

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNO ACCIOLY ALVES ROMAGNOLI

CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS ZFP11, ZFP29 E ZFPTTP  
EM *Trypanosoma cruzi*

CURITIBA

2013

BRUNO ACCIOLY ALVES ROMAGNOLI

CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS ZFP11, ZFP29 E ZFPTTP  
EM *Trypanosoma cruzi*

Trabalho apresentado como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Processos Moleculares no curso de graduação em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador interno: Prof. Dr. Leonardo Magalhães Cruz

Orientador externo: Dra. Lysangela Ronalte Alves

CURITIBA

2013

## TERMO DE APROVAÇÃO

BRUNO ACCIOLY ALVES ROMAGNOLI

CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS ZFP11, ZFP29 E ZFPTTP  
EM *Trypanosoma cruzi*

Trabalho apresentado como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Processos Moleculares no curso de graduação em Ciências Biológicas, pela seguinte banca examinadora:

---

Prof. Dr. Leonardo Magalhães Cruz

Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná

---

Prof. Dr. Wanderson Duarte da Rocha

Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná

---

Dr. Helisson Faoro

Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 16 de dezembro de 2013.

À minha família pelo amor, carinho e incentivo.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Beatriz e Luiz Fernando, por serem os melhores pais do mundo e serem grandes exemplos de pessoas para mim... sem vocês eu não seria nada, literalmente....amo muito vocês!

À minha irmã, Isabela, por ser tão querida e companheira, além de curiosa com o “andamento do trabalho”...

À minha família por todo apoio e amor em todos os momentos da minha vida, em especial à minha avó Maria Lúcia que me acompanha na vida acadêmica de muito perto e sempre será uma grande inspiração para mim (muito obrigado Janja!)

Ao Adriano e Mike pelas fanfarrônicas e por serem parte da minha família....  
Auiés!

À todos meus amigos da faculdade, de infância, do futebol e do boxe por me ajudarem nos momentos de descontração, inspiração e pela amizade que muito me ajudaram e ajudam, em especial para: Aline, Augusto, Cassiano, Chito, Fran, Gonzalo, Haruo, Marcelli, Marcelo, Mariana e Vinícius.

Aos membros do Laboratório de Regulação da Expressão Gênica do ICC por todo auxílio, ensinamentos e companheirismo.

À Rô (Rosane Cavet Martins) e à Vanessa Peres pela grande paciência e ajuda com os assuntos referentes ao curso e a monografia.

À Dra. Lysangela por ter me acolhido, pela paciência, pelos ensinamentos, pela confiança no meu trabalho e por sempre me motivar.

Ao Dr. Leonardo pela disposição, ajuda e pela paciência.

Ao Dr. Samuel Goldenberg pela oportunidade, por me acolher, pela confiança e por todos os incentivos e auxílios prestados, o meu muito obrigado.

À Juliane e Helisa por serem grandes companheiras e amigas dentro e fora do laboratório.

À Menina (Beatriz) por todo o apoio, carinho e companhia que fizeram com que esse momento fosse infinitamente mais feliz e prazeroso.

*"Os Covardes nunca tentam, os fracassados nunca terminam, os vencedores nunca desistem."*

Norman Vincent Peale

## RESUMO

O *Trypanosoma cruzi* apresenta um ciclo complexo na natureza envolvendo pelo menos quatro estágios distintos de desenvolvimento e dois hospedeiros intermediários. A alternância de tipos funcionalmente e morfologicamente distintos implica que genes distintos são expressos pelos diferentes estágios de diferenciação durante o ciclo de vida do parasita. Os mecanismos envolvidos na regulação da expressão de genes em tripanossomatídeos ainda permanecem desconhecidos em sua extensão. O fato de que promotores para RNA polimerase II ainda não tenham sido funcionalmente caracterizados em tripanossomatídeos e o fato da transcrição de mRNAs ser essencialmente policistrônica, com o posterior processamento dos transcritos primários por “trans-splicing”, indica que a regulação da expressão gênica ocorra principalmente, se não exclusivamente, por mecanismos pós-transcricionais. Assim, os mecanismos de regulação podem ocorrer em nível do processamento do transcrito primário, em nível do transporte dos transcritos processados do núcleo para o citoplasma, em nível da estabilidade dos transcritos ou ao nível da seleção das sequências a serem traduzidas. Resultados descritos na literatura mostram que proteínas com dedos de zinco tipo CCCH interagem especificamente com regiões de mRNAs podendo modular sua expressão interferindo com a estabilidade dos mRNAs. Diferentes proteínas com este domínio CCCH foram recentemente evidenciadas através de análise do genoma de *T. cruzi*, dentre essas as proteínas ZFP11, ZFP29 e ZFPTTP que foram estudadas nesse projeto. Os genes codificadores dessas três proteínas foram amplificados a partir do DNA genômico de *T. cruzi*, clonados e expressos utilizando a plataforma Gateway® e sistema de expressão heteróloga, e as proteínas recombinantes obtidas foram purificadas e inoculadas em camundongos para obtenção de anticorpos policlonais específicos para realizar os imunoenaios de localização celular e análise do padrão de expressão ao longo do ciclo de vida do parasita. Até o presente momento foram obtidos anticorpos específicos contra as proteínas ZFP29 e ZFPTTP o que permitiu realizar as análises de imunolocalização em epimastigotas e do padrão de expressão ao longo do ciclo de vida do parasita. Os resultados mostram que ZFP29 e ZFPTTP apresentam-se localizadas no citoplasma num padrão granular disperso e possuem um padrão de expressão diferenciado no decorrer do ciclo de vida, sendo sua expressão aumentada em epimastigotas.

Palavras-Chave: *Trypanosoma cruzi*. Proteínas de ligação ao RNA. Dedo de zinco. Domínio CCCH.

## ABSTRACT

*Trypanosoma cruzi* has a complex cycle in nature involving at least four distinct stages of development and two intermediate hosts. The alternation of functionally and morphologically different types implies that different genes are expressed by different differentiation stages during the life cycle of the parasite. The mechanisms involved in regulation of gene expression in trypanosomes remain unknown extent. The fact that promoters for RNA polymerase II have not yet been functionally characterized in trypanosomatids and the fact that transcription of mRNAs essentially be polycistronic , with the further processing of primary transcripts by " trans-splicing", indicates that the regulation of gene expression occurs mainly if not exclusively, by post-transcriptional mechanisms .

Thus, the regulatory mechanisms may occur in the processing of the primary transcript level in transport of the processed transcripts from the nucleus to the cytoplasm in terms of stability of the transcripts or at the selection of sequences to be translated level. Results reported in the literature show that zinc finger proteins that specifically interact with CCCH type regions of mRNAs can modulate its expression interfere with the stability of the mRNAs . Different proteins with CCCH this area have recently been revealed by analysis of the genome of *T. cruzi*, among these the ZFP11, ZFP29 ZFPTTP and proteins that have been studied in this project. The genes encoding these three proteins were amplified from genomic DNA of *T. cruzi*, cloned and expressed using the *Gateway*® platform and heterologous expression system, the recombinant proteins obtained were purified and inoculated in mice to obtain specific polyclonal antibodies used to perform immunoassays of the cellular localization and the analysis of the pattern of expression throughout the parasite's life cycle. To date specific antibodies against proteins ZFP29 and ZFPTTP which allowed the analysis of epimastigotes and immunolocalization pattern of expression throughout the life cycle of the parasite were obtained. The results show that ZFP29 ZFPTTP and are shown located in the cytoplasm dispersed in a granular pattern and have a different pattern of expression during the life cycle , and its expression increased epimastigotes .

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. RNA Binding Proteins. Zinc Finger. CCCH domain



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	11
2. OBJETIVOS .....	16
2.1. OBJETIVO GERAL .....	16
2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	16
2.2.1. Análises de bioinformática .....	16
2.2.2. Amplificação e Clonagem no sistema Gateway®.....	16
2.2.3. Expressão de proteínas .....	16
2.2.4. Obtenção de anticorpos contra as proteínas recombinantes .....	16
2.2.5. Imunoensaios .....	17
3. METODOLOGIA .....	18
3.1. SOLUÇÕES UTILIZADAS .....	18
3.2. ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA .....	19
3.2.1. Desenho de oligonucleotídeos para a amplificação dos genes selecionados .....	19
3.3. AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE INTERESSE E CLONAGEM NO SISTEMA GATEWAY® .....	20
3.3.1. Reação em cadeia da polimerase e purificação dos amplicons.....	20
3.3.2. Eletroforese de DNA .....	21
3.3.3. Clonagem dos amplicons no vetor de entrada pDONR™221 .....	21
3.3.4. Transformação de bactérias calcio-competentes com os plasmídeos e cultivo em meio sólido.....	22
3.3.5. Identificação das colônias bacterianas.....	22
3.3.6. Busca de clones positivos através de Ensaio de <i>Toothpick</i> ou PCR de colônia.....	23
3.3.7. Sequenciamento de DNA.....	24
3.3.8. Mini preparação de plasmídeos .....	24
3.3.9. Subclonagem em vetor de expressão pDEST™17 .....	25
3.4. EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS .....	26
3.4.1. Transformação de bactérias cálcio competentes com o vetor de expressão.....	26
3.4.2. Testes de expressão .....	27

3.4.3. Eletroforese de proteínas em gel desnaturante de poliacrilamida ( <i>SDS-PAGE</i> ) .....	28
3.4.4. Ensaio de <i>Western Blot</i> – Protocolo base .....	29
3.4.5. Expressão de proteínas em larga escala .....	30
3.4.6. Purificação das proteínas obtidas por cromatografia de afinidade e eletroeluição .....	31
3.4.7. Detecção da proteína recombinante através do ensaio de <i>Western Blot</i> com anticorpos anti-histidina .....	32
3.5. OBTENÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA AS PROTEÍNAS RECOMBINANTES .....	32
3.5.1. Teste do soro pré-imune .....	32
3.5.2. Inoculações em animais para a obtenção de antisoro .....	33
3.5.3. Teste dos antisoros .....	33
3.6. IMUNOENSAIOS COM OS ANTICORPOS OBTIDOS	34
3.6.1. Detecção de proteínas em extratos protéicos de <i>T. cruzi</i> em diferentes etapas do ciclo de vida .....	34
3.6.2. Imunofluorescência .....	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	36
5. CONCLUSÃO .....	52
REFERÊNCIAS .....	54

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. O *TRYPANOSOMA CRUZI* E A DOENÇA DE CHAGAS

O protozoário *Trypanosoma cruzi* foi primeiramente descrito por Carlos Chagas, no início do século XX, que o detectou nos insetos hematófagos transmissores da doença de Chagas, patologia causada pelo parasita (CHAGAS, 1909)

A doença de Chagas, apesar de ser conhecida também por tripanossomíase americana, não é mais uma enfermidade restrita às Américas já que nas últimas décadas passou a ser detectada também em países da Europa e do Oriente e, atualmente, estima-se que entre 7 e 8 milhões de pessoas estejam infectadas com o *Trypanosoma cruzi* (WHO, 2009)

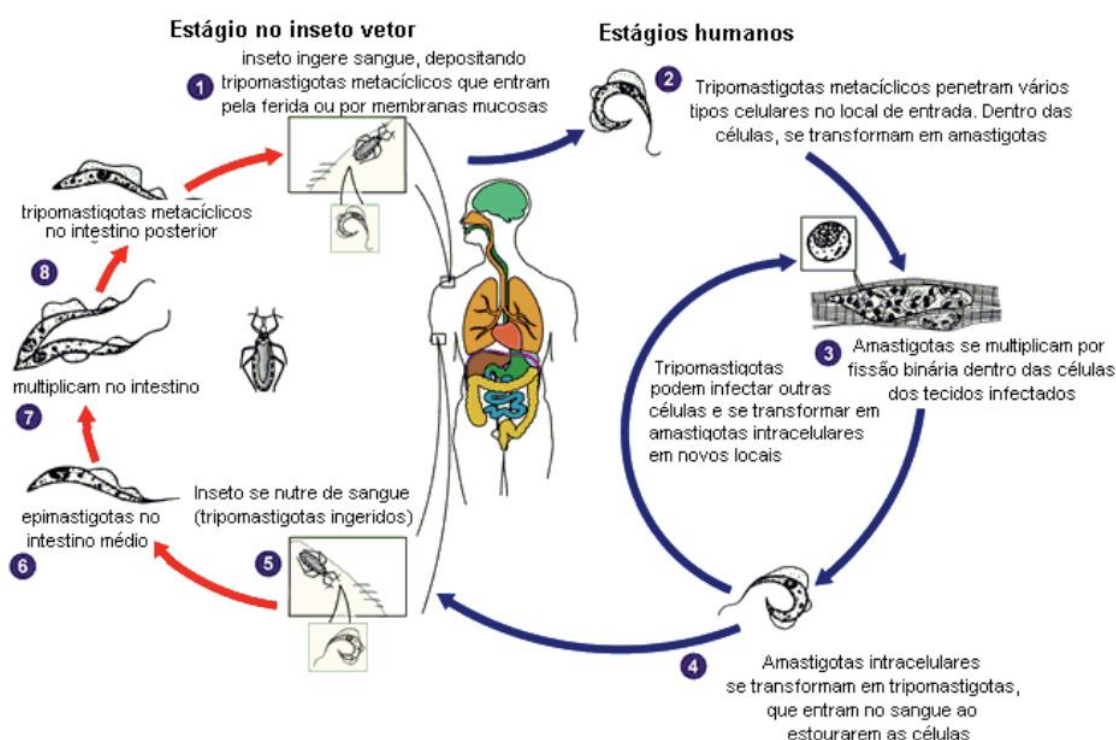
O *Trypanosoma cruzi* é um parasita pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, e que apresenta um ciclo parasitário que envolve dois hospedeiros distintos na natureza, um inseto hematófago triatomíneo, popularmente conhecido como barbeiro, e um vertebrado mamífero, e quatro estágios, tripomastigotas sanguíneos e tripomastigotas metacíclicos como sendo as formas infectivas e amastigotas e epimastigotas como formas replicativas (CHAGAS, 1909; CHAGAS, 1935; DE SOUZA, 2002).

O ciclo de vida o *T. cruzi* está representada na figura 1.1 e pode ser resumido nas etapas de 1 a 8 destacadas. Inicialmente o barbeiro contaminado com o parasita apresenta formas tripomastigotas metacíclicas (Etapa 1) na porção final de seu intestino que são liberados pelas fezes quando o inseto realiza o repasto sanguíneo. Durante o repasto sanguíneo a lesão do epitélio do hospedeiro vertebrado provocada pela picada do barbeiro fornece uma abertura para a entrada das formas metacíclicas para a corrente sanguínea do hospedeiro.

Após o acesso à corrente sanguínea as formas tripomastigotas metacíclicas podem invadir diversas células nucleadas de diversos tecidos do mamífero (Etapa 2). A infecção da célula resulta num processo de diferenciação de tripomastigota

metacíclico em amastigota (denominado amastigogênese) que é a forma replicativa no interior das células do hospedeiro vertebrado (3). Quando a célula infectada começa a ficar saturada de amastigotas, inicia-se o processo de diferenciação desses amastigotas em tripomastigotas sanguíneos (4) que são capazes de romper a célula, alcançar a corrente sanguínea e infectar outras células e/ou outros tecidos. Na corrente sanguínea as formas tripomastigotas sanguíneas podem ser ingeridos pelo triatomíneo (5).

No triatomíneo os tripomastigotas ingeridos, ao alcançarem a porção anterior do estômago, diferenciam-se em epimastigotas (6). Os parasitas que sobrevivem as ações enzimáticas do estômago do barbeiro conseguem, já no intestino, se multiplicar em altas taxas por divisão binária (7). Essa multiplicação dos epimastigotas é reduzida apenas na porção posterior do intestino onde os parasitas começam a se aderir à membrana do intestino e isso, aliado ao fato da condição de escassez de alimentos promover um estresse celular grande para o parasita, desencadeia o processo de diferenciação denominado de metaciclogênese. Nesse processo então os epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos que podem ser eliminados pelo barbeiro a qualquer momento (8), reiniciando assim o ciclo do *T. cruzi*.



**FIGURA 1.1 CICLO DE VIDA DO *Trypanosoma cruzi*.** (ADAPTADO DO SITE <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>)

## 1.2. REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

A alternância de tipos funcionalmente e morfológicamente distintos implica que genes distintos são expressos pelos vários estágios de diferenciação durante o ciclo de vida do parasita. Os mecanismos envolvidos na regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos ainda permanecem desconhecidos em sua grande extensão (DAS ET AL, 2008; FERREIRA ET AL, 2008; PALENCHAR & BELLOFATTO, 2006). Promotores para RNA polimerase II ainda não foram funcionalmente caracterizados em tripanossomatídeos e a transcrição de mRNAs é essencialmente policistrônica, com o posterior processamento dos transcritos primários por “*trans-splicing*”. Os mRNAs expressos co-transcricionalmente no policistron apresentam diferentes níveis de mRNA maduro, indicando que a regulação da expressão gênica ocorre principalmente (se não exclusivamente) por mecanismos pós-transcricionais (AVILA ET AL, 2003; CLAYTON & SHAPIRA, 2007). Esta regulação pode ocorrer em diferentes níveis: durante o processamento do transcrito primário, ou no transporte dos transcritos processados do núcleo para o citoplasma ou ainda no citoplasma tanto ao nível da estabilidade dos transcritos como ao nível da seleção das sequências traduzidas.

Grande parte dos estudos efetuados até o presente foram centrados na determinação de sequências reguladoras presentes nas regiões não traduzidas dos mRNAs (UTRs), notadamente a região 3' não codificadora (3'-UTR) (DA SILVA ET AL, 2006). Assim, estudos com genes repórteres e sequências derivadas de genes estágio específicos indicam que estas regiões têm efetivamente um papel modulador na regulação da expressão gênica. Todavia a regulação não deve ocorrer apenas pelas sequências nucleotídicas *per se*, mas sim pela associação de proteínas específicas a estas regiões, modulando a estabilidade e a funcionalidade dos mRNAs (D'ORSO ET AL, 2003; HOLETZ ET AL, 2007).

## 1.3. PROTEÍNAS DEDO DE ZINCO

Algumas proteínas que se ligam a RNA (*RNA binding proteins* ou RBPs) e que podem regular a expressão gênica já foram preliminarmente caracterizadas no

modelo de diferenciação de *T. cruzi* (metaciclologênese) que foi desenvolvido em nosso laboratório (CONTRERAS ET AL, 1985; DALLAGIOVANNA ET AL, 2008; HOLETZ ET AL, 2007; MORKING ET AL, 2004; NARDELLI ET AL, 2007). Um grupo destas proteínas é formado por proteínas com dedos de zinco tipo CCCH (MORKING ET AL, 2004; MÖRKING ET AL, 2012). Esse domínio tipo dedo de zinco apresenta um arranjo bastante conservado de cisteínas e histidina, C-x(8)-C-x(5)-C-x(3)-H, pertencente ao tipo C3H1 de dedos de zinco que é conservada em eucariotos, sendo identificada desde leveduras até mamíferos. Esse tipo de dedos de zinco interage com mRNAs, preferencialmente na porção 3' não traduzida (revisado por HALL, 2005). Em 2004, Hudson e colaboradores determinaram a estrutura da proteína TIS11d ligada ao mRNA alvo. Essa proteína possui dois domínios dedo de zinco C3H1 e ambos se dobram formando domínios compactados e independentes que são mantidos unidos por uma sequência conectora ("linker"). Em cada domínio, forma-se uma alfa hélice logo após a primeira cisteína, seguida de uma segunda hélice entre a segunda e terceira cisteínas, ficando sempre todas expostas para a superfície onde fazem a ligação ao mRNA. Outros exemplos de proteínas tipos dedo de zinco incluem a tristetraprolina (TTP), que em mamíferos atua desestabilizando o mRNA do fator TNF-alfa e de outros 23 transcritos. No mRNA de TNF-alfa, TTP reconhece a sequência UUAUUUAUU (ARE) na região 3' não traduzida (LAI ET AL., 2006). Uma proteína similar a TTP da família TIS/CTH denominada TIS11d, atua como reguladora de fatores de crescimento, também possui dois domínios de dedo de zinco. Essa proteína se liga a elementos ricos em AU (ARE) da região 3' não traduzida de mRNAs alvo e promove sua desadenilação e degradação (HUDSON ET AL., 2004). Em *T. cruzi* foi clonado um gene que codifica uma proteína da família dedo de zinco denominada TcZFP1 homóloga a TbZFP1 (67.6%) (MORKING ET AL, 2004). Resultados demonstraram que TcZFP1 se liga especificamente a oligorribonucleotídeos contendo sequências ricas em C. Este tipo de sequência está presente nas regiões não traduzidas de muitos mRNAs de tripanosomatídeos, aumentando a possibilidade de que TcZFP1 possa interagir com RNAs ou complexos ribonucleoproteicos na célula via domínio CCCH, regulando sua estabilidade ou tradução. A análise do genoma do *T. cruzi* (EL-SAYED ET AL, 2005A; EL-SAYED ET AL, 2005B) mostra que há vários genes que codificam proteínas desta família, sugerindo que as mesmas possam ter um papel importante na modulação da expressão gênica no parasita.

Há de fato uma grande variedade de proteínas que se ligam a RNA (GLISOVIC ET AL, 2008; PAQUIN & CHARTRAND, 2008), algumas especificamente associadas a algumas seqüências, definindo motivos de reconhecimento de RNA. Estas proteínas podem atuar na estabilidade dos mRNAs positiva ou negativamente. É importante mencionar que os RNAs estão sempre associados a proteínas e o conjunto de proteínas associado a um mRNA é que acaba definindo a sua funcionalidade. Assim mRNAs relacionados podem associar-se a conjuntos específicos de proteínas podendo ser coordenadamente expressos ou degradados em regiões específicas do citoplasma, definindo os denominados “operons funcionais” (KEENE, 2007).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Caracterização de proteínas de *Trypanosoma cruzi* que possuem domínios de ligação a RNA tipo dedo de zinco CCCH.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

#### 2.2.1. Análises de bioinformática

a) Desenho de oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação dos genes selecionados.

#### 2.2.2. Amplificação e Clonagem no sistema Gateway®

a) Amplificação dos genes por Reação em cadeia da polimerase (PCR) e purificação dos *amplicons*.

b) Clonagem no vetor de entrada pDONR™221.

c) Confirmação das clonagens por *toothpick*, PCR de colônia e sequenciamento de DNA.

d) Extração dos plasmídeos dos clones positivos e subclonagem no vetor de expressão pDEST™17.

e) Confirmação da subclonagem e seleção do clone positivo para expressão

#### 2.2.3. Expressão de proteínas

a) Testes para determinar as condições ideais de expressão para cada proteína.

b) Expressão em larga escala.

c) Purificação das proteínas obtidas por cromatografia de afinidade e eletroeluição.

#### 2.2.4. Obtenção de anticorpos contra as proteínas recombinantes

a) Imunização de coelhos e camundongos com as proteínas obtidas.

b) Análise da qualidade dos anticorpos por *Western Blot*.



### 2.2.5. Imunoensaios

- a) Imunolocalização das proteínas em *Trypanosoma cruzi* por microscopia de fluorescência.
- b) Análise do padrão de expressão das proteínas durante o ciclo de vida do parasita.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. SOLUÇÕES UTILIZADAS

**Azul de comassie R-250:** Azul de comassie R-250 0,1%; metanol 45% ; ácido acético 10%

**Ficoll Solução estoque 10x:** azul de bromofenol 0,21%; xileno cianol FF 0,21%; EDTA 0,2 M pH 8,0; glicerina 50%

**Gel de empilhamento para proteínas:** 4,75% de acrilamida 33/0,9%; Tris-HCl 120 mM pH 6,8; SDS 0,1%; persulfato de amônio 0,075%; TEMED 0,07%.

**Gel de corrida de proteínas:** acrilamida:bisacrilamida 33%:0,9% na concentração necessária de acordo com o tamanho da proteína; Tris-HCl 400 mM pH 8,8; SDS 0,1%; persulfato de amônio 0,075% e TEMED 0,07%.

**Meio de cultura Luria –Bertani:** Para 100 ml: Triptona - 1g; Extrato de Levedura - 0,5g; NaCl - 1g.

**Ponceau S:** Ponceaus S Sigma P-3504 0,5%, ácido acético 1%

**Solução de bloqueio:** 5% de leite em pó desnatado em PBS-Tween 0,1%

**Solução de descoloração:** metanol 4%; ácido acético 7,5%.

**Solução de lise para *toothpick*:** NaOH 50 mM; glicerol 5%; SDS 0,5%; EDTA 5 mM; azul de bromofenol 0,025% e H<sub>2</sub>O q.s.p.

**Solução de purificação:** Triton 2%; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100mM; Tris - Hcl 10 mM; Uréia 2M; Nacl 0,5M.

**Tampão de amostra 4x:** Tris-HCl 40 mM pH 6,8; SDS 1%; β-mercaptoetanol 2,5%; glicerol 6% e azul de bromofenol 0,005%.

**Tampão de eluição (coluna de níquel):** Uréia 8M; Nacl 300mM ; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM; Imidazol 300 mM.

**Tampão de ligação (coluna de níquel):** Uréia 8M; Nacl 300 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM; Imidazol 10mM.

**Tampão de revelação com fosfatase alcalina (*AP Buffer*):** Tris-HCl 100 mM pH 9,5 ; NaCl 100 mM; MgCl<sub>2</sub> 5 mM.

**Tampão de ressuspensão de proteínas:** NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100mM; Tris-Hcl 10mM; Uréia 8M PH 8,0.

**Tampão de SDS-page:** Tris 255 mM, Glicina 192 mM, SDS 1%

**Tampão de sonicação:** NaCl 500 mM, PH 8,0; Triton 2% PH 8,0; Tris-Hcl 20mM.

**Tampão TBE (Solução estoque 10X):** Tris-base 89 mM; Ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM pH 8.0

**Tampão de transferência (Western Blot):** Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%

**TE:** Tris Hcl 10mM PH 7,5 e EDTA 1 mM

## 3.2. ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA

### 3.2.1. Desenho de oligonucleotídeos para a amplificação dos genes selecionados

Para a amplificação dos genes de interesse através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é necessário um par de oligonucleotídeos iniciadores para cada gene (“*Foward* e *Reverse*”). As sequências nucleotídicas dos genes selecionados de *T. cruzi* foram retiradas do banco de dados do site <http://www.genedb.org>, e a partir delas os oligonucleotídeos foram desenhados através da ferramenta *PrimerSelect* do software *Lasergene* (DNASTAR, Inc.). O desenho dos oligonucleotídeos foi feito de modo a permitir a recombinação dos *amplicons* com o vetor de entrada pDONR™221 da tecnologia *Gateway*® (Invitrogen) . Os oligonucleotídeos a serem utilizados nesta tecnologia de clonagem devem possuir regiões codificadoras para sítios *AttB* 1 e 2, necessários para a recombinação do *amplicon* purificado com o vetor pDONR™221. Códon de parada são opcionais, e os oligonucleotídeos para os três genes estudados foram desenhados sem códon de parada, de modo a permitir uma posterior agregação de seqüências codificadoras para *tags* na região 3’, como regiões codificadoras para GFP (*Green fluorescent protein*).

Primer F	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC TG GAAGGAGATA ATG CTGGCAGTAAATAAAC 3'
Primer R	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG TCGCCTTAGGACGCAGAGT 3'

Attb1

Shine-dalgarno (ribosome binding)

START

Attb2

Sequência específica para cada gene

FIGURA 4.1 – SÍTIOS NECESSÁRIOS À CONSTRUÇÃO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA USO NA PLATAFORMA GATEWAY®. ATTB1 E ATTB2: SEQUÊNCIAS QUE PERMITEM A RECOMBINAÇÃO ESPECÍFICA ENTRE O *AMPLICON* PURIFICADO E O VETOR DE ENTRADA DA PLATAFORMA GATEWAY® PDONR™221; SHINE DALGARNO: SEQUÊNCIA DE LIGAÇÃO A RIBOSOMOS; START: CÓDON NECESSÁRIO AO INÍCIO DA TRADUÇÃO; SEQUÊNCIA ESPECÍFICA: REGIÃO DE ANELAMENTO ESPECÍFICA PARA CADA GENE A SER AMPLIFICADO.

### 3.3. AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE INTERESSE E CLONAGEM NO SISTEMA GATEWAY®

#### 3.3.1. Reação em cadeia da polimerase e purificação dos amplicons

Os genes foram amplificados utilizando-se a técnica de PCR (Reação em cadeia da polimerase). As amplificações foram feitas utilizando-se 100 ng de DNA genômico de *T. cruzi* como molde. A enzima utilizada foi a *Taq Polimerase* (Invitrogen), além de 200 mM de DNTP, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, Tampão específico para a enzima utilizada, 10 pmol de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores e água ultrapura suficiente para completar o volume da reação. Os ciclos de amplificação foram montados da seguinte forma: 94° C por 3 minutos iniciais para desnaturação do DNA seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94° C, 30 segundos de anelamento (temperaturas específicas para cada gene, vide anexo), e por fim 72° C para extensão. O tempo de extensão foi variável de acordo com o tamanho do gene, e a regra de 1 minuto de extensão para cada mil pares de bases foi seguida.

Os *amplicons* foram purificados com uma solução de 30% PEG 8000/30mM MgCl<sub>2</sub>, fornecida pelo sistema de purificação da plataforma Gateway®. O DNA foi ressuspenso em TE e adicionada a solução de PEG/MgCl<sub>2</sub>, em volume de 1:1. A mistura foi agitada vigorosamente e centrifugada por 15 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente e o sedimento contendo o DNA foi seco a 60°C por 15 minutos. O sedimento foi ressuspenso em 10 µL de tampão TE e as amostras foram armazenadas a - 20°C.

### 3.3.2. Eletroforese de DNA

Alíquotas de 5 µl dos *amplicons* purificados foram misturadas ao tampão de aplicação *Ficoll* e submetidas a eletroforese em gel de agarose 1%, na presença de Tampão TBE, a fim de se verificar seu perfil eletroforético. O marcador de peso molecular utilizado como referência foi o 1kb *Plus* (Invitrogen).

O gel foi submetido a uma corrente constante de 100v, e posteriormente corado em uma solução de brometo de etídeo (0,5 µg/ml) por aproximadamente 20 minutos. Após o tratamento com este intercalante o DNA pode ser observado sob luz UV (comprimento de onda na faixa de 260nm), e fotografado através do sistema de captação de imagens *UV White Darkroom* (*UVP Bioimaging Systems*).

### 3.3.3. Clonagem dos amplicons no vetor de entrada pDONR™221

A reação de recombinação entre os *amplicons* flanqueados por sítios *AttB* e o vetor de entrada da plataforma Gateway® pDONR™221, mediada pela enzima BP clonase, foi feita de acordo com o manual do fabricante (Invitrogen - Catalog nos. 12535-019 e 12535-027). O vetor pDONR™221 contém um gene de resistência a canamicina utilizado para selecionar as colônias bacterianas, e regiões *AttP1* e *AttP2*, utilizadas na recombinação com os produtos de PCR flanqueados por regiões *AttB*.



FIGURA 4.2 – ESQUEMA DA REAÇÃO BP (MANUAL DO FABRICANTE). A ENZIMA BP CLONASE UTILIZA OS SÍTIOS *ATTB* DO *AMPLICON* E *ATTP* DO VETOR PDONR PARA REALIZAR UMA RECOMBINAÇÃO ESPECÍFICA QUE DARÁ ORIGEM AO VETOR DE ENTRADA CONTENDO O GENE DE INTERESSE E A UM PRODUTO SECUNDÁRIO LINEAR.

### 3.3.4. Transformação de bactérias calcio-competentes com os plasmídeos e cultivo em meio sólido

Os plasmídeos recombinados foram incubados com bactérias *Escherichia. coli* cálcio-competentes (DH5 $\alpha$ ) por 30 minutos no gelo (0,1  $\mu$ g de plasmídeo para 50  $\mu$ L de *E.coli*). Após esse período, as bactérias foram submetidas a um choque térmico para permitir a entrada dos plasmídeos. Após serem incubadas a 42 °C por 2 minutos as suspensões bacterianas foram imediatamente colocadas no gelo por 2 minutos. Após este tempo foi adicionado 1 ml de meio de cultura Luria-Bertani (LB) sem antibiótico, e as células foram incubadas sob agitação constante a 37 °C por 45 minutos, para que pudessem se recuperar e começassem a expressar os genes de resistência aos antibióticos antes de serem colocadas em um meio seletivo. Após esse período as bactérias foram espalhadas em placas contendo 25 ml de meio sólido LB + ágar e antibióticos específicos de acordo com a resistência que cada vetor confere às bactérias transformadas (pDONR<sup>TM</sup>221 – canamicina 50  $\mu$ g/ml , pDEST<sup>TM</sup>17 – ampicilina 100  $\mu$ g/ml e cloranfenicol 34  $\mu$ g/ml). As placas foram incubadas por 18 horas a 37 °C para o crescimento das colônias.

### 3.3.5. Identificação das colônias bacterianas

Após 18 horas de incubação as placas foram recolhidas e as colônias isoladas replaqueadas em uma placa referência contendo meio LB + antibióticos.

Cada colônia foi riscada em uma região numerada, de modo a realizar a identificação das colônias. As placas foram incubadas por 18 horas a 37°C.

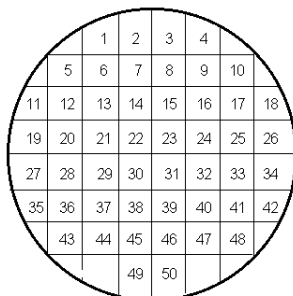


FIGURA 4.3 – MODELO DE PLACA REFERÊNCIA. É COLOCADO NA PARTE DE BAIXO DA PLACA CONTENDO MEIO DE CULTURA SÓLIDO UM PAPEL COM REGIÕES NUMERADAS. EM CADA UMA DAS REGIÕES SERÁ ADICIONADA UMA COLÔNIA BACTERIANA, QUE PODERÁ SER IDENTIFICADA POSTERIORMENTE POR UM NÚMERO.

### 3.3.6. Busca de clones positivos através de Ensaio de *Toothpick* ou PCR de colônia

A técnica de *toothpick* é feita a fim de se verificar o sucesso da recombinação e da transformação. Através desse ensaio pode-se checar se o vetor está presente na bactéria e se possui tamanho diferente do vetor controle (o mesmo vetor utilizado na recombinação, porém sem inserto). Cerca de 15 colônias foram coletadas da placa referencial com um palito estéril e transferidas para tubos de polipropileno. A cada poço foram adicionados 15 µl de solução de lise. A solução foi agitada vigorosamente e a mistura foi incubada a 65 °C por 10 minutos.

Após a incubação as amostras foram submetidas à eletroforese em um gel de agarose 0,8%, com uma corrente de 80 V, utilizando-se o plasmídeo sem o inserto como controle do gel. As colônias com tamanho diferente do plasmídeo controle foram coletadas e os plasmídeos purificados por minipreparação (como descrito no item 4.3.8). Após esta etapa, foi feita uma PCR convencional da minipreparação para se verificar a presença de insertos.

Uma outra maneira de se verificar o sucesso da transformação é a PCR de colônia, quando a amplificação é feita diretamente a partir de uma colônia bacteriana. Para isso foi feita uma PCR parecida com a convencional, porém em vez

de DNA genômico utilizou-se como base para a amplificação uma alíquota da colônia bacteriana transformada com o vetor de interesse. As amostras foram incubadas por 10 minutos a 94° C no termociclador para lisar a parede bacteriana, e o ciclo de PCR prosseguiu normalmente depois desta etapa. As outras etapas da reação de PCR foram feitas de maneira convencional, assim como a eletroforese, descritas em 4.3.1 e 4.3.2. Esta técnica pode gerar um resultado falso-negativo, caso a lise não seja eficiente. Para genes em que não conseguimos uma amplificação por PCR de colônia, utilizamos a abordagem de toothpick / PCR de minipreparação.

### 3.3.7. Sequenciamento de DNA

As amostras foram sequenciadas pela empresa Macrogen de modo a se verificar se os insertos estavam posicionados corretamente nos vetores, bem como a presença de erros que podem prejudicar a expressão da proteína.

### 3.3.8. Mini preparação de plasmídeos

A minipreparação foi feita a fim de se isolar das bactérias os plasmídeos contendo os insertos corretos e purificá-los. Foi utilizado o kit *Qiaprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit (QIAGEN)*. As colônias positivas selecionadas foram inoculadas em 2 ml de meio LB líquido com o antibiótico canamicina na concentração de 50 µg/ml (bactérias contendo plasmídeos pDONR™221 mais inserto de interesse) ou 100µg/ml de ampicilina (bactérias contendo plasmídeos pDEST™17 mais inserto de interesse) . As culturas foram incubadas a 37 ° C durante 18 horas sob agitação constante de 200 rpm. Após as culturas serem centrifugadas a 12.000 x g por 1 minuto os plasmídeos foram purificados utilizando-se o kit, segundo as recomendações do fabricante, utilizando-se o protocolo para uso em microcentrífuga. Após os procedimentos de lavagem os plasmídeos foram eluídos em H<sub>2</sub>O ultrapura e armazenados a -20°C.



### 3.3.9. Subclonagem em vetor de expressão pDEST™17

A reação de recombinação entre o vetor de entrada contendo o gene de interesse e o vetor de destino pDEST™17, mediada pela enzima LR clonase, foi feita de acordo com o manual do fabricante (Invitrogen - Catalog nos. 12535-019 e 12535-027).



FIGURA 3.4 – ESQUEMA DA REAÇÃO LR (MANUAL DO FABRICANTE). A ENZIMA LR CLONASE UTILIZA OS SÍTIOS ATTL DO VETOR DE ENTRADA E ATTR DO VETOR pDEST™17 PARA REALIZAR UMA RECOMBINAÇÃO ESPECÍFICA QUE DARÁ ORIGEM AO CLONE DE EXPRESSÃO E A UM PRODUTO SECUNDÁRIO CIRCULAR.

O vetor p DEST™17 é amplamente utilizado para a expressão de proteínas recombinantes em *E.coli*. Possui um promotor para a polimerase T7, um sítio de ligação a ribossomos e um códon de iniciação ATG, que permitem a expressão do gene incluso no vetor. Possui ainda uma região codificante para uma TAG de 6 histidinas (que pode ser utilizado posteriormente para a purificação das proteínas recombinantes), um gene de resistência a ampicilina (utilizado para selecionar as colônias positivas através de meio seletivo), e regiões *attR1* e *attR1*, utilizadas para a recombinação com o vetor de entrada pDONR™ 221, além de regiões para contra-seleção e manutenção do plasmídeo.

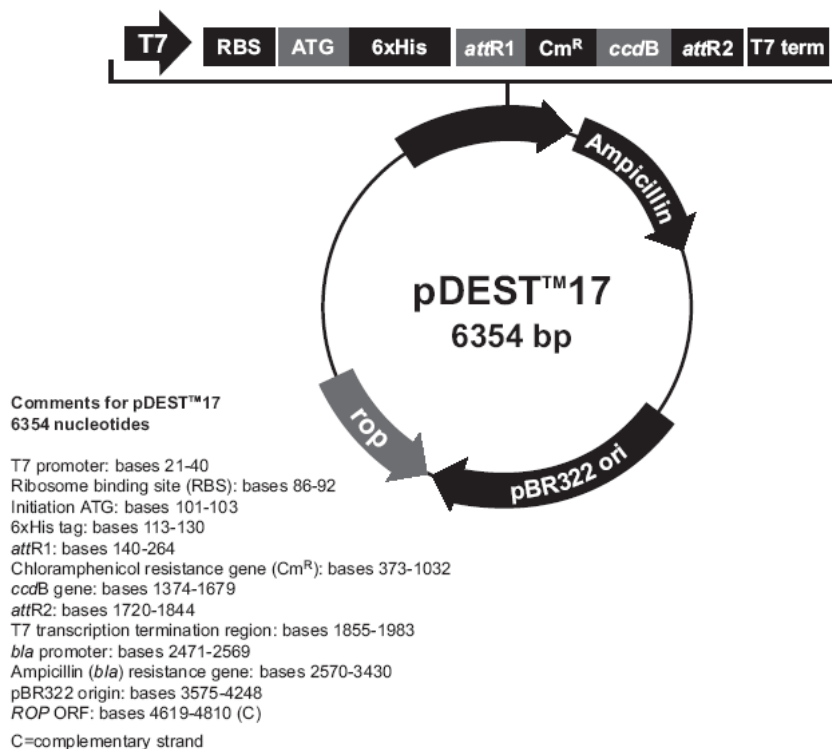


FIGURA 3.5 – MAPA ILUSTRATIVO DO VETOR DE EXPRESSÃO pDEST™17. T7: PROMOTOR PARA RNA POLIMERASE T7; RBS: SEQÜÊNCIA DE LIGAÇÃO A RIBOSOMOS; ATG: CÓDON DE INÍCIO; 6XHIS: REGIÃO CODIFICADORA PARA UM TAG DE SEIS HISTIDINAS; ATTR1 E ATTR2: SEQÜÊNCIAS QUE PERMITEM A RECOMBINAÇÃO COM O VETOR pDONR™221; CMR: GENE DE RESISTÊNCIA AO CLORANFENICOL PARA CONTRA-SELEÇÃO DO PLASMÍDEO; CCDB: GENE LETAL QUE EVITA O CRESCIMENTO DE COLÔNIAS COM PLASMÍDEO PDEST SEM O GENE DE INTERESSE; T7 TERM: SEQÜÊNCIA QUE PERMITE O TÉRMINO DA TRANSCRIÇÃO; AMPICILLIN: GENE DE RESISTÊNCIA AO ANTIBIÓTICO AMPICILINA; PBR322 ORI: ORIGEM DA REPLICAÇÃO PARA DUPLICAÇÃO DO DNA E MANUTENÇÃO DO PLASMÍDEO;

### 3.4. EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS

#### 3.4.1. Transformação de bactérias cálcio competentes com o vetor de expressão

A transformação foi feita da maneira descrita em 4.3.4, porem as bactérias utilizadas eram da cepa de expressão *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Esta bactéria contem um gene codificante para a RNA polimerase T7 sob controle do promotor *lacUV5*. O IPTG, um análogo sintético da lactose, liga-se ao repressor do operon *lacUV5* e

permite que a RNA polimerase se ligue ao promotor lac, possibilitando a expressão da polimerase T7. Esta enzima se liga ao promotor T7 presente no vetor pDEST™17, possibilitando a expressão do inserto presente no vetor. O plasmídeo pLysS presente nesta cepa confere resistência ao antibiótico cloranfenicol e codifica para a produção da lisozima T7, que impede a expressão da RNA polimerase T7 na ausência do IPTG, o que inibe a expressão basal da proteína recombinante.

#### 3.4.2. Testes de expressão

Os testes de expressão em pequenos volumes foram realizados para verificar se os clones selecionados expressavam as proteínas de interesse, e sob quais condições.

O pré-inóculo de uma colônia bacteriana em meio de cultura LB contendo antibióticos (ampicilina 100 µg/ml e cloranfenicol 34 µg/ml), foi crescido em uma estufa a 37°C por 18 horas, sob agitação constante de 200 rpm. Após esse tempo uma alíquota da cultura foi diluída em 3 ml (10 ml) de LB com antibióticos, na proporção de 1:50, e incubada sob as mesmas condições por 2 horas, para que as bactérias atingissem crescimento exponencial até uma densidade óptica em 600 nm de 0,4 a 0,6. Foi adicionado IPTG à cultura em concentração final de 1 mM para a indução da expressão das proteínas. A incubação prosseguiu por mais 3 horas nas mesmas condições. Paralelamente foi realizado um cultivo sem adição de IPTG como controle não induzido.

As bactérias foram sedimentadas por centrifugação a 5.000g por 5 minutos, e o sedimento bacteriano ressuspense em PBS. Foi adicionado tampão de amostra 4x à solução em quantidade suficiente para que a concentração final de 1x. Os extratos protéicos foram homogeneizados em um homogenizador compacto tipo vórtex e desnaturados por aquecimento a 100 °C por 5 minutos seguidos de centrifugação a 16.000g por 1 minuto e analisados em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE – como descrito em 4.4.3).

Para verificar a eficácia da indução, deve-se observar no gel uma banda do tamanho esperado da proteína (comparando-se ao marcador de peso molecular), e que só exista ou seja significativamente maior no extrato induzido, quando

comparada ao controle não induzido. Se ainda houver dúvidas se a proteína observada no gel é a de interesse, pode-se realizar um ensaio de *Western Blot* e marcar a membrana com um anticorpo anti-histidina, o que evidencia somente a proteína recombinante com sua cauda de histidina.

### 3.4.3. Eletroforese de proteínas em gel desnaturante de poliacrilamida (*SDS-PAGE*)

O gel desnaturante possui uma região de corrida e uma região de empilhamento, e os tampões e concentração de acrilamida são diferentes em cada uma destas partes. A concentração de poliacrilamida no gel de empilhamento é sempre de 4,75%, e a do gel de corrida depende do peso molecular da proteína a ser analisada. Géis com concentrações muito altas formam uma malha muito fechada, o que pode prejudicar a mobilidade das proteínas maiores. As concentrações de géis utilizadas na análise dos extratos e das proteínas purificadas estão especificadas no quadro abaixo.

Peso molecular da Proteína	Concentração do gel
Acima de 100 Kda	8%
Entre 100 e 50 Kda	10%
Entre 25 e 60 Kda	13%
Abaixo de 25 Kda	15%

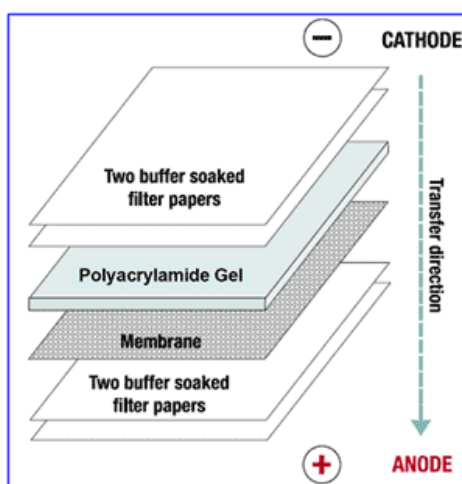
QUADRO 3.1 – CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS PARA OS GÉIS DESNATURANTES DE POLIACRILAMIDA. A CONCENTRAÇÃO UTILIZADA NO GEL VARIA INVERSAMENTE AO PESO MOLECULAR DA PROTEÍNA A SER ANALISADA.

Os géis foram imersos em Tampão SDS-PAGE, e as amostras contendo Tampão de amostra foram aplicadas. O controle de peso molecular utilizado foi o *BenchMark™ Protein Ladder* (Invitrogen), que possui marcadores de 10 a 220 Kda. As amostras foram submetidas a eletroforese sob amperagem de 30 mA por gel. Após a eletroforese os géis foram corados com Azul de comassie R-250 por cerca de 20 minutos, e em seguida o excesso de corante foi removido com uma solução de descoloração. Através desta metodologia, somente as regiões onde há presença de proteínas se mantém coradas e a localização das proteínas pode ser visualizada.

#### 3.4.4. Ensaio de *Western Blot* – Protocolo base

O ensaio de *Western Blot* foi utilizado para o teste das proteínas expressas (*Western Blot* anti-histidina) e foi utilizado para o teste de qualidade dos antisoros e avaliação do padrão de expressão das proteínas durante o ciclo de vida do parasita. O protocolo utilizado em ambos os casos foi o mesmo, diferindo somente a amostra aplicada no gel de poliacrilamida e os anticorpos utilizados na marcação da membrana.

Foi feito inicialmente um gel de proteína desnaturante SDS-PAGE das amostras e após o término da eletroforese, o gel foi colocado sobre uma membrana de nitrocelulose e submetido a uma corrente elétrica de 20 V por 18 horas, imerso em tampão de transferência. Desta forma as proteínas foram transferidas para a membrana, mantendo a mesma disposição espacial que apresentavam no gel de poliacrilamida.



<http://www.fermentas.com/techinfo/electrophoresis/img/blotting.gif>

FIGURA 3.6 – ESQUEMATIZAÇÃO DO SISTEMA UTILIZADO NA TRANSFERÊNCIA DE PROTEÍNAS PARA A MEMBRANA NA TÉCNICA DE *WESTERN BLOT*. UMA MEMBRANA DE NITROCELULOSE É COLOCADA SOBRE O GEL DE POLIACRILAMIDA, E O SISTEMA É CERCADO POR PAPEL FILTRO E ENCAIXADO EM UMA CUBA DE TRANSFERÊNCIA. A DIREÇÃO DA CORRENTE FAZ COM QUE AS PROTEÍNAS SAIAM DO GEL E SE FIXEM À MEMBRANA.

A membrana foi então corada com *Ponceau S* por 10 minutos e lavada delicadamente com água destilada. Após esta lavagem, pode-se observar as bandas controle presentes na canaleta do marcador de peso molecular. As bandas foram marcadas com um lápis e a canaleta correspondente ao marcador foi recortada da membrana e guardada, para posterior comparação com a membrana marcada. A parte restante da membrana foi então imersa em solução de bloqueio (5% de leite em pó desnatado em PBS-Tween 0,1%) por 1 hora.

Foram feitas 3 lavagens de 5 minutos com o tampão PBS-Tween 0,1%, e a partir desta etapa seguiu-se com a incubação dos anticorpos primário e secundário de acordo com o objetivo pretendido (descrito em 4.4.4 e 4.4.7). Após as incubações foi preparada uma solução de revelação 10 ml de tampão de revelação com fosfatase alcalina, 33 µl BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt) e 66 µl NBT (Nitro-Blue Tetrazolium Chloride). A membrana foi revelada no escuro por um intervalo de 2 a 15 minutos. Após este período a reação de revelação foi interrompida através da imersão da membrana em uma solução de água destilada + EDTA. As membranas foram secas a temperatura ambiente.

#### 3.4.5. Expressão de proteínas em larga escala

A expressão de proteínas para a inoculação em animais e obtenção de antisoro deve ser feita em grandes volumes, pois é necessária uma quantidade considerável de proteína para a inoculação. O protocolo de indução foi o mesmo já padronizado no teste de expressão, porém o volume de cultura utilizado foi de 200 ml.

Após as 2 horas de indução as culturas foram centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 7.000 g. O sobrenadante foi descartado e o sedimento bacteriano ressuspenso em Tampão de sonicação. As células foram sonicadas (Homogenizador 4710 - *Cole Parmer*) durante 15 segundos na potência 9 por 5 vezes, de modo a lisar as células bacterianas. A cultura foi novamente centrifugada e o sobrenadante coletado e denominado "fração solúvel". O sedimento restante foi ressuspenso na solução de purificação, que contém uréia 2 M, e a mistura foi agitada vigorosamente e centrifugada. O sobrenadante foi descartado e a lavagem foi repetida. Após a purificação o sedimento foi misturado ao tampão de

ressuspensão de proteínas, contendo 8M de uréia, e a mistura sonicada novamente nas mesmas condições anteriores. Após a centrifugação de 10 minutos a 7.000g o sobrenadante foi coletado e denominado “fração insolúvel”. As amostras foram armazenadas a - 20°C.

#### 3.4.6. Purificação das proteínas obtidas por cromatografia de afinidade e eletroeluição

As proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade com coluna de Níquel-ácido nitrilotriacético. A solução contendo a proteína recombinante a ser purificada, equivalente a um volume de 5 ml, foi incubada com 1 mL de resina Ni-NTA (*Qiagen*) em agitador orbital por 1 hora a 4°C. Após esse tempo, o material não ligado à resina foi coletado por gravidade e chamado de “*flow through*”. Foram feitas três lavagens de 5 ml com o tampão de ligação, sendo que foi coletada uma amostra de 1 ml do primeiro lavado. Após as lavagens foram feitas 6 eluições com 500 µl de tampão de eluição contendo imidazol. O imidazol compete com a histidina na ligação ao níquel e desta forma promove o desligamento das proteínas com cauda de histidina da coluna de purificação. Após esse processo, foi feita uma eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (item 4.4.3).

Como podia haver um excesso de proteínas provenientes da célula hospedeira *E. coli* durante a purificação por cromatografia foi feita também uma segunda etapa purificação por eletroeluição das proteínas de um gel preparativo. Foi adicionado tampão de amostra de proteínas 4X às frações eluídas pela coluna Ni-NTA em volume final de 5 ml. As amostras foram misturadas e submetidas à eletroforese por 16 h a 20 mA. O gel foi então corado em uma solução de KCl 100mM e a banda correspondente à proteína de interesse foi cortada do gel e colocada em uma membrana de diálise contendo cerca de 1 ml de tampão SDS-PAGE. O sistema foi imerso em uma cuba de eletroforese contendo o mesmo tampão e submetido a uma corrente de 60V por 2 horas. Após esse período as proteínas eluídas em SDS - PAGE foram coletadas da membrana de diálise e quantificadas no espectrofotômetro *nanodrop ND- 1000* (Thermo scientific).

### 3.4.7. Detecção da proteína recombinante através do ensaio de *Western Blot* com anticorpos anti-histidina

Como um controle de que a proteína expressa observada no gel de poliacrilamida correspondia a proteína recombinante de interesse, foi realizado um ensaio de *Western Blot* e marcação da membrana de nitrocelulose com um anticorpo primário anti-histidina e um anticorpo secundário conjugado a fosfatase alcalina.

Foram aplicados 10 µl da proteína recombinante diluída em tampão de amostra e 5µl do marcador BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen) no gel de poliacrilamida e as etapas de eletroforese, transferência e bloqueio da membrana foram feitas como descrito anteriormente. Após a lavagem da membrana esta foi incubada com o anticorpo anti-histidina diluído em PBS-Tween 0,1% na proporção 1:3000, à temperatura ambiente. Após 1 hora de incubação a membrana foi lavada por 3 vezes de 5 minutos com PBS-Tween 0,1%, e incubada com o anticorpo secundário *anti-mouse* conjugado à enzima fosfatase alcalina, diluído 1:10.000 em PBS-Tween 0,1%. Após a incubação de uma hora foram feitas mais 3 lavagens do mesmo modo anterior, e revelação como descrita em 4.4.4.

## 3.5. OBTENÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA AS PROTEINAS RECOMBINANTES

### 3.5.1. Teste do soro pré-imune

Antes das inoculações foi necessário verificar se no soro dos animais que foram utilizados existia algum anticorpo que podia apresentar reação cruzada com proteínas presentes no extrato de *T. cruzi*. Para realizar este teste foi retirada uma alíquota de 100 a 200 µl de sangue da cauda de cada camundongo. O sangue foi incubado a temperatura ambiente por 15 minutos e a 37°C por 15 minutos, e posteriormente centrifugado a 5.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante (soro pré-imune) foi coletado e transferido para um outro tubo, que foi armazenado a -20°C. O antisoro foi testado por *Western Blot* contra extrato protéico de *T. cruzi*, como descrito anteriormente. A diluição usada neste caso foi a menor diluição utilizada para o teste do soro imune.



### 3.5.2. Inoculações em animais para a obtenção de antisoro

Os animais utilizados para a inoculação foram camundongos da linhagem *Swiss*, com mais de 40 dias de vida. A escolha do sexo foi de acordo com a disponibilidade do biotério, mas foram todos do mesmo sexo, ao menos para cada uma das proteínas. Na primeira inoculação foi preparada uma solução contendo 50 µg de proteína para cada camundongo e o adjuvante completo de *Freund*. A proporção adjuvante / solução de proteína foi de 1:1 e o volume da solução de proteína foi completado com solução salina a 0,9%. A partir da segunda inoculação foram utilizados 20µg de proteína por camundongo e 77µl do adjuvante Alu-gel. As inoculações intraperitoneais foram feitas de 10 em 10 dias. Uma semana após a 4ª inoculação uma alíquota de 100 a 200µl de sangue foi retirada através da cauda e o soro obtido como em 4.5.1. O soro foi testado por *Western Blot*, e caso ainda não houvesse produção de anticorpos contra a proteína recombinante, foi feita uma quinta inoculação nos mesmos moldes das anteriores. Ao se verificar a produção de anticorpos os camundongos foram sedados com quetamina e anestesiados com xilazina , e o sangue retirado por punção cardíaca.

### 3.5.3. Teste dos antisoros

Para o teste de qualidade dos antisoros produzidos foi aplicado em um gel de poliacrilamida o extrato protéico de *T. cruzi* (epimastigota com 3 ou 5 dias de cultivo), de modo que haja extrato correspondente a  $5 \times 10^6$  células por canaleta do gel. A proteína recombinante purificada funcionou como um controle positivo adicional. Também foi aplicado um marcador de peso molecular neste gel.

O gel de proteína SDS-PAGE e o *Western Blot* foram realizados como descrito anteriormente. Antes de a membrana ter sido incubada com a solução de bloqueio todas as regiões da membrana correspondentes às canaletas do gel foram cortadas individualmente e as diluições do soro a serem testadas foram escritas em cada tira.

A incubação foi feita em uma placa plástica onde cada diluição de antisoro foi testada. Após uma hora e meia de incubação a 37°C (este tempo foi otimizado dependendo da eficiência do anticorpo), foram feitas as lavagens, incubação com o anticorpo secundário conjugado a fosfatase e revelação, como descrito anteriormente.

### 3.6. IMUNOENSAIOS COM OS ANTICORPOS OBTIDOS

#### 3.6.1. Detecção de proteínas em extratos protéicos de *T. cruzi* em diferentes etapas do ciclo de vida

Foi realizado um ensaio de *Western Blot* da mesma forma descrita anteriormente para o teste dos antisoros. Porém, cada antisoro foi testado contra extratos de *T. cruzi* em várias etapas do ciclo de vida, bem como sob stress nutricional para se verificar o padrão de expressão destas proteínas durante as etapas do desenvolvimento do parasita.

#### 3.6.2. Imunofluorescência

Os parasitas suspensos em PBS foram submetidos à adesão sobre lâminas histológicas, previamente tratadas com poli-L-lisina por 20 minutos. Em seguida, os parasitas foram fixados com paraformaldeído a 4% em PBS, por 5 minutos a temperatura ambiente, seguido de lavagens com PBS. Posteriormente, o parasita foi permeabilizado pela incubação com 0,1% de Triton X-100 em PBS por 5 minutos, seguido pelo bloqueio dos sítios de ligação inespecíficos, que foi realizado pela incubação com solução contendo BSA 1% em PBS, por 16 horas a 4°C em câmara úmida. Após o bloqueio, as lâminas foram lavadas e incubadas por uma hora a 37°C com o soro contendo anticorpo primário, anti-proteína recombinante. Os soros imune e pré-imune foram diluídos em PBS contendo BSA 1%. Após o período de incubação, foram realizadas lavagens com PBS, para a retirada do excesso de anticorpos. Posteriormente, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário (anti-IgG de

camundongo, conjugado com *Alexa fluor 488*), na diluição de 1:500 por uma hora a 37°C, seguido de lavagens com PBS.

O núcleo celular foi evidenciado pela coloração com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride), incubado na diluição 1:2000 em PBS, por 5 minutos, à temperatura ambiente. Após a incubação foram realizadas 3 lavagens de 5 minutos com PBS. Ao final, foi colocada uma lamínula sobre a lâmina, utilizando o meio de montagem n-propil-galato, sendo o material selado com esmalte.

As lâminas foram observadas em microscopia de fluorescência, utilizando microscópio *Nikon*, sendo que as imagens foram capturadas com a utilização de câmara CoolSnap (*Media Cybernetics*) e analisadas com o programa *Image Pro-Plus v. 4.5.1.22 (Media Cybernetics)*.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. SELEÇÃO DOS GENES CANDIDATOS

A seleção dos genes para esse trabalho foi feita com base numa busca no genoma do *Trypanosoma cruzi* utilizando a ferramenta BLAST( Basic Local AlignmentSearch Tool) e a sequência do gene TcZC3H39 que codifica para uma proteína com domínio CCCH que apresenta interação com RNAs (dados submetidos para publicação Alves et al, 2013). Dos candidatos apresentados foram selecionados os genes ZFP11, ZFP29 e ZFPTTP, com seus respectivos IDs no banco de dados *TritypDB* (<http://tritypdb.org/tritypdb/>): Tc00.1047053504929.5, Tc00.1047053506885.204 e Tc00.1047053503453.20.

A nomenclatura dos genes foi baseada no estudo realizado por Kramer e colaboradores em 2010, onde foi realizada uma análise *in silico* no genoma de *T. cruzi* buscando a identificação de proteínas com domínios dedo de zinco convencionais ou não convencionais, conforme classificado pelos autores, os genes selecionados para esse trabalho foram identificados e a presença dos domínios CCCH foram confirmadas por análises de sequências (Figura 4.1).

Como mostrado na figura 4.1, as três proteínas apresentam os domínios na porção amino terminal, porém existem diferenças entre elas. Enquanto que para a proteína ZFP11 não foi encontrado outro domínio senão o CCCH, para ZFP29 foi identificado, além do domínio convencional (C-X7-C-X5-C-X3-H), um domínio não convencional, tratado como sendo diferente da estrutura C-X7-8-C-X5-C-X3-H. Já para a proteína ZFPTTP, além do domínio CCCH foi detectado o domínio DNAJ, característicos de proteínas chaperonas. (KRAMER ET AL, 2010).

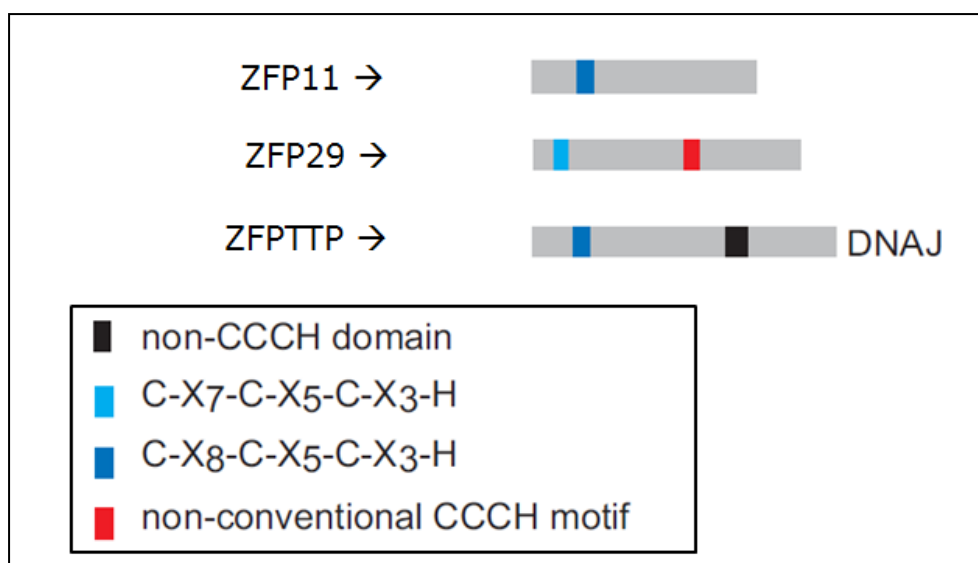


FIGURA 4.1 DOMÍNIOS ENCONTRADOS NAS SEQUÊNCIAS DAS PROTEÍNAS ZFP11, ZFP29 E ZFPTTP. (ADAPTADO DE KRAMER *et al* ,2010)

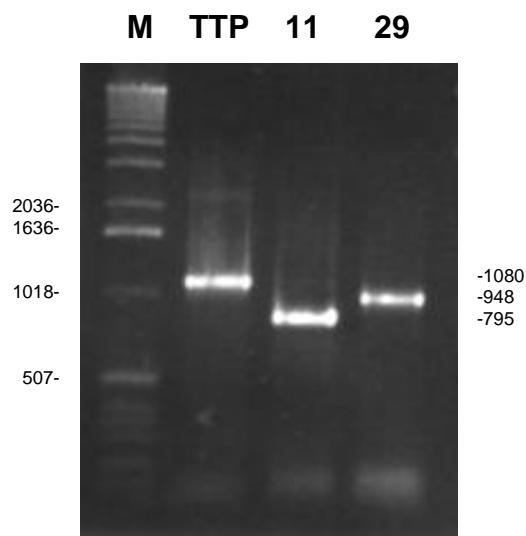
#### 4.2. AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DOS GENES ZFP11, ZFP29 E ZFPTTP

Os oligonucleotídeos desenhados para realizar as etapas de amplificação dos genes estão representados no quadro 4.1. O resultado da amplificação dos três genes a partir do DNA genômico do *T. cruzi* está mostrado na figura 4.2 onde pode-se observar que houve a amplificação de fragmentos específicos de DNA de tamanho correspondente ao esperado para os genes de interesse.

Sendo assim partiu-se para as etapas de clonagem na plataforma Gateway®, inicialmente no vetor de entrada pDONR™221, confirmadas por PCR de colônia e de minipreparação plasmidial, conforme ilustrado na figura 4.3 e 4.4 respectivamente.

Gene	Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores
ZFP11 F	5' - <b>GGGG</b> - <b>ACA</b> - <b>AGT</b> - <b>TTG</b> - <b>TAC</b> - <b>AAA</b> - <b>AAA</b> - <b>GCA</b> - <b>GGC</b> - <b>TCC</b> - <b>ATGACGAGCATGCATTCA</b> - 3'
ZFP11 R	5' - <b>GGGG</b> - <b>AC</b> - <b>CAC</b> - <b>TTT</b> - <b>GTA</b> - <b>CAA</b> - <b>GAA</b> - <b>AGC</b> - <b>TGG</b> - <b>GTC</b> - <b>TTACTGCAATGCCGCCTC</b> - 3'
ZFP29 F	5' - <b>GGGG</b> - <b>ACA</b> - <b>AGT</b> - <b>TTG</b> - <b>TAC</b> - <b>AAA</b> - <b>AAA</b> - <b>GCA</b> - <b>GGC</b> - <b>TCC</b> - <b>ATGACACAGATCATCACTGAGAAT</b> - 3'
ZFP29 R	5' - <b>GGGG</b> - <b>AC</b> - <b>CAC</b> - <b>TTT</b> - <b>GTA</b> - <b>CAA</b> - <b>GAA</b> - <b>AGC</b> - <b>TGG</b> - <b>GTC</b> - <b>TTACCATTCCACATCCTGTACA</b> - 3'
ZFPTTP F	5' - <b>GGGG</b> - <b>ACA</b> - <b>AGT</b> - <b>TTG</b> - <b>TAC</b> - <b>AAA</b> - <b>AAA</b> - <b>GCA</b> - <b>GGC</b> - <b>TCC</b> - <b>ATGTCGCTTTCATTTATCGAGT</b> - 3'
ZFPTTP R	5' - <b>GGGG</b> - <b>AC</b> - <b>CAC</b> - <b>TTT</b> - <b>GTA</b> - <b>CAA</b> - <b>GAA</b> - <b>AGC</b> - <b>TGG</b> - <b>GTC</b> - <b>TCACCAGATGCTGTCCTCAG</b> - 3'

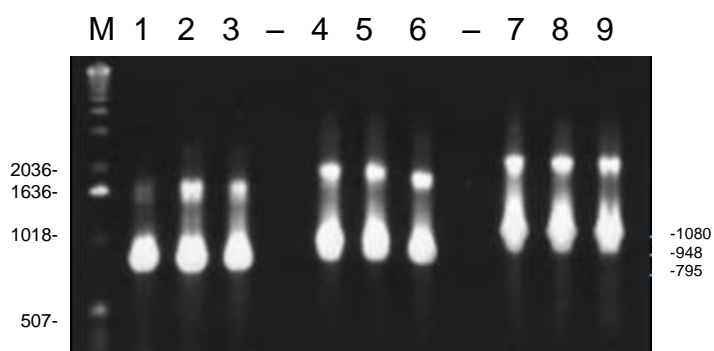
**QUADRO 4.1– SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES.** EM NEGRITO ESTÃO AS REGIÕES DE RECOMBINAÇÃO PARA PLATAFORMA GATEWAY® E EM COLORIDO AS REGIÕES ESPECÍFICAS PARA AMPLIFICAÇÃO DE CADA GENE SENDO: VERDE – ZFP11; AZUL – ZFP29 E VERMELHO – ZFPTTP.



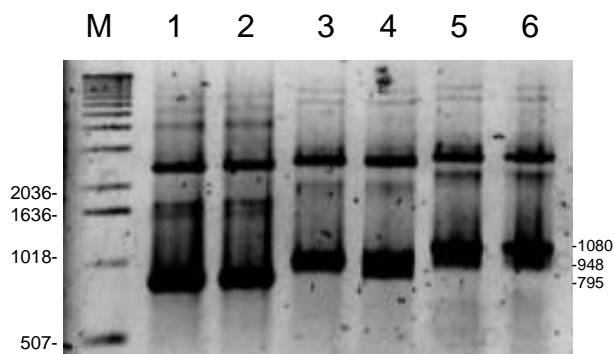
**FIGURA 4.2 – AMPLIFICAÇÃO DOS GENES ZFP11, ZFP29 E ZFPTTP A PARTIR DO DNA GÊNOMICO DE *T. cruzi*.** GEL DE ELETROFORESE DA PCR DOS GENES ZFPTTP, ZFP11 e ZFP29. M – MARCADOR 1KB GIBCO; TTP - ZFPTTP (1080PB); 11 – ZFP11 (795PB); 29 – ZFP29 (948PB).

As colônias positivas, identificadas por PCR de colônia para a presença do pDONR™221 contendo os respectivos insertos gênicos foram submetidas a minipreparação plasmidial para posterior análise dos plasmídeos por PCR convencional e sequenciamento dos mesmos. Com base nas análises dos clones e dos vetores obtidos, somado aos dados do sequenciamento dos plasmídeos, constatou-se que os genes foram corretamente inseridos no vetor de entrada.

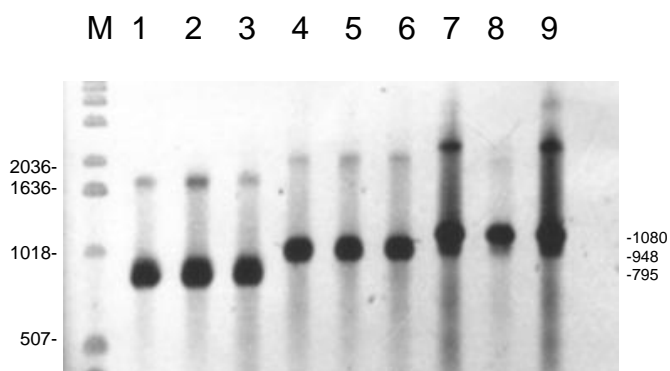
Dessa forma prosseguiu-se para a etapa de recombinação com o vetor de expressão pDEST™17, a qual foi confirmada através de PCR de colônia (figura 4.5) e minipreparação plasmidial (figura 4.6) seguida de confirmação da recombinação pelos dados do sequenciamento.



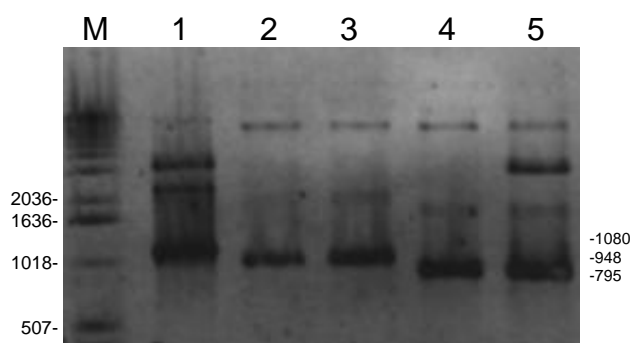
**FIGURA 4.3 – CLONAGEM DOS GENES ZFP11, ZFP29 E ZFPTTP EM PDONR™221.** GEL DE ELETROFORESE DA PCR DE COLÔNIAS SELECIONADAS PARA OS GENES ZFPTTP, ZFP11 e ZFP29 RECOMBINADOS EM PDONR™221 E TRANSFORMADOS EM DH5α. M – MARCADOR 1KB GIBCO; 1,2 E 3 – ZFP11 (795PB); 4,5 E 6 – ZFP29 (948PB); 7,8 E 9 – ZFPTTP (1080PB).



**FIGURA 4.4 – CLONAGEM DOS GENES ZFP11, ZFP29 E ZFPTTP EM PDONR™221.** GEL DE ELETROFORESE DA PCR DA MINIPREPARAÇÃO PLASMIDIAL DOS GENES ZFPTTP, ZFP11 E ZFP29 EM PDONR™221. M – MARCADOR 1KB GIBCO, 1 E 2 – ZFP11 (795PB); 3 E 4 – ZFP29 (948PB); 5 E 6 – ZFPTTP (1080PB).



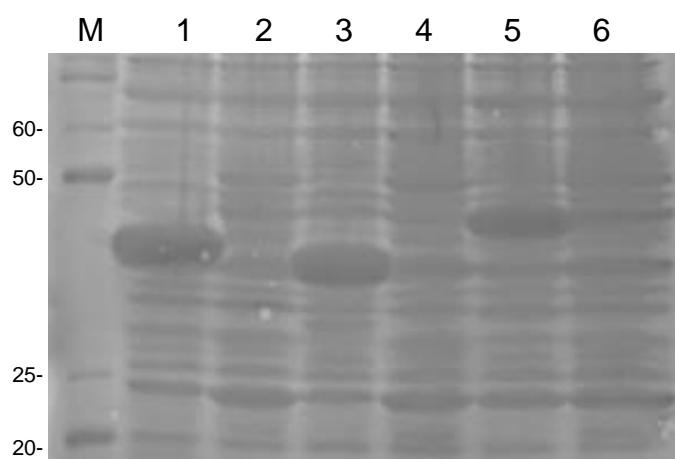
**FIGURA 4.5 – CLONAGEM DOS GENES ZFP11, ZFP29 E ZFPTTP EM pDEST™17** GEL DE ELETROFORESE DA PCR DE COLÔNIA SELECIONADAS PARA OS GENES ZFPTTP, ZFP11 e ZFP29 RECOMBINADOS EM pDEST™17 E TRANSFORMADOS EM DH5α. M – MARCADOR 1KB GIBCO; 1,2 E 3 – ZFP11 (795PB); 4,5 E 6 – ZFP29 (948PB); 7,8 E 9 – ZFPTTP (1080 PB).



**FIGURA 4.6 – CLONAGEM DOS GENES ZFP11, ZFP29 E ZFPTTP EM pDEST™17.** GEL DE ELETROFORESE DA PCR DA MINIPREPARAÇÃO PLASMIDIAL DOS GENES ZFPTTP, ZFP11, ZFP29 EM PDEST™17. M – MARCADOR 1KB GIBCO; 1 – ZFPTTP (1080PB); 2 E 3 – ZFP29 (948PB), 4 E 5 – ZFP11 (795PB).

### 4.3. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Depois de confirmada a correta inserção dos genes selecionados no vetor de expressão, foi realizada a transformação desses vetores contendo os genes ZFPTTP, ZFP11 e ZFP29 na cepa de expressão *E. coli* BL21(DE3)pLysS e os testes de expressão. O resultado da indução, realizada a 37°C sob agitação por 3 horas e com 1 mM IPTG, desses três genes encontra-se na figura 4.7.



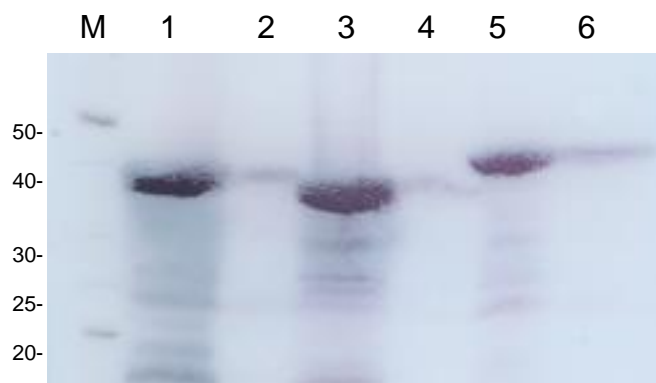
**FIGURA 4.7 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES ZFP11, ZFP29 E ZFPTTP.** GEL DE POLIACRILAMIDA 15% CORADO COM COMASSIE BLUE COM TESTE DE EXPRESSÃO DOS GENE ZFPTTP, ZFP11 E ZFP29. M – MARCADOR BENCHMARK; 1 – ZFP11 (INDUZIDO); 3 – ZFP29 (INDUZIDO); 5 – ZFPTTP (INDUZIDO); 2,4 E 6 – NÃO INDUZIDO DE 1,3 E 5 RESPECTIVAMENTE. A INDUÇÃO FOI FEITA UTILIZANDO OS PARÂMETROS DE CULTIVO DAS COLÔNIAS DE 1mM IPTG, 37°C POR 3 HORAS. O NÃO INDUZIDO SOFREU AS MESMAS CONDIÇÕES EXCETO A PRESENÇA DE IPTG. PESO MOLECULAR DAS PROTEÍNAS SEM CONSIDERAR O PESO CORRESPONDENTE A CAUDA DE HISTIDINA ACRESCIDA PELO VETOR PDEST™ 17. ZFP11 - 29,64kDa; ZFP29 – 35,01kDa; ZFPTTP – 39,28kDa .

Com base no resultado observado na eletroforese é possível afirmar que o sistema de indução funcionou (comparando induzido e não induzido) e o perfil de migração eletroforético da superexpressão é condizente com peso molecular esperado para as proteínas ZFP11, ZFP29 e ZFPTTP, considerando a adição de 6kDa referente à cauda de Histidina. Realizou-se um ensaio de *Western Blot* para verificar a presença da cauda de histidina (Figura 4.8).

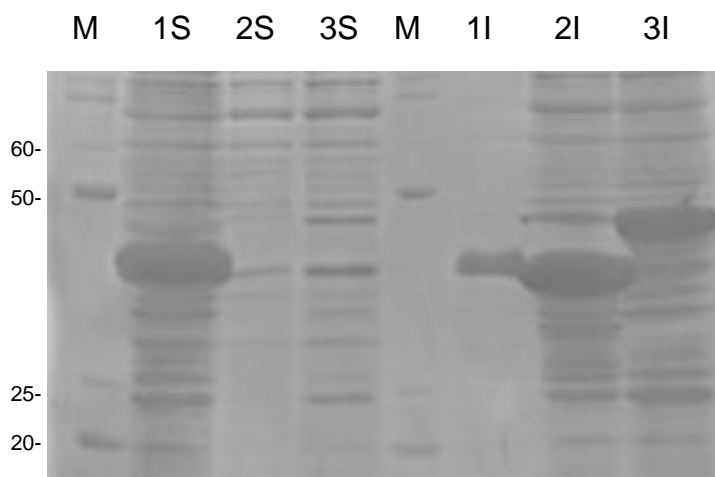
Tendo em vista que as proteínas foram expressas com sucesso e confirmadas como sendo as de interesse, o passo seguinte foi investigar em que condição essas proteínas estavam sendo expressas, se na fração solúvel ou insolúvel. Para isso repetiu-se a expressão e separou-se a fração solúvel e insolúvel,



utilizando protocolo descrito em 3.4.5. Essas frações foram então aplicadas em gel de poliacrilamida para análise (figura 4.9).



**FIGURA 4.8 – CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES ZFP11, ZFP29 E ZFP11P.** MEMBRANA DE *WESTERN BLOT* COM AS FRAÇÕES INDUZIDAS E NÃO INDUZIDAS DOS GENES ZFP11, ZFP29 E ZFP11P, INCUBADA COM ANTICORPO  $\alpha$ -HISTIDINA (1:3000). M – MARCADOR BENCHMARK; 1 – ZFP11 (INDUZIDO); 3 – ZFP29 (INDUZIDO); 5 – ZFP11P (INDUZIDO); 2,4 E 6 – NÃO INDUZIDO DE 1,3 E 5 RESPECTIVAMENTE. PESO MOLECULAR DAS PROTEÍNAS SEM CONSIDERAR O PESO CORRESPONDENTE A CAUDA DE HISTIDINA ACRESCIDA PELO VETOR PDEST™17. ZFP11 - 29,64kDa; ZFP29 - 35,01kDa; ZFP11P - 39,28kDa.



**FIGURA 4.9 – ANÁLISE DE SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES ZFP11, ZFP29 E ZFP11P.** GEL POLIACRILAMIDA 15% CORADO COM COMASSIE BLUE CONTENDO FRAÇÕES SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS ZFP11, ZFP29 E ZFP11P. M – MARCADOR BENCHMARK, 1S E 1I – ZFP11; 2S E 2I – ZFP29; 3S E 3I – ZFP11P. S – SOLÚVEL E I – INSOLÚVEL. PESO MOLECULAR DAS PROTEÍNAS SEM CONSIDERAR O PESO CORRESPONDENTE A CAUDA DE HISTIDINA ACRESCIDA PELO VETOR PDEST™17: ZFP11 - 29,64kDa; ZFP29 - 35,01kDa; ZFP11P - 39,28kDa.

Como resultado, observou-se que dentre todas as proteínas em estudo apenas ZFP11 encontrou-se enriquecida na fração solúvel, enquanto que ZFP29 e ZFPTTP concentraram-se na fração insolúvel (solubilizada com 8M de Ureia).

O fato da proteína ZFP11 ter sido obtida com esse enriquecimento na fração solúvel é bem interessante, uma vez que em sistemas de expressão utilizando procariotos para proteínas provenientes de organismos eucariotos geralmente resulta em grandes níveis da proteína na fração insolúvel, como consequência de uma maquinaria de modificação pós-traducional primitiva, quando comparada com a existente em eucariotos.

Na tentativa de se obter as proteínas ZFP29 e ZFPTTP nas frações solúveis foram feitos testes com alterações no protocolo de indução. Esses testes resumiram-se em mudanças no tempo e na temperatura de indução, na concentração do agente indutor (IPTG) e nos tampões de ressuspensão e lise das células (principalmente com modificações no pH das soluções), porém até o momento não foi possível alterar a solubilidade das proteínas ZFP29 e ZFPTTP.

No entanto, como o objetivo final da expressão e purificação das proteínas correspondia a imunizar camundongos e obter anticorpos policlonais específicos, foi possível realizar essas etapas com as proteínas obtidas nas frações insolúveis.

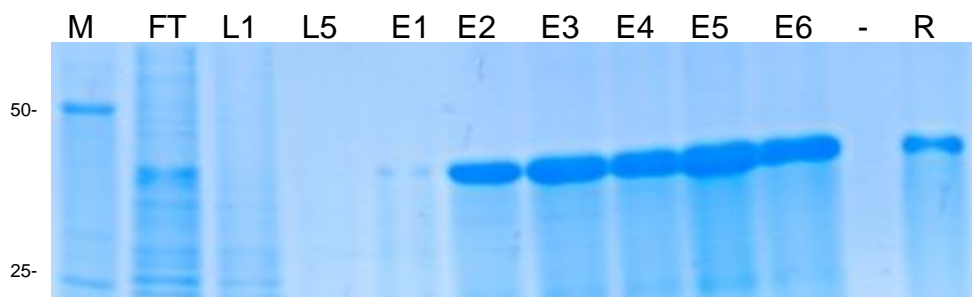
Portanto, com a padronização da expressão dos genes ZFPTTP, ZFP11 e ZFP29, foi dada continuidade para a próxima etapa de expressão em larga escala e purificação das proteínas, conforme descrito nos itens 4.4.5 e 4.4.6, respectivamente.

O resultado da purificação por cromatografia de afinidade das proteínas obtidas nas frações insolúveis ZFP11, ZFP29 e ZFPTTP encontram-se nas figuras 4.10, 4.11 e 4.12, respectivamente.

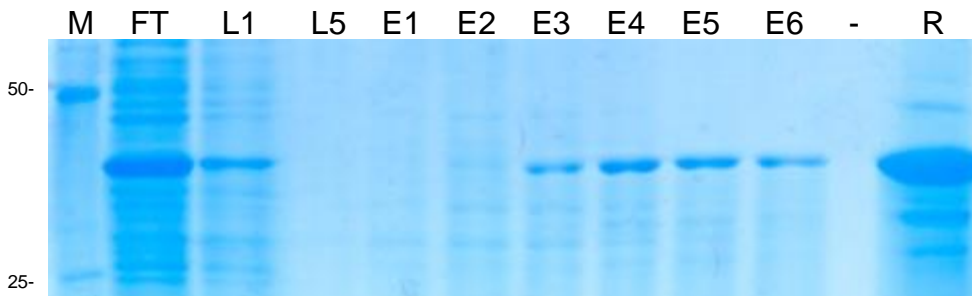
Apesar da proteína ZFP11 ter sido obtida na fração solúvel, não foi possível purificá-la uma vez que não houve a ligação da proteína com a coluna de níquel. A hipótese levantada é a que a conformação nativa da proteína pode ter escondido a cauda de histidina, o que impediria a interação desta com o níquel presente na resina da coluna e explicaria o fato da proteína ter sido identificada apenas na fração correspondente ao “*flow through*”.

Uma das abordagens possíveis para testar essa hipótese seria trocar a posição da cauda de histidina da porção N-terminal para a porção C-terminal (uma troca de vetor seria necessária para alterar a posição das histidinas, ou mesmo

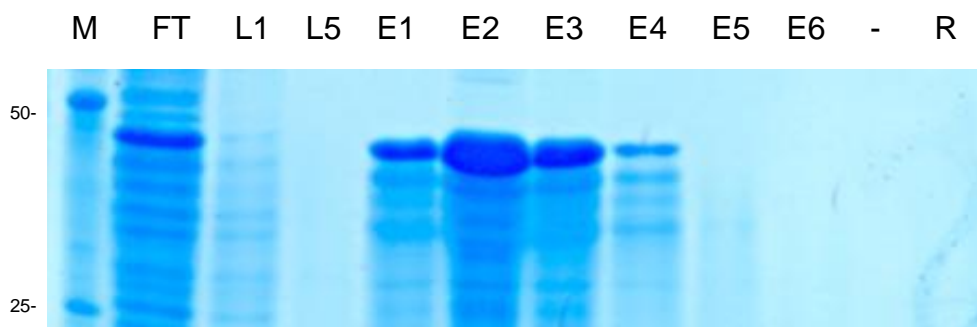
alterar a cauda adicionada a proteína), no entanto, por questões de tempo e prioridade essa abordagem ainda não foi realizada. Para as etapas futuras foi então utilizada a proteína ZFP11 na fração insolúvel.



**FIGURA 4.10 – ANÁLISE DA PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE DA PROTEÍNA ZFP11.** GEL POLIACRILAMIDA 15% CORADO COM COMASSIE BLUE CONTENDO FRAÇÕES DA CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE POR COLUNA DE NÍQUEL DA PROTEÍNA ZFP11. M – MARCADOR BENCHMARK; FT – FLOW THROUGH; L1 E L5 – PRIMEIRA E QUINTA LAVAGEM (TAMPÃO COM 10 mM IMIDAZOL); E1 A E6 – ELUÍDOS (CONCENTRAÇÕES DE 300mM A 500mM IMIDAZOL); R – RESINA. ZFP11 – 29,64 kDa MAIS ADIÇÃO DE 6kDa REFERENTE À CAUDA DE HISTIDINA.



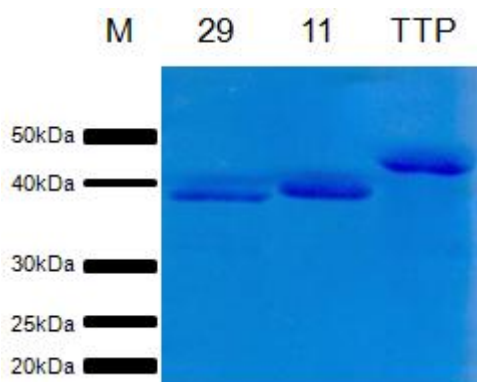
**FIGURA 4.11 – ANÁLISE DA PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE DA PROTEÍNA ZFP29.** GEL POLIACRILAMIDA 15% CORADO COM COMASSIE BLUE CONTENDO FRAÇÕES DA CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE POR COLUNA DE NÍQUEL DA PROTEÍNA ZFP29. M – MARCADOR BENCHMARK; FT – FLOW THROUGH; L1 E L5 – PRIMEIRA E QUINTA LAVAGEM (TAMPÃO COM 10 mM IMIDAZOL); E1 A E6 – ELUÍDOS (CONCENTRAÇÕES DE 300mM A 500mM IMIDAZOL); R – RESINA. ZFP29 – 35,01 kDa MAIS ADIÇÃO DE 6kDa REFERENTE À CAUDA DE HISTIDINA.



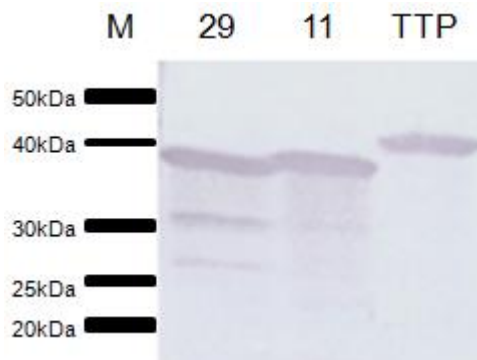
**FIGURA 4.12 – ANÁLISE DA PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE DA PROTEÍNA ZFPTTP.** GEL POLIACRILAMIDA 15% CORADO COM COMASSIE BLUE CONTENDO FRAÇÕES DA CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE POR COLUNA DE NÍQUEL DA PROTEÍNA ZFPTTP. M – MARCADOR BENCHMARK; FT – FLOW THROUGH; L1 E L5 – PRIMEIRA E QUINTA LAVAGEM (TAMPÃO COM 10mM IMIDAZOL); E1 A E6 – ELUÍDOS (CONCENTRAÇÕES DE 300mM A 500mM IMIDAZOL); R – RESINA. ZFPTTP – 39,28kDa MAIS ADIÇÃO DE 6kDa REFERENTE À CAUDA DE HISTIDINA.

A análise da eletroforese realizada permite concluir que a purificação por cromatografia de afinidade por coluna de níquel foi parcialmente eficiente, já que apesar das proteínas terem sido enriquecidas nas frações eluídas, algumas outras proteínas podem ter sido copurificadas com a proteínas de interesse.

Foi realizada então uma etapa posterior de purificação por eletroeluição, seguido de análise em gel de poliacrilamida e confirmação por ensaio de *Western Blot*, novamente utilizando anticorpo anti-histidina como forma de identificação das proteínas recombinantes (figura 4.13 e 4.14 respectivamente).



**FIGURA 4.13 – ANÁLISE DA PURIFICAÇÃO POR ELETROELUIÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES ZFP11, ZFP29 E ZFPTTP.** GEL POLIACRILAMIDA 15% CORADO COM COMASSIE BLUE CONTENDO AS PROTEÍNAS ZFP11, ZFP29 E ZFPTTP PURIFICADAS POR ELETROELUIÇÃO. M – MARCADOR BENCHMARK; 29 – ZFP29 (35,01kDa); 11 - ZFP11 (29,64kDa); TTP - ZFPTTP (39,28kDa).



**FIGURA 4.14 – CONFIRMAÇÃO DA PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES ZFP11, ZFP29 E ZFPTTP.** GEL POLIACRILAMIDA 15% CORADO COM COMASSIE BLUE CONTENDO AS PROTEÍNAS ZFP11, ZFP29 E ZFPTTP PURIFICADAS. M – MARCADOR BENCHMARK; 29 – ZFP29 (35,01kDa); 11 - ZFP11 (29,64kDa); TTP - ZFPTTP ( 39,28kDa).

#### 4.4. OBTENÇÃO E ANÁLISE DE ANTICORPOS POLICLONAIS

Paralelamente as etapas de purificação, foi realizada a coleta e análise do soro pré-imune de seis camundongos da linhagem *Swiss* por meio de *Western Blot* (figura 4.15).



**FIGURA 4.15 – ANÁLISE DO SORO PRÉ-IMUNE.** MEMBRANA DE *WESTERN BLOT* INCUBADA COM SORO PRÉ-IMUNIZADO DOS SEIS CAMUNDONGOS TESTADOS. DE 1 A 6 CADA NÚMERO REPRESENTA UM CAMUNDONGO DIFERENTE. O SORO FOI TESTADO NA TITULAÇÃO DE 1:100, UTILIZANDO EXTRATO DE *T. cruzi* NA FORMA EPIMASTIGOTA 3 DIAS.

Com as proteínas ZFP11, ZFP29 e ZFPTTP purificadas e com os camundongos não apresentando reação cruzada contra o extrato de *T. cruzi*, iniciou-se o protocolo de obtenção de anticorpos policlonais, primeiramente com as inoculações das proteínas, conforme descrito em 4.5.2.

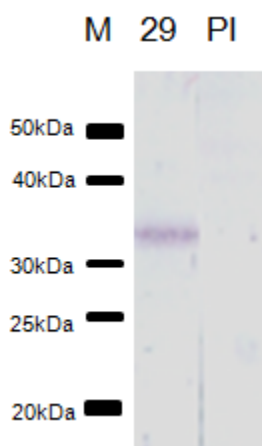
Após a quarta e última inoculação os camundongos foram sacrificados e o soros foram testados contra as proteínas recombinantes por meio da técnica de *Dot Blot* (figura 4.16).



**FIGURA 4.16 – ANÁLISE DO SORO OBTIDO CONTRA PROTEÍNAS RECOMBINANTES ZFP11, ZFP29 E ZFPTTP.** DOT BLOT COM SORO DOS CAMUNDONGOS IMUNIZADOS CONTRA AS PROTEÍNAS RECOMBINANTES ZFP11, ZFP29 E ZFPTTP. DE 1 A 6 CADA NÚMERO REPRESENTA UM CAMUNDONGO DIFERENTE, SENDO 1 E 2 IMUNIZADOS COM ZFP11; 3 E 4 COM ZFP29; 5 E 6 COM ZFPTTP. A TÉCNICA DE DOT BLOT CONSISTE NUMA MODIFICAÇÃO DE UM *WESTERN BLOT* APENAS PELO FATO DE NÃO SER NECESSÁRIO REALIZAR UMA ELETROFORESE E TRANSFERÊNCIA PARA UMA MEMBRANA DE NITROCELULOSE. EM VEZ DISSO APLICA-SE UMA QUANTIDADE MINÍMIMA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE DIRETO NA MEMBRANA E COLOCA-SE PARA BLOQUEAR ESSA MEMBRANA, SEGUINDO COM AS ETAPAS DE INCUBAÇÃO COM OS ANTICORPOS (NESSE CASO ANTI-HISTIDINA)

A análise dos soros produzidos contra as proteínas recombinantes demonstrou que as inoculações geraram uma resposta imune positiva que gerou anticorpos capazes de reconhecer as proteínas recombinantes ZFP11, ZFP29 e ZFPTTP.

A próxima etapa foi analisar se esses soros eram capazes de reconhecer a proteína nativa do *T. cruzi*. Para isso os soros respectivos para cada uma das proteínas foram testados contra o extrato de parasitas epimastigotas através de um ensaio de *Western Blot*. Dos seis soros testados apenas dois apresentaram anticorpos capazes de reconhecer a proteína nativa ZFP29 (figura 4.17) e ZFPTTP (figura 4.18) de modo específico a julgar pela única marcação obtida no peso molecular esperado para ambas as proteínas.



**FIGURA 4.17 – ANÁLISE DO SORO ANTI-ZFP29.** WESTERN BLOT COM EXTRATO DE EPIMASTIGOTA 3 DIAS ( $5 \times 10^6$  PARASITAS/CANALETA) INCUBADO COM SORO ANTI-ZFP29 OU SORO DO CAMUNDONGO PRÉ-IMUNIZADO. M – MARCADOR BENCHMARK; 29 – ANTI-ZFP29 (1:500); PI – SORO PRÉ-IMUNE (1:500). ZFP29 – 35,01kDa

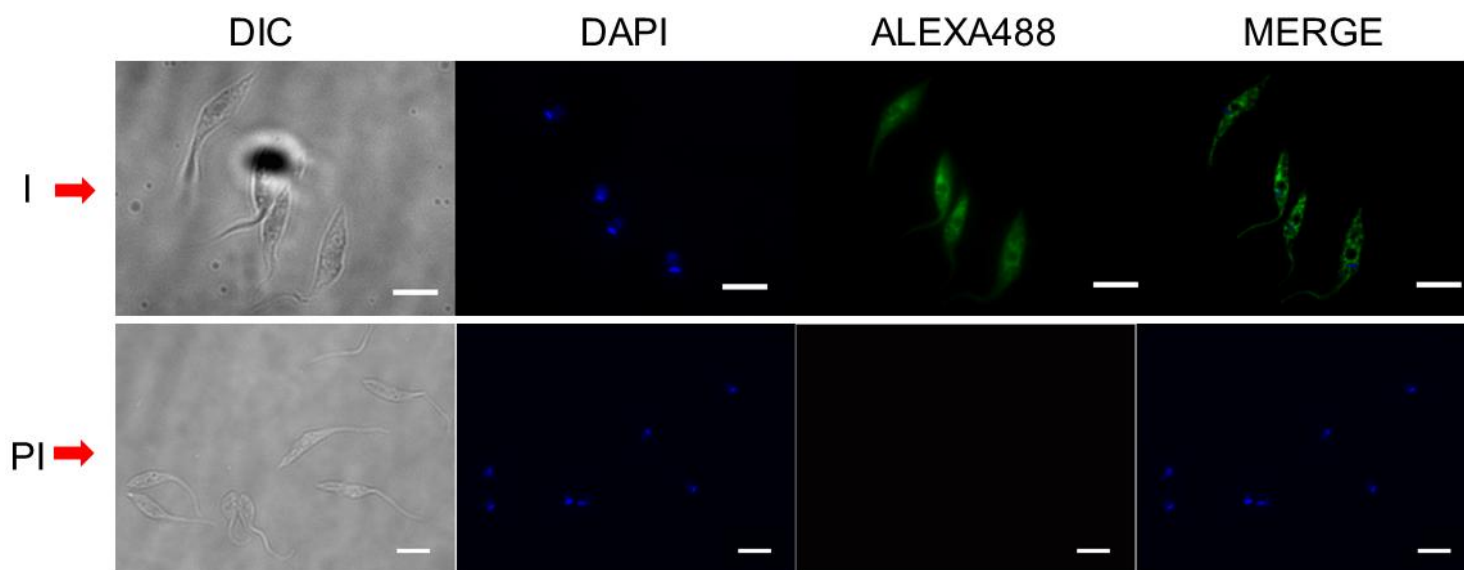


**FIGURA 4.18 – ANÁLISE DO SORO ANTI-ZFPTTP.** WESTERN BLOT COM EXTRATO DE EPIMASTIGOTA 3 DIAS ( $5 \times 10^6$  PARASITAS/CANALETA) INCUBADO COM SORO ANTI-ZFPTTP OU SORO DO CAMUNDONGO PRÉ-IMUNIZADO. M – MARCADOR BENCHMARK; TTP – ANTI-ZFPTTP (1:500); PI – SORO PRÉ-IMUNE (1:500). ZFPTTP – 39,28kDa

#### 4.5. IMUNOLocalização DAS PROTEÍNAS ZFP29 E ZFPTTP

Sendo assim, enquanto a proteína ZFP11 voltou para as etapas de expressão e purificação proteica, com o intuito de se obter mais proteínas para repetir as inoculações, as proteínas ZFP29 e ZFPTTP avançaram para os ensaios de imunolocalização e análise do padrão de expressão ao longo do ciclo de vida.

A imunofluorescência foi realizada em parasitas no estágio epimastigotas 3 dias utilizando os soros na titulação de 1:500 e como controle o soro pré-imune dos camundongos correspondentes nas mesmas titulações. O resultado da imunolocalização para as proteínas ZFP29 e ZFPTTP encontram-se nas figuras 4.19 e 4.20, respectivamente.

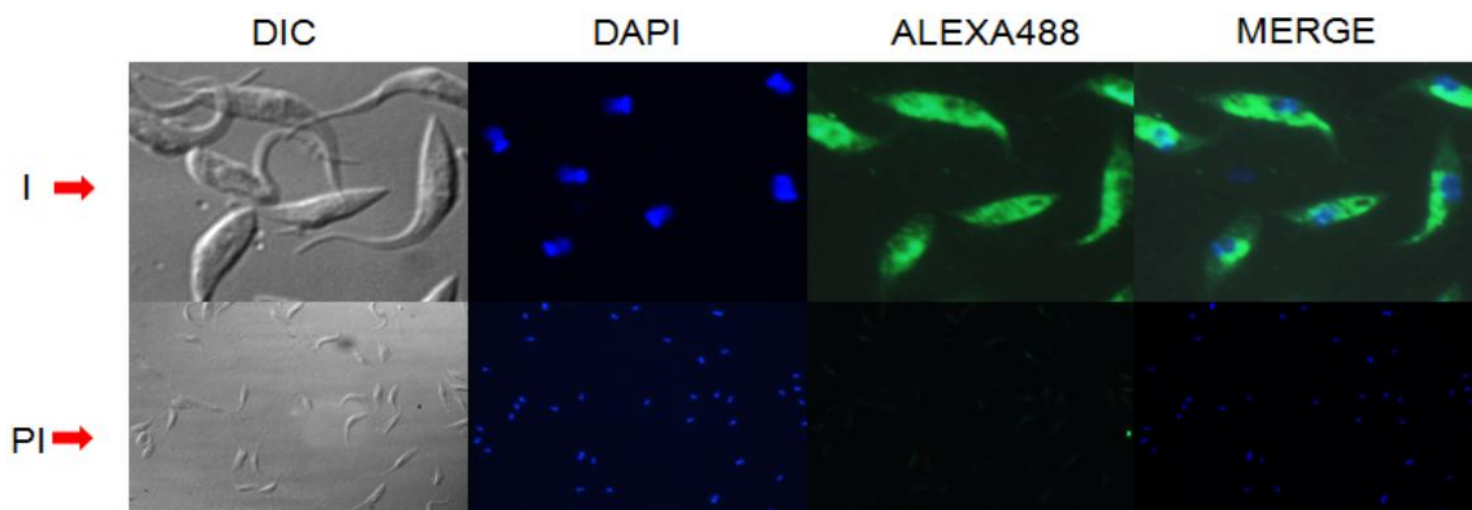


**FIGURA 4.19 – IMUNOLocalização DA PROTEÍNA ZFP29.** IMUNOFUORESCÊNCIA DE EPIMASTIGOTA 3 DIAS COM SORO  $\alpha$ -ZFP29 E CONTROLE PRÉ-IMUNE, AMBOS NUMA TITULAÇÃO DE 1:500. A LINHA SUPERIOR REFERE-SE AO SORO PÓS-IMUNIZAÇÃO E A LINHA INFERIOR AO PRÉ-IMUNE. DA ESQUERDA PARA DIREITA TEM-SE O DIC, O DAPI, O ALEXA488 (SECUNDÁRIO  $\alpha$ -IgG DE CAMUNDONGO) E O MERGE (COM IMAGEM PROCESSADA POR DECONVOLUÇÃO).

As marcações observadas sugerem que ambas as proteínas (ZFP29 e ZFPTTP) apresentam uma localização citoplasmática num padrão granular disperso.

É interessante notar que em alguns parasitas há uma concentração da marcação ao redor do núcleo tanto para a proteína ZFP29 quanto para ZFPTTP, indicando um acúmulo dessas proteínas nessa região.

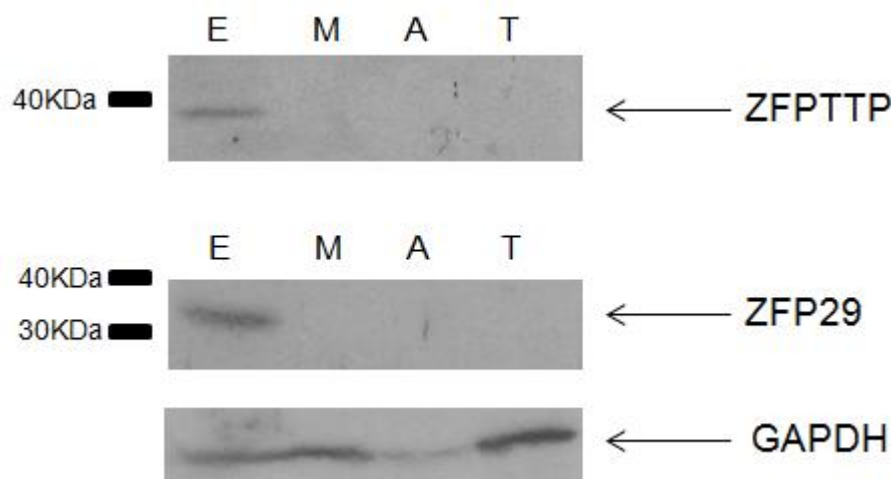




**FIGURA 4.19 – IMUNOLocalização da proteína ZFPTTP.** IMUNOFLORESCÊNCIA DE EPIMASTIGOTA 3 DIAS COM SORO  $\alpha$ -ZFPTTP E CONTROLE PRÉ-IMUNE, AMBOS NUMA TITULAÇÃO DE 1:500. A LINHA SUPERIOR REFERE-SE AO SORO PÓS-IMUNIZAÇÃO E A LINHA INFERIOR AO PRÉ-IMUNE. DA ESQUERDA PARA DIREITA TEM-SE O DIC, O DAPI, O ALEXA488 (SECUNDÁRIO  $\alpha$ -IgG DE CAMUNDONGO) E O MERGE.

#### 4.6. PERFIL DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS ZFP29 E ZFPTTP AO LONGO DO CICLO DE VIDA DO *Trypanosoma cruzi*

Com o intuito de analisar o perfil de expressão das proteínas ZFP29 e ZFPTTP no decorrer do ciclo de vida do parasita, realizou-se um ensaio de *Western Blot* com os principais estágios do parasita utilizando como anticorpo primário o soro específico contra as respectivas proteínas ZFP29 e ZFPTTP e como um normalizador o anticorpo anti-GAPDH (figura 4.21) que reconhece a proteína GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) que apresenta um padrão de expressão constitutivo, típico de genes *housekeeping* (BARBER, 2005). A GAPDH está descrita na literatura como sendo uma enzima importante no metabolismo energético e na produção de ATP e piruvato através da glicólise anaeróbica no citoplasma, além de desempenhar outras funções importantes em diferentes processos celulares (NICHOLLS, 2012).



**FIGURA 4.21 – ANÁLISE DO PADRÃO DE EXPRESSÃO AO LONGO DO CICLO DE VIDA DO *T. cruzi* DAS PROTEÍNAS ZFP29 E ZFPTTP.** NO PAINEL ACIMA A MEMBRANA DE NITROCELULOSE INCUBADA COM ANTICORPO PRIMÁRIO ANTI-ZFPTTP (1:500), NO PAINEL NO MEIO UTILIZANDO UM ANTICORPO PRIMÁRIO ANTI-ZFP29 (1:500) E LOGO ABAIXO INCUBADA COM O ANTICORPO ANTI-GAPDH (1:1000) QUE FOI UTILIZADO COMO CONTROLE. E – EPIMASTIGOTAS 3 DIAS; M – TRIPOMASTIGOTAS METACÍCLICOS; A – AMASTIGOTAS; T – TRIPOMASTIGOTAS DE CULTURA. PARA TODOS OS EXTRATOS FORAM APLICADOS A QUANTIDADE EQUIVALENTE A  $5 \times 10^6$  PARASITAS POR CANALETA.

O resultado da análise do padrão de expressão das proteínas ZFP29 e ZFPTTP mostram que ambas as proteínas tem sua expressão aumentada nas formas epimastigotas em relação as demais formas.

É importante ressaltar que não é possível afirmar apenas por esse experimento que as proteínas são exclusivamente expressas nesse estágio do ciclo de vida, uma vez que existem alguns fatores que devem ser levados em conta, tais como: o fato do modo de revelação do *Western Blot* ter sido por fosfatase alcalina que não é o modo mais sensível disponível; a normalização dos extratos ter sido feita por número de parasitas e não quantidade de proteínas, pois é sabido que em tripomastigotas metacíclicos a taxa de tradução é reduzida em relação as demais formas (ELIAS, 2001); ainda com relação à diferença observada no aos extratos, conforme mostra expressão da GAPDH em amastigotas, pelo fato dessa estar reduzida é um indício de que o extrato possa ter sofrido uma degradação em relação aos demais; até que ponto é possível comparar tripomastigotas de cultura (diferenciados no cultivo) com os presentes no sangue do hospedeiro vertebrado.

Diante dessas questões fica evidente a necessidade de confirmar esses experimentos antes de se concluir a exclusividade da expressão das proteínas ZFP29 e ZFPTTP em formas epimastigotas e, caso essa observação se confirme,

torna-se interessante analisar o padrão de expressão de ZFP29 e ZFPTTP nas etapas de diferenciação entre as formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas, de modo a acompanhar o momento e tentar descrever o fenômeno responsável pela queda da expressão de ambas as proteínas no decorrer da metaciclogênese.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para a proteína ZFP11 até o momento não foi possível realizar os imunoenaios propostos diante do fato do soro obtido não ter sido capaz de reconhecer a proteína nativa em extrato do *T. cruzi*, porém novas etapas de inoculação estão sendo realizadas.

As análises de imunolocalização por imunofluorescência em epimastigotas mostraram para as proteínas ZFP29 e ZFPTTP uma localização citoplasmática num perfil granular disperso. O fato de alguns parasitas terem apresentado marcações intensas próximas ao núcleo, provoca uma necessidade de investigar esse fenômeno observado.

Com relação às análises do perfil de expressão das proteínas nos diferentes estágios do ciclo de vida do parasita, notou-se que para ambas as proteínas ZFP29 e ZFPTTP foi observado um padrão de expressão diferenciado, com significativo aumento de expressão na forma epimastigotas em relação às demais. Novamente gerou-se uma questão importante devido à alteração significativa no padrão de expressão das proteínas ZFP29 e ZFPTTP entre as formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas, tornando-se crucial uma análise da expressão dessas proteínas no decorrer do processo de metaciclogênese.

## 6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos é possível afirmar que a proteína ZFP29 apresenta uma localização citoplasmática num padrão granular disperso e uma expressão diferenciada ao longo dos estágios do ciclo de vida do parasita, sendo a sua expressão aumentada nas formas epimastigotas.

Para a proteína ZFPTTP os resultados foram semelhantes tendo em vista que foi detectada uma localização também citoplasmática num padrão granular por todo o corpo do parasita e sua expressão mostrou-se diferenciada entre as formas do ciclo de vida, sendo essa expressão também aumentada nas formas epimastigotas

## REFERÊNCIAS

AVILA AR, DALLAGIOVANNA B, YAMADA-OGATTA SF, MONTEIRO-GOES V, FRAGOSO SP, KRIEGER MA, GOLDENBERG S. **Stage-specific gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis.** *Genet Mol Res* 2(1): 159-168. 2003

BARBER RD, HARMER DW, COLEMAN RA, CLARK BJ. **GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues.** *Physiol Genomics*. 2005 May 11:21(3):389-95. 2005

CHAGAS, C. **Nova tripanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem.** Mem do Inst Oswaldo Cruz, v.1,n.2, p. 159-218 1909.

CHAGAS, E. **Summula dos conhecimentos actuaes sobre a Trypanosomiasis Americana.** Mem Inst Oswaldo Cruz, v.30, n.3, p.387-416. 1935.

CLAYTON C, SHAPIRA M. **Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias.** *Mol Biochem Parasitol* 156(2): 93-101 2007.

CONTRERAS, V.T., MOREL, C.M. AND GOLDENBERG, S. **Stage-specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis.** *Mol. Biochem. Parasitol.* 14: 83-96. 1985a.

D'ORSO I, DE GAUDENZI JG, FRASCH AC. **RNA-binding proteins and mRNA turnover in trypanosomes.** *Trends Parasitol* 19(4): 151-155. 2003.

DA SILVA RA, BARTHOLOMEU DC, TEIXEIRA SM. **Control mechanisms of tubulin gene expression in *Trypanosoma cruzi*.** *Int J Parasitol* 36(1): 87-96. 2006.

DALLAGIOVANNA B, CORREA A, PROBST CM, HOLETZ F, SMIRCICH P, DE AGUIAR AM, MANSUR F, DA SILVA CV, MORTARA RA, GARAT B, BUCK GA, GOLDENBERG S, KRIEGER MA. **Functional Genomic Characterization of mRNAs Associated with TcPUF6, a Pumilio-like Protein from *Trypanosoma cruzi*.** *J Biol Chem* 283(13): 8266-8273. 2008

DAS A, BANDAY M, BELLOFATTO V. **RNA Polymerase Transcription Machinery in Trypanosomes.** *Eukaryotic Cell* 7(3): 429-434. 2008.

DE SOUZA W. **Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*.** *International Review of Cytology* 86: 197-283. 1983.

DE SOUZA W. **Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*.** *Curr Pharm Des* 8(4): 269-285. 2002.

EL-SAYED NM, MYLER PJ, BARTHOLOMEU DC, NILSSON D, AGGARWAL G, TRAN AN, GHEDIN E, WORTHEY EA, DELCHER AL, BLANDIN G, WESTENBERGER SJ, CALER E, CERQUEIRA GC, BRANCHE C, HAAS B, ANUPAMA A, ARNER E, ASLUND L, ATTIPOE P, BONTEMPI E, BRINGAUD F, BURTON P, CADAG E, CAMPBELL DA, CARRINGTON M, CRABTREE J, DARBAN H, DA SILVEIRA JF, DE JONG P, EDWARDS K, ENGLUND PT, FAZELINA G, FELDBLYUM T, FERELLA M, FRASCH AC, GULL K, HORN D, HOU L, HUANG Y, KINDLUND E, KLINGBEIL M, KLUGE S, KOO H, LACERDA D, LEVIN MJ, LORENZI H, LOUIE T, MACHADO CR, MCCULLOCH R, MCKENNA A, MIZUNO Y, MOTTRAM JC, NELSON S, OCHAYA S, OSOEGAWA K, PAI G, PARSONS M, PENTONY M, PETTERSSON U, POP M, RAMIREZ JL, RINTA J, ROBERTSON L, SALZBERG SL, SANCHEZ DO, SEYLER A, SHARMA R, SHETTY J, SIMPSON AJ, SISK E, TAMMI MT, TARLETON R, TEIXEIRA S, VAN AKEN S, VOGT C, WARD PN, WICKSTEAD B, WORTMAN J, WHITE O, FRASER CM, STUART KD, ANDERSSON B. **The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease.** *Science* 309(5733): 409-415. 2005a.

EL-SAYED NM, MYLER PJ, BLANDIN G, BERRIMAN M, CRABTREE J, AGGARWAL G, CALER E, RENAULD H, WORTHEY EA, HERTZ-FOWLER C, GHEDIN E, PEACOCK C, BARTHOLOMEU DC, HAAS BJ, TRAN AN, WORTMAN JR, ALSMARK UC, ANGIUOLI S, ANUPAMA A, BADGER J, BRINGAUD F, CADAG E, CARLTON JM, CERQUEIRA GC, CREAMY T, DELCHER AL, DJIKENG A, EMBLEY TM, HAUSER C, IVENS AC, KUMMERFELD SK, PEREIRA-LEAL JB, NILSSON D, PETERSON J, SALZBERG SL, SHALLOM J, SILVA JC, SUNDARAM J, WESTENBERGER S, WHITE O, MELVILLE SE, DONELSON JE, ANDERSSON B, STUART KD, HALL N. **Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa.** *Science* 309(5733): 404-409. 2005b.

ELIAS MC, MARQUES-PORTO R, FREYMÜLLER E, SCHENKAMN S. **Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation.** *Mol. Biochem-Parasitol.* 112(1):79-90. 2001.

FERREIRA LR, DOSSIN FDE M, RAMOS TC, FREYMULLER E, SCHENKMAN S. **Active transcription and ultrastructural changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis.** *An Acad Bras Cienc* 80(1): 157-166. 2008.

GLISOVIC T.; BACHORIK J.L.; YONG J.; DREYFUSS G. **RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation.** *FEBS Lett.* 2:1-10. 2008.

HALL T.M. **Multiple modes of RNA recognition by zinc finger proteins.** *Curr Opin Struct Biol.* 15(3):367-373. 2005.

HOLETZ FB, CORREA A, AVILA AR, NAKAMURA CV, KRIEGER MA, GOLDENBERG S. **Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma cruzi*.** *Biochem Biophys Res Commun* 356(4): 1062-1067. 2007.

HUDSON B.P., MARTINEZ-YAMOUT M.A., DYSON H.J., WRIGHT P.E. **Recognition of the mRNA AU-rich element by the zinc finger domain of TIS11d.** *Nat Struct Mol Biol.* 11(3):257-264. 2004.

KEENE JD. **RNA regulons: coordination of post-transcriptional events.** *Nat Rev Genet* 8(7): 533-543. 2007.

KRAMER S, KIMBLIN NC, CARRINGTON M. **Genome-wide *in silico* screen for CCCH-type zinc finger proteins of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania major*.** *BMC Genomics* 2010, 11:283. 2010

LAI W.S., PARKER J.S., GRISSOM S.F., STUMPO D.J., BLACKSHEAR P.J. **Novel mRNA targets for tristetraprolin (TTP) identified by global analysis of stabilized transcripts in TTP-deficient fibroblasts.** *Mol Cell Biol.* 26(24):9196-9208. 2006.

MÖRKING PA, DALLAGIOVANNA BM, FOTI L, GARAT B, PICCHI GF, UMAKI AC, PROBST CM, KRIEGER MA, GOLDENBERG S, FRAGOSO SP. **TcZFP1: a CCCH zinc finger protein of *Trypanosoma cruzi* that binds poly-C oligoribonucleotides *in vitro*.** *Biochem Biophys Res Commun* 319(1): 169-177. 2004.

MÖRKING PA, RAMPAZZO RDE C, WALRAD P, PROBST CM, SOARES MJ, GRADIA DF, PAVONI DP, KRIEGER MA, MATTHEWS K, GOLDENBERG S, FRAGOSO SP, DALLAGIOVANNA B. **The zinc finger protein TcZFP2 binds target mRNAs enriched during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012 Sep;107(6):790-9. 2012.



NARDELLI SC, AVILA AR, FREUND A, MOTTA MC, MANHAES L, DE JESUS TC, SCHENKMAN S, FRAGOSO SP, KRIEGER MA, GOLDENBERG S, DALLAGIOVANNA B. **Small-Subunit rRNA Processome Proteins Are Translationally Regulated during Differentiation of *Trypanosoma cruzi*.** *Eukaryot Cell* 6(2): 337-345. 2007.

NICHOLLS C, LI-H, LIU JP. **GAPDH a common enzyme with uncommon functions.** *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2012 Aug; 39(8): 674-9. 2012.

PALENCHAR JB, BELLOFATTO V. **Gene transcription in trypanosomes.** *Mol Biochem Parasitol* 146(2): 135-141. 2006.

PAQUIN N, CHARTRAND P. **Local regulation of mRNA translation: new insights from the bud.** *Trends Cell Biol* 18(3): 105-111. 2008.

WHO – BULLETIN OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas: one hundred years later.** *Bull World Health Organ*. V. 87, no. 7. 2009.