

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

FERNANDO CESAR YAMAMOTO

**Caracterização de Genes Diferencialmente Expressos Durante a
Metaciclogênese do *Trypanosoma cruzi***

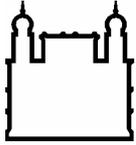
CURITIBA

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

FERNANDO CESAR YAMAMOTO

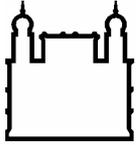
**Caracterização de Genes Diferencialmente Expressos Durante a
Metaciclogênese do *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Instituto
Oswaldo Cruz como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Mestre em
Biologia Celular e Molecular

Orientadores: Dr. Marco Aurélio Krieger
Dra. Daniela Parada Pavoni

CURITIBA

2009



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

FERNANDO CESAR YAMAMOTO

**Caracterização de Genes Diferencialmente Expressos Durante a
Metaciclogênese do *Trypanosoma cruzi***

ORIENTADORES: Dr. Marco Aurélio Krieger
Dra. Daniela Parada Pavoni

Aprovada em: 31/07/2009

EXAMINADORES:

Dr. Stenio Perdigão Fragoso – Presidente
Dr. Bruno Dallagiovanna Muñiz
Dr. Christian Macagnan Probst
Dr. Alejandro Correa Dominguez
Dr. Augusto Savio Ramos

Curitiba, 14 de Setembro de 2009

Aos meus pais, Nelson e Lucia.
Ao meu irmão, Fábio.

AGRADECIMENTOS

Aos diretores do Instituto Carlos Chagas pela oportunidade de iniciar minha carreira científica, especialmente ao Dr. Marco Aurélio Krieger pela sábia orientação e ao Dr. Stênio Perdigão Fragoso, por compartilhar seus conhecimentos e ajudar ativamente no desenvolver deste trabalho.

À Dra. Daniela Parada Pavoni não só pela orientação, mas pela sua dedicação, pelos ensinamentos e pela aprendizagem pessoal e profissional a mim proporcionada. Pela confiança depositada em mim e pela paciência.

Ao Dr. Christian Macagnan Probst pela ajuda em etapas cruciais do projeto.

Ao Dr. Maurílio José Soares pelo auxílio com as imagens de microscopia.

À doutoranda Rita de Cássia Pontello Rampazzo e a Andréia Cristine Dallabona pela participação e auxílio nos ensaios laboratoriais.

Aos colegas e amigos que direta ou indiretamente participaram do trabalho.

Aos meus familiares por todo apoio, compreensão, incentivo e por estarem sempre presentes em momentos importantes da minha vida.

ÍNDICE

ÍNDICE	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE QUADROS	x
LISTA DE QUADROS	x
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
LISTA DE SÍMBOLOS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DO <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
1.2. DOENÇA DE CHAGAS	2
1.3. FORMAS EVOLUTIVAS DO <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
1.4. CICLO DE VIDA	5
1.5. METACICLOGÊNESE.....	7
1.6. CARACTERÍSTICAS CELULARES DO PARASITA	10
1.7. GENOMA DO <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
1.8. TRANSCRIÇÃO POLICISTRÔNICA E <i>TRANS-SPLICING</i>	14
1.9. REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA	16
1.10. MICROARRANJO E PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS EM <i>T. cruzi</i>	18
1.11. SISTEMA DE CLONAGEM GATEWAY®	19
2. JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVOS	26
3.1. OBJETIVO PRINCIPAL.....	26
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1. SOLUÇÕES E TAMPÕES.....	27
4.2. PROCEDÊNCIA DOS REAGENTES	28
4.3. EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS UTILIZADOS	29
4.4. COMPOSIÇÃO DOS GÉIS DE POLIACRILAMIDA	30
4.5. MEIOS DE CULTURA	31
4.6. ORGANISMOS	31
4.7. METACICLOGÊNESE <i>IN VITRO</i>	31
4.7.1. Epimastigotas em fase exponencial de crescimento	32
4.7.2. Epimastigotas em estresse nutricional	32
4.7.3. Epimastigotas em diferenciação, aderidos ao substrato	32
4.7.4. Tripomastigotas metacíclicos	32
4.7.5. Obtenção dos extratos protéicos	33
4.8. SELEÇÃO DOS GENES.....	33
4.9. AMPLIFICAÇÃO DOS GENES.....	33
4.9.1. Em Sistema Gateway®.....	33
4.9.2. No vetor pGEX-4T-1.....	35
4.10. PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR	36
4.10.1. Para clonagem em Sistema Gateway®	36
4.10.2. Para clonagem em pGEX-4T-1.....	36
4.11. CLONAGEM EM pGEX-4T-1.....	37
4.11.1. Digestão dos produtos de PCR G01, G02 e G04 e do vetor pGEX-4T-1	37
4.11.2. Reações de desfosforilação dos vetores, ligação dos insertos e transformação.....	37
4.11.3. Teste para expressão solúvel dos genes em pGEX-4T-1	38
4.11.4. Purificação da proteína G02 em pGEX-4T-1.....	39
4.12. CLONAGEM EM VETOR DE ENTRADA DO SISTEMA GATEWAY	39
4.13. CLONAGEM EM VETORES DE DESTINO DO SISTEMA GATEWAY.....	40
4.14. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS EM pDEST™17	41

4.15. CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS.....	42
4.16. PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS EXPRESSAS PELO SISTEMA GATEWAY.....	43
4.17. INOCULAÇÃO EM CAMUNDONGOS.....	43
4.18. PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS.....	44
4.19. ENSAIOS DE <i>WESTERN BLOT</i>	44
4.20. IMUNOLocalização.....	45
4.21. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS EM <i>Trypanosoma cruzi</i>	46
4.22. TRANSFECCÃO DO <i>T. cruzi</i> USANDO OS VETORES pTcPR-GFPN.....	46
4.23. LOCALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS FLUORESCENTES.....	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1. GENES SELECIONADOS.....	48
5.2. AMPLIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS GENES.....	50
5.3. OBTENÇÃO DOS CLONES DE ENTRADA.....	51
5.4. OBTENÇÃO DOS CLONES DE DESTINO.....	52
5.5. SEQUENCIAMENTO DOS CLONES.....	53
5.6. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS.....	54
5.7. PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS.....	57
5.8. OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS SOROS.....	58
5.9. RECOMBINAÇÃO DOS GENES EM pDEST TM 221 PARA O VETOR pTcPR-GFPN.....	60
5.10. TRANSFECCÃO DO <i>T. cruzi</i> USANDO OS VETORES pTcPR-GFPN.....	61
5.11. RESULTADOS DA ANÁLISE DE EXPRESSÃO POR <i>WESTERN BLOT</i> , IMUNOLocalização E TRANSFECCÃO.....	63
5.11.1. TcExp02G01 - 5594.t00011 - Domínio TBC / Sítio ativo de aspartil proteases eucarióticas e virais.....	64
5.11.2. TcExp02G02 - 6146.t00006 - Domínio de ligação à GTP / Sítio de ligação a ATP/GTP motivo A (P-loop)....	70
5.11.3. TcExp02G03 - 6487.t00002 - Proteína semelhante a Hus1.....	77
5.11.4. TcExp02G04 - 6869.t00042 - Domínio de ligação a DNA semelhante a Myb.....	82
5.11.5. TcExp02G05 - 7189.t00016 - Domínio PX / Provável região RNP-1 eucariótica de ligação a RNA.....	87
5.11.6. TcExp02G06 - 7970.t00016 - Domínio PH.....	91
5.11.7. TcExp02G07 - 8015.t00008 - RNA metiltransferase, família TrmH.....	94
5.11.8. TcExp02G08 - 8257.t00047 - Família Spc97/Spc98.....	99
5.11.9. TcExp02G09 - 8773.t00029 - Domínio PH / Domínio PH.....	104
5.11.10. TcExp02G10 - 8825.t00032 - RNA metiltransferase, família TrmH.....	105
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	109
7. CONCLUSÃO.....	112
8. PERSPECTIVAS.....	114
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. As três principais formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
Figura 1.2. Ciclo vital do <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
Figura 1.3. Esquema das estruturas subcelulares de um epimastigota de <i>T. cruzi</i>	10
Figura 1.4. Representação esquemática do processo de trans-splicing em tripanossomatídeos.....	15
Figura 1.5. Esquema mostrando as diversas possibilidades de aplicação da plataforma Gateway®.....	20
Figura 1.6. Representação esquemática da reação BP, promovida entre os sítios <i>attB</i> e <i>attP</i>	21
Figura 1.7. Representação esquemática da reação LR, promovida entre os sítios <i>attL</i> e <i>attR</i>	21
Figura 1.8. Vetor de entrada pDONR™221.....	22
Figura 1.9. Vetor de destino pDEST™17.....	22
Figura 1.10. Esquema do vetor de destino pTcPR-GFPN, desenvolvido por nossa equipe.....	23
Figura 5.1. Padrão de expressão dos 10 genes selecionados.....	49
Figura 5.2. Gel de agarose 1% contendo os dez genes amplificados por PCR e purificados por PEG.....	50
Figura 5.3. Perfil eletroforético dos clones de entrada em gel de agarose 1%.....	52
Figura 5.4. Amplificação dos genes de interesse inseridos no vetor de entrada pDONR™221.....	52
Figura 5.5. Eletroforese dos genes em pDEST™17 em gel de agarose 1%.....	53
Figura 5.6. Amplificação dos genes de interesse após inserção no vetor de destino pDEST™17.....	53
Figura 5.7. SDS-PAGE mostrando os testes de expressão protéica para os 10 genes selecionados.....	55
Figura 5.8. Expressão em larga escala do gene TcExp02G01.....	57
Figura 5.9. SDS-PAGE confirmando a pureza das proteínas eletroeluídas.....	58
Figura 5.10. Purificação dos anticorpos específicos contra a proteína TcExp02G02.....	60
Figura 5.11. Perfil eletroforético dos clones de destino pTcPR-GFPN extraídos por midipreparação.....	61
Figura 5.12. Gel de poliacrilamida corado com coomassie blue, contendo os extratos protéicos das formas envolvidas na metacicloênese de <i>T. cruzi</i> normalizados por quantidade de proteína.....	63
Figura 5.13. Padrão de conservação do domínio TBC.....	64
Figura 5.14. Alinhamento da proteína estudada de <i>T. cruzi</i> com ortólogas de tripanossomatídeos.....	65
Figura 5.15. Análise dos extratos da metacicloênese, por <i>western blot</i> , com o soro purificado obtido contra a proteína TcExp02G01.....	66
Figura 5.16. <i>Western blot</i> revelado por quimioluminescência dos extratos da metacicloênese com o soro purificado obtido contra a proteína TcExp02G01.....	66
Figura 5.17. Imunofluorescência do soro pré (A) e pós-imune (B) obtido após inoculação com a proteína TcExp02G01.....	67
Figura 5.18. Expressão da proteína TcExp02G01 fusionada ao GFP no <i>T. cruzi</i> , em comparação com a proteína nativa em epimastigotas, analisada por <i>western blot</i>	68
Figura 5.19. Localização da proteína TcExp02G01 fusionada a GFP no <i>T. cruzi</i>	68
Figura 5.20. Gel de agarose contendo o gene TcExp02G01 amplificado por PCR para a clonagem no plasmídeo pGEX-4T-1.....	69
Figura 5.21. Alinhamento da proteína estudada de <i>T. cruzi</i> com ortólogas de tripanossomatídeos.....	71
Figura 5.22. <i>Western blot</i> do soro purificado anti-G02 contra os extratos protéicos das formas envolvidas na metacicloênese revelado por fosfatase alcalina.....	72

Figura 5.23. <i>Western blot</i> com extrato das formas do <i>T. cruzi</i> obtidas no processo de metaciclo gênese <i>in vitro</i> e reagidas com o soro anti-G02 revelado por quimioluminescência.....	72
Figura 5.24. Imunofluorescência do soro pré (A) e pós-imune (B) contra a proteína TcExp02G02.....	73
Figura 5.25. <i>Western blot</i> demonstrando a expressão da proteína TcExp02G02 fusionada ao GFP no <i>T. cruzi</i> , em comparação com a proteína nativa em formas epimastigotas.....	73
Figura 5.26. Localização da proteína TcExp02G02 fusionada a GFP no <i>T. cruzi</i>	74
Figura 5.27. Gel de agarose contendo o gene TcExp02G02 amplificado por PCR para a clonagem no vetor pGEX-4T-1.....	74
Figura 5.28. Gel de agarose confirmando a digestão do vetor pGEX-4T-1	75
Figura 5.29. Gel de poliácridamida mostrando a expressão da proteína TcExp02G02 fusionada a GST	75
Figura 5.30. Gel de poliácridamida da purificação teste da proteína TcExp02G02 fusionada a GST.....	76
Figura 5.31. Representação esquemática do vetor pGFPXa.....	76
Figura 5.32. Conservação aminoacídica de proteínas semelhantes a Hus1	78
Figura 5.33. Alinhamento da proteína TcExp02G03 de <i>T. cruzi</i> com ortólogos de tripanossomatídeos.....	79
Figura 5.34. <i>Western blot</i> do soro purificado anti-G03 contra os extratos protéicos das formas envolvidas na metaciclo gênese revelado por fosfatase alcalina	80
Figura 5.35. <i>Western blot</i> com extrato das formas do <i>T. cruzi</i> obtidas no processo de metaciclo gênese <i>in vitro</i> e reagidas com o soro anti-G03 revelado por quimioluminescência.....	80
Figura 5.36. Imunofluorescência do soro pré (A) e pós-imune purificado (B) contra a proteína TcExp02G03 ...	81
Figura 5.37. <i>Western blot</i> demonstrando a expressão da proteína TcExp02G03 fusionada ao GFP no <i>T. cruzi</i> , em comparação com a proteína nativa em formas epimastigotas não transfectadas	81
Figura 5.38. Localização da proteína TcExp02G03 fusionada a GFP no <i>T. cruzi</i>	82
Figura 5.39. Grau de conservação dos aminoácidos no domínio de ligação ao DNA semelhante a Myb.....	82
Figura 5.40. Alinhamento da proteína TcExp02G04 de <i>T. cruzi</i> com ortólogos de tripanossomatídeos.....	83
Figura 5.41. <i>Western blot</i> do soro purificado contra a proteína TcExp02G04 incubado com os extratos protéicos das formas envolvidas na metaciclo gênese revelado por fosfatase alcalina.....	84
Figura 5.42. <i>Western blot</i> com os extratos das formas do <i>T. cruzi</i> obtidas no processo de metaciclo gênese <i>in vitro</i> incubados com o soro anti-G04 revelado por quimioluminescência	84
Figura 5.43. Imunofluorescência do soro pré (A) e pós-imune (B) purificado contra a proteína TcExp02G04 ...	85
Figura 5.44. <i>Western blot</i> demonstrando a expressão da proteína TcExp02G04 fusionada ao GFP no <i>T. cruzi</i> , em comparação com a proteína nativa em formas epimastigotas não transfectadas	85
Figura 5.45. Localização nuclear da proteína TcExp02G04 fusionada a GFP no <i>T. cruzi</i>	86
Figura 5.46. Gel de agarose contendo o gene TcExp02G04 amplificado por PCR para a clonagem no plasmídeo pGEX-4T-1.....	86
Figura 5.47. Grau de conservação dos aminoácidos no domínio PX	88
Figura 5.49. <i>Western blot</i> do soro purificado contra a proteína TcExp02G05 incubado com os extratos protéicos das formas envolvidas na metaciclo gênese revelado por fosfatase alcalina.....	89
Figura 5.50. <i>Western blot</i> com os extratos das formas do <i>T. cruzi</i> obtidas no processo de metaciclo gênese <i>in vitro</i> incubados com o soro anti-G05 revelado por quimioluminescência	89
Figura 5.51. Imunofluorescência com o soro pré (A) e pós-imune (B) contra a proteína TcExp02G05	90
Figura 5.52. <i>Western blot</i> demonstrando a expressão da proteína TcExp02G05 fusionada a GFP no <i>T. cruzi</i> , em comparação com a proteína nativa em formas epimastigotas não transfectadas	91

Figura 5.53. Localização da proteína TcExp02G05 fusionada a GFP no <i>T. cruzi</i>	91
Figura 5.54. Grau de conservação dos aminoácidos no domínio PH	92
Figura 5.55. Alinhamento da proteína TcExp02G06 de <i>T. cruzi</i> com as ortólogas nos tripanossomatídeos <i>Leishmania</i> e <i>Trypanosoma</i>	93
Figura 5.56. <i>Western blot</i> demonstrando a expressão da proteína TcExp02G06 fusionada a GFP no <i>T. cruzi</i> , em comparação com a proteína nativa em formas epimastigotas não transfectadas	94
Figura 5.57. Localização da proteína TcExp02G06 fusionada a GFP no <i>T. cruzi</i>	94
Figura 5.58. Conservação dos aminoácidos presentes no domínio RNA metiltransferase, família TrmH.....	95
Figura 5.59. Alinhamento da proteína TcExp02G07 de <i>T. cruzi</i> com as ortólogas em <i>Leishmania</i> e <i>Trypanosoma brucei</i>	96
Figura 5.60. <i>Western blot</i> do soro purificado contra a proteína TcExp02G07 incubado com os extratos protéicos das formas envolvidas na metaciclo gênese revelado por fosfatase alcalina	96
Figura 5.61. <i>Western blot</i> com os extratos das formas do <i>T. cruzi</i> obtidas no processo de metaciclo gênese <i>in vitro</i> incubados com o soro anti-G07 revelado por quimioluminescência	97
Figura 5.62. Imunofluorescência do soro pré (A) e pós-imune (B) contra a proteína TcExp02G07.....	97
Figura 5.63. <i>Western blot</i> demonstrando a expressão da proteína TcExp02G07 fusionada ao GFP no <i>T. cruzi</i> , em comparação com a proteína nativa em formas epimastigotas não transfectadas	98
Figura 5.64. Localização da proteína TcExp02G07 fusionada a GFP no <i>T. cruzi</i>	98
Figura 5.65. Conservação dos aminoácidos presentes no domínio da família Spc97/Spc98.....	100
Figura 5.66. Alinhamento da proteína TcExp02G08 de <i>T. cruzi</i> com as ortólogas em <i>Leishmania</i> e <i>T. brucei</i> .	101
Figura 5.67. <i>Western blot</i> do soro purificado contra a proteína TcExp02G08 incubado com os extratos protéicos das formas envolvidas na metaciclo gênese revelado por fosfatase alcalina	101
Figura 5.68. <i>Western blot</i> com os extratos das formas do <i>T. cruzi</i> obtidas no processo de metaciclo gênese <i>in vitro</i> incubados com o soro anti-G08 revelado por quimioluminescência	102
Figura 5.69. Imunofluorescência do soro pré (A) e pós-imune (B) contra a proteína TcExp02G08.....	102
Figura 5.70. <i>Western blot</i> demonstrando a expressão da proteína TcExp02G08 fusionada a GFP no <i>T. cruzi</i> , em comparação com a proteína nativa em formas epimastigotas não transfectadas	103
Figura 5.71. Localização da proteína TcExp02G08 fusionada a GFP no <i>T. cruzi</i>	103
Figura 5.72. Alinhamento da proteína TcExp02G09 de <i>T. cruzi</i> com as ortólogas em <i>Leishmania</i> e <i>T. brucei</i> .	104
Figura 5.73. Localização da proteína TcExp02G09 fusionada a GFP no <i>T. cruzi</i>	105
Figura 5.74. Alinhamento da proteína TcExp02G10 de <i>T. cruzi</i> com as ortólogas nos tripanossomatídeos <i>Leishmania</i> e <i>T. brucei</i>	105
Figura 5.75. <i>Western blot</i> do soro purificado contra a proteína TcExp02G10 incubado com os extratos protéicos das formas envolvidas na metaciclo gênese revelado por fosfatase alcalina	106
Figura 5.76. <i>Western blot</i> com os extratos das formas do <i>T. cruzi</i> obtidas no processo de metaciclo gênese <i>in vitro</i> incubados com o soro anti-G10 revelado por quimioluminescência	106
Figura 5.77. Imunofluorescência do soro pré (A) e pós-imune (B) contra a proteína TcExp02G10.....	107
Figura 5.78. <i>Western blot</i> demonstrando a expressão da proteína TcExp02G10 fusionada ao GFP no <i>T. cruzi</i> , em comparação com a proteína nativa em formas epimastigotas não transfectadas	108
Figura 5.79. Localização da proteína TcExp02G10 fusionada a GFP no <i>T. cruzi</i>	108

LISTA DE QUADROS

Quadro 5.1. Lista dos dez genes selecionados.....	48
Quadro 5.2. Porcentagem de células fluorescentes nas culturas dos transfectantes GFP	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Iniciadores utilizados na amplificação dos genes para inserção no sistema Gateway®	34
Tabela 3.2. Primers usados para amplificar os genes para clonagem em pGEX-4T-1	35

LISTA DE ABREVIATURAS

- Amp - Ampicilina
- AP *Buffer* - Tampão para fosfatase alcalina
- BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*
- BSA - Albumina sérica bovina
- DAPI - Diamidino-2-fenilindol
- Dm - *Didelphis marsupialis*
- DNA - Ácido desoxirribonucléico
- dNTP - Desoxirribonucleotídeo
- EDTA - Ácido etileno-diamino-tetracético
- G418 - Antibiótico aminoglicosídeo relacionado à gentamicina
- GAP - Proteína ativadora de GTPase (*GTPase-activation protein*)
- GDP - Difosfato de guanosina
- GEF - Fator de substituição por GTP (*Guanine nucleotide exchange factor*)
- GFP - Proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*)
- gRNA - RNA guia
- GTP - Trifosfato de guanosina
- gp - Glicoproteína
- HEPES - Ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2'-etanossulfônico
- ICC - Instituto Carlos Chagas
- IgG - Imunoglobulina G
- IgM - Imunoglobulina M
- IPTG - Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
- kDNA - DNA do cinetoplasto
- LB - Meio Luria-Bertani
- LIT - Meio Infusão de fígado e triptose (*Liver Infusion Tryptose*)
- MASP - Proteína de superfície associada à mucina (*Mucin-associated surface protein*)
- mRNA - RNA mensageiro
- PBS - Solução salina tamponada com fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)
- PCR - Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)
- PFAM - *Protein families*
- PFGE – Eletroforese em gel de campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*)
- PSG - Tampão salina fosfato com glicose (*Phosphate Saline Glucose*)

RNA - Ácido ribonucléico

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS

TAU - Meio Urina artificial de Triatomíneo (*Triatomine Artificial Urine*)

TBE - Tampão tris-borato-EDTA

TBS - Solução salina tamponada com Tris

TRIS - Tris-hidroximetil aminometano

Tween 20 - Monolaurato de polioxietileno (20) sorbitana

UTR - Região não traduzida (*Untranslated region*)

VSG - Glicoproteína variável de superfície (*Variable Surface Glycoprotein*)

LISTA DE SÍMBOLOS

°C - Grau Celsius

% - Porcentagem

μg - Micrograma

μl - Microlitro

μM - Micromolar

g - Grama (unidade de medida de massa)

g - Aceleração de gravidade

kb - Quilobase; em DNA, 1000 pares de nucleotídeos

kDa - QuiloDalton

l - litro

M - Molar

MΩ-cm - Megohm-cm (Unidade de resistividade eléctrica)

Mb - 1000 kb

mg - Miligrama

ml - Mililitro

mM - Milimolar

ng - Nanograma

nm - Nanometro

pb - Pares de bases

pH - Potencial hidrogeniônico

U - Unidade

V - Volts

RESUMO

O processo de diferenciação celular das formas epimastigotas para as formas tripomastigotas metacíclicas do protozoário *Trypanosoma cruzi*, processo este denominado metaciclogênese, envolve mudanças morfológicas e funcionais, as quais estão relacionadas ao padrão de expressão diferencial de vários genes. Dados da nossa equipe, obtidos através de experimentos utilizando a técnica de microarranjo de DNA, juntamente com o sequenciamento do genoma da cepa CL Brener de *T. cruzi*, confirmaram que, durante a transição destas formas, existem genes cujas expressões são moduladas. Foi observado ainda, que aproximadamente 55% destes genes que são diferencialmente expressos, são codificadores de proteínas hipotéticas. Sabendo-se disso, dez genes codificadores de proteínas hipotéticas conservadas, com domínios protéicos conhecidos, que se apresentaram modulados neste processo de diferenciação celular foram selecionados. Visando a caracterização destes genes, a plataforma Gateway foi utilizada para auxiliar no processo de clonagem dos mesmos. Todos os genes selecionados para o trabalho foram clonados em pDEST17. Foram expressas oito proteínas recombinantes em *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS, as quais foram purificadas e inoculadas em camundongos para a obtenção de anticorpos policlonais. Os soros dos camundongos inoculados com as proteínas recombinantes foram retirados por punção cardíaca e purificados. Eles foram utilizados para ensaios de imunolocalização e de *western blot* para a comparação com os dados gerados anteriormente pelo microarranjo. Paralelamente, também foram observadas, em formas epimastigotas do *T. cruzi*, as localizações celulares das proteínas estudadas através das suas fusões com a etiqueta GFP. Os experimentos de *western blot* confirmaram um aumento de expressão durante a metaciclogênese para pelo menos uma das dez proteínas, o que corrobora com os resultados de microarranjo obtidos por nossa equipe. Além disso, três proteínas apresentaram, em *T. cruzi*, uma localização celular coerente com os respectivos domínios que elas contêm. Assim, este trabalho fornece informações preliminares a respeito de proteínas conservadas de função desconhecida do *T. cruzi*, sobre as quais pouca ou nenhuma informação está disponível em literatura até o momento.

ABSTRACT

The process of cell differentiation from epimastigotes to metacyclic trypomastigotes forms of *Trypanosoma cruzi* is called metacyclogenesis. Functional and morphological changes of the parasite throughout this process are related to the pattern of differential expression of many genes. Together with the genome sequence of CL Brener strain of *T. cruzi*, data obtained by our team using DNA microarray experiments confirmed that during this event there are several genes whose expression is modulated. Also, we observed that nearly fifty-five percent of these genes encode hypothetical proteins. From these results, we selected ten differentially expressed genes coding for conserved hypothetical proteins, with known domains, that presented modulated in metacyclogenesis. In order to characterize these genes, we used a cloning system that allows their easy propagation and expression, the Gateway platform. All selected genes were cloned in pDEST17 and eight of them generated recombinant proteins produced in *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS strain. The expressed proteins were purified and inoculated in mice to obtain polyclonal antibodies. The sera from mice inoculated with the recombinant proteins were taken by cardiac puncture and purified. They were used on immunolocalization assays in *T. cruzi* and western blots to compare with data previously observed by microarray. Additionally, localization assays in epimastigotes of *T. cruzi* were performed using the proteins fused to GFP. The experiments of western blot showed an increase of expression during metacyclogenesis for at least one of the ten proteins, which confirms the results of microarray obtained by our team. In addition, three proteins showed in *T. cruzi* a cellular localization consistent with their respective domains. This study provides preliminary information concerning *T. cruzi* conserved proteins of unknown function about which little or no information is available in literature so far.

1. INTRODUÇÃO

1.1. CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DO *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909) é um protozoário flagelado pertencente ao reino Protista, subreino Protozoa. Este organismo está incluído no filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, classe Zoomastigophora e ordem Kinetoplastida. Nessa ordem é encontrada, dentre outras, a família Trypanosomatidae, na qual está presente o gênero *Trypanosoma* (LEVINE *et al.*, 1980).

A ordem Kinetoplastida abrange protozoários flagelados que contêm uma região especializada, conhecida como cinetoplasto, onde reside o DNA mitocondrial, também denominado de kDNA. (SHAPIRO & ENGLUND, 1995; TELLERIA *et al.*, 2006). Entre os kinetoplastidas incluem-se os parasitas tripanossomatídeos causadores de doenças em humanos (gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*) e os coletivamente chamados de bodonídeos (demais kinetoplastidas). Apenas nos tripanossomatídeos o kDNA encontra-se como uma rede complexa de DNA circular condensado, formando uma massa única. Nos bodonídeos, o kDNA pode permanecer difuso pela mitocôndria ou apresentar-se em nódulos distintos (SIMPSON *et al.*, 2002).

O gênero *Trypanosoma* constitui um dos gêneros mais importantes da família Trypanosomatidae, pois inclui, além do *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas (CHAGAS, 1909), outras duas subespécies do *Trypanosoma brucei* que ocasionam doenças em humanos, como o *T. b. rhodesiense* e *T. b. gambiense*, ambos agentes da doença do sono. Adicionalmente, ainda há o *T. b. brucei*, causador da enfermidade conhecida como nagana, em animais (HIDE, 1999).

Este mesmo gênero foi dividido em dois grupos: Stercoraria e Salivaria, de acordo com o modo de desenvolvimento do parasita no interior dos seus respectivos hospedeiros invertebrados. O primeiro grupo abrange parasitas que se desenvolvem no tubo digestivo do vetor e progridem em direção a sua porção final, culminando na liberação das suas formas infectivas através das excretas. Como exemplo deste grupo pode-se citar o *T. cruzi*. Já no grupo Salivaria são incluídos os parasitas que se desenvolvem no trato digestivo do vetor, porém, que posteriormente migram para as glândulas salivares, para deste modo, ser inoculados mecanicamente, como no caso do *T. brucei* (DIAS, 2000).

1.2. DOENÇA DE CHAGAS

Esta enfermidade foi descrita primeiramente pelo médico e cientista brasileiro Carlos Chagas, que em seu trabalho, publicado no início do século XX, reportou seus elementos clínicos, anatomopatológicos e epidemiológicos, assim como seu vetor transmissor (inseto da ordem Hemiptera) e agente etiológico, o *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2007), a Doença de Chagas está presente principalmente em países do continente americano, atingindo o México, América Central e América do Sul. Nestas localidades, o número de indivíduos infectados chega a aproximadamente 8 milhões. No entanto, casos desta doença também já foram encontrados em países não endêmicos da Europa, no Canadá e Estados Unidos. De acordo com o Ministério da Saúde (2006), no Brasil há em torno de 3 milhões de infectados.

Há evidências de que na era pré-colombiana a doença de Chagas já existia. Múmias chilenas (ROTHHAMMER *et al.*, 1985; FERREIRA *et al.*, 2000) e peruanas (FORNACIERI *et al.*, 1992) pertencentes a esse período foram encontradas infectadas com *T. cruzi*, o qual foi detectado através de exames histológicos. AUFDERHEIDE e colaboradores (2003) sugerem que anteriormente à ocupação humana, nesta região havia apenas a existência do ciclo silvestre da doença, sendo que a transmissão do parasita era efetuada através do repasto sanguíneo de insetos vetores em animais silvestres. Posteriormente, com o estabelecimento dos homens neste território, os mesmos foram incluídos neste ciclo na medida em que os insetos passaram a habitar os ambientes domésticos.

Existem diversas formas de transmissão da Doença de Chagas, dentre as quais se destaca a via vetorial que consiste na transmissão do *T. cruzi* por meio das fezes do inseto-vetor hematófago, o qual pertence à ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae. Em meio aos triatomíneos, conhecidos popularmente como barbeiros, várias espécies são potenciais hospedeiras para o agente etiológico, sendo *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*, os gêneros de maior importância sob o ponto de vista epidemiológico (LARANJA *et al.*, 1956).

Além da transmissão vetorial, ainda há a contaminação através de transfusão sanguínea e a congênita. Transplante de órgãos e acidentes laboratoriais são modos de transmissão mais raros (TANOWITZ *et al.*, 1992).

Recentemente, também foram registrados vários casos de contração da doença a partir da ingestão de cana-de-açúcar e suco de açaí contaminados com formas infectivas do parasita, como ocorrido, respectivamente, nos estados de Santa Catarina (DIAS *et al.*, 2008) e da região amazônica (MARCILI *et al.*, 2009; PINTO *et al.*, 2008). Por esta via de inoculação, os

tripanosomas penetram diretamente pela barreira gastrointestinal ou através de lesões na mesma, levando, muitas vezes, o indivíduo ao óbito (BARBOSA, 2006). Além disso, também na região amazônica, diversos casos de indivíduos infectados pela via vetorial têm sido reportados (COURA *et al.*, 2002a; 2002b).

A cepa, sua virulência, tamanho do inóculo do *T. cruzi*, via de inoculação, e a idade, sexo e raça do indivíduo infectado são fatores que influenciam no desenvolvimento da doença. Em linhas gerais, duas fases distintas podem ser observadas: a fase aguda e a crônica. A fase aguda é caracterizada como a etapa inicial da enfermidade, sendo rápida, com duração de 4 a 12 semanas, e com elevada parasitemia; geralmente assintomática. Nela, quando aparente, os sintomas verificados são febre, inflamação dos nodos linfáticos, hepatoesplenomegalia, náusea, vômito, miocardite, entre outros. Em geral, eles desaparecem mesmo sem tratamento. A fase crônica distingui-se da aguda por possuir uma evolução lenta e por apresentar uma queda na taxa de parasitemia. Nesta fase, que ocorre anos após a aguda, também há um decréscimo dos níveis de IgM e um aumento de IgG (SOUZA, 2000).

Alguns casos agudos da Doença de Chagas podem evoluir para a chamada forma crônica indeterminada, na qual os pacientes não apresentam sintomas ou exames clínicos alterados. No entanto, uma grande parcela dos infectados por esta moléstia evoluem para as formas crônicas determinadas: forma cardíaca, apresentando arritmias cardíacas, cardiomiopatia dilatada, insuficiência cardíaca congestiva (CHAGAS, 1927) e eventos tromboembólicos (TANOWITZ *et al.*, 1992), ou forma digestiva, na qual são observadas desordens gastrointestinais que se manifestam como disfagia, quando há megaesôfago, e como constipação intestinal, quando há megacólon (REZENDE & MOREIRA, 2000; TEIXEIRA *et al.*, 2006).

Os sintomas típicos da forma cardíaca crônica da doença, adquirida através do barbeiro, aparecem de 5 a 15 anos após a infecção inicial (COURA, 2007a). Este pode ser considerado um tempo longo, visto que na infecção pela via oral, o período de incubação do parasita é de 5 dias (BARBOSA, 2006).

Em relação à variável idade, geralmente infecções que acometem crianças menores de 2 anos são fatais, quando presentes meningoencefalite e insuficiência cardíaca (COURA, 2007b).

Vacinas contra esta doença não existem e o tratamento ainda é problemático uma vez que as drogas utilizadas, nifurtimox e benzonidazol, geram severos efeitos colaterais nos pacientes. Embora haja discussões relacionadas ao modo de ação desses fármacos, acredita-se que o primeiro atue sobre o mecanismo de detoxificação de radicais livres do parasita (já que

ânions superóxidos e peróxido de hidrogênio são gerados pela droga) e que o segundo resulte na inibição da sua síntese protéica (DOCAMPO & STOPPANI, 1979; GRUNBERG, 1968).

1.3. FORMAS EVOLUTIVAS DO *Trypanosoma cruzi*

Durante o ciclo de vida do *T. cruzi* podem ser evidenciadas diversas formas evolutivas, dentre as quais se podem citar três principais: as formas amastigota e epimastigota, ambas replicativas, e as formas tripomastigotas, infectivas (TANOWITZ *et al.*, 1992).

Os amastigotas (figura 1.1A), conhecidos também como esferomastigotas, apresentam uma morfologia arredondada, geralmente com 3 a 5 µm de diâmetro, e um flagelo muito curto, muitas vezes reduzido ao segmento contido na bolsa flagelar. São formas replicativas intracelulares que em decorrência de lise celular são liberadas na circulação sanguínea. Segundo CARVALHO & DE SOUZA (1986) e LEY *et al.* (1988), os amastigotas também são capazes de infectar células de vertebrados, podendo assim, acarretar no surgimento de novas células infectadas.

Epimastigotas (figura 1.1B) são células fusiformes medindo de 20 a 40 µm de comprimento. Possuem nucléolo definido e cinetoplasto em forma de bastão e em posição anterior ao núcleo, o qual é esférico e contém pouca heterocromatina. São capazes de se dividir, podendo ser encontrados no intestino do inseto vetor e em culturas axênicas em fase logarítmica de crescimento. Formas semelhantes aos epimastigotas, os chamados *epimastigote-like*, provavelmente formas de transição entre amastigotas e tripomastigotas, estão presentes em células do hospedeiro vertebrado quando os amastigotas se transformam em tripomastigotas, ou vice-versa, quando um novo ciclo intracelular é iniciado (ALMEIDA-DE-FARIA *et al.*, 1999).

Os tripomastigotas (figura 1.1C) possuem aproximadamente 25 µm de comprimento e 2 µm de diâmetro. Células nesse estágio evolutivo não apresentam um nucléolo evidente. Possuem um núcleo mais alongado com um aumento de heterocromatina em relação aos epimastigotas. Não são capazes de se dividir, sendo exclusivamente infectivos. Nestas formas celulares o cinetoplasto é visto posteriormente ao núcleo, com uma forma mais arredondada devido, possivelmente, à diminuição no grau de empacotamento do kDNA. Estão presentes em células do tecido e no sangue do hospedeiro vertebrado, onde são denominados tripomastigotas sanguíneos. Além disso, são observados na porção posterior do intestino do inseto vetor e nas suas excretas, onde são chamados de tripomastigotas metacíclicos. Em

adição a isto, são visualizados em fase estacionária de crescimento de culturas axênicas e na fase líquida de culturas de células.

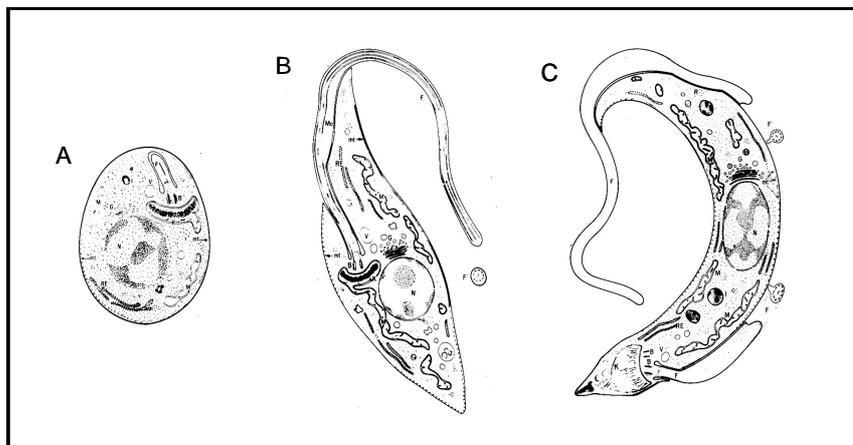


Figura 1.1. As três principais formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*. Representação esquemática das formas amastigota (A), epimastigota (B) e tripomastigota (C). (modificado de <http://lineu.icb.usp.br/~gwunder/3trypanosomiaseAmericana.ppt>).

1.4. CICLO DE VIDA

O ciclo biológico do *T. cruzi* consiste na alternância entre um hospedeiro vertebrado (mamífero) e um invertebrado (inseto), como pode ser visto na figura 1.2. Este ciclo é iniciado quando o inseto triatomíneo se alimenta do sangue periférico de um mamífero infectado, deste modo, ingerindo tripomastigotas sanguíneos. No estômago do inseto, o parasita passa por um processo de transformação para as formas epimastigotas, que migram para o seu intestino. Neste local, os epimastigotas multiplicam-se intensamente por fissão binária e quando alcançam a porção final do intestino, mais precisamente no reto, sofrem diferenciação para as formas tripomastigotas metacíclicas, as quais são eliminadas com as fezes e capazes de infectar o hospedeiro vertebrado.

Esta diferenciação das formas epimastigotas para as formas tripomastigotas metacíclicas é denominada metaciclogênese e, em condições naturais, depende da interação hidrofóbica entre o flagelo do parasita e a parede interna do aparelho digestivo do inseto (SOUZA, 1984; BONALDO *et al.*, 1988; KOLLIEN & SCHAUB, 2000).

Logo após o repasto sanguíneo, quando eliminados nos dejetos do vetor invertebrado, os tripomastigotas metacíclicos podem penetrar no hospedeiro vertebrado através de discontinuidades na epiderme, como por exemplo, no próprio local onde houve a lesão causada pela picada, ou até mesmo através de mucosas ou membranas conjuntivas,

ocasionando a infecção (GARCIA & AZAMBUJA, 1991; SOUZA, 2002; TEIXEIRA *et al.*, 2006).

A partir do sítio de infecção inicial, os parasitas podem atingir a corrente sanguínea e infectar vários tipos celulares. O tripomastigota metacíclico é internalizado através de pseudópodos emitidos pelas células hospedeiras, e permanece horas no interior do vacúolo parasitóforo. A fusão desse vacúolo com os lisossomos leva a um aumento da acidez no interior desta estrutura onde se encontra o parasita, o que inicia o processo de diferenciação da forma tripomastigota para a amastigota. Paralelamente, ocorre a degradação gradual da membrana vacuolar pela ação de uma enzima secretada pelo parasita, a TcTOX, cuja molécula é semelhante à porina (ANDREWS, 1993).

Uma vez no citoplasma, os amastigotas sofrem sucessivas divisões por fissão binária e então iniciam o processo de transformação para tripomastigotas sanguíneos. Durante a transformação, ocorrem mudanças na organização geral da célula, na estrutura do cinetoplasto e no flagelo, o qual sofre um alongamento até alcançar 20 µm de comprimento (MEYER & SOUZA, 1976). Através do intenso movimento flagelar, os tripomastigotas sanguíneos causam o rompimento da célula hospedeira, conseqüentemente ocasionando sua liberação para o meio extracelular, onde os mesmos podem infectar novas células do organismo ou serem ingeridas por outro inseto vetor durante o seu repasto, fechando o ciclo (SOUZA, 2002).

As diferentes condições ambientais encontradas pelo parasita durante a transição pelos hospedeiros mamífero e invertebrado, e até mesmo durante a passagem através do sistema digestivo do inseto vetor, desencadeiam mudanças na expressão gênica do protozoário, conseqüentemente resultando em diferenças morfológicas, ultra-estruturais, funcionais e bioquímicas entre os diversos estágios evolutivos apresentados por este organismo (BRENER, 1973; ZELEDON, 1999; TYLER & ENGMAN, 2001).

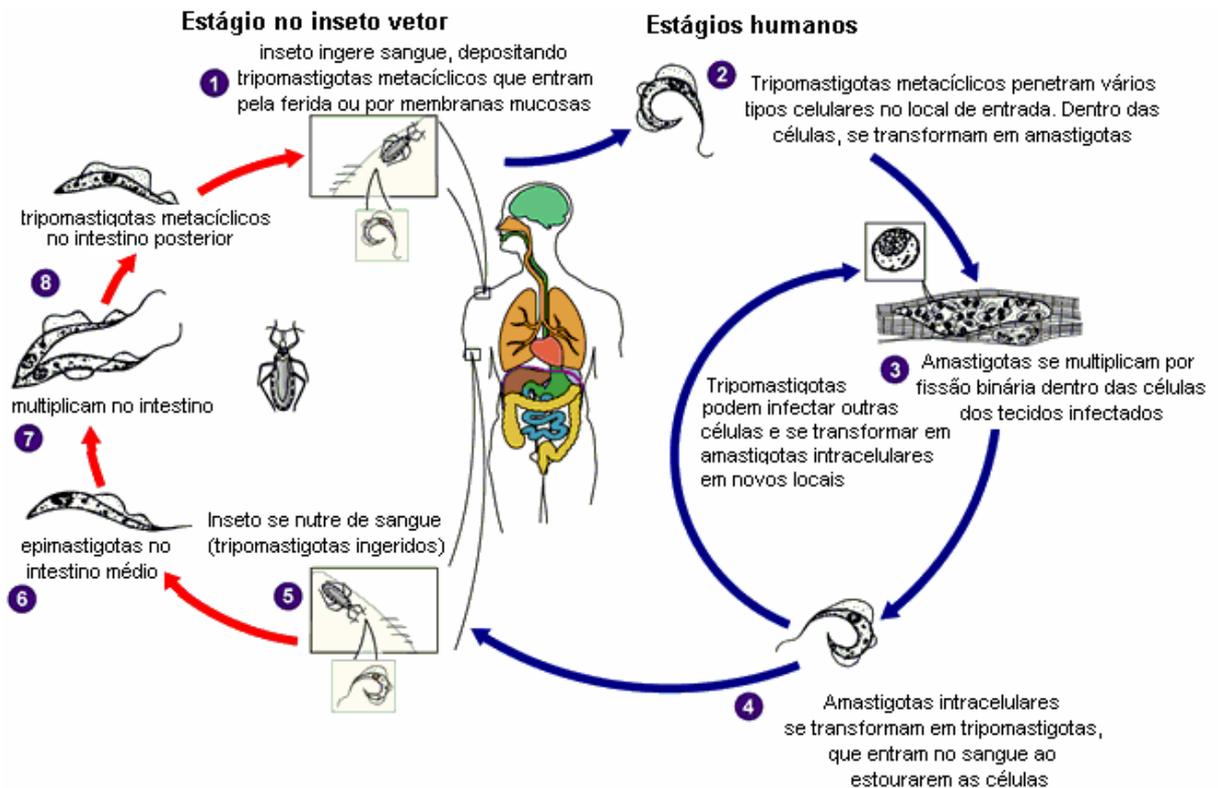


Figura 1.2. Ciclo vital do *Trypanosoma cruzi*
(modificado de www.dpd.cdc.gov/dpdx)

1.5. METACICLOGÊNESE

No ciclo evolutivo do *T. cruzi*, cada uma das formas morfológicas apresentam características próprias. Entre elas, podemos citar a capacidade diferenciada dos tripomastigotas metacíclicos em infectar o hospedeiro vertebrado (SOUZA, 1984). Essas formas são viabilizadas através da metaciclogênese, processo de transformação dos epimastigotas, não infectivos, para as formas infectivas, tripomastigotas metacíclicas.

Como citado anteriormente, essa diferenciação ocorre *in vivo* no intestino do inseto vetor e é essencial para a progressão do ciclo de vida do parasita. Portanto, o estudo deste processo é de suma importância tanto para o seu entendimento como um fenômeno biológico básico, quanto para a compreensão do mesmo visando à identificação de alvos para o desenvolvimento de agentes profiláticos para a doença de Chagas. Além disso, esse processo é de grande interesse, pois envolve a modulação da expressão gênica do protozoário, a qual está relacionada com sua infectividade (CONTRERAS *et al.*, 1985a).

Nesse sentido, com o objetivo de ampliar os conhecimentos em relação a este processo, condições ambientais encontradas pelo parasita durante o momento da sua diferenciação foram mimetizadas em laboratório. Através da utilização de meios de cultivo

quimicamente definidos que reproduzem essas condições, tornou-se possível o estudo da metaciclologênese *in vitro* do *T. cruzi* (CONTRERAS *et al.*, 1985b; BONALDO *et al.*, 1988), usando-se como padrão o clone Dm28c (CONTRERAS *et al.*, 1988). Este fato foi de grande importância, pois facilitou as pesquisas nas áreas de regulação da expressão de genes estágio-específicos e diferenciação celular, além de contribuir para a elucidação de mecanismos envolvidos com o potencial de infecção do parasita.

De modo similar ao que ocorre no trato digestivo do triatomíneo, a metaciclologênese *in vitro* também requer a adesão dos epimastigotas a um substrato (BONALDO *et al.*, 1988; SCHAUB, 1988). Esta etapa de adesão acontece após estas formas sofrerem um estresse nutricional, que é causado pela sua transferência do meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*), rico nutricionalmente, para o meio TAU (*Artificial Triatomine Urine*), o qual consiste em uma solução ligeiramente hipertônica que se assemelha às condições iônicas encontradas na urina do inseto vetor. Após duas horas de incubação em meio TAU, no qual os parasitas se aderem ao substrato, os mesmos são transferidos para o meio de diferenciação denominado TAU3AAG (meio TAU acrescido de prolina, ácido glutâmico, ácido aspártico e glicose), onde permanecem por 96 horas. Decorrido este período, cerca de 80% dos epimastigotas encontram-se diferenciados em tripomastigotas metacíclicos (BONALDO *et al.*, 1988). De acordo com CONTRERAS *et al.* (1988), no final do processo *in vitro*, os metacíclicos são encontrados exclusivamente no sobrenadante da cultura e apresentam as mesmas propriedades biológicas que os parasitas diferenciados no inseto vetor. Poucas horas após o início do processo, os epimastigotas mostram-se resistentes à lise pelo complemento, característica esta, apresentada por tripomastigotas metacíclicos (NOGUEIRA *et al.*, 1975).

Estudos envolvendo a metaciclologênese *in vitro* sugerem que o estresse nutricional é importante para a ocorrência do disparo da diferenciação, pois, segundo FIGUEIREDO *et al.* (2000), os fenômenos de adesão e diferenciação celular são interrompidos caso as condições de nutrição sejam restauradas após o período de estresse. Além disso, CASTELLANI *et al.* (1967) e CONTRERAS *et al.* (1985b) citam o estresse nutricional como sendo um fator capaz de induzir a metaciclologênese, evidenciando sua importância para o início deste processo. Durante esta fase de privação de alimento, ocorre a ativação de enzimas presentes no reservossomo do parasita, o que leva à degradação de proteínas estocadas no seu interior, conseqüentemente acarretando no desaparecimento dessa organela (SOARES *et al.*, 1989; URBINA, 1994; SOARES, 1999). Os aminoácidos gerados através da quebra dessas proteínas são liberados para o citoplasma da célula e utilizados como fonte de energia para dar prosseguimento à diferenciação celular.

A metaciclologênese também pode ser induzida por fatores séricos (CONTRERAS *et al.*, 1985b; DUSANIC, 1980) e AMP cíclico (GONZALES-PERDOMO *et al.*, 1988), já que o aumento da concentração deste no parasita, causa a transformação de epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos.

Adicionalmente ao AMP cíclico, os íons Ca^{++} , K^+ , PO_4^- e HCO_3^- são descritos como agentes que facilitam a metaciclologênese (KRASSNER *et al.*, 1991). Durante a fase estacionária de crescimento dos epimastigotas, as concentrações de polifosfatos de cadeia curta e longa, presentes no acidocalcissomo do parasita, sofrem um aumento. Em condições de estresse hiposmótico ou alcalino, essas moléculas são hidrolisadas levando à liberação de Ca^{++} da organela. Este íon, por sua vez, possibilita respostas rápidas às mudanças ambientais encontradas pelo parasita. Portanto, os polifosfatos também podem estar envolvidos na regulação da metaciclologênese (RUIZ *et al.*, 2001).

Mudanças na composição lipídica do parasita também são evidenciadas no percorrer deste processo. As concentrações dos ácidos linoléico e mirístico são aumentadas, enquanto as dos ácidos palmítico, esteárico e linolênico sofrem um decréscimo (ESTEVES *et al.*, 1989). Modificações nos açúcares de superfície são observadas nos parasitas (DE ANDRADE *et al.*, 1991), o que acarreta em alterações na permeabilidade e fluidez da membrana. A L-prolina também foi descrita como um estimulante da metaciclologênese (CONTRERAS *et al.*, 1985b; HOMSY *et al.*, 1989) e da diferenciação das formas amastigotas para as formas tripomastigotas no interior das células do hospedeiro vertebrado (TONELLI *et al.*, 2004).

As mudanças morfológicas sofridas pelo *T. cruzi* durante o processo de metaciclologênese refletem as modulações no perfil de expressão gênica (CONTRERAS *et al.*, 1985a) e a redução no nível de transcrição que são observadas no mesmo (GOLDENBERG *et al.*, 1985). Alguns dos vários genes transitoriamente expressos durante esse processo apresentam uma regulação pós-transcricional efetivada através da sua mobilização diferencial para os polissomos (ÁVILA *et al.*, 2001; FRAGOSO *et al.*, 2003). Ainda é importante salientar que a expressão de proteína-quinases é modulada durante a metaciclologênese (ULLOA *et al.*, 1988; OCHATT *et al.*, 1993), o que indica a participação de mensageiros secundários e a transdução de sinais no processo. Por outro lado, inibidores de poli-ADP ribosilação (ISOLA *et al.*, 1987) e inibidores de proteases (BONALDO *et al.*, 1991) foram descritos como capazes de interromper o processo de diferenciação, assim como o ânion Cl^- (KRASSNER *et al.*, 1991).

A metaciclologênese *in vitro*, em meio quimicamente definido, pelo fato de permitir o isolamento de células em vários estágios de diferenciação, tem sido o modelo adotado pelo

nosso grupo para caracterizar a expressão gênica nas diferentes fases da metaciclogênese do *T. cruzi* (ÁVILA *et al.*, 2003).

1.6. CARACTERÍSTICAS CELULARES DO PARASITA

Peculiar da ordem Kinetoplastida, faz-se presente no *T. cruzi* uma mitocôndria única e diferenciada, com um DNA composto por moléculas circulares denominadas maxicírculos e minicírculos, que concatenados, formam uma estrutura chamada cinetoplasto, o qual compreende aproximadamente 25% do conteúdo total do DNA celular (SOUZA, 2003). Os maxicírculos portam genes codificadores de proteínas mitocondriais e RNA ribossômico, basicamente envolvidos na via de fosforilação oxidativa (SIMPSON *et al.*, 1987; SHLOMAI, 2004) enquanto os minicírculos codificam moléculas de RNA guia que participam no processo de edição (através da inserção e, menos freqüentemente, deleção de uridinas) dos mRNA transcritos a partir dos maxicírculos (MADISON-ANTENUCCI *et al.*, 2002).

Várias estruturas estão presentes no *T. cruzi*, porém, três delas são bastante evidentes: o núcleo, cinetoplasto e flagelo (figura 1.3). O grau de compactação do material genético nuclear e do cinetoplasto varia de acordo com o estágio evolutivo em que o organismo se encontra, bem como o comprimento do flagelo e sua posição celular em relação a estas duas estruturas, como descrito no tópico anterior. O nível de compactação da cromatina está relacionado ao padrão de transcrição do parasita, ou seja, formas replicativas possuem uma maior atividade transcritoral que as células em estágio infectivo (ELIAS *et al.*, 2002).

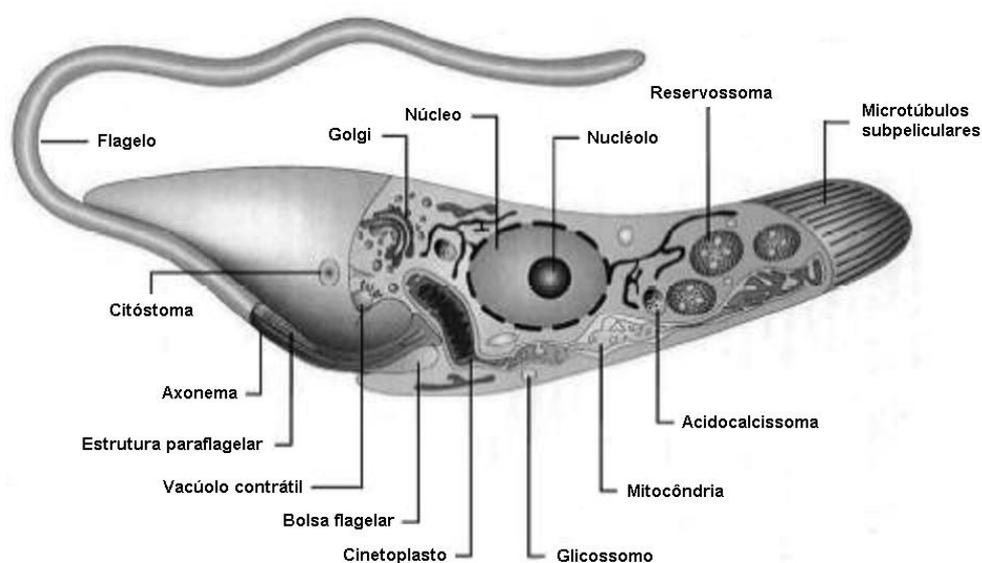


Figura 1.3. Esquema das estruturas subcelulares de um epimastigota de *T. cruzi* (modificado de SOUZA, 2008)

Assim como na maioria dos eucariotos, o flagelo dos tripanossomas são formados pelo axonema, constituído de microtúbulos na conformação 9 + 2, que conduz o movimento flagelar. Característico dos tripanossomas é a estrutura paraflagelar (*paraflagellar rod* - PFR), um filamento semi-cristalino que se estende por todo o flagelo, ao longo do axonema. Além de ser um importante elemento estrutural, o PFR pode estar relacionado com a agregação de proteínas regulatórias e metabólicas que contribuem para a função do flagelo (RALSTON & HILL, 2008). Estudos de RNA antisense em *Trypanosoma brucei* demonstraram o requerimento desta estrutura interrompe a motilidade normal do flagelo (BASTIN *et al.*, 1998).

A membrana plasmática deste organismo é coberta por uma superfície de glicocálice composto por diversas proteínas integrais e periféricas voltadas para o ambiente extracelular, as quais podem sofrer modificações formando as glico e lipoproteínas de superfície. Deste modo, existem proteínas e glicoconjugados complexos presos à membrana através de âncoras glicosilfosfatidilinositol. Estas moléculas que recobrem o organismo atuam como mediadoras no processo de interação do parasita com a célula hospedeira (HEISE *et al.*, 1996).

Logo abaixo da membrana plasmática, na face intracelular, encontra-se uma camada de microtúbulos, designados microtúbulos sub-peliculares, que conferem ao tripanossomatídeo resistência mecânica e rigidez (KOHL & GULL, 1998; SOUZA, 2003).

Na região de emergência do flagelo está localizada a bolsa flagelar. Esta estrutura é formada por uma depressão no local onde ocorre a junção das membranas plasmática e flagelar (SOUTO-PADRON & DE SOUZA, 1979). Este é um local que não apresenta microtúbulos sub-peliculares (OVERATH *et al.*, 1997), mas que contém uma grande quantidade de receptores. Por este motivo, supõe-se que a bolsa flagelar seja uma região onde ocorra intenso tráfego vesicular. Existe ainda, uma outra invaginação menor, localizada próxima à bolsa flagelar: o citóstoma, cuja função também está relacionada com a absorção de nutrientes advindos do meio externo (TYLER *et al.*, 2003). Internalizados em vesículas, os nutrientes oriundos da bolsa flagelar e do citóstoma são transportados para os reservossomos: estruturas esféricas, envoltas por membrana, encontradas com maior frequência na região posterior do parasita. Todas as macromoléculas ingeridas pela célula são estocadas nesta organela, que possui em seu interior grandes quantidades de proteinases, dentre elas, a cruzipaina (CAZZULO *et al.*, 1997). Por este motivo, foi proposto que os reservossomos seriam compartimentos pré-lisossomais (SOARES *et al.*, 1992).

A presença do glicossomo é um outro aspecto que diferencia os tripanossomatídeos dos demais organismos. Essa organela está distribuída por todo o citoplasma celular e contém as enzimas envolvidas na glicólise e proteínas relacionadas com a fixação de carbono e

síntese de pirimidina *de novo* (HANNAERT *et al.*, 2003; SOUZA, 2003). As proteínas glicosomais são sintetizadas no citoplasma e, posteriormente, transportadas para o interior dos glicosomos, devido à presença de um peptídeo sinal.

No *T. cruzi* ainda existe o acidocalcissoma, uma organela cuja função é estocar íons cálcio, essenciais para a sinalização e invasão celular do parasita na célula hospedeira (MORENO *et al.*, 1994; LU *et al.*, 1997; VIEIRA & MORENO, 2000) e outras duas organelas também estocam cálcio intracelular: o retículo endoplasmático e a mitocôndria (DOCAMPO & VERCESI, 1989a, 1989b), no entanto, este íon é encontrado em maior quantidade no acidocalcissoma. Além da estocagem de cálcio, esta estrutura realiza o estoque de pirofosfato, regula o pH citoplasmático através de uma H⁺-ATPase localizada em sua membrana e controla a osmorregulação celular (DOCAMPO & MORENO, 1999, 2001).

1.7. GENOMA DO *Trypanosoma cruzi*

O material genético dos tripanossomatídeos apresenta-se dividido em duas frações: nuclear e mitocondrial (kDNA). O *T. cruzi*, como espécie, é bastante heterogêneo a nível genômico. As diferentes cepas dessa espécie e até mesmo os clones derivados de uma mesma cepa apresentam uma grande variação quanto ao número de cromossomos e conteúdo total de DNA (Mac DANIEL & DVORAK, 1993; MACHADO & AYALA, 2001). O genoma deste parasita apresenta uma grande plasticidade tanto no número como na estrutura dos cromossomos, sendo ambos possibilitados, provavelmente, por trocas genéticas entre organismos desta espécie (MACHADO & AYALA, 2001; GAUNT *et al.*, 2003), embora haja evidências de que as populações sejam originadas predominantemente através da propagação clonal (TIBAYRENC & AYALA, 2002).

Uma peculiaridade dos tripanossomatídeos é que estes não apresentam condensação cromossômica (VICKERMAN & TETLEY, 1977), apesar do cariótipo ser estável nas diferentes formas evolutivas (AYMERICH & GOLDENBERG, 1989; HENRIKSSON *et al.*, 1995). A cromatina é diferentemente distribuída no núcleo celular dependendo da fase do ciclo em que a célula se encontra. Enquanto na fase G1 do ciclo celular a cromatina localiza-se preferencialmente na região central do núcleo, na fase S ela é visualizada na periferia nuclear, local onde ocorre a replicação (ELIAS *et al.*, 2002).

Em 2005 foi concluída a montagem do genoma do *T. cruzi*, o qual foi sequenciado pela técnica de *whole genome shotgun* (WGS). O projeto genoma deste parasita foi concretizado através de um consórcio formado pelo *The Institute for Genomic Research*

(TIGR), *Seattle Biomedical Research Institute* (SBRI) e *Karolinska Institute* (KI). A cepa CL Brener foi a escolhida para o sequenciamento por ser bem caracterizada bioquímica e parasitologicamente (ZINGALES *et al.*, 1997) e por ser considerada representativa para o universo de cepas circulantes de *T. cruzi*. Anteriormente a este projeto, através de análise densitométrica da separação por PFGE, acreditava-se que esta cepa continha um genoma de 87 Mb distribuídos entre 64 cromossomos (CANO *et al.*, 1995). Com o término da montagem do sequenciamento, estimou-se que o genoma diplóide do parasita possuía aproximadamente 110 Mb, com cada haplótipo contendo cerca de 12.000 genes, sendo que mais de 50% do genoma constituiu-se de sequências repetitivas compostas por famílias de proteínas de superfície, retrotransposons e elementos subteloméricos. Estes fragmentos repetitivos, juntamente com a natureza híbrida desta cepa, dificultaram e tornaram o processo de montagem bastante trabalhoso. Dentre as famílias gênicas de maior representatividade no genoma do *T. cruzi* encontram-se as trans-sialidases (TS), proteínas de superfície associadas à mucina (MASP), mucinas e a glicoprotease de superfície gp63, que juntas perfazem 18% dos genes codificadores de proteínas. No total foram identificados 23.216 prováveis genes codificadores de proteínas, geralmente organizados em longos *clusters*, sendo 11.398 genes de função determinada através de experimentação ou por homologia, 9.975 codificadores de proteínas hipotéticas conservadas e 1.843 codificadores de proteínas hipotéticas exclusivas de *T. cruzi* (EL-SAYED *et al.*, 2005a).

Interessantemente, proteínas sinalizadoras como a proteína G heterotrimérica, receptores do tipo serpentina, domínios de interação SH2 e SH3, fatores regulatórios de transcrição e diversos receptores catalíticos não foram encontrados no genoma do protozoário. Por outro lado, proteína-quinases e proteína-fosfatases mostraram-se abundantes. Em torno de 167 genes de proteína-quinases distintos foram observados, o dobro do apresentado pelo *Plasmodium falciparum* (WARD *et al.*, 2004) e 30% maior que o deparado em *Saccharomyces cerevisiae*.

Devido à publicação também recente do genoma dos tripanossomatídeos *T. brucei* (BERRIMAN *et al.*, 2005) e *Leishmania major* (IVENS *et al.*, 2005), análises comparativas entre eles e o *T. cruzi* tornaram-se possíveis: 6.158 grupos de genes ortólogos (COG, *clusters of orthologous genes*) mostraram-se compartilhados entre os três organismos, e 1.014 COGs apresentaram-se em somente dois deles (EL-SAYED *et al.*, 2005b). Apesar de terem divergido há mais de 200 milhões de anos (OVERATH *et al.*, 2001; STEVENS *et al.*, 2001), esses tripanossomatídeos possuem um alto grau de sintonia gênica.

1.8. TRANSCRIÇÃO POLICISTRÔNICA E *TRANS-SPLICING*

De um modo geral, os eucariotos apresentam uma transcrição monocistrônica que consiste na transcrição individual de cada gene, ou seja, cada mRNA é transcrito separadamente, sendo este composto por éxons e íntrons. Portanto, para que o mRNA maduro seja formado, faz-se necessário uma reação de *cis-splicing*, na qual os íntrons são removidos do transcrito primário (pré-mRNA) e os éxons são unidos (PROUDFOOT *et al.*, 2002).

Diferentemente desse padrão monocistrônico, os tripanossomatídeos apresentam uma transcrição policistrônica (JOHNSON *et al.*, 1987; TEIXEIRA & DAROCHA, 2003) e não apresentam interrupções por íntrons, com exceção do gene da enzima poli-A polimerase, para o qual foi relatado a presença de sequências intrônicas em *T. cruzi* e *T. brucei* (MAIR *et al.*, 2000). A transcrição polistrônica é representada por um único RNA gerado pela transcrição de dois ou mais genes em tandem, os quais não possuem funções relacionadas, ao contrário do que ocorre no caso de operons bacterianos. Curiosamente, genes de uma mesma unidade policistrônica podem ser expressos em quantidades diferentes, ressaltando a importância de mecanismos pós-transcricionais no controle da expressão gênica (VANHAMME & PAYS, 1995).

Os RNAs policistrônicos são processados pelo mecanismo de *trans-splicing* (VAN DER PLOEG *et al.*, 1982; SUTTON & BOOTHROYD, 1986) para gerar unidades monocistrônicas maduras. Neste processo, similarmente ao que ocorre no *cis-splicing*, as unidades codificadoras são individualizadas e à extremidade 5' de cada uma delas, é adicionada uma sequência extremamente conservada, espécie-específica, de 39 nucleotídeos, chamada de *spliced leader* (SL) ou mini-éxon (McCARTHY-BURKE *et al.*, 1989; NILSEN, 1992). Como pode ser visto na figura 1.4, duas moléculas de RNA participam deste processo: o *RNA spliced leader* (SL-RNA) e o pré-mRNA. O SL-RNA possui cerca de 110 nucleotídeos (ZWIERZYNSKI & BUCK, 1991) e contém dois domínios separados pelo sítio doador de *splicing*: o domínio 5' denominado mini-éxon, e o domínio 3' correspondente ao íntron, sendo que o primeiro é adicionado ao sítio aceptor de *splicing* no pré-mRNA. Este sítio é composto pelo dinucleotídeo AG localizado a jusante de uma região rica em pirimidinas (DE LAFAILLE, LABAN & WIRTH, 1992).

Para finalizar o processo de maturação do mRNA são adicionados simultaneamente ao mRNA uma cauda poli-A na sua extremidade 3' e o mini-éxon (contendo o cap 4) na região 5' (ULLU & TSCHUDI, 1991; LEBOWITZ *et al.*, 1993). O cap 4 é assim chamado por possuir os quatro primeiros nucleotídeos após a 7-metil-guanosina, metilados. Esta estrutura peculiar dos tripanossomatídeos está implicada na estabilidade do mRNA, no seu transporte e

regulação traducional (STOVER, KAYE & CAVALCANTI, 2006). A região rica em resíduos de pirimidinas e a seqüência consenso (AG) regulam a adição do mini-éxon e da cauda poli-A. Deleções nestas regiões impedem o correto processamento destes transcritos (MATTHEWS *et al.*, 1994).

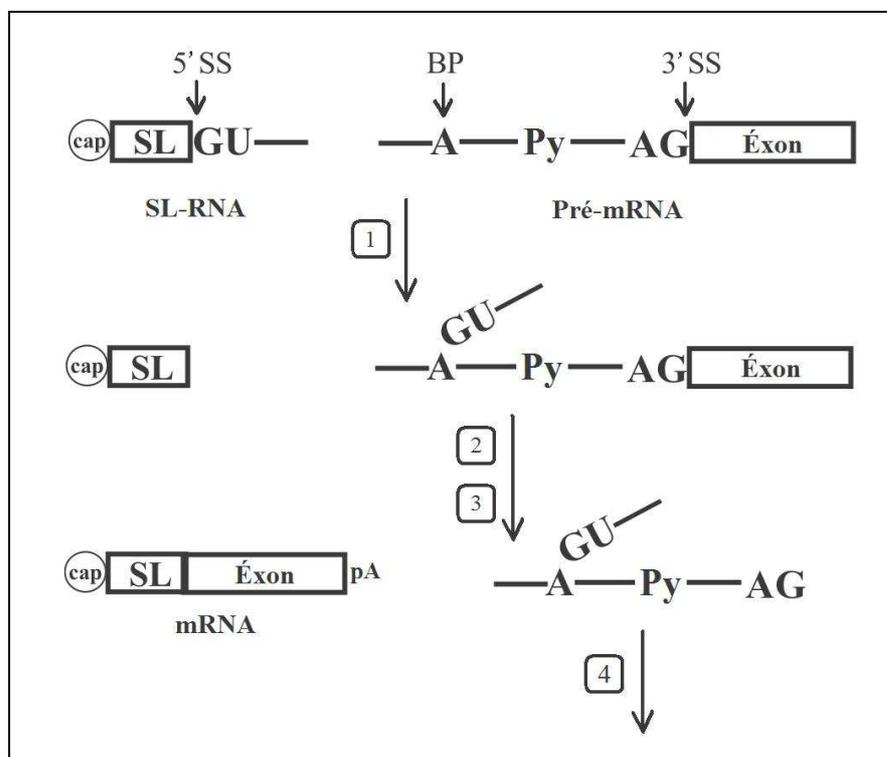


Figura 1.4. Representação esquemática do processo de *trans-splicing* em tripanossomatídeos. O RNA spliced leader (SL-RNA) contém o sítio (GU) de splicing 5' (5' SS) e o pré-mRNA apresenta o sítio aceptor (AG) de splicing 3' (3' SS). Esta última molécula também possui uma adenosina conservada (A) que é utilizada como ponto de ramificação (BP) no processo e um trato de polipirimidina (Py). O mRNA maduro é gerado mediante duas reações de transesterificação (1 e 2). Após, ocorre o processo de clivagem e poliadenilação (3), seguido da desramificação e degradação do intermediário em Y (4). A estrutura cap 4 (cap) e a cauda poli-A (pA) estão indicadas na figura. (modificado de MAYER & FLOETER-WINTER, 2005).

As três RNA polimerases, I, II e III, já foram identificadas em tripanossomatídeos (CORNELISSEN *et al.*, 1989; CORNELISSEN *et al.*, 1990; KOCK & CORNELISSEN, 1991) através de similaridades estruturais compartilhadas com as RNA polimerases de eucariotos superiores (VANHAMME & PAYS, 1995). Os genes que codificam para as subunidades principais já foram clonados e caracterizados (KOCK *et al.*, 1988; EVERS *et al.*, 1989; JESS *et al.*, 1989; SMITH *et al.*, 1989).

Entre as diferenças observadas entre as RNA polimerases dos tripanossomatídeos e dos eucariotos superiores, destacam-se as alterações na extensão C-terminal da RNA

polimerase II (ausência das repetições em *tandem* de heptapeptídeos nos tripanossomas) e a susceptibilidade das RNA polimerases dos tripanossomatídeos frente a inibidores como a α -amanitina (LAUFER *et al.*, 1999). Em adição a isto, aparecem diferenças na dependência de Mn^{2+} , na utilização de fita simples e no reconhecimento de promotores específicos entre as polimerases desses dois grupos de organismos supracitados. Em *T. brucei*, de modo geral, a RNA polimerase I transcreve RNAs ribossômicos e genes de glicoproteínas variáveis de superfície (VSGs), enquanto a RNA polimerase do tipo II, genes codificadores de proteínas, incluindo genes do mini-éxon. A RNA polimerase III transcreve moléculas de RNA nucleolar e de transferência (GILINGER & BELLOFATTO, 2001). As regiões promotoras das polimerases I e III já foram evidenciadas, contudo, os promotores associados à transcrição dos genes que codificam proteínas ainda não foram identificados (LANDFEAR, 2003), com exceção de um promotor associado ao gene do mini-éxon (NUNES *et al.*, 1997). A atividade de alguns promotores de *T. cruzi* parece ser controlada por fatores de transcrição que são cepa-específicos (TYLER-CROSS *et al.*, 1995). No entanto, NUNES e colaboradores (1997) demonstraram que o promotor rRNA de cepas do grupo I é funcional apenas entre as cepas desse mesmo grupo, enquanto o mesmo promotor de cepas do grupo II são ativos em cepas de ambos os grupos.

Acredita-se que os promotores para a RNA polimerase II estejam alojados em locais do genoma conhecidos como *strand-switch regions* (IVENS *et al.*, 2005), regiões que delimitam longos transcritos policistrônicos que se estendem por dezenas a centenas de genes (chegando a possuir 82 kb de comprimento, como no cromossomo 1 de *Leishmania major*) pertencentes a uma mesma fita de DNA molde (WORTHEY *et al.*, 2003; EL-SAYED *et al.*, 2005b; NILSSON & ANDERSSON, 2005). Ou ainda, especula-se que o início da transcrição seja promíscuo, em pontos aleatórios do cromossomo (MYLER *et al.*, 1999), pois genes repórteres podem ser expressos na ausência de regiões específicas, apenas sob o controle de sequências intergênicas (LAFAILLE & WIRTH, 1992).

1.9. REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

Para que a sobrevivência dos organismos seja possibilitada frente às mudanças de condições ambientais, respostas adaptativas rápidas são necessárias. Estas são mediadas através da modulação da expressão gênica, cujo controle se dá em diferentes níveis: compactação da cromatina, transcrição, processamento, transporte e estabilidade do mRNA, tradução e pós-tradução.

Na maioria dos eucariotos, a regulação da expressão gênica é realizada em nível transcricional, ou seja, os produtos gênicos são produzidos de acordo com a necessidade da célula, em um determinado momento. Quanto aos tripanossomatídeos, há relatos de que os níveis de expressão de algumas proteínas estão relacionados ao número de cópias gênicas (TOVAR & FAIRLAMB, 1996; TOMÁS *et al.*, 1997). Porém, como não há evidências de sequências promotoras típicas de RNA polimerase II em *T. cruzi*, e devido ao fato de que genes pertencentes ao mesmo transcrito policistrônico resultam em quantidades protéicas diferentes, supõe-se que a regulação gênica dos tripanossomatídeos ocorra, predominantemente, em etapas posteriores à transcrição (regulação pós-transcricional). Então, dentre os processos responsáveis pela regulação da expressão gênica, pode-se citar a adição da cauda poli-A e SL no pré-mRNA (*trans-splicing*), estabilidade dos mRNAs maduros (tempo de meia-vida e taxa de degradação dos mRNAs), transporte dos mRNAs do núcleo para o citoplasma, seleção e acessibilidade dos mRNAs à maquinaria de tradução (CLAYTON, 2002; BOUCHER *et al.*, 2002). Há relatos de que este último controle seja o que possui maior influência na expressão diferencial de alguns genes envolvidos na metaciclologênese de *T. cruzi*. Isso é constatado quando comparadas as frações celulares de RNA total e RNA associado aos polissomos. Algumas espécies de RNA estão sempre presentes na célula, porém, associam-se aos polissomos somente em alguns estágios evolutivos (GOLDENBERG *et al.*, 1985; DALLAGIOVANNA *et al.*, 2001; ÁVILA *et al.*, 2003; FRAGOSO *et al.*, 2003; YAMADA-OGATTA *et al.*, 2004).

Ainda é importante salientar que a expressão de genes pode se manter constante ou aumentar, mesmo com a queda nos níveis de transcrição (ABUIN *et al.*, 1999; TOMAS & KELLY, 1996; RECINOS *et al.*, 2001). Também está descrito que a expressão de algumas proteínas de tripanossomatídeos pode ser modulada mesmo quando a concentração de seus respectivos mRNAs permanece constante nas diversas formas evolutivas, demonstrando assim, a existência de controle traducional influenciando no processo (TOMÁS & KELLY, 1996; FRAGOSO *et al.*, 1998). Além disso, fatores pós-traducionais como, por exemplo, a taxa de degradação protéica, podem estar relacionados à quantidade final de produtos gênicos encontrados nas células.

Algumas sequências que alteram a estabilidade dos mRNAs foram observadas, muitas das quais encontram-se na sua região 3'-UTR, como é o caso da alça formada na região 3'-UTR dos mRNAs da prociclina em *T. brucei* (BERBEROF *et al.*, 1995; HEHL *et al.*, 1994). Adicionalmente, ensaios envolvendo o gene da amastina de *T. cruzi* e de várias espécies de *Leishmania* mostram que a sua região 3'-UTR é necessária para a manutenção da estabilidade

e associação do mRNA aos polissomos e para o aumento da sua taxa de tradução (TEIXEIRA *et al.*, 1995; COUGHLIN *et al.*, 2000; BOUCHER *et al.*, 2002).

Sequências 5'-UTR e intergênicas também demonstram atividades relacionadas à regulação da expressão gênica. No *T. cruzi* foi descrita uma proteína capaz de reconhecer tratos de poli-[dT-dG] em fita simples de polinucleotídeos, sequências estas, frequentes em regiões intergênicas (DUHAGON *et al.*, 2003). Neste organismo também se identificou sequências na região 5'-UTR do gene codificador para proteína DNA topoisomerase do cinetoplasto capazes de regular o nível de mRNA deste gene durante o ciclo celular (PASION *et al.*, 2007).

CASSOLA e colaboradores (2007) verificaram em *T. cruzi* grânulos citoplasmáticos contendo mRNAs estocados. Destes locais, esses polinucleotídeos seguem para degradação ou para posterior tradução. Segundo HOLETZ *et al.* (2007) esses grânulos são evidenciados quando os parasitas encontram-se em condições de estresse nutricional ou sob tratamento com drogas que diminuem ou aumentam a associação dos mRNAs aos polissomos.

1.10. MICROARRANJO E PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS EM *T. cruzi*

Com o início dos projetos de sequenciamento genômico, iniciados na década de 90, diversos consórcios e colaborações entre grandes grupos foram concretizados a fim de tornar possível a montagem do genoma dos diversos organismos estudados. Atualmente encontram-se disponíveis as sequências genômicas de organismos que variam desde vírus e bactérias até plantas e animais, incluindo o ser humano. Com relação ao *T. cruzi*, o sequenciamento já foi concluído e publicado, conforme relatado anteriormente.

De posse de uma grande quantidade de sequências depositadas em bancos de dados, o desafio posterior ao sequenciamento tornou-se correlacionar a estrutura com a função, caracterizando a chamada genômica funcional. Em outras palavras, a genômica funcional utilizou os dados produzidos pelos projetos de sequenciamento com o intuito de compreender aspectos dinâmicos, como por exemplo, o modo como ocorre a regulação da expressão dos genes em diferentes situações, visando entender o funcionamento global da célula.

Desse modo, PROBST (2005), utilizando uma abordagem de genômica funcional (já que esta abrange estudos de transcriptoma, entre outros) e empregando a técnica de microarranjo de DNA desenvolvida no Instituto Carlos Chagas (ICC), foi capaz de analisar o perfil de expressão gênica do clone Dm28c do *T. cruzi* durante o processo de metaciclo gênese, usando duas representações do transcriptoma, o RNA total do protozoário e o RNA associado

aos polissomos. Esta análise compreendeu as formas epimastigota e tripomastigota metacíclica, além das formas de transição, ou seja, as formas epimastigotas sob estresse por 2 horas e as formas aderidas por 3, 12 e 24 horas. O microarranjo envolveu o estudo de cerca de 4.500 genes deste organismo, sendo que aproximadamente 1.200 apresentaram-se diferencialmente expressos entre epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos. Dentre os genes de expressão modulada, a maioria encontra-se anotado como codificadores de proteínas hipotéticas. Essa denominação genérica de “proteína hipotética” é usada porque seus genes codificadores, preditos pelo sequenciamento do genoma do *T. cruzi*, são de função desconhecida. Deste modo, as proteínas hipotéticas podem ser classificadas em dois grupos: as conservadas, que apresentam ortólogas em outros organismos, e as ditas “hipotéticas” somente, que a princípio são exclusivas do organismo em questão.

A partir desses resultados obtidos pelo nosso grupo através do microarranjo, devido ao grande número de proteínas hipotéticas encontradas, este trabalho teve início com a finalidade de aumentar os conhecimentos relacionados à função das proteínas hipotéticas e de promover a caracterização biológica das mesmas.

1.11. SISTEMA DE CLONAGEM GATEWAY®

A plataforma Gateway® (Invitrogen) consiste em um método de clonagem baseado na recombinação de sequências sítio específicas do bacteriófago lambda (LANDY, 1989). O uso desta tecnologia possibilita, rápida e eficientemente, a passagem de sequências de DNA, sejam elas produtos de PCR, clones de cDNA ou fragmentos digeridos por enzimas de restrição, para uma grande gama de vetores, os quais visam a expressão e análise funcional de proteínas (HARTLEY *et al.*, 2000), como mostra a figura 1.5.

Na natureza, no ciclo lisogênico do bacteriófago lambda, a inserção do DNA deste organismo no material genético da *Escherichia coli* se dá pela ação das proteínas Integrase (Int), proveniente do fago, e Fator de Integração ao Hospedeiro (*Integration Host Factor* – IHF), da bactéria. Quando ocorre a mudança do ciclo lisogênico para o ciclo lítico, ou seja, quando o DNA do bacteriófago é excisado do genoma da bactéria, além dessas duas proteínas anteriormente citadas, a recombinação é promovida com a participação adicional da enzima Excisionase (Xis), também do fago. O sistema Gateway® faz uso dessas enzimas, porém, modificadas. Essas alterações aumentam a especificidade e eficiência da reação (BUSHMAN *et al.*, 1985).

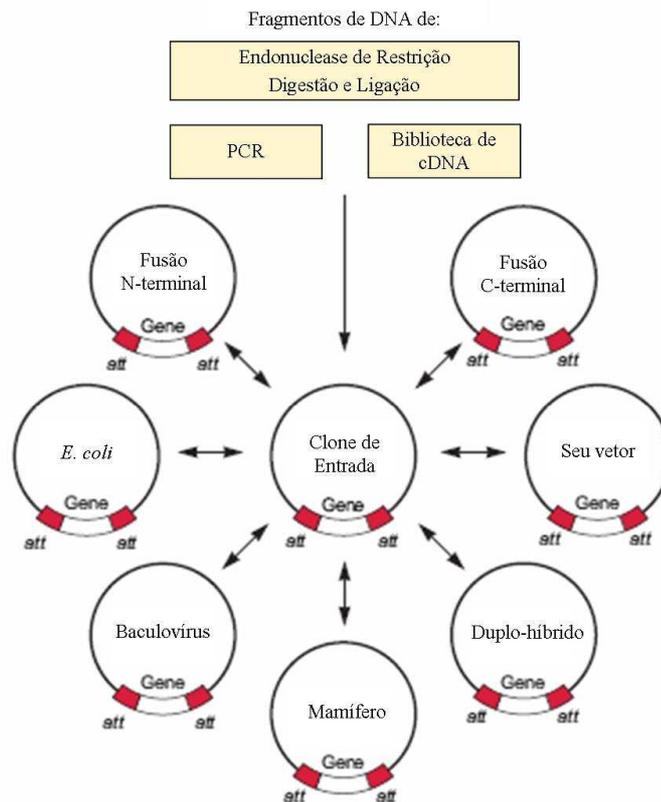


Figura 1.5. Esquema mostrando as diversas possibilidades de aplicação da plataforma Gateway®. A partir do clone de entrada pode-se escolher um vetor de destinação adequado visando o objetivo do trabalho e modelo de estudo, de acordo com a caracterização funcional desejada. Através desse sistema pode-se escolher vetores que adicionam diferentes etiquetas à sua proteína, tanto na região N (fusão N-terminal) como na C-terminal (fusão C-terminal), pode-se expressar sua proteína em sistema procaríoto (*E. coli*) ou em eucarioto (mamífero), até mesmo em vírus (baculovírus). Permite o estudo de interações entre proteínas através do vetor de duplo-híbrido. Enfim, há uma ampla gama de vetores passíveis de serem utilizados nesta plataforma (representados na figura como seu vetor). (modificado do Manual Gateway® Technology).

Duas reações compõem o sistema Gateway®. A primeira delas é denominada reação BP, na qual ocorre a recombinação *in vitro* entre o fragmento de DNA e o vetor de entrada. Nela é utilizada a *BP Clonase enzyme mix*, que contém as proteínas Int e IHF modificadas. A segunda é chamada de reação LR, que consiste na passagem do inserto (no clone de entrada) para o vetor de destino, através da ação das proteínas Int, IHF e Xis presentes na *LR Clonase enzyme mix*.

Os processos de recombinação ocorrem através de sequências específicas chamadas *attachment (att) sites*. A reação entre os sítios *attB* e *attP* resultam nos sítios *attL* e *attR* (figura 1.6), enquanto a recombinação entre os sítios *attL* e *attR* resultam novamente nos sítios *attB* e *attP* (figura 1.7). Essas reações são específicas e direcionais, pois os sítios *attB1* e *attP1*, *attB2* e *attP2*, *attL1* e *attR1*, *attL2* e *attR2* recombina-se somente entre si.

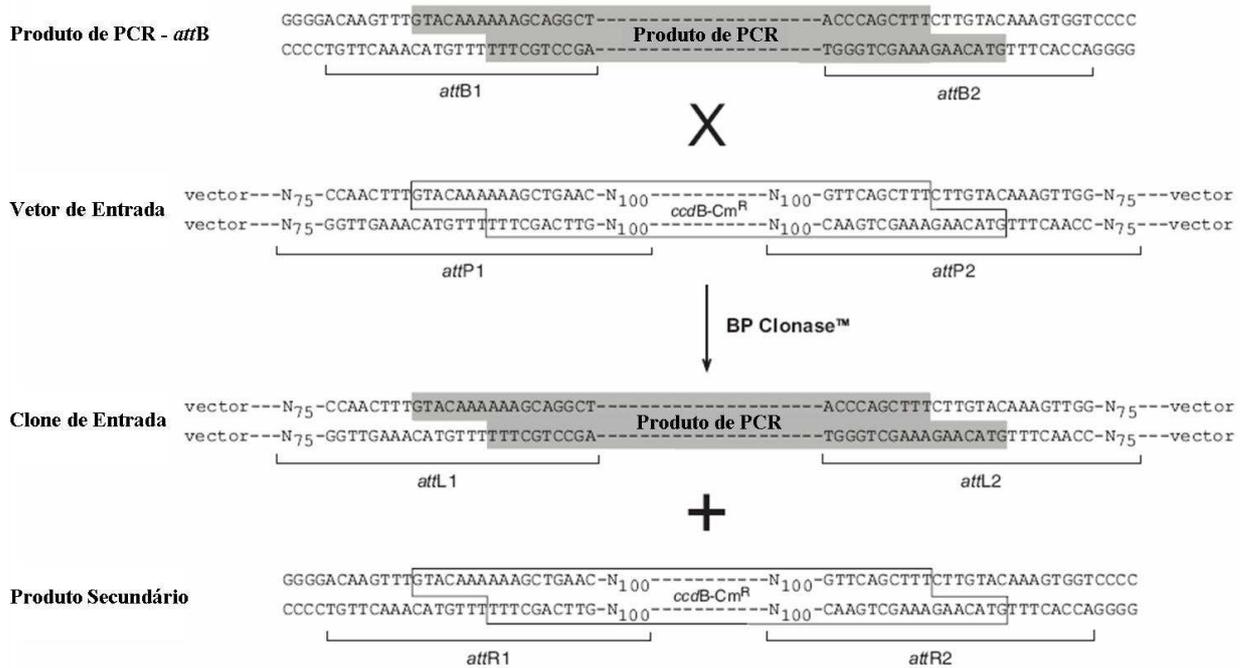


Figura 1.6. Representação esquemática da reação BP, promovida entre os sítios attB e attP. A reação BP necessita da BP Clonase enzyme mix. O gene *ccdB* (*control of cell death*) encontra-se tanto em vetores de entrada como em vetores de destino e codifica uma proteína que interfere com a DNA girase da *E. coli*, inibindo o crescimento de bactérias transformadas com os vetores nativos. Quando há a recombinação, o gene *ccdB* é substituído pelo produto de PCR, gerando o clone de entrada. O gene *Cm^R* confere resistência ao antibiótico cloranfenicol. (modificado de Manual Gateway® Technology).

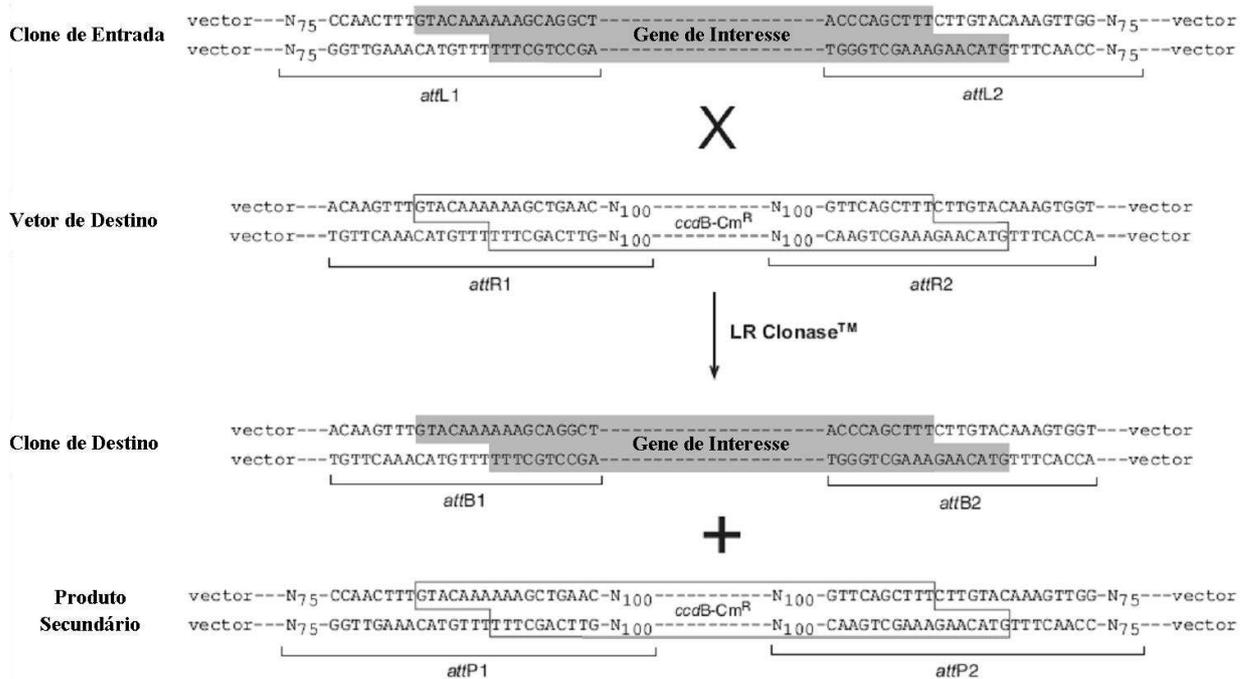


Figura 1.7. Representação esquemática da reação LR, promovida entre os sítios attL e attR. Para que a reação LR aconteça é preciso o uso da LR Clonase enzyme mix. Neste caso, o fragmento de DNA presente no clone de entrada é transferido para o vetor de destino. (modificado de Manual Gateway® Technology).

No presente trabalho foram utilizados o vetor de entrada pDONRTM221 (figura 1.8) e o vetor de destino pDESTTM17 (figura 1.9), visando a expressão de proteínas recombinantes com etiqueta de poli-histidina N-terminal, em *E. coli*. O vetor de destinação possui o cassete RfA, composto pelo gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol (Cm^R) e o gene *ccdB* (vide legenda da figura 1.6), flanqueados pelos sítios de recombinação *attR1* e *attR2*.

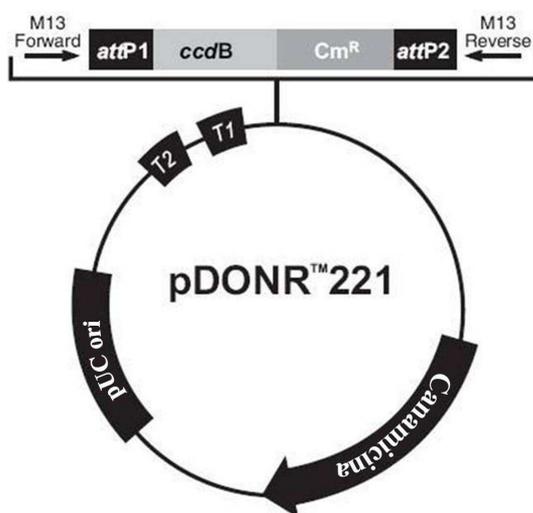


Figura 1.8. Vetor de entrada pDONRTM221. O plasmídeo possui os sítios *attP*, necessários para recombinação BP; os sítios de ancoragem para os primers M13, utilizados para o sequenciamento do inserto; os genes *ccdB*, Cm^R e de resistência à canamicina (Canamicina); as sequências de terminação da transcrição *rrnT1* (T1) e *rrnT2* (T2); pUC ori, origem de replicação do plasmídeo.(modificado do Manual Gateway[®] pDONRTM Vectors).

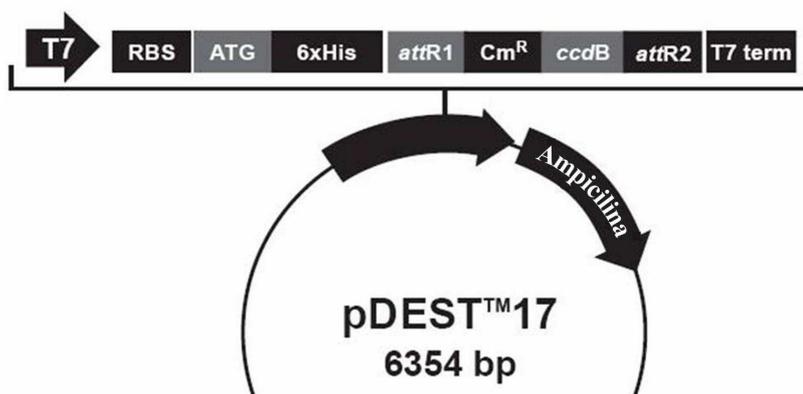


Figura 1.9. Vetor de destino pDESTTM17. Contém os sítios *attR1* e *attR2* necessários para a recombinação LR; o promotor e terminador T7; os genes *ccdB*, Cm^R e de resistência à ampicilina (Ampicilina); o sítio de ligação do ribossomo (RBS) para tradução em sistema procarioto; o ATG inicial e uma de sequência nucleotídica que codifica seis histidinas (6xHis). (modificado de http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pdest17_map.pdf).

Vários vetores, contendo diferentes etiquetas para purificação e localização intracelular de proteínas, foram desenvolvidos no nosso instituto, tendo como base o sistema Gateway[®]. Neste trabalho foi utilizado um deles, o vetor pTcPR-GFPN, que permite a expressão de proteínas recombinantes fusionadas a GFP, no *T. cruzi*, para ensaios de localização celular. Esse vetor possui o gene sintético da neomicina fosfotransferase (NeoR), que confere o caráter de resistência ao antibiótico neomicina, e o cassete RfA flanqueados pelas regiões intergênicas 35.1. Ambos estão sob a regulação do promotor ribossomal 18S de *T. cruzi* Dm28c. O gene de resistência à ampicilina (AmpR) é utilizado para a seleção de clones de *E. coli* transformados com esse plasmídeo (BATISTA, 2008), como pode ser visto na figura 1.10.

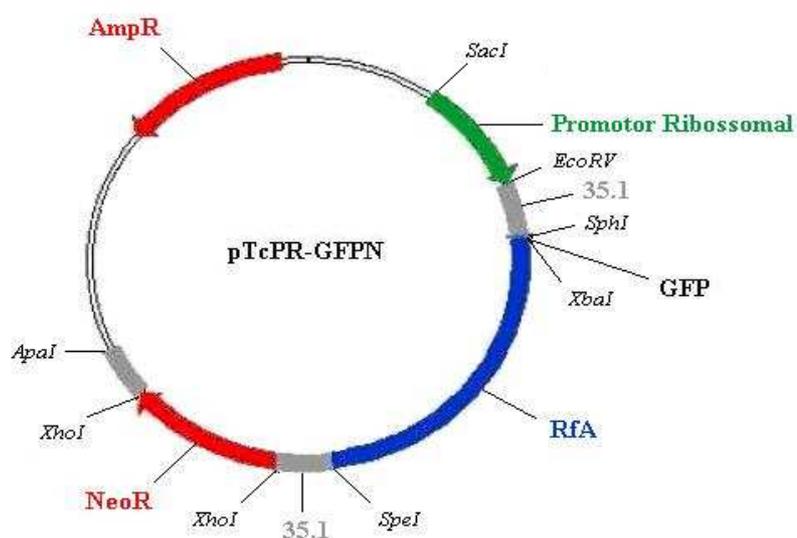


Figura 1.10. Esquema do vetor de destino pTcPR-GFPN, desenvolvido por nossa equipe. A figura mostra o plasmídeo com o promotor ribossomal 18S de *T. cruzi*, o cassete RfA, o gene de resistência à ampicilina (AmpR), neomicina fosfotranferase (NeoR), as regiões intergênicas 35.1 e a sequência codificadora para a GFP. (modificado de BATISTA, 2008).

A clonagem clássica apresenta desvantagens em relação ao sistema Gateway[®]. Na metodologia clássica é necessário o uso de enzimas de restrição. Com isso, também deve haver a disponibilidade de sítios de restrição nos genes. Além disso, clones positivos são mais difíceis de serem obtidos devido à baixa eficiência no processo de digestão dos vetores ou do DNA a ser inserido e a adaptabilidade para a transferência dos genes entre diferentes vetores é baixa.

O sistema Gateway[®] foi escolhido para este trabalho devido a sua simplicidade, pois não necessita de enzimas de restrição. Além disso, ele consiste em uma metodologia rápida,

com alta eficiência e grande versatibilidade, o que a torna uma ferramenta bastante útil e vantajosa para experimentos de caracterização de proteínas de função desconhecida, onde se enquadra este trabalho. Adicionalmente, vários projetos que envolvem a clonagem de grandes quantidades de genes, por exemplo, o ORFeoma de vários organismos, fazem o uso desse sistema, confirmando sua aplicabilidade em estudos em grande escala (REBOUL *et al.*, 2003; DRICOT *et al.*, 2004; MATSUYAMA *et al.*, 2006; HU *et al.*, 2007; LAMESCH *et al.*, 2007; BRANDNER *et al.*, 2008). Esse foi mais um motivo pelo qual optamos por esta plataforma de clonagem, já que neste presente estudo visou-se a caracterização de diversas proteínas.

2. JUSTIFICATIVA

O *T. cruzi* é o protozoário causador da doença de Chagas, a qual afeta milhões de indivíduos em vários países, principalmente na América Latina. Apesar de diversos estudos terem sido aplicados a este microrganismo, ainda não se possui vacinas ou medicamentos que sejam efetivos contra a patologia.

O parasita também é considerado um importante modelo de estudo, pois divergiu cedo dos demais eucariotos na escala evolutiva. Assim, ele possui diversas características peculiares que são essenciais para o prosseguimento do seu ciclo vital. Deste modo, torna-se de grande interesse, o entendimento destes mecanismos característicos do protozoário.

Com o sequenciamento do genoma do *T. cruzi* novas sequências de DNA foram descobertas. Isso causou um acúmulo de dados, pois as funções das proteínas codificadas por esses elementos não foram elucidadas seguindo o ritmo imposto pela era genômica. Ainda com o sequenciamento, descobriu-se que grande parte do genoma do *T. cruzi*, aproximadamente 55%, codifica para proteínas hipotéticas.

Portanto, o estudo das proteínas hipotéticas é essencial para a obtenção de informações a respeito de suas funções, não apenas pela sua importância biológica, mas pelo fato de serem possíveis alvos para drogas antiparasitárias.

Por esses motivos, o presente trabalho visa a caracterização de genes que codificam proteínas hipotéticas do *T. cruzi* e cujas expressões são moduladas durante a metacicloênese.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO PRINCIPAL

Caracterizar um grupo de genes codificadores de proteínas hipotéticas, diferencialmente expressos no *T. cruzi* durante a metaciclogênese.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar, a partir dos dados de microarranjo, genes codificadores de proteínas hipotéticas que são modulados durante o processo de metaciclogênese do *T. cruzi*;
- Clonar os genes selecionados utilizando a plataforma Gateway[®];
- Expressar esses genes em *E. coli* utilizando os vetores de expressão regulada do sistema acima citado;
- Gerar anticorpos específicos contra as proteínas recombinantes através da inoculação destas em camundongos;
- Obter dados da expressão protéica por *western blot* para comparação com dados obtidos através do microarranjo;
- Realizar experimentos de imunolocalização em *T. cruzi*;
- Localizar as proteínas de interesse em *T. cruzi* por meio da fusão destas com GFP para confirmação dos resultados gerados a partir da técnica de imunolocalização.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. SOLUÇÕES E TAMPÕES

- **AP Buffer (tampão para fosfatase alcalina):** Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM.
- **Brometo de etídio:** solução 2,5 µg/ml.
- **PBS (solução salina tamponada com fosfato) 1x:** KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 1,5 mM; Na₂HPO₄·7H₂O 4,3 mM; NaCl 137 mM.
- **PSG:** Na₂HPO₄ anidro 47,47 mM; Na₂HPO₄·H₂O 2,5 mM; NaCl 36,76 mM; glicose 55,5 mM.
- **Solução de acrilamida/bis-acrilamida (33/0,9%):** 33 g de acrilamida; 0,9 g de bis-acrilamida; H₂O q.s.p 100 ml.
- **Solução de bloqueio para Western blot:** TBS 1x; tween 20 0,1%; leite desnatado 5%.
- **Solução de coloração para SDS-PAGE:** azul de Coomassie R-250 0,1%; metanol 4,5%; ácido acético 10%; H₂O q.s.p 100 ml.
- **Solução de descoloração para SDS-PAGE:** metanol 30%; ácido acético 10%; H₂O q.s.p 100 ml.
- **Solução de lavagem para Western blot:** TBS 1x; tween 20 0,1%.
- **Solução de Ponceau:** Ponceau S 0,5% em ácido acético 1%.
- **Tampão 2 M de uréia:** NaH₂PO₄ 100 mM; Tris-base 10 mM; 2 M uréia; 500 mM NaCl; triton X-100 2%.
- **Tampão 8 M de uréia:** NaH₂PO₄ 100 mM; Tris-base 10 mM; 8 M uréia.
- **Tampão de amostra para eletroforese de DNA 6x:** azul de bromofenol 0,25%; xileno cianol 0,25%; glicerol em H₂O 30%.
- **Tampão de amostra para SDS-PAGE 4x:** Tris-HCl 160 mM pH 6,8; SDS 4%; β-mercaptoetanol 10%; glicerol 24%; azul de bromofenol 0,02%.
- **Tampão de eletroporação:** NaCl 140 mM; HEPES (ácido) 25 mM e Na₂HPO₄ 0,74 mM pH 7,5.
- **Tampão de lise celular para toothpick:** glicerol 5%; SDS 0,5%; EDTA 5 mM; NaOH 50 mM; azul de bromofenol.
- **Tampão de sonicação:** NaCl 500 mM; triton X-100 2%; Tris-HCl 2,5 M pH 8,0 20 mM.
- **Tampão para SDS-PAGE:** Tris-base 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1%.

- **Tampão de transferência para Western blot 1x:** Tris-base 25 mM; glicina 192 mM; metanol 20%.
- **TBE 1x:** Tris-base 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM.
- **TBS 1x:** Tris-HCl pH8,0 20 mM; NaCl 150 mM.
- **TE:** Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0.

4.2. PROCEDÊNCIA DOS REAGENTES

- **Amersham-Pharmacia Biotech:** anticorpo policlonal anti-GST; dNTPs; membrana de nitrocelulose *Hybond*; *ECL Western blotting detection reagents and analysis system*; resina glutationa sefarose; *high-performance chemiluminescence film*; pGEX-4T-1.
 - **Becton Dickinson:** extrato de levedura.
 - **BioRad:** azul de bromofenol; xilenocianol.
 - **Cult-lab:** soro fetal bovino.
 - **Difco:** infuso de fígado; triptose.
 - **Fermentas:** *Page Ruler Unstained Protein Ladder*.
 - **Fisher Scientific:** meio de cultura *Luria Bertani*.
 - **Fort Dodge:** cetamina; xilazina.
 - **Invitrogen:** *1 Kb Plus DNA Ladder*; acrilamida; Alexa Fluor 488 anti-camundongo 2 mg/ml; anticorpo monoclonal IgG anti-histidina; *BenchMark Protein Ladder*; bis-acrilamida; EDTA; BP Clonase II *enzyme mix*; IPTG; LR Clonase II *enzyme mix*; glicerol; pDESTTM17; pDONRTM221; *Platinum Taq High Fidelity*, proteinase K; *Quant-iT Protein Assay Kit*; solução 30% PEG 8000/30 mM MgCl₂; *Taq DNA Polimerase*.
 - **Merck:** acetato de sódio; ácido acético; ácido bórico; ácido clorídrico; cloreto de cálcio; cloreto de magnésio; cloreto de potássio; cloreto de sódio; etanol absoluto; fosfato de potássio monobásico; fosfato dibásico de sódio; glicose; hidróxido de sódio; SDS.
 - **Microbiológica:** hemina.
 - **Molecular Probes:** anticorpo monoclonal anti-GFP mAB 3E6 1 mg/ml.
 - **New England Biolabs:** endonucleases de restrição *BamHI* e *EcoRI*; *NEBuffers*; BSA.
 - **Polysciences:** tween 20.
 - **Promega:** anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina; BCIP (*Bromo-Chloro-Indolyl Phosphate*); *Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)*; NBT (*NitroBlue Tetrazolium*).
 - **Qiagen:** *QIAprep Spin Miniprep Kit*; *HiSpeed Plasmid Midi Kit*.

- **SERVA Electrophoresis:** Alu-Gel-S
- **Sigma-Aldrich:** ácido L-aspártico; ácido L-glutâmico; adjuvante completo de Freund; agarose; ampicilina; anticorpo anti-IgG de cabra conjugado à fosfatase alcalina; azul de Coomassie R-250; β -mercaptoetanol; brometo de etídeo; BSA; canamicina; cloranfenicol; DEAE-celulose; G418; HEPES; L-prolina; membrana de diálise; paraformaldeído; Ponceau S; TEMED.
- **Stratagene:** *PfuUltra high-fidelity DNA polymerase*; *PfuUltra HF Reaction Buffer*.
- **Vetec:** glicina; metanol.
- **United States Biochemical Corporation:** glutationa.
- **USB:** T4 DNA ligase; persulfato de amônio; Tris-base; uréia.

4.3. EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS UTILIZADOS

- **Accujet:** pipeta de dispensação.
- **Amersham-Pharmacia Biotech:** fonte de eletroforese EPS 301; espectrofotômetro GeneQuant *pro*.
- **Applied Biosystems:** Gene Amp PCR System 9700; analisador genético ABI Prism 3100.
- **Axygen:** ponteiras 1-10 μ l, 2-200 μ l, 200-1000 μ l; tubos de 0,2 e 1,5 ml.
- **Becton Dickinson:** agulha descartável 0,45 x 13; citômetro de fluxo FACSCalibur; tubos de centrífuga de 50ml.
- **BioAgency:** cubetas de eletroporação.
- **BioRad:** eletroporador Gene Pulser II.
- **Biocycler:** Peltier Thermal Cycler MJ96G.
- **Casplast:** capela de exaustão de gases / CPE.
- **Cole-Parmer:** ultrasonic homogenizer 4710.
- **Corning Incorporated:** erlenmeyer 500 ml e 1000ml.
- **ELGA:** sistema de ultrapurificação de água modelo MLB 186487.
- **Eppendorf:** centrífugas modelos 5415 D, 5417 R, 5418, 5424, MiniSpin plus; pipeta de dispensação Easypet; Thermomixer Comfort; termociclador *Mastercycler*.
- **Fanem:** banho-maria modelos 102R e 100; estufa incubadora para B.O.D. modelo 347.
- **Gilson:** micropipetas pipetman P2, P10, P200 e P1000.
- **Hettich:** centrífuga MIKRO 120.

- **Hoefler Scientific Instruments:** sistema para eletroforese vertical *mighty small II SE 250*; sistema para eletroforese horizontal *mini horizontal submarine unit*; sistema para transferência de proteínas gel-membrana *mighty small transphor TE 22*.

- **Invitrogen:** plataforma de quantificação *Qubit*.
- **Lab-Line:** Orbit Environ Shaker modelo 3527.
- **National Labnet:** *vortex* mixer S 1000.
- **New Brunswick Scientific:** agitador orbital; incubador agitador Innova 4080.
- **Nikon:** microscópios Eclipse TS 100, Eclipse E 400 e Eclipse E 600.
- **Ohaus Corporation:** balança modelo NOB110.
- **Omniphor:** cuba de eletroforese vertical (gel preparativo).
- **Orion:** pHmetro modelo 520A.
- **Pharmacia LKB:** espectrofotômetro Ultrospec II.
- **Precision Scientific:** estufa modelo 3EG.
- **Roper Scientific Photometrics:** câmera CCD *CoolSNAP-Pro cf Color*.
- **Sarstedt:** pipetas Pasteur.
- **Schott Duran:** erlenmeyer 250 ml.
- **Scie-Plas:** sistema para eletroforese horizontal modelos HU 6, HU 10 e HU 13.
- **Sorvall:** centrífuga refrigerada modelo RC 5B *Plus*.
- **Thermo Scientific:** espectrofotômetro NanoDrop ND-1000.
- **TPP:** frascos de 25 cm² para cultura celular, tubos de centrífuga de 15 ml.
- **UVP:** UV *White Darkroom*.
- **Veco:** fluxo laminar VLFS 12 classe 2.

4.4. COMPOSIÇÃO DOS GÉIS DE POLIACRILAMIDA

- **Gel 10 %:** acrilamida (33/0,9%) 2,95 ml; H₂O 5,5 ml, Tris-HCl 2,5 M pH 8,0 1,6 ml; SDS 100 µl; persulfato de amônio 70 µl; TEMED 7 µl.

- **Gel 13 %:** acrilamida (33/0,9%) 3,8 ml; H₂O 4,6 ml; Tris-HCl 2,5 M pH 8,0 1,6 ml; SDS 100 µl; persulfato de amônio 70 µl; TEMED 7 µl.

- **Gel de empilhamento (*stacking*):** acrilamida (33/0,9%) 0,7 ml; H₂O 3,7 ml; Tris-HCl 1 M pH 6,8 0,6 ml; SDS 50 µl; persulfato de amônio 35 µl; TEMED 7 µl.

4.5. MEIOS DE CULTURA

- **Meio LB (*Luria Bertani*):** triptona 10 g/l; extrato de levedura 5 g/l; NaCl 5 g/l.
- **Meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) acrescido de penicilina:** extrato de levedura 15 g/l; fosfato dibásico de sódio 11,56 g/l; glicose 2,2 g/l; hemina 0,02 g/l; infuso de fígado 5 g/l; KCl 0,4 g/l; NaCl 4,4 g/l; soro fetal bovino 10 % (v/v); triptose 5 g/l; penicilina 63 mg/l. pH 7,2 ajustado com HCl.
- **Meio TAU (*Triatomine Artificial Urine*):** CaCl₂ 2 mM; KCl 17 mM; MgCl₂ 2 mM; NaCl 190 mM; tampão fosfato 8 mM pH 6,0.
- **Meio TAU3AAG:** TAU suplementado com ácido L-aspártico 2 mM; ácido L-glutâmico 50 mM; L-prolina 10 mM e glicose 10 mM.

4.6. ORGANISMOS

- *Trypanosoma cruzi* clone Dm28c (GOLDENBERG *et al.*, 1985; CONTRERAS *et al.*, 1988), em diferentes estágios envolvidos no processo de metacicloênese *in vitro* (CONTRERAS *et al.*, 1985b).
- *Escherichia coli* cepa DH5 α (F⁻, *recA1*, *endA1*, *hsdR17* (rk⁻, mk⁺), *supE44*, λ ⁻, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*, Φ 80*dlacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169) para transformação e seleção de clones positivos.
- *Escherichia coli* cepa BL21(DE3)pLysS (F⁻, *ompT*, *hsdS_B* (r_B⁻, m_B⁻), *dcm*, *gal*, λ (DE3), pLysS, Cm^r) para expressão da proteína recombinante.
- *Escherichia coli* cepa XL1-Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* (F' proAB lacIqZ Δ M15 Tn10 (Tetr))) para expressão da proteína recombinante solúvel.

4.7. METACICLOGÊNESE IN VITRO

O experimento de metacicloênese foi realizado *in vitro* utilizando meios quimicamente definidos com base em CONTRERAS *et al.* (1985b). Parasitas em diferentes fases (tempos) da diferenciação foram usados para o preparo de extratos protéicos, os quais serviram posteriormente para ensaios de *Western blot*.

4.7.1. Epimastigotas em fase exponencial de crescimento

Culturas do *T. cruzi* foram crescidas em meio LIT a 28°C, mediante inóculo de 1×10^6 células/ml. No terceiro dia dessa cultura, quando a densidade celular era de aproximadamente 2 a 3×10^7 células/ml, ou seja, quando os parasitas encontravam-se em fase logarítmica de crescimento, estes foram lisados para a obtenção do extrato protéico, seguindo o protocolo descrito no item 4.7.5.

Do mesmo modo, após cinco dias de cultura (aproximadamente 6×10^7 células/ml) sob as mesmas condições anteriores, já em final de fase logarítmica de crescimento, foi obtido o extrato protéico das formas epimastigotas 5 dias.

4.7.2. Epimastigotas em estresse nutricional

Após os cinco dias em cultura no meio LIT a 28°C, os parasitas foram coletados por centrifugação e ressuspensos em meio TAU na concentração de 5×10^8 células/ml, onde permaneceram por 2 horas na mesma temperatura (nesta condição, as células sofrem o estresse provocado pelo seu acondicionamento em um meio pobre em nutrientes).

4.7.3. Epimastigotas em diferenciação, aderidos ao substrato

Após o estresse nutricional em meio TAU, os parasitas foram incubados em meio TAU3AAG na concentração de 5×10^8 células/ml, a 28°C, durante 96 horas (neste meio, durante esse período, os parasitas se aderiram à superfície das garrafas de cultivo). Depois do sobrenadante ser descartado, foi adicionado 10 ml de PBS 1x em cada garrafa. As células aderidas à garrafa foram liberadas por meio de forte agitação. Foram coletadas amostras após 3, 6, 12, 18 e 24 horas de incubação neste meio.

4.7.4. Tripomastigotas metacíclicos

Ao final das 96 horas em permanência no meio TAU3AAG, em torno de 90% das formas epimastigotas se transformaram em tripomastigotas metacíclicos, os quais são visualizados no sobrenadante da cultura (BONALDO *et al.*, 1988). Assim, através de cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE celulose equilibrada em PSG, os metacíclicos foram purificados da cultura (SOUSA, 1983).

4.7.5. Obtenção dos extratos protéicos

Para a obtenção dos extratos protéicos nos diferentes estágios da metaciclologênese, os parasitas foram coletados por centrifugação a 7.000 x g por 5 minutos e lavados duas vezes com PBS 1x, para então, serem aliquotados em tubos de 1,5 ml, de modo que cada um contivesse 2×10^8 células. Após a centrifugação sob as mesmas condições anteriores, o sedimento celular foi ressuspenso em 75 µl de PBS 1x, ao qual foi adicionado 25 µl de tampão de amostra 4x. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 99°C por 10 minutos, incubadas no gelo por 2 minutos e submetidas à centrifugação na velocidade máxima (16.000 x g) por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e armazenados em nitrogênio líquido.

4.8. SELEÇÃO DOS GENES

Para o presente estudo foram selecionados genes com expressão modulada durante o processo de diferenciação, encontrados em ensaios prévios utilizando a técnica de microarranjo, no qual foram avaliados níveis de mRNA associados a polissomos (PROBST, 2005).

Como pré-requisito para a escolha, os genes deveriam apresentar um aumento de expressão de pelo menos duas vezes durante o processo de metaciclologênese e deveriam codificar proteínas hipotéticas conservadas, com ortólogos em *Leishmania* spp e/ou *T. brucei*, conseqüentemente, gerando uma maior confiabilidade de que estes genes não resultavam de erros de anotação, ou seja, eles realmente existem no genoma e codificam proteínas. Além disso, as proteínas codificadas por esses genes deveriam possuir domínios conhecidos, mas que não fossem transmembrana, para auxiliar na inferência de uma possível função às mesmas.

4.9. AMPLIFICAÇÃO DOS GENES

4.9.1. Em Sistema Gateway®

Os genes foram amplificados por PCR utilizando a enzima de alta fidelidade *Platinum® Taq High Fidelity* para minimizar a taxa de incorporação de nucleotídeos errados na sequência de interesse.

As reações de PCR foram feitas com 20 ng de DNA genômico, 0,2 µM de cada iniciador, 1x tampão da enzima (*High Fidelity PCR Buffer*), MgSO₄ 2 mM, de dNTPs 0,2 mM, 1U da enzima e água para completar 50 µl de volume de reação.

As condições de amplificação foram as seguintes:

- 94°C por 2 minutos;
- 10 ciclos de 94°C (30 segundos), 57°C (30 segundos) e 72°C (2 minutos);
- 25 ciclos de 94°C (30 segundos), 62°C (30 segundos) e 72°C (2 minutos).

Para os genes com tamanho acima de 1.400 pares de bases (pb), o período de extensão foi aumentado para 3 minutos.

Os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes selecionados foram desenhados utilizando o *software Primer Select* (DNASTAR, *Lasergene Inc.*). Os iniciadores foram desenhados baseados na sequência nucleotídica dos genes encontrados na cepa CL Brener do *T. cruzi*, de modo que os anterógrados incluíssem o ATG inicial e os retrógrados excluíssem o códon de parada. Foram incluídos nos oligonucleotídeos, além da sequência específica do gene, os sítios de recombinação para possibilitar a entrada do produto da PCR nos vetores do sistema Gateway[®] (tabela 3.1.).

Tabela 3.1. Iniciadores utilizados na amplificação dos genes para inserção no sistema Gateway[®]

TcExp02G01F	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT CATGTTCAGATCCGCTCCGTGTGAC-3'
TcExp02G01R	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCGACGCAACAGTGGCACCC -3'
TcExp02G02F	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT CATGCGTCTTTTTTACCGGCC-3'
TcExp02G02R	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCGTCGCCCAGTATCCGGT -3'
TcExp02G03F	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT CATGAAGTTCAAGGCCACTGTGCGTG-3'
TcExp02G03R	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTT GCGCCACGGCAGGCAT-3'
TcExp02G04F	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT CATGGACCGTGGCGACTTT-3'
TcExp02G04R	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAAAAAAATCGTCCTCTAAAGGTTTAT -3'
TcExp02G05F	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT CATGGAGTTTCTTGTGCCCAGTG-3'
TcExp02G05R	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCACTTCCAATCCATTTACTTGCTTC -3'
TcExp02G06F	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT CATGAATTTGGGAGTGGATGCTCG-3'
TcExp02G06R	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCA CGCGGACTCCACATCGCT-3'
TcExp02G07F	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT CATGCAGCGTGGGAGCCG-3'
TcExp02G07R	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCT CGCCAATTCGGTGGATT-3'
TcExp02G08F	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT CATGGAGGAGCTGCAATGCA-3'
TcExp02G08R	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCC CCACGTGTAGAATTCGACGT-3'
TcExp02G09F	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT CATGATGTCTGGTGGCATGCAACAAC-3'
TcExp02G09R	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCT CGCCGTGAGTTGTGACGGG-3'
TcExp02G10F	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT CATGCGTCTTGGGAGGATATTGC-3'
TcExp02G10R	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCT TTTTCTCCCTGTTTCCCATC-3'

Primers forward (F) e *reverse* (R) dos dez genes. A sequência destacada em negrito indica os sítios de recombinação necessários para a inserção dos produtos de PCR na plataforma Gateway[®]. A região sem destaque mostra a sequência específica de cada gene.

4.9.2. No vetor pGEX-4T-1

Os iniciadores usados para a clonagem dos genes TcExp02G01, TcExp02G02 e TcExp02G04 no vetor pGEX-4T-1 foram desenhados no mesmo *software* acima citado. No entanto, ao invés de adicionar os sítios de recombinação para esta plataforma, foi usada a metodologia clássica de clonagem, com o uso de enzimas de restrição. Com isso, para a amplificação dos genes TcExp02G01 e TcExp02G04, sítios para a enzima *EcoRI* foram adicionados aos iniciadores (tabela 3.2). No desenho dos *primers* para a clonagem do gene TcExp02G02, o sítio de restrição utilizado foi da enzima *BamHI* (tabela 3.2).

Tabela 3.2. Primers usados para amplificar os genes para clonagem em pGEX-4T-1

G01EXF	5'-CCGGGAATTCATGTCAGATCCGCTCCGTGTG-3'
G01EXREV	5'-GGGGGAATTCACGACGCAACAGTGGCAC-3'
G02EXF	5'-GAAGGGATCCATGCGTCTTTTTTACCGGCCGCTTTTG-3'
G02EXREV	5'-GAAAGGATCCCTACGTCGCCAGTATCCGGTCTTCTTT-3'
G04EXF	5'-GTTGGAATTCATGGACCGTGGCGACTTTGAATTTTC-3'
G04EXREV	5'-GGCGGAATTCATAAAAAAAAAATCGTCCTCTAAAGGTTTATTAAGTTCCA-3'

Primers forward (EXF) e *reverse* (REV) utilizados para clonagem em pGEX-4T-1 dos genes TcExp02G01 (G01), TcExp02G02 (G02) e TcExp02G04 (G04). As sequências destacadas em negrito indicam os sítios de reconhecimento da enzima de restrição *EcoRI* (GAATTC) e *BamHI* (GGATCC). A região sem destaque mostra a sequência específica de cada gene.

A PCR dos genes TcExp02G01 e TcExp02G04 visando a clonagem no vetor pGEX-4T-1 foi feita utilizando 25 ng de DNA genômico, 0,2 µM de cada iniciador, 1x tampão da enzima (*PfuUltra HF Reaction Buffer* que contém Mg²⁺), dNTPs 0,25 mM, 1,25 U da enzima *PfuUltra high-fidelity DNA polymerase* e água para completar 50 µl de volume de reação. O programa usado foi:

- 94°C por 5 minutos;
- 35 ciclos de 94°C (45 segundos), 52°C (30 segundos) e 72°C (1 minuto);
- 72°C por 10 minutos.

Para o gene TcExp02G02 (clonagem em pGEX-4T-1), a PCR foi realizada com 100 ng de DNA genômico, 0,6 µM de cada iniciador, 1x tampão da enzima (*PfuUltra HF Reaction Buffer* que contém Mg²⁺), dNTPs 0,25 mM, 2,5 U da enzima *PfuUltra high-fidelity DNA polymerase* e água para completar 15 µl de volume de reação. O programa usado para a amplificação foi:

- 95°C por 2 minutos;
- 30 ciclos de 95°C (30 segundos), 58°C (30 segundos) e 72°C (2 minutos);
- 72°C por 10 minutos.

4.10. PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

4.10.1. Para clonagem em Sistema Gateway®

Após a etapa de amplificação dos genes, os produtos gerados foram submetidos a um processo de purificação utilizando uma solução de polietilenoglicol (30% PEG 8000, 30 mM MgCl₂) para a retirada de iniciadores e pequenos fragmentos de DNA sintetizados menores que 300 pb, provenientes da reação de PCR. Para isso, os produtos de PCR foram diluídos quatro vezes com TE, foi acrescentado 1/2 volume com solução de polietilenoglicol e homogeneizado. Posteriormente, procedeu-se a centrifugação por 15 minutos a 16.000 x g. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensado em 10 µl de TE. Depois, as amostras purificadas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose e foram quantificadas em espectrofotômetro.

4.10.2. Para clonagem em pGEX-4T-1

Para a clonagem dos genes G01, G02 e G04 em pGEX-4T-1, procedeu-se a purificação dos produtos da PCR por fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), seguido pela precipitação por acetato de sódio. O volume total de PCR foi colocado em um tubo de 1,5 ml. Foi adicionado o mesmo volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e centrifugado 5 minutos a 13.000 x g. O sobrenadante foi retirado, foi adicionado 1/10 do volume recuperado de acetato de sódio 3 M e acrescentou-se 3 volumes de etanol absoluto. O material foi incubado por 15 - 16 horas a -20°C. O DNA foi coletado por centrifugação por 20 minutos a 16.000 x g. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com 500 µl de etanol 70%. O material foi novamente submetido à centrifugação por 5 minutos na mesma velocidade. Essa etapa de lavagem com etanol 70% foi repetida 4 vezes. Depois o precipitado foi incubado a 37°C para secagem e o mesmo foi ressuspensado em 50 µl de água. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro.

4.11. CLONAGEM EM pGEX-4T-1

4.11.1. Digestão dos produtos de PCR G01, G02 e G04 e do vetor pGEX-4T-1

Para as digestões dos produtos de PCR G01 e G04, para posterior clonagem no vetor pGEX-4T-1, foram utilizados 2 µg de DNA, 3 µl de tampão NEB2, 3 µl de BSA 10x, 20 U da enzima *EcoRI* e água, totalizando 30 µl de reação.

Para a clonagem do gene G02 em pGEX-4T-1, a digestão do DNA amplificado G02 foi realizada utilizando 2 µg de DNA, 3 µl de tampão da enzima *BamHI*, 0,3 µl de BSA 10x, 20 U da enzima *BamHI* e água para completar 30 µl de volume de reação.

Na digestão do vetor, para a clonagem dos genes G01 e G04, usou-se 3 µg do plasmídeo pGEX-4T-1, 3 µl de tampão NEB2, 3 µl de BSA 10x, 20 U da enzima *EcoRI* e água, em um total de 30 µl de reação. Para a clonagem do gene G02 no pGEX-4T-1, o mesmo procedimento foi realizado, porém, para este, a digestão foi feita com a enzima *BamHI*.

Estas digestões foram incubadas a 37°C por 15 - 16 horas. Após, procedeu-se a inativação da enzima *EcoRI* por calor, a 65°C por 20 minutos. Para a enzima *BamHI*, a inativação foi realizada com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), conforme descrito no item 4.10.2. As digestões dos plasmídeos e genes foram analisadas por eletroforese em gel de agarose.

4.11.2. Reações de defosforilação dos vetores, ligação dos insertos e transformação

Então, prosseguimos com a reação de defosforilação dos vetores com a fosfatase alcalina (*Shrimp Alkaline phosphatase* - SAP) para evitar a religação do plasmídeo linearizado. Para isso, aos 30 µl de plasmídeo digerido foram adicionados 1 U da enzima SAP, 4 µl do tampão da enzima e 5 µl de água ultrapura. Esta reação foi incubada a 37°C por 15 minutos. A enzima foi inativada a 65°C por 15 minutos.

As ligações foram feitas utilizando 2 µl de inserto, 6 µl de vetor, 1 µl de tampão T4 ligase 10x e 1 U de T4 DNA ligase. Essa reação foi incubada durante 15 - 16 horas a 16°C.

Em seguida foi realizada a transformação de 50 µl de células cálcio-competentes da linhagem *E. coli* DH5α com 10 µl da ligação. Seguindo o protocolo de choque térmico, as células com os plasmídeos foram deixadas no gelo por 30 minutos e, posteriormente, foram incubadas a 42°C por 2 minutos, sendo colocadas novamente no gelo.

Às células transformadas foi adicionado 1 ml de meio LB. As bactérias foram incubadas a 37°C por 1 hora sob agitação de 220 rpm e posteriormente foram semeadas em

meio LB solidificado contendo ampicilina (100 mg/l), onde permaneceram por 12 a 15 horas, a 37°C.

Para verificar a presença dos clones com o inserto de interesse, os mesmos foram selecionados pela técnica de *toothpick*. As colônias de bactérias foram transferidas para tubos de 1,5 ml, onde foram colocados 20 µl de tampão de lise celular. Uma porção destas colônias foi concomitantemente transferida para uma placa-mãe (*master plate*) a fim de ter uma réplica dos clones analisados. Depois, os tubos foram incubados a 65°C por 10 minutos. Estas amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose. Os clones positivos foram usados no preparo de um inóculo para a posterior extração do plasmídeo, que foi feita utilizando o kit comercial *QIAprep Spin Miniprep*.

4.11.3. Teste para expressão solúvel dos genes em pGEX-4T-1

Para os genes G01, G02 e G04 no vetor pGEX-4T-1, a transformação foi realizada em *E. coli* cepa XL1-Blue cálcio competente para o teste de expressão. Para isso, 100 ng dos plasmídeos purificados foram transformados em 50 µl de células por choque térmico, como citado anteriormente. Um ml de meio LB foi adicionado à suspensão bacteriana e a cultura foi mantida por 1 hora a 37°C, sob agitação. Após esse tempo, 5 ml de meio LB com ampicilina (100 mg/l) foram adicionados à cultura, que permaneceu por mais 12 a 15 horas a 37°C, sob agitação (220 rpm) (pré-inóculo). Um ml do pré-inóculo foi diluído em 9 ml de LB seletivo e a cultura foi incubada até a absorvância de 0,6-0,8 a 600 nm. Ao atingir essa densidade, 2 ml da cultura foram retirados para servir como controle não induzido. O restante da cultura foi induzido com IPTG na concentração final de 0,3 mM. Após 3 horas de indução, as bactérias foram coletadas por centrifugação, por 5 minutos, a 4.000 x g à temperatura de 4°C. O meio de cultura foi descartado e o sedimento bacteriano foi lavado duas vezes com solução PBS 1x. As células foram ressuspensas nesta mesma solução e sonicadas 4 vezes (10 segundos cada) na potência 4. O lisado foi centrifugado nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante (fração solúvel) foi coletado e PMSF foi adicionado na concentração final de 1 mM. O sedimento foi ressuspenso em 1 ml de PBS 1x (fração insolúvel). A fração não induzida passou pelos mesmos passos iniciais de lavagem, porém não sofreu sonicação.

Alíquotas das amostras induzidas, solúveis e insolúveis foram analisadas por SDS-PAGE para verificação da expressão das proteínas de interesse. Adicionalmente, ensaios de *western blot* com anticorpos anti-GST, na diluição de 1:1.000, foram feitos para confirmação da expressão protéica. A revelação foi realizada com o anticorpo anti-IgG de cabra conjugado

à fosfatase alcalina (diluído 1:10.000). A metodologia detalhada desta técnica encontra-se no item 4.19.

4.11.4. Purificação da proteína G02 em pGEX-4T-1

Após a expressão da proteína fusionada a GST, foram realizados testes de purificação da mesma por cromatografia de afinidade em resina Glutathiona-Sepharose 4B (*Pharmacia Biotech*). Para estes testes, foram utilizados 10 ml da cultura induzida. Depois da indução da expressão e fracionamento das proteínas, o sobrenadante, correspondente a fração solúvel, foi incubado com 30 µl de resina glutathiona-sepharose, em um tubo de 1,5 ml. Esta resina foi centrifugada a 700 x g por 30 segundos, lavada com 100 µl de PBS 1x e centrifugada nas mesmas condições. O sobrenadante foi retirado e esta etapa foi repetida novamente. Então a fração solúvel do lisado bacteriano foi incubada com a resina, durante 15 horas a 4 °C, sob leve agitação. O material foi centrifugado por 1 minuto a 700 x g. O sobrenadante da mistura foi aliqotado (fração não ligada à resina) e foi realizada uma lavagem da resina com 1 ml de PBS 1x. A resina foi centrifugada e o sobrenadante, aliqotado (lavado). Então, para eluição da proteína recombinante, foi adicionado 100 µl de uma solução de Tris-HCl / glutathiona (30 mg de glutathiona em 10 ml de tris-HCl 50 mM, pH 8,0). Essa solução foi incubada com a resina por 30 minutos, sob agitação. O material foi centrifugado e o sobrenadante foi retirado (eluato). Alíquotas das diferentes etapas do processo foram analisadas por SDS-PAGE.

4.12. CLONAGEM EM VETOR DE ENTRADA DO SISTEMA GATEWAY

Os fragmentos de PCR, depois de purificados e dosados, foram inseridos através de recombinação sítio-específica no vetor de entrada pDONRTM221 da plataforma Gateway[®], de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (*Gateway[®] BP Clonase II Enzyme Mix*). Para a inserção do gene de interesse no vetor de entrada (reação BP), foram colocados 150 ng do produto de PCR juntamente com 150 ng do plasmídeo pDONRTM221, sendo o volume completado para 8 µl com tampão TE. Foram adicionados 2 µl da *BP Clonase II Enzyme Mix* e a reação foi incubada por 12 a 15 horas, a 25°C. Após esta etapa, foram acrescentados 2 µl de proteinase K e a reação foi mantida por 10 minutos a 37°C.

Em seguida foi realizada a transformação de células cálcio-competentes da linhagem *E. coli* DH5α com os clones de entrada. Acrescentou-se 1 µl da reação BP e 50 µl de células cálcio-competentes. O protocolo de transformação foi o mesmo utilizado para o vetor pGEX-

4T-1. As bactérias foram semeadas em LB solidificado contendo canamicina (25 µg/ml), onde permaneceram por 12 a 15 horas, a 37°C.

A presença dos clones com o inserto de interesse também foi verificada por *toothpick*. Adicionalmente, com a finalidade de confirmar a presença do gene de interesse no plasmídeo, uma reação de PCR convencional foi realizada utilizando a enzima Taq DNA polimerase e os oligonucleotídeos específicos do gene. Para essa reação comprobatória, foram utilizados menos ciclos de amplificação e a temperatura de anelamento foi fixada em 55°C. A PCR foi realizada com 0,5 U da enzima, 100 ng do plasmídeo, concentração final de 0,2 µM de cada iniciador, 1x tampão da enzima, dNTPs 0,25 mM, MgCl₂ 1,5 mM e água para completar 25 µl de volume de reação. O programa utilizado foi:

- 94°C por 5 minutos;
- 25 ciclos de 94°C (45 segundos), 55°C (45 segundos) e 72°C (1 minuto);
- 72°C (10 minutos).

O período de extensão foi adaptado de acordo com o tamanho do gene a ser amplificado.

4.13. CLONAGEM EM VETORES DE DESTINO DO SISTEMA GATEWAY

Com os genes de interesse inseridos no pDONRTM221, prosseguiu-se com a reação LR, que consistiu na troca dos insertos entre os vetores de entrada e de destino. No intuito de expressar as proteínas em sistema heterólogo, foi utilizado o vetor de destino pDESTTM17. Já para a expressão em *T. cruzi*, para os ensaios de localização celular da proteína, a reação LR foi realizada entre os vetores pDONRTM221 e pTcPR-GFPN, este último, desenvolvido por nossa equipe com base no sistema Gateway[®] de recombinação (BATISTA, 2008).

De acordo com as orientações do fabricante (*Gateway[®] LR Clonase II Enzyme Mix*), o processo consistiu em acrescentar 150 ng do pDONRTM221 com o inserto desejado e 150 ng do plasmídeo de destino (pDESTTM17 ou pTcPR-GFPN), sendo o volume completado para 8 µl com tampão TE. Adicionou-se 2 µl da *LR Clonase II Enzyme Mix* e a reação foi incubada durante 12 a 15 horas, a 25°C. Em seguida foram acrescentados 2 µl de proteinase K e procedeu-se a incubação por 10 minutos a 37°C para parar a reação.

Novamente, células cálcio-competentes *E. coli* DH5α foram transformadas por choque térmico com 1 µl da reação LR, cultivadas em LB, semeadas agora em meio LB solidificado contendo o antibiótico ampicilina (100 mg/l), e os vetores de destino foram verificados quanto à presença do gene esperado por *toothpick* e PCR, como descrito

anteriormente. Posteriormente a extração do vetor de destino pDESTTM17 com o kit *QIAprep Spin Miniprep*, esses plasmídeos foram sequenciados usando oligonucleotídeos do próprio vetor para conferir se os insertos neles presentes, eram os desejados. Para os genes no vetor de destino foram usados os oligonucleotídeos pDEST17F – 5'-AATACGACTCACTATAGGGAGACC-3' e pDEST17R – 5'-TTCCTTTCGGGCTTTGTTAGCAGCC-3', cujos locais de ancoragem localizam-se, respectivamente, a 94 bases antes e 8 bases após os sítios de recombinação presentes no vetor. Além disso, também foram utilizados os iniciadores para o promotor e terminador T7, respectivamente, 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' e 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'. Para o sequenciamento dos genes em pDONRTM221, usou-se os iniciadores M13F-pUC(-40) – 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3' e M13R-pUC(-40) – 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'.

4.14. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS EM pDESTTM17

As proteínas recombinantes em *E. coli* cepa BL21(DE3)pLysS foram produzidas para a obtenção de anticorpos policlonais em camundongos. Para isso, 50 µl das células cálcio-competentes foram misturadas com 100 ng de plasmídeo pDESTTM17 contendo o inserto desejado. A transformação foi feita do mesmo modo anterior, mantendo as células em gelo por 30 minutos, promovendo o choque térmico a 42°C por 2 minutos e incubando as células por mais 2 minutos no gelo. Feito isso, foi acrescentado 1 ml de LB, com posterior cultivo a 37°C, por 1 hora a 220 rpm. Após este tempo, as células foram usadas para o preparo do pré-inóculo, no qual elas foram cultivadas em meio LB seletivo contendo ampicilina (100 µg/ml) e cloranfenicol (25 µg/ml) em uma diluição de 1/10, deixadas sob 220 rpm de agitação, a 37°C, durante 12 a 15 horas. A partir deste pré-inóculo foi preparado um inóculo, o qual foi crescido nas mesmas condições anteriores até a densidade óptica de 0,8 a 600 nm. Nesse momento foi adicionado IPTG na concentração final de 1 mM para a indução da expressão do gene de interesse. Imediatamente antes dessa etapa, foi retirada uma alíquota para servir como controle não induzido. Tanto o controle como a cultura induzida foram incubados sob agitação a 37°C por 2 horas.

Primeiramente foi realizado um teste de expressão, que consistiu na expressão da proteína desejada em um pequeno volume de cultura, com o intuito de verificar se haveria a expressão. Nesta etapa, foram induzidos 5 ml de cultura (inóculo). As frações protéicas totais

foram comparadas com a fração de proteínas do extrato não induzido e do extrato protéico de *E. coli* BL21(DE3)pLysS sem o plasmídeo, ou seja, não transformado.

Uma vez verificada a expressão da proteína de interesse, procedeu-se a expressão em maior quantidade. Neste caso, foram induzidos 300-500 ml de cultura utilizando o mesmo procedimento usado nos testes de expressão.

4.15. CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS

Após a indução com IPTG, as células foram coletadas por centrifugação a 5.000 x g por 15 minutos, a 4°C (*Sorvall RC 5B Plus*). As culturas não induzida e induzida do teste de expressão foram ressuspensas diretamente em tampão de amostra 4x. Já para a expressão realizada em maior escala, após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensado em tampão de sonicação de modo a concentrar a cultura 30 vezes em relação ao volume inicial. Em seguida, as bactérias foram sonicadas com 4 pulsos de 15 segundos na potência 8, com intervalos de 1 minuto no gelo. Logo após, uma alíquota de 75 µl da fração total de proteínas foi retirada. O restante da cultura sonicada foi centrifugada a 10.000 x g por 15 minutos a 4°C, obtendo-se deste modo, as frações solúvel (sobrenadante) e insolúvel (sedimento) do lisado. Uma alíquota de 75 µl da fração solúvel foi retirada. A fração insolúvel foi lavada com tampão de uréia 2M (mesmo volume utilizado de tampão de sonicação), sonicada e centrifugada nas mesmas condições anteriores, sendo esse procedimento repetido 3 vezes. A cada lavagem, uma alíquota de 75 µl do sobrenadante foi removida. Depois da terceira lavagem, o sedimento foi ressuspensado em tampão de uréia 8M. Novamente, as etapas de sonicação e centrifugação foram executadas, 75 µl do sobrenadante foi alíquotado e o restante do mesmo foi armazenado a -20°C. O sedimento foi descartado. Às alíquotas, foram adicionados 25 µl de tampão de amostra 4x. Antes de serem aplicadas em gel de poliacrilamida, as amostras foram incubadas a 95°C por 5 minutos, colocadas imediatamente no gelo por 2 minutos e agitadas vigorosamente. Os géis foram corados com solução de azul de coomassie e descorados com solução de descoloração.

Ainda com a finalidade de confirmar a expressão da proteína, foram realizados ensaios de *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-poli-histidina diluído 1:3.000 em solução de bloqueio.

4.16. PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS EXPRESSAS PELO SISTEMA GATEWAY

Após a verificação da expressão por SDS-PAGE e *Western blot*, as proteínas foram submetidas ao processo de purificação através de gel preparativo seguido de eletroeluição.

Para o gel preparativo, foi utilizada a mesma receita dos géis de poliacrilamida (vide item 4.4.), porém, em uma escala cinco vezes maior devido ao tamanho do gel. Nele foram aplicados 4 ml da fração onde a proteína de interesse estava presente. Após a eletroforese ter cessado, o gel foi incubado em uma solução de KCl 100 mM gelado por 20 minutos. Na presença de KCl gelado o SDS presente nas amostras (associado às proteínas) precipitou e as bandas das proteínas tornaram-se visíveis, permitindo a excisão da banda desejada do gel.

Em seguida, as proteínas de interesse contidas na banda excisada do gel de poliacrilamida foram submetidas à eletroeluição. O material excisado foi colocado em uma membrana de diálise, a qual foi previamente lavada e fervida três vezes por 5 minutos com água deionizada. Juntamente com a banda, foi adicionado aproximadamente 1 ml de tampão SDS-PAGE. As extremidades da membrana foram lacradas com grampos e a mesma foi submersa em tampão SDS-PAGE dentro de uma cuba eletroforética. Feito isso, a membrana foi submetida a uma tensão de 60V por 1 hora. Após este período, o líquido presente no interior da membrana foi coletado. A pureza da proteína eletroeluída foi confirmada através de gel de poliacrilamida e, uma vez pura, a proteína foi quantificada no aparelho Qubit da Invitrogen, em concordância com as recomendações fornecidas pelo fabricante.

4.17. INOCULAÇÃO EM CAMUNDONGOS

Cada proteína foi inoculada em dois camundongos Swiss, sendo que as inoculações foram feitas com 20 µg de proteína, pela via intraperitoneal, em intervalos de duas semanas. Na primeira inoculação a proteína foi emulsificada com adjuvante completo de Freund e nas subsequentes, as inoculações foram efetuadas com hidróxido de alumínio (Alu-Gel-S). Os camundongos foram sacrificados por punção cardíaca 7 dias após a última inoculação. Eles foram sedados utilizando uma solução anestésica contendo 10 mg/ml de cetamina e 1 mg/ml de xilazina. O sangue retirado foi incubado por 20 minutos a 37°C e em seguida foi centrifugado a 200 x g por 30 minutos. O sobrenadante (antissoro) foi alíquotado e armazenado a -20°C.

4.18. PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS

Os antissoros foram submetidos a um processo de purificação, que consistiu na adição de extrato solúvel de *E. coli* ao soro. Posteriormente, essa solução foi incubada com a respectiva proteína recombinante purificada, imobilizada em membrana de nitrocelulose (previamente bloqueada em solução de bloqueio), por 15 horas a 4°C, sob leve agitação.

Após este período, a membrana foi retirada e lavada 2 vezes com TBS 1x / tween20 0,1% durante 15 minutos. A mesma foi incubada em solução de glicina 200 mM pH 2,5 por 2 minutos, sob agitação. Imediatamente depois, adicionou-se Tris-base 1 M pH 9,5 para neutralizar a solução contendo os anticorpos purificados.

4.19. ENSAIOS DE WESTERN BLOT

Esta técnica foi utilizada para: (a) confirmar a produção da proteína recombinante (utilizando anticorpos monoclonais anti-histidina), (b) para verificar a qualidade dos soros obtidos, ou seja, se os anticorpos produzidos pelos camundongos eram específicos no reconhecimento tanto da proteína recombinante inoculada, quanto da proteína presente no *T. cruzi* e (c) para otimizar a diluição do soro a ser utilizada nos experimentos.

Depois da separação das proteínas por SDS-PAGE, foi feita a transferência das mesmas para uma membrana de nitrocelulose (*Hybond*) a 20V por 12-16 horas (LAEMMLI, 1974). Decorrido este período, a membrana de nitrocelulose foi corada com solução de Ponceau S com o intuito de verificar a qualidade da transferência. Em seguida, ela foi incubada em solução de bloqueio por 1 hora à temperatura ambiente (ou por 12 a 15 horas a 4°C), lavada 3 vezes com 50 ml de solução TBS 1x / tween20 0,1% por 5 minutos sob agitação e posteriormente, foi colocada em tampão TBS 1x / tween20 0,1% contendo os anticorpos em diluição adequada. A membrana permaneceu por 1 hora sob leve agitação nesta solução e depois foi lavada 3 vezes do mesmo modo anterior. Proseguiu-se com a incubação do anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina, na diluição de 1:10.000 em TBS 1x / tween20 0,1%. Após essa incubação, a membrana foi novamente lavada 3 vezes, como descrito anteriormente. Para revelar as reações, foram utilizados 33 µl de BCIP e 66 µl de NBT em 10 ml de tampão para fosfatase alcalina.

Depois da diluição dos soros purificados ser otimizada, também foram realizados ensaios de *Western blot* contendo os extratos protéicos das formas epimastigotas 3 e 5 dias em cultura, formas em diferenciação aderidas 3, 6, 12, 18 e 24 horas, e formas tripomastigotas

metacíclicas. Para os ensaios com os extratos da metaciclogênese, a revelação foi efetuada tanto por fosfatase alcalina como por quimioluminescência, utilizando o produto *ECL Western blotting detection reagents and analysis system*, conforme orientações do fabricante.

4.20. IMUNOLOCALIZAÇÃO

Os experimentos de localização das proteínas de interesse em *T. cruzi* foram realizados utilizando os antissoros purificados. Diversas diluições dos anticorpos, variando de 1:100 a 1:5, foram testadas a fim de obter uma boa intensidade de sinal. Soros obtidos antes das inoculações das proteínas recombinantes (soros pré-ímmunes) foram utilizados como controle.

Para o teste de cada soro, utilizaram-se 1×10^6 parasitas cultivados por 3 dias em meio LIT, que foram coletados por centrifugação a $5.000 \times g$ por 1 minuto e lavados em PBS 1x por 2 vezes. Em seguida, essas células foram ressuspensas em 50 μ l de PBS 1x.

Os ensaios de imunofluorescência foram realizados em lâminas contendo 10 campos delimitados por teflon. As lâminas foram tratadas com poli-L-lisina 0,1% e incubadas a 37°C por 20 minutos. Decorrido este tempo, foram lavadas com água e colocadas para secar na estufa a 37°C. Os parasitas foram depositados sobre os campos das lâminas onde permaneceram por 20 minutos para a adesão. O excesso de células foi retirado com uma lavagem utilizando PBS 1x. As células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS 1x e incubadas com cloreto de amônio 50 mM por 10 minutos. Após lavagem com PBS 1x, os parasitas foram permeabilizados pela adição de triton X-100 0,1% por 3 minutos. As lâminas foram lavadas por imersão com PBS 1x, 3 vezes. Solução de bloqueio (PBS 1x contendo soro de cabra 25%) foi adicionada sob a superfície das lâminas, que foram incubadas por 12 a 15 horas a 4°C em câmara úmida. Em seguida, o excesso da solução de bloqueio foi retirado e o antissoro na diluição desejada (em solução de bloqueio) foi adicionado. A reação com o anticorpo foi realizada durante 1 hora, a 37°C, em câmara úmida. Após esse tempo, a lâmina foi lavada 3 vezes em PBS 1x por imersão, por 5 minutos. O material foi então incubado com anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa 488) na diluição de 1:500 em solução de bloqueio. De modo similar, a incubação com o anticorpo secundário deu-se por 1 hora a 37°C em câmara úmida, protegida da luz. A partir desta etapa, todos os procedimentos subsequentes foram realizados de modo que o experimento fosse protegido da luz. Depois deste período, a lâmina foi lavada 3 vezes em PBS 1x por 5 minutos, por imersão. Foram

adicionados 20 µl de solução de bloqueio contendo DAPI na diluição de 1:1.000 visando a marcação do material genético do núcleo e cinetoplasto. A lâmina foi incubada por 5 minutos a 37°C, em câmara úmida. Prosseguiu-se com a lavagem, como descrito anteriormente. As lâminas foram montadas para imunofluorescência com de N-propil-galacto e lacradas utilizando lamínula e esmalte.

As lâminas já seladas foram observadas no microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse E 600). As imagens foram capturadas usando a câmara *CoolSNAP-Pro cf Color* e analisadas com o programa *Image Pro-Plus v. 4.5.1.22* (Media Cybernetics). As imagens foram trabalhadas controlando o brilho e contraste com a finalidade de ressaltar os resultados para sua exibição.

4.21. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS EM *Trypanosoma cruzi*

Com a finalidade de localizar as proteínas de interesse *in situ* no organismo de estudo através da fluorescência emitida pela etiqueta GFP, foram realizadas as reações de recombinação para transferência dos genes presentes em pDONRTM221 para os vetores de destino pTcPR-GFPN. Os processos de recombinação, transformação dos vetores pTcPR-GFPN contendo os genes-alvo do estudo em *E. coli* DH5a e seleção dos clones positivos foram feitos conforme descrito no ítem 3.12. Deste modo foram obtidos clones que confirmadamente carregavam os insertos desejados. Esses clones foram cultivados em meio LB e, com as culturas resultantes foram realizadas as midipreparações de plasmídeos com o kit *HiSpeed Plasmid Midi Kit*, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

Os vetores purificados foram precipitados com acetato de sódio e etanol e, posteriormente, foram quantificados para serem usados na transfecção do *T. cruzi*.

4.22. TRANSFECCÃO DO *T. cruzi* USANDO OS VETORES pTcPR-GFPN

Na transfecção de cada gene foram utilizados 4×10^7 parasitas. Esses parasitas, após lavados com PBS 1x estéril e centrifugados por 5 minutos a 5.000 x g, foram ressuspensos em 400 µl de tampão de eletroporação e transferidos para cubeta pré-resfriada. Aos parasitas foram adicionadas de 55 a 70 µg do plasmídeo. Para a transfecção foram realizados 2 pulsos de 450V, 500 µF e, imediatamente depois, as cubetas foram novamente incubadas no gelo por 10 minutos. Também foi submetida à eletroporação uma cultura sem a adição dos plasmídeos, a qual foi utilizada como controle. Os parasitas já transfectados foram incubados a 28°C em

10 ml de meio LIT contendo 10.000 UI de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. Vinte quatro horas após a transfecção, o antibiótico G418 (concentração final de 250 µg/ml) foi adicionado às culturas para seleção das células que receberam o vetor pTcPR-GFPN contendo o gene de interesse. Após 72 horas em cultura, a concentração de G418 foi aumentada para 500 µg/ml. A cada 3 a 5 dias eram realizadas a contagem e a passagem das culturas, com a finalidade de manter a densidade celular em torno de 1×10^6 parasitas/ml.

4.23. LOCALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS FLUORESCENTES

Os parasitas transfectados com o vetor pTcPR-GFPN contendo o inserto de interesse foram visualizados no microscópio óptico de fluorescência com a finalidade de verificar em que local da célula a proteína estava presente, através da detecção da fluorescência emitida pelo GFP.

Os ensaios de localização das proteínas fusionadas ao GFP foram realizados em lamínulas, de modo similar à metodologia adotada para a técnica de imunofluorescência, utilizando 1×10^6 parasitas. Os parasitas em fase logarítmica de crescimento foram lavados com PBS 1x e centrifugados nas mesmas condições utilizadas no preparo das lâminas de imunofluorescência. Depois de ressuspensas em PBS 1x, as células foram colocadas sobre as lamínulas tratadas com poli-lisina, onde permaneceram por 5 minutos para a adesão. Em seguida as lamínulas foram lavadas com PBS 1x e incubadas com DAPI (1mg/ml), diluído 1:1.000 em PBS 1x por 5 minutos. Após esse tempo, as lamínulas foram lavadas 3 vezes de 5 minutos com PBS 1x e montadas com N-propil-galacto.

As imagens de fluorescência foram capturadas e analisadas como descrito no item 5.20.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. GENES SELECIONADOS

Os genes escolhidos para esse trabalho foram selecionados a partir dos resultados gerados por microarranjo, obtidos por PROBST (2005). Os genes encontram-se no quadro a seguir (quadro 5.1.), os quais, para facilitar, foram denominados de TcExp02G01 a TcExp02G10 e que, portanto, serão assim chamados deste momento em diante.

Gene – ID	Tamanho do gene (pares de bases)	Massa molecular da proteína (kDa)	Domínios
TcExp02G01 - 5595.t00011	1.443	54,4	Domínio TBC Sítio ativo de aspartil proteases eucarióticas e virais
TcExp02G02 - 6146.t00006	1.983	73,8	Proteína hipotética conservada de ligação à GTP Sítio de ligação a ATP/GTP motivo A (P-loop)
TcExp02G03 - 6487.t00002	915	33,6	Proteína semelhante à Hus1
TcExp02G04 - 6869.t00042	948	35,5	Domínio de ligação a DNA semelhante a Myb
TcExp02G05 - 7189.t00016	1.470	56,5	Domínio PX Provável região RNP-1 eucariótica de ligação a RNA (RRM1)
TcExp02G06 - 7970.t00016	2.448	91,8	Domínio PH
TcExp02G07 - 8015.t00008	1.230	45,1	RNA metiltransferase, família TrmH (Família spoU metilase)
TcExp02G08 - 8257.t00047	2.052	74,7	Família Spc97/Spc98
TcExp02G09 - 8773.t00029	1.824	68,6	Domínio PH Domínio PH
TcExp02G10 - 8824.t00032	1.152	41,8	RNA metiltransferase, família TrmH (Família spoU metilase)

Quadro 5.1. Lista dos dez genes selecionados. Este quadro contém os IDs (número de identificação do gene no banco de dados GeneDB) dos genes eleitos para o trabalho com seus respectivos tamanhos, massa molecular esperada das proteínas expressas e domínios presentes. TBC (*Ter-2/Bub2/Cdc16*); PX (*phox*); PH (*pleckstrin homology*); Myb (derivado de *myeloblastosis*); Spc97/Spc98 e Hus1 são nomes de proteínas. O domínio *Provável região RNP-1 eucariótica de ligação a RNA* pode ser encontrado como domínio *RRM1* e o domínio *RNA metiltransferase, família TrmH* pode ser encontrado com o nome de *Família spoU metilase*.

Estes genes possuem tamanhos que variam de 915 a 2.448 pb, com uma média aproximada de 1.500 pb. Todos codificam proteínas de massa molecular abaixo de 100 kDa, sendo a maioria abaixo de 70 kDa. Há dois pares de proteínas distintas, eleitas para o estudo,

que possuem o mesmo domínio: PH (G06 e G09) e RNA metiltransferase (G07 e G10). As predições dos domínios protéicos foram realizadas através da similaridade com sequências contidas nos bancos de dados públicos PFAM e Interpro.

Os genes são hipotéticos conservados e apresentam um perfil de expressão aumentado nas formas intermediárias da metaciclologênese (PROBST, 2005). Nos experimentos de microarranjo realizados por PROBST (2005), a partir dos quais foram selecionados os genes para o presente trabalho, as sondas utilizadas foram produtos de PCR. As lâminas eram compostas por um total de 6.198 *spots*, dispostos em três réplicas, abrangendo cerca de 4.500 genes do *T. cruzi*. Foram comparados 6 pontos do processo de diferenciação (epimastigotas 3 dias, epimastigotas sob estresse nutricional, formas aderidas por 3, 12 e 24 horas, tripomastigotas metacíclicas), usando-se o RNA total e RNA polissomal extraído dos parasitas. Conforme observado na figura 5.1., os genes selecionados possuem um ápice de expressão nas formas aderidas ao substrato por 3 ou 12 horas e a maioria deles não se mostra aumentada nas formas tripomastigotas metacíclicas.

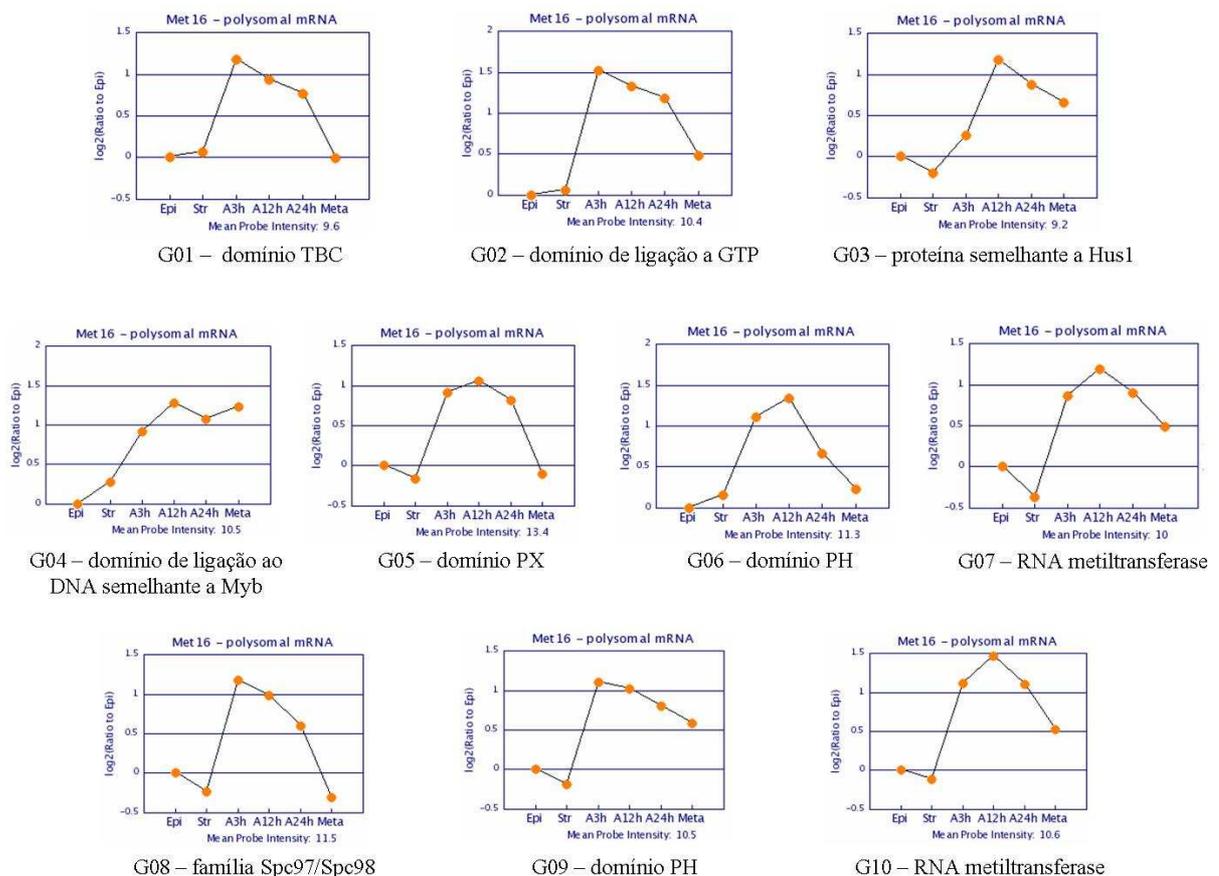


Figura 5.1. Padrão de expressão dos 10 genes selecionados. As formas epimastigotas (epi), estresse (str), aderidas por 3, 12 e 24 horas (A3h, A12h e A24h, respectivamente) e metacíclicas (meta) foram avaliadas pelo microarranjo (PROBST, 2005). A figura mostra os resultados obtidos com a análise do mRNA polissomal dos 10 genes selecionados (G01 a G10). Os gráficos estão em escala logarítmica na base 2 e a expressão dos genes está apresentada em relação aos epimastigotas, aos quais foi atribuído o valor 0 de expressão.

5.2. AMPLIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS GENES

As reações de PCR foram realizadas utilizando o protocolo descrito no item 3.9. Para amplificar os genes de maior tamanho, o período de extensão foi prolongado para 3 minutos. Devido à presença dos sítios de recombinação nos iniciadores, foi possível aumentar a temperatura de anelamento da PCR nos ciclos posteriores, proporcionando uma reação mais estridente. Como resultado desta etapa, todos os dez genes selecionados neste trabalho foram amplificados com sucesso.

Visando retirar fragmentos de DNA como os iniciadores não consumidos durante a reação de PCR, dímeros de *primers* e pequenos *amplicons* originados através de reações inespecíficas, foi realizada a purificação dos produtos amplificados utilizando uma solução contendo PEG e MgCl₂. Foi demonstrado que, dependendo da concentração utilizada de PEG, o limite de exclusão de fragmentos muda, em outras palavras, fragmentos de diferentes tamanhos são removidos da amostra de PCR (HARTLEY & BOWEN, 1996). Purificações que fazem uso de fenol/clorofórmio seguido de precipitação com acetato de sódio e etanol ou isopropanol também não são recomendados, pois estes protocolos normalmente não retiram de modo eficaz dímeros de *primers* maiores que 100 pb (Manual Gateway[®] pDONR[™] Vectors).

Todos os produtos foram adequadamente purificados como pode ser observado na figura 5.2. Após a etapa de purificação, os iniciadores já não podem ser detectados em gel de agarose, comprovando que este método é bastante eficiente. Além disso, ele demonstrou ser um procedimento rápido e relativamente barato.

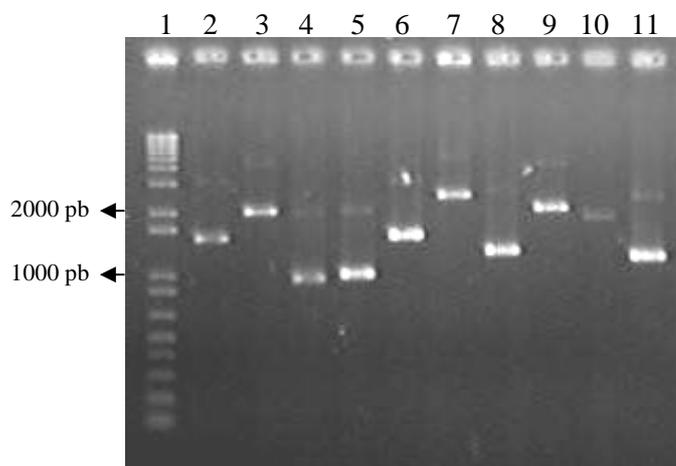


Figura 5.2. Gel de agarose 1% contendo os dez genes amplificados por PCR e purificados por PEG. Canaletas 2 a 11 mostram os genes TcExp02G01 a TcExp02G10. A canaleta 1 contém o marcador de massa molecular *1Kb Plus DNA Ladder*.

5.3. OBTENÇÃO DOS CLONES DE ENTRADA

Com os genes purificados contendo os sítios de recombinação, foi realizada a reação BP que consiste na entrada do produto de PCR no vetor de entrada pDONRTM221 por meio da recombinação entre os sítios homólogos *attB* (presente no produto de PCR) e *attP* (presente no vetor pDONRTM221).

Após a inserção do gene no vetor de entrada, uma fração do DNA recombinado foi transformada em *E. coli* cálcio-competente, as quais foram cultivadas em meio seletivo líquido e após, semeadas. Foi realizado o *toothpick* com alguns clones e procedeu-se a extração dos plasmídeos dos clones positivos. Para verificar se os fragmentos que estavam inseridos no vetor eram os genes de interesse, realizou-se uma reação de PCR convencional com os iniciadores do próprio gene, que por sua vez, confirmou a presença destes.

Nesta etapa foi observado que o tempo de permanência de recombinação influenciava no sucesso e na quantidade de clones resultantes. Recombinações de duração mais prolongada geraram maiores quantidades de clones, os quais, em sua grande maioria, mostraram-se positivos. Além disso, genes menores são recombinados mais facilmente que genes maiores, fato este, corroborado por WIEMANN *et al.* (2004), HU *et al.* (2007) e LAMESCH *et al.* (2007). Diversas publicações, como de LABAER *et al.* (2004) e BECHTEL *et al.* (2007), demonstram que o Gateway[®] é um sistema adequado para ser aplicado em trabalhos de larga escala e que apresenta uma elevada taxa de sucesso de clonagem (mais de 90% nos casos acima citados).

Os clones de entrada portadores dos fragmentos desejados foram facilmente encontrados, exceto para o gene TcExp02G02. Inicialmente, para cada gene foram analisados 5 clones, sendo pelo menos um deles, confirmadamente positivo pelos ensaios de PCR. Para o gene TcExp02G02 foram avaliados 30 clones até um deles mostrar-se positivo. Esta dificuldade em obter o clone não era esperada, uma vez que há genes com tamanhos maiores do que ele neste trabalho e que foram facilmente clonados. Por exemplo, o clone para o gene TcExp02G06. Entretanto, essa etapa foi concluída com êxito. Os dez genes foram corretamente inseridos em pDONRTM221 (figura 5.3.). O perfil de amplificação dos insertos no vetor de entrada está mostrado na figura 5.4.

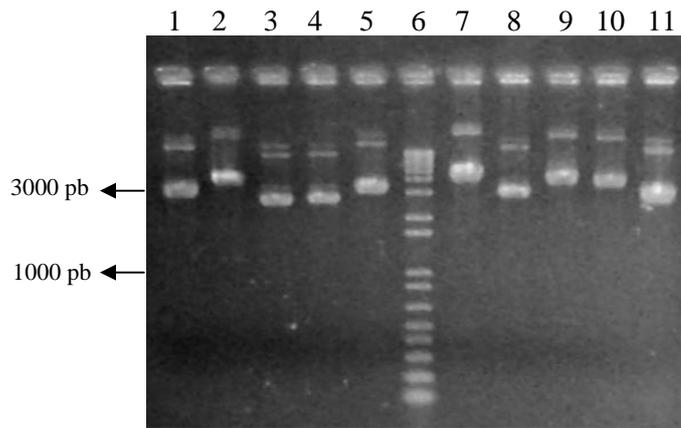


Figura 5.3. Perfil eletroforético dos clones de entrada em gel de agarose 1%. Vetores pDONRTM221 contendo os genes TcExp02G01 (canaleta 1) a TcExp02G10 (canaleta 11). Marcador *1Kb Plus DNA Ladder* está presente na canaleta 6.

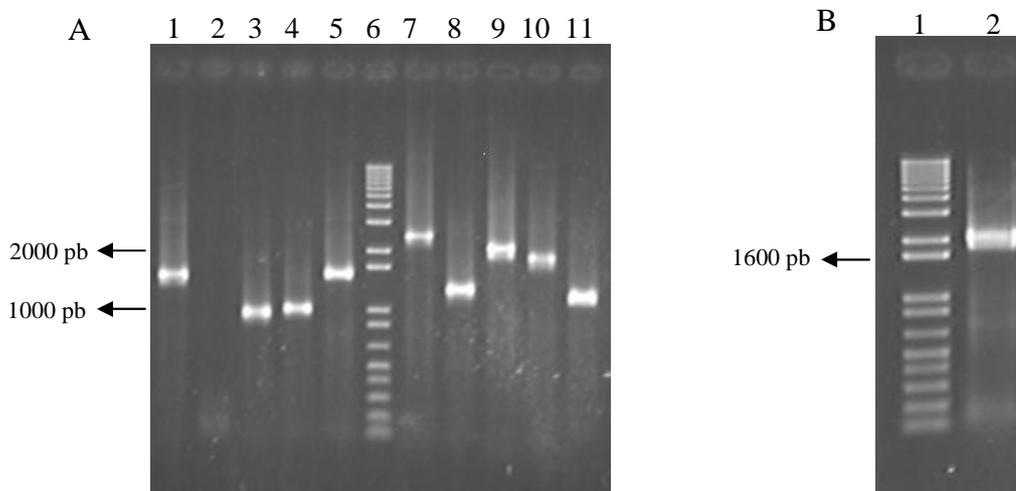


Figura 5.4. Amplificação dos genes de interesse inseridos no vetor de entrada pDONRTM221. (A) Perfil de amplificação dos genes TcExp02G01 (canaleta 1) a TcExp02G10 (canaleta 11) após inserção no vetor de entrada, com o marcador *1Kb Plus DNA Ladder* presente na canaleta 6. Neste gel não é possível verificar o gene TcExp02G02. (B) Na canaleta 2 está apresentada a amplificação do TcExp02G02 no tamanho esperado. Marcador de massa molecular (canaleta 1).

5.4. OBTENÇÃO DOS CLONES DE DESTINO

A transferência do inserto do vetor de entrada pDONRTM221 para o vetor de destino pDESTTM17 foi realizada colocando-se em solução o pDONRTM221 (contendo o inserto de interesse) juntamente com o pDESTTM17, reação esta chamada de LR. Desta maneira ocorre a passagem do gene para o vetor de destino.

Novamente, a transformação das células competentes foi realizada, do mesmo modo descrito anteriormente. Os clones foram cultivados em placa contendo o antibiótico

apropriado e selecionados por *toothpick*. Clones positivos para o inserto foram utilizados para a minipreparação e PCR do plasmídeo.

A figura 5.5 mostra o perfil eletroforético dos vetores de destino pDESTTM17 contendo os seus respectivos genes de interesse. Todas as reações comprobatórias de PCR dos vetores geraram fragmentos no tamanho esperado, conforme observado na figura 5.6.

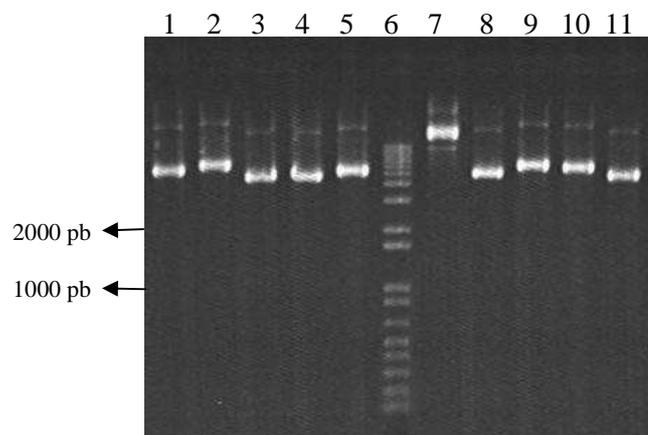


Figura 5.5. Eletroforese dos genes em pDESTTM17 em gel de agarose 1%. Genes TcExp02G01 (canaleta 1) a TcExp02G10 (canaleta 11) inseridos no vetor de destino. Marcador *1Kb Plus DNA Ladder* presente na canaleta 6.

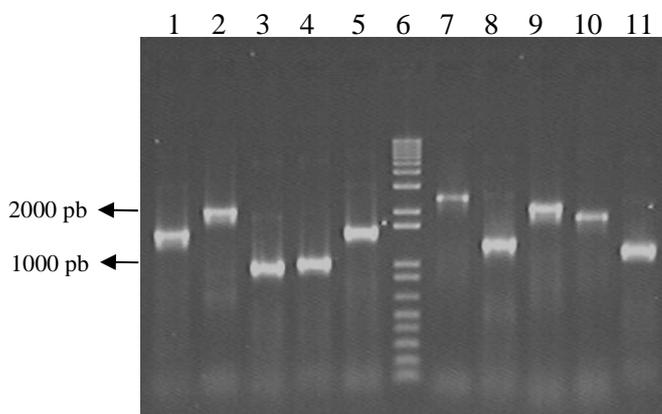


Figura 5.6. Amplificação dos genes de interesse após inserção no vetor de destino pDESTTM17. Genes TcExp02G01 (canaleta 1) a TcExp02G10 (canaleta 11) amplificados a partir dos vetores de destinação pDESTTM17. Marcador *1Kb Plus DNA Ladder* presente na canaleta 6.

5.5. SEQUENCIAMENTO DOS CLONES

Os processos de clonagem dos genes em pDONRTM221 e pDESTTM17 foram concluídos com 100% de sucesso. Os dez genes clonados nos vetores de destinação foram submetidos ao sequenciamento com a finalidade de identificar possíveis erros que possam ter

ocorrido nos passos anteriores, como incorporações ou deleções de nucleotídeos nas sequências de interesse, que por ventura, pudessem acarretar em modificações no quadro de leitura, conseqüentemente gerando códons de parada que levassem ao impedimento da expressão protéica.

Para o sequenciamento dos insertos nos vetores, utilizou-se primeiramente o pDESTTM17. Nestas reações foram usados os *primers* que reconhecem sítios contidos no próprio plasmídeo. Como as reações de sequenciamento no pDESTTM17 não foram bem sucedidas, resolveu-se sequenciar os insertos em pDONRTM221, uma vez que dificilmente erros seriam agregados à sequência durante a reação LR, já que esta é baseada em recombinação sítio-específica e não faz uso de enzimas de restrição. Para isso, fez-se o uso dos iniciadores M13, promotor e terminador.

Seis insertos (G01, G03, G04, G5, G07 e G10), os que possuem menor tamanho, foram sequenciados na sua totalidade. Os demais (G02, G06, G08 e G09) foram sequenciados apenas em suas extremidades devido ao longo comprimento gênico. Para o gene G09, a cobertura gênica foi de 93% da sua sequência, seguido pelos genes G02 (86%), G08 (82%) e G06 (70%). Através da análise dos resultados obtidos, observou-se que os fragmentos clonados compartilham 97-98% de identidade na sua sequência nucleotídica com seus respectivos genes da cepa CL Brener, identificando-os como os insertos desejados. A alteração de algumas bases acarretou mudanças aminoacídicas. Apenas o gene TcExp02G06 apresentou uma deleção na posição nucleotídica 358 que ocasionou uma mudança no quadro de leitura, gerando um códon de parada. Por este motivo, esta proteína não pôde ser expressa. Porém, este erro só foi detectado após as tentativas de expressão e depois dos ensaios de transfecção terem sido realizados.

5.6. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS

Para a expressão das proteínas com a etiqueta de poli-histidina N-terminal, foi usada a linhagem de célula competente *E. coli* BL21(DE3)pLysS. No teste de expressão, as frações protéicas totais foram comparadas com a fração de proteínas totais dos controles não induzidos (bactéria contendo o plasmídeo pDESTTM17 com o gene de interesse, porém não induzida por IPTG) e o extrato protéico total de *E. coli* BL21(DE3)pLysS (sem o plasmídeo). Na figura 5.7, pode-se verificar a expressão teste das dez proteínas recombinantes através da intensidade da banda do gel SDS-PAGE, quando corado com azul de coomassie. Como pode ser observado nos géis, algumas proteínas apresentaram um tamanho acima do previsto

(quadro 5.1) devido à adição da etiqueta N-terminal e pelo fato do gene não possuir o códon de parada, o que ocasionou na expressão de um fragmento inerente ao vetor. Adicionalmente, ensaios de *western blot* foram realizados com anticorpos anti-histidina para confirmação dos resultados de expressão protéica.

Nesse teste, dos dez genes, oito foram expressos com sucesso. Os genes que não expressaram foram: TcExp02G06 (devido ao códon de parada) e TcExp02G09. Para a expressão do gene G09, foram testados diferentes protocolos, cepas de células competentes, temperaturas e tempos de indução. A indução foi testada a 20°C, 25°C, 30°C, 37°C e 40°C. O tempo de indução variou desde 30 minutos até 5 horas e as cepas utilizadas foram BL21(DE3)pLysS, Rosetta e GroESL. Além disso, foi utilizado o protocolo de expressão por estresse pela adição de etanol às culturas, como descrito por THOMAS & BARNEYX (1997). Resumidamente, esta metodologia consiste na adição de 3% (v/v) de etanol na cultura, anteriormente a indução por IPTG, visando aumentar a produção de chaperonas da bactéria. No entanto, nenhuma alternativa foi eficaz para a expressão desta proteína. Portanto, foi dado continuidade ao trabalho com as demais 8 proteínas confirmadamente expressas.

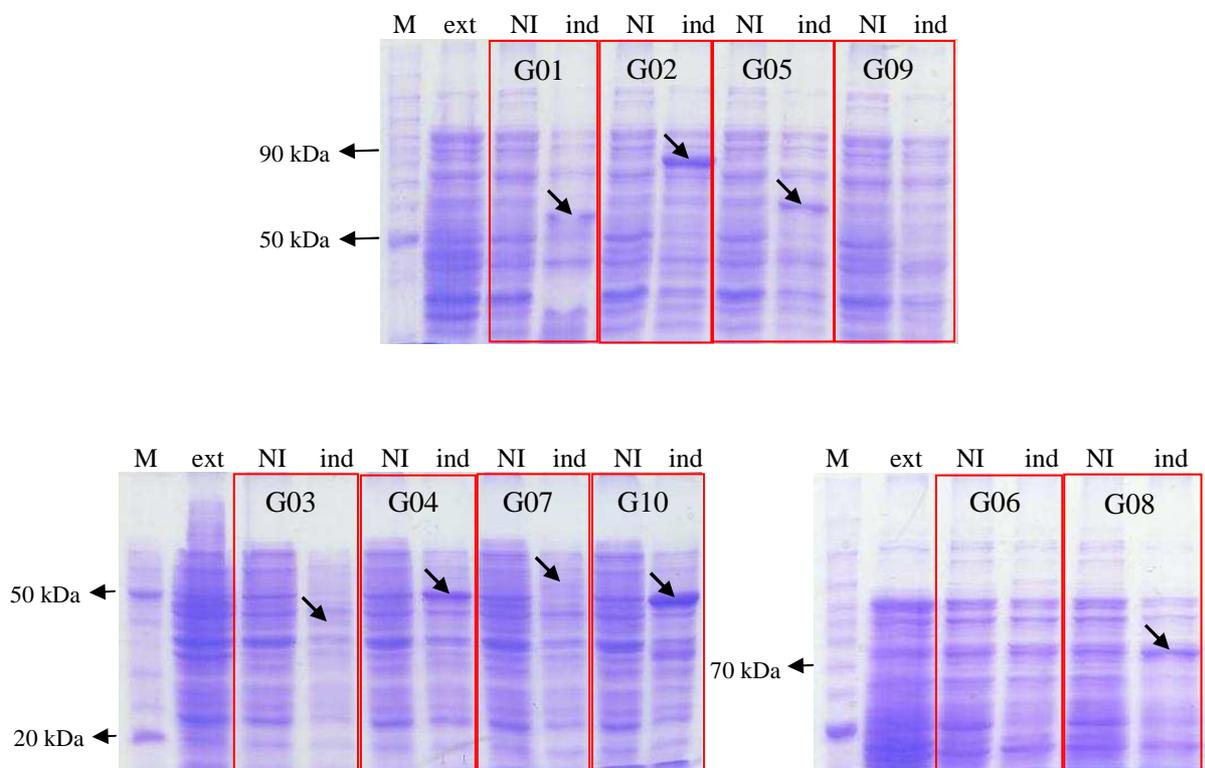


Figura 5.7. SDS-PAGE mostrando os testes de expressão protéica para os 10 genes selecionados. As bandas de expressão das proteínas estão marcadas com uma seta. As proteínas TcExp02G06 e TcExp02G09 não expressaram. M, marcador de massa molecular *BenchMark Protein Ladder*; ext, extrato protéico de *E. coli*; NI, controle não induzido; ind, expressão induzida.

As proteínas recombinantes, cujos testes de expressão deram positivos, foram expressas novamente, porém, em maior volume de cultura (300-500 ml). O protocolo de expressão utilizado nesta etapa foi o mesmo realizado na expressão-teste, no entanto, nesta fase, as proteínas foram analisadas com relação a sua presença no extrato total e nas frações solúvel e/ou insolúvel, sendo que as 8 proteínas recombinantes apresentaram-se na fração insolúvel. Esse não foi um resultado adverso tendo em vista que estas proteínas seriam utilizadas como antígenos para produção de anticorpos.

Sabidamente, altos níveis de expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* levam ao surgimento de agregados dessas proteínas (estruturalmente mal-formadas), referidos como corpúsculos de inclusão. Estes agregados são pouco solúveis em meio aquoso (KOPITO, 2000). Quando recuperados do lisado celular por meio de centrifugação, os corpúsculos de inclusão são co-sedimentados com debris celulares, incluindo uma alta quantidade de componentes da membrana e parede celular das bactérias (RUDOLPH & LILIE, 1996).

Em um primeiro momento, após a expressão das proteínas em grande quantidade, tentamos purificar as proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade em coluna de níquel, através da eluição destas, com soluções de diferentes pH. No entanto, esta metodologia apresentou-se pouco eficaz, pois as proteínas recombinantes não foram eluídas da resina, a qual também permaneceu com diversas proteínas contaminantes. Em alguns casos, uma pequena quantidade de proteína recombinante foi eluída, a qual, em etapas futuras de purificação por SDS-PAGE e eletroeluição, não pôde ser recuperada. Devido a esse obstáculo, como uma alternativa, visando purificar os corpúsculos de inclusão, ou seja, as proteínas de interesse, foram realizadas 3 lavagens da fração insolúvel de expressão com uma solução de uréia 2 M, antes da mesma ser ressuspensa em tampão de uréia 8 M. Ainda é importante salientar que foi adicionado Triton X-100 à solução de uréia 2 M, pelo fato deste detergente desestruturar membrana e auxiliar nesta etapa de purificação da proteína.

As frações protéicas e os sobrenadantes obtidos das lavagens foram aplicadas em um gel de poliacrilamida, o qual está representado na figura 5.8. Neste gel também se observa que as etapas de lavagem foram bem sucedidas, resultando em proteínas recombinantes mais enriquecidas na fração solubilizada em uréia 8 M.

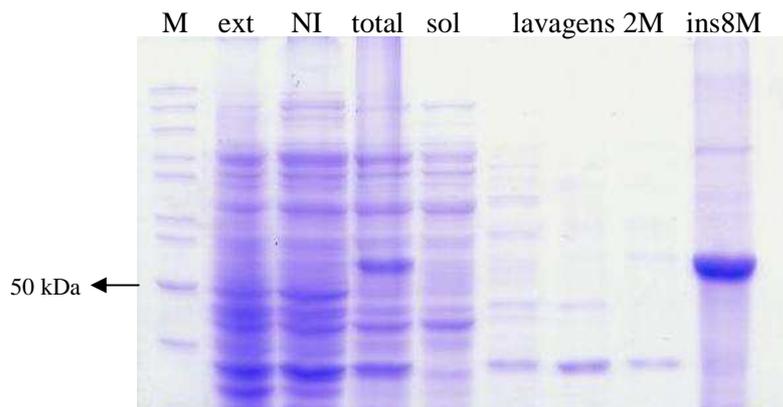


Figura 5.8. Expressão em larga escala do gene TcExp02G01. M, marcador de massa molecular *Page Ruler Unstained Protein Ladder*; ext, extrato protéico total de *E. coli*. Estão indicadas as frações não induzida (NI), total, solúvel (sol) e insolúvel, a qual foi ressuspensa em solução de uréia 8 M (ins8M) após as três lavagens com solução de uréia 2 M (lavagens 2M).

5.7. PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

As oito proteínas recombinantes foram purificadas através de gel preparativo e eletroeluição para posterior inoculação em camundongos da linhagem Swiss. A pureza das proteínas eletroeluídas foi confirmada através de gel de poliacrilamida e *western blot* anti-histidina. Nestes géis as bandas referentes às proteínas recombinantes foram visualizadas. As proteínas eletroeluídas estão expostas na figura 5.9. Com as proteínas purificadas em mãos, elas foram quantificadas no aparelho Qubit conforme orientações do fabricante.

Das oito proteínas passíveis de serem purificadas, todas resultaram em qualidade e quantidade suficientes para o prosseguimento do trabalho. Obteve-se no total, por volta de 1-1,5 mg de cada proteína purificada partindo de 500 ml de cultura induzida, com exceção da proteína TcExp02G07 que resultou em aproximadamente 400 µg de proteína eletroeluída em virtude da sua baixa abundância relativa nos experimentos de expressão.

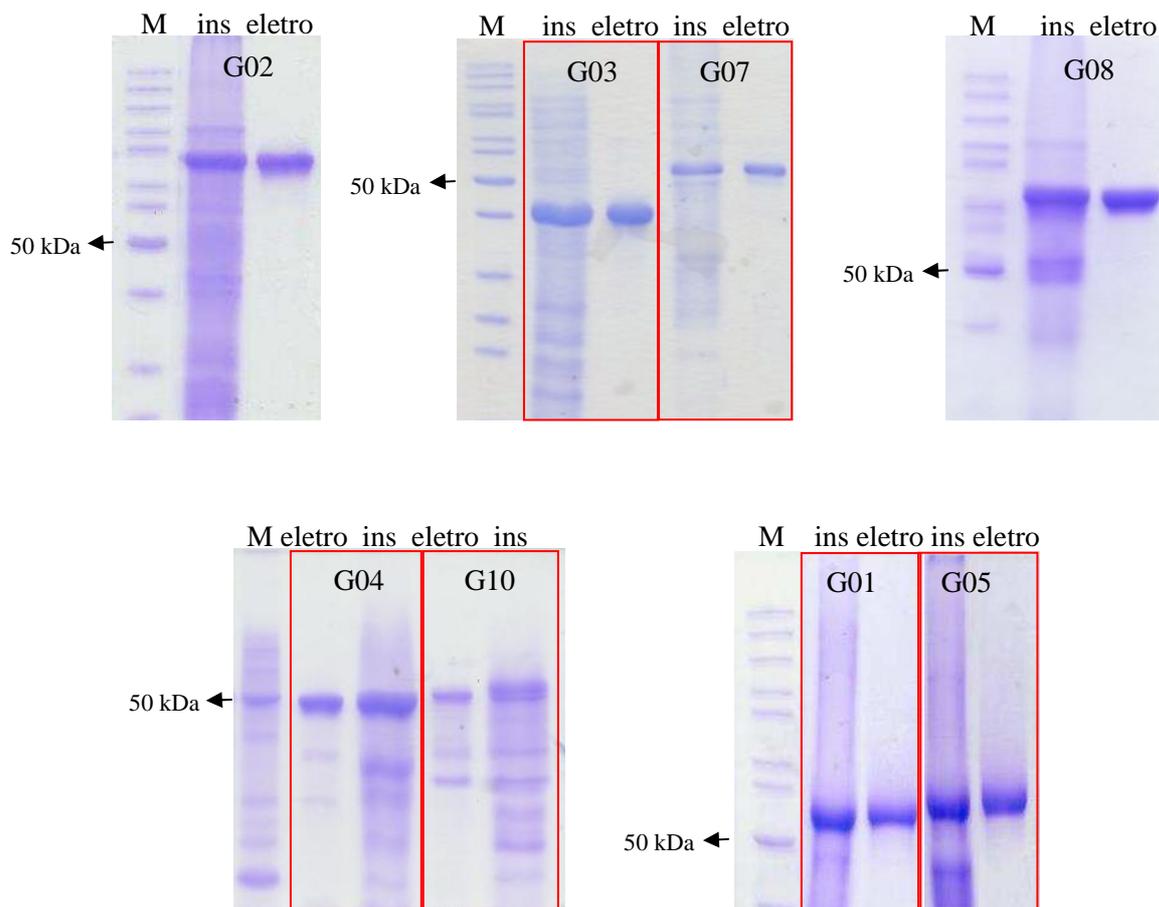


Figura 5.9. SDS-PAGE confirmando a pureza das proteínas eletroeluídas. M, marcador de massa molecular *Page Ruler Unstained Protein Ladder*; Ins, Proteína recombinante solubilizada em uréia 8 M; eletro, proteína recombinante insolúvel purificada por eletroeluição.

5.8. OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS SOROS

Posteriormente à purificação, foram realizadas inoculações em camundongos para a produção de anticorpos policlonais específicos contra as proteínas purificadas. Previamente às inoculações, uma pequena quantidade de soro foi retirada dos animais (pré-imune) com a finalidade de verificar se estes não possuíam anticorpos que reconheciam proteínas do *T. cruzi*. Os soros pré-ímenes dos camundongos foram testados por ensaio de *western blot*, na diluição 1:250 contra o extrato protéico do parasita (referente a 5×10^6 células).

Antes de sacrificar os animais, a partir da terceira inoculação, uma alíquota dos seus soros foi recolhida e utilizada em experimentos de *western blot* contra a respectiva proteína recombinante eletroeluída e o extrato protéico das formas epimastigotas de *T. cruzi*. Nessas reações, a diluição do soro foi fixada em 1:300. O reconhecimento das proteínas recombinantes foi verificado para todos os 16 soros (2 camundongos para cada proteína

inoculada) já no primeiro ensaio realizado. Porém, o reconhecimento das proteínas nativas no extrato de *T. cruzi* não foi satisfatório.

Como não houve o reconhecimento das proteínas desejadas no extrato do parasita, novas inoculações foram feitas até a resposta ser obtida. Todos os camundongos foram sacrificados por punção cardíaca. Entretanto, após sucessivas inoculações o que se observou foi uma resposta arbitrária. Os soros obtidos passaram a reconhecer outras proteínas além daquela de interesse. A partir daí, diversas diluições do soro foram testadas a fim de reduzir o sinal das ligações indesejadas. Como esta experimentação não surtiu efeito, partimos para a purificação dos soros.

Como uma primeira tentativa, o extrato protéico total de *E. coli* foi transferido para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada com os soros, individualmente, a 4°C por 15 horas, repetindo esse procedimento por 3 vezes. Esta metodologia foi utilizada como um teste de purificação apenas para os 2 soros obtidos contra a proteína TcExp02G02 (pois foram os primeiros antissoros obtidos), porém nenhum deles foi purificado apropriadamente. Houve apenas uma redução na intensidade no sinal das bandas indesejadas.

Como alternativa, foi utilizado outro protocolo para a purificação, o qual consistia em incubar o soro com o extrato solúvel de *E. coli* juntamente com a proteína recombinante, esta última, aderida à membrana de nitrocelulose. Deste modo, os anticorpos específicos contra a proteína de interesse ligar-se-iam à membrana e os anticorpos responsáveis pelo reconhecimento das demais proteínas se ligariam ao extrato da bactéria. Com isso, a eluição dos anticorpos específicos contra a proteína recombinante (aderidos na membrana) poderia ser feita com solução à base de glicina ácida.

Utilizando este último procedimento, para o soro contra TcExp02G02 houve o reconhecimento de uma única banda, relativa à proteína de interesse nativa do *T. cruzi* (figura 5.10). Devido ao resultado positivo obtido através desse procedimento, todas as demais purificações dos antissoros foram realizadas seguindo a mesma estratégia. Como desvantagem desta metodologia inclui-se a drástica diminuição na titulação do soro, causada tanto pelo uso da solução de glicina ácida que desnatura os anticorpos, quanto pela diluição resultante do próprio volume de solução utilizada para a eluição dos mesmos.

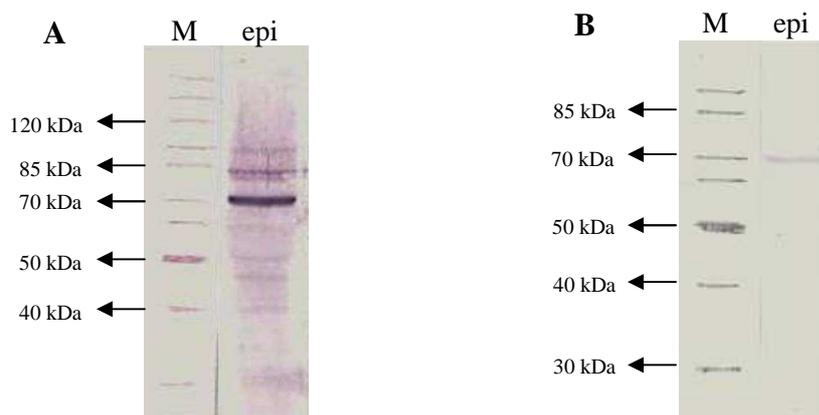


Figura 5.10. Purificação dos anticorpos específicos contra a proteína TcExp02G02. Padrão de proteínas reconhecidas pelo antissoro anti-G02, por *western blot*, nos extratos protéicos de epimastigotas, antes (A) e após (B) o procedimento de purificação dos anticorpos. Em ambos os ensaios foram utilizados extratos protéicos normalizados por quantidade de célula (5×10^6 células). Em A a diluição do anticorpo foi de 1:300 e em B, 1:100. M, marcador de massa molecular; epi, extrato protéico das formas epimastigotas de *T. cruzi*.

Mesmo depois de purificados e após vários testes de diluições, os antissoros gerados contra as demais sete proteínas reconheceram bandas além da de interesse, ou em alguns casos, reconheceram uma única banda, porém, de tamanho diferente do esperado no extrato protéico do *T. cruzi*. Portanto, resolvemos proceder novas inoculações em outros camundongos. Por desconfiar que falhas durante as etapas de purificação das proteínas recombinantes poderiam estar influenciando na qualidade final dos soros, reiniciamos o trabalho desde o processo de expressão e purificação das mesmas.

No total foram 5 camundongos inoculados para cada proteína em 3 diferentes tentativas de produção dos antissoros. Em cada uma delas, novas proteínas recombinantes foram produzidas. Em adição a isto, utilizamos camundongos da linhagem Swiss e Balb/c, de ambos os sexos.

5.9. RECOMBINAÇÃO DOS GENES EM pDESTTM221 PARA O VETOR pTcPR-GFPN

A etapa de recombinação dos 10 genes para o vetor pTcPR-GFPN foi realizada com sucesso. Após a recombinação dos genes para o vetor pTcPR-GFPN, foi feita a transformação em célula competente *E. coli* DH5 α . Os clones semeados em placas contendo ampicilina foram selecionados pelo tamanho dos plasmídeos visualizados em gel de agarose (*toothpick*). Em seguida, com os clones positivos que apresentavam o vetor com o gene de interesse,

realizou-se testes de amplificação deste fragmento por PCR usando iniciadores específicos de cada gene.

Sabendo quais eram os clones confirmadamente positivos, estes foram cultivados em meio líquido para a realização da midipreparação de plasmídeo (figura 5.11). Os vetores foram precipitados e quantificados para serem utilizados na transfecção do *T. cruzi*.

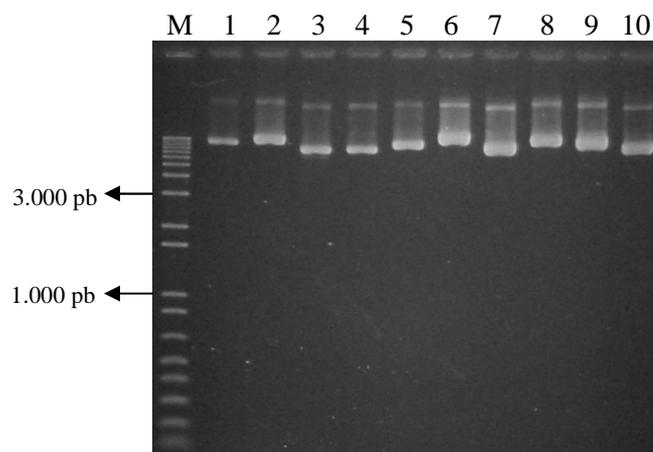


Figura 5.11. Perfil eletroforético dos clones de destino pTcPR-GFPN extraídos por midipreparação. Genes TcExp02G01 (canaleta 1) a TcExp02G10 (canaleta 10) inseridos no vetor pTcPR-GFPN para expressão em *T. cruzi*. M, marcador *1Kb Plus DNA Ladder*.

5.10. TRANSFECCÃO DO *T. cruzi* USANDO OS VETORES pTcPR-GFPN

A transfecção dos parasitas foi realizada para os 10 genes, sendo utilizado 57-70 µg de DNA para cada uma delas (quadro 5.2). Uma cultura, usada como controle, foi submetida ao mesmo procedimento de eletroporação, porém, sem a adição do vetor. Vinte e quatro horas após este procedimento, o antibiótico G418 foi adicionado ao meio de cultura para seleção das células que receberam o vetor pTcPR-GFPN contendo o gene de interesse. A cada 3 a 5 dias era realizada a contagem e a passagem das culturas para um novo meio de cultivo.

Os parasitas transfectados foram selecionados depois de 14 dias em meio com antibiótico. Decorrido este período, iniciou-se os ensaios de localização celular das proteínas fusionadas ao GFP em formas epimastigotas 3 dias.

Adicionalmente, a quantidade de células fluorescentes foi mensurada através de citometria de fluxo (FACS). As culturas apresentaram baixa porcentagem de células com fluorescência, variando de 0,55% a 35,43%, em um total de 20.000 analisadas (quadro 5.2). Com base nesses resultados, observou-se que não houve relação direta entre a quantidade de DNA utilizada na transfecção e a porcentagem de células fluorescentes, nem mesmo

encontrou-se uma relação entre esses dois fatores com o tamanho do gene codificador da proteína.

Gene – IDs	Domínios	Células fluorescentes	DNA
TcExp02G01 - 5595.t00011	Domínio TBC Sítio ativo de aspartil proteases eucarióticas e virais	28.34%	70 µg
TcExp02G02 - 6146.t00006	Proteína hipotética conservada de ligação à GTP Sítio de ligação a ATP/GTP motivo A (P-loop)	4.9%	57 µg
TcExp02G03 - 6487.t00002	Proteína semelhante à Hus1	14.36%	70 µg
TcExp02G04 - 6869.t00042	Domínio de ligação a DNA semelhante a Myb	2.51%	70 µg
TcExp02G05 - 7189.t00016	Domínio PX RNP-1 eucariótica de ligação a RNA (RRM1)	35.43%	61 µg
TcExp02G06 - 7970.t00016	Domínio PH	15.1%	70 µg
TcExp02G07 - 8015.t00008	RNA metiltransferase, família TrmH (Família spoU metilase)	1.04%	70 µg
TcExp02G08 - 8257.t00047	Família Spc97/Spc98	12.39%	70 µg
TcExp02G09 - 8773.t00029	Domínio PH Domínio PH	20.23%	70 µg
TcExp02G10 - 8824.t00032	RNA metiltransferase, família TrmH (Família spoU metilase)	0.55%	70 µg

Quadro 5.2. Porcentagem de células fluorescentes nas culturas dos transfectantes GFP. Genes G01 a G10, com seus respectivos IDs e domínios. Eles foram inseridos no vetor pTcPR-GFPN, transfectados em *T. cruzi* e as culturas resultantes foram analisadas quanto a presença (porcentagem) de células fluorescentes. A coluna DNA mostra a quantidade de plasmídeo utilizado para cada transfecção.

Além disso, experimentos de *western blot* foram feitos com o intuito de observar se os transfectantes realmente estavam expressando as proteínas fusionadas ao GFP. Nesses ensaios foram usados os anticorpos purificados contra os extratos de epimastigotas nativos e transfectados, normalizados por quantidade de células (5×10^6). A partir destes experimentos também foi possível comparar a abundância das proteínas de interesse encontradas nesses dois extratos celulares, ou seja, se estava ocorrendo a superexpressão de proteínas recombinantes nas células transfectadas. Esses resultados serão apresentados no tópico a seguir, com todos os dados integrados, para facilitar o entendimento do trabalho.

5.11. RESULTADOS DA ANÁLISE DE EXPRESSÃO POR WESTERN BLOT, IMUNOLocalização E TRANSFECCÃO

Mesmo após a purificação dos antissoros, o que significou uma redução no título dos mesmos, os respectivos soros pré-ímmes foram usados como controle negativo nos ensaios de imunofluorescência indireta. Deste modo, a noção de concentração entre esses anticorpos foi perdida, porém, o reconhecimento das proteínas no parasita deveria ser diferente entre esses dois soros. Comparando-se o soro pré-ímmes com o soro ímmes, caso o primeiro apresente uma marcação na célula do parasita, o segundo deve apresentar uma marcação em local diferenciado do primeiro, sendo esta marcação referente à proteína de interesse. Nesses ensaios, o contraste e brilho das imagens foram alterados para evidenciar os resultados adquiridos.

Nos ensaios de *western blot* com os extratos protéicos obtidos da metacicloênese *in vitro*, para todas as proteínas estudadas, a normalização das amostras foi feita por quantidade protéica. Um gel representativo da normalização está demonstrado na figura 5.12. Nesses experimentos, para cada proteína estudada, foi utilizado o mesmo soro purificado e o mesmo extrato protéico nos ensaios revelados por fosfatase alcalina e por quimioluminescência, a não ser quando mencionado.

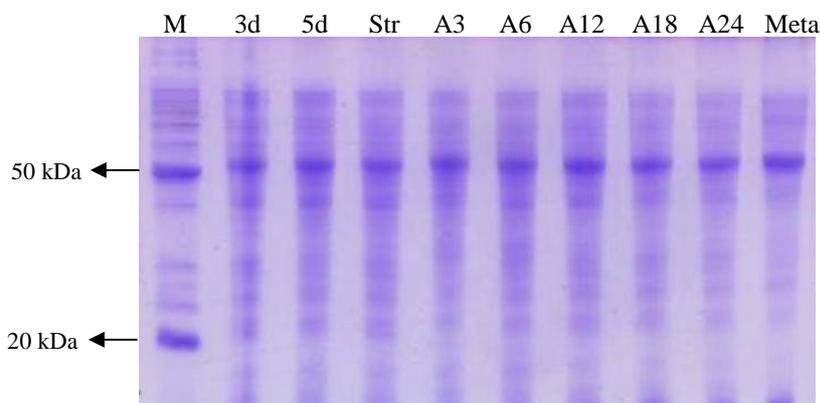


Figura 5.12. Gel de poliacrilamida corado com coomassie blue, contendo os extratos protéicos das formas envolvidas na metacicloênese de *T. cruzi* normalizados por quantidade de proteína. M, marcador de massa molecular; 3d, epimastigotas 3 dias; 5d, epimastigotas 5 dias; formas aderidas ao substrato por 3 (A3), 6 (A6), 12 (A12), 18 (A18) e 24 horas (A24); Meta, formas tripomastigotas metacíclicas.

Os resultados adquiridos com os antissoros purificados serão mostrados nesta sessão. Para a melhor compreensão e para facilitar a integração dos dados, a partir deste momento, as proteínas serão apresentadas individualmente. Primeiramente será feita uma breve descrição

dos domínios protéicos e, depois, serão expostos os resultados obtidos com os experimentos dependentes dos soros acima citados, além dos ensaios utilizando os transfectantes.

5.11.1. TcExp02G01 - 5594.t00011 - Domínio TBC / Sítio ativo de aspartil proteases eucarióticas e virais

A proteína codificada por este gene possui 54,4 kDa de tamanho. Ela possui o domínio TBC compreendendo o aminoácido 216 ao 430, com uma probabilidade predita de $5,4 \times 10^{-11}$. O domínio é assim denominado, pois ele foi primeiramente encontrado em uma proteína murina chamada Tbc1, a qual possui similaridade com a sequência do oncogene Tre-2 e as proteínas reguladoras da mitose em leveduras, BUB2 e cdc16 (RICHARDSON & ZON, 1995).

O domínio TBC é um domínio bastante extenso composto por aproximadamente 200 aminoácidos, sendo alguns deles localizados em posições altamente conservadas, como no caso do resíduo de triptofano (W) na posição aminoacídica 14 e a prolina (P), na 182 (figura 5.13).

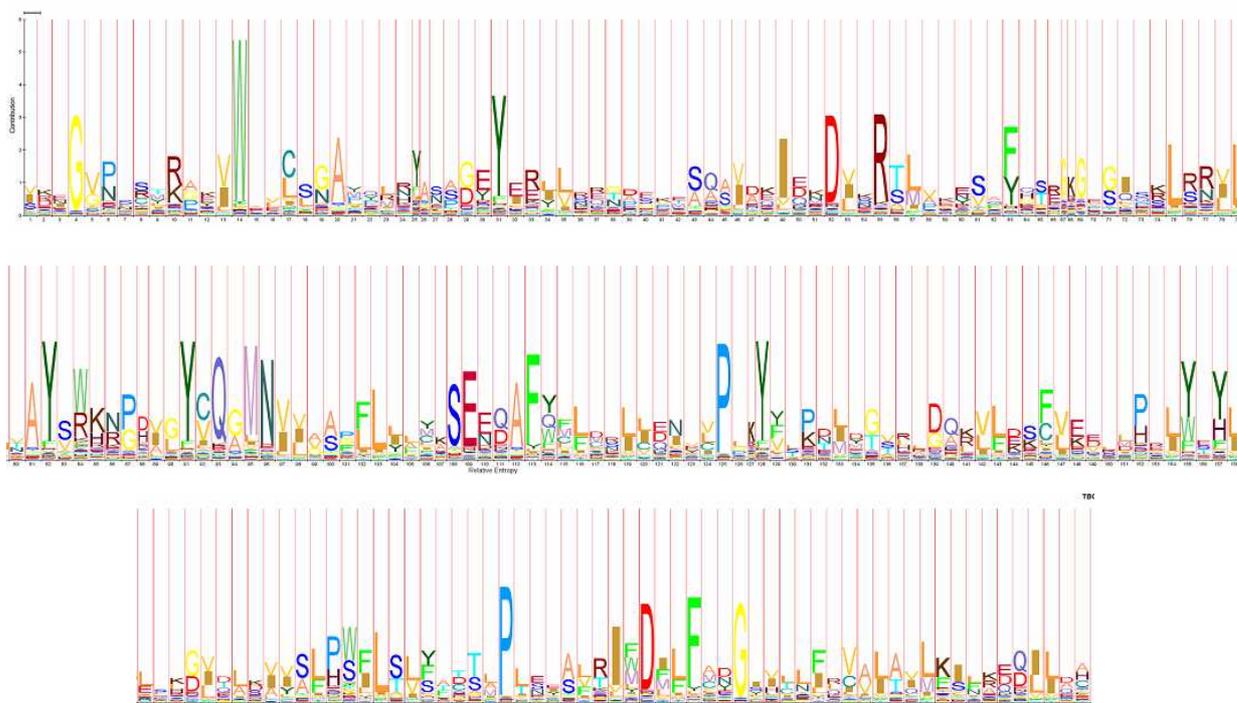


Figura 5.13. Padrão de conservação do domínio TBC. O gráfico representa o domínio TBC no banco de dados PFAM, mostrando o grau de conservação em cada posição aminoacídica da sequência. No eixo inferior do gráfico estão numeradas as posições de cada aminoácido e no eixo lateral a entropia relativa de cada um deles. A dimensão (altura) da letra representativa do aminoácido exprime a sua probabilidade de presença na determinada posição, ou seja, quanto maior a letra, mais frequente o aminoácido é na determinada posição.

Esse domínio é encontrado nas proteínas GYP6 e GYP7 de leveduras, sendo estas proteínas ativadoras de GTPase (*GTPase activating protein* - GAP) da família Ypt/Rab. ALBERT e colaboradores (1999) verificaram que este domínio TBC estava relacionado com a atividade catalítica da proteína GYP7. Por esse motivo, acredita-se que esta estrutura seja responsável pela modulação da atividade catalítica de pequenas GTPases semelhantes a Rab, as quais estão envolvidas no tráfego vesicular (RAK *et al.*, 2000).

GAPs são responsáveis pela aceleração da ativação e desativação de GTPases, através da hidrólise de GTP. Depois de ligadas a GTP, as GTPases tornam-se ativas e passam por mudanças conformacionais, alterando a afinidade de interação com outras proteínas efetoras ou enzimas. Simultaneamente a esse processo, ocorre a hidrólise do GTP. Quando inativas, as GTPases permanecem ligadas a GDP, na qual ligações não ocorrem. Elas podem se tornar ativas novamente através da ação de proteínas denominadas GEF (*Guanine nucleotide exchange factor*), que fazem a troca de GDP por GTP. (CALDON *et al.*, 2001).

Através de análises de alinhamentos, observou-se que o domínio em questão contém 6 motivos conservados, denominados de A-F, compartilhados com várias proteínas de leveduras, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* e mamíferos, inclusive humanos (NEUWALD, 1997), sendo que no motivo B encontra-se uma arginina responsável pela atividade catalítica de GAPs (ALBERT *et al.*, 1999). A figura 5.14 mostra o alinhamento da proteína de estudo contra outras proteínas ortólogas de tripanossomatídeos.

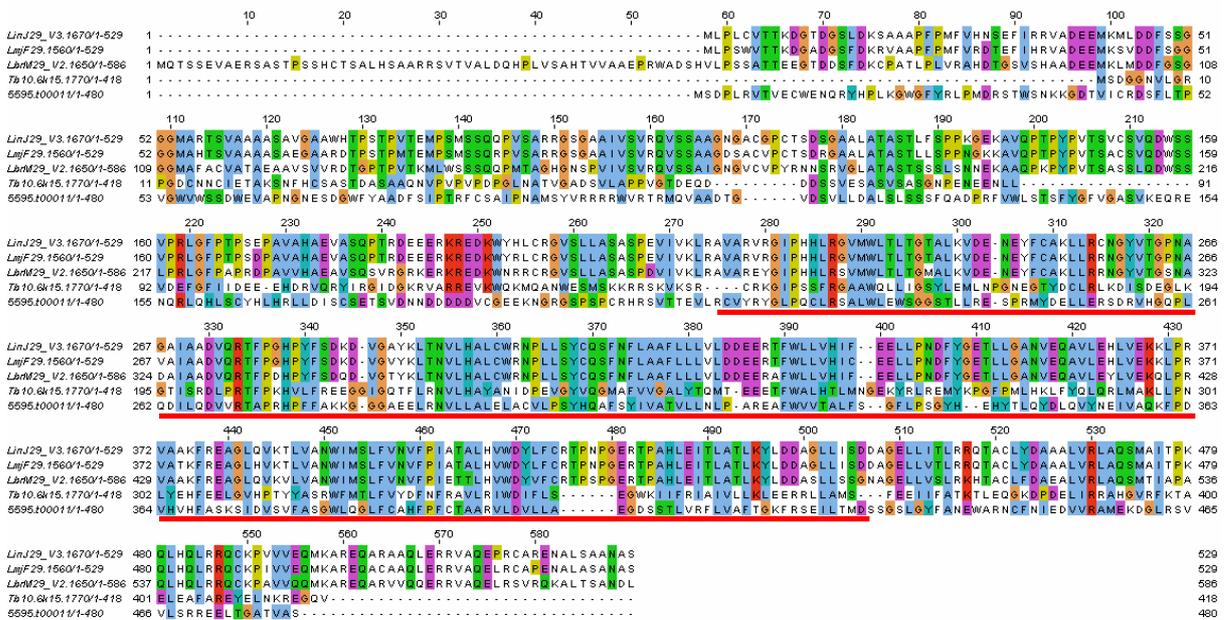


Figura 5.14. Alinhamento da proteína estudada de *T. cruzi* com ortólogas de tripanossomatídeos. No alinhamento, de cima para baixo, os organismos são *Leishmania infantum*, *L. major*, *L. braziliensis*, *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma cruzi*. Nesta figura, a sequência referente ao domínio TBC está sublinhada em vermelho.

Já o segundo domínio, Sítio ativo de aspartil proteases eucarióticas e virais, foi predito pelo banco de dados Prosite e está presente no início da proteína, entre os aminoácidos 108 e 119. Ele é encontrado em proteases cujo sítio ativo contém um resíduo aspartil. Este domínio é verificado em vertebrados, fungos, plantas, retrovirus e em alguns vírus de plantas.

Análise por *western blot* dos extratos da metaciclologênese reagidos contra o antissoro anti-G01 mostrou que mais de uma banda é reconhecida por esse antissoro, como pode ser visto na revelação pela técnica de fosfatase alcalina (figura 5.15). A banda de maior massa molecular pode ser resultado de interações da proteína de interesse com outras. A revelação por quimioluminescência apresentou mais bandas reconhecidas devido a maior sensibilidade da técnica e, provavelmente, devido à utilização de extratos protéicos diferentes para os dois ensaios (figura 5.16).

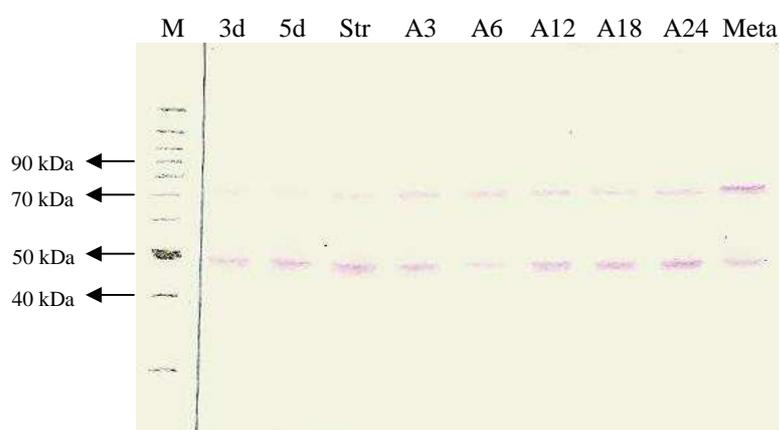


Figura 5.15. Análise dos extratos da metaciclologênese, por *western blot*, com o soro purificado obtido contra a proteína TcExp02G01. A diluição do soro foi de 1:75. Vide legenda da figura 5.12.

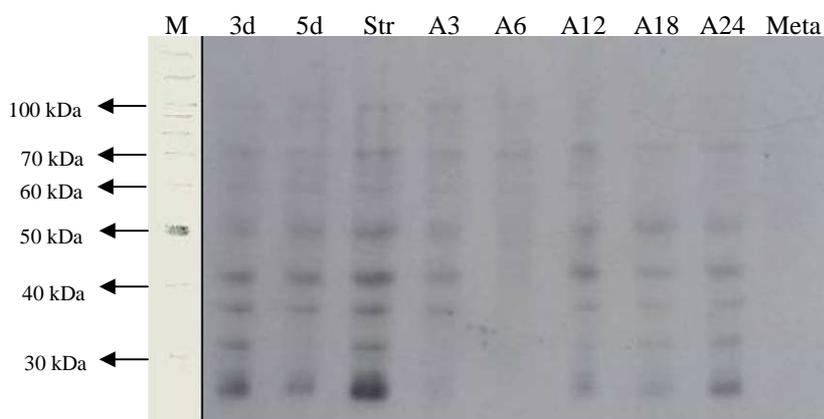


Figura 5.16. *Western blot* revelado por quimioluminescência dos extratos da metaciclologênese com o soro purificado obtido contra a proteína TcExp02G01. A diluição do soro foi de 1:100. Vide legenda da figura 5.12.

Na imunofluorescência, com o antissoro purificado contra TcExp02G01, obtivemos uma localização do núcleo e cinetoplasto. Também houve o reconhecimento, aparentemente, da bolsa flagelar, região que está envolvida em tráfego de vesículas. A imunofluorescência com o soro pré-imune não mostrou o reconhecimento das proteínas do *T. cruzi*, conforme visto na figura 5.17.

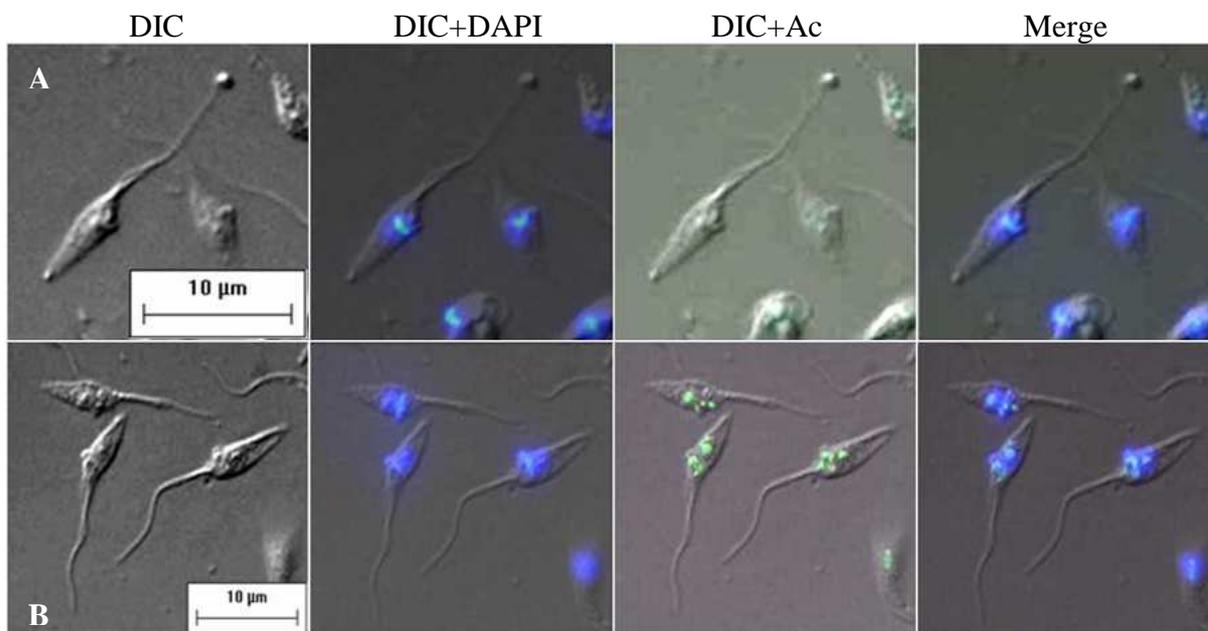


Figura 5.17. Imunofluorescência do soro pré (A) e pós-imune (B) obtido após inoculação com a proteína TcExp02G01. DIC, contraste interferencial; DIC+DAPI, sobreposição das imagens de contraste interferencial e marcação de núcleo e cinetoplasto; DIC+Ac, contraste interferencial e localização da proteína do *T. cruzi* pelo anticorpo purificado (verde); Merge, sobreposição das imagens.

Em relação ao transfectante TcExp02G01-GFP, a análise por *western blot* mostrou que houve a expressão da proteína recombinante no *T. cruzi* e que esta, em comparação com a nativa, estava em maior quantidade. Pode-se notar na figura 5.18, na canaleta referente ao extrato protéico dos transfectantes, uma banda do tamanho aproximado da proteína nativa (~50 kDa). Acima desta banda, com altura de aproximadamente 80 kDa, encontra-se a proteína recombinante, possuindo ~27 kDa adicionais referente à etiqueta GFP e a inclusão da expressão do fragmento inerente ao vetor. Assim, a partir dos resultados obtidos através deste ensaio, supõe-se que o antissoro anti-G01 está reconhecendo a proteína de interesse, e que esta apresenta um tamanho de aproximadamente 50 kDa. Nesta mesma ilustração ainda foi possível verificar o reconhecimento de uma banda referente à proteína nativa no extrato de epimastigotas, embora na impressão esteja pouco visível.

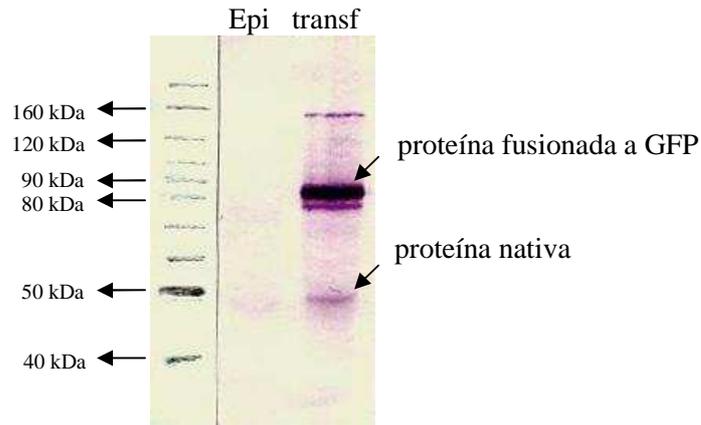


Figura 5.18. Expressão da proteína TcExp02G01 fusionada ao GFP no *T. cruzi*, em comparação com a proteína nativa em epimastigotas, analisada por *western blot*. Nesta figura, os extratos protéicos de epimastigotas (epi) e transfectantes GFP (transf) foram normalizados por quantidade de células (5×10^6 células) e foram incubados com os anticorpos purificados obtidos contra a proteína TcExp02G01, na concentração de 1:75.

A proteína TcExp02G01 quando fusionada a GFP mostrou uma localização próxima ao núcleo da célula como pode ser visto na figura 5.19. Verifica-se a presença de um ponto na região posterior da célula na forma epimastigota.

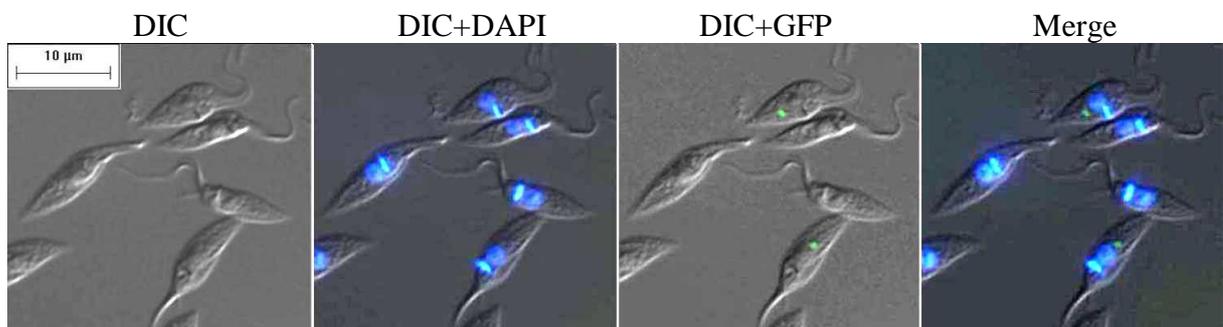


Figura 5.19. Localização da proteína TcExp02G01 fusionada a GFP no *T. cruzi*. DIC, contraste interferencial; DIC+DAPI, sobreposição das imagens de contraste interferencial e marcação de núcleo e cinetoplasto; DIC+GFP, sobreposição da fluorescência da proteína estudada fusionada a GFP e contraste interferencial; Merge, sobreposição das imagens DIC+GFP com DAPI.

Tendo em vista que o domínio TBC está relacionado as GAPs (de pequenas Rab GTPases) que são proteínas envolvidas no transporte vesicular, a localização nuclear revelada pelos ensaios de imunofluorescência foram surpreendentes. Porém, neste mesmo experimento também houve o reconhecimento de uma região próxima ao flagelo da célula, provavelmente referente à bolsa flagelar, região esta, de intenso tráfego de vesículas. O resultado obtido com a fluorescência emitida pelo GFP também foi inesperado, pois apesar deste ser encontrado em

grânulos, esperava-se que a localização fosse visualizada na região anterior da célula, próxima à bolsa flagelar e citóstoma.

Com a finalidade de realizar ensaios funcionais de ligação a GTP com esta proteína, a clonagem do gene no vetor pGEX-4T-1 foi feita, visando a produção da mesma na forma solúvel. Novas reações de amplificação do gene foram feitas com a enzima *PfuUltra high-fidelity DNA polymerase* (figura 5.20). A purificação do gene foi realizada através da excisão da banda de interesse para eliminar os produtos que não eram desejados.

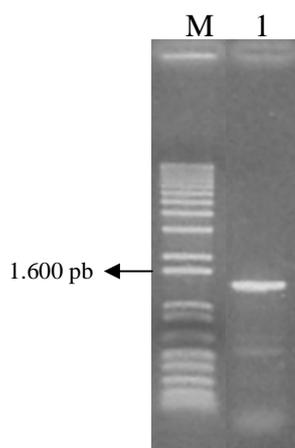


Figura 5.20. Gel de agarose contendo o gene TcExp02G01 amplificado por PCR para a clonagem no plasmídeo pGEX-4T-1. Na canaleta 1 observa-se a amplificação do gene TcExp02G01, com tamanho aproximado de 1.443 pb, além de outros fragmentos indesejados. Por este motivo, procedeu-se a excisão da banda de interesse do gel de agarose para purificação. M, marcador de massa molecular *1 Kb Plus DNA Ladder*.

As etapas de digestão e clonagem do gene no vetor pGEX-4T-1 foram bem sucedidas e após a transformação de células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 α , os clones positivos foram selecionados pela técnica de *toothpick*. Eles foram submetidos a minipreparação para extração dos plasmídeos contendo o gene de interesse.

Os plasmídeos purificados foram transformados em células XL1-Blue cálcio competentes para os testes de expressão, porém, até o momento, não foi obtida a expressão protéica.

5.11.2. TcExp02G02 - 6146.t00006 - Domínio de ligação à GTP / Sítio de ligação a ATP/GTP motivo A (P-loop)

Esta proteína possui 660 aminoácidos, resultando em um tamanho previsto de 73,8 kDa. Ela contém 2 domínios encontrados através de busca por homologia em banco de dados públicos. O domínio de ligação à GTP foi predito pelo (PFAM) com uma probabilidade de $1,7 \times 10^{-07}$. Este domínio localiza-se entre as posições aminoacídicas 83-132, na região anterior da proteína. Esta estrutura, como o nome do domínio define, é um domínio de ligação a GTP, que é encontrado em várias proteínas de várias famílias, incluindo membros da superfamília Ras GTPase e a proteína G heterotrimérica.

A função básica de ligação e hidrólise do GTP é possibilitada por uma estrutura presente na proteína denominada de “domínio G”, que é composto por 6 folhas- β e 5 α -hélices. Através de ensaios de cristalografia de raio-X, SPRANG (1997) verificou que o dobramento do domínio G apresenta-se quase invariável entre as diversas GTPases avaliadas. As GTPases podem ser formadas apenas pelo domínio G ou podem conter domínios adicionais nas suas extremidades N e C-terminal, o que torna possível a existência de GTPases com sequências altamente diversificadas. Elas estão presentes em Bactéria, Eukarya e Archaea e estão relacionadas com diversas funções, entre elas síntese de proteínas, ciclo celular e diferenciação e sinalização hormonal (BOURNE *et al.*, 1990).

GNBPs (*Guanine Nucleotide-Binding Proteins*) possuem 4 ou 5 motivos conservados que encontram-se alinhados ao longo do sítio onde há a ligação do nucleotídeo. O motivo da proteína que possui maior importância para a ligação com o nucleotídeo é o N/TKXD (onde X representa qualquer aminoácido) e para ligação com o fosfato é o chamado P-loop (*phosphate-binding loop*), cuja sequência é GXXXXGKS/T. A especificidade de ligação com a guanina é imposta pela cadeia lateral do resíduo de ácido aspártico, no motivo DXXG, o qual realiza ponte de hidrogênio com a base e por uma interação com uma alanina invariável do motivo SAK (VETTER & WITTINGHOFER, 2001).

Este motivo P-loop também foi encontrado em análises de busca de padrões no banco de dados Prosite, proporcionando uma maior confiabilidade nos resultados. A proteína de estudo apresenta todos estes motivos supracitados incluindo o motivo DXXG, o que a caracteriza como sendo uma ligadora de GTP. É interessante notar que entre as proteínas ortólogas dos tripanossomatídeos há uma grande conservação dos aminoácidos, principalmente nas regiões dos motivos P-loop e DXXG, conforme a figura 5.21.

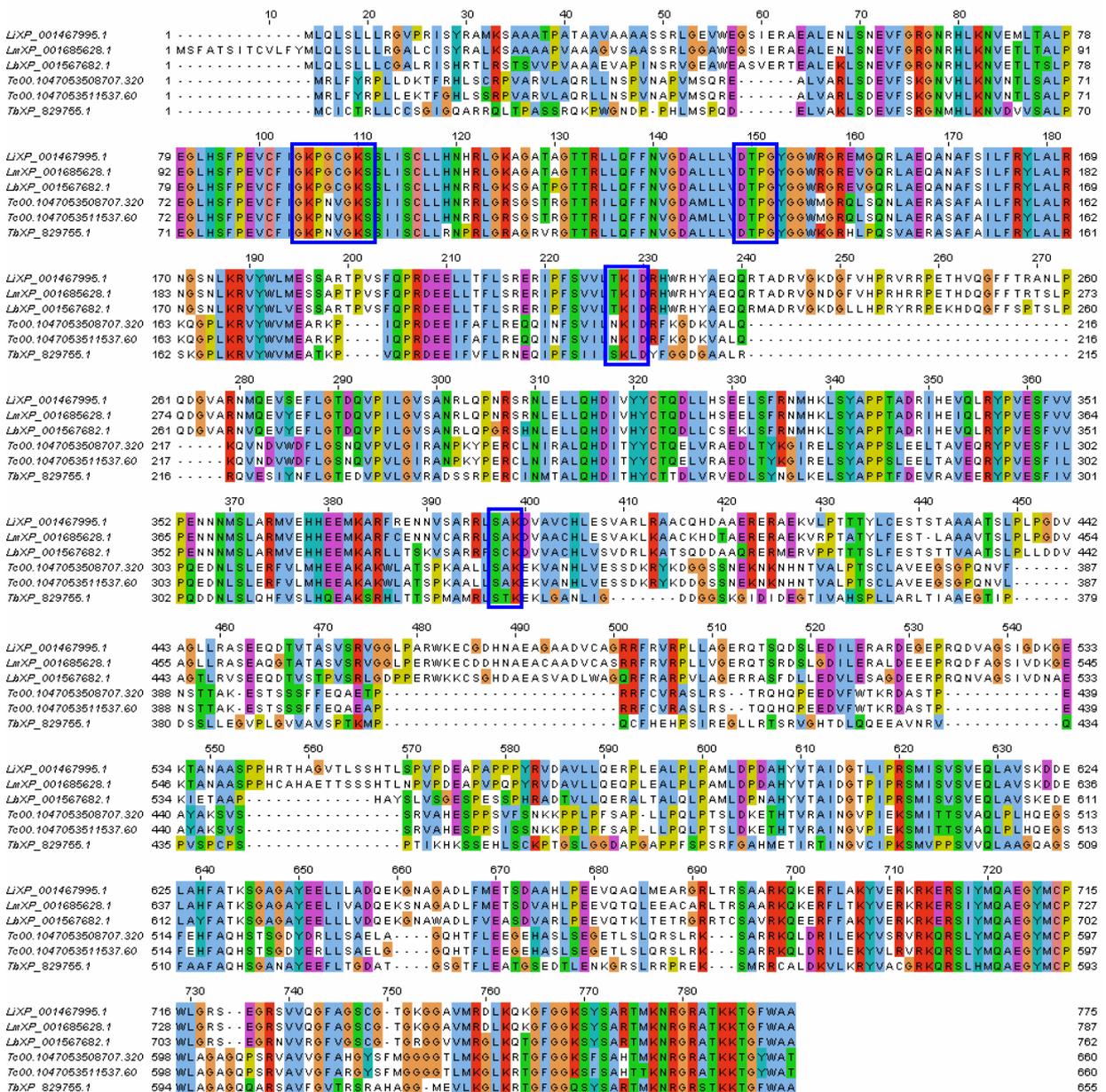


Figura 5.21. Alinhamento da proteína estudada de *T. cruzi* com ortólogos de tripanossomatídeos. Pode-se ver no gráfico, o grau de conservação da proteína estudada entre os tripanossomatídeos: *Leishmania infantum* e *L. major*, um provável alelo da proteína em *T. cruzi* e em *T. brucei* (de cima para baixo). As regiões destacadas no retângulo em azul mostram os motivos conservados descritos no texto. (Alinhamento retirado do banco de dados CruziiGeneDB).

Com o anticorpo anti-G02, o qual foi purificado com êxito, foi realizado *western blot* contra os extratos protéicos das formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas, além das formas de transição do processo de metaciclo-gênese (formas epimastigotas sob estresse por 2 horas e formas epimastigotas aderidas por 3, 6, 12, 18 e 24 horas).

Nos ensaios de *western blot* com o antissor contra a proteína G02 as reações foram reveladas tanto pela técnica de fosfatase alcalina (figura 5.22) como por quimioluminescência (figura 5.23). O mesmo extrato protéico foi utilizado para os dois ensaios. Observando essas

figuras pode-se perceber a presença de uma única proteína reconhecida, pelas duas técnicas. Há um aumento da expressão da proteína em questão durante o processo de metaciclogênese, dado que confirma os resultados obtidos previamente pelo microarranjo.

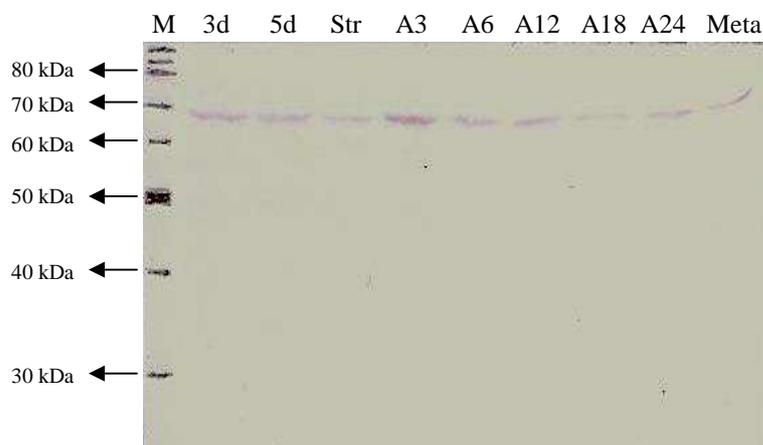


Figura 5.22. *Western blot* do soro purificado anti-G02 contra os extratos protéicos das formas envolvidas na metaciclogênese revelado por fosfatase alcalina. A diluição do soro foi de 1:100. Vide legenda da figura 5.12.

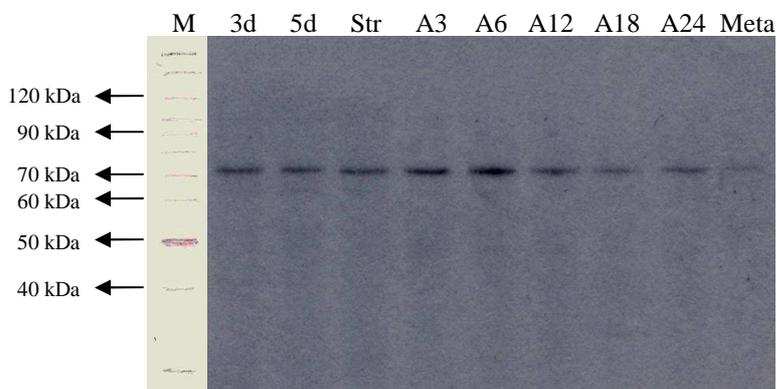


Figura 5.23. *Western blot* com extrato das formas do *T. cruzi* obtidas no processo de metaciclogênese *in vitro* e reagidas com o soro anti-G02 revelado por quimioluminescência. A diluição do soro foi de 1:100. Vide legenda da figura 5.12.

O anticorpo purificado contra a proteína TcExp02G02 reconheceu uma região do cinetoplasto do parasita, conforme pode ser observado na figura 5.24B. O soro pré-imune reconheceu fracamente uma região próxima ao flagelo do *T. cruzi*.

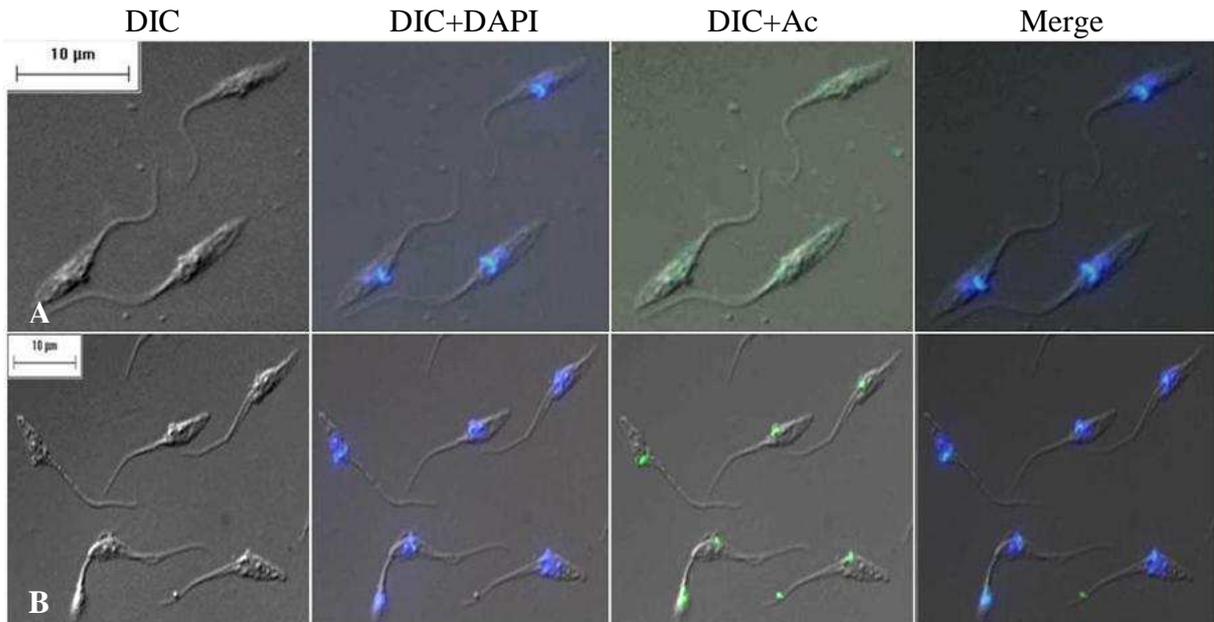


Figura 5.24. Imunofluorescência do soro pré (A) e pós-imune (B) contra a proteína TcExp02G02. DIC, contraste interferencial; DIC+DAPI, sobreposição das imagens de contraste interferencial e marcação de núcleo e cinetoplasto; DIC+Ac, contraste interferencial e localização da proteína do *T. cruzi* pelo anticorpo purificado (verde); Merge, sobreposição das imagens.

Em relação aos experimentos realizados com a proteína recombinada a GFP, observamos que ela foi expressa no *T. cruzi* após a transfecção do plasmídeo. Visualizando a figura 5.25 pode-se perceber que as bandas relativas às proteínas recombinantes e nativa estão presentes nas células transfectadas. Além disso, vemos que não houve uma superexpressão da proteína com etiqueta GFP em relação a outra.

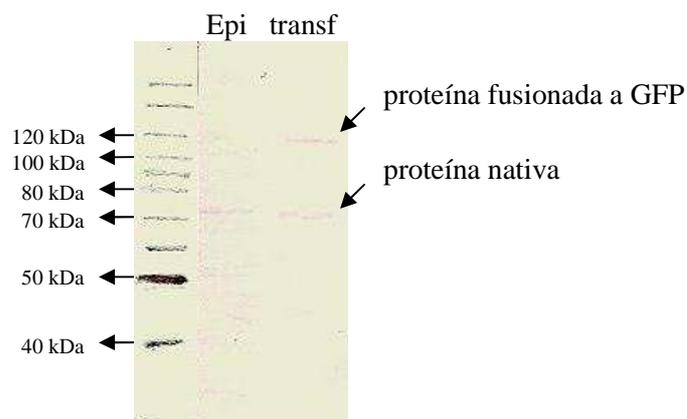


Figura 5.25. Western blot demonstrando a expressão da proteína TcExp02G02 fusionada ao GFP no *T. cruzi*, em comparação com a proteína nativa em formas epimastigotas. Os extratos protéicos de epimastigotas (epi) e transfectantes GFP (transf) foram normalizados por quantidade de células (5×10^6 células) e foram incubados com o soro anti-G02 diluído em 1:100.

A análise da localização da proteína TcExp02G02 através da fluorescência de GFP mostra que ela está presente em um ponto no citoplasma da célula epimastigota, próximo ao núcleo do parasita (figura 5.26).

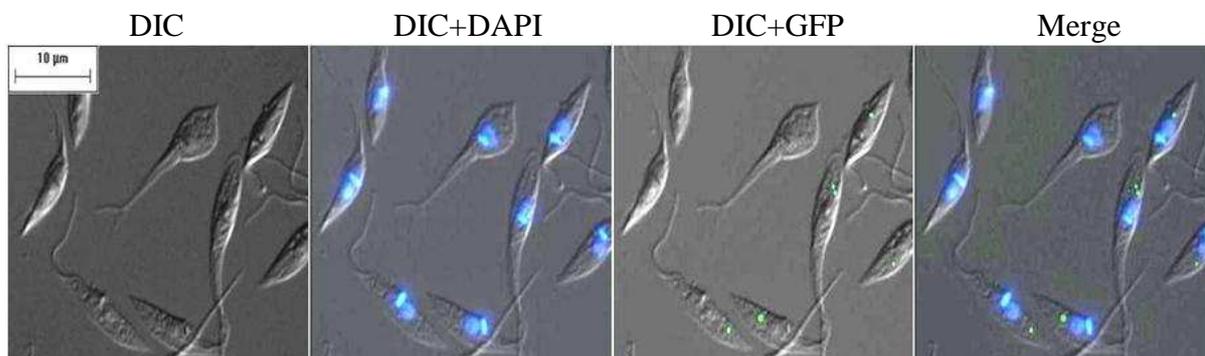


Figura 5.26. Localização da proteína TcExp02G02 fusionada a GFP no *T. cruzi*. Vide legenda da figura 5.19.

Adicionalmente a esses ensaios foi realizada a expressão da proteína fusionada ao GST através da clonagem do gene em vetor pGEX-4T-1, com a finalidade de promover experimentos bioquímicos, já que esta proteína possui um domínio de ligação a GTP. Para isso, o gene TcExp02G02 foi amplificado por PCR (figura 5.27) e digerido com a enzima de restrição *Bam*HI. Com esta mesma enzima foi feita a digestão do vetor pGEX-4T-1 (figura 5.28).

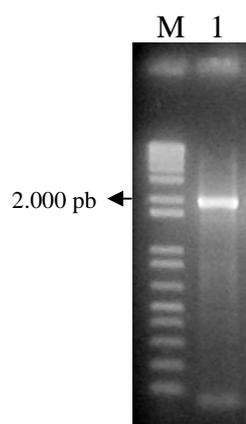


Figura 5.27. Gel de agarose contendo o gene TcExp02G02 amplificado por PCR para a clonagem no vetor pGEX-4T-1. Na canaleta 1 observa-se a amplificação de uma única banda, a qual é referente ao gene TcExp02G02 amplificado. M, marcador de massa molecular *1 Kb Plus DNA Ladder*.

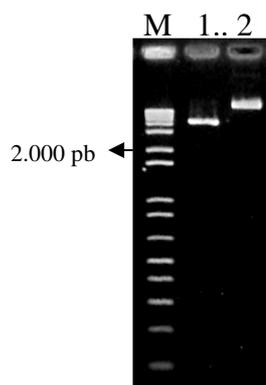


Figura 5.28. Gel de agarose confirmando a digestão do vetor pGEX-4T-1. No gel podemos verificar o plasmídeo digerido na canaleta 1 quando comparado com o vetor concatenado não digerido (canaleta 2). M, marcador de massa molecular *1 Kb Plus DNA Ladder*.

Após as etapas de purificação e desfosforilação, foi realizada a reação de ligação entre o produto de PCR e o vetor pGEX-4T-1. Procedeu-se a transformação de células competentes da linhagem *E. coli* XL1-Blue e os clones obtidos foram selecionados por *toothpick*. Os clones positivos foram utilizados nos testes de expressão da proteína TcExp02G02 recombinante. Diferentes temperaturas e tempos de indução (37°C e 28°C por 3 horas e 20°C por 15-16 horas) foram testados a fim de obter uma maior quantidade de proteína solúvel, no entanto, pouca expressão solúvel foi obtida, como pode ser visto no gel comprobatório de expressão (figura 5.29).

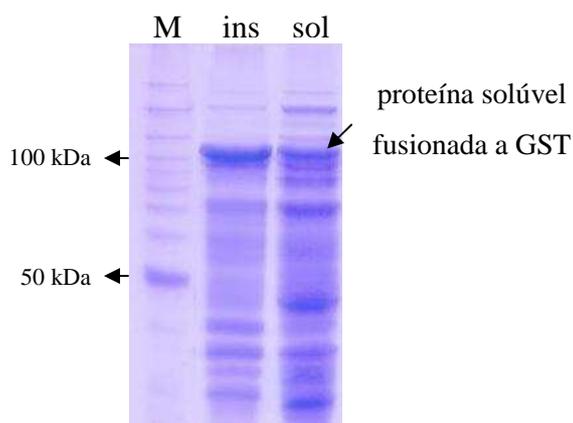


Figura 5.29. Gel de poliacrilamida mostrando a expressão da proteína TcExp02G02 fusionada a GST. Através da clonagem do gene no vetor pGEX-4T-1 foi possível expressar a proteína recombinada a GST em *E. coli*. A etiqueta GST localizada na região N-terminal da proteína acrescenta aproximadamente 26 kDa de massa molecular. Portanto, o tamanho de ~100 kDa apresentado no gel está de acordo com a massa molecular prevista para a proteína fusionada a GST. M, marcador de massa molecular; ins, fração insolúvel; sol, fração solúvel.

Com a proteína TcExp02G02-GST solúvel, partimos então para os testes de purificação em resina Glutathiona-Sepharose. Nestes ensaios foi obtida uma baixa quantidade de proteína eluída, sendo que grande parte do material expresso não se ligou a resina (figura 5.30). Supõe-se que este fato tenha ocorrido devido ao dobramento da proteína recombinante, a qual pode ter internalizado em sua estrutura a etiqueta GST, tornando-a indisponível para a ligação com a resina.

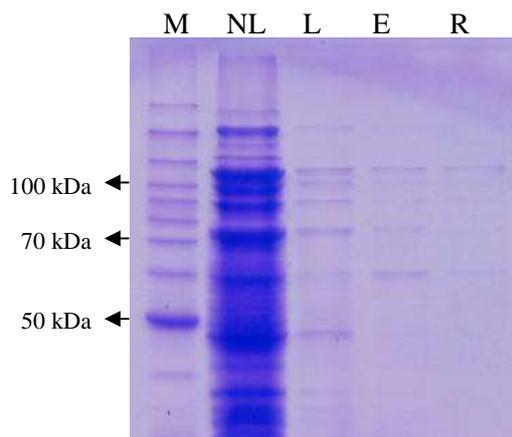


Figura 5.30. Gel de poliacrilamida da purificação teste da proteína TcExp02G02 fusionada a GST. Nota-se que apenas uma pequena quantidade da proteína recombinante foi eluída da resina. M, marcador de massa molecular; NL, fração não ligada a resina; L, proteínas retiradas na lavagem da resina; E, fração protéica eluída da resina; R, proteínas que continuaram ligadas a resina.

Como não obtivemos êxito na purificação da proteína fusionada a GST, como um alternativa, prosseguiremos com a tentativa de clonar o gene no vetor pGFPXa desenvolvido por nossa equipe (FOTI, 2004). O plasmídeo pQE30 foi utilizado como base para a construção do vetor de expressão pGFPXa (Figura 5.31), o qual permite a clonagem de genes ou fragmentos de genes, em um sítio *EcoRI*, em fase com extremidade 3' do gene da GFP. Há também um sítio de reconhecimento para o Fator Xa, em fase à extremidade 3' do gene da GFP e antes do sítio de clonagem (*EcoRI*), de tal maneira que a proteína de interesse possa ser posteriormente separada da proteína carreadora (GFP) através da clivagem com o Fator Xa.



Figura 5.31. Representação esquemática do vetor pGFPXa. O plasmídeo pGFPXa contém uma região que codifica para seis resíduos de histidina (6xHis), o gene GFP (GFP), a região do sítio de reconhecimento do fator Xa (FatorXa) e os sítios de restrição para as endonucleases *BamHI*, *EcoRI* e *HindIII*. (FOTI, 2004).

Para a clonagem neste novo vetor, outros iniciadores serão desenhados com o sítio para a enzima de restrição *EcoRI*, para que o gene TcExp02G02 possa ser amplificado por PCR, digerido e inserido corretamente em pGFPXa.

5.11.3. TcExp02G03 - 6487.t00002 - Proteína semelhante a Hus1

Proteínas que fazem o controle (*checkpoint*) da ordem dos eventos do ciclo celular são importantes para que a informação genética completa seja distribuída entre a geração filha. Defeitos nessa etapa de verificação levam à instabilidade genética e morte celular (HARTWELL & WEINERT, 1989). Através de estudos em leveduras descobriu-se um grupo de proteínas responsáveis pela cascata de controle do ciclo celular. Entre elas encontram-se as proteínas Hus1, Rad1 e Rad9 (BODDY & RUSSELL, 1999; HUMPHREY, 2000). Essas proteínas são conservadas na linha evolutiva e estão presentes em vários eucariotos, inclusive humanos (VOLKMER & KARNITZ, 1999; VENCLOVAS & THELEN, 2000).

Através da predição de estrutura tridimensional, foi visto que as três proteínas, Hus1, Rad1 e Rad9, quando em conjunto, formam um complexo semelhante ao PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), o qual é responsável pela processividade durante a replicação e reparo do DNA celular. Ele é estruturalmente semelhante a um anel que desliza pelo DNA a procura de lesões no genoma e forquilhas de replicação. Então, pela semelhança estrutural, supõe-se que o complexo possua as mesmas funções relatadas para o PCNA. Além disso, esta estrutura poderia atuar como uma plataforma que recrutaria outras proteínas para os locais lesionados ou forquilhas de replicação (ZHANG *et al.*, 1999). Sabe-se também, que a Hus1 é fosforilada após eventos que causam dano ao DNA, como a incidência de raios gama e luz ultravioleta e que, em *Schizosaccharomyces pombe*, a Hus1 possui uma localização nuclear (CASPARI *et al.*, 2000).

A proteína TcExp02G03 de *T. cruzi* constitui uma proteína semelhante a Hus1, encontrada com uma confiabilidade de $1,5 \times 10^{-09}$ pelo PFAM. Esta proteína possui um tamanho predito de 33,6 kDa. Na figura 5.32 é possível verificar quais os aminoácidos mais conservados na sequência.

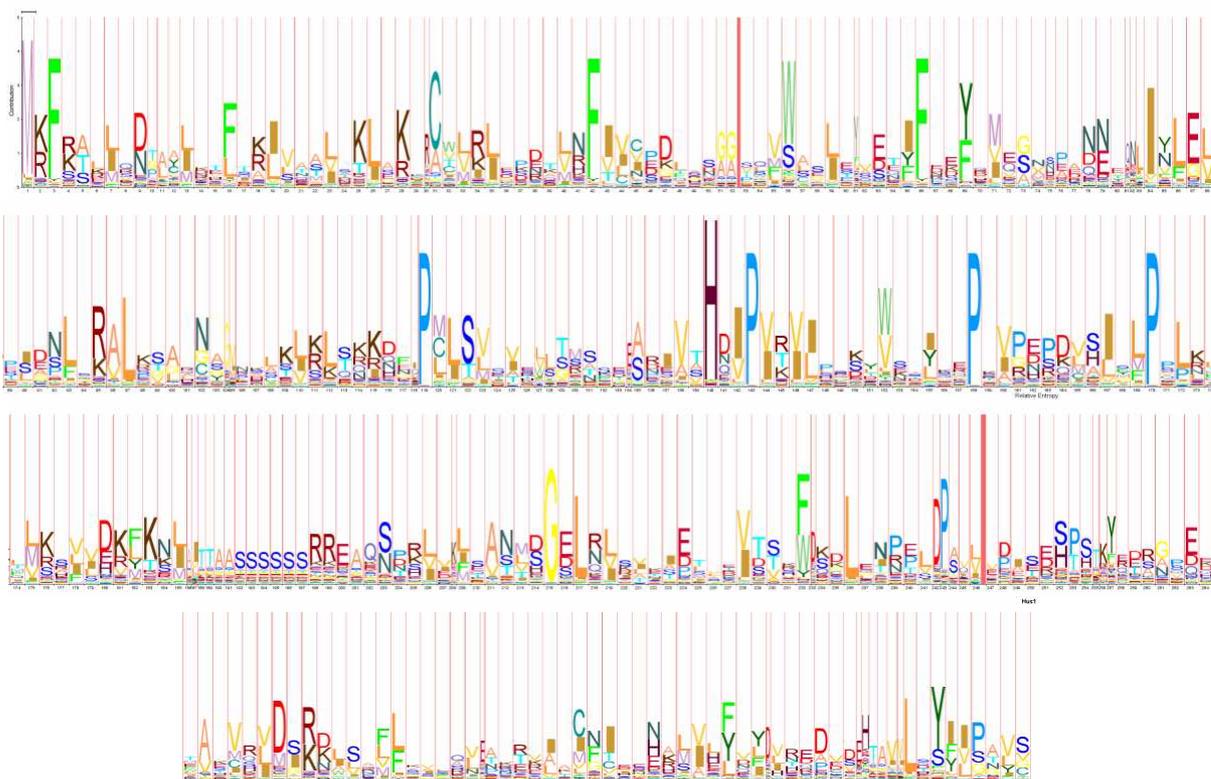


Figura 5.32. Conservação aminoacídica de proteínas semelhantes a Hus1. O gráfico retirado do PFAM mostra o grau de conservação em cada posição aminoacídica da sequência. No eixo inferior do gráfico estão numeradas as posições de cada aminoácido e no eixo lateral a entropia relativa de cada um deles. Os aminoácidos que são representados em maior tamanho são os que aparecem com maior frequência naquela determinada posição.

Utilizando ferramentas computacionais para alinhamento de sequências (BLAST) com o intuito de identificar possíveis proteínas semelhantes em outros tripanossomatídeos, foi visto que existem ortólogas em *Leishmania infantum*, *L. major*, *L. braziliensis* e *T. brucei*, além de mais 3 possíveis alelos em *T. cruzi*. A identidade entre a proteína G03 com as de *Leishmania* chega a 37%, no entanto, todas ainda são classificadas como hipotéticas. O alinhamento delas pode ser visto na figura 5.33.

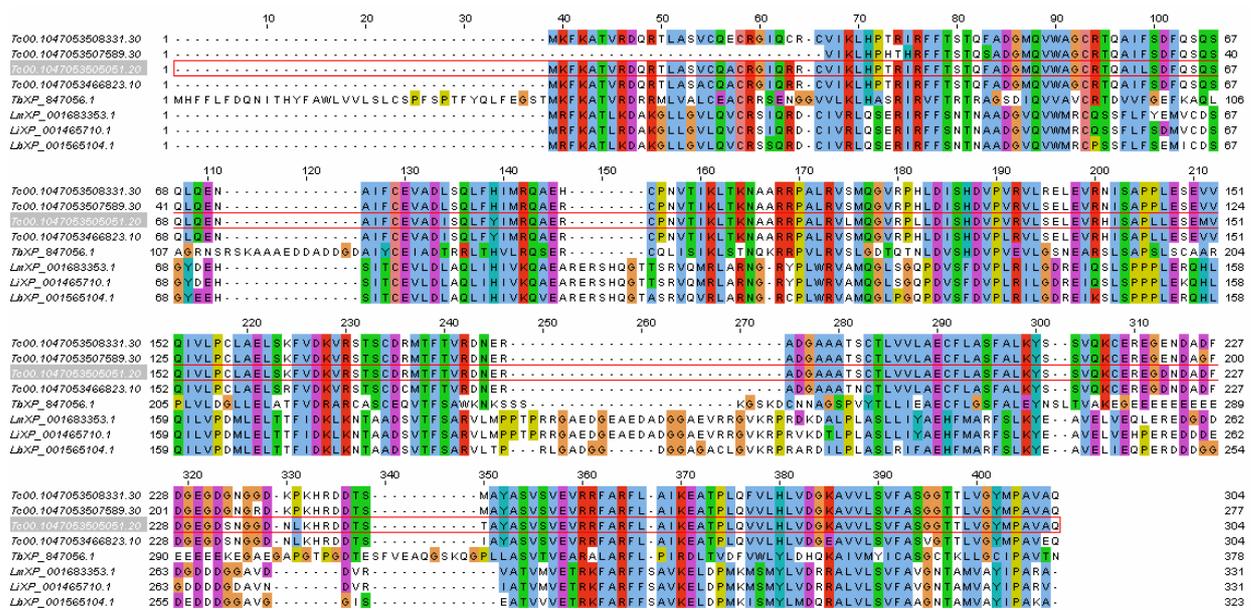


Figura 5.33. Alinhamento da proteína TcExp02G03 de *T. cruzi* com ortólogas de tripanossomatídeos. Pode-se ver no gráfico, o grau de conservação da proteína estudada entre as espécies de *Leishmania* e *T. brucei* citadas no texto. A sequência da proteína estudada está destacada no retângulo vermelho. Nota-se uma extensão N-terminal na proteína de *T. brucei*, que provavelmente é decorrente de um erro de anotação. Nesta figura também pode ser visto sequências que estão presentes apenas nas espécies de *Leishmania* (as 3 inferiores no alinhamento). (Alinhamento retirado do banco de dados CruzGeneDB).

Os experimentos de *western blot* contra os extratos da metaciclogênese demonstram que o antissoro anti-G03 purificado reconheceu duas bandas pela revelação por fosfatase alcalina. Uma de massa aproximada de 47 kDa e outra um pouco mais acima, com uma intensidade bem menor, de ~50 kDa (figura 5.34). A revelação por quimioluminescência revelou um padrão diferente da apresentada pela fosfatase alcalina (figura 5.35), talvez pelos extratos protéicos utilizados serem diferentes. CASPARI *et al.* (2000) em estudos de caracterização da proteína Hus1 em *S. pombe*, descobriu que esta se encontra presente em 4 formas distintas: Hus1-A (75 kDa), Hus1-B (65 kDa), Hus1-C (60 kDa), and Hus1-D (35 kDa). Já em *T. cruzi* não se tem conhecimento para afirmar a presença ou ausência dessas formas protéicas.

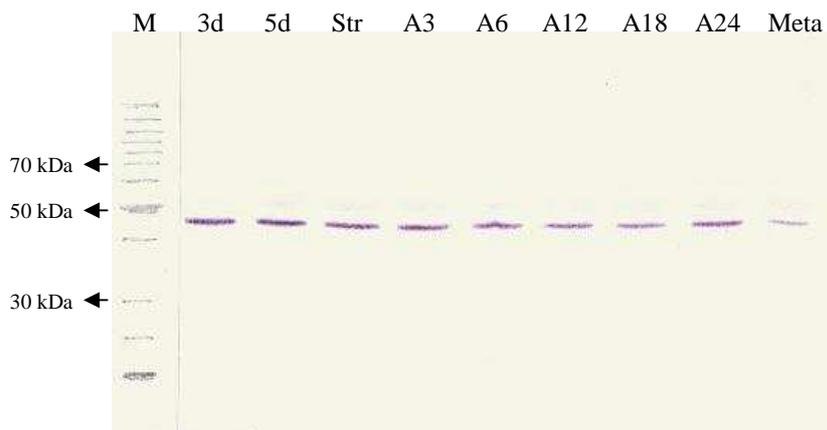


Figura 5.34. *Western blot* do soro purificado anti-G03 contra os extratos protéicos das formas envolvidas na metaciclôgênese revelado por fosfatase alcalina. A diluição do soro foi de 1:100. Vide legenda da figura 5.12.

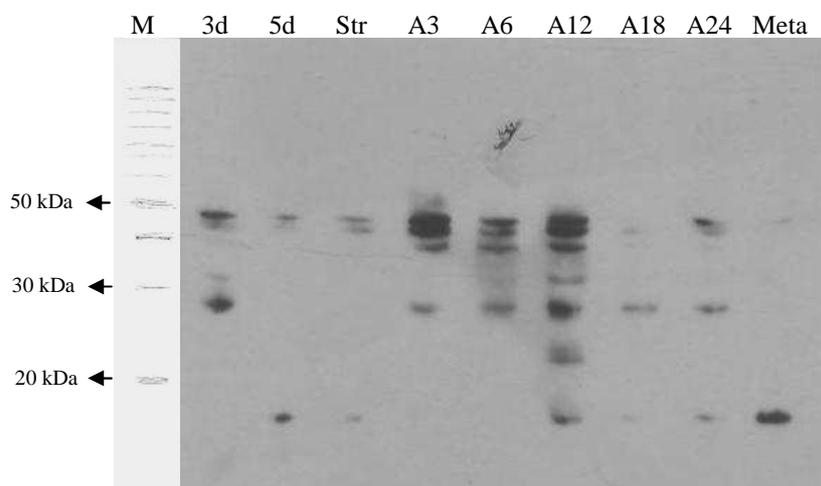


Figura 5.35. *Western blot* com extrato das formas do *T. cruzi* obtidas no processo de metaciclôgênese *in vitro* e reagidas com o soro anti-G03 revelado por quimioluminescência. A diluição do soro foi de 1:200. Vide legenda da figura 5.12.

Com o mesmo soro purificado utilizado para os ensaios de *western blot*, obtido contra a proteína TcExp02G03, foi verificada uma marcação difusa pelo citoplasma da célula epimastigota (figura 5.36). Como pode ser visto nesta imagem, o soro pré-imune não reconheceu nenhuma estrutura específica do organismo.

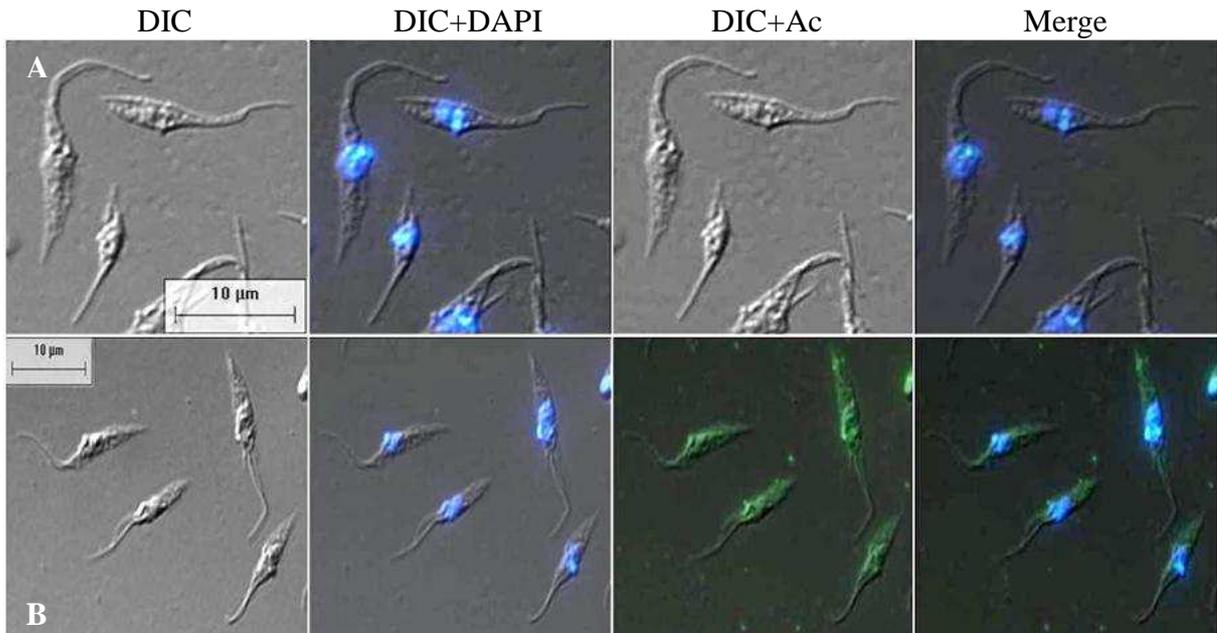


Figura 5.36. Imunofluorescência do soro pré (A) e pós-imune purificado (B) contra a proteína TcExp02G03. Vide legenda da figura 5.24.

Utilizando os extratos protéicos dos parasitas transfectados verificou-se o reconhecimento de duas bandas, provavelmente relativas a proteína nativa e recombinante (figura 5.37), pois estas diferem em aproximadamente 27 kDa, o tamanho da etiqueta GFP, a qual encontra-se fusionada a proteína de interesse. Deste modo, este experimento confere uma confiabilidade de que o antissoro esteja reconhecendo a proteína de estudo.

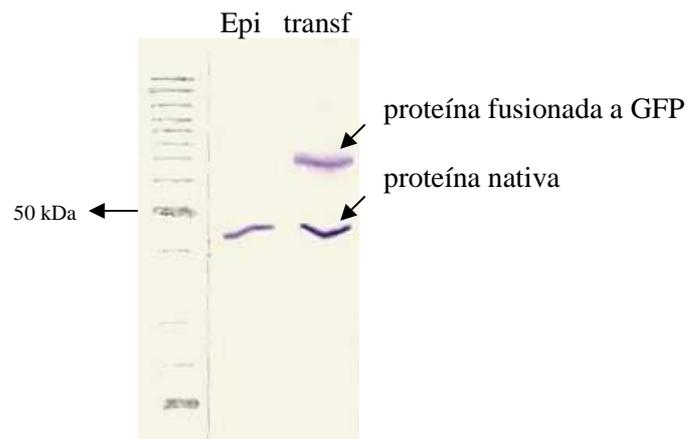


Figura 5.37. Western blot demonstrando a expressão da proteína TcExp02G03 fusionada ao GFP no *T. cruzi*, em comparação com a proteína nativa em formas epimastigotas não transfectadas. Os extratos protéicos de epimastigotas (epi) e transfectantes GFP (transf) foram normalizados por quantidade de células (5×10^6 células) e foram incubados com o soro anti-G03 purificado, diluído 1:100.

Observando a figura 5.38 podemos observar a localização celular da proteína TcExp02G03 recombinada a GFP. Ela está presente em uma região próxima ao núcleo, na região posterior do parasita.

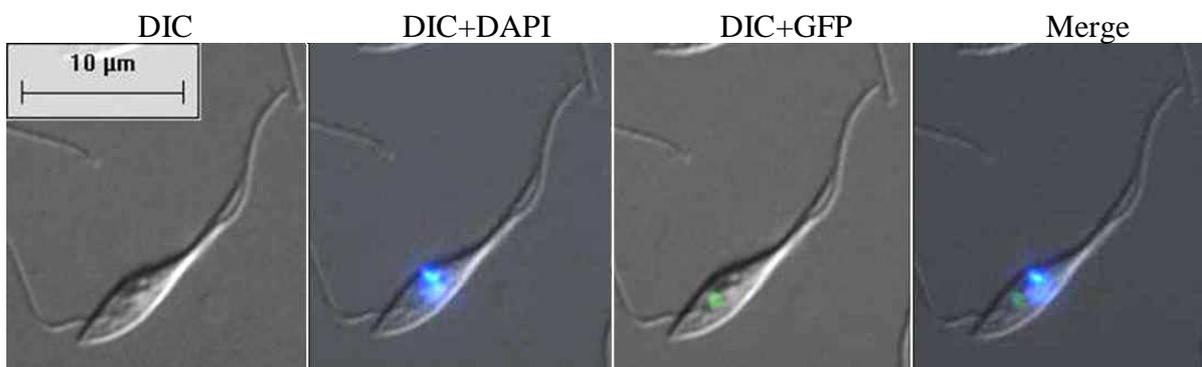


Figura 5.38. Localização da proteína TcExp02G03 fusionada a GFP no *T. cruzi*. Vide legenda da figura 5.19.

5.11.4. TcExp02G04 - 6869.t00042 - Domínio de ligação a DNA semelhante a Myb

A nomenclatura ‘Myb’ provém de ‘myeloblastosis’, um tipo de leucemia. Este domínio foi descoberto no oncogene v-Myb do vírus da mieloblastose aviária (*avian myeloblastosis virus* - AMV). O v-Myb foi criado a partir de uma inserção de um retrovírus em um proto-oncogene celular altamente conservado (c-Myb). Esse domínio semelhante a Myb, na proteína TcExp02G04 de 35,5 kDa, foi predito com uma confiabilidade de $9,1 \times 10^{-07}$ e está posicionado entre os aminoácidos 112-157 da sequência protéica (figura 5.39).

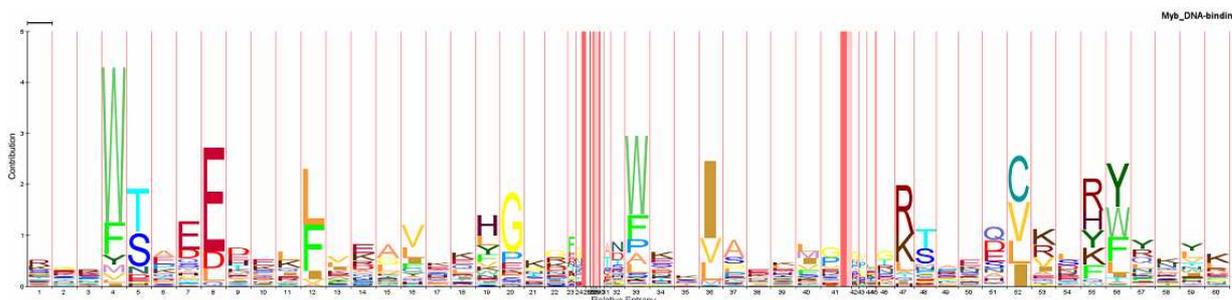


Figura 5.39. Grau de conservação dos aminoácidos no domínio de ligação ao DNA semelhante a Myb. Ver legenda da figura 5.33.

Proteínas com esse domínio se ligam ao DNA nuclear e provavelmente são responsáveis pela regulação da expressão gênica. O domínio foi encontrado em uma ampla gama de espécies, incluindo vertebrados, humanos (DOI-KATAYAMA *et al.*, 2005),

Drosophila melanogaster (KATZEN *et al.*, 1985) e *Zea mays* (MERCY *et al.*, 2003). Através de análises de alinhamento foram encontradas proteínas ortólogas nas espécies de *T. brucei* e *Leishmania*, sendo *L. infantum* a espécie que mais compartilha identidade com a de *T. cruzi* (50%). Entretanto, esta ainda se encontra sem descrição nos bancos de dados, denominada apenas como hipotética. O alinhamento também encontrou uma sequência de *L. amazonensis*. Segundo LIRA *et al.* (2007), através de estudos com a proteína LaTBP1 de *L. amazonensis* que possui o domínio semelhante a Myb, observou que este é responsável pela associação da proteína a regiões teloméricas ricas em GT. Além disso, por meio de ensaios de imunoprecipitação de cromatina, neste trabalho foi mostrado que este domínio se liga à dupla-fita de DNA.

Proteínas que se ligam a telômeros são importantes para a manutenção da estabilidade cromossômica, exercendo funções de regulação da telomerase. Por este motivo, elas são interessantes candidatos de estudo por serem potenciais alvos para agentes quimioterápicos. Proteínas teloméricas que se ligam a simples fita de DNA atuam como reguladores positivos na manutenção do telômero enquanto proteínas de ligação a fita dupla são na maioria dos casos, reguladores negativos (SMOGORZEWSKA & LANGE, 2004).

Na figura 5.40 está o alinhamento com as proteínas ortólogas dos tripanossomatídeos.

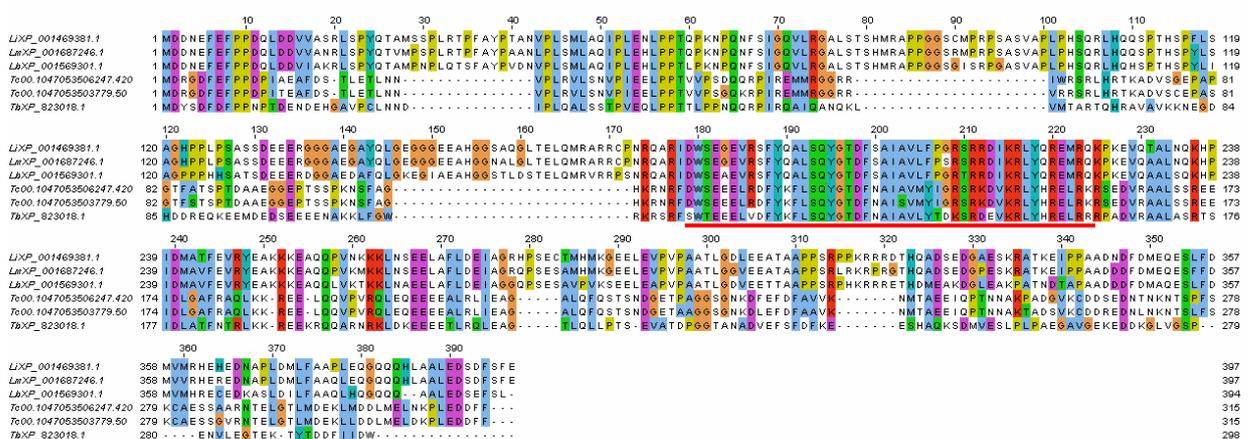


Figura 5.40. Alinhamento da proteína TcExp02G04 de *T. cruzi* com ortólogas de tripanossomatídeos. Pode-se ver no gráfico, o grau de conservação da proteína estudada entre as espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma brucei*. O domínio de ligação a DNA semelhante a Myb está sublinhado em vermelho. (Alinhamento retirado do banco de dados CruziGeneDB).

Na análise por *western blot* com o antissoro purificado podemos observar bandas de diferentes tamanhos, revelados tanto por fosfatase alcalina como por quimioluminescência, como pode ser visto nas figuras 5.41 e 5.42, respectivamente.

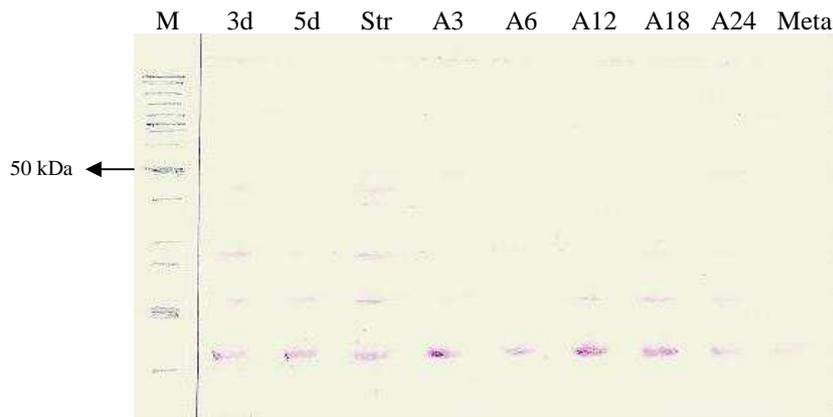


Figura 5.41. *Western blot* do soro purificado contra a proteína TcExp02G04 incubado com os extratos protéicos das formas envolvidas na metaciclogênese revelado por fosfatase alcalina. A diluição do soro foi de 1:100. Vide legenda da figura 5.12.

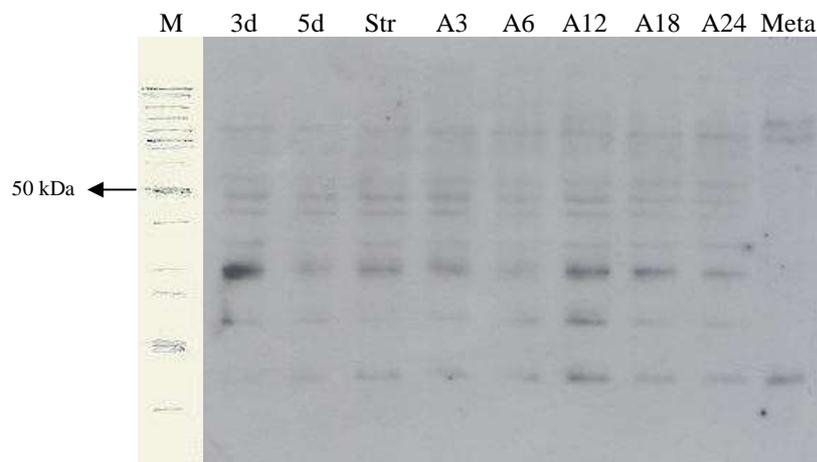


Figura 5.42. *Western blot* com os extratos das formas do *T. cruzi* obtidas no processo de metaciclogênese *in vitro* incubados com o soro anti-G04 revelado por quimioluminescência. A diluição do soro foi de 1:200. Vide legenda da figura 5.12.

O parasita, quando incubado com este soro purificado, nos experimentos de imunofluorescência, apresentou uma marcação espalhada por todo o corpo celular. Na imunofluorescência do pré-imune, uma região próxima ao flagelo foi reconhecida fracamente pelo anticorpo (figura 5.43).

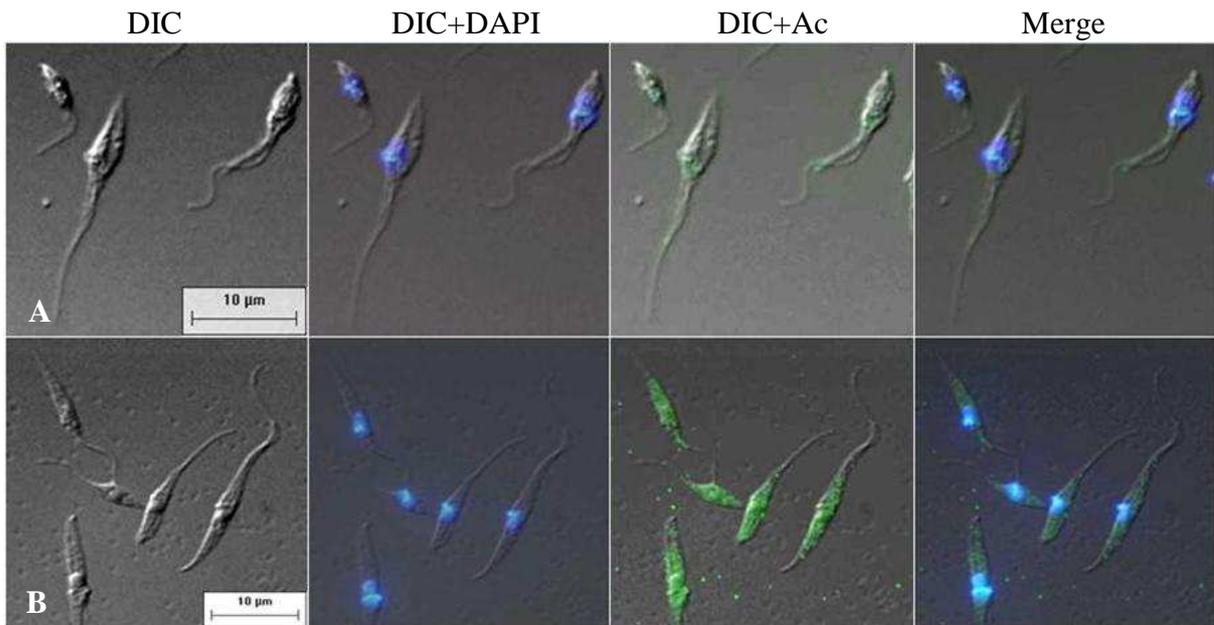


Figura 5.43. Imunofluorescência do soro pré (A) e pós-imune (B) purificado contra a proteína TcExp02G04. Vide legenda da figura 5.24.

O *western blot* realizado com o extrato de proteínas das células transfectadas apresentou duas bandas, comprovando a expressão da proteína fusionada a GFP (figura 5.44). Além disso, devido a diferença aproximada de 27 kDa entre as bandas presentes no extrato protéico da célula transfectada, pode-se inferir que o soro anti-G04 reconhece a proteína de interesse.

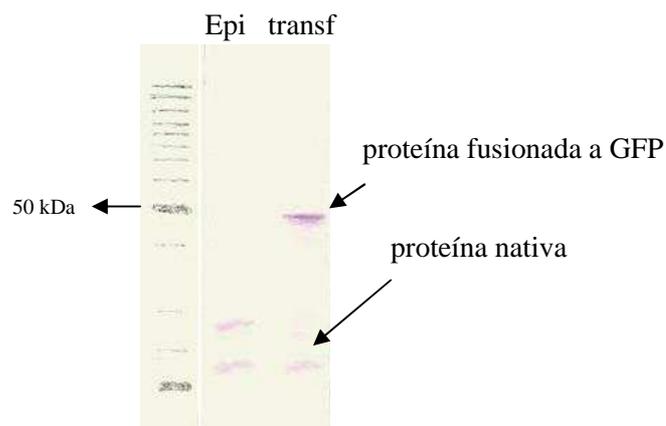


Figura 5.44. Western blot demonstrando a expressão da proteína TcExp02G04 fusionada ao GFP no *T. cruzi*, em comparação com a proteína nativa em formas epimastigotas não transfectadas. Os extratos protéicos de epimastigotas (epi) e transfectantes GFP (transf) foram normalizados por quantidade de células (5×10^6 células) e foram incubados com o soro anti-G04 purificado, diluído 1:100.

A fluorescência obtida com a proteína TcExp02G04 fusionada a GFP pode ser vista na figura 5.45. A sua localização nuclear dá suporte aos dados de que esta proteína possui um domínio de ligação ao DNA, como visto pelas análises prévias de bioinformática e pelas informações adquiridas através da literatura sobre este domínio. Nesse caso, enfatiza-se o resultado obtido com a localização da proteína recombinante, a qual está de acordo com trabalhos publicados até o momento sobre este domínio.

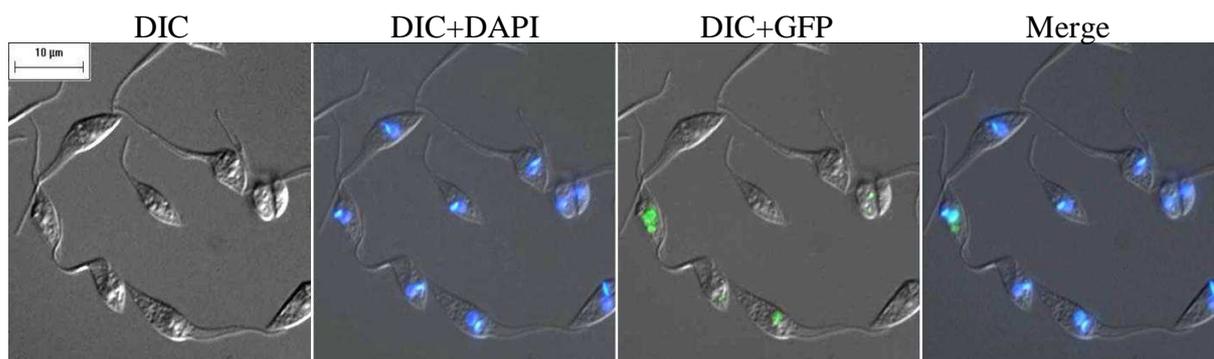


Figura 5.45. Localização nuclear da proteína TcExp02G04 fusionada a GFP no *T. cruzi*. Vide legenda da figura 5.19

Com o intuito de realizar ensaios complementares de caracterização da proteína TcExp02G04, foi realizada a clonagem deste gene no vetor pGEX-4T-1, visando obter a proteína na fração solúvel para experimentos de imunoprecipitação de cromatina, uma vez que esta proteína possui um domínio de interação com o DNA.

A amplificação do gene foi realizada com a enzima *PfuUltra high-fidelity DNA polymerase* (figura 5.46). A purificação do gene foi realizada através da excisão da banda de interesse para eliminar os produtos que não eram desejados.

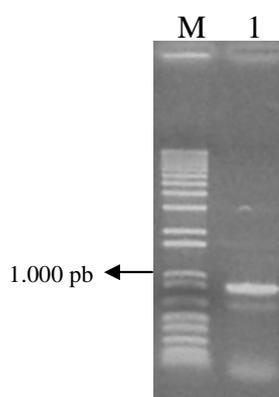


Figura 5.46. Gel de agarose contendo o gene TcExp02G04 amplificado por PCR para a clonagem no plasmídeo pGEX-4T-1. Na canaleta 1 observa-se uma banda referente a amplificação do gene TcExp02G04, com tamanho aproximado de 950 pb. M, marcador de massa molecular.

A digestão do gene e do pGEX-4T-1 foi feita com a enzima de restrição *EcoRI*. A ligação e transformação em *E. coli* DH5 α cálcio-competente foram obtidas com sucesso. Os clones foram selecionados por *toothpick* e os que se mostraram positivos foram submetidos a minipreparação para extração dos plasmídeos contendo o gene alvo do estudo. Então, os plasmídeos purificados foram transformados em células XL1-Blue cálcio-competentes para a realização dos testes de expressão protéica. Até o momento não foi obtida a expressão da proteína recombinante.

5.11.5. TcExp02G05 - 7189.t00016 - Domínio PX / Provável região RNP-1 eucariótica de ligação a RNA

O domínio PX (*phox* – *phagocyte oxidase*) é caracterizado por conter um motivo conservado rico em prolinas. Por essa razão, o domínio provavelmente interage com proteínas ricas em prolinas, como a proteína SH3 (KAY *et al.*, 2000). Além disso, o motivo PXXP (onde X é qualquer aminoácido) e a região flanqueadora de caráter básico da SH3 são bem conservados no domínio PX (HIROAKI *et al.*, 2001). Apesar de possuir relativamente pouca conservação aminoacídica (figura 5.47), este domínio parece ser estruturalmente bastante conservado. Ele é encontrado em leveduras até humanos, incluindo em *Saccharomyces cerevisiae* e *S. pombe*, organismos bastante estudados (PONTING, 1996). Na proteína de estudo, de 56,5 kDa, esse domínio foi predito com uma confiabilidade de 1×10^{-08} pelo banco de dados PFAM (figura 5.47). Ele está localizado na região amino-terminal da proteína, começando no aminoácido 1 e chegando até o 154 (figura 5.48).

Os domínios PX estão relacionados ao processo de sinalização celular, tráfego vesicular, endereçamento de proteínas e modificação de lipídeos. A via de sinalização intracelular parece ser exercida através de interações proteína-proteína promovidas através deste domínio (HIROAKI *et al.*, 2001).

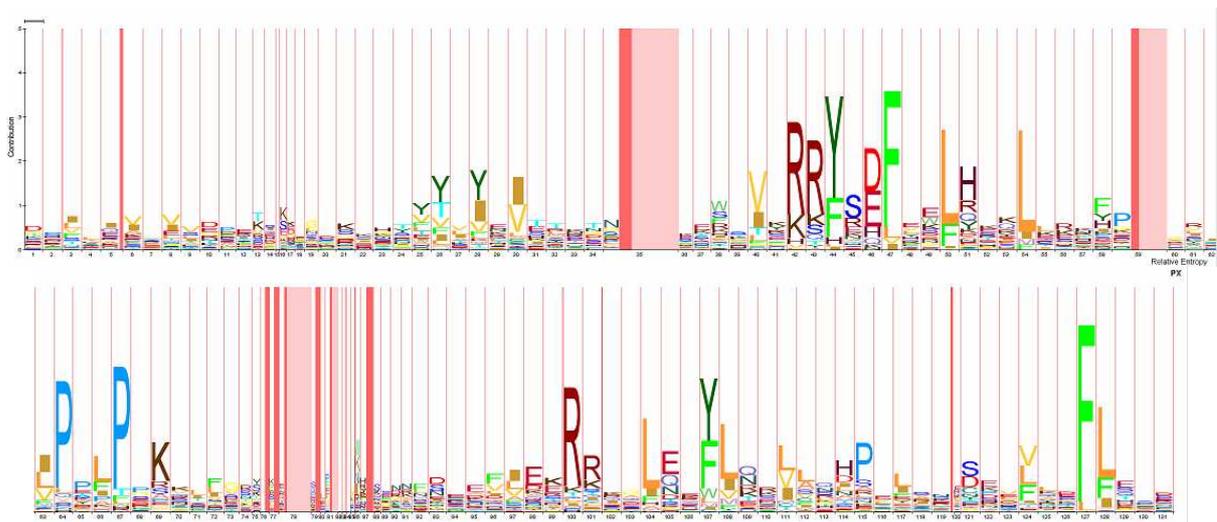


Figura 5.47. Grau de conservação dos aminoácidos no domínio PX. Ver legenda da figura 5.33.

Esse domínio de extensão aproximada de 130 aminoácidos dobra-se em três folhas- β seguidas de três α -hélices (BRAVO *et al.*, 2001; LU *et al.*, 2002). Ele interage especificamente a fosfoinosítídeos, sendo o fosfatidilinositol-3-fosfato o alvo primário dessa estrutura, seguido pelo fosfatidilinositol-3,4-bifosfato (CHEEVER *et al.*, 2001; ELLSON *et al.*, 2001; KANAI *et al.*, 2001; XU *et al.*, 2001). A ligação a estes compostos é realizada através de resíduos de carga positiva encontrados no domínio da proteína (CHEEVER *et al.*, 2001). Dados de localização celular revelam que um número significativo de proteínas com o domínio PX se localiza em membranas ou estruturas vesiculares (SCHULTZ *et al.*, 2000).

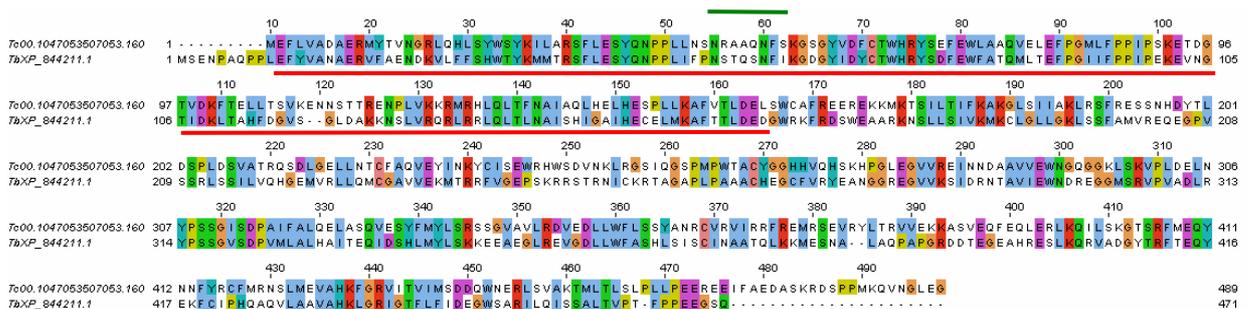


Figura 5.48. Alinhamento da proteína TcExp02G05 de *T. cruzi* com a ortóloga em *T. brucei*. Pode-se ver no gráfico, o grau de conservação da proteína estudada entre os tripanossomas. O domínio PX está sublinhado em vermelho. O domínio de Provável região RNP-1 eucariótica de ligação a RNA está demarcado abaixo da linha verde. (Alinhamento retirado do banco de dados CruzeiGeneDB).

O segundo domínio da proteína TcExp02G05 é a Provável região RNP-1 eucariótica de ligação a RNA (figura 5.48). Esse domínio foi encontrado por análises de similaridade no Prosite. Presente em várias proteínas eucarióticas, ele é um domínio de ligação a RNA

simples fita de aproximadamente 90 aminoácidos de tamanho. Nesta proteína estudada o domínio foi encontrado com uma extensão de 8 aminoácidos, correspondendo ao motivo RNP-1 de domínios de ligação a RNA. A família RRM (*RNA recognition motif*) contém esse motivo e está presente em proteínas envolvidas na regulação do *splicing* alternativo, em componentes de snRNPs (*small nuclear ribonucleoproteins*) e em proteínas que regulam a estabilidade e tradução do RNA.

O soro purificado contra a proteína TcExp02G05, nos ensaios de *western blot*, reconheceu algumas bandas, sendo uma delas, a proteína de tamanho esperado de aproximadamente 56 kDa, demonstrando que antissoro reconheceu a proteína de interesse (figura 5.49). Na revelação por quimioluminescência (figura 5.50) foi possível verificar a presença de bandas adicionais em relação à marcação observada por fosfatase alcalina, talvez, devido ao uso de extratos protéicos diferentes nestes dois ensaios.

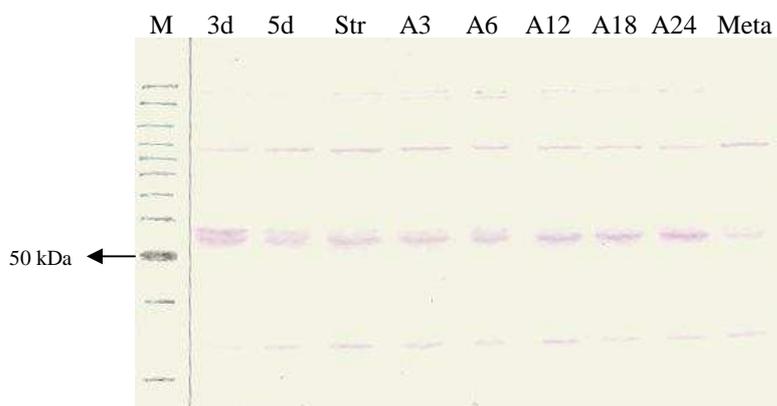


Figura 5.49. *Western blot* do soro purificado contra a proteína TcExp02G05 incubado com os extratos protéicos das formas envolvidas na metaciclogênese revelado por fosfatase alcalina. A diluição do soro foi de 1:100. Vide legenda da figura 5.12.

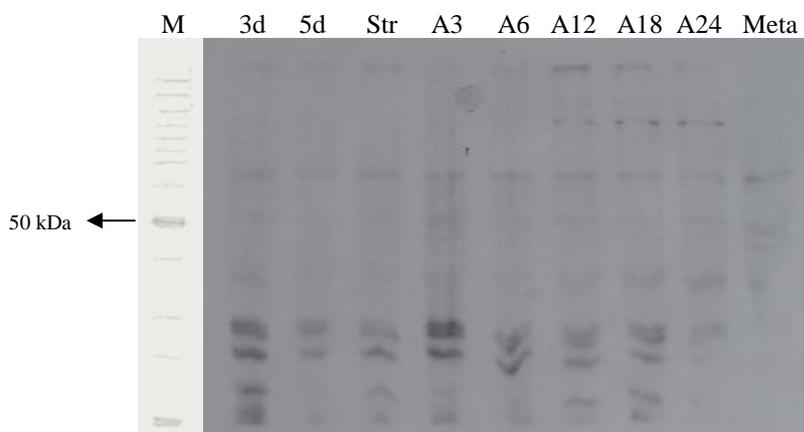


Figura 5.50. *Western blot* com os extratos das formas do *T. cruzi* obtidas no processo de metaciclogênese *in vitro* incubados com o soro anti-G05 revelado por quimioluminescência. A diluição do soro foi de 1:200. Vide legenda da figura 5.12.

Na imunofluorescência houve a marcação de todo o citoplasma do parasita, ou seja, a célula apresentou pequenos grânulos por todo o corpo celular (figura 5.51B). Nas imagens utilizando o soro pré-imune houve o reconhecimento de uma região próxima ao flagelo do organismo, aparentemente a bolsa flagelar (figura 5.51A).

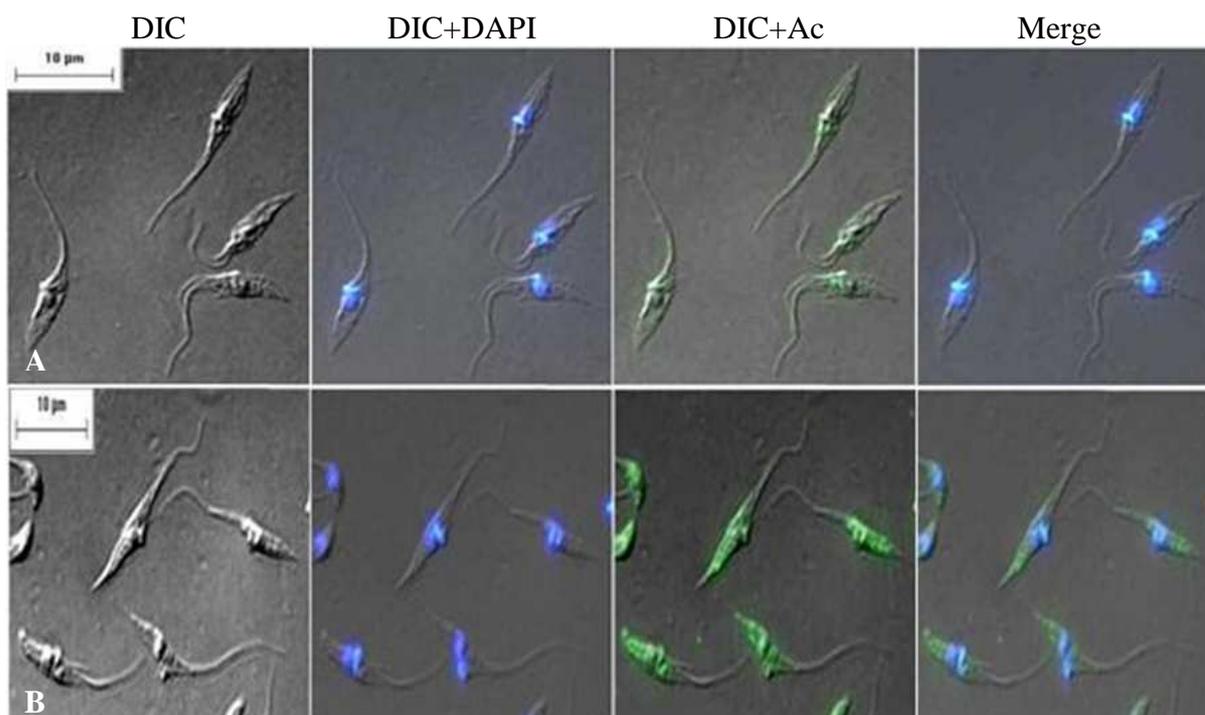


Figura 5.51. Imunofluorescência com o soro pré (A) e pós-imune (B) contra a proteína TcExp02G05. Vide legenda da figura 5.24.

Em relação aos transfectantes, no *western blot* comparando a forma transfectada com os epimastigotas, observou-se a expressão da proteína recombinada a GFP em quantidade maior que a nativa. Acredita-se que a banda de tamanho aproximado de 90 kDa seja referente a proteína recombinante, pois esta é ~27 kDa maior que a proteína nativa, reforçando a idéia de que o soro purificado reconhece o polipeptídeo desejado. No extrato protéico de epimastigotas não transfectados também é possível verificar a presença da proteína nativa, embora na impressão ela não esteja visível (figura 5.52).

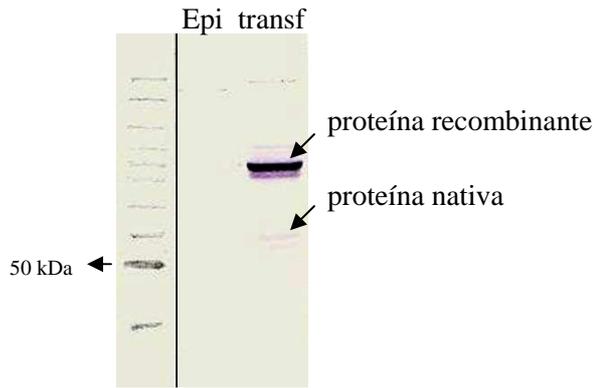


Figura 5.52. *Western blot* demonstrando a expressão da proteína TcExp02G05 fusionada a GFP no *T. cruzi*, em comparação com a proteína nativa em formas epimastigotas não transfectadas. Os extratos protéicos de epimastigotas (epi) e transfectantes GFP (transf) foram normalizados por quantidade de células (5×10^6 células) e foram incubados com o soro anti-G05 purificado, diluído 1:100.

Esta proteína mostrou-se localizada em uma região perto do núcleo, podendo ser observada a presença de um grânulo no citoplasma da célula (figura 5.53).

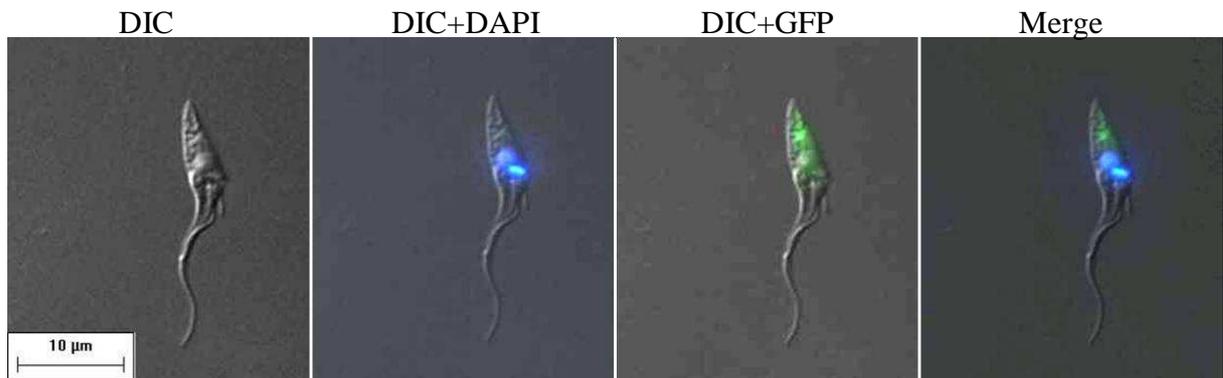


Figura 5.53. Localização da proteína TcExp02G05 fusionada a GFP no *T. cruzi*. Vide legenda da figura 5.19.

5.11.6. TcExp02G06 - 7970.t00016 - Domínio PH

A proteína TcExp02G06 de 91,8 kDa contém o domínio homólogo a pleckstrina (PH - *pleckstrin homology*) na posição 391 - 485 da proteína. Este domínio foi predito pelo PFAM com uma probabilidade de $3,2 \times 10^{-15}$ e foi descoberto primeiramente na proteína denominada pleckstrina, um substrato da proteína quinase C.

O domínio homólogo a pleckstrina é encontrado apenas em eucariotos e ocorre em proteínas envolvidas na sinalização celular, em constituintes do citoesqueleto ou relacionado

ao endereçamento de proteínas para membrana plasmática. Serina/treonina quinases, tirosina quinases, reguladores da proteína G são alguns exemplos onde este domínio está presente.

Segundo LEMMON e colaboradores (2001) a identidade entre os domínios PH é baixa, variando de 10% a 30% nos melhores casos. Apesar de este domínio mostrar pouca conservação nos aminoácidos (figura 5.54), ele possui um dobramento comum constituído de duas folhas- β antiparalelas seguidas por uma α -hélice na região C-terminal. As voltas que conectam as folhas- β diferem muito em comprimento, tornando o domínio PH difícil de ser identificado. A especificidade na ligação com lipídeos ocorre através das voltas ou inserções na região N-terminal do domínio PH, regiões estas que não são conservadas. Portanto, a ligação a lipídeos apresenta pouca especificidade (HURLEY & MISRA, 2000). Domínios PH da pleckstrina e de várias outras proteínas ligam-se a vesículas de lipídeos que contêm o fosfoinosítido fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (MAFFUCCI & FALASCA, 2001). Na figura 5.55 é possível verificar o grau de conservação aminoacídica na sequência da proteína.

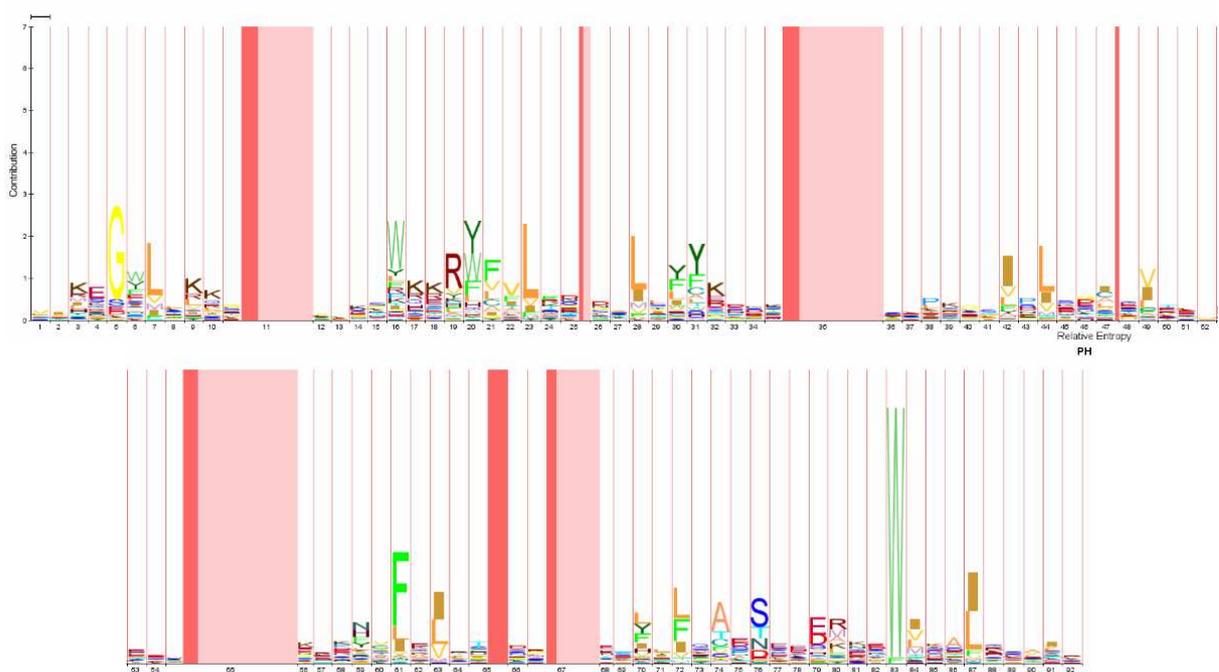


Figura 5.54. Grau de conservação dos aminoácidos no domínio PH. Ver legenda da figura 5.33.

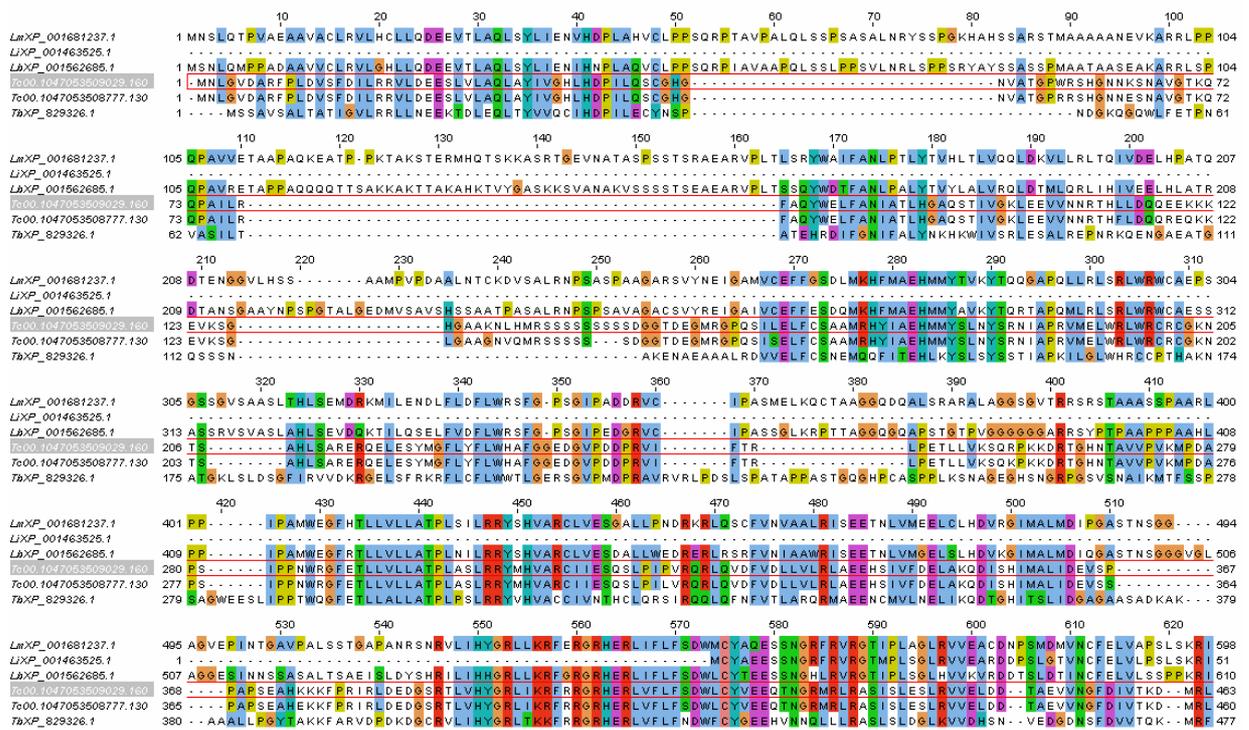


Figura 5.55. Alinhamento da proteína TcExp02G06 de *T. cruzi* com as ortólogas nos tripanossomatídeos *Leishmania* e *Trypanosoma*. Pode-se ver na figura, o baixo grau de conservação na região N-terminal da proteína estudada entre os tripanossomas. Em vermelho está a proteína TcExp02G06. (Alinhamento retirado do banco de dados *CruziGeneDB*).

Os experimentos de *western blot* com os extratos protéicos da metaciclógenese e as imunofluorescências não foram realizados, pois não foram obtidos os anticorpos para esta proteína.

Apenas os ensaios com o transfectante foram feitos. O *western blot* foi incubado com o anticorpo anti-GFP para detecção da etiqueta adicionada a proteína. Na figura 5.56 podemos observar uma banda relativa a proteína TcExp02G06 truncada (~45 kDa), como previsto pelo sequenciamento do gene clonado em pDONRTM221.

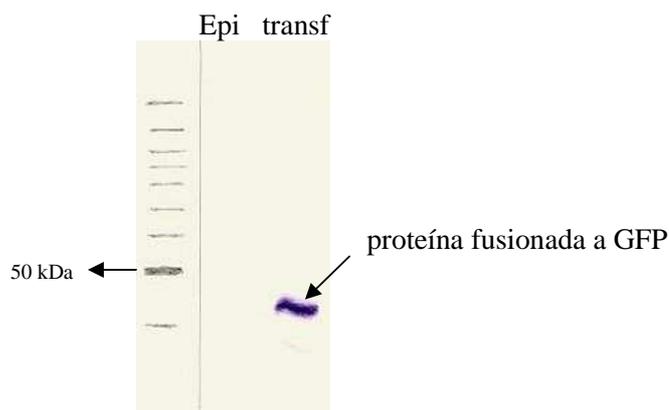


Figura 5.56. Western blot demonstrando a expressão da proteína TcExp02G06 fusionada a GFP no *T. cruzi*, em comparação com a proteína nativa em formas epimastigotas não transfectadas. Os extratos protéicos de epimastigotas (epi) e transfectantes GFP (transf) foram normalizados por quantidade de células (5×10^6 células) e foram incubados com o soro anti-GFP diluído 1:100.

Na localização celular da proteína recombinante, obteve-se a fluorescência de uma região próxima ao núcleo celular, conforme a figura 5.57.

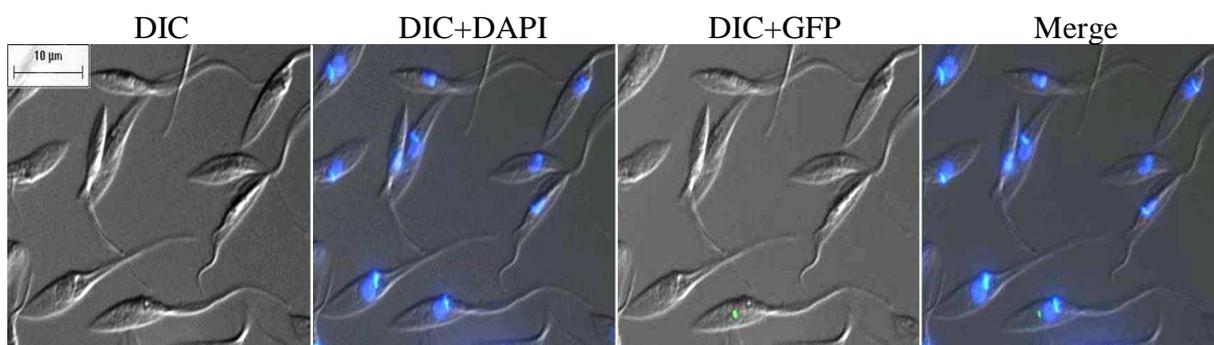


Figura 5.57. Localização da proteína TcExp02G06 fusionada a GFP no *T. cruzi*. Vide legenda da figura 5.19.

5.11.7. TcExp02G07 - 8015.t00008 - RNA metiltransferase, família TrmH

O domínio nesta proteína de 45,1 kDa foi identificado através do banco de dados PFAM com uma probabilidade de $2,2 \times 10^{-10}$. Através da observação da figura 5.58, pode-se verificar que existem alguns aminoácidos bastante conservados neste domínio. Na proteína TcExp02G07 o domínio tem início na posição 193 e se estende até o aminoácido 393 (figura 5.59).

O gene spoU está localizado no quarto quadro de leitura aberto (ORF - *open reading frame*) do operon spo da bactéria *E. coli* (GENTRY *et al.*, 1993). Deste operon bacteriano, o gene estudado é o único que ainda permanece sem caracterização.

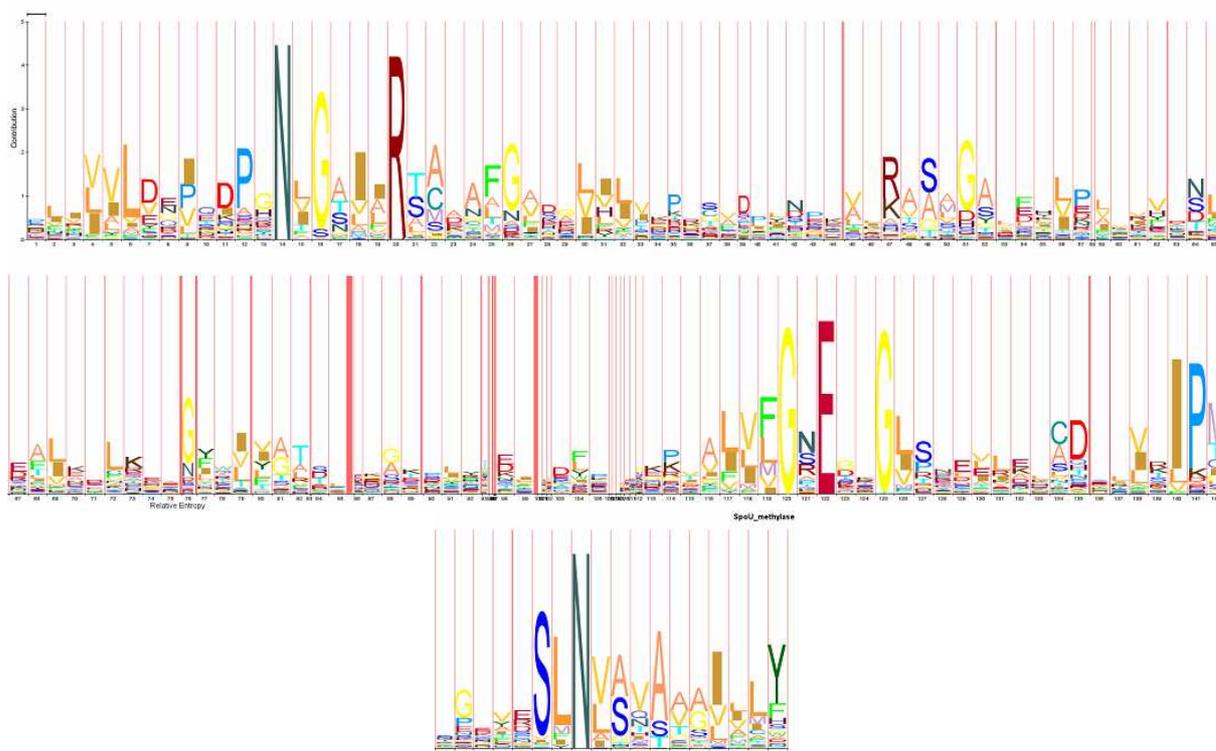


Figura 5.58. Conservação dos aminoácidos presentes no domínio RNA metiltransferase, família TrmH. Ver legenda da figura 5.33.

As informações a respeito da função desse domínio ainda são confusas. Alguns autores sugerem que este domínio esteja relacionado a modificação de tRNAs. Outros, com a modificação de rRNAs. Por exemplo, através da deleção do gene spoU foi visto que este é necessário para a atividade tRNA (Gm18) 2'-O-metiltransferase, ou seja, que essa ORF é responsável pela metilação 2'-hidroxil da guanosina (Gm) no resíduo 18 de tRNAs de *Escherichia coli* (PERSSON *et al.*, 1997). Por esse motivo, o autor sugeriu a renomeação do gene spoU para trmH (*tRNA methylation*). Outros trabalhos mostraram que, por comparação de sequência, o gene SpoU apresentou similaridade com uma rRNA metilase de *Streptomyces aureus* (BIBB *et al.*, 1985). Além disso, foi verificada a presença de um motivo composto por duas glicinas precedidas de aminoácidos hidrofóbicos (região destacada em azul na figura 5.59), o qual se assemelha ao motivo de ligação a S-adenosilmetionina, conservado em várias metiltransferases (INGROSSO *et al.*, 1989; KOONIN *et al.*, 1993).

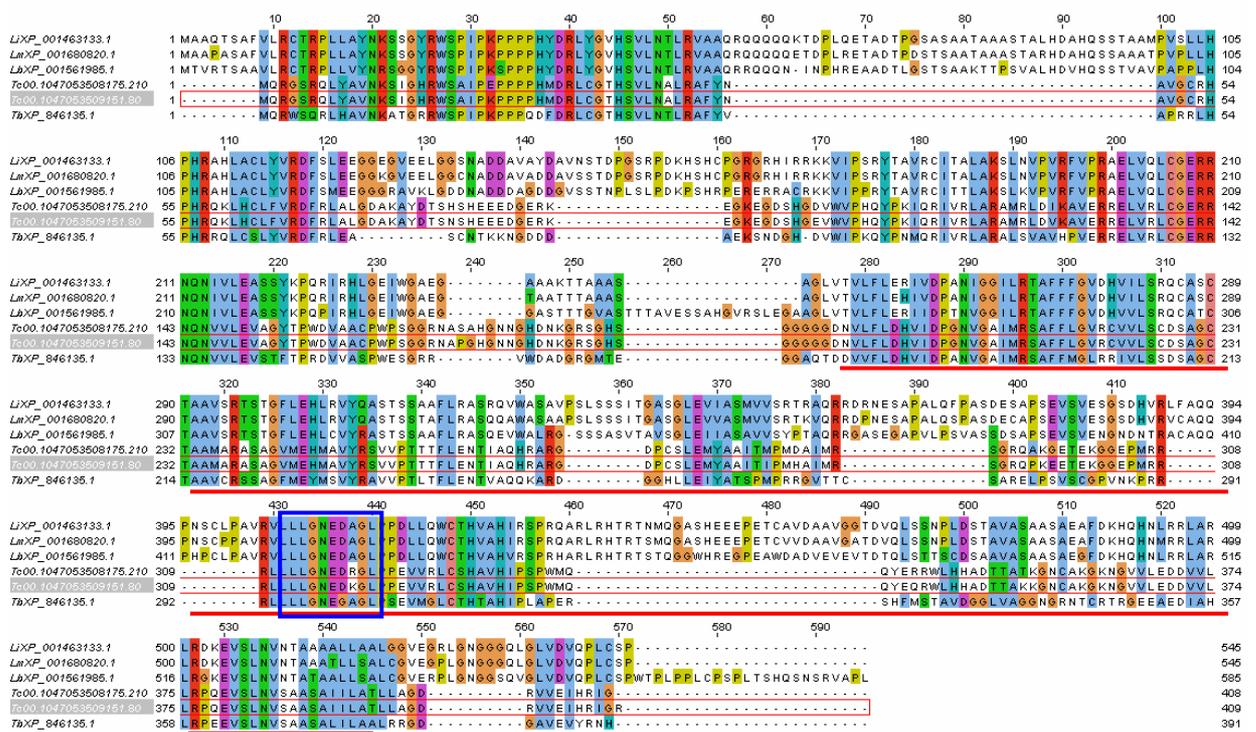


Figura 5.59. Alinhamento da proteína TcExp02G07 de *T. cruzi* com as ortólogas em *Leishmania* e *Trypanosoma brucei*. Pode-se ver na figura, o grau de conservação na região do domínio entre os tripanossomatídeos. É possível notar que existem inserções presentes apenas no gênero *Leishmania* em relação ao *Trypanosoma*. Em vermelho está a proteína TcExp02G07 e em sublinhado está o domínio RNA metiltransferase, família TrmH. (Alinhamento retirado do banco de dados *CruziGeneDB*).

Os extratos protéicos dos parasitas em diferenciação, envolvidos na metacicloênese, foram reconhecidos pelo soro purificado anti-G07. A técnica de revelação por fosfatase alcalina (figura 5.60), assim como a revelação por quimioluminescência (figura 5.61) apresentou mais de uma banda reconhecida.

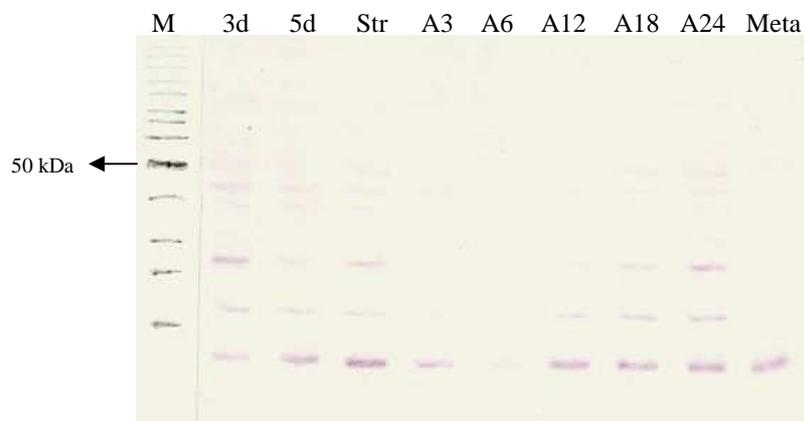


Figura 5.60. Western blot do soro purificado contra a proteína TcExp02G07 incubado com os extratos protéicos das formas envolvidas na metacicloênese revelado por fosfatase alcalina. A diluição do soro foi de 1:100. Vide legenda da figura 5.12.

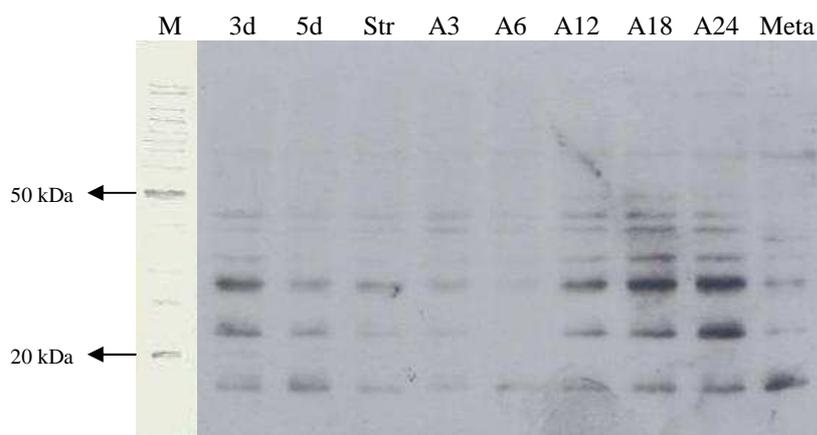


Figura 5.61. *Western blot* com os extratos das formas do *T. cruzi* obtidas no processo de metaciclôgênese *in vitro* incubados com o soro anti-G07 revelado por quimioluminescência. A diluição do soro foi de 1:150. Vide legenda da figura 5.12.

Nos ensaios de imunolocalização, para o soro pré-imune não houve o reconhecimento de estruturas do *T. cruzi*. No entanto, a localização utilizando o soro purificado contra a proteína TcExp02G07 apresentou-se difusa por toda a célula do organismo (figura 5.62).

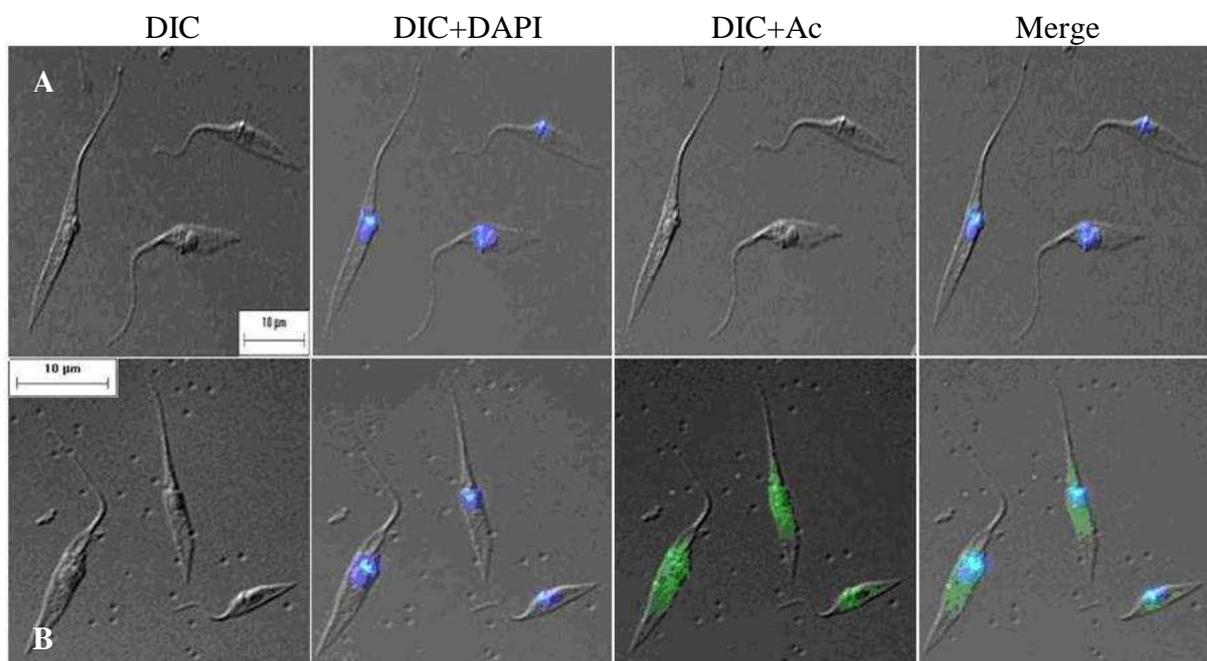


Figura 5.62. Imunofluorescência do soro pré (A) e pós-imune (B) contra a proteína TcExp02G07. Vide legenda da figura 5.24.

A análise por *western blot* das células transfectadas com o gene TcExp02G07 presente no vetor pTcPR-GFPN foi revelado com o anticorpo específico contra a proteína de interesse.

Foi verificada a presença de uma banda de aproximadamente 50 kDa a qual acredita-se que seja a proteína nativa, uma vez que também houve o reconhecimento de uma proteína ~27 kDa maior, de aproximadamente 85 kDa, referente à recombinação da mesma com GFP (figura 5.63). Isso indica que o soro contra a proteína G07 foi capaz de reconhecer a proteína alvo do estudo. Além disso, nesta mesma figura, observou-se que a proteína recombinante foi expressa em maior quantidade que a proteína nativa.

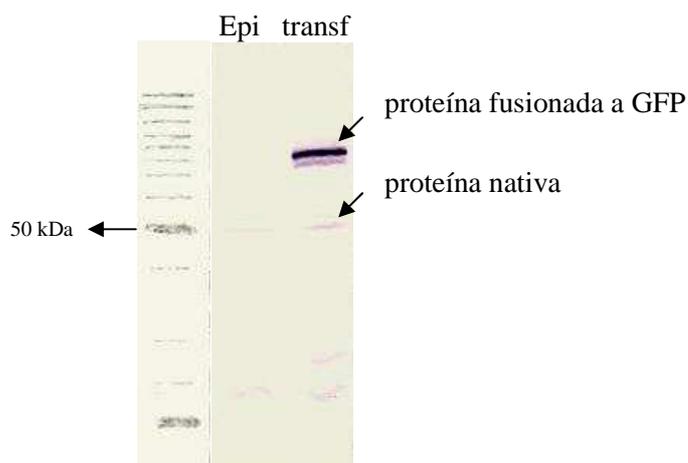


Figura 5.63. *Western blot* demonstrando a expressão da proteína TcExp02G07 fusionada ao GFP no *T. cruzi*, em comparação com a proteína nativa em formas epimastigotas não transfectadas. Os extratos protéicos de epimastigotas (epi) e transfectantes GFP (transf) foram normalizados por quantidade de células (5×10^6 células) e foram incubados com o soro anti-G07 purificado, diluído 1:100.

A proteína TcExp02G07 recombinada com GFP localiza-se na região posterior ao núcleo das formas epimastigotas do parasita pelos ensaios de microscopia óptica de fluorescência, como visto na figura 5.64.

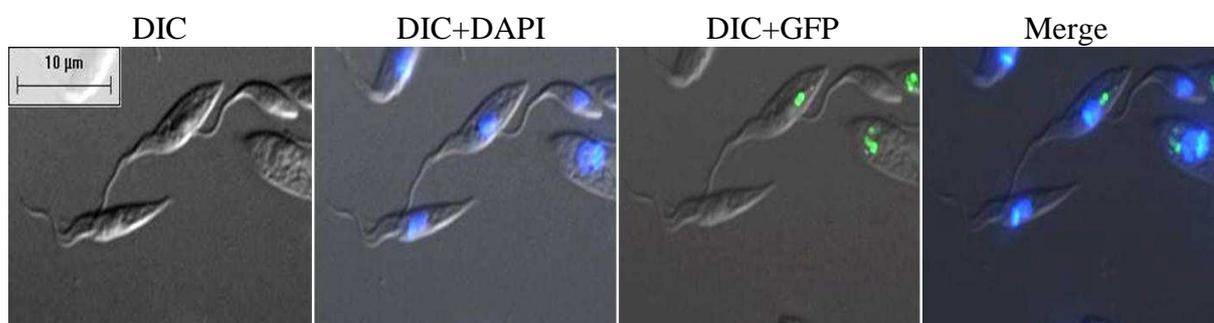


Figura 5.64. Localização da proteína TcExp02G07 fusionada a GFP no *T. cruzi*. Vide legenda da figura 5.19.

5.11.8. TcExp02G08 - 8257.t00047 - Família Spc97/Spc98

A proteína TcExp02G08 possui o tamanho estimado de 74,7 kDa. O domínio da família Spc97/Spc98 presente nesta proteína é bastante extenso (figura 5.65). Este domínio se estende do aminoácido 1 ao 494 da proteína e foi encontrado através de análises de alinhamento no banco PFAM com uma probabilidade de $5,8 \times 10^{-05}$. O alinhamento da proteína estudada com ortólogas em *T. brucei* e *Leishmania* pode ser visto na figura 5.66.

Componentes do centrossomo, como as proteínas Spc97, Spc98 e a gama-tubulina são constituintes dessa família. Em *S. cerevisiae* essas três proteínas formam um complexo protéico (KNOP *et al.*, 1997; KNOP & SCHIEBEL, 1997). Em leveduras, o centrossomo funciona como um centro organizador de microtúbulos, sendo portanto, responsável pela organização celular, segregação de cromossomos durante a divisão da célula e tráfego vesicular (GUNAWARDANE *et al.*, 2000).

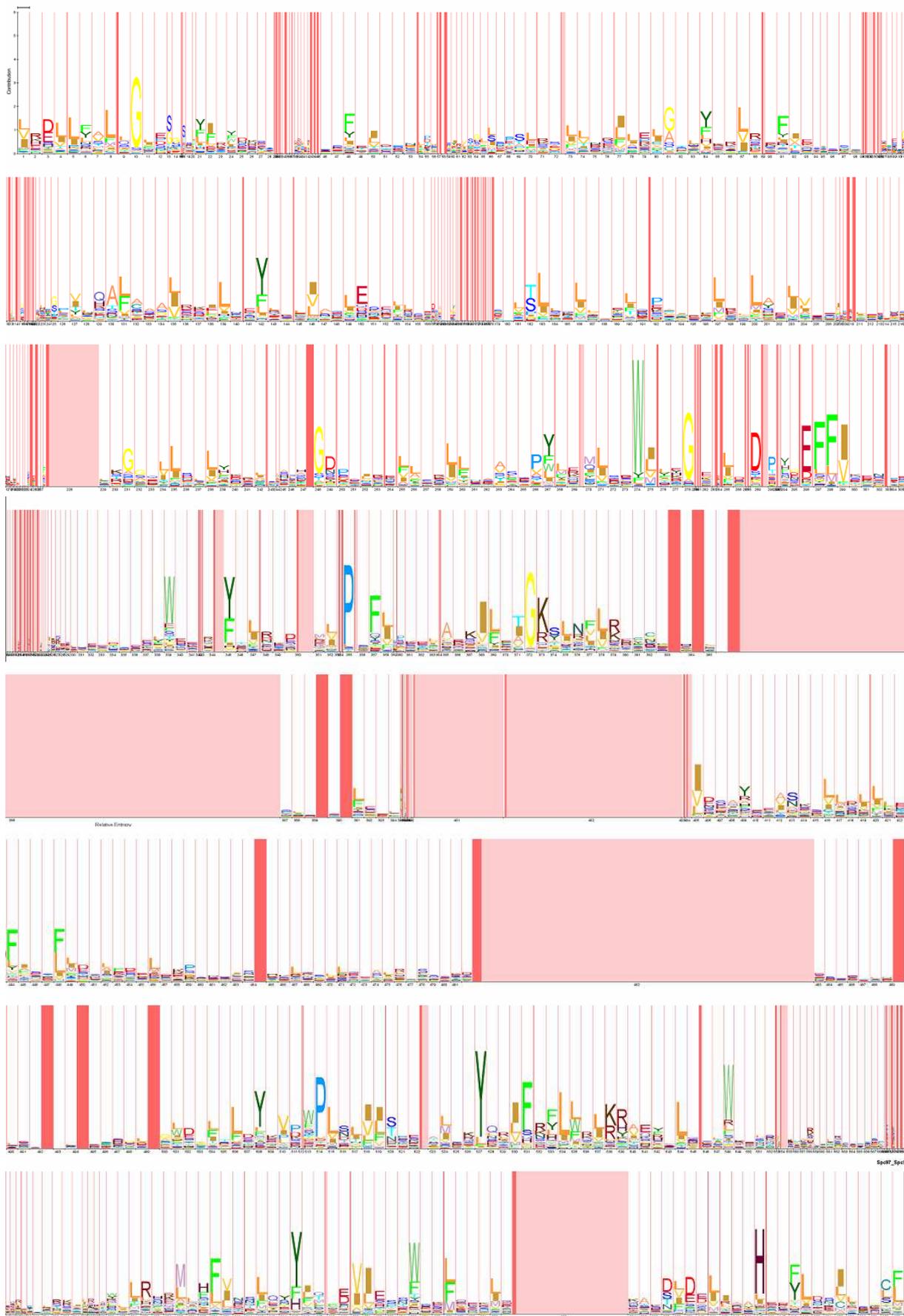


Figura 5.65. Conservação dos aminoácidos presentes no domínio da família Spc97/Spc98. Ver legenda da figura 5.33.

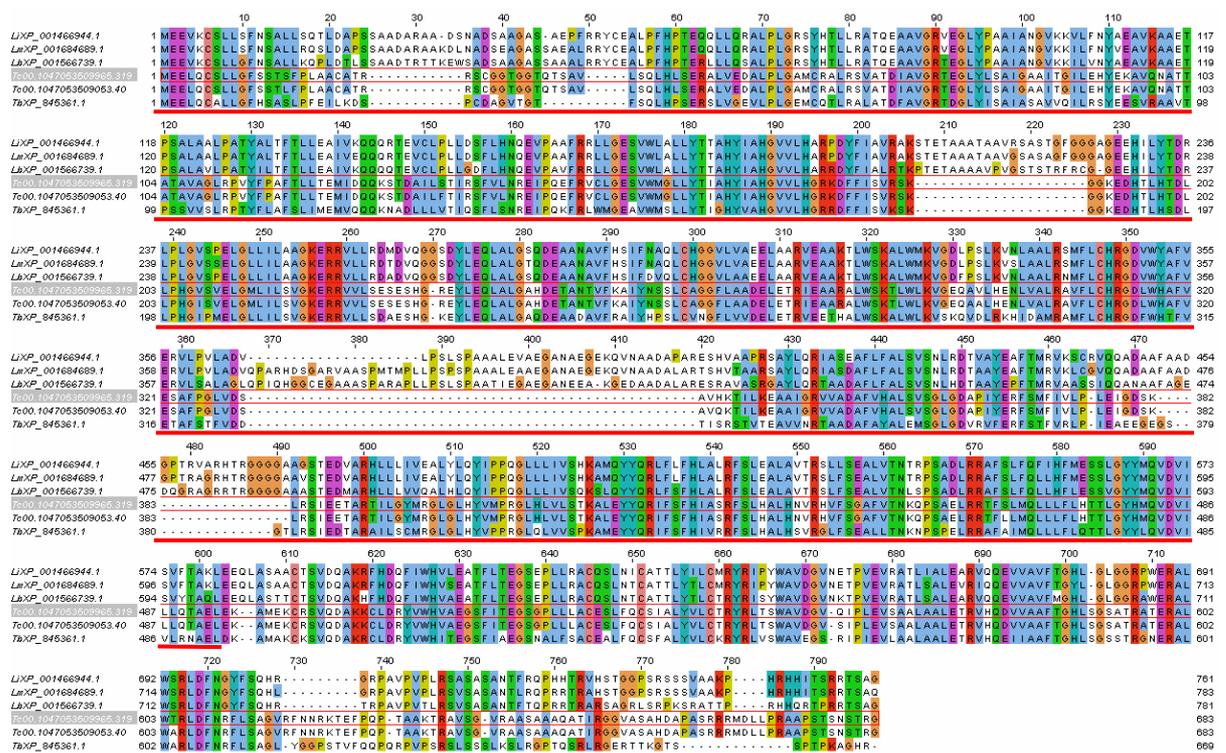


Figura 5.66. Alinhamento da proteína TcExp02G08 de *T. cruzi* com as ortólogas em *Leishmania* e *T. brucei*. A figura mostra o grau de conservação da proteína de interesse entre os tripanossomatídeos. A proteína TcExp02G08 está em destaque. O domínio da família Spc97/Spc98 encontra-se sublinhado em vermelho. (Alinhamento retirado do banco de dados CruzeGeneDB).

Com o soro anti-G08 purificado foram realizados *western blots*, os quais foram revelados por fosfatase alcalina (figura 5.67) e quimioluminescência (figura 5.68). Em ambas as metodologias, o resultado observado foi semelhante. Nesses ensaios é possível observar uma banda de ~74 kDa relativa a proteína nativa de interesse.

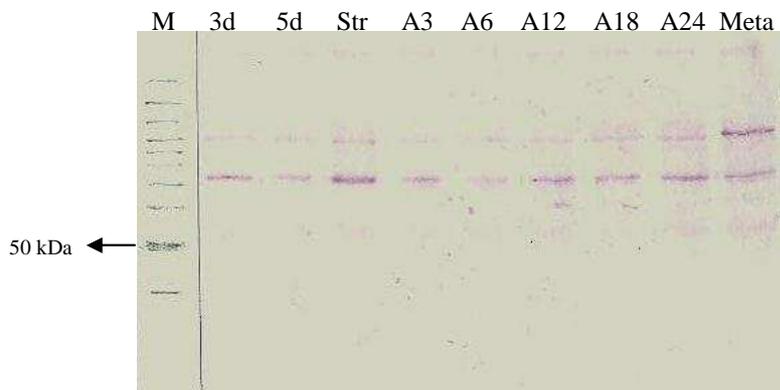


Figura 5.67. *Western blot* do soro purificado contra a proteína TcExp02G08 incubado com os extratos protéicos das formas envolvidas na metaciclo gênese revelado por fosfatase alcalina. A diluição do soro foi de 1:250. Vide legenda da figura 5.12.

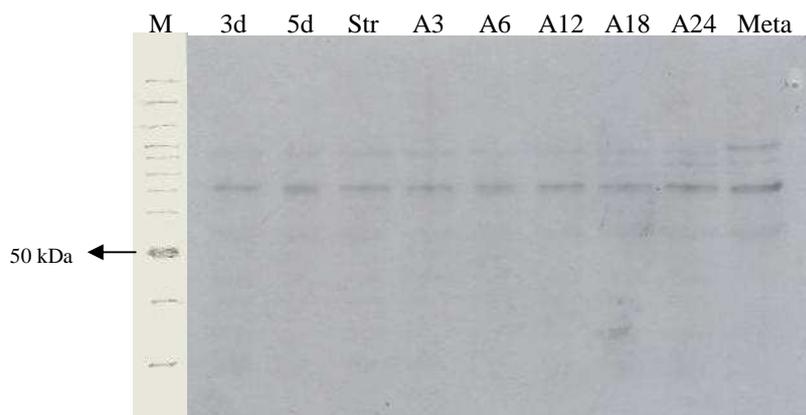


Figura 5.68. *Western blot* com os extratos das formas do *T. cruzi* obtidas no processo de metaciclogênese *in vitro* incubados com o soro anti-G08 revelado por quimioluminescência. A diluição do soro foi de 1:350. Vide legenda da figura 5.12.

Quanto a localização celular da proteína nativa nas formas epimastigotas, o soro imune purificado reconheceu todo o parasita. O soro pré-imune não reagiu com nenhuma proteína do modelo de estudo (figura 5.69).

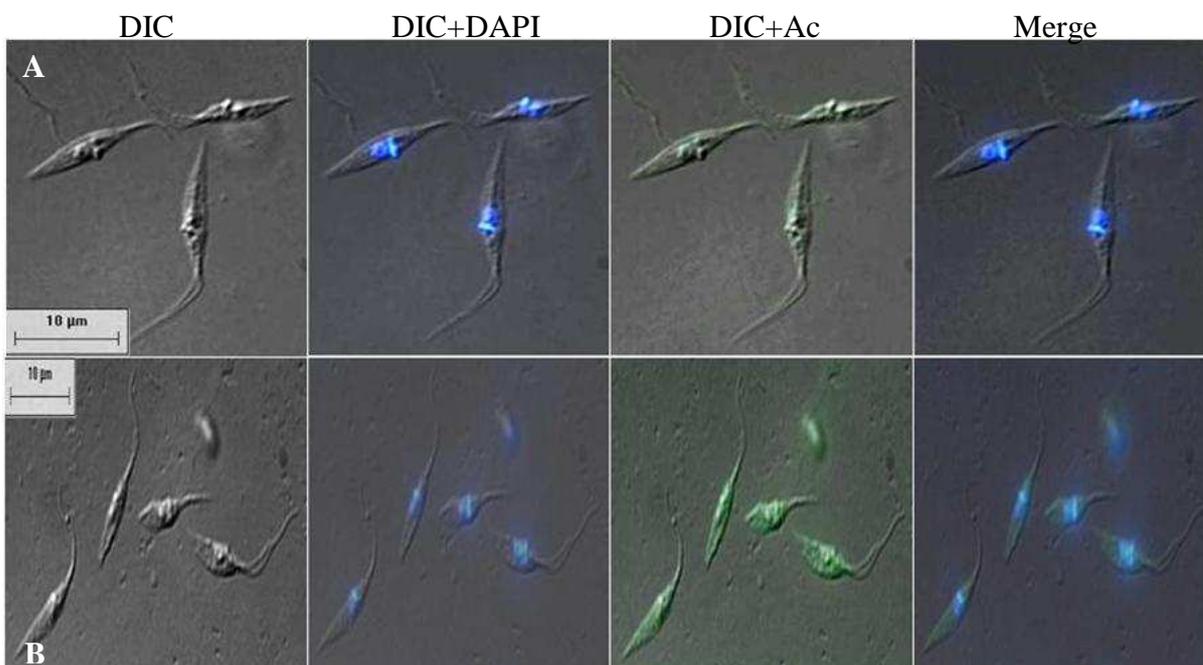


Figura 5.69. Imunofluorescência do soro pré (A) e pós-imune (B) contra a proteína TcExp02G08. Vide legenda da figura 5.24.

Considerando o *western blot* de expressão da proteína recombinada a GFP nas formas epimastigotas transfectadas, observa-se a presença de uma proteína em maior quantidade que a proteína nativa (figura 5.70). Supõe-se que esta banda refere-se à proteína recombinante,

pois esta se encontra ~27 kDa acima da banda da proteína nativa. Esses dados confirmam que o antissoro anti-G08 reconhece o polipeptídeo de interesse no extrato protéico do parasita.

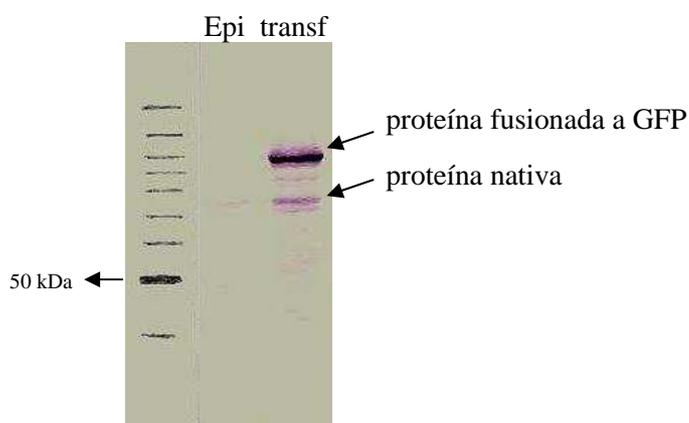


Figura 5.70. *Western blot* demonstrando a expressão da proteína TcExp02G08 fusionada a GFP no *T. cruzi*, em comparação com a proteína nativa em formas epimastigotas não transfectadas. Os extratos protéicos de epimastigotas (epi) e transfectantes GFP (transf) foram normalizados por quantidade de células (5×10^6 células) e foram incubados com o soro anti-G08 purificado, diluído 1:100.

De acordo com os ensaios com a proteína recombinada a GFP, esta proteína mostrou-se localizada em uma região perto do núcleo e cinetoplasto, podendo ser observada a presença de um grânulo no interior do parasita (figura 5.71).

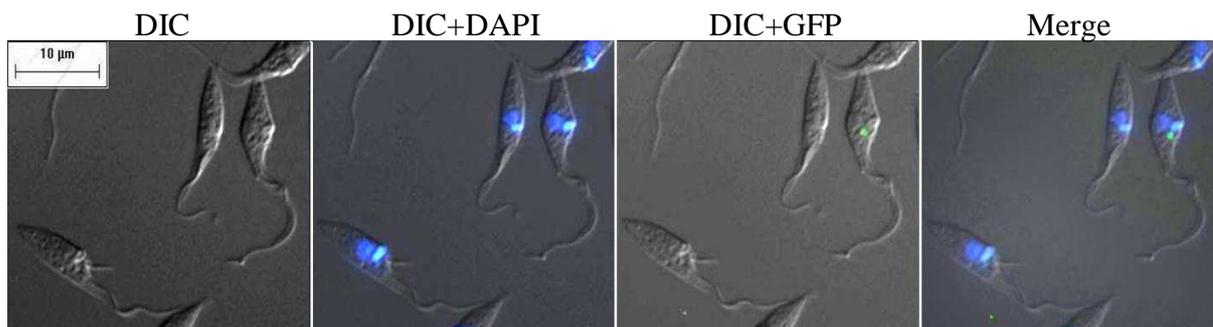


Figura 5.71. Localização da proteína TcExp02G08 fusionada a GFP no *T. cruzi*. Vide legenda da figura 5.19.

5.11.9. TcExp02G09 - 8773.t00029 - Domínio PH / Domínio PH

Esta proteína apresenta o mesmo domínio descrito para a proteína TcExp02G06. No entanto, a proteína TcExp02G09 contém dois domínios PH, o que é raro. Dois domínios PH na mesma proteína só foram encontrados na pleckstrina. Os dois domínios foram encontrados com a mesma probabilidade de $3,9 \times 10^{-14}$ pelo PFAM. O primeiro está presente entre os aminoácidos 14 e 105, enquanto o segundo é achado entre os aminoácidos 114 e 205 (figura 5.72).

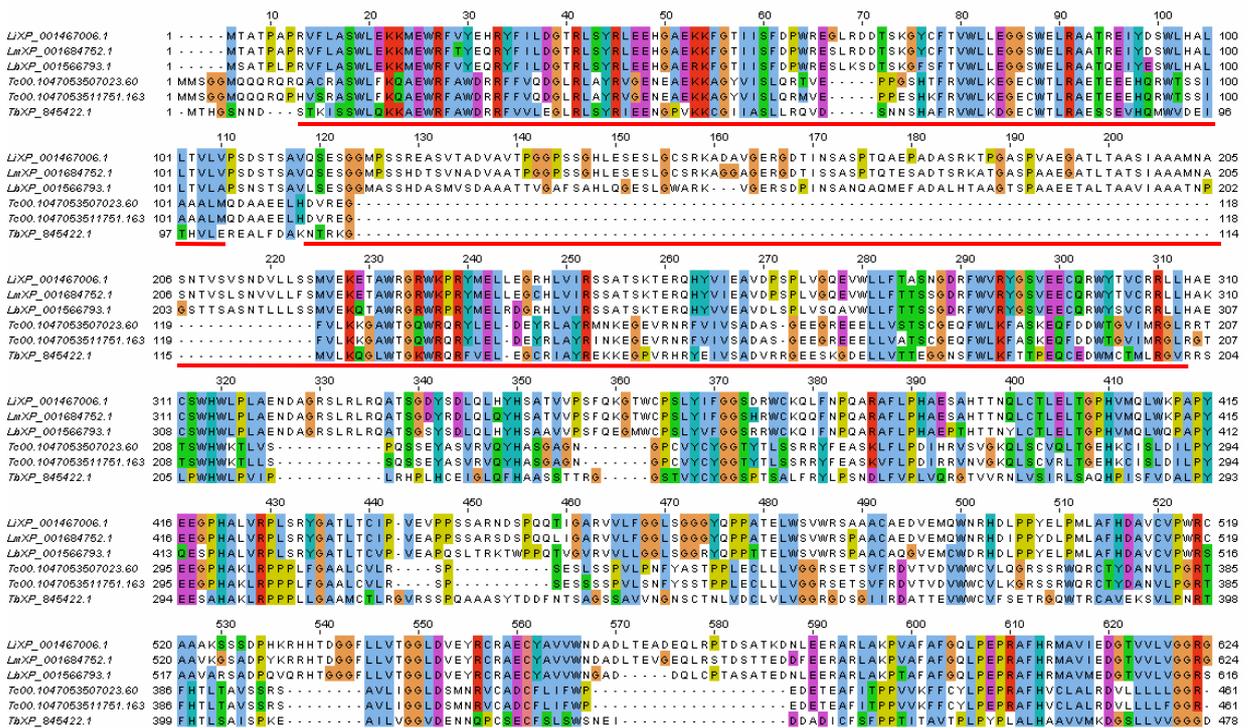


Figura 5.72. Alinhamento da proteína TcExp02G09 de *T. cruzi* com as ortólogas em *Leishmania* e *T. brucei*. Pode-se ver na figura, sublinhados em vermelho, os dois domínios PH na região N-terminal da proteína em questão. (Alinhamento retirado do banco de dados CruzGeneDB).

Como o antissoro contra esta proteína não foi obtido, não há os dados resultantes de imunofluorescência e de *western blot*. Pelas análises do sequenciamento, o gene clonado não apresentou-se truncado e aproximadamente 20% da cultura apresentou-se fluorescente quando analisada por citometria de fluxo. No entanto, no ensaio de *western blot* com os extratos protéicos dos transfectantes, quando utilizado o anticorpo anti-GFP, a proteína recombinante não foi detectada.

Realizamos os experimentos de localização celular da proteína através da etiqueta GFP e observamos que existia a emissão de fluorescência em grandes vesículas próximas ao núcleo celular, o que *a priori* poderiam ser proteínas acumuladas nos reservossomos (figura 5.73).

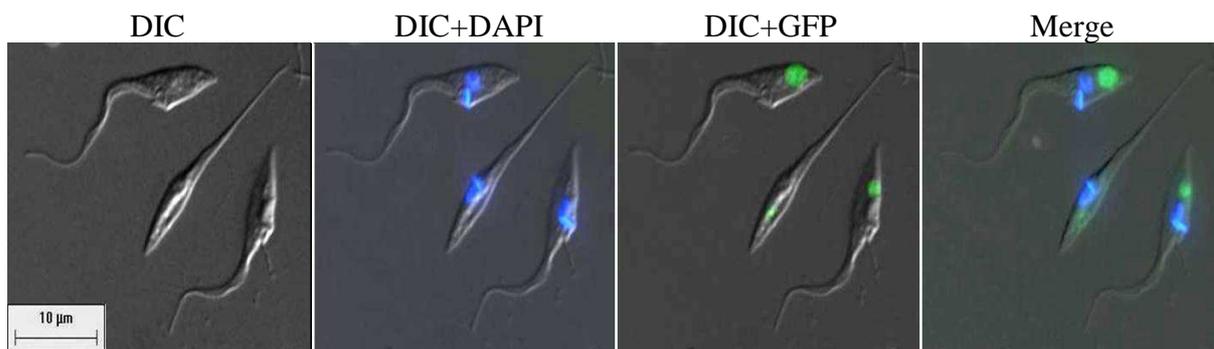


Figura 5.73. Localização da proteína TcExp02G09 fusionada a GFP no *T. cruzi*. Vide legenda da figura 5.19

5.11.10. TcExp02G10 - 8825.t00032 - RNA metiltransferase, família TrmH

Esta proteína contém o mesmo domínio descrito para a proteína TcExp02G07. Uma breve descrição acerca dele está presente no item 5.11.7., incluindo a conservação aminoacídica do domínio (figura 5.59). Focando na presente proteína de tamanho esperado de 41,8 kDa, o domínio inicia-se na posição do aminoácido 172 e termina na 342, sendo predito com uma probabilidade de $7,6 \times 10^{-06}$ no banco de dados PFAM. No alinhamento das proteínas ortólogas dos tripanossomatídeos, percebe-se que em determinadas regiões há extensões encontradas somente nas espécies de *Leishmania* quando comparadas com as sequências de *Trypanosoma* (figura 5.74).

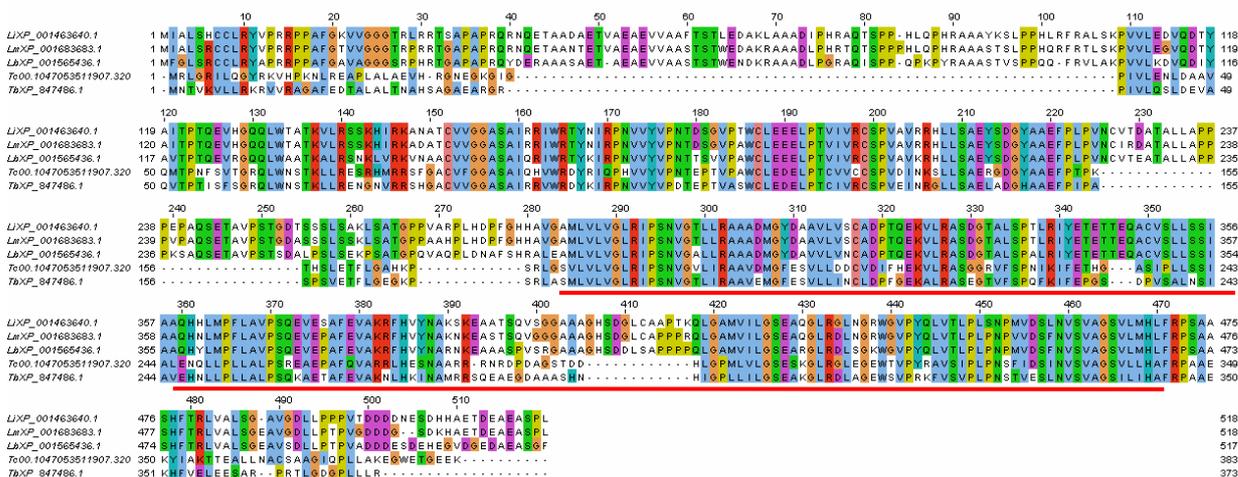


Figura 5.74. Alinhamento da proteína TcExp02G10 de *T. cruzi* com as ortólogas nos tripanossomatídeos *Leishmania* e *T. brucei*. Pode-se ver na figura o domínio RNA metiltransferase na proteína estudada sublinhado em vermelho. As três primeiras sequências do alinhamento são as espécies *Leishmania infantum*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, respectivamente. Logo abaixo são encontradas as sequências protéicas do *Trypanosoma cruzi* e *T. brucei*. (Alinhamento retirado do banco de dados CruzGeneDB).

Com o soro anti-G10 purificado foram realizados *western blots* contra os extratos protéicos dos parasitas encontrados em diferentes fases durante o processo de metaciclogênese. A revelação por fosfatase alcalina resultou no reconhecimento de algumas proteínas, como mostrado na figura 5.75. Dentre elas, visualiza-se uma banda de aproximadamente 40 kDa que pode ser a proteína de estudo. As bandas reconhecidas pela revelação por quimioluminescência apresentaram um padrão diferente do verificado pela fosfatase alcalina (figura 5.76). Este fato pode ser explicado, pois extratos diferentes foram utilizados para cada ensaio.

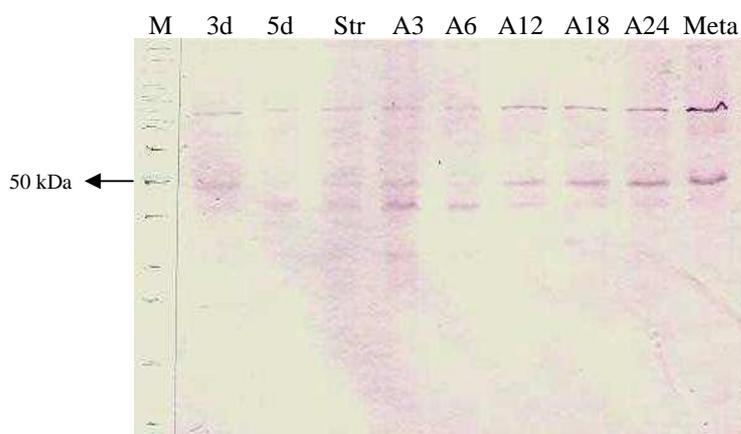


Figura 5.75. *Western blot* do soro purificado contra a proteína TcExp02G10 incubado com os extratos protéicos das formas envolvidas na metaciclogênese revelado por fosfatase alcalina. A diluição do soro foi de 1:300. Vide legenda da figura 5.12.

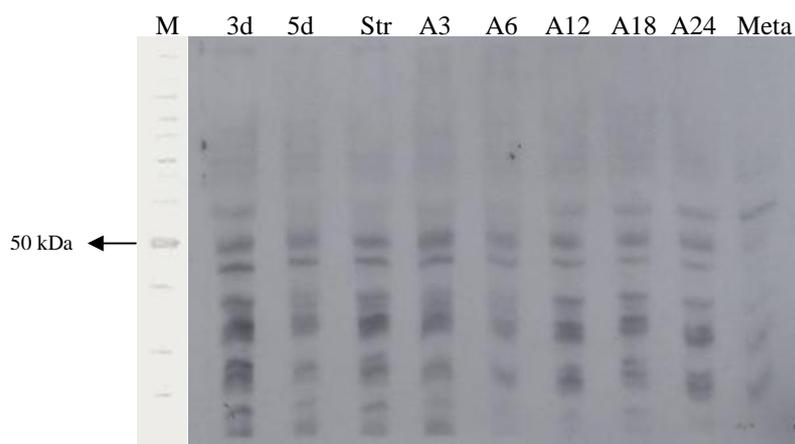


Figura 5.76. *Western blot* com os extratos das formas do *T. cruzi* obtidas no processo de metaciclogênese *in vitro* incubados com o soro anti-G10 revelado por quimioluminescência. A diluição do soro foi de 1:300. Vide legenda da figura 5.12.

Nos experimentos de imunolocalização, o soro pré-imune TcExp02G10 apresentou muito fracamente, fluorescência na região próxima ao flagelo do organismo. Com o anticorpo pós-imune purificado contra a proteína TcExp02G10 foi obtida uma localização nuclear, como esperado para proteínas portadoras do domínio spoU metilase, de modificação de RNAs (figura 5.77).

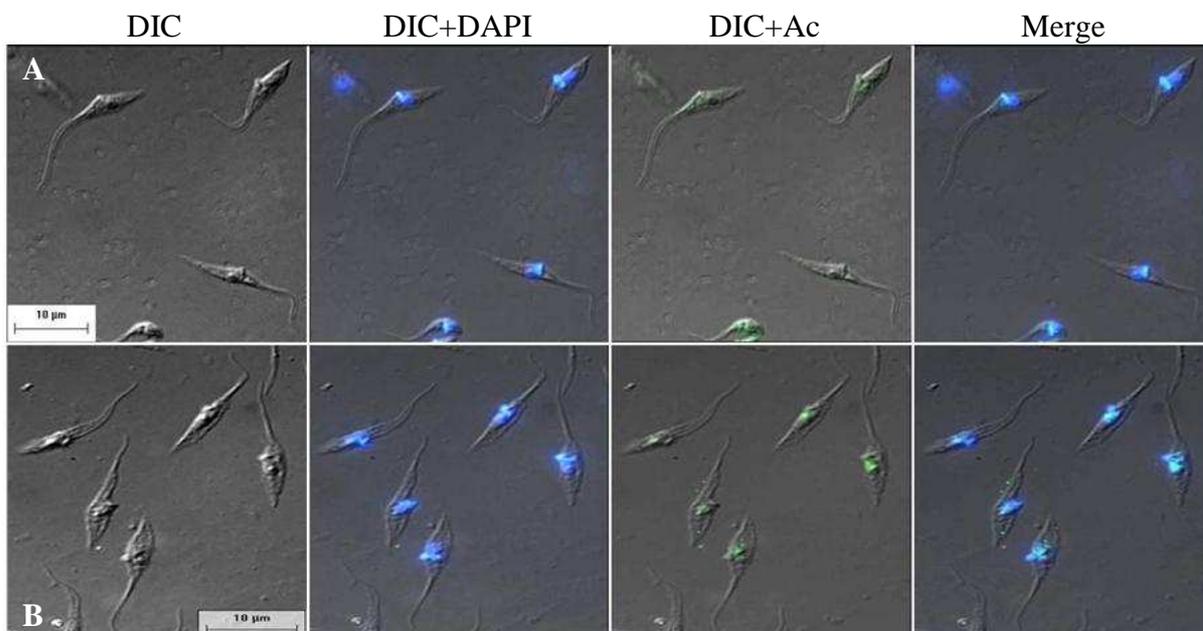


Figura 5.77. Imunofluorescência do soro pré (A) e pós-imune (B) contra a proteína TcExp02G10. Vide legenda da figura 5.24.

Em relação aos parasitas transfectados, no *western blot* foram reconhecidas as mesmas proteínas nos extratos protéicos da cultura transfectada com o vetor pTcPR-GFPN e no extrato de células não transfectadas. Portanto, por este método não foi possível identificar se houve a expressão da proteína fusionada ao GFP no tamanho esperado (figura 5.78). A ausência da banda relativa à proteína fusionada a GFP pode ser explicada pela baixa quantidade de células fluorescentes detectadas na análise por citometria de fluxo (quadro 5.2).

Nesta mesma figura há uma banda de tamanho aproximado de 40 kDa que foi reconhecida pelo soro purificado anti-G10, a qual provavelmente representa a proteína de estudo. Pouco acima desta encontra-se outra banda, a qual pode ser a mesma proteína modificada após sua tradução.

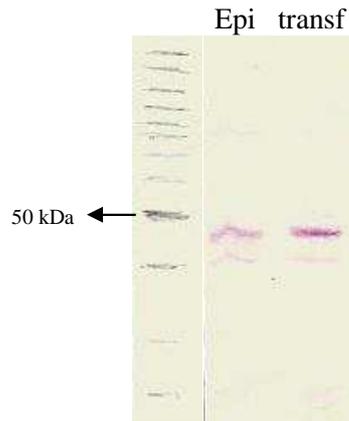


Figura 5.78. Western blot demonstrando a expressão da proteína TcExp02G10 fusionada ao GFP no *T. cruzi*, em comparação com a proteína nativa em formas epimastigotas não transfectadas. Os extratos protéicos de epimastigotas (epi) e transfectantes GFP (transf) foram normalizados por quantidade de células (5×10^6 células) e foram incubados com o soro anti-G10 purificado diluído 1:300.

Nos experimentos de localização celular através da fluorescência emitida pelo GFP, a proteína TcExp02G10 foi localizada perto do núcleo, na região posterior da célula (figura 5.79).

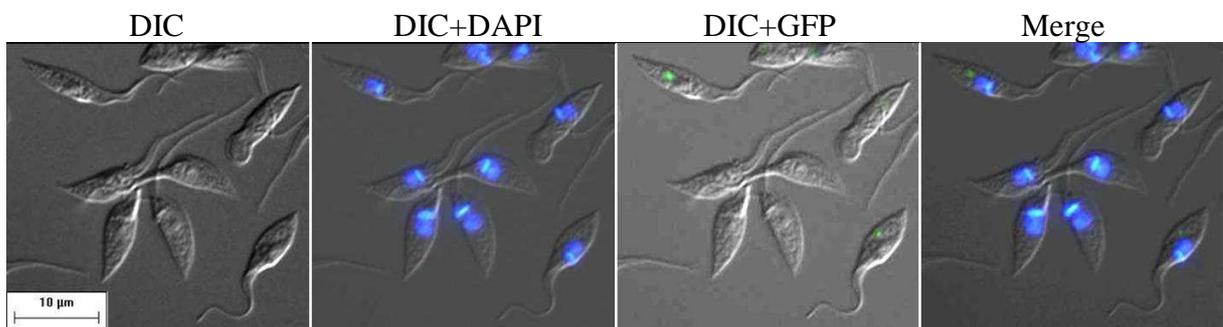


Figura 5.79. Localização da proteína TcExp02G10 fusionada a GFP no *T. cruzi*. Vide legenda da figura 5.19.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Selecionamos para o presente trabalho 10 proteínas hipotéticas conservadas contendo domínios identificados para auxiliar no processo de caracterização. O fato destas proteínas possuírem ortólogas nos tripanossomatídeos ainda fornece maior confiabilidade nos dados de que estas ORFs realmente são genes funcionais. A expressão das proteínas (exceto TcExp02G06 e TcExp02G09) foi realizada e os antissoros contra elas foram obtidos. Os resultados de *western blot*, nos quais, a princípio, as proteínas do *T. cruzi* foram reconhecidas pelos seus respectivos anticorpos nos extratos protéicos, confirmam que as proteínas são realmente expressas e existentes no parasita.

As informações a respeito dos domínios que estas proteínas selecionadas portam foram de grande ajuda para a inferência da função e localização celular das mesmas. Contudo, pouca ou nenhuma informação sobre essas proteínas do *T. cruzi* é existente. Com este trabalho foi possível dar início a uma caracterização prévia dessas proteínas de função desconhecida, consistindo um passo importante para o desenvolvimento de novos estudos visando a caracterização funcional destas.

O processo de clonagem dos 10 genes, utilizando a plataforma Gateway, foi concluído com êxito e se mostrou uma etapa relativamente fácil quando comparada com a metodologia de clonagem clássica, que faz uso de endonucleases de restrição. A disponibilidade de uso dessa plataforma facilita e torna o procedimento de clonagem bastante rápido e eficaz, possibilitando o desenvolvimento de trabalhos em larga escala. Além disso, o Gateway é um sistema de clonagem extremamente versátil que permite a transferência de genes entre diferentes vetores de destinação, os quais são bastante úteis para a caracterização funcional de genes.

Um dos pontos cruciais deste trabalho foi a produção dos antissoros. Neste trabalho, foram encontradas dificuldades na obtenção dos anticorpos, ou seja, em alguns antissoros havia anticorpos contra, a princípio, proteínas que não eram a de interesse, uma vez que nos ensaios de *western blot* contra os extratos protéicos das formas envolvidas na metaciclogênese, bandas de tamanho diferente do esperado foram observadas. Por esse motivo, etapas de purificação dos soros foram realizadas. No entanto, este procedimento acarretou na diluição dos soros e aparentemente não removeu os anticorpos a princípio indesejados. Daí a decisão de produzir novamente as proteínas e reinoculá-las.

Porém, analisando apenas os *western blots* das proteínas fusionadas a GFP revelados com os respectivos antissoros purificados, nos ensaios realizados após as várias inoculações, quando comparado o tamanho das proteínas nativa e recombinante dos epimastigotas

transfectados, pode-se observar que a primeira é aproximadamente 27 kDa menor que a segunda, massa esta referente à proteína GFP. Isso demonstra que os soros purificados poderiam estar reconhecendo especificamente as proteínas de interesse e que estas, em *T. cruzi*, poderiam possuir um peso molecular diferente do predito, talvez devido a modificações pós-traducionais, como por exemplo, glicosilação, ou talvez a clivagens que porventura possam ocorrer nestas proteínas. Assim, a diferença encontrada no perfil de bandas entre os *western blots* com o extrato protéico do transfectante e extratos da metaciclogênese pode ser explicada pelo método utilizado para normalização dos experimentos, já que em ambos, o mesmo antissoro foi utilizado. Neste, a normalização do gel foi feita por quantidade de proteína e naquele, por quantidade de células. Fazendo-se uma análise *a posteriori*, alguns dos antissoros obtidos estavam reconhecendo a proteína de interesse.

Em alguns casos o padrão de bandas encontrado na análise por *western blot* usando a revelação por duas técnicas distintas, fosfatase alcalina e quimioluminescência, mostrou-se diferente, apesar do mesmo soro ter sido usado em ambos os experimentos. Isso pode ser explicado pelo fato de extratos protéicos diferentes terem sido utilizados nestes ensaios e também pela diferença de sensibilidade dos dois métodos.

Considerando cada proteína individualmente, os experimentos de localização celular destas fusionadas a GFP e da imunolocalização obtida através da incubação dos epimastigotas com o soro purificado também diferiram entre si, para as 8 proteínas. Como nos ensaios de *western blot* pode-se observar a presença de mais de uma banda, em alguns casos, mesmo após a purificação, o soro pode ter reconhecido proteínas indesejadas do parasita, o que pode ter levado à divergência entre os ensaios acima citados.

Quanto aos experimentos de localização celular com as proteínas fusionadas com GFP, a maioria delas apresentou a marcação de um ponto próximo ao núcleo, na região posterior da célula, inclusive a proteína TcExp02G06, a qual estava truncada. Algumas das proteínas recombinantes apresentaram uma expressão maior do que a da proteína nativa, como verificado nos experimentos de *western blot* das células transfectadas. Possivelmente, esse ponto possa corresponder a alguma organela na qual a proteína superexpressa pode estar se concentrando. O reservossomo seria uma das possibilidades. As proteínas fusionadas a GFP podem se localizar nessas estruturas talvez por apresentarem conformações tridimensionais erradas, por sofrerem modificações que ocasionem o seu deslocamento para essas localidades ou por estarem presentes em quantidades acima do necessário, podendo permanecer estocadas nessas organelas ou até mesmo tornando-se dispensáveis para a célula, uma vez que o parasita expressa normalmente a proteína nativa codificada pelo seu genoma.

Se estes resultados de localização da proteína fusionada ao GFP são não-fisiológicos, então esperaríamos que eles não corroborassem o observado pela imunolocalização.

Segundo MATSUYAMA e colaboradores (2006), a expressão em altos níveis da proteína recombinante pode alterar a sua localização no interior da célula. Além disso, a localização das proteínas recombinantes pode variar dependendo de onde a etiqueta está presente, se na extremidade N ou C-terminal da proteína, pois, tanto a região N como C-terminal portam, frequentemente, peptídeos sinais (WIEMANN *et al.*, 2004). A localização intracelular de 567 proteínas humanas fusionadas a GFP foi realizada por WIEMANN e colaboradores em 2004 e demonstrou que em 39% dos casos, a localização da proteína recombinante foi influenciada pela orientação da etiqueta. Em estudos de localização celular utilizando como modelo a levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi demonstrado que a etiqueta GFP fusionada na região C-terminal de proteínas pode causar a localização incorreta das mesmas devido a problemas conformacionais ou a problemas críticos envolvendo, por exemplo, a obstrução de sinais de localização e/ou retenção dos polipeptídeos (HUH *et al.*, 2003). Assim, presume-se que, em *T. cruzi*, em determinadas situações, a fusão N-terminal pode esconder sequências da proteína que seriam responsáveis pelo endereçamento das mesmas para regiões específicas da célula.

Através da fusão da proteína TcExp02G04 com GFP a localização apresentou-se nuclear, de acordo com as descrições sobre o domínio de ligação a DNA semelhante a Myb.

Para a proteína TcExp02G10, a imunolocalização obtida com o uso do soro purificado mostrou-se nuclear, o que corrobora com os dados encontrados sobre o domínio da família spoU metilase.

No presente estudo, a GFP foi fusionada apenas à extremidade amino-terminal da proteína de interesse. No entanto, para verificar se ocorrem mudanças na localização celular da proteína, a recombinação na extremidade C-terminal pode ser realizada uma vez que não foi adicionado um códon de parada aos genes estudados.

Ainda em relação à localização celular das proteínas em questão, ensaios de microscopia ótica podem ser realizados com marcadores de organelas específicas ou através da co-localização com proteínas de organelas específicas, para que haja a confirmação das localidades onde as proteínas se encontram.

7. CONCLUSÃO

Este trabalho foi importante para iniciar o processo de caracterização das 10 proteínas hipotéticas conservadas, abrindo possibilidades de estudo com estes polipeptídeos e gerando vários resultados, mesmo que preliminares, já que nenhuma ou pouca informação a respeito dessas moléculas está disponibilizada em literatura.

Todos os dez genes selecionados para este trabalho foram clonados no vetor pDONRTM221 e transferidos para o vetor de destinação pDESTTM17 do sistema Gateway. Além disso, também foi possível a transferência dos genes, presentes no clone de entrada, para o vetor pTcPR-GFPN desenvolvido pelo nosso grupo (BATISTA, 2008).

O sequenciamento dos fragmentos de PCR contidos nos vetores confirmou que estes eram realmente os genes de interesse do estudo. Adicionalmente, estes dados prévios demonstraram que a identidade nucleotídica dos genes em questão é bastante alta, em torno de 97-98%, entre a cepa CL Brener e o clone Dm28c de *T. cruzi*.

Dos 10 genes escolhidos para o presente trabalho, 8 foram expressos com sucesso em sistema heterólogo (*E. coli*) visando a produção de anticorpos policlonais em camundongos.

O processo de produção dos antissoros específicos para as proteínas alvo do estudo mostrou-se ser bastante complexo, constituindo uma etapa essencial para o desenvolvimento e prosseguimento da caracterização funcional mais aprofundada das proteínas.

Após a recombinação dos genes no vetor pTcPR-GFPN, foi possível realizar ensaios de localização celular através da fluorescência emitida pela fusão da proteína com a etiqueta GFP. A expressão das proteínas recombinantes no *T. cruzi* foi confirmada pelos ensaios de *western blot* e através da fluorescência das células quando analisadas pelo citômetro de fluxo.

Os *western blots* realizados com os extratos protéicos dos parasitas transfectados incubados com os anticorpos purificados demonstraram que os antissoros podem estar reconhecendo as proteínas alvo de estudo, pois a diferença de massa molecular encontrada entre as proteínas nativas e as recombinantes equivalem a aproximadamente 27 kDa, o tamanho da etiqueta GFP. Estes resultados, além de dar suporte ao fato de que os antissoros estão específicos, eles indicam que as proteínas estudadas possuem um tamanho diferente do estimado, sendo isto ocasionado, talvez, por modificações pós-traducionais ou clivagens eventuais da proteína.

Em relação à localização celular apresentada pelas proteínas recombinantes nos parasitas transfectados, foi visto que estas se encontraram em regiões próximas ao núcleo do protozoário. As proteínas fluorescentes podem estar se concentrando em grânulos localizados, possivelmente, em reservossomos. Podemos supor que as proteínas permaneçam nestes locais

devido a problemas decorrentes da expressão excessiva da proteína de interesse, pois esta é codificada tanto pela sequência do genoma como pelo gene transfetado.

A purificação do antissoro contra a proteína TcExp02G02, com o domínio de ligação a GTP, foi executada com sucesso, fato este confirmado pelos experimentos de *western blot* revelados por fosfatase alcalina e quimioluminescência, nos quais houve o reconhecimento de uma única banda referente a proteína de estudo. Foi observado também, que esta proteína possui um aumento de expressão durante o processo de metaciclogênese, como previsto pela técnica de microarranjo realizada por PROBST em 2005.

A proteína TcExp02G04 em ensaios de localização celular com as células transfetadas mostrou-se nuclear, concordando com as informações referentes ao domínio de ligação ao DNA semelhante a Myb.

Embora os ensaios de *western blot* com os extratos protéicos da metaciclogênese incubados com o soro purificado anti-G10 tenham mostrado o reconhecimento de mais de uma proteína, os experimentos de imunolocalização da proteína TcExp02G10 indicaram que ela está presente no núcleo de epimastigotas de *T. cruzi*. Essa última informação corrobora com os dados publicados a respeito de proteínas que contêm o domínio da família RNA metiltransferase, família TrmH.

8. PERSPECTIVAS

Neste trabalho, o antissoro contra a proteína TcExp02G02 mostrou-se bastante puro, o que possibilitou a realização de *western blots* que confirmaram os dados de expressão diferencial da proteína durante a metaciclogênese, obtidos por PROBST (2005), em experimentos de microarranjo. Com o intuito de realizar uma caracterização mais aprofundada acerca desta proteína e pelo fato dela possuir um domínio de ligação à GTP, serão realizados ensaios bioquímicos de ligação a GTP, através da expressão solúvel da proteína fusionada a GFP.

A proteína TcExp02G01 possui o domínio TBC, o qual se presume que seja responsável pela atividade catalítica de GTPase de pequenas GTPases semelhantes a Rab. Por este motivo, esta proteína será expressa na conformação solúvel, com o auxílio do vetor pGEX-4T-1 (expressão teste em andamento), com o intuito de realizar ensaios bioquímicos de ligação a GTP.

A localização nuclear da proteína TcExp02G04 fusionada ao GFP em formas epimastigotas de *T. cruzi* corrobora com os dados encontrados em literatura. Por esta proteína possuir domínio de ligação ao DNA, seria interessante expressar a proteína TcExp02G04 na forma solúvel, através da recombinação com o vetor pGEX-4T-1, visando experimentos de imunoprecipitação de cromatina. Assim seria possível verificar com quais sequências nucleotídicas este domínio interage.

Adicionalmente, a localização das proteínas será realizada em *T. cruzi* através da fusão das mesmas com a etiqueta GFP na região C-terminal (ao invés da N-terminal), uma vez que diferentes localizações podem ser obtidas utilizando cada uma das construções. O próprio vetor pTcPR-GFPN permite a transferência da etiqueta GFP para a região C-terminal. Assim, a plataforma Gateway pode ser mantida como método de clonagem. Deste modo, a clonagem dos genes deste trabalho pode ser retomada a partir do vetor de entrada. Isso facilita e torna possível a expressão das proteínas recombinantes no parasita para comparação com os dados de localização celular adquiridos neste presente trabalho.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abuin G, Freitas-Junior LH, Colli W, Alves MJ, Schenkman S. Expression of trans-sialidase and 85-kDa glycoprotein genes in *Trypanosoma cruzi* is differentially regulated at the post-transcriptional level by labile protein factors. *J. Biol. Chem.* (1999) 274(19):13041-7.
- Albert S, Will E, Gallwitz D. Identification of the catalytic domains and their functionally critical arginine residues of two yeast GTPase-activating proteins specific for Ypt/Rab transport GTPases. *EMBO J.* (1999) 18(19):5216-25.
- Almeida-de-Faria M, Freymuller E, Colli W, Alves MJ. *Trypanosoma cruzi*: characterization of an intracellular epimastigote-like form. *Exp. Parasitol.* (1999) 92(4):263-74.
- Andrade AF, Esteves MJ, Angluster J, Gonzales-Perdomo M, Goldenberg S. Changes in cell-surface carbohydrates of *Trypanosoma cruzi* during metacyclogenesis under chemically defined conditions. *J. Gen. Microbiol.* (1991) 137(12):2845-9.
- Andrews NW. Living dangerously: how *Trypanosoma cruzi* uses lysosomes to get inside host cells, and then escapes into the cytoplasm. *Biol. Res.* (1993) 26(1-2):65-7.
- Aufderheide AC, Salo W, Maddena M, Streitz J, Buikstra J, Guhl F, et al. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2004) 101(7):2034-9.
- Ávila AR, Yamada-Ogata SF, Monteiro VS, Krieger MA, Nakamura CV, Souza W, et al. Cloning and characterization of the metacyclogenin gene, which is 140 specifically expressed during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mol. Biochem. Parasitol.* (2001) 117:169-77.
- Ávila AR, Dallagiovanna B, Yamada-Ogatta SF, Monteiro-Góes V, Fragoso SP, Krieger MA, et al. Stage-specific gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Genet. Mol. Res.* (2003) 2(1):159-68.
- Aymerich S, Goldenberg S. The karyotype of *Trypanosoma cruzi* Dm 28c: comparison with other *T. cruzi* strains and trypanosomatids. *Exp. Parasitol.* (1989) 69(2):107-15.
- Bastin P, Sherwin T, Gull K. Paraflagellar rod is vital for trypanosome motility. *Nature.* (1998) 391(6667):548.
- Batista M. Construção de vetores para caracterização de genes de *Trypanosoma cruzi* em um sistema para clonagem em alta demanda [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2008.
- Bechtel S, Rosenfelder H, Duda A, Schmidt CP, Ernst U, Wellenreuther R, et al. The full-ORF clone resource of the German cDNA Consortium. *BMC Genomics.* (2007) 8:399.
- Benchimol Barbosa PR. The oral transmission of Chagas' disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks. *Int. J. Cardiol.* (2006) 112(1):132-3.
- Berberof M, Vanhame L, Tebabi P, Pays A, Jefferies D, Welburn S, et al. The 3'-terminal region of the mRNAs for VSG and procyclin can confer stage specificity to gene expression in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.* (1995) 14:2925-34.

- Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renauld H, Bartholomeu DC, *et al.* The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*. (2005) 309(5733):416-22.
- Bibb MJ, Bibb MJ, Ward JM, Cohen SN. Nucleotide sequences encoding and promoting expression of three antibiotic resistance genes indigenous to *Streptomyces*. *Mol. Gen. Genet.* (1985) 199(1):26-36.
- Biedenkapp H, Borgmeyer U, Sippel AE, Klempnauer KH. Viral myb oncogene encodes a sequence-specific DNA-binding activity. *Nature*. (1988) 335(6193):835-7.
- Boddy MN, Russell P. DNA replication checkpoint control. *Front. Biosci.* (1999) 4:D841-8.
- Bonaldo MC, Souto-Padron T, Souza W, Goldenberg S. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. *J Cell Biol.* (1988) 106(4):1349-58.
- Bonaldo MC, d'Escoffier LN, Salles JM, Goldenberg S. Characterization and expression of proteases during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Exp. Parasitol.* (1991) 73(1):44-51.
- Boucher N, Wu Y, Dumas C, Dube M, Sereno D, Breton M, *et al.* A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'-untranslated region element. *J. Biol. Chem.* (2002) 277(22):19511-20.
- Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*. (1990) 348(6297):125-32.
- Brandner CJ, Maier RH, Henderson DS, Hintner H, Bauer JW, Onder K. The ORFeome of *Staphylococcus aureus* v 1.1. *BMC Genomics*. (2008) 9:321.
- Bravo J, Karathanassis D, Pacold CM, Pacold ME, Ellson CD, Anderson KE, *et al.* The crystal structure of the PX domain from p40(phox) bound to phosphatidylinositol 3-phosphate. *Mol. Cell*. (2001) 8(4):829-39.
- Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Rev. Microbiol.* (1973) 27:347-82.
- Bushman W, Thompson JF, Vargas L, Landy A. Control of directionality in lambda site specific recombination. *Science*. (1985) 230(4728):906-11.
- Caldon CE, Yoong P, March PE. Evolution of a molecular switch: universal bacterial GTPases regulate ribosome function. *Mol. Microbiol.* (2001) 41(2):289-97.
- Cano MI, Gruber A, Vazquez M, Cortés A, Levin MJ, González A, *et al.* Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project. *Mol. Biochem. Parasitol.* (1995) 71(2):273-278.
- Carvalho TU, Souza W. Infectivity of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. (1986) 28(4):205-12.
- Cassola A, Gaudenzi JG, Frasch AC. Recruitment of mRNAs to cytoplasmic ribonucleoprotein granules in trypanosomes. *Mol. Microbiol.* (2007) 65(3):655-70.

- Castellani O, Ribeiro LV, Fernandes JF. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. J. Protozool. (1967) 14(3):447-51.
- Caspari T, Dahlen M, Kanter-Smoler G, Lindsay HD, Hofmann K, Papadimitriou K, *et al.* Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* Hus1: a PCNA-related protein that associates with Rad1 and Rad9. Mol. Cell Biol. (2000) 20(4):1254-62.
- Cazzulo JJ, Stoka V, Turk V. Cruzipain, the major cysteine proteinase from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. Biol. Chem. (1997) 378(1):1-10.
- Chagas C. Nova tripanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. (1909) 1(2):159-218.
- Chagas CJ. A forma cardíaca da trypanosomíase americana. Brazil-Medico. (1927) 41(52):1386.
- Cheever ML, Sato TK, de Beer T, Kutateladze TG, Emr SD, Overduin M. Phox domain interaction with PtdIns(3)P targets the Vam7 t-SNARE to vacuole membranes. Nat. Cell Biol. (2001) 3(7):613-8.
- Clayton C. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. EMBO J. (2002) 21(8):1881-8.
- Clayton C, Shapira M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. Mol. Biochem. Parasitol. (2007) 156(2):93-101.
- Contreras VT, Morel CM, Goldenberg S. Stage specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. Mol. Biochem. Parasitol. (1985a) 14(1):83-96.
- Contreras VT, Salles JM, Thomas N, Morel CM, Goldenberg S. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. Mol. Biochem. Parasitol. (1985b) 6(3):315-27.
- Contreras VT, Araujo-Jorge TC, Bonaldo MC, Thomaz N, Barbosa HS, Meirelles MN, *et al.* Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. (1988) 83(1):123-33.
- Cornelissen AW, Backes S, Evers R, Grondal EJ, Jess W, Kock J. Transcription analysis in *Trypanosoma brucei*. Biochem. Soc. Trans. (1990) 18(5):710-14.
- Cornelissen AW, Evers R, Grondal EJ, Hammer A, Jess W, Kock J. Transcription and RNA polymerases in *Trypanosoma brucei*. Acta Leiden. (1989) 58(2):75-96.
- Coughlin BC, Teixeira SM, Kirchhoff LV, Donelson JE. Amastin mRNA abundance in *Trypanosoma cruzi* is controlled by a 3'-untranslated region position-dependent cis-element and an untranslated region-binding protein. J. Biol. Chem. (2000) 275(16):12051-60.
- Coura JR, Junqueira AC, Bóia MN, Fernandes O, Bonfante C, Campos JE, *et al.* Chagas disease in the Brazilian Amazon: IV. a new cross-sectional study. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo (2002a) 44(3):159-65.

- Coura JR, Junqueira AC, Fernandes O, Valente AS, Miles MA. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol.* (2002b) 18(4):171-6.
- Coura JR. Origem, determinantes e morbidade da Doença de Chagas. *Salus.* (2007a) 11:62-66.
- Coura JR. Chagas disease: what is know and what is needed A background article. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* (2007b) 102(Supl I):113-22.
- Dallagiovanna B, Plazanet-Menut C, Ogatta SF, Ávila AR, Krieger MA, Goldenberg S. *Trypanosoma cruzi*: a gene family encoding chitin-binding-like proteins is posttranscriptionally regulated during metacyclogenesis. *Exp. Parasitol.* (2001) 99(1):7-16.
- Dias JCP. Epidemiologia. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Netto M, editors. *Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas*. 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2000. p.48-75.
- Dias JP, Bastos C, Araújo E, Mascarenhas AV, Martins Netto E, Grassi F. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. *Rev. Soc. Brás. Méd. Trop.* (2008) 41(3):296-300.
- DoCampo R, Stoppani AOM. Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*. *Arch. Biochem. Biophys.* (1979) 197(1):317-21.
- DoCampo R, Vercesi AE. Characteristics of Ca²⁺ transport by *Trypanosoma cruzi* mitochondria *in situ*. *Arch. Biochem. Biophys.* (1989a) 272(1):122-29.
- DoCampo R, Vercesi AE. Ca²⁺ transport by coupled *Trypanosoma cruzi* mitochondria *in situ*. *J. Biol. Chem.* (1989b) 264(1):108-11.
- DoCampo R, Moreno SN. Acidocalcisome: A novel Ca²⁺ storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites. *Parasitol. Today.* (1999) 15(11):443-8.
- DoCampo R, Moreno SN. The acidocalcisome. *Mol. Biochem. Parasitol.* (2001) 114(2):51-159.
- Doi-Katayama Y, Hayashi F, Inoue M, Kigawa T, Yokoyama S, Hirota H. Solution structure of two human Myb-like DNA-binding domain repeats. The 44th Annual Meeting of The NMR Society of Japan. 2005.
- Dricot A, Rual JF, Lamesch P, Bertin N, Dupuy D, Hao T, *et al.* Generation of the *Brucella melitensis* ORFeome version 1.1. *Genome Res.* (2004) 14(10B):2201-6.
- Duhagon MA, Dallagiovanna B, Ciganda M, Ruyechan W, Williams N, Garat B. A novel type of single-stranded nucleic acid binding protein recognizing a highly frequent motif in the intergenic regions of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2003) 309(1):183-8.
- Dusanic DG. *In vitro* production of metacyclic tripomastigotes. *J. Parasitol.* (1980) 66(6):1046-9.

- Elias MC, Faria M, Mortara RA, Motta MC, Souza W, Thiry M, *et al.* Chromosome localization changes in the *Trypanosoma cruzi* nucleus. *Eukaryot. Cell.* (2002) 1(6):944-53.
- Ellson CD, Gobert-Gosse S, Anderson KE, Davidson K, Erdjument-Bromage H, Tempst P *et al.* PtdIns(3)P regulates the neutrophil oxidase complex by binding to the PX domain of p40(phox). *Nat. Cell Biol.* (2001) 3(7):679-82.
- El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science.* (2005a) 309(5733):409-15.
- El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G, *et al.* Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science.* (2005b) 309(5733):404-9.
- Esteves MG, Gonzales-Perdomo M, Alviano CS, Angluster J, Goldenberg S. Changes in fatty acid composition associated with differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol. Lett.* (1989) 50(1-2):31-4.
- Evers R, Hammer A, Köck J, Jess W, Borst P, Mémet S, *et al.* *Trypanosoma brucei* contains two RNA polymerase II largest subunit genes with an altered C-terminal domain. *Cell.* (1989) 56(4):585-97.
- Ferreira LF, Britto C, Cardoso MA, Fernandes O, Reinhard K, Araújo A. Paleoparasitology of Chagas disease revealed by infected tissues from Chilean mummies. *Acta Trop.* (2000) 75(1):79-84.
- Figueiredo RC, Rosa DS, Soares MJ. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. *J. Parasitol.* (2000) 86(6):1213-18.
- Fornaciari G, Castagna M, Viacava P, Tognetti A, Beliacqua G, Segura EL. Chaga's disease in Peruvian Inca mummy. *Lancet.* (1992) 339(8785):128-9.
- Foti L. Construção de um Novo Vetor de Expressão Utilizando a GFP como Carreador [monografia]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2004.
- Fragoso SP, Mattei D, Hines JC, Ray D, Goldenberg S. Expression and cellular localization of *Trypanosoma cruzi* type II DNA topoisomerase. *Mol. Biochem. Parasitol.* (1998) 94:197-204.
- Fragoso SP, Plazanet-Menut C, Carreira MA, Motta MC, Dallagiovana B, Krieger MA, Goldenberg S. Cloning and characterization of a gene encoding a putative protein associated with U3 small nucleolar ribonucleoprotein in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* (2003) 126(1):113-7.
- Garcia ES, Azambuja P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol Today.* (1991) 7:240-45.
- Gaunt MW, Yeo M, Frame IA, Stothard JR, Carrasco HJ, Taylor MC. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature.* (2003) 421(6926):936-9.
- Gentry D, Bengra C, Ikehara K, Cashel M. Guanylate kinase of *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.* (1993) 268(19):14316-21.

- Gilinger G, Bellofatto V. Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. *Nucleic Acids Res.* (2001) 29(7):1556-64.
- Goldenberg S, Salles JM, Contreras VT, Lima Franco MP, Katzin AM, Colli W, Morel CM. Characterization of messenger RNA from epimastigotes and metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *FEBS Lett.* (1985) 180(2):265-70.
- Gonzales-Perdomo M, Romero P, Goldenberg S. Cyclic AMP and adenylyate cyclase activators stimulate *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Exp. Parasitol.* (1988) 66(2):205-12.
- Grunberg E, Beskid G, Cleeland R, De Lorenzo WF, Titsworth E, Scholer HJ, Richle R, Brener Z. Anti-protozoan and antibacterial activity of 2-nitroimidazole derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 513-519, 1968. *In* Brener Z, Andrade ZA, Barral-Netto M, editors. *Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas*. 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2000. p.380-88.
- Gunawardane RN, Martin OC, Cao K, Zhang L, Dej K, Iwamatsu A, Zheng Y. Characterization and reconstitution of *Drosophila* gamma-tubulin ring complex subunits. *J. Cell Biol.* (2000) 151:1513-1524.
- Hannaert V, Bringaud F, Opperdoes FR, Michels PA. Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. *Kinetoplastid. Biol. Dis.* (2003) 2(1):11.
- Hartley JL, Bowen H. PEG precipitation for selective removal of small DNA fragments. *Focus J.* (1996) 18:27.
- Hartley JL; Temple GF, Brasch MA. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res.* (2000) 10(11):1788-95.
- Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science.* (1989) 246(4930):629-34.
- Hehl A, Vassella E, Braun R, Roditi I. A conserved stem-loop structure in the 3' untranslated region of procyclin mRNAs regulates expression in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1994) 91(1):370-74.
- Heise N, Raper J, Buxbaum LU, Peranovich TM, Almeida ML. Identification of complete precursors for the glycosylphosphatidylinositol protein anchors of *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* (1996) 271(28):16877-87.
- Henriksson J, Porcel B, Rydaker M, Ruiz A, Sabaj V, Galanti N, *et al.* Chromosome specific markers reveal conserved linkage groups in spite of extensive chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* (1995) 73(1-2):63-74.
- Hide G. History of Sleeping Sickness in East Africa. *Clin. Microbiol. Rev.* (1999) 12(1):112-25.
- Hiroaki H, Ago T, Ito T, Sumimoto H, Kohda D. Solution structure of the PX domain, a target of the SH3 domain. *Nat. Struct. Biol.* (2001) 8(6):526-30.

- Homsy JJ, Granger B, Krassner SM. Some factors inducing formation of metacyclic stages of *Trypanosoma cruzi*. *J. Protozool.* (1989) 36(2):150-3.
- Holetz FB, Correa A, Avila AR, Nakamura CV, Krieger MA, Goldenberg S. Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2007) 356(4):1062-7.
- Hu Y, Rolfs A, Bhullar B, Murthy TV, Zhu C, Berger MF, *et al.* Approaching a complete repository of sequence-verified protein-encoding clones for *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Res.* (2007) 17(4):536-43.
- Huh WK, Falvo JV, Gerke LC, Carroll AS, Howson RW, Weissman JS, O'Shea EK. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature.* (2003) 425(6959):686-91.
- Humphrey T. DNA damage and cell cycle control in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mutat. Res.* (2000) 451(1-2):211-26.
- Hurley JH, Misra S. Signaling and subcellular targeting by membrane-binding domains. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* (2000) 29:49-79.
- Ingrosso D, Fowler AV, Bleibaum J, Clarke S. Sequence of the D-aspartyl/L-isoaspartyl protein methyltransferase from human erythrocytes. Common sequence motifs for protein, DNA, RNA, and small molecule S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *J. Biol. Chem.* (1989) 264(33):20131-9.
- Isola EL, Lammel EM, González Cappa SM. *Trypanosoma cruzi*: differentiation to metacyclic trypomastigotes in the presence of ADP-ribosyltransferase inhibitors. *Exp. Parasitol.* (1987) 64(3):424-9.
- Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, *et al.* The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science.* (2005) 309(5733):436-42.
- Johnson PJ, Kooter JM, Borst P. Inactivation of transcription by UV irradiation of *T. brucei* provides evidence for a multicistronic transcription unit including a VSG gene. *Cell.* (1987) 51(2):273-81.
- Kanai F, Liu H, Field SJ, Akbary H, Matsuo T, Brown GE, *et al.* The PX domains of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI(3)K. *Nat. Cell Biol.* (2001) 3(7):675-8.
- Katzen AL, Kornberg TB, Bishop JM. Isolation of the proto-oncogene c-myb from *D. melanogaster*. *Cell.* (1985) 41(2):449-56.
- Kay BK, Williamson MP, Sudol M. The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J.* (2000) 14(2):231-41.
- Klempnauer KH, Sippel AE. The highly conserved amino-terminal region of the protein encoded by the v-myb oncogene functions as a DNA-binding domain. *EMBO J.* (1987) 6(9):2719-25.

- Knop M, Schiebel E. Spc98p and Spc97p of the yeast gamma-tubulin complex mediate binding to the spindle pole body via their interaction with Spc110p. *EMBO J.* (1997) 16(23):6985-95.
- Knop M, Pereira G, Geissler S, Grein K, Schiebel E. The spindle pole body component Spc97p interacts with the gamma-tubulin of *Saccharomyces cerevisiae* and functions in microtubule organization and spindle pole body duplication. *EMBO J.* (1997) 16(7):1550-64.
- Kopito RR. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol.* (2000) 10(12):524-30.
- Köck J, Evers R, Cornelissen AW. Structure and sequence of the gene for the largest subunit of trypanosomal RNA polymerase III. *Nucleic Acids Res.* (1988) 16(18):8753-72.
- Köck J, Cornelissen AW. Characterization of the RNA polymerases of *Crithidia fasciculata*. *Mol. Microbiol.* (1991) 5(4): 835-42.
- Kohl L, Gull K. Molecular architecture of the trypanosome cytoskeleton. *Mol. Biochem. Parasitol.* (1998) 93(1):1-9.
- Kollien AH, Schaub GA. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitol. Today.* (2000) 16(9):381-7.
- Koonin EV. Computer-assisted identification of a putative methyltransferase domain in NS5 protein of flaviviruses and lambda 2 protein of reovirus. *J. Gen. Virol.* (1993) 74 (Pt 4):733-40.
- Krassner SM, Granger B, Lee P, Guerra C, Le T, Luc KO. Action of exogenous potassium and calcium ions on in vitro metacyclogenesis in *Trypanosoma cruzi*. *J. Protozool.* (1991) 38(6):602-8.
- LaBaer J, Qingqing Q, Anumanthan A, Mar W, Dongmei Z, Murthy TV, *et al.* The *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 gene collection. *Genome Res.* (2004) 14(10B):2190-200.
- Lafaille MA, Wirth DF. Creation of null/+ mutants of the alpha-tubulin gene in *Leishmania enriettii* by gene cluster deletion. *J. Biol. Chem.* (1992) 75:145-57.
- Lafaille MA, Laban A, Wirth DF. Gene expression in *Leishmania*: Analysis of essential 5' DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1992) 89:2703-7.
- Lamesch P, Li N, Milstein S, Fan C, Hao T, Szabo G, *et al.* hORFeome v3.1: a resource of human open reading frames representing over 10,000 human genes. *Genomics.* (2007) 89(3):307-15.
- Landfear SM. Trypanosomatid transcription factors: waiting for Godot. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* (2003) 100(1):7-9.
- Landy A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu. Rev. Biochem.* (1989) 58:913-49.
- Laranja FS, Dias E, Nóbrega G, Miranda A. Chagas' Disease: A Clinical, Epidemiologic, and Pathologic Study. *Circulation.* (1956) 14:1035-60.

- Laufer G, Schaaf G, Bollgonn S, Günzl A. *In vitro* analysis of α -amanitin-resistant transcription from the rRNA, procyclic acidic repetitive protein and variant surface glycoprotein gene promoters in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell Biol.* (1999) 19:5466-73.
- Lebowitz JH, Smith HQ, Rusche L, Beverley SM. Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes Dev.* (1993) 7(6):996-1007.
- Lemmon MA, Ferguson KM, Abrams CS. Pleckstrin homology domains and the cytoskeleton. *FEBS Lett.* (2002) 513(1):71-6.
- Levine ND, Corliss JO, Cox FEG, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, *et al.* A newly revised classification of the Protozoa. *J. Protozool.* (1980) 27(1):37-58.
- Ley V, Andrews NW, Robbins ES, Nussenzweig V. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *J. Exp. Med.* (1988) 168(2):649-59.
- Lira CB, de Siqueira Neto JL, Khater L, Cagliari TC, Peroni LA, dos Reis JR *et al.* LaTBP1: a *Leishmania amazonensis* DNA-binding protein that associates *in vivo* with telomeres and GT-rich DNA using a Myb-like domain. *Arch. Biochem. Biophys.* (2007) 465(2):399-409. Epub 2007 Jun 29.
- Lu HG, Zhong L, Souza W, Benchimol M.; Moreno S, DoCampo R. Ca^{2+} content and expression of an acidocalcisomal calcium pump are elevated in intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Cell Biol.* (1997) 18(4):2309-23.
- Lu J, Garcia J, Dulubova I, Südhof TC, Rizo J. Solution structure of the Vam7p PX domain. *Biochemistry.* (2002) 41(19):5956-62.
- Machado CA, Ayala FJ. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2001) 98(13):7396-401.
- Madison-Antenucci S, Grams J, Hajduk SL. Editing machines: the complexities of trypanosome RNA editing. *Cell.* (2002) 108:435-8.
- Maffucci T, Falasca M. Specificity in pleckstrin homology (PH) domain membrane targeting: a role for a phosphoinositide-protein co-operative mechanism. *FEBS Lett.* (2001) 506(3):173-9.
- Mair G, Shi H, Li H, Djikeng A, Aviles HO, Bishop JR, *et al.* A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. *RNA.* (2000) 6(2):163-9.
- Marcili A, Valente VC, Valente SA, Junqueira AC, Silva FM, Pinto AY, *et al.* *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *Int. J. Parasitol.* (2009) 39(5):615-23.
- Matsuyama A, Arai R, Yashiroda Y, Shirai A, Kamata A, Sekido S, *et al.* ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Biotechnol.* (2006) 24(8):1033.

- Matthews KR, Tschudi C, Ullu E. A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes Dev.* (1994) 8(4):491-501.
- Mayer MG, Floeter-Winter LM. Pre-mRNA trans-splicing: from kinetoplastids to mammals, an easy language for life diversity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* (2005) 100(5):501-13.
- McCarthy-Burke C, Taylor ZA, Buck GA. Characterization of the spliced leader genes and transcripts in *Trypanosoma cruzi*. *Gene.* (1982) 82(1):177-89.
- McDaniel JP, Dvorak JA. Identification, isolation, and characterization of naturally-occurring *Trypanosoma cruzi* variants. *Mol. Biochem. Parasitol.* (1993) 57(2):213-22.
- Mercy IS, Meeley RB, Nichols SE, Olsen OA. *Zea mays* ZmMybst1 cDNA, encodes a single Myb-repeat protein with the VASHAQKYF motif. *J. Exp. Bot.* (2003) 54(384):1117-9.
- Meyer H, De Souza W. Electron microscopic study of *Trypanosoma cruzi* periplast in tissue cultures. I. Number and arrangement of the peripheral microtubules in the various forms of the parasite's life cycle. *J. Protozool.* (1976) 23(3):385-90.
- Ministério da Saúde. Oficina de prioridades de pesquisa em doenças negligenciadas [boletim informativo]. 2006;2(2):1-17.
- Moreno SN, Silva J, Vercesi AE, DoCampo R. Cytosolic-free calcium elevation in *Trypanosoma cruzi* is required for cell invasion. *J. Exp. Med.* (1994) 180(4):1535-40.
- Myler PJ, Audleman L, deVos T, Hixson G, Kiser P, Lemley C, *et al.* *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1999) 96(6):2902-6.
- Neuwald AF. A shared domain between a spindle assembly checkpoint protein and Ypt/Rab-specific GTPase-activators. *Trends Biochem. Sci.* (1997) 22(7):243-4.
- Nilsen TW. Trans-splicing in protozoa and helminths. *Infect. Agents Dis.* (1992) 1(4):212-8.
- Nilsson D, Andersson B. Strand asymmetry patterns in trypanosomatid parasites. *Exp. Parasitol.* (2005) 109(3):143-9.
- Nogueira N, Bianco C, Cohn Z. Studies on the selective lysis and purification of *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med.* (1975) 142(1):224-9.
- Nunes LR, Carvalho MR, Shakarian AM, Buck GA. The transcription promoter of the spliced leader gene from *Trypanosoma cruzi*. *Gene.* (1997) 188:157-68.
- Ochatt CM, Ulloa RM, Torres HN, Téllez-Iñón MT. Characterization of the catalytic subunit of *Trypanosoma cruzi* cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol. Biochem. Parasitol.* (1993) 57(1):73-81.
- Overath P, Stierhof YD, Wiese M. Endocytosis and secretion in trypanosomatid parasites - Tumultuous traffic in a pocket. *Trends Cell Biol.* (1997) 7(1):27-33.

- Overath P, Haag J, Lischke A, O'Huigin C. The surface structure of trypanosomes in relation to their molecular phylogeny. *Int. J. Parasitol.* (2001) 31(5-6):468-71.
- Pasion, SG, Hines, JC, Ou, X, Mahwood, R, Ray, DS. Sequences within the 5' untranslated region regulate the levels of a kinetoplast DNA topoisomerase mRNA during the cell cycle. *Mol. Cell Biol.* (1996) 16(12):6724-35.
- Persson BC, Jäger G, Gustafsson C. The spoU gene of *Escherichia coli*, the fourth gene of the spoT operon, is essential for tRNA (Gm18) 2'-O-methyltransferase activity. *Nucleic Acids Res.* (1997) 25(20):4093-7.
- Pinto AY, Valente SA, Valente VC, Ferreira Junior AG, Coura JR. Acute phase of Chagas disease in the Brazilian Amazon region. Study of 233 cases from Pará, Amapá and Maranhão observed between 1988 and 2005. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* (2008) 41(6):602-14.
- Ponting CP. Novel domains in NADPH oxidase subunits, sorting nexins, and PtdIns 3-kinases: binding partners of SH3 domains? *Protein Sci.* (1996) 5(11):2353-7.
- Probst, CM. Descrição da Metaciclo-gênese de *Trypanosoma cruzi* pelo uso de microarranjos de DNA. [dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz; 2005.
- Proudfoot NJ, Furger A, Dye MJ. Integrating mRNA processing with transcription. *Cell.* (2002) 108(4):501-12.
- Rak A, Fedorov R, Alexandrov K, Albert S, Goody RS, Gallwitz D, et al. Crystal structure of the GAP domain of Gyp1p: first insights into interaction with Ypt/Rab proteins. *EMBO J.* (2000) 19(19):5105-13.
- Ralston KS, Hill KL. The flagellum of *Trypanosoma brucei*: new tricks from an old dog. *Int. J. Parasitol.* (2008) 38(8-9):869-84.
- Reboul J, Vaglio P, Rual JF, Lamesch P, Martinez M, Armstrong CM, et al. *C. elegans* ORFeome version 1.1: experimental verification of the genome annotation and resource for proteome-scale protein expression. *Nat. Genet.* (2003) 34(1):35-41.
- Recinos RF, Kirchhoff LV, Donelson JE. Cell cycle expression of histone genes in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* (2001) 103(2):215-22.
- Rezende JM, Moreira H. Forma digestiva da doença de Chagas. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Netto M. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-koogan; 2000. p.297-343.
- Richardson PM, Zon LI. Molecular cloning of a cDNA with a novel domain present in the tre-2 oncogene and the yeast cell cycle regulators BUB2 and cdc16. *Oncogene.* (1995) 11(6):1139-48.
- Rothhammer F, Allison MJ, Núñez L, Standen V, Arriaza B. Chagas' disease in pre-Columbian South America. *Am. J. Phys. Anthropol.* (1985) 68(4):495-8.
- Rudolph R, Lilie H. *In vitro* folding of inclusion body proteins. *FASEB J.* (1996) 10(1):49-56.

- Ruiz FA, Rodrigues CO, DoCampo R. Rapid changes in polyphosphate content within acidocalcosomes in response to cell growth, differentiation, and environmental stress in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* (2001) 276(28):26114-21.
- Schaub GA. Metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi* in the vector *Triatoma infestans*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* (1988) 83 Suppl 1:563-70.
- Schultz J, Copley RR, Doerks T, Ponting CP, Bork P. SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic Acids Res.* (2000) 28(1):231-4.
- Shapiro TA, Englund PT. The Structure and Replication of Kinetoplast DNA. *Annu. Rev. Microbiol.* (1995) 49:117-43.
- Shlomai J. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Curr. Mol. Med.* (2004) 4:623-47.
- Simpson L, Neckelmann N, de la Cruz VF, Simpson AM, Feagin JE, Jasmer DP, Stuart JE. Comparison of the maxicircle (mitochondrial) genomes of *Leishmania tarentolae* and *Trypanosoma brucei* at the level of nucleotide sequence. *J Biol Chem.* (1987) 262(13):6182-96.
- Simpson AGB, Lukes J, Roger AJ. The Evolutionary History of Kinetoplastids and Their Kinetoplasts. *Mol. Biol. Evol.* (2002) 19(12):2071-83.
- Smith JL, Levin JR, Agabian N. Molecular characterization of the *Trypanosoma brucei* RNA polymerase I and III largest subunit genes. *J. Biol. Chem.* (1989) 264(30):18091-9.
- Smogorzewska A, de Lange T. Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu. Rev. Biochem.* (2004) 73:177-208.
- Soares MJ. The reservosome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: an organelle of the endocytic pathway with a role on metacyclogenesis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* (1999) 94 Suppl 1:139-41.
- Soares MJ, Souto-Pradón T, Bonaldo MC, Goldenberg S, Souza W. A stereological study of the differentiation process in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Res.* (1989) 75(7): 522-7.
- Soares, MJ, Souto-Pradón T, Souza W. Identification of a large prelysosomal compartment in the pathogenic protozoon *Trypanosoma cruzi*. *J. Cell Sci.* (1997) 102(1): 157-67.
- Sousa MA. A simple method to purify biologically and antigenically preserved bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* using DEAE-celulose columns. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* (1983) 78(3):317-33.
- Souto-Pradón T, Souza W. Cytochemical analysis at the fine-structural level of trypanosomatids stained with phosphotungstic acid. *J. Protozool.* (1979) 26(4):551-7.
- Souza W. Novel Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. In: Tyler KM, Miles MA. *World Class Parasites vol 7: American Trypanosomiasis*. New York: Kluwer Academic Publishers; 2003. p.13-24.
- Souza W. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int. Res. Cytol.* (1984) 86:197-283.

Souza W. O Parasito e Sua Interação com os Hospedeiros. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Netto M, editors. *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas. 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2000. p.88-126.

Souza W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr. Pharm. Des.* (2002) 8(4):269-85.

Souza W. Electron microscopy of trypanosomes - A historical view. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* (2008) 103(4):313-25.

Sprang SR. G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annu. Ver. Biochem.* (1997) 66:639-78.

Stevens JR, Noyes HA, Schofield CJ, Gibson W. The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Adv. Parasitol.* (2001) 48:1-56.

Stover NA, Kaye MS, Cavalcanti AR. Spliced leader trans-splicing. *Curr. Biol.* (2006) 16(1):R8-R9.

Sutton RE, Boothroyd JC. Evidence for trans splicing in trypanosomes. *Cell.* (1986) 47(4):527-35.

Tanowitz HB, Kirchhoff LV, Simon D, Morris SA, Weiss LM, Wittner M. Chagas' disease. *Clin. Microbiol. Rev.* (1992) 5(4):400-19.

Teixeira AR, Nascimento RJ, Sturm NR. Evolution and pathology in chagas disease - a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* (2006) 101(5):463-91.

Teixeira SM, Kirchhoff LV, Donelson JE. Post-transcriptional elements regulating expression of mRNAs from the amastin/tuzin gene cluster of *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* (1995) 270(38):22586-94.

Teixeira SM; DaRocha WD. Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. *Genet. Mol. Res.* (2003) 2(1):148-58.

Telleria J, Lafay B, Virreira M, Barnabé C, Tibayrenc M, Svoboda M. *Trypanosoma cruzi*: Sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. *Exp. Parasitol.* (2006) 114:279-88.

Tibayrenc M, Ayala FJ. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *Trends Parasitol.* (2002) 18(9):405-10.

Thomas JG, Baneyx F. Divergent effects of chaperone overexpression and ethanol supplementation on inclusion body formation in recombinant *Escherichia coli*. *Protein Expression Purif.* (1997) 11(3):289-96.

Tomás AM, Miles MA, Kelly JM. Overexpression of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, is associated with enhanced metacyclogenesis. *Eur. J. Biochem.* (1994) 244:596-603.

Tomás AM, Kelly JM. Stage-regulated expression of cruzipain, the major cysteine protease of *Trypanosoma cruzi* is independent of the level of RNA1. *Mol. Biochem. Parasitol.* (1996) 76(1-2):91-103.

- Tonelli RR, Silber AM, Almeida-de-Faria M, Hirata IY, Colli W, Alves MJ. L-proline is essential for the intracellular differentiation of *T. cruzi*. *Cell Microbiol.* (2004) 6(8):733-41.
- Tovar J, Fairlamb AH. Extrachromosomal, homologous expression of trypanothione reductase and its complementary mRNA in *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Res.* (1996) 24:2942-9.
- Tyler-Cross RE, Short SL, Floeter-Winter LM, Buck GA. Transient expression mediated by the *Trypanosoma cruzi* rRNA promoter. *Mol. Biochem. Parasitol.* (1995) 72(1-2):23-31.
- Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int. J. Parasitol.* (2001) 31(5-6):472-81.
- Tyler KM, Olson CL, Engman DM. The Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*. In: Tyler KM, Miles MA. *World Class Parasites vol 7: American Trypanosomiasis*. New York: Kluwer Academic Publishers; 2003. p.1-11.
- Ulloa RM, Mesri E, Esteva M, Torres HN, Tellez-Inon MT. Cyclic AMP-dependent protein kinase activity in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* (1988) 255(1):319-26.
- Ullu E, Tschudi C. Trans *splicing* in trypanosomes requires methylation of the 5' end of the spliced leader RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1991) 88(22):10074-8.
- Urbina JA. Intermediary metabolism of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Today.* (1994) 10(3):107-10.
- Van der Ploeg LH, Liu AY, Michels PA, De Lange T, Borst P, Majumder HK, *et al.* RNA splicing is required to make the messenger RNA for a variant surface antigen in trypanosomes. *Nucleic Acids Res.* (1982) 10(12):3591-604.
- Vanhamme L, Pays E. Control of gene expression in trypanosomes. *Microbiol. Rev.* (1995) 59(2):223-40.
- Venclovas C, Thelen MP. Structure-based predictions of Rad1, Rad9, Hus1 and Rad17 participation in sliding clamp and clamp-loading complexes. *Nucleic Acids Res.* (2000) 28(13):2481-93.
- Vetter IR, Wittinghofer A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science.* (2001) 294(5545):1299-304.
- Vickerman K, Tetley L. Recent ultrastructural studies on trypanosomes. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* (1977) 57(4-5):441-57.
- Vieira MC, Moreno SN. Mobilization of intracellular calcium upon attachment of *Toxoplasma gondii* tachyzoites to human fibroblasts is required for invasion. *Mol. Biochem. Parasitol.* (2000) 106(1):157-62.
- Volkmer E, Karnitz LM. Human homologs of *Schizosaccharomyces pombe* rad1, hus1, and rad9 form a DNA damage-responsive protein complex. *J. Biol. Chem.* (1999) 274(2):567-70.

- Ward P, Equinet L, Packer J, Doerig C. Protein kinases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: the kinome of a divergent eukaryote. *BMC Genomics*. (2004) 5(1):79.
- Wiemann S, Arlt D, Huber W, Wellenreuther R, Schleeper S, Mehrle A, *et al.* From ORFeome to biology: a functional genomics pipeline. *Genome Res*. (2004) 14(10B):2136-44.
- World Health Organization. New global effort to eliminate Chagas disease. *Weekly Epidemiological Record*. (2007) 82:245-60.
- Worthey EA, Schnauffer A, Mian IS, Stuart K, Salavati R. Comparative analysis of editosome proteins in trypanosomatids. *Nucleic Acids Res*. (2003) 31(22):6392-408.
- Xu Y, Hortsman H, Seet L, Wong SH, Hong W. SNX3 regulates endosomal function through its PX-domain-mediated interaction with PtdIns(3)P. *Nat. Cell Biol*. (2001) 3(7):658-66.
- Yamada-Ogatta SF, Mota MC, Toma HK, Monteiro-Goes V, Ávila AR, Muniz BD, *et al.* *Trypanosoma cruzi*: cloning and characterization of two genes whose expression is up-regulated in metacyclic trypomastigotes. *Acta Tropica*. (2004) 90:171-79.
- Zeledon R. Some morphological and molecular aspects of the life cycle of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. (1999) 94 (Supl 1):217-8.
- Zhang G, Gibbs E, Kelman Z, O'Donnell M, Hurwitz J. Studies on the interactions between human replication factor C and human proliferating cell nuclear antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1999) 96(5):1869-74.
- Zingales B, Pereira ME, Almeida KA, Umezawa ES, Nehme NS, Oliveira RP, *et al.* Biological parameters and molecular markers of clone CL Brener the reference organism of the *Trypanosoma cruzi* genome project. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. (1997) 92(6):811-14.
- Zwierzynski TA, Buck GA. RNA-protein complexes mediate *in vitro* capping of the spliced-leader primary transcript and U-RNAs in *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1991) 88:5626-30.

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](#)