

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

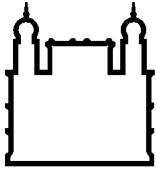
Mestrado em Biociências e Biotecnologia

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PROTEÍNAS
HIPOTÉTICAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS EM
TRIPOMASTIGOTA METACÍCLICO.**

BRUNO DIAS RAMOS

Curitiba/PR

2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS
Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

BRUNO DIAS RAMOS

Caracterização molecular de proteínas hipotéticas diferencialmente expressas em tripomastigota metacíclico.

Dissertação apresentada ao Instituto Carlos Chagas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Christian Macagnan Probst

Curitiba/PR
2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

R175 Ramos, Bruno Dias

Caracterização molecular de proteínas hipotéticas diferencialmente expressas em tripomastigota metacíclico / Bruno Dias Ramos. – Curitiba, 2014.

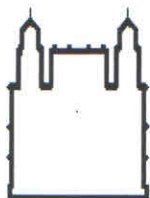
xviii, 99 f.: il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Carlos Chagas, Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, 2014.

Bibliografia: f. 92-99

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Proteínas hipotéticas. 3. Tripomastigota metacíclico. 4. Caracterização molecular. I. Título.

CDD 616.9363



Ministério da Saúde
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
Instituto Carlos Chagas
Coordenação Curso de Pós-Graduação em Biociências e
Biotecnologia



Ata da Sessão Pública de exame de dissertação para obtenção do grau de **Mestre** em
Biociências e Biotecnologia.

Aos 28 dias do mês de fevereiro de dois mil e quatorze, às quatorze horas, nas dependências do Instituto Carlos Chagas/Fiocruz Paraná, reuniu-se a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, composta pelos Professores: Dr. Stênio Perdigão Fragoso, Dra. Daniela Parada Pavoni e Dra. Gisele Picchi, com a finalidade de julgar a dissertação do(a) candidato(a) **Bruno Dias Ramos**, intitulada: **“CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS EM TRIPOMASTIGOTA METACÍCLICO”**, para obtenção do grau de Mestre em Biociências e Biotecnologia. O(a) candidato(a) teve até 45 (quarenta e cinco) minutos para a apresentação, e cada examinador teve um tempo máximo de arguição de 30 (trinta) minutos, seguido de 30 (trinta) minutos para resposta do(a) candidato(a) ou de 60 (sessenta) minutos quando houve diálogo na arguição. O desenvolvimento dos trabalhos seguiu o roteiro de sessão de defesa, estabelecido pela Coordenação do Programa, com abertura, condução e encerramento da sessão solene de defesa feito pelo Presidente **Dr. Stênio Perdigão Fragoso**. Após haver analisado o referido trabalho e arguido o(a) candidato(a), os membros da banca examinadora deliberaram pela ".....*aprovada*.....", habilitando-o(a) ao título de Mestre em Biociências e Biotecnologia, condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da Banca Examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.


Prof. Dr. Stênio Perdigão Fragoso
ICC / FIOCRUZ


Prof. Dra. Daniela Parada Pavoni
ICC / FIOCRUZ


Prof. Dra. Gisele Fernanda Assine Picchi
ICC / FIOCRUZ

*A meus pais e meu irmão.
Por tudo.*

AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

Agradeço ao Dr. Christian M. Probst pela oportunidade de poder desenvolver esse projeto e pela confiança depositada em mim para tal realização.

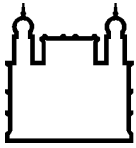
Ao Dr. Henrique Preti pela amizade e por todos os ensinamentos que me transmitiu.

A Bianca Moreno, Emanuella Castro, Marcele Faret e Pedro Schluga pela amizade e pelo valoroso auxílio nas etapas finais do trabalho.

Agradeço a todos os amigos do Instituto Carlos Chagas.

À minha família, por todo o apoio e incentivo.

Do. Or do not.
There is no try.
Jedi Master Yoda



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

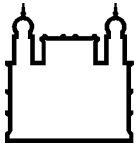
Caracterização molecular de proteínas hipotéticas diferencialmente expressas em tripomastigota metacíclico.

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Bruno Dias Ramos

Desde sua descoberta, no início do século 20, o protozoário parasita causador da Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, se tornou alvo de estudo em diversas instituições de pesquisa ao redor do mundo. Portador de características peculiares interessantes, *T. cruzi* é um excelente modelo de estudo de processo de regulação pós-transcricional. O parasita teve o seu genoma sequenciado em 2005, e foi observado que muitos dos genes contidas em seu genoma não apresentaram uma descrição funcional confiável, sendo anotados como codificadores de "proteínas hipotéticas". Tendo em vista essa ausência de caracterização funcional de uma parcela considerável do genoma de *T. cruzi*, o presente trabalho se propôs a realizar a caracterização molecular de um grupo de 10 proteínas de *T. cruzi* anotadas como "hipotéticas", e que se apresentavam diferencialmente expressas na forma celular tripomastigota metacíclica do parasita, a forma infectiva não-replicativa que inicialmente infecta o hospedeiro mamífero na via usual de transmissão da doença via o inseto vetor. Após amplificação, todos os dez genes selecionados no estudo foram clonados em vetor de entrada (pDONRTM221, Invitrogen), a partir do qual foi possível a transferência do fragmento gênico para outros vetores, visando diferentes abordagens de análise. Todos os genes foram transferidos com sucesso para o vetor de expressão pDESTTM17, de expressão em *Escherichia coli*, e nove para o vetor pTcGFP, de expressão no próprio *T. cruzi* e que fusiona à proteína uma etiqueta fluorescente. Dos genes inseridos no pDESTTM17, sete deles foram com sucesso expressos em *E. coli*, sendo obtidos anticorpos policlonais contra seis das proteínas expressas. Os ensaios de *western blot* realizados com os soros obtidos contra extratos das quatro formas celulares de *T. cruzi* corroboram os dados previamente obtidos de sequenciamento de mRNA. Foram realizados ensaios de imunolocalização com os soros obtidos, no entanto, os padrões encontrados nas imunolocalizações foram diferentes dos observados pelas proteínas fusionadas à etiqueta fluorescente GFP. Ensaios de nocaute gênico das proteínas estudadas foram iniciados, e em breve virão a contribuir para o trabalho. Espera-se que os dados obtidos com esse estudo venham melhorar a anotação funcional e a compreensão das proteínas selecionadas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

Molecular characterization of hypothetical proteins differentially expressed in metacyclic trypomastigotes.

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Bruno Dias Ramos

Since its discovery in early 20th century, the Chagas Disease causative protozoan parasite, *Trypanosoma cruzi*, became the subject of study in several research institutions around the world. Carrier of interesting peculiar characteristics, *T. cruzi* is an excellent study model of post-transcriptional regulation process. The parasite had its genome sequenced in 2005, and it was observed that several of its genes did not show a reliable functional description, been annotated as coding for "hypothetical proteins". Given this lack of functional characterization of a considerable portion of *T. cruzi* genome, the present study proposed to perform a molecular characterization of a group of ten *T. cruzi* proteins annotated as "hypothetical" that in mRNA studies had showed to be differentially expressed in the parasite metacyclic trypomastigotes cell form, the infective non-replicative that initially infect the mammalian host in the usual route of transmission of the disease via the insect vector. After being amplified all the ten genes selected in the study were cloned into entry vector (pDONRTM221, Invitrogen) from which it was possible to transfer the gene fragment to other vectors, targeting different approaches to analysis. All genes were successfully transferred to pDESTTM17 expression vector, for expression in *Escherichia coli*, and nine to the pTcGFP vector, for expression of the protein fused to a fluorescent tag in *T. cruzi*. From all genes inserted into pDESTTM17, seven were successfully expressed in *E. coli*, which six were purified and inoculated in mice for obtaining polyclonal antibody. *Western blot* assays performed against protein extracts of the four *T. cruzi* cell forms using this sera corroborate the data previously obtained by mRNA sequencing. Immunolocalization assays were performed, however, the localization patterns observed in the immunolocalizations were different from those observed by the proteins fused to the GFP fluorescent tag. Gene knockout assays of the studied proteins were started and soon will come to contribute to this characterization work. It is hoped that the data obtained from this study will improve the functional annotation and understanding of the selected proteins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Esquema das estruturas e organelas celulares encontradas em <i>T. cruzi</i>	3
Figura 1.2: As três principais formas evolutivas do <i>T. cruzi</i>	5
Figura 1.3: Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	6
Figura 4.1: Possibilidades de utilização do sistema Gateway a partir do clone de entrada.....	19
Figura 4.2: Vetor pDONR TM 221(Invitrogen) utilizado.....	20
Figura 4.3: Vetor pDEST TM 17 (Invitrogen) utilizado.....	20
Figura 4.4: Vetores pTcGFP utilizados.....	21
Figura 5.1: Gráficos com o padrão de expressão obtido por RNA-seq dos genes selecionados.....	43
Figura 5.2: Padrão de amplificação dos genes, observado em gel de agarose.....	45
Figura 5.3: Perfil eletroforético dos produtos obtidos da PCR de colônia dos clones de entrada.....	45
Figura 5.4: Perfil eletroforético da purificação dos clones de entrada pDONR TM 221.....	46
Figura 5.5: Perfil eletroforético dos produtos obtidos da PCR de colônia dos vetores de expressão pDEST17.....	47
Figura 5.6: Perfil eletroforético da purificação dos clones de expressão pDEST TM 17.....	47
Figura 5.7: Alinhamento do clone A01 com modelos gênicos da cepa CL Brener.....	49
Figura 5.8: Perfil eletroforético das proteínas expressas em células bacterianas.....	51
Figura 5.9. <i>Western blot</i> dos normalizadores de extratos proteicos.....	52
Figura 5.10: Perfil eletroforético da amplificação A) das regiões intergênicas e B) dos cassetes de seleção.....	55
Figura 5.11: Perfil eletroforético da amplificação dos cassetes de nocaute contendo o gene neomicina como marcador de seleção.....	55
Figura 5.12: Perfil eletroforético da amplificação dos cassetes de nocaute contendo o gene higromicina como marcador de seleção.....	56
Figura 5.13: Análise de similaridade entre A01 e A02.....	57
Figura 5.14: Micrografia da localização da proteína A01 fusionada a etiqueta fluorescente.....	58
Figura 5.15: Gráfico HMM relativo ao domínio EF-hand.....	59
Figura 5.16: Análise de similaridade entre A03 e ortólogos encontrados em outros tripanossomatídeos.....	60
Figura 5.17: <i>Western blot</i> com o soro A03 contra os extratos proteicos do ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> ..	61

Figura 5.18: Imunolocalização celular da proteína A03.	62
Figura 5.19: Micrografia da localização da proteína A03 fusionada a etiqueta fluorescente.	63
Figura 5.20: Análise de similaridade entre A04 e a proteína ortóloga em <i>T. cruzi marinkellei</i>	64
Figura 5.21: <i>Western blot</i> com o soro A04 contra os extratos proteicos do <i>T. cruzi</i>	64
Figura 5.22: Imunolocalização celular da proteína A04.	65
Figura 5.23: Micrografia da localização da proteína A04 fusionada à etiqueta fluorescente.	66
Figura 5.24: Comprovação da fusão da proteína A04 com a etiqueta GFP.	66
Figura 5.25: Análise de similaridade entre A05 e a proteína ortóloga em <i>T. cruzi marinkellei</i>	67
Figura 5.26: <i>Western blot</i> com o soro A05 contra os extratos proteicos do <i>T. cruzi</i>	68
Figura 5.27: Imunolocalização da proteína A05.	68
Figura 5.28: Análise de similaridade entre A06 e ortólogos em outros tripanossomatídeos.	70
Figura 5.29: Análise da hidrofobicidade da proteína A06 e de seus ortólogos.	70
Figura 5.30: Análise de similaridade entre A06 e A07.	72
Figura 5.31: Análise de similaridade entre A08 e ortólogos em outros tripanossomatídeos.	73
Figura 5.32 Análise da hidrofobicidade da proteína A08 e de seus ortólogos.	73
Figura 5.33: Micrografia da localização da proteína A08 fusionada a etiqueta fluorescente.	74
Figura 5.34: Análise de similaridade entre A09 e a proteína ortóloga em <i>T. cruzi marinkellei</i>	75
Figura 5.35: Análise de similaridade entre A10 e ortólogos em outros tripanossomatídeos.	76
Figura 5.36: <i>Western blot</i> com o soro A10 contra os extratos proteicos do <i>T. cruzi</i>	77
Figura 5.37: <i>Western blot</i> com o soro A10 contra os extratos proteicos da metaciclogênese.....	78
Figura 5.38: Imunolocalização da proteína A10.	79
Figura 5.39: Micrografia da localização da proteína A10 fusionada a etiqueta fluorescente.	80
Figura 5.40: Comprovação da fusão da proteína A10 com a etiqueta GFP.	80
Figura 5.41: Análise de similaridade entre A11 e ortólogos em outros tripanossomatídeos.	81
Figura 5.42: <i>Western blot</i> com o soro A11 contra os extratos proteicos do <i>T. cruzi</i>	82
Figura 5.43. <i>Western blot</i> com o soro A11 contra os extratos proteicos da metaciclogênese.....	82
Figura 5.44. Imunolocalização da proteína A11.	83
Figura 5.45: Micrografia da localização da proteína A11 fusionada à etiqueta fluorescente.	84

Figura 5.46: Comprovação da fusão da proteína A11 com a etiqueta GFP.	85
Figura 5.47: Análise de similaridade entre A12 e ortólogos em outros tripanossomatídeos.	85
Figura 5.48: <i>Western blot</i> com o soro A12 contra os extratos proteicos do <i>T. cruzi</i>	86
Figura 5.49: <i>Western blot</i> com o soro A12 contra os extratos proteicos da metaciclogênese.....	86
Figura 5.50: Imunolocalização celular da proteína A12.	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1: Iniciadores construídos adaptados para o sistema Gateway®	16
Tabela 4.2: Reações de amplificação dos genes selecionados.	17
Tabela 4.3: Iniciadores utilizados na segunda PCR.	18
Tabela 4.4: PCR de colônia da reação BP.....	22
Tabela 4.5: PCR de colônia da reação LR.....	24
Tabela 4.6: Iniciadores construídos para a amplificação das regiões intergênicas do genes selecionados.	34
Tabela 4.7: Reação de PCR utilizada para amplificação das regiões intergênicas dos genes selecionados.	35
Tabela 4.8: Reação de amplificação dos cassetes de seleção.....	36
Tabela 4.9: Reação de PCR de Fusão.	37
Tabela 4.10: Reação de amplificação da PCR de fusão.	38
Tabela 5.1: Lista de genes selecionados para a caracterização.	42
Tabela 6.1: Metas propostas e taxa de sucesso.	89
Tabela 6.2: Tabela resumida das etapas realizadas.	90

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Histórico.....	1
1.2 Morfologia e aspectos gerais peculiares	2
1.3 Formas evolutivas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
1.4 Ciclo de vida	6
1.5 A metaciclogênese	7
1.6 Transcrição policistrônica, <i>trans-splicing</i> e regulação da expressão gênica	9
1.7 Aspectos genômicos e proteínas hipotéticas em <i>T. cruzi</i>	10
2. JUSTIFICATIVA.....	13
3. OBJETIVOS	14
3.1 Objetivo geral	14
3.2 Objetivos específicos	14
4. MATERIAIS e MÉTODOS.....	15
4.1 Critérios de seleção dos genes	15
4.2 Desenho dos iniciadores	15
4.3 Amplificação dos genes	16
4.4 Purificação	18
4.5 Clonagem.....	19
4.5.1 Clones de entrada	21
4.5.2 Clones de expressão	23
4.6 Expressão das proteínas	24
4.7 Purificação das proteínas	27
4.8 Obtenção dos anticorpos policlonais	28
4.9 Ensaio de <i>western blot</i>	29
4.10 Imunolocalização.....	30

4.11	Proteínas fusionadas à etiqueta fluorescente	32
4.12	Nocautê gênico	33
4.12.1	Amplificação das regiões intergênicas	34
4.12.2	Amplificação dos cassetes de seleção	36
4.12.3	Purificação e Quantificação dos produtos	37
4.12.4	PCR de fusão	37
4.12.5	Concentração do material	38
4.12.6	Cultivo dos parasitas e eletroporação	39
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1	A importância da caracterização de proteínas hipotéticas	41
5.2	Genes selecionados	41
5.3	Amplificação e purificação dos genes	44
5.4	Obtenção dos clones de entrada.....	45
5.5	Obtenção dos clones de expressão.....	46
5.6	Sequenciamento dos clones obtidos	48
5.7	Expressão das proteínas	50
5.8	Purificação das proteínas	51
5.9	Obtenção dos anticorpos policlonais	51
5.10	Imunolocalização	53
5.11	Localização celular com etiqueta fluorescente	53
5.12	Nocautê gênico	54
5.13	Características dos genes selecionados.....	57
5.13.1	A01, TcCLB.509601.140, Proteína Hipotética.	57
5.13.2	A03, TcCLB.508637.130, Proteína Hipotética Conservada.	58
5.13.3	A04, TcCLB.507143.60, Proteína Hipotética.	63
5.13.4	A05, TcCLB.506925.10, Proteína Hipotética.	66

5.13.5	A06, TcCLB.505789.20, Proteína Hipotética Conservada.	69
5.13.6	A08, TcCLB.508863.10, Proteína Hipotética Conservada.	72
5.13.7	A09, TcCLB.508355.230, Proteína Hipotética.	75
5.13.8	A10, TcCLB.510355.230, Proteína Hipotética Conservada.	76
5.13.9	A11, TcCLB.506825.40, Proteína Hipotética Conservada.	81
5.13.10	A12, TcCLB.511577.120, Proteína Hipotética Conservada.....	85
6.	CONCLUSÃO	88
7.	PERSPECTIVAS	91
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

Trypanosoma cruzi (CHAGAS, 1909) é um protista flagelado causador da Doença de Chagas, ou Tripanossomíase Americana, uma moléstia que atinge entre 7 e 8 milhões de pessoas ao redor do mundo (WHO, 2013). É considerada a quarta entre as doenças infecciosas e parasitárias mais prevalentes no continente Americano, sendo registrados cerca de 300 mil novos casos anualmente, causando aproximadamente 23 mil mortes/ano (MARTINS *et al.*, 2012). Apesar de *T. cruzi* ser endêmico da América Latina, já foram registrados casos da Doença de Chagas nos EUA, no Canadá e em diversos países da Europa, principalmente devido ao aumento da imigração ocasional de pessoas infectadas assintomáticas para esses países (KIRCHHOFF, 2011; MARTINS *et al.*, 2012).

Taxonomicamente, *T. cruzi* é pertencente ao Super-reino Metakaryota, Reino Protozoa, Filo Euglenozoa, Classe Kinetoplastea, Ordem Kinetoplastida (CAVALIER-SMITH, 1993; 2009) e Família Trypanosomatidae (LEVINE *et al.*, 1980). Assim como outros integrantes da Família Trypanosomatidae, é um parasita heteróxico, apresentando alternância entre dois organismos hospedeiros em seu ciclo de vida: um inseto triatomíneo hematófago da Família Reduviidae e um vertebrado mamífero, podendo este ser o homem.

A Doença de Chagas pode ser transmitida de diversas formas ao homem, sendo a principal através do inseto vetor hematófago. No ato do repasto sanguíneo, o inseto contaminado elimina excretas com parasitas vivos que, ao entrarem em contato com membranas mucosas ou descontinuidades da pele do hospedeiro mamífero, geram a infecção. Também já foram descritas outras formas de transmissão, seja por transfusão sanguínea ou doação de órgãos de pessoas contaminadas, por transmissão congênita da mãe para o feto em desenvolvimento, bem como por transmissão oral, através do consumo de alimentos contaminados (BENCHIMOL-BARBOSA, 2006; COURA, 2007; KIRCHHOFF, 2011).

Após ter ocorrido a infecção, é iniciada a fase aguda da doença, geralmente assintomática, mas que pode se caracterizar por reação inflamatória local e febre. As formas tripomastigotas encontradas na corrente sanguínea são transportadas por macrófagos a diversos tecidos como fígado, baço e tecidos musculares. Geralmente, a doença evolui para

uma forma crônica assintomática, ocasionalmente ocorrendo evolução para formas cardíacas ou digestivas (megacólon e/ou megaesôfago, principalmente) (TANOWITZ *et al.*, 1992; COURA, 2007; BERN *et al.*, 2011).

A Doença de Chagas foi inicialmente descrita em 1909 pelo médico e pesquisador brasileiro Carlos Chagas, que em seu trabalho relatou seus elementos clínicos, patológicos e epidemiológicos, assim como o vetor de transmissão e o agente etiológico, o protozoário *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909). Desde então, tanto a doença quanto o protozoário que a causa vêm sendo estudados por diversos institutos de pesquisa pelo mundo.

1.2 Morfologia e aspectos gerais peculiares

Assim como os outros membros da Ordem Kinetoplastida, *T. cruzi* possui uma única mitocôndria que apresenta uma especialização denominada cinetoplasto (Figura 1.1), onde é encontrado o DNA mitocondrial. Esse DNA mitocondrial, chamado kDNA, é composto por moléculas circulares chamadas maxicírculos e minicírculos, que correspondem a cerca de 20 a 25% do conteúdo total de DNA celular (SOUZA, 2002). São encontrados entre 20 e 50 maxicírculos, de cerca de 40 kb cada, que são análogos ao DNA mitocondrial dos eucariotos pluricelulares, compreendendo os genes codificadores das proteínas e rRNAs utilizados na mitocôndria. Os minicírculos, por outro lado, são muito mais numerosos, entre 10.000 e 20.000, com 1,4 kb em média, e codificam moléculas de RNA chamadas RNA-guia, gRNAs, responsáveis pelo processo de edição dos mRNAs transcritos a partir dos maxicírculos (BENNE, 1994; STUART *et al.*, 2005). Esse processo de edição ocorre pela adição e, menos frequentemente, remoção de nucleotídeos uridina nos pré-mRNAs dos maxicírculos. Em alguns pré-mRNAs, até 50% dos nucleotídeos são adicionados dessa maneira, gerando um mRNA maduro (BENNE, 1994; MADISON-ANTENUCCI *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2005; STUART *et al.*, 2005).

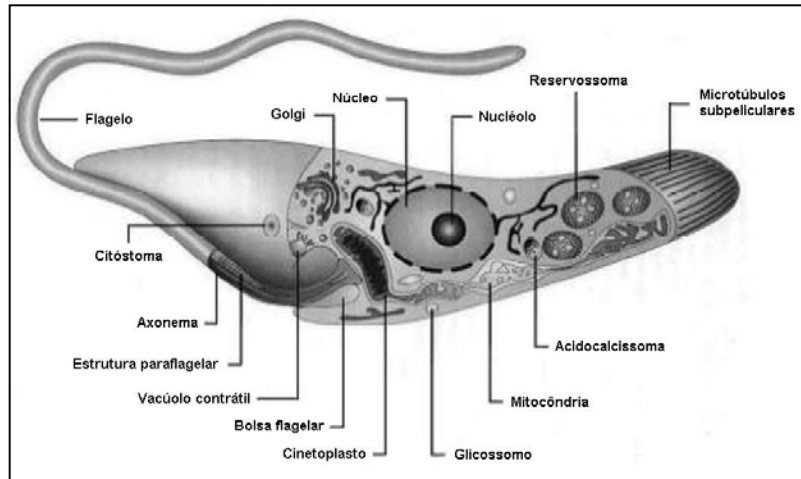


Figura 1.1: Esquema das estruturas e organelas celulares encontradas em *T. cruzi*.
(modificado de SOUZA, 2008)

Os integrantes da Família Trypanosomatidae têm sua superfície celular formada por dois componentes: a membrana plasmática, seguida de uma camada proteica denominada rede de microtúbulos subpelículares. A membrana plasmática de *T. cruzi* é composta por proteínas integrais e periféricas, fosfolipídeos, e pelo glicocálice, esse último sendo três vezes mais espesso nas formas celulares tripomastigota do que na forma epimastigota, tendo papel importante na interação do parasita com a célula hospedeira (MARTINS *et al.*, 2012). A rede de microtúbulos subpelículares se encontra na face interna da membrana plasmática, e é responsável pela resistência e rigidez da célula, formando a maior parte do citoesqueleto dos tripanossomatídeos (SOUZA, 1999; 2002).

Todos os membros da Família Trypanosomatidae possuem um flagelo formado pelo axonema, e que varia de tamanho dependendo da forma celular observada. Esse axonema apresenta a conformação 9 + 2 de microtúbulos, e em *T. cruzi* emerge de uma região denominada bolsa flagelar, uma depressão da superfície celular onde ocorre a junção entre as membranas plasmática e flagelar, e que não apresenta microtúbulos subpelículares em sua face interna (OVERATH *et al.*, 1997; SOUZA, 1999; 2002; MARTINS *et al.*, 2012), o que torna a bolsa flagelar uma região de intenso tráfico de vesículas (OVERATH *et al.*, 1997; SOUZA, 1999; MARTINS *et al.*, 2012).

Outra região responsável pela absorção de nutrientes provenientes do meio externo é conhecida como citóstoma-citofaringe, uma estrutura em forma de funil, formada por uma invaginação da membrana plasmática recoberta por microtúbulos subpelículares em sua face

interna (SOUZA, 1999; 2002; MARTINS *et al.*, 2012). Após serem internalizadas, todas as macromoléculas que foram ingeridas pelo processo de endocitose, tanto pela bolsa flagelar quanto pelo citóstoma-citofaringe, são estocadas e processadas em uma organela arredondada denominadas reservossomo. Os reservossomos são organelas envoltas por membrana, encontradas na porção posterior da forma celular epimastigota de *T. cruzi* que apresentam em seu interior grande quantidade de proteinases, e por isso acredita-se serem compartimentos pré-lisossomais (SOARES, 1999; SOUZA, 1999; 2002; MARTINS *et al.*, 2012).

Outra organela encontrada em *T. cruzi* é o acidocalcissomo. É uma organela vacuolar que possui a capacidade de estocar íons cálcio e pirofosfatos, regular o pH citoplasmático através de bombas de prótons localizadas em sua membrana, além de controlar a osmorregulação celular (SOUZA, 1999; 2002; DOCAMPO & MORENO, 2011; MARTINS *et al.*, 2012).

O glicosomo é outra organela que diferencia os tripanossomatídeos dos demais organismos. É uma organela envolta por membrana, encontrada dispersa por todo o citoplasma celular, e é considerada um tipo especial de peroxissomo variante. Nele estão concentradas as enzimas responsáveis pela via glicolítica, assim como enzimas de outros processos metabólicos, que em outros organismos ocorreriam no citosol da célula (MICHELS *et al.*, 2006; MARTINS *et al.*, 2012).

1.3 Formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi*

Diferentes formas celulares são evidenciadas durante o ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Três formas principais são comumente descritas na literatura: duas formas replicativas, chamadas amastigota e epimastigota, e uma forma infectiva, chamada tripomastigota (TANOWITZ *et al.*, 1992; TYLER *et al.*, 2003).

A forma amastigota (Figura 1.2A) é a forma celular replicativa encontrada no interior das células do hospedeiro mamífero, sendo também encontradas na circulação sanguínea após a lise da célula hospedeira (TANOWITZ *et al.*, 1992). Possui uma morfologia arredondada, com cerca de 3 a 5 μm de diâmetro, e um flagelo muito reduzido contido no interior da bolsa flagelar (SOUZA, 1984). Foi demonstrado que a forma amastigota, além de ser uma forma

replicativa intracelular, também possui a capacidade de infectar células do hospedeiro mamífero (CARVALHO & SOUZA, 1986; TANOWITZ *et al.*, 1992).

A forma epimastigota (Figura 1.2B) é a forma replicativa encontrada no trato digestivo do inseto triatomíneo. Apresenta morfologia fusiforme, medindo entre 20 e 40 μm de comprimento, com o cinetoplasto em forma de bastão, em posição anterior ao núcleo, e com um flagelo livre emergindo de uma região próxima ao cinetoplasto (SOUZA, 1984; MARTINS *et al.*, 2012).

A forma tripomastigota possui cerca de 25 μm de comprimento por 2 μm de largura (Figura 1.2C) (SOUZA, 1984). Apresenta um núcleo mais alongado, com um aumento de heterocromatina em relação aos epimastigotas. São exclusivamente infectivos, não apresentando atividade replicativa. O cinetoplasto é encontrado em posição posterior em relação ao núcleo, com uma morfologia mais arredondada, possivelmente devido a uma diminuição no grau de empacotamento do kDNA. Essa forma celular é dividida em dois tipos: a) um encontrado circulando no sangue e no interior das células de tecidos do hospedeiro vertebrado, sendo denominado tripomastigota sanguíneo; b) outro encontrado na porção posterior do intestino e nas excretas do inseto vetor, chamado de tripomastigota metacíclico. É essa forma, tripomastigota metacíclico, que inicialmente infecta o hospedeiro vertebrado na transmissão usual via inseto vetor.

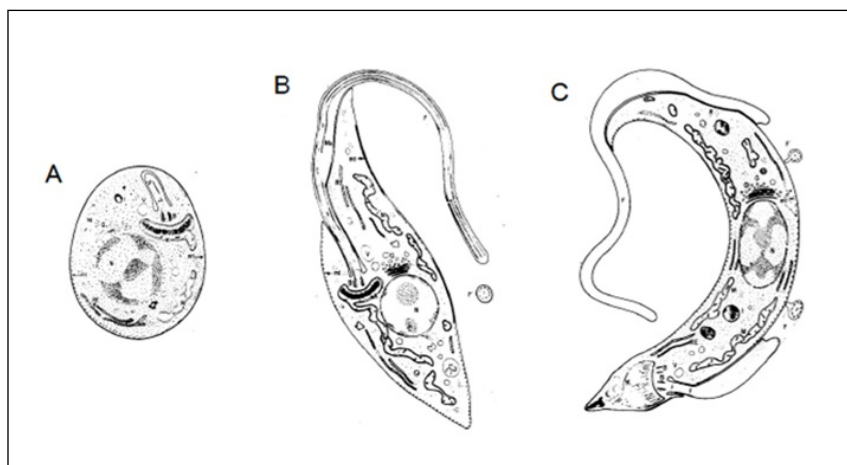


Figura 1.2: As três principais formas evolutivas do *T. cruzi*.

Representação esquemática das formas amastigota (A), epimastigota (B) e tripomastigota (C).
(modificado de <http://lineu.icb.usp.br/~gwunder/3tripanosomiaseAmericana.ppt>).

1.4 Ciclo de vida

Como dito anteriormente, *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida bastante complexo, alternando entre dois hospedeiros, um inseto hematófago da Família Reduviidae e um vertebrado mamífero. O ciclo de vida está evidenciado na Figura 1.3, e didaticamente é iniciado quando a forma celular tripomastigota metacíclica, presente nas excretas do inseto vetor contaminado, infecta o hospedeiro mamífero.

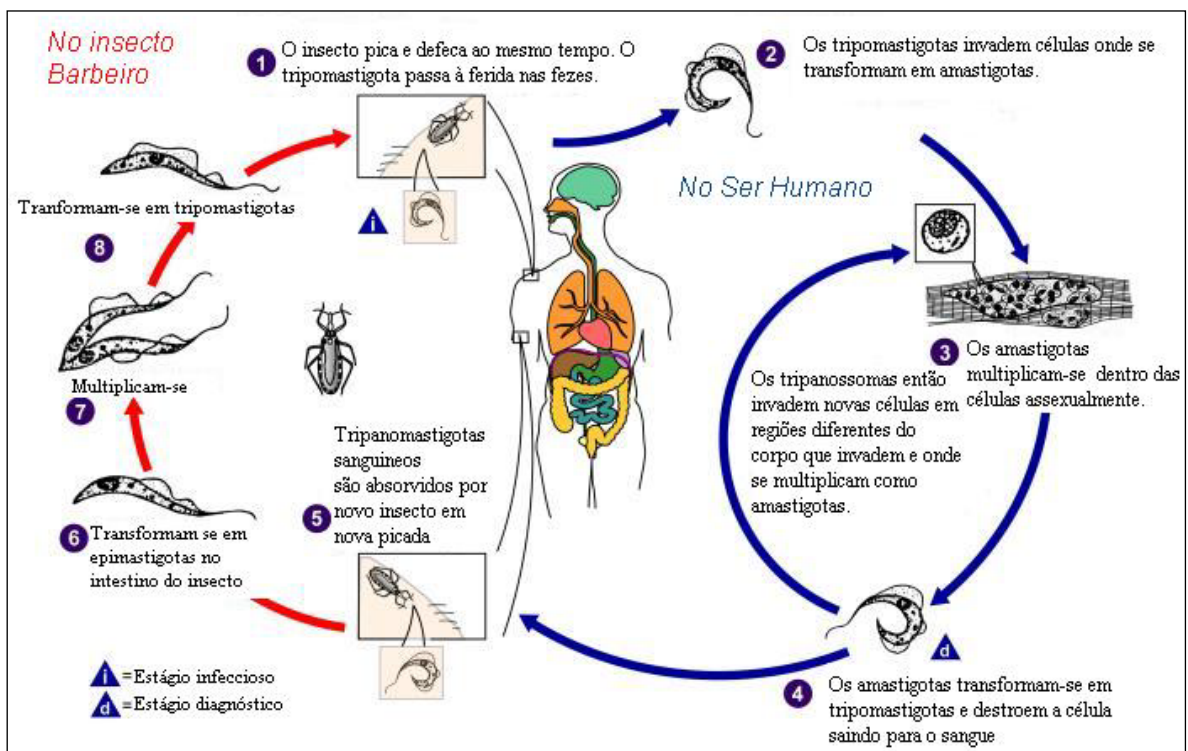


Figura 1.3: Ciclo de vida de *T. cruzi*.
(modificado de www.dpd.cdc.gov/dpdx)

No ato do repasto sanguíneo, o inseto hematófago infectado elimina suas excretas sobre a pele do mamífero do qual se alimenta. Essas excretas contêm parasitas na forma infectiva tripomastigota metacíclica, que infectam o mamífero ao entrarem na epiderme, seja pelo ponto de lesão causado pela picada do inseto hematófago, seja por outras discontinuidades da pele do mamífero, ou ainda por regiões de membranas mucosas (KIRCHHOFF, 2011). Esses tripomastigotas metacíclicos invadem as células ao redor do sítio de inoculação, assim como podem atingir a corrente sanguínea, e serem então distribuídos para diversas regiões do organismo do mamífero, podendo infectar vários outros tipos celulares (SOUZA *et al.*, 2010; MARTINS *et al.*, 2012). Os tripomastigotas

metacíclicos são internalizados pelas células hospedeiras através da formação de pseudópodes, e ao serem internalizados, ficam envoltos por uma estrutura denominada vacúolo parasitóforo. Lisossomos da célula hospedeira se fundem ao vacúolo, aumentando a acidez no interior dessa estrutura, o que inicia o processo de diferenciação da forma tripomastigota para a forma amastigota. Também ocorre a dissolução da membrana do vacúolo parasitóforo pela ação de uma enzima - TcTOX - secretada pelo próprio parasita (TYLER *et al.*, 2003; MARTINS *et al.*, 2012). A forma amastigota, agora livre no citoplasma da célula hospedeira, inicia um intenso processo de divisão celular por fissão binária e então, após vários ciclos de divisão, inicia sua transformação para a forma tripomastigota sanguínea, com o alongamento do corpo, a aquisição de um longo flagelo e movimentação intensa. Essa movimentação intensa leva à ruptura da célula hospedeira, ocorrendo então a liberação dos tripomastigota para áreas extracelulares, o que pode ocasionar a infecção de outras células do hospedeiro. Caso esses parasitas livres atinjam a corrente sanguínea, podem ser ingeridos pelo inseto vetor no ato do repasto sanguíneo (SOUZA *et al.*, 2010; MARTINS *et al.*, 2012).

Ao se alimentar do sangue de um mamífero contaminado, o inseto vetor hematófago ingere junto os parasitas na forma tripomastigota sanguínea, que ao atingirem o estômago do inseto iniciam o processo de diferenciação para a forma replicativa epimastigota, que então migra para as regiões posteriores do intestino, aderindo à sua superfície, onde sofre intensa replicação celular. Após diversos ciclos de divisão celular, esses epimastigotas iniciam o processo de diferenciação para a forma infectante tripomastigota metacíclica, que se soltam da parede do intestino e se acumulam no reto do inseto vetor, sendo eliminados com suas excretas no ato do novo repasto sanguíneo, fechando dessa forma o ciclo (Figura 1.3) (CHAGAS, 1909; TANOWITZ *et al.*, 1992; TYLER *et al.*, 2003; GOLDENBERG & ÁVILA, 2011).

1.5 A metaciclogênese

Uma etapa fundamental importante no ciclo de vida de *T. cruzi* descrito anteriormente é o processo de diferenciação da forma replicativa e não-infectiva epimastigota para a forma não-replicativa e infectiva tripomastigota metacíclica, que ocorre na porção final do trato digestivo do inseto vetor, e que recebe o nome de metaciclogênese (TYLER & ENGMAN, 2001; TYLER *et al.*, 2003; MARTINS *et al.*, 2012). Após o desenvolvimento de um meio de

cultura com condições quimicamente definidas que mimetiza, *in vitro*, o processo de diferenciação que ocorre no interior do inseto vetor (CONTRERAS *et al.*, 1985b; BONALDO *et al.*, 1988), esse processo se tornou um modelo no estudo de diferenciação celular e de regulação da expressão gênica no parasita.

Tanto *in vitro* quanto *in vivo*, para que ocorra a diferenciação das formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos, os epimastigotas devem aderir a um substrato, seja ao frasco no qual a cultura é mantida, ou à parede do intestino do inseto vetor (BONALDO *et al.*, 1988; SCHAUB, 1988). Foi demonstrado que essa adesão celular ao substrato, e conseqüentemente o processo de diferenciação, são desencadeados por um período de estresse nutricional vivenciado pelo parasita, e que esses fenômenos de adesão e diferenciação são interrompidos caso as condições nutricionais do meio sejam restauradas (BONALDO *et al.*, 1988; SCHAUB, 1988; FIQUEIREDO *et al.*, 2000). Acredita-se que sinais provenientes do processo de adesão causem alterações nos padrões de expressão gênica dos parasitas (GOLDENBERG *et al.*, 1985)

In vivo, a metacicloênese ocorre na porção terminal do trato digestivo do triatomíneo, uma região onde ocorre acentuada escassez de nutrientes em consequência da absorção dos mesmos pelas porções anteriores do intestino do inseto, e pela sua utilização pelos próprios parasitas. No interior dos epimastigotas em diferenciação, essa escassez nutricional leva à acidificação do conteúdo dos reservossomos e a ativação de enzimas encontradas no interior dessa organela, que então evolui pra um estado lisossomal, iniciando a degradação das proteínas armazenadas no seu interior. A degradação dessas proteínas leva ao desaparecimento do reservossomo, liberando para o citoplasma celular os aminoácidos digeridos, que serão então utilizados como fonte de energia (URBINA, 1994; SOARES, 1999).

Foi observado que, apesar de importante e necessário, o processo de adesão ao substrato não é suficiente para promover a diferenciação celular (BONALDO *et al.*, 1988). Outros fatores já foram descritos como capazes de induzir a metacicloênese, entre eles o estresse nutricional (CONTRERAS *et al.*, 1985b). *In vitro* foi evidenciada a importância do AMP cíclico (cAMP) e análogos no desencadeamento do processo de metacicloênese (GONZALES-PERDOMO *et al.*, 1988; KOLLIEN & SCHAUB, 2000). No inseto vetor,

cAMP é secretado pelos túbulos de Malpighi, estando presente em sua urina, o que sugere um papel do cAMP na metaciclogênese em condições naturais (KOLLIEN & SCHAUB, 2000).

Apesar de ainda não se conhecer todos os elementos que influenciam o processo de metaciclogênese, alguns fatores já foram descritos como capazes de afetar no processo. A L-prolina foi descrita como um dos fatores que estimulam o processo de diferenciação (CONTRERAS *et al.*, 1985b), enquanto que enzimas inibidoras de cisteino-proteases foram descritas como fatores inibidores do processo (BONALDO *et al.* 1991).

Durante o processo de metaciclogênese, são observadas modificações no padrão de expressão gênica dos parasitas. Foi documentado que essas mudanças no padrão de expressão gênica ocorrem antes de serem observadas as alterações morfológicas nos parasitas (CONTRERAS *et al.*, 1985a; ÁVILA *et al.*, 2003).

1.6 Transcrição policistrônica, *trans-splicing* e regulação da expressão gênica

Na maioria dos eucariotos, o processo de transcrição é regulado por uma sequência promotora localizada a montante da região codificadora. Após a transcrição, o transcrito primário é processado, sendo adicionado um resíduo metil-guanosina-trifosfato, ou cap, na sua extremidade 5' e uma cauda poli-A na sua extremidade 3'. A reação de *cis-splicing* remove os íntrons deste pré-transcrito e liga os seus éxons, formando ao final o transcrito maduro.

Nos tripanossomatídeos, o processo de transcrição gera como produto transcritos policistrônicos, que corresponde a moléculas únicas de RNA contendo diversos genes que, diferentemente do observado nos operons de procariotos, não são relacionados a uma mesma via metabólica. A molécula de RNA policistrônica é processada por um mecanismo denominado *trans-splicing*, que gera as unidades monocistrônicas traduzíveis. Nesse *trans-splicing* ocorre a separação das unidades monocistrônicas, sendo também adicionados a sequência *spliced leader* (sequência conservada presente em todos os mRNAs maduros, espécie-específica, de 39 nucleotídeos, SL) na extremidade 5' e a cauda poli-A, na extremidade 3' (VANHAMME & PAYS, 1995; TEIXEIRA, et al., 2011).

Diferente da maioria dos eucariotos, onde a regulação da expressão gênica é realizada no início da transcrição pela enzima RNA polimerase II, em tripanossomatídeos não há evidências da existência de promotores que regulam a transcrição dos genes codificadores de proteínas. Assim, acredita-se que os RNAs policistrônicos precursores de tripanossomatídeos sejam transcritos mais ou menos na mesma taxa, sendo os mecanismos de regulação da expressão gênica ocorrendo em etapas posteriores à transcrição, denominada regulação pós-transcricional. Processos conhecidos que regulam a expressão gênica nos tripanossomatídeos compreendem mudanças na cromatina, o processamento do mRNA, a estabilidade e taxa de tradução desse mRNA, assim como a estabilidade das proteínas formadas e modificações pós-traducionais que possam ocorrer (KRAMMER, 2012).

1.7 Aspectos genômicos e proteínas hipotéticas em *T. cruzi*

O conteúdo genético do *Trypanosoma cruzi* está localizado em duas organelas celulares distintas: o núcleo e a mitocôndria. Não ocorre condensação cromossômica em nenhum estágio do ciclo celular do parasita, sendo necessárias técnicas diferenciadas para a análise de seu cariótipo. ELIAS e colaboradores (2002) demonstraram que a cromatina sofre alterações em sua distribuição durante o ciclo celular do parasita, sendo observada concentrada no centro do núcleo durante a fase G1, e que se desloca para a periferia na fase S, onde ocorre a replicação.

No ano de 2005 foi publicado o primeiro esboço do sequenciamento do genoma de *T. cruzi*, que foi realizado por um consórcio internacional formado pelo *The Institute for Genomic Research* (TIGR), *Seattle Biomedical Research Institute* (SBRI) e *Karolinska Institutet* (KI). A cepa CL Brener, por ser bem caracterizada experimentalmente na época e por ser considerada representativa do universo de cepas circulantes de *T. cruzi* (ZINGALES *et al.*, 1997), foi a escolhida para o sequenciamento, que foi realizado pela técnica de *whole genome shotgun* (WGS) (EL-SAYED *et al.*, 2005a). Com o sequenciamento terminado, foi estimado que o genoma diploide do parasita possui aproximadamente 110 Mb, apresentando cerca de 12.000 genes em cada haplótipo. No total, foram identificados 23.216 elementos codificadores de proteínas no parasita, dos quais 11.398 genes apresentam função conhecida confirmada por experimentação ou por homologia, 9.975 genes codificadores de proteínas

hipotéticas conservadas e 1.843 genes codificadores de proteínas hipotéticas, além de 1.994 genes que codificam moléculas de RNAs funcionais e estruturais (EL-SAYED *et al.*, 2005a).

Com o esboço do genoma de *T. cruzi* pronto, foi observado que mais de 50% do genoma do parasita é formado por sequências repetitivas compostas por famílias de proteínas de superfície, retrotransposons e elementos subteloméricos (EL-SAYED *et al.*, 2005a; TEIXEIRA *et al.*, 2011). As famílias gênicas mais representativas são as codificadores de proteínas de superfície, como é o caso das trans-sialidases, das proteínas de superfície associadas à mucina (MASP), das mucinas e da glicoproteína de superfície gp63, que correspondem a 18% de todos os genes codificadores de proteínas do parasita. Foi observado uma grande abundância de genes codificadores de proteína-quinases e proteína-fosfatases no genoma de *T. cruzi*. Por outro lado, foi observada a ausência de várias classes de proteínas sinalizadoras importantes.

Com a publicação do genoma de outros dois tripanossomatídeos, *T. brucei* e *Leishmania major*, foi possível realizar comparações entre os três patógenos. Observou-se que 6.158 grupos de genes ortólogos (COG, *clusters of orthologous genes*) são compartilhados entre os três tripanossomatídeos, e que 1.014 COGs são encontrados em somente dois deles (EL-SAYED *et al.*, 2005b). Apesar de terem divergido há mais de 200 milhões de anos, esses tripanossomatídeos apresentam um grau muito elevado de conservação de sintenia.

Como dito anteriormente, tendo obtido os dados de sequenciamento do genoma de *T. cruzi*, foram realizadas análises de predição gênica para a inferência de função aos genes encontrados. Por ser um organismo pouco estudado e por estar evolutivamente distante dos organismos modelos biológicos clássicos, *T. cruzi* teve muitas de suas regiões codificadoras preditas com uma anotação funcional pouco confiável, sendo então genericamente classificadas de "proteínas hipotéticas". Constituindo um pouco mais da metade das proteínas identificadas no parasita *T. cruzi*, as proteínas hipotéticas são divididas em dois grupos: as "proteínas hipotéticas conservadas", que apresentam ortólogos em outros organismos, e as "proteínas hipotéticas", que no caso seriam restritas a *T. cruzi*. Se levarmos em consideração somente a forma celular que inicia a infecção do hospedeiro mamífero via transmissão vetorial, a forma tripomastigota metacíclico, foi observado que a grande maioria dos genes diferencialmente expressos nessa forma estão anotados como codificadores de proteínas hipotéticas (PROBST, 2005), demonstrando a grande importância do estudo funcional desse

grupo de proteínas, pelo seu interesse no esclarecimento da biologia do parasita, assim como pelo seu potencial como alvo no desenvolvimento métodos profiláticos de combate e prevenção da Doença de Chagas.

2. JUSTIFICATIVA

Apesar de vir sendo estudada há mais de um século, a Doença de Chagas ainda é um grave problema de saúde pública no mundo, afetando milhões de pessoas, especialmente na América Latina. Com cerca de 300 mil novos relatos de pessoas infectadas anualmente, é uma das doenças parasitárias de maior impacto no continente Americano. Diversos estudos já foram realizados proporcionando avanços tanto no entendimento dos aspectos clínicos da doença quanto das questões biológicas e metabólicas do protozoário parasita que a causa, *Trypanosoma cruzi*. No entanto, ainda não foram desenvolvidos métodos profiláticos eficazes de combate e tratamento da Doença de Chagas, e até o momento a melhor forma de controle da dispersão da doença consiste na eliminação do inseto vetor das regiões habitadas.

Além de sua importância como causador da Doença de Chagas, *T. cruzi* também é um importante modelo de estudo por apresentar diversas características peculiares que são fundamentais em seu ciclo de vida.

Visto que o processo de metaciclogênese origina as formas infectivas tripomastigotas metacíclicas, que irão iniciar a infecção na via usual de transmissão da Doença de Chagas pelo inseto vetor, e que importantes modificações estruturais e bioquímicas ocorrem no parasita nesse processo, é de extrema importância a compreensão dos mecanismos envolvidos nessa etapa de diferenciação.

Após o sequenciamento de *T. cruzi* ter sido completado, algumas perguntas puderam ser respondidas sobre a biologia molecular desse parasita. No entanto, a velocidade com que os dados genômicos surgiram fez com que ocorresse um acúmulo de informação, que não foi acompanhado pela elucidação funcional dessas proteínas sequenciadas, levando muitos desses elementos sequenciados a serem anotados como codificadores de "proteína hipotética". Com o grande aumento nos estudos e análises em larga escala, que passaram a abranger os organismos em uma escala global, tornou-se de extrema importância a caracterização das "proteínas hipotéticas".

Dessa forma, o presente trabalho visa a caracterização de um grupo de genes anotados como codificadores de proteínas hipotéticas e hipotéticas conservadas de *T. cruzi*, que apresentam uma expressão elevada na forma celular tripomastigota metacíclica.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar genes de *Trypanosoma cruzi* anotados como codificadores de proteínas hipotéticas, que apresentam uma expressão elevada na forma celular tripomastigota metacíclico, selecionados a partir de dados provenientes de análise do ciclo de vida do parasita, obtidos pela metodologia de sequenciamento de RNA (RNA-seq).

3.2 Objetivos específicos

- Clonar os genes de estudo utilizando o Sistema Gateway[®];
- Expressar os genes selecionados em bactéria (*Escherichia coli*);
- Produzir anticorpos policlonais em camundongos a partir das proteínas recombinantes expressas;
- Realizar ensaios de *western blot* utilizando os anticorpos obtidos;
- Realizar imunolocalização por microscopia óptica de fluorescência utilizando os anticorpos obtidos;
- Realizar ensaios de localização celular com as proteínas selecionadas fusionadas a etiqueta fluorescente GFP (*green fluorescent protein*);
- Realizar o nocaute gênico dos genes selecionadas;
- Avaliar os fenótipos obtidos com os nocautes gênicos;
- Realizar o sequenciamento do transcriptoma dos parasitas nocauteados.

4. MATERIAIS e MÉTODOS

4.1 Critérios de seleção dos genes

Os genes de estudo foram selecionados devido ao seu padrão de expressão no ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*, obtido através de sequenciamento de RNA (RNA-seq) pelo grupo de Genômica Funcional do Instituto Carlos Chagas/FIOCRUZ-PR (PAVONI *et al.*, em preparação). Nesse trabalho, as quatro formas morfológicas principais de *T. cruzi* tiveram seus transcritos sequenciados e quantificados, obtendo dessa forma o padrão de expressão dos genes de cada uma, permitindo selecionar genes diferencialmente expressos em cada etapa do ciclo de vida do parasita.

No presente trabalho foram selecionados 10 genes, todos diferencialmente expressos na forma celular tripomastigota metacíclica, com uma expressão elevada nessa forma, e apresentando uma expressão basal nas outras formas do ciclo de vida do parasita. Todos os genes selecionados estão anotados como codificadores de proteínas "hipotéticas" ou "hipotéticas conservadas". Para a seleção dos melhores genes para o estudo entre os diversos genes com essas características no genoma de *T. cruzi*, a estrutura da região codificadora dos mesmos foi avaliada, bem como a anotação funcional dos genes adjacentes. Caso a estrutura codificadora do gene selecionado fosse considerada pouco complexa (baixa diversidade de códons) ou fosse adjacente a genes de famílias multi-gênicas, o mesmo era eliminado, visando primariamente a não inclusão de regiões codificadoras espúrias, isto é, que não codificassem realmente para proteínas de função desconhecida.

4.2 Desenho dos iniciadores

Para proceder à amplificação dos genes selecionados, foi necessário prever e desenhar os iniciadores que seriam utilizados no processo. Foi feita a análise das regiões codificadoras selecionadas e foi identificada, para cada gene, a região codificadora mais provável. A partir dessa região, foram desenhados os oligonucleotídeos com uma temperatura de fusão próxima a 60°C utilizando a fórmula:

$$T_m = 81.5^{\circ}\text{C} + 16.6^{\circ}\text{C} \times (\log_{10}[\text{Na}^+] + [\text{K}^+]) + 0.41^{\circ}\text{C} \times (\%GC) - 675/N$$

onde T_m equivale à temperatura de fusão e N é o tamanho do oligonucleotídeo. A

concentração de sal utilizada foi de 50 mM.

A essas sequências de oligonucleotídeos foi acrescentada a sequência que permitiria acoplar ao gene amplificado a sequência de recombinação attB utilizada pelo sistema de clonagem Gateway[®]. Devido à dificuldade em se identificar o início correto da região codificadora de dois genes dentre os selecionados, foram desenhados dois iniciadores distintos para cada um deles, e portanto, para o presente trabalho construímos a princípio 12 clones Gateway.

Abaixo segue a Tabela 4.1, com a sequência de iniciadores predita para cada gene utilizado no estudo.

Tabela 4.1: Iniciadores construídos adaptados para o sistema Gateway[®].

ID dos Genes (identificação)	Iniciadores <i>forward</i> (5' - 3')	Iniciadores <i>reverse</i> (5' - 3')
TcCLB.509601.140 (A01)	GGCTCCACCATGCGGTTTGTITTTGTCTTC	TGGGTGGATYCATTTTTTACACAGTTGTCAGG
TcCLB.509767.140 (A02)	GGCTCCACCATGCGATTGTTTTTTTCTTCTC	TGGGTGGATYCACTGGCGTCTGTGGAATC
TcCLB.508637.130 (A03)	GGCTCCACCATGAAATGTGGACAAAAGGC	TGGGTGGATYCAAACGGCAAAAACAAAATAGATTG
TcCLB.507143.60 (A04)	GGCTCCACCATGGACGAGACTTCGCTC	TGGGTGGATYCATGAGTCCGTGCCGTTGT
TcCLB.506925.10 (A05)	GGCTCCACCATGACGGCATTGTGCGCTT	TGGGTGGATYCACACGCCTTGCCGCCAC
TcCLB.505789.20 (A06)	GGCTCCACCATGCCCTCTGGCAAAGCAAC	TGGGTGGATYCAAACCCCAAGAGGGCTCGTA
TcCLB.510065.10 (A07)	GGCTCCACCATGCCCTCTGGCAAAGCAAC	TGGGTGGATYCAACTACTCTGGGCAGCATTTAC
TcCLB.508863.10 (A08)	GGCTCCACCATGGTGAAAGGGAAACTGG	TGGGTGGATYCACGCGCTTGCATAAACGCA
TcCLB.508355.230 (A09)	GGCTCCACCATGAGTGATCATCACGAAAATG	TGGGTGGATYCACAACATAGATGCATTTGGGC
TcCLB.510355.230 (A10)	GGCTCCACCATGGAGTCTATCTTTTGCCT	TGGGTGGATYCATTCAACGCGAAAAACAGTT
TcCLB.506825.40 (A11)	GGCTCCACCATGGGAAACGGCGCCT	TGGGTGGATYCAATCCTCAAACATCATAAAGAGG
TcCLB.511577.120 (A12)	GGCTCCACCATGTCCACGAGCAAGGAAA	TGGGTGGATYCAGCTCAATAAAGAACGTGTCC

Iniciadores das sequências nucleotídicas com os adaptadores do sistema Gateway[®]
(entre parênteses se encontra a identificação pessoal utilizada nos experimentos; em negrito e sublinhado está a sequência específica ao gene).

4.3 Amplificação dos genes

A amplificação dos genes foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR),

utilizando a enzima de alta fidelidade AccuPrime™ *Pfx* DNA Polimerase (Invitrogen). Foram utilizadas para as ampliações condições já padronizadas pelo grupo, ocorrendo modificações somente quando observado a ausência de amplificação em algum gene (Tabela 4.2).

A amplificação foi realizada em duas etapas (duas PCRs): uma primeira PCR, de 15 ciclos, que tem por objetivo amplificar o fragmento gênico de estudo, e que utiliza os iniciadores específicos do gene, descritos acima. A segunda PCR, de 20 ciclos, tem por intuito incorporar os sites de recombinação attB1 e attB2, utilizados pela plataforma Gateway®, nas extremidades do produto recém amplificado, totalizando uma reação de PCR de 35 ciclos.

Tabela 4.2: Reações de amplificação dos genes selecionados.

1ª PCR (15 µL)		Programa termociclador (15 ciclos*)
AccuPrime <i>Pfx</i> DNA Polimerase (2.5 U/µl)	0,15 µL	96° C --- 2 minutos
10X AccuPrime™ <i>Pfx</i> Reaction Mix	1,3 µL	96° C --- 15 segundos
DNA genômico Dm28c (100 ng/µL)	0,8 µL	57° C --- 30 segundos
Iniciadores <i>forward</i> (0,5 µM)	2,0 µL	68° C --- 1 minuto 40 segundos
Iniciadores <i>reverse</i> (0,5 µM)	2,0 µL	68° C --- 5 minutos
H ₂ O 18,2Ω	8,75 µL	
2ª PCR (15 µL)		Programa termociclador (20 ciclos*)
AccuPrime <i>Pfx</i> DNA Polimerase (2.5 U/µl)	0,24 µL	96° C --- 2 minutos
10X AccuPrime™ <i>Pfx</i> Reaction Mix	2,54 µL	96° C --- 15 segundos
Iniciadores <i>forward</i> (5 µM)	0,51 µL	59° C --- 30 segundos
Iniciadores <i>reverse</i> (5 µM)	0,51 µL	68° C --- 1 minuto 40 segundos
H ₂ O 18,2Ω	11,2 µL	68° C --- 5 minutos

*: O número de ciclos na PCR se refere às etapas em negrito do programa utilizado.

Para a segunda PCR foram utilizados iniciadores específicos, apresentados na Tabela 4.3. Foi construído um iniciador *forward* e dois iniciadores *reverse*: um que adiciona um códon de parada na extremidade 3' do gene, e um sem o códon de parada. Tendo em vista os ensaios de localização celular com etiqueta fluorescente fusionada nas extremidades das proteínas estudadas, os clones foram obtidos com ou sem o códon de parada.

Tabela 4.3: Iniciadores utilizados na segunda PCR.

Identificação dos iniciadores	Sequência iniciadores (5' - 3')
<i>Forward</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCACCATG
Reverse COM códon de parada	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGGATTCA
Reverse SEM códon de parada	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGGATCCA

O mix de reagentes da segunda PCR é acrescentado ao produto da primeira após os 15 ciclos iniciais, obtendo um volume final de 30 μ L, que é então submetido a mais 20 ciclos de amplificação.

4.4 Purificação

Com o intuito de remover fragmentos pequenos de DNA sintetizados e os iniciadores utilizados no processo de amplificação, foi utilizado o sistema Agencourt[®] AMPure[®] PCR Purification (Beckman Coulter), que utiliza a tecnologia de esferas paramagnéticas, que se ligam a *amplicons* com tamanho superior a 100 pares de bases. O excesso de oligonucleotídeos, nucleotídeos, sais e enzimas são removidos por um procedimento de lavagem. Esse processo é realizado em três etapas:

- Ligação seletiva do produto de PCR nas esferas paramagnéticas e separação das esferas com um campo magnético;
- Limpeza das esferas para remoção de contaminantes;
- Eluição do produto de PCR purificado das esferas magnéticas.

Ao produto de PCR foi adicionado 30 μ L (v/v) da solução de esferas magnéticas Agencourt AMPure, homogeneizando em seguida, e deixando a solução incubando por aproximadamente 5 minutos. Em seguida, os tubos foram colocados em uma placa magnética por 10 minutos para a separação das esferas da solução, observado a formação de um halo no interior do tubo de PCR. Ainda com os tubos na placa magnética, o sobrenadante foi descartado e foi acrescentado 200 μ L de etanol 70% em cada tubo. Aguardou-se 30 segundos

e o sobrenadante foi então descartado. Esse procedimento de lavagem foi repetido mais uma vez, e em seguida os tubos foram conduzidos a uma estufa a 37°C para secarem bem.

Após estarem bem secos, foi acrescentado 15 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) em cada tubo, e os mesmos foram homogeneizados bem, usando um vortex, para ressuspender as esferas paramagnéticas. Em seguida, com os tubos novamente posicionados na placa magnética, o sobrenadante foi retirado e passado para tubos novos e a purificação foi confirmada e analisada através de eletroforese em gel de agarose, e posteriormente dosadas utilizando um espectrofotômetro.

4.5 Clonagem

A clonagem dos produtos gênicos amplificados foi realizada utilizando o sistema de clonagem comercial Gateway® (Invitrogen), que se baseia em recombinação utilizando sequências sítio específicas do bacteriófago lambda. O sistema de clonagem Gateway® permite inserir e transferir fragmentos de DNA entre diversos tipos vetores, de acordo com a necessidade do estudo (Figura 4.1), permitindo uma rápida análise funcional das proteínas de interesse.

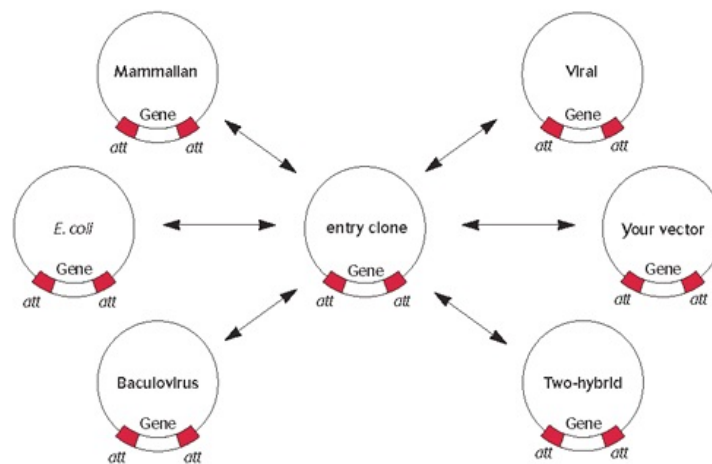


Figura 4.1: Possibilidades de utilização do sistema Gateway a partir do clone de entrada.
(Fonte: www.invitrogen.com)

Para que o produto gênico amplificado entre nessa plataforma, foi escolhido o vetor de entrada pDONR™221 (Invitrogen, Figura 4.2) que permite a clonagem direcional dos produtos de PCR. O vetor pDONR™221 possui 4.761 pares de bases (bp) e apresenta o marcador de seleção para o antibiótico canamicina. Ele possui os sítios de recombinação attP1

e attP2, onde ocorrerá, respectivamente, a recombinação com os sítios attB1 e attB2 incorporados no gene amplificado, resultando na formação dos sítios attL1 e attL2.

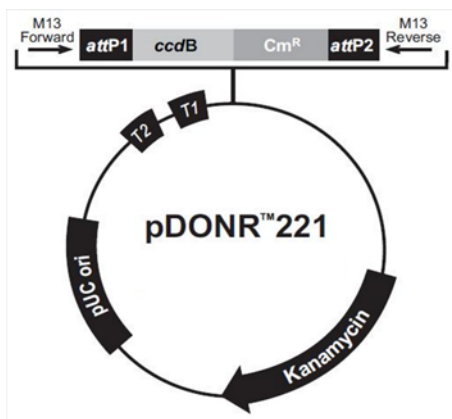


Figura 4.2: Vetor pDONR™221(Invitrogen) utilizado.
(Fonte: www.invitrogen.com)

Após obter os clones de entrada, é possível transferir os insertos em diversos vetores de estudo. Inicialmente foi realizada a recombinação com o vetor pDEST™17 (Invitrogen, Figura 4.3) que é um vetor utilizado para expressão heteróloga das proteínas de interesse em *E. coli*, e que fusiona uma sequência de seis aminoácidos histidina na extremidade N-terminal da proteína. O vetor pDEST™17 possui 6.354 pares de bases (bp) e apresenta o marcador de seleção para o antibiótico ampicilina. Ele possui os sítios de recombinação attR1 e attR2, nos quais ocorrerá a recombinação com os sítios attL1 e attL2, respectivamente, incorporados no vetor de entrada, resultando na formação dos sítios attB1 e attB2.

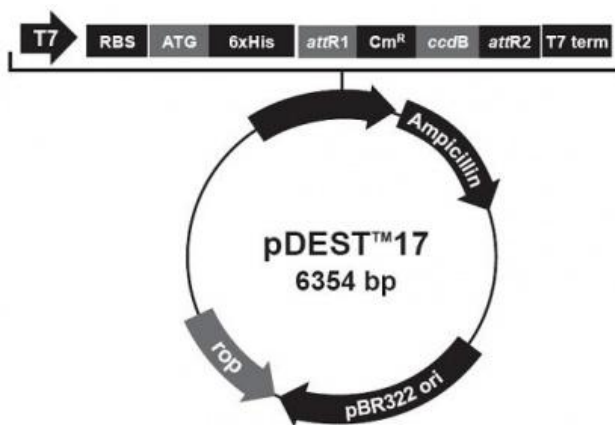


Figura 4.3: Vetor pDEST™17 (Invitrogen) utilizado.
(Fonte: www.invitrogen.com)

Para os ensaios de localização celular com as proteínas fusionadas a uma etiqueta

fluorescente GFP (*green fluorescent protein*), foram utilizados vetores de expressão do próprio *T. cruzi*, construídos pelo nosso grupo, denominado pTcGFP. Esses vetores, que correspondem a vetores pDEST™ modificados, fusionam a etiqueta fluorescente ou na extremidade amino-terminal, ou na extremidade carboxila-terminal da proteína expressa (Figura 4.4).

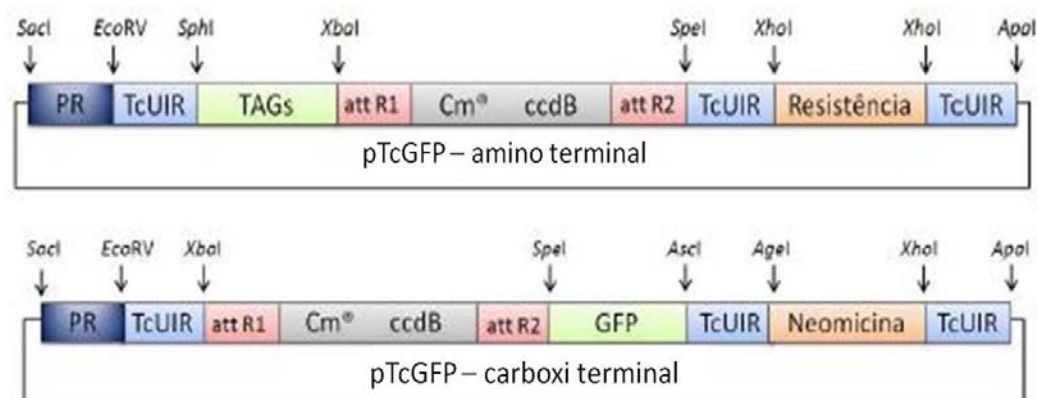


Figura 4.4: Vetores pTcGFP utilizados.
(Modificado de: Batista *et al.*, 2010)

4.5.1 Clones de entrada

Como dito anteriormente, a inserção dos produtos de PCR nos vetores ocorreu por um processo de recombinação sítio-específica. Na etapa de amplificação, foram gerados amplicons com os sítios attB nas extremidades, os quais iriam recombinar com os sítios presentes no vetor pDONR™221 (Invitrogen). Após esses amplicons terem sido devidamente purificados e quantificados por espectrofotômetro, foi realizada a reação de recombinação, seguindo as orientações fornecidas pelo fabricante (*Gateway® BP Clonase II Enzyme Mix*, Invitrogen). Para a reação BP, que corresponde à inserção do gene de interesse amplificado (com os sítios attB1 e attB2) no vetor de entrada, pDONR™221 (que possui os sítios attP1 e attP2), foram acrescentados 150 ng de produto de PCR contendo o sítio attB, 150 ng de plasmídeo pDONR™221, completando para 9 µL com tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8). Foi adicionado 1 µL de *BP Clonase II Enzyme Mix*, e a reação foi incubada por cerca de 16 horas a 25°C. Em seguida, foi adicionado 1 µg de enzima proteinase K e a reação incubada por 10 minutos a 37°C.

Ao término dessa etapa, foi realizada a transformação (processo de inserção de material genético em células bacterianas) em células cálcio-competentes da linhagem de *E. coli* DH5α, um procedimento realizado por choque térmico. Foram acrescentados 5 µL de

reação BP a 50 µL de células DH5α, e as mesmas foram então mantidas no gelo por 30 minutos. Em seguida, foi realizado o choque térmico, onde as células foram incubadas a 42°C por 2 minutos, sendo então colocadas novamente no gelo. Foi acrescentado 200 µL de meio LB em cada transformação, e as células cresceram a 37°C por uma hora sob agitação constante (220 rpm, rotações por minuto). Após esse tempo, as transformações foram centrifugadas a 2.000 g por 2 minutos, e o *pellet* formado foi coletado e espalhado sobre um placa de cultivo contendo o meio LB acrescido do antibiótico canamicina (25 mg/ml), sendo então mantidas a 37°C por cerca de 16 horas.

Foram feitas *master plates* e, em seguida, para comprovar a obtenção de clones com o inserto de interesse, foram realizadas PCRs de colônia com os clones selecionados, seguindo o protocolo mostrado na Tabela 4.4. Após o término da PCR de colônia, foi realizada eletroforese em gel de agarose, para comprovação e escolha das colônias com os insertos corretos. As colônias selecionadas foram transferidas para placa contendo o meio LB e canamicina (25 mg/mL) e colocadas em uma estufa a 37°C por 16 horas. Tendo a comprovação dos clones corretos pela PCR de colônia, duas colônias de cada um dos genes foram selecionadas e as mesmas foram incubadas em 3 mL de meio LB contendo canamicina (25 mg/mL) por mais 16 horas, a 37°C sob agitação constante (220 rpm), para o crescimento em cultura do clone bacteriano.

Tabela 4.4: PCR de colônia da reação BP.

PCR de colônia reação BP (15 µL)		Programa termociclador (35 ciclos*)
<i>Taq</i> DNA polimerase (6 U/µL)	0,15 µL	94 °C --- 5 minutos 94 °C --- 15 segundos 55 °C --- 30 segundos 72 °C --- 1 minuto 40 segundos 72 °C --- 5 minutos
10X PCR Buffer minus Mg	1,5 µL	
Mix dNTPs (10 mM)	1,2 µL	
MgCl ₂ (50 mM)	0,45 µL	
Iniciadores <i>forward</i> específicos (0,5 µM)	3,0 µL	
Iniciadores <i>reverse</i> do pDONR (5 µM)	0,3 µL	
H ₂ O 18,2 mΩ	8,4 µL	

*: O número de ciclos na PCR se refere às etapas em negrito do programa utilizado.

Em seguida, procedeu-se à purificação do plasmídeo utilizando o kit comercial *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen) conforme orientações do fabricante. Tendo obtido os plasmídeos, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose dos mesmos para comprovar a

extração dos mesmos, e em seguida foi feita sua quantificação utilizando espectrofotômetro.

Após a obtenção e purificação dos clones de entrada, uma alíquota dos mesmos foi enviada para sequenciamento, para a comprovação e análise da correta inserção do fragmento gênico estudado no vetor de entrada. Uma alíquota de 10 µL de cada clone de entrada, em uma concentração de 100 ng/ µL, foi enviada para a empresa coreana Macrogen, que realiza o sequenciamento pela metodologia "BigDye[®] terminator".

4.5.2 Clones de expressão

Após a obtenção dos vetores de entrada, foi feita a reação LR, que consiste na transferência dos insertos dos vetores de entrada para os vetores de destino. A reação LR foi feita de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (*Gateway LR Clonase II Enzyme mix*, Invitrogen), tendo sido usado 150 ng do plasmídeo pDONR contendo o gene de interesse, 150 ng do plasmídeo de destino (pDEST17, pDEST15, ou pTcGFP), completando o volume para 9 µL com TE (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA, pH 8). Adicionou-se 1 µL de *LR Clonase II Enzyme Mix*, e a reação foi incubada por cerca de 16 horas a 25°C. Na sequência, foi adicionado 1 µg da enzima proteinase K e a reação incubada por 10 minutos a 37°C.

Finalizada a etapa de recombinação, foi feita a transformação em células cálcio-competentes da linhagem de *E. coli* DH5α, conforme descrito anteriormente. Após a transformação, foi acrescentado 200 µL de meio LB em cada transformação, e as células cresceram a 37°C por uma hora sob agitação constante (220 rpm) para em seguida serem centrifugadas a 2.000 g por 2 minutos. O *pellet* formado foi coletado e espalhado sobre um placa de cultivo contendo o meio LB acrescido do antibiótico ampicilina (25 mg/ml), sendo então mantidas a 37°C por cerca de 16 horas.

A comprovação da obtenção dos clones de destino foi realizada do mesmo modo que a comprovação dos clones de entrada. As colônias selecionadas da transformação foram transferidas para uma *master plate* e foram usadas para realizar a PCR de colônia, de acordo com o protocolo mostrado na Tabela 4.5. A PCR de colônia foi seguida da eletroforese em gel de agarose para confirmação e seleção das colônias com os insertos corretos. Para a *master plate*, foi utilizada placa de meio LB com ampicilina (25 mg/ml), e após as colônias terem

sido transferidas para a mesma, ela foi conduzida para estufa de 37°C, por cerca de 16 horas. Com o resultado da PCR de colônia, duas colônias de cada gene foram coletadas da master plate e incubadas em 3 mL de meio LB acrescido de ampicilina (25 mg/ml) a 37°C por mais 16 horas sob agitação constante (220 rpm), para o crescimento do clone bacteriano.

Tabela 4.5: PCR de colônia da reação LR.

PCR de colônia reação LR (15 µL)		Programa termociclador (35 ciclos*)
<i>Taq</i> DNA polimerase (6 U/µL)	0,15 µL	94 °C --- 5 minutos 94 °C --- 15 segundos 55 °C --- 30 segundos 72 °C --- 1 minuto 40 segundos 72 °C --- 5 minutos
10X PCR Buffer minus Mg	1,5 µL	
Mix dNTPs (10 mM)	1,2 µL	
MgCl ₂ (50 mM)	0,45 µL	
Iniciadores <i>forward</i> específicos (0,5 µM)	3,0 µL	
Iniciadores <i>reverse</i> do pDEST (5 µM)	0,3 µL	
H ₂ O 18,2 mΩ	8,4 µL	

*: O número de ciclos na PCR se refere às etapas em negrito do programa utilizado.

Dado o tempo de crescimento da cultura, os plasmídeos foram purificados e extraídos utilizando o kit comercial *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen) conforme orientações do fabricante. Foi realizada uma eletroforese em gel de agarose dos plasmídeos para comprovação da extração. Na sequência, foi realizada a quantificação dos plasmídeos utilizando espectrofotômetro.

Esse procedimento foi realizado para a transferência dos genes tanto para o vetor pDEST™17, que possibilita expressão heteróloga das proteínas em bactérias, quanto para o vetor pTcGFP, que permite a expressão das proteínas fusionadas à etiqueta fluorescente no próprio *T. cruzi*.

4.6 Expressão das proteínas

Com os genes inseridos no vetor de expressão pDEST™17, procedeu-se à expressão heteróloga das proteínas em células bacterianas. Inicialmente foi feito um teste de expressão para comprovar a expressão heteróloga das proteínas e depois, tendo sido comprovada a expressão da proteína desejada, foi realizada a expressão em maior quantidade das proteínas para poder proceder à imunização dos camundongos. Após a obtenção dessas proteínas, as

mesmas foram inoculadas em camundongos com o intuito de obter anticorpos policlonais.

Foram utilizadas células bacterianas de *E. coli* da linhagem Tuner(DE3)pLysS para expressão dessas proteínas. Caso o teste de expressão com essa linhagem de *E. coli* não fosse satisfatório, recorreu-se a outras linhagens bacterianas, BL21 StarTM(DE3)pLysS ou Rosetta-gami 2, com o intuito de otimizar a expressão. Iniciou-se o processo pela transformação por choque térmico. Foi adicionado 1 µL de plasmídeo pDESTTM17 contendo o gene de interesse em 50 µL de células Tuner(DE3)pLysS, que foram então mantidas em gelo por 30 minutos. Após esse tempo foi feito o choque térmico a 42°C por 2 minutos, voltando, em seguida, as células para o gelo. Foi então acrescentado 200 µL de meio LB em cada transformação, e as células foram incubadas a 37°C por uma hora sob agitação constante (220 rpm). As transformações foram então centrifugadas a 2.000 g por 2 minutos, e o *pellet* formado foi coletado e espalhado sobre um placa de cultivo contendo o meio LB acrescido do antibiótico ampicilina (25 mg/ml), sendo mantidas a 37°C por cerca de 16 horas. Ao término desse tempo, colônias foram coletadas e incubadas em meio LB mais ampicilina por mais 16 horas a 37°C, sob agitação constante (220 rpm).

Para o teste de expressão, as colônias coletadas da placa de cultivo foram incubadas em tubos de ensaio com 2 mL de meio LB mais ampicilina, a 37°C por 16 horas. Em seguida, a partir desse pré-inóculo, foi feito um inóculo em meio LB sem antibiótico, em uma diluição de 1:20 (100 µL de pré-inóculo em 2 mL de meio LB), que foi mantida por 2 horas a 37°C a 220 rpm. Terminado esse tempo, foi feita a indução, onde cada inóculo recebeu 0,5 mM de IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo). Cada inóculo inicial foi dividido em dois tubos que foram induzidos separadamente e mantidos por 3 horas a 30°C e a 37°C, sob agitação constante (220 rpm). Essa divisão teve por intuito analisar em qual temperatura ocorreria uma melhor indução da expressão das proteínas de estudo.

Após o tempo de indução, os inóculos foram transferidos para microtubos, e centrifugados por 10.000 g por 10 minutos, sendo então descartado o sobrenadante. A ruptura celular e extração das proteínas foi realizada utilizando o kit comercial BugBusterTM Protein Extraction Reagents (Novagen), que utiliza um mistura de detergentes não-iônicos capazes de perfurar a parede celular sem desnaturar proteínas solúveis. Os *pellets* formados em cada centrifugação foram ressuspensos em 50 µL de BugBuster (Novagen), acrescido de 1 µL da nuclease benzonaze para a degradação de ácidos nucleicos, e incubado por 20 minutos a

temperatura ambiente em um agitador orbital. Na sequência, os inóculos foram novamente centrifugados a 16.000 g por 20 minutos e o sobrenadante foi transferido para novos microtubos identificados como "fração solúvel". O *pellet* formado foi ressuspensionado em 45 µL de PBS 1X e esses tubos foram identificados como "fração insolúvel". Foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para avaliação da expressão. Foi preparado gel de poliacrilamida (33% acrilamida/0,9% bis-acrilamida) na concentração de 13%, utilizando 30 mA de corrente elétrica por gel. Os géis foram corados com azul de coomassie, e o excesso foi retirado com solução de descoloração (metanol 30%, ácido acético 10%).

Dependendo do resultado observado no teste de expressão, procedeu-se à expressão em maior quantidade. Foi feito um pré-inóculo de 12 mL de meio LB acrescido de 48 µL de ampicilina, que foi mantido a 37°C por 16 horas sob agitação constante. Em seguida, a partir desse pré-inóculo, foi feito um inóculo em meio LB sem antibiótico, em uma diluição de 1:20. De acordo com o resultado do teste de expressão, o volume de inóculo foi ajustado visando obter a maior quantidade de proteínas, mas sempre mantendo a diluição de 1:20 do pré-inóculo com relação ao meio LB. Esse inóculo foi mantido a 37°C por duas horas sob agitação constante, e em seguida foi feita a indução das proteínas com 0,5 mM de IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo), também a 37°C, temperatura na qual obtivemos os melhores resultados no teste de expressão, por 3 horas. Depois desse tempo, as culturas foram centrifugadas a 5.000 g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi então descartado e o *pellet* formado foi ressuspensionado em 5 mL de tampão de sonicação (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol). As células foram então sonicadas por 15 segundos (potência 9), repetindo-se esse procedimento por 4 vezes. Após essa primeira etapa de sonicação, as culturas foram novamente centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos, o sobrenadante foi retirado e guardado como "fração solúvel", e o *pellet* formado foi ressuspensionado em 5 mL de solução de ureia 2 M (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl, 2 M ureia). Novamente levou-se as culturas ao sonicador, seguindo o mesmo processo anteriormente descrito (4 pulsos de 15 segundos cada, potência 9). As culturas foram novamente centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos, o sobrenadante guardado como "fração 2M", e o *pellet* foi então ressuspensionado em 5 mL de uma solução de ureia 8 M (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl, 8 M ureia), que foi novamente sonicado como descrito anteriormente. Em seguida, produto foi novamente centrifugado a 10.000 g por 10 minutos, o sobrenadante foi guardado como "fração

insolúvel", e o *pellet* foi descartado. Foi realizado um SDS-PAGE com cada uma dessas frações para comprovar e analisar a qualidade das expressões.

4.7 Purificação das proteínas

Para que a imunização ocorra da melhor forma e que os anticorpos gerados sejam o mais específico possível, as proteínas expressas necessitam passar por um processo de purificação. Foram utilizadas duas metodologias de purificação, inicialmente através de cromatografia de afinidade por níquel (QIAexpress System, Qiagen), e posteriormente por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

O processo de purificação por cromatografia de afinidade foi realizado por dois procedimentos, sendo feita a eluição ou por imidazol, ou por acidificação do pH. No processo de purificação utilizando imidazol, iniciou-se fazendo a lavagem das colunas e equilíbrio das mesmas com a solução de lise contendo imidazol (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl e 10 mM imidazol). Os extratos proteicos foram adicionados à coluna, permitindo a ligação das proteínas contendo a cauda de histidina à resina de níquel. O que não se ligou à resina foi coletado e armazenado, sendo denominado de *flow-through* (FT). Em seguida, para a remoção de proteínas contaminantes que possam estar na resina, foram feitas duas lavagens com 4 mL de solução de lavagem (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol), e os produtos provenientes das lavagens foram armazenados para verificação do processo de purificação. Foi feito então o processo de eluição, sendo realizadas três eluições com 0,5 mL de solução de eluição (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl e 250 mM imidazol), e o produto obtido foi coletado e identificado como "eluição 1", "eluição 2" ou "eluição 3", sendo armazenados a -20°C.

Na purificação por acidificação do pH também iniciou-se o processo pela lavagem das colunas e equilíbrio com solução de lise contendo ureia (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M ureia, pH 8). Na sequência, os extratos proteicos foram adicionados à coluna, permitindo a ligação das proteínas com cauda de histidina na resina de níquel, e o que não se ligou à resina foi coletado e armazenado, denominado de *flow-through* (FT). Em seguida, foram feitas lavagens com 4 mL de solução de lavagem (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M ureia, pH 6,3), e o material obtido foi armazenado a -20°C para verificação da qualidade do processo de purificação. Para o processo de eluição, foram utilizadas soluções de eluição (100

mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M ureia) com diferentes valores de pH. A cada três eluições de 0,5 mL, o pH foi acidificado, seguindo a ordem: pH 5,9; pH 4,5; pH 4,0 e pH 3,5. As frações eluídas foram identificadas separadamente e armazenadas a -20°C.

Depois de cada purificação, seja por imidazol ou por diminuição do pH, as amostras FT, os lavados e os eluídos foram analisados por SDS-PAGE para análise da qualidade da purificação.

Como dito anteriormente, foi realizado um segundo procedimento de purificação, baseado em separação por tamanho das proteínas. Foram realizadas SDS-PAGE, utilizando uma concentração de acrilamida de 13% para todas as proteínas obtidas, e foi utilizado 30 mA de corrente elétrica por gel. Após o término da eletroforese, o gel foi submetido à coloração por KCl 100 mM, e a banda desejada foi cortada do gel. Foi realizado um processo de eletroeluição para retirar a proteína do gel de acrilamida. A banda cortada foi colocada em uma membrana de diálise (*SnakeSkin Dialysis Tubing, 10K*, Thermo Scientific) na qual foi adicionado 1 mL de tampão de SDS-PAGE (Tris 25 mM; Glicina 192 mM; SDS 0,1%), que foi então lacrada com grampos. As membranas foram colocadas em uma cuba de eletroforese horizontal contendo o tampão SDS-PAGE, e submetida a uma tensão elétrica de 100 V por uma hora. Ao término desse tempo, o líquido presente no interior da membrana foi coletado e analisado em um SDS-PAGE como descrito anteriormente, para análise e comprovação da purificação.

Tendo em mãos as imagens das comprovações das purificações, foi realizada a quantificação das proteínas utilizando para isso o programa ImageJ (ImageJ 1.47, <http://imagej.nih.gov/>), que permitiu extrair a intensidade de sinal das bandas obtidas, possibilitando a obtenção de uma concentração relativa de cada uma das bandas referentes às proteínas através da comparação com as bandas do marcador de peso molecular, que possui uma concentração conhecida (BenchMark Ladder™, Invitrogen).

4.8 Obtenção dos anticorpos policlonais

Estando devidamente purificadas, as proteínas recombinantes foram inoculadas em camundongos para a obtenção de anticorpos policlonais. Foram utilizados dois camundongos por proteína, inicialmente sendo utilizados camundongos da linhagem Swiss (heterogênicos).

No entanto, para algumas proteínas também foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c (isogênicos), com o intuito de aumentar a probabilidade de se obter um soro adequado. Foram feitas quatro inoculações pela via intraperitoneal, de aproximadamente 10 µg de proteína, com intervalos de 15 dias. Para a primeira inoculação, a proteína foi emulsificada em adjuvante completo de Freund (Sigma), em uma proporção de 1:1 (v/v). Para as inoculações subsequentes, as proteínas foram emulsificadas em Alu-gel (Serva). Dez dias após a última inoculação, procedeu-se ao sacrifício e coleta do soro. Os animais foram sedados com solução anestésica (cetamina 100 mg/kg, xilasina 20 mg/kg, acepromazina 3 mg/kg), e o sangue foi coletado por punção cardíaca, que em seguida foi colocado a 37°C por 15 minutos e centrifugado a 7.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e novamente centrifugado a 7.000 g por 10 minutos, e o novo sobrenadante formado foi transferido para tubos e armazenado a -20°C. Foi também realizada a lavagem peritoneal, sendo aplicado 4 mL de solução de PBS 1X (*Phosphate-buffered saline*) no interior da membrana peritoneal dos camundongos, que na sequência foi coletado, centrifugado a 7.000g por 10 minutos e o sobrenadante armazenado a -20°C.

4.9 Ensaios de *western blot*

Tendo obtido os soros contra as proteínas recombinantes, procedeu-se a ensaios de *western blot*, contra os extratos proteicos de *T. cruzi*. Inicialmente foram utilizados extratos das quatro formas celulares de *T. cruzi*, e na sequência foram utilizados extratos de diferentes pontos do processo de metaciclogênese.

O *western blot* é uma técnica laboratorial usada para a detecção de moléculas específicas de proteínas em uma mistura proteica. O método consiste na transferência eletroforética de proteínas, separadas por SDS-PAGE, para uma membrana de nitrocelulose, e posterior incubação dessa membrana com anticorpos específicos contra a proteína de interesse. O procedimento foi realizado de acordo com o método de TOWBIN *et al.* (1979). Inicialmente foi feita a eletroforese dos extratos proteicos de *T. cruzi* e em seguida as proteínas foram eletrotransferidas para um membrana de nitrocelulose, utilizando uma tensão elétrica de 15 V por cerca de 16 horas, a 4°C. Na sequência da transferência, a membrana foi corada com a solução corante Ponceau S para analisar a qualidade da transferência, sendo em seguida descorada com solução PBS/Tween 0,1%. As membranas foram então incubadas em

solução de bloqueio (5 g de leite desnatado em 100 mL PBS/Tween 0,1%) por cerca de 16 horas a 4°C. Após esse período, as membranas foram colocadas em 3 mL de solução de bloqueio com o anticorpo primário (anticorpo policlonal obtido) diluído inicialmente na proporção de 1:250 em solução de bloqueio, mantido por 1 hora a 37°C, sob leve agitação. Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes por 5 minutos com PBS/Tween 0,1% e então incubadas com a solução de anticorpo secundário (*Anti-mouse-Alkaline Phosphatase antibody*, Sigma), em uma diluição de 1:10.000 em PBS/Tween 0,1%, que também foi mantido sob agitação leve por 1 hora à temperatura ambiente. Na sequência, as membranas foram novamente lavadas três vezes por 5 minutos com PBS/Tween 0,1%, sendo então reveladas pelo kit de revelação BCIP/NBT Color Development Substrate (Promega), por fosfatase alcalina. A solução utilizada na revelação foi preparada misturando 10 mL do tampão para fosfatase alcalina (100 mM Tris-HCl [pH 9,0]; 150 mM NaCl; 1 mM MgCl₂) com 66 µL do cromógeno NBT (*nitro blue tetrazolium*) e 33 µL do substrato BCIP (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate*) (Promega).

4.10 Imunolocalização

Tendo obtido os anticorpos contra as proteínas de estudo, e após confirmar a especificidade desses anticorpos, foram realizadas as imunofluorescências utilizando as formas celulares epimastigota e tripomastigota metacíclico do *T. cruzi*.

Para a obtenção dos parasitas na forma tripomastigota metacíclica, foi realizada a metaciclogênese *in vitro*. Uma cultura de epimastigotas de 5 dias foi coletada e mantida por duas horas em estresse nutricional em meio TAU (*Triatomine Artificial Urine*, 2 mM CaCl₂; 2 mM MgCl₂; 17 mM KCl; 190 mM NaCl; tampão fosfato 8 mM pH 6,0), um meio de cultura pobre, quimicamente definido, que mimetiza a urina do inseto vetor (CONTRERAS et al., 1985), a 28°C. Em seguida, esses parasitas foram transferidos para o meio de diferenciação TAU3AAG (meio TAU suplementado com 2 mM de ácido L-aspártico; 50 mM de ácido L-glutâmico; 10 mM de L-prolina e 10 mM de glicose) e mantidos em estufa a 28°C por cerca de 72 horas. Após esse tempo, a grande maioria dos parasitas no frasco de cultura se encontram diferenciados na forma infectiva tripomastigota metacíclica.

Para a confecção das lâminas para as imunofluorescências, os parasitas foram centrifugados (os epimastigotas a 5.000g por 5 minutos e os tripomastigotas metacíclicos a

3.000g por 10 minutos) e ressuspensos em 1 mL de PBS 1X, sendo então novamente centrifugados nas mesmas condições.

As imunolocalizações foram realizadas em lâminas de microscopia com oito campos separados por teflon. Foi aplicado em cada poço da lâmina cerca de 30 µL de poli-L-lisina, incubando a lâmina a 37°C por cerca de 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas com H₂O ultra-pura e secas em uma estufa a 37°C. Em cada campo da lâmina foi aplicado 1x10⁶ parasitas, sendo então mantida a 28°C por uma hora em câmara úmida. Após esse tempo, o excesso foi retirado da lâmina e foi adicionado 10 µL de paraformaldeído 8X por cerca de 10 minutos para fixação dos parasitas, retirando o excesso ao final desse tempo e lavando cada poço de 2 a 3 vezes com PBS 1X. Foi então acrescentado 10 µL de Triton 0,1% em cada poço por 5 minutos, para a permeabilização das células, seguido da lavagem das lâminas por imersão em PBS 1X. Na sequência, foi adicionado 10 µL de PBS acrescido de soro fetal bovino 4% em cada campo da lâmina, e a mesma foi deixada por cerca de 16 horas a 4°C em câmara úmida, realizando o bloqueio da lâmina. Após esse tempo, foi retirado o excesso de solução de bloqueio e foi acrescentado 20 µL de solução de anticorpo primário, em uma diluição de 1:100 (1 µL de anticorpo + 99 µL de PBS 1X), mantendo a lâmina em câmara úmida por 1 hora a 37°C. A lâmina foi novamente lavada por imersão 3 vezes em PBS 1X, e então foi acrescentada solução de anticorpo secundário (anti-camundongo, fluoróforo alexa 488), em uma diluição de 1:200 em PBS 1X. Foram aplicados 20 µL da solução de anticorpo secundário em cada campo, sendo incubado por 1 hora em câmara úmida. Na sequência, o excesso foi retirado dos campos, e as lâminas foram lavadas por imersão 3 vezes em PBS 1X. Para a coloração do núcleo e do cinetoplasto, foram adicionados cerca de 10 µL de Hoechst 1X em cada campo, mantendo por 5 minutos a temperatura ambiente, seguido da lavagem da lâmina por imersão 3 vezes em PBS 1X. Realizada a lavagem, foram adicionados cerca de 10 µL de N-propil-galato em cada campo, lacrando as lâminas em seguida com lamínula de microscopia (24 mm X 50 mm) e selador (esmalte).

As imunofluorescências foram observadas utilizando microscópio de fluorescência (Nikon). Foi utilizado a câmara *CoolSnap* (Media Cybernetics) para captura das imagens, e as mesmas foram analisadas e trabalhadas com o programa ImageJ. Esse programa foi utilizado no controle do brilho e do contraste, com o objetivo de ressaltar os resultados observados, além de ter sido utilizado para realizar a sobreposição das imagens.

4.11 Proteínas fusionadas à etiqueta fluorescente

Como descrito no item 4.5, foram obtidos vetores de expressão em *T. cruzi*, denominado pTcGFP, que fusionam uma etiqueta fluorescente seja na extremidade amino-terminal ou carboxila-terminal das proteínas de interesse. Após a obtenção desses vetores, os mesmos foram quantificados e transfectados na forma celular epimastigota do parasita da cepa Dm28c, por um processo de eletroporação. Partindo de um inóculo de 1×10^6 parasitas/mL de meio de cultura, culturas axênicas de *T. cruzi* foram mantidas a 28°C em meio LIT até atingirem a fase logarítmica de crescimento.

Para a eletroporação, a cultura de *T. cruzi* em fase logarítmica de crescimento foi inicialmente centrifugada a 6.000g por 5 minutos a 4°C. O *pellet* formado foi ressuscitado em PBS 1X e então novamente centrifugado, nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em tampão de eletroporação estéril, e então 400 μ L da suspensão de parasitas, contendo cerca de 4×10^7 parasitas, foi transferido a cada cubeta de eletroporação previamente resfriada em gelo. Foi acrescentado 50 μ L da solução contendo os cassetes de nocaute (exceto pelo controle negativo da transfecção) em cada cubeta e as cubetas foram mantidas em gelo por 10 minutos. Em seguida, as cubetas foram colocadas no equipamento de eletroporação, configurado a 500 μ F e 450 V, e dois pulsos seguidos foram dados em cada uma. A suspensão de parasitas foi então transferida para 1 mL de meio LIT, e incubada por aproximadamente 24 horas em uma estufa de CO₂ a 28°C.

Após a incubação de 24 horas, foi acrescentado o antibiótico G418, ao qual o vetor pTcGFP confere resistência, em uma concentração inicial de 1 mg/mL, e uma semana após a transfecção foi realizado o primeiro repique, no qual cerca de 1×10^6 parasitas foram transferidos para novos 1 mL de meio LIT contendo 500 μ g de antibiótico G418. Dessa forma, após sucessivos repiques, ocorre a seleção dos parasitas que internalizaram o vetor contendo o gene de interesse.

Tendo sido realizada a seleção dos parasitas transfectantes, procedeu-se à confecção de lâminas de microscopia para serem observadas em microscópio de fluorescência. Foram realizadas lâminas com parasitas nas formas epimastigota e tripomastigota metacíclica. Novamente foi realizada a metaciclogênese *in vitro*, como descrito no item 4.10, para a obtenção dos parasitas transfectantes na forma tripomastigota metacíclica. Os parasitas foram centrifugados (6.000 rpm por 5 minutos), o sobrenadante foi descartado, os parasitas

ressuspendidos em PBS 1X, centrifugados novamente, e novamente ressuspendidos em PBS 1X. Foram utilizadas lâminas de microscopia com 8 campos separados com *teflon*, previamente tratadas com poli-L-lisina e mantidas a 37°C por 20 minutos, e em cada campo foi aplicado aproximadamente 1×10^6 parasitas. A solução de parasitas foi mantida por 10 minutos em contato com o campo da lâmina, para que uma quantidade suficiente se aderisse à lâmina. Foi então aplicado paraformaldeído 8% (v/v), que permaneceu cerca de 10 minutos em contato com a lâmina. Em seguida, cada campo da lâmina foi lavado individualmente com cerca de 30 μ L de PBS 1X, utilizando uma micropipeta, por 4 vezes. Os campos foram então incubados com o corante aproximadamente 10 μ L do corante Hoechst 1X em uma diluição de 1:300, por 10 minutos, e novamente lavados individualmente com PBS 1X como descrito acima. O excesso de PBS foi retirado da lâmina, e foi aplicado uma gota de N-propil-galato em cada campo, posicionando em seguida a lamínula e lacrando a mesma com esmalte.

As lâminas de microscopia prontas foram analisadas e fotografadas utilizando os mesmos equipamentos (microscópio de fluorescência e câmera) descritos no item 4.10.

Para comprovar que os parasitas transfectantes realmente estavam expressando a proteína de interesse fusionada à etiqueta fluorescente, foram realizados ensaios de *western blot*. Foi utilizado o extrato dos parasitas transfectantes nas formas epimastigota e tripomastigota metacíclica contra um anticorpo anti-GFP e, para aquelas proteínas às quais foram obtidos os anticorpos policlonais, eles também foram utilizados para comprovar a expressão da proteína fusionada a GFP.

4.12 Nocaute gênico

Para realizar os ensaios de nocaute gênico foi utilizada a metodologia de PCR de fusão (KUWAYAMA *et al.*, 2002), adaptada por LORUSSO (2013) para o nocaute em *T. cruzi*. Nela, diversas etapas ocorrem até a produção dos cassetes de nocaute, que são então transfectados nos parasitas. Por um processo de recombinação, o gene alvo é substituído por um marcador de seleção, permitindo aos parasitas "nocauteados" sobreviverem a um meio de cultura acrescido de um determinado antibiótico.

4.12.1 Amplificação das regiões intergênicas

Iniciou-se os ensaios de nocaute gênico pela amplificação das regiões intergênicas a montante e a jusante do gene alvo, pela metodologia de PCR. Para o desenho dos oligonucleotídeos necessários para essa etapa de amplificação, foi utilizado o software de predição de iniciadores para nocaute gênico - denominado TcruziKO - desenvolvido pelo nosso grupo (LORUSSO, 2013), sendo então sintetizados por The Midland Certified Reagent Company[®]. A Tabela 4.6 mostra a lista de iniciadores utilizados para a amplificação das regiões a montante e a jusante dos genes selecionados. Nessa etapa de amplificação foi utilizada a enzima *Taq* DNA Polimerase produzida pelo Instituto de Biologia Molecular do Paraná, e os demais reagentes foram obtidos comerciais (Invitrogen) (Tabela 4.7).

Quando observado produtos de PCR com tamanhos diferentes ou sem amplificação, as PCRs em questão foram repetidas, alterando as condições da reação, como concentração de oligonucleotídeos e temperatura de anelamento.

Tabela 4.6: Iniciadores construídos para a amplificação das regiões intergênicas do genes selecionados.

Genes	Posição dos iniciadores	Sequência do iniciadores (5' - 3')
A01 TcCLB.509601.140	UPS_Forward	GGGGGGGGTGTACGATTTATTGTTGACGCC
	UPS_Reverse	AGTGCGGAAAGAGAAATGGACGGTGCATTTGCTCCTCTGCTGTTGTTG
	DOWNS_Forward	ACATTGAACAGAATTTAACATGCCCATCAATGTGAATATATACAATCAACACGAAA
	DOWNS_Reverse	GGGGGGGGAGCTCTGCAAAGCAACGC
A03 TcCLB.509245.20	UPS_Forward	GGGGGGGGTAACCGTGAACAAATCCAGC
	UPS_Reverse	AGTGCGGAAAGAGAAATGGACGGTGCATTTAAAAAGTCCAACCTGAACACAAA
	DOWNS_Forward	ACATTGAACAGAATTTAACATGCCCATCAATTTCTCGAGAAAAAGAGGTGG
	DOWNS_Reverse	GGGGGGGGTCAATGAATCAAATAGACCAATCAA
A04 TcCLB.507143.60	UPS_Forward	GGGGGGGGCTGGTGCAAATGGATACACG
	UPS_Reverse	AGTGCGGAAGAGAAATGGACGGTGCATTTTAAATACCGTCACACTGCGG
	DOWNS_Forward	ACATTGAACAGAATTTAACATGCCCATCAATTTTAGAGATGTGAGGGAAGAGC
	DOWNS_Reverse	GGGGGGGGTTTCTCTCCCTTCTCCGC
A05 TcCLB.506925.10	UPS_Forward	GGGGGGGGAAAAGTAGGTGGTGATGTGTGC
	UPS_Reverse	AGTGCGGAAAGAGAAATGGACGGTGCATTTTCTTCGAGAACGTCTCTT
	DOWNS_Forward	ACATTGAACAGAATTTAACATGCCCATCAACTCACACCCATTGACACG
	DOWNS_Reverse	GGGGGGGGTTATGTGCCAAGCCATGC

Sublinhado se encontra a porção dos oligonucleotídeos envolvida no processo de fusão.

Tabela 4.6 (continuação): Iniciadores construídos para a amplificação das regiões intergênicas do genes selecionados.

Genes	Posição dos iniciadores	Sequência do iniciadores (5' - 3')
A08 TcCLB.508863.10	UPS_Forward	GGGGGGGGAATAAATATATACGCCCCCGC
	UPS_Reverse	AGTGCGGAAAGAGAAATGGACGGTGCATTTTCCCTTTCACCATCTCGTC
	DOWNS_Forward	ACATTGAACAGAATTTAACATGCCCATCAAGACCAACTCAATTGGACGAT
	DOWNS_Reverse	GGGGGGGGCACCAGGAAGGAATTCGAG
A09 TcCLB.508355.230	UPS_Forward	GGGGGGGGACGGAAGAAGACGTGGGAG
	UPS_Reverse	AGTGCGGAAAGAGAAATGGACGGTGCATTTTGCCTTCTATACCAAACAGTTG
	DOWNS_Forward	ACATTGAACAGAATTTAACATGCCCATCAATCGGTTTACTCGCACTTCG
	DOWNS_Reverse	GGGGGGGGCGGGTACACAGTGAGAAGGG
A10 TcCLB.510355.230	UPS_Forward	GGGGGGGGTGATAACATGCAGGGCGATA
	UPS_Reverse	AGTGCGGAAAGAGAAATGGACGGTGCATTTCTTGTCAAAGGGAGCAGAC
	DOWNS_Forward	ACATTGAACAGAATTTAACATGCCCATCAACTTCACACCGATGAGAATGG
	DOWNS_Reverse	GGGGGGGGAAAAAGAATAGAATAGAAGCAAACCAA
A11 TcCLB.506681.40	UPS_Forward	GGGGGGGGATTGCCATTGTTGATTCTTGC
	UPS_Reverse	AGTGCGGAAAGAGAAATGGACGGTGCATTTTGCCTTTTCTGTTGTTC
	DOWNS_Forward	ACATTGAACAGAATTTAACATGCCCATCAAGCAAATGATACATGAGCCGA
	DOWNS_Reverse	GGGGGGGGATACTTGCGGAAGTGCATGG
A12 TcCLB.511577.120	UPS_Forward	GGGGGGGGACCTGGGTTTTGGGGTTG
	UPS_Reverse	AGTGCGGAAAGAGAAATGGACGGTGCATTTGACTTTGGGGTCTCC
	DOWNS_Forward	ACATTGAACAGAATTTAACATGCCCATCAATGGACCTCCAATGACTGC
	DOWNS_Reverse	GGGGGGGGAACAAAGGTGGTGGTTAAGCTC

Sublinhado se encontra a porção dos oligonucleotídeos envolvida no processo de fusão.

Tabela 4.7: Reação de PCR utilizada para amplificação das regiões intergênicas dos genes selecionados.

PCR Amplificação intergênicas (100 µL)	Programa termociclador (35 ciclos*)
<i>Taq</i> DNA polimerase (6 U/µL)	1,0 µL
10X PCR Buffer minus Mg	10,0 µL
Mix dNTPs (10 mM)	8,0 µL
MgCl ₂ (50 mM)	3,0 µL
DNA genômico (100ng/µL)	1,0 µL
Iniciadores <i>forward</i> (5 µM)	2,0 µL
Iniciadores <i>reverse</i> (5 µM)	2,0 µL
H ₂ O 18,2 mΩ	73,0 µL
	94 °C --- 3 minutos
	94 °C --- 30 segundos
	55 °C --- 30 segundos
	72 °C --- 1 minuto
	72 °C --- 5 minutos

*: O número de ciclos na PCR se refere às etapas em negrito do programa utilizado.

4.12.2 Amplificação dos cassetes de seleção

Na sequência, procedeu-se à amplificação dos cassetes de seleção, que codificam genes que conferem resistência a antibióticos (*neo* - neomicina fosfotransferase e *higro* - higromicina fosfotransferase) (Tabela 4.8). Esses cassetes foram amplificados usando como molde dois vetores cedidos pelo Dr. Stênio Perdigão Fragoso, do Laboratório de Biologia Molecular de Tripanossomatídeos, do Instituto Carlos Chagas, pNEO2 e pHYG2. Neles, a região codificante dos genes de resistência ao antibiótico são flanqueadas por duas sequências diferentes, obtidas de regiões não-codificantes do genoma de *T. cruzi*, situadas entre os genes que codificam as proteínas enolase (**TcCLB.511529.90**) e KAP3 (**TcCLB.511529.80**), denominado "IR KAP3", e entre duas cópias do gene que codifica a enzima GAPDH (**TcCLB.506943.60** e **TcCLB.506943.50**), denominado "IR GAPDH". Para essa etapa de amplificação, foi utilizada a enzima de alta fidelidade AccuPrime™ *Pfx* DNA Polimerase (Invitrogen), e foi utilizado um iniciador que se anela à extremidade 5' (IR KAP3) e um iniciador que se anela à extremidade 3' (IR GAPDH) do cassete, denominados de K7-F e K7-R, respectivamente.

Tabela 4.8: Reação de amplificação dos cassetes de seleção.

PCR Amplificação cassetes de seleção (100 µL)		Programa termociclador (35 ciclos*)
AccuPrime <i>Pfx</i> DNA Polimerase (2.5 U/µl)	1,0 µL	96° C --- 2 minutos
10X AccuPrime™ <i>Pfx</i> Reaction Mix	10 µL	96° C --- 30 segundos
Vetores (pNEO2/pHYG2)	2,0 µL	55° C --- 30 segundos
Iniciadores K7-F (5,0 µM)	2,0 µL	68° C --- 2 minutos
Iniciadores K7-R (5,0 µM)	2,0 µL	68° C --- 5 minutos
H ₂ O 18,2Ω	83,0 µL	

*: O número de ciclos na PCR se refere às etapas em negrito do programa utilizado.

A comprovação da amplificação foi realizada por eletroforese em gel de agarose. Se observado produtos de PCR com tamanhos diferentes ou sem amplificação, as amplificações foram repetidas, alterando a temperatura de anelamento das reações.

4.12.3 Purificação e Quantificação dos produtos

Após o término da amplificação das regiões intergênicas e dos cassetes de seleção, esses produtos foram purificados utilizando o sistema Agencourt® AMPure® PCR Purification baseado em esferas paramagnéticas, baseando no mesmo protocolo anteriormente descrito.

Os produtos purificados foram então quantificados com o kit Quant-iT™ dsDNA BR Assay, da plataforma Qubit™ Fluorometer (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Tendo o resultado dessas dosagem, foi possível ajustar as concentrações de produtos amplificados necessários para as etapas subsequentes.

4.12.4 PCR de fusão

Após a quantificação dos produtos amplificados, foi realizada a PCR de fusão, uma reação de 20 ciclos que tem por objetivo fusionar as regiões intergênicas, anteriormente amplificadas, nas extremidades do cassete de seleção, sem a adição de DNA genômico nem de oligonucleotídeos iniciadores, formando assim os cassetes de nocaute. Na reação de fusão foi utilizado 0,5 ng/μL de produto de PCR do cassete de seleção, sendo que os demais fragmentos foram adicionados em uma proporção de 5:5:1, dos produtos de PCR da intergênica 5', da intergênica 3' e do cassete de seleção, respectivamente (Tabela 4.9).

Tabela 4.9: Reação de PCR de Fusão.

PCR de Fusão (50 μL)		Programa termociclador (20 ciclos*)
<i>Taq</i> DNA polimerase (6 U/μL)	0,5 μL	94 °C --- 2 minutos 94 °C --- 20 segundos 50 °C --- 30 segundos 72 °C --- 3 minuto 72 °C --- 8 minutos
10X PCR Buffer minus Mg	5,0 μL	
Mix dNTPs (10 mM)	4,0 μL	
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 μL	
Intergênica a jusante	**	
Intergênica a montante	**	
Cassete de seleção (0,5 ng/ μL)	**	
H ₂ O 18,2 mΩ	(completar para 50 μL)	

*: O número de ciclos na PCR se refere às etapas em negrito do programa utilizado.

** : volume utilizado dependendo do valor da quantificação das intergênicas e do cassete de seleção.

Para obter uma grande quantidade de produto fusionado, uma nova reação de PCR foi realizada, utilizando o produto da PCR de fusão descrita acima como molde. Foram utilizados nessa reação os iniciadores anterógrados (*forward*) que amplificaram da região intergênica 5' e os iniciadores retrógrados (*reverse*) que amplificaram a região intergênica 3'. Inicialmente foram feitas reações de testes de 50 µL para avaliar se essa amplificação da PCR de fusão seria satisfatória (Tabela 4.10). Tendo sido comprovada a amplificação por eletroforese em gel de agarose, a PCR foi repetida em diversas reações com 100 µL de volume final, para se obter uma quantidade de cassetes de nocaute suficiente para poder transfectar nos parasitas.

Tabela 4.10: Reação de amplificação da PCR de fusão.

Amplificação da PCR de Fusão (50 µL)		Programa termociclador (20 ciclos*)
<i>Taq</i> DNA polimerase (6 U/µL)	0,5 µL	94 °C --- 2 minutos 94 °C --- 20 segundos 61 °C --- 30 segundos 72 °C --- 5 minuto 72 °C --- 8 minutos
10X PCR Buffer minus Mg	5,0 µL	
Mix dNTPs (10 mM)	4,0 µL	
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 µL	
Iniciadores <i>forward</i> (5,0 µM)	1,0 µL	
Iniciadores <i>reverse</i> (5,0 µM)	1,0 µL	
Produto da fusão	1,0 µL	
H ₂ O 18,2 mΩ	36 µL	

* O número de ciclos na PCR se refere às etapas em negrito do programa utilizado.

4.12.5 Concentração do material

Tendo amplificado os cassetes de nocaute em grande quantidade, foi necessário concentrar todo o material produzido na PCR de fusão (cerca de 1,2 mL) para poder realizar a transfecção. Para isso foi utilizado o equipamento *SpeedVac* (Savant™ SPD131DDA *SpeedVac*™ Concentrator, Thermo Scientific), que utiliza de centrifugação, formação de vácuo e calor para a remoção de solventes e concentração de amostras. As amostras (~1,2 mL) foram submetidas ao *SpeedVac*, e permaneceram sob centrifugação, vácuo e a 45°C por cerca de 2 horas, o que resultou em um volume final de amostra de cerca de 50 µL concentrado. Após essa etapa de concentração, as amostras foram novamente quantificadas utilizando a plataforma Qubit™ Fluorometer (Invitrogen), sendo então realizada a sua transfecção nos parasitas.

4.12.6 Cultivo dos parasitas e eletroporação

Para a transfecção dos parasitas, culturas axênicas da forma celular epimastigota de *T. cruzi*, da cepa Dm28c (CONTRERAS *et al.*, 1988) foram mantidas a 28°C em meio LIT durante 3 dias, para atingirem a fase logarítmica de crescimento, partindo de um inóculo inicial de 1×10^6 parasitas/mL de meio de cultura.

A eletroporação foi realizada utilizando o equipamento Gene Pulser Xcell™ Total System (Bio-Rad) e cubetas estéreis de eletroporação Gene Pulser/Micro Pulser® 0,2 cm (Bio-Rad). Partiu-se de uma cultura de *T. cruzi* mantida em meio LIT em fase logarítmica de crescimento, que foi então centrifugada a 6.000g por 5 minutos a 4°C. O *pellet* formado foi ressuspenso em PBS 1X e então novamente centrifugado, nas mesmas condições anteriores. Após o descarte do sobrenadante, o *pellet* foi ressuspenso em tampão de eletroporação estéril, e então 400 µL da suspensão de parasitas, contendo cerca de 3×10^8 parasitas, foi adicionado a cada cubeta de eletroporação previamente resfriada a 4°C. Às cubetas foi acrescentado 50 µL da solução contendo os cassetes de nocaute (exceto no controle negativo) e as cubetas foram mantidas em gelo por 10 minutos. Após esse tempo, as cubetas foram acopladas ao equipamento de eletroporação, configurado a 500 µF e 450 V, e dois pulsos seguidos foram dados em cada uma. Em seguida, a suspensão de parasitas foi transferida para 5 mL de meio LIT, e incubada por aproximadamente 24 horas em uma estufa de CO₂ a 28°C.

Após esse tempo, foi adicionado o antibiótico adequado (G418 para os nocautes com o marcador de seleção *neo* (neomicina fosfotransferase), e higromicina para os nocautes com o marcador de seleção *higro* (higromicina fosfotransferase)), em uma concentração de 500 µg/mL. Em seguida, os parasitas foram deixados na estufa de CO₂ a 28°C, até a constatação de que o controle negativo utilizado tivesse morrido, assim demonstrando que os parasitas que não internalizaram o cassete de nocaute contendo o marcador de seleção morreram.

Após a seleção desses nocautes simples, foi feita uma curva de crescimento para avaliar se a supressão de um alelo desses genes levaria à diminuição no crescimento das culturas dos parasitas. As culturas contendo os parasitas nocaute foram contadas em 3, 5 e 7 dias após um repique inicial de 1×10^6 parasitas crescendo em meio LIT com e sem o acréscimo de antibiótico. Como controle, foi utilizada uma cultura de epimastigota selvagens.

Com a finalidade de suprimir completamente a expressão das proteínas no parasitas, foram realizadas novas transfecções nesses parasitas, após a sua seleção, utilizando os

cassetes de nocaute com a resistência ao outro antibiótico: se na primeira transfecção foram utilizados os cassetes de nocaute com a resistência ao antibiótico G418, na nova transfecção foram utilizados os cassetes que conferem resistência ao antibiótico higromicina, e vice-versa. O protocolo de transfecção utilizado foi o mesmo descrito acima, utilizando 3×10^8 parasitas no processo. Como controle negativo os parasitas foram transfectados sem a adição do segundo cassete de nocaute. Para a seleção desses nocautes duplos, os parasitas foram mantidos em meio de cultura acrescido dos antibióticos G418 e higromicina. Após a seleção desses nocautes duplos, diversos ensaios para avaliar o impacto funcional da deleção gênica são realizados com esses parasitas, como curva de crescimento, diferenciação, infectividade e avaliação por microscopia óptica de alterações morfológicas, bem como sequenciamento de RNA para evidenciar alterações do perfil de transcriptoma.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 A importância da caracterização de proteínas hipotéticas

Com o avanço das tecnologias e estudos em larga escala, diversas questões referentes à biologia molecular e aos estudos genômicos dos organismos começaram a ser respondidas. Com isso, a integração desses dados e informações obtidas se tornou de fundamental importância para a elucidação das questões que ainda estão em aberto e as que ainda serão formuladas no futuro. Sendo assim, o estudo das proteínas anotadas como "hipotéticas", ou de função desconhecida, se faz de suma relevância, tendo em vista que é de pouca utilidade a obtenção de grandes quantidades de dados referentes a um organismo se uma grande parcela desses dados refere-se a genes que até o momento não apresentam uma caracterização funcional confiável.

Isso é uma realidade no caso de *Trypanosoma cruzi*, visto a grande parcela de seu genoma que codifica para proteínas de função desconhecida. Considerando somente a forma infectiva tripomastigota metacíclica, que é a forma celular que inicia a infecção no hospedeiro mamífero pela transmissão via inseto vetor, e que conta com cerca de 70% de seus genes diferencialmente expressos anotados como proteínas "hipotéticas" (PROBST, 2005), se torna bastante evidente a necessidade desses trabalhos de caracterização para que cada vez mais as perguntas elaboradas referentes a esse parasita possam ser respondidas, e para que no futuro os dados obtidos possam ser utilizados para a elaboração de métodos eficazes de combate ao parasita e de tratamento à Doença de Chagas.

5.2 Genes selecionados

Para o presente estudo foram selecionados 10 genes anotados como codificadores de proteínas hipotéticas, sendo seis proteínas hipotéticas com ortólogos em outros organismos, e quatro identificadas somente em *T. cruzi*. A lista dos 12 clones selecionados referentes a esses 10 genes se encontra na Tabela 5.1, com as características dos mesmos extraídas do banco de dados de genomas de cinetoplastídeos TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>). De todas as proteínas selecionadas no estudo, 4 delas foram identificadas na análise do proteoma do *T. cruzi* durante a metaciclogênese publicada por DE GODOY e colaboradores (2012), uma foi

identificada no fosfoproteoma do processo de metaciclogênese publicado por MARCHINI e colaboradores (2011), duas foram identificadas no proteoma de reservossomo da cepa Dm28c de SANT'ANNA e colaboradores (2009) e duas foram identificadas na forma celular tripomastigota metacíclica na análise do proteoma do ciclo de vida, realizado por ATWOOD e colaboradores (2005), dando uma maior confiabilidade na existência funcional dessas proteínas. Outra evidência que corrobora a existência de algumas dessas proteínas é a presença de ortólogos em organismos relacionados.

Tabela 5.1: Lista de genes selecionados para a caracterização.

ID gene	Identificação experimento	Tamanho	Anotação	Domínio	Ortólogos	Proteômica
<u>TcCLB.509601.140</u>	A01	543 pb, 21 kDa	P. H.	Sem domínios no PFAM		X
<u>TcCLB.509767.140</u>	A02	465 pb, 18 kDa	P. H.	Sem domínios no PFAM		
<u>TcCLB.508637.130</u>	A03	519 pb, 20 kDa	P. H. C.	2 domínios EF-Hand 7	Tb, Tbg, Te	
<u>TcCLB.507143.60</u>	A04	1451 pb, 53 kDa	P. H.	Domínio família PFAM-B19407		
<u>TcCLB.506925.10</u>	A05	936 pb, 36 kDa	P. H.	Família das ciclinas		
<u>TcCLB.505789.20</u>	A06	1461 pb, 53 kDa	P. H. C.	Domínios <i>Prominin</i> e SUR7	Lms, Tb, Te, Tv	X
<u>TcCLB.510065.10</u>	A07	1497 pb, 54 kDa	P. H. C.	Sem domínios no PFAM	Lms, Tb, Te, Tv	X
<u>TcCLB.508863.10</u>	A08	564 pb, 20 kDa	P. H. C.	Domínios DUF 1152 e LSR	Tb, Tc, Te, Tv	X
<u>TcCLB.508355.230</u>	A09	1323 pb, 50 kDa	P. H.	Sem domínios no PFAM		
<u>TcCLB.510355.230</u>	A10	498 pb, 19 kDa	P. H. C.	Domínios RIIa e EF-HAND7	Lms, Tb, Tc, Te, Tv	
<u>TcCLB.506825.40</u>	A11	1548 pb, 59 kDa	P. H. C.	Domínio TPR 11	Tb, Te	X
<u>TcCLB.511577.120</u>	A12	507 pb, 20 kDa	P. H. C.	Sem domínios no PFAM	Tb, Tc, Te	X

Pb (pares de bases); kDa (quilodaltons); P. H. (Proteína hipotética); P. H. C. (Proteína hipotética conservada)
Lms (*Leishmanias*); Tb (*Trypanosoma brucei*); Tbg (*Trypanosoma brucei gambiense*); Tc (*Trypanosoma congolense*); Te (*Trypanosoma evansi*); Tv (*Trypanosoma vivax*); X (identificado na proteômica). Em sublinhado, os genes que possuem mais de um clone Gateway no presente estudo.

Todos os 10 genes analisados no estudo foram selecionados de acordo com seu padrão de expressão durante o ciclo de vida do *T. cruzi*, sendo escolhidos genes diferencialmente expressos na forma celular tripomastigota metacíclica. Os dados de expressão foram obtidos por sequenciamento de RNA (RNA-seq) e os gráficos do padrão de expressão desses genes pode ser observado na Figura 5.1. É evidenciada a alta expressão na forma metacíclica, em comparação com a expressão basal observada nas outras formas celulares do parasita.

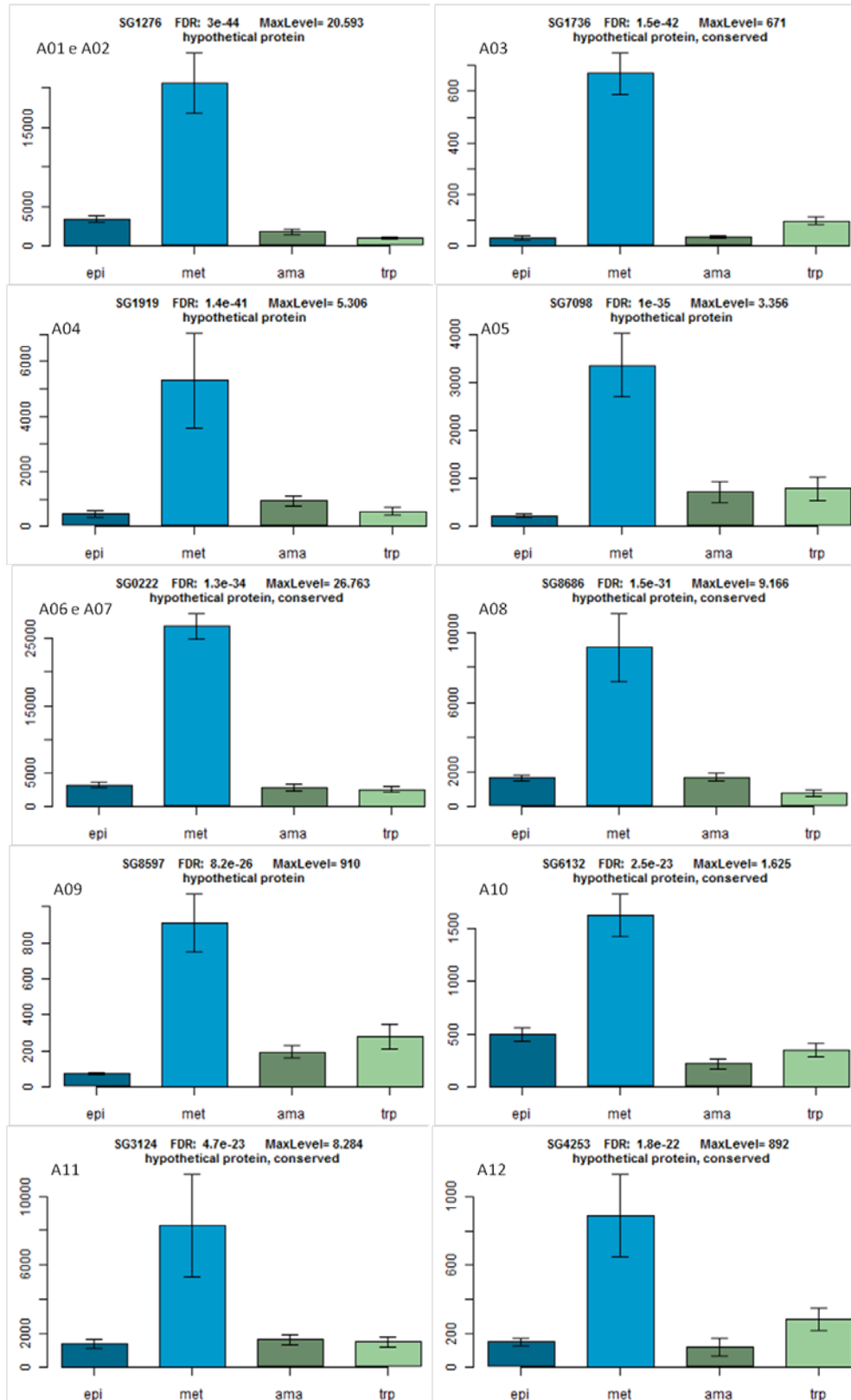


Figura 5.1: Gráficos com o padrão de expressão obtido por RNA-seq dos genes selecionados. (Eixo X: formas celulares do *T. cruzi*; eixo Y: número de leituras).

Os clones foram identificados de A01 a A12 para facilitar no trabalho laboratorial. Como dito anteriormente, os 12 clones selecionados são referentes a 10 genes. Os clones A01 e A02 correspondem ao mesmo gene, assim como os clones A06 e A07. Foram selecionados duas regiões codificadoras distintas desses genes com o intuito de analisar qual seria a melhor representante.

5.3 Amplificação e purificação dos genes

Dos 12 clones selecionados no estudo, 10 deles foram amplificados de maneira satisfatória. Esses clones amplificados são referentes aos 10 genes selecionados no estudo, isto é, para cada um dos genes com dois clones, só foi obtido sucesso na amplificação de um dos clones (os clones A02 e A07 não foram amplificados). Diversas PCRs foram realizadas com esses dois genes, utilizando diversas condições de reação, alterando a temperatura de anelamento assim como a concentração final de iniciadores, mas ainda assim não se obteve produto para esses genes. O padrão de amplificação dos 10 genes é evidenciado na Figura 5.2. Os produtos de amplificação dos clones A01 e A06, os pares dos clones A02 e A07, foram obtidos posteriormente devido a problemas encontrados no início do processo de amplificação. Novos iniciadores foram encomendados, o que resultou em um atraso na amplificação e posterior clonagem dos genes em questão.

Como dito no Capítulo 4, a etapa de amplificação foi realizada em duas PCRs, uma específica, e uma para acoplar o sítios de recombinação attB1 e attB2 no produto pré-amplificado. Visando a futura inserção dos genes nos vetores de expressão em *T. cruzi* pTcGFP, a segunda PCR foi realizada de duas formas: utilizando iniciadores que acoplam um códon de parada na extremidade 3' do gene amplificado, e utilizando iniciadores que não inserem um códon de parada. Isso possibilita, posteriormente, fusionar a etiqueta fluorescente GFP na extremidade N-terminal da proteína, para os genes com códon de parada. Todos os genes no estudo foram amplificados com sucesso, tanto com códon de parada quanto sem o códon de parada.

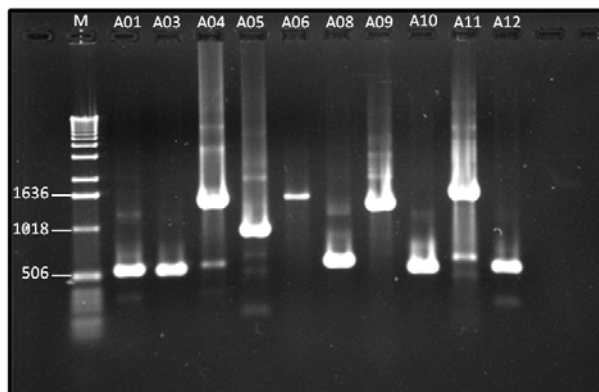


Figura 5.2: Padrão de amplificação dos genes, observado em gel de agarose.

M: Marcador de peso molecular 1Kb (Gibco®), com três indicadores de tamanho, em pares de base.

Depois das PCRs, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose, e todos os que se apresentaram amplificados de maneira satisfatórios foram purificados pelo sistema Agencourt® AMPure® PCR Purification (Beckman Coulter) de esferas paramagnéticas. Tendo em vista que esse sistema de purificação tem como objetivo a retirada de resíduos de até cem pares de bases, do produto amplificado, esse processo foi realizado para a eliminação dos iniciadores remanescentes da PCR, que interfeririam no processo futuro de recombinação.

5.4 Obtenção dos clones de entrada

O processo de clonagem procedeu-se de acordo com o protocolo descrito no item 4.5, sem a necessidade de alteração no mesmo. A Figura 5.3 mostra o perfil obtido na eletroforese da PCR de colônia dos clones selecionados. Para todos os genes, submetidos à recombinação, foram obtidos clones positivos.

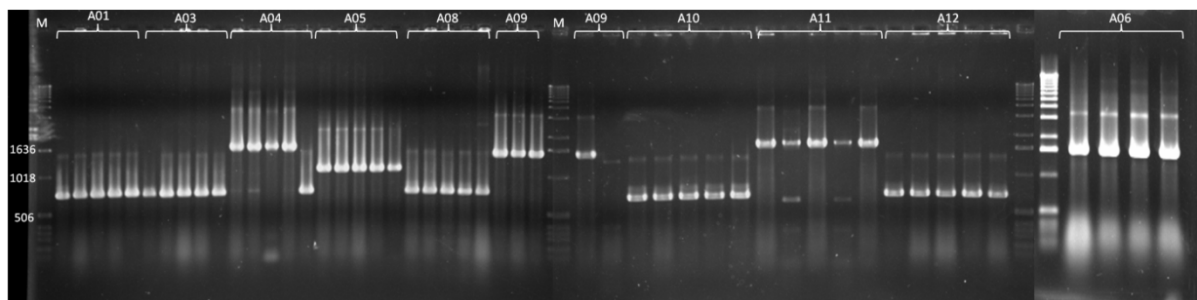


Figura 5.3: Perfil eletroforético dos produtos obtidos da PCR de colônia dos clones de entrada.

M: marcador de peso molecular de DNA (1Kb, Gibco®), com três indicadores de tamanho, em pares de base.

Os plasmídeos contendo o genes de estudo foram purificados segundo o protocolo descrito no Capítulo 4. A Figura 5.4 apresenta o perfil eletroforético dos plasmídeos purificados. A rapidez e qualidade dos clones obtidos evidencia a eficácia e a confiabilidade da plataforma usada no processo de recombinação.

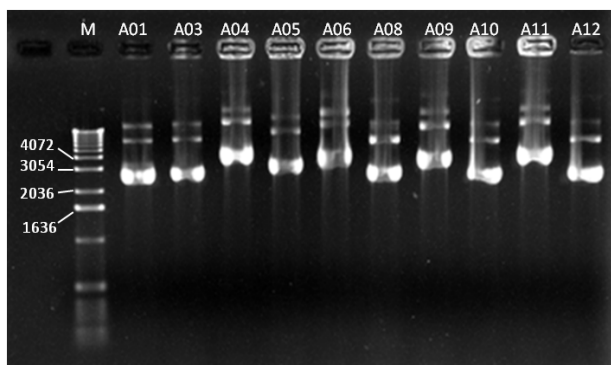


Figura 5.4: Perfil eletroforético da purificação dos clones de entrada pDONRTM221.
M: marcador de peso molecular de DNA (1Kb, Gibco[®]), com quatro indicadores de tamanho, em pares de base.

5.5 Obtenção dos clones de expressão

Como foi explicado, a plataforma Gateway[®] (Invitrogen) permite a fácil transferência de fragmentos gênicos entre diversos vetores, com características próprias, possibilitando a realização de uma grande gama de experimentos. No presente trabalho, tendo os genes inseridos no vetor de entrada pDONRTM221, foi possível transferi-los para vetores de destino com características distintas.

Inicialmente, procedeu-se à clonagem dos genes no vetor pDESTTM17, de expressão em *E. coli*, para obtenção das proteínas recombinantes. Assim como foi realizado para os clones de entrada, a clonagem para obtenção dos clones de expressão foi realizada com sucesso, sem alterações no protocolo descrito anteriormente (item 4.5). A Figura 5.5 mostra o perfil obtido na eletroforese da PCR de colônia para a seleção dos clones corretos utilizando o vetor pDESTTM17. Dos dez genes submetidos à recombinação pela reação LR, foram obtidos clones positivos para todos. A obtenção dos clones A01 e A06 foi comprovada através da técnica da "palitagem" (*toothpick*).

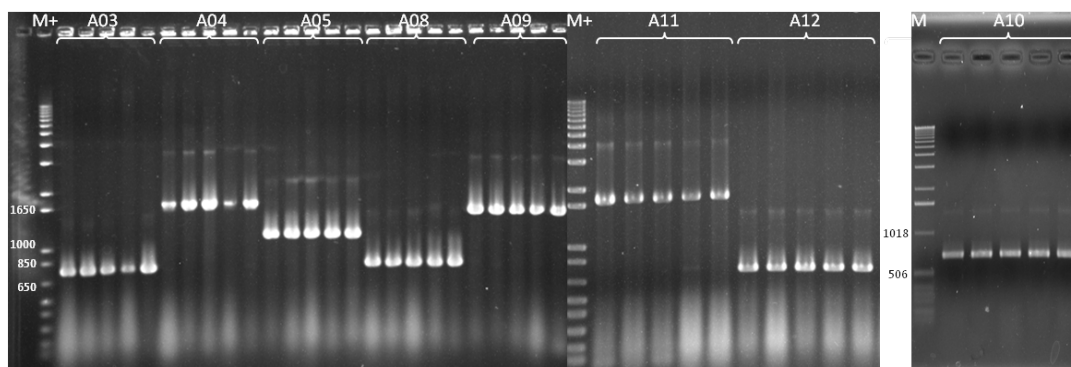


Figura 5.5: Perfil eletroforético dos produtos obtidos da PCR de colônia dos vetores de expressão pDEST17.

M+: marcador de peso molecular de DNA (1Kb plus, Gibco®), com quatro indicadores de tamanho, em pares de base; M: marcador de peso molecular DNA (1Kb, Gibco®), com dois indicadores de tamanho, em pares de base.

Os plasmídeos contendo o genes de estudo no vetor de expressão pDESTTM17 foram purificados segundo o protocolo descrito no Capítulo 4. A Figura 5.6 mostra o perfil dos plasmídeos purificados. Novamente, o processo de clonagem se mostrou de grande eficácia, permitindo a rápida transferência de genes entre vetores, com as mais diversas finalidades.

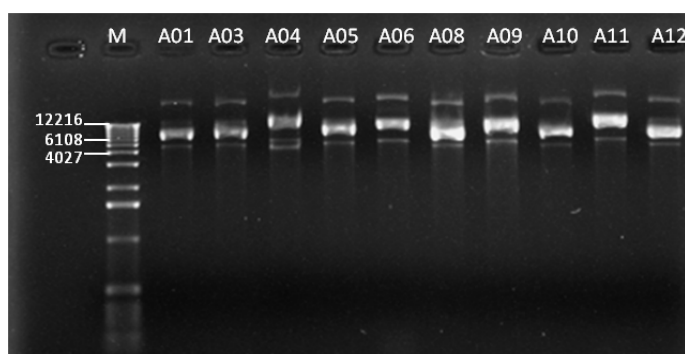


Figura 5.6: Perfil eletroforético da purificação dos clones de expressão pDESTTM17.

M: marcador de peso molecular de DNA (1Kb, Gibco®), com três indicadores de tamanho, em pares de base.

Também foi feita a clonagem dos genes no vetor de expressão em *T. cruzi*, pTcGFP, o qual fusiona à proteína expressa uma etiqueta fluorescente GFP. Nessa etapa, foram utilizados tanto os vetores com o gene contendo o códon de parada quanto aqueles sem o códon de parada. Isso permitiu a fusão da etiqueta fluorescente tanto na extremidade amino quanto na extremidade carboxila.

O processo de recombinação foi realizado da mesma forma que para o vetor pDESTTM17, havendo a seleção dos clones positivos também por PCR de colônia (dado não

mostrado). A etapa de purificação foi realizada como descrito para o vetor pDESTTM17, e os plasmídeos foram obtidos e purificados pelo mesmo protocolo descrito

Para os vetores A01 (amino-terminal) e A06 (amino e carboxila-termina) não foi realizada a recombinação nos vetores pTcGFP devido a problemas na sincronização das etapas e otimização de protocolo. Esses vetores serão criados posteriormente.

5.6 Sequenciamento dos clones obtidos

Todos os genes estudados foram clonados nos vetores compatíveis com o sistema Gateway® (pDONRTM221, pDESTTM17 e pTcGFP). Para comprovar o sucesso dos processos de clonagem e identificar possíveis erros, como inserção ou deleção de nucleotídeos nas sequências de interesse que poderiam resultar em mudanças no quadro de leitura, e consequentemente no surgimento de códons de parada indesejáveis, os genes clonados nos vetores foram submetidos a sequenciamento.

Inicialmente foi realizado o sequenciamento de todos os vetores de entrada (genes inseridos no pDONRTM221), com ou sem códon de parada. Todas as regiões codificadoras foram comprovadas, com exceção dos genes A01 e A06, que apresentavam desde o início do trabalho um alto potencial de dificuldade em sua clonagem pois sua região codificadora não era facilmente identificável, o que levou ao desenho de dois conjuntos de iniciadores distintos para cada um deles. Durante o processo de amplificação, não foi possível obter produto para esses dois genes e procedeu-se à análise dos dados genômicos da cepa Dm28c, que haviam sido recentemente obtidos por nosso grupo. Com essa nova informação, foram desenhados novos iniciadores e obteve-se sucesso na amplificação.

Ao comprovarmos os clones por sequenciamento, observou-se que o gene A01 na verdade é uma versão mais curta do gene inicialmente predito, pela existência de um códon de parada prematuro, corroborado por um dos modelos gênicos da cepa CL Brener. A Figura 5.7 apresenta o alinhamento do clone A01 sequenciado com os dois modelos gênicos da cepa CL Brener, que diferem entre si por sua extremidade 3', mas alongada em um deles. Ambos os modelos gênicos de CL Brener possuem códon de parada em sua extremidade 3', sem a existência de códons de parada no meio das sequências codificadoras.

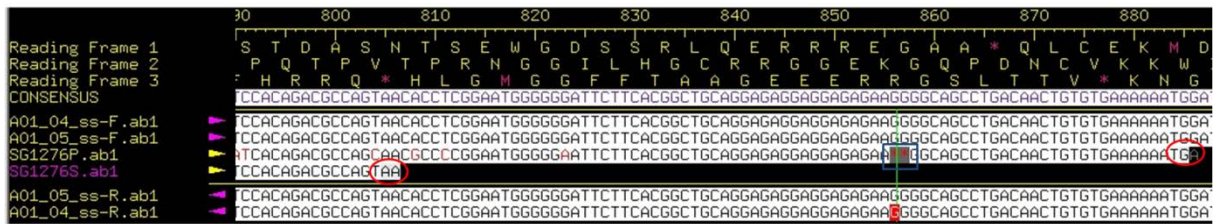


Figura 5.7: Alinhamento do clone A01 com modelos gênicos da cepa CL Brener.

Os círculos vermelhos representam os códons de parada nos dois modelos gênicos de CL Brener; o quadrado azul representa a região de inserção dos dois nucleotídeos G. Em rosa a esquerda, o modelo gênico de CL Brener ao qual o clone A01 sequenciado se refere, com seu códon de parada prematuro.

Nos clones A01 sequenciados é possível observar a inserção de dois nucleotídeos G, na extremidade 3', que não estão presentes no modelo gênico mais alongado de CL Brener, ocasionando uma mudança de quadro de leitura nesses clones, podendo ocasionar uma alteração na sequência codificadora.

O clone A01 foi identificado no estudo de proteômica do ciclo de vida de *T. cruzi* (ATWOOD et al., 2005), com peptídeo identificado na forma tripomastigota metacíclica, corroborando a existência dessa proteína. No entanto, a região peptídica que foi identificada na proteômica de ATWOOD e colaboradores (2005) se encontra na região carboxila-terminal da proteína comum aos dois membros do grupo gênico. Tendo em vista a existência de alguns aminoácidos metionina ao longo da sequência do clone A01 e as diferentes posições de códons de parada encontradas nos modelos gênicos de CL Brener, é bastante incerto dizer qual seria o real tamanho da proteína. Acreditávamos ter amplificado e clonado o modelo gênico de maior tamanho, mas o resultado do sequenciamento nos mostrou que o clone inserido no vetor de entrada na verdade refere-se ao modelo gênico menor, visto a existência, nos vetores sequenciados, de um códon de parada prematuro.

No caso do gene A06, obtivemos um clone com a configuração aberta, sem um códon de parada, e outra com a configuração fechada, com um códon de parada. O clone com a configuração fechada apresentou uma inserção de 10 nucleotídeos, comprovado por leituras do sequenciamento anterógradas e retrógradas, o que cria uma mudança de quadro de leitura e um códon de parada prematuro. A princípio, esse clone foi eliminado. O clone com a configuração aberta apresentou uma sequência correta e será utilizado para os ensaios posteriores, tanto para análises amino quanto carbóxi-terminal.

A comprovação da sequência clonada foi realizada somente nos vetores de entrada. Para os genes A08 e A09 foi realizado também o sequenciamento do vetor de destino pDESTTM17, pois não foi obtido a expressão protéica desses genes. O resultado foi a comprovação de que os fragmentos nucleotídicos inseridos nesses vetores de expressão correspondem aos respectivos genes da cepa CL Brener, sendo a ausência de expressão provavelmente um problema do processo de expressão heteróloga em bactérias.

5.7 Expressão das proteínas

No teste de expressão com o kit comercial de extração de proteínas BugBusterTM Protein Extraction Reagents (Novagen), foi obtida a expressão de sete (70%) das proteínas estudadas (Figura 5.8), sendo que cinco delas foram expressas utilizando a linhagem bacteriana Tuner(DE3)pLysS, e as outras duas com a linhagem Rosetta-gami 2. Os genes A01 e A06 foram sendo obtidos recentemente, e seu padrão de expressão ainda não foi corretamente avaliado, o que será feito subsequentemente. Para o gene A08, vários testes foram realizados, com o intuito de obter um nível mínimo aceitável de proteína expressa, mas em nenhuma das condições testadas obteve-se expressão para essa proteína. Ela apresenta dois possíveis domínios trans-membrana, próximo a ambas extremidades, o que pode dificultar a expressão heteróloga dessa proteína. Planeja-se realizar a expressão dessa proteína em condições que favoreceriam o enovelamento de proteínas hidrofóbicas, bem como a expressão homóloga nos vetores de *T. cruzi*.

Todas as proteínas que foram consideradas como expressas na fase de teste foram produzidas em quantidade com sucesso. Para uma delas (A09), no entanto, foi observada uma expressão muito fraca, quando expressa, o que inviabilizou a sua utilização nos experimentos futuros. Tentou-se otimizar o rendimento da mesma, aumentando o volume de inóculo na indução, mas sem sucesso, optando-se por eliminar essa proteína dos ensaios subsequentes.

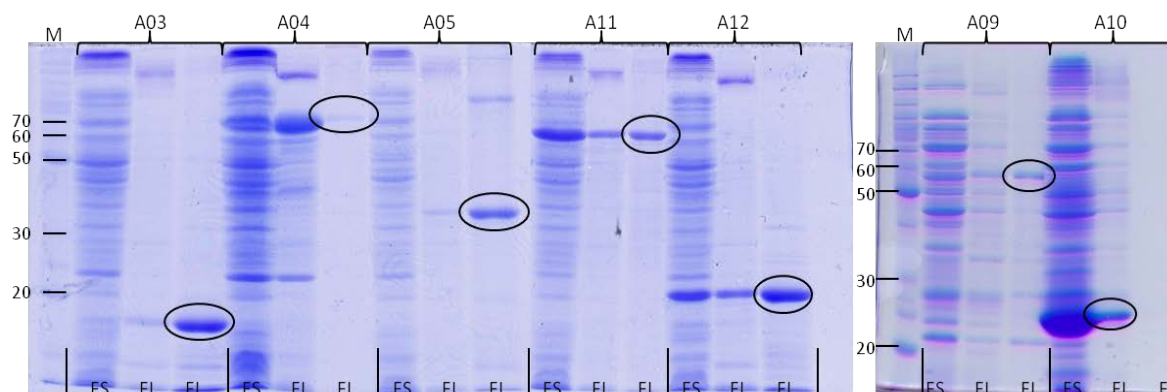


Figura 5.8: Perfil eletroforético das proteínas expressas em células bacterianas.

M: marcador de peso molecular, em quilo Dalton, kDa (*BenchMark Ladder*, Invitrogen); FS: fração solúvel; FL: fração de lavagem; FI: fração insolúvel; círculos evidenciam as proteínas no tamanho desejado.

5.8 Purificação das proteínas

Todas as 6 proteínas expressas em quantidade foram purificadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) seguida de eletro-eluição das proteínas do gel, conforme descrito no item 4.7. Inicialmente, foi realizada a purificação por cromatografia de afinidade por níquel (QIAexpress System, Qiagen), mas que não apresentou resultados satisfatório, com grau de pureza relativamente baixo e com grande perda de material.

Tendo em vista esse resultado, as purificações subsequentes foram todas realizadas por eletroforese em gel (SDS-PAGE), obtendo-se proteínas com grau de pureza adequado e quantidade suficiente para a realização das inoculações em camundongo.

5.9 Obtenção dos anticorpos policlonais

As 6 proteínas expressas heterologicamente em bactérias foram inoculadas em camundongos para a obtenção de anticorpos policlonais, como descrito no item 4.8. Inicialmente foram utilizados camundongos da linhagem Swiss, em duplicata, para todas as 6 proteínas. Tendo obtido esses soros, foram realizados ensaios de *western blot* para comprovar e avaliar a qualidade dos mesmos, contra os extratos do ciclo de vida de *T. cruzi*.

Dos 12 soros obtidos, somente os soros contra a proteína A10 e A12 foram considerados satisfatórios nessa primeira etapa de inoculação. Alguns dos outros soros

reconheceram, no *western blot*, bandas do tamanho esperado, mas também bandas inespecíficas, tanto contra o extrato de tripomastigota metacíclico, como contra os extratos das outras fases do ciclo de vida do parasita. Foi observado também que a mesma proteína, tendo sido inoculada em dois camundongos diferentes, resultou em soros com características diferentes. Devido a isso, para tentar eliminar essa diferença entre os soros contra a mesma proteína, o processo de imunização foi repetido, utilizando dessa vez camundongos da linhagem isogênica BALB/c.

Os resultados dos ensaios de *western blot* dos anticorpos obtidos são apresentados mais adiante, quando as proteínas de estudo forem descritas separadamente. Como dito, foram utilizados extratos proteicos das quatro formas celulares de *T. cruzi*, assim como de diversos pontos do processo de metaciclo gênese, nos ensaios de *western blot*. Como normalizador dos *western blots* realizados, para analisar se uma quantidade equivalente de cada extrato proteico foi aplicada, foram feitos ensaios de *western blot* utilizando anticorpos anti-actina (em uma diluição 1:200) e anti-GAPDH (em uma diluição de 1:300). As duas proteínas, actina (45 kDa) e GAPDH (~40 kDa), possuem a característica de serem constitutivamente expressas em todas as formas celulares de *T. cruzi*, e por isso são bons alvos para análises de normalização de extratos proteicos (Figura 5.9).

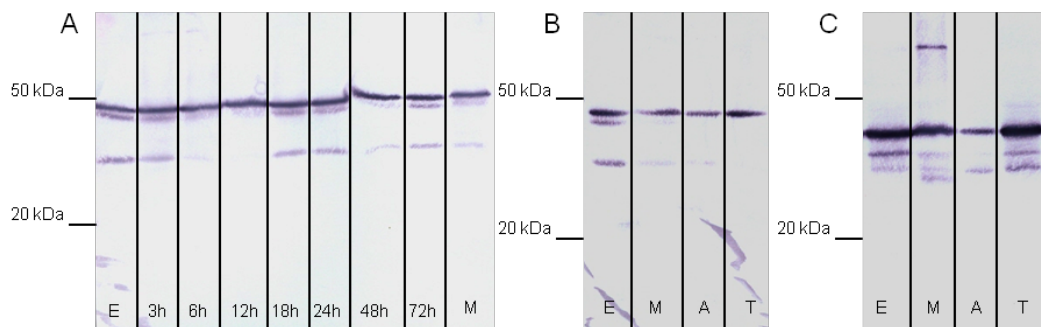


Figura 5.9. Western blot dos normalizadores de extratos proteicos.

A) Normalizador do extrato dos pontos da metaciclo gênese utilizando o soro anti-actina; B) normalizador dos extratos do ciclo de vida do *T. cruzi* utilizando o soro anti-actina; C) normalizador dos extratos do ciclo de vida utilizando o soro anti-GAPDH. E: forma epimastigota; M: forma tripomastigota metacíclico; A: forma amastigota; T: tripomastigota sanguíneo; 3h, 6h, 12h, 18h, 24h, 48h, 72h: extratos proteicos de parasitas aderidos ao substrato após 3, 6, 12, 18, 24, 48 e 72 horas de indução com TAU3AAG, respectivamente. Ao lado esquerdo da figura, duas bandas de referência do marcador de peso molecular.

De todos os extratos utilizados, o único que apresentou uma diferença mais significativa de intensidade no resultado do *western blot* foi o extrato de amastigota, em relação à GAPDH. Os outros, apesar de algumas leves variações, e do aparecimento de bandas inespecíficas, apresentaram um padrão bastante homogêneo, demonstrando uma uniformidade da quantidade de extrato proteico aplicado. A caracterização do que seria um normalizador adequado é muito dependente do processo que está sendo avaliado. É possível que, embora considerado um normalizador aceitável, GAPDH não apresente expressão constitutiva e idêntica nos estágios do ciclo de vida de *T. cruzi*.

5.10 Imunolocalização

Após a análise por western blot, foi selecionado um antissoro para cada uma das 6 proteínas e utilizados para a realização dos ensaios de imunolocalização. Foram preparadas lâminas de microscopia de oito poços separados por *teflon*, contendo tanto parasitas na forma tripomastigota metacíclica, como parasitas na forma epimastigota. Os resultados de imunolocalização serão discutidos posteriormente, quando as proteínas estudadas forem descritas separadamente.

5.11 Localização celular com etiqueta fluorescente

Também foram realizadas análises de localização celular expressando, no próprio parasita, a proteína de interesse fusionada a uma etiqueta fluorescente. Foram utilizados os vetores de expressão pTcGFP apresentados no item 5.5, que foram transfectados em epimastigotas da cepa Dm28c. Dos plasmídeos obtidos contendo os genes de interesse, somente para um deles (A05 carboxila-terminal) os parasitas morreram pouco tempo depois da transfecção. Todos os outros vetores foram transfectados com sucesso nos parasitas, que foram selecionados acrescentando, ao meio de cultura, o antibiótico G418. A transfecção do gene A05 carboxila-terminal será repetida futuramente.

Após o período de seleção dos parasitas, foram produzidas lâminas de microscopia com os parasitas transfectantes tanto na forma epimastigota quanto na forma tripomastigota metacíclica.

Foi possível observar padrões de fluorescência das proteínas recombinantes na forma epimastigota. No entanto, não foi possível observar os padrões de fluorescência adquiridos pelos parasitas transfectantes na forma tripomastigota metacíclica, provavelmente devido ao tamanho do parasita e ao fraco sinal fluorescente da proteína GFP (*green fluorescent protein*).

Para comprovar a expressão das proteínas de interesse fusionadas à etiqueta GFP, foram realizados ensaios de *western blot* com os extratos dos transfectantes nas formas epimastigota e tripomastigota metacíclica. Nos ensaios em que foi utilizado o soro anti-GFP não foi observado sinal, provavelmente devido a algum problema com o soro utilizado. Para as proteínas às quais foram obtidos os anticorpos policlonais, o resultado do *western blot* será apresentado mais à frente, junto com a descrição individualizada de cada gene.

5.12 Nocaute gênico

Conforme descrito no item 4.12, foi feita a amplificação das regiões intergênicas a montante e a jusante dos genes selecionados. As regiões intergênicas dos 9 genes selecionados para a realização dos nocautes gênicos foram amplificadas com sucesso (Figura 5.10A). Para alguns produtos de amplificação foram observadas bandas duplas próximas às bandas desejadas, que apesar de tentativas de otimização das reações, não puderam ser eliminadas. Somente o gene A06 não foi selecionado para a realização do nocaute gênico, pois através da análise de cópias gênicas da plataforma TcruziKO (omics.icc.fiocruz.br/TcruziKO; LORUSSO, 2013) estimou-se que esse gene tivesse aproximadamente 9 cópias no genoma de Dm28c.

Em seguida foi feita a amplificação dos cassetes de seleção: genes de resistência aos antibióticos G418 (1.640 pb) e higromicina (2.030 pb). Os dois cassetes de seleção foram amplificados com sucesso (Figura 5.10B).

Em seguida esses produtos (as intergênicas e os cassetes de resistência amplificados) foram quantificados e realizada a PCR de fusão, respeitando as proporções de intergênicas e resistência descritas por LORUSSO, 2013. O produto dessa PCR de fusão, o cassete de nocaute, foi então utilizado como DNA molde para uma nova etapa amplificação, conforme descrito no item 4.12.

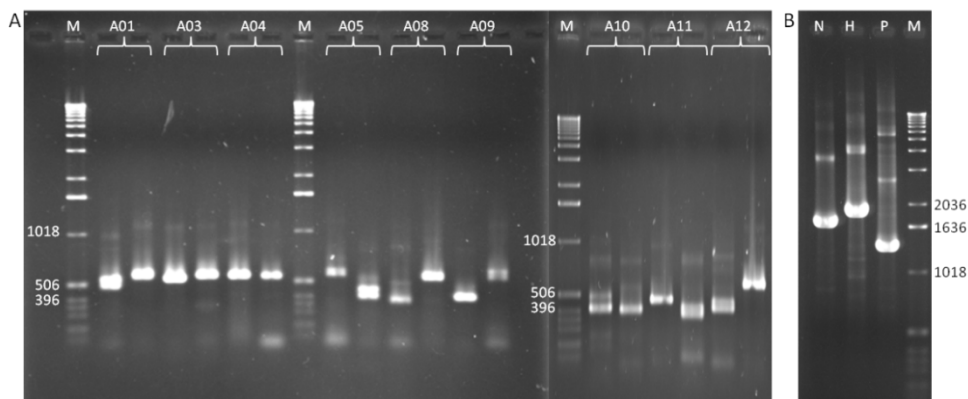


Figura 5.10: Perfil eletroforético da amplificação A) das regiões intergênicas e B) dos cassetes de seleção.

M: marcador de peso molecular de DNA (1Kb, Gibco®), com três indicadores de tamanho, em pares de base; N: Neomicina; H: Higromicina; P: Puomicina.

Após os testes de amplificação dos cassetes de nocaute terem comprovado a fusão, essas amplificações foram feitas em grande quantidade para obter ao final um grande volume de produto de fusão amplificado. As Figuras 5.11 e 5.12 mostram a amplificação, em quantidade, dos cassetes de nocaute dos genes estudados com as resistências à neomicina (G418) e higromicina, respectivamente.

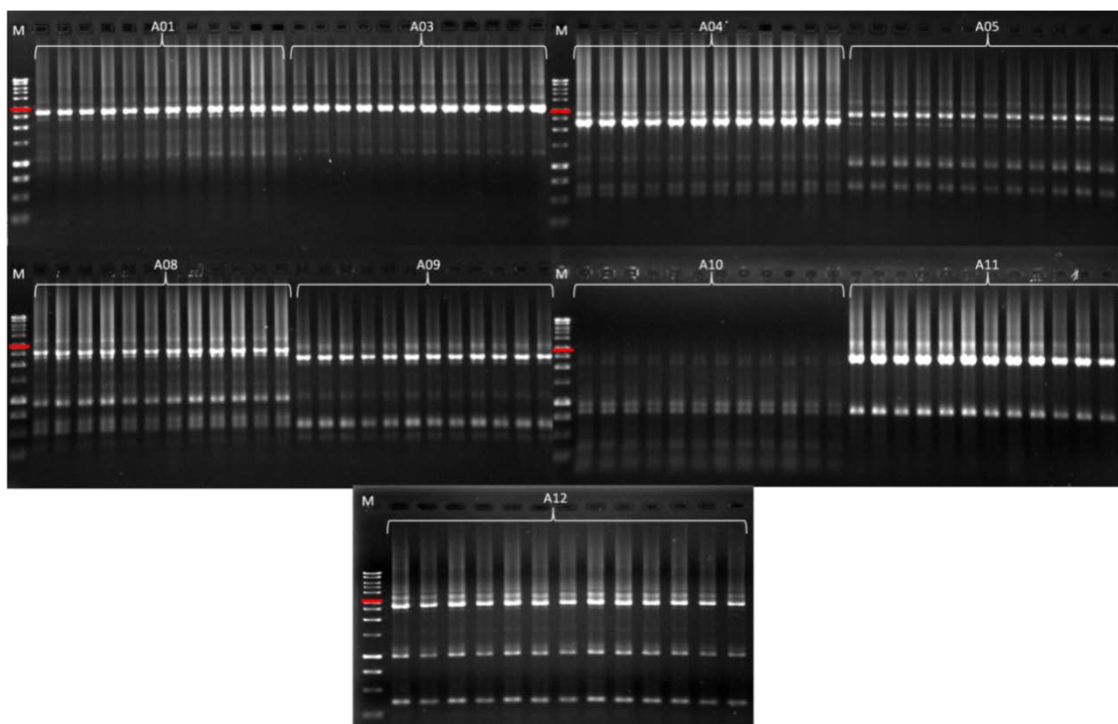


Figura 5.11: Perfil eletroforético da amplificação dos cassetes de nocaute contendo o gene neomicina como marcador de seleção.

M: marcador de peso molecular de DNA (1Kb, Promega), a banda vermelha corresponde a 3.000 pares de base.

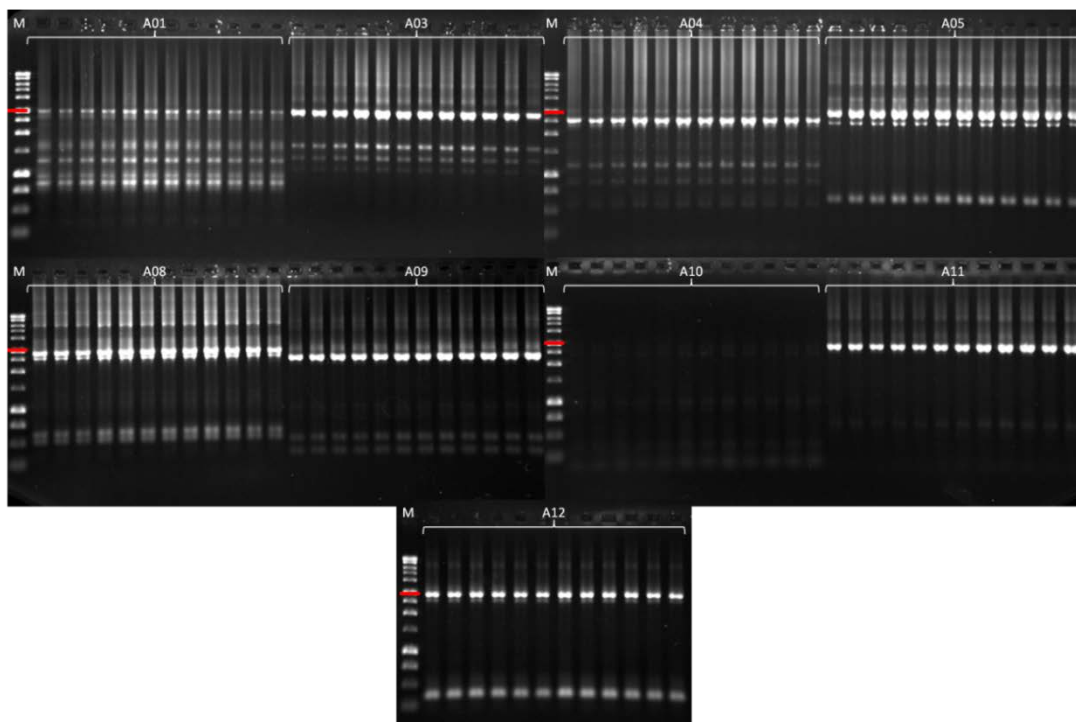


Figura 5.12: Perfil eletroforético da amplificação dos cassetes de nocaute contendo o gene higromicina como marcador de seleção.

M: marcador de peso molecular de DNA (1Kb, Promega), a banda vermelha corresponde a 3.000 pares de base.

Esses cassetes de nocaute foram concentrados e quantificados e então transfectados em *T. cruzi* da cepa Dm28c em cultura. Visto a baixa quantidade de cassete de nocaute obtido para o gene A10, não foi realizada a transfecção do mesmo.

Após a realização da seleção dos nocautes simples, foi obtido um crescimento adequado para todos os oito genes analisados. Atualmente estamos realizando a validação do sítio de inserção dos cassetes de recombinação.

Para os genes A01 e A09, foi possível realizar a transfecção objetivando deletar o segundo alelo. Atualmente, os parasitas contendo a possível deleção dupla estão sendo selecionados.

As populações de parasitas contendo as deleções gênicas, sejam simples ou duplas, serão avaliados em relação a curva de crescimento, capacidade de diferenciação para tripomastigotas metacíclicos, infectividade em cultura de células e sequenciamento de transcriptoma por RNA-Seq.

5.13 Características dos genes selecionados

Agora serão apresentadas as características dos genes selecionados para o estudo, assim como os resultados de *western blot*, as imunolocalizações e as imagens de localização celular com as proteínas fusionadas à etiqueta fluorescente GFP.

5.13.1 A01, TcCLB.509601.140, Proteína Hipotética.

O clone A01 possui 543 pares de bases, que codifica uma proteína hipotética de 21 kDa, sem um domínio descrito no banco de dados de famílias proteicas PFAM. Essa proteína foi identificada na análise do proteoma do ciclo de vida, realizado por ATWOOD e colaboradores (2005), na fase tripomastigota metacíclico.

Esse gene faz parte do grupo gênico SG1276 (TrypansOmics, omics.icc.fiocruz.br), do qual também faz parte o modelo gênico TcCLB.509767.140, que foi denominado como clone A02 no presente estudo. Segundo o banco de dados de genomas de cinetoplastídeos, TritrypDB (<http://tritrypdb.org>), ambos estão situados no mesmo cromossomo (Cromossomo 22), e apresentam um grau significativo de similaridade, como mostrado na Figura 5.13.

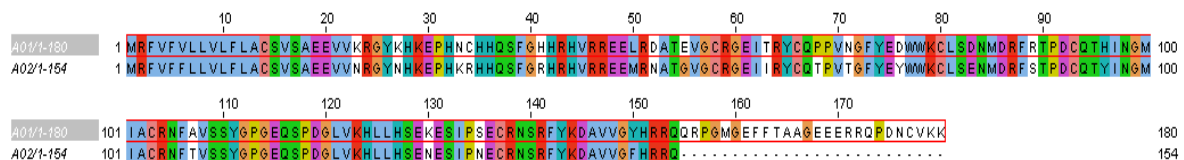


Figura 5.13: Análise de similaridade entre A01 e A02.

À esquerda, a identificação dos genes, sendo A01 marcado em cinza. Na parte superior do alinhamento se encontra a numeração referente à posição dos aminoácidos.

Pode ser visto no alinhamento que a característica mais marcante de diferença entre as duas proteínas é a extremidade carboxila-terminal, que em A01 se prolonga 26 aminoácidos a mais do que em A02. Esses dois modelos gênicos apresentam diversas características que o classificam como alelos, mas essa grande divergência protéica é incongruente. No entanto, de acordo com os resultados do sequenciamento do clone A01, discutido anteriormente, é pouco provável que o gene A01, conforme predito no genoma de CL Brener, seja realmente funcional e provavelmente a forma menor, do gene A02, seja a correta, também presente no genoma de Dm28c.

O gene que codifica para a proteína A01/A02 foi amplificado com sucesso e inserido nos vetores de entrada e destino utilizados pela plataforma Gateway[®]. No entanto, não foi obtido sucesso na expressão heteróloga da proteína, mesmo utilizando diferentes cepas de *E. coli* para a expressão. Porém, esses resultados ainda são muito preliminares, devido à obtenção relativamente recente dos vetores de destino, e os ensaios serão repetidos.

O gene A01 foi também inserido no vetor pTcGFP de expressão em *T. cruzi*. Para esse gene, somente o vetor que fusiona a etiqueta fluorescente GFP na extremidade carboxila-terminal foi utilizado, sendo observado um padrão de fluorescência difuso pelo citoplasma celular na forma epimastigota (Figura 5.14). Esses ensaios serão repetidos com as versões mais recentes dos vetores de destino.

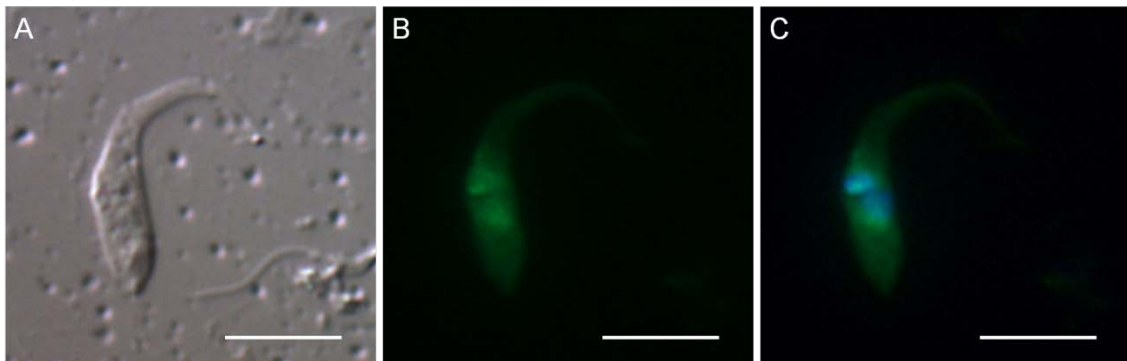


Figura 5.14: Micrografia da localização da proteína A01 fusionada a etiqueta fluorescente. Parasitas com a etiqueta florescente GFP fusionada na extremidade carboxila-terminal. A) contraste de fase; B) localização celular com o uso da etiqueta GFP (verde); C) sobreposição da localização celular GFP com o marcador de fluorescência de núcleo e cinetoplasto, Hoeschst. Barra de escala: 10 μ m.

Até o momento, o gene TcCLB.509601.140 é um dos dois genes para os quais o nocaute gênico simples, com resistência a neomicina, foi obtido. Com esses parasitas, foi realizada uma curva de crescimento para analisar o efeito da deleção desse gene no crescimento da cultura de parasitas na fase epimastigota. Não houve diferença significativa no crescimento dos parasitas nocaute em comparação com os parasitas selvagens (dado não apresentado).

5.13.2 A03, TcCLB.508637.130, Proteína Hipotética Conservada.

O clone A03 corresponde ao grupo gênico SG1736 (modelos gênicos TcCLB.509245.20 e TcCLB.508637.130) e possui 519 pares de bases, codificando uma

proteína hipotética conservada de cerca de 20 kDa, apresentando dois domínios estruturais EF-hand 7 de ligação ao cálcio.

O domínio EF-hand apresenta conservação de vários aminoácidos como pode ser visto pelo gráfico da Figura 5.15. O eixo X corresponde à posição do aminoácido dentro do domínio PFAM e o eixo Y seu grau de conservação. Por exemplo, na posição 6 (eixo X) existe a possibilidade de ocorrência de fenilalanina e triptofano, sendo que a fenilalanina é mais conservada, evidenciado pela letra F em maior tamanho.

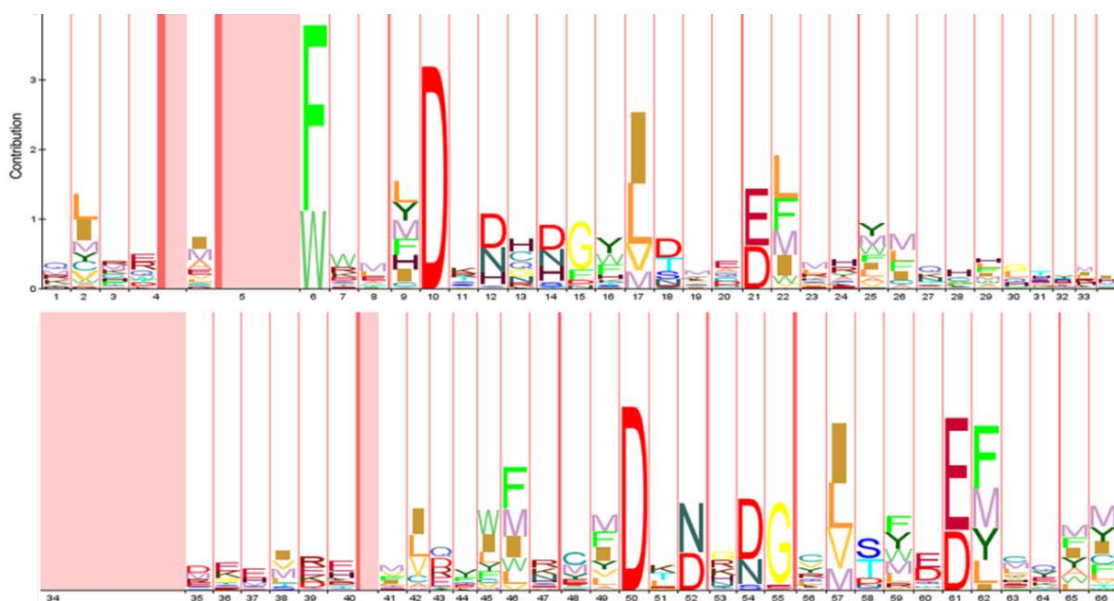


Figura 5.15: Gráfico HMM relativo ao domínio EF-hand.

Gráfico HMM retirado do programa PFAM mostrando o grau de conservação em cada posição aminoacídica do domínio EF-hand. No eixo inferior do gráfico estão numeradas as posições aminoacídicas do domínio e no eixo lateral o grau de conservação.

No entanto, a confiabilidade da identidade do domínio PFAM EF-hand na proteína TcCLB.508637.130 é baixa. O primeiro domínio EF-hand (mais amino-terminal) apresenta um e-value de 0,86 e o segundo (mais carboxila-terminal) apresenta um e-value de 4,2E+04.

O domínio EF-hand é um domínio estrutural *hélice-loop-hélice* encontrado em uma grande família de proteínas de ligação ao cálcio. Esses domínios tendem a ocorrer aos pares, e podem ser divididos em duas classes, os sensores de cálcio, que traduzem o sinal químico de um aumento na concentração de Ca^{2+} em diversas reações bioquímicas, e os moduladores de cálcio, que ajudam a modular o sinal do Ca^{2+} espaço-temporalmente ao se ligarem ao Ca^{2+}

livre, transmitindo o sinal ou removendo os íons do citoplasma (NELSON *et al.*, 2001; GIFFORD *et al.*, 2007).

A Figura 5.16 mostra o grau de similaridade da proteína A03 com proteínas ortólogas em *T. brucei*, *T. gambiense* e *T. evansi*, mostrando a grande conservação da proteína observada.

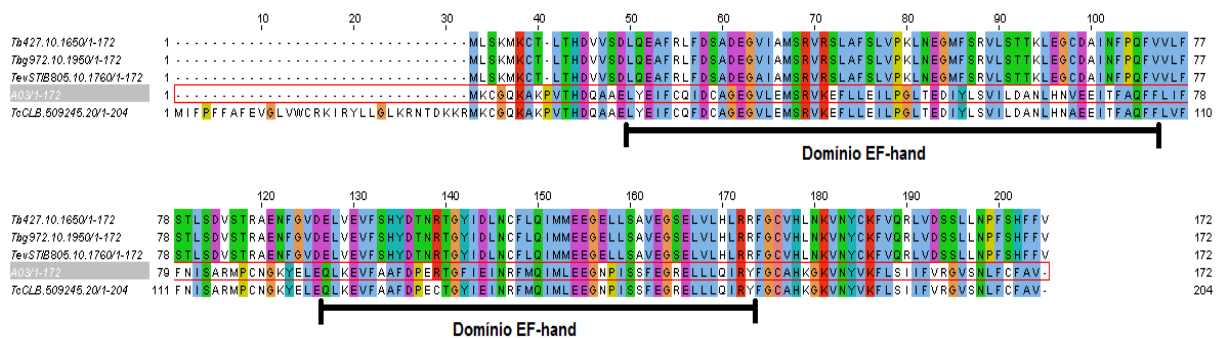


Figura 5.16: Análise de similaridade entre A03 e ortólogos encontrados em outros tripanossomatídeos.

Em cinza, a esquerda, a identificação do gene A03, e logo abaixo dele a sequência do gene parólogo a ele. Na parte superior do alinhamento se encontra a numeração referente à posição dos aminoácidos.

O gene TcCLB.508637.130 foi amplificado e inserido nos vetores utilizados pela plataforma Gateway[®]. Foi obtido sucesso na expressão heteróloga da proteína na cepa bacteriana Tuner(DE3)pLysS, procedendo em seguida para a purificação e inoculação, da mesma, em camundongos. Após as inoculações e a obtenção dos soros, a qualidade e especificidade do mesmo foi analisada por *western blot* contra extratos proteicos das quatro formas celulares de *T. cruzi* e contra extratos proteicos de diversos pontos do processo de metaciclogênese. Dos três soros obtidos contra a proteína A03, os *western blots* daquele que se mostrou mais específico está apresentado na Figura 5.17. É possível observar, pela comparação com o gráfico obtido do RNaseq que o nível de expressão da proteína corresponde ao nível de mRNA observado.

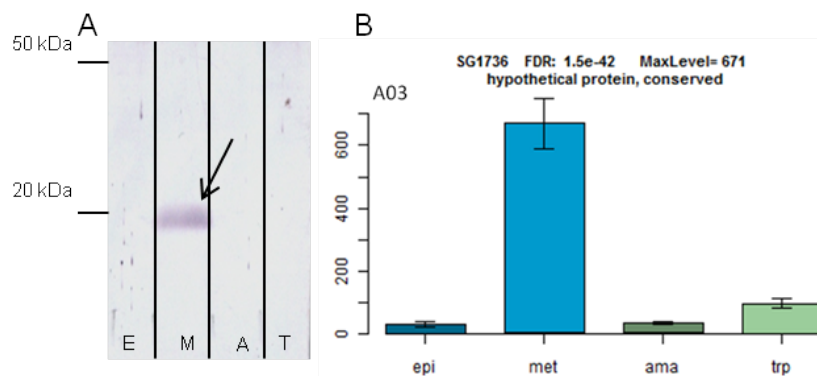


Figura 5.17: Western blot com o soro A03 contra os extratos proteicos do ciclo de vida do *T. cruzi*.

A) contra extratos das quatro formas celulares do parasita; B) padrão de expressão do gene TcCLB.508637.130 obtido pelos dados de RNAseq. E: forma epimastigota; M: forma tripomastigota metacíclica; A: forma amastigota; T: tripomastigota sanguíneo. Ao lado esquerdo de cada figura, duas bandas de referência do marcador de peso molecular.

Foi realizado o ensaio de *western blot* contra os diferentes pontos da metaciclogênese, no entanto, não foi observado sinal. Esse ensaio será repetido.

Utilizando o soro obtido contra a proteína A03 foram realizadas imunolocalizações e foi observado um padrão de localização nuclear (Figura 5.18), sem sinal de outra localização celular. Esse padrão pode ser observado tanto em parasitas na forma epimastigota quanto em parasitas na forma tripomastigota metacíclica.

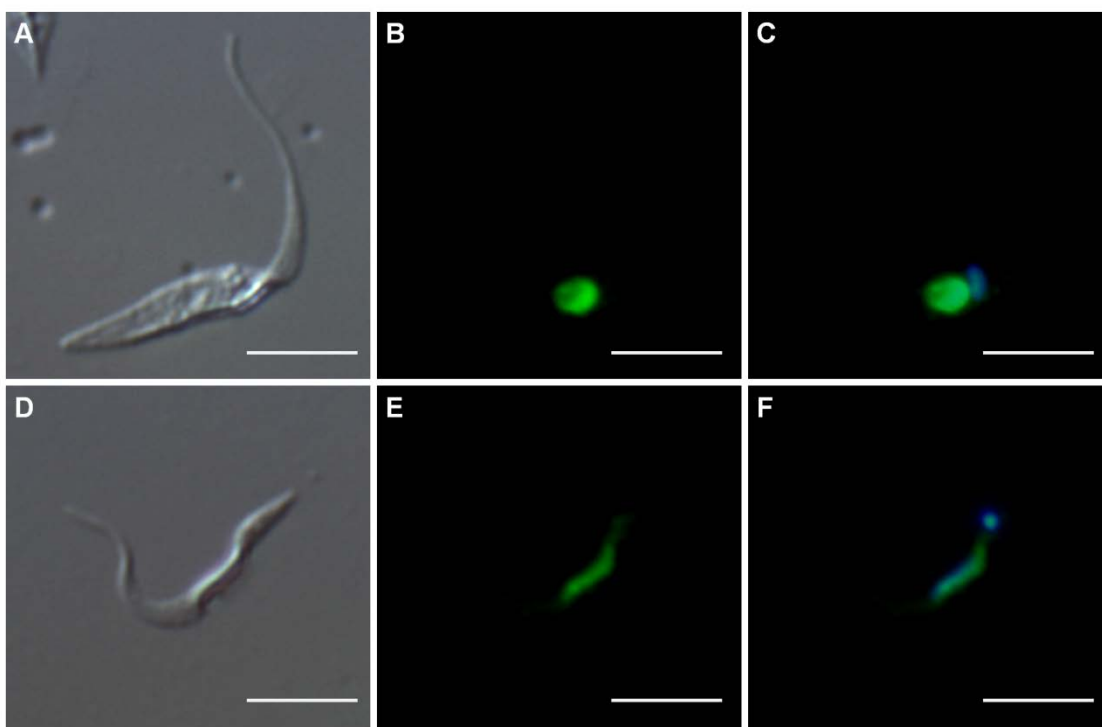


Figura 5.18: Imunolocalização celular da proteína A03.

A), B) e C) parasitas na forma epimastigota; D), E) e F) parasitas na forma tripomastigota metacíclica. A) e D) contraste de fase; B) e E) imunolocalização celular com soro contra a proteína A03; C) e F) sobreposição da imunolocalização com o marcador de fluorescência de núcleo e cinetoplasto, Hoeschst. Barra de escala: 10 μm .

A proteína A03 foi expressa em *T. cruzi* fusionada à etiqueta fluorescente, utilizando o vetor pTcGFP. Foram utilizados os vetores que fusionam a etiqueta GFP em ambas as extremidade da proteína. A posição da etiqueta fluorescente em ambas as extremidades evidenciou um padrão de fluorescência difuso pelo citoplasma celular da forma epimastigota, com um pequeno acúmulo de fluorescência na região posterior dos parasitas nos quais a etiqueta fluorescente foi fusionada na extremidade amino-terminal da proteína (Figura 5.19).

A incongruência da localização pela imunofluorescência e pela fusão com GFP não é totalmente inesperada. A proteína em estudo se expressa prioritariamente em tripomastigota metacíclico e não foi possível observar sinal da proteína fusionada a GFP nessa forma; a expressão em epimastigota, por ser em um contexto celular distinto do natural, pode impedir a localização nuclear da mesma. Além disso, é sabido que a fusão da proteína com uma etiqueta pode alterar a sua conformação e conseqüentemente a sua localização celular. É importante salientar que o modelo gênico clonado é uma versão mais curta, sem uma extremidade amino-terminal, a qual poderia ser um sinal de localização nuclear.

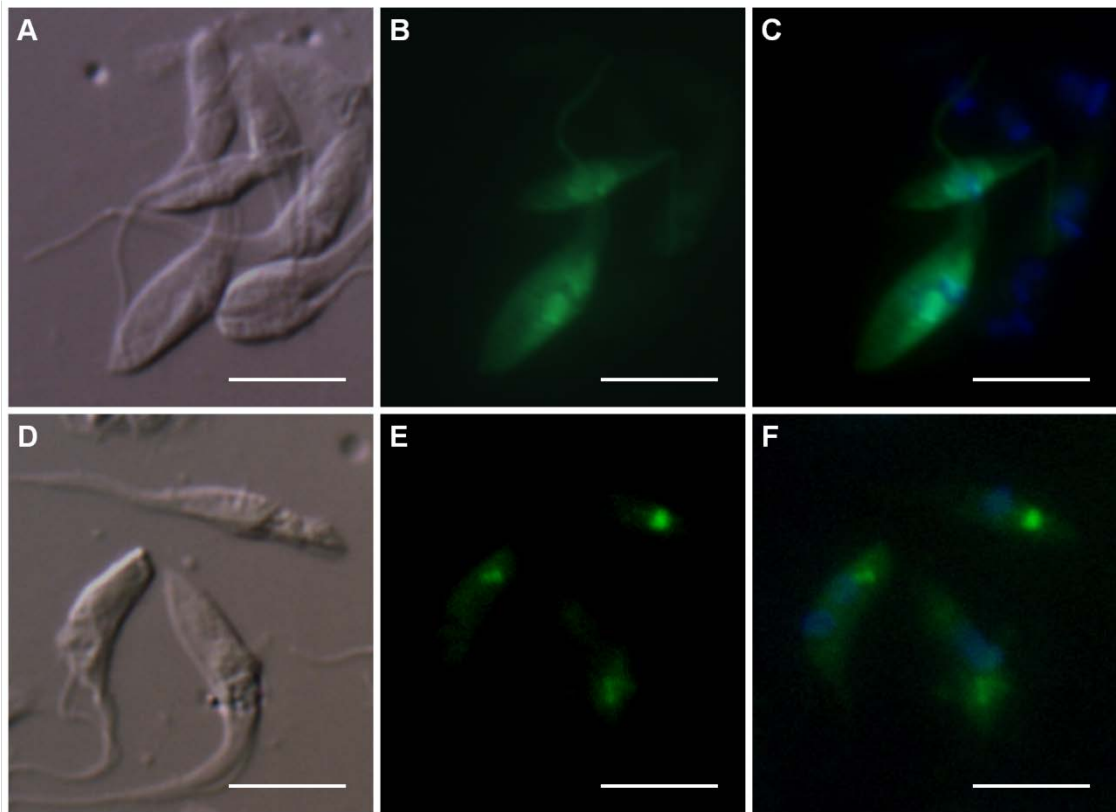


Figura 5.19: Micrografia da localização da proteína A03 fusionada a etiqueta fluorescente. Parasitas com a etiqueta florescente GFP fusionada na extremidade carboxila-terminal(A, B e C) e amino-terminal (D, E e F). A) e D) contraste de fase; B) e E) localização celular com o uso da etiqueta GFP (verde); C) e F) sobreposição da localização celular GFP com o marcador de fluorescência de núcleo e cinetoplasto, Hoeschst. Barra de escala: 10 μ m.

Foi realizado *western blot* para comprovar a fusão da proteína de estudo com a etiqueta GFP. Foi utilizado o soro anti-A03 e os extratos dos parasitas transfectantes com a etiqueta GFP na extremidade amino e carboxila, mas no entanto, não foram visualizadas bandas no *western blot*.

5.13.3 A04, TcCLB.507143.60, Proteína Hipotética.

O clone A04 corresponde ao grupo gênico SG1919 (modelos gênicos TcCLB.507143.60 e TcCLB.506319.40) e possui 1.451 pares de bases que codificam uma proteína hipotética de aproximadamente 53 kDa, não apresentando um domínio descrito no banco de dados de famílias proteicas PFAM.

Foi observada a existência de um ortólogo em *T. cruzi marinkellei* (Tc_MARK_1170), uma subespécie de *T. cruzi* associada a morcego, com um escore de similaridade de 89,5%. A Figura 5.20 mostra o padrão de similaridade entre A04 e Tc_MARK_1170.

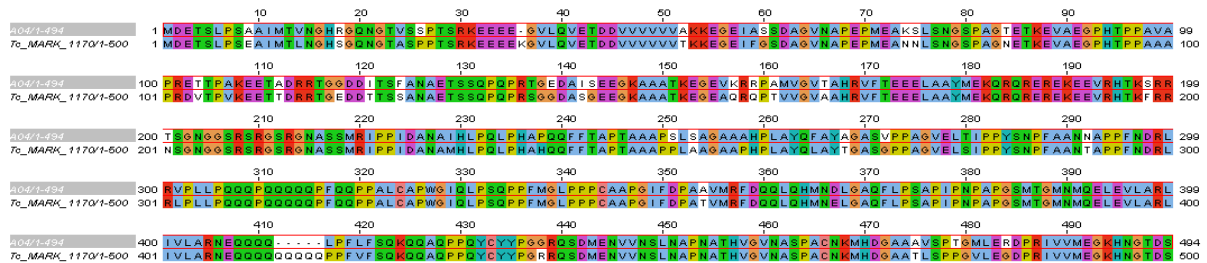


Figura 5.20: Análise de similaridade entre A04 e a proteína ortóloga em *T. cruzi marinkellei*
Em cinza, a esquerda, a identificação do gene A04. Na parte superior do alinhamento se encontra a numeração referente à posição dos aminoácidos.

O gene A04 foi amplificado e inserido nos vetores utilizados pela plataforma Gateway[®]. Foi obtido sucesso na expressão heteróloga da proteína na cepa bacteriana Tuner(DE3)pLysS, procedendo em seguida para a purificação e inoculação da mesma em camundongos. Após a obtenção dos soros, a qualidade dos mesmos foi analisada por *western blot* contra os extratos do ciclo de vida (Figura 5.21). Pela comparação com o gráfico obtido do RNAseq, é possível constatar que o nível de expressão da proteína corresponde ao nível de mRNA observado, apesar do fraco sinal obtido no *western blot*.

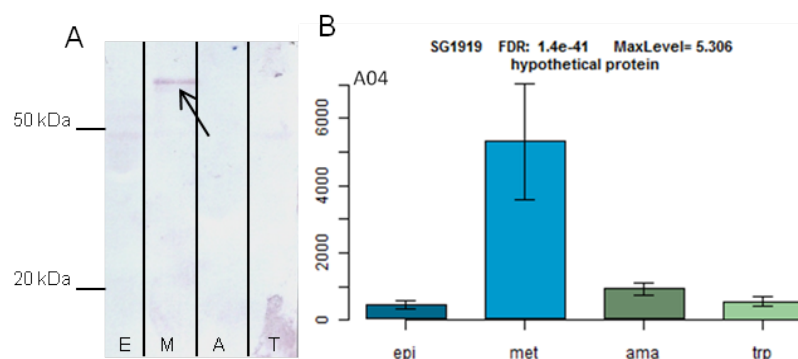


Figura 5.21: Western blot com o soro A04 contra os extratos proteicos do *T. cruzi*.
A) contra extratos das quatro formas celulares do parasita; B) padrão de expressão do gene TcCLB.507143.60 obtido pelos dados de RNAseq. E: forma epimastigota; M: forma tripomastigota metacíclico; A: forma amastigota; T: tripomastigota sanguíneo. Ao lado esquerdo de cada figura, duas bandas de referência do marcador de peso molecular.

Foi realizado o ensaio de *western blot* contra os diferentes pontos da metaciclogênese, no entanto, não foi possível visualizar o reconhecimento do anticorpo com a proteína. Esse procedimento será repetido.

É possível observar pela Figura 5.22 a imunolocalização da proteína A04, apresentando uma localização difusa pelo citoplasma celular, nas formas epimastigota e tripomastigota metacíclica. Além disso, na forma tripomastigota a proteína aparenta ter uma localização mais acentuada na metade proximal do flagelo do parasita.

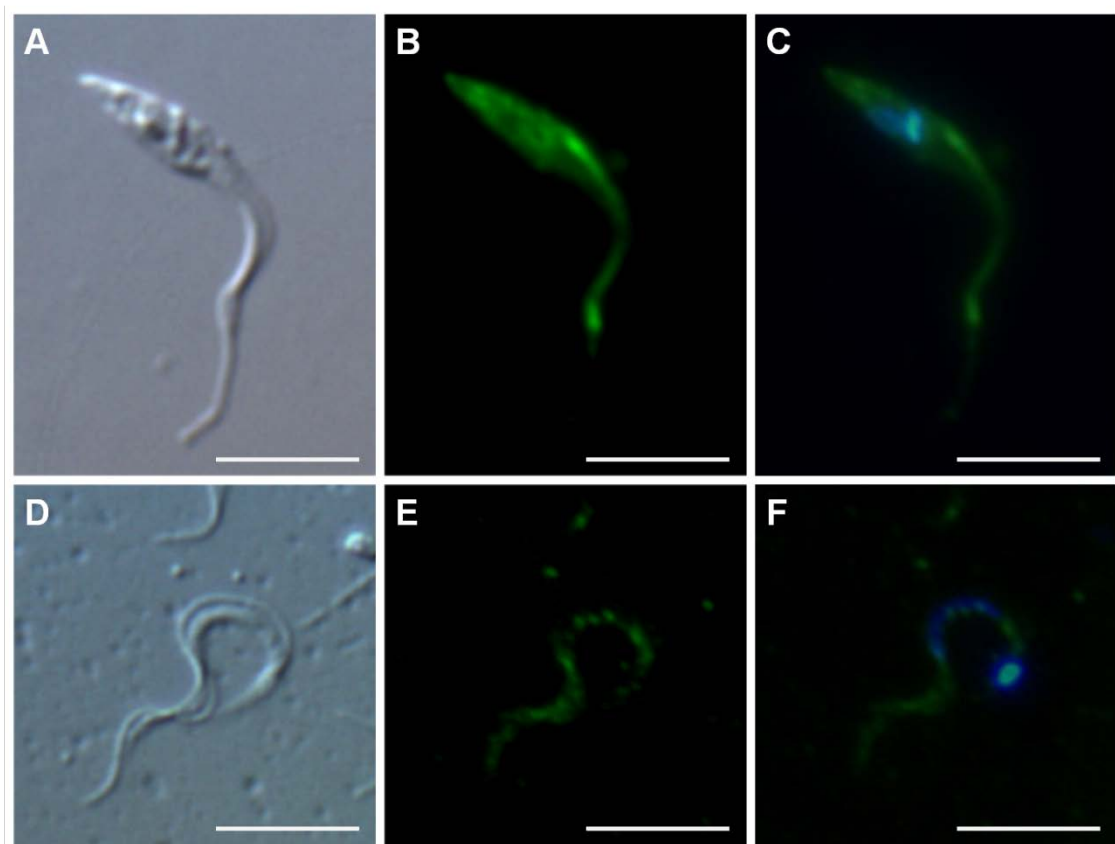


Figura 5.22: Imunolocalização celular da proteína A04.

A), B) e C) parasitas na forma epimastigota; D), E) e F) parasitas na forma tripomastigota metacíclica. A) e D) contraste de fase; B) e E) imunolocalização celular com soro contra a proteína A04; C) e F) sobreposição da imunolocalização com o marcador de fluorescência de núcleo e cinetoplasto, Hoeschst. Barra de escala: 10 μ m.

A proteína A04 foi expressa no próprio *T. cruzi* fusionada à etiqueta fluorescente GFP, utilizando o vetor pTcGFP. Foram utilizados vetores que fusionam a etiqueta fluorescente em ambas as extremidade da proteína. O padrão de fluorescência observado, apesar de fraco, foi difuso por todo o citoplasma das células, e possível de visualizar somente dos vetores com a etiqueta fluorescente na extremidade amino-terminal (Figura 5.23).

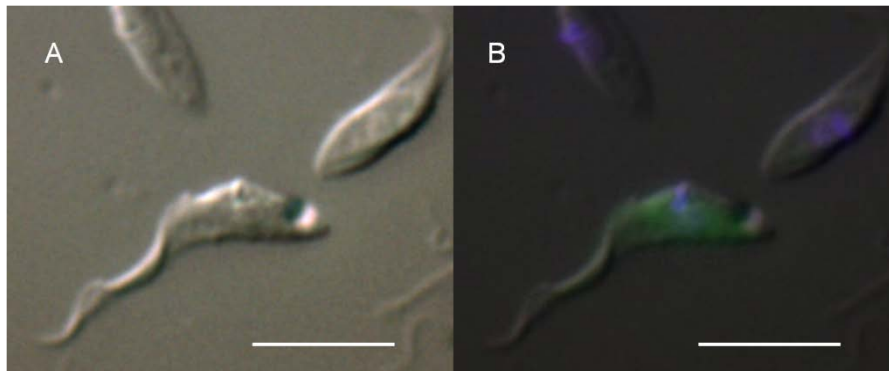


Figura 5.23: Micrografia da localização da proteína A04 fusionada à etiqueta fluorescente.
 A) contraste de fase; B) localização celular com o uso da etiqueta GFP (verde) fusionada à extremidade aminoterminal; em azul marcador de fluorescência Hoechst. Barra de escala: 10 µm.

O resultado do *western blot* de comprovação da fusão da proteína A04 com a etiqueta fluorescente pode ser visualizado na Figura 5.24. Seriam esperadas duas bandas no resultado do *western blot*: uma referente à proteína A04, perto de 50 kDa, e uma banda cerca de 30 kDa acima, referente a proteína A04 mais a etiqueta GFP. Apesar de apresentar bandas nas regiões esperadas, a presença de outras bandas inespecíficas impossibilita uma comprovação precisa.

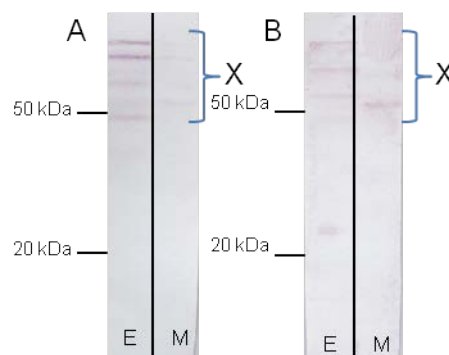


Figura 5.24: Comprovação da fusão da proteína A04 com a etiqueta GFP.
 A) Extrato protéico dos parasitas com a GFP na extremidade carboxila; B) extrato protéico dos parasitas com a GFP na extremidade amino. X marca a região esperada da ocorrência das bandas.

5.13.4 A05, TcCLB.506925.10, Proteína Hipotética.

O clone A05 corresponde ao grupo gênico SG7098 (modelo gênico TcCLB.506925.10) e possui 936 pares de bases, codificando uma proteína hipotética com cerca de 36 kDa, que possui um domínio da família das ciclinas em sua sequência.

Possui um ortólogo em *T. cruzi marinkellei* (Tc_MARK_6266), com um escore de similaridade de 90,0%. A Figura 5.25 mostra o padrão de similaridade entre A05 e Tc_MARK_6266.

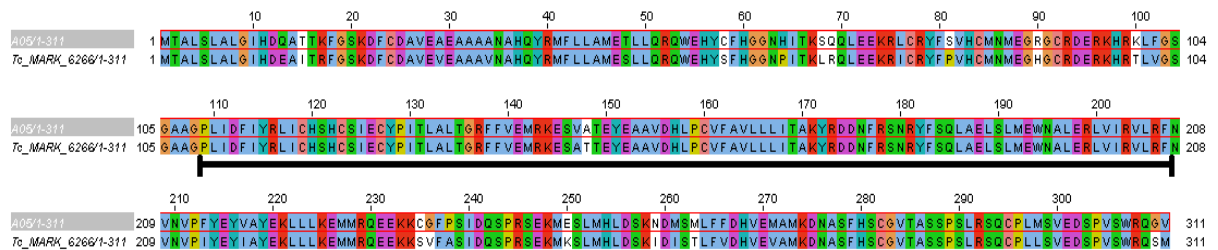


Figura 5.25: Análise de similaridade entre A05 e a proteína ortóloga em *T. cruzi marinkellei*. Em cinza, a esquerda, a identificação do gene A05. Em preto a região do domínio ciclina. Na parte superior do alinhamento se encontra a numeração referente à posição dos aminoácidos.

As ciclinas compreendem um grupo de proteínas eucarióticas que desempenham um papel ativo no controle dos ciclos de divisão celular e regulando um grupo de enzimas quinases dependentes de ciclina (CDKs). Existem dois grupos principais de ciclinas, as G_1/S ciclinas, essenciais no controle do início do ciclo celular, e as G_2/M ciclinas, essenciais no controle da mitose (GALDERISI *et al.*, 2003).

O gene A05 foi amplificado com sucesso e inserido nos vetores de entrada e destino utilizados pela plataforma Gateway[®]. Foi obtido sucesso na expressão heteróloga da proteína na cepa bacteriana Tuner(DE3)pLysS, procedendo em seguida para a purificação e inoculação da proteína em camundongos. Os soros obtidos contra a proteína A05 foram analisados por *western blot* contra extratos do ciclo de vida do *T. cruzi* (Figura 5.26). Apesar do baixo sinal obtido no *western blot*, é possível constatar que o nível de expressão da proteína corresponde ao nível de mRNA obtido pelo RNAseq.

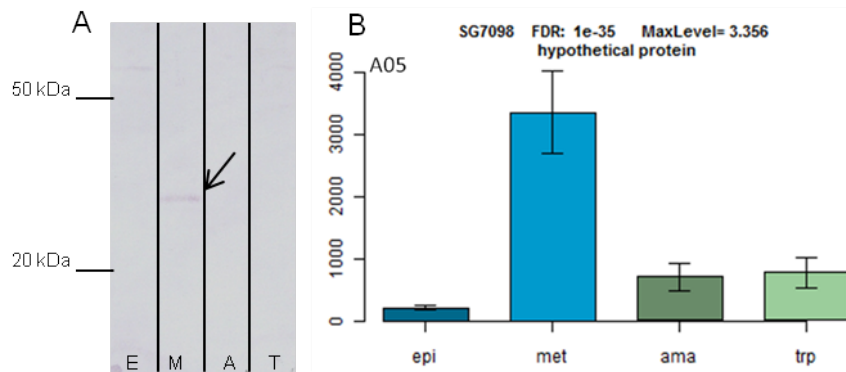


Figura 5.26: Western blot com o soro A05 contra os extratos proteicos do *T. cruzi*.
 A) contra extratos das quatro formas celulares do parasita; B) padrão de expressão do gene TcCLB.506925.10 obtido pelos dados de RNAseq. E: forma epimastigota; M: forma tripomastigota metacíclico; A: forma amastigota; T: tripomastigota sanguíneo. Ao lado esquerdo de cada figura, duas bandas de referência do marcador de peso molecular.

Apesar de também ter sido realizado o *western blot* contra os pontos da metaciclogênese, não foi possível visualizar o reconhecimento do anticorpo com a proteína.

Foi então realizada a imunolocalização da proteína A05, utilizando o soro usado no *western blot* do ciclo de vida (Figura 5.27). Nos parasitas na forma epimastigota foi observado um padrão de localização difuso pelo citoplasma celular, apresentando, assim como para a proteína A04, um sinal mais acentuado na porção proximal do flagelo. Não foi observada sinal de fluorescência na forma tripomastigota metacíclica.

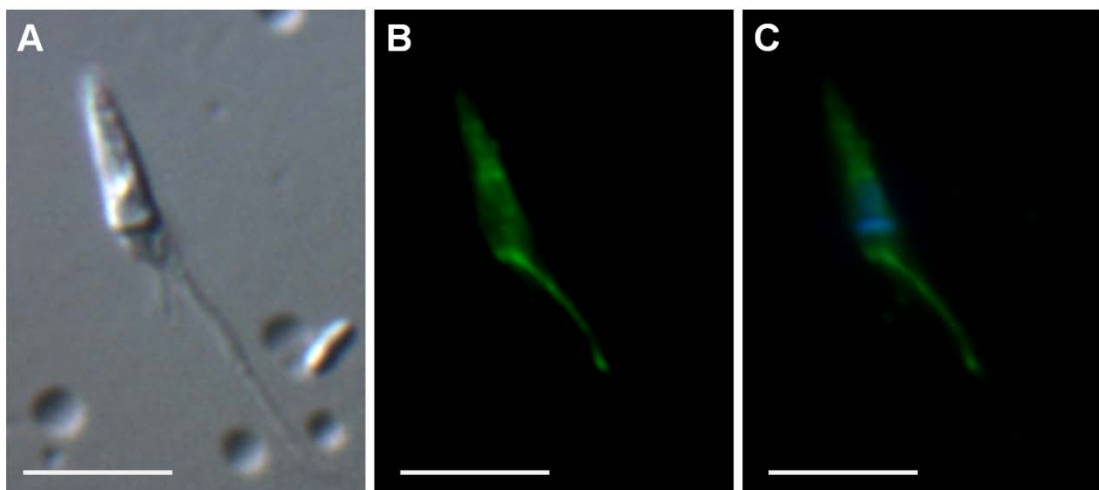


Figura 5.27: Imunolocalização da proteína A05.
 A) contraste de fase; B) imunolocalização celular com soro contra a proteína A05; C) sobreposição da imunolocalização com o marcador de fluorescência de núcleo e cinetoplasto, Hoeschst. Barra de escala: 10 μ m.

A proteína A05 foi expressa no próprio *T. cruzi* fusionada à etiqueta fluorescente GFP, utilizando o vetor pTcGFP. Foram utilizados os vetores que fusionam a etiqueta GFP em ambas as extremidades da proteína. No entanto, os parasitas transfectados com a etiqueta fluorescente na extremidade carboxila-terminal não sobreviveram às primeiras semanas após a transfecção. Nos parasitas transfectantes com a etiqueta GFP fusionada à extremidade amino-terminal não foi observada fluorescência, provavelmente devido a baixos sinal e estabilidade da etiqueta fluorescente.

5.13.5 A06, TcCLB.505789.20, Proteína Hipotética Conservada.

O clone A06 corresponde ao grupo gênico SG0222 (modelos gênicos TcCLB.505789.20, TcCLB.510065.10, TcCLB.505789.10, TcCLB.509441.10, TcCLB.510063.30 e TcCLB.510065.5) e possui 1.461 pares de bases e codifica uma proteína hipotética conservada de aproximadamente 53 kDa. Dois domínios foram identificados utilizando o banco de dados PFAM, um domínio *Prominin* com *e-value* de 0,14 e um domínio SUR7 com *e-value* de 0,61 Também foi identificada no proteoma da membrana do reservossomo da cepa Dm28c de *T. cruzi*, realizado por SANT'ANNA e colaboradores (2009), assim como na análise do proteoma de *T. cruzi* durante a metaciclogênese publicada por DE GODOY e colaboradores. (2012), com uma expressão diferenciada na forma tripomastigota metacíclica. Ela apresenta ortólogos em diversos outros tripanossomatídeos, e a Figura 15.28 apresenta o padrão de similaridade entre eles.

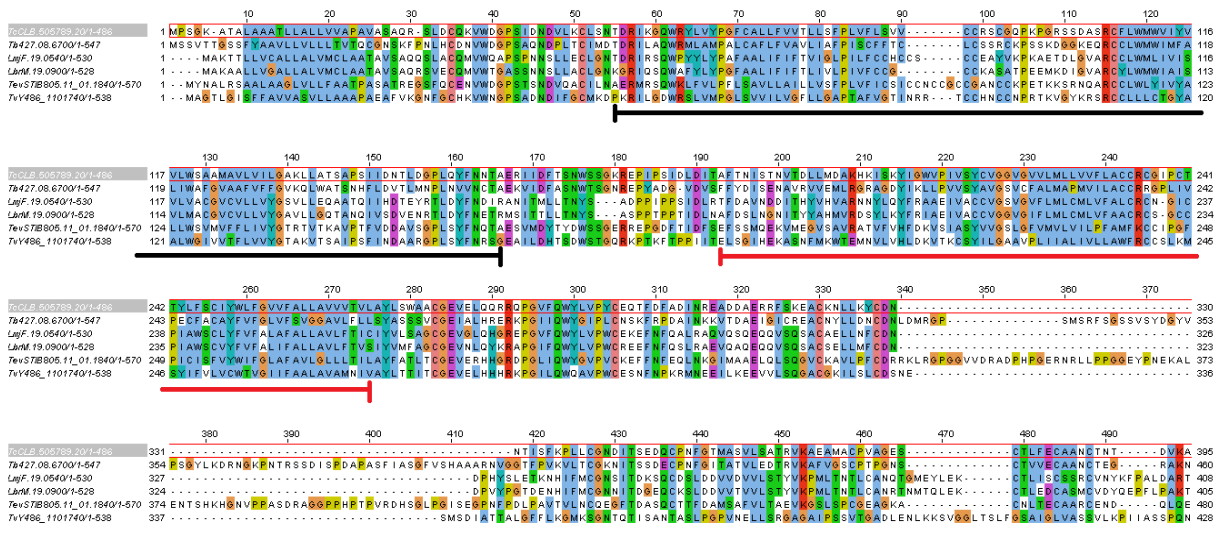


Figura 5.28: Análise de similaridade entre A06 e ortólogos em outros tripanossomatídeos. Em cinza, a esquerda, a identificação do gene A06. A barra preta inferior delimita a região do domínio *prominin* e a barra inferior vermelha a região do domínio SUR7. Na parte superior do alinhamento se encontra a numeração referente à posição dos aminoácidos.

Quando a sequência proteica é analisada considerando sua hidrofobicidade, é possível observar cerca de 5 agrupamentos de aminoácidos hidrofóbicos, o que possivelmente representa regiões transmembrana (Figura 5.29). Esse fato corrobora a identificação dessa proteína no proteoma da membrana de reservossomos.

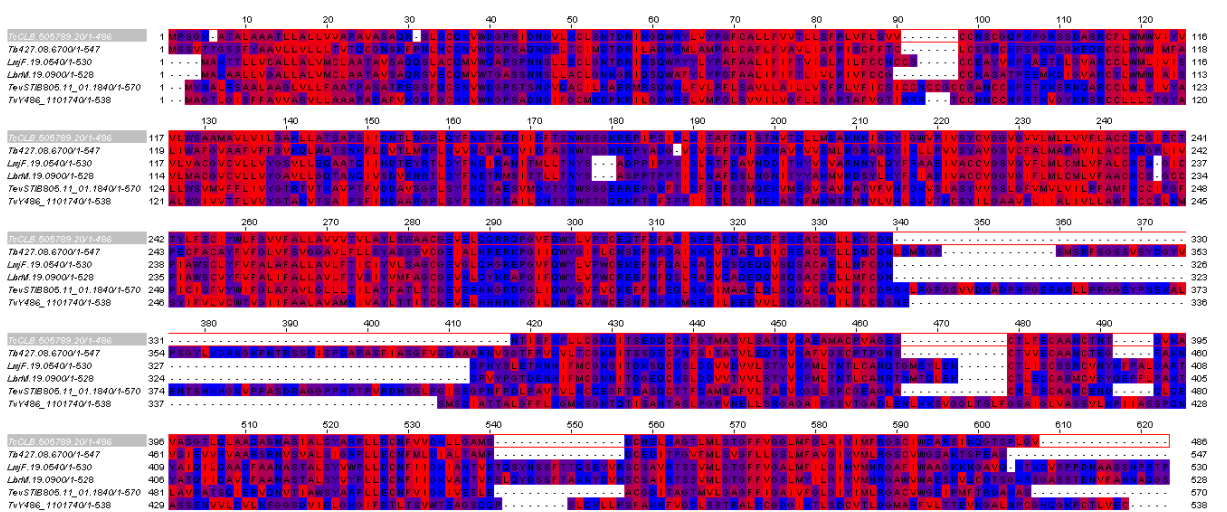


Figura 5.29: Análise da hidrofobicidade da proteína A06 e de seus ortólogos. Em cinza, a esquerda, a identificação do gene A06. Em vermelho os aminoácidos com características hidrofóbicas. Na parte superior do alinhamento se encontra a numeração referente à posição dos aminoácidos.

Prominin corresponde a uma família de proteínas de membrana conservada por todo o reino animal. Apresentam uma topologia de membrana contendo cerca de 5 regiões transmembrana e dois grandes loops extracelulares glicosilados. A nível molecular, interage com colesterol de membrana e é marcador de um novo tipo de *lipid-raft* baseado em colesterol. Acredita-se que proteínas da família *prominin* possuam um papel na geração de protrusões da membrana plasmática, assim como na composição e organização de lipídios de membrana e em interações membrana-membrana (CORBEIL *et al.*, 2001).

SUR7 é um domínio protéico específico de fungos, que age no processo de endocitose. Acredita-se que atue com uma proteína âncora eisossomos, que são complexos protéicos imóveis, que colocalizam com sítios de endocitose de proteínas e lipídios na membrana plasmática.

O gene que codifica a proteína A06 foi amplificado e inserido nos vetores de entrada e destino utilizados pela plataforma Gateway[®], mas não obteve-se sucesso na expressão heteróloga da proteína, mesmo utilizando diferentes cepas de *E. coli* para a expressão, possivelmente devido aos agrupamentos de aminoácidos hidrofóbicos encontrados ao longo da proteína. Futuramente, serão analisadas novas condições de expressão, visando otimizar a expressão desses proteínas com domínios hidrofóbicos. Até o momento, devido a atrasos na obtenção dos clones de entrada, gene A06 não foi inserido nos vetores pTcGFP, impossibilitando a realização dos ensaios de localização celular da proteína.

Devido ao grande número de cópias gênicas desse gene no genoma de *T. cruzi*, não é possível realizar ensaios de nocaute gênico.

A Figura 15.30 apresenta a similaridade entre as proteínas A06 e A07 (modelo gênico TcCLB.510065.10), ambas representantes do mesmo grupo gênico. Como é possível observar, a principal diferença entre elas se encontra na extremidade carboxila-terminal, que em A07 se estende 12 aminoácidos a mais do que em A06. Como dito anteriormente, não foi obtido sucesso na amplificação do clone A07.

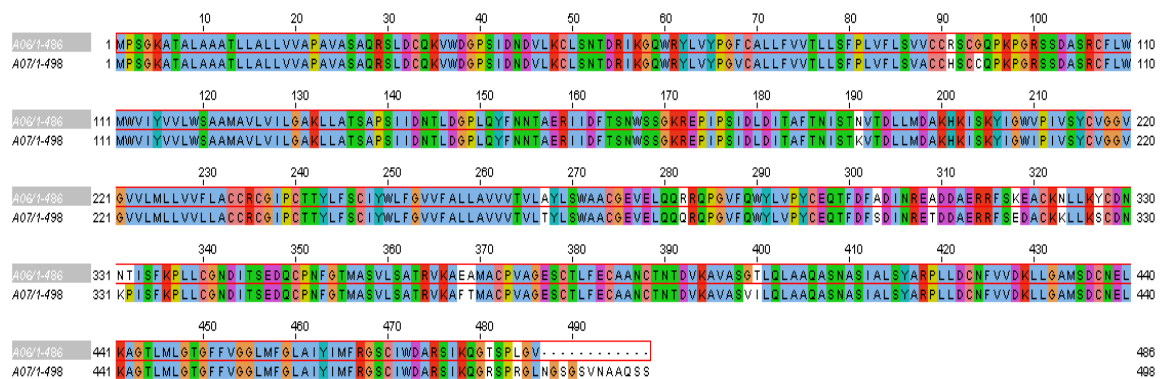


Figura 5.30: Análise de similaridade entre A06 e A07.

Em cinza, à esquerda, a identificação do gene A06. Na parte superior do alinhamento se encontra a numeração referente à posição dos aminoácidos.

5.13.6 A08, TcCLB.508863.10, Proteína Hipotética Conservada.

O clone A08 corresponde ao grupo gênico SG8686 (modelo gênico TcCLB.508863.10) que possui 564 pares de bases, codificando uma proteína de cerca de 20 kDa anotada como hipotética conservada, observada em diversos tripanossomatídeos. Foram encontradas duas regiões referentes a possíveis domínios para essa proteína no banco de dados de famílias proteicas PFAM: uma região de domínio DUF1152 (*Domain of Unknown Function*), com um valor de *e-value* de 2,6E+04, e uma região de domínio LSR (*Lipolysis-Stimulated Receptor*), com valor de 0,38. Essa proteína foi identificada na análise do proteoma do *T. cruzi* durante o processo de metaciclogênese realizado por DE GODOY e colaboradores (2012), com uma expressão diferenciada na forma tripomastigota metacíclica. A Figura 5.31 apresenta a similaridade entre A08 e seus ortólogos nos outros tripanossomatídeos, evidenciando a região dos dois domínios descritos.

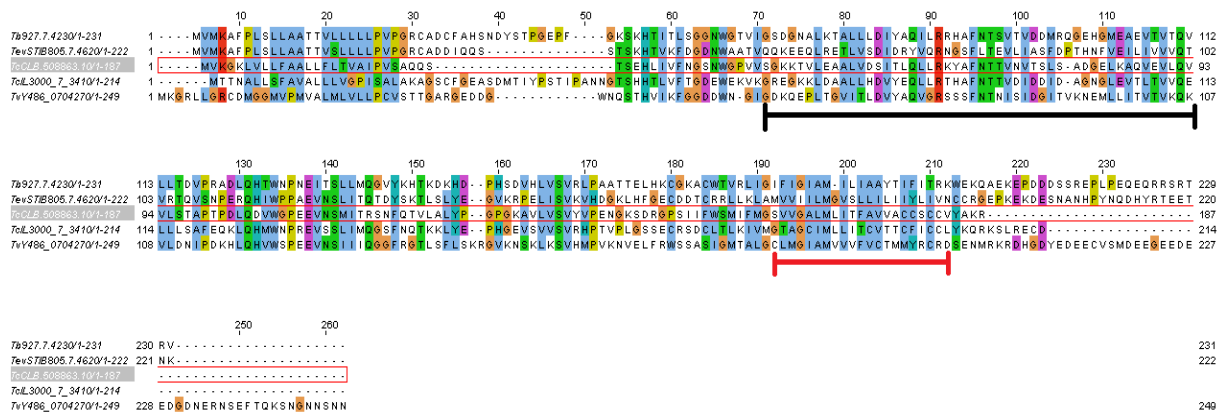


Figura 5.31: Análise de similaridade entre A08 e ortólogos em outros tripanossomatídeos.

Em cinza, à esquerda, a identificação do gene A08. A barra preta delimita a região do domínio DUF1152 e a barra vermelha o domínio LSR. Na parte superior do alinhamento se encontra a numeração referente à posição dos aminoácidos.

Levando em consideração a hidrofobicidade da sequência aminoacídica, é possível observar duas grandes regiões de concentração de aminoácidos hidrofóbicos (Figura 5.32). Isso pode sugerir uma localização transmembranar para a proteína A08, o que justificaria a impossibilidade de obtenção da proteína recombinante, visto que proteínas com regiões hidrofóbicas de membrana são de difícil obtenção em bactérias.

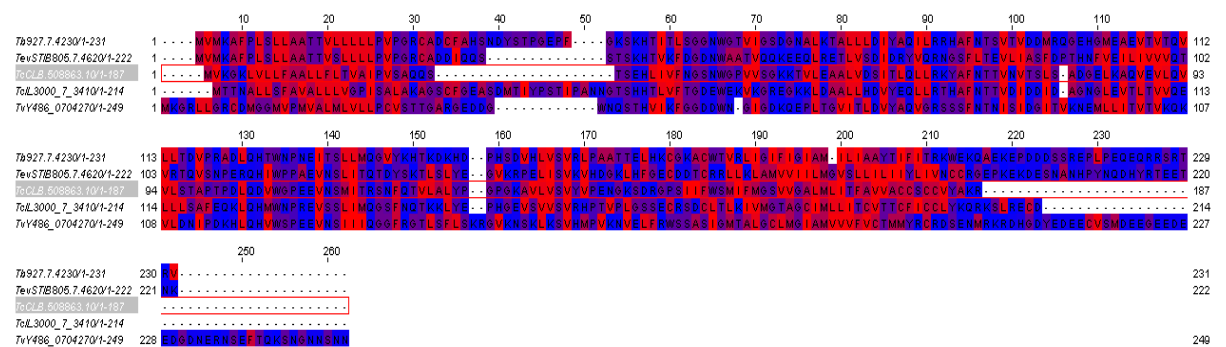


Figura 5.32 Análise da hidrofobicidade da proteína A08 e de seus ortólogos.

Em vermelho os aminoácidos com características hidrofóbicas. Na parte superior do alinhamento se encontra a numeração referente à posição dos aminoácidos.

O LSR (*Lipolysis-stimulated receptor*) é um receptor de lipoproteína encontrado no fígado que, na presença de ácidos graxos, reconhece apolipoproteínas (proteínas que interagem com lipídeos para formar lipoproteínas) B ou E e leva à internalização ou degradação de partículas de lipoproteínas. Ele apresenta maior afinidade por lipoproteínas ricas em triglicerídeos (BIHAIN & YEN, 1998).

O gene A08 foi amplificado e inserido nos vetores de entrada e destino utilizados pela plataforma Gateway[®]. No entanto, não foi obtido sucesso na expressão heteróloga da proteína com as cepas bacterianas utilizadas, e com isso não foram realizados os ensaios imunológicos.

O gene A08 foi inserido no vetor pTcGFP de expressão em *T. cruzi*. Para esse gene, foram utilizados vetores que fusionam a etiqueta fluorescente GFP em ambas as extremidade da proteína. Foi observado um padrão de fluorescência colocalizando com a marcação do cinetoplasto na proteína com a etiqueta fluorescente na extremidade amino, e uma localização difusa pelo citoplasma, na proteína com a etiqueta na extremidade carboxila-terminal (Figura 5.33).

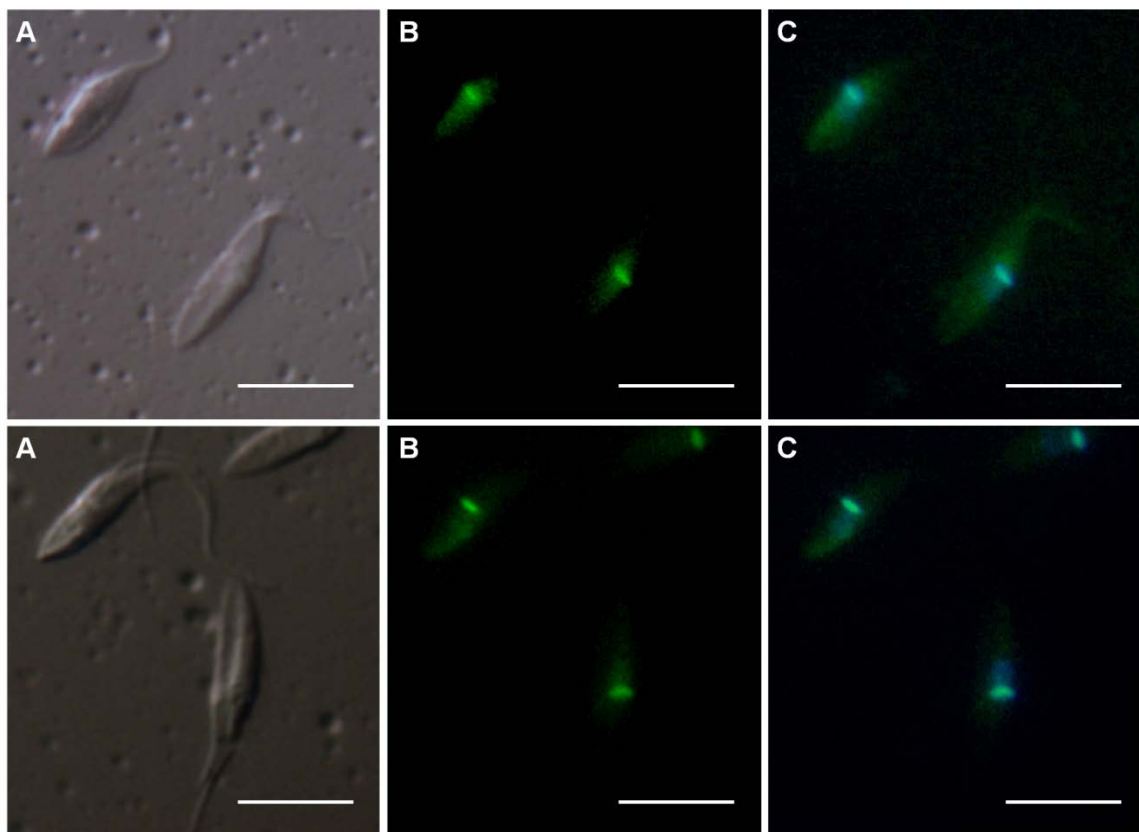


Figura 5.33: Micrografia da localização da proteína A08 fusionada a etiqueta fluorescente. Parasitas com a etiqueta florescente GFP fusionada na extremidade carboxila-terminal(A, B e C) e amino-terminal (D, E e F). A) e D) contraste de fase; B) e E) localização celular com o uso da etiqueta GFP (verde); C) e F) sobreposição da localização celular GFP com o marcador de fluorescência de núcleo e cinetoplasto, Hoeschst. Barra de escala: 10 μ m.

5.13.7 A09, TcCLB.508355.230, Proteína Hipotética.

O clone A09 corresponde ao grupo gênico SG8597 (modelo gênico TcCLB.508355.230) e possui 1.323 pares de bases e codifica uma proteína hipotética de aproximadamente 50 kDa. Ela apresenta ortólogo no tripanossomatídeo *T. cruzi marinkellei* (Tc_MARK_4186), com um escore de similaridade de 83,2%. A Figura 5.34 mostra o padrão de similaridade entre a proteína A09 e seu ortólogo Tc_MARK_4186.

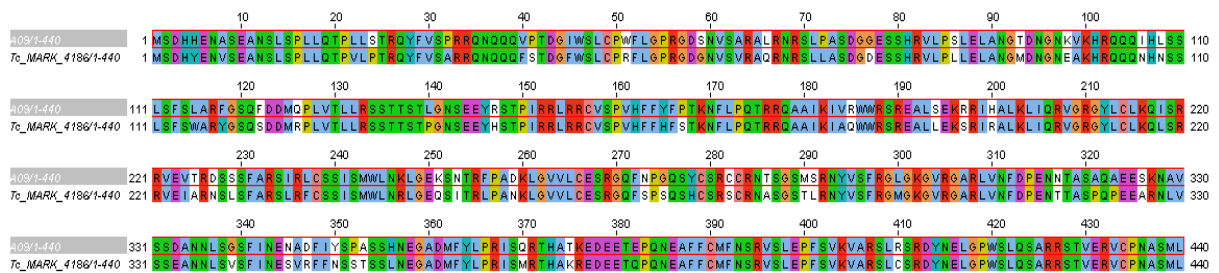


Figura 5.34: Análise de similaridade entre A09 e a proteína ortóloga em *T. cruzi marinkellei*. Em cinza, a esquerda, a identificação do gene A09. Na parte superior do alinhamento se encontra a numeração referente à posição dos aminoácidos.

O gene TcCLB.508355.230 foi amplificado e inserido nos vetores de entrada e destino utilizados pela plataforma Gateway[®]. Foi obtido sucesso na expressão heteróloga da proteína somente na cepa bacteriana Rosetta-gami 2, mas no entanto o rendimento da mesma foi muito baixo, o que impossibilitou sua inoculação nos camundongos. Tentou-se otimizar a expressão da proteína, modificando o volume de indução, mas o rendimento ainda continuou baixo, o que levou à descontinuidade dos experimentos com essa proteína.

O gene A09 foi com sucesso inserido no vetor pTcGFP de expressão em *T. cruzi*. Para esse gene, foram utilizados os vetores que fusionam a etiqueta fluorescente GFP em ambas as extremidade da proteína. No entanto, não foi possível observar nenhuma fluorescência nos parasitas transfectantes. Provavelmente isso se deva a um problema de baixo de sinal da própria proteína fluorescente.

O nocaute simples do gene TcCLB.508355.230 foi realizado. Após os parasitas terem sido selecionados, foi realizada uma curva de crescimento para analisar o efeito da deleção desse gene no crescimento da cultura de parasitas. A Figura 5.36 mostra o gráfico realizado com os dados obtidos da curva de crescimento realizada por um período de sete dias. Não

houve diferença significativa no crescimento dos parasitas nocaute em comparação com os parasitas selvagens.

5.13.8 A10, TcCLB.510355.230, Proteína Hipotética Conservada.

O clone A10 corresponde ao grupo gênico SG6132 (modelos gênicos TcCLB.510355.230 e TcCLB.506753.70) que tem 498 pares de bases e codifica uma proteína hipotética conservada de cerca de 19 kDa, que possui dois domínios identificados no banco de dados PFAM: um domínio RIIa (*Regulatory subunit of type II PKA R-subunit*), com um valor de confiabilidade de 2,4E+03, e um domínio EF-hand, com um valor de confiabilidade 7,3E+03. A Figura 5.35 mostra a similaridade entre a proteína A10 e ortólogos nos outros tripanossomatídeos, assim como a posição dos domínios identificados.

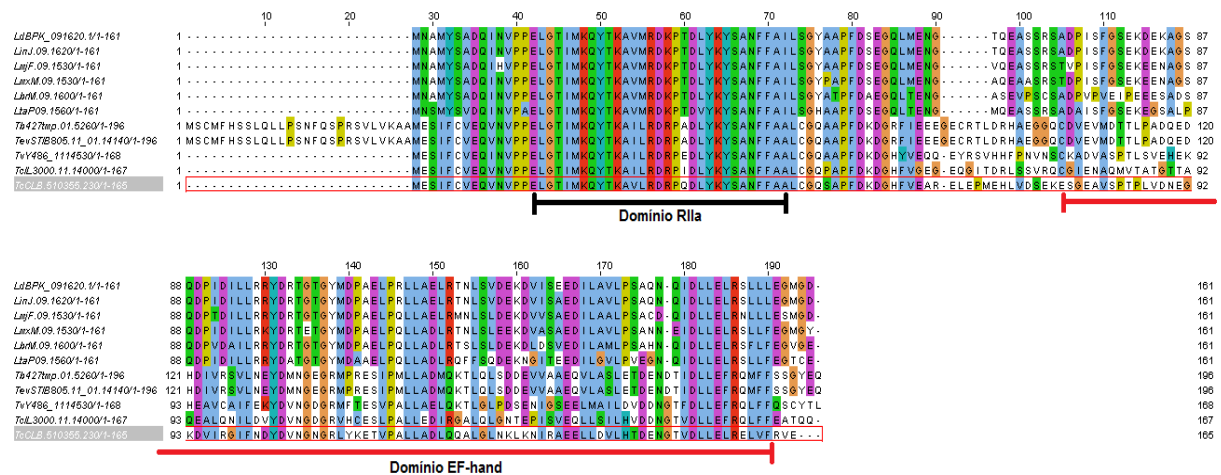


Figura 5.35: Análise de similaridade entre A10 e ortólogos em outros tripanossomatídeos.

Em cinza, a esquerda, a identificação do gene A10. A barra preta delimita a região do domínio RIIa e a barra vermelha o domínio EF-hand. Na parte superior do alinhamento se encontra a numeração referente à posição dos aminoácidos.

Em eucariotos, proteínas quinases cAMP-dependentes (PKAs) medeiam uma vasta variedade de respostas a estímulos externos. As PKAs são formadas por subunidades catalíticas (C) e regulatórias (R), que correspondem a produtos de genes distintos. Além de atuar como inibidor da subunidade C, a subunidade R ancora a holoenzima em um local específico no interior da célula, impedindo a entrada da subunidade C no núcleo. São

descritos dois tipos de subunidade R - I e II - cada um dividido em alfa e beta. É nessas subunidades que se encontram a interface de dimerização da enzima e o sítio de ligação para as proteínas de ancoramento da quinase A (AKAPs) (CANAVES, *et al.*, 2002).

O gene A10 foi amplificado e inserido nos vetores de entrada e destino utilizados pela plataforma Gateway[®]. Foi obtido sucesso na expressão heteróloga da proteína na cepa bacteriana Tuner(DE3)pLysS, procedendo em seguida para a purificação e inoculação nos camundongos.

Tendo obtido os soros contra a proteína A10, foram feitas análises por *western blot* para analisar a qualidade do mesmo. Esses ensaios foram realizados contra extratos de *T. cruzi* referentes às 4 formas celulares do parasita e a diversos pontos do processo de metaciclogênese (Figuras 5.36 e 5.37).

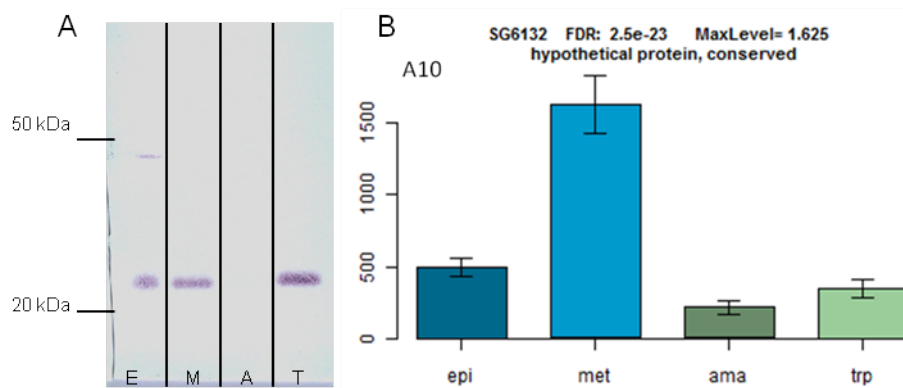


Figura 5.36: Western blot com o soro A10 contra os extratos proteicos do *T. cruzi*. A) contra extratos das quatro formas celulares do parasita; B) padrão de expressão do gene TcCLB.510355.230 obtido pelos dados de RNAseq. E: forma epimastigota; M: forma tripomastigota metacíclico; A: forma amastigota; T: tripomastigota sanguíneo. Ao lado esquerdo de cada figura, duas bandas de referência do marcador de peso molecular.

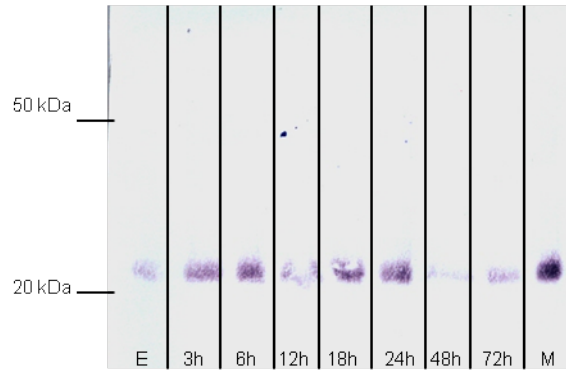


Figura 5.37: Western blot com o soro A10 contra os extratos proteicos da metaciclogênese. Contra extratos pontos da metaciclogênese. E: forma epimastigota; M: forma tripomastigota metacíclica; 3h, 6h, 12h, 18h, 24h, 48h, 72h: extratos proteicos de parasitas aderidos ao substrato após 3, 6, 12, 18, 24, 48 e 72 horas de indução com TAU3AAG, respectivamente. Ao lado esquerdo da figura, duas bandas de referência do marcador de peso molecular.

É possível comparar o resultado do *western blot* da Figura 5.36A com o gráfico obtido do RNAseq (Figura 5.36B). No gráfico em questão é possível observar que os parasitas na forma amastigota apresentam uma taxa menor de mRNA da proteína em questão, se comparado com as outras formas de celulares do parasita. No resultado do *western blot* é observada a ausência de expressão da proteína em amastigotas e uma maior expressão em tripomastigota sanguíneo, não muito condizente com o resultado de RNAseq. Provavelmente, essa alteração se deva a processos de regulação pós-transcricional observados no parasita, como degradação de mRNA ou da própria proteína. No *western blot* utilizando os extratos da metaciclogênese é observado um acentuado aumento no sinal na forma tripomastigota metacíclica, como esperado.

Com os soros obtidos foi realizada a imunolocalização da proteína A10, e foi observado um padrão de localização no flagelo do parasita (Figura 5.38), tanto nas formas epimastigota como nas formas tripomastigota metacíclica.

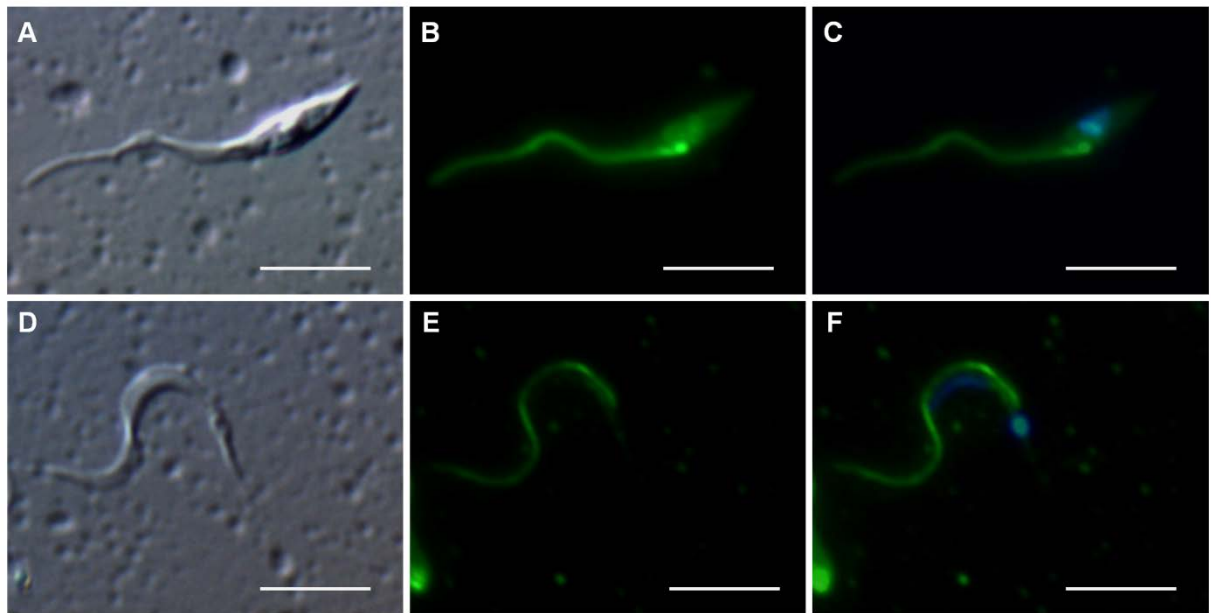


Figura 5.38: Imunolocalização da proteína A10.

A), B) e C) parasitas na forma epimastigota; D), E) e F) parasitas na forma tripomastigota metacíclica. A) e D) contraste de fase; B) e E) imunolocalização celular com soro contra a proteína A10; C) e F) sobreposição da imunolocalização com o marcador de fluorescência de núcleo e cinetoplasto, Hoeschst. Barra de escala: 10 μm .

Comparando o resultado do *western blot* com o observado nas imunolocalizações, é possível correlacionar a função da proteína A10 com a atividade do flagelo do parasita, visto que a única forma celular do parasita a qual o anticorpo anti-A10 não se ligou foi amastigota, a forma celular na qual o flagelo se encontra bastante reduzido. Talvez seja interessante no futuro realizar a imunolocalização da proteína A10 em parasitas na forma amastigota.

A proteína A10 também foi expressa no próprio *T. cruzi* fusionada à etiqueta fluorescente GFP. Foram utilizados os vetores que fusionam a etiqueta fluorescente em ambas as extremidades da proteína. Só foi possível a visualização de fluorescência quando a etiqueta GFP foi fusionada à extremidade amino-terminal da proteína, apresentando um padrão difuso pelo citoplasma celular, com uma intensidade maior de fluorescência em alguns pontos da região posterior do parasita (Figura 5.39).

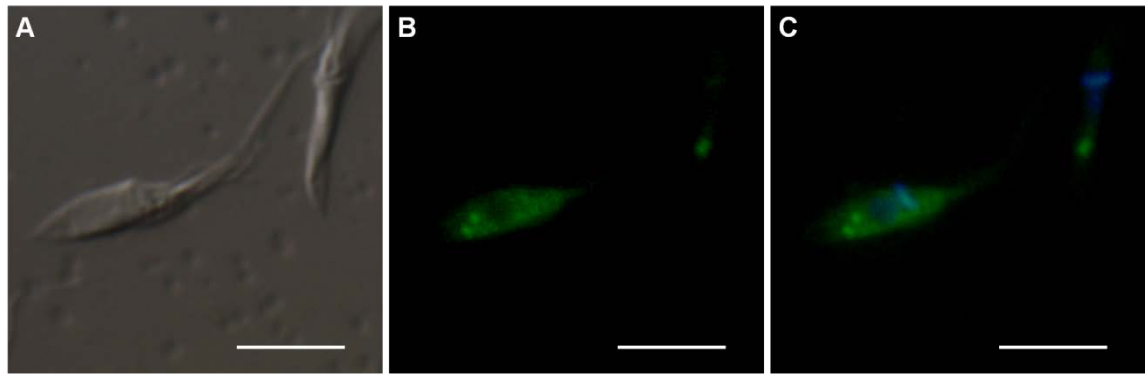


Figura 5.39: Micrografia da localização da proteína A10 fusionada a etiqueta fluorescente. Parasitas com a etiqueta florescente GFP fusionada na extremidade amino-terminal. A) contraste de fase; B) localização celular com o uso da etiqueta GFP (verde); C) sobreposição da localização celular GFP com o marcador de fluorescência de núcleo e cinetoplasto, Hoeschst. Barra de escala: 10 μ m.

Não foi observada uma correspondência entre as imunolocalizações e os ensaios de localização celular com a proteína A10 fusionada a uma etiqueta fluorescente. Uma possibilidade é que a adição de uma etiqueta fluorescente, com aproximadamente 240 aminoácidos, pode ter interferido com a correta localização da proteína, supondo que a imunolocalização esteja correta. O resultado do *western blot* apresentou as duas bandas esperadas: uma com cerca de 20 kDa, referente ao tamanho da proteína A10, e outra com aproximadamente 50 kDa, correspondendo a fusão de A10 com a etiqueta GFP (Figura 5.40).

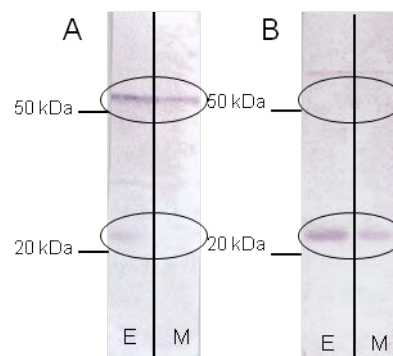


Figura 5.40: Comprovação da fusão da proteína A10 com a etiqueta GFP.

A) Extrato protéico dos parasitas com a GFP na extremidade carboxila; B) extrato protéico dos parasitas com a GFP na extremidade amino. Os círculos marcam as bandas esperadas: círculos inferiores, a proteína A10, e círculos superiores, a fusão A10 + GFP.

5.13.9 A11, TcCLB.506825.40, Proteína Hipotética Conservada.

O clone A11 corresponde ao grupo gênico SG3124 (modelos gênicos TcCLB.506825.40 e TcCLB.506681.40), possui 1.548 pares de bases, e codifica uma proteína hipotética conservada de aproximadamente 58 kDa, que apresenta no banco de dados PFAM uma região TPR-like (*Tetratrico-peptide repeat*), com um valor de confiabilidade baixo de 0,2. Essa proteína foi identificada no proteoma do ciclo de vida do *T. cruzi* de ATWOOD e colaboradores (2005), no fosfoproteoma do processo de metaciclogênese estudado por MARCHINI e colaboradores (2011), no proteoma do reservossomo da cepa Dm28c de SANT'ANNA e colaboradores (2009) e no proteoma do processo de metaciclogênese DE GODOY e colaboradores (2012), com uma expressão diferenciada na forma tripomastigota metacíclica. A Figura 5.41 mostra o padrão de similaridade entre a proteína A11 e ortólogos no outros tripanossomatídeos.

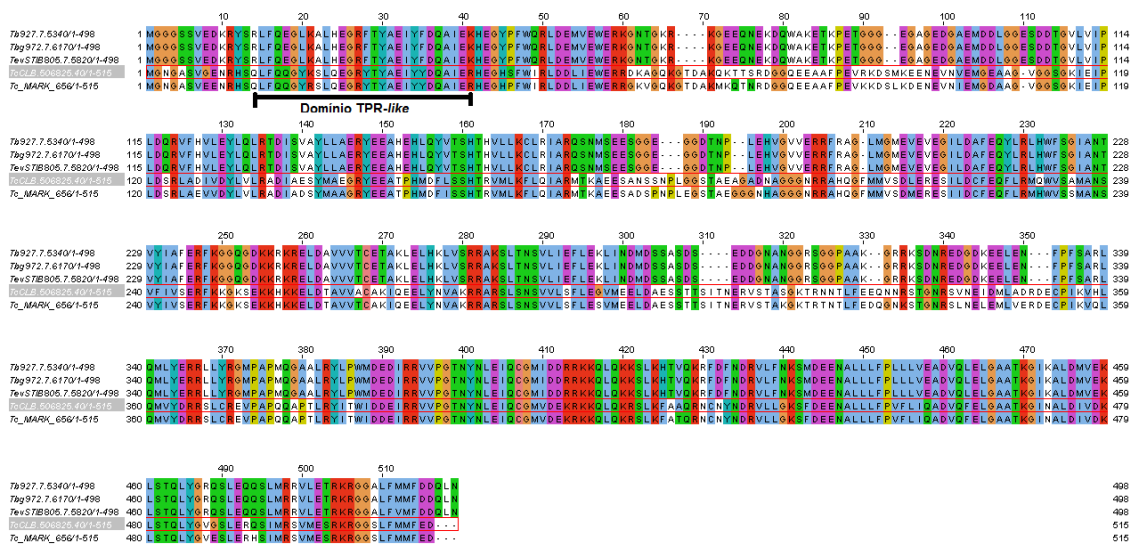


Figura 5.41: Análise de similaridade entre A11 e ortólogos em outros tripanossomatídeos. Em cinza, à esquerda, a identificação do gene A11. A barra preta delimita a região do domínio TPR 11. Na parte superior do alinhamento se encontra a numeração referente à posição dos aminoácidos.

A região repetitiva TPR é um motivo estrutural presente em uma grande variedade de proteínas, e medeia interações proteína-proteína e a associação de complexos multiproteína. É um motivo repetido de 34 aminoácidos, variando de 3 a 16 repetições em *tandem*. Proteínas que contêm regiões repetitivas TPR estão envolvidas em diversos processos em células eucarióticas, como a fusão de vesículas sinápticas e importação mitocondrial. Em bactérias foi

demonstrada sua importância em processos como associação de membrana externa e patogenicidade (CORTAJARENA & REGA, 2006; ZEYTUNI & ZARIVACH, 2012).

O gene A11 foi amplificado e inserido nos vetores de entrada e destino utilizados pela plataforma Gateway®. Foi obtido sucesso na expressão heteróloga da proteína na cepa de *E. coli* Tuner(DE3)pLysS, procedendo então para a purificação e inoculação da mesma em camundongos.

Após a obtenção dos soros contra a proteína A11, foram feitas análises por *western blot* para verificar sua qualidade e especificidade. Esses ensaios foram realizados contra extratos proteicos referentes às 4 formas celulares de *T. cruzi* e extratos proteicos de diversos pontos do processo de metaciclogênese (Figuras 5.42 e 5.43).

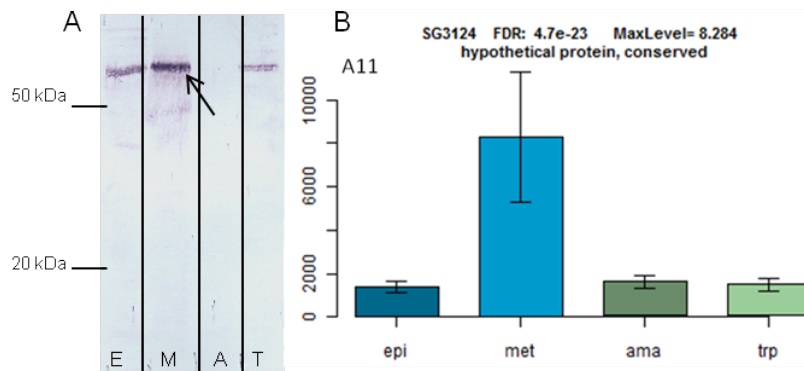


Figura 5.42: Western blot com o soro A11 contra os extratos proteicos do *T. cruzi*.
 A) contra extratos das quatro formas celulares do parasita; B) padrão de expressão do gene TcCLB.506825.40 obtido pelos dados de RNAseq. E: forma epimastigota; M: forma tripomastigota metacíclico; A: forma amastigota; T: tripomastigota sanguíneo. Ao lado esquerdo de cada figura, duas bandas de referência do marcador de peso molecular.

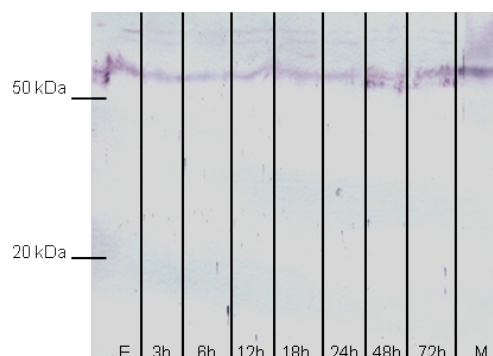


Figura 5.43. Western blot com o soro A11 contra os extratos proteicos da metaciclogênese.
 Contra extratos pontos da metaciclogênese. E: forma epimastigota; M: forma tripomastigota metacíclica; 3h, 6h, 12h, 18h, 24h, 48h, 72h: extratos proteicos de parasitas aderidos ao substrato após 3, 6, 12, 18, 24, 48 e 72 horas de indução com TAU3AAG, respectivamente. Ao lado esquerdo da figura, duas bandas de referência do marcador de peso molecular.

Na Figura 5.42A é possível observar a maior expressão da proteína na forma tripomastigota metacíclica, condizente com o observado no gráfico do sequenciamento mRNA (Figura 5.42B). Quando observado o *western blot* do soro anti-A11 contra extratos da metaciclogênese é possível observar um leve aumento de sinal nos extratos de 48 horas, 72 horas e nos tripomastigotas metacíclicos, como seria esperado.

Com os soros obtidos foi realizada a imunolocalização da proteína A11, que apresentou um padrão de localização difuso pelo citoplasma na forma celular epimastigota, e uma localização pontual nas formas tripomastigota metacíclicas, na região anterior do parasita (Figura 5.44).

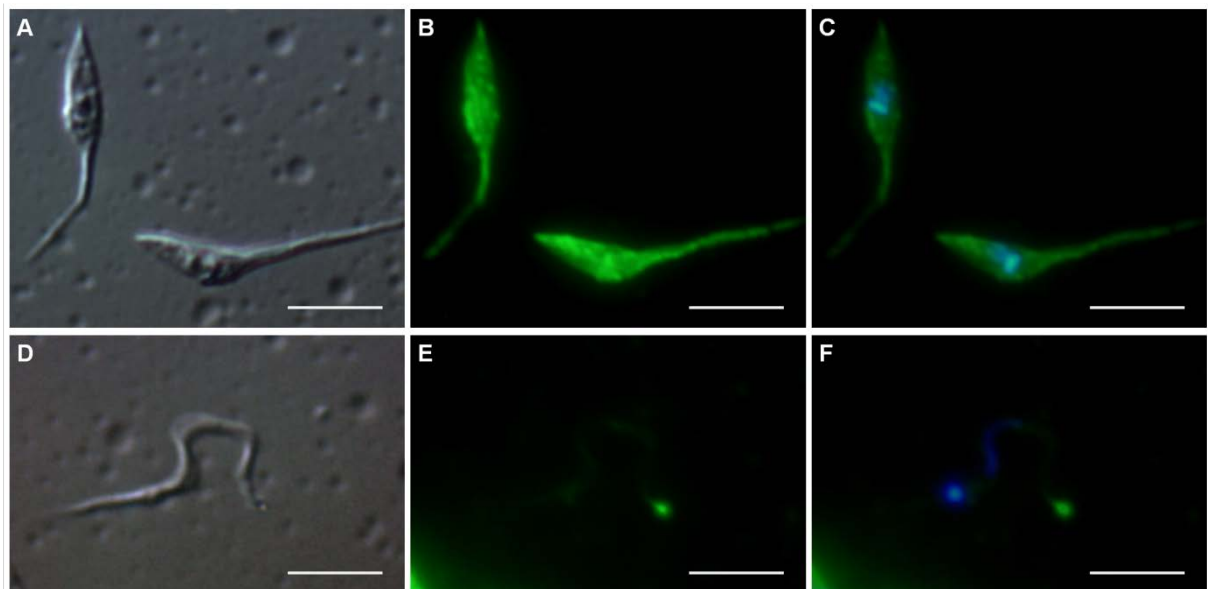


Figura 5.44. Imunolocalização da proteína A11.

A), B) e C) parasitas na forma epimastigota; D), E) e F) parasitas na forma tripomastigota metacíclica. A) e D) contraste de fase; B) e E) imunolocalização celular com soro contra a proteína A11; C) e F) sobreposição da imunolocalização com o marcador de fluorescência de núcleo e cinetoplasto, Hoeschst. Barra de escala: 10 μ m.

Além disso, o gene A11 foi inserido nos vetores pTcGFP de expressão em *T. cruzi*, que fusionam a etiqueta fluorescente GFP nas extremidades carboxila- e amino-terminal. Quando analisados os parasitas transfectantes nos quais a etiqueta fluorescente foi fusionada à extremidade carboxila-terminal da proteína, foi observada uma localização celular na região posterior do parasita, podendo corresponder à região de reservossomos. Quando se observou os parasitas nos quais a etiqueta fluorescente foi fusionada à extremidade amino-terminal da

proteína, foi evidenciado um padrão de fluorescência difuso por todo o citoplasma celular (Figura 5.45).

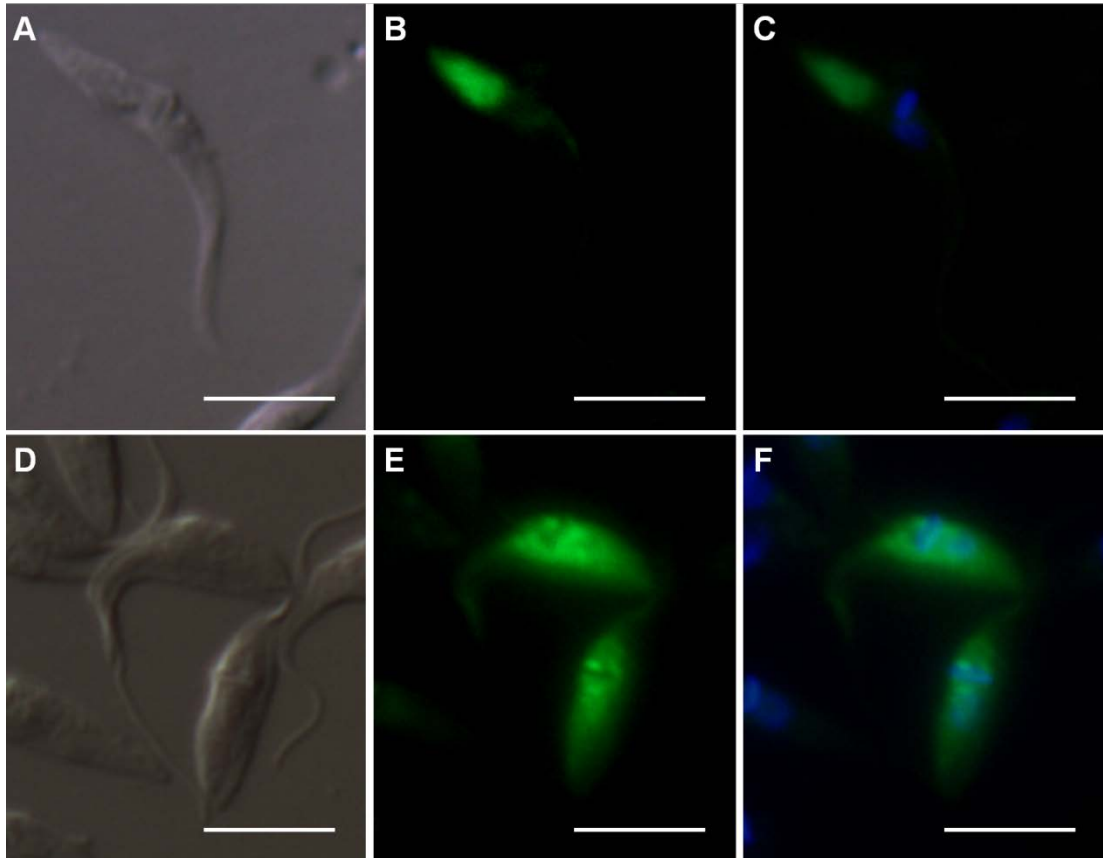


Figura 5.45: Micrografia da localização da proteína A11 fusionada à etiqueta fluorescente. A Parasitas com a etiqueta florescente GFP fusionada na extremidade carboxila-terminal (A, B e C) e amino-terminal (D, E e F). A) e D) contraste de fase; B) e E) localização celular com o uso da etiqueta GFP (verde); C) e F) sobreposição da localização celular GFP com o marcador de fluorescência de núcleo e cinetoplasto, Hoeschst. Barra de escala: 10 μ m.

Foi comprovada a fusão da proteína A10 com a etiqueta fluorescente GFP por *western blot*. A Figura 5.46 mostra a ocorrência das duas bandas esperadas, uma referente à proteína A11 e outra, cerca de 30 kDa acima, referente à fusão de A11 com a etiqueta GFP.

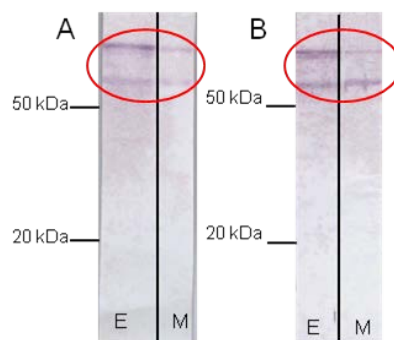


Figura 5.46: Comprovação da fusão da proteína A11 com a etiqueta GFP.

A) Extrato protéico dos parasitas com a GFP na extremidade carboxila; B) extrato protéico dos parasitas com a GFP na extremidade amino. Os círculos marcam as bandas esperadas.

5.13.10 A12, TcCLB.511577.120, Proteína Hipotética Conservada.

O clone A12 corresponde ao grupo gênico SG4253 (modelos gênicos TcCLB.511577.120 e TcCLB.509339.10) e possui 507 pares de bases que codificam uma proteína hipotética conservada de cerca de 19 kDa. Essa proteína foi identificada na análise do proteoma de *T. cruzi* durante a metaciclogênese publicada por DE GODOY e colaboradores (2012), apresentando uma expressão diferenciada na forma tripomastigota metacíclica. Utilizando o banco de dados PFAM não foram encontrados domínios referentes a essa proteína, que possui ortólogos em *T. brucei*, *T. brucei gambiense*, *T. congolense* e *T. evansi*. A Figura 5.47 mostra a similaridade entre a proteína A12 e seus ortólogos.

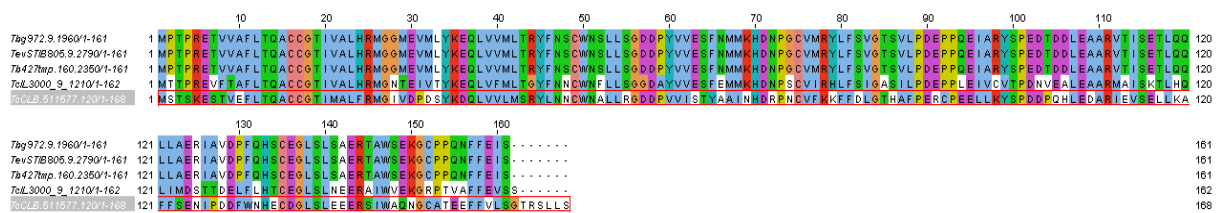


Figura 5.47: Análise de similaridade entre A12 e ortólogos em outros tripanossomatídeos.

Em cinza, a esquerda, a identificação do gene A12. Na parte superior do alinhamento se encontra a numeração referente à posição dos aminoácidos.

O gene TcCLB.511577.120 foi amplificado com sucesso e inserido nos vetores de entrada e destino utilizados pela plataforma Gateway®. A proteína A12 foi expressa heterologicamente na cepa de *E. coli* Tuner(DE3)pLysS, procedendo então para a purificação e inoculação da mesma em camundongos.

Após a obtenção dos soros contra a proteína A12, também foram feitas análises por *western blot* para verificar a qualidade e especificidade dos mesmos. Esses ensaios foram realizados contra extratos proteicos referentes às 4 formas celulares do *T. cruzi* e extratos proteicos de diversos pontos do processo de metaciclogênese (Figura 5.48 e 5.49).

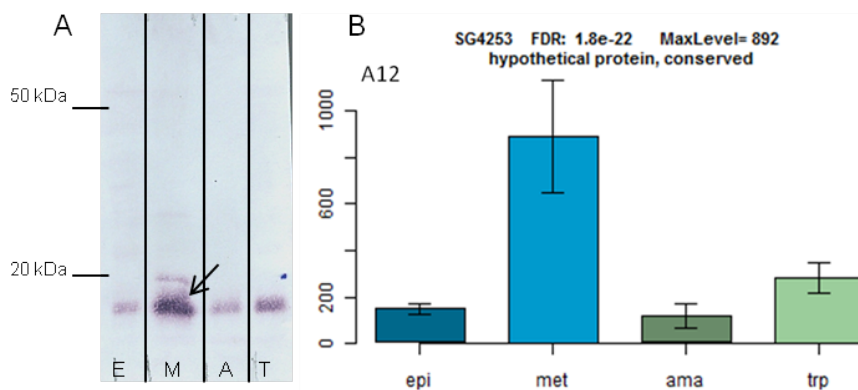


Figura 5.48: Western blot com o soro A12 contra os extratos proteicos do *T. cruzi*.
 A) contra extratos das quatro formas celulares do parasita, B) padrão de expressão do gene TcCLB.511577.120 obtido pelos dados de RNAseq. E: forma epimastigota; M: forma tripomastigota metacíclico; A: forma amastigota; T: tripomastigota sanguíneo. Ao lado esquerdo de cada figura, duas bandas de referência do marcador de peso molecular.

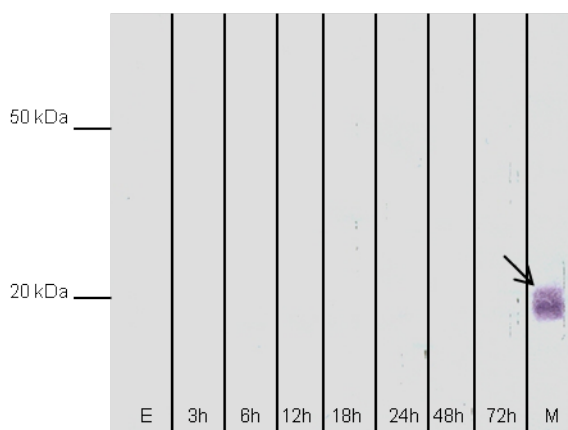


Figura 5.49: Western blot com o soro A12 contra os extratos proteicos da metaciclogênese.
 Contra extratos pontos da metaciclogênese. E: forma epimastigota; M: forma tripomastigota metacíclica; 3h, 6h, 12h, 18h, 24h, 48h, 72h: extratos proteicos de parasitas aderidos ao substrato após 3, 6, 12, 18, 24, 48 e 72 horas de indução com TAU3AAG, respectivamente. Ao lado esquerdo da figura, duas bandas de referência do marcador de peso molecular.

Na Figura 5.48 o resultado de *western blot* é condizente com o observado no gráfico de sequenciamento de mRNA, sendo que a maior expressão da proteína é observada em tripomastigota metacíclico, seguido de uma expressão mais fraca nas outras formas celulares do parasita. No *western blot* utilizando pontos da metaciclogênese como extrato proteico

(Figura 5.49), foi observado uma expressão específica em tripomastigota metacíclico, sem expressão em nenhum dos outros pontos do processo.

Tendo o soro contra a proteína A12 em mãos, procedeu-se para os ensaios de imunolocalização, utilizando parasitas na forma epimastigota e tripomastigota metacíclica (Figura 5.50). Nos parasitas na forma epimastigota foi observado um padrão de localização difuso/granular pelo citoplasma celular. Em compensação, não foi observada fluorescência nos tripomastigotas metacíclicos.

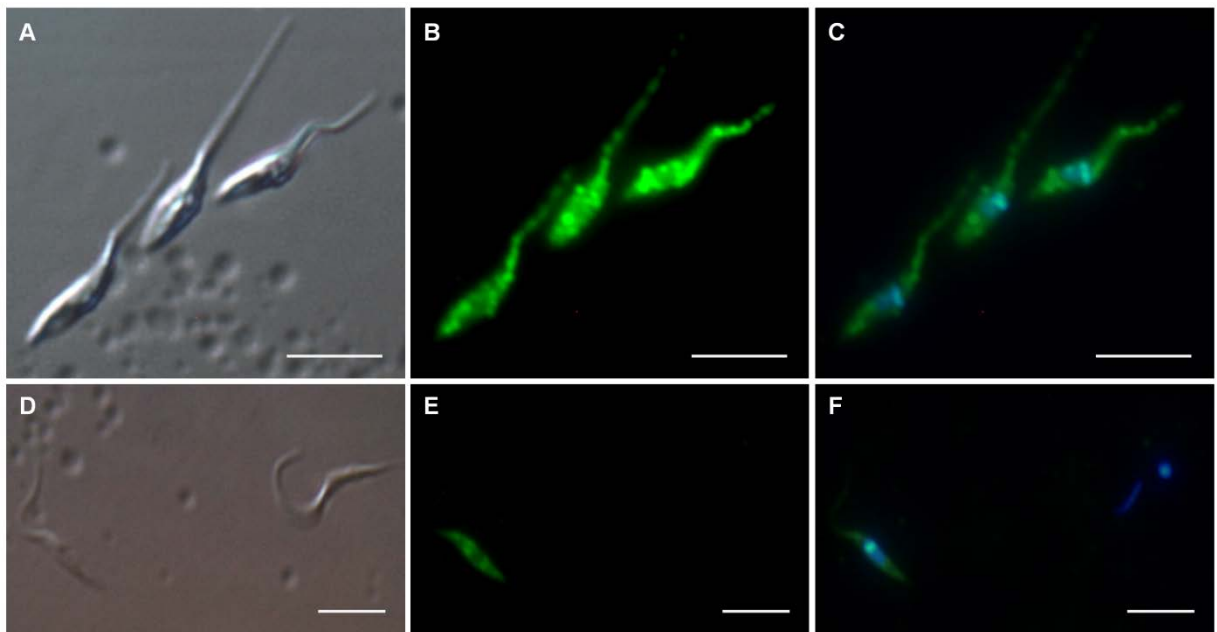


Figura 5.50: Imunolocalização celular da proteína A12.

A), B) e C) parasitas na forma epimastigota; D), E) e F) parasitas na forma tripomastigota metacíclica. A) e D) contraste de fase; B) e E) imunolocalização celular com soro contra a proteína A12; C) e F) sobreposição da imunolocalização com o marcador de fluorescência de núcleo e cinetoplasto, Hoeschst. Barra de escala: 10 μ m.

Além disso, o gene TcCLB.511577.120 foi inserido nos vetores pTcGFP de expressão em *T. cruzi*, que fusionam a etiqueta fluorescente GFP tanto na extremidade amino-terminal quanto na extremidade carboxila-terminal da proteína no parasita. No entanto, não foi possível observar nenhuma fluorescência nos parasitas transfectantes, provavelmente devido a um baixo de sinal da etiqueta fluorescente. O *western blot* realizado para comprovação da fusão da proteína A12 com a etiqueta GFP também apresentou um baixo sinal, não permitindo a distinção de bandas nas regiões esperadas (dados não mostrados).

6. CONCLUSÃO

Dando continuidade a diversos trabalhos de caracterização de proteínas realizados pelo Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP) e pelo Instituto Carlos Chagas (ICC-FIOCRUZ/PR) (PRETI, 2007, LEPREVOST, 2009, YAMAMOTO, 2009), o presente trabalho deu início à caracterização de 10 proteínas do *Trypanosoma cruzi*, que foram anotadas no sequenciamento do genoma do parasita como sendo "hipotéticas" ou "hipotéticas conservadas", cujos genes se mostraram diferencialmente expressos na forma celular tripomastigota metacíclica, dado esse obtido por análises de sequenciamento de RNA (RNAseq).

Dos 10 genes selecionados, todos foram clonados em vetores compatíveis com a plataforma Gateway[®]. Inicialmente esses genes foram inseridos no vetor de entrada pDONRTM221, e em seguida transferidos para os vetores de expressão pDESTTM17, para expressão heteróloga em bactéria, e pTcGFP, para a expressão da proteína em *T. cruzi* fusionada a uma etiqueta fluorescente, esse último desenvolvido por nosso grupo (BATISTA, 2008, BATISTA et al., 2010).

Desses dez genes, sete foram expressos em *E. coli*, sendo que desses, seis (60% do total) foram obtidos em quantidade adequada para inoculação em camundongos para obtenção de anticorpos policlonais. A qualidade dos soros obtidos foi analisada por ensaios de *western blot* utilizando extratos das quatro formas celulares de *T. cruzi*, assim como extratos de diversos pontos do processo de metaciclogênese. Os padrões de expressão observados nos ensaios de *western blot* condizem com os dados obtidos pelo sequenciamento de mRNA realizado pelo grupo. Apesar dos dados não se complementarem totalmente, o padrão de expressão mais elevado em tripomastigota metacíclicos foi observada em todos os resultados de *western blot*.

Com os soros, foram realizadas imunolocalizações para analisar a posição das proteínas no parasita. Dos seis soros obtidos, três apresentaram um padrão de localização difuso por todo o citoplasma dos epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos. A proteína A03 apresentou um padrão de localização nuclear em ambas as formas celulares observadas. A proteína A10 apresentou um padrão de localização flagelar bastante intenso nas duas

formas, e A11 apresentou um padrão difuso pelo citoplasma em epimastigotas e uma localização pontual anterior em tripomastigotas metacíclicos.

Apesar de terem sido realizados ensaios de localização celular com a proteína fusionada a etiqueta fluorescente GFP, não foi possível correlacionar esses dados com os dados de localização observados nas imunolocalizações. Provavelmente, o grande tamanho da etiqueta fluorescente influenciou no posicionamento da proteína no interior das células. Além disso, não foi obtido sinal na forma tripomastigota metacíclica, o que inviabilizou a utilização da etiqueta fluorescente para a realização de localização celular.

Apesar da metodologia de nocaute por PCR de fusão estar sendo utilizada e ter dado resultados satisfatórios, a grande dificuldade na obtenção dos cassetes de nocaute torna a tarefa bastante trabalhosa, consumindo bastante tempo. É necessário otimizar ainda mais as condições utilizadas na metodologia de PCR de fusão para a obtenção dos cassetes de nocaute. Os resultados obtidos até o momento ainda são incipientes e será necessário um período adicional para a realização das análises e obtenção de resultados conclusivos.

A finalidade desse trabalho foi trazer um pouco mais de luz sobre esse grupo de proteínas de função desconhecida, visando auxiliar futuros trabalhos que venham a estudar o *Trypanosoma cruzi* de forma mais global.

No início do trabalho foram estabelecidas metas e taxas de sucesso para cada um dos objetivos específicos aos quais nos propúnhamos a realizar. Esses objetivos e suas respectivas taxas de sucesso estão listadas abaixo:

Tabela 6.1: Metas propostas e taxa de sucesso.

Objetivos propostos	Taxa de Sucesso
Clonagem dos genes (Gateway [®])	100%
Expressão das proteínas	80%
Imunização e obtenção de anticorpos	50%
Imunolocalização	50%
Imunoprecipitação e interação proteína-proteína	30%
Localização celular das proteínas fusionadas GFP	70%
Nocaute dos genes selecionados	50%
RNA-seq dos nocautes	30%

Um resumo dos resultados obtidos pode ser visualizado na Tabela 6.2. Na tabela, em verde estão representadas as etapas que foram realizadas com sucesso. Em amarelo as etapas que ainda estão em andamento e em vermelho as etapas que foram realizadas mas que não deram resultado. Os espaços com um X representam etapas que não puderam ser realizadas devido a ausência de resultado em etapas anteriores.

Tabela 6.2: Tabela resumida das etapas realizadas.

ID do gene		A01	A03	A04	A05	A06	A08	A09	A10	A11	A12
Amplificação		Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
Clonagem		Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
Expressão da proteína		Vermelho	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Vermelho	Amarelo	Verde	Verde	Verde
Obtenção de anticorpos		X	Verde	Verde	Verde	X	X	X	Verde	Verde	Verde
Imunolocalização		X	Verde	Verde	Verde	X	X	X	Verde	Verde	Verde
Localização celular (GFP)		Verde	Verde	Amarelo	Amarelo	X	Verde	Amarelo	Verde	Verde	Amarelo
Nocaute gênico	Cassetes de nocaute	Verde	Verde	Verde	Verde	X	Verde	Verde	Amarelo	Verde	Verde
	Transfecção	Verde	Verde	Verde	Verde	X	Verde	Verde	X	Verde	Verde
	Seleção	Verde	Amarelo	Amarelo	Amarelo	X	Amarelo	Verde	X	Amarelo	Amarelo
	Análise	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	X	Amarelo	Amarelo	X	Amarelo	Amarelo

Comparando a Tabela 6.1 com as metas propostas no início do trabalho, e que estão listadas abaixo, podemos observar que a maioria das etapas propostas foram realizadas com a taxa de sucesso esperado.

Apesar da taxa de sucesso de algumas etapas não ter sido alcançada até o momento, elas ainda estão sendo realizadas, e espera-se em um futuro próximo completar a tabela com os dados que serão obtidos, o que irá culminar na elaboração de artigos científicos descrevendo as características obtidas e analisadas durante o trabalho.

7. PERSPECTIVAS

Como próximos passos pretende-se concluir os ensaios de nocaute gênico, realizando o nocaute duplo em todos os parasitas que já foram transfectados com um cassete de nocaute. Diferentes ensaios para comprovação e análise dos nocautes serão realizados assim que esses parasitas forem selecionados:

- A comprovação dos nocautes será feita por PCR;
- Serão realizadas curvas de crescimento para analisar a taxa de crescimento dos parasitas nocauteados;
- Serão feitas análises de microscopia para analisar a morfologia desses parasitas transfectantes;
- Pretende-se realizar o sequenciamento de mRNA (RNAseq) desses nocautes, para analisar qual o efeito das deleções desses genes no transcriptoma do parasita.

Além das análises de nocaute gênico, que já foram iniciadas, pretende-se realizar ensaios de co-immunoprecipitação, utilizando os anticorpos específicos obtidos, para descobrir se as proteínas de estudo são encontradas em complexos proteicos, e também para auxiliar na inferência de localização celular dessas proteínas.

Após o término dos experimentos laboratoriais, os resultados obtidos serão utilizados para a elaboração de artigos sobre a caracterização das proteínas estudadas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATWOOD, J. A. 3rd; WEATHERLY, D. B.; MINNING, T. A.; BUNDY, B.; CAVOLA, C.; OPPERDOES, F. R.; ORLANDO, R.; TARLETON, R. L. *The Trypanosoma cruzi* proteome. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 473-476, 2005.
- ÁVILA, A. R.; DALLAGIOVANNA, B.; YAMADA-OGATTA, S. F.; MONTEIRO-GÓES, V.; FRAGOSO, S. P.; KRIEGER, M. A.; GOLDENBERG, S. Stage-specific gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 159-168, 2003.
- BATISTA, M. Construção de vetores para caracterização de genes de *Trypanosoma cruzi* em um sistema para clonagem em alta demanda. **Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná**, 2008.
- BATISTA, M.; MARCHINI, F. K.; CELEDON, P. A. F.; FRAGOSO, S. P.; PROBST, C. M.; PRETI, H.; OZAKI, L. S.; BUCK, G. A.; GOLDENBERG, S.; KRIEGAR, M. A. A high-throughput cloning system for reverse genetics in *Trypanosoma cruzi*. **BMC Microbiology**, v. 10:259, 2010.
- BENCHIMOL-BARBOSA, P. R. The oral transmission of Chagas' disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks. **International journal of cardiology**, v. 112, n. 1, p. 132-3, 2006.
- BENNE, R. RNA editing in trypanosomes. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 221, n. 1, p. 9-23, 1994.
- BERN, C.; MARTIN, D. L.; GILMAN, R. H. Acute and Congenital Chagas Disease. **Advances in Parasitology**, v. 75, p. 19-47, 2011.
- BIHAIN, B. E.; YEN, F. T. The lipolysis stimulated receptor: a gene at last. **Current Opinion in Lipidology**, v. 9, n. 3, p. 221-224, 1998

- BONALDO, M. C.; SOUTO-PADRON, T.; SOUZA, W. de; GOLDENBERG, S. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. **The Journal of Cell Biology**, v. 106, n. 4, p. 1349-58, 1988.
- BONALDO, M. C.; D'ESCOFFIER, L. N.; SALLES, J. M.; GOLDENBERG, S. Characterization and expression of proteases during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Experimental Parasitology**, v. 73, n. 1, p. 44-51, 1991.
- CANAVES, J. M.; TAYLOR, S. S. Classification and phylogenetic analysis of the cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit family. **Journal of Molecular Evolution**, v. 54, p. 17-29, 2002.
- CARVALHO, T. U.; SOUZA, W. Infectivity of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 28, n. 4, p. 205-12, 1986.
- CAVALIER-SMITH, T. Kingdom protozoa and its 18 phyla. **Microbiological reviews**, v. 57, n. 4, p. 953-94, 1993.
- CAVALIER-SMITH, T. Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. **Biology letters**, v. 6, n. 3, p. 342-5, 2009.
- CHAGAS, C. Nova tripanossomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.gen., n.sp., agente etiológico da nova entidade mórbida do homem. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.1, p. 159-218, 1909.
- CONTRERAS, V. T.; MOREL, C. M.; GOLDENBERG, S. Stage specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 14, n. 1, p. 83-96, 1985a.
- CONTRERAS, V. T.; SALLES, J. M.; THOMAS, N.; MOREL, C. M.; GOLDENBERG, S. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 16, n. 3, p. 315-27, 1985b.
- CONTRERAS V. T., ARAÚJO-JORGE T.C., BONALDO M.C., THOMAZ N., BARBOSA H. S., MEIRELLES M. N. S. L., GOLDENBERG S. Biological aspects of the DM 28c

- clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, p. 123-133, 1988.
- CORBEIL, D.; RÖPER, K.; FARGEAS, C. A.; JOESTER, A.; HUTTNER, W. B. Prominin: A story of cholesterol, plasma membrane protrusions and human pathology. **Traffic**, v. 2, p. 82-91, 2001.
- CORTAJARENA, A. L.; REGAN, L. Ligand binding by TPR domains. **Protein Science**, v. 15, p. 1193-1198, 2006.
- COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 113-22, 2007.
- DE GODOY, L. M. F.; MARCHINI, F. K.; PAVONI, D. P.; RAMPAZZO, R. C. P.; PROBST, C. M.; GOLDENBERG, S.; KRIEGER, M. A. Quantitative proteomics of *Trypanosoma cruzi* during metacyclogenesis. **Proteomics**, v. 12, n. 17, p. 2694-703, 2012.
- DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. J. Acidocalcisomes. **Cell Calcium**, v. 50, n. 2, p. 113-9, 2011.
- EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BARTHOLOMEU, D. C. *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi* etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 409-415, 2005a.
- EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BLANDIN, G. *et al.* Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 404-409, 2005b.
- ELIAS, M. C. Q. B.; FARIA, M.; MORTARA, R. A.; MOTTA, M. C. M.; de SOUZA, W.; THIRY, M.; SCHENKMAN, S. Chromosome localization changes in the *Trypanosoma cruzi* nucleus. **Eukaryotic Cell**, v. 1, n. 6, p. 944-953, 2002.
- FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; ROSA, D. S.; SOARES, M. J. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. **Journal of Parasitology**, v. 86, n. 6, p. 1213-18, 2000.

- GALDERISI, U.; JORI, F. P.; GIORDANO, A. Cell cycle regulation and neural differentiation. **Oncogene**, v. 22, p. 5208-5219, 2003.
- GIFFORD, J. L.; WALSH, M. P.; VOGEL, H. J. Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix-loop-helix EF-hand motifs. **Biochemical Journal**, v. 405, p. 199-221, 2007.
- GOLDENBERG, S.; SALLES, J. M.; CONTRERAS, V. T.; LIMA FRANCO, M. P. A.; KATZIN, A. M.; COLLI, W. & MOREL, C. M. Characterization of messenger RNA from epimastigotes and metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **FEBS**, v. 180, n.2, p. 265-270, 1985.
- GOLDENBERG, S.; ÁVILA, A. R. Aspects of *Trypanosoma cruzi* stage differentiation. In: Chagas Disease. **Advances in Parasitology**, v. 75, part A, p. 285-305, 2011.
- GONZALES-PERDOMO, M.; ROMERO, P.; GOLDENBERG, S. Cyclic AMP and adenylate cyclase activators stimulate *Trypanosoma cruzi* differentiation. **Experimental Parasitology**, v.66, n. 2, p. 205-212, 1988.
- KIRCHHOFF, L. V. Epidemiology of American Trypanosomiasis (Chagas Disease). In: Chagas Disease. **Advances in Parasitology**, v. 75, part A, p. 1-18, 2011.
- KOLLIEN, A. H.; SCHAUB, G. A. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. **Parasitology Today**, v. 16, p. 381-387, 2000.
- KRAMMER, S. Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: The case of the kinetoplastids. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 18, p. 61-72, 2012.
- KUWAYAMA, H.; OBARA, S.; MORIO, T.; KATOH, M.; KUHARA, S.; TANAKA, Y. A novel PCR-mediated method for one-tube generation of a gene disruption construct. **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 16, p. 1307-1312, 2002.
- LEPREVOST, F. da V. Caracterização de Genes de Função Desconhecida com Expressão Associada às Formas Infectivas do *Trypanosoma cruzi*. **Dissertação de Mestrado**

apresentada ao Programa de Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, 2009.

LEVINE, N. D.; CORLISS, J. O.; COX, F. E. G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B. M.; LEEDADE, G. F.; LOEBLICH, A. R.; LOM, F.; LYNN, D.; MERINFELD, E. G.; PAGE, F. C.; POLJANSKI, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F. C. A newly revised classification of the Protozoa. **Journal of Protozoology**, v.27, p.37-58, 1980.

LIU, B.; LIU, Y.; MOTYKA, S. A; AGBO, E. E. C; ENGLUND, P. T. Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. **Trends in parasitology**, v. 21, n. 8, p. 363-9, 2005.

LORUSSO, A. B. Desenvolvimento de um sistema semi-automatizado para nocautes gênicos em *Trypanosoma cruzi*. **Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Biociências e Biotecnologia do Instituto Carlos Chagas**, 2013.

MADISON-ANTENUCCI, S.; GRAMS, J.; HAJDUK, S. L. Editing machines: the complexities of trypanosome RNA editing. **Cell**, v. 108, p. 435-8, 2002.

MARCHINI, F. K.; DE GODOY, L. M. F. de; RAMPAZZO, R. C. P; PAVONI, D. P.; PROBST, C. M.; GNAD, F.; MANN, M.; KRIEGER, M. A. Profiling the *Trypanosoma cruzi* Phosphoproteome. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, e25381, 2011.

MARTINS, A. V.; GOMES, A. P.; MENDONÇA, E. G.; FIETTO, J. L. R.; SANTANA, L. A.; OLIVEIRA, M. G. A.; GELLER, M.; SANTOS, R. F.; VITORINO, R. R.; SIQUEIRA-BATISTA, R. Biology of *Trypanosoma cruzi*: an update. **Infectio**, v. 16, p. 45-58, 2012.

MICHELS, P. A. M., BRINGAUD, F.; HERMAN, M.; HANNAERT, V. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1763, n. 12, p. 1463-77, 2006.

NELSON, M. R.; THULIN, E.; FAGAN, P. A.; FORSÉN, S.; CHAZIN, W. J. The EF-hand domain: A global cooperative structural unit. **Protein Science**, v.11, p. 198-205, 2001.

- OVERATH, P.; STIERHOF, Y. D.; WIESE, M. Endocytosis and secretion in trypanosomatid parasites -Tumultuous traffic in a pocket. **Trends in Cell Biol**, v. 7, n. 1, p. 27-33, 1997.
- PRETI, H. Caracterização funcional de genes codificadores de proteínas hipotéticas diferencialmente expressos durante a metacicloênese de *Trypanosoma cruzi*. **Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná**, 2007.
- PROBST, C. M. Descrição da Metacicloênese de *Trypanosoma cruzi* pelo uso de microarranjos de DNA. **Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz**, 2005.
- SANT'ANNA, C.; NAKAYASU, E. S.; PEREIRA, M. G.; LOURENÇO, D.; SOUZA, W. de; ALMEIDA, I. C.; CUNHA-E-SILVA, N. L. Subcellular proteomics of *Trypanosoma cruzi* reservosomes. **Proteomics**, v. 9, n. 7, p. 1782–1794, 2009.
- SCHAUB, G.A. Metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi* in the vector *Triatoma infestans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, p. 563-570, 1988.
- SOARES, M. J. The reservosome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: an organelle of the endocytic pathway with a role on metacyclogenesis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, p. 139-41, 1999.
- SOUZA, W. de. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. **International review of cytology**, v. 86, p. 197-283, 1984.
- SOUZA, W. de. A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, p. 17-36, 1999.
- SOUZA, W. de. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current Pharmaceutical Design**, v.8, n. 4, p. 269-85, 2002.
- SOUZA, W. de. Electron microscopy of trypanosomes - A historical view. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, n. 4, p. 313-25, 2008.

- SOUZA, W. de. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell interaction. **International Journal of Cell Biology**, p. 1- 18, 2010.
- STUART, K. D.; SCHNAUFER, A.; ERNST, N. L.; PANIGRAHI, A. Complex management: RNA editing in trypanosomes. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 30, n. 2, p. 97-105, 2005.
- TANOWITZ, H. B.; KIRCHHOFF, L. V.; SIMON, D.; MORRIS, S. A.; WEISS, L. M.; WITTNER, M. Chagas' disease. **Clinical microbiology reviews**, v. 5, n. 4, p. 400-19, 1992.
- TEIXEIRA, S. M.; EL-SAYED, N. M.; ARAÚJO, P. R. The genome and its implications. *In*: Chagas Disease. **Advances in Parasitology**, v. 75, part A, p. 209-230, 2011.
- TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979
- TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal of Parasitology**, v. 31, p. 472-81, 2001.
- TYLER, K. M.; OLSON, C. L.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *In*: American Trypanosomiasis. **World Class Parasites**, v. 7, p. 1-11, 2003.
- URBINA, J. A. Intermediary metabolism of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Today**, v. 10, n. 3, p. 107-110, 1994.
- VANHAMME, L.; PAYS, E. Control of gene expression in trypanosomes. **Microbiology Reviews**, v.59, p.223-240, 1995.
- WHO, Chagas Disease. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>. Acesso em novembro de 2013, às 09h00.

YAMAMOTO, F. C. Caracterização de Genes Diferencialmente Expressos Durante a Metacicloênese do *Trypanosoma cruzi*. **Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz**, 2009.

ZEYTUNI, N.; ZARIVAH, R. Chapter 6: The TPR motif as protein interaction module - A discussion of structure and function. *In: Protein Interactions*. Editora InTech; p. 103-118, 2012.

ZINGALES, B.; PEREIRA, M. E.; ALMEIDA, K. A.; UMEZAWA, E. S.; NEHME, N. S.; OLIVEIRA, R. P.; MACEDO, A.; SOUTO, R. P. Biological parameters and molecular markers of clone CL Brener - the reference organism of the *Trypanosoma cruzi* genome project. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.92, n.6, p.811-814, 1997.