

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA LUISA KALB

**CARACTERIZAÇÃO DAS FKBPS (FK506 BINDING PROTEIN) DE
*TRYPANOSOMA CRUZI***

CURITIBA

2010

ANA LUISA KALB

**CARACTERIZAÇÃO DAS FKBPS (FK506 BINDING PROTEIN) DE
*TRYPANOSOMA CRUZI***

Monografia apresentado à disciplina Estágio em Genética do curso de graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharelado em Ciências Biológicas.

Orientador interno: Prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza

Orientadora externa: Dra. Daniela Parada Pavoni

**CURITIBA
2010**

Aos meus pais, Ivo e Iraci
Ao meu amado Cristhiano

AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda equipe do Instituto Carlos Chagas que me auxiliaram e me apoiaram nos meus primeiros passos da carreira científica. Em especial à Andreia Dallabona, pela dedicação e paciência em me ensinar, pela grande ajuda no desenvolvimento desse projeto e principalmente pela amizade e companheirismo compartilhado durante o trabalho no laboratório.

À minha orientadora Dra. Daniela Parada Pavoni que acreditou em mim desde minha primeira apresentação no ICC, durante o estagio probatório. Pela sua dedicação, ensinamentos e confiança.

Ao Dr. Ricardo Lehtonen, meu orientador da UFPR, que desde os tempos em que eu estagiava no departamento de genética prontamente me ajudava e ensinava a solucionar os problemas de laboratório.

A todos do laboratório que de alguma maneira tornaram esse projeto possível, tanto pela auxílio nas técnicas como pelo companheirismo.

Aos meus pais pelo seu amor, pelas oportunidades, por suportarem minha ausência muitas vezes causada pelos estudos. Por me ouvirem, mesmo sem entender, por me ajudarem em meus estudos etológicos com a Laica ou na minha coleção de inseto. Amo muito vocês!

À minha Irmã que prontamente me ajudou nos experimentos, principalmente quando precisava ir para a faculdade.

Ao meu amor Cristhiano, que sempre está ao meu lado, desde quando passei no vestibular até quando estive, por longos 8 meses, na Alemanha. Por compartilhar momentos de alegria e de distração, por ouvir pacientemente minhas maluquices da Biologia. Amo muito você!

A Deus que tem me amado, me capacitado, me dado tantas alegrias e tem feito infinitamente mais do que eu possa imaginar. Obrigado por ser meu refúgio e fortaleza.

Obrigada a todos!

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Isomerização <i>cis-trans</i> de uma ligação peptídica Xaa-Pro.....	10
FIGURA 2 - Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	18
FIGURA 3 - Vetor de entrada pDONR™ 221.....	28
FIGURA 4 - Vetor de expressão pDEST™ 17.....	28
FIGURA 5 - Vetor de expressão pDEST™ 15.....	29
FIGURA 6 - Esquema do vetor de destino pTcPR-GFPN.....	40
FIGURA 7 - Gel de agarose com resultado das amplificações.....	44
FIGURA 8 - Gel de agarose com resultado da purificação das amplificações dos genes B12 e C01.....	45
FIGURA 9 - Gel de agarose da amplificação dos genes de interesse após inserção no vetor pDONR™221.....	45
FIGURA 10 - Gel de agarose da amplificação dos genes de interesse após inserção no vetor pDEST™17.....	46
FIGURA 11 - Gel de agarose da amplificação do gene B10 inserido no vetor pDEST™17 purificado por miniprep.....	47
FIGURA 12 - Gel de agarose da amplificação dos genes de interesse após inserção no vetor pDEST™15.....	48
FIGURA 13 - Gel SDS - PAGE 13% do teste de expressão das proteínas recombinantes.....	49
FIGURA 14 - <i>Western-blot</i> do teste de expressão com anti-histidina.....	50
FIGURA 15 - <i>Western-blot</i> do teste de expressão da proteína B12 com inibidor de protease PMSF.....	50
FIGURA 16 – Gel SDS – PAGE (A) e <i>Western-blot</i> (B) anti-GST do teste de expressão solúvel das proteínas fusionadas a GST (pDEST™15).....	51
FIGURA 17 - Gel SDS – PAGE (A) e <i>Western-blot</i> (B) anti-GST do teste de expressão solúvel da proteínas B07 (48,3 kDa) fusionada a GST (pDEST™15).....	52
FIGURA 18 - Gel SDS-PAGE da expressão em larga escala.....	53
FIGURA 19 - <i>Western-blot</i> anti-histidina para confirmação da expressão das proteínas recombinantes.....	54
FIGURA 20 - <i>Western-blot</i> anti-histidina da expressão das proteínas recombinantes na fração solúvel.....	55
FIGURA 21 - Gel SDS–PAGE com a purificação da proteína solúvel B09 das frações solúvel e lavado 1.....	55
FIGURA 22 - <i>Western blot</i> com a purificação da proteína solúvel B09 das frações solúvel e lavado 1.....	56
FIGURA 23 - Detecção das proteínas no extrato de <i>T. cruzi</i> utilizando os soros com anticorpos produzidos em camundongos.....	57
FIGURA 24 - Detecção das proteínas B07 (48,3 kDa) e B11 (41,7 kDa) no extrato de <i>T. cruzi</i> utilizando os soros purificados.....	58
FIGURA 25 – Gel SDS–PAGE das proteínas purificadas por gel preparativo.....	59
FIGURA 26 - Gel de agarose da amplificação dos genes de interesse após inserção no vetor pTcPR-GFPN.....	60

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Iniciadores dos genes codificadores de FKPBs de <i>T. cruzi</i> selecionados neste projeto.	26
TABELA 2 - Listagem de genes codificadores de FKPBs de <i>T. cruzi</i>	41
TABELA 3 - Análise dos domínios das proteínas selecionadas neste projeto através do banco de famílias protéicas PFAM.....	42
TABELA 4 - Listagem de genes codificadores de FKBP5 de <i>T. brucei</i>	43
TABELA 5 - Resumo dos resultados obtidos neste trabalho.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

BCIP	- 5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt
BSA	- Bovine Serum Albumine (Albumina Bovina Sérica)
CsA	- Ciclosporina
CypA	- Ciclofilina
DNA	- Ácido Desoxirribonucléico
DO	- Densidade ótica
EDTA	- Ácido etileno-diamino-tetracético
FCBP	- FK506 - CsA <i>Binding Protein</i>
FKBD	- FK506 <i>Binding Domain</i>
FKBPs	- FK506 <i>Binding Protein</i>
GFP	- <i>Green Fluorescent Protein</i> (Proteína Fluorescente Verde)
GST	- Enzima glutathiona S- transferase
IPTG	- Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
kDa	- Quilo Dalton
LB	- Luria-Bertani
MIP	- <i>macrophage infectivity potentiator</i>
mRNA	- RNA mensageiro
NBT	- Nitro-Blue Tetrazolium Chloride
ORF	- <i>Open Reading Frame</i> (Quadro Aberto de Leitura)
pb	- Pares de bases de nucleotídeos
PEG	- Polietilenoglicol
PMSF	- <i>Phenylmethyl-sulfonyl fluoride</i>
PBS	- Tampão fosfato salina
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
PPIase	- Peptidil-prolil cis-trans isomerase
RNA	- Ácido Ribonucléico
RRM	- <i>RNA recognition motif</i>
SDS	- Dodecil Sulfato de Sódio
TE	- Tampão Tris – HCL e EDTA
TPR	- Tetratricopeptideo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 PEPTIDIL-PROLIL CIS-TRANS ISOMERASES (PPIASES).....	10
1.1.1 PPlases na interação patógeno-hospedeiro.....	12
1.1.2 Família FKBP.....	13
1.2 <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	16
1.2.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de chagas.....	16
1.2.2 Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
1.2.3 Expressão gênica em <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
1.3 PPlases DE <i>T. CRUZI</i>	19
1.4 JUSTIFICATIVA.....	20
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 PROCEDÊNCIA DE REAGENTES E MATERIAIS.....	22
3.2 MEIOS DE CULTURA, SOLUÇÕES E TAMPÕES.....	23
3.3 SOFTWARES UTILIZADOS.....	25
3.4 AMPLIFICAÇÃO DAS CDS (CODING SEQUENCE) PARA INSERÇÃO EM VETORES.....	25
3.5 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR	27
3.6 CLONAGEM E VETORES.....	27
3.6.1 Clones de entrada.....	29
3.6.2 Clones de expressão.....	30
3.7 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS.....	31
3.7.1 Teste de expressão.....	31
3.7.2 Teste de expressão solúvel.....	32
3.7.3 <i>Western-Blot</i> e detecção da proteína recombinante e revelação por fosfatase alcalina.....	33
3.7.4 Expressão em larga escala.....	34
3.8 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	36
3.8.1 Purificação das proteínas por gel preparativo.....	36
3.8.2 Purificação das proteínas proteína em colunas contendo resina NiNTA-Agarose (Qiagen).....	36
3.8.3 Quantificação da proteína purificada.....	37
3.9 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS.....	37
3.9.1 Inoculações em camundongos.....	37
3.9.2 Purificação dos anticorpos.....	38
3.10 TRANSFECCÃO EM <i>T. CRUZI</i> COM O GENE INSERIDO NO VETOR pTcPR-GFPN.....	39
3.10.1 Clonagem do gene para o vetor pTcPR-GFPN.....	39
3.10.2 Transfecção em <i>T. cruzi</i>	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1 SELEÇÃO DOS GENES.....	41
4.2 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES.....	44

4.3	OBTENÇÃO DE CLONES DE ENTRADA.....	44
4.4	OBTENÇÃO DE CLONES DE EXPRESSÃO.....	46
4.5	TESTE DE EXPRESSÃO.....	49
4.6	EXPRESSÃO EM LARGA ESCALA.....	53
4.7	PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS.....	56
4.8	PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	59
4.9	CLONAGEM DO GENE PARA O VETOR PTCPR-GFPN.....	60
5	CONCLUSÕES.....	62
6	PERSPECTIVAS.....	63
	REFERÊNCIAS.....	64

1. INTRODUÇÃO

1.1 PEPTIDIL-PROLIL CIS-TRANS ISOMERASES (PPIASES)

As enzimas com atividade de peptidil-prolil cis-trans isomerase (PPIase) realizam a isomerização da ligação peptídica entre uma prolina e um aminoácido precedente (ligação Xaa-Pro), como exemplificado na figura 1. Apesar da maioria das ligações peptídicas serem encontradas na conformação trans e as proteínas manterem este estado energeticamente favorecido, há uma significativa minoria (5-7% de proteínas) que se modificam para a conformação cis com o auxílio dessas enzimas (Bell *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2008). Além de influenciar a conformação das proteínas, esta isomerização na extremidade N-terminal da prolina é essencial para o enovelamento da proteína nascente e está relacionada com outros aspectos importantes como interação protéica, tráfego, localização e atividade (Barik, 2006).

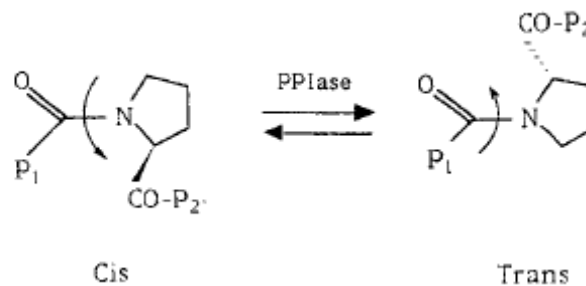


FIGURA 1. Isomerização *cis-trans* de uma ligação peptídica Xaa-Pro. (Galat A,1993)

Enzimas PPIases são divididas em três famílias: ciclofilinas, FKBP e parvulinas, as quais já foram descritas em uma gama de organismos, desde bactérias até seres humanos. As três famílias não são relacionadas nem na seqüência nucleotídica e nem estruturalmente, embora compartilhem a função de peptidil-prolil isomerase. As ciclofilinas foram assim denominadas por interagirem com a droga imunossupressora ciclosporina A (CsA) e as FKBP por se ligarem com o antibiótico FK506 (**FK506 Binding Protein**). Outras drogas também se ligam à família FKBP, como a rapamicina. A ligação destas drogas com as PPIases bloqueiam o sítio de ligação com a prolina inibindo a atividade de isomerase, mas não é esta inibição que causa o efeito de imunossupressão. Os complexos CsA-

ciclofilina e FK506-FKBP inibem a calcineurina, uma fosfatase regulada por calmodulina necessária para uma variedade de mecanismos de transdução de sinal dependente de Ca^{2+} (Liu *et al.*, 1991). Um dos substratos da calcineurina é o fator nuclear de células T ativadas (NF-AT) que, sem a remoção dos resíduos de fosfato, não é translocado para o núcleo e vários genes codificadores para citocinas permanecem silenciados, suprimindo a resposta imune. O complexo rapamicina-FKBP inibe a cinase TOR, essencial para uma variedade de processos. Devido a essa propriedade, ciclofilinas e FKBP são coletivamente chamadas de imunofilinas (revisado por Barik, 2006).

O conjunto de proteínas hoje denominadas parvulinas (do latim *parvulus*, pequeno, pois têm ~10 kDa) foi formalmente inserido dentro do conjunto de PPlases em 1994 por Rahfeld *et al.* em um trabalho com *Eschechiria coli*. A ortóloga de *Saccharomyces cerevisiae* (ESS1) (Hanes *et al.*, 1989; Hani *et al.*, 1995) e da espécie humana (Pin-1) estão envolvidas no controle do ciclo celular (Lu *et al.*, 1996). Estas parvulinas realizam a isomerização de ligações fosfotreonina- ou fosfoserina-prolina, em proteínas cuja conformação será alterada após sua fosforilação.

Uma nova família de imunofilinas foi recentemente estudada contendo ambas as seqüências de ciclofilina e FKBP. Devido a essa propriedade, essas proteínas foram chamadas de FCBP (FK506 - **CsA Binding Protein**). As FCBPs foram identificadas em três gêneros de protozoários (*Toxoplasma*, *Theileria* e *Tetrahymena*) e em duas bactérias (*Flavobacterium johnsonae* e *Treponema denticola*). Adams *et al.* (2005) estudaram a proteína FCBP57 de *Toxoplasma gondii* (TgFCBP57) e verificaram que os domínios FKBP e ciclofilina, quando expressos separadamente, apresentam aproximadamente metade da atividade de PPlase da proteína inteira mas são sensíveis à droga específica da família. Ambas as drogas, FK506 e CsA, inibem o crescimento do protozoário (Adams *et al.*, 2005).

Algumas PPlases têm atividade de chaperona independente da atividade de PPlase. Uma ciclofilina de *Leishmania donovani* consegue desagregar agregados solúveis de adenosina cinase mesmo quando uma grande porção do domínio PPlase está deletado. Análises de FKBP de *Methanothermococcus thermolithotrophicus* indicam que a atividade de chaperona que elas possuem independe da atividade de PPlase. De uma forma geral, ambas as atividades devem

auxiliar no correto enovelamento de grandes polipeptídeos contendo prolina (revisto por Barik, 2006; Kang *et al.*, 2008).

Todos os organismos estudados possuem pelo menos uma PPIase, indicando que sua função é essencial para a sobrevivência de todas as células. Camundongos *knock-out* para uma das ciclofilinas (CypA) são viáveis, mas espontaneamente desenvolvem uma doença alérgica, e a procura do mecanismo responsável levou à identificação de uma fosfatase alvo (entre alguns outros) crucial para o direcionamento da resposta Th2. Camundongos *knock-out* para uma FKBP são estéreis e possuem anormalidades dos órgãos reprodutivos. Experimentos de silenciamento de uma PPIase de *Toxoplasma gondii* através de RNAi indicam que esta proteína parece ser essencial para a viabilidade celular (Adams *et al.*, 2005).

Entretanto, Dolinski *et al.* (1997), deletaram todos os 12 genes codificadores de imunofilinas de *S. cerevisiae* individual e conjuntamente e não observaram nenhum defeito em um número de parâmetros fisiológicos estudados. A idéia atual é a de que as imunofilinas têm um papel em vias bioquímicas necessárias em determinados nichos ambientais e patogênicos que devem ser investigados.

1.1.1 PPIases na interação patógeno-hospedeiro

Há vários relatos de que imunofilinas – tanto do patógeno quanto do hospedeiro – contribuem de alguma forma para o estabelecimento da infecção.

Hoerauf *et al.* (1997) analisaram 2 ciclofilinas de *Leishmania major* e a CypA de macrófagos e perceberam, através de inibição da proteína, que a ciclofilina da célula hospedeira é importante na replicação de amastigotas.

A proteína CyP18 de *T. gondii* liga-se ao receptor CCR5 em células dendríticas e macrófagos, levando à indução da produção de IL-12 e IFN- γ , citocinas críticas para a sobrevivência da célula hospedeira na fase aguda da infecção. Da mesma maneira, uma ciclofilina de *Neospora caninum* tem um papel na estimulação de IFN- γ pelas células mononucleares periféricas e CD4+ (Tuo *et al.*, 2005).

Cianciotto *et al.* (1989) descreveram uma PPIase em *Legionella pneumophila* que exerce um papel na sua sobrevivência dentro de macrófagos, portanto denominada de MIP (*macrophage infectivity potentiator*), posteriormente identificada

em outros patógenos intracelulares como *Chlamydia* (Lundemose *et al.*, 1991). Moro *et al.* em 1995 identificaram uma FKBP homóloga em *Trypanosoma cruzi*, a única de protozoário identificada até o momento. TcMip é secretada pelas formas infectivas (tripomastigotas) mas o alvo da atividade de PPlase ainda não foi identificado (Pereira *et al.*, 2002).

Estudos verificaram que a droga FK506 possui um efeito anti-malaria. Entretanto, Monaghan e Bell (2005) demonstraram que a proteína PfFKBP35 inibe a atividade da calcineurina na ausência da droga. Este fenômeno também foi reportado na proteína humana FKBP38 (Monaghan e Bell, 2005).

A utilização em camundongos de ciclosporina A para potencializar a infecção por *Plasmodium*, uma vez que a resposta imune seria suprimida, mostrou que a droga, ao invés de facilitar a infecção, tem um efeito contrário – o de inibição. O mesmo efeito ocorre com a administração da droga em animais infestados por certos helmintos. A infecção por *T. cruzi*, entretanto, é exacerbada após a administração de CsA, devido ao seu efeito imunossupressor (*apud* High e Handschumacher, 1992). As drogas FK506 e/ou rapamicina inibem o crescimento de *Plasmodium falciparum*, *T. gondii* e *T. cruzi* em cultura (revisto por Bell *et al.*, 2006).

Tem se assumido que o mecanismo através do qual estas drogas imunossupressoras têm um efeito de inibição da infecção é o mesmo que faz com que elas desencadeiem a imunossupressão, ou seja, a interação com a imunofilina e a calcineurina e a sua conseqüente inibição. Algumas observações, entretanto, não são condizentes com este modelo. Existe a hipótese de que os fenótipos são decorrentes da inibição de eventos de enovelamento catalisados pela função de PPlase.

1.1.2 Família FKBP

Os membros da família das FKBP existem em todos os organismos desde archebacterias até primatas e já foram identificadas proteínas de 12 a 135 kDa. Os membros dessa família com baixo peso molecular apresentam apenas o domínio de ligação à FK506 (FKBD – **FK506 Binding Domain**) enquanto os com maiores pesos moleculares possuem outros domínios e motivos de ligação como tetratricopeptideo

(TPR), domínio de ligação à calmodulina, transmembrana (TM), sinal de localização nuclear (NLS), EF Hand e leucina zipper (Galat, 2000; Kang *et al.*, 2008).

O domínio FKBD apresenta 108 aminoácidos e é responsável tanto pela atividade de PPlase quanto de ligação à FK506 (Kang *et al.*, 2008). As proteínas FKBP51 e FKBP52 de humano apresentam dois domínios FKBD em tandem; o domínio N-terminal possui a atividade de PPlase e pode se ligar às drogas FK506 e rapamicina, enquanto o domínio C-terminal é responsável pela interação com outras proteínas como a chaperona HSP 90 e receptores esteróides. Há fortes evidências que a interação da FKBP52 com os receptores esteróides requer o domínio TPR (Davies e Sánchez, 2005). O domínio de interação proteína - proteína (TPR) auxilia na modulação da atividade das proteínas e serve como sítio de ligação para chaperonas, como Hsp90 (Davies e Sánchez, 2005; Barik, 2006; Kang *et al.*, 2008).

O genoma de *E. coli* apresenta quatro FKBP's cujas massas variam de 16 a 29 kDa (Galat, 2000). A extremidade N-terminal da EcFKBP29 exibe atividade de chaperona enquanto a extremidade C-terminal apresenta atividade de PPlase e se liga à FK506 (Barik, 2006). O domínio FKBD de EcFKBP16 é altamente hidrofóbico sugerindo que esta proteína está associada à membrana (Galat, 2000).

O número de proteínas da família FKBP presente em *Arabidopsis thaliana* é muito maior em comparação a outros organismos. Enquanto *S. cerevisiae* possui quatro FKBP's, *Caenorhabditis elegans* oito e *Homo sapiens* 11, *A. thaliana* apresenta 23 FKBP's. Dentre as 23 proteínas, sete contêm um domínio FKBD flanqueado por um domínio N-terminal de ligação ao ribossomo e um C-terminal de ligação a chaperona (Geisler e Bailly, 2007). As outras proteínas podem conter de três a quatro FKBD's seguidos de domínios TPRs e de ligação a calmodulina (Breiman e Camus, 2002).

Recentemente, Brasseur *et al.* (2009) identificaram quatro FKBP's de *Trypanosoma brucei* (FKBP11, FKBP12, FKBP21 e FKBP47), as quais foram silenciadas através de RNAi. Apenas a proteína de 12 kDa (TbFKBP12) é essencial para a sobrevivência do parasita. A supressão dessa proteína bloqueia a citocinese impedindo o processo de mitose. Além disso, afeta severamente a motilidade flagelar. Neste trabalho não foi possível determinar a localização da proteína TbFKBP12, a qual é expressa em todas as formas de vida do parasita.

Muitas FKBP's possuem específica localização intracelular como citoplasma, núcleo e retículo endoplasmático (Barik, 2006). A proteína FKBP35 de *Plasmodium*

falciparum, por exemplo, foi expressa predominantemente no citosol em todo o ciclo de vida no eritrócito enquanto nas formas trofozoíto e esquizonte foi observada significativa quantidade da proteína no núcleo (Monaghan e Bell, 2005). A FKBP12 de *S. cerevisiae* é encontrada no citoplasma e a FKBP60 no núcleo (Dolinski *et al.*, 1997). Dados bioquímicos e de proteômica suportam que grande parte das 16 FKBP de *A. thaliana* com simples domínio localizam-se no lúmen do tilacóide onde apresentam função relacionada à fotossíntese. Outras FKBP de *A. thaliana* são encontradas no citoplasma, núcleo, retículo endoplasmático e mitocôndria (Breiman, 2002). A única FKBP de *T. cruzi* identificada até o momento é secretada pelas formas infectivas (tripomastigotas) (Pereira *et al.*, 2002).

O fato das FKBP se ligarem a diferentes proteínas na célula cria um amplo espectro de alvos celulares para as drogas FK506 e rapamicina. As FKBP localizadas em diferentes compartimentos celulares podem estar sob o controle dessas drogas que influenciam processos de crescimento e proliferação celular (Galat, 2008).

O complexo formado entre FKBP e a droga reforça a estabilidade da proteína, sendo mais resistente à clivagem proteolítica, e cria uma superfície para a ligação com a calcineurina e a cinase TOR. Estudos revelarem que na ausência de FK506, a FKBP12 liga-se a alvos celulares, tais como os receptores rianodina (RyRs), os quais são um dos principais canais de liberação de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático. A ligação das FKBP com FK506 ou rapamicina provoca um vazamento de Ca^{2+} em células endoteliais isoladas e induz a fuga de Ca^{2+} intracelular que pode contribuir para a patogênese da disfunção endotelial e hipertensão (Kang *et al.*, 2008).

Recentes estudos têm demonstrado o papel das FKBP na regeneração do nervo. FKBP12 e FKBP52 apresentam elevados níveis nos neurônios. Um aumento da FKBP12 é verificado nas áreas de patologia em doenças neurodegenerativas. Esses estudos podem fornecer importantes pistas terapêuticas para o tratamento de doenças neurodegenerativas que atualmente afetam o envelhecimento da população humana, tais como Alzheimer e Parkinson (revisto por Barik, 2006).

1.2 TRYPANOSOMA CRUZI

1.2.1 *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

O *Trypanosoma cruzi* é o protozoário flagelado unicelular pertencente à família Trypanosomatidae da ordem Kinetoplastida. O gênero *Trypanosoma* é um dos mais importantes em termos de saúde pública, dentro da família Trypanosomatidae, por incluir uma série de espécies causadoras de importantes doenças humanas, como o *T. cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, e o *Trypanosoma brucei rhodesiense* e *T. b. gambiense*, ambos agentes da doença do sono (Hide, 1999).

A doença de Chagas, descrita em 1909 por Carlos Chagas, constitui um grave problema de saúde pública na América Latina. Caracteriza-se por ser debilitante e incapacitante e é uma das principais causas de aposentadoria antecipada nas áreas de risco. Estima-se que existam entre 12 e 14 milhões de infectados na América Latina, com mais de 60 milhões de pessoas sob risco de transmissão, em cerca de 18 países endêmicos (Dias, 2007). Estima-se que no Brasil haja 5 milhões de pessoas infectadas.

Atualmente não há vacina desenvolvida e as drogas utilizadas, benzonidazol e o nifurtimox, não são satisfatórias. O tratamento apresenta melhores resultados na fase aguda da doença, em pacientes com infecção recente. Porém, ambos os medicamentos causam várias reações colaterais indesejáveis que, por vezes, obrigam a interrupção do tratamento e as probabilidades de cura diminuem à medida que a doença vai adquirindo a forma crônica (revisto por Cançado *et al.*, 2000).

A doença de Chagas compreende, basicamente, duas fases: a fase aguda e a fase crônica. A fase aguda da doença é usualmente silenciosa, rápida e com elevada parasitemia. Os sintomas podem ser febre, dor de cabeça, edema, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, miocardite, meningoencefalite e cardiopatia aguda. O conjunto e a intensidade dos sintomas é bastante variável de caso a caso. A duração desta fase é de aproximadamente 4 a 12 semanas. No final da fase aguda o quadro febril e a parasitemia tendem a desaparecer e os níveis de imunoglobulinas do tipo IgM decrescem enquanto as do tipo IgG sobem (revisto por

Dias, 2000). Essas características definem a transição para a fase crônica da doença.

A evolução desta fase é lenta e ocorre anos após a fase aguda, podendo durar toda a vida do paciente. Esta fase pode ser representada por diversas formas clínicas: a indeterminada, a cardíaca ou a digestiva. A forma indeterminada consiste na ausência de sintomatologia. A morbimortalidade da doença de Chagas está associada às formas cardíaca e digestiva, que constituem evoluções da forma indeterminada em 2 a 5% dos casos. A primeira se caracteriza por uma cardiopatia crônica, cujo aspecto mais importante é a fibrose (Andrade *et al.*, 1978). A forma digestiva caracteriza-se por esofagopatia e colopatia (revisito por Dias, 2000).

1.2.2 Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

Há três maneiras principais de transmissão da doença de Chagas: a vetorial, a transfusional e a congênita. De menor impacto, há a contaminação através de transplantes de órgão e acidentes de laboratório (revisito por Schmuñis, 2000). Todavia a transmissão por via oral também tem sido responsável por um número significativo dos casos agudos da doença (Coura *et al.*, 2002). Recentemente, por exemplo, foram registrados vários casos de contração da doença a partir da ingestão de cana-de-açúcar no estado de Santa Catarina e suco de açaí nos estados do Pará e Bahia contaminados com formas infectivas do parasita (Dias *et al.*, 2008; Nobrega *et al.*, 2009).

A via vetorial de transmissão da doença é a responsável pela grande maioria dos casos registrados. Acontece pelo contato do hospedeiro vertebrado com as excretas contaminadas do inseto vetor. O inseto vetor pertence à ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae. Embora possuam hábitos diversos, todas as espécies de triatomíneos são potencialmente vetoras do *T. cruzi*, mas poucas possuem importância epidemiológica. Os triatomíneos são conhecidos popularmente como “barbeiros”, entre outros nomes vulgares (Sherlock, 2000).

O ciclo de vida do *T. cruzi* ocorre em dois hospedeiros. Geralmente, o hospedeiro intermediário, ou vetor, é um invertebrado hematófago e um vertebrado, às vezes o homem, é o hospedeiro definitivo (Chagas, 1909).

A interação parasita – hospedeiro é bastante dinâmica, dependendo de diversos fatores ligados ao *T. cruzi* - cepa, virulência, tamanho do inóculo -, ao homem - idade, sexo e provavelmente raça - e ao ambiente (revisto por Dias, 2000).

O ciclo de vida do *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado é iniciado quando o inseto vetor libera as formas tripomastigotas metacíclicas, presentes nas excretas, durante o repasto sanguíneo. Esse estágio infectivo é capaz de alcançar o interior da célula hospedeira e se diferenciar na forma replicativa amastigota. Após intensa divisão binária, os amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas sanguíneos que rompem as células hospedeiras e alcançam a corrente sanguínea do hospedeiro. Estes, por sua vez, podem ser ingeridos por um novo inseto vetor. No tubo digestório do inseto, os tripomastigotas sanguíneos transformam-se na forma replicativa epimastigota. Após sucessivas divisões, migram para a porção posterior do intestino e se transformam nas formas tripomastigotas metacíclicas que são liberados nas excretas e podem atingir um novo hospedeiro vertebrado através de uma ferida na pele ou por uma mucosa (ciclo de vida revisto por Tyler e Engman, 2001). O ciclo de vida do *T. cruzi* pode ser visualizado na figura 2.

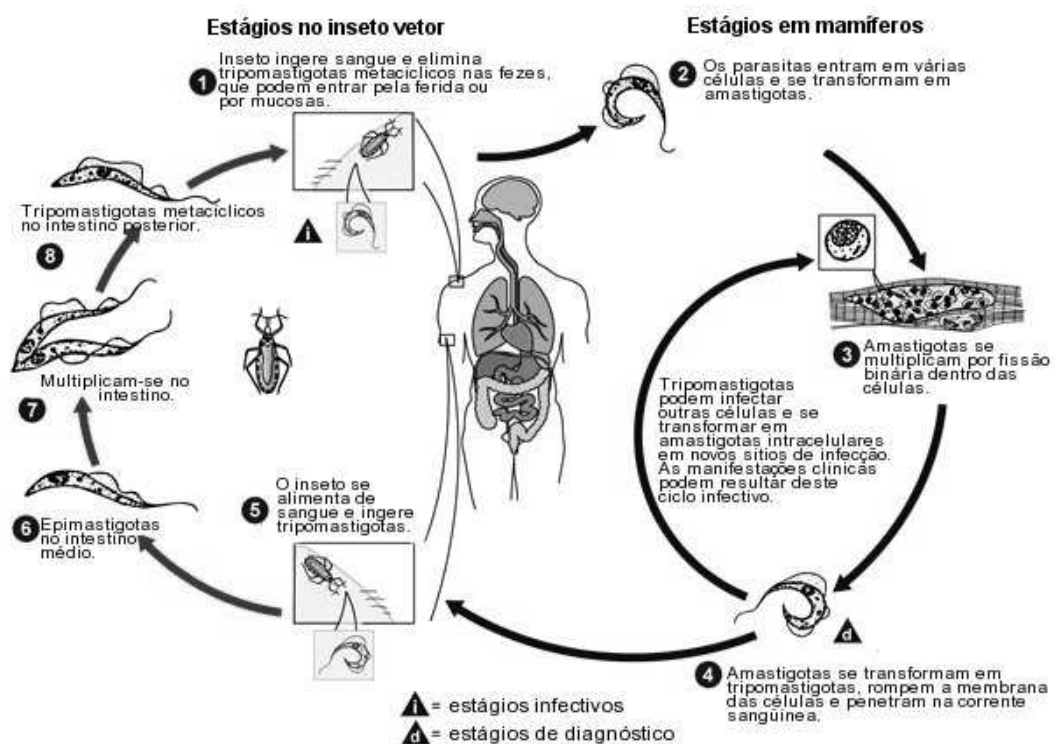


FIGURA 2 - Ciclo de vida do *T. cruzi*. Modificado de: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/>

1.2.3 Expressão gênica em *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* tem despertado grande interesse na biologia por ser o responsável por uma doença grave de grande importância em muitos países da América Latina e por apresentar algumas características especiais, compartilhada pelos tripanossomatídeos, as quais o tornam um organismo modelo.

Os tripanossomatídeos apresentam mecanismos genéticos peculiares, como a organização dos genes em unidades transcricionais policistrônicas, o processamento dos transcritos através de trans – *splicing* e a editoração do RNA (revisto por Silveira, 2000).

Existe uma tendência nos tripanossomas de agrupar os genes que codificam proteínas, os quais, muitas vezes, organizam-se em tandem separados por espaçadores intergênicos curtos. Quando esses agrupamentos gênicos estão sob controle de um único promotor, a transcrição gera um transcrito policistrônico (revisto por Silveira, 2000). Este transcrito é processado através de um mecanismo denominado trans – *splicing*, gerando RNAs monocistrônicos. Neste processo ocorre a adição de uma seqüência conservada de 39 nucleotídeos, denominada de seqüência líder, na sua extremidade 5' e na extremidade 3' é adicionada à cauda poli-A (revisto em Teixeira, 1998).

A diferenciação das formas durante o ciclo de vida é consequência de uma regulação da expressão gênica que ocorre em etapas pós-transcricionais. Várias etapas podem estar potencialmente sujeitas a algum tipo de regulação em *T. cruzi*, como etapas associadas ao RNA – *splicing* gerando os transcritos monocistrônicos, translocação do RNA para o citoplasma, estabilidade do mRNA e seu acesso aos ribossomos – e associadas às proteínas – tradução, controle da estabilidade *versus* degradação das proteínas e modificações pós-traducionais.

1.3 PPIASES DE *T. CRUZI*

O sequenciamento do genoma de *Trypanosoma cruzi*, disponível em meados de 2005 (El-Sayed *et al.*, 2005), foi realizado com a cepa CL Brener, por ser uma

das mais bem caracterizadas experimentalmente. Esse processo permitiu que se identificasse o número de genes codificadores de PPlases deste organismo. *T. cruzi* tem 14 genes codificadores de ciclofilinas, 5 genes codificadores de FKPBs e 2 genes que codificam parvulinas. Além dos domínios de PPlase que todas possuem, duas delas possuem um domínio TPR, uma apresenta um domínio WD40, e uma um domínio RRM; os dois primeiros domínios envolvidos com interações proteína-proteína e o último interação com RNA. Uma análise de similaridade e de busca por domínios enquadrou mais dois genes na família das ciclofilinas e mais um com um domínio de parvulina, anotados como proteínas hipotéticas. Alguns genes anotados como codificadores de proteínas hipotéticas aparecem como FKPBs em *T. cruzi*, porém com uma probabilidade pequena.

Potenza *et al.* (2006) descreveram a família das ciclofilinas de *T. cruzi* e identificaram algumas delas por espectrometria de massas. As três parvulinas de *T. cruzi* estão sendo estudadas pelo grupo de Esteban Erben e Sergio Schenkman. Uma das parvulinas foi caracterizada no trabalho de Erben *et al.* (2007). Até o presente momento não há relatos na literatura sobre a caracterização da família das FKPBs em dois tripanossomatídeos de relevância para a saúde humana (*T. cruzi* e *L. major*). Recentemente, Brasseur *et al.* (2009) caracterizaram a FKBP12 de *T. brucei*, como descrito anteriormente.

1.4. JUSTIFICATIVA

O papel que as PPlases exerce nas células de todos os organismos estudados é extremamente interessante em um organismo como o *T. cruzi*, no qual a regulação da expressão gênica ocorre predominantemente em eventos pós-transcricionais e pode ter importantes implicações, pois mecanismos associados à estabilidade, degradação e modificações pós-traducionais de proteínas podem ter relevante papel na dinâmica do conjunto de proteínas do parasita. Além disto, a importância que PPlases exercem na interação patógeno-célula hospedeira e a confirmação de que uma das FKPBs é secretada pelas formas infectivas, impulsionam o estudo destas proteínas na interação do *T. cruzi* com células de mamíferos, contribuindo para um aprofundamento do evento complexo que é a

infecção por *T. cruzi*. Além disso, um grande número das FKBP's tem sua atividade de isomerase inibida através de agentes imunossupressores como FK506 e rapamicina, os quais constituem, simultaneamente, tanto uma ferramenta de estudo através do bloqueio da função protéica quanto uma perspectiva de medida terapêutica.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste projeto é aprofundar a caracterização das FKBP's de *Trypanosoma cruzi*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Produzir proteínas recombinantes;
- 2) Produzir anticorpos específicos contra a proteína recombinante;
- 3) Verificar a expressão protéica durante o ciclo de vida e etapas de diferenciação;
- 4) Determinar a localização celular;

3. MATERIAIS E MÉTODO

3.1 PROCEDÊNCIA DE REAGENTES E MATERIAIS

AMERSHAM-PHARMACIA BIOTECH:

- Anticorpo monoclonal anti-histidina
- Anticorpo monoclonal anti-GST
- dNTPs
- *Hybond* membrana de nitrocelulose

BIORAD:

- Azul de bromofenol

FISHER SCIENTIFIC:

- Meio de cultura *Luria Bertani*

GIBCO:

- EDTA

INVITROGEN:

- 1 Kb Plus DNA *Ladder*
- Acrilamida
- Bis-acrilamida
- BP Clonase II *enzyme mix*
- BenchMark™ Protein Ladder
- Glicerol
- LR Clonase II *enzyme mix*
- *Platinum Taq* High Fidelity
- Proteinase K
- PEG 8000;
- *Taq* DNA Polimerase
- Vetor pDEST™17
- Vetor pDEST™15
- Vetor pDONR™221

MERCK:

- Ácido acético
- Ácido clorídrico
- Cloreto de cálcio
- Cloreto de sódio
- Etanol absoluto
- Hidróxido de sódio
- SDS

PROMEGA:

- BCIP
- Fosfatase Alcalina
- NBT

QIAGEN:

- *QIAprep Spin Miniprep Kit*

SIGMA-ALDRICH:

- Anticorpo anti-IgG de cabra conjugado à fosfatase alcalina
- β -mercaptoetanol
- Adjuvante completo de Freund
- Agarose
- Ampicilina
- Anti-mouse AP
- Azul de Coomassie R-250
- Brometo de etídeo
- BSA
- Canamicina
- Cloranfenicol
- G418
- HEPES
- Membrana de diálise
- Ponceau S
- TEMED
- Triton

STRATAGENE:

- *Pfu Ultra DNA Polimerase*
- *PfuUltra HF Reaction Buffer.*

USB:

- IPTG
- Persulfato de amônio
- Tris-base
- Uréia

VETEC:

- Metanol

3.2 MEIOS DE CULTURA, SOLUÇÕES E TAMPÕES

- Brometo de etídeo: solução 0,5 $\mu\text{g/ml}$

- Gel de corrida de poliacrilamida para eletroforese de proteínas: Acrilamida: bisacrilamida 33%:0,9% na concentração desejada, Tris-HCl 400mM pH 8,8, SDS 0,1%, persulfato de amônio 0,075% e TEMED 0,07%
- H₂O ultra-pura: sistema de purificação de água da Elga
- Meio LB (*Luria Bertani*): triptona 10 g/l, extrato de levedura 5 g/l, NaCl 5 g/l
- Meio 2YT: bacto-triptona 16 g/l, extrato de levedura 10 g/l, NaCl 10 g/l
- PBS 10X: KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, Na₂HPO₄.7H₂O 4,3 mM, NaCl 137 mM
- Meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) acrescido de penicilina: extrato de levedura 15 g/l; fosfato dibásico de sódio 11,56 g/l; glicose 2,2 g/l; hemina 0,02 g/l; infuso de fígado 5 g/l; KCl 0,4 g/l; NaCl 4,4 g/l; soro fetal bovino 10% (v/v); triptose 5 g/l; penicilina 63 mg/l. pH 7,2 ajustado com HCl
- *Ponceau S*: Ponceaus S Sigma P-3504 0,5%, ácido acético 1%
- Solução de acrilamida/bis-acrilamida (33/0,9%): 33 g de acrilamida; 0,9 g de bis-acrilamida; H₂O 100 ml.
- Solução de azul de Coomassie: azul de coomassie R-250 0,1%, metanol 45%, ácido acético 10%
- Solução de bloqueio 5%: 5% leite em pó desnatado em PBS-Tween 0,05%
- Solução de descoloração para SDS - PAGE: metanol 4%, ácido acético 7,5%
- Solução de lavagem para *Western blot*: PBS 1X, tween 20 0,05%
- Solução 30% PEG 8000/30 mM MgCl₂
- Tampão de revelação para fosfatase alcalina (*AP-buffer*): Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM
- Tampão com uréia 2 M: NaH₂PO₄ 100 mM, Tris 10 mM, uréia 2 M, NaCl 0,5M, Triton 2%, pH 8,0
- Tampão com uréia 8 M: NaH₂PO₄ 100 mM, Tris 10 mM, uréia 8 M, pH 8,0
- Tampão de amostra 4X: Tris-HCl 160 mM pH 6,8, SDS 4%, β-mercaptoetanol 1,47 M, glicerol 24%, azul de bromofenol ~ 0,02%
- Tampão de corrida SDS - PAGE: Tris 255 mM, Glicina 192 mM, SDS 1%
- Tampão de eletroporação: NaCl 140 mM; HEPES (ácido) 25 mM e Na₂HPO₄ 0,74 mM pH 7,5
- Tampão de lise para *toothpick*: NaOH 50 mM, Glicerol 5%, SDS 0,5%, EDTA 5mM, água ultra-pura para completar 1 ml e 1,5 mg azul de bromofenol

- Tampão de sonicação: Tris-HCl pH 8,0 20 mM, NaCl 0,5 M, Triton x-100 2%
- Tampão TBE 10X: Tris base 0,89 M; Ácido bórico 0,89 M; EDTA 0,02 M; pH 8,3
- Tampão TE: Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0
- Tampão de transferência para *Western blot* 1X: Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%

3.3 SOFTWARES UTILIZADOS

- **DNASTAR:** EditSeq, MegAlign e PrimerSelect, do *Software Lasergene*
- **UVP:** LabWorks Analysis Software

3.4 AMPLIFICAÇÃO DAS CDS (CODING SEQUENCE) PARA INSERÇÃO EM VETORES

Oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação dos genes foram desenhados (TABELA 2) e possuem uma sequência conservada a 5' tanto no iniciador *forward* como no *reverse*, responsável pela recombinação do produto de PCR ao vetor de entrada pDONRTM221 da plataforma Gateway. Na extremidade 3' desta sequência, está a sequência específica para cada gene, que permitiu a amplificação da CDS completa. O DNA para as amplificações gênicas foi extraído segundo Frago e Goldenberg (1992) e as PCRs (reações em cadeia da polimerase) foram realizadas utilizando-se uma DNA polimerase termoestável de alta fidelidade (*Platinum Taq High Fidelity* e *Pfu Ultra DNA Polimerase*). As condições de amplificação utilizando a enzima *Platinum Taq High Fidelity* foram as seguintes:

- 94 °C por dois minutos;
- 35 ciclos de 94 °C (30 segundos), 55 °C (30 segundos) e 68 °C (1 minuto);
- 68 °C por dez minutos;

As condições de amplificação utilizando a enzima *Pfu* Ultra DNA Polimerase foram as seguintes:

- 94 °C por cinco minutos;
- 35 ciclos de 94 °C (45 segundos), 55 °C (45 segundos) e 72 °C (1 minuto);
- 72 °C por dez minutos;

Para os genes com tamanho maior de 1.500 pares de bases, o tempo de extensão foi aumentado para 4 minutos. O produto dessas amplificações foi analisado em eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo.

TABELA 1 - Iniciadores dos genes codificadores de FKPBs de *T. cruzi* selecionados neste projeto.

Nomenclatura	Primers	TM
B06F	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGGAGTCACGCGGCAAG	3' 58, 2
B06R	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAATTTATCTTAAGAAGTTTCGATTTCAAAAATAA G	3' 56
B07F	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGATTCAATGAACTGGGAAG	3' 52, 2
B07R	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGATGTAAACATTTTTTTGTAAATAGCC	3' 53, 9
B08F	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCCCGCGAATGACTGCGTA	3' 55, 3
B08R	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGAGCAACGTCCAGTAGTGTCACC	3' 53, 2
B09F	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAGCACGGACTCTGCAAAGTC	3' 57, 2
B09R	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAATGTTTTTGAGACCGGTAATATGC	3' 56, 1
B10F	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAACATCGCCATTGCCGCATG	3' 65, 2
B10R	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCGTCCCCCAGCTGGGCGAGC	3' 66, 6
B11F	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCGCTCGACAACCTCCACC	3' 57, 3
B11R	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCGTCTGGTACCTCAATTCGTTG	3' 58, 4
B12F	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCAGCAGAAGGTACTTATCG	3' 50, 8
B12R	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCGTCACTGTCACTGCTTTCAAAG	3' 49, 2
C01F	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGTACGACTCATGCTCTTCTGTC	3' 51, 9
C01R	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAATGCAGAGGTCCCCGTT	3' 51, 6
A03F	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCTCAGTGACAAAACACACATGCG	3' 54, 4
A03R	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTTATTGAGCCATCAGAGGAATC	3' 53, 1

Nomenclatura corresponde ao nome interno, TM: temperatura de anelamento

3.5 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

Para purificar os produtos de PCR foi utilizado o polietilenoglicol (PEG), o qual remove pequenos fragmentos de DNA sintetizados e os iniciadores da reação. Ao produto de PCR acrescentou-se quatro volumes de tampão TE. Em seguida acrescentou-se 1 volume de PEG para 2 volumes da solução TE com a PCR. As soluções foram completamente homogeneizadas e colocadas sob centrifugação a 10.000 g por 15 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente e descartado, e o *pellet* ressuspenso em 10 µl de tampão TE. Após este processo de purificação, as amostras foram submetidas à dosagem utilizando espectrofotômetro.

3.6 CLONAGEM E VETORES

Os produtos de PCR dos genes selecionados, após purificação, foram clonados em vetores do sistema de clonagem comercial Gateway® (Invitrogen), cuja tecnologia é baseada em recombinação utilizando seqüências sítio específicas do bacteriófago lambda (LANDY, 1989). A recombinação entre os sítios do bacteriófago lambda acontece tanto no ciclo lisogênico, entre os sítios attB e attP, resultando nos sítios attL e attR, quanto no ciclo lítico, entre os sítios attL e attR, resultando novamente nos sítios attB e attP. A enzima utilizada na reação BP na verdade é formada por uma integrase do bacteriófago lambda (Int) e um fator de integração ao hospedeiro de *E. coli* (IHF).

No presente trabalho foram utilizados o vetor de entrada pDONRTM221 (figura 3) e os vetores de destino pDESTTM17 (figura 4) e pDESTTM15 (figura 5). O vetor pDESTTM17 promove a expressão da proteína fusionada a uma cauda de 6 histidinas enquanto o pDESTTM15 promove a expressão da proteína fusionada à enzima GST (glutathione S-transferase). Os vetores, de entrada e destino escolhidos, possuem dois sítios de recombinação específicos (*attP* e *attR*, respectivamente) flanqueando um cassete gênico contendo um gene de resistência a cloranfenicol (Cm^R) e um gene para seleção negativa (*ccdB*) do clone transformado. Após a

reação de recombinação, seus cassetes são substituídos pelo gene de interesse, gerando os clones de entrada e de expressão. A seleção negativa dos vetores ocorre devido a presença do gene *ccdB* o qual codifica uma proteína (CcdB) que interfere na enzima DNA girase da *E. coli* inibindo seu crescimento.

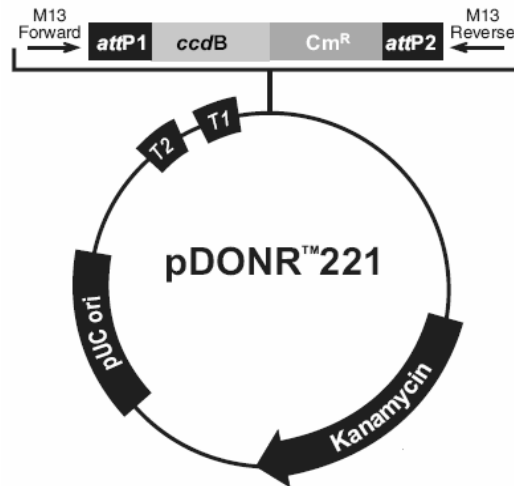


FIGURA 3 - Vetor de entrada pDONR™ 221. M13 Forward e Reverse = sítios para iniciador M13; *attP1* e *attP2* = sítio de recombinação; *ccdB* = gene para seleção negativa; *CmR* = gene de resistência a cloranfenicol; Kanamycin = gene para resistência a canamicina; pUC ori = sítio de origem de replicação; T1 e T2 = seqüência de terminação.

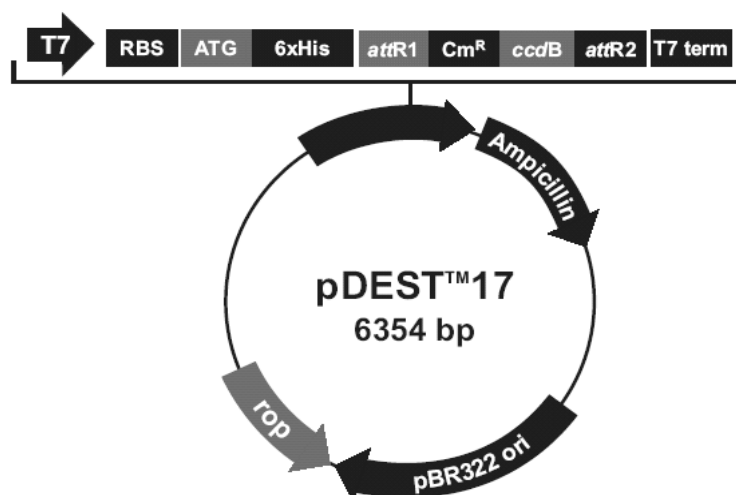


FIGURA 4 - Vetor de expressão pDEST™ 17. T7 = sítio do promotor T7; RBS = sítios de ligação de ribossomos; ATG = códono de iniciação ATG; 6xHis = seqüência codificante de seis histidinas; *attR1* e *attR2* = sítio de recombinação específica *attR1*; *CmR* = gene de resistência a cloranfenicol; *ccdB* = gene para seleção negativa; T7 term = região de terminação de transcrição T7; Ampicillin = gene para resistência a ampicilina; pBR322 ori = sítio de origem de replicação pBR322; rop = interage com a origem pBR322.

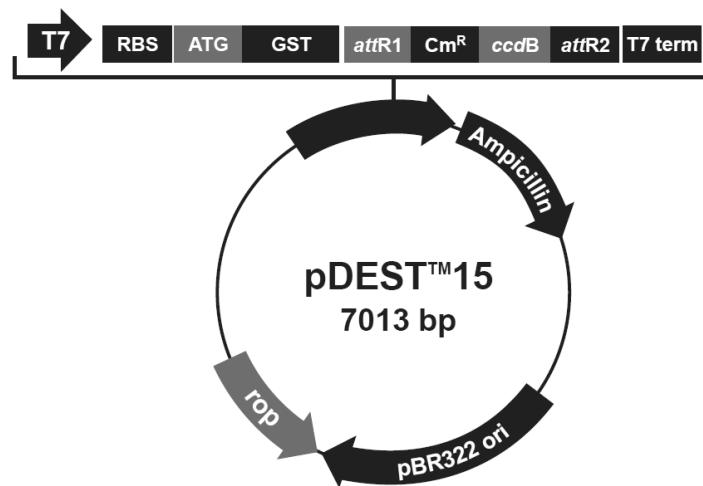


FIGURA 5 - Vetor de expressão pDEST™15. T7 = sítio do promotor T7; RBS = sítios de ligação de ribossomos; ATG = códon de iniciação ATG; GST = seqüência codificante da enzima glutationa S- transferase; *attR1* e *attR2*= sítio de recombinação específica *attR1*; CmR = gene de resistência a cloranfenicol; *ccdB* = gene para seleção negativa; T7 term = região de terminação de transcrição T7; Ampicillin = gene para resistência a ampicilina; pBR322 ori = sítio de origem de replicação pBR322; *rop* = interage com a origem pBR322.

3.6.1 Clones de entrada

Os iniciadores para a amplificação dos genes foram desenhados com uma seqüência conservada responsável pela recombinação do produto de PCR ao vetor de entrada pDONR™221. A reação de recombinação BP consistiu em acrescentar 150 ng do produto de PCR contendo o sítio *attB*, 150 ng do plasmídeo pDONR™221, 2 µl de *BP Clonase II Enzyme Mix* e completar até 8 micro litros com TE. As reações foram incubadas a 25 °C por duas horas ou mais. Após, foi adicionado 1 µl de proteinase K e a reação incubada por 10 minutos a 37 °C.

Após a recombinação do gene para o vetor de entrada foi realizada a transformação em células cálcio-competente da linhagem de *E. coli* DH5α. Acrescentou-se 1 µl da reação BP a 50 µl de células cálcio-competentes. Estas células permaneceram no gelo por 30 minutos e, em seguida, foram incubadas a 42 °C por 1 minuto, sendo colocadas novamente no gelo. Após a transformação, as células cresceram em 1 ml de meio LB por uma hora a 37 °C sob agitação de 220

rpm. Em seguida, a cultura foi plaqueada em meio LB solidificado contendo canamicina (25 µg/ml), onde permaneceram por 16 horas a 37 °C.

Para verificar a presença de clones com os insertos de interesse, as colônias foram coletadas com o auxílio de palitos de dente (*toothpick*) estéreis e transferidas para o fundo de tubos de micro centrífuga e para uma placa contendo LB solidificado com canamicina (*master plate*) para a obtenção de uma réplica das colônias. A cada um dos tubos foram acrescentados 15 µl do tampão de lise e incubados em banho-maria a 65 °C por 10 min. A análise dessas amostras foi realizada por eletroforese em gel de agarose utilizando o plasmídeo original como controle. Ao fim da eletroforese o gel foi corado com brometo de etídeo.

A partir das colônias positivas foi realizado um pré-inóculo contendo 5 ml de LB e canamicina, por 16 horas a 37 °C sob agitação (220 rpm). Após o crescimento em cultura do clone bacteriano, foi feita a purificação do plasmídeo utilizando-se o produto comercial *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen) conforme orientações do fabricante. Após a obtenção dos plasmídeos, fez-se a mensuração da concentração através do uso de espectrofotômetro e PCRs utilizando a enzima Taq DNA polimerase e os iniciadores específicos do gene. O programa utilizado foi:

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

3.6.2 Clones de expressão

Com os genes de interesse inseridos no pDONR™221, prosseguiu-se com a troca de insertos entre os plasmídeos de entrada e destino, denominada de reação LR. Foram utilizados 150 ng de pDONR contendo o gene de interesse, 150 ng do plasmídeo pDEST, 2 µl de *LR Clonase II Enzyme Mix*, completando o volume até 8 µl com TE. A reação foi incubada a 25 °C por duas horas ou mais. Após esta etapa, foi adicionado 1 µl de proteinase K e a reação incubada por 10 minutos a 37 °C.

A transformação desta recombinação foi feita em células cálcio-competentes da linhagem de *E. coli* DH5α, conforme descrito anteriormente. Após a transformação as células foram incubadas em 1 ml de meio LB por uma hora a 37

°C, e colocadas para crescer em placa de LB contendo ampicilina (100 mg/l) a 37 °C durante 16 horas.

A partir das colônias positivas foi realizado um pré-inóculo contendo 5 ml de LB e ampicilina, por 16 horas a 37 °C sob agitação (220 rpm). Após o crescimento em cultura do clone bacteriano, foi feita a purificação do plasmídeo como descrito anteriormente. Após a obtenção dos plasmídeos, fez-se a mensuração da concentração através do uso de espectrofotômetro e PCRs utilizando a enzima Taq DNA polimerase e os iniciadores específicos do gene.

Os plasmídeos com os insertos de interesse foram sequenciados usando os iniciadores para o promotor e terminador T7, respectivamente, 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' e 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'.

3.7 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS

3.7.1 Teste de expressão

As células utilizadas para esta etapa foram da linhagem de *E. coli* BL21(DE3) pLysS. A expressão das proteínas teve início com a transformação por choque térmico das células. O plasmídeo de expressão contendo o gene de interesse foi adicionado em 50 µl de células e mantidas por 30 minutos no gelo. As células foram, então, incubadas a 42 °C por um minuto voltando ao gelo. Foi acrescentado ao tubo 1 ml de meio LB, com posterior incubação a 37 °C por 1 hora, sob agitação de 220 rpm. As células foram, então, inoculadas em meio LB contendo cloranfenicol (25 mg/l) e ampicilina em uma diluição de 1/10 e deixadas sob agitação de 220 rpm a 37 °C, durante 15 horas.

Um novo inóculo com uma diluição de 1/10 em um volume final de 10 ml foi feito após as 16 horas de incubação. A densidade óptica foi monitorada, até que se obtivesse o valor de 0,6 - 0,8 a 600 nm, sendo então adicionado IPTG (1 mM) visando a indução da expressão da proteína desejada. Imediatamente antes desta etapa, foi retirada uma alíquota de 2 ml, a qual foi denominada de amostra não induzida. Esta amostra, juntamente com a cultura induzida, foi colocada sob

agitação a 37 °C por duas horas. Após duas horas de indução, a cultura foi centrifugada a 5.000 g durante 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensão em PBS 1X e novamente centrifugado nas mesmas condições. Esse passo foi repetido mais uma vez e o *pellet* foi ressuspensão em tampão de amostra 4X e colocado em banho-maria a 90 °C durante dez minutos.

A verificação da expressão foi realizada através da técnica de SDS-PAGE com diferentes concentrações de acordo com o peso molecular das proteínas, utilizando 30 mA de corrente elétrica por gel. Os géis foram corados com azul de Coomassie.

3.7.2 Teste de expressão solúvel

Os testes de expressão solúvel foram realizados com as cepas Tuner(DE3)pLysS e Rosetta-gami 2. As células TunerTM possuem uma mutação (lacY1) no gene que codifica β -galactosídeo permease, envolvida no transporte de lactose para o interior celular. Essa mutação permite a entrada de IPTG, independentemente das vias de permease, de maneira uniforme em todas as células da cultura. Isso permite que a indução com IPTG ocorra de maneira dependente da concentração. Ao ajustar a concentração de IPTG, a expressão pode ser regulada a partir de níveis de expressão muito baixa, sendo que baixos níveis de expressão podem aumentar a solubilidade de algumas proteínas.

As células Rosetta-gami 2 combinam características das células Origami 2 e Rosetta 2. Possuem mutações na tireodoxina redutase e na glutatona redutase que facilita a formação de pontes de dissulfeto no citoplasma e, conseqüentemente, permitem um arranjo da proteína apropriada, aumentando a solubilidade da mesma. Além disso, carregam pRARE2, que fornece tRNAs para sete códons raros, AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA, aprimorando a expressão de proteínas eucarióticas que contém esses códons raramente vistos em *E. coli* (Protocolo de células competentes Novagen® - www.novagen.com).

A transformação das células competentes foi realizada como descrita no item 3.7.1. Um ml de meio LB foi adicionado ao tubo e a cultura foi mantida por 1 hora a 37°C, sob agitação. As células foram, então, inoculadas em 10 ml de meio LB

contendo cloranfenicol (25 mg/l) e ampicilina para ambas as cepas bacterianas e, ainda, tetraciclina (12,5 mg/l) para a cepa Rosetta-gami 2 e deixadas sob agitação de 220 rpm a 37°C, durante 15 horas.

Um novo inóculo, com os antibióticos específicos para cada cepa bacteriana, com uma diluição de 1/10 em um volume final de 25 ml foi feito após as 16 horas de incubação. A densidade óptica da cultura foi monitorada, até que se obtivesse o valor de 0,3 - 0,4 a 600 nm. Antes da indução, as culturas foram centrifugadas por 10 minutos a 5.000 g e ressuspendidas em 25 mL de meio 2YT seletivo. Para a indução da proteína desejada foi adicionado IPTG em menor concentração final que nos outros testes (0,1 mM). Devido as propriedades de ajustar a concentração de IPTG, foi testado duas concentrações diferentes para as células Tuner(DE3)pLysS, 0,1 mM e 0,025 mM. Antes desta etapa, foi retirada uma alíquota de 2 ml, a qual foi denominada de amostra não induzida. Todas as amostras, induzidas e não induzidas, foram colocadas sob agitação a 18 °C por 20 horas. As culturas foram centrifugadas e lavadas como descrito no item 3.7.1. As células induzidas foram ressuspendidas em 500 µl de tampão de sonicação e sonicadas 4 pulsos de 15 segundos a potência 4, com intervalo de 1 minuto entre cada pulso, seguido de centrifugação a 10.000 g por 10 minutos a 4 °C. Do sobrenadante, correspondente a fração solúvel, foi retirado uma alíquota e o pellet foi ressuspendido em 500 µl de PBS 1X e retirado uma alíquota. A verificação da expressão foi realizada em gel SDS – PAGE e *Western blot*.

3.7.3 *Western-blot* para detecção da proteína recombinante usando revelação por fosfatase alcalina

A confirmação da expressão da proteína recombinante foi realizada através de um *Western blot* utilizando-se um anticorpo primário contra a proteína recombinante imobilizada em uma membrana de nitrocelulose. Para a detecção das proteínas codificadas no pDESTTM17 utilizou-se o anticorpo anti-histina, uma vez que o vetor contém uma cauda de 6 histidinas em sua extremidade N-terminal. Enquanto para as proteínas expressas no vetor pDESTTM15, as quais possuem a enzima GST fusionada, utilizou-se o anticorpo anti-GST.

Para esta etapa, preparou-se um gel de poliacrilamida e, em seguida, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose. O sistema para transferência foi preparado e imerso em tampão de transferência. Após aproximadamente 2 horas de transferência a 50 - 60 V, a membrana foi retirada e colocada em solução de *Ponceau S* para coloração reversível das proteínas transferidas. A canaleta com o marcador foi recortada e guardada para posterior comparação com o resultado do *Western blot*. A membrana foi lavada para remoção do *Ponceau S* e colocada em solução de bloqueio 5% por 1 hora.

Foram feitas três lavagens de 5 minutos com PBS-Tween 0,05%, em seguida a membrana foi incubada com o anticorpo primário por 1 hora. Novamente, foram feitas três lavagens de 5 minutos com PBS-Tween 0,05% e a membrana foi incubada com anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina (diluído 1:10.000), anti-histidina para as proteínas expressas no vetor pDEST™17 e anti-GST para as proteínas expressas no vetor pDEST™15. Após 40-60 minutos, a membrana foi lavada três vezes com PBS-Tween 0,05%. Foi preparada a solução de revelação com 10 ml de *AP-buffer*, 33 µl BCIP e 66 µl NBT e a membrana colocada para revelar, no escuro, por aproximadamente 5 minutos. Quando as bandas apareceram, a membrana foi colocada em água destilada para parar a reação.

3.7.4 Expressão em larga escala

Esta etapa visou à obtenção da proteína recombinante em quantidade suficiente para a inoculação em camundongos. O protocolo para a transformação é o mesmo descrito no item 3.6.1. Após a transformação, foi acrescentado 1 ml de LB às células, com posterior cultivo a 37 °C, por 1 hora a 220 rpm. Um pré-inóculo foi preparado a partir dessas células as quais foram cultivadas em 30 ml de meio LB seletivo contendo ampicilina (100 mg/l) e cloranfenicol (25 mg/l), deixadas sob 220 rpm de agitação, a 37 °C, durante 12 a 15 horas.

Um novo inóculo com uma diluição de 1/10 em um volume final de 300 ml foi feito após as 16 horas de incubação. As células cresceram a 37 °C sob rotação de 200 rpm até atingir a $DO_{600} = 0,6 - 0,8$ (aproximadamente 2 horas). Antes da

indução, foram retirados 2 ml de meio de cultura para ter o controle da proteína não induzida e foi, então, adicionado IPTG para concentração final 1 mM. As células cresceram a 37 °C sob rotação de 200 rpm por mais 3 horas. A cultura foi centrifugada a 5.000 g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em PBS no mesmo volume de cultura em que foi expresso e foram novamente centrifugadas a 5.000 g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado (repetiu - se este procedimento por mais uma vez).

As células não induzidas foram ressuspensas em 120 µl de tampão de amostra 4X. As células induzidas foram ressuspensas em 9 ml de tampão de sonicação e sonicadas 4 pulsos de 15 segundos a potência 8, com intervalo de 1 minuto entre cada pulso. Foram retirados 75 µl e, a essa alíquota, foi adicionado 25 µl de tampão de amostra 4X. Essa amostra corresponde ao 'lisado total', isto é, possui todas as proteínas presentes na bactéria. O restante foi centrifugado a 10.000 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo, onde foi armazenado. Do sobrenadante, foram retirados 75 µl e adicionado 25 µl de tampão de amostra 4X. Essa amostra corresponde à 'fração solúvel', isto é, possui apenas as proteínas solúveis da bactéria. O sedimento foi ressuspendido em 9 ml de tampão com uréia 2 M, sonicado novamente com 4 pulsos de 15 segundos a potência 8, com intervalo de 1 minuto entre cada pulso e centrifugado a 10.000 g por 10 minutos e teve o sobrenadante armazenado. A ressuspensão em tampão com uréia 2 M foi repetido por mais duas vezes para eliminação das impurezas e proteínas que não estão no corpúsculo e, de cada sobrenadante, foram retirados 75 µl e adicionado 25 µl de tampão de amostra 4X, correspondentes às primeira, segunda e terceira passagens por tampão de uréia 2 M. O sedimento foi ressuspendido em 9 ml de tampão com uréia 8 M, sonicado 4 pulsos de 15 segundos a potência 8, com intervalo de 1 minuto entre cada pulso e centrifugado a 10.000 g por 10 minutos e o sobrenadante armazenado. Quando formou sedimento, este foi descartado. Do sobrenadante, foram retirados 75 µl e adicionados 25 µl de tampão de amostra 4X, que corresponde à 'fração insolúvel'.

3.8 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

3.8.1 Purificação das proteínas por gel preparativo

As proteínas foram submetidas ao processo de purificação através de gel preparativo seguido de eletroeluição. Para tal propósito um gel de poliacrilamida com volume de 50 ml foi preparado e colocado em uma cuba de eletroforese própria para o gel preparativo. Foram aplicados 3 ml da proteína com 1 ml de tampão de amostra 4X. O gel foi submerso no tampão de eletroforese SDS-PAGE e submetido a uma amperagem de 30 mA por aproximadamente 15 horas. Após esse período, o gel foi incubado em solução de KCl 100 mM gelado. Na presença de KCl gelado, o SDS presente nas amostras (associado às proteínas) precipita e as bandas das proteínas tornam-se visíveis, permitindo a excisão da banda desejada do gel. A banda correspondente foi cortada do gel e colocada em uma membrana de diálise, juntamente com aproximadamente 1 ml de tampão de corrida SDS-PAGE para remover a proteína do gel.

A membrana foi colocada em uma cuba de eletroforese horizontal, em sentido transversal, com tampão de corrida SDS-PAGE e submetida a uma tensão de 60 V por 2 horas. Os pólos da cuba foram invertidos, permanecendo por mais 1 minuto sob tensão de 60 V. As proteínas, então, ficavam em solução a qual foi coletada e armazenada.

3.8.2 Purificação das proteínas em colunas contendo resina NiNTA-Agarose (Qiagen)

Para a purificação da proteína em colunas contendo resina NiNTA-Agarose (Qiagen), cerca de 1 ml de proteína recombinante foi incubado por 2 horas, a 4 °C com 100 µl de resina NiNTA-Ag previamente equilibrada com tampão de lise de bactérias. Após incubação, as amostras foram centrifugadas a 600 g por 60 segundos e uma alíquota foi retirada do sobrenadante (não ligado). A resina foi

lavada 3 vezes com 500 µl de tampão de lavagem com imidazol. Após as lavagens, 500 µl de tampão de eluição foi adicionado nas amostras e incubadas sob agitação por 30 minutos a 4 °C. As amostras foram centrifugadas a 600 g por 60 segundos, uma alíquota foi retirada do sobrenadante (eluído) e a resina foi separada.

3.8.3 Quantificação da proteína purificada

Para a quantificação das proteínas purificadas, foi utilizado o Qubit™ Fluorometer (Invitrogen), conforme orientações do fabricante. A plataforma de quantificação do Qubit utiliza corantes fluorescentes específicos para DNA, RNA ou proteínas, evitando a contaminação por outras macromoléculas.

3.9 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS

3.9.1 Inoculações em camundongos

Para a produção de anticorpos, as proteínas de interesse foram inoculadas em camundongos da linhagem Swiss em duplicata. Antes de iniciar a inoculação foram coletados cerca de 100 µl de sangue de cada camundongo, para verificar se os camundongos não apresentavam anticorpos capazes de reconhecer a proteína de interesse.

Para a primeira inoculação foram utilizados, para cada camundongo, 50 µg de proteína as quais foram diluídas em solução salina 0,9% e adjuvante de Freund completo. As inoculações foram realizadas em intervalos de duas semanas e aplicado pela via intraperitoneal. Para a segunda, terceira e quarta inoculações foram preparados 20 µg de proteína, 75 µl de hidróxido de alumínio (Alu-Gel-S) e quantidade suficiente de solução salina 0,9% para 200 µl. Sete dias após a quarta

inoculação, uma amostra de aproximadamente 100 µl de sangue da cauda de cada camundongo foi coletada para verificar se houve produção de anticorpos contra a proteína inoculada. Caso a quantidade de anticorpos produzidos tivesse sido pequena, mais duas inoculações seriam repetidas da mesma forma e no mesmo intervalo de tempo.

Os camundongos foram sacrificados por punção cardíaca 7 dias após a última inoculação. Para tal, eles foram sedados com uma solução anestésica contendo 10 mg/ml de cetamina e 1 mg/ml de xilazina. O sangue retirado foi incubado por 10 minutos a 37 °C seguido de uma incubação no gelo por 5 minutos, posteriormente foi centrifugado a 3000 g por 5 minutos. O sobrenadante (soro) foi aliqotado e armazenado a -20 °C.

A verificação da qualidade dos soros obtidos, ou seja, se os anticorpos produzidos pelos camundongos eram específicos no reconhecimento tanto da proteína recombinante inoculada, quanto da proteína presente no *T. cruzi*, foi realizada através da técnica de *Western blot*, como descrito 3.7.3. utilizando como substrato as proteínas recombinantes e as proteínas nativas do extrato de *T. cruzi*.

3.9.2 Purificação dos anticorpos

Para a purificação dos anticorpos, foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida 15% para as proteínas com 12 kDa e 10% para as proteínas com cerca de 50 kDa, com 100 µg da proteína purificada, sendo transferido para uma membrana de nitrocelulose. Após ser corada com *Ponceau S*, a membrana foi recortada de modo que apenas a região da membrana contendo a proteína fosse colocada para bloquear em solução de bloqueio 5% por uma hora. Após três lavagens de cinco minutos com PBS-Tween 0,05%, a membrana foi colocada para incubar em solução contendo o soro do camundongo com aproximadamente 20 µl do extrato de proteínas da bactéria *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Após duas horas sob agitação, a membrana foi lavada e, então, colocada em um recipiente com 500 µl de glicina 0,2 M pH 2,5, agitando-se manualmente por dois minutos. A solução de glicina com os anticorpos eluídos foi retirada deste recipiente e colocada em outro,

com 50µl de Tris base 1 M pH 9,5 para neutralizar a solução. Para evitar a formação de complexos entre os anticorpos, adicionou-se 5 µl de BSA.

3.10 TRANSFEÇÃO EM *T. CRUZI* COM O GENE INSERIDO NO VETOR pTcPR-GFPN

3.10.1 Clonagem do gene para o vetor pTcPR-GFPN

O vetor pTcPR-GFPN (figura 6), desenvolvido pelo nosso grupo, permite a expressão de proteínas recombinantes fusionadas a GFP, no *T. cruzi*, para ensaios de localização celular. O vetor pTcPR-GFPN foi derivado do vetor pTcPRHisN, com substituição da seqüência N-terminal das seis histidinas pelo gene da proteína GFP (BATISTA, 2008).

Por ter sido baseado na plataforma Gateway[®], o vetor pTcPR-GFPN, assim como o vetor de expressão pDEST, contém os sítios *attR1* e *attR2* que permite a recombinação com os sítios *attL1* e *attL2* presentes no vetor de entrada. Portanto a recombinação do vetor de entrada para o vetor pTcPR-GFPN foi realizada da mesma forma que a recombinação para o vetor pDEST (item 3.6.2). A transformação em célula cálcio-competente e a confirmação dos clones com o inserto de interesse foram realizadas como descrito no item 3.6.1

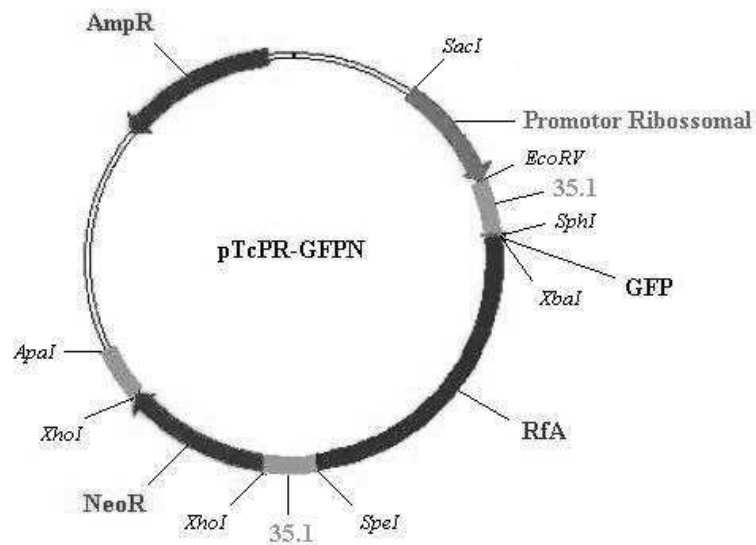


FIGURA 6 - Esquema do vetor de destino pTcPR-GFPN. A figura mostra o plasmídeo com o promotor ribossomal 18S de *T. cruzi*, o cassete RfA, o gene de resistência à ampicilina (AmpR), neomicina fosfotransferase (NeoR), as regiões intergênicas e a sequência codificadora para a GFP. (modificado de BATISTA, 2008).

3.10.2 Transfecção em *T. cruzi*

Para a transfecção de cada gene foram utilizados 4×10^7 parasitas. Esses parasitas foram lavados com PBS 1X estéril, centrifugados por 5 minutos a 5.000 g e ressuspensos em 400 μ l de tampão de eletroporação. Os parasitas foram transferidos para uma cubeta pré-resfriada na qual foram adicionados 15 μ g do plasmídeo. Para a transfecção foram realizados 2 pulsos de 450V, 500 μ F e, imediatamente depois, as cubetas foram novamente incubadas no gelo por 10 minutos. Para o controle, foi utilizada uma cultura sem a adição dos plasmídeos. Os parasitas já transfectados foram incubados a 28 °C em 10 ml de meio LIT contendo 10.000 UI de penicilina e 100 μ g/ml de estreptomicina. Vinte quatro horas após a transfecção, o antibiótico G418 (concentração final de 250 μ g/ml) foi adicionado às culturas para seleção das células que receberam o vetor pTcPR-GFPN contendo o gene de interesse. Após 72 horas em cultura, a concentração de G418 foi aumentada para 500 μ g/ml. Após a seleção dos parasitas, a cada 3 a 5 dias foram realizadas a contagem e a passagem das culturas, com a finalidade de manter a densidade celular em torno de 1×10^6 parasitas/ml.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SELEÇÃO DOS GENES

O objetivo geral deste projeto é aprofundar a caracterização da família das FKBP's de *Trypanosoma cruzi*. Para tal propósito, foram selecionados 9 genes de FKBP's (Tabela 2) para o presente trabalho, dos 10 genes identificados. O gene TcMip (*macrophage infectivity potentiator*) faz parte de outro projeto do nosso grupo que está em andamento.

TABELA 2 - Listagem de genes codificadores de FKBP's de *T. cruzi*.

Nomenclatura interna	Gene	Tamanho (pares de base)	Peso molecular (kDa)	Anotação no Genedb
B06	Tc00.1047053506581.14	330	12	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative
B07	Tc00.1047053511301.70	1281	48,3	peptidyl-prolyl isomerase-like, putative
B08	Tc00.1047053508323.84	339	12,1	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative
B09	Tc00.1047053511295.10	960	35,7	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative
B10	Tc00.1047053508209.39	726	27,7	hypothetical protein, conserved
B11	Tc00.1047053510593.40	1143	41,7	hypothetical protein, conserved
B12	Tc00.1047053511491.20	3351	124,8	hypothetical protein, conserved
C01	Tc00.1047053507629.39	2511	92,7	hypothetical protein, conserved
A03	Tc00.1047053511731.89	3027	113,7	hypothetical protein, conserved
G12	Tc00.1047053508897.110	591	21,1	macrophage infectivity potentiator, precursor putative PPIase,

NOTA: Nomenclatura corresponde ao nome interno, Gene corresponde ao nome registrado no banco de dados <http://www.genedb.org>.

A partir do sequenciamento do genoma de *T. cruzi* foi possível identificar os genes codificadores de FKBP's. Cinco genes estão anotados como PPIase e apresentam o domínios de FKBP (FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase). Foi realizada uma análise de similaridade e busca por domínios através da qual foi possível enquadrar mais cinco genes na família das FKBP's, anotados como proteínas hipotéticas. Dentre essas proteínas hipotéticas, apenas uma (C01) possui

E-value baixo, comparável à proteína B09 anotada como FKBP. No entanto, a proteína B12, que possui um alto valor de E-value em *T. cruzi*, possui o domínio FKPD em *T. brucei*. Diante disso, selecionamos todos os genes que apresentavam o domínio FKBD, mesmo com altos valores de E-value. Esses valores são observados na tabela 3.

O gene B07 possui o domínio TPR, de interação proteína-proteína, e o gene B10, anotado como proteína hipotética, possui o domínio RRM, de interação com RNA. Os domínios para cada proteína podem ser verificados na tabela abaixo, os quais foram retirados do banco de famílias protéicas PFAM.

TABELA 3 - Análise dos domínios das proteínas selecionadas neste projeto através do banco de famílias protéicas PFAM

Nome interno	Description	Entry type	Envelope		HMM		Bit score	E-value
			Start	End	From	To		
B06	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Domain	11	106	2	96	93.9	3.6e-27
B07	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Domain	50	144	1	96	102.2	9e-30
	Tetratricopeptide repeat	Repeat	280	312	6	31	12.2	0.1
	Tetratricopeptide repeat	Repeat	362	395	1	33	16.4	0.0048
B08	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Domain	15	109	1	96	98.4	1.4e-28
B09	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Domain	179	270	10	94	26.7	3.4e-06
B10	RNA recognition motif (a.k.a. RRM, RBD, or RNP domain)	Domain	25	95	4	68	19.8	0.00036
	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Domain	69	91			5.1	1.6
B11	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Domain	252	261			4.6	2.3
B12	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Domain	126	227			-26.3	2.5
C01	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Domain	206	310	6	90	26.4	4.2e-06
A03	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Domain	129	268	1	74	14.0	0.031
G12	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Domain	76	168	1	96	84.6	2.8e-24

NOTA: Nome corresponde ao nome interno; Description: descrição do domínio; Entry type: tipo de domínio encontrado; Envelope: tamanho das sequencias; HMM: região modelo utilizado pelo programa; Bit score e E-value: valores estatísticos que demonstram a chance do alinhamento ter ocorrido ao acaso.

Através de uma busca de FKBP's ortólogos em *T. brucei* identificamos cinco genes anotados como PPIase que possuem o domínio de FKPB e cinco genes anotados como hipotéticos sendo que dois possuem o domínio de FKBP.

TABELA 4 - Listagem de genes codificadores de FKBP's de *T. brucei*.

Nome interno <i>T. cruzi</i>	Gene em <i>T. brucei</i>	Anotação no Genedb	PFAM
B06	Tb10.70.2600*	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
B07	Tb10.61.0180*	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase/ Tetratricopeptide repeat
B08	Tb927.7.3420*	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
B09	Tb927.10.15600	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, conserved/ putative	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
B10	Tb927.7.1390	hypothetical protein, conserved	
B11	Tb927.4.5110	hypothetical protein, conserved	
B12	Tb927.6.1730	hypothetical protein, conserved	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase**
C01	Tb11.02.1000	hypothetical protein, conserved	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
A03	Tb927.6.4550	hypothetical protein, conserved	
G12	Tb10.61.0760*	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, conserved/putative	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase

NOTA: Nomenclatura corresponde ao nome interno dos genes em *T. cruzi*. Gene corresponde ao nome registrado no banco de dados <http://www.genedb.org>. * genes codificadores de FKBP's identificados no trabalho de Brasseur (2009). **Dados retirados do banco de dados <http://www.genedb.org>.

Na tabela 4 podemos verificar que o gene Tb927.10.15600 está anotado como FKBP e possui o domínio de FKBP apesar de não ter sido identificado no trabalho de Brasseur (2009). Assim como em *T. cruzi* (gene B07), o gene Tb10.61.0180 possui o domínio de interação proteína - proteína (TPR). Vários estudos têm demonstrado que esse domínio serve como sítio de ligação para chaperonas, como Hsp90, e auxilia na modulação da atividade das proteínas (Davies e Sánchez, 2005; Barik, 2006; Kang *et al*, 2008). Os genes anotados como hipotéticos possuem ortólogos igualmente hipotéticos. O gene A03, proteína

hipotética, apresenta o domínio de FKBP, porém seu ortólogo em *T. brucei* não apresenta esse domínio.

4.2 AMPLIFICAÇÕES DOS GENES

As ampliações dos genes selecionados foram realizadas a partir do DNA genômico do parasita conforme descrito no item 3.4. Após a amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose, como mostra a figura 7.

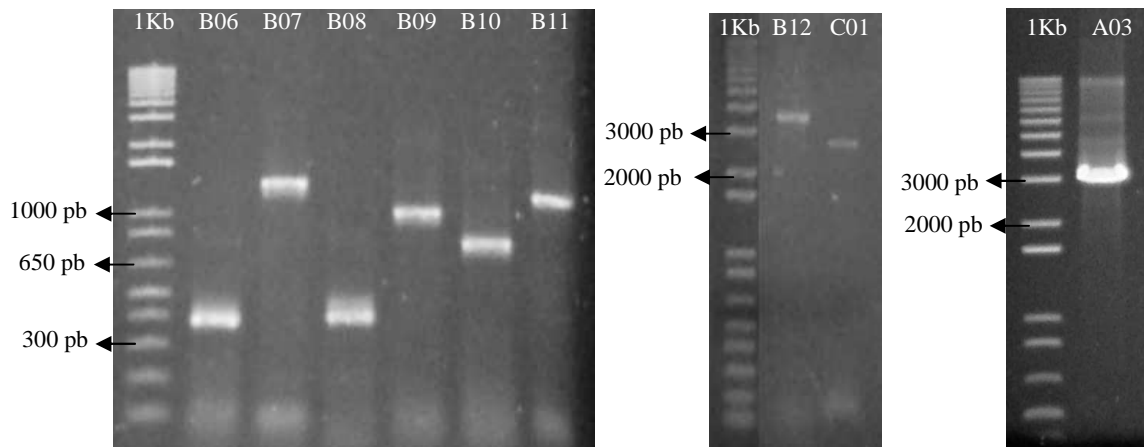


FIGURA 7 –Gel de agarose com resultado das ampliações. Genes: B06 (330pb), B07 (1281pb), B08 (339pb), B09 (960pb), B10 (726pb), B11 (1143pb), B12 (3351pb), C01 (2511pb) e A03 (3027pb). Legenda: 1 Kb = marcador de DNA para comparação do tamanho das seqüências amplificadas; pb = pares de bases de nucleotídeos.

4.3 OBTENÇÃO DE CLONES DE ENTRADA.

Após a purificação das sequências amplificadas, os produtos de PCR foram recombinados no vetor de entrada pDONRTM221, como descrito anteriormente. Para verificar a presença de clones com os insertos de interesse, foi realizada a técnica *toothpick*.

Cerca de 50 colônias foram testadas, mas nenhuma positiva foi encontrada para os genes C01 e B12. Os dois genes foram novamente recombinados no vetor de entrada e cerca de 50 colônias foram testadas, todas com resultado negativo na

técnica *toothpick*. Verificou-se, então, que a amplificação dos genes através da PCR não apresentou um resultado satisfatório, uma vez que as bandas apresentaram baixa intensidade (figura 7). Partiu-se para uma nova amplificação dos genes com resultado satisfatório, seguida da purificação dos produtos de PCR, como mostra a figura 8, e recombinação para o vetor de entrada.

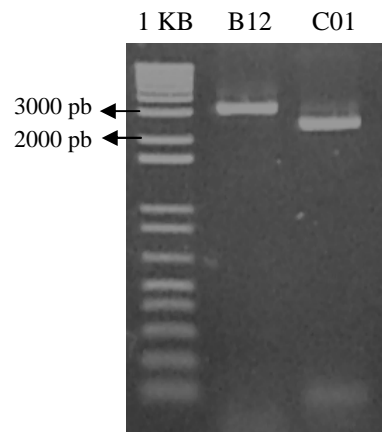


FIGURA 8 - Gel de agarose com resultado da purificação das amplificações dos genes B12 (3351pb) e C01 (2511pb). Legenda: 1 Kb = marcador de DNA para comparação do tamanho das seqüências amplificadas; pb = pares de bases de nucleotídeos.

Todos os nove genes foram inseridos no vetor de entrada pDONRTM221. Após a purificação dos plasmídeos, foi realizado uma PCR para confirmar a presença do inserto (figura 9).

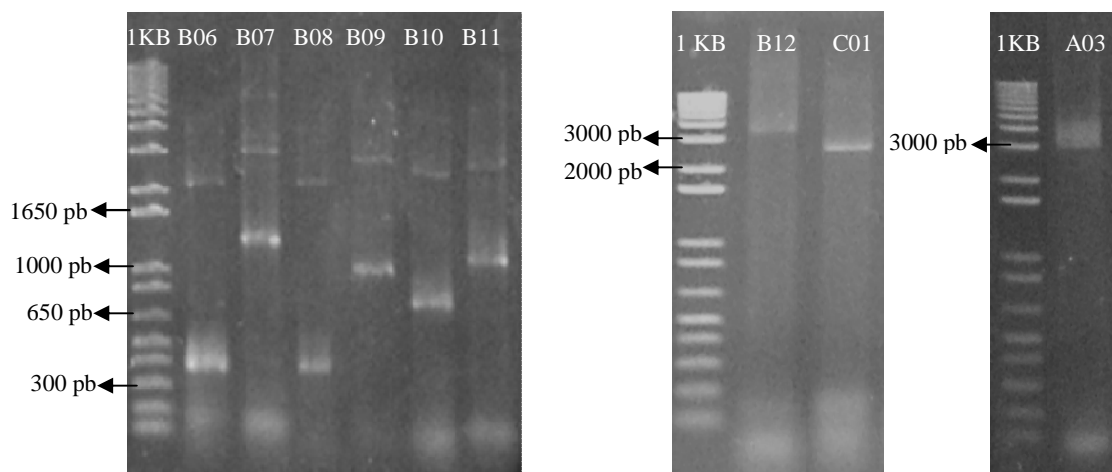


FIGURA 9 - Gel de agarose da amplificação dos genes de interesse após inserção no vetor pDONRTM221. Genes: B06 (330pb), B07 (1281pb), B08 (339pb), B09 (960pb), B10 (726pb), B11 (1143pb), B12 (3351pb), C01 (2511pb) e A03 (3027pb). Legenda: 1 Kb = marcador de DNA para comparação do tamanho das seqüências amplificadas; pb = pares de bases de nucleotídeos.

Com o resultado da PCR positivo, partiu-se para a próxima etapa – recombinação para o vetor de expressão. Caso o resultado desse negativo, a amostra da solução de plasmídeo era descartada e uma nova miniprep era efetuada a partir de outra colônia positiva.

4.4 OBTENÇÃO DE CLONES DE EXPRESSÃO

A plataforma Gateway® permite, de maneira rápida e eficiente, mover seqüências de DNA entre múltiplos sistemas vetoriais para caracterização, análise funcional e expressão protéica. A partir da obtenção dos clones de entrada (pDONR™221), é possível inseri-los em diversas plataformas. Um dos vetores de expressão utilizados neste projeto foi o pDEST™17 que é apropriado para a expressão heteróloga da proteína de interesse em *E. coli*, fusionada a uma seqüência de seis histidinas em sua extremidade N-terminal.

Todos os genes foram inseridos no vetor pDEST™17, como verificado na figura 10 com o resultado da amplificação dos genes inseridos no vetor.

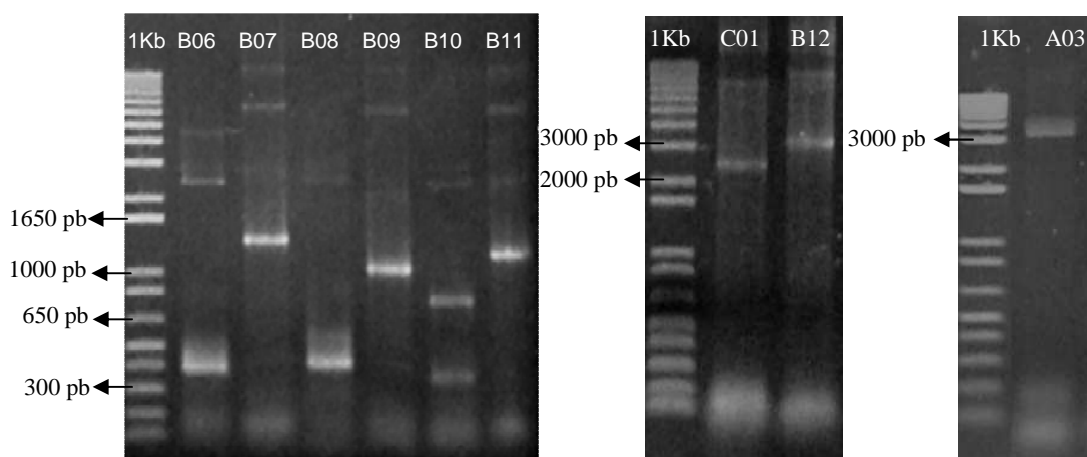


FIGURA 10 - Gel de agarose da amplificação dos genes de interesse após inserção no vetor pDEST™17. Genes: B06 (330pb), B07 (1281pb), B08 (339pb), B09 (960pb), B10 (726pb), B11 (1143pb), B12 (3351pb), C01 (2511pb) e A03 (3027pb). Legenda: 1 Kb = marcador de DNA para comparação do tamanho das seqüências amplificadas; pb = pares de bases de nucleotídeos.

É possível verificar, na figura acima, a presença de duas bandas na amplificação do gene B10 inserido no vetor pDESTTM17. Devido a este fato, o vetor pDONRTM221 contendo o gene B10 foi sequenciado com a finalidade de identificar possíveis erros que possam ter ocorrido de maneira tal que a recombinação para o vetor pDESTTM17 não ocorreu de maneira satisfatória acarretando no aparecimento dessas duas bandas. Após a análise do sequenciamento, no qual verificamos que o gene foi clonado corretamente, uma nova recombinação para o vetor pDESTTM17 foi realizada. A confirmação da purificação do plasmídeo contendo o gene B10 foi realizada por PCR, como mostra a figura 11 onde o gene B10 apresenta apenas uma banda no tamanho esperado.

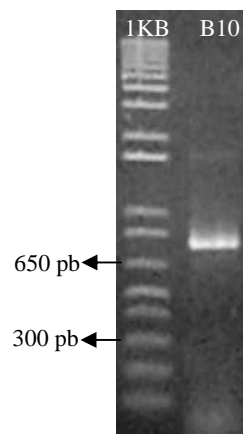


FIGURA 11 - Gel de agarose da amplificação do gene B10 inserido no vetor pDESTTM17 purificado por miniprep. Nesta amplificação o gene B10 (726pb) apresenta apenas uma banda com o tamanho esperado.

A recombinação dos genes inseridos no vetor de entrada para o vetor pDESTTM15 foi realizada para todos os nove genes. A figura 12 mostra o resultado da amplificação dos genes de interesse inseridos no vetor de expressão pDESTTM15.

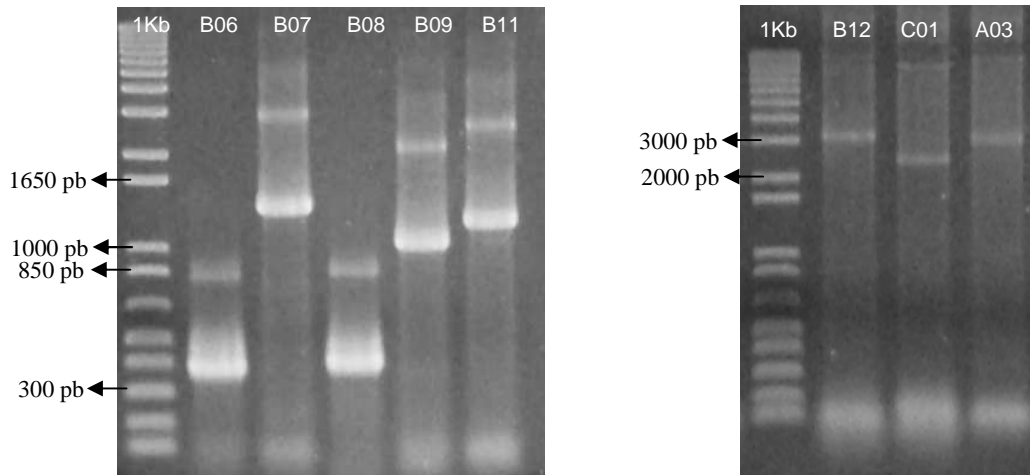


FIGURA 12 - Gel de agarose da amplificação dos genes de interesse após inserção no vetor pDESTTM15. Genes: B06 (330pb), B07 (1281pb), B08 (339pb), B09 (960pb), B11 (1143pb), B12 (3351pb), C01 (2511pb) e A03 (3027pb). Legenda: 1 Kb = marcador de DNA para comparação do tamanho das seqüências amplificadas; pb = pares de bases de nucleotídeos.

Para o vetor contendo o gene B10, após duas tentativas, não houve crescimento algum na placa contendo LB solidificado, onde a cultura foi plaqueada após a transformação. Uma nova recombinação foi efetuada e, apesar do aparecimento de colônias na placa, nenhum clone positivo foi encontrado.

Todos os genes clonados no vetor pDESTTM17 e pDESTTM15 foram submetidos ao sequenciamento. Os genes de maior tamanho não foram sequenciados por completo, apenas suas extremidades, devido ao longo comprimento. Apesar da alteração de alguns aminoácidos devido à mudança de algumas bases, essas modificações não alteraram o quadro de leitura, que poderia levar a formação de códons de parada impedindo a expressão protéica. A mudança de alguns nucleotídeos ocasionou mutações sinônimas e não sinônimas, além da mudança de alguns aminoácidos com mesma função protéica. A frequência dessas modificações foi proporcional ao tamanho molecular das seqüências.

Através da análise dos resultados obtidos, observou-se que os fragmentos clonados, amplificados da cepa Dm28c, compartilham 97-98% de identidade na sua seqüência nucleotídica com seus respectivos genes da cepa CL Brener.

4.5 TESTE DE EXPRESSÃO

Os nove genes inseridos no vetor de expressão pDESTTM17 foram submetidos ao teste de expressão com a cepa bacteriana BL21(DE3)pLysS. Os genes B06, B07, B11, C01 e A03 expressaram a proteína correspondente no teste realizado a 37 °C. Os genes B08 e B09 foram submetidos a novas condições de expressão e expressaram a proteína correspondente apenas a 25 °C.

Como é possível verificar na figura 13, com o resultado do teste de expressão, as proteínas foram expressas na fração não induzida. Devido à cauda de 6 histidinas inserido na extremidade N-terminal do vetor pDESTTM17 há um acréscimo de 2,7 kDa no peso molecular das proteínas. Além disso, os primers específicos para a amplificação dos genes não contêm códon de parada que leva a um acréscimo 3,6 kDa no final do gene, totalizando mais de 6 kDa de adição no peso molecular na proteína recombinante, como verificado no gel SDS – PAGE da figura 13.

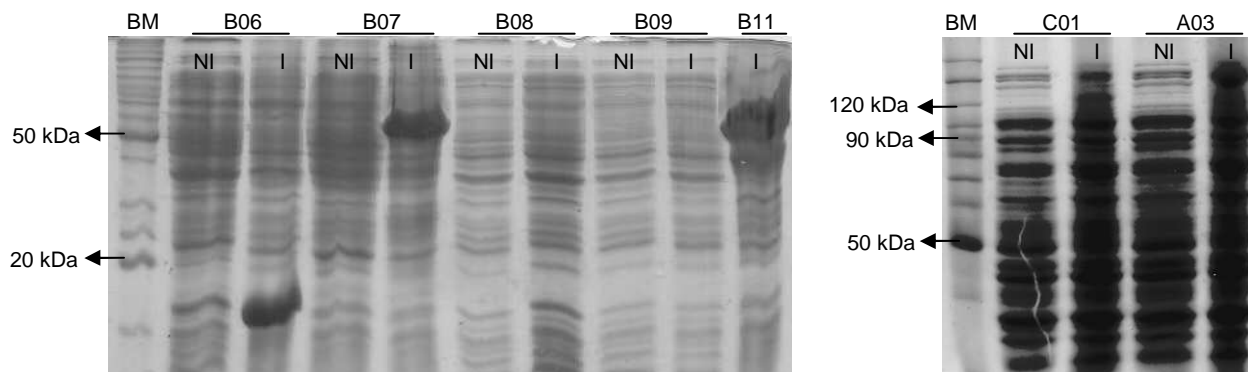


FIGURA 13 - Gel SDS - PAGE 13% do teste de expressão das proteínas recombinantes. Teste a 37 °C: B06(12 kDa), B07 (48,3 kDa), B11 (41,7 kDa), C01 (92,7 kDa), A03 (113,7 kDa) e a 25 °C: B08 (12 kDa), B09 (35,7 kDa). Legenda: BM = perfil de corrida do padrão de massa molecular BenchMark (Invitrogen) a ser comparado ao esperado para as proteínas recombinantes. NI = fração não-induzida. I = fração induzida.

As proteínas B08 e B09 foram expressas em baixos níveis e a confirmação da expressão só pode ser observada através de *Western blot*. A figura 14 mostra a confirmação da expressão de todas as proteínas recombinantes. Neste ensaio foi

utilizado um anticorpo anti-histidina contra a proteína recombinante imobilizada em uma membrana de nitrocelulose, já que as proteínas codificadas no pDESTTM17 contêm uma cauda de 6 histidinas em sua extremidade N-terminal.

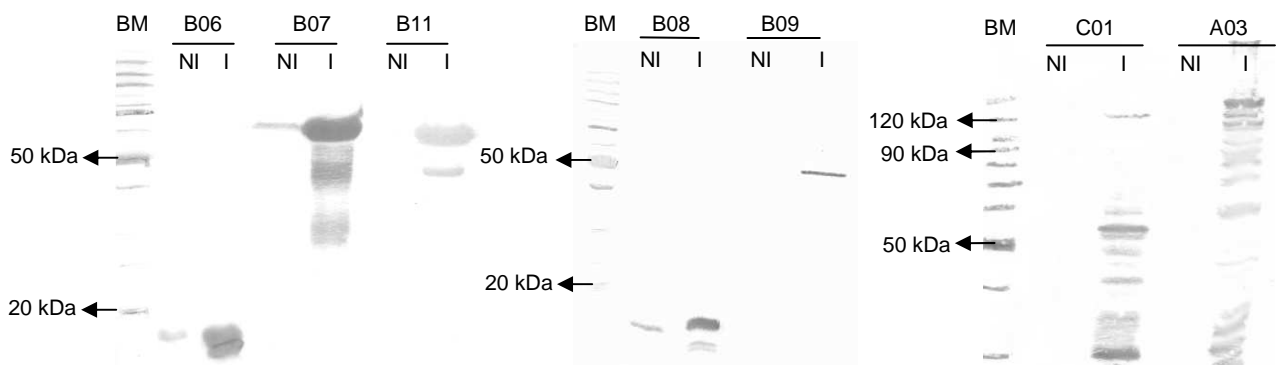


FIGURA 14 – *Western blot* do teste de expressão com anti-histidina. Proteínas: B06(12 kDa), B07 (48,3 kDa), B08 (12 kDa), B09 (35,7 kDa), B11 (41,7 kDa), C01 (92,7 kDa) e A03 (113,7 kDa). Legenda: BM = marcador de massa molecular *benchmark*. NI = fração não-induzida. I = fração induzida.

As proteínas C01 e A03 apresentaram um perfil de degradação na figura 14. Para evitar a degradação, um novo teste de expressão foi realizado, juntamente com o gene B12, utilizando o inibidores de proteases PMSF (1 mM) antes de acrescentar o tampão de amostra 4X. Esse teste foi realizado com duas temperaturas de indução, 37 °C e 25 °C. O perfil de degradação foi verificado nas frações induzidas da proteína B12 para as duas temperaturas, figura 15. Entretanto, não houve a aparecimento de bandas no *Western blot* para a confirmação de expressão das proteínas C01 e A03.

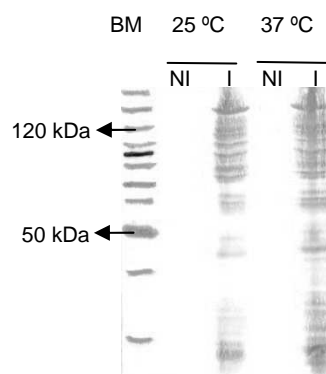


FIGURA 15 – *Western blot* do teste de expressão da proteína B12 com inibidor de protease PMSF. Proteínas: B12 (124,8 kDa). Legenda: BM = marcador de massa molecular *benchmark*. NI = fração não-induzida. I = fração induzida.

Várias abordagens têm por objetivo aumentar a solubilidade de proteínas como o uso de vetores fusionados a enzima GST, tal como o vetor pDESTTM15, mutações em cepas bacterianas, como Tuner(DE3)pLysS e Rosetta-gami 2, que permitem o ajuste da concentração de IPTG regulando a expressão em níveis baixos, mutações que facilitam a formação de pontes dissulfeto no citoplasma e expressão de códons raros.

Como parte da caracterização das FKBP_s, os ensaios bioquímicos visam definir a existência de atividade de chaperona e os domínios envolvidos nesta atividade bem como verificar a interação dessas proteínas com as drogas. Visando obter a proteína na fração solúvel para tais experimentos, o teste de expressão como descrito no item 3.7.1 foi realizado com os genes B06, B08 e B09 inseridos no vetor pDESTTM15. É possível verificar na figura 16 a expressão das proteínas fusionadas ao GST na fração solúvel.

Como o vetor pDESTTM15 promove a expressão da proteína fusionada à enzima GST (glutathione S-transferase) há um acréscimo de aproximadamente 26 kDa de massa molecular. Portanto, o tamanho de ~40 kDa para as proteínas B06 e B08 e de ~64 kDa para a proteína B09 apresentadas na figura 16 está de acordo com a massa molecular prevista para a proteína fusionada a GST.

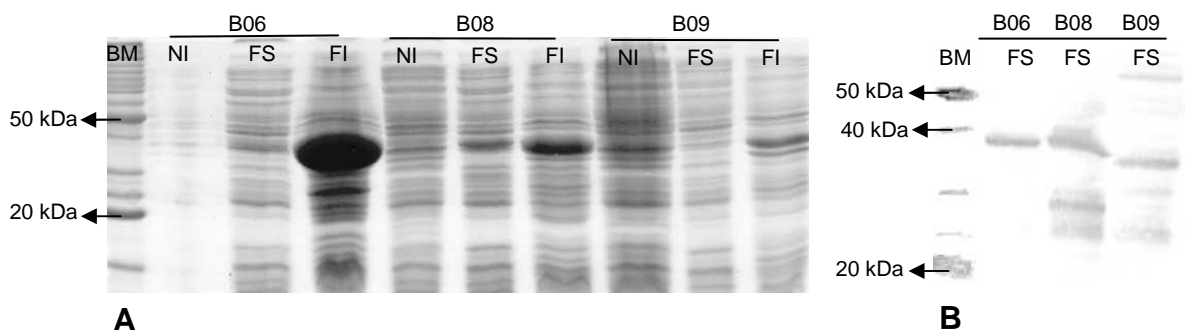


FIGURA 16 – Gel SDS – PAGE (A) e *Western blot* (B) anti-GST do teste de expressão solúvel das proteínas fusionadas a GST (pDESTTM15). Proteínas: B06 (12 kDa), B08 (12 kDa) e B09 (35,7 kDa). Legenda: BM = marcador de massa molecular *benchmark*. NI = fração não-induzida. FS: fração solúvel. FI = fração insolúvel.

Na tentativa de expressar a proteína recombinante na forma nativa sem a fusão da enzima GST realizamos alguns testes com modificações no protocolo com os genes inseridos no vetor pDESTTM17. Os testes foram realizados com as cepas

Tuner(DE3)pLysS e Rosetta-gami 2 como descrito no item 3.7.2. com os genes B06, B07, B09 e B10. Em nenhum deles houve a expressão da proteína na fração solúvel, como esperado. Este mesmo teste foi realizado com o gene B07 inserido no vetor pDESTTM15. A proteína solúvel correspondente foi expressa no teste realizado com as células Tuner(DE3)pLysS induzidas com 0,1 mM de IPTG, como mostra a figura 17.

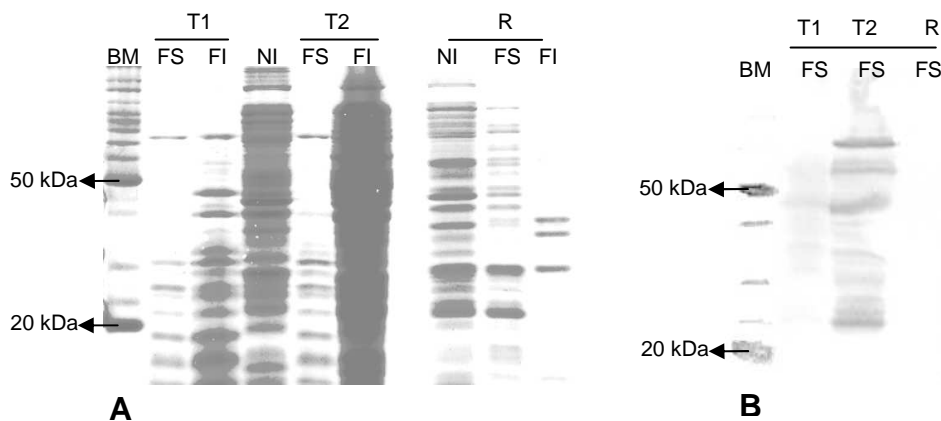


FIGURA 17 - Gel SDS – PAGE (A) e *Western blot* (B) anti-GST do teste de expressão solúvel da proteína B07 (48,3 kDa) fusionada a GST (pDESTTM15). Legenda: BM = marcador de massa molecular *benchmark*. NI = fração não-induzida. FS: fração solúvel. FI = fração insolúvel. T1 = Célula Tuner(DE3)pLysS induzida com 0,025 mM de IPTG. T2 = Célula Tuner(DE3)pLysS induzida com 0,1 mM de IPTG. R = Célula Rosetta-gami 2.

Os resultados obtidos não foram como o esperado uma vez que a tentativa de utilizar outras cepas bacterianas para expressão da proteína solúvel só foi verificado para um dos cinco genes testados. Além disso, o gene foi expresso fusionada a enzima GST. Esse resultado corrobora com outros trabalhos onde várias abordagens são utilizadas na tentativa de se obter a proteína na fração solúvel (Park *et al.*, 2008, Hammarstrom *et al.*, 2006). Para tanto, novas testes serão realizados com as cepas Tuner(DE3)pLysS e Rosetta-gami 2 para os genes inseridos no vetor pDESTTM17 que não foram testados. Caso o resultado obtido seja negativo, esses genes serão testados a partir do pDESTTM15 com as cepas BL21(DE3) pLysS, Tuner(DE3)pLysS e Rosetta-gami 2.

4.6 EXPRESSÃO EM LARGA ESCALA

Esta etapa tem por objetivo a obtenção das proteínas que serão inoculadas em camundongos, para obtenção de anticorpos policlonais. As cinco proteínas que apresentaram resultado positivo no teste de expressão foram expressas em larga escala. Na figura 18 é possível verificar as 6 frações, descritas no item 3.7.4, obtidas nesta etapa.

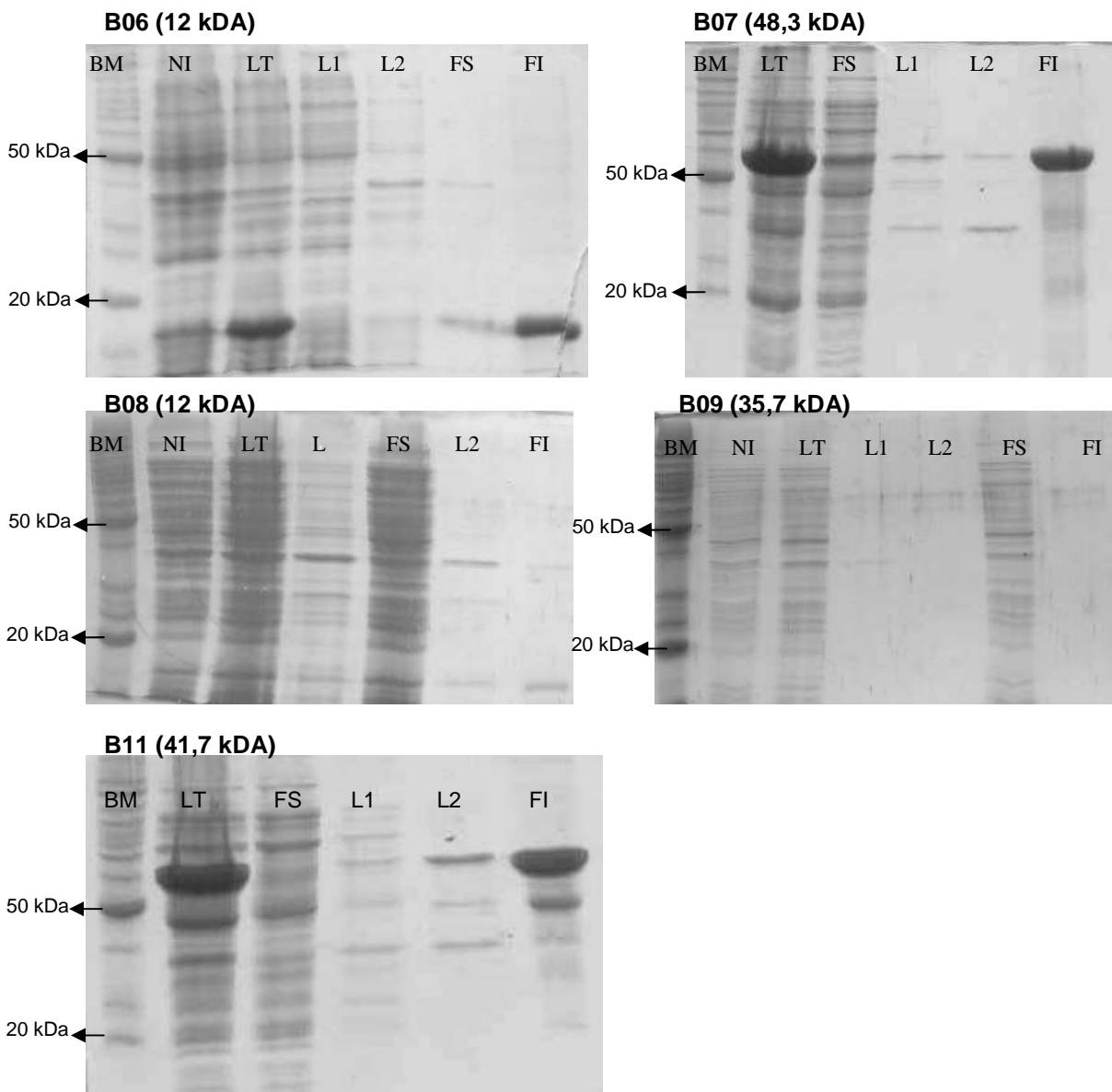


FIGURA 18 - Gel SDS-PAGE da expressão em larga escala. Proteínas: B06(12 kDa), B07 (48,3 kDa), B08 (12 kDa), B09 (35,7 kDa) e B11 (41,7 kDa) Legenda: BM = marcador de massa molecular BenchMark. NI = fração não-induzida. LT = lisado total. L1 = lavado 1. L2 = lavado 2. FS = fração solúvel. FI = fração insolúvel.

A confirmação da expressão da proteína recombinante na fração solúvel ou insolúvel foi realizada através de um *Western blot* utilizando-se um anticorpo anti-histidina contra a proteína recombinante, como mostra a figura 19.

Após várias lavagens realizadas durante a expressão em larga escala, o padrão de bandas encontrado no gel SDS – PAGE foi muito semelhante ao verificado no *Western blot* para as proteínas B06, B07, B08 e B11, figura 19. Nos dois experimentos é possível verificar apenas a proteína recombinante na fração insolúvel. Diante desse resultado, o próximo passo realizado foi a inoculação em camundongos, a partir da fração insolúvel, para a produção de anticorpos.

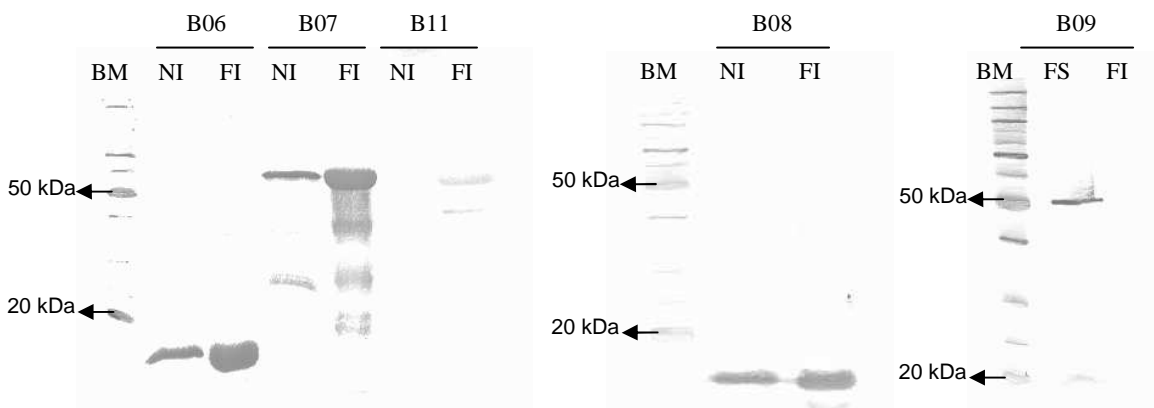


FIGURA 19 – *Western blot* anti-histidina para confirmação da expressão das proteínas recombinantes. B06(12 kDa), B07 (48,3 kDa), B08 (12 kDa) e B11 (41,7 kDa) na fração insolúvel e da proteína B09 (35,7 kDa) na fração solúvel. Legenda: BM = marcador de massa molecular *benchmark*; NI = fração não-induzida; I = fração induzida; FI = fração insolúvel; FS = fração solúvel.

A figura 20 confirma a expressão das proteínas B07, B08 e B09 na fração solúvel a partir do pDESTTM17 na célula BL21(DE3) pLysS.

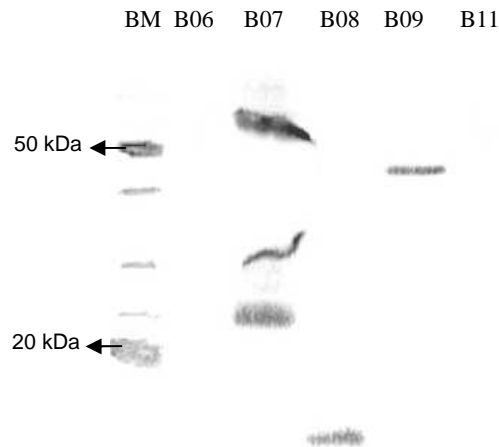


FIGURA 20 – *Western blot* anti-histidina da expressão das proteínas recombinantes na fração solúvel. Proteínas: B06 (12 kDa), B07 (48,3 kDa), B08 (12 kDa) e B11 (41,7 kDa). Legenda: BM = marcador de massa molecular *benchmark*.

A proteína B09, expressa apenas na fração solúvel, apresentou muitas bandas inespecíficas, que pode ser verificado no gel SDS – PAGE (figura 18). Na tentativa de eliminar as diversas bandas, além da de interesse, foi realizado o método de purificação em colunas contendo resina NiNTA-Agarose (Qiagen), como descrito no item 3.8.2. A purificação foi realizada com as frações solúvel e lavado 1, as quais apresentaram resultado positivo no *Western blot*. Para verificar o resultado da purificação foi realizado um gel SDS – PAGE (figura 21) e um *Western blot* (figura 22) com todas as etapas.

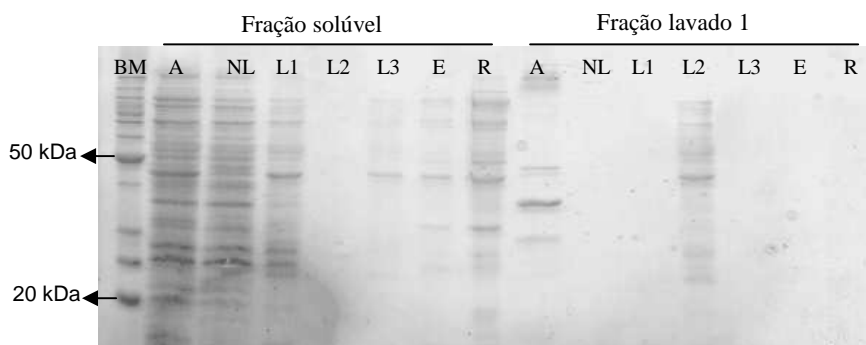


FIGURA 21 - Gel SDS–PAGE com a purificação da proteína solúvel B09 das frações solúvel e lavado 1. Etapas da purificação: A = proteína antes da purificação; NL = fração não ligada a resina; L1 = fração da primeira lavagem; L2 = fração da segunda lavagem; L3 = fração da terceira lavagem; e = fração eluída; R = resina.

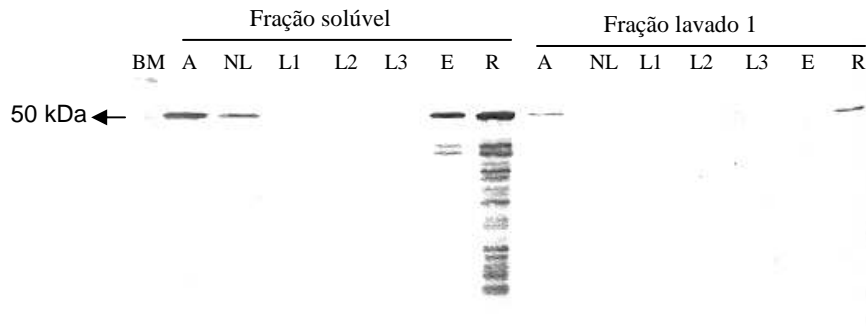


FIGURA 22 - *Western blot* com a purificação da proteína solúvel B09 das frações solúvel e lavado 1. Etapas da purificação: A = proteína antes da purificação; NL = fração não ligada a resina; L1 = fração da primeira lavagem; L2 = fração da segunda lavagem; L3 = fração da terceira lavagem; e = fração Heloisa; R = resina.

Porém, as bandas inespecíficas permaneceram e, algumas delas, de maneira mais intensa que a proteína B09 impossibilitando o emprego do método de purificação por gel preparativo, uma vez que seria muito difícil saber qual a banda correspondente à proteína de interesse.

Decidiu-se partir para uma nova estratégia e tentar aumentar a expressão da proteína modificando alguns procedimentos do processo de expressão. Para isso testamos outras cepas bacterianas, como Tuner(DE3)pLysS e BL21(DE3), outras temperaturas de indução (37 °C, 25 °C, 18 °C e 4 °C) e o meio de cultura 2YT. Porém, não houve aumento da expressão como esperado. Portanto novas metodologias para a purificação da proteína deverão ser realizadas no intuito de realizar os ensaios bioquímicos.

4.7 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS

A produção de anticorpos é uma etapa essencial para o desenvolvimento e prosseguimento da caracterização funcional mais aprofundada das proteínas. Portanto, após a confirmação da expressão em larga escala, as frações insolúveis das proteínas B06, B07, B08 e B11 foram inoculadas em camundongos da linhagem Swiss, que apresentaram resultado negativo para o teste pré – imune, em duplicata.

Sete dias após a quarta inoculação, foi realizada a verificação da produção de anticorpos contra a proteína inoculada através da técnica de *Western blot*, utilizando como substrato as proteínas recombinantes e as proteínas nativas do extrato de *T. cruzi*. Houve produção de anticorpos em quantidade adequada apenas para a proteína B07. Para as outras proteínas foram realizadas duas novas inoculações, sendo que a última para as proteínas B06 e B11 foram injetadas na cauda e para a proteína B08 injetada no peritônio. Os camundongos foram sacrificados por punção cardíaca 7 dias após a última inoculação.

A verificação da qualidade dos soros obtidos, ou seja, se os anticorpos produzidos pelos camundongos eram específicos no reconhecimento tanto da proteína recombinante inoculada, quanto da proteína presente no *T. cruzi*, foi realizada através da técnica de *Western blot*, como mostra a figura 23, utilizando como substrato as proteínas recombinantes e as proteínas nativas do extrato de *T. cruzi*.

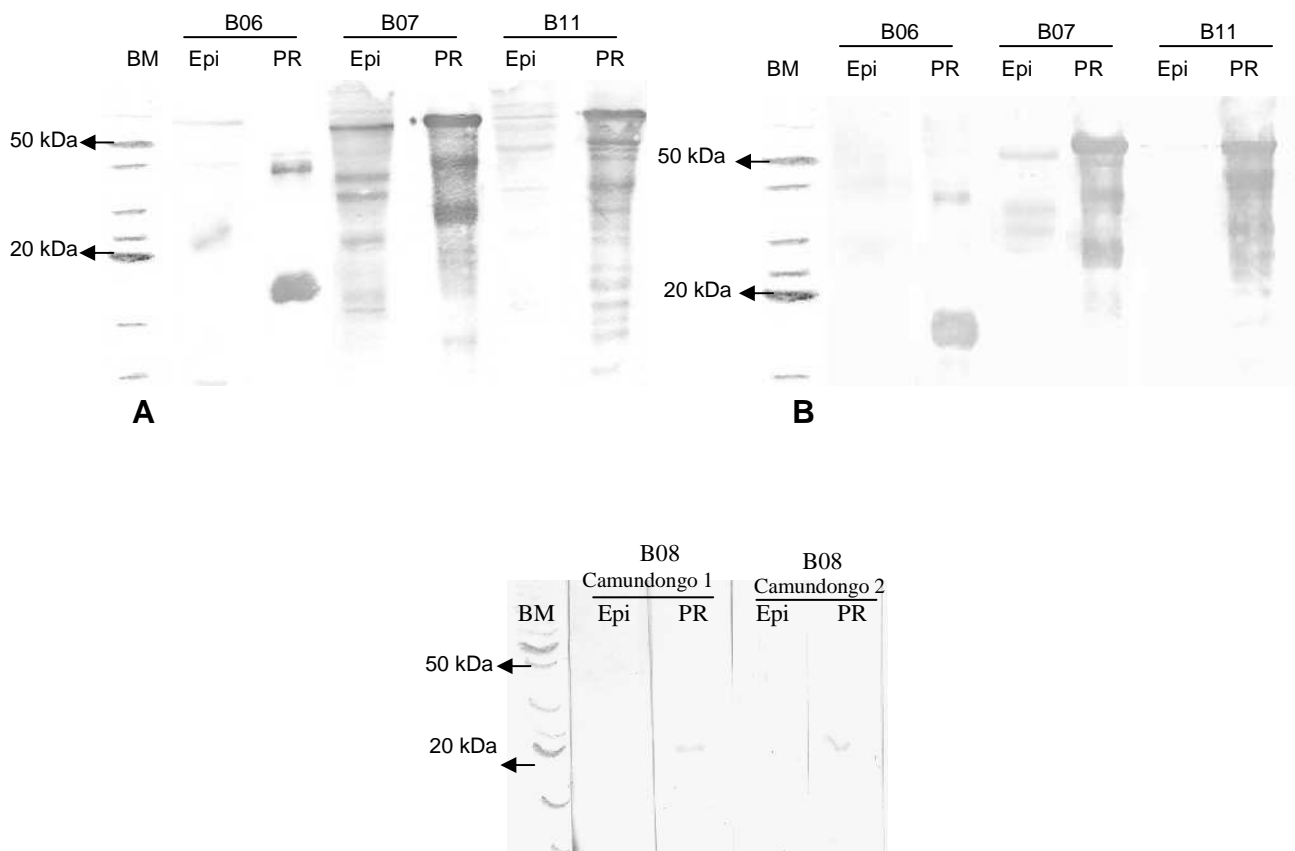


FIGURA 23 - Detecção das proteínas no extrato de *T. cruzi* utilizando os soros com anticorpos produzidos em camundongos. Proteínas recombinantes: B06(12 kDa), B07 (48,3 kDa), B08 (12 kDa), B09 (35,7 kDa) e B11 (41,7 kDa) Figura A: camundongo 1; Figura B: camundongo 2. Legenda: BM = marcador de massa molecular *benchmark*. Epi= extratos protéicos de *T. cruzi* de epimastigotas não diferenciados. PR= proteína recombinante utilizada para as inoculações.

Os anticorpos produzidos, de ambos os camundongos, para as proteínas B06 e B08, apesar de reconhecerem a proteína recombinante, não reconheceram a proteína correspondente nos extratos protéicos de *T. cruzi* (figura 23). Os soros obtidos para as proteínas B07 e B11, no entanto, reconhecerem outras proteínas além daquela de interesse, gerando a necessidade de purificação dos soros com o intuito de eliminar as bandas inespecíficas. Na figura 23 é possível verificar que o camundongo 1 (figura A) reconhece mais proteínas inespecíficas do que o camundongo 2 (figura B).

A purificação foi realizada com o soro de apenas um camundongo. O protocolo utilizado para a purificação consiste em incubar o soro com o extrato solúvel de *E. coli* juntamente com a proteína recombinante aderida à membrana de nitrocelulose. Deste modo, os anticorpos específicos contra a proteína recombinante ligam-se à membrana enquanto os anticorpos responsáveis pelo reconhecimento das demais proteínas se ligam ao extrato da bactéria. Com isso, os anticorpos específicos para a proteína de interesse são eluídos com solução à base de glicina ácida.

No entanto, nenhuma das purificações apresentou resultado satisfatório uma vez que houve uma redução da intensidade das bandas inespecíficas, ao invés da sua eliminação, como mostra a figura 24. Para o soro B11, a intensidade das bandas é tão baixa que não é possível verificar a presença das bandas na figura 24.

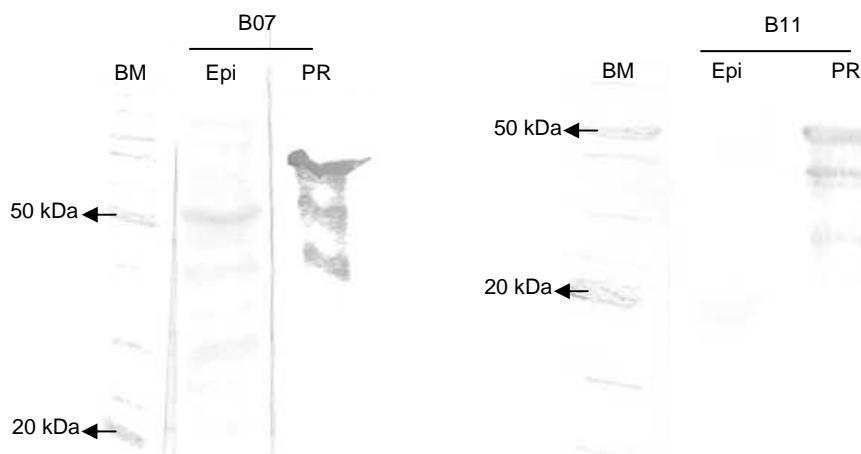


FIGURA 24 - Detecção das proteínas B07 (48,3 kDa) e B11 (41,7 kDa) no extrato de *T. cruzi* utilizando os soros purificados. Legenda: BM = marcador de massa molecular *benchmark*. Epi= extratos protéicos de *T. cruzi* de epimastigotas não diferenciados. PR = proteína recombinante utilizada para as inoculações.

4.8 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Os soros obtidos apresentaram baixa intensidade no reconhecimento da proteína de interesse além de várias bandas inespecíficas, as quais continuaram presentes mesmo após a purificação. Esse resultado pode ter sido gerado pelo fato das proteínas terem sido inoculadas diretamente sem uma purificação prévia, uma vez que, aparentemente, as proteínas estavam puras sendo que no gel SDS – PAGE e no *Western blot* apenas a proteína de interesse foi detectada. Com o intuito de obter um soro que reconheça a proteína de maneira mais específica, as proteínas foram purificadas antes de realizarmos novas inoculações.

Portanto, as proteínas B06, B07, B08 e B11, expressas na fração insolúvel foram purificadas por gel preparativo, como mostra a figura 25 com o resultado das eletroeluições. Os resultados obtidos permitiram purificar quantidade suficiente de cada proteína para a inoculação em camundongos.

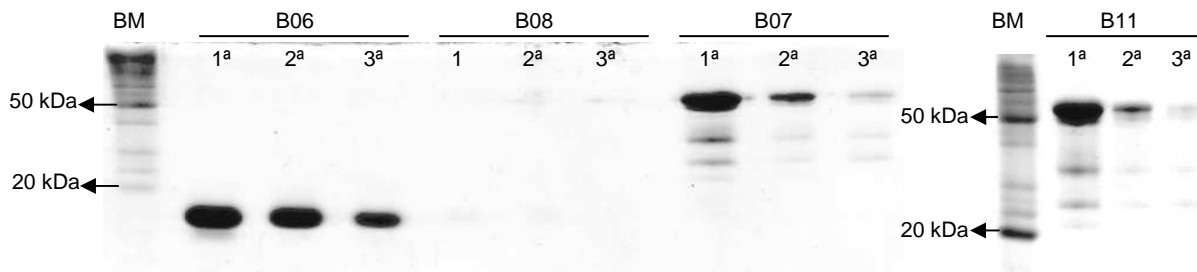


FIGURA 25 – Gel SDS–PAGE das proteínas purificadas por gel preparativo. Proteínas: B06(12 kDa), B07 (48,3 kDa), B08 (12 kDa) e B11 (41,7 kDa) Legendas: BM = marcador de massa molecular *Benchmark*; 1º = primeira eluição; 2º = segunda eluição; 3º = terceira eluição.

Devido à baixa expressão da proteína B08, é pouco visível a purificação da proteína no gel SDS – PAGE da figura 25. Após a quantificação da proteína purificada através do Qubit™ Fluorometer (Invitrogen) foi possível confirmar a baixa expressão (cerca de 100 µg/ml).

Novas inoculações estão sendo realizadas para as proteínas B06, B08 e B07. Até o momento, não houve camundongo com pré-imune negativo disponível para as inoculações da proteína B11.

4.9 CLONAGEM DO GENE PARA O VETOR pTcPR-GFPN

Todos os genes foram corretamente inseridos no vetor pTcPR-GFPN, que permite a expressão de proteínas recombinantes fusionadas a GFP, no *T. cruzi*, para ensaios de localização celular. A figura 26 mostra o resultado das amplificações dos genes inseridos no vetor pTcPR-GFPN, comprovando que todos foram inseridos corretamente.

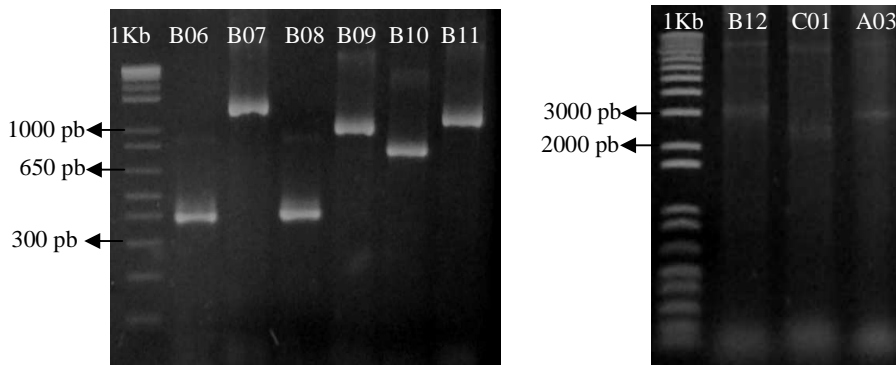


FIGURA 26 - Gel de agarose da amplificação dos genes de interesse após inserção no vetor pTcPR-GFPN. Genes: B06 (330pb), B07 (1281pb), B08 (339pb), B09 (960pb), B10 (726pb), B11 (1143pb), B12 (3351pb), C01 (2511pb) e A03 (3027pb). A identificação 1 Kb corresponde ao marcador de DNA.

As transfecções foram realizadas em colaboração com Andreia Dallabona. Porém, os parasitas transfectados não apresentaram fluorescência quando observados em microscópio óptico de fluorescência. Um novo teste foi realizado onde foi observado um crescimento exacerbada dos parasitas, inclusive no controle. Então, foram realizados testes para verificação da atividade do antibiótico utilizado e testes de quantidade de DNA transfectado. Diante do resultado destes testes, novos ensaios serão realizados.

A tabela 4 expõe os resultados obtidos para cada gene selecionado em cada etapa deste projeto, como a amplificação por PCR, inserção nos vetores pDONRTM221, pDESTTM17, pDESTTM15 e pTcPR-GFPN, testes de expressão e produção de anticorpos. Os quadros pintados representam resultado positivo.

TABELA 5 - Resumo dos resultados obtidos neste trabalho.

Gene	PCR	pDONR™221	pDEST™15	Teste solúvel pDEST™15	pDEST™17	Teste de Exp. pDEST™17	Expressão pDEST™17	Anticorpo	pTcPR-GFPN
B06								em andamento	
B07							solúvel	em andamento	
B08							solúvel	em andamento	
B09							solúvel		
B10									
B11									
B12									
C01									
A03									

NOTA: Gene corresponde ao nome interno de cada gene; PCR = amplificação dos genes; pDONR™221 = vetor de entrada; pDEST™15 = vetor de expressão; Teste solúvel pDEST™15 = teste de expressão das proteínas na fração solúvel a partir do pDEST™15; pDEST™17 = vetor de expressão; Teste de Exp. pDEST™17 = teste de expressão das proteínas a partir do pDEST™17; Expressão pDEST™17 = expressão em larga escala das proteínas a partir do pDEST™17; Anticorpo = produção de anticorpos; pTcPR-GFPN = vetor que permite a expressão de proteínas recombinantes fusionadas a GFP.

5. CONCLUSÕES

Em vista da importância que as FKBP's apresentam em diferentes processos celulares, além de apresentar um importante papel na interação patógeno-célula hospedeira e ter sua atividade de isomerase inibida através da ligação com as drogas imunossupressoras as quais constituem tanto uma ferramenta de estudo quanto uma perspectiva de medida terapêutica, este projeto teve por objetivo aprofundar a caracterização das FKBP's em *T. cruzi*

Para que esta caracterização possa ser realizada, os genes selecionados foram amplificados com sucesso utilizando-se primers específicos. Todos os genes foram inseridos nos diversos vetores utilizados neste projeto: vetores pDONRTM221, pDESTTM17 e pDESTTM15, com exceção do gene B10, da plataforma Gateway®, e o vetor pTcPR-GFPN.

Após a confirmação dos genes inseridos corretamente no vetor de expressão pDESTTM17, foram realizados os teste de expressão e apenas os genes B06, B07, B08, B09 e B11 expressaram a proteína recombinante. Todas as proteínas, com exceção da B09, foram inoculadas em camundongo. No entanto, os soros obtidos apresentaram baixa intensidade no reconhecimento da proteína de interesse além de várias bandas inespecíficas, as quais continuaram presentes mesmo após a purificação. Diante disso, nossa estratégia foi realizar a purificação das proteínas por gel preparativo e efetuar novas inoculações com o intuito de obter um soro que reconheça a proteína de maneira mais específica.

Para a obtenção das proteínas na fração solúvel, vários testes foram realizados, inclusive com as cepas Tuner(DE3)pLysS e Rosetta-gami 2, dos genes inseridos tanto no vetor pDESTTM17 quanto no pDESTTM15. Os genes B07, B08 e B09 inseridos no vetor pDESTTM17 expressaram a proteína solúvel no teste com a célula BL21(DE3)pLysS. Os genes inseridos no vetor pDESTTM15 que passaram pelo teste de expressão, B06, B08 e B09, expressaram a proteína correspondente na fração solúvel. Nos testes realizados com as células Tuner(DE3)pLysS e Rosetta-gami 2, apenas o gene B07 inserido no vetor pDESTTM15 expressou a proteína solúvel nas células Tuner(DE3)pLysS induzidas a 1 mM de IPTG.

A proteína B09, expressa na fração solúvel, devido à baixa expressão e a presença de diversas bandas não foi possível purificar a proteína de interesse por

coluna de níquel, pois as bandas inespecíficas continuaram presentes. Novos testes de expressão foram realizados com objetivo de aumentar a expressão da proteína B09 para facilitar sua posterior purificação. Porém não houve aumento da expressão como esperado.

6. PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, como a produção de proteínas recombinantes, inserção dos genes no vetor pTcPR-GFPN e com resultado positivo das inoculações que estão em andamento, será possível iniciar a caracterização das FKBP, através da determinação da localização celular destas proteínas e analisar se o produto proteico sofre algum tipo de regulação ao longo da diferenciação nas distintas formas. Além disso, com as proteínas na forma nativa será possível realizar ensaios bioquímicos para definir a existência de atividade de chaperona e os domínios importantes da molécula que são responsáveis por esta atividade bem como verificar a interação dessas proteínas com as drogas.

Novos testes de expressão serão realizados com os genes B12, C01 e A03 que apresentaram perfil de degradação no ensaio de *Western blot* e do gene B10 que não expressou a proteína correspondente para que anticorpos específicos contra a proteína recombinante possam ser obtidos.

Além disso, novos testes de expressão serão realizados com os genes B10, B11, B12, C01 e A03 para a expressão da proteína correspondente na sua forma nativa. As proteínas B06, B07, B08 e B09 que foram expressas na fração solúvel serão purificadas para que os ensaios bioquímicos possam ser realizados.

Novas transfecções serem realizadas a partir dos resultados obtidos nos testes para verificação da atividade do antibiótico e da quantidade de DNA transfectado.

Para os genes que não foram sequenciados por completo devido ao seu extenso tamanho, novos primers serão desenhados com o intuito de amplificar o interior dos genes.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, B.; MUSIYENKO, A.; KUMAR, R.; BARIK, S. A novel class of dual-family immunophilins. **J Biol Chem**, v. 280, p. 24308–24314, 2005
- ANDRADE, Z. A.; ANDRADE S. G.; OLIVEIRA, G. B.; ALONSO, D. R. Histopathology of the conducting tissue of the heart in Chagas' myocarditis. **Amer Heart J** v. 95, p. 316-324, 1978.
- BARIK, S. Immunophilins: for the love of proteins. **Cell Mol Life Sci**, v. 63, p. 2889-2900, 2006.
- BATISTA, M. **Construção de Vetores para Caracterização de Genes de Trypanosoma cruzi em um Sistema para Clonagem em Alta Demanda**. 124 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- BELL, A.; MONAGHAN, P.; PAGE, A. P. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases (immunophilins) and their roles in parasite biochemistry, host-parasite interaction and antiparasitic drug action. **Int J Parasitol** 36, 261-276, 2006.
- BRASSEUR, A. Study of the TOR pathway components: characterization of TbFKBP12, a protein from the PPLases family (isomerases) involved in flagellum homeostasis in Trypanosoma brucei. 233 f. Tese (Doutorado em Ciências) Université Libre de Bruxelles, Bruxelles, 2009.
- BREIMAN, A.; CAMUS, I. The involvement of mammalian and plant FK506-binding proteins (FKBPs) in development. **Transgenic Research**, v. 11, p. 321–335, 2002.
- CIANCIOTTO, N. P.; EISENSTEIN, B. I.; MODY, C. H.; TOEWS, G. B.; ENGLEBERG, N. C. A *Legionella pneumophila* gene encoding a species-specific surface protein potentiates initiation of intracellular infection. **Infect Immun**, v. 57(4), p. 1255-1262, 1989.
- CANÇADO, J. R. *In*: BRENNER, Z.; ANDRADE, A. Z. e BARRAL-NETTO, M. (eds) **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2000.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909.
- COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C.; BOIA, M. N.; FERNANDES, O.; BONFANTE, C.; CAMPOS, J. E.; SANTOS, L.; DEVERA, R. Chagas disease in the Brazilian Amazon: IV. a new cross-sectional study. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, p. 159-65, 2002.
- DAVIES, T. H.; SÁNCHEZ, E. R. FKBP52. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, p. 42-47, 2005.

DIAS J. C. P. *In*: BRENNER, Z.; ANDRADE, A. Z. e BARRAL-NETTO, M. (eds) ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***. 2. ed. Guanabara Koogan S.A. 2000.

DIAS, J.C.P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 23 Sup 1:S13-S22, 2007.

DIAS, J. C. P.; BASTOS, C.; ARAÚJO, E.; MASCARENHAS, A. V.; MARTINS NETTO, E.; GRASSI, F. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. **Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.**, v. 41(3), p. 296-300, 2008.

DOLINSKI, K.; MUIR, S.; CARDENAS, M.; HEITMAN, J. All cyclophilins and FK506 binding proteins are, individually and collectively, dispensable for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 94, p. 13093–13098, 1997

EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BARTHILOMEU, D. C. *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi* etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 409-15, 2005.

ERBEN, E. D.; DAUM, S.; TÉLLEZ-IÑÓN, M. T. The *Trypanosoma cruzi* PIN1 gene encodes a parvulin peptidyl-prolyl cis/trans isomerase able to replace the essential ESS1 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 153(2), p. 186-193, 2007.

FRAGOSO, S. P., GOLDENBERG, S. Cloning and characterization of the gene encoding *Trypanosoma cruzi* topoisomerase II. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 55, p. 127-34, 1992.

GALAT, A. *Review* Peptidylproline cis-trans-isomerases : immunophilins. **J. Biochem**, v. 216, p. 689-707, 1993.

GALAT, A. Sequence diversification of the FK506-binding proteins in several different genomes. **Eur. J. Biochem**, v. 267, p. 4945-4959, 2000.

GALAT, A. Functional Drift of Sequence Attributes in the FK506-Binding Proteins (FKBPs). **J. Chem. Inf. Model**, v. 48, p. 1118–1130, 2008

GEISLER, M.; BAILLY, A. Tête-à-tête: the function of FKBP in plant development. **Trends in Plant Science**, v.12 , p. 465-473, 2007

GeneDB. Disponível em: <<http://www.genedb.org/>>. Acesso em 10/08/2008.

HAMMARSTROM, M.; WOESTENENK, E. A.; HELLGREN, N.; HARD, T.; BERGLUND, H. Effect of N-terminal solubility enhancing fusion proteins on yield of purified target protein. **Journal of Structural and Functional Genomics**, v. 7, p. 1–14, 2006.

HANES, S. D.; SHANK, P. R.; BOSTIAN, K. A. Sequence and mutational analysis of ESS1, a gene essential for growth in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v.5(1), p. 55-72, 1989.

HANI, J.; STUMPF, G.; DOMDEY, H. PTF1 encodes an essential protein in *Saccharomyces cerevisiae*, which shows strong homology with a new putative family of PPIases. **FEBS Lett**, v. 365(2-3), p. 198-202, 1995

HIDE, G. History of Sleeping Sickness in East Africa. **Clin. Microbiol**, v. 12(1), p. 112-25, 1999.

HIGH, K. P.; HANDSCHUMACHER, R. E. Immunity, microbial pathogenesis, and immunophilins: finding the keys, now where are the locks? **Infect Agents Dis**, v. 1, p. 121-135, 1992.

HOERAUF, A.; RASCHER, C.; BANG, R.; PAHL, A.; SOLBACH, W.; BRUNE, K.; RÖLLINGHOFF, M.; BANG, H. Host-cell cyclophilin is important for the intracellular replication of *Leishmania major*. **Mol Microbiol**, v. 24(2), p. 421-429, 1997

INVITROGEN. Disponível em: <<http://www.invitrogen.com>>. Acesso em 29/04/2010.

KANG, C.B.; YE, H.; DHE-PAGANON, S.; YOON, H. S. FKBP Family Proteins: immunophilins with Versatile Biological Functions. **Neurosignals**, v. 16, p.318–325, 2008

LANDY, A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. **Annual Review of Biochemistry**, v. 58, p. 913-949, 1989

LIU, J.; FARMER, J.D.; LANE, W.S.; FRIEDMAN, J.; WEISSMAN, I.; SCHREIBER, S. L. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. **Cell**, v.66, p. 807-815, 1991

LU, K. P.; HANES, S. D.; HUNTER, T. A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. **Nature**, v. 380 (6574), p. 544-547, 1996.

LUNDEMOSE, A. G.; BIRKELUND, S.; FEY, S. J.; LARSEN, P. M.; CHRISTIANSEN, G. *Chlamydia trachomatis* contains a protein similar to the *Legionella pneumophila* mip gene product. **Mol Microbiol**, v. 5(1), p. 109-115, 1991.

MONAGHAN, P.; BELL, A. A *Plasmodium falciparum* FK506-binding protein (FKBP) with peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase and chaperone activities. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 139, p. 185–195, 2005.

MORO, A.; RUIZ-CABELLO, F.; FERNÁNDEZ-CANO, A.; STOCK, R. P.; GONZÁLEZ, A. Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase involved in cell infection. **EMBO J**, v. 14(11), p. 2483-2490, 1995.

NÓBREGA, A. A.; GARCIA, M. H.; TATTO, E.; OBARA, M. T.; COSTA, E.; SOBEL, J. *et al.* Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 41(3), p. 296-300, 2009.

NOVAGEN. Protocolo de células competentes. Disponível em: <www.novagen.com>. Acessado em: 20/07/2009.

PARK, J. S.; HAN, K.Y.; LEE, J. H.; SONG, J. A.; AHN, K. Y.; SEO, H. S.; SIM, S. J.; KIM, S. W.; LEE, J. Solubility enhancement of aggregation-prone heterologous

proteins by fusion expression using stress-responsive *Escherichia coli* protein, RpoS. **BMC Biotechnology**, v. 8, p. 15-26, 2008.

PEREIRA, P. J.; VEJA, M. C.; GONZÁLEZ-REY, E.; FERNÁNDEZ-CARAZO, R.; MACEDO-RIBEIRO, S.; GOMIS-RÜTH, F. X.; GONZÁLEZ, A.; COLL, M. *Trypanosoma cruzi* macrophage infectivity potentiator has a rotamase core and a highly exposed alpha-helix. **EMBO Rep**, v. 3(1), p. 88-94, 2002.

POTENZA, M.; GALAT, A.; MINNING, T. A.; RUIZ, A. M.; DURAN, R.; TARLETON, R. L.; MARÍN, M.; FICHERA, L. E.; BÚA, L. Analysis of the *Trypanosoma cruzi* cyclophilin gene family and identification of Cyclosporin A binding proteins. **Parasitology**, v. 32, p. 867-882, 2006.

RAHFELD, J.U.; RUCKNAGEL, K.P.; SCHELBERT, B.; LUDWIG, B.; HACKER, J.; MANN, K.; FISCHER, G. Confirmation of the existence of a third family among peptidyl-prolyl cis/trans isomerases. Amino acid sequence and recombinant production of parvulin. **FEBS Lett**, v. 352(2), p. 180-184, 1994.

SCHMUÑIS, G A. A tripanossomíase americana e seu impacto na Saúde Pública das Américas. In BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A; BARRAL NETTO, M. (eds), ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., p. 1-15, 2000.

SHERLOCK, I. A. Vetores. In BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL NETTO, M. (eds), ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***, 2a Ed., Guanabara-Koogan, Riode Janeiro, p. 21-47, 2000.

SILVEIRA, J. F. biologia molecular do *Trypanosoma cruzi*. In BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL NETTO, M. (eds), ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***, 2a Ed., Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, p. 21-47, 2000.

TEIXEIRA, S. M. R. Control of gene expression in Trypanosomatidae. **Brazilian Journal of medical and biological**, v. 31, p. 1503-1516, 1998.

TUO, W.; FETTERER, R.; JENKINS, M.; DUBEY, J. P. Identification and characterization of *Neospora caninum* cyclophilin that elicits gamma interferon production. **Infect Immun**, v. 73, p. 5093-5100, 2005.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal of Parasitology**, v. 31, p. 472-81, 2001.