene P2 $\beta$ no coração dos camundongos binários pela técnica RT-PCR

### 2.7.1. Extração do RNA total dos tecidos

Os camundongos transgênicos foram sacrificados por deslocamento cervical e o coração recuperado foi rapidamente lavado em PBS e imediatamente congelado em nitrogênio líquido.

O RNA total foi obtido utilizando o reagente Trizol (GIBCO, EUA). Esse reagente é uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, desenvolvida por CHOMCZYNSKI & SACCHI, 1987. Aproximadamente 100 mg de tecido foram ressuspensos em 1mL de Trizol. A amostra foi homogeneizada e incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação foram adicionados 0,2 ml de clorofórmio à mistura que foi incubada por 5 minutos a

temperatura ambiente e então centrifugada a 12 000 g por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo ao qual foram acrescentados 0,5 ml de isopropanol. A amostra foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugada por 10 minutos a 12 000 g. O precipitado de RNA obtido na centrifugação foi lavado com 1 ml de etanol 75%, seco a temperatura ambiente e solubilizado em água tratada com DEPC. A concentração do RNA foi determinada por espectrofotometria a 260nm. Os valores em OD foram convertidos em  $\mu\text{g/ml}$  pela seguinte fórmula: concentração é igual a OD x diluição x 40 dividido por 1000. A integridade do RNA foi analisada pela relação de OD a 260 nm sobre 280nm e as amostras foram consideradas integras com o coeficiente igual ou superior a 2,2.

### 2.7.2. Ensaio de RT-PCR

Para os ensaios de RT-PCR foram utilizados 5 $\mu\text{g/ml}$  de RNA total. O RNA foi submetido a uma RNase-Free DNASE (Promega, USA) a fim de eliminar o DNA segundo protocolo do fabricante. Posteriormente o RNA foi submetido a uma reação de transcriptase reversa pela enzima SuperScript III utilizando Oligo (dT) primer (Invitrogen, USA). O cDNA foi amplificado por PCR utilizando iniciadores específicos para p2 $\beta$ . A posição de anelamento dos iniciadores senso e antisense foram apresentadas na figura 2. Como controle interno da reação e da qualidade do RNA foram utilizados iniciadores específicos para beta-actina (Tabela 5).

O volume final da reação foi de 20 µl contendo, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µM de iniciadores senso e antisenso, 0,5 U Taq-polimerase, tampão (20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl), 0,2 mM de cada desoxiribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) e 2 µl de solução contendo cDNA .

As amostras foram amplificadas em termociclador com o seguinte protocolo: 35 vezes do ciclo → 94°C por 20 segundos, 66°C por 20 segundos, 72°C por 30 segundos e 72°C por 3 minutos. Após esse procedimento 10 µl de cada amostra foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose a 1% em TAE 1X. O produto de amplificação esperado é de 300 pb para a amplificação do transgene e 328 pb para amplificação do controle interno.

**Tabela 5. Seqüência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados na reação de polimerização em cadeia (PCR).**

<b>P2β</b>	
Senso (p2β1)	5'- TACCTTGCCGCTTATGCTCT -3'
Antisenso (p2β2)	5'- CATGTCATCGTCCTCCTCCT-3'
<b>Beta-actina (controle interno)</b>	
Senso (ACT 1)	5'-CACCCCTGTGCTGCTCACC-3'
Antisenso (ACT 2)	5'-GCACGATTTCCCTCTCAG-3'

## **2.8. Análise da proteína P2β nos corações de camundongos binários através do “Western blot”**

As amostras de coração foram homogeneizadas na solução de lise celular (50mM Tris pH 7,6, 0,025% Triton, 0,15mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1mM EDTA, 0,1mM PMSF).

Foram adicionados 10 µl de tampão de amostra (4 ml de água destilada, 1 ml de Tris HCl [0,5 M, pH 6,8], 800 µl de glicerol, 1,6 ml de SDS 10%, 0,4 % de beta mercaptoetanol e 0,05 % azul de bromofenol) e as amostras foram fervidas por 5 minutos.

### SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada segundo a metodologia de Laemmli (1970), em gel descontínuo constituído de gel separador (15% acrilamida, 0,2% bisacrilamida, 0,1% SDS e 0,375M tris pH 8,8), gel “stacking” (5% acrilamida, 0,5% bisacrilamida, 0,1% SDS e 0,125M tris pH 6,8).

As corridas eletroforéticas foram realizadas em mini-gel (Mini-Protean II – BioRad Laboratories), com tampão de corrida 1X (25mM tris, 192mM glicina e 0,1% SDS pH 8,3) a voltagem constante de 100 V por 1 hora de corrida. A massa molecular foi determinada por comparação com padrões de massas moleculares conhecidas (Molecular Weight “Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards – BIO-RAD”).

Após a corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose com poros de 0,45µm, utilizando equipamento de transferência BioRad, com tampão de transferência 1X (25mM Tris,192mM glicina; 20% de metanol pH 8,3). Em seguida a membrana de nitrocelulose contendo as proteínas transferidas foi incubada em solução bloqueadora de 5% de leite desnatado em PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Após essa etapa a membrana foi incubada por 2 horas a temperatura ambiente com anticorpo primário monoclonal Mab17.2 contra proteína P2β, gentilmente

cedido pelo pesquisador Mariano Levin, numa concentração de 1µg/ml e lavadas em TBS contendo Tween 20 a 0,1% por 3 vezes durante 10 minutos. Ao término da lavagem, a membrana foi incubada em TBS (20mM Tris e 137mM NaCl), contendo anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com peroxidase (HRPconjugate, Santa Cruz, Biotecnology, EUA) por 1 hora. O anticorpo foi diluído 3000 vezes de acordo com o protocolo do fabricante.

Novamente a membrana foi lavada em TBS/Tween, nas mesmas condições citadas anteriormente. A revelação do complexo foi feita pelo tratamento da membrana com o coquetel quimioluminescente (ECL, Santa Cruz, Biotecnology, EUA) por 1 minuto e em seguida foi exposta ao filme Hyperfilm (Kodak) por tempos variáveis. O filme foi revelado com solução reveladora Polimax T (Kodak).

## **2.9. Determinação de alterações fisiológicas através das técnicas de eletrocardiograma**

Os animais submetidos ao eletrocardiograma foram divididos em dois grupos: animais binários induzidos (duplos transgênicos) e animais binários não induzidos (duplos transgênicos e os transgênicos P2β). Os registros foram realizados nos animais estudados no dia em que o grupo experimental completasse o período de indução determinado neste trabalho. Os camundongos foram anestesiados com uma combinação de cloridrato de ketamina (Dopalen<sup>®</sup>) e cloridrato de xilazina (Anasedan<sup>®</sup>) (50 e 5 mg por kg de peso, respectivamente, diluídos em solução salina 0,9% v/v) pela via intraperitoneal. Uma vez anestesiados, os eletrodos foram implantados no tecido subcutâneo das regiões dorsal e ventral à altura do tórax dos camundongos.

Dois dias após o implante, os eletrodos foram conectados a um amplificador diferencial e os registros foram adquiridos digitalmente (amostragem de 150 pontos por segundo) usando uma interface analógica-digital da Axon Instruments Inc (Union City, Califórnia, Estados Unidos) e o software Axoscope 9,0 da mesma firma (adaptado por Pereira Jr *et al.*, 2006).

Os registros eletrocardiográficos do presente trabalho foram realizados em animais conscientes, com o objetivo de evitar o efeito de anestésicos sobre a eletrofisiologia cardíaca. A aquisição dos registros na derivação D2 foi feita sempre no mesmo horário e os parâmetros analisados foram: frequência cardíaca e duração da onda P, do complexo QRS e dos intervalos PR e QT.

#### **2.10. Determinação de alterações fisiológicas através das técnicas de ecocardiograma**

Para a realização do ecocardiograma foi utilizado um equipamento de ultra-som (modelo Visual Sonics Vevo770) que permite a aquisição de imagens uni e bidimensionais com transdutor de 30 MHz (Figura 8).

Os animais foram divididos em dois grupos: animais duplos transgênicos induzidos e animais não induzidos, sendo este último grupo constituído de duplos transgênicos e transgênicos para o gene P2 $\beta$ . Estes grupos foram analisados no período de 2, 4, 8, 12, 20 e 30 semanas. O grupo de 2 semanas foi constituído de 8 animais induzidos e 4 não induzidos; o grupo de 4 e 20 semanas foram compostos de 5 animais induzidos e 4 não induzidos e os grupo de 8, 12 e 30 semanas foi constituído de 4 animais induzidos e 4 não induzidos.

Os camundongos foram anestesiados com Isoflurano por via inalatória em mistura com oxigênio num fluxo de 8 ml/min e foram posicionados em decúbito dorsal em uma placa aquecida especialmente projetada, a qual permite a realização do ecocardiograma e a monitoração eletrocardiográfica e a frequência ventilatória simultânea dos mesmos. Após tricotomia da parede anterior do tórax, foi aplicado um gel condutor de ultra-som (Carbogel, indústria brasileira) em seu tórax para diminuir o contato com o ar e melhorar a qualidade das imagens. Todas as imagens foram adquiridas pelo mesmo pesquisador que desconhecia a origem dos animais. Os parâmetros avaliados compreenderam a fração de ejeção, o volume diastólico e o débito sistólico do ventrículo esquerdo (VE) e o débito cardíaco.

Os cortes empregados para aquisição dos parâmetros obtidos seguiram os critérios da American Society of Echocardiography.



**Figura 8 Equipamento de ultra-som, modelo Visual Sonics Vevo 770 utilizado para as análises de ecocardiograma nos camundongos transgênicos.**

### **2.11. Análise estatística**

A taxa de nascimento de embriões microinjetados e o número de animais transgênicos foram avaliados pelo teste Chi-quadrado (GrafPAD, Prisma).

Para comparação entre grupos experimentais, foi utilizado o teste t de *Student*. O grau mínimo de significância considerado foi 95 % ( $p < 0.05$ ). Os cálculos foram realizados utilizando o programa Graphpad Prizm (New York, EUA). Todos os valores são representados como média  $\pm$  dp (desvio padrão).

### 3. Resultados

#### 3.1. Análise da produção de camundongos transgênicos pela microinjeção do DNA do vetor pTcP2 $\beta$

Foram microinjetados 192 zigotos com o DNA recombinante referente ao fragmento pTcP2 $\beta$  ocorrendo o nascimento de 54 (27%) filhotes. Entre os nascidos foram identificadas 2 fêmeas transgênicas (3,7%) pela reação de PCR, que receberam a identificação 1♀<sub>1</sub> e 2♀<sub>2</sub>. Estas fêmeas transgênicas 1♀<sub>1</sub> e 2♀<sub>2</sub> da primeira geração (F0) foram usadas como fundadoras para criação de linhagens de animais transgênicos e cruzadas com machos não transgênicos

A fêmea 1♀<sub>1</sub> produziu 18 filhotes (F1), entre eles foram identificados 2 transgênicos (Figura 9). A proporção entre não-transgênicos e transgênicos foi 9:1, ocorrendo um desvio esperado de 1:1, segundo a herança Mendeliana. Com o objetivo de melhorar esses resultados, uma fêmea transgênica da geração F1 foi cruzada com um macho não transgênico e gerou 4 filhotes, entre eles 2 transgênicos. A proporção neste caso foi 1:1, atingindo o padrão esperado (Tabela 6).

A fêmea transgênica 2♀<sub>2</sub>, não gerou prole transgênica entre 24 nascidos. Estes dados sugerem um mosaicismos tecidual, falta de integração do transgene na linhagem germinativa, que gerou uma incapacidade dessa fêmea transmitir o transgene para as gerações seguintes.



### 3.2. Herança do transgene P2 $\beta$ nas gerações e estabelecimento das linhagens de camundongos transgênicos.

A fim de ampliar o número de transgênicos para o desenvolvimento do experimento e padronizar o fundo genético, dois transgênicos P2 $\beta$  obtidos da fêmea fundadora 1♀<sub>1</sub> foram cruzados com animais isogênicos C57BL/6 (tabela 7). O transgene presente nos camundongos P2 $\beta$  de fundo genético heterogêneo foi transferido para a linhagem isogênica C57BL/6 através de retrocruzamento durante 10 gerações. Estes animais da geração F10 foram utilizados para o cruzamento com os transgênicos do *Jackson Laboratory*.

Entre os 60 nascidos provenientes da linhagem da fêmea F1 foram identificados 30 camundongos transgênicos (Figura 10), entre os 42 nascidos da linhagem do macho F1 foram identificados 20 transgênicos (Figura 11). A proporção de animais transgênicos e não transgênicos nas gerações da fêmea F1 e do macho F1 foi de 1:1, como esperado pela herança Mendeliana.

<b>Tabela 7. Herança do transgene pTcP2<math>\beta</math> nas gerações (cruzamento dos animais transgênicos com camundongos isogênicos C57BL/6).</b>				
<b>Fundador</b>	<b>Construção</b>	<b>Número de animais nascidos</b>	<b>Número de animais transgênicos</b>	<b>Proporções genotípicas *</b>
♀ F1	pTcP2 $\beta$	60	30	1:1
♂ F1	pTcP2 $\beta$	42	20	1:1

\* Proporções de camundongos transgênicos e não transgênicos

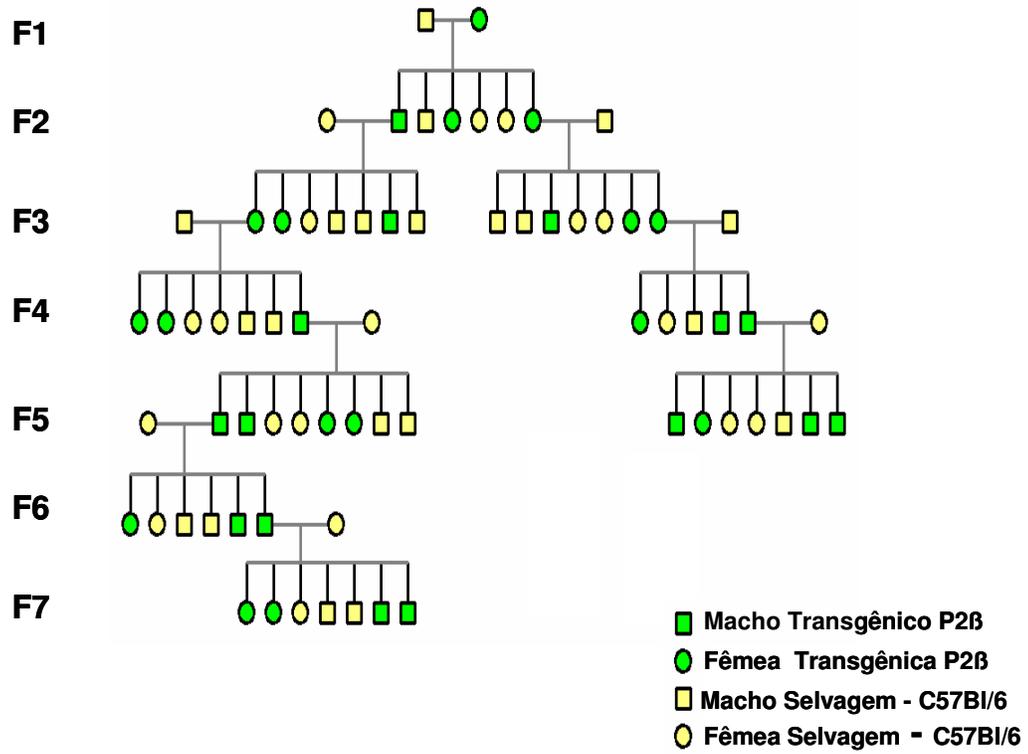


Figura 10. Herança do transgene P2 $\beta$  na linhagem da fêmea F1- Retrocruzamento da fêmea transgênica P2 $\beta$  com macho isogênico C57Bl/6.

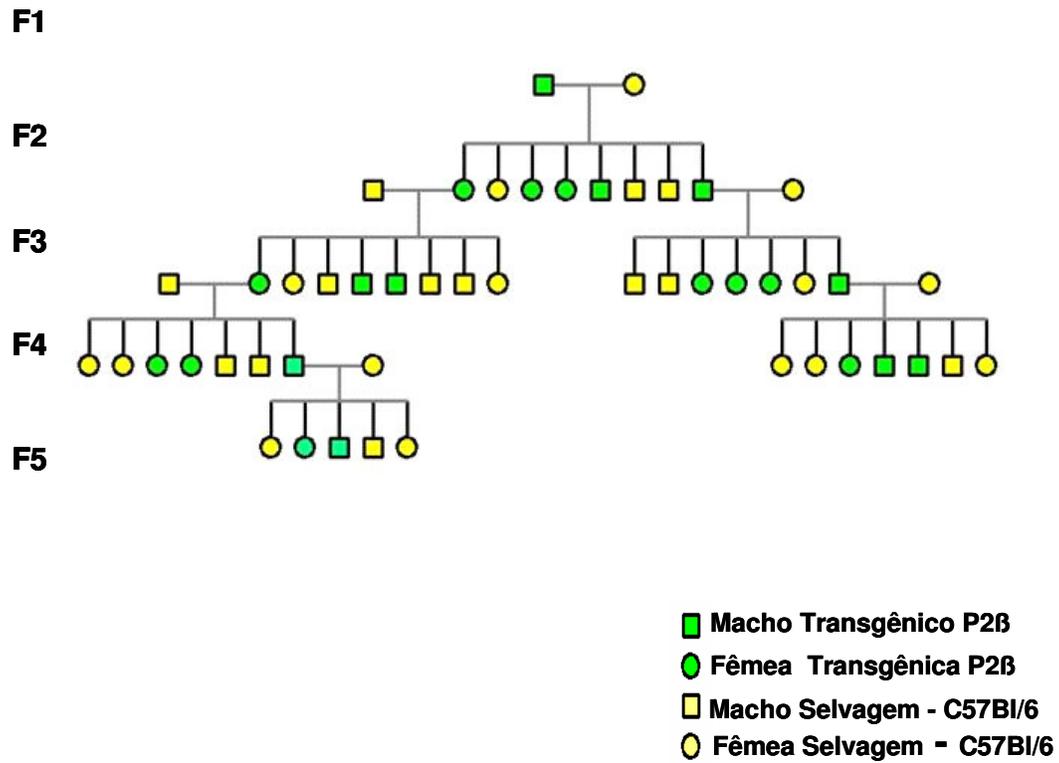


Figura 11. Herança do transgene P2β na linhagem do macho F1- Retrocruzamento do macho transgênico P2β com fêmea isogênica C57Bl/6.

### **3.3. Herança das linhagens de camundongos duplos transgênicos (P2 $\beta$ e STOCK Tg(rtTAhCMV)4Bjd/J) na geração F1.**

Os resultados do cruzamento dos animais transgênicos e STOCK Tg(rtTAhCMV)4Bjd/J estão apresentados nas tabelas 7, 8 e 9. O cruzamento de todas as sublinhagens STOCK Tg(rtTAhCMV)4Bjd/J com camundongos transgênicos P2 $\beta$  produziu um total de 89 descendentes binários. As sublinhagens 1, 2 e 3 produziram 105, 21 e 82 camundongos, entre eles, 49, 6 e 34 camundongos binários, respectivamente (Figuras 12, 13 e 14). Embora os transgênicos para o gene P2 $\beta$  utilizados estivessem num fundo isogênico(C57BL/6) os transgênicos STOCK Tg(rtTAhCMV)4Bjd/J fornecidos pelo *Jackson Laboratory* encontravam-se em fundo heterogênico resultante de três linhagens (NMRI, C57BL/6 and DBA/2 ).

Para o desenvolvimento dessa dissertação foram utilizados apenas animais binários da geração F1, híbridos do cruzamento dos transgênicos P2 $\beta$  e STOCK Tg(rtTAhCMV)4Bjd/J.

Os animais nascidos foram analisados com dois pares de iniciadores específicos para a confirmação dos animais duplos transgênicos. A figura 15 mostra o produto de amplificação do transgene TcP2 $\beta$  nos camundongos binários utilizando os iniciadores TRS e TRA. Enquanto, na figura 16 mostra o produto de amplificação do transgene rtTa utilizando os iniciadores TTA1 e TTA2. Os mesmos animais foram utilizados para a realização dos dois PCR e foram considerados binários aqueles que possuíram bandas positivas em ambos.

**Tabela 8. Herança dos transgenes pTcP2 $\beta$  e STOCK Tg(rtTAhCMV)4Bjd/J na geração F<sub>1</sub> da sublinhagem 1**

Fundador pTcP2 $\beta$	Fundador rtTA	Número de animais nascidos	Número de animais binários	Número do heredograma
421	464	16	7	A
724	527	12	5	B
485	458	8	7	C
685	461	14	7	D
480/488	465	55	23	E

**Tabela 9. Herança dos transgenes pTcP2 $\beta$  e STOCK Tg(rtTAhCMV)4Bjd/J na geração F<sub>1</sub> da sublinhagem 2**

Fundador pTcP2 $\beta$	Fundador rtTA	Número de animais nascidos	Número de animais binários	Número do heredograma
570	530	21	6	F

**Tabela10. Herança dos transgenes pTcP2 $\beta$  e STOCK Tg(rtTAhCMV)4Bjd/J na geração F<sub>1</sub> da sublinhagem 3**

Fundador pTcP2 $\beta$	Fundador rtTA	Número de animais nascidos	Número de animais binários	Número do heredograma
479/481	438	42	18	G
437	383	20	8	H
500	540	20	8	I

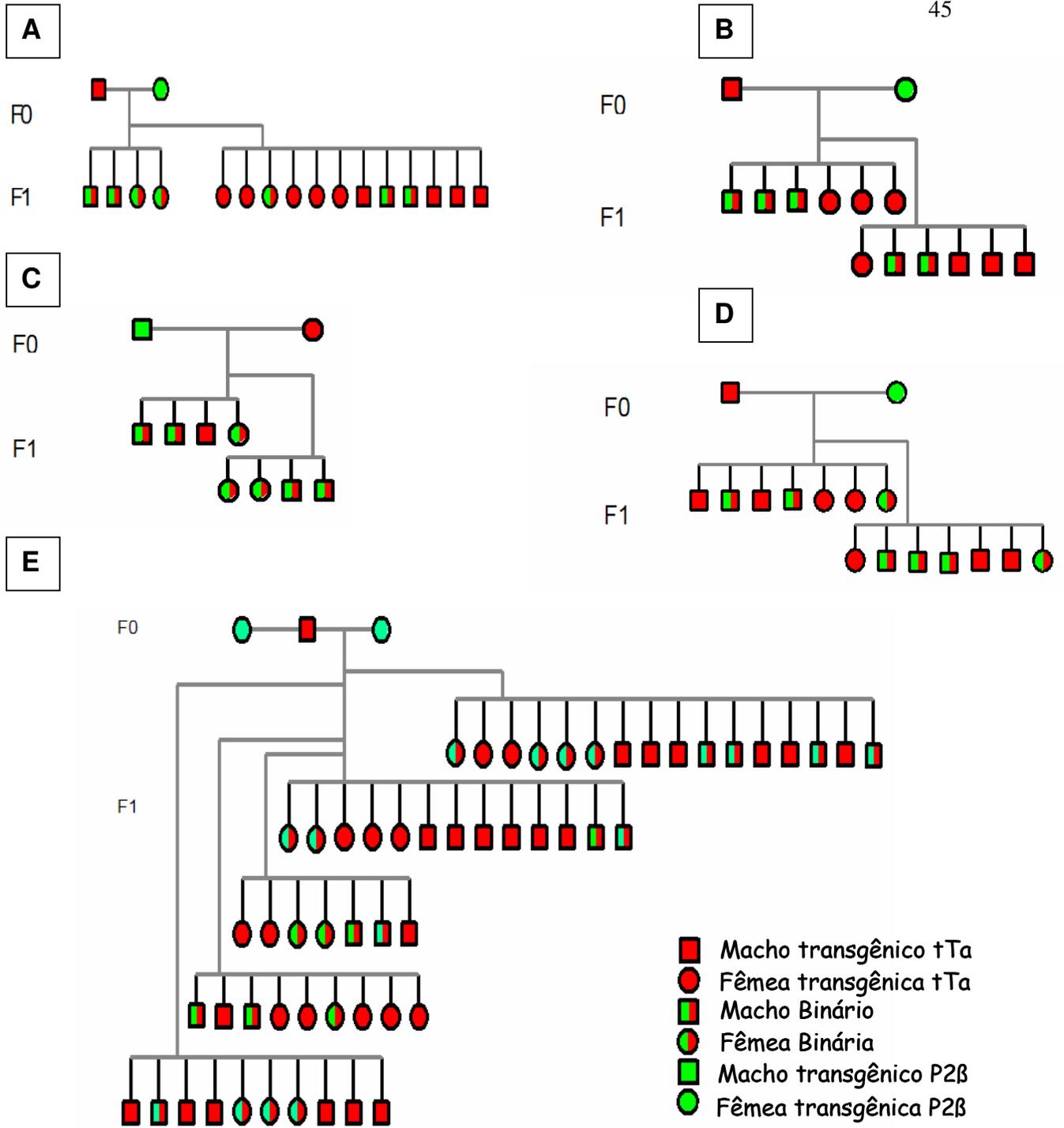


Figura 12. Herança dos camundongos provenientes do cruzamento da sublinhagem 1 STOCK Tg(rtTAhCMV)4Bjd/J com camundongos transgênicos P2β na geração F1.

F

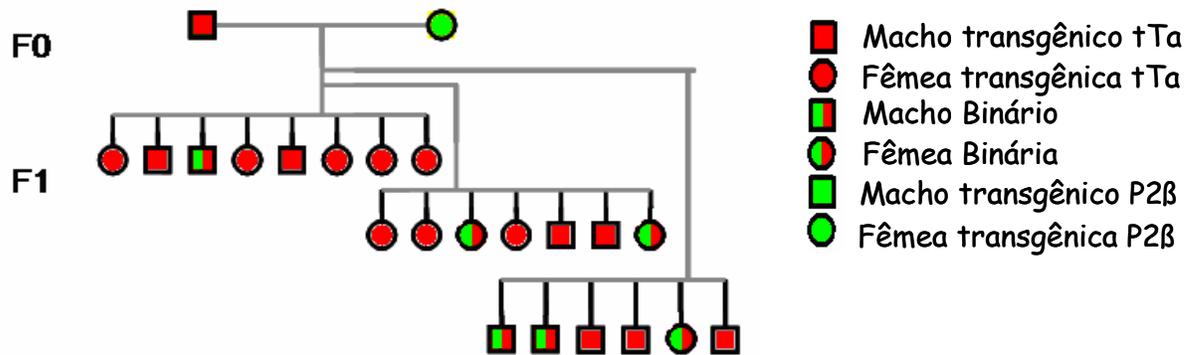
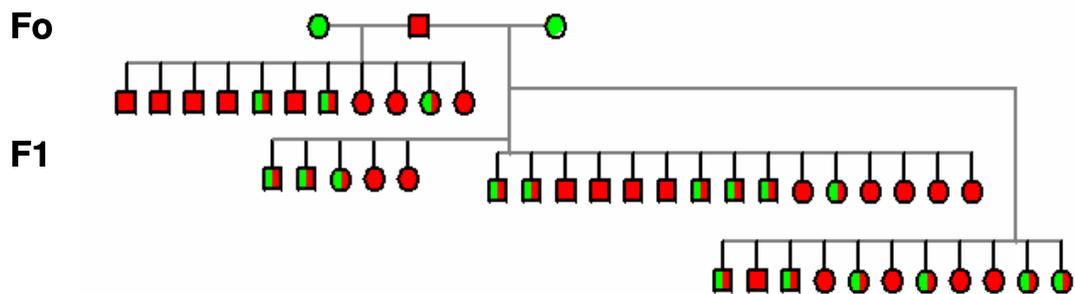


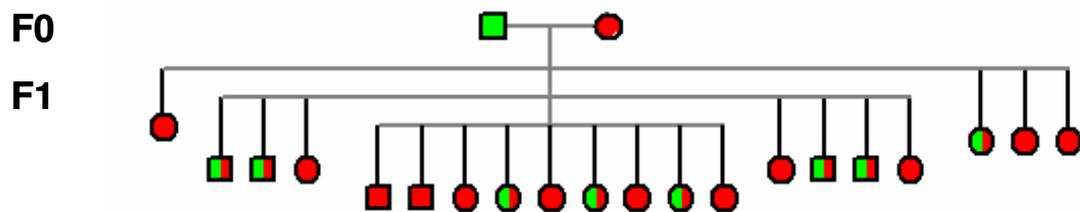
Figura 13. Herança dos camundongos provenientes do cruzamento da sublinhagem 2 STOCK Tg(rtTAhCMV)4Bjd/J com camundongos transgênicos P2β na geração F1.

G

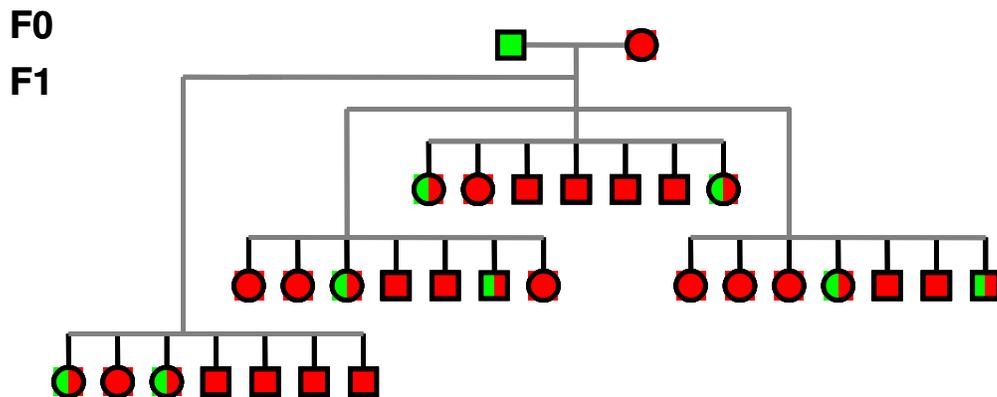


- Macho transgênico tTa  
 ● Fêmea transgênica tTa  
 ■ Macho Binário  
 ● Fêmea Binária  
 ■ Macho transgênico P2β  
 ● Fêmea transgênica P2β

H

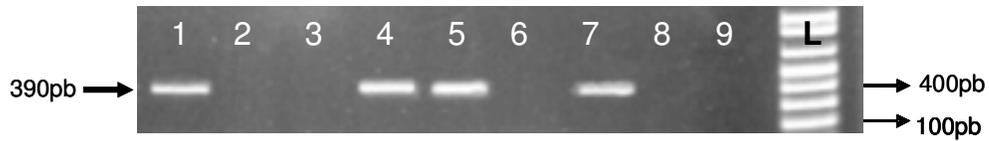


I

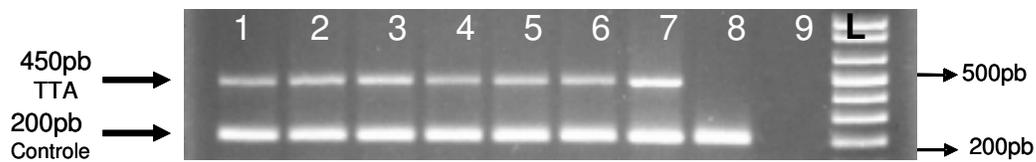


- Macho transgênico tTa
- Fêmea transgênica tTa
- Macho Binário
- Fêmea Binária
- Macho transgênico P2β
- Fêmea transgênica P2β

Figura 14. Herança dos camundongos provenientes do cruzamento da sublinhagem 3 STOCK Tg(rtTAhCMV)4Bjd/J com camundongos transgênicos P2β na geração F1.



**Figura 15. Análise eletroforética em gel de agarose a 1 % dos produtos de PCR de amostras de DNA de camundongos duplos transgênicos P2 $\beta$  e STOCK Tg(rtTAhCMV)4Bjd/J utilizando os iniciadores TRS e TRA. 1, 4 e 5 - transgênicos para o gene TcP2 $\beta$ ; 2, 3 e 6 - não transgênicos; 7 - controle positivo ; 8- controle negativo (camundongo selvagem); 9 - PBS e L - *ladder* de 1 Kb plus.**

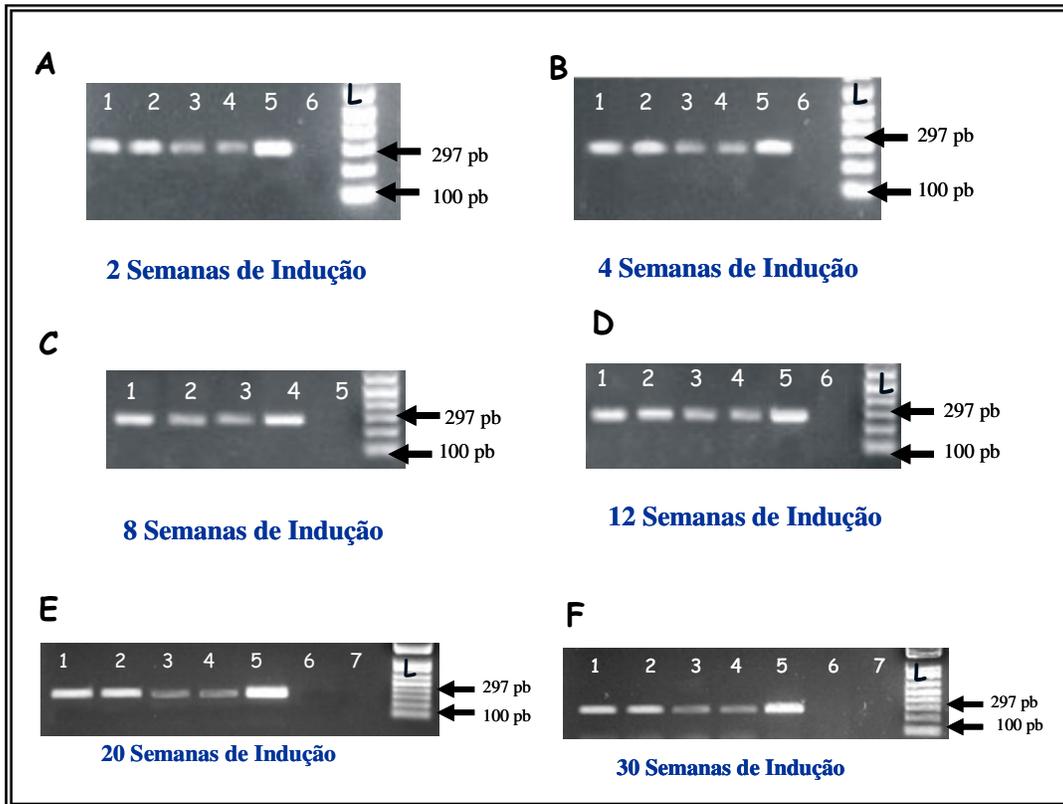


**Figura 16. Análise eletroforética em gel de agarose a 1 % dos produtos de PCR de amostras de DNA de camundongos transgênicos P2 $\beta$  e STOCK Tg(rtTAhCMV)4Bjd/J utilizando os iniciadores TTA1/TTA2 e como controle interno C1/C2. 1 a 6 - transgênicos para o gene rTta; 7 - controle positivo; 8- controle negativo (camundongo selvagem); 9 - PBS e L - *ladder* de 1 Kb plus.**

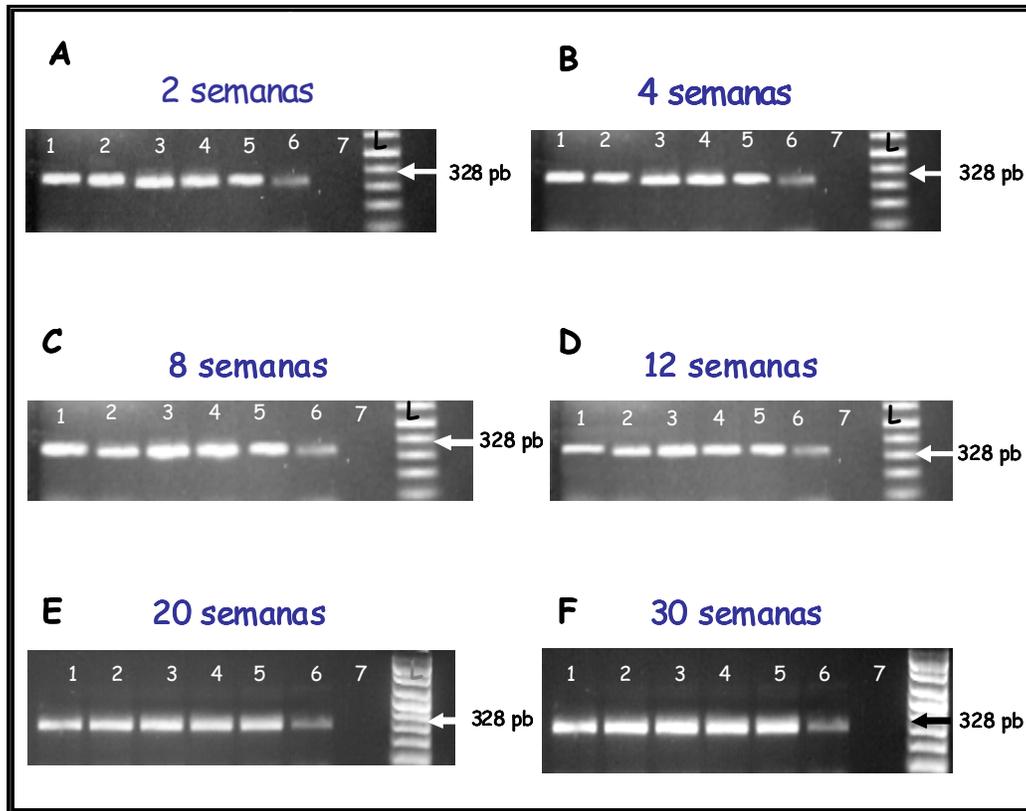
### **3.4 Análise da expressão do gene TcP2 $\beta$ no coração dos camundongos pela técnica RT-PCR**

A expressão do transgene foi positiva no coração dos camundongos duplos transgênicos que foram induzidos por doxiciclina em todos os períodos de indução. Nos animais duplos transgênicos que não receberam doxiciclina e nos camundongos transgênicos para o gene TcP2 $\beta$  ocorreu uma expressão basal do RNAm TcP2 $\beta$  em todos os grupos, o que não ocorreu com camundongos não transgênicos (Figura 17).

A integridade do RNA total das amostras de coração dos camundongos utilizados no RT-PCR foi analisada utilizando actina que serviu como o controle interno do experimento (Figura 18).



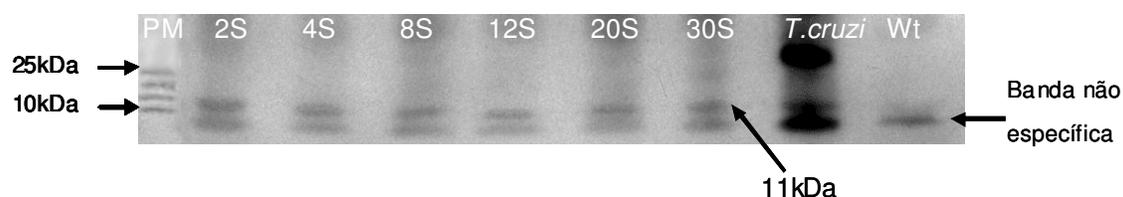
**Figura 17.** Análise eletroforética em gel de agarose 1% da expressão do RNAm do gene P2 $\beta$  de *Trypanosoma cruzi* no coração dos camundongos pelo RT-PCR, utilizando os iniciadores P2 $\beta$  1 e P2 $\beta$  2. Letras A, B, D, E e F: 1 e 2  $\rightarrow$  binários induzidos; 3  $\rightarrow$  binários não induzidos; 4  $\rightarrow$  linhagem P2 $\beta$ ; 5  $\rightarrow$  controle positivo (RNA total de *Trypanosoma cruzi*); 6  $\rightarrow$  controle negativo (RNA total de coração de camundongo não transgênico); 7  $\rightarrow$  RT- e L  $\rightarrow$  1 kb *ladder*. Letra C: 1  $\rightarrow$  Binário induzido - 2  $\rightarrow$  Binário não induzido; 3  $\rightarrow$  linhagem P2 $\beta$  - 4  $\rightarrow$  controle positivo (RNA total de *Trypanosoma cruzi*); 5  $\rightarrow$  controle negativo (RNA total de coração de camundongo não transgênico) e L  $\rightarrow$  1 kb *ladder*.



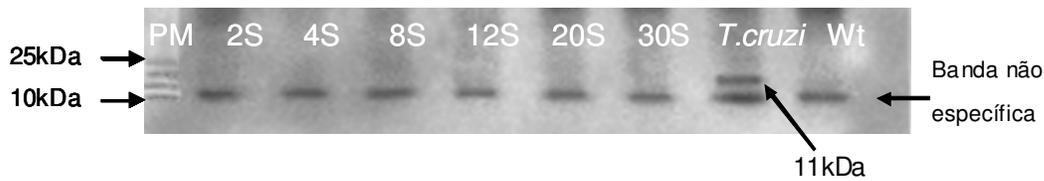
**Figura 18. Análise eletroforética em gel de agarose 1% da expressão de Beta-actina no coração dos camundongos pelo RT-PCR, utilizando os iniciadores específicos. A, B, C, D, E e F: 1 e 2 → binários induzidos; 3→ binário não induzido; 4→ linhagem P2β; 5 → RNA total de coração de camundongo não transgênico; 6→ RNA total de *Trypanosoma cruzi*; 7→ RT- e L → 1 kb ladder.**

### 3.5. Análise da proteína P2 $\beta$ de *Trypanosoma cruzi* produzida no coração de camundongos binários por *Western blot*

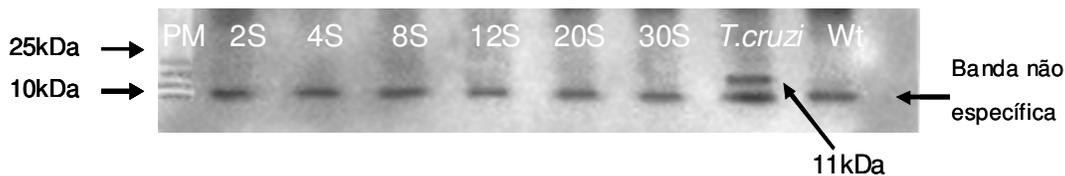
No intuito de avaliar se os animais duplos transgênicos sintetizam a proteína ribossomal de *Trypanosoma cruzi* foram analisadas amostras de coração de camundongos através da técnica de *Western blot* durante todos os períodos de indução. Os resultados mostraram que os corações dos camundongos binários induzidos pela doxíciclina em todos os períodos de tratamento continham a proteína P2 $\beta$  de *Trypanosoma cruzi* (Figura 19). Em contrapartida, não foi detectada a proteína P2 $\beta$  de *Trypanosoma cruzi* no coração dos animais binários não induzidos e dos animais transgênicos para a construção TcP2 $\beta$  (Figura 20 e 21). A fim de testar a integridade das amostras, utilizamos o anticorpo contra GAPH em todas as amostras testadas, gerando um produto esperado de 37kDa (Figura 22).



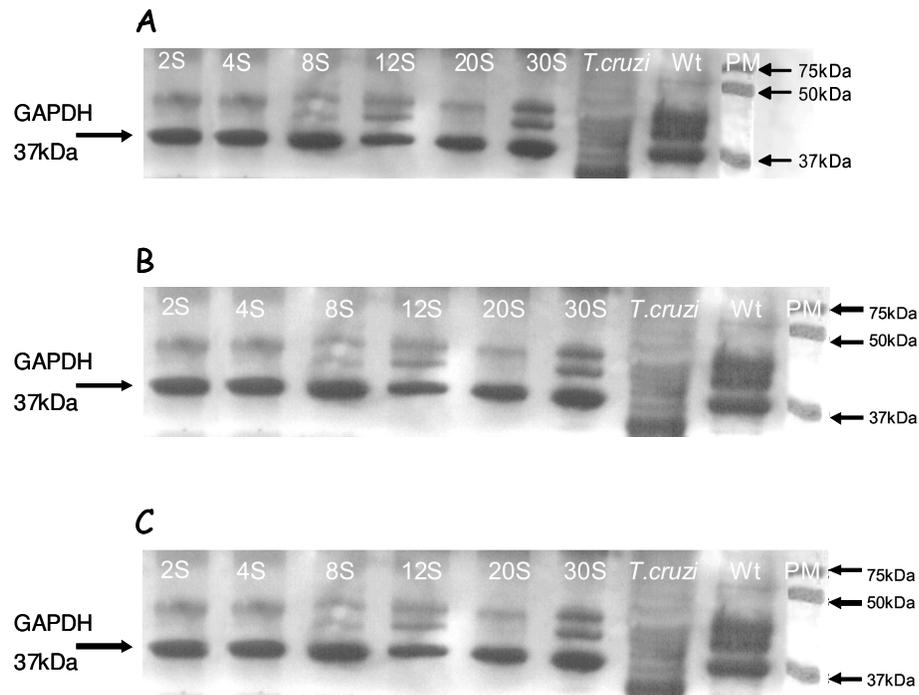
**Figura 19. Resultados da análise da proteína P2 $\beta$  de *Trypanosoma cruzi* no coração dos camundongos duplos transgênicos induzidos com doxíciclina, utilizando o anticorpo Mab 17.2.** Coluna 1 – peso molecular em kDa; Coluna 2 – animal induzido por 2 semanas; Coluna 3 – animal induzido por 4 semanas; Coluna 4 – animal induzido por 8 semanas; coluna 5– animal induzido por 12 semanas ; Coluna 6 – animal induzido por 20 semanas; Coluna 7– animal induzido por 30 semanas; Coluna 8 – controle positivo (*Trypanosoma cruzi*) e Coluna 9 – controle negativo (macho não transgênico).



**Figura 20. Resultados da análise da proteína P2 $\beta$  de *Trypanosoma cruzi* no coração dos camundongos duplos transgênicos não induzidos, utilizando o anticorpo Mab 17.2.** Coluna 1 – peso molecular em kDa; Coluna 2 – animal induzido por 2 semanas; Coluna 3 – animal induzido por 4 semanas; Coluna 4 – animal induzido por 8 semanas; coluna 5– animal induzido por 12 semanas ; Coluna 6 – animal induzido por 20 semanas; Coluna 7– animal induzido por 30 semanas; Coluna 8 – controle positivo (*Trypanosoma cruzi*) e Coluna 9 – controle negativo (macho não transgênico).



**Figura 21. Resultados da análise da proteína P2 $\beta$  de *Trypanosoma cruzi* no coração dos camundongos transgênicos para o gene TcP2 $\beta$  não induzido, utilizando o anticorpo Mab 17.2.** Coluna 1 – peso molecular em kDa; Coluna 2 – animal induzido por 2 semanas; Coluna 3 – animal induzido por 4 semanas; Coluna 4 – animal induzido por 8 semanas; coluna 5– animal induzido por 12 semanas ; Coluna 6 – animal induzido por 20 semanas; Coluna 7– animal induzido por 30 semanas; Coluna 8 – controle positivo (*Trypanosoma cruzi*) e Coluna 9 – controle negativo (macho não transgênico).



**Figura 22. Resultados da análise da proteína GAPDH nos corações dos camundongos duplos transgênicos induzidos, não induzidos e P2β.** A - Animais duplos transgênicos induzidos, B – Animais duplos transgênicos não induzido e C – Animais transgênicos P2β. Coluna 1 – animal induzido por 2 semanas; Coluna 2 – animal induzido por 4 semanas; Coluna 3 – animal induzido por 8 semanas; coluna 4– animal induzido por 12 semanas ; Coluna 5 – animal induzido por 20 semanas; Coluna 6 - animal induzido por 30 semanas Coluna 7– proteína total de *Trypanosoma cruzi* , Coluna 8 – macho não transgênico e Coluna 9 - peso molecular em kDa

### **3.6. Avaliação eletrocardiográfica de camundongos conscientes, Binários e transgênicos.**

A atividade elétrica cardíaca dos camundongos duplos transgênicos induzidos, duplos transgênicos não induzidos e os camundongos transgênicos para o gene TcP2 $\beta$  foram realizados em animais não anestesiados para evitar a influência do anestésico sobre os parâmetros cardíacos nos registros eletrocardiográficos.

Foram realizados ECGs em alguns dos animais estudados ao longo do período. No grupo de 2 semanas foram analisados: 2 animais induzidos e 3 não induzidos; no de 4 semanas foram analisados 5 animais induzidos e 3 não induzidos; no de 8 semanas foram analisados: 4 induzidos e 4 não induzidos; no 12 semanas foram analisados: 3 induzidos e 3 não induzidos; no de 20 semanas foram analisados: 5 induzidos e 2 não induzidos e com 30 semanas foram analisados: 2 induzidos e 3 não induzidos.

Os animais duplos transgênicos induzidos não apresentaram alterações no ECG com significância estatística quando comparando com o grupo não induzido (Tabela 11).

**Tabela 11. Parâmetros eletrocardiográficos de camundongos machos duplos transgênicos induzidos e não induzidos.**

Parâmetros	Animais	2semanas	4semanas	8semanas	12semanas	20semanas	30semanas
<b>Onda P</b> (m/s)	Induzido	9,5 ± 1,5	10,7 ± 0,7	10,4 ± 0,5	10,8 ± 0,5	10,8 ± 1,5	10,8 ± 0,5
	Não induzidos	11,2 ± 1,2	12,5 ± 2,1	11,3 ± 1,0	11,7 ± 0,4	8,5 ± 0,7	11,3 ± 0,8
<b>Interv. PR</b> (m/s)	Induzido	32,5 ± 1,5	33,3 ± 2,8	34,9 ± 1,5	33,8 ± 0,1	34,4 ± 2,3	33,4 ± 0,3
	Não induzidos	32,7 ± 0,4	36,5 ± 4,9	34,3 ± 1,8	35,8 ± 2,5	28,5 ± 0,7	34,4 ± 0,5
<b>Interv. QT</b> (m/s)	Induzido	23,0 ± 4,2	25,0 ± 1,4	25,4 ± 1,3	26,8 ± 1,2	27,2 ± 1,8	27,5 ± 0,4
	Não induzidos	24,2 ± 0,4	32,0 ± 8,4	27,8 ± 3,1	29,4 ± 1,9	31,5 ± 2,1	29,2 ± 0,5
<b>Complexo QRS</b> (m/s)	Induzido	9,0 ± 0	9,7 ± 1,0	9,5 ± 0,6	9,1 ± 0,7	10,6 ± 1,1	9,4 ± 0,6
	Não induzidos	9,6 ± 1,4	11,5 ± 3,5	9,6 ± 1,4	9,5 ± 1,0	11,5 ± 0,7	10,4 ± 0,5
<b>Frequência cardíaca</b>	Induzido	696±48,0	635±86,0	638±98,4	657±75,4	688±26,3	596±57,3
	Não induzidos	670±37,5	423±125,8	498±19,5	556±193,0	653±2,1	607±71,9

Os valores representam a média ± desvio-padrão.

### **3.7. Avaliação ecocardiográfica de camundongos binários e transgênicos**

Foram realizados ecocardiograma em alguns dos animais estudados ao longo de todo o período estudado. No grupo de 2 semanas foram analisados 2 animais induzidos e 3 não induzidos, no de 4 semanas foram analisados 5 animais induzidos e 3 não induzidos, no de 8 semanas foram analisados 4 induzidos e 4 não induzidos, no de 12 semanas foram analisados 3 induzidos e 3 não induzidos, no de 20 semanas foram analisados 5 induzidos e 2 não induzidos e em 30 semanas analisamos 2 induzidos e 3 não induzidos.

Os animais duplos transgênicos induzidos não apresentaram alterações mecânicas com significância estatística quando comparados com o grupo não induzido (Tabela 12).

**Tabela 12. Parâmetros ecocardiográficos de camundongos machos duplos transgênicos induzidos e não induzidos.**

<b>Parâmetros</b>	<b>Animais</b>	<b>2semanas</b>	<b>4semanas</b>	<b>8semanas</b>	<b>12semanas</b>	<b>20semanas</b>	<b>30semanas</b>
<b>Fração de ejeção</b>	Induzido	59,9 ± 6,1	60,5 ± 6,4	57,0±10,8	55,2±18,5	52,6±12,1	54,4±11,2
	Não induzidos	65,0 ± 8,2	62,98±11,9	63,7±5,0	62,5±2,5	63,4±15,9	56,9±8,4
<b>Volume sistólico do VE</b>	Induzido	24,2 ± 6,0	25,2±8,5	36,9±14,2	31,5±20,2	30,8±10,9	25,8±4,7
	Não induzidos	18,2 ± 5,9	25,4±6,3	42,2±28,6	23,9±4,5	21,9±14,6	27,6±6,0
<b>Volume diastólico do VE</b>	Induzido	60,3±12,1	62,9±15,7	85,4±18,4	66,1±19,5	66,1±10,8	59,7±3,0
	Não induzidos	52,3±13,0	70,5±16,1	68,9±29,4	64,2±8,3	55,5±15,1	65,7±13,6
<b>Débito Cardíaco</b>	Induzido	14,1 ± 4,5	15,5±5,6	19,6±3,3	14,5±4,3	13,3±3,5	14,9±5,3
	Não induzidos	13,9 ± 5,0	15,7± 8,3	20,8±5,3	14,7±0,9	11,8±2,3	14,9±4,5

Os valores representam a média ± desvio-padrão.

#### 4. Discussão

A produção e criação da linhagem de camundongos transgênicos P2 $\beta$  com fundo genético C57BL/6 foi alcançada através de retrocruzamento durante 10 gerações, mostrando que construção pTcP2 $\beta$  foi passada de geração em geração de forma estável. O sítio de integração do transgene no genoma dessa linhagem foi outro fator que corroborou com a estabilidade, sugerindo que a inserção não ocorreu em regiões de recombinação homóloga ou em regiões de heterocromatina constitutiva que poderia provocar o silenciamento do transgene.

Os resultados da expressão do transgene TcP2 $\beta$  no tecido cardíaco dos camundongos binários, através da síntese do RNAm e da proteína TcP2 $\beta$ , comprovam a funcionalidade do sistema com a sinalização das duas construções nos animais transgênicos. A expressão do RNAm TcP2 $\beta$  ocorreu de forma basal nos corações dos camundongos P2 $\beta$  e dos binários que não foram induzidos com doxiciclina, que normalmente não deveriam expressar este RNAm. Uma possível explicação é que o gene tenha se inserido perto de genes que estão sendo constantemente transcritos (constitutivos), já que a inserção do transgene no genoma ocorre de forma aleatória, nesta forma de transgenia. No entanto a síntese da proteína P2 $\beta$  no tecido cardíaco foi observada apenas nos camundongos binários induzidos. A ausência da proteína P2 $\beta$  no coração dos camundongos P2 $\beta$  e dos binários não induzidos sugere uma expressão insuficiente de RNAm para um processo de tradução eficaz. Não examinamos a expressão do RNAm ou de proteínas P2 $\beta$  de

*Trypanosoma cruzi* em outros órgãos onde os binários deveriam expressá-los, como timo, rim, pâncreas e músculo esquelético. Estes tecidos estão estocados e nos permitirá uma análise mais abrangente da expressão do transgene no futuro. Também, devido ao exíguo prazo para a defesa da dissertação, não foi possível examinar a expressão do transgene ao longo do desenvolvimento embrionário dos animais binários e do transgênico P2 $\beta$ . Embora nos animais adultos só tenhamos detectado níveis de proteína de *Trypanosoma cruzi* nos binários induzidos, não podemos afastar a possibilidade de que a proteína tenha sido expressa durante a vida embrionária, levando a tolerização dos animais a vida adulta. A presença de anticorpos anti-P2 $\beta$  de *Trypanosoma cruzi* no sangue dos animais binários induzidos poderia afastar a hipótese de tolerização, embora sua ausência não nos permite afastar a tolerização, posto que a expressão da proteína deve ser essencialmente intracelular, evitando assim a ativação do sistema imune.

Os resultados do eletro e ecocardiograma não mostraram diferenças significativas entre os animais do grupo binário induzido e não induzido. Sugerindo que a expressão da proteína P2 $\beta$  de *Trypanosoma cruzi* neste modelo não é capaz de provocar alterações funcionais cardíacas. Esses resultados vão de encontro aos apresentados por LEVIN e seus colaboradores (1997), que utilizando camundongos imunizados com a seqüência da proteína recombinante P2 $\beta$  de *Trypanosoma cruzi* mostraram algumas alterações no eletrocardiograma características da fase crônica da doença de Chagas, como o aumento da duração do complexo QRS, mas não encontraram lesões inflamatórias no coração. Dados similares foram apresentados por RUIZ *et al.*

(1985) quando mostraram lesões inflamatórias no músculo cardíaco e distúrbios eletrocardiográficos semelhantes à fase crônica de doença de Chagas após administrarem por via sistêmica proteínas ribossomais de *Trypanosoma cruzi* em camundongos. Quando comparamos o modelo desse estudo aos de LEVIN *et al.* (1997) e RUIZ *et al.* (1985) observamos uma grande diferença no mecanismo de apresentação da proteína recombinante P2 $\beta$  de *Trypanosoma cruzi* ao sistema imunológico. Nos modelos defendidos por esses autores a proteína está presente no sistema circulatório dos animais e é apresentada ao sistema imunológico que a reconhece produzindo anticorpos contra a região carboxi-terminal da proteína P ribossomal do *Trypanosoma cruzi* e através do mimetismo molecular ocorre uma reação cruzada contra a região da segunda alça extracelular do receptor  $\beta$ 1-adrenérgico, levando as alterações elétricas no coração, bem como, em alguns casos à lesões inflamatórias.

Em contrapartida, no modelo do presente trabalho, as proteínas P2 $\beta$  de *Trypanosoma cruzi* são expressas em órgãos sólidos e devem estar restritas ao meio intracelular, não sendo apresentadas ao sistema imunológico e por isso não são gerados os anticorpos que reconheceriam a segunda alça extracelular do receptor  $\beta$ 1-adrenérgico, justificando a ausência de distúrbios eletrocardiográficos em nossos camundongos. Uma outra possibilidade já discutida para explicar esta discrepância de resultados seria a tolerização dos animais binários induzidos pela expressão da proteína durante a vida embrionária.

Esse modelo poderia ser melhorado com o ajuste de 4 fatores: cruzar a linhagem P2 $\beta$  para obter o transgene em homozigose, utilizar uma linhagem de camundongos mais suscetível à doença de Chagas, administrar uma concentração maior e por um tempo mais longo da doxiciclina aos camundongos e utilizar os camundongos duplos transgênicos com um único fundo genético. Discutiremos abaixo em maiores detalhes cada um destes itens:

Os camundongos duplos transgênicos em dupla homozigose apresentariam uma maior expressão do gene e este poderia responder melhor a indução, produzindo mais a proteína P2 $\beta$  e talvez apresentando alterações cardíacas. Do mesmo modo, a mudança da linhagem heterogênica para uma isogênica diminuiria a variabilidade genética dos Camundongos favorecendo a análise dos dados.

Como já foi mencionado a doxiciclina regula a ativação do promotor para a produção da proteína rtTA, que ativa o TRE, e conseqüentemente estimula a tradução da proteína P2 $\beta$ . Mas para se obter uma resposta ótima na produção dessa proteína dois processos são importantes: a concentração da droga e a inserção do transgene no genoma do animal. Nesse trabalho foi administrada uma única concentração de 200  $\mu$ g/ml de doxiciclina, baseado nos dados apresentados por KISTNER et al. (1996) que produziram o modelo utilizado nesse trabalho. No entanto, o aumento da dosagem poderia favorecer uma maior síntese protéica. Os mesmos autores descrevem que a capacidade de ativação do promotor depende da posição do sítio de integração do transgene no cromossomo. Além da dose, o tempo de indução é outro fator que pode ter influenciado nos resultados. Prolongamos a indução por 30 semanas mas

ainda assim não podemos afastar a hipótese de que tempos de indução mais longos poderiam ter resultado em alterações funcionais cardíacas, especialmente em se tratando de CCC que em modelos murinos pode levar mais de 12 meses para se estabelecer após a infecção por *Trypanosoma cruzi*.

Trabalhos recentes relatam que a linhagem isogênica C57Bl/6 não é facilmente suscetível a infecção por *Trypanosoma cruzi* e não apresenta miocardite no início da infecção. Algumas linhagens de camundongos são reconhecidas como mais suscetíveis para o modelo de infecção por *Trypanosoma cruzi*, entre essas a linhagem A/j que é altamente suscetível (GIRONÈS *et al.*,2005).

Diante da importância social e econômica da doença de Chagas novos modelos *in vivo* necessitam ser criados para dissecar todas as peculiaridades desta doença. O melhoramento do modelo desenvolvido no presente trabalho se faz necessário por apresentar o controle da expressão de um único antígeno de *Trypanosoma cruzi* direcionado ao tecido cardíaco no camundongo adulto e permite testar a hipótese da autoimunidade na progressão da Doença de Chagas. Mesmo que em um modelo melhorado a expressão da proteína TcP2 $\beta$  não resulte na produção de autoanticorpos anti-P2 $\beta$  de *Trypanosoma cruzi* e nem distúrbios funcionais cardíacos (por ECO e ECG) a infecção dos animais binários induzidos por cepas *Trypanosoma cruzi* pode resultar em proteção destes animais comparando com animais selvagens, indicando não só que mecanismos imunes estão operando na progressão da doença, mas também comprovando a hipótese do mimetismo molecular na doença de Chagas.

Por fim, acreditamos que conseguimos gerar um animal transgênico que expresse uma proteína parasitária (do *Trypanosoma cruzi*) sob forma órgão específica e indutível. Este modelo certamente será útil aos pesquisadores interessados em estudar a etiopatogenia da doença de Chagas.

## 5. Conclusões

- Foram produzidas duas fêmeas de camundongos transgênicos para o gene TcP2 $\beta$  contendo o promotor hCMV, cDNA da proteína ribossomal de *Trypanosoma cruzi* e a  $\beta$ -globina poly A. Dessas duas fêmeas somente uma foi capaz de originar linhagem transgênica;
- Foram produzidos camundongos duplos transgênicos (binários) com genes TcP2 $\beta$  e STOCK Tg (rtTAhCMV)4Bj/j que permite a expressão do transgene TcP2 $\beta$  sob indução de doxiciclina em órgãos específicos;
- Os camundongos duplos transgênicos induzidos, apresentaram expressão do RNAm no coração durante todos os períodos analisados, uma expressão basal de RNAm também foi observada nos animais duplos transgênicos não induzidos e nos transgênicos para o gene P2 $\beta$  de *Trypanosoma cruzi*;
- A proteína TcP2 $\beta$  de *Trypanosoma cruzi* foi expressa no coração de todos os camundongos duplos transgênicos que foram induzidos pela doxiciclina, enquanto, nos animais que não receberam a doxiciclina não foi observada a expressão da proteína;
- Nas análises eletrocardiográficas e ecocardiográficas não foram observadas diferenças significativas entre os animais que receberam doxiciclina e os que não a receberam.

## 6. Referências

Almeida-de-Faria, M.; Freymüller, E.; Colli, W.; Alves, M. J. M. *Trypanosoma cruzi* Characterization of an Intracellular Epimastigote-like Form Exp. Parasitology, 92, 263–274, 1999.

Anselmi, A. et al. Miocardiopathy in Chagas' disease. Am Heart J, v. 72, n. 4, p. 469-481, 1966.

Bonaldo, M. C.; Souto-Padron, T.; DE Souza, W.; Goldeberg, S. Cell-Substrate Adhesion during *Trypanosoma cruzi* Differentiation The Journal of Cell Biology, 106,1349-1358, 1988.

Campos-de-Carvalho A de, Masuda MO, Tanowitz HB, Wittner M, Goldenberg RC, Spray DC. Conduction defects and arrhythmias in Chagas Disease: Possible role of gap junctions and humoral mechanisms. Journal of Cardiovascular Electrophysiology 5:686-698, 1994.

Chagas C (1909) Nova tripanozomiaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schitrypanum cruzi* n. gen., n. sp. Agente etiolojico de nova entidade morbida do homen. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1:159–219

Cossio, P.M.; Diez, D.; Szarfman, A.; Arana, R. M. Chagasic cardiopathy:

demonstration of a serum gamma globin factor which reacts with endocardium and vascular structures. *Circulation*, v.49, p.13-21, 1974.

Coura, J.R. et al. Morbidade da doença de Chagas. II Estudos seccionais em quatro áreas de campo no Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 79, n. 1, p. 101-124, 1984.

Cunha-Neto, E, Coelho, V, Guilherme, L, Fiorelli, A, Stolf, N, Kalil, J (1996) Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. *J Clin Invest* 98:1709–1712

De Souza, W. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. *Kinetoplastid Biology and Disease*, 1(1), 3, 2002.

Dias, J.C.P. Control of Chagas' disease in Brazil. *Parasitol Today*, v. 3, n. 11, p.336-341, 1987.

Dias, J.C.P. Epidemiology of Chagas' disease. In: Wendel, S.; Brener, Z.; Camargo, M. E.; Rassi, A. Chagas disease (american trypanosomiasis): Its Impact on Transfusion And Clinical Medicine. São Paulo: Ed. ISBT BRAZIL – Sociedade Brasileira Hematologia Hemoterapia, 1992. cap. 5, p.49-80.

Dias, J.C.P.; Coura, J.R. Epidemiologia. In: Dias, J.C.P.; Coura, J.R. (Org).Clínica e Terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1997. p. 33-65.

Dias, J.C.P.; Schofield, C.J. Controle da transmissão transfusional da doença de Chagas na *Iniciativa do Cone Sul*. Rev Soc Bras Med Trop, v.31, n. 4, p. 373-383,1998.

Dias, J.C.P. Doença de Chagas no novo milênio. Rev Patol Trop, v. 29, suppl., p.229-239, 2000.

Elizari, M.V.; Chiale, P.A. Cardiac arrhythmias in Chagas' heart disease. J Cardiovasc Electrophysiol, v. 4, n. 5, p. 596-608, 1993.

Elkon, K, Skelly, S, Parnassa, A, Moller, W, Danho, W, Weissbach, H, Brot, N (1986). Identification and chemical synthesis of a ribosomal protein antigenic determinant in systemic lupus erythematosus. Proc Natl Acad Sci U S A 83:7419–7423

Engman, DM, Leon, JS (2002) Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. Acta Trop 81:123–132.

Faucher, J. F.; Baltz, T.; Petry, K. G. Detection of an “epimastigote-like” intracellular stage of *Trypanosoma cruzi*. Parasitology Research, 81, 441–443, 1995.

Fedoseyeva, EV, Zhang, F, Orr, PL, Levin, D, Buncke, HJ, Benichou, G (1999) De novo autoimmunity to cardiac myosin after heart transplantation and its contribution to the rejection process. *J Immunol* 162:6836–6842

Gironès, N, Rodriguez, CI, Basso, B, Bellon, JM, Resino, S, Munoz-Fernandez, MA, Gea, S, Moretti, E, Fresno, M (2001a) Antibodies to an epitope from the Cha human autoantigen are markers of Chagas' disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 8:1039–1043

Gironès, N, Rodriguez, CI, Carrasco-Marin, E, Hernaez, RF, de Rego, JL, Fresno, M (2001b) Dominant T- and B-cell epitopes in an autoantigen linked to Chagas' disease. *J Clin Invest* 107:985–993

Gironès, N. ;Cuervo, H. ; Fresno, M. (2005) *Trypanosoma cruzi*-Induced Molecular Mimicry and Chagas' Disease. *CTMI* 296:89–123

Gonzales-Perdomo, M.; Romero, P.; Goldenberg, S. Cyclic AMP and adenylate cyclase activators stimulate *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Exp. Parasitol.*, 66, 205-212, 1988

Gruber, A, Zingales, B (1993) *Trypanosoma cruzi*: characterization of two recombinant antigens with potential application in the diagnosis of Chagas' disease. *Exp Parasitol* 76:1–12

Hogan, B, Beddington, R, Constantini, F., Lacy, E. "Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual". Gold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1994.

Kerner, N.; Liegeard, P.; Levin, M.J.; Hontebeyrie-Joskowicz, M. *Trypanosoma cruzi*: antibodies to a MAP-like protein in chronic Chagas' disease cross-react with mammalian cytoskeleton. *Exp. Parasitol.*, v.73, p.451-459, 1991.

Kierszenbaum, F (1999) Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. *Clin Microbiol Rev* 12:210–223

Kierszenbaum, F (2003). Views on the autoimmunity hypothesis for Chagas disease pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 37:1–11

Kistner, A.; Gossen, M.; Zimmermann, F.; Jerecic, J.; Ullmer, C.; Lübbert, H.; and Bujard, H. Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol.93, pp. 10933-10938, 1996.

Kleffmann, T.; Schmidt, J.; Schaub, G. A. Attachment of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes to hydrophobic substrates and use of this property to separate stages and promote metacyclogenesis. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 45(5), 548-555, 1998.

Leon, JS, Engman, DM (2001) Autoimmunity in Chagas heart disease. *Int J Parasitol* 31:555–561

Leon, JS, Godsel, LM, Wang, K, Engman, DM (2001) Cardiac myosin autoimmunity in acute Chagas' heart disease. *Infect Immun* 69:5643–5649

Levin, MJ, Mesri, E, Benarous, R, Levitus, G, Schijman, A, Levy-Yeyati, P, Chiale, PA, Ruiz, AM, Kahn, A, Rosenbaum, MB, et al. (1989) Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas' heart disease. *Am J Trop Med Hyg* 41:530–538

Levin, MJ, Levitus, G, Kerner, N, Lafon, S, Schijman, A, Levy-Yeyati, P, Finkieltein, C, Chiale, P, Schejtman, D, Hontebeyrie-Joskowics, M (1990) Autoantibodies in Chagas' heart disease: possible markers of severe Chagas' heart complaint. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85:539–543

Levin, M.J. (1991) Molecular mimicry and Chagas heart disease: high anti-R13 autoantibody levels are markers of severe heart complaint. *Res. Immunol.* 142, 157-159.

Lopez Bergami, P, Cabeza Meckert, P, Kaplan, D, Levitus, G, Elias, F, Quintana, F, Van Regenmortel, M, Laguens, R, Levin, MJ (1997) Immunization with recombinant *Trypanosoma cruzi* ribosomal P2beta protein induces changes in

the electrocardiogram of immunized mice. FEMS Immunol Med Microbiol 18:75–85

Lopez Bergami, P, Scaglione, J, Levin, MJ (2001) Antibodies against the carboxylterminal end of the *Trypanosoma cruzi* ribosomal P proteins are pathogenic. FASEB J 15:2602–2612

Moncayo A 1999. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 94 (suppl I): 401–404.

Moncayo, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. v.98(5), p.577-591, 2003.

Pacheco et al., Anais do XXI Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, 2005

Pereira Jr, PP; Chaves, EA; Costa e Sousa, RH; Masuda, MO; Campos de Carvalho, AC & Nascimento, JHM, 2006. Cardiac autonomic dysfunction in rats chronically treated with anabolic steroid. Eur J Appl Physiol, 96: 487-494.

Petry, K.; Eisen, H. Chagas' disease: a model for the study of autoimmune diseases. Parasitol. Today, v.5, p.111-121, 1989.

Petry K, Van Voorhis Wc. "Antigens of *Trypanosoma cruzi* that mimic mammalian nervous tissues: investigations of their role in the autoimmune pathophysiology of chronic Chagas' disease." (1991). *Res Immunol.* 142(2):151-6

Rassi, A. Clínica: Fase aguda. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. *Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1979. cap. 7, p.249-264.

Rassi A, Rassi JA, Rassi GG 2000. Fase aguda. In: *Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas*. 2.<sup>a</sup> Edição. Brener Z, Andrade ZA, Barral-Netto M. Rio de Janeiro, 231-244.

Rizzo LV, Cunha-Neto E & Teixeira ARL (1989). Autoimmunity in Chagas' disease: specific inhibition of reactivity of CD4+ T cells against myosin in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* 1989 September; 57(9): 2640-2644.

Rowland, E.C.; Mikhail, K.S.; McCormick, T.S. Isotype determination of anti-*Trypanosoma cruzi* antibody in murine Chagas' disease. *J. Parasitol.*, v.78 (3), p.557-561,1992.

Rowland, E.C.; Luo, H.; McCormick, T. Infection characteristics of an Ecuadorian *Trypanosoma cruzi* strain with reduced virulence. *J. Parasitol.*, v.81, 123-126, 1995.

Ruiz, A.M., Esteva, M., Cabeza Meckert, P., Laguens, R.P. and Segura, E.L. (1985) Protective immunity and pathology induced by inoculation of mice with different subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 42, 299 -309.

Sambrook, J, Fritsch, EF & Maniatis, T. *Molecular Cloning – A Laboratory Manual- Second Edition*, 1989.

Schmuñis GA. A tripanossomíase americana e seu impacto na saúde pública das Américas. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M (ed). *Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas*, 2a edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.1-15, 2000.

Smulski, C., Labovsky, V.; Levy, G.; Hontebeyrie, M.; Hoebeke J.; Levin, M. J. Structural basis of the cross-reaction between an antibody to the *Trypanosoma cruzi* ribosomal P2 $\beta$  protein and the human  $\beta_1$  adrenergic receptor. *FASEB J.* 20, 1396–1406 (2006).

Tafuri, W.L Pathogenesis of lesions of the autonomic nervous system of the mouse in experimental acute Chagas' disease. Light and electron microscope studies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.19(3), p.405-417, 1970.

Tafuri, W.L. Patogenia da doença de Chagas. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.29, p.194-199, 1987.

Talvani, A, Ribeiro, CS, Aliberti, JC, Michailowsky,V, Santos, PV,Murta, SM,Romanha, AJ,Almeida, IC, Farber, J, Lannes-Vieira, J, Silva, JS, Gazzinelli, RT (2000) Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect* 2:851–866.

Teixeira, A.R.L., Teixeira, M.L. and Santos-Buch, C.A. (1975) The immunology of experimental Chagas disease. IV. Production of lesions in rabbits similar to those of chronic Chagas disease in man. *Am. J. Pathol.* 80, 163 -179.

Tibbetts, R.S.; McCormick, T.S.; Rowland, E.C.; Miller, S.D.; Engman, D.M. Cardiac antigen-specific autoantibody production is associated with cardiomyopathy in *Trypanosoma cruzi* infected mice. *J. Immunol.*, v.152, p.1493-1499, 1994.

Tyler, K. M.; Engman, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*, 31, 472-481, 2001.

Van Voorhis, WC, Schlekewy, L, Trong, HL (1991) Molecular mimicry by *Trypanosoma cruzi*: the F1–160 epitope that mimics mammalian nerve can be mapped to a 12-amino acid peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5993–5997.

World Health Organization. Control of Chagas disease. Geneva: World Health Organization; 2002.

World Health Organization. Control of Chagas disease. Geneva: World Health Organization; 2005.

Zeledon, R. Infection of the insect host by *Trypanosoma cruzi*. In "Atlas Chaga's Disease Vectors in the Americas". Editora Fiocruz., 1, 271-287, 1997.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)