

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CHEYSA ARIELLY BIONDO

Caracterização de miosinas órfãs de *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909)

CURITIBA

2011

CHEYSA ARIELLY BIONDO

Caracterização de miosinas órfãs de *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909)

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Dra. Daniela Parada Pavoni

CURITIBA

2011

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que **Cheysa Arielly Biondo** no dia 26 de maio de 2011, no Instituto Carlos Chagas (ICC) defendeu sua Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Molecular, intitulada: "**Caracterização de miosinas órfãs de *Trypanosoma cruzi***", com a banca examinadora constituída, pelos Prof. Drs. Maurilio José Soares (ICC), Daniela Fiori Gradia (ICC), e Daniela Parada Pavoni (ICC, orientadora e Presidente da Banca Examinadora), e tendo sido Aprovada.

A solicitação de emissão do Diploma de Mestre em Biologia Celular e Molecular ficará condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação. Esta Declaração tem validade por 60(sessenta) dias, a partir da data da mesma.

Curitiba, 26 de maio de 2011.


Prof. Dr. Edvardo da Silva Trindade
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Mat. 185795

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”

(Chico Xavier)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por permitir que mais uma etapa da minha vida fosse concluída.

À minha orientadora Dani, pelo voto de confiança dado não somente uma vez, mas sim duas vezes durante esse projeto. No início de tudo quando acreditou que eu seria capaz, e exatamente no meio de tudo quando EU não acreditava mais que seria capaz. Muito obrigada por acreditar em mim nesses dois momentos, muito obrigada por toda a orientação e paciência, e muito obrigada também pelos puxões de orelha, pois sem eles esse trabalho não seria concluído.

Agradeço muito à minha companheira de projeto Ju, que formava minha dupla no time das “meninas das miosinas”. Muito obrigada por toda ajuda, por todos os momentos divertidos e por fornecer um ombro amigo para as horas em que tudo parecia que não iria funcionar. Foi um prazer trabalhar com você.

À Andreia que me deu toda a força para eu iniciar essa jornada, e se mostrou muito amiga durante todo esse tempo me ajudando muito nas etapas iniciais do trabalho.

A todas as meninas do laboratório: Ana, Tahi, Carlinha, Cami, Flávia, Nicole e Fer por toda a ajuda, pela ótima companhia e amizade, pelos papos cabeça e também pelos papos furados.

À Rita pela ajuda com a manipulação dos parasitas.

À Paola por sempre estar disponível para tentar nos explicar os problemas com nossas imunoprecipitações.

Aos meninos: Henrique, Michel, Maykol, Felipe e Eduardo, que sempre nos deram atenção quando tínhamos alguma dúvida.

Ao Nilson, Vanessa, Tania e Silvio pela amizade e apoio técnico.

Ao Curso de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular.

Ao ICC e seus diretores, pela oportunidade de desenvolver minha dissertação no Instituto.

Aos Doutores Augusto Ramos e Andréa Ávila por realizarem as revisões dos relatórios, sempre acrescentando conhecimento e idéias ao projeto.

Aos Doutores Maurílio Soares, Daniela Fiori e Gisele Picchi por aceitarem o convite de fazer parte da banca examinadora desta defesa de mestrado.

Ao programa de bolsas REUNI/CAPES pelo apoio financeiro.

Às Lulus amadas: Shei, Quel, Ta, Sú, Flá, Mi, Pri, Gi, Jaque, Ly e Dani, pela SUPER amizade.

A toda minha família, minha Super Vó Mauze, D. Leoni e Seu Ferreira, tios, primos, cunhada e cunhado, que presentes ou não, sempre torceram pelo meu sucesso.

À minha mãezona Rosangela, que amo tanto, por toda a dedicação prestada a mim em todos esses anos da minha vida, por estar sempre presente em momentos importantes, sejam eles bons ou ruins. E ao Vagnário por estar cuidando dela pra mim, nessas horas finais que precisei ficar muito tempo ausente.

Ao meu Grande Amor, Mano, por existir em minha vida e tornar meus dias mais felizes. Muito obrigada pela paciência, amor e apoio emocional.

Ao meu pai querido, Jair, e meu vô, Waldemar, que onde quer que estejam tenho certeza que estão muito felizes com meu sucesso. Saudades!

RESUMO

Miosinas são motores moleculares envolvidas com diferentes formas de movimentação celular, como fagocitose, citocinese, contração muscular, batimento de cílios e tráfego de organelas e partículas. Elas usam a energia derivada da hidrólise do ATP para realizar esses movimentos e possuem um domínio motor comum. A diversidade dos membros da família nos permite agrupá-las em classes. A miosina muscular foi definida como convencional (classe 2), enquanto outros tipos são referidos coletivamente como miosinas não-convencionais (agrupadas em várias classes). Miosinas que filogeneticamente não se agrupam com qualquer outra miosina são denominadas miosinas órfãs. *T. cruzi* possui, além dos genes que codificam para duas miosinas (uma presente em quase todos os organismos – classe 1 – e uma presente apenas em outros tripanosomatídeos – classe 13), outros sete genes identificados que codificam para miosinas órfãs, chamadas de MyoA, MyoB, MyoC, MyoD, MyoE, MyoF, MyoG, que são o foco deste trabalho. Para iniciar a caracterização destas miosinas, experimentos foram delineados visando elucidar a localização celular e as proteínas que interagem com as miosinas. Para alcançar estes objetivos foi necessária a expressão de proteínas recombinantes para a produção de anticorpos em camundongos que foram utilizados para ensaios de imunolocalização e imunoprecipitação. Em paralelo, a transfecção do parasita para a expressão da proteína fusionada ao GFP e identificação da sua localização foi realizada. Os resultados nos confirmam que cinco das sete miosinas identificadas *in silico* são encontradas nos extratos protéicos das formas epimastigotas do parasita, mas que essa expressão deva ocorrer em baixos níveis. A localização celular visualizada através da utilização de anticorpos foi realizada para a MyoC, MyoD e MyoE. As miosinas C e E se concentram na região anterior do parasita, compatível com a bolsa flagelar e base do flagelo respectivamente e a miosina D tem uma localização granular dispersa pelo citoplasma. As demais miosinas tiveram sua localização visualizada somente quando expressas fusionadas à etiqueta de GFP, através da captação da fluorescência da etiqueta. A maioria dessas localizações apresentaram um padrão disperso pelo corpo celular, com exceção da MyoF que apresentou uma localização filamentar concentrada da porção anterior do parasita. Estamos trabalhando para identificar as proteínas que possam estar interagindo com as miosinas órfãs de *T. cruzi*. O nocaute gênico foi realizado para MyoC e ocorreu morte da cultura celular após o provável silenciamento de um dos alelos desta proteína. Estamos investigando se o hemizigoto realmente não é viável ou se não houve a adequada recombinação do cassete de resistência nessa primeira tentativa de transfecção. O estudo das miosinas de *T. cruzi*, suas funções e suas interações dentro da célula irá contribuir para a avaliação do papel do citoesqueleto em *Trypanosoma cruzi*.

Palavras-chave: Miosina. Citoesqueleto. *Trypanosoma cruzi*.

ABSTRACT

Myosins are molecular motors involved in various forms of cellular movement like phagocytosis, cytokinesis, muscle contraction, beating of cilia and trafficking of organelles and particles. They use energy derived from ATP hydrolysis to perform these movements and have a common motor domain. The diversity of the family members enables us to group them in classes. The muscle myosin was defined as conventional (class 2), whereas other types are collectively referred to as unconventional myosins (grouped in many classes). Myosins that phylogenetically do not group to any other myosin are termed orphan myosins. *T. cruzi* has, besides the genes coding for 2 myosins (one present in almost all organisms - class 1 - and the other present only in trypanosomatids – class 13), seven other genes identified that code for orphan myosins, called MyoA, MyoB, MyoC, MyoD, MyoE, MyoF, MyoG, which are the focus of this work. To start the characterization of these myosins, experiments were designed to elucidate the cellular localization and the proteins that interact with each myosin. To achieve this objective it was necessary to produce recombinant proteins for antibody production in mice that were used in immunolocalization and immunoprecipitation assays. In parallel, transfection of the parasite with a plasmid coding for the myosin fused to GFP and identification of their location were performed. The results confirm that five of the seven myosins identified *in silico* are found in the protein extract of epimastigotes parasite, but this expression occurs at low levels. The cellular localization by immunofluorescence performed for MyoC, MyoD and MyoE. The myosins C and E are concentrated in the anterior region of the parasite, compatible with the flagellar pocket and the proximal region of the flagellum, respectively and the myosin D have a granular localization throughout of the parasite cytoplasm. The other myosins had their localization identified only by their expression fused with GFP tag, by capturing the label fluorescence. The localization of all of them except MyoF showed a pattern scattered throughout the cell body; MyoF showed a concentrated localization in the anterior region of the parasite, going to the posterior end in a filament shape. We are working to identify the proteins that can be interacting with the orphan myosins of *T. cruzi*. The gene knockout was performed for MyoC and it occurred cell death after the probable gene silencing of one allele. We are investigating whether hemizygotes is really not viable or if there was no appropriate recombination of the resistance cassette in this first attempt transfection. The study of *T. cruzi* myosins, their functions and their interactions within the cell will contribute to the evaluation of the cytoskeleton role in *Trypanosoma cruzi*.

Key words: Myosin. Cytoskeleton. *Trypanosoma cruzi*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – CICLO EVOLUTIVO DO <i>T. CRUZI</i>	22
FIGURA 2 – ESQUEMA GERAL DAS PRINCIPAIS ESTRUTURAS CELULARES DO <i>T. CRUZI</i>	23
FIGURA 3 – SECÇÃO TRANSVERSAL DE UMA CÉLULA PROCÍCLICA DE <i>T. BRUCEI</i> MOSTRANDO A REGIÃO FLAGELAR.....	26
FIGURA 4 – ESTRUTURA DA MIOSINA MUSCULAR	30
FIGURA 5 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DA ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE MIOSINAS ANOTADAS EM BANCO DE DADOS.....	32
FIGURA 6 – DESENHO ESQUEMÁTICO DAS PROTEÍNAS MIOSINAS DE <i>T. CRUZI</i> E SEUS RESPECTIVOS DOMÍNIOS.....	34
FIGURA 7 – pDONR™221.....	49
FIGURA 8 – pDEST™17.....	49
FIGURA 9 – DESENHO ESQUEMÁTICO DOS VETORES pTcGFPN E pTcPTP	50
FIGURA 10 – ALINHAMENTO DA REGIÃO DA CABEÇA DAS MIOSINAS DE <i>T. CRUZI</i> ...68	
FIGURA 11 – GEL DE AGAROSE 1% COM OS PRODUTOS DE PCR PURIFICADOS ...69	
FIGURA 12 – GEL DE AGAROSE 0,8% DEMONSTRANDO OS CLONES DE ENTRADA (pDONR™221) COM SEUS CORRETOS INSERTOS	71
FIGURA 13 – GEL DE AGAROSE 1% DEMONSTRANDO OS CLONES DE DESTINO (pDEST™17) COM SEUS CORRETOS INSERTOS	72
FIGURA 14 – GEL DE AGAROSE 1% DEMONSTRANDO OS CLONES DE DESTINO (pTcGFPN E pTcPTP) COM SEUS CORRETOS INSERTOS.....	72
FIGURA 15 – PERFIL ELETROFORÉTICO EM MATRIZ DE GEL SDS-PAGE 10% E WESTERN BLOT DOS TESTES DE EXPRESSÃO REALIZADOS A 37°C COM 2 HORAS DE INDUÇÃO.....	75
FIGURA 16 – PERFIL ELETROFORÉTICO EM MATRIZ DE GEL SDS-PAGE 10% E WESTERN BLOT DOS TESTES DE EXPRESSÃO REALIZADOS A 37°C COM 2 HORAS DE INDUÇÃO.....	76
FIGURA 17 – PERFIL ELETROFORÉTICO EM MATRIZ DE GEL SDS-PAGE 10% E WESTERN BLOT DOS TESTES DE EXPRESSÃO REALIZADOS A 25°C COM 4 HORAS DE INDUÇÃO.....	77

FIGURA 18 – <i>WESTERN BLOT</i> DA EXPRESSÃO EM LARGA ESCALA DO FRAGMENTO DA MYO E CABEÇA E MYO G CABEÇA	78
FIGURA 19 – PERFIL ELETROFORÉTICO EM MATRIZ DE GEL SDS-PAGE 10% DAS EXPRESSÕES EM GRANDE QUANTIDADE	79
FIGURA 20 – PERFIL ELETROFORÉTICO EM MATRIZ DE GEL SDS-PAGE 10% DAS EXPRESSÕES EM GRANDE QUANTIDADE	80
FIGURA 21 – <i>WESTERN BLOT</i> DAS EXPRESSÕES EM GRANDE QUANTIDADE	81
FIGURA 22 – <i>WESTERN BLOT</i> DAS EXPRESSÕES EM GRANDE QUANTIDADE	82
FIGURA 23 – PERFIL ELETROFORÉTICO EM MATRIZ DE GEL SDS-PAGE 10% DA PURIFICAÇÃO POR ELETROELUIÇÃO.....	83
FIGURA 24 – <i>WESTERN BLOT</i> DEMONSTRANDO TESTES COM OS SOROS PRÉ-IMUNES	86
FIGURA 25 – <i>WESTERN BLOT</i> DEMONSTRANDO TESTE DOS SOROS APÓS A QUARTA INOCULAÇÃO	87
FIGURA 26 – <i>WESTERN BLOT</i> DOS SOROS APÓS A SEXTA INOCULAÇÃO.....	88
FIGURA 27 – <i>WESTERN BLOT</i> DEMONSTRANDO A PURIFICAÇÃO DE UM DOS SOROS DA MYO E	91
FIGURA 28 – <i>WESTERN BLOT</i> DEMONSTRANDO A PURIFICAÇÃO DE UM DOS SOROS DA MYO F.....	91
FIGURA 29 – <i>WESTERN BLOT</i> DEMONSTRANDO TESTE UTILIZANDO EXTRATO DE <i>TRYPANOSOMA BRUCEI</i>	92
FIGURA 30 – <i>WESTERN BLOT</i> DEMONSTRANDO TESTE UTILIZANDO EXTRATO DE <i>TRYPANOSOMA BRUCEI</i>	93
FIGURA 31 – MEMBRANA DE NITROCELULOSE DEMONSTRANDO TESTE DO <i>WESTERN</i> COMPETITIVO	94
FIGURA 32 – <i>WESTERN BLOT</i> UTILIZANDO EXTRATO DE PARASITAS TRANSFECTADOS.....	97
FIGURA 33 – LOCALIZAÇÃO DA MYO B INTEIRA EM EPIMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i>	98
FIGURA 34 – LOCALIZAÇÃO DA CAUDA DA MYO B EM EPIMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i> ..	99
FIGURA 35 – <i>WESTERN BLOT</i> UTILIZANDO EXTRATO DE PARASITAS TRANSFECTADOS.....	101
FIGURA 36 – LOCALIZAÇÃO DA MYO C INTEIRA EM EPIMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i> ..	102
FIGURA 37 – LOCALIZAÇÃO DA CAUDA DA MYO C EM EPIMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i>	103

FIGURA 38 – LOCALIZAÇÃO DA MYoC EM EPIMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i> OBTIDA POR IMUNOFLOURESCÊNCIA	105
FIGURA 39 – WESTERN BLOT UTILIZANDO EXTRATO DE PARASITAS TRANSFECTADOS.....	106
FIGURA 40 – LOCALIZAÇÃO DA CAUDA DA MYoD EM EPIMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i>	107
FIGURA 41 – LOCALIZAÇÃO DA MYoD EM EPIMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i> OBTIDA POR IMUNOFLOURESCÊNCIA	108
FIGURA 42 – WESTERN BLOT UTILIZANDO EXTRATO DE PARASITAS TRANSFECTADOS.....	109
FIGURA 43 – LOCALIZAÇÃO DA CAUDA DA MYoE EM EPIMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i>	110
FIGURA 44 – LOCALIZAÇÃO DA MYoE EM EPIMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i> OBTIDA POR IMUNOFLOURESCÊNCIA	112
FIGURA 45 – WESTERN BLOT UTILIZANDO EXTRATO DE PARASITAS TRANSFECTADOS.....	113
FIGURA 46 – LOCALIZAÇÃO DA MYoF INTEIRA EM EPIMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i> ...	113
FIGURA 47 – LOCALIZAÇÃO DA CAUDA DA MYoF EM EPIMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i>	114
FIGURA 48 – WESTERN BLOT UTILIZANDO EXTRATO DE PARASITAS TRANSFECTADOS.....	115
FIGURA 49 – LOCALIZAÇÃO DA MYoG INTEIRA EM EPIMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i> ..	116
FIGURA 50 – LOCALIZAÇÃO DA CAUDA DA MYoG EM EPIMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i>	117
FIGURA 51 – GEL DA IMUNOPRECIPITAÇÃO REALIZADA COM OS PARASITAS TRANSFECTADOS COM O VETOR pTcPTP	119
FIGURA 52 – GEL DE AGAROSE 1% MOSTRANDO AS AMPLIFICAÇÕES OBTIDAS PARA AS INTERGÊNICAS DAS MIOSINAS	120
FIGURA 53 – GEL DE AGAROSE 0,8% MOSTRANDO AS AMPLIFICAÇÕES OBTIDAS PARA OS CASSETES DE RESISTÊNCIA	120
FIGURA 54 – GEL DE AGAROSE 0,8% MOSTRANDO AS VARIANTES TESTADAS PARA OTIMIZAR A PCR DE FUSÃO	122
FIGURA 55 – GEL DE AGAROSE 0,8% MOSTRANDO A PCR DE FUSÃO DA MYoC, MYoD E MYoE.....	122

FIGURA 56 – GEL DE AGAROSE 0,8% MOSTRANDO A PCR DE FUSÃO DA MYO ^E COM MENOR QUANTIDADE DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES.....	123
FIGURA 57 – GEL DE AGAROSE 0,8% MOSTRANDO A PCR DA PCR DE FUSÃO DA MYO ^C , MYO ^D E MYO ^E EM 25 μL.....	124
FIGURA 58 – GEL DE AGAROSE 0,8% MOSTRANDO A PCR DA PCR DE FUSÃO DA MYO ^C EM 1 mL.....	124

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – GENES TRABALHADOS COM SUAS RESPECTIVAS IDENTIFICAÇÕES ANOTADA NO BANCO DE DADOS GENEDB (ID), TAMANHO EM PARES DE BASES (PB) E PESO MOLECULAR (KDA) DA PROTEÍNA RESULTANTE DA SUA EXPRESSÃO	44
TABELA 2 – INICIADORES DESENHADOS PARA CADA GENE	46
TABELA 3 – SOLUÇÕES E QUANTIDADES PARA PREPARO DE GEL DE POLIACRILAMIDA, PARA CORRIDA DE AMOSTRAS PROTÉICAS.....	56
TABELA 4 – INICIADORES DESENHADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO INTERGÊNICA A 5' E A 3' DOS GENES DAS MIOSINAS	66
TABELA 5 – INICIADORES DESENHADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DOS CASSETES DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS	66
TABELA 6 – RESUMO DAS RECOMBINAÇÕES REALIZADAS COM OS VETORES DE ENTRADA E DE DESTINO PARA CADA SEQÜÊNCIA DE MIOSINA	73
TABELA 7 – RESUMO DAS EXPRESSÕES E PURIFICAÇÕES.....	85
TABELA 8 – RESUMO DA PRODUÇÃO DOS ANTISSOROS CONTRA AS MIOSINAS ..	90
TABELA 9 – SITUAÇÃO DAS TRANSFECCÕES REALIZADAS COM O VETOR pTcGFPN	96
TABELA 10 – TAMANHOS EM PARES DE BASE DA REGIÃO 5' E 3' DE CADA MIOSINA (1ª COLUNA) E TAMANHO DO CASSETE PARA A TRANSFECCÃO (2ª E 3ª COLUNA).....	121

LISTA DE ABREVIATURAS

- ATP – Adenosina trifosfato
- ADP – Adenosina difosfato
- BCIP – 5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt
- BSA – Bovine Serum Albumine (Albumina Bovina Sérica)
- CDS – *Protein Coding Sequence* (Sequência Codificadora de Proteína)
- DAPI – 4'6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride
- Dm – *Didelphis marsupialis*
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- dNTPs – Desoxirribonucleotídeos
- DNase – Desoxirribonuclease
- EDTA – Ácido etileno-diamino-tetracético
- G418 – Antibiótico aminoglicosídeo relacionado à gentamicina
- GFP – *Green Fluorescent Protein* (Proteína Fluorescente Verde)
- HEPES – Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2'-etanossulfônico
- IgG – Imunoglobulina G
- IPTG – Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
- kDa – Quilo Dalton
- kDNA – DNA do cinetoplasto
- LB – Luria-Bertani
- LIT – *Liver Infusion Tryptose* (Infusão de Fígado e Tryptose)
- NBT – Nitro-Blue Tetrazolium Chloride
- NP-40 – Nonidet P-40
- pb – Pares de bases de nucleotídeos
- PBS – *Phosphate Buffered Saline* (Solução salina tamponada com fosfato)
- PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
- PTP – Proteína C, TEV, Proteína A
- PFAM – *Protein Families* (Famílias de Proteínas)
- PMSF – Fluoreto de fenil metil sulfonil
- RNA – Ácido Ribonucleico
- RNA_m – RNA mensageiro
- RNase – Ribonuclease

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SDS-*page* – Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

TA – Tampão de Amostra para proteínas

TAP – *Tandem Affinity Purification* (Purificação por Afinidade em Tandem)

TAU – *Triatomine Artificial Urine* (Urina artificial de Triatomíneo)

TAU3AAG – Urina artificial de Triatomíneo suplementado com os aminoácidos prolina, glutamato sódico e aspartato sódico e glicose

TBE – Tampão tris-borato-EDTA

TE – Tampão Tris-EDTA

TH1 – domínio de homologia 1

TRIS – Tris-hidroximetil aminometano

Tween 20 – Monolaurato de polioxietileno (20) sorbitana

UBA – *Ubiquitin Associated Domais* (Domínio Associado a Ubiquitina)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 DOENÇA DE CHAGAS	20
1.2 CICLO DE VIDA DO <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
1.3 ASPECTOS CELULARES DO <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
1.4 CITOESQUELETO	25
1.5 PROTEÍNAS MOTORAS – MIOSINAS	28
2 OBJETIVOS	36
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 SOLUÇÕES E TAMPÕES	37
3.2 PROCEDÊNCIA DOS REAGENTES	39
3.3 MEIOS DE CULTURA	40
3.4 ORGANISMOS	41
3.5 CULTIVO DO <i>Trypanosoma cruzi</i>	41
3.5.1 Epimastigotas	41
3.5.2 Tripomastigotas metacíclicos	41
3.6 OBTENÇÃO DE DNA DO <i>Trypanosoma cruzi</i>	42
3.7 OBTENÇÃO DE EXTRATO PROTÉICO DO <i>Trypanosoma cruzi</i>	42
3.7.1 Extrato total para eletroforese	42
3.7.2 Extratos nativo e desnaturado para imunoprecipitação	43
3.8 GENES SELECIONADOS	43
3.9 PCR – REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	44
3.10 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR	47
3.10.1 Eletroforese de DNA	47
3.11 CLONAGEM E EXPRESSÃO DOS ALVOS SELECIONADOS EM VETORES DA PLATAFORMA GATEWAY®	48
3.12 TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS CÁLCIO-COMPETENTES	51
3.12.1 Preparação de bactérias cálcio-competentes	51
3.12.2 Transformação por choque térmico	51
3.13 TÉCNICA DE PALITAGEM (TOOTHPICK)	52
3.14 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	53
3.15 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	55

3.16 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS	55
3.16.1 Coloração com azul de coomassie	56
3.16.2 Coloração por nitrato de prata	56
3.16.3 Transferência de proteínas para membrana de nitrocelulose	57
3.17 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS EM CAMUNDONGOS	57
3.17.1 Avaliação dos anticorpos – <i>western blot</i>	58
3.17.2 Avaliação dos anticorpos - <i>western competitivo</i>	59
3.17.3 Purificação dos anticorpos	59
3.18 IMUNOLOCALIZAÇÃO	60
3.19 IMUNOPRECIPITAÇÃO	61
3.20 TRANSFECCÃO DO <i>Trypanosoma cruzi</i>	62
3.20.1 Preparo de lâminas dos parasitas expressando miosinas fusionadas ao GFP	63
3.20.2 Imunoprecipitação de parasitas transfectados com o vetor pTcPTP.....	63
3.21 NOCAUTE GÊNICO	65
4 RESULTADOS	67
4.1 ANÁLISE DOS GENES	67
4.2 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES	69
4.3 INSERÇÃO DOS GENES NA PLATAFORMA GATEWAY®.....	70
4.4 TESTE DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	73
4.5 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	77
4.6 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	82
4.7 PRODUÇÃO E ANÁLISE DOS ANTICORPOS	84
4.8 LOCALIZAÇÃO CELULAR DAS MIOSINAS EM EPIMASTIGOTAS DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	94
4.8.1 Localização da MyoB	96
4.8.2 Localização da MyoC	100
4.8.3 Localização da MyoD	104
4.8.4 Localização da MyoE	109
4.8.5 Localização da MyoF.....	111
4.8.6 Localização da MyoG	115
4.9 LOCALIZAÇÃO CELULAR DAS MIOSINAS EM TRIPOMASTIGOTAS METACÍCLICOS DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	118
4.10 IDENTIFICAÇÃO DE COMPLEXOS	118

4.11 NOCAUTE GÊNICO.....	120
5 DISCUSSÃO	126
5.1 ANTICORPOS.....	127
5.2 LOCALIZAÇÃO CELULAR.....	128
5.3 VISUALIZAÇÃO DE COMPLEXOS.....	131
5.4 SILENCIAMENTO GÊNICO OU NOCAUTE GÊNICO	133
5.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	134
6 CONCLUSÕES	135
7 PERSPECTIVAS.....	136
REFERÊNCIAS.....	137
ANEXO.....	144

1 INTRODUÇÃO

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário parasita pertencente ao reino Protozoa, sub-reino Eozoa, filo Euglenozoa, classe Kinetoplastea, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae (CAVALIER-SMITH, 2010). O *T. cruzi* é o agente etiológico da Doença de Chagas, enfermidade que constitui sério problema de saúde pública nas Américas do Sul e Central. Entender a biologia deste organismo é de suma importância, para tentarmos compreender um pouco mais sobre as adaptações desse parasita aos diferentes ambientes em que vive durante seu ciclo de vida. Este organismo tem um complexo ciclo de vida, que envolve insetos vetores e estágios em mamíferos, apresenta distintas formas morfológicas e funcionais, e se alterna entre estágios replicativos e infectivos. Essas diferenças na forma celular refletem mudanças na organização do citoesqueleto e na estrutura do parasita. Microtúbulos e microfilamentos de actina são os dois principais componentes do citoesqueleto das células eucarióticas. A actina é uma proteína altamente conservada que possui um papel fundamental na estrutura e dinâmica da maioria das células de eucariotos. Em tripanossomatídeos o citoesqueleto é atípico onde o principal componente são os microtúbulos subpeliculares, mas a presença da actina tem sido demonstrada em todas as espécies de tripanossomatídeos estudados. O sistema actomiosina (ligação da actina mais a proteína miosina) faz parte do conjunto correspondente ao citoesqueleto das células eucariotas, e desempenha diversas funções celulares. Pouco se sabe sobre a função das miosinas nos parasitas tripanossomatídeos. Existem alguns estudos sobre miosinas em *T. brucei* e em *Leishmania*, porém em *T. cruzi* ainda não foi publicado nada que diz respeito a essas proteínas. O presente trabalho proporciona num primeiro momento uma breve dissertação sobre a situação dos estudos referentes ao citoesqueleto (actina e miosina) dos tripanossomatídeos, seguido da descrição de experimentos realizados para tentar elucidar um pouco mais sobre a localização celular, interações e possíveis funções que as miosinas exercem no parasita *T. cruzi*.

1.1 DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas (CHAGAS, 1909) é causada pela infecção com o *Trypanosoma cruzi*. 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). A transmissão da doença de Chagas pode realizar-se principalmente de três maneiras: via vetorial, via oral e via congênita. De todas, a via vetorial é responsável pela grande maioria dos casos registrados (revisto por DIAS, 2000). Hoje em dia a transmissão por via transfusional está controlada através de exames realizados nos bancos de sangue.

Esta doença caracteriza-se por apresentar fases aguda e crônica distintas. A fase aguda pode ser ou não sintomática e, quando sintomática, o indivíduo infectado apresenta alta parasitemia, febre, mal-estar, cefaléia, edema subcutâneo, disfunção cardíaca, hepatomegalia e esplenomegalia. Nesta fase pode haver morte por insuficiência cardíaca ou meningoencefalite.

Se não tratados, os casos agudos evoluem para quadros crônicos, normalmente assintomáticos. Alguns indivíduos, entretanto, apresentam distúrbios cardíacos e digestivos. Os sintomas típicos da forma cardíaca crônica da doença, adquirida através do barbeiro, aparecem de 5 a 15 anos após a infecção inicial (COURA, 2007). Do ponto de vista epidemiológico, as formas crônicas determinadas são as que causam os maiores impactos médico-sociais, particularmente a cardiopatia crônica, com a conseqüente perda de produtividade, impedimento ao trabalho, comprometimento de órgãos vitais, podendo acarretar óbito. Muitos casos de formas crônicas determinadas apresentam uma evolução muito lenta, compatível com muitos anos de vida. No entanto, muitos casos, principalmente as cardiopatias chagásicas, acabam tendo uma evolução grave, com comprometimento cardíaco, sobrevivendo a morte por insuficiência cardíaca, arritmias graves e, também, por tromboembolismos (PUIGBÓ e cols, 1993; GUIMARÃES, 1997).

A quimioterapia disponível contra a doença de Chagas não é satisfatória. Atualmente, o tratamento é realizado com a utilização de uma droga genericamente conhecida como benzonidazol que inibe a síntese de proteínas e de RNA no parasita. As probabilidades de cura diminuem à medida que a doença vai adquirindo a forma

crônica. A droga causa várias reações colaterais indesejáveis que, por vezes, obrigam a interrupção do tratamento (revisto por CANÇADO e cols., 2000).

1.2 CICLO DE VIDA DO *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* apresenta dois hospedeiros: um inseto hematófago pertencente à ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae e um hospedeiro vertebrado mamífero. O parasita pode infectar uma grande variedade de mamíferos além do homem, incluindo cães, gatos, macacos, roedores, esquilos, gambás e tatus. (WILKINSON, 2009).

Durante seu ciclo de vida, o *T. cruzi* apresenta variações morfológicas que refletem sua adaptação a diferentes ambientes: epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos no inseto e amastigotas e tripomastigotas sangüíneos no hospedeiro mamífero (revisto por SOUZA, 2000).

O ciclo de vida do *T. cruzi* inicia-se quando um hospedeiro invertebrado ingere sangue de um mamífero infectado. No tubo digestivo do inseto, as formas tripomastigotas sangüíneas ingeridas iniciam sua diferenciação em epimastigotas. Os epimastigotas multiplicam-se por fissão binária e migram para porção posterior do intestino sofrendo diferenciação em tripomastigotas metacíclicos, processo chamado de metaciclogênese (revisto por SOUZA, 2000).

Durante o repasto sangüíneo, o triatomíneo libera junto com as fezes e urina as formas metacíclicas na pele ou mucosa do vertebrado. Através de descontinuidades dos tecidos, os parasitas podem atingir a corrente sangüínea e infectar outros tipos celulares. Após a penetração da forma tripomastigota metacíclica na célula hospedeira, ocorre a formação do vacúolo parasitóforo, onde há a diferenciação dos metacíclicos em amastigotas e simultaneamente a membrana do vacúolo vai sendo destruída. A forma amastigota é liberada no citoplasma da célula hospedeira, iniciando o processo de multiplicação. Posteriormente, as formas amastigotas sofrem uma diferenciação em tripomastigotas intracelular. Com a intensa movimentação do flagelo e devido ao grande número de parasitas, a célula se rompe, liberando os parasitas (tripomastigotas sangüíneos) na corrente sangüínea, que podem tanto infectar outras células ou serem

ingeridos pelo inseto vetor, dando reinício ao ciclo, ilustrado na figura 1 (revisto por SOUZA, 2000).

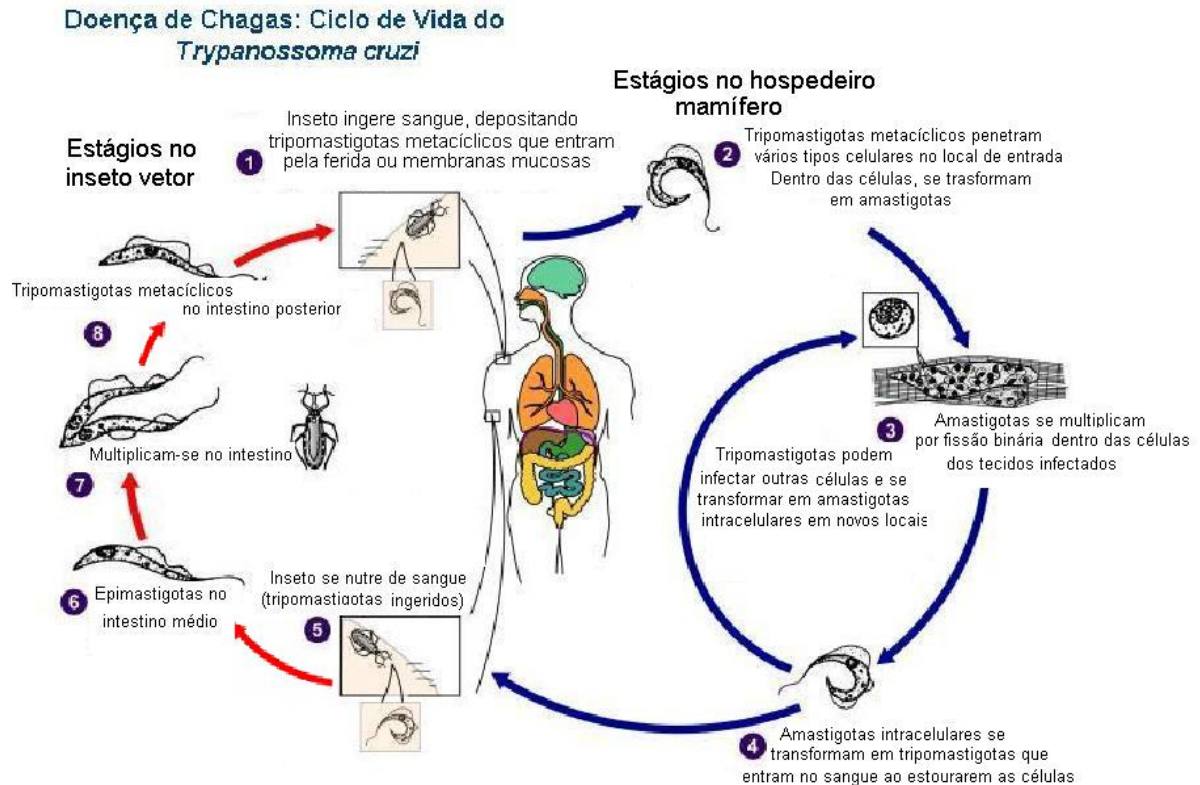


FIGURA 1 – CICLO EVOLUTIVO DO *T. cruzi*
 FONTE: Modificado de www.dpd.cdc.gov/dpdx

1.3 ASPECTOS CELULARES DO *Trypanosoma cruzi*

Além das organelas típicas da maioria das células eucarióticas, como núcleo, retículo endoplasmático, aparato de Golgi e mitocôndria, o *Trypanosoma cruzi* apresenta algumas estruturas peculiares (FIGURA 2), como os microtúbulos subpeliculares, a estrutura paraflagelar, os reservossomos, o cinetoplasto, os glicossomos e os acidocalcisomos (revisto por DE SOUZA, 2002).

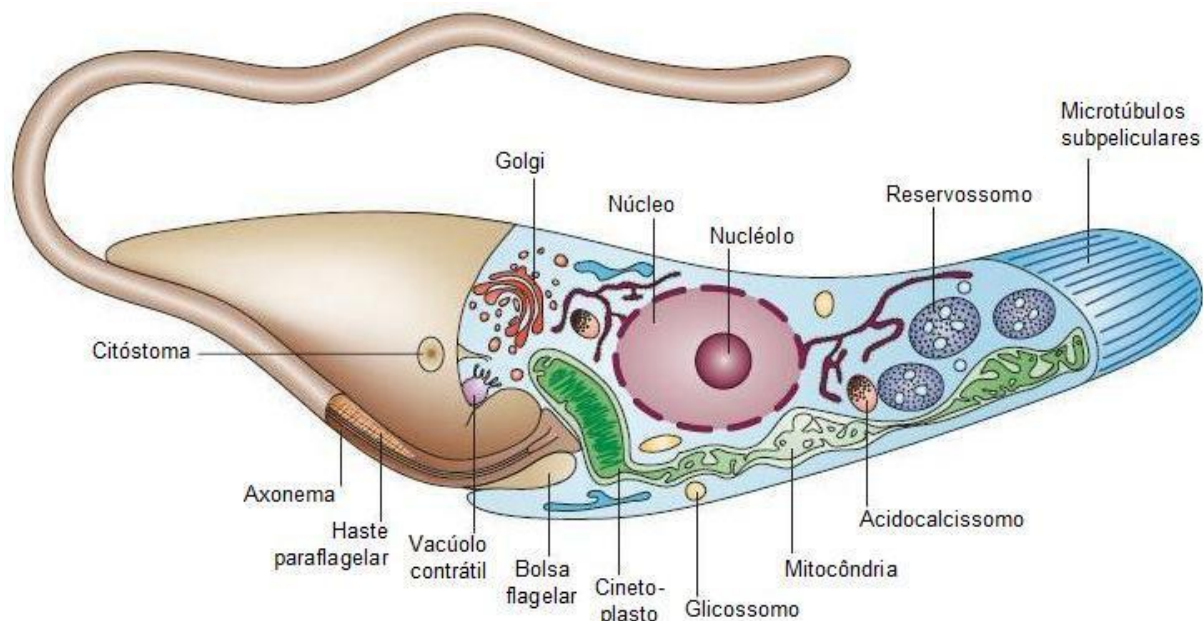


FIGURA 2 – ESQUEMA GERAL DAS PRINCIPAIS ESTRUTURAS CELULARES DO *T. cruzi*
 FONTE: Modificado de SOUZA (2008)

A superfície celular dos tripanosomatídeos é composta por dois componentes: a membrana plasmática e logo abaixo dela encontra-se uma camada formada pelos microtúbulos subpeliculares, os quais estão distribuídos por todo o corpo do parasita, exceto na região da bolsa flagelar (DE SOUZA, 2002), conferindo rigidez à célula e resistência ao rompimento mecânico.

Todos os membros da família Trypanosomatidae apresentam um flagelo, que tem seu tamanho variado, de acordo com o estágio de desenvolvimento do ciclo de vida do parasita. Este flagelo emerge de uma área de invaginação da membrana plasmática conhecida como bolsa flagelar. Devido à localização específica de vários receptores nesta área, acredita-se que a maior parte do tráfego vesicular e entrada de nutrientes ocorram nesta região (PORTO-CARREIRO e cols., 2000).

O flagelo do *T. cruzi* apresenta uma estrutura básica semelhante a outros flagelos, sendo envolvido por uma membrana e contendo um axonema típico, que apresenta um padrão de nove pares de microtúbulos periféricos e um par central. Associado ao flagelo deste parasita é encontrado um complexo arranjo de filamentos protéicos, denominado de estrutura paraflagelar (PFR) (revisto por GULL, 1999).

No caso das formas epimastigotas e amastigotas encontramos outro domínio de membrana altamente especializado localizado na região anterior do corpo do parasita, próximo à abertura da bolsa flagelar. Esta região especial é denominada de citóstomo e está envolvida na captação de macromoléculas do meio. Ela encontra-se claramente

delimitada do restante da membrana que envolve o corpo celular por um arranjo linear de partículas intramembranas criando uma área muito pobre em proteínas integrais de membrana (DE SOUZA, 2002).

O *T. cruzi*, assim como todos os membros da família Trypanosomatidae, apresenta uma mitocôndria única e ramificada que se estende por todo o corpo do parasita. Como em todas as células eucarióticas, a mitocôndria dos tripanosomatídeos também apresenta DNA mitocondrial, que se concentra em uma determinada região da mitocôndria localizada logo abaixo do corpúsculo basal, dando origem a uma estrutura chamada de cinetoplasto. O cinetoplasto abriga o kDNA, o qual é constituído por moléculas circulares que se encontram interligadas formando uma extensa rede entre si (SHLOMAI, 1994).

Na parte posterior da célula, existem organelas usualmente esféricas denominadas reservossomos. Os reservossomos são organelas ácidas que possuem em seu interior proteinases, principalmente a cruzipaina (uma cisteinoproteinase), e proteínas ingeridas, que chegam dentro de vesículas endocíticas, oriundas da bolsa flagelar e do citóstomo. Com base nisso foi proposto que os reservossomos seriam compartimentos pré-lisossomais (SOARES e cols., 1992). Também tem sido proposta a participação dos reservossomos no processo de metaciclogênese, como principal fonte de energia para esta atividade (SOARES, 1999).

Distribuídos pelo citoplasma estão os glicossomos, um tipo especializado de peroxissomo. Estes acumulam enzimas da via glicolítica, envolvidas na conversão da glicose a 3-fosfoglicerato, e a compartimentalização de parte desta via também é uma peculiaridade da família (HANNAERT e cols., 2003).

Outra particularidade dos tripanosomatídeos está na estocagem intracelular de cálcio. Este íon, importante nos processos de sinalização celular, é estocado em organelas denominadas acidocalcissomos. Os acidocalcissomos provavelmente estão envolvidos em diversos processos biológicos, tais como o armazenamento de cálcio e polifosfatos, adaptação dos tripanosomatídeos a condições de estresse ambiental, manutenção do pH intracelular e osmorregulação (revisto por DOCAMPO e cols., 2005).

O retículo endoplasmático (RE) liso e rugoso pode ser encontrado por todo o corpo de todas as formas evolutivas de *T. cruzi*. Em alguns casos o RE alcança a periferia celular, estabelecendo contato com a membrana plasmática e com os

microtúbulos subpeliculares. As cisternas do complexo de Golgi são sempre observadas na porção anterior do corpo celular, próximo ao cinetoplasto e da bolsa flagelar.

O núcleo de *T. cruzi* apresenta uma organização estrutural similar à de outras células eucarióticas com a membrana nuclear apresentando poros típicos. Nas formas tripomastigotas de *T. cruzi* o núcleo é alongado e localiza-se na porção central da célula, em amastigotas e epimastigotas o núcleo tem forma arredondada (DE SOUZA, 2002).

1.4 CITOESQUELETO

O citoesqueleto das células eucarióticas consiste numa trama de filamentos altamente regulados e dinâmicos, importante para as funções estruturais e mecânicas das células e é formado por três principais tipos de filamentos, cada um com uma função e estrutura particular.

Os mais espessos são os microtúbulos, com cerca de 25 nm de diâmetro. Distribuem-se radialmente do núcleo em direção à periferia. São formados por subunidades chamadas de alfa e beta tubulinas, que se polimerizam e despolimerizam conforme a necessidade da célula (DESAI e MITCHISON, 1997). Os microtúbulos estão envolvidos na formação do fuso mitótico, transporte intracelular, movimento flagelar e em outras funções mediadas pelo citoesqueleto (TAO, 2010).

Os filamentos intermediários possuem cerca de 10 nm de diâmetro e proporcionam à célula força mecânica e resistência para enfrentar o estresse. Os filamentos intermediários, como citoqueratinas e vimentinas são proteínas estruturais citoplasmáticas presentes na maior parte das células de vertebrados. Citoqueratinas formam um grupo de pelo menos 29 diferentes proteínas características de células epiteliais (MOLL, 1994). A proteína vimentina é um filamento intermediário amplamente distribuído pelo citoplasma, e está presente em muitas células de origem mesodermal, incluindo fibroblastos, células endoteliais e células brancas do sangue (leucócitos) (VAN-DEN-HURK e cols., 1995).

Os filamentos menores são os filamentos de actina ou microfilamentos, com diâmetro entre 5 e 9 nm, estão distribuídos principalmente na periferia celular e podem formar feixes. Nas células musculares encontram-se bem organizados. Os filamentos de actina formam uma rede altamente dinâmica capaz de polimerizar e despolimerizar em vários sentidos muito rapidamente (FURUKAWA e FECHHEIMER, 1997). São responsáveis por determinar a forma da superfície celular e são necessários para a locomoção da célula como um todo (ALBERTS cols., 2002)

Os tripanossomatídeos são caracterizados pela presença de um citoesqueleto muito particular (FIGURA 3), responsável pela manutenção e modulação da forma celular durante os diferentes estágios do ciclo de vida. Estes organismos necessitam migrar por diferentes órgãos do inseto vetor e por diferentes tecidos do hospedeiro mamífero, e a motilidade e a mediação de adesão à superfície das células hospedeiras são provavelmente funções adicionais do citoesqueleto.

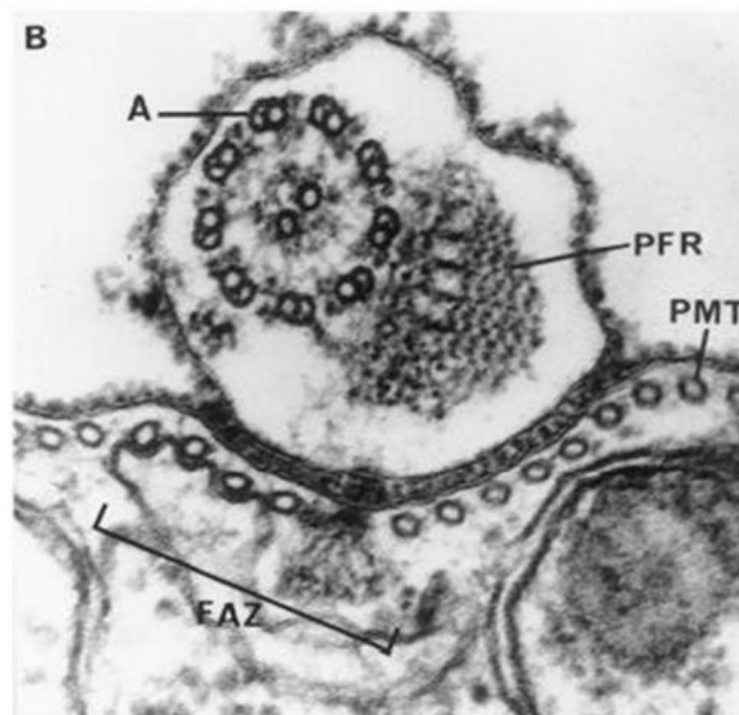


FIGURA 3 – SECÇÃO TRANSVERSAL DE UMA CÉLULA PROCÍCLICA DE *T. brucei* MOSTRANDO A REGIÃO FLAGELAR

FONTE: KOHL e GULL (1998)

LEGENDA: **A**: axonema; **FAZ**: zona de ligação do flagelo; **PFR**: estrutura paraflagelar; **PMT**: microtúbulos subpeliculares

Os principais componentes desse citoesqueleto são:

- o axonema, que forma a estrutura do flagelo com um padrão de nove pares de microtúbulos periféricos e um par central;

- o corpúsculo basal, que é uma estrutura firmemente associada ao citoplasma da célula e que se caracteriza por apresentar nove “triplets” periféricos de microtúbulos. Esta estrutura também se encontra firmemente associada à membrana mitocondrial externa, na sua porção onde ocorre a condensação de DNA e que é conhecida como cinetoplasto;

- a estrutura paraflagelar, esta estrutura é formada por um complexo arranjo de filamentos de diferentes espessuras (25 e 70 nm) que se encontram conectados, via pontes especiais, aos pares de microtúbulos 4 e 7 do axonema. Estudos bioquímicos indicam a presença de duas proteínas majoritárias, de 69 e 80 kDa, e várias outras minoritárias, fazendo parte da estrutura paraxial. Mutantes de *T. brucei* e *C. fasciculata* que não expressam um gene que codifica uma das proteínas majoritárias da estrutura paraxial apresentam significativa diminuição de motilidade;

- a zona de ligação do flagelo, que é a região de adesão do flagelo ao corpo celular;

- e os microtúbulos subpeliculares, que estão distribuídos por todo o corpo celular, colocados imediatamente abaixo da membrana plasmática. Os microtúbulos seguem um arranjo helicoidal ao longo do corpo e estão interligados entre si, com a membrana plasmática e, em alguns casos, com perfis do retículo endoplasmático, por pontes de natureza protéica. Estas pontes apresentam características morfológicas típicas de proteínas associadas aos microtúbulos (KOHL e GULL, 1998).

Os estudos relativos ao citoesqueleto em *T. cruzi* ainda são incipientes. Não se detectou ainda os microfilamentos, mas a actina, principal componente dos microfilamentos já foi identificada. Utilizando um anticorpo contra uma região N-terminal conservada da actina, a marcação desta proteína aparece de forma dispersa pelo citoplasma tanto nas formas epimastigotas, como nas formas tripomastigotas e amastigotas do parasita *T. cruzi* (DE MELO, 2008). Utilizando este mesmo anticorpo em ensaios de *western blot*, foi detectada no extrato de proteínas de *T. cruzi*, uma proteína com tamanho equivalente ao esperado (42 kDa). Neste mesmo trabalho foi realizada uma análise *in silico* das proteínas que se ligam à actina, demonstrando que

elas são muito conservadas, e na sua maioria estão presentes em *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major* (DE MELO, 2008).

A presença das principais proteínas de nucleação dos filamentos de actina, proteínas do complexo Arp2/3, em *T. cruzi* sugerem que de alguma maneira este parasita manteve sua capacidade de polimerizar filamentos de actina durante seu ciclo de vida (DE MELO, 2008). Outras proteínas como profilina que colaboram com a polimerização dos filamentos de actina e cofilina que estão envolvidas na despolimerização dos filamentos de actina, também estão conservadas nos três tripanossomatídeos, *T. cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania major* (DE MELO, 2008).

Formas sanguíneas de *T. brucei* possuem uma alta atividade endocítica, provavelmente devido a duas funções: internalizar fatores de crescimento e defesa (reciclagem de proteínas de superfície). O citoesqueleto desempenha um papel reconhecido no tráfego de vesículas em todos os eucariotos (ENGQVIST-GOLDSTEIN, 2003). A actina é uma proteína essencial nas formas sangüíneas de *T. brucei*, sua diminuição na célula, causa retardos de crescimento e eventual morte celular, porque há perda do tráfego de vesículas da bolsa flagelar, a endocitose é abolida. Em formas procíclicas não há efeitos óbvios na alteração do crescimento do parasita (GARCIA-SALCEDO, 2004).

A atividade endocítica é afetada pelo decréscimo de actina, porém as proteínas sintetizadas pela célula são entregues normalmente à superfície, levando-se a concluir que o citoesqueleto de actina em *T. brucei* é requerido para a endocitose, mas não para o tráfego secretor, e que esta rota é dependente de outros fatores de organização (NOLAN e GARCIA-SALCEDO, 2007).

1.5 PROTEÍNAS MOTORAS – MIOSINAS

Existem muitas proteínas que interagem com o citoesqueleto das células eucarióticas, algumas auxiliam a polimerização dos filamentos, outras a despolimerização, algumas ajudam a manter a estabilidade desses filamentos, outras os desestabilizam. Um grupo muito importante de proteínas que interagem com o citoesqueleto são as proteínas motoras. Estas proteínas utilizam energia derivada de

repetidos ciclos de hidrólise de ATP para se moverem ao longo do filamento. Muitas proteínas motoras transportam organelas e vesículas para manter a organização celular, outras fazem com que os filamentos deslizem uns sobre os outros gerando força para realizar contração muscular, batimentos de cílios e flagelos e divisão celular (MANFRED e WOEHLKE, 2003).

As proteínas motoras se associam aos filamentos pela sua região N-terminal, conhecida como cabeça ou domínio motor, onde também ocorre a hidrólise de ATP. A identidade da “carga” a ser transportada é reconhecida pela cauda da proteína motora (MANFRED e WOEHLKE, 2003).

Os três grupos de proteínas motoras do citoesqueleto são as dineínas, cinesinas e miosinas. A realização das suas funções como motores moleculares é dependente dos filamentos: de microtúbulos, onde atuam dineína e cinesina e de actina, esqueleto sobre o qual as miosinas trafegam (MANFRED e WOEHLKE, 2003).

Miosinas são motores moleculares envolvidas com várias formas de movimentação celular como fagocitose, citocinese, transdução de sinal e tráfego de organelas e partículas. Essas proteínas compartilham um domínio motor comum (cabeça) presente na porção N-terminal, que é responsável pela ligação ao filamento de actina e possui atividade ATPásica que é o que as caracteriza como sendo miosinas, um domínio do pescoço, onde ocorre a ligação das cadeias leves de miosinas responsável por regular a atividade da cabeça, e uma cauda C-terminal que confere especificidade funcional para as diferentes classes de miosina. Em 1859, Kühne descobriu que podia ser extraída em grandes quantidades do músculo uma proteína viscosa, chamada na época de globulina de músculo. Só depois de 1930, esta ficou caracterizada como o componente contrátil da miofibrila. Engelhardt e Ljubimowa, em 1939, num passo fundamental, mostraram que a miosina era também uma enzima ATPase, catalizando a passagem do ATP para ADP, derivando sua energia da hidrólise do ATP. Em 1941, Szent-Györgyi e cols. descreveram a actomiosina, um complexo de actina e miosina, surgindo a idéia de que, separadas estavam em repouso, uniam-se na fase de contração por efeito do ATP (revisto por GOTTSCHALL, 1999).

Essa miosina de músculo esquelético, envolvida com a contração muscular, consiste de uma proteína longa formada por duas cadeias pesadas e duas cópias de cada uma das duas cadeias leves (GEEVES, 2005).

Cada uma das cadeias pesadas possui um domínio globular (cabeça) em sua extremidade N-terminal, responsável pela união à actina e hidrólise do ATP, que fornece energia para a locomoção da molécula, seguida de uma longa sequência de aminoácidos que formam uma cauda C-terminal na qual a “carga” se associa (FIGURA 4). Nas células musculares essa cauda formará feixes através da ligação com outras caudas de outras miosinas. Essa interação levará à formação de um grande “filamento espesso” que possui várias cabeças de miosinas orientadas em direções opostas nas duas extremidades dos filamentos (GEEVES, 2005).

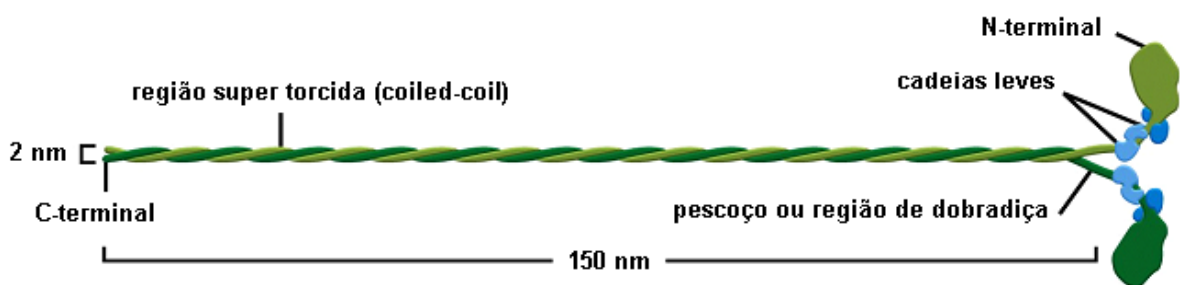


FIGURA 4 – ESTRUTURA DA MIOSINA MUSCULAR
 FONTE: Modificado de ALBERTS e cols. (2002)

As duas cadeias leves da miosina muscular se ligam próximos ao domínio globular das cadeias pesadas. Os dois pares de cadeias leves das miosinas musculares são chamados de: cadeias leves essenciais (ELC - *essential light chains*) e cadeias leves regulatórias (RLC - *regulatory light chains*). Essas cadeias leves estabilizam a região em alfa-hélice, o pescoço, da cadeia pesada da miosina, e algumas cadeias leves são importante na regulação da atividade ATPásica das miosinas no músculo liso.

Muitas miosinas possuem como cadeias leves as calmodulinas, mas algumas miosinas têm suas cadeias leves específicas. O sítio de ligação para as cadeias leves é chamado de *IQ motif*. O domínio motor e o domínio ATPase são os domínios que caracterizam as miosinas, mas algumas miosinas apresentam ainda outros, como por exemplo SH3-like e coiled coil.

Posterior à descoberta da miosina muscular, pesquisadores descobriram uma miosina não muscular, encontrada em *Acanthamoeba castellanii* na década de 1970 (POLLARDI e KORN, 1973). Esta foi denominada de miosina 1, pois possuía apenas

uma cabeça, a muscular ficou sendo conhecida como miosina 2. As demais miosinas incluem uma série de variedades com uma e com duas cabeças e a nomenclatura refletiu aproximadamente a ordem de descoberta. As miosinas mais estudadas são a miosina 1, que possui um sítio de ligação com actina e um sítio de ligação à membranas, está envolvida na organização intracelular e protrusão de estruturas ricas em actina na superfície celular, a miosina 2 que realiza atividade contrátil e citocinese e a miosina 5, que tem como função transporte de organelas e vesículas (ALBERTS e cols., 2002).

As miosinas do tipo 2 (musculares) foram definidas como convencionais (miosina de classe 2), enquanto que os outros tipos são coletivamente referidos como miosinas não-convencionais, diferenciadas por estudos genéticos e de biologia molecular como uma diversa família de miosinas que possuem um domínio motor comum (KRENDEL e MOOSEKER, 2005; FOTH e cols., 2006).

Estudos com diversas miosinas foram realizados e identificaram que há miosinas não-convencionais que atuam não somente se ligando à actina para realizar os transportes, mas, por exemplo, interagindo com microtúbulos e também atuando na reorganização da cromatina (WOOLNER e BEMENT, 2009). Mas a maioria das funções ainda são desconhecidas, e muitos estudos ainda devem ser realizados para se entender a ampla diversidade de funções que se acredita ter as miosinas.

Uma revisão recente analisou 2269 seqüências gênicas de miosinas anotadas em banco de dados de 328 organismos e propôs um consenso de nomenclatura para as miosinas eucarióticas. Depois de uma análise filogenética, estas moléculas foram agrupadas em 35 classes (ODRONITZ e KOLLMAR, 2007), como pode ser observado na figura 5.

Analisando essa árvore filogenética das miosinas, fica difícil chegar a uma conclusão sobre que miosina seria essencial para a sobrevivência de um organismo. Há três espécies, cujas seqüências do genoma foram avaliadas e que não contém qualquer miosina: a alga vermelha unicelular *Cyanidioschyzon merolae* e os parasitas *Giardia lamblia* e *Trichomonas vaginalis* (ODRONITZ e KOLLMAR, 2007).

O maior número de miosinas em um único organismo foi encontrado no peixe Paulistinha, *Brachydanio rerio* (61 miosinas agrupadas em 13 classes), enquanto a distribuição mais ampla de classe foi para a espécie de fungo *Phytophthora* (25 miosinas agrupadas em pelo menos 15

classes). A miosina de classe 1 tem a mais ampla distribuição taxonômica, mas organismos do grupo dos Apicomplexa e Viridiplantae, por exemplo, não a possuem (ODRONITZ e KOLLMAR, 2007). Durante a evolução ocorreu a perda e o surgimento de muitas miosinas. Algumas são exclusivas de determinados organismos, as quais são denominadas de miosinas órfãs (ODRONITZ e KOLLMAR, 2007).

Organismos como os protozoários ciliados *Tetrahymena thermophila* e *Paramecium tetraurelia* são exemplos de organismos que possuem somente miosinas órfãs. *Tetrahymena thermophila* possui 13 miosinas exclusivamente encontradas neste organismo e *Paramecium tetraurelia* possui 7 miosinas órfãs.

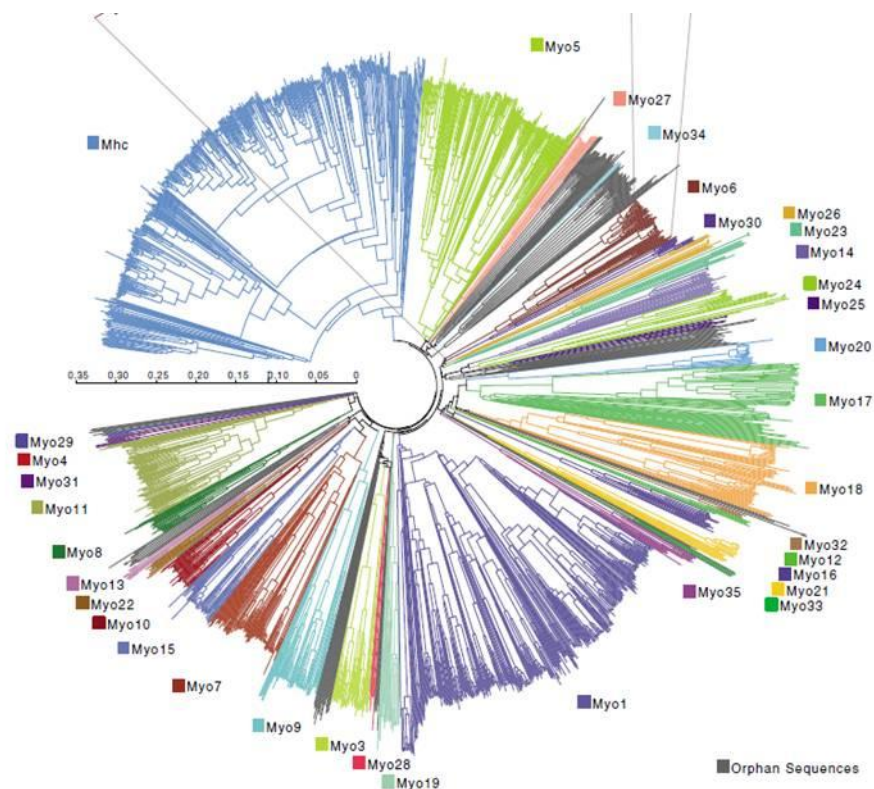


FIGURA 5 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DA ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE MIOSINAS ANOTADAS EM BANCO DE DADOS

FONTE: ODRONITZ e KOLLMAR (2007)

NOTA: Cada cor se refere a uma classe de miosina e as miosinas órfãs estão anotadas em cinza

Em 2005, com a finalização do projeto genoma de *T. brucei*, *T. cruzi* e *Leishmania major* (El SAYED, 2005), foi descrito um gene para uma nova miosina presente apenas em tripanossomatídeos que, segundo o trabalho de Odronitz e

Kollmar, foi classificada como miosina de classe 13. Existe ainda outra miosina que está presente numa gama de organismos, entre eles os tripanossomatídeos, e está classificada como miosina de classe 1. Dentre todos os genomas tripanossomatídeos seqüenciados até o presente momento, somente o genoma de *T. cruzi* possui outros 7 genes identificados que codificam miosinas (miosinas órfãs), que conforme sugerido pelo referido trabalho acima são denominadas de TcMyoA, TcMyoB, TcMyoC, TcMyoD, TcMyoE, TcMyoF, TcMyoG, as quais foram foco do presente trabalho.

No início da evolução eucariótica, o domínio motor da miosina foi desenvolvido. Durante a subsequente evolução, um amplo processo de fusões de domínio começou, durante o qual o motivo IQ carboxi-terminal foi introduzido em primeiro lugar. Após a duplicação desse gene, o domínio amino-terminal SH3-like foi fundido com o domínio motor. Estas duas organizações de domínio são compartilhadas por miosinas de todas as espécies. A miosina de classe 1, que apresenta a maior distribuição taxonômica, é desprovida do domínio SH3-like e, portanto, é sugerido ser a primeira classe de miosina a ter evoluído. Os autores propõem que o domínio motor mais antigo de miosina teve uma seqüência muito próxima ao da miosina da classe 1 (ODRONITZ e KOLLMAR, 2007).

Dentre as miosinas órfãs do *T. cruzi* pode-se observar além do domínio *IQ motif*, para sítio de ligação de cadeias leves, e do domínio SH3-like N-terminal, que está envolvido na interação proteína-proteína, o domínio *coiled-coil* importante principalmente para dimerização da proteína. Um desenho esquemático representando as miosinas órfãs de *T. cruzi* e seus respectivos domínios está ilustrado na figura 6. De acordo com uma busca de domínios no banco de dados Pfam, a miosina de classe 1 possui, além do domínio da cabeça de miosina, o domínio TH1 truncado pela inserção do domínio FYVE e o domínio WW de interação protéica. A busca de domínios no banco de dados Pfam para a miosina de classe 13 mostrou que, além do domínio da cabeça de miosina, esta proteína possui dois domínios UBA associados à ubiquitina adjacentes.

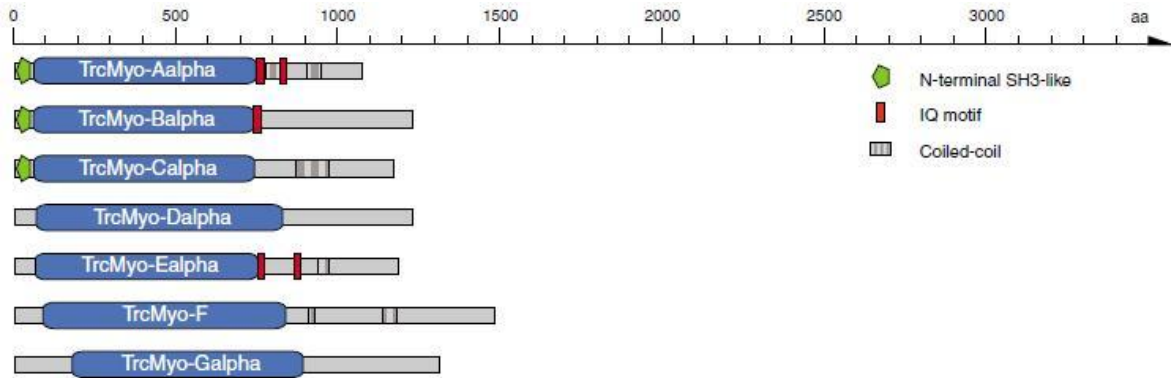


FIGURA 6 – DESENHO ESQUEMÁTICO DAS PROTEÍNAS MIOSINAS DE *T. cruzi* E SEUS RESPECTIVOS DOMÍNIOS
 FONTE: Modificado de ODRONITZ e KOLLMAR (2007)

Um trabalho recente demonstrou que a miosina de classe 1 de *Trypanosoma brucei* é expressa em níveis similares, mas está organizada diferentemente durante o ciclo de vida do parasita. Ela se localiza polarizada no caminho endocítico em formas sanguíneas do parasita e está espalhada por todo o citoplasma nas formas procíclicas (SPITZNAGEL e cols., 2010), e esta organização é dependente da actina (NOLAN e GARCIA-SALCEDO, 2007).

Quando realizado RNA de interferência (RNAi) dessa miosina ocorreu uma significativa redução na atividade endocítica, uma diminuição da divisão celular e eventual morte celular nas formas sanguíneas do parasita (SPITZNAGEL e cols., 2010).

Em *L. major*, a miosina de tripanossomatídeos, que segundo o trabalho de Odronitz foi classificada como miosina de classe 13, possui uma localização flagelar e a sua região variável, a cauda, que é responsável por essa localização específica (KATTA e cols, 2009). Quando realizado nocaute gênico da miosina, ocorreu uma redução no comprimento flagelar, ausência da estrutura paraflagelar, o tráfego intracelular ficou prejudicado e foi possível constatar que ela é requerida na montagem e alongamento flagelar, mas não está diretamente envolvida na regulação do comprimento do flagelo durante os estágios de diferenciação. O tráfego intracelular também foi prejudicado quando ocorreu a perturbação da dinâmica da actina, mesmo com níveis normais de miosinas, indicando, portanto, que a atividade motora da miosina é essencialmente requerida na montagem do flagelo e no transporte intracelular, ou seja, o sistema actomiosina (KATTA e cols, 2010).

Em *T. cruzi* ainda não foi realizado nenhum estudo relacionado às miosinas, nem às miosinas 1 e 13, as quais já foram estudadas em outros tripanossomatídeos e nem às miosinas órfãs, exclusivas de *T. cruzi*.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é iniciar a caracterização das miosinas órfãs do *Trypanosoma cruzi*, e para alcançar tal objetivo fez-se necessários os objetivos específicos abaixo descritos:

- Visualizar a localização celular de cada miosina através de imunoensaio e/ou da proteína fusionada ao GFP em *T. cruzi*;
- Identificar as proteínas que interagem com cada miosina;
- Analisar o fenótipo da célula que possui a proteína não funcional, através do dominante negativo e da célula que não possui a proteína, através de nocaute gênico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 SOLUÇÕES E TAMPÕES

- **Brometo de etídio:** solução 0,5 µg/mL.
- **Gel de corrida de poliacrilamida para eletroforese de proteínas:** acrilamida:bisacrilamida 33/0,9% na concentração desejada; 400 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1% SDS; 0,075% persulfato de amônio; 0,07% TEMED.
- **Gel de empilhamento de poliacrilamida para eletroforese de proteínas:** 4,75% de acrilamida 33/0,9%; 120 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1% SDS; 0,075% persulfato de amônio; 0,07% TEMED.
- **H₂O ultra-pura:** sistema de purificação de água da Elga.
- **PBS 1X:** 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH₂PO₄; 4,3 mM Na₂HPO₄.7H₂O; 137 mM NaCl.
- **Solução de acrilamida/bisacrilamida (33/0,9 %):** 33 g de acrilamida; 0,9 g de bisacrilamida; em 100 mL H₂O.
- **Solução de bloqueio para *western blot*:** 5 % leite desnatado; 0,05% *Tween* 20 em PBS 1X.
- **Solução de coloração para SDS-page azul de coomassie:** 0,1% azul de Coomassie R-250; 4,5% metanol; 10% ácido acético.
- **Solução de descoloração para SDS-page:** 4% metanol; 7,5% ácido acético.
- **Solução de fixação de SDS-page:** 40% etanol; 10% ácido acético.
- **Solução de coloração por prata:** 0,1% nitrato de prata.
- **Solução de revelação de prata:** 3% carbonato de sódio; 0,05% formaldeído.
- **Solução de sensibilização para coloração por prata:** 0,02% tiosulfato de sódio.
- **Solução de término de revelação de prata:** 40% etanol; 10% ácido acético.
- **Solução de lavagem para *western blot*:** 0,05% *Tween* 20 em PBS 1X.
- **Solução de Ponceau:** 0,5% Ponceau S; 1% ácido acético.
- **Solução hidratante:** 0,15 M NaCl; 4 mM NaH₂PO₄.
- **Tampão 2 M de uréia:** 100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris-base; 2 M uréia; 500 mM NaCl; 2% triton x-100.

- **Tampão 8 M de uréia:** 100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris-base; 8 M uréia.
- **Tampão de amostra para eletroforese de DNA 6X:** Azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%, glicerol 30%.
- **Tampão de amostra para SDS-page 4X:** 160 mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 10% β-mercaptoetanol; 24% glicerol; 0,02% azul de bromofenol.
- **Tampão de corrida SDS-page:** 25 mM Tris-base 25 mM; 192 mM glicina; 0,1% SDS.
- **Tampão de crosslinking para imunoprecipitação:** 0,2 M Dimetil pimelimidato em tampão de lavagem para imunoprecipitação.
- **Tampão de diluição para imunoprecipitação:** 1 mg/mL BSA em PBS 1X.
- **Tampão de lavagem para imunoprecipitação:** 0,2 M trietanolamina em PBS 1X.
- **Tampão de lavagem para restauração da resina:** 20 mM Tris pH 7,5; 1 M NaCl; 1 mM CaCl₂.
- **Tampão de eletroporação de *T. cruzi*:** 140 mM NaCl; 25 mM HEPES ácido; 0,74 mM Na₂HPO₄ pH 7,5.
- **Tampão de eluição:** 10 mM Tris pH 7,5; 100 mM NaCl; 2 mM EDTA.
- **Tampão de equilíbrio da resina:** 20 mM Tris pH 7,5; 100 mM NaCl; 1 mM CaCl₂.
- **Tampão de lise celular para *toothpick*:** glicerol 5%; SDS 0,5%; EDTA 5 mM; NaOH 50 mM; azul de bromofenol.
- **Tampão de lise desnaturante:** 40 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM MgSO₄; 1 mM CaCl₂; 1% SDS; 10 mM β-mercaptoetanol; 1 mM PMSF; 10 μM E-64.
- **Tampão de lise hipotônica:** 100 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% NP-40; 2 mM CaCl₂.
- **Tampão de lise não desnaturante:** 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 137 mM NaCl; 10% glicerol; 1% NP-40; 1 mM PMSF; 10 μM E-64.
- **Tampão de parada do crosslinking:** 0,05 M etanolamina em PBS 1X.
- **Tampão de revelação para fosfatase alcalina (AP Buffer):** 100 mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂.
- **Tampão de sonicação:** 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,5 M NaCl; 2% triton x-100.
- **Tampão de transferência para western blot 1X:** 25 mM Tris-base; 192 mM glicina; 20% metanol.

- **Tampão TBE 1X:** 89 mM Tris-base; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA.
- **Tampão TE:** 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0.
- **Tampão TELT:** 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 62,5 mM EDTA pH 9,0, 2,5 M LiCl; 4% Triton x-100.

3.2 PROCEDÊNCIA DOS REAGENTES

- **Abcam:** anticorpo policlonal anti-GFP.
- **Amersham Bioscience:** anticorpo monoclonal anti-histidina; dNTPs; membrana de nitrocelulose *Hybond*.
- **Appligene:** IPTG.
- **Becton Dickinson:** extrato de levedura.
- **BioRad:** azul de bromofenol.
- **Cult-Lab:** soro fetal bovino.
- **Difco:** triptose.
- **Fort Dodge:** cetamina; xilazina.
- **Gibco:** EDTA.
- **Invitrogen:** *1 Kb Plus DNA Ladder*; acrilamida; Alexa Fluor 488 anti-camundongo 2 mg/mL; *BenchMark™ Protein Ladder*; *BenchMark™ Pre-Stained*; bis-acrilamida; EDTA; enzima Platinum® *Taq DNA polimerase High Fidelity*; enzima *Taq DNA Polimerase*; glicerol; IPTG; kit de clonagem *Gateway® pDEST™17*; kit de clonagem *Gateway® pDONR™221*; proteinase K; *Quant-iT Protein Assay Kit*; sacarose; solução 30% PEG 8000/30 mM MgCl₂; vetor pDEST™17; vetor pDONR™221.
- **Merck:** acetato de sódio; ácido acético; ácido bórico; ácido clorídrico; cloreto de cálcio; cloreto de magnésio; cloreto de potássio; cloreto de sódio; etanol absoluto; fosfato de potássio monobásico; fosfato dibásico de sódio; glicose; hidróxido de sódio; SDS; sulfato de amônio; triethanolamine.
- **Midland Certified:** oligonucleotídeos.
- **Polysciences:** *Tween 20*.
- **Promega:** *1 Kb DNA Ladder*; BCIP (*Bromo-Chloro-Indolyl Phosphate*);

fosfatase alcalina; NBT (*NitroBlue Tetrazolium*).

- **Qiagen:** *QIAprep Spin Miniprep Kit*.
- **Roche:** *Anti-Protein C Affinity Matrix; High Pure PCR Product Purification Kit; Protease Inhibitor Cocktail Tablets*
- **SERVA Electrophoresis:** Alu-Gel-S.
- **Sigma-Aldrich:** adjuvante completo de Freund; agarose; ampicilina; anticorpo anti-camundongo conjugado à fosfatase alcalina; anticorpo anti-coelho conjugado à fosfatase alcalina; azul de coomassie R-250; β -mercaptoetanol; brometo de etídeo; BSA; canamicina; cloranfenicol; DAPI; dimethyl pimelimidate; E-64; ethanolamine; G418; HEPES; membrana de diálise; nitrato de prata; Nonidet P-40 (NP-40); paraformaldeído; PMSF; poli-L-lisina; Ponceau S; resina proteína G sepharose; TEMED; Triton x-100.
- **Vetec:** glicina; metanol.
- **USB:** persulfato de amônio; Tris-base; uréia.

3.3 MEIOS DE CULTURA

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

3.4 ORGANISMOS

- *Trypanosoma cruzi* clone Dm28c.
- *Escherichia coli* cepa DH5 α .
- *Escherichia coli* cepa BL21(DE3)pLysS.
- *Mus musculus* linhagem Swiss.

3.5 CULTIVO DO *Trypanosoma cruzi*

Neste trabalho, foi utilizado o clone Dm28c de *T. cruzi* (CONTRERAS e cols., 1985, CONTRERAS e cols., 1988) nas formas: (a) epimastigota e (b) tripomastigota metacíclico.

3.5.1 Epimastigotas

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT (CAMARGO, 1964) a 28°C com passagens a cada três dias e inóculo de 1×10^6 células/mL. As formas epimastigotas foram coletadas por centrifugação no terceiro dia de cultivo (correspondente a fase logarítmica de crescimento), quando a densidade celular apresentava-se entre $1 - 3 \times 10^7$ células/mL.

3.5.2 Tripomastigotas metacíclicos

As formas metacíclicas foram obtidas através do processo de diferenciação *in vitro* (BONALDO e cols., 1988). Formas epimastigotas em final de fase logarítmica de crescimento (densidade celular entre $5 - 7 \times 10^7$ células/mL) foram coletadas por

centrifugação a 7000 x *g*, por 5 minutos, e ressuspendidas em meio TAU, na concentração de 5 x 10⁸ células/mL e mantidas a 28°C por 2 horas. Após este período, correspondente ao estresse nutricional, as células foram transferidas para garrafas de 75 cm² contendo 50 mL de meio TAU3AAG (concentração final de 5 x 10⁶ células/mL). Uma proporção dos parasitas que se aderiram à superfície da garrafa de cultivo se diferenciou em metacíclicos, os quais foram liberados no sobrenadante (BONALDO e cols., 1988) e utilizados nos ensaios.

Este procedimento foi realizado com o tipo selvagem, e também com os transfectantes de *T. cruzi*.

3.6 OBTENÇÃO DE DNA DO *Trypanosoma cruzi*

A extração de DNA foi realizada conforme descrito por Medina-Acosta e Cross (1993). Epimastigotas (1 x 10⁷ células) foram coletadas por centrifugação a 7000 x *g* por 5 minutos, lavadas em PBS e ressuspendidas em 350 µL de tampão TELT. Após 5 minutos de incubação, à temperatura ambiente, foi adicionado à amostra 1 volume de fenol/clorofórmio e o material foi centrifugado a 13000 x *g* por 5 minutos. A fase aquosa foi recolhida e o DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto e coletado por centrifugação a 13000 x *g* por 10 minutos. O DNA presente no sedimento foi lavado com etanol 70%, seco e em seguida ressuspendido em tampão TE contendo RNase a 20 µg/mL.

3.7 OBTENÇÃO DE EXTRATO PROTÉICO DO *Trypanosoma cruzi*

3.7.1 Extrato total para eletroforese

Os parasitas foram centrifugados 7000 x *g* por 5 minutos a 4°C, ressuspendidos na metade do volume da cultura de PBS 1X e centrifugados nas mesmas condições

por duas vezes. Os parasitas foram então ressuspensos em 1 mM PMSF + 10 μ M E-64 em PBS 1X no volume necessário para que a densidade ficasse em 1×10^6 células/ μ L e aliqüotados em 75 μ L por tubo. Em seguida, foram adicionados 25 μ L de tampão de amostra (TA) 4X por tubo, as amostras foram imediatamente aquecidas a 99°C por 5 minutos e colocadas no gelo por 15 minutos. Quando a amostra ficou viscosa, ela foi submetida a sonicação em potência 2 por 3 segundos, e foram armazenadas no freezer -70°C.

3.7.2 Extratos nativo e desnaturado para imunoprecipitação

Os parasitas foram centrifugados 7000 g por 5 minutos a 4°C, ressuspensos na metade do volume da cultura de PBS 1 x e centrifugados nas mesmas condições por duas vezes. Os parasitas foram então ressuspensos em 2 mL de PBS 1X para separação em dois tubos, que foram novamente centrifugados nas mesmas condições. Para cada 100 mL de cultura inicial foi utilizado 1 mL de cada tampão de lise. Um precipitado celular foi ressuspendido em 1 mL de tampão de lise nativo e o outro foi ressuspendido em 1 mL de tampão de lise desnaturante. Ao extrato desnaturado, foi adicionado 5 μ L de DNase. O extrato nativo ficou por 2 horas agitando a 4°C e depois foi centrifugado por 20 minutos a 14000 rpm a 4°C e foi recuperado o sobrenadante. As amostras foram armazenadas a -70°C.

3.8 GENES SELECIONADOS

O *T. cruzi* possui 7 miosinas exclusivas, que não possuem similaridade com as miosinas anotadas em banco de dados de outros organismos tais como *T. brucei* ou *L. major*. As 7 miosinas órfãs de *T. cruzi* foram denominadas nesse trabalho de MyoA, MyoB, MyoC, MyoD, MyoE, MyoF e MyoG (TABELA 1). As proteínas variam de aproximadamente 130 a 170 kDa. Como se tratam de grandes proteínas, para facilitar suas respectivas expressões em sistema heterólogo (procarioto), foi decidido realizar a amplificação de fragmentos de cada gene, como o domínio motor (cabeça), presente

na porção N-terminal da proteína e a porção C-terminal (cauda) de cada miosina. A seqüência da região codificadora (CDS) do gene de cada miosina também foi amplificada para expressão em *T. cruzi*.

TABELA 1 – GENES TRABALHADOS COM SUAS RESPECTIVAS IDENTIFICAÇÕES ANOTADA NO BANCO DE DADOS GeneDB (ID), TAMANHO EM PARES DE BASES (pb) E PESO MOLECULAR (kDa) DA PROTEÍNA RESULTANTE DA SUA EXPRESSÃO

Nome	ID	pb	kDa
MyoA	TcCLB.510943.190 TcCLB.504867.120	3219	124,3
MyoA cabeça		2223	84,3
MyoA cauda		1055	42,5
MyoB	TcCLB506779.190 TcCLB.511151.100	3687	139,7
MyoB cabeça		2205	82,9
MyoB cauda		1541	59,2
MyoC	TcCLB.503847.20 TcCLB.504103.30	3504	132,3
MyoC cabeça		2208	82,4
MyoC cauda		1355	52
MyoD	TcCLB.509663.10 TcCLB.506685.50 TcCLB.503905.10	3678	139,5
MyoD cabeça		2469	92
MyoD cauda		1269	50
MyoE	TcCLB.511649.80 TcCLB.507811.120	3555	135,7
MyoE cabeça		2241	84
MyoE cauda		1374	54
MyoF	TcCLB.507445.50 TcCLB.506947.110 TcCLB.507057.4	4446	168,5
MyoF cabeça		2499	93,5
MyoF cauda		1947	76
MyoG	TcCLB.507093.210	3930	146,6
MyoG cabeça		2667	100
MyoG cauda		1322	50,9

3.9 PCR – REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Com base na seqüência dos genes selecionados foram encomendados oligonucleotídeos para sua amplificação por PCR a partir de DNA genômico do parasita e clonagem no sistema *Gateway*®. Utilizamos três amplificações para cada gene, foram desenhados oligonucleotídeos para amplificação da região codificadora de

cada proteína, para amplificação da região da cabeça (N-terminal) da proteína e para amplificação da cauda (C-terminal).

Os iniciadores direto e reverso para os genes foram desenhados utilizando o programa *Primer Select* (DNA Star), usando como base a seqüência de cada gene disponível nos bancos de dados do TIGR (Institute of Genome Research, <http://www.genedb.org/genedb/tcruzi/>), com o auxílio do programa foi possível excluir os dímeros e grampos que poderiam ser formados durante a PCR. Às extremidades de cada iniciador foi acrescentada uma seqüência de nucleotídeos para servir como adaptadores entre o gene e o vetor de entrada desejado (TABELA 2).

As amplificações foram realizadas com Platinum® *Taq* DNA polimerase *High Fidelity*, a qual consiste de uma enzima DNA polimerase de alta fidelidade que minimiza os erros de polimerização, possibilitando melhores resultados. A mistura para a reação continha, em um volume final de 50 µL, 200 nM dos iniciadores direto e reverso, 0,2 mM dos quatro desoxirribonucleotídeos (dNTP), 2 mM de MgSO₄, 20 ng de DNA genômico de *T. cruzi* Dm28c e 2,5 unidades de Platinum® *Taq* DNA polimerase, em tampão Buffer 10X.

As condições das amplificações foram as seguintes:

- 94°C por 2 minutos;

- 35 ciclos:

desnaturação → 94°C, 30 segundos;

hibridação dos iniciadores → 45°C ou 50°C (dependendo do gene), 30 segundos;

polimerização → 68°C, 1 minuto para cada 1000 pares de base a ser amplificado.

- 68°C por 10 minutos.

O resultado das amplificações foi verificado em gel de Agarose 0,8%.

TABELA 2 – INICIADORES DESENHADOS PARA CADA GENE

Nome do Gene	Oligonucleotídeos Direto	Oligonucleotídeos Reverso
MyoA	ATGCCTGCCGGACGCATAG	CTATCGTTGTTGCTTCTGGAATG
MyoA cabeça	ATGCCTGCCGGACGC	GCGATGATTCAGCTTAAAATAAG
MyoA cauda	CAGTTTGGAGAGACGAAAATCTTTATG	CTATCGTTGTTGCTTCTGGAATG
MyoB	ATGTCACCTTGATGTAGGCTCTC	TCACGCCCAGCGTTTTGAG
MyoB cabeça	ATGTCACCTTGATGTAGGCTCTCTTTG	CAGGCGTTCCACGATGG
MyoB cauda	CAACTGGGGAAAACGAAGG	TCACGCCCAGCGTTTTG
MyoC	ATGGCCGAGCAAAGTGTTTTCG	AAAAACCAAAGTCCATCGTACT
MyoC cabeça	ATGGCCGAGCAAAGTGTTTTC	CACGACCTCCAGTTGCTGATATG
MyoC cauda	CAAATAGGGAAGTCGCGTGTCTTC	TCACGCCCAGCGTTTTG
MyoD	ATGGAAGTGGGCAGTAGCGA	TCACAAGTCGCTGACCTTCC
MyoD cabeça	ATGGAAGTGGGCAGTAGCGATG	CCTGGATTCCAACATGCGATG
MyoD cauda	CAATTGGGAAGTCTCGTGTG	TCACAAGTCGCTGACCTTCC
MyoE	ATGAACGCGCTCAAGGCTG	TTATTGCTCTGATCCAAAGACGC
MyoE cabeça	ATGAACGCGCTCAAGGC	CAACCTTTCTAGCAATTTAAAACC
MyoE cauda	CAAATAGGCAAAACTAAGTTTTTC	TTATTGCTCTGATCCAAAGACGC
MyoF	ATGGCGGAGGTTTCTGTAACAT	CTAACGACTAAAGCTAGTAAAATACG
MyoF cabeça	ATGGCGGAGGTTTCTGTAAC	AATAGAAGCGAGATACTGTGAAATC
MyoF cauda	CAAGTGGGAAGGACCAAAGTCTTTC	CTAACGACTAAAGCTAGTAAAATACGGCTC
MyoG	ATGCGTAATGGTGGGCGGG	TCAGGTGTTCAACCCGTCTTG
MyoG cabeça	ATGCGTAATGGTGGGCGG	TTCACCTCGTGAACCAGAGAAATC
MyoG cauda	GATGCCTTTCAGCACGGTATC	TCAGGTGTTCAACCCGTCTTG

NOTA: Aos iniciadores direto foi adicionado a sequência GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC e aos reversos GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC que corresponde aos sítios de recombinação necessários para a inserção dos produtos de PCR na plataforma Gateway®

Quando o objetivo era a verificação da presença do inserto no vetor, a PCR era realizada utilizando 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), tampão *Taq* 1X, entre 1 e 2 ng do vetor purificado, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP e 500 nM de cada iniciador em 10 µL de volume final.

As condições das amplificações foram as seguintes:

- 94°C por 4 minutos;

- 30 ciclos:

desnaturação → 94°C, 45 segundos;

hibridação dos iniciadores → 45°C ou 50°C (dependendo do gene), 30 segundos;

polimerização → 72°C, 1 minuto para cada 1000 pares de base a ser amplificado.

- 72°C por 10 minutos.

3.10 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

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

3.10.1 Eletroforese de DNA

As eletroforeses de DNA foram realizadas em géis de agarose horizontal conforme descrito por Sambrook e cols. (1989). As amostras foram diluídas em tampão de amostra de DNA e aplicadas em gel de agarose 0,8%, também o padrão de massa molecular foi aplicado no gel (1 Kb Plus – Invitrogen). Os géis de agarose foram preparados em tampão TBE 0,5X, e a corrida eletroforética foi realizada no mesmo tampão, a aproximadamente 100 V durante tempo variável. O DNA foi corado com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta em transluminador e o perfil eletroforético foi registrado em um sistema de vídeo documentação.

3.11 CLONAGEM E EXPRESSÃO DOS ALVOS SELECIONADOS EM VETORES DA PLATAFORMA GATEWAY®

A tecnologia *Gateway*® (Invitrogen) é baseada na recombinação utilizando seqüências sítio-específicas do bacteriófago lambda (LANDY, 1989), possibilitando uma rápida e eficiente análise funcional e expressão protéica (HARTLEY e cols., 2000). A recombinação entre os sítios do bacteriófago lambda acontece tanto no ciclo lisogênico, entre os sítios attB x attP, resultando attL x attR quanto no ciclo lítico, entre os sítios attL x attR, resultando attB x attP. Essas reações são específicas e direcionais: attB1 recombina somente com attP1, attB2 recombina somente com attP2, attL1 recombina somente com attR1 e attL2 recombina somente com attR2.

O produto amplificado ingressou nesta plataforma através do vetor pDONR™221 (Invitrogen) (FIGURA 7). Nossos vetores de entrada possuindo os fragmentos dos genes (cabeça e cauda) foram recombinados com o plasmídeo pDEST™17 (FIGURA 8) possibilitando a expressão heteróloga em *Escherichia coli*. Os vetores de entrada contendo a seqüência completa e seqüência da cauda dos genes foram recombinados com o vetor de destinação pTcGFPN (FIGURA 9), para transfecção em *T. cruzi*, esse vetor expressa a etiqueta de GFP (proteína fluorescente verde, da sigla em inglês *green fluorescent protein*) na porção N-terminal da proteína. As seqüências completas das miosinas foram também recombinadas com o vetor pTcPTP (FIGURA 9), uma variação da etiqueta TAP (TAP-tag, do inglês, *Tandem Affinity Purification*) (RIGAUT e cols., 1999; PUIG e cols., 2002), para realização de ensaio de imunoprecipitação com anticorpos anti-proteína C, presente na etiqueta PTP, na extremidade N-terminal da proteína recombinante.

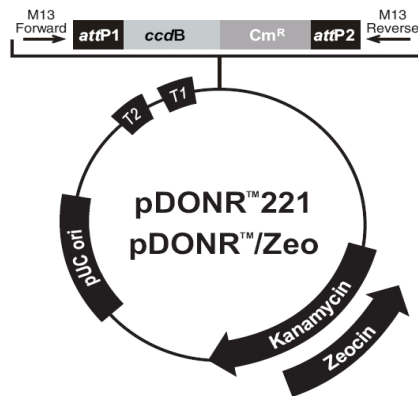


FIGURA 7 – pDONR™221

FONTE: www.invitrogen.com

LEGENDA: **M13 Forward E M13 Reverse:** Sítios com seqüências de ligação destes oligonucleotídeos para sequenciamento; **attP1 e attP2:** Seqüências de DNA derivadas do bacteriófago λ que permitem clonagem por recombinação do gene de interesse de um clone de expressão Gateway® ou produto de PCR *attB*; **ccdB:** Gene que codifica uma proteína citotóxica, sendo letal para a bactéria, o que evita que cresçam colônias com pDONR™221 sem o gene de interesse; **Cm^R:** Gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol; **kanamycin:** Gene de resistência ao antibiótico canamicina; **pUC ori:** Possibilita replicação em alta cópia; **T1 E T2:** Seqüências terminadoras de transcrição

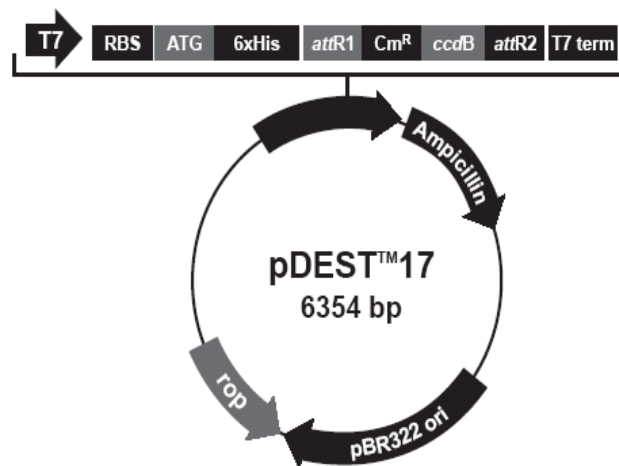


FIGURA 8 – pDEST™17

FONTE: www.invitrogen.com

LEGENDA: **T7:** Promotor para T7 RNA Polimerase; **RBS:** Sequência Shine-dalgarno; **ATG:** Códon de início da tradução; **6XHIS:** Região codificadora de seis histidinas; **attR1 E attR2:** Seqüências de recombinação derivadas do bacteriófago λ que permite a recombinação do gene no vetor; **Cm^R:** Gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol; **ccdB:** Gene que codifica uma proteína citotóxica, sendo letal para a bactéria, o que evita que cresçam colônias com pDEST™17 sem o gene de interesse; **T7 TERM:** Sequência 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; **ROP:** Interege com a origem pBR322 para facilitar a baixa taxa de replicação em *E. coli*

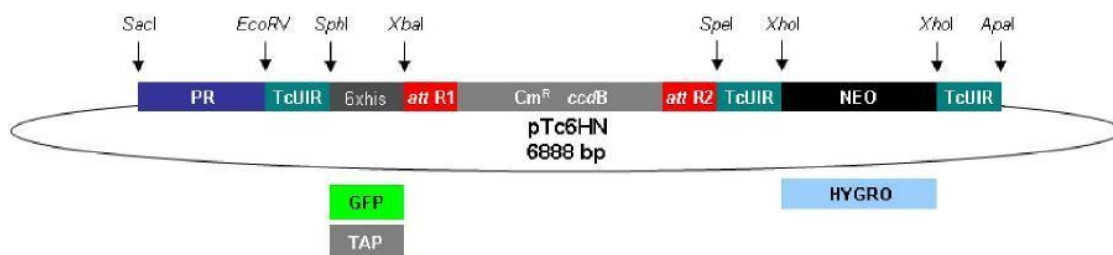


FIGURA 9 – DESENHO ESQUEMÁTICO DOS VETORES pTcGFPN e pTcPTP

FONTE: Modificado de BATISTA e cols. (2010)

NOTA: Esquema dos vetores exemplificado pelo vetor pTc6HN, que contém a etiqueta de seis histidinas. Acima do vetor estão os sítios para endonucleases de restrição.

LEGENDA: **PR**: promotor ribossomal; **TcUIR**: região intergênica de *T. cruzi* do locus da ubiquitina; **att R1 e att R2**: sítios de recombinação da plataforma Gateway®; **Cm^R**: gene de resistência à cloranfenicol; **ccdB**: gene para seleção negativa durante a clonagem; **NEO e HYGR0**: genes de resistência à neomicina e higromicina, respectivamente, para seleção de parasitas transfectados; **6xhis, GFP, TAP**: etiquetas de fusão de 6 histidinas, GFP e TAP

A recombinação BP, realizada para inserir o gene de interesse no vetor de entrada, foi feita com o auxílio do *mix* enzimático *BP Clonase*TMII (Invitrogen). Utilizando-se 50 fmol do produto de PCR purificado, 150 ng do vetor (pDONRTM221), 1 µL da enzima BP clonase e QSP para 10 µL de TE pH 8,0, a 25°C durante a noite. A reação foi parada através da adição de 1 µL proteinase K.

Após a recombinação, realizou-se transformação em células cálcio-competentes de *Escherichia coli* linhagem DH5α. Foi realizada posteriormente ao crescimento das culturas, a técnica de palitagem (*toothpick*) para rápida seleção de clones positivos. Após esta técnica os plasmídeos foram extraídos dos clones positivos com o *kit QIAprep Spin Miniprep* (QIAGEN) conforme recomendações do fabricante, e para confirmação dos clones positivos foi realizado PCR com oligonucleotídeos específicos para cada inserto.

Os clones de entrada foram recombinados com os vetores de destinação com o auxílio do *mix* enzimático LR ClonaseTMII (Invitrogen). A recombinação foi obtida através da incubação de 150 ng do clone em vetor de entrada, 150 ng de vetor de destino, 2 µL da enzima LR clonase e tampão TE pH 8,0 a 25°C durante a noite. Após incubação foi acrescentado 1 µL de Proteinase K para encerrar a reação. Foi realizada novamente a transformação em células cálcio-competentes, a técnica de *toothpick*, a extração dos plasmídeos dos clones positivos com o *kit QIAprep Spin Miniprep* (QIAGEN), e confirmação dos clones positivos por PCR.

3.12 TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS CÁLCIO-COMPETENTES

3.12.1 Preparação de bactérias cálcio-competentes

Uma colônia de *E. coli* da cepa desejada foi inoculada em 5,0 mL de meio LB contendo antibiótico apropriado para a cepa. A cultura foi incubada a 37 °C por 18 horas sob agitação de 200 rpm. Foi realizado um novo inóculo na proporção 1:100, com 1 mL desta cultura em 99 mL de meio LB, e foi novamente incubado a 37 °C sob agitação 200 rpm até o início da fase de crescimento exponencial, que foi estimada através da densidade ótica com Abs_{600} entre 0,4 e 0,6 (aproximadamente 3 horas).

Após o crescimento, as células foram resfriadas no gelo por 35 minutos. A partir desse ponto todas as etapas foram feitas a 4°C. A cultura foi centrifugada a 4000 x g, por 5 minutos, a 4°C, e as células foram ressuspensas em 50 mL de 100 mM $CaCl_2$ 10 mM HEPES pH 7,0 gelado e estéril e mantidas no gelo durante 30 minutos para então serem submetidas a uma centrifugação nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 2 mL de 100 mM $CaCl_2$ 10 mM HEPES pH 7,0 glicerol 10%. As células foram aliqüotadas e estocadas a -70°C.

3.12.2 Transformação por choque térmico

Diferentes cepas da bactéria *E. coli* foram utilizadas, dependendo da necessidade de cada momento. Quando o objetivo foi a propagação de plasmídeos, utilizou-se a cepa DH5- α , e quando o objetivo foi a expressão da proteína recombinante a cepa utilizada foi BL21(DE3)pLysS.

As transformações consistiram na adição de 5 μ L da reação de recombinação ou aproximadamente 100 ng do plasmídeo recombinante purificado em 50 μ L de célula cálcio competente, então realizou-se o choque térmico que consistiu de incubação por 30 minutos das amostras em gelo, incubação por 1,5 minutos a 42°C e incubação

novamente no gelo por mais 2 minutos. Foi adicionado 1 mL de meio LB e as células permaneceram por 1 hora a 37°C sob agitação 200 – 220 rpm.

Quando o objetivo foi a propagação ou purificação dos plasmídeos, as células foram cultivadas em placas contendo o meio LB-ágar com 25 µg/mL do antibiótico canamicina (para o vetor pDONR™221) ou 100 µg/mL do antibiótico ampicilina (para os vetores pDEST™17, pTcGFPN e pTcPTP). Para a garantia de que haveria uma quantidade adequada de colônias na placa, em uma placa foi plaqueado 200 µL de células e o restante foi centrifugado por 4 minutos a 6000 x g, o sobrenadante foi descartado restando cerca de 100 µL de meio de cultura no tubo que foi utilizado para ressuspender o restante de células que foi então plaqueado em outra placa. As placas foram mantidas na estufa a 37°C por 16 horas.

Quando o objetivo foi a expressão protéica, as células foram transferidas para meio LB líquido contendo 100 µg/mL do antibiótico ampicilina e mais o antibiótico da cepa quando necessário, gerando o pré-inóculo, que foi mantido por 16 horas a 37°C sob agitação 200 – 220 rpm. O pré-inóculo para o teste de expressão foi feito em 2 mL de meio de cultura, enquanto o pré-inóculo para a expressão em grande quantidade foi feito em 30 mL de meio de cultura.

3.13 TÉCNICA DE PALITAGEM (*TOOTHPICK*)

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 a superfície do meio LB solidificado para a obtenção de uma réplica das colônias que foram analisadas (placa-mãe). A cada um dos tubos foram acrescentados 15 µL do tampão de lise. Os tubos foram incubados em banho-maria a 65°C por 10 minutos. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%, usando o plasmídeo nativo como controle. Posteriormente, o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por aproximadamente 20 minutos, lavado com água e analisado sob luz ultravioleta. O gel foi fotografado no sistema de foto-documentação UVP (Biorad).

3.14 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

A expressão dos genes foi realizada em células cálcio-competentes da linhagem BL21 pLysS de *E. coli*. Antes da expressão em grande volume, foi realizado um teste para definição das condições ótimas de expressão, definidas como 37°C, 2 horas de indução para algumas proteínas e 25°C, 4 horas de indução para outras com uma agitação de 220 rpm.

Para o teste de expressão, foi feita uma diluição 1:10 do pré-inóculo em 5 ml de meio de cultura com 100 µg/mL do antibiótico ampicilina mais o antibiótico específico para a cepa, quando necessário, gerando o inóculo que foi mantido a 37°C sob agitação 200 - 220 rpm até que a densidade ótica₆₀₀ estivesse em entre 0,6 e 0,8. Neste momento, foi retirado 2 mL de cultura para a indução da expressão com 1 mM de IPTG por 2/4 horas a 37/25°C e o restante da cultura permaneceu crescendo sem a adição de IPTG para controle negativo da expressão. Após o tempo de indução, todas as culturas foram centrifugadas por 10 minutos a 5000 x g e o sedimentado foi ressuspendido em 1 mL de PBS 1X para ser novamente centrifugado por 10 minutos a 5000 x g, e o processo de ressuspensão em PBS e centrifugação se repetiu por mais uma vez. O sedimentado foi então ressuspendido em 120 µL de tampão de amostra 4X, as amostras foram *vortexadas* e mantidas por 5 minutos a 95°C seguindo para o gelo por mais 5 minutos, para serem então analisado por SDS-*page* em gel de poliacrilamida (10%) corado com azul de coomassie. Para confirmação da expressão da proteína, foi realizado *western blot* utilizando-se o anticorpo monoclonal anti-histidina contra a proteína recombinante imobilizada em membrana de nitrocelulose. O anticorpo reconhece a etiqueta de 6 histidinas fusionadas à porção N-terminal da proteína, adicionada pelo vetor de expressão pDEST™17.

Quando confirmada a expressão no teste utilizando pequena quantidade de meio, o procedimento foi repetido em maior volume.

As colônias foram então inoculadas em 30 mL meio LB com o antibiótico de resistência do plasmídeo (ampicilina 100 mg/mL) e cultivadas durante 16 horas a 37°C sob agitação (pré-inóculo). A seguir, foi feito uma diluição 1:10 em volume final de 300 mL de meio LB/ampicilina e incubadas a 37°C sob agitação até que a densidade ótica₆₀₀ ficasse entre 0,6 e 0,8. Após esse período foi adicionado IPTG na

concentração final de 1 mM. Uma alíquota da cultura sem adição de IPTG (não induzida) foi reservada para servir de controle negativo da expressão. Ambas as culturas foram incubadas a 37/25°C por mais 2/4 horas. Após o tempo de expressão, as culturas induzida e não induzida foram centrifugadas por 10 minutos 5000 x g 4°C. O sedimentado da cultura não induzida foi ressuscitado em 1 mL de PBS 1X e o sedimento da cultura induzida foi ressuscitado em 100 mL de PBS 1X, foi centrifugado nas mesmas condições e as etapas de ressuspensão em PBS 1X e centrifugação se repetiu por mais uma vez. O sedimentado da cultura não induzida foi ressuscitado em 120 µL de tampão de amostra 4X e o sedimentado da cultura induzida foi ressuscitado em 15 mL de tampão de sonicação, que foi sonicado por 4 pulsos de 15 segundos a potência 8, com intervalo de 1 minuto entre os pulsos, para lise das células. Foi retirado 75 µL desta solução e foi adicionado 25 µL de tampão de amostra 4X, esta amostra foi identificada como fração total, pois contém todas as proteínas presentes na célula.

A amostra com as células lisadas foi então centrifugada por 10 minutos 10000 x g 4°C, separando assim as proteínas solúveis e insolúveis. O sobrenadante foi armazenado e identificado como fração solúvel, por conter as proteínas solúveis das células. Foi retirada uma alíquota de 75 µL da fração solúvel e foi adicionado 25 µL de tampão de amostra 4X. O restante do sedimentado foi ressuscitado com 15 mL de tampão desnaturante 2 M uréia e novamente sonicado e centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante foi armazenado e identificado como lavado 1, e uma alíquota de 75 µL foi retirada e adicionado 25 µL de tampão de amostra 4X. O sedimentado foi novamente ressuscitado em 15 mL de tampão desnaturante 2 M uréia e os passos seguintes foram repetidos, gerando o lavado 2. O sedimentado foi então ressuscitado em tampão desnaturante 8 M uréia, que foi novamente sonicado e centrifugado nas mesmas condições, gerando a amostra solubilizada em 8 M uréia (fração insolúvel), e o sedimentado desta etapa foi descartado.

As alíquotas contendo tampão de amostra 4X das amostras não induzida, solúvel, lavado 1, lavado 2 e insolúvel foram mantidas por 5 minutos a 95° C e transferidas para o gelo por mais 5 minutos para serem aplicadas em gel SDS-page.

3.15 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Foi adicionado a aproximadamente 3 mL da fração insolúvel da proteína 1 mL de tampão de amostra para proteínas 4X e esta fração foi purificada a partir de gel de poliacrilamida, com 15 cm de largura por 10 cm de altura. O gel foi submetido a eletroforese por 16 horas a 30 mA. Após este período, o gel foi corado com solução de KCl 100 mM gelado, a banda correspondente foi cortada, inserida em uma membrana de diálise e eletroeluída por 2 horas a 60 Volts em tampão para eletroforese SDS-*page*. Esse procedimento de eletroeluição foi repetido por mais duas ou três vezes, resultando nas eluições E1, E2 e E3. Posteriormente as proteínas foram dosadas utilizando o Qubit™ Fluorometer (Invitrogen).

As proteínas pouco expressas e/ou que apresentaram na sua fração insolúvel com o mínimo de proteínas contaminantes, foram somente submetidas à diálise para retirada da uréia e posterior inoculação. Para este procedimento a fração insolúvel foi colocada em uma membrana de diálise devidamente selada. Esta membrana foi colocada em um Becker com aproximadamente 2 litros de tampão SDS-*page* e incubada a 4°C por aproximadamente 16 horas sob agitação.

3.16 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS

As proteínas foram analisadas por eletroforese em SDS-*page* sob condições desnaturantes, conforme o descrito por Hames e Rickwood (1990). As concentrações de géis utilizadas foram de 10% para análise dos resultados de expressão das proteínas, e 8% para os géis que foram submetidos a transferência para membrana de nitrocelulose nos ensaios de *western blot* para teste dos soros contra as proteínas recombinantes e contra os extratos do *T. cruzi*. Os volumes das soluções utilizadas para os géis de corrida e de empilhamento estão descritos na tabela 3.

As amostras de proteínas foram diluídas em tampão de amostra de proteína (TA 4X) na proporção 3:1 (3 partes de amostra para 1 parte de TA 4X), fervidas por 5 minutos, incubadas no gelo por mais 5 minutos e centrifugadas a 14000 x g por 10 minutos antes de serem aplicadas no gel.

TABELA 3 – SOLUÇÕES E QUANTIDADES PARA PREPARO DE GEL DE POLIACRILAMIDA, PARA CORRIDA DE AMOSTRAS PROTÉICAS

Soluções	Gel de Corrida		Empilhamento
	10%	8%	
Acrilamida/Bisacrilamida (33/0,9%)	2,95 mL	2,36 mL	0.7 mL
Tris-HCl 2,5 M pH 8,8	1,6 mL	1,6 mL	-
Tris-HCl 1 M pH 6,8	-	-	0.6 mL
H ₂ O	5,5 mL	6,09 mL	3.7 mL
SDS 10%	100 µL	100 µL	50 µL
Persulfato de amônio 10%	70 µL	70 µL	35 µL
TEMED	7 µL	7 µL	7 µL

As amostras foram aplicadas no gel vertical de poliacrilamida juntamente com o padrão de massa molecular (*BenchMarkTM*, Invitrogen) e a corrida foi feita em tampão de eletroforese para SDS-*page* a 30 miliampères, aproximadamente 150 Volts.

3.16.1 Coloração com azul de coomassie

Os resultados obtidos após eletroforese das amostras em SDS-*page* foram observados pela coloração do gel com azul de coomassie. Para tanto os géis foram incubados por aproximadamente 30 minutos à temperatura ambiente neste corante e, a seguir, os géis foram descorados com solução de descoloração para SDS-*page* para visualização das bandas.

3.16.2 Coloração por nitrato de prata

Outra alternativa de coloração de SDS-*page* para visualização dos resultados é pela marcação por nitrato de prata que é mais sensível, marcando bandas que poderiam não ser visualizadas pela coloração com azul de coomassie. Para tanto, as proteínas no gel foram inicialmente fixadas em solução de fixação de SDS-*page* por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, o gel foi lavado 2 vezes com etanol 30% por 20 minutos e 2 vezes em H₂O também por 20 minutos. O gel foi então incubado

com solução de sensibilização por 1 minuto e lavado 3 vezes com H₂O durante 20 segundos e incubado com solução de coloração por prata por 20 minutos a 4°C. A revelação foi realizada com solução de revelação depois de lavar o gel com água corrente, e a reação foi parada com solução de término.

3.16.3 Transferência de proteínas para membrana de nitrocelulose

Os ensaios padrões de imuno blot (TOWBIN e cols., 1979) foram possíveis a partir da transferência de proteínas em gel SDS-*page* para membrana de nitrocelulose (*Hybond N+*, *Amersham Biosciences*). O gel foi disposto em um suporte e a membrana de nitrocelulose foi colocada sobre o gel, evitando a formação de bolhas. O gel e a membrana foram protegidos por papel 3 MM e o suporte contendo ambos foi inserido na cuba de transferência de proteínas juntamente com tampão para transferência gelado. A transferência foi feita por 2 horas a 60 Volts a 4°C ou 20 Volts durante 18 horas a 4°C. Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau S por 5 minutos, para visualização das bandas e marcação, lavada em água corrente e bloqueada em PBS 1X, *Tween* 20 0,05% e leite 5%, por 1 hora, em temperatura ambiente ou durante a noite a 4°C.

3.17 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS EM CAMUNDONGOS

A utilização dos camundongos para este projeto e o protocolo institucional foram aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Fiocruz (CEUA), sob licença de número L005/09.

Após a purificação, as proteínas foram inoculadas em camundongos Swiss com mais de 40 dias de vida, aplicando-se aproximadamente 50 µg da proteína no peritônio dos animais na primeira inoculação e aproximadamente 30 µg nas seguintes. Foram 4 inoculações com intervalos de duas semanas entre elas. O antígeno foi emulsificado em adjuvante completo de Freund, na primeira inoculação e com adjuvante a base de

hidróxido de alumínio (Alu-Gel) nas inoculações posteriores. Cada proteína foi inoculada em dois camundongos distintos. Antes das inoculações, aproximadamente 200 µL de sangue foi retirado da cauda de cada animal para servir de controle pré-inoculação (soro pré-imune). Uma semana após a quarta inoculação, aproximadamente 200 µL de sangue foi recolhido do animal e devidamente centrifugado para obtenção do soro. A análise da presença dos anticorpos foi realizada utilizando a técnica de *western blot* contra a proteína recombinante e contra extratos de *T. cruzi*.

Como os resultados obtidos para os soros após a 4ª inoculação não foram satisfatórios, foram realizadas mais 2 inoculações antes dos animais serem sacrificados através de punção cardíaca.

3.17.1 Avaliação dos anticorpos – *western blot*

Foi realizado um gel de poliacrilamida com as proteínas recombinantes (cada proteína foi aplicada em 2 canais diferentes – 1 canal para cada camundongo), e com os extratos de *T. cruzi*, (1 canal para cada camundongo) seguido pela transferência para a membrana de nitrocelulose, a 20 Volts durante a noite a 4°C. Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau S por 10 minutos e lavada brevemente com água. A canaleta da membrana correspondente ao marcador foi recortada e armazenada, e os diferentes canais que contêm as proteínas e os extratos foram separados ficando sob agitação à temperatura ambiente por duas horas em solução de bloqueio: PBS 1X, *Tween* 20 0,05%, 5% leite em pó desnatado.

As membranas foram incubadas com o soro diluído 1:250 em PBS 1X, *Tween* 20 0,05% por uma hora. Após as lavagens, as membranas foram incubadas com anticorpo anti-murino conjugado à fosfatase alcalina, diluído 1:10000 durante 1 hora à temperatura ambiente. A revelação das membranas foi realizada com 10 mL de tampão fosfatase alcalina; 66 µL de NBT (azul de nitrotetrazólio) 50 mg/mL; 33 µL de BCIP (5 - bromo, 4 - cloro, 3 – indolfosfato) 50 mg/mL.

3.17.2 Avaliação dos anticorpos - *western* competitivo

Para este ensaio, o antissoro com uma diluição de 1:250, foi incubado juntamente com 50 µg da proteína recombinante, num volume total de 1 mL de PBS 1X, Tween 20 0,05%. Após, a membrana de nitrocelulose contendo extrato protéico de *T. cruzi* foi incubada com essa solução por 1 hora sob agitação em temperatura ambiente. Decorrida essa 1 hora a membrana foi lavada 3x com PBS 1X, Tween 20 0,05% e então incubada com o anticorpo secundário anti-murino conjugado à fosfatase alcalina diluído 1:10000 durante 1 hora sob agitação à temperatura ambiente. Em seguida as membranas foram novamente lavadas 3x com PBS 1X, Tween 20 0,05% e reveladas.

A revelação das membranas foi realizada com 10 mL de tampão fosfatase alcalina; 66 µL de NBT (azul de nitrotetrazólio) 50 mg/mL; 33 µL de BCIP (5 - bromo, 4 - cloro, 3 - indolfosfato) 50 mg/mL.

3.17.3 Purificação dos anticorpos

Foi realizado um SDS-*page* com 80 µg da proteína recombinante purificada que foi transferida para membrana de nitrocelulose. A porção da membrana contendo a proteína foi recortada e incubada em uma solução contendo 250 µL do soro diluído em 800 µL PBS-Tween 20 0,1% e 20 µL de proteínas solúveis de *E. coli* durante 2 horas. A membrana foi então lavada duas vezes durante 5 minutos em PBS-Tween 20 0,05% e transferida para 500 µL de 0,2 M glicina pH 2,5 para eluição dos anticorpos. Após 2 minutos de incubação, a solução de glicina foi retirada e transferida para 50 µL de 1 M Tris-HCl pH 9,5, a fim de neutralizar a solução e foi adicionado 10 µL 1 mg/mL BSA.

3.18 IMUNOLOCALIZAÇÃO

Para os experimentos de localização das proteínas de interesse em *T. cruzi* diversas diluições dos anticorpos foram testadas a fim de obter uma boa intensidade de sinal. Soros obtidos antes das inoculações das proteínas recombinantes (soros pré-ímmunes) foram utilizados como controle.

Para o teste de cada soro, utilizaram-se 1×10^6 parasitas cultivados por 3 dias em meio LIT, que foram coletados por centrifugação a $5000 \times g$ por 1 minuto e lavados 2 vezes em PBS 1X. Em seguida, essas células foram ressuspendidas em PBS 1X de tal maneira que a concentração final fosse de 1×10^8 células/mL.

Os ensaios de imunofluorescência foram realizados em lâminas contendo campos delimitados por teflon. As lâminas foram tratadas com poli-L-lisina 0,1% e incubadas a 37°C por 20 minutos. Decorrido este tempo, foram lavadas com água e colocadas na estufa a 37°C para secar. Os parasitas foram depositados sobre os campos das lâminas (10^6 células) e fixados com paraformaldeído 4% por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas 2 vezes com PBS 1X e incubadas e os parasitas permeabilizados pela adição de triton X-100 0,05% por 2 minutos, após as lâminas foram lavadas com PBS 1X por 4 vezes. Solução de bloqueio (BSA 1%) foi adicionada sob a superfície das lâminas, que foram incubadas por 12 a 15 horas a 4°C em câmara úmida.

Em seguida, o excesso da solução de bloqueio foi retirado e o antissoro na diluição desejada (em solução de bloqueio) foi adicionado. A reação com o anticorpo foi realizada durante 1 hora, a 37°C, em câmara úmida. Após esse tempo, a lâmina foi lavada 3 vezes em PBS 1X por imersão, por 5 minutos. O material foi então incubado com anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa 488) na diluição de 1:500 em solução de bloqueio. De modo similar, a incubação com o anticorpo secundário deu-se por 1 hora a 37°C em câmara úmida, protegida da luz. A partir desta etapa, todos os procedimentos subseqüentes foram realizados de modo que o experimento fosse protegido da luz. Depois deste período, a lâmina foi lavada 2 vezes em PBS 1X por 5 minutos, por imersão. Foram adicionados 20 μ L de solução de bloqueio contendo DAPI diluído 1 μ g/mL em solução de bloqueio visando a marcação do material genético do núcleo e cinetoplasto. A lâmina foi incubada por 5 minutos em

câmara úmida. Depois deste período, a lâmina foi lavada por imersão 6 vezes em PBS 1X por 5 minutos. As lâminas foram montadas para imunofluorescência com N-propil-galacto e seladas utilizando lamínula e esmalte.

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

3.19 IMUNOPRECIPITAÇÃO

A fim de avaliar as interações das miosinas, procedemos à imunoprecipitação destas com seus respectivos anticorpos e/ou com anti-GFP. Inicialmente 20 μ L de soro de camundongo contendo os anticorpos específicos para cada proteína (ou anti-GFP comercial – Abcam) foram diluídos em 100 μ L de PBS e 1 mg/mL de BSA e incubados por 2 horas à temperatura ambiente com 50 μ L de resina de proteína G-sepharose cada, no caso dos anticorpos específicos, e resina de proteína A-sepharose no caso do anti-GFP desenvolvido em coelho, sob agitação. Após incubação foi realizada uma reação de *crosslinking* para ligar o anticorpo à proteína G ou A covalentemente. Este procedimento é possível com a utilização do reagente dimethyl pimelimidate (DMP): a resina foi lavada por 5 minutos com PBS acrescido de 1 mg/mL de BSA, depois somente com PBS e, então, incubada por 30 minutos com 0,02 M de DMP diluído em 0,2 M de trietanolamina pH 8,0, repetindo este processo 3 vezes, sempre lavando com 0,2 M de trietanolamina pH 8,0 entre as incubações. A reação foi parada com 0,05 M de etanolamina pH 8,0 e a resina foi lavada 3 vezes com PBS. Após o *crosslinking*, aproximadamente 1 mg de extrato protéico de epimastigotas de *T. cruzi* foi incubado com a resina por 16 horas a 4°C. A seguir, a resina foi lavada com tampão de lavagem de imunoafinidade e as proteínas ligadas foram eluídas com 50 μ L de glicina 0,2 M pH 2,5 por 5 minutos, neutralizando-se o pH logo em seguida com a adição de 15 μ L de Tris-HCl pH 9,0. O material eluído de cada imunoprecipitação foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida, seguido da transferência para membrana de

nitrocelulose para realização de *western blot* utilizando anticorpos para cada miosina, possibilitando assim verificar a presença ou ausência da mesma nos imunoprecipitados.

3.20 TRANSFECCÃO DO *Trypanosoma cruzi*

Os parasitas utilizados foram epimastigotas da cepa Dm28c (*Didelphis marsupialis*) de *T. cruzi*.

A transfecção foi realizada através de eletroporação (KELLY e cols., 1992) usando o eletroporador da BioRad (GenePulser II Electroporator). Na transfecção de cada gene foram utilizados 4×10^7 parasitas. Esses parasitas, depois de lavados com PBS 1X estéril e centrifugados por 5 minutos a $5000 \times g$, foram ressuspensos em 400 μL de tampão de eletroporação e transferidos para cubeta pré-resfriada. Aos parasitas foram adicionados 15 μg do plasmídeo. Para a transfecção foram realizados 2 pulsos de 450 V, 500 μF e, imediatamente depois, as cubetas foram novamente incubadas no gelo por 10 minutos. Também foi submetida à eletroporação parasitas sem a adição dos plasmídeos, a qual foi utilizada como controle. Os parasitas já transfectados foram incubados a 28°C em 10 mL de meio LIT (Liver Infusion Tryptose) acrescido de antibiótico ao qual o vetor confere a resistência. Vinte quatro horas após a transfecção, o antibiótico G418 (concentração final de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi adicionado às culturas para seleção das células que receberam os vetores pTcGFPN e pTcPTP contendo o gene de interesse. Após 72 horas em cultura, a concentração de G418 foi aumentada para 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A cada 3 a 5 dias eram realizadas a contagem e a passagem das culturas, com a finalidade de manter a densidade celular em torno de 1×10^6 parasitas/mL.

Após a seleção dos parasitas, foi realizada a confecção de uma lâmina para a visualização dos mesmos, e suas respectivas fluorescências, através do microscópio óptico de fluorescência.

3.20.1 Preparo de lâminas dos parasitas expressando miosinas fusionadas ao GFP

Para a adesão dos parasitas na lamínula, 20 μL de poli-L-lisina 0,1% foi colocado no centro de uma lamínula, permanecendo por 20 minutos a 37°C, após, foram lavadas e colocadas para secar.

Foram centrifugados 500 μL de cultura por 3 minutos a 4000 x g, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL de PBS 1X e centrifugadas nas mesmas condições por duas vezes. As células foram então ressuspensas em um volume de PBS 1X de forma que em 20 μL da solução tivesse 1×10^6 células.

As lamínulas foram colocadas em poços de placa de cultura com a face contendo a poli-L-lisina voltadas para de cima e 20 μL da solução dos parasitas foi colocado sobre a poli-L-lisina. Depois de 5 minutos foram adicionados 20 μL de paraformaldeído 4% e, 5 minutos depois, 20 μL dessa solução foi retirada e foi colocado 20 μL de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI + 0,2% Triton. Após 5 minutos, foi adicionado 1 mL de PBS 1X e, após 1 minuto sob agitação, a solução foi descartada e esse procedimento foi repetido por mais 3 vezes.

Em lâmina de microscopia, foi colocado 5 μL de N-propil-galacto, a lamínula foi colocada com a face contendo os parasitas virada para baixo sobre essa gota e foi selada com esmalte. A lâmina foi visualizada em microscópio Nikon, as imagens foram capturadas usando a câmara *CoolSnap* (Media Cybernetics) e analisadas com o programa Image Pro-Plus v. 4.5.1.22 (Media Cybernetics).

3.20.2 Imunoprecipitação de parasitas transfectados com o vetor pTcPTP

Foram preparadas duas culturas de 150 ml com 10^6 células/mL, uma com parasitas selvagem e outra com parasitas transfectados com o vetor pTcPTP. Após quatro dias de crescimento, o volume total foi centrifugado por 5 minutos a 6000 rpm, 4°C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensado em 30 mL de PBS 1X gelado. Este processo de lavagem com PBS 1X foi realizado duas vezes. O

sedimento foi então ressuspensionado em 1 mL de tampão de lise hipotônica (com 0,5% NP-40) com tablete de coquetel de inibidor de proteases, e a lise dos parasitas foi monitorada em microscópio invertido. Após aproximadamente 5 minutos, a solução foi diluída em mais 4 mL do mesmo tampão com 0,1% NP-40, e foi centrifugado por 10 minutos a 10000 rpm, 4°C. O sobrenadante foi transferido para uma coluna de purificação gelada e foi adicionado 50 µL de resina contendo o anticorpo anti-proteína C. Após 2 horas de incubação a 4°C, o extrato não ligado foi recuperado, e foi adicionado 1 mL do tampão de lise hipotônica sem inibidor de proteases, para recuperação da resina, que foi então transferida para um tubo de 1,5 mL. Após 5 minutos de incubação no gelo, foi submetido à centrifugação a 12000 x g por 30 segundos, e o sobrenadante descartado. Este processo de lavagem com tampão de lise hipotônica foi repetido por mais duas vezes e o sobrenadante foi armazenado. Foi adicionado 200 µL de tampão de eluição e, após 5 minutos no gelo, foi submetido à centrifugação a 12000 x g por 30 segundos e o sobrenadante foi armazenado. Este processo de eluição foi repetido mais uma vez.

As resinas foram restauradas para reutilização em novo ensaio. Para a restauração, foi adicionado 1 mL de tampão de lavagem, foi submetido à centrifugação a 12000 x g por 30 segundos e o sobrenadante foi descartado. A resina foi então ressuspensionada em 1 mL de tampão de equilíbrio, foi submetido à centrifugação nas mesmas condições e o sobrenadante foi descartado. Este processo de equilíbrio foi repetido por mais duas vezes, e a resina foi armazenada com 1 mL de tampão de equilíbrio adicionado 0,09% azida sódica.

3.20.2.1 Precipitação protéica com acetato de amônio

As segundas e terceiras frações de lavagem após a incubação do extrato com a resina e a fração eluída foram precipitadas com acetato de amônio para diminuir o volume de solução de proteínas, para que pudesse ser aplicado em gel de poliacrilamida para eletroforese em SDS-*page*.

Foi adicionado 10 M acetato de amônio para concentração final de 2,5 M e, após 30 minutos de incubação sob agitação, foi submetido à centrifugação por 10 minutos

15000 x g. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com 1 mL de metanol gelado por aproximadamente 30 segundos no vórtex e então submetido à centrifugação nas mesmas condições. O processo de lavagem com metanol foi repetida por mais duas vezes, o sobrenadante foi descartado e o sedimento permaneceu a 55°C. Após a evaporação do metanol, foi adicionado 3 µL de H₂O, 12 µL de 9,5 M uréia e 5 µL de TA 4X.

3.21 NOCAUTE GÊNICO

Dois pares de oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados visando a amplificação das regiões que flanqueiam o gene da miosina, sendo que a região 5' dos oligonucleotídeos Reverso da região montante e Direto da região jusante tem uma seqüência que é complementar às extremidades das duas regiões intergênicas que ladeiam o gene de resistência à neomicina ou à higromicina. A seqüência dos oligonucleotídeos pode ser visualizada na tabela 4.

Os oligonucleotídeos iniciadores desenhados foram devidamente testados numa reação de PCR utilizando DNA genômico de *T. cruzi*, para verificar a amplificação das regiões. As temperaturas utilizadas para esta amplificação variaram entre 50°C e 55°C de anelamento com aproximadamente 1 minuto de extensão.

Para a amplificação dos cassetes de resistência aos antibióticos foi utilizado um mesmo conjunto de oligonucleotídeos iniciadores para a neomicina e para a higromicina, que podem ser visualizados na tabela 5.

Para a PCR de fusão, onde ocorreu a formação do produto a ser transfectado, que consiste na região 5' do gene, mais o cassete de resistência ao antibiótico, mais a região 3' do gene foi utilizado 55°C de temperatura de anelamento e 3 minutos de extensão.

TABELA 4 – INICIADORES DESENHADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO INTERGÊNICA A 5' E A 3' DOS GENES DAS MIOSINAS

Nome	Oligonucleotídeos
MyoA 5' direto	GAAAGAAGAAAAGAAAAGAAGAGGG
MyoA 5' reverso*	ACCACAAACATCGAATGTCTAAAAG
MyoA 3' direto**	GGGACGTTCGAAACGCCAGT
MyoA 3' reverso	CAGCAGGGCAAATGCATTTAATC
MyoB 5' direto	TGGACGGCTGGAAATAACAAG
MyoB 5' reverso*	CTTCCTTTTCGTGAAATAAAAAAGAAC
MyoB 3' direto**	TAAGCCGAAACGAAAATAACGAAAAG
MyoB 3' reverso	GCTCGTAAGGGAAAGAAGTGG
MyoC 5' direto	TGTTACACAGAAATACACAGAG
MyoC 5' reverso*	GCCTCACACTACCTAACTTTAAC
MyoC 3' direto**	GTGTGTGTCTTTCCGTCTGTCC
MyoC 3' reverso	GACATGCAACAGTCATTTACAG
MyoD 5' direto	CGTGGAAAATTGCAGTGTCATTC
MyoD 5' reverso*	ACTGCCCACTTCCACCTTTG
MyoD 3' direto**	CAAACGGTGGAGAGATAGGCG
MyoD 3' reverso	CTGTCGTCACCTTTCCGCCGATTC
MyoE 5' direto	GGCGAAACGCGCTCAAGGCTG
MyoE 5' reverso*	CTTGAGCGCGTTCACCTTGC
MyoE 3' direto**	TGATATGACTATATAGGTAAGGAGAG
MyoE 3' reverso	AACCGCTTTAATCACTTGCCC
MyoF 5' direto	GAATGACAATTAACACAGGCATAC
MyoF 5' reverso*	TGTTCCCTTCAACCTTACCGAC
MyoF 3' direto**	GTCGGAGATAGGAAGAACTTGAAGAG
MyoF 3' reverso	ATAATCCATCGAATGAACGCC
MyoG 5' direto	TTCAGTCGCCAGACGAGATTG
MyoG 5' reverso*	CGTCAGCCCCACCACTC
MyoG 3' direto**	GCTTCTTACTCACTCTCTCAGAAT
MyoG 3' reverso	CGTTAATGCAACAAGGCACGC

NOTA: *Seqüência adaptadora do iniciador reverso a 5' do gene: AGTGCGGAAAGAGAAATGGACGGTGCATTT; **Seqüência adaptadora do iniciador direto a 3' do gene: ACATTGAACAGAATTTAACATGCCCATCAA

TABELA 5 – INICIADORES DESENHADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DOS CASSETES DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS

Nome	Oligonucleotídeos
KOK7 Direto	AAATGCACCGTCCATTTCTCTTTCCGCACT
KOK7 Reverso	TTGATGGGCATGTTAAATTCTGTTCAATGT

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DOS GENES

T. cruzi apresenta em seu genoma uma miosina de classe 1 e uma de classe 13, assim como outras espécies dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*. Mas diferentemente dos demais organismos relacionados, *T. cruzi* possui ainda mais 7 miosinas classificadas como miosinas órfãs, por não se agruparem em uma análise filogenética com nenhuma outra miosina descrita de nenhum organismo e nem entre elas (ODRONITZ e KOLLMAR, 2007).

Após a classificação destas miosinas como órfãs, outros genomas de tripanosomatídeos foram seqüenciados e uma análise em banco de dados como TriTrypDB e GeneDB confirmaram a ausência de ortólogos para as sete miosinas órfãs encontradas em *T. cruzi*.

A figura 10 apresenta o alinhamento realizado com a região da cabeça de todas as miosinas de *T. cruzi*. É possível observar que mesmo dentro do domínio motor (cabeça) que é o que caracteriza uma miosina, há diferenças suficientes para classificá-las separadamente. O alinhamento foi feito utilizando o software ClustalW2 (disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) os parâmetros padrão e o resultado foi mostrado usando o software JALVIEW (disponível em <http://www.jalview.org/download.html>) usando o esquema de cores BLOSUM62 Score, com valor de visibilidade de conservação 20.

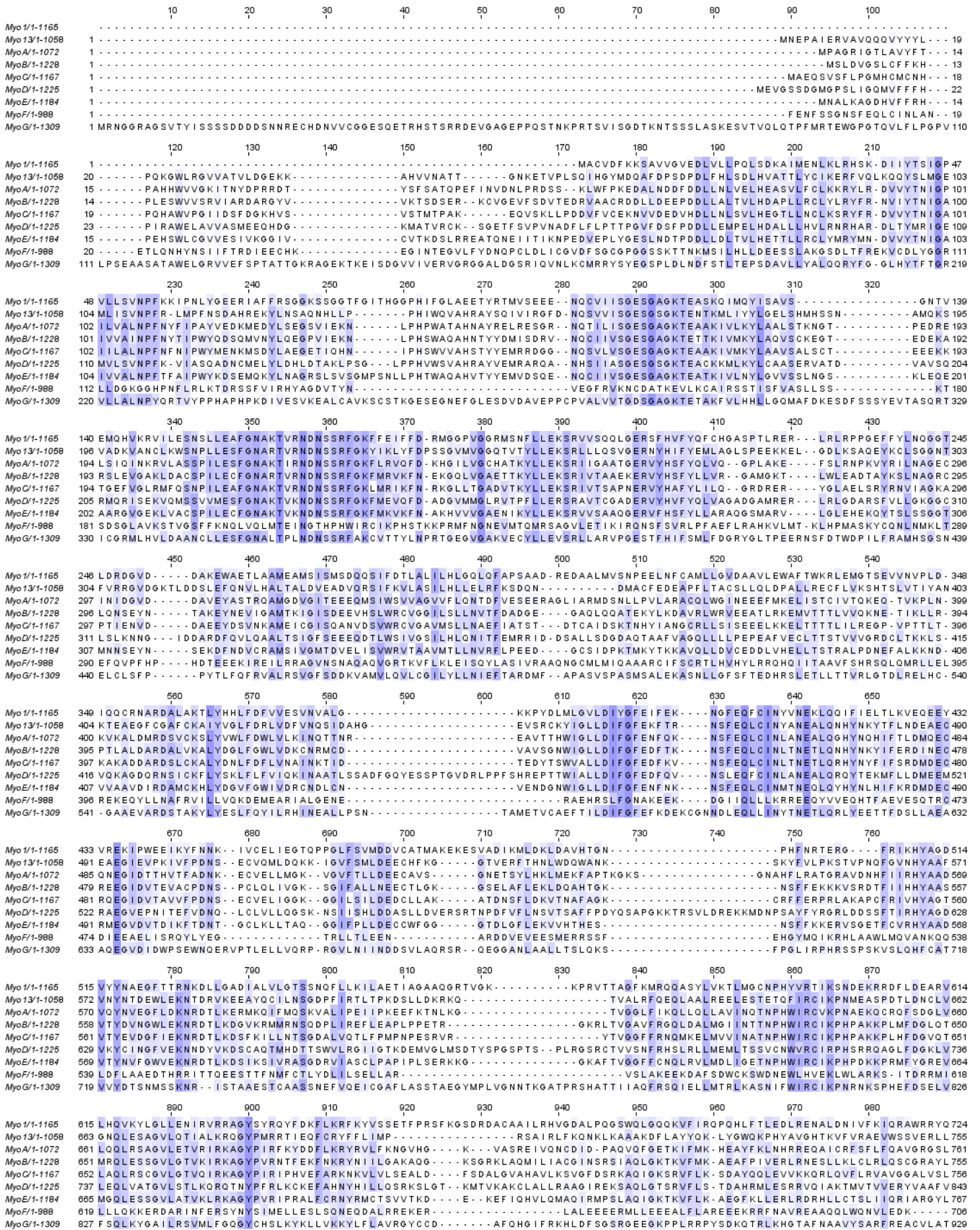


FIGURA 10 – ALINHAMENTO DA REGIÃO DA CABEÇA DAS MIOSINAS DE *T. cruzi*

NOTA: Quanto mais escura a coloração, maior a semelhança entre os nucleotídeos das diferentes seqüências

4. 2 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES

As amplificações do gene inteiro e dos fragmentos das miosinas foram realizadas a partir do DNA genômico do parasita conforme descrito no item 3.9. Diferentes enzimas, temperaturas de anelamento e tempos de extensão foram utilizados para otimizar a amplificação de cada seqüência.

Todos os genes foram amplificados corretamente, apresentando o tamanho esperado para cada amplificação. A figura 11 mostra um gel com os produtos de PCR devidamente purificados das seqüências desejadas.

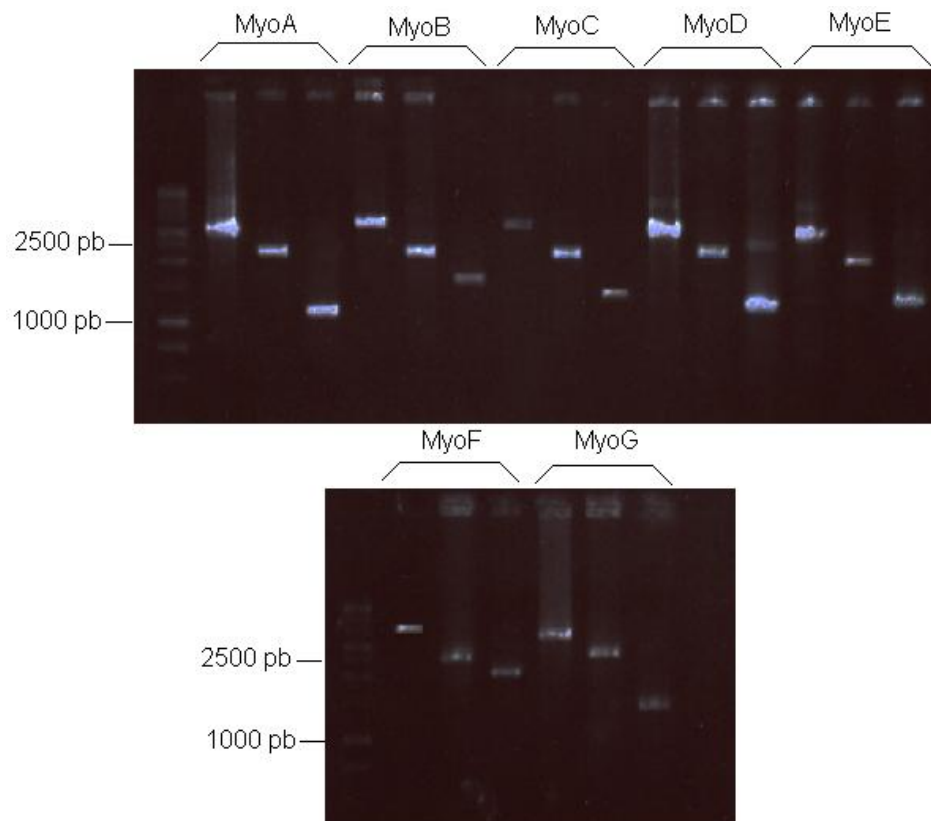


FIGURA 11 – GEL DE AGAROSE 1% COM OS PRODUTOS DE PCR PURIFICADOS
NOTA: Gene inteiro, cabeça e cauda respectivamente para cada miosina

4.3 INSERÇÃO DOS GENES NA PLATAFORMA GATEWAY®

Os fragmentos amplificados possuindo a seqüência adaptadora para a correta inserção na plataforma *Gateway*® foram recombinados com o vetor de entrada, pDONR™221, gerando assim nossos clones de entrada, que consiste no plasmídeo (pDONR™221) contendo a seqüência de interesse devidamente inserida. Para confirmação se os clones eram positivos ou não, o tamanho dos plasmídeos foi analisado através de migração em gel de agarose. Sabendo-se que o tamanho da seqüência que é retirada do vetor pDONR™221 é de aproximadamente 2246 pares de base e sabendo-se qual o tamanho da seqüência a ser inserida nessa região, foi realizada uma comparação do tamanho do vetor sem o inserto, com os candidatos a clones positivos (vetor com o inserto) (FIGURA 12). Ainda para a confirmação, foi realizado PCR dos plasmídeos utilizando iniciadores específicos para cada gene e também seqüenciamento, com a finalidade de identificar possíveis erros que possam ter ocorrido nos passos anteriores, como incorporações ou deleções de nucleotídeos nas seqüências de interesse que por ventura, pudessem acarretar em modificações no quadro de leitura, conseqüentemente gerando códons de parada que levassem ao impedimento da expressão protéica.

Para algumas seqüências como, por exemplo, os fragmentos da cauda da MyoB e cabeça da MyoC, encontramos muita dificuldade para cloná-las corretamente. Quando era realizada PCR do vetor de entrada, obtinha-se uma banda correspondente ao tamanho esperado para as amplificações, o que nos fazia acreditar que nosso vetor de entrada estava correto, mas as várias tentativas de recombinação com o vetor de destinação foram ineficientes. Com o resultado do seqüenciamento verificamos que a seqüência inserida no vetor pDONR™221 não era a desejada e, então, iniciamos posteriormente nova amplificação e nova recombinação com o vetor de entrada e ambos foram corretamente inseridos na plataforma.

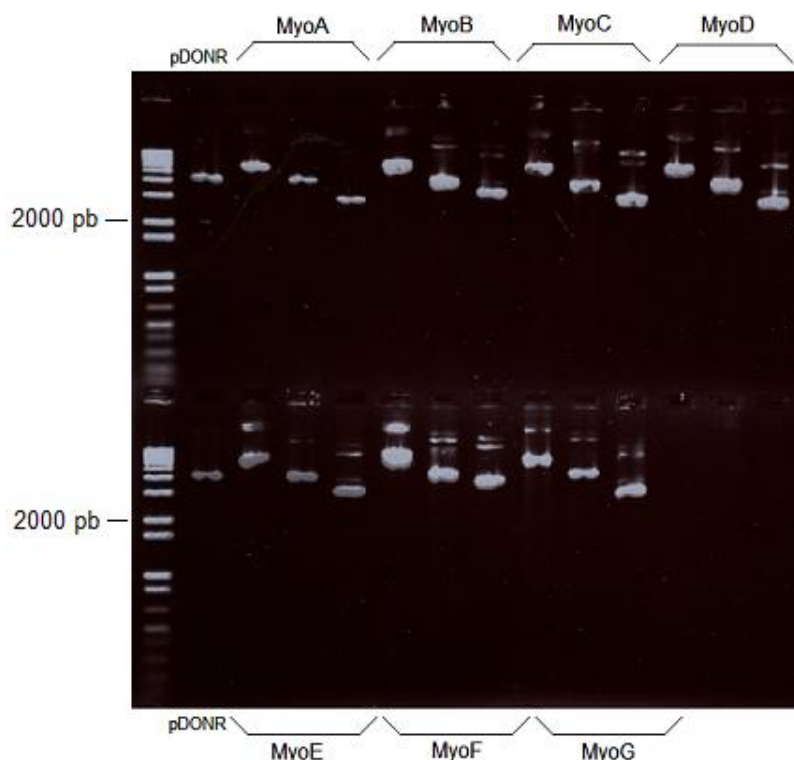


FIGURA 12 – GEL DE AGAROSE 0,8% DEMONSTRANDO OS CLONES DE ENTRADA (pDONR™221) COM SEUS CORRETOS INSERTOS

NOTA: O pDONR™221 na primeira canaleta da figura representa o vetor de entrada sem inserto

LEGENDA: Clone contendo o gene inteiro, cabeça e cauda respectivamente para cada miosina.

Para a obtenção dos clones de destinação foi realizado recombinação entre o clone de entrada e o vetor de destino. Nossos clones de entrada contendo os fragmentos (cabeça e cauda) das miosinas foram recombinados com o vetor de destinação pDEST™17, para expressão em sistema heterólogo. Os clones contendo as regiões codificadoras inteiras e a seqüência da cauda das miosinas foram recombinadas com vetor pTcGFPN para transfecção em *T. cruzi*. A seqüência inteira da MyoC, MyoD e MyoE foram ainda recombinadas com o vetor pTcPTP para tentarmos visualizar complexos protéicos, porém a seqüência inteira da MyoE não foi eficientemente inserida neste vetor.

Para a confirmação desses clones assim como para confirmação dos clones de entrada o tamanho dos plasmídeos foi analisado através de migração em gel de agarose, para comparação com o vetor sem o inserto (FIGURA 13 e 14), sabendo-se para isto que a seqüência retirada dos vetores de destino é de aproximadamente 1700 pares de base. Também foram realizadas PCR dos plasmídeos com iniciadores específicos para cada gene e seqüenciamento.

A tabela 6 mostra resumidamente o resultado obtido através das recombinações com o vetor de entrada e com os vetores de destino, apresentando em verde as recombinações bem sucedidas e em vermelho, os que, mesmo após várias tentativas, não apresentaram clones positivo.

A seqüência da MyoE e MyoA inteira não foram eficientemente inseridas no vetor de destino pTcGFPN. As demais seqüências, após várias tentativas foram recombinadas com os vetores de destinação desejados.

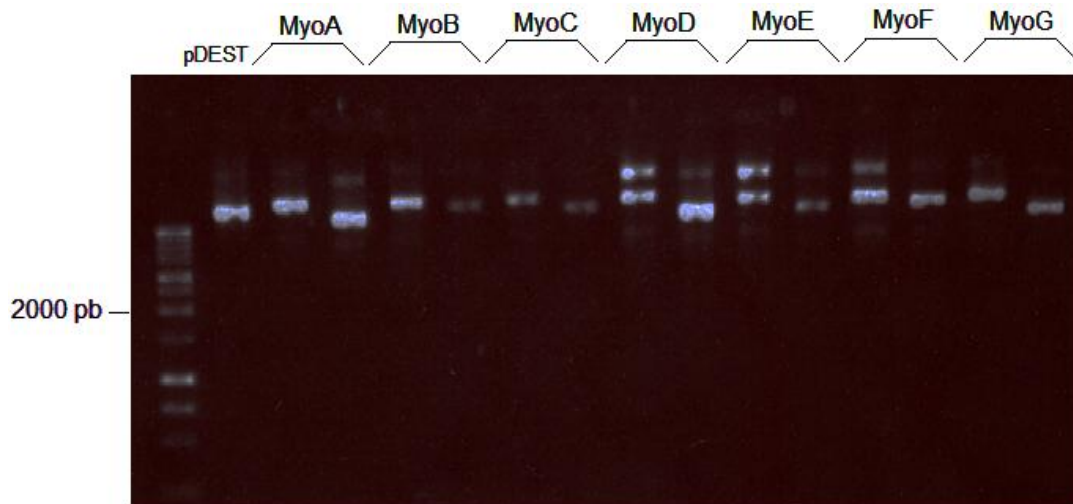


FIGURA 13 – GEL DE AGAROSE 1% DEMONSTRANDO OS CLONES DE DESTINO (pDEST™17) COM SEUS CORRETOS INSERTOS

NOTA: O pDEST™17 na primeira canaleta da figura representa o vetor sem inserto

LEGENDA: Clone contendo o fragmento da cabeça e cauda respectivamente para cada miosina.

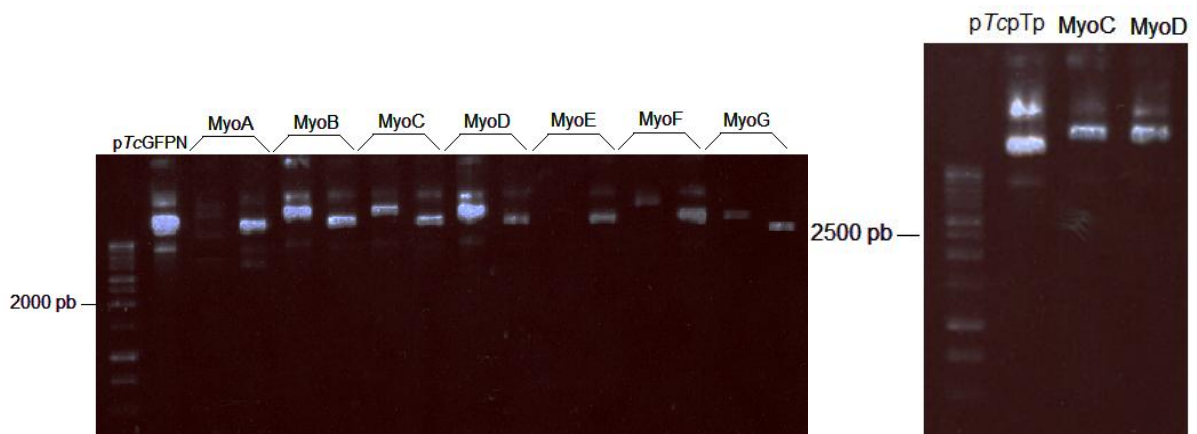


FIGURA 14 – GEL DE AGAROSE 1% DEMONSTRANDO OS CLONES DE DESTINO (pTcGFPN e pTcPTP) COM SEUS CORRETOS INSERTOS

NOTA: O pTcGFPN e o pTcPTP indicado nas primeiras canaletas das figuras representa os vetores sem inserto. MyoA e MyoE inteira não foram clonadas no vetor pTcGFPN com sucesso

LEGENDA: Clone contendo o gene inteiro e cauda respectivamente para o vetor pTcGFPN e MyoC e MyoD inteiras para o vetor pTcPTP

TABELA 6 – RESUMO DAS RECOMBINAÇÕES REALIZADAS COM OS VETORES DE ENTRADA E DE DESTINO PARA CADA SEQUÊNCIA DE MIOSINA

		pDONR™221	pDEST™17	pTcGFPN	pTcPTP
MyoA	CDS				
	cabeça				
	cauda				
MyoB	CDS				
	cabeça				
	cauda				
MyoC	CDS				
	cabeça				
	cauda				
MyoD	CDS				
	cabeça				
	cauda				
MyoE	CDS				
	cabeça				
	cauda				
MyoF	CDS				
	cabeça				
	cauda				
MyoG	CDS				
	cabeça				
	cauda				

NOTA: As seqüências inteiras não foram inseridas no vetor pDEST™17, os fragmentos das cabeças não foram inseridos no vetor pTcGFPN e somente foi realizado tentativa de clonagem da MyoC, MyoD e MyoE inteira no vetor pTcPTP

4.4 TESTE DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Foi realizado primeiramente um teste de expressão dos fragmentos cabeça e cauda das miosinas que estavam no vetor de destinação pDEST™17, utilizando para este, temperatura de 37°C e 2 horas de indução com IPTG. Através da observação em gel de poliacrilamida do conteúdo protéico, foi possível somente notar a expressão do fragmento MyoA cabeça e MyoD cabeça, observada como uma banda mais forte presente na altura correspondente ao tamanho esperado desses fragmentos (84,3 kDa e 92 kDa) (FIGURA 15 – A1 e B1). Para a confirmação da expressão das outras proteínas cuja expressão poderia não estar clara no gel, foi realizado um teste de *western blot*, utilizando anticorpo anti-histidina, uma vez que as proteínas recombinantes possuem uma cauda com 6 histidinas conferidas pelo vetor

pDEST™17. A revelação do teste confirmou o fragmento da MyoA cabeça e MyoD cabeça, já visualizadas no gel, e mais algumas cuja visualização em gel não foi possível. Os fragmentos que foram confirmados por *western blot* utilizando anti-histidina foram: MyoA cabeça (FIGURA 15 - A2), MyoB cauda (FIGURA 15 - C2), MyoC cabeça (FIGURA 15 - D2), MyoD cabeça (FIGURA 15 - B2), MyoD cauda (FIGURA 15 - B2), MyoE cabeça (FIGURA 16 - A2), MyoE cauda (FIGURA 16 - A2), MyoF cabeça (FIGURA 16 - A2) e MyoG cabeça (FIGURA 16 - B2). As demais, ou expressaram muito pouco ou não expressaram.

Foi realizado um novo teste de expressão dos fragmentos que expressaram muito pouco a 37°C, fragmento da MyoB cabeça, e MyoC cauda e os fragmentos das caudas da MyoA, MyoF e MyoG que não expressaram. As condições alteradas para essa nova tentativa de expressão foram a temperatura e o tempo de indução, que passaram para 25°C com 4 horas de indução. A expressão dessas proteínas não ficou clara no gel de poliacrilamida, sendo, portanto realizado um teste de *western blot*, utilizando anticorpo anti-histidina para confirmação. O fragmento da MyoB cabeça expressou muito pouco mas mesmo assim realizamos sua expressão em maior volume e o fragmento da MyoC cauda expressou em boa quantidade (FIGURA 17). Os fragmentos da cauda da MyoA, MyoF e MyoG não foram expressos.

O objetivo de expressar fragmentos de cada miosina era a futura inoculação destes em camundongos para produção de anticorpos, portanto pelo menos um peptídeo de cada miosina (cabeça ou cauda) seria suficiente para continuação do trabalho. Por isso não se tentou a expressão destas que não funcionaram nos dois testes.

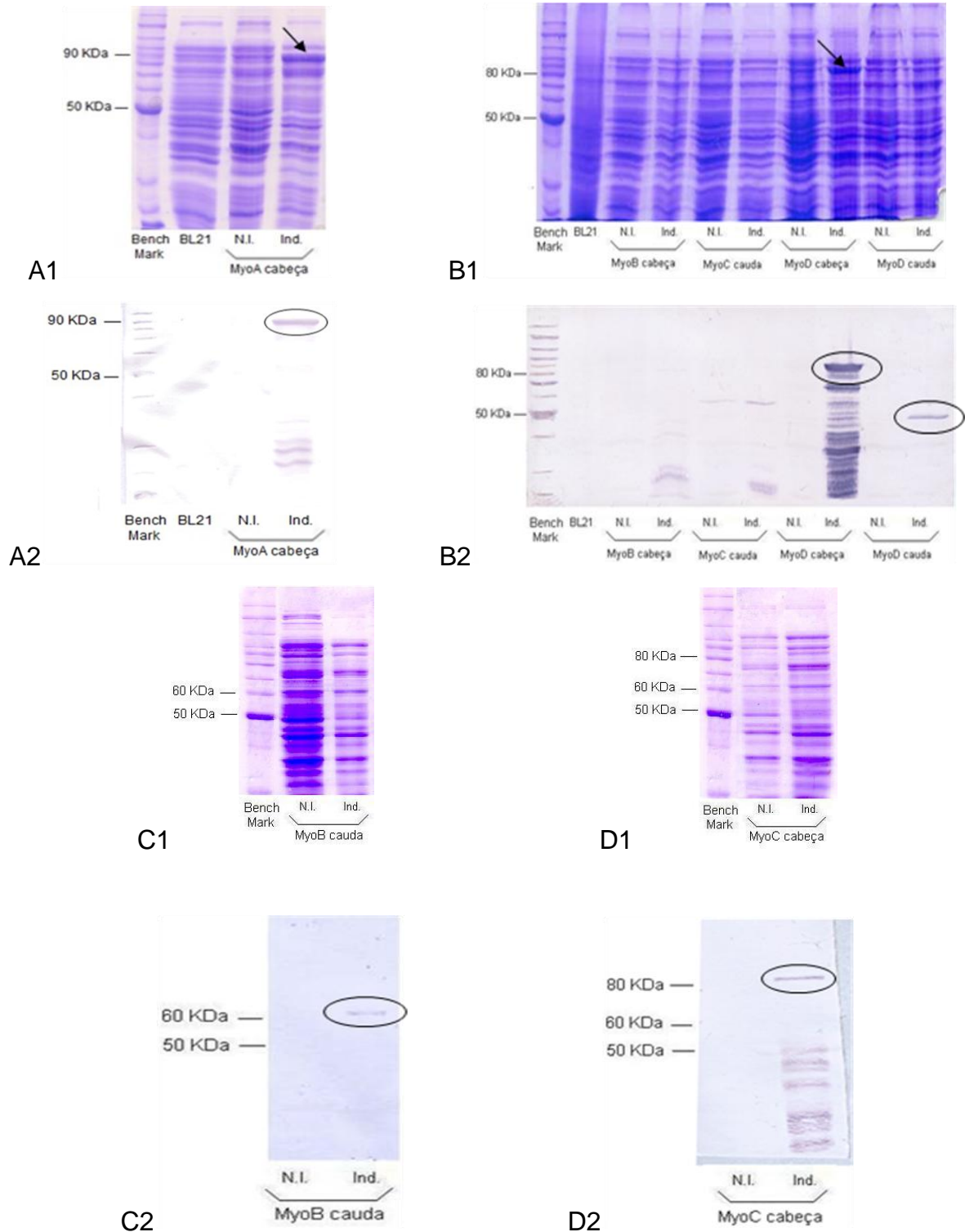


FIGURA 15 – PERFIL ELETROFORÉTICO EM MATRIZ DE GEL SDS-page 10% E WESTERN BLOT DOS TESTES DE EXPRESSÃO REALIZADOS A 37°C COM 2 HORAS DE INDUÇÃO

NOTA: Os círculos indicam os tamanhos esperados para cada expressão e as setas nas figuras A1 e B1 indicam a banda correspondente ao tamanho esperado para a expressão

LEGENDA: **BenchMark:** Padrão de massa molecular; **BL21:** Extrato de proteínas produzidas pela célula BL21pLysS sem o inserto (controle); **N.I.:** Proteínas expressas pela célula sem a adição do indutor IPTG; **Ind.:** Proteínas expressas pela célula com a adição do indutor IPTG

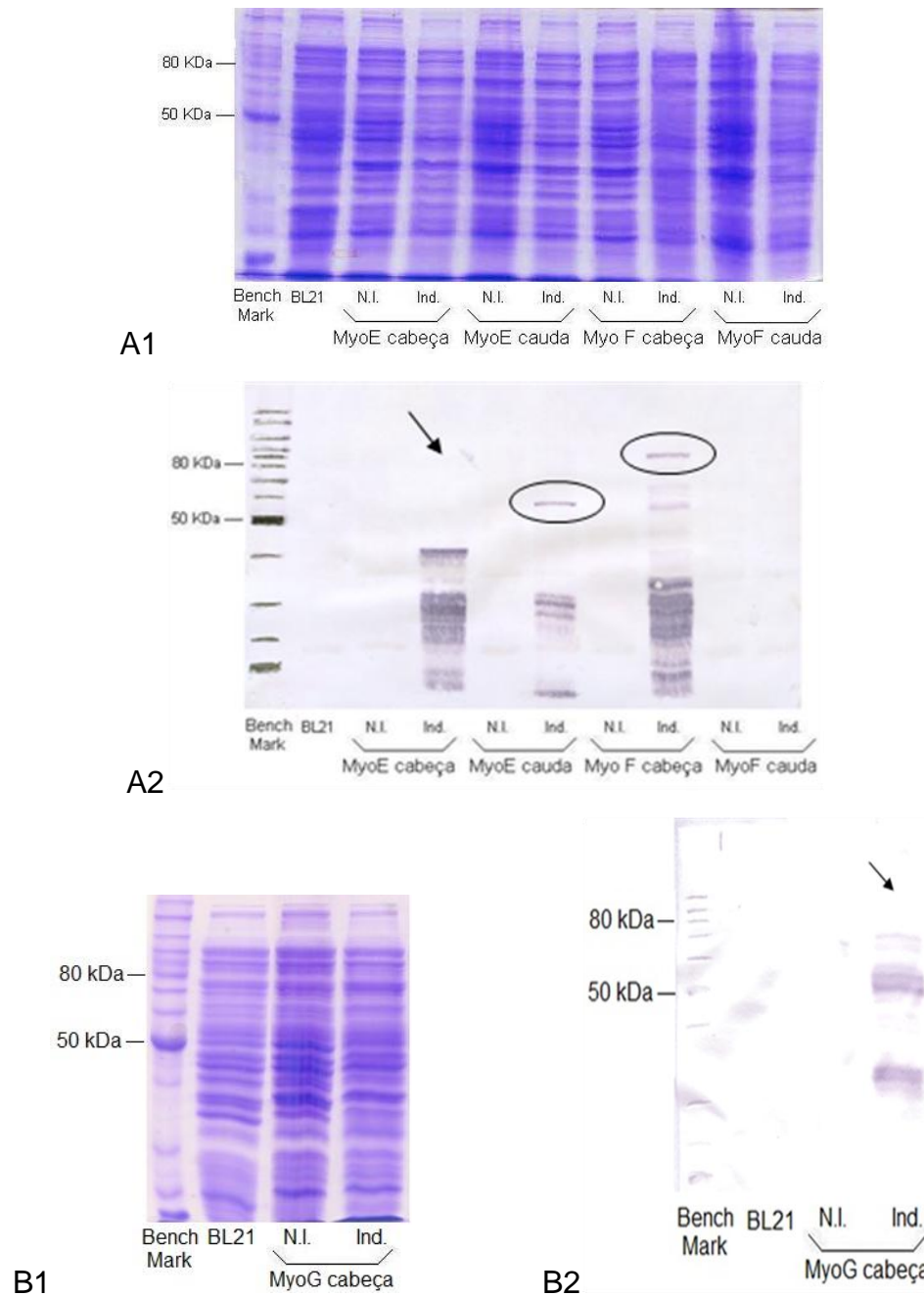


FIGURA 16 – PERFIL ELETROFORÉTICO EM MATRIZ DE GEL SDS-page 10% E WESTERN BLOT DOS TESTES DE EXPRESSÃO REALIZADOS A 37°C COM 2 HORAS DE INDUÇÃO

NOTA: Os círculos indicam os tamanhos esperados para cada expressão e as setas na figura A2 e B2 indicam onde deveria estar aparecendo a banda correspondente a expressão do fragmento da MyoE cabeça e MyoG cabeça

LEGENDA: **BenchMark**: Padrão de massa molecular; **BL21**: Extrato de proteínas produzidas pela célula BL21pLysS sem o inserto (controle); **N.I.**: Proteínas expressas pela célula sem a adição do indutor IPTG; **Ind.**: Proteínas expressas pela célula com a adição do indutor IPTG

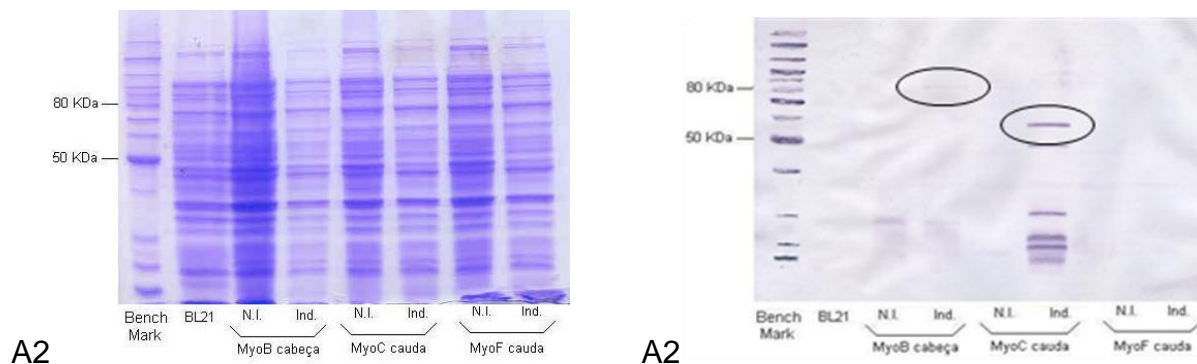


FIGURA 17 – PERFIL ELETROFORÉTICO EM MATRIZ DE GEL SDS-*page* 10% E *WESTERN BLOT* DOS TESTES DE EXPRESSÃO REALIZADOS A 25°C COM 4 HORAS DE INDUÇÃO

NOTA: Os círculos indicam os tamanhos esperados para cada expressão

LEGENDA: **BenchMark**: Padrão de massa molecular; **BL21**: Extrato de proteínas produzidas pela célula BL21pLysS sem o inserto (controle); **N.I.**: Proteínas expressas pela célula sem a adição do indutor IPTG; **Ind.**: Proteínas expressas pela célula com a adição do indutor IPTG

As proteínas que tiveram resultados positivos nas expressões em pequena quantidade foram posteriormente expressas em maiores volumes de meio para se obter uma grande quantidade de proteína para futura purificação.

4.5 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Foram cultivadas culturas de *E. coli* para a produção em maior volume (300 mL) dos fragmentos de miosinas expressos em pequena quantidade. São eles: os fragmentos da MyoA cabeça, MyoB cabeça e cauda, MyoC cabeça e cauda, MyoD cabeça e cauda, MyoE cabeça e cauda, MyoF cabeça e MyoG cabeça.

O protocolo de expressão utilizado nesta etapa foi o mesmo realizado para expressão em pequena quantidade, no entanto, nesta fase, as proteínas foram analisadas com relação à sua presença no extrato total e nas frações solúvel e/ou insolúvel. Todas as proteínas recombinantes expressas apresentaram-se na fração insolúvel.

A expressão das proteínas na fração insolúvel não é um resultado inesperado, visto que altos níveis de expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* levam ao surgimento de agregados dessas proteínas (estruturalmente mal-formadas), referidos como corpúsculos de inclusão. Estes agregados são pouco solúveis em meio aquoso

(KOPITO, 2000). Quando recuperados do lisado celular por meio de centrifugação, os corpúsculos de inclusão são co-sedimentados com debris celulares, incluindo uma alta quantidade de componentes da membrana e parede celular das bactérias (RUDOLPH & LILIE, 1996).

Após o ensaio de expressão e o fracionamento das proteínas conforme a solubilidade, observou-se que o fragmento da MyoB cabeça e MyoC cauda, que já haviam expressado em baixa quantidade no teste, também expressaram muito pouco em maior volume. O fragmento da MyoA cabeça também expressou muito pouco, apesar de ter apresentado um bom resultado no teste de expressão.

Quando tentamos expressar os fragmentos da MyoE cabeça e da MyoG cabeça com as mesmas condições do teste de expressão, que foi 37°C com 2 horas de indução, utilizando o mesmo protocolo adotado para todas as miosinas, estes fragmentos que já se mostraram muito degradados no teste, não foram eficientemente expressos, aparecendo completamente degradado durante a expressão em grande quantidade (FIGURA 18).

Tentamos novamente a expressão deste fragmento, com as mesmas condições, mas utilizando durante o processo um inibidor de protease (PMSF) e não realizando as etapas de sonicação para fracionamento da proteína. Com estas alterações, foi possível a correta expressão somente do fragmento da MyoE cabeça (FIGURA 20 – A e FIGURA 22 – A). O fragmento da MyoG cabeça não expressou.

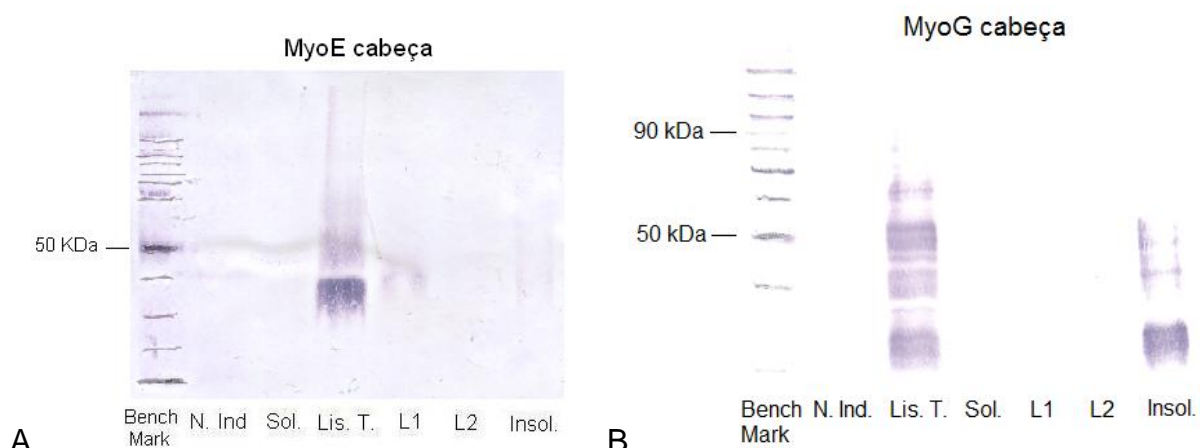


FIGURA 18 – WESTERN BLOT DA EXPRESSÃO EM LARGA ESCALA DO FRAGMENTO DA MyoE CABEÇA E MyoG CABEÇA

LEGENDA: **BenchMark:** Padrão de massa molecular; **N.Ind.:** Proteínas expressas pela célula sem a adição do indutor; **Sol.:** Proteínas solúveis; **Lis. T.:** Lisado Total; **L1:** Lavado 1; **L2:** Lavado 2; **Insol.:** Proteínas insolúveis

Os géis de poliacrilamida com os resultados das expressões podem ser visualizados na figura 19 e 20, onde podemos observar que houve a produção das proteínas, indicada através da presença de uma banda correspondente a aproximadamente o tamanho correto dos fragmentos, na fração insolúvel da expressão.

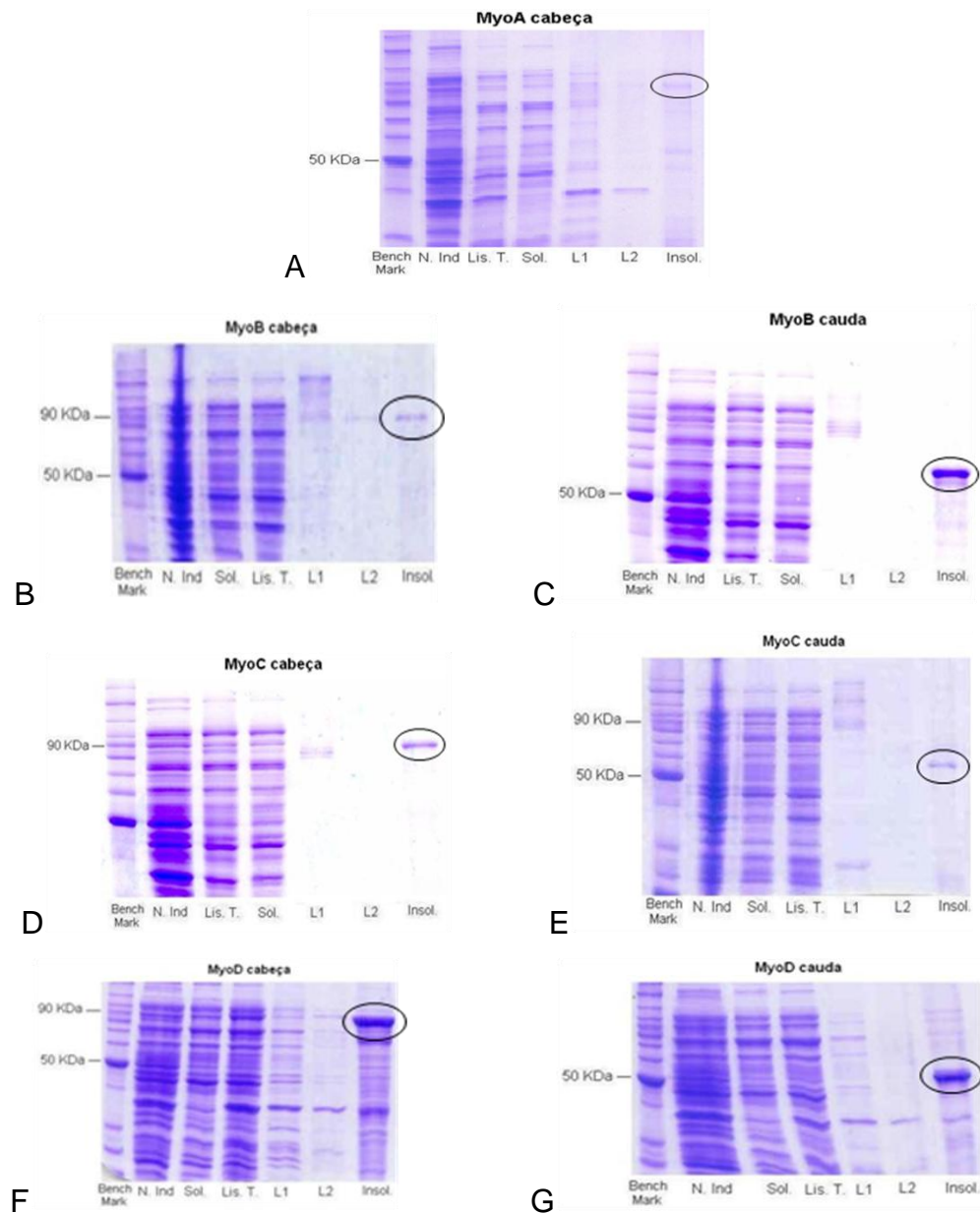


FIGURA 19 – PERFIL ELETROFORÉTICO EM MATRIZ DE GEL SDS-*page* 10% DAS EXPRESSÕES EM GRANDE QUANTIDADE

NOTA: As expressões foram realizadas com as mesmas condições em que expressaram nos testes; Os círculos indicam o tamanho correto dos fragmentos expressos; Maiores informações sobre as frações podem ser obtidas em Material e Métodos

LEGENDA: **BenchMark:** Padrão de massa molecular; **N.Ind.:** Proteínas expressas pela célula sem a adição do indutor; **Sol.:** Proteínas solúveis; **Lis. T.:** Lisado Total; **L1:** Lavado 1; **L2:** Lavado 2; **Insol.:** Proteínas insolúveis

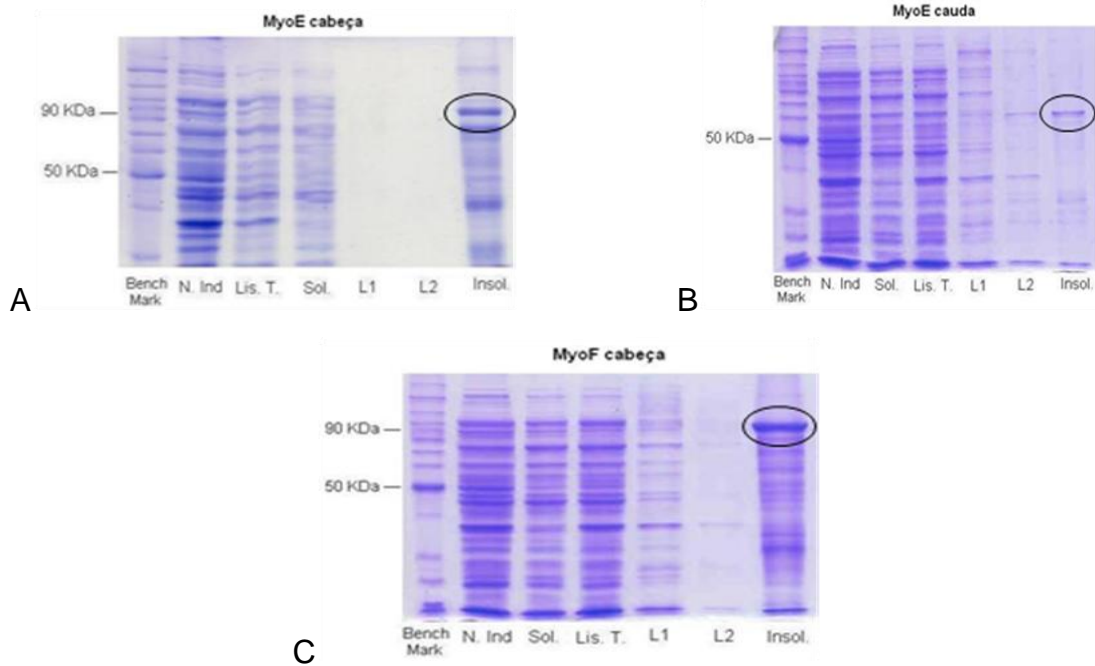


FIGURA 20 – PERFIL ELETROFORÉTICO EM MATRIZ DE GEL SDS-*page* 10% DAS EXPRESSÕES EM GRANDE QUANTIDADE

NOTA: As expressões foram realizadas com as mesmas condições em que expressaram nos testes; Os círculos indicam o tamanho correto dos fragmentos expressos; Maiores informações sobre as frações podem ser obtidas em Material e Métodos

LEGENDA: **BenchMark:** Padrão de massa molecular; **N.Ind.:** Proteínas expressas pela célula sem a adição do indutor; **Sol.:** Proteínas solúveis; **Lis. T.:** Lisado Total; **L1:** Lavado 1; **L2:** Lavado 2; **Insol.:** Proteínas insolúveis.

Foi realizado teste de *western blot* das expressões utilizando anticorpo anti-histidina para confirmar se as bandas que apareceram eram as proteínas esperadas (FIGURA 21 e 22).

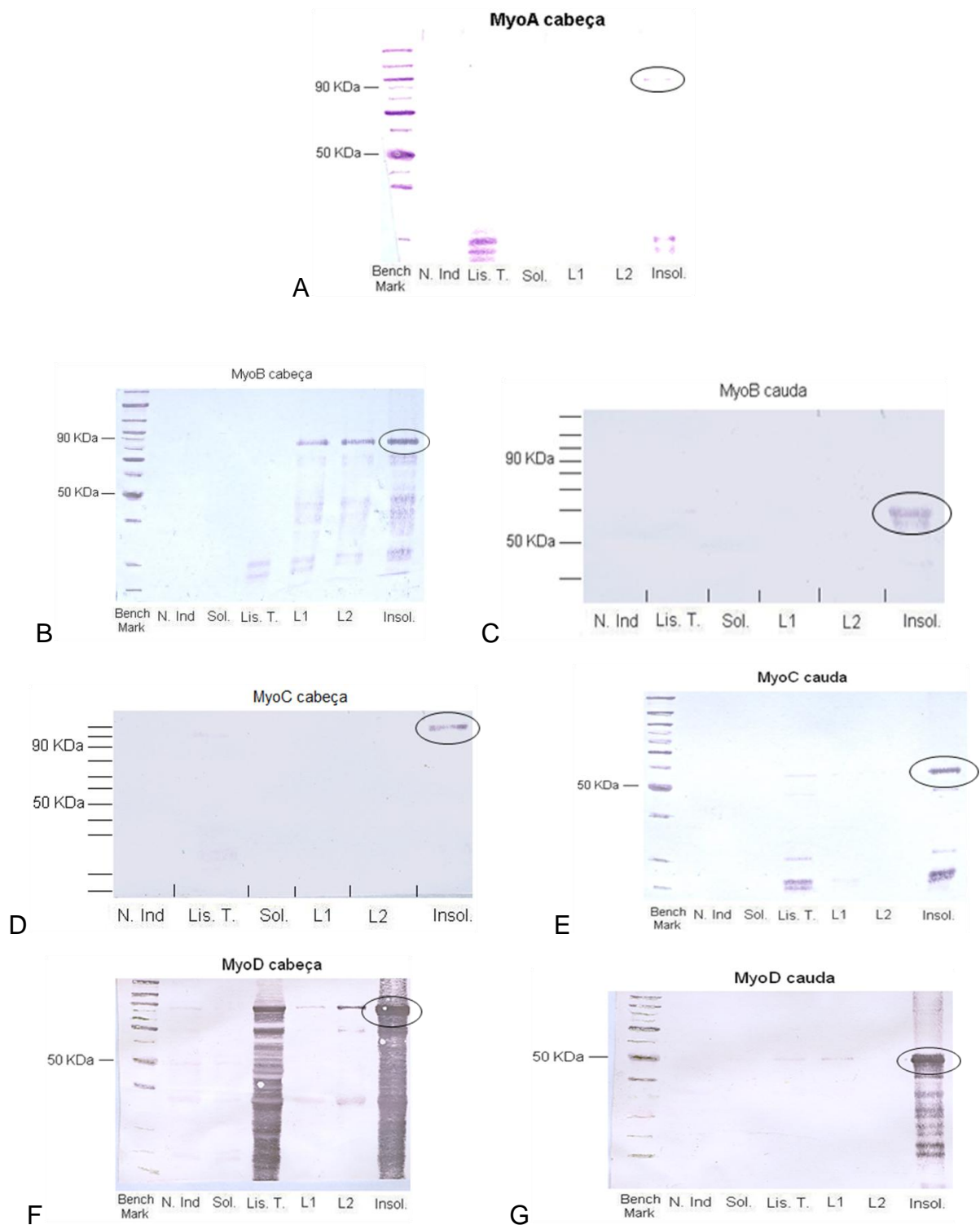


FIGURA 21 – WESTERN BLOT DAS EXPRESSÕES EM GRANDE QUANTIDADE

NOTA: As expressões foram realizadas com as mesmas condições em que expressaram nos testes. Os círculos indicam o tamanho correto dos fragmentos expressos

LEGENDA: **BenchMark:** Padrão de massa molecular; **N.Ind.:** Proteínas expressas pela célula sem a adição do indutor; **Sol.:** Proteínas solúveis; **Lis. T.:** Lisado Total; **L1:** Lavado 1; **L2:** Lavado 2; **Insol.:** Proteínas insolúveis

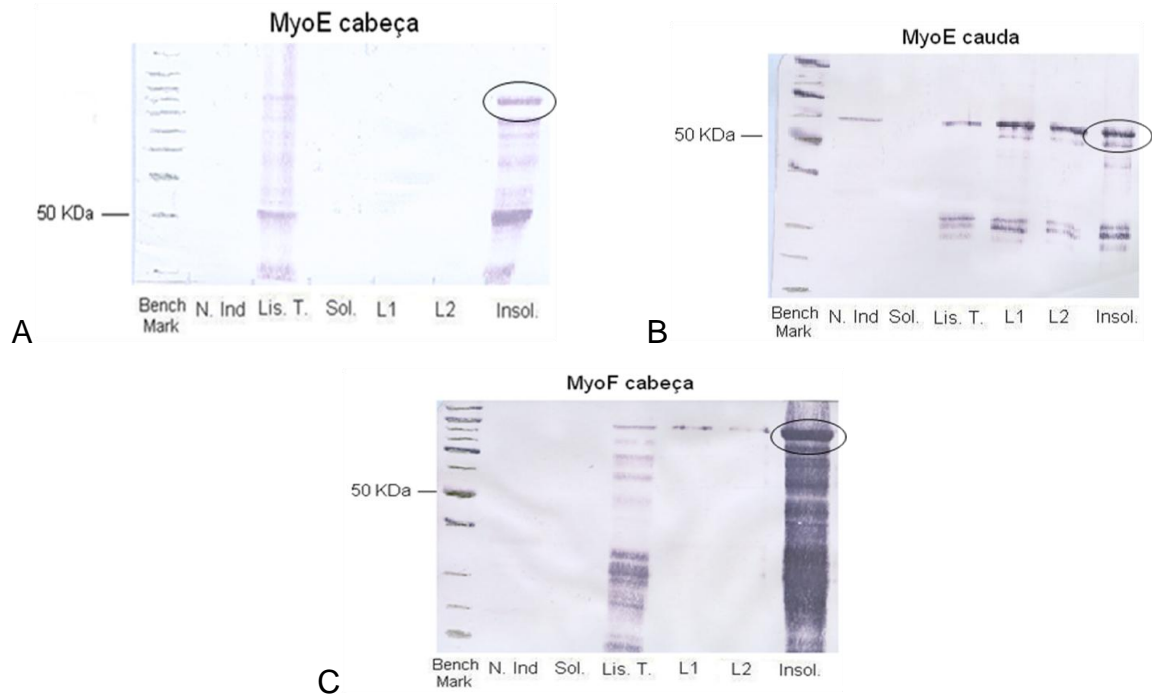


FIGURA 22 – WESTERN BLOT DAS EXPRESSÕES EM GRANDE QUANTIDADE

NOTA: As expressões foram realizadas com as mesmas condições em que expressaram nos testes. Os círculos indicam o tamanho correto dos fragmentos expressos

LEGENDA: **BenchMark:** Padrão de massa molecular; **N.Ind.:** Proteínas expressas pela célula sem a adição do indutor; **Sol.:** Proteínas solúveis; **Lis. T.:** Lisado Total; **L1:** Lavado 1; **L2:** Lavado 2; **Insol.:** Proteínas insolúveis

Observando os resultados é possível verificar que houve degradação de algumas proteínas, através da presença de um forte rastro na fração insolúvel e também é possível verificar que houve perda da proteína nos lavados para algumas miosinas como o fragmento da MyoB cabeça e MyoE cauda por exemplo.

4.6 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Alguns fragmentos foram submetidos à purificação por eletroeluição e posterior inoculação em camundongos. Esses fragmentos são MyoB cabeça, MyoC cauda, MyoD cabeça, MyoD cauda, MyoE cabeça, MyoE cauda e MyoF cabeça. A pureza das proteínas eletroeluídas foi confirmada através de gel de poli-acrilamida, onde foi possível verificar as bandas purificadas do tamanho esperado referente às proteínas (FIGURA 23). Para outros fragmentos foram adotados outros procedimentos de purificação.

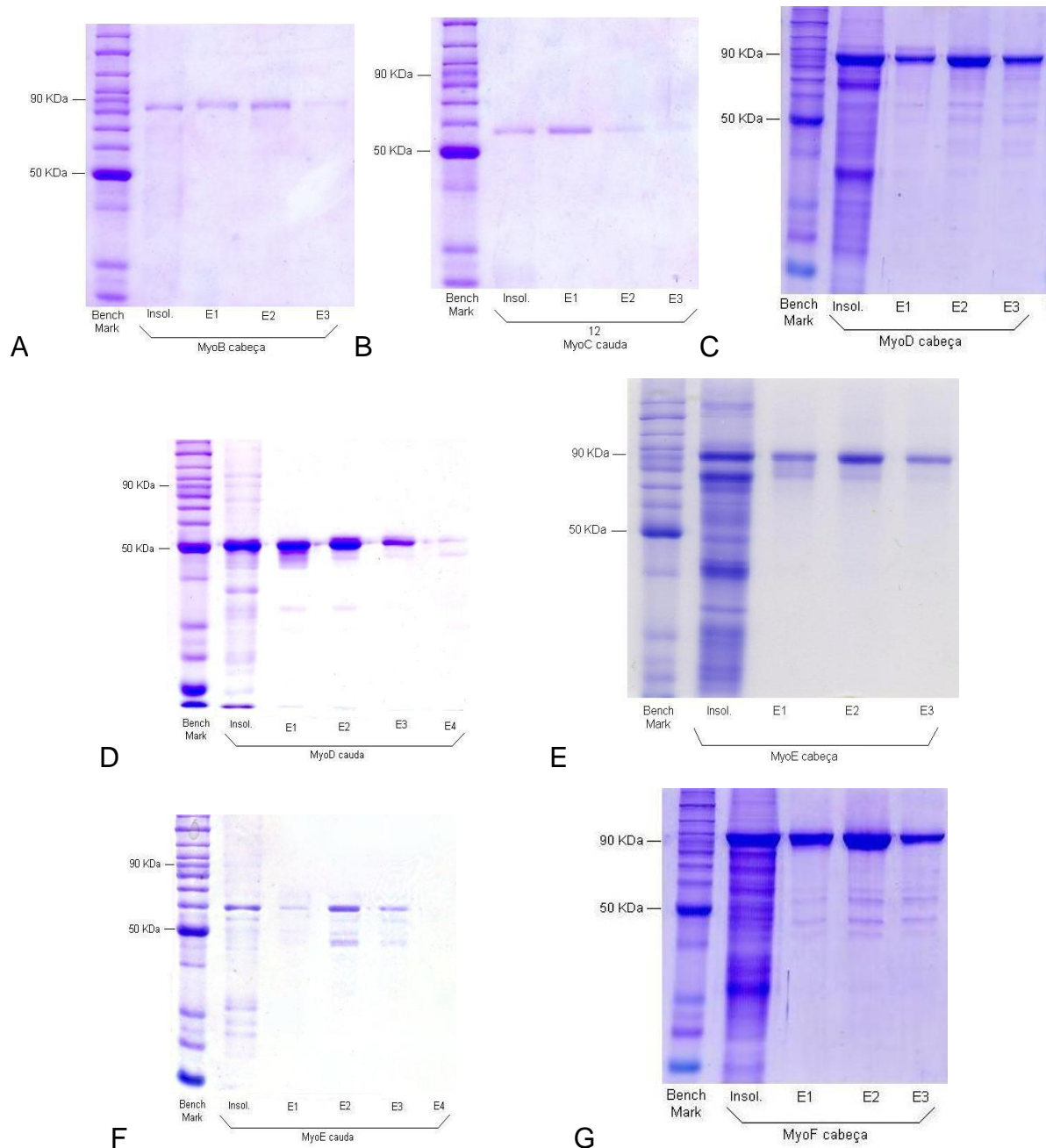


FIGURA 23 – PERFIL ELETROFORÉTICO EM MATRIZ DE GEL SDS-*page* 10% DA PURIFICAÇÃO POR ELETROELUIÇÃO

LEGENDA: **BenchMark**: Padrão de massa molecular; **Insol.**: Proteínas insolúveis (fração que foi utilizada para realizar a purificação); **E1, E2, E3 e E4**: Diferentes eluições realizadas

As proteínas purificadas foram quantificadas no aparelho Qubit conforme orientações do fabricante. Após dosagem das proteínas purificadas por eletroeluição, verificou-se que o fragmento da MyoB cabeça e MyoC cauda não apresentaram

quantidade suficiente para as inoculações. Como pode ser observado no gel da expressão, as frações insolúveis dessas proteínas praticamente não possuem proteínas contaminantes, optou-se, portanto realizar diálise dessas frações para retirada da uréia e posterior inoculação, sem nenhuma outra estratégia de purificação.

O fragmento da MyoA cabeça que expressou muito pouco e o fragmento da MyoG cabeça que expressou a proteína muito degradada, também foram submetidos somente à diálise.

O fragmento da MyoB cauda e MyoC cabeça foram expressas em um momento tardio do trabalho, pois foram as últimas a serem clonadas no vetor pDEST™17. Como já tínhamos realizados diálise para alguns fragmentos de uma maneira eficiente, e observando os géis de expressão dessas duas miosinas pode-se verificar pouca contaminação e/ou degradação, optou-se por realizar diálise dessas proteínas ao invés de purificação por eletroeluição.

Após esse procedimento, foi realizada a quantificação dessas amostras, obtendo-se uma boa quantidade de proteína para continuidade do trabalho.

A tabela 7 apresenta a situação em relação às expressões e purificações dos fragmentos das miosinas.

4.7 PRODUÇÃO E ANÁLISE DOS ANTICORPOS

Após a purificação das proteínas, estas foram inoculadas em camundongos para a produção de anticorpos. Anteriormente às inoculações, foi retirado soro dos animais (pré-imune) a fim de verificar se os mesmos estavam reagindo ou não com o extrato protéico de *T. cruzi*. Para tanto, foi realizado um ensaio de *western blot*, onde o extrato de proteínas de *T. cruzi* foi separado em gel de acrilamida SDS-*page* e imobilizado em membrana de nitrocelulose. A seguir, as membranas com os extratos foram incubadas com os soros pré-ímenes diluídos 1:250 por 1 hora a temperatura ambiente. Dessa forma, foi possível concluir que os soros não reconhecem nenhuma proteína de *T. cruzi* de maneira inespecífica, viabilizando sua utilização em experimentos futuros. De 19 camundongos testados, o soro de apenas 1 (camundongo 13) apresentou

reconhecimento de uma forte banda de aproximadamente 50 kDa. Este animal não foi utilizado no trabalho. (FIGURA 24).

TABELA 7 – RESUMO DAS EXPRESSÕES E PURIFICAÇÕES

		pDONR™221	pDEST™17	Expressão	Purificação
MyoA	CDS				
	cabeça			Pouco expressa	Diálise
	cauda				
MyoB	CDS				
	cabeça			Pouco expressa	Diálise
	cauda				Diálise
MyoC	CDS				
	cabeça				Diálise
	cauda			Pouco expressa	Diálise
MyoD	CDS				
	cabeça				Eletroeluição
	cauda				Eletroeluição
MyoE	CDS				
	cabeça				Eletroeluição
	cauda				Eletroeluição
MyoF	CDS				
	cabeça				Eletroeluição
	cauda				
MyoG	CDS				
	cabeça			Degradada	Diálise
	cauda				

NOTA: Em verde está representado os resultados positivos para as expressões e purificações e em vermelho está representado as expressões e purificações mal sucedidas. As seqüências inteiras não foram expressas

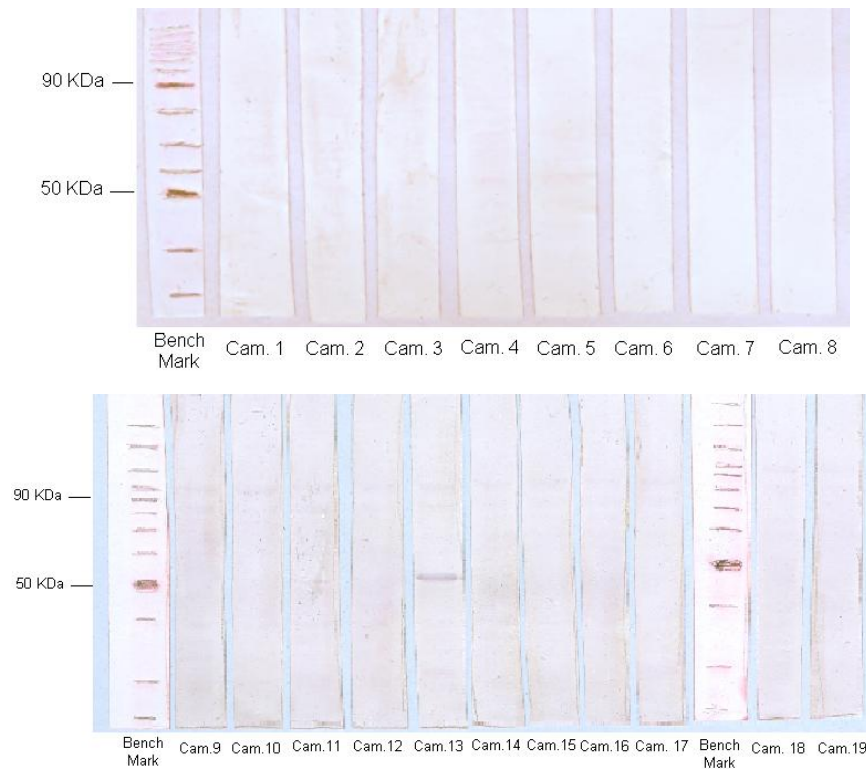


FIGURA 24 – *WESTERN BLOT* DEMONSTRANDO TESTES COM OS SOROS PRÉ-IMUNES
 LEGENDA: **BenchMark**: Padrão de massa molecular; **Cam. 1 a Cam. 19**: Soro de camundongo 1 a 19

Cada um dos fragmentos foi inoculado em dois camundongos distintos.

Após a quarta inoculação, foi retirado soro dos animais para ensaios de *western blot* para verificarmos se os animais já haviam produzido anticorpos contra as proteínas recombinantes. Os resultados mostraram que não houve reconhecimento do anticorpo em relação ao extrato do parasita, como é o caso da MyoB cabeça, MyoC cauda, MyoD cabeça e cauda e MyoF cabeça (FIGURA 25), ou quando houve reconhecimento de uma banda do tamanho completo da miosina em questão, este fez-se de uma maneira muito fraca (MyoE), apesar de reconhecer muito fortemente as proteínas recombinantes. Optamos por realizar mais imunizações pra tentarmos melhores resultados para estes soros. A figura 25 mostra os ensaios de *western blot* para alguns soros onde estes foram testados contra as proteínas recombinantes e contra extrato de *T. cruzi* após a quarta inoculação das proteínas.

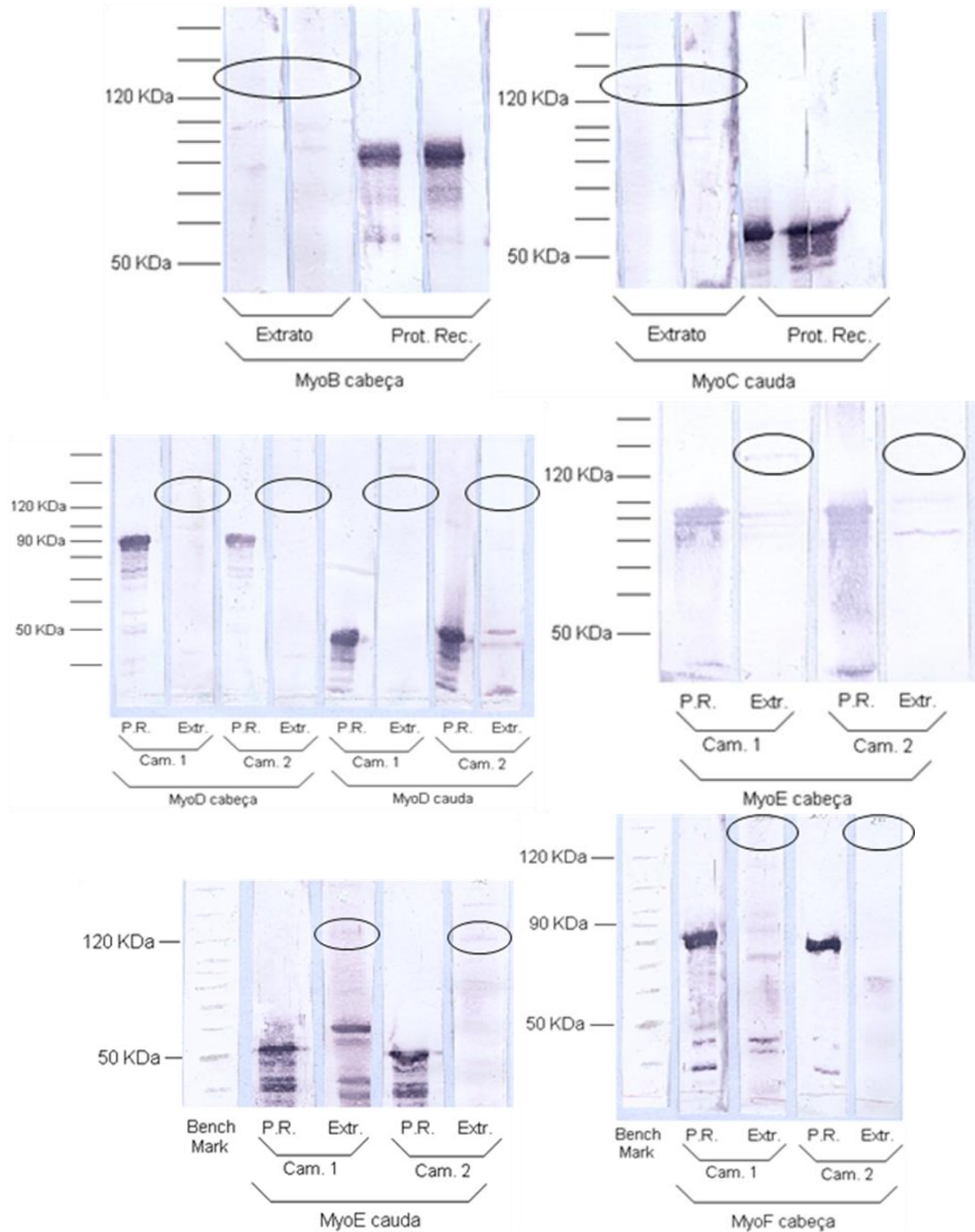


FIGURA 25 – WESTERN BLOT DEMONSTRANDO TESTE DOS SOROS APÓS A QUARTA INOCULAÇÃO

NOTA: Teste realizado contra as proteínas recombinantes e contra o extrato de *T. cruzi*

LEGENDA: **BenchMark:** Padrão de massa molecular; **Extrato ou Extr.:** Extrato de *T. cruzi*; **Prot. Rec. ou P.R.:** Proteína recombinante

Uma semana após a sexta inoculação, os animais foram sacrificados por punção cardíaca, e o soro foi retirado para testes futuros. O resultado do reconhecimento desse soro contra os extratos de *T. cruzi* encontram-se na figura 26,

onde se pode observar a presença de bandas correspondentes ao tamanho esperado para algumas proteínas.

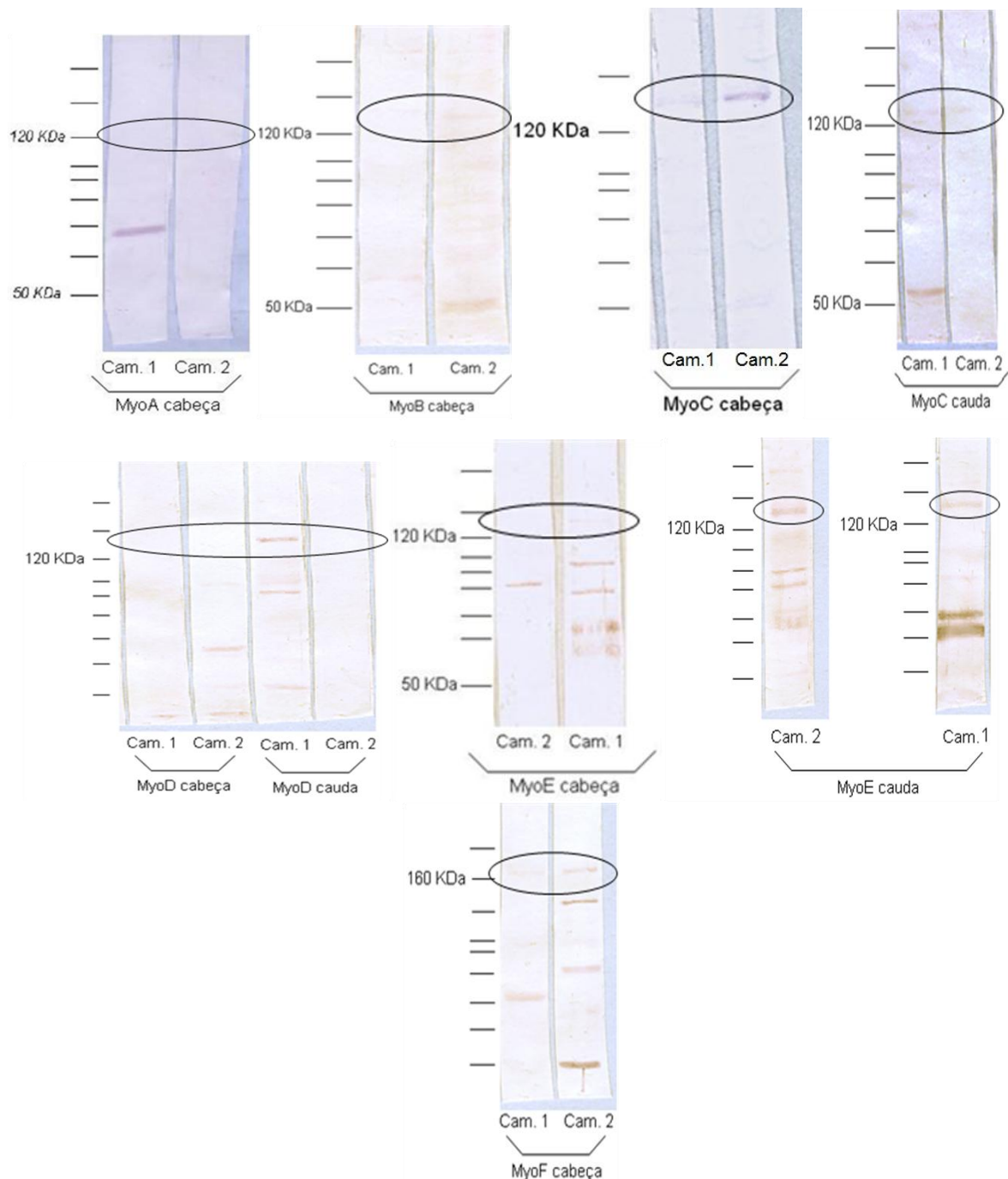


FIGURA 26 – WESTERN BLOT DOS SOROS APÓS A SEXTA INOCULAÇÃO

NOTA: Teste realizado contra o extrato de *T. cruzi*. Os círculos indicam o tamanho esperado de cada proteína

LEGENDA: **Cam. 1 e Cam. 2:** Diferentes animais em que foi inoculada uma mesma proteína

O teste do antissoro da MyoA cabeça contra os extratos de *T. cruzi* apresentou uma banda única para um dos camundongos, porém muito menor do que o tamanho da miosina que é de 124,3 kDa.

O reconhecimento da banda do tamanho esperado para o teste com o antissoro produzido contra a região da cabeça da MyoB, que corresponde ao tamanho completo da miosina, ainda não ficou muito claro mesmo após a sexta inoculação. O antissoro produzido contra a cauda da MyoB, mesmo após 6 inoculações não apresentou reconhecimento de bandas esperadas em nenhum dos soros dos animais imunizados.

O antissoro produzido contra a região da cabeça da MyoC se mostrou muito específico após a 6ª imunização, apresentando uma única banda na altura do tamanho esperado (132,3 kDa) para o antissoro produzido em um dos animais, o soro do segundo animal imunizado reconheceu uma banda muito fracamente. Já o antissoro contra a MyoC cauda ficou muito fraco, mesmo após a sexta inoculação.

Os testes com os antissoros produzidos contra a MyoD apresentou o reconhecimento da banda do tamanho esperado (139,5 kDa) somente no soro de um dos camundongos que foi inoculado com o fragmento da cauda da MyoD. O antissoro produzido contra a região da cabeça da MyoD não apresentou reconhecimento algum. Diferente dos testes dos outros soros, os resultados do teste com o soro da MyoE após a quarta inoculação apresentou o reconhecimento de bandas do tamanho da miosina completa que é de 135,7 kDa (FIGURA 25), mas com um fraco reconhecimento, mesmo com esse resultado optamos por mais inoculações. Após a 6ª imunização o reconhecimento da banda do tamanho esperado, para o soro dos dois animais imunizados apareceu de uma maneira mais forte para a MyoE cauda. O camundongo 1 imunizado com a MyoE cauda apresentou uma banda muito forte na altura de aproximadamente 60 kDa, decidimos portanto não utilizar esse antissoro para dar continuidade ao trabalho. O soro produzido contra a região da cabeça da MyoE também apresentou um bom resultado após a quarta imunização, mas somente para o soro de um dos animais, e depois da punção cardíaca a intensidade dessa banda parece ter diminuído.

A MyoF é a maior miosina encontrada no genoma de *T. cruzi*, possuindo cerca de 168,5 kDa, e como pode-se observar no teste após a sexta inoculação, ocorreu o reconhecimento da banda do tamanho esperado. Mas como quase todos os outros soros, mais de uma banda foi também reconhecida.

O antissoro produzido contra a região da cabeça da MyoG, mesmo após 6 inoculações não apresentou reconhecimento de bandas esperadas em nenhum dos soros dos animais imunizados.

A tabela abaixo demonstra a situação dos anticorpos produzidos.

TABELA 8 – RESUMO DA PRODUÇÃO DOS ANTISSOROS CONTRA AS MIOSINAS

		Expressão	Anticorpos
MyoA	cabeça	Pouco expressa	Tamanho inesperado
	cauda		
MyoB	cabeça	Pouco espesso	Fraço
	cauda		
MyoC	cabeça		OK
	cauda	Pouco expressa	Fraço
MyoD	cabeça		
	cauda		OK
MyoE	cabeça		Fraço
	cauda		OK
MyoF	cabeça		OK
	cauda		
MyoG	cabeça	Degradada	
	cauda		

NOTA: Em vermelho está representado os antissoros que tiveram ausência de reconhecimento mesmo após 6 imunizações dos animais

Para alguns soros que apresentaram um bom reconhecimento da banda de interesse, mas também estavam reconhecendo bandas de outros tamanhos, foi realizada uma purificação. O protocolo adotado para a purificação consistia em incubar o soro com o extrato solúvel de *E. coli* juntamente com a proteína recombinante, esta última, aderida à membrana de nitrocelulose. Deste modo, os anticorpos específicos contra a proteína de interesse se ligariam à membrana e os anticorpos responsáveis pelo reconhecimento das demais proteínas se ligariam ao extrato da bactéria, se estes tivessem sido gerados em resposta a algum componente bacteriano. Com isso, a eluição dos anticorpos específicos contra a proteína recombinante (aderidos na membrana) poderia ser feita com solução à base de glicina ácida.

Os soros escolhidos para esta purificação foi o soro do camundongo 2 da MyoE cauda, que após a purificação apresentou uma melhora na qualidade, aparecendo somente uma banda além da de interesse (FIGURA 27). O soro do camundongo 1 da

MyoF também foi purificado, e mesmo após este procedimento o padrão de bandas se manteve (FIGURA 28).

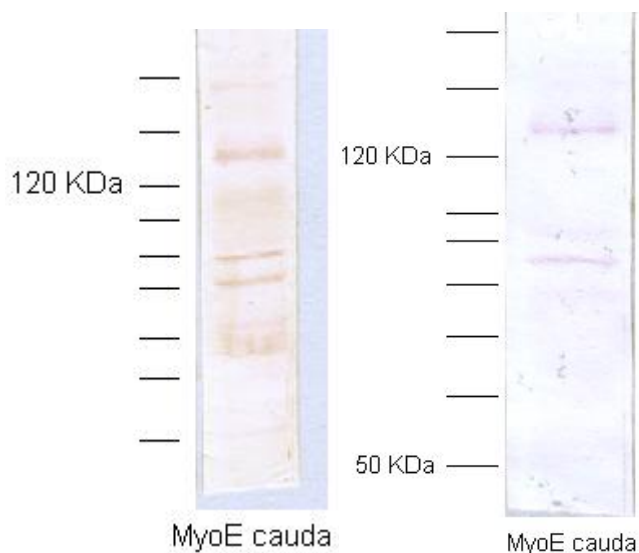


FIGURA 27 – WESTERN BLOT DEMONSTRANDO A PURIFICAÇÃO DE UM DOS SOROS DA MyoE
NOTA: À esquerda soro antes da purificação, à direita após a purificação

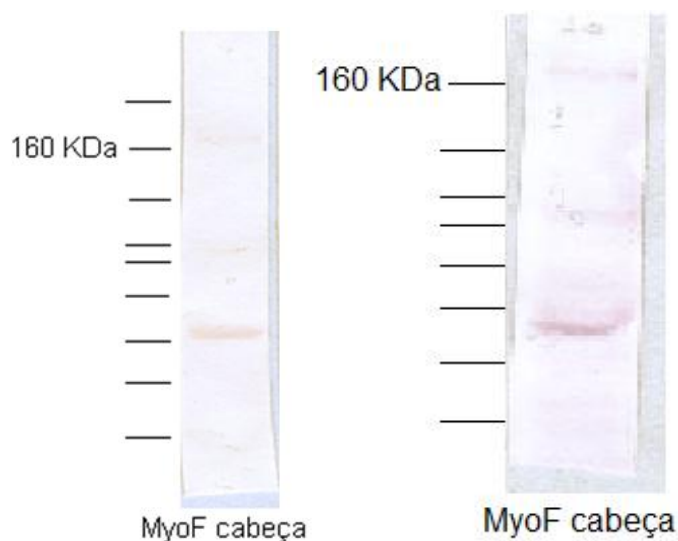


FIGURA 28 – WESTERN BLOT DEMONSTRANDO A PURIFICAÇÃO DE UM DOS SOROS DA MyoF
NOTA: À esquerda soro antes da purificação, à direita após a purificação

O soro purificado da MyoE e também o outro soro, o qual não foi submetido à purificação, foram testados contra os extratos de *T. brucei*, para analisarmos a especificidade desses soros anti MyoE, uma vez que *T. brucei* não tem esta proteína (pelo menos bioinformaticamente identificada). O soro purificado apresentou resultado positivo somente para o extrato de *T. cruzi*, não aparecendo qualquer reconhecimento

no extrato de *T. brucei*. Já o outro soro, o qual reconhece fortes bandas de aproximadamente 60/70 kDa também reconheceu esta banda nos extrato de *T. brucei*, indicando que estas proteínas estão interagindo inespecificamente com o soro, mas não reconheceu a banda correspondente ao tamanho da miosina (FIGURA 29).

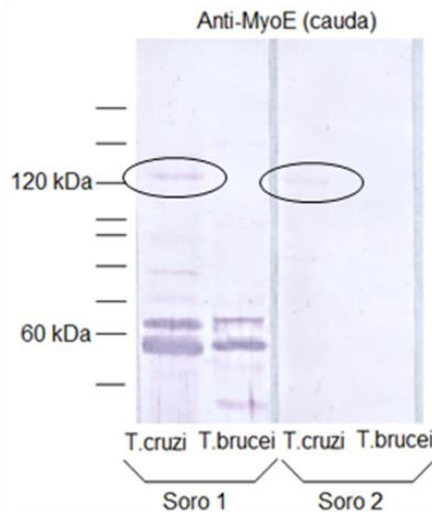


FIGURA 29 – WESTERN BLOT DEMONSTRANDO TESTE UTILIZANDO EXTRATO DE *Trypanosoma brucei*

NOTA: Os círculos indicam o tamanho correto da miosina

LEGENDA: **Soro 1**: Soro do camundongo 1 sem purificação; **Soro 2**: Soro do camundongo 2 após a purificação

Também realizamos este ensaio para o soro produzido contra a MyoD cauda (FIGURA 30), O resultado mostra que o antissoro não reconheceu nenhuma banda com o tamanho da MyoD no extrato de *T. brucei*, porém apresentou varias outras, de tamanhos diferentes, sendo que nenhuma delas aparentemente corresponde ao tamanho das bandas presentes no extrato de *T. cruzi*.

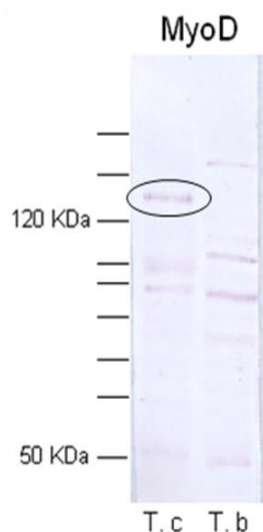


FIGURA 30 – WESTERN BLOT DEMONSTRANDO TESTE UTILIZANDO EXTRATO DE *Trypanosoma brucei*

NOTA: O círculo indica o tamanho correto da miosina

LEGENDA: T. c: Extrato de *Trypanosoma cruzi*; T. b: Extrato de *Trypanosoma brucei*

Estas miosinas são exclusivas de *T. cruzi*, não estando presente no genoma de *T. brucei*, o que poderia ter ocorrido era algum tipo de reação cruzada do antissoro com uma das duas miosinas presentes nesse parasita, a miosina de classe 1 e de classe 13. Porém nenhuma das bandas presentes no extrato de *T. brucei* correspondem ao tamanho dessas miosinas, que são 131,7 kDa para a miosina de classe 1 e 120,5 kDa para a miosina de classe 13. O que pode nos indicar talvez que essas bandas menores que aparecem nos ensaios de *western blot* com extrato de *T. cruzi* podem ser degradações ou clivagens da miosina de interesse, pois as bandas que aparecem no extrato de *T. brucei* apresentam um padrão diferente do encontrado no extrato de *T. cruzi*.

Depois de analisar os anticorpos produzidos contra as miosinas, os que achamos serem adequados para realização dos imunoenaios foram o antissoro produzido contra a MyoC cabeça, o antissoro produzido contra a MyoD cauda, o antissoro produzido contra a MyoE cauda após a purificação e o antissoro produzido contra a MyoF cabeça.

Ainda para avaliar esses soros, foi realizado *western* competitivo, onde a membrana de nitrocelulose contendo o extrato do parasita foi incubada com o anticorpo e com a proteína recombinante. Como a quantidade de proteína em solução é maior do que a quantidade de proteína presente no extrato espera-se que todo o anticorpo ligue-se a ela, não reagindo com a membrana que após a revelação do

ensaio deveria então estar branca (sem marcações de bandas, principalmente as correspondentes às miosinas de interesse). Na figura 31 é possível observar o resultado deste teste.

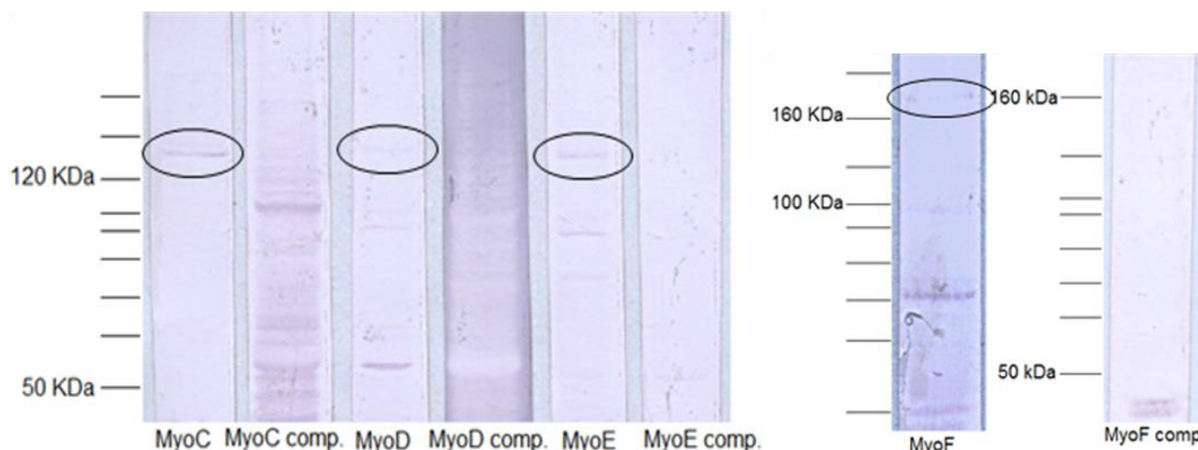


FIGURA 31 – MEMBRANA DE NITROCELULOSE DEMONSTRANDO TESTE DO *WESTERN* COMPETITIVO

NOTA: Os círculos indicam o tamanho correto das miosinas

No teste com a MyoE e com a MyoF não aparecem bandas na membrana que foi submetida a competição. Já para a MyoC aparecem várias outras bandas, porém não a do tamanho da miosina e para MyoD ocorreu queima da membrana, que aparece inteiramente roxa, mas os espaços onde deveriam estar as bandas que normalmente aparecem quando este soro é incubado com o extrato de *T. cruzi* apresentam-se aparentemente em branco.

4.8 LOCALIZAÇÃO CELULAR DAS MIOSINAS EM EPIMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi*

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

Foi inserida no vetor de expressão a seqüência inteira da miosina e também a seqüência da cauda. Esta última estratégia foi para tentarmos visualizar um efeito

dominante negativo, superexpressando uma proteína não funcional que pudesse minimizar a atividade da proteína nativa, acarretando em alguma mudança fenotípica na célula. Esta alteração de fenótipo ocorreria somente com a superexpressão da miosina, o que não ocorreu. Algumas expressaram as miosinas recombinantes em baixos níveis, que será demonstrado pelos testes de *western blot* realizados com os extratos dos parasitas transfectados. Todos os transfectantes que superexpressaram a cauda de miosina não apresentaram nenhuma alteração fenotípica.

O vetor de expressão em *T. cruzi* utilizado adiciona a etiqueta de GFP na região N-terminal da proteína, o que poderia atrapalhar a ligação das miosinas completas com a actina, que é realizada nessa região. Se isto ocorresse, o esperado era que a localização da cauda fosse a mesma localização da miosina inteira. Caso a localização da inteira e da cauda fossem diferentes, provavelmente poderíamos confiar na localização da inteira, que neste caso não estaria sendo atrapalhada pela etiqueta presente na região N-terminal da proteína.

Com exceção da seqüência da MyoE inteira e MyoA inteira todas as outras seqüências foram corretamente inseridas no vetor para transfecção, que foi confirmada por *toothpick* e PCR dos plasmídeos utilizando iniciadores específicos para cada seqüência. Mas algumas não expressaram, mesmo ocorrendo seleção do parasita através do uso do antibiótico específico (G418). Quando visualizado no microscópio não houve emissão de fluorescência ou houve uma marcação geral, um *background*, parecendo uma inespecificidade de localização. A tabela 9 demonstra a situação em relação às transfecções realizadas com o vetor pTcGFPN. Em vermelho estão os casos em que não foi possível visualização de fluorescência e/ou não viabilidade da cultura celular. E no caso da MyoE e MyoA, o vermelho significa que não conseguimos clonar estas seqüências no vetor desejado.

TABELA 9 – SITUAÇÃO DAS TRANSFECCÕES REALIZADAS COM O VETOR pTcGFPN

		pTcGFPN	Transfecção	Fluorescência
MyoA	CDS			
	cabeça			
	cauda			
MyoB	CDS			
	cabeça			
	cauda			
MyoC	CDS			
	cabeça			
	cauda			
MyoD	CDS			
	cabeça			
	cauda			
MyoE	CDS			
	cabeça			
	cauda			
MyoF	CDS			
	cabeça			
	cauda			
MyoG	CDS			
	cabeça			
	cauda			

Para confirmar se estava ou não ocorrendo a expressão das proteínas no parasita, optou-se por realizar um teste de *western blot* utilizando os soros específicos (quando disponível) e um anticorpo anti-GFP contra os extratos dos *T. cruzi* transfectados. Neste caso os soros específicos deveriam reconhecer a banda de aproximadamente o tamanho da miosina nativa, e também reconhecer uma banda com 30 kDa a mais que isto, que corresponde ao tamanho do GFP.

Ainda para localização celular foram realizados ensaios de imunolocalização somente para aquelas miosinas que possuíam um bom anticorpo.

4.8.1 Localização da MyoB

A expressão da MyoB foi confirmada com o uso do soro específico somente para o transfectante da miosina inteira, pois o soro disponível para este teste era anti-MyoB cabeça. Para o transfectante da cauda foi realizado somente *western blot* com

anti-GFP, por falta de anticorpos específicos que reconhecessem a região da cauda dessa miosina.

Foi possível visualizar as bandas esperadas no teste com os transfectantes expressando a miosina inteira: as duas no teste onde foi utilizado o soro específico, uma correspondente a proteína nativa e outra a proteína recombinante expressa pelo vetor pTcGFPN, e a banda correspondente a proteína recombinante quando utilizado o anti-GFP (FIGURA 32). No transfectante que expressava a cauda da miosina foi possível visualizar a banda correspondente a cauda recombinante quando utilizado o anti-GFP, mas muito fracamente (FIGURA 32), o que pode talvez justificar a baixa qualidade das imagens exibindo a fluorescência referente ao que seria a localização da cauda da MyoB.

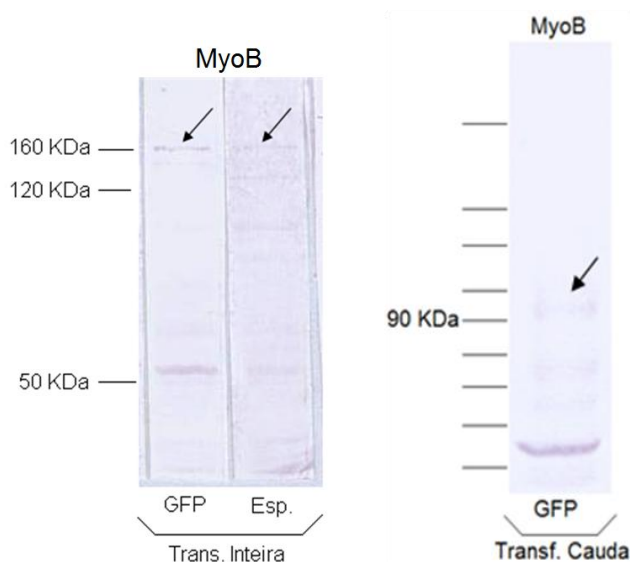


FIGURA 32 – WESTERN BLOT UTILIZANDO EXTRATO DE PARASITAS TRANSFECTADOS

NOTA: As setas indicam as bandas correspondentes à proteína recombinante

LEGENDA: **GFP:** Anticorpo anti-GFP produzido em coelho; **Esp.:** Soro específico anti-MyoB cabeça produzido em camundongo; **Transf. Inteira:** Extrato dos parasitas transfectados com a miosina inteira fusionada ao GFP; **Transf. Cauda:** Extrato dos parasitas transfectados com a cauda da miosina fusionada ao GFP

A figura 33 mostra o resultado da localização celular da miosina B inteira através da expressão da proteína fusionada à etiqueta de GFP. Nessa imagem pode-se observar que há uma distribuição da proteína por todo o corpo do parasita nas formas epimastigotas do *T. cruzi* (FIGURA 33 C, D). A figura 34 apresenta o resultado obtido utilizando parasitas transfectados com a construção contendo a cauda da MyoB fusionada ao GFP.

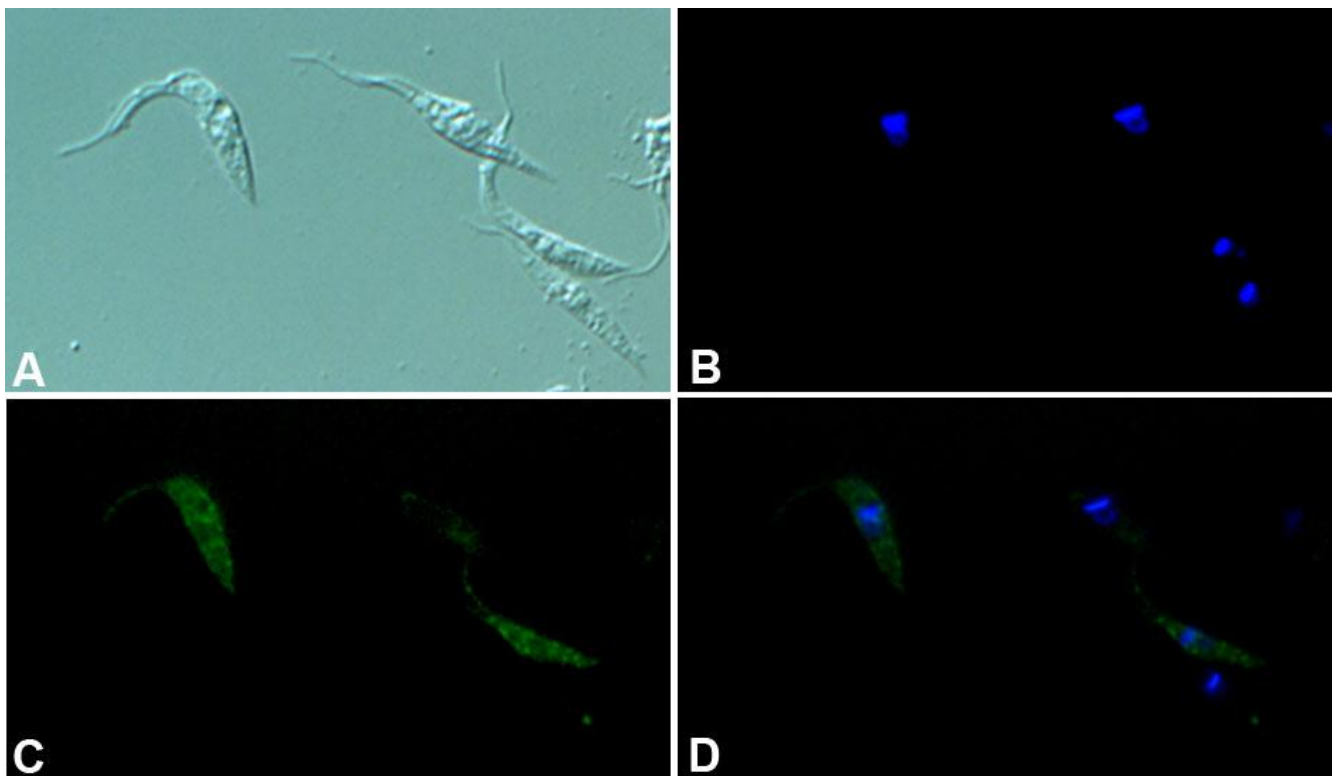


FIGURA 33 – LOCALIZAÇÃO DA MyoB INTEIRA EM EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi*
LEGENDA: **A**: Contraste interferencial diferencial (DIC); **B**: Diamidino-2-fenilindo (DAPI), marcando o núcleo e o cinetoplasto; **C**: Fluorescência, mostrando a localização de MyoB inteira; **D**: sobreposição das imagens B e C

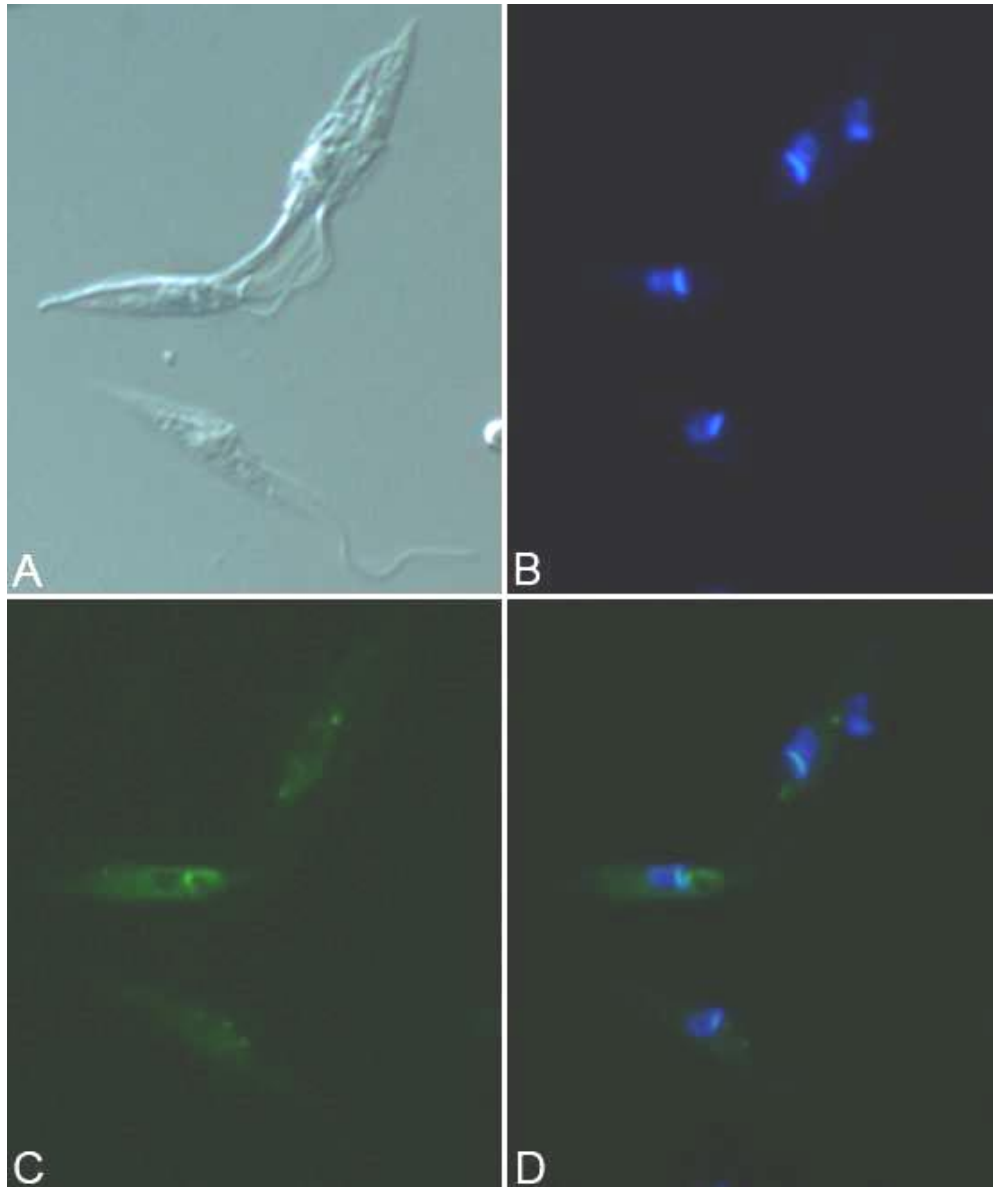


FIGURA 34 – LOCALIZAÇÃO DA CAUDA DA MyoB EM EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi*
LEGENDA: **A:** Contraste interferencial diferencial (DIC); **B:** Diamidino-2-fenilindo (DAPI), marcando o núcleo e o cinetoplasto; **C:** Fluorescência, mostrando a localização de MyoB cauda; **D:** sobreposição das imagens B e C

Devido à falta de um anticorpo que considerássemos de boa qualidade para esta miosina, não foram realizados ensaios de localização celular por imunofluorescência para MyoB.

4.8.2 Localização da MyoC

O mesmo teste foi realizado para os transfectantes da MyoC. Neste caso, o soro deveria reconhecer uma banda de aproximadamente 132,3 kDa, que seria o tamanho da miosina nativa, e também reconhecer uma banda com 30 kDa a mais, que corresponde ao tamanho da miosina fusionada ao GFP. No teste com o transfectante com a construção contendo a cauda fusionada ao GFP, a banda a ser reconhecida seria de aproximadamente 80 kDa, que corresponde ao tamanho da cauda (52,2 kDa) mais os 30 kDa do GFP.

Utilizamos para este teste, tanto extrato dos parasitas transfectados com a miosina inteira como extrato dos parasitas transfectados com a cauda da miosina, pois o soro que obtínhamos para este teste era anti-MyoC cauda. Estes foram submetidos à incubação com o soro específico, e também com anticorpo anti-GFP. Foi claramente possível visualizar a banda correspondente a proteína recombinante quando utilizado o soro específico, anti-MyoC cauda, nos dois tipos de extratos. Na figura 35 é possível notar a presença de uma banda de aproximadamente 160 kDa no extrato dos transfectantes da miosina completa, e também nota-se a presença de uma banda de aproximadamente 80 kDa no extrato dos transfectantes da cauda, quando utilizado soro específico para a miosina. Porém quando utilizado o anti-GFP uma fraca banda apareceu nos transfectantes da inteira e nos transfectantes da cauda, acreditamos que o anti-GFP utilizado neste teste não esteja com um bom reconhecimento.

A intensidade da banda da superexpressão da proteína recombinante prevaleceu em relação à banda correspondente ao tamanho da proteína nativa, e essa superexpressão pode justificar a ausência da banda nativa quando utilizado anticorpo específico, que estaria em muito menor quantidade do que a proteína recombinante, não sendo detectada no teste.

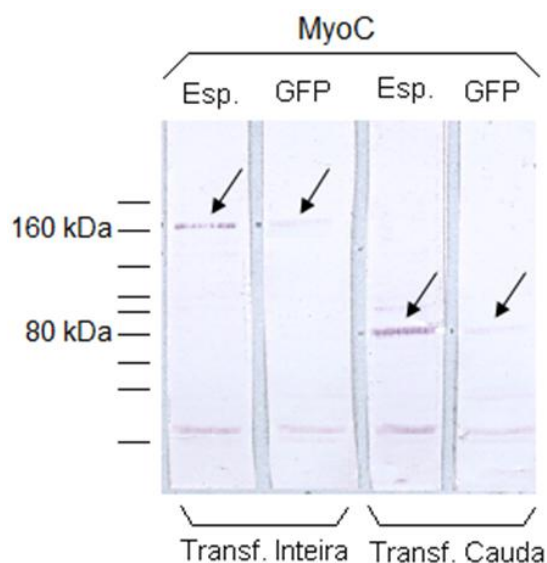


FIGURA 35 – WESTERN BLOT UTILIZANDO EXTRATO DE PARASITAS TRANSFECTADOS

NOTA: As setas indicam as bandas correspondentes à proteína recombinante

LEGENDA: **GFP:** Anticorpo anti-GFP produzido em coelho; **Esp.:** Soro específico anti-MyoC cauda produzido em camundongo; **Transf. Inteira:** Extrato dos parasitas transfectados com a miosina inteira fusionada ao GFP; **Transf. Cauda:** Extrato dos parasitas transfectados com a cauda da miosina fusionada ao GFP

Os parasitas transfectados com o a MyoC inteira e MyoC cauda foram visualizados no microscópio óptico de fluorescência e o resultado desta análise encontra-se na figura 36, onde está sendo demonstrado o resultado da localização celular da MyoC completa, e na figura 36, onde aparecem os resultados dos parasitas transfectados com a cauda da MyoC. Nessas imagens pode-se observar que há uma marcação mais forte que percorre o corpo celular de uma forma filamentar, presente com mais intensidade na região anterior do parasita (FIGURA 36 e 37 C, D).

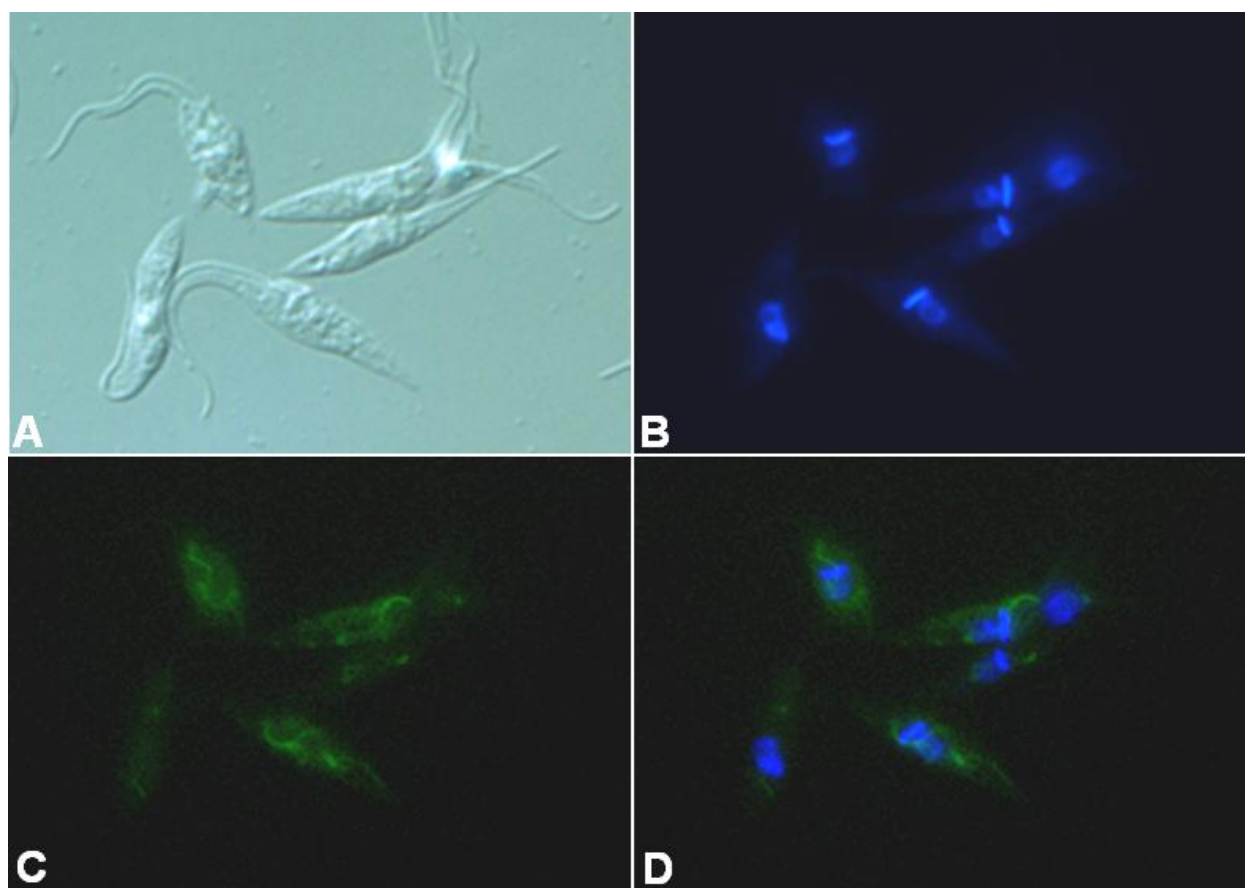


FIGURA 36 – LOCALIZAÇÃO DA MyoC INTEIRA EM EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi*

LEGENDA: **A:** Contraste interferencial diferencial (DIC); **B:** Diamidino-2-fenilindo (DAPI), marcando o núcleo e o cinetoplasto; **C:** Fluorescência, mostrando a localização de MyoC inteira; **D:** sobreposição das imagens B e C

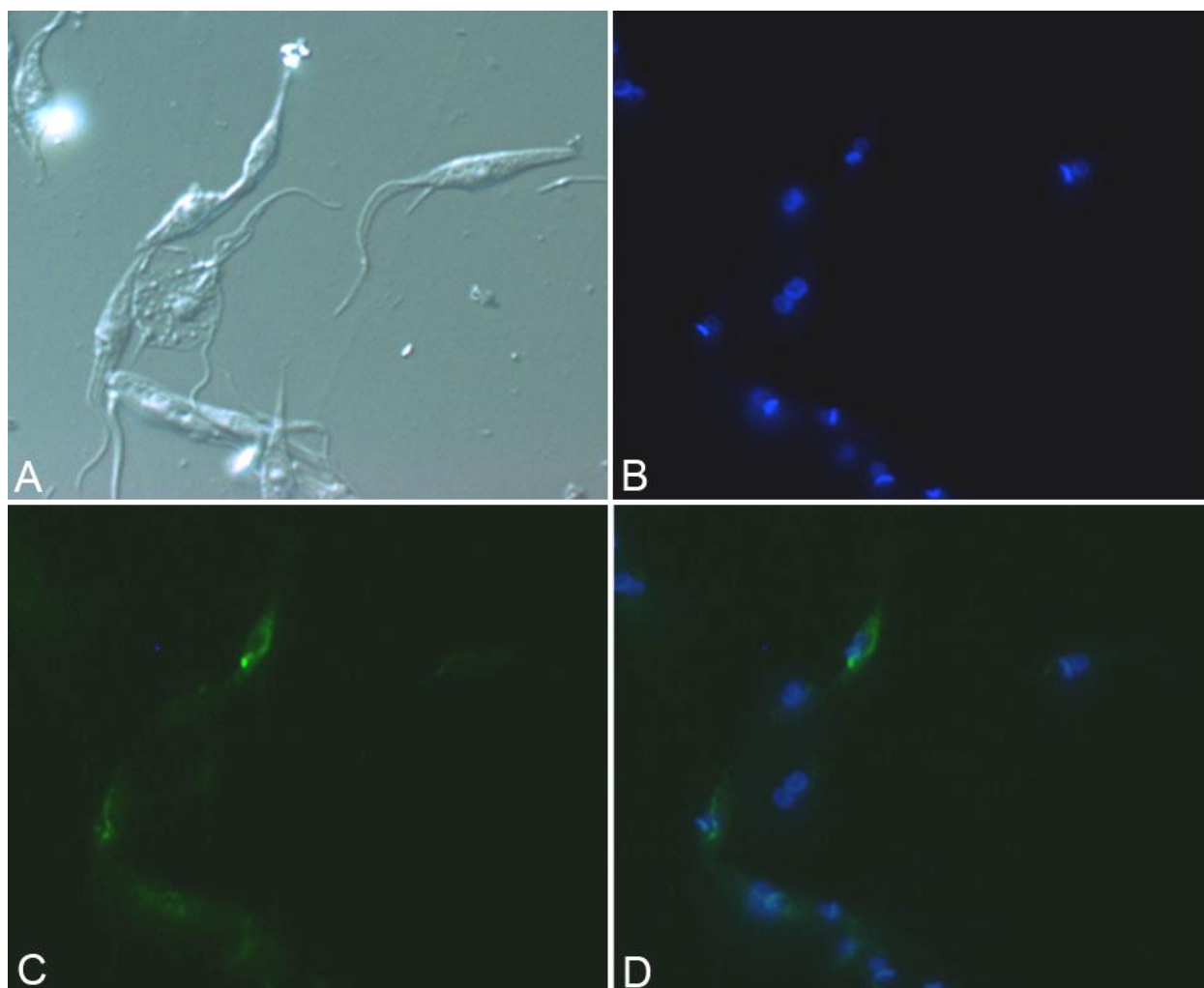


FIGURA 37 – LOCALIZAÇÃO DA CAUDA DA MyoC EM EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi*

LEGENDA: **A:** Contraste interferencial diferencial (DIC); **B:** Diamidino-2-fenilindo (DAPI), marcando o núcleo e o cinetoplasto; **C:** Fluorescência, mostrando a localização de MyoC cauda; **D:** sobreposição das imagens B e C

Foi realizado ensaio de localização celular por imunofluorescência para a MyoC, pois o soro obtido para esta proteína foi considerado de boa qualidade. O ensaio com o anticorpo pré-imune (soro retirado do camundongo antes das inoculações) também foi realizado, sendo que com este não se obteve marcação, como esperado.

O soro produzido contra a região da cabeça da MyoC foi utilizado nesses ensaios, por se mostrar mais específico do que o anti-MyoC cauda. A figura 38 mostra o resultado desse experimento.

Os resultados mostraram a localização da proteína na região anterior do parasita, entre o cinetoplasto e a base do flagelo em formas epimastigotas, compatível com a região que pode ser da bolsa flagelar.

4.8.3 Localização da MyoD

O teste de *western blot* com os transfectantes da MyoD inteira e cauda foi possível pois o soro que obtínhamos para este teste era anti-MyoD cauda. As membranas de *western* com os extratos dos parasitas transfectados foram submetidas à incubação com o soro específico, e também por anticorpo anti-GFP.

Foi possível visualizar a banda correspondente à proteína recombinante quando utilizado o soro específico anti-MyoD cauda somente no extrato dos transfectantes da cauda, onde aparece uma banda de aproximadamente 80 kDa, que corresponde ao tamanho da cauda mais os 30 kDa do GFP. Quando utilizado o anti-GFP não se observou a banda desejada nos transfectantes das inteiras e uma fraca banda apareceu nos transfectantes da cauda (FIGURA 39).

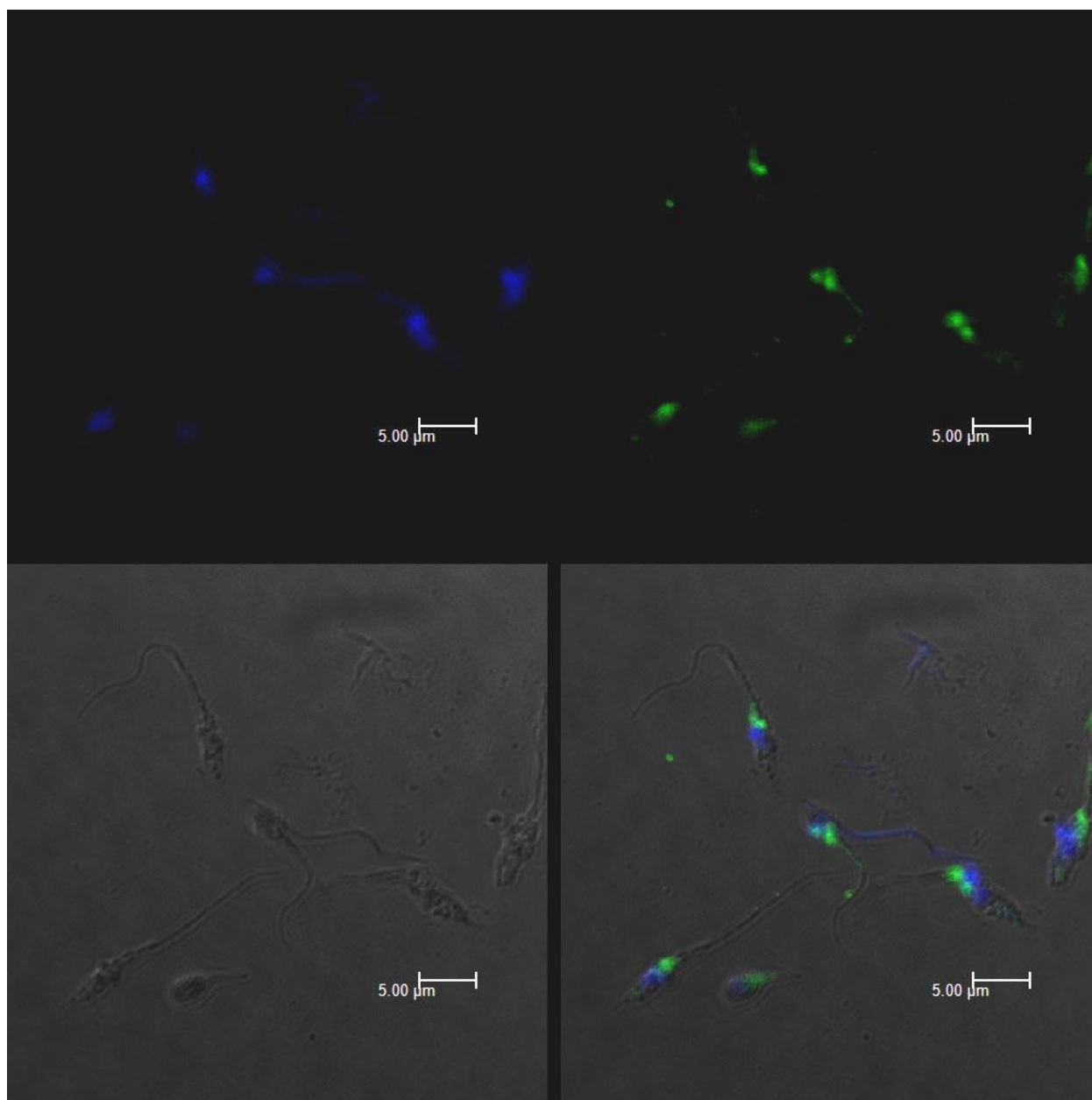


FIGURA 38 – LOCALIZAÇÃO DA MyoC EM EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi* OBTIDA POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

LEGENDA: **A:** Diamidino-2-fenilindo (DAPI), marcando o núcleo e o cinetoplasto; **B:** Detecção da MyoC usando um anticorpo secundário anti-mouse acoplado a AlexaFluor 488; **C:** Contraste interferencial diferencial (DIC); **D:** sobreposição das imagens A, B e C

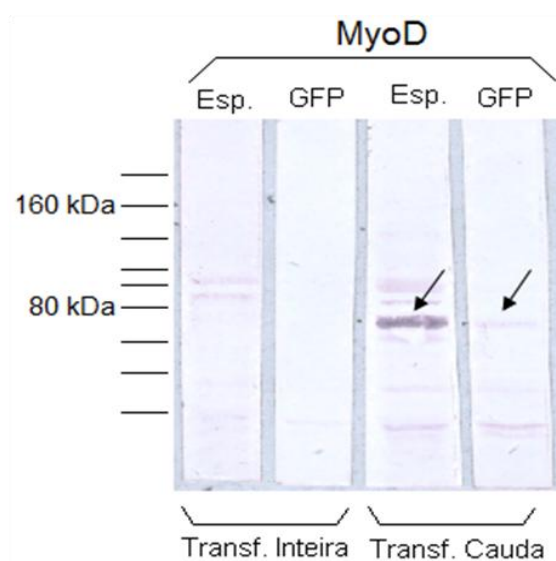


FIGURA 39 – WESTERN BLOT UTILIZANDO EXTRATO DE PARASITAS TRANSFECTADOS

NOTA: As setas indicam as bandas correspondentes à proteína recombinante

LEGENDA: **GFP:** Anticorpo anti-GFP produzido em coelho; **Esp.:** Soro específico anti-MyoD cauda produzido em camundongo; **Transf. Inteira:** Extrato dos parasitas transfectados com a miosina inteira fusionada ao GFP; **Transf. Cauda:** Extrato dos parasitas transfectados com a cauda da miosina fusionada ao GFP

As culturas dos transfectantes que estavam expressando a MyoD inteira cresceram normalmente. Ocorreu a seleção através do uso do antibiótico específico, o que nos levaria a acreditar que o plasmídeo estava presente no parasita e que a miosina recombinante estaria sendo expressa, porém segundo o resultado do *western blot* a proteína não foi expressa. A transfecção foi repetida, ocorreu o crescimento da cultura, mas a miosina não foi novamente expressa. O resultado apresentado, portanto, só demonstra a localização segundo a fluorescência de GFP para os parasitas transfectados com a construção da cauda da MyoD fusionada ao GFP (FIGURA 40).

As imunofluorescências da MyoD foram realizadas utilizando anti-MyoD cauda, e assim como nas imagens obtidas dos transfectantes, a marcação para esta miosina encontra-se dispersa de forma granular por todo o parasita (FIGURA 41). Isso poderia indicar que a fusão MyoD-GFP N-terminal não estaria atrapalhando a ligação com actina.

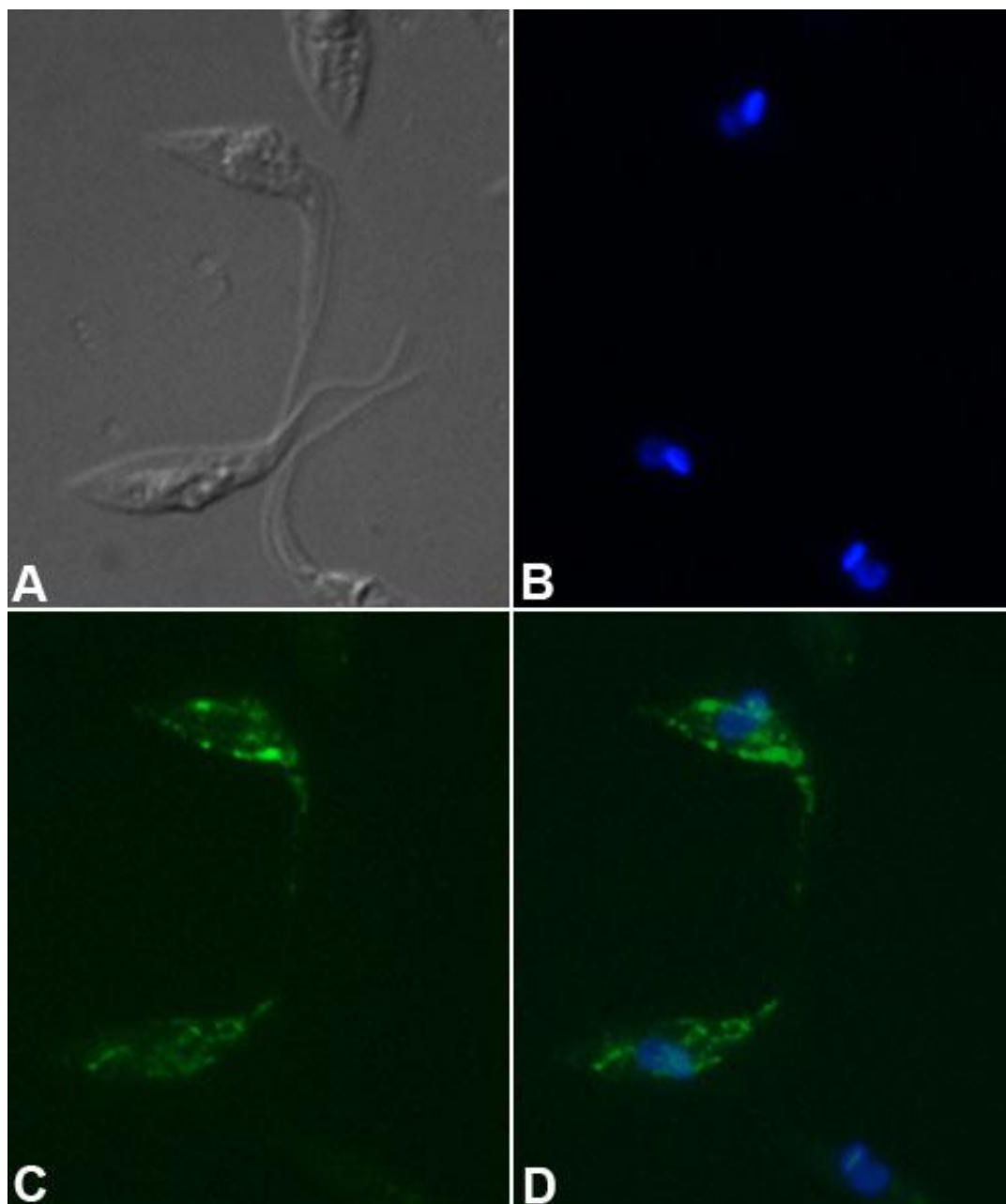


FIGURA 40 – LOCALIZAÇÃO DA CAUDA DA MyoD EM EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi*
LEGENDA: **A:** Contraste interferencial diferencial (DIC); **B:** Diamidino-2-fenilindo (DAPI), marcando o núcleo e o cinetoplasto; **C:** Fluorescência, mostrando a localização de MyoD cauda; **D:** sobreposição das imagens B e C

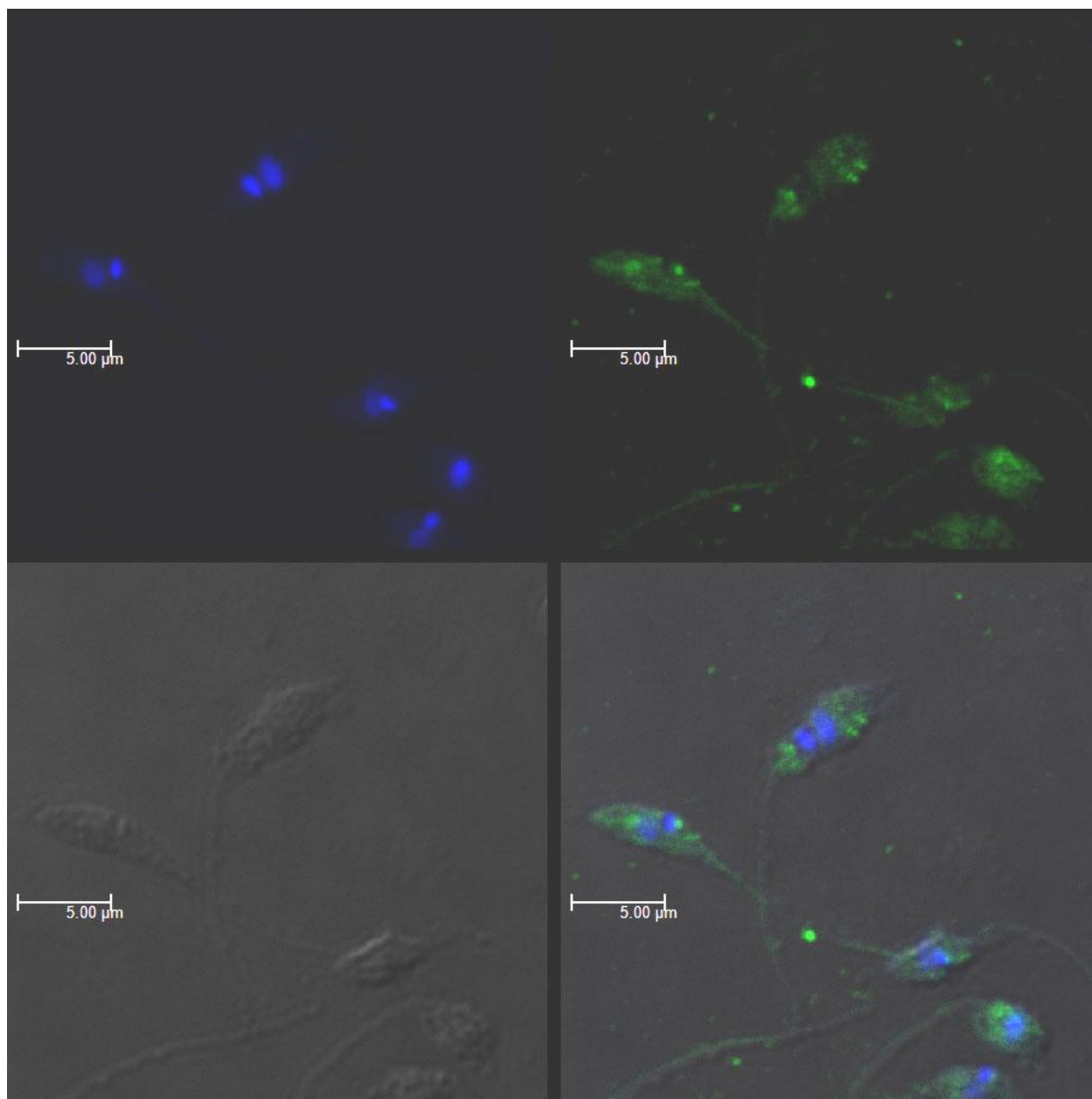


FIGURA 41 – LOCALIZAÇÃO DA MyoD EM EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi* OBTIDA POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

LEGENDA: **A:** Diamidino-2-fenilindo (DAPI), marcando o núcleo e o cinetoplasto; **B:** Detecção da MyoC usando um anticorpo secundário anti-mouse acoplado a AlexaFluor 488; **C:** Contraste interferencial diferencial (DIC); **D:** sobreposição das imagens A, B e C

4.8.4 Localização da MyoE

Assim como a MyoD, a seqüência da MyoE inteira fusionada ao GFP também não foi expressa. Como o soro purificado que obtínhamos dessa miosina era anti-cauda, foi possível realizar o *western blot* para confirmar a expressão da construção contendo a cauda da miosina fusionada ao GFP no parasita, ao mesmo tempo o teste confirmou a falta de expressão da miosina completa (FIGURA 42).

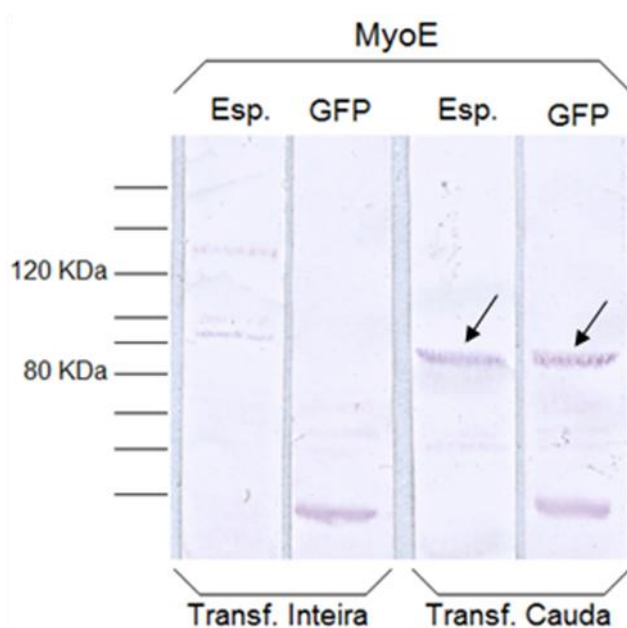


FIGURA 42 – WESTERN BLOT UTILIZANDO EXTRATO DE PARASITAS TRANSFECTADOS

NOTA: As setas indicam as bandas correspondentes à proteína recombinante

LEGENDA: **GFP:** Anticorpo anti-GFP produzido em coelho; **Esp.:** Soro específico anti-MyoE cauda produzido em camundongo; **Transf. Inteira:** Extrato dos parasitas transfectados com a miosina inteira fusionada ao GFP; **Transf. Cauda:** Extrato dos parasitas transfectados com a cauda da miosina fusionada ao GFP

A banda de aproximadamente 80 kDa confirma a superexpressão da cauda da MyoE e o resultado da fluorescência está apresentado na figura 43.

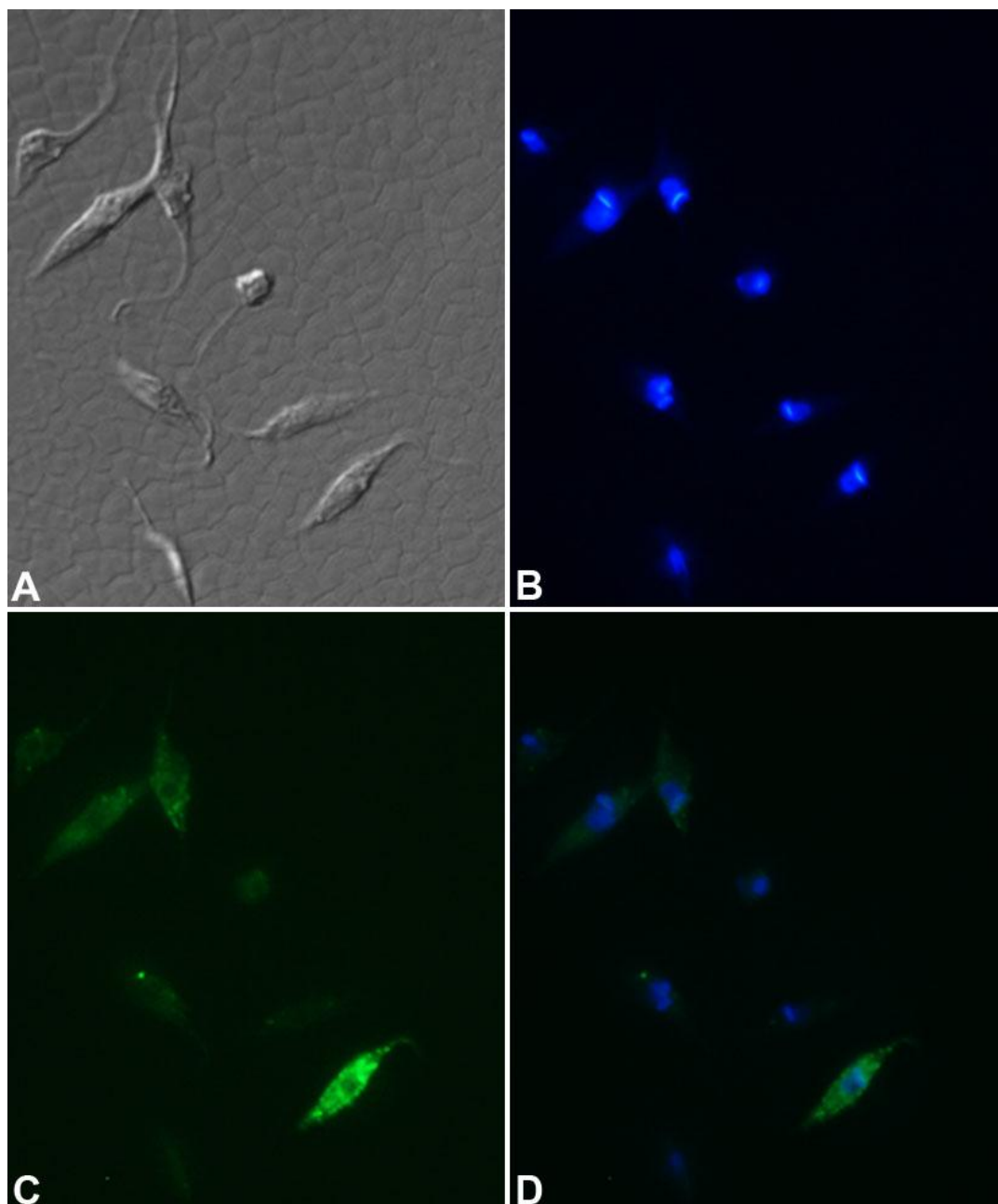


FIGURA 43 – LOCALIZAÇÃO DA CAUDA DA MyoE EM EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi*
LEGENDA: **A**: Contraste interferencial diferencial (DIC); **B**: Diamidino-2-fenilindo (DAPI), marcando o núcleo e o cinetoplasto; **C**: Fluorescência, mostrando a localização de MyoE cauda; **D**: sobreposição das imagens B e C

Novamente observamos uma marcação dispersa pelo citoplasma do parasita.

Os ensaios de imunofluorescência da MyoE foram realizados com o soro purificado produzido contra a região da cauda da MyoE. A marcação obtida nesse experimento difere fortemente do resultado obtido para os transfectantes, onde a fluorescência estava espalhada por todo o parasita. Quando realizado o ensaio com o anticorpo a localização ficou muito concentrada na região da base do flagelo (FIGURA 44).

4.8.5 Localização da MyoF

A expressão da MyoF inteira e cauda fusionadas ao GFP foi confirmada através do teste de *western blot* utilizando os extratos dos parasitas transfectados. O anticorpo disponível para MyoF era anti-cabeça, por isso a expressão da MyoF cauda somente foi confirmada utilizando-se anti-GFP. A MyoF é a maior miosina de *T. cruzi*. As bandas correspondentes as proteínas recombinantes, que seriam aproximadamente 168 kDa a inteira e 76 kDa a cauda mais os 30 kDa do GFP aparecem nos testes com os dois extratos, confirmando assim que houve a expressão (FIGURA 45). As imagens da fluorescência dos transfectantes podem ser visualizadas a seguir nas figuras 46 e 47, onde estão os resultados para MyoF inteira e cauda respectivamente.

A fluorescência da MyoF, tanto inteira como cauda se assemelha à fluorescência apresentada para MyoC, onde se observa uma marcação de uma forma filamentar pelo corpo celular.

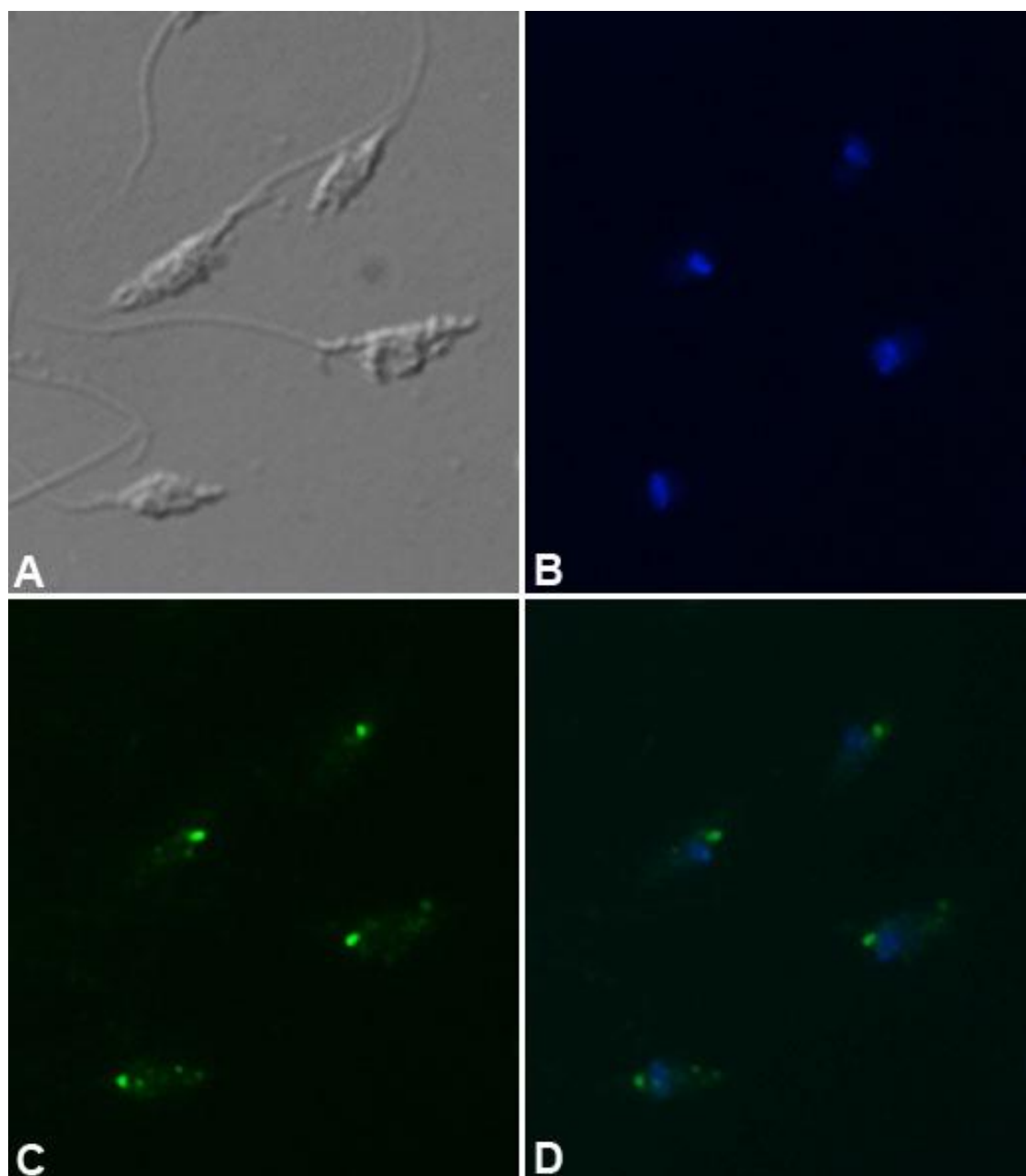


FIGURA 44 – LOCALIZAÇÃO DA MyoE EM EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi* OBTIDA POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

LEGENDA: **A:** Contraste interferencial diferencial (DIC); **B:** Diamidino-2-fenilindo (DAPI), marcando o núcleo e o cinetoplasto; **C:** Detecção da MyoE usando um anticorpo secundário anti-mouse acoplado a AlexaFluor 488; **D:** sobreposição das imagens B e C

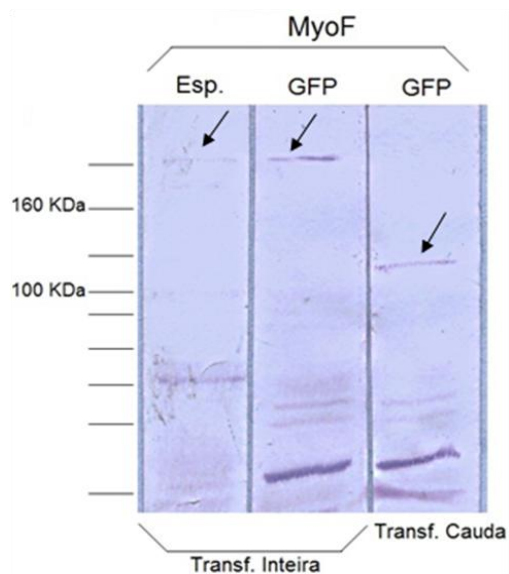


FIGURA 45 – WESTERN BLOT UTILIZANDO EXTRATO DE PARASITAS TRANSFECTADOS

NOTA: As setas indicam as bandas correspondentes à proteína recombinante

LEGENDA: **GFP:** Anticorpo anti-GFP produzido em coelho; **Esp.:** Soro específico anti-MyoF cabeça produzido em camundongo; **Transf. Inteira:** Extrato dos parasitas transfectados com a miosina inteira fusionada ao GFP; **Transf. Cauda:** Extrato dos parasitas transfectados com a cauda da miosina fusionada ao GFP

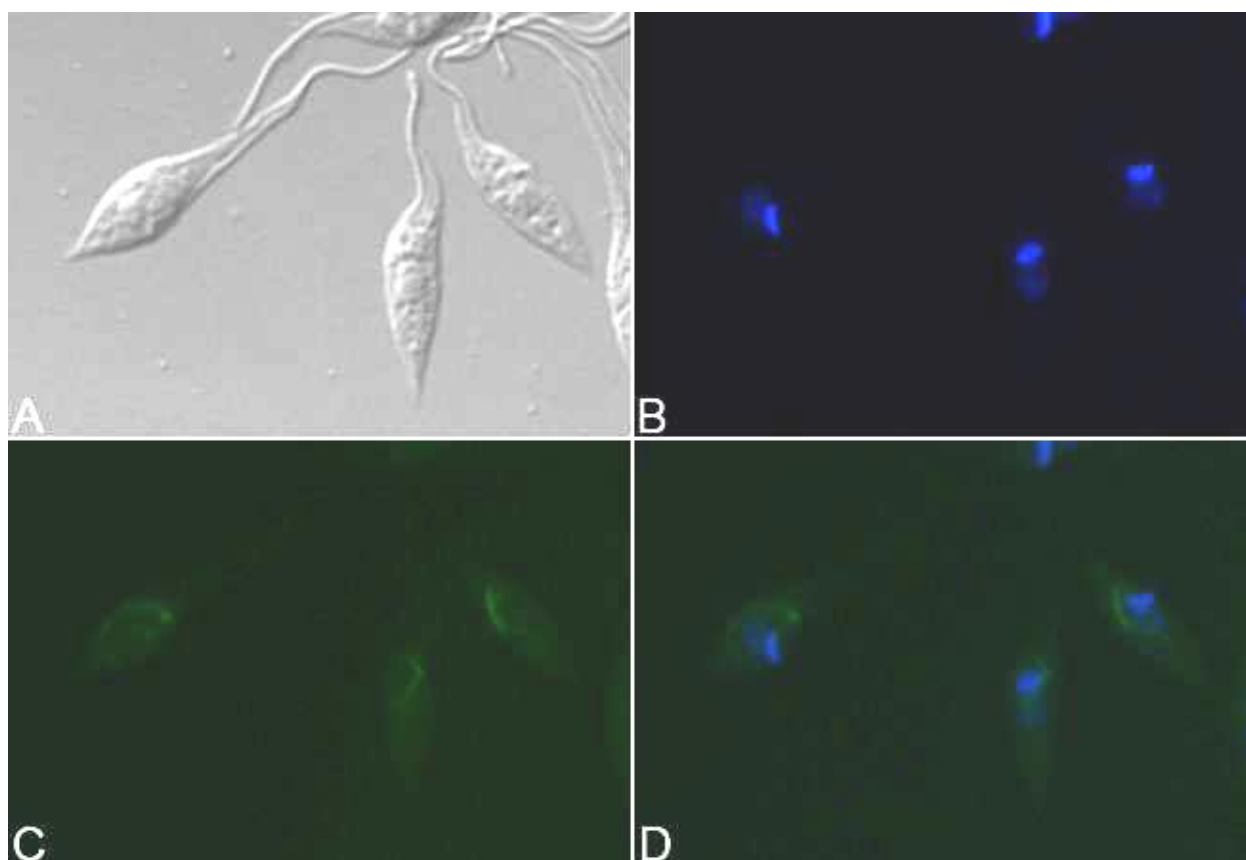


FIGURA 46 – LOCALIZAÇÃO DA MyoF INTEIRA EM EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi*

LEGENDA: **A:** Contraste interferencial diferencial (DIC); **B:** Diamidino-2-fenilindo (DAPI), marcando o núcleo e o cinetoplasto; **C:** Fluorescência, mostrando a localização de MyoF inteira; **D:** sobreposição das imagens B e C

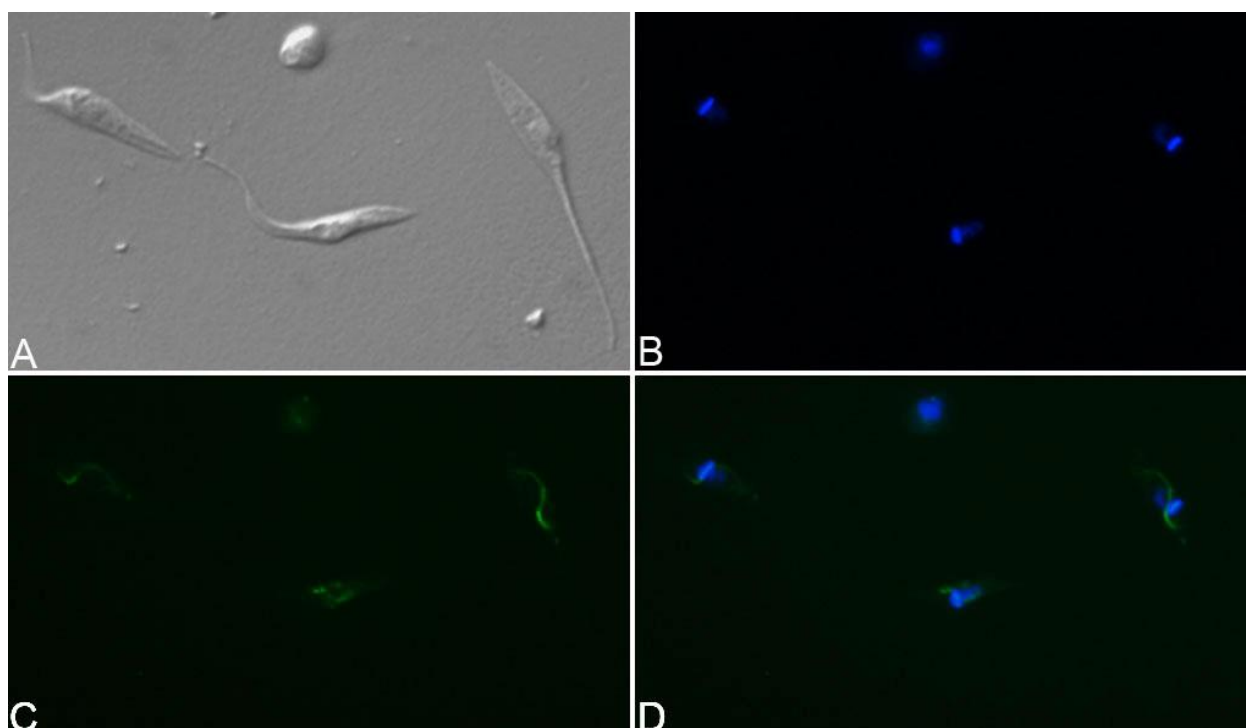


FIGURA 47 – LOCALIZAÇÃO DA CAUDA DA MyoF EM EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi*

LEGENDA: **A:** Contraste interferencial diferencial (DIC); **B:** Diamidino-2-fenilindo (DAPI), marcando o núcleo e o cinetoplasto; **C:** Fluorescência, mostrando a localização de MyoF cauda; **D:** sobreposição das imagens B e C

4.8.6 Localização da MyoG

Para a miosina G não foi realizado teste de *western blot* utilizando anticorpos específicos com os transfectantes, mas a confirmação da expressão foi realizada através da utilização do anti-GFP (FIGURA 48). As imagens da fluorescência dos transfectantes estão apresentadas nas figuras 49 e 50.

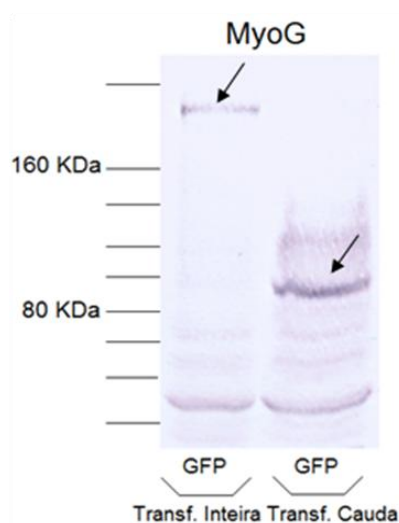


FIGURA 48 – *WESTERN BLOT* UTILIZANDO EXTRATO DE PARASITAS TRANSFECTADOS

NOTA: As setas indicam as bandas correspondentes à proteína recombinante

LEGENDA: **GFP:** Anticorpo anti-GFP produzido em coelho; **Transf. Inteira:** Extrato dos parasitas transfectados com a miosina inteira fusionada ao GFP; **Transf. Cauda:** Extrato dos parasitas transfectados com a cauda da miosina fusionada ao GFP

Como a maioria dos resultados, a MyoG, tanto inteira como cauda, apresentou uma marcação dispersa pelo citoplasma.

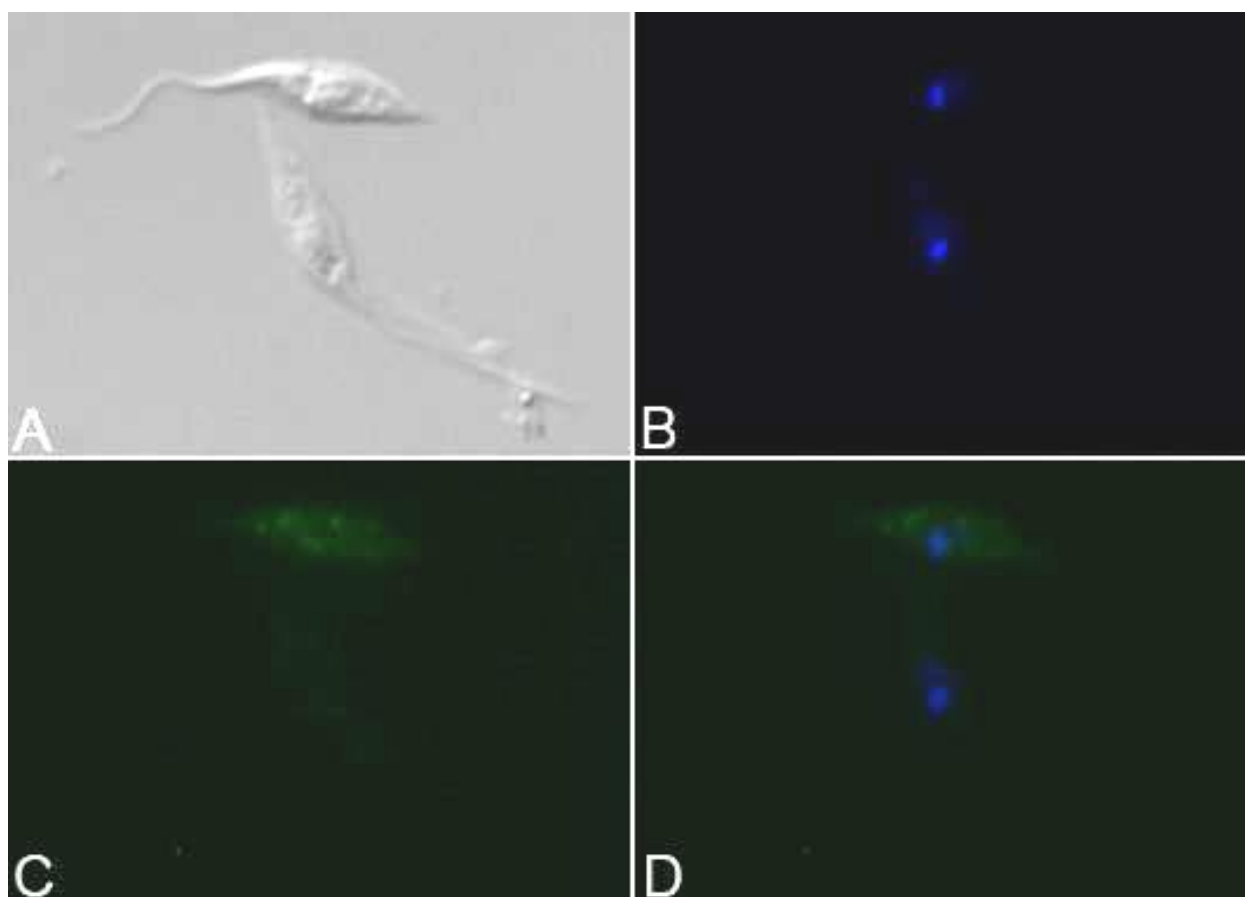


FIGURA 49 – LOCALIZAÇÃO DA MyoG INTEIRA EM EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi*

LEGENDA: **A:** Contraste interferencial diferencial (DIC); **B:** Diamidino-2-fenilindo (DAPI), marcando o núcleo e o cinetoplasto; **C:** Fluorescência, mostrando a localização de MyoG inteira; **D:** sobreposição das imagens B e C

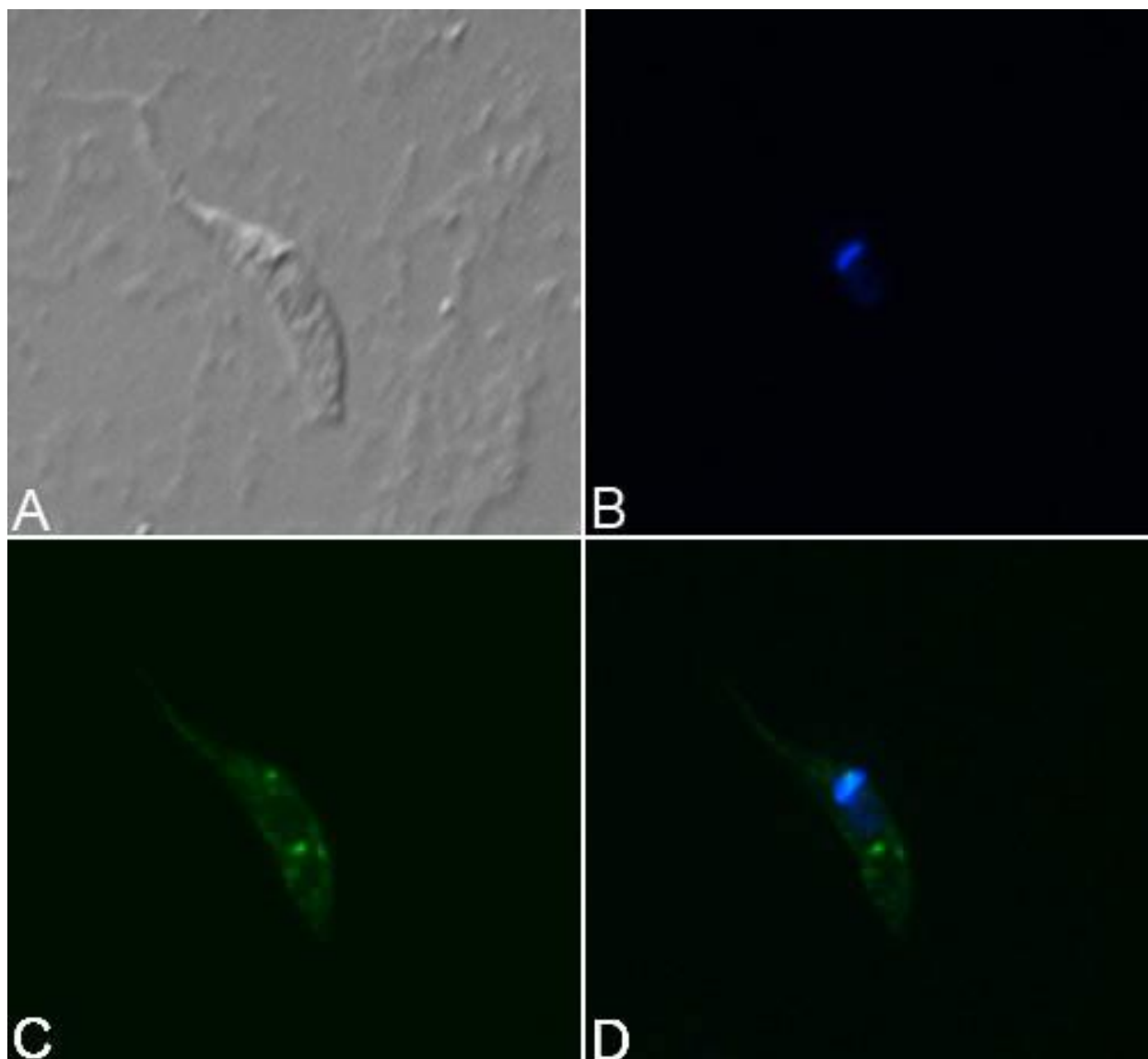


FIGURA 50 – LOCALIZAÇÃO DA CAUDA DA MyoG EM EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi*
LEGENDA: **A**: Contraste interferencial diferencial (DIC); **B**: Diamidino-2-fenilindo (DAPI), marcando o núcleo e o cinetoplasto; **C**: Fluorescência, mostrando a localização de MyoG cauda; **D**: sobreposição das imagens B e C

4.9 LOCALIZAÇÃO CELULAR DAS MIOSINAS EM TRIPOMASTIGOTAS METACÍCLICOS DE *Trypanosoma cruzi*

Dados os resultados dos anticorpos mais promissores, iniciamos uma avaliação melhor de algumas miosinas, MyoC, MyoD e MyoE, as quais possuem resultados de localização celular em epimastigotas por imunofluorescência. Foi realizado metaciclogênese dos parasitas transfectados destas miosinas a fim de verificarmos a localização celular dessas proteínas nas formas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi*, porém não conseguimos visualizar fluorescências nestas formas. Ensaio de imunofluorescência utilizando tripomastigotas metacíclicos selvagens também foram feitos, mas sem resultados conclusivos.

4.10 IDENTIFICAÇÃO DE COMPLEXOS

A fim de verificarmos complexos protéicos, algumas estratégias foram adotadas neste trabalho. Nossa primeira tentativa foi realizar ensaios de imunoprecipitação utilizando os anticorpos específicos para cada miosina. Nas primeiras tentativas, que consistiram na utilização de anti-MyoC, anti-MyoD e anti-MyoE, não conseguimos identificar a própria miosina alvo. O resultado desta análise não foi satisfatório, não conseguimos recuperar nenhum complexo e nem a miosina de interesse. Isto pode ter ocorrido devido à baixa qualidade do anticorpo ou ainda devido à baixa expressão dessas miosinas no parasita.

Como outra estratégia, transfectamos os parasitas com o vetor pTcPTP, que faria os parasitas expressarem a miosina fusionada a uma pequena etiqueta PTP, e neste caso o ensaio de imunoprecipitação utilizaria *beads* acopladas ao anticorpo contra proteína C, que é uma das proteínas presentes nesta etiqueta. Mas esta estratégia também não foi eficiente, o que aparentemente aconteceu foi a não expressão da miosina recombinante. Este teste foi realizado com a MyoC e MyoD. Após a precipitação, foi corrido um gel e corado com prata (pois esta coloração é mais

sensível e apresentaria bandas que a coloração por azul de coomassie poderia não mostrar (FIGURA 51).

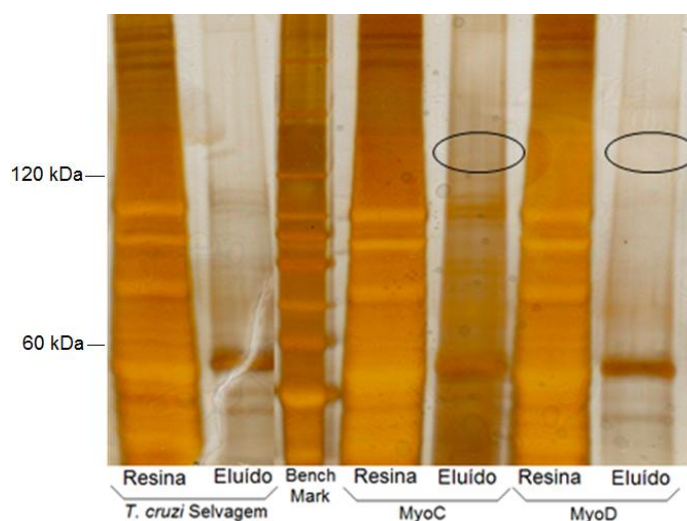


FIGURA 51 – GEL DA IMUNOPRECIPITAÇÃO REALIZADA COM OS PARASITAS TRANSFECTADOS COM O VETOR pTcPTP

NOTA: Matriz de SDS-*page* 8% corado com nitrato de prata. Os círculos indicam onde deveria estar as bandas correspondentes ao tamanho das miosinas

LEGENDA: **MyoC**: parasitas transfectados com a MyoC inteira no vetor pTcPTP; **MyoD**: parasitas transfectados com a MyoD inteira no vetor pTcPTP; **Resina**: extrato de proteínas não ligadas; **Eluído**: fração eluída

Foi realizado o ensaio com o parasita selvagem como um controle, quando visualizado o gel, esperávamos encontrar bandas com um diferente padrão de distribuição do encontrado na fração do eluído no controle, o que não ocorreu. Nestas frações deveria estar presente uma banda correspondente ao tamanho das miosinas e algumas outras bandas, que seriam as proteínas relacionadas a elas. Como pode-se observar no gel, essas bandas não apareceram, não foi possível recuperar nenhum complexo e nem mesmo a miosina recombinante apareceu (miosina fusionada à etiqueta PTP)

Nossa terceira técnica para tentarmos visualizar as interações protéicas das miosinas, foi utilizar anticorpo anti-GFP, tentando baixar os complexos dos transfectantes que estavam expressando a miosina fusionada ao GFP. Para tal, realizamos novas transfecções dos parasitas para preparo de extratos para os ensaios de imunoprecipitação. A grande maioria das culturas não foi selecionada, morrendo e não sendo possível o preparo dos extratos. E as que foram selecionadas não estavam expressando a miosina fusionada ao GFP, que foi confirmada por *western blot* utilizando anti-GFP, o qual não identificou a banda correspondente às miosinas recombinantes nesses extratos.

4.11 NOCAUTE GÊNICO

Para início do trabalho de nocaute foi realizado PCR para a amplificação das regiões a montante e a jusante do gene das miosinas. Obtivemos um ótimo resultado para as amplificações, tendo em vista que os oligonucleotídeos foram desenhados usando como base a seqüência da cepa CL Brener disponível nos bancos de dados, e o DNA genômico utilizado para estas amplificações foram da cepa Dm28c.

A figura 52 mostra o perfil eletroforético das amplificações realizadas para a região 5' e 3' de todas as miosinas órfãs.

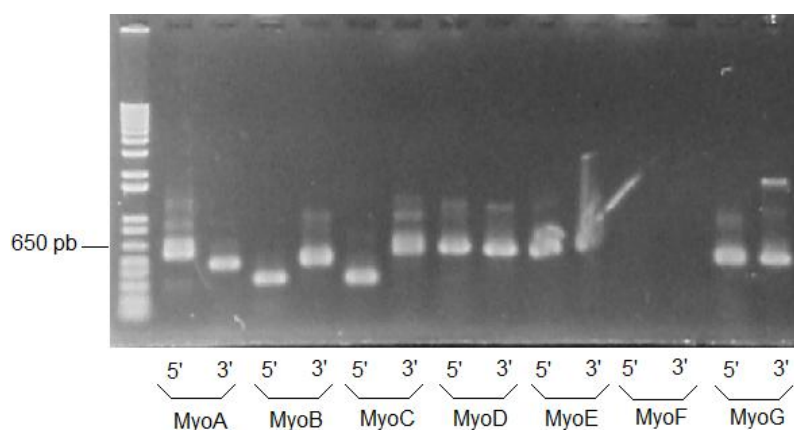


FIGURA 52 – GEL DE AGAROSE 1% MOSTRANDO AS AMPLIFICAÇÕES OBTIDAS PARA AS INTERGÊNICAS DAS MIOSINAS

Os cassetes de resistência à neomicina e à higromicina também foram amplificados com sucesso (FIGURA 53).

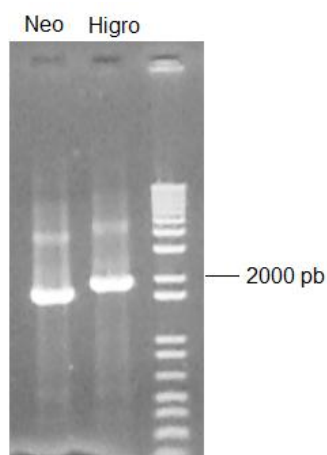


FIGURA 53 – GEL DE AGAROSE 0,8% MOSTRANDO AS AMPLIFICAÇÕES OBTIDAS PARA OS CASSETES DE RESISTÊNCIA

Para a PCR de fusão, onde ocorre a montagem do produto a ser transfectado no parasita para o nocaute, que consiste a região 5' do gene da miosina, mais a seqüência do cassete de resistência ao antibiótico (neomicina ou higromicina), mais a região a 3' da miosina, foram testadas várias condições. As principais foram a quantidade de DNA utilizado (PCRs purificadas), a quantidade de oligonucleotídeos e a temperatura. Na tabela 10 encontra-se os tamanhos em pares de base da região 5' e 3' de cada miosina, o tamanho do cassete de resistência (Neo e Higo) e o tamanho do cassete para a transfecção.

Após várias tentativas encontramos condições adequadas para a produção de um melhor produto para a transfecção, porém não conseguíamos reproduzir esses resultados quando alterávamos a enzima e também quando outra construção para outra miosina era realizada. A figura 54 mostra um dos testes realizados para tentar otimizar a PCR de fusão da MyoB, nesse caso a condição mais adequada ficou sendo a de número 7. A enzima utilizada para este teste foi a Platinum® Taq DNA polimerase *High Fidelity*.

TABELA 10 – TAMANHOS EM PARES DE BASE DA REGIÃO 5' E 3' DE CADA MIOSINA (1ª COLUNA) E TAMANHO DO CASSETE PARA A TRANSFECCÃO (2ª E 3ª COLUNA)

	5' + 3'	Neo 1650	Higo 1850
MyoA	497 + 433	2580	2780
MyoB	330 + 458	2438	2638
MyoC	292 + 524	2466	2666
MyoD	564 + 529	2743	2943
MyoE	482 + 532	2664	2864
MyoF	503 + 501	2654	2854
MyoG	523 + 494	2667	2867

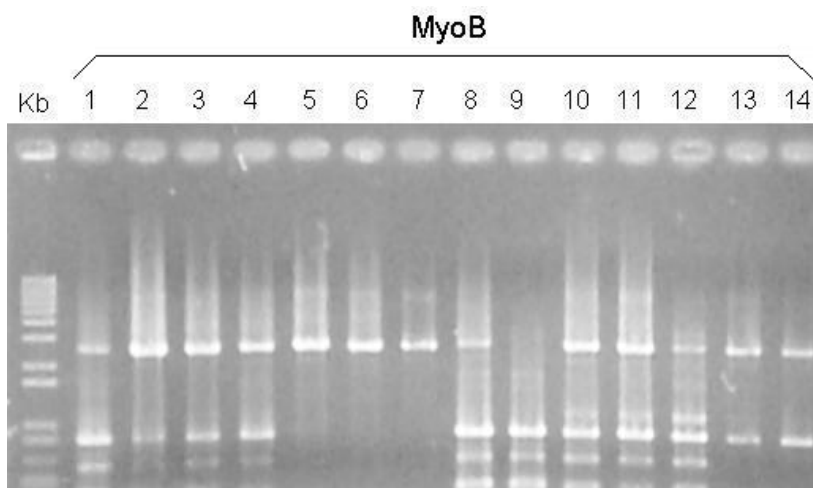


FIGURA 54 – GEL DE AGAROSE 0,8% MOSTRANDO AS VARIANTES TESTADAS PARA OTIMIZAR A PCR DE FUSÃO

LEGENDA: 1 a 7 → teste realizado a 55°C;

8 a 14: teste realizado a 60°C

1 → 5 pmol de oligo e 0,25 μ L de DNA
 2 → 2,5 pmol de oligo e 0,5 μ L de DNA
 3 → 2,5 pmol de oligo e 0,25 μ L de DNA
 4 → 2,5 pmol de oligo e 0,1 μ L de DNA
 5 → 1 pmol de oligo e 0,25 μ L de DNA
 6 → 1 pmol de oligo e 0,1 μ L de DNA
 7 → 0,5 pmol de oligo e 0,25 μ L de DNA

8 → 5 pmol de oligo e 0,5 μ L de DN A
 9 → 5 pmol de oligo e 0,25 μ L de DNA
 10 → 2,5 pmol de oligo e 0,5 μ L de DNA
 11 → 2,5 pmol de oligo e 0,25 μ L de DNA
 12 → 2,5 pmol de oligo e 0,1 μ L de DNA
 13 → 1 pmol de oligo e 0,25 μ L de DNA
 14 → 0,5 pmol de oligo e 0,25 μ L de DNA

Os testes posteriores foram inicialmente realizados para as miosinas C, D e E, e nosso foco foi em tentar realizar nocaute de pelo menos uma das três. Depois de inúmeras tentativas conseguimos realizar PCR de fusão para estas miosinas (FIGURA 55). A MyoC foi a que apresentou uma melhor amplificação.

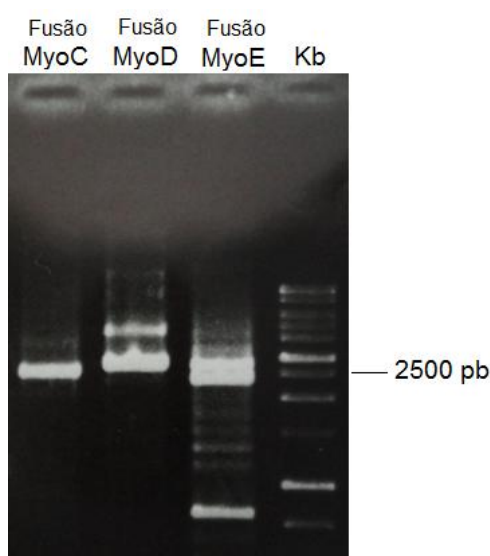


FIGURA 55 – GEL DE AGAROSE 0,8% MOSTRANDO A PCR DE FUSÃO DA MyoC, MyoD e MyoE

O teste da PCR de fusão da MyoE foi repetido com menor quantidade de iniciador e o resultado encontra-se na figura 56.

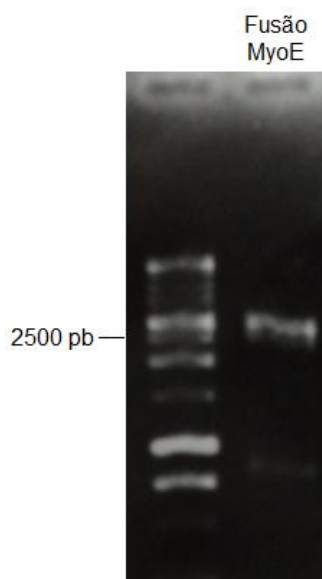


FIGURA 56 – GEL DE AGAROSE 0,8% MOSTRANDO A PCR DE FUSÃO DA MyoE COM MENOR QUANTIDADE DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES

Num primeiro momento tentamos realizar uma PCR de fusão em maior volume da MyoC, para obtermos quantidade suficiente para a transfecção, mas os resultados não foram satisfatórios. Decidimos então, realizar uma reação de PCR utilizando como DNA molde a própria PCR de fusão, fizemos uma PCR da PCR. No primeiro teste realizado em 25 μ L conseguimos com sucesso amplificar a seqüência da MyoC, MyoD e MyoE (FIGURA 57).

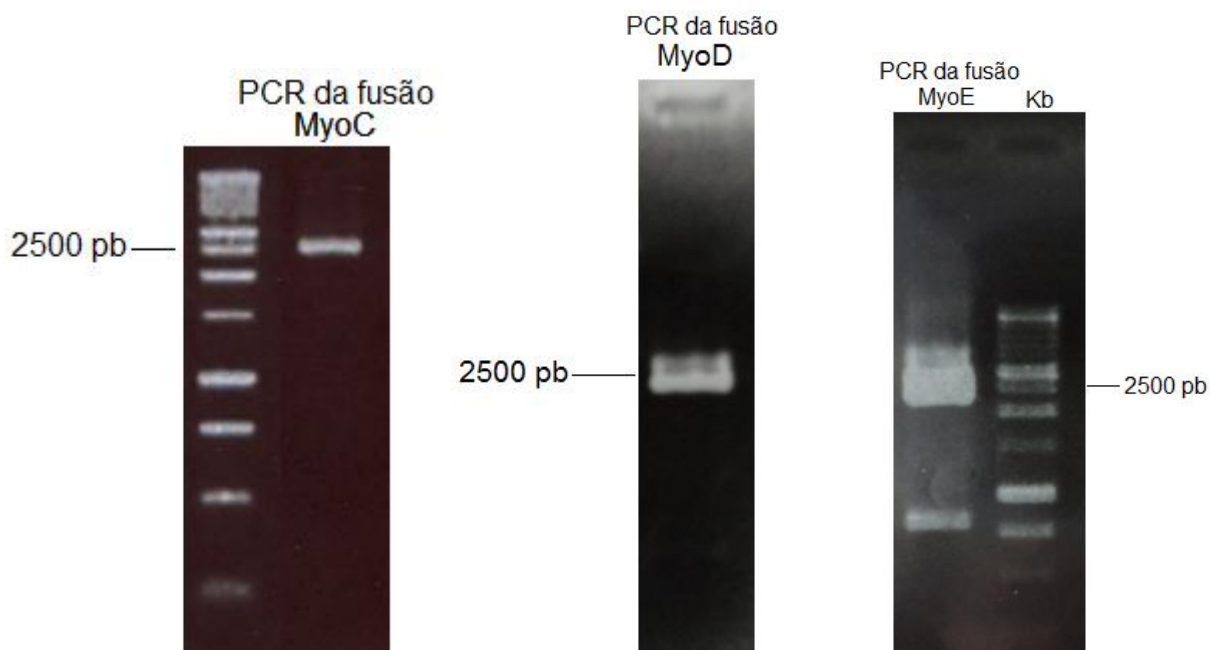


FIGURA 57 – GEL DE AGAROSE 0,8% MOSTRANDO A PCR DA PCR DE FUSÃO DA MyoC, MyoD e MyoE EM 25 μ L

As tentativas de repetir esse teste em maior volume, não apresentaram o resultado esperado. Como pode ser visualizada na figura 58, uma banda de menor tamanho aparece em menor quantidade que a banda correta para o teste com a MyoC. Para este teste foram feitas 10 reações de 100 μ L cada. Quando realizada a PCR da PCR de fusão em maior volume da miosina D e E não ocorreu amplificação.

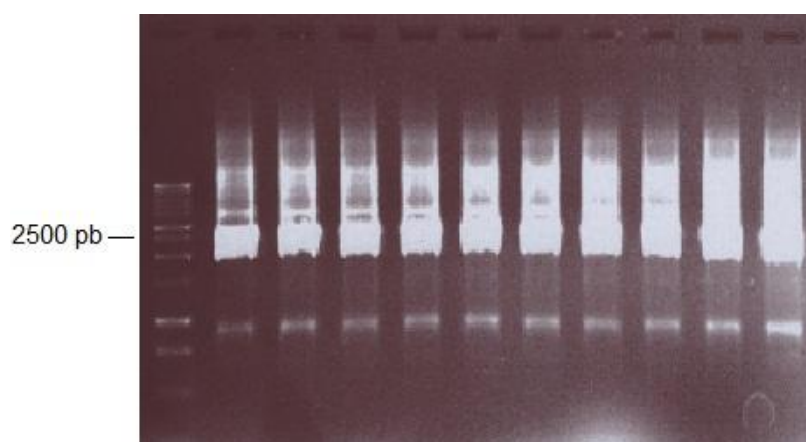


FIGURA 58 – GEL DE AGAROSE 0,8% MOSTRANDO A PCR DA PCR DE FUSÃO DA MyoC EM 1 mL

O que optou-se por fazer com as amplificações da MyoC foi concentrar essas amostras e realizar a transfecção desse material, já que essa banda menor permanece sempre que realizamos a PCR da fusão em maiores volumes.

Após a transfecção do cassete de resistência da neomicina, como tentativa de nocautear o primeiro alelo da MyoC, ocorreu a morte da cultura, não havendo seleção de parasitas positivos e não sendo possível continuidade do experimento. Esta transfecção será novamente repetida para confirmação da possível não viabilidade celular sem um dos alelos da MyoC em *T. cruzi*. O que pode ainda ter ocorrido é a não recombinação adequada do cassete de resistência, o que explicaria também a morte da cultura após a adição do antibiótico.

5 DISCUSSÃO

O *Trypanosoma cruzi* pertence a um grupo que divergiu muito cedo na linhagem eucariótica, apresentando diversas características únicas em relação a outros eucariotos, entre elas a presença de um citoesqueleto muito peculiar responsável pela manutenção da forma celular e na modulação dessa forma entre os diferentes estágios do ciclo de vida.

O citoesqueleto de actina controla processos celulares importantes como motilidade e citocinese, bem como interações célula-célula e célula-substrato. A montagem e organização espacial dos filamentos de actina são eventos dinâmicos regulados por um grande repertório de proteínas que se ligam à actina. As miosinas são proteínas motoras encontradas nas células eucarióticas que se ligam à actina e da qual são dependentes para exercer suas funções.

Baseado em uma análise filogenética, na qual foram avaliadas as variações na seqüência de aminoácidos e composições dos domínios, as miosinas estão classificadas em 35 classes em diferentes organismos (ODRONITZ e KOLLMAR, 2007; FOTH e cols., 2006). O genoma dos parasitas cinetoplastídeos, como *Trypanosoma* e *Leishmania* codificam, além da classe 1 de miosina, presente numa gama de organismos, uma classe de miosina que foi classificada como miosina 13, que não possui relações estruturais ou funcionais com miosinas presentes em outros organismos que possuam cílios ou flagelos (ODRONITZ e KOLLMAR, 2007; FOTH e cols., 2006).

T. cruzi, diferentemente de organismos relacionados como outras espécies dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*, possui ainda mais 7 miosinas, classificadas como miosinas órfãs, por não se agruparem em uma análise filogenética com nenhuma outra miosina descrita de nenhum organismo e nem entre elas (ODRONITZ e KOLLMAR, 2007).

Após a classificação destas miosinas como órfãs, outros genomas de tripanosomatídeos foram seqüenciados e uma análise em banco de dados como TriTrypDB e GeneDB confirmaram a ausência de ortólogos para as sete miosinas órfãs encontradas em *T. cruzi*.

Não há estudos referentes às miosinas de *T. cruzi*. Alguns trabalhos identificaram a localização celular e função da miosina 1, que é uma proteína comum a um grande número de organismos, em *T. brucei* (SPITZNAGEL e cols., 2010). Outros realizaram estudos com a miosina comum aos tripanossomatídeos, a miosina 13, em *Leishmania* (KATTA e cols, 2009; KATTA e cols, 2010). Porém em *T. cruzi* nenhum estudo foi realizado, nem com as miosinas 1 ou 13, nem com nenhuma das miosinas exclusivas de *T. cruzi*, o que torna este trabalho pioneiro nesta área.

5.1 ANTICORPOS

Com a finalidade de tentar elucidar um pouco o papel celular destas proteínas encontradas unicamente em *T. cruzi*, o presente trabalho se propôs num primeiro momento realizar imunoenaios para visualizar a localização celular e interações das miosinas, sendo para isto necessário a produção de anticorpos contra as miosinas em questão.

Na análise desses anticorpos, observamos um baixo reconhecimento de bandas que seriam correspondentes às miosinas. Primeiramente pensamos em uma má qualidade desses antissoros, mas com exceção dos que realmente não reconheceram nenhuma proteína nos extratos de *T. cruzi* mesmo após 6 imunizações nos animais, os demais quando testados contra os extratos dos parasitas transfectados com o vetor que expressaria a miosina fusionada ao GFP apresentaram um forte reconhecimento da proteína recombinante. O que nos leva a crer que na verdade a qualidade do soro não está ruim, e sim que essas miosinas são pouca expressas no parasita, pois quando elas são superexpressas há um bom reconhecimento pelos anticorpos, com exceção da MyoB que parece ter sido a única em que não houve uma expressão da proteína recombinante muito maior do que a proteína nativa.

Estudos de espectrometria de massas realizados por um grupo do nosso laboratório demonstraram em seus resultados apenas a presença da MyoF, dentre as miosinas órfãs, e da Myo13 (MARCHINI, em preparação). As demais miosinas não foram identificadas, o que pode indicar a baixa quantidade dessas proteínas nos

extratos do parasita e o que pode explicar o fraco reconhecimento das proteínas nativas pelos anticorpos.

5.2 LOCALIZAÇÃO CELULAR

Para identificar a localização celular destas miosinas no parasita, realizaram-se ensaios de imunofluorescência utilizando anticorpos que foram produzidos em camundongos e também transfecções do parasita com um vetor que expressou as miosinas fusionadas a uma etiqueta de GFP.

Encontramos algumas diferenças de localização quando comparado os experimentos utilizando anticorpos, com a localização apresentada pela proteína fusionada ao GFP. O vetor de expressão utilizado insere a etiqueta de GFP na região N-terminal da proteína. Essa região é sabidamente conhecida como a porção da miosina que liga à actina e essa diferença de localização pode se dar ao fato de que talvez a etiqueta de GFP, que possui aproximadamente 30 kDa, pode estar interferindo na correta localização destas miosinas, quando realizado a análise das imagens dos parasitas que foram transfectados com a miosina completa. Quando realizado transfecção para expressão da região da cauda das miosinas em *T. cruzi*, que não possui a região de ligação a actina, a localização apresentada foi provavelmente da possível carga que é transportada pela miosina, ou a localização pode ser totalmente inespecífica devido a grande quantidade da proteína não funcional (cauda de miosina) espalhada pela célula.

Um trabalho onde foi identificada a localização celular da Myo19 de humano através da fusão da proteína ao GFP mostrou que a etiqueta de GFP nesse caso não atrapalhou a correta localização da miosina. Neste trabalho eles realizaram a fusão do GFP na região N-terminal e C-terminal da miosina completa e da cauda da miosina, e na porção N-terminal do domínio motor. Com exceção da seqüência que estava expressando somente o domínio motor, todas as outras estratégias utilizadas apresentaram a Myo19 com uma localização mitocondrial (QUINTERO e cols., 2009). Se neste caso for a carga que está indicando a localização da miosina, esperaríamos

que talvez a construção com a etiqueta na porção C-terminal (da inteira e da cauda) atrapalhasse os resultados, o que não ocorreu.

Nos nossos ensaios de transfecção não foi encontrado diferença entre as localizações da miosina inteira e da região da cauda, para as miosinas as quais conseguimos a expressão de ambas as seqüências.

Considerando a possível interferência da etiqueta de GFP na localização das miosinas completas, podemos dizer que os ensaios de imunofluorescência, mesmo com baixos níveis de expressão das miosinas, sejam mais confiáveis quando ocorrer divergência de resultados entre as duas estratégias de visualização da localização celular. Primeiro porque a proteína nativa está sendo localizada. Segundo porque uma proteína recombinante fusionada ao GFP pode não ter um enovelamento correto ou a etiqueta adicionar um impedimento estérico de ligação a um alvo, seja ele a actina ou a carga, o que pode interferir na localização. E depois, a expressão de uma proteína recombinante que pode ocorrer em níveis maiores que a nativa pode fazer com que o fino equilíbrio de associação entre moléculas se corrompa, o que pode interferir na localização. De qualquer forma, apesar de todas estas características na expressão de uma proteína recombinante, ela ainda pode ser bastante informativa quando não se tem anticorpos específicos, e bastante útil se forem exploradas várias construções.

Os ensaios de imunofluorescência nos mostraram igual localização ao encontrado nos transfectantes somente para MyoD, forma granular dispersa por todo o corpo celular, tanto nos parasitas que expressavam a região da cauda da miosina fusionada ao GFP como quando utilizado anticorpos (a localização da miosina inteira fusionada ao GFP não foi realizada para MyoD). A localização da cauda pode estar indicando a localização da carga transportada pela MyoD, mas quando utilizado anticorpos a marcação apresenta a localização da miosina completa, portanto este padrão disperso pelo citoplasma da célula pode ser a correta localização para esta miosina.

O padrão de distribuição da fluorescência apresentado pelos parasitas transfectados com a MyoC (inteira e cauda) diferiram da localização da imunofluorescência. Nestes ensaios a marcação apresentou-se um pouco mais forte numa região que talvez possa ser a região do citóstomo, região que é conhecida por possuir atividade de endocitose.

A MyoC apresentou a fluorescência localizada numa região que parece estar entre o cinetoplasto e a bolsa flagelar quando realizado ensaios com anticorpos. Esta região é sabidamente conhecida como uma região ativa em atividades de endocitose e exocitose, e sabendo-se também que miosinas são proteínas motoras envolvidas entre outras funções no tráfego de vesículas, poderíamos inferir algum papel desta miosina no tráfego das vesículas oriundas da bolsa flagelar e/ou carregadas até ela para exportação.

Em *T. brucei* já foi demonstrado que a miosina 1 está relacionada à via endocítica nas formas sanguíneas (SPITZNAGEL e cols., 2010), visto que ensaios de *knock down* dessa miosina resultaram em uma significativa redução da atividade endocítica e eventual morte celular. Já o tráfego da rota secretora deve depender de outros fatores de organização, pois quando há uma redução da expressão da proteína actina, necessária para o funcionamento da miosina, na célula também há um retardo de crescimento e morte celular, mas a exportação de proteínas sintetizadas para a superfície celular não é alterada (NOLAN e GARCIA-SALCEDO, 2007).

A imunolocalização da MyoE, muito diferente do apresentado pelos transfectantes, nos quais a marcação está dispersa pelo citoplasma do parasita, apresentou uma localização muito concentrada na base do flagelo. Se considerarmos que a localização da imunofluorescência esteja correta, podemos talvez inferir que essa miosina esteja relacionada com alguma atividade celular importante como, por exemplo, a montagem do flagelo.

A miosina 13 de *L. donovani* está localizada na base flagelar, e esta localização é dependente do domínio da cauda da miosina. Quando realizados ensaios de localização através da fusão da proteína e seus domínios à etiqueta de GFP observou-se que a localização do domínio motor (cabeça) fusionado ao GFP na sua região C-terminal apresentava-se disperso pelo citoplasma, diferente do que o visualizado na localização da miosina inteira com fusão de GFP na porção C-terminal e região da cauda com fusão do GFP na região N-terminal, a qual encontrava-se na base do flagelo (KATTA e cols, 2009). Vários ensaios demonstraram que a miosina 13 de *L. donovani* está indiretamente envolvida na regulação do tamanho do flagelo. Diminuições dos níveis desta miosina no parasita prejudicam a montagem do flagelo e o tráfego intracelular, mas isto ocorre de uma maneira muito dependente da actina, pois quando foi realizado ensaios de nocaute para o gene da cofilina, que é uma

proteína que regula a dinâmica da actina, também há prejuízos na montagem do flagelo e no tráfego intracelular, mesmo com níveis normais de expressão da miosina. Isto indica, portanto, a importância não somente da presença da proteína miosina, mas sim da sua atividade de tráfego sobre os filamentos de actina (sistema actomiosina) (KATTA e cols, 2010).

Embora *T. cruzi* também possua a miosina 1 e a miosina 13 ortólogas das de *T. brucei* e *L. donovani*, que possam exercer essas mesmas funções descritas, este parasita possui ainda outras 7 miosinas exclusivas, e a aparente co-localização entre entre MyoC e Myo1 e entre MyoE e Myo13 podem sugerir que as 9 miosinas presentes no *T. cruzi* dividam as funções que as 2 miosinas (1 e 13) de *T. brucei* e *L. donovani* possuem. Não é, portanto uma surpresa que algumas miosinas órfãs de *T. cruzi* tenham as mesmas funções que as miosinas 1 e 13 de outros tripanossomatídeos, até mesmo porque as miosinas 1 e 13 de *T. cruzi* ainda não têm suas funções definidas.

Quanto aos ensaios de localização para visualização da proteína fusionada ao GFP das demais proteínas, podemos dizer que de um modo geral a localização apresentou-se dispersa pelo citoplasma para quase todas as miosinas, com exceção da MyoF (inteira e cauda), a qual teve sua localização muito similar à encontrada nos transfectantes da MyoC (inteira e cauda). Esta localização dispersa das miosinas B, D, G pode ser devido à interferência do GFP no domínio motor das miosinas, mas também pode ser a correta distribuição das proteínas. A MyoD que teve sua localização testada através da utilização de anticorpos mostrou igual localização à apresentada pelos transfectantes, o que pode indicar que a proteína recombinante está localizando corretamente e que esta localização dispersa seria real. O mesmo poderia estar acontecendo com as miosinas B e G, porém a falta de anticorpos não nos permite confirmar tal resultado.

5.3 VISUALIZAÇÃO DE COMPLEXOS

As miosinas são proteínas que desempenham diversas funções celulares, e estas funções estão associadas à ligação da cabeça da miosina ao filamento de actina e à ligação da região da cauda dessas proteínas a uma carga a ser transportada. As

caudas das miosinas têm como característica se ligarem a uma variedade de membranas, fazendo assim o transporte de organelas e vesículas (ADAMS e POLLARD, 1989). Algumas cargas transportadas pelas miosinas podem induzir dimerização da proteína (PHICHITH e cols., 2009). Exemplos de cargas transportadas por miosinas são: precursores de vesículas sinápticas, neurotransmissores e receptoras de fatores neurotróficos (HIROKAWA e cols, 2010). Algumas miosinas transportam ainda drogas como mesalazina/ácido 5-aminosalicílico /5-ASA, que é uma droga antiinflamatória utilizada em doenças como colite ulcerativa (KAUR e cols., 2010). Há evidências também da presença de miosina no núcleo das células e da associação da actina com todas as três RNA polimerases (Pol I, Pol II e Pol III) que juntamente com a miosina nuclear dirigem os processos de transcrição (YE e cols., 2008). Em leveduras as células filhas e células mães possuem identidades distintas; o RNA mensageiro e a proteína de Ash1 são encontrados somente no broto de crescimento, ficando restritos portanto apenas às células filhas. A miosina V de levedura é que é responsável por essa distribuição assimétrica do RNA mensageiro de Ash1 (ALBERTS, 2005; MADDEN e SNYDER, 1998).

Para visualização dos complexos protéicos formados pelas miosinas órfãs de *T. cruzi*, primeiramente tentamos realizar ensaios de imunoprecipitação utilizando os anticorpos produzidos em camundongos. Não conseguimos bons resultados nestes ensaios, não foi possível a identificação de proteínas que poderiam estar interagindo com as miosinas de interesse e nem a própria miosina foi detectada. Podemos talvez explicar nosso insucesso nestes resultados, baseado na baixa presença dessas miosinas nos extratos de proteínas do parasita. Outra estratégia utilizada foi clonar as seqüências das miosinas no vetor de expressão em *T. cruzi* que adicionaria a etiqueta PTP na região N-terminal da miosina. Quando realizamos a imunoprecipitação com extratos de transfectantes da MyoC e MyoD utilizando anti-proteína C, também não obtivemos bons resultados. Não houve a devida expressão da proteína recombinante, por motivos desconhecidos, porém passíveis de ocorrer.

Nossa última estratégia foi realizar imunoprecipitação utilizando anti-GFP dos parasitas que foram transfectados com a miosina completa ou com a cauda fusionada à etiqueta de GFP. Até o presente momento não foi possível a realização dos ensaios utilizando anticorpo anti-GFP, pois quando efetuamos uma nova transfecção dos parasitas para obtenção dos extratos que seriam utilizados para os ensaios de

imunoprecipitação, essas culturas não cresceram ou não expressaram a proteína recombinante.

5.4 SILENCIAMENTO GÊNICO OU NOCAUTE GÊNICO

Uma maneira para tentar elucidar a função de uma proteína é realizar a retirada da mesma da célula e analisar possíveis mudanças que poderiam ocorrer.

Uma estratégia muito utilizada em diversos organismos é a realização de RNA de interferência (RNAi), na qual há uma diminuição dos níveis de RNA mensageiro que são degradados, e conseqüentemente uma diminuição dos níveis da proteína em questão. Em *T. cruzi* não é possível realizar ensaios de RNAi, por falta de algumas proteínas necessárias nesta via de degradação dos RNA mensageiros. Devido a isso, outras técnicas são utilizadas para tentar interferir na função das proteínas ou para a não expressão das proteínas em *T. cruzi*.

Ensaio de dominante negativo vêm sendo utilizados como forma de tentar silenciar a função de proteínas. Nestes ensaios a célula é induzida a produzir uma proteína não funcional, que estando em maior quantidade do que a proteína nativa inibe a atividade desta. A superexpressão em uma célula da seqüência da cauda das proteínas miosinas atuaria como um dominante negativo, pois estas “seqüestrariam” toda a carga a ser transportada pela miosina em análise, inativando a atividade da proteína nativa. Bittins e cols. (2009) realizaram expressões de dominante negativo para a miosina 5 em neurônios e observaram que houve um aumento da atividade de exocitose de vesículas nestas células.

Neste trabalho foi realizada a expressão da seqüência da cauda das miosinas órfãs em *T. cruzi* como tentativa de realizar um dominante negativo. As caudas de miosinas que foram superexpressas foram as MyoC, MyoD, MyoE, MyoF e MyoG, confirmadas por ensaios de *western blot*, a MyoB aparentemente expressou a cauda da miosina, que também foi confirmado por *western blot*, mas a expressão não pareceu ser maior do que a expressão da proteína nativa. Em todos os casos em que houve a superexpressão da cauda não houve nenhuma alteração fenotípica nas células, e nem inviabilidade de crescimento que poderia ocorrer, por exemplo, pela

diminuição da atividade endocítica do parasita. O que pode ocorrer em *T. cruzi* é que devido a presença de 9 miosinas neste parasita, diferente do encontrado em *T. brucei* e *Leshmania*, possa haver redundância de funções.

O nocaute gênico é outra alternativa para a retirada a proteína da célula, excluindo o gene da proteína em questão conseqüentemente não havendo RNAm e nem a produção da proteína. Nós somente conseguimos realizar a transfecção no parasita para o nocaute gênico da MyoC, e houve morte da cultura celular após o provável nocaute de um dos alelos. Esta transfecção será repetida para confirmação da não viabilidade celular sem um dos alelos desta miosina, ou para verificarmos que não houve a recombinação adequada do cassete de resistência.

5.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conseguimos com este trabalho confirmar a presença das miosinas órfãs de *T. cruzi* no extrato de proteínas totais das formas epimastigotas do parasita e também identificar a localização celular de algumas miosinas utilizando anticorpos produzidos em camundongos e através da localização da proteína fusionada ao GFP.

Com as seqüências das miosinas (inteira, cabeça e cauda) devidamente inseridas na plataforma Gateway®, poderemos muito em breve realizar outras construções com o vetor de expressão em *T. cruzi*, fusionando, por exemplo, a etiqueta de GFP na região C-terminal da proteína, como forma de confirmar as localizações das proteínas para as quais não temos anticorpos.

De nossos objetivos iniciais ainda estamos trabalhando nos experimentos para a identificação de complexos e para a análise do fenótipo da célula que não possui a proteína (nocaute). A identificação das proteínas que interagem com cada miosina pode elucidar diversas questões que ainda não foram respondidas com o presente trabalho, como que tipo de vesícula, organela ou molécula pode estar sendo carregada por determinada miosina. E o nocaute gênico destas proteínas pode nos responder se estas desempenham um papel tão importante em *T. cruzi* quanto tem desempenhado outras miosinas em outros eucariotos, e o quanto as nove miosinas de *T. cruzi* têm funções redundantes.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados observados neste trabalho, foi possível concluir que:

- As miosinas órfãs de *T. cruzi* são realmente exclusivas deste organismo, não possuindo ortólogos em outros tripanossomatídeos;
- As regiões intergênicas das miosinas são muito semelhantes entre as cepas CL Brener e Dm28c;
- As miosinas B, C, D, E e F estão presentes nos extratos protéicos das formas epimastigotas de *T. cruzi*;
- A presença das miosinas A e G não pôde ser confirmada devido a falta de um anticorpo que reconhecesse estas proteínas nos extratos de *T. cruzi*;
- A expressão das miosinas órfãs de *T. cruzi* parece ocorrer em baixos níveis;
- A localização celular da MyoC está na região que pode corresponder entre o cinetoplasto e o flagelo, segundo análises utilizando anticorpos contra MyoC. E esta localização é semelhante à localização da Myo1 em *T. brucei*, sugerindo a participação desta miosina no transporte de vesículas oriundas da bolsa flagelar;
- A localização celular da MyoD apresenta-se de forma granular dispersa por todo o parasita, segundo análises utilizando anticorpos contra MyoD;
- A localização celular da MyoE está na região que pode corresponder à base flagelar, segundo análises utilizando anticorpos contra MyoE. E esta localização é semelhante à localização da Myo13 em *L. donovani*, sugerindo a participação desta miosina na montagem do flagelo;
- A localização das miosinas B, F e G ainda devem ser confirmadas com dados que corroborem os apresentados pelas imagens das proteínas fusionadas ao GFP;
- A proliferação e a diferenciação do *T. cruzi* não foram alteradas, quando houve a superexpressão da proteína não funcional das miosinas C, D, E, F e G;
- As funções das miosinas em *T. cruzi* podem ser redundantes, por isso talvez a ausência de alterações nos ensaios de dominante negativo.

7 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos nesta dissertação abrem algumas perspectivas:

- Realizar construções para expressar as miosinas inteiras e as cabeças em *T. cruzi* fusionadas ao GFP na porção C-terminal da proteína;
- Tratar células do parasita com latrunculina B – agente despolimerizador de filamentos de actina – e verificar se há alterações na localização das miosinas;
- Realizar imunofluorescência dos parasitas em outros estágios do ciclo de vida, com os antissoros contra a MyoC, MyoD e MyoE;
- Clonar as caudas no vetor pTcPTP e tentar obter os complexos através da imunoprecipitação realizada com o anticorpo anti-proteína C;
- Realizar imunoprecipitação utilizando os antissoros produzido contra a MyoC, MyoD e MyoE utilizando o extrato do transfectante que superexpressa a proteína, a fim de se obter e identificar proteínas que interagem com a miosina através de análise em espectrômetro de massas;
- Repetir a transfecção para nocaute gênico da MyoC;
- Construir os cassetes para nocaute para realizar as transfecção das demais miosinas;
- Realizar ensaios que comprovem a localização e função da MyoC e MyoE, como ensaios para visualização de endocitose, exocitose e transporte intracelular.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. J.; POLLARD, T.D. Binding of myosin I to membrane lipids. **Nature**, v. 17, p. 340(6234):565-8, 1989.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**, 4 ed. Porto Alegre: Artmed 2002.

BATISTA, M., *et al.* A high-throughput cloning system for reverse genetics in *Trypanosoma cruzi*. **BioMed Central Microbiology**, v. 10, n. 259, 2010.

BITTINS, C. M.; EICHLER, T. W.; GERDES, H. H. Expression of the dominant-negative tail of myosin Va enhances exocytosis of large dense core vesicles in neurons. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 29(4), p. 597-608, 2009.

BONALDO, M. C.; SOUTO-PADRON, T.; DE SOUZA, W.; GOLDENBERG, S. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. **Journal of Cell Biology**, v. 106, p. 1349-1358, 1988.

BREMS, S.; GUILBRIDE, D.L.; GUNDLESODJIR-PLANCK, D.; BUSOLD, C.; LUU, V.D.; SCHANNE, M.; HOHEISEL, J.; CLAYTON, C. The transcriptomes of *Trypanosoma brucei* Lister 427 and TREU927 bloodstream and procyclic trypomastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 139, p. 163-72, 2005.

CAMARGO, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*: I. Origin of metacyclic trypomastigotes in liquid media. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 6, p. 93-100, 1964.

CANÇADO, J.R. In: Brenner Z, Andrade AZ e Barral-Netto M (eds) **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**, 2a Ed. Guanabara Koogan SA, 2000.

CAVALIER-SMITH, T. Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. **Biology Letters**, v. 6, p. 342-345, 2010.

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.

CONTRERAS, V. T.; SALLES, J. M.; THOMAS, N.; MOREL, C. M.; GOLDENBERG, S. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 16, p. 315-27, 1985.

CONTRERAS, V. T.; ARAUJO-JORGE, T. C.; BONALDO, M. C.; THOMAS, N.; BARBOSA, H. S.; MEIRELLES, M. N. L.; GOLDENBERG, S. Biological aspects of the DM 28C clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, p. 123-133, 1988.

COURA, J.R. Origem, determinantes e morbidade da Doença de Chagas. **Salus**, v. 11, p. 62-66, 2007.

DESAI, A.; MITCHINSON, T. J. Microtubule polymerization dynamics. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 13, p. 83-117, 1997.

DE MELO, L. D. B.; SANT'ANNA, C.; REIS, S. A.; LOURENÇO, D.; DE SOUZA, W.; LOPES, U. G.; CUNHA-E-SILVA, N. L. Evolutionary conservation of actin-binding proteins in *Trypanosoma cruzi* and unusual subcellular localization of the actin homologue. **Parasitology**, v.135, p. 955-965, 2008.

DIAS, J.C.P. In: Brenner Z, Andrade AZ e Barral-Netto M (eds) ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***, 2a Ed. Guanabara Koogan SA, 2000.

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

DOCAMPO, R.; DE SOUZA, W.; MIRANDA, K.; ROHLOFF, P.; MORENO, S. N. Acidocalcisomes – conserved from bacteria to man. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 251-261, 2005.

EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BARTHOLOMEU, D. C.; NILSSON, D.; AGGARWAL, G.; TRAN, A. N.; GHEDIN, E.; WORTHEY, E. A.; DELCHER, A. L.; BLANDIN, G.; WESTENBERGER, S. J.; CALER, E.; CERQUEIRA, G. C.; BRANCHE, C.; HAAS, B.; ANUPAMA, A.; ARNER, E.; ASLUND, L.; ATTIPOE, P.; BONTEMPI, E.; BRINGAUD, F.; BURTON, P.; CADAG, E.; CAMPBELL, D. A.; CARRINGTON, M.; CRABTREE, J.; DARBAN, H.; DA SILVEIRA, J. F.; DE JONG, P.; EDWARDS, K.; ENGLUND, P. T.; FAZELINA, G.; FELDBLYUM, T.; FERELLA, M.; FRASCH, A. C.; GULL, K.; HORN, D.; HOU, L.; HUANG, Y.; KINDLUND, E.; KLINGBEIL, M.; KLUGE, S.; KOO, H.; LACERDA, D.; LEVIN, M. J.; LORENZI, H.; LOUIE, T.; MACHADO, C. R.; MCCULLOCH, R.; MCKENNA, A.; MIZUNO, Y.; MOTTRAM, J. C.; NELSON, S.; OCHAYA, S.; OSOEGAWA, K.; PAI, G.; PARSONS, M.; PENTONY, M.; PETTERSSON, U.; POP, M.; RAMIREZ, J. L.; RINTA, J.; ROBERTSON, L.; SALZBERG, S. L.; SANCHEZ, D. O.; SEYLER, A.; SHARMA, R.; SHETTY, J.; SIMPSON, A. J.; SISK, E.; TAMMI, M. T.; TARLETON, R.; TEIXEIRA, S.; VAN AKEN, S.; VOGT, C.; WARD, P. N.; WICKSTEAD, B.; WORTMAN, J.; WHITE, O.; FRASER, C. M.; STUART, K. D.; ANDERSSON, B. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi* etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 409-15, 2005.

ENGQVIST-GOLDSTEIN, A. E. Y.; DRUBIN, D. G. Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 19, p. 287-332, 2003.

FOTH, B. J.; GOEDECKE, M. C.; SOLDATI, D. New insights into myosin evolution and classification. **Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.**, v. 103, p. 3681-3686, 2006.

FURUKAWA, R.; FECHHEIMER, M. The structure, function, and assembly of actin filament bundles. **International Review of Cytology**, v. 175, p. 29-90, 1997.

GARCÍA-SALCEDO, J. A.; PÉREZ-MORGA, D.; GIJÓN, P.; DILBECK, V.; PAYS, E.; NOLAN, D. P. A differential role for actin during the life cycle of *Trypanosoma brucei*. **The EMBO Journal**, v. 23, p. 780-789, 2004.

GEEVES, M.A.; HOLMES, K. C. The molecular mechanism of muscle contraction. **Advances in Protein Chemistry**, v. 71, p. 161-193, 2005.

GOLDENBERG, S.; SALLES, J.M.; CONTRERAS, V.T.; LIMA FRANCO, M.P.; KATZIN, A.M.; COLLI, W.; MOREL, C.M. Characterization of messenger RNA from epimastigotes and metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **FEBS Letters**, v. 180(2), p. 265-70, 1985.

GOTTSCHALL, C. A. M. *Maior Descoberta Médica do Milênio (Passos Fundamentais para o Entendimento do Desempenho Cardíaco)*. Instituto de Cardiologia/Fundação Universitária de Cardiologia, – Porto Alegre, 1999.

GUIMARÃES, A.C. *Cardiopatia Crônica: Insuficiência cardíaca*. Em: **Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral**, Dias, J.C.P.; Coura, J.R. Rio de Janeiro: Fiocruz Editora, 1997.

GULL, K. The cytoskeleton of trypanosomatid. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 629-655, 1999.

HAMES, B. D.; RICKWOOD, D. **Gel Electrophoresis of Proteins**. 2a edição, 1990.

HANNAERT, V.; BRINGAUD, F.; OPPERDOES, F. R.; MICHELS, P. A. Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. **Kinetoplastid Biology**, v. 2(1), p. 11, 2003.

HARTLEY, J.L.; TEMPLE, G.F.; BRASCH, M.A. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. **Genome Research**, v. 10, p. 1788-1795, 2000.

HIROKAWA, N.; NIWA, S.; TANAKA, Y. Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. **Neuron**, v. 18, p. 610-38, 2010.

KATTA, S. S.; SAHASRABUDDHE, A. A.; GUPTA, C. M. Flagellar localization of a novel isoform of myosin, myosin XXI, in *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 164, p. 105-10, 2009.

KATTA, S. S.; TAMMANA, T. V.; SAHASRABUDDHE, A. A.; BAIPAI, V. K.; GUPTA, C. M. Trafficking activity of myosin XXI is required in assembly of *Leishmania* flagellum. **Journal of Cell Science**, v. 123, p. 2035-2044, 2010.

KAUR, H.; KUMAR, S.; KUKKAR, D.; KAUR, I.; SINGH, K.; BHARADWAJ, L. M. Transportation of drug-(polystyrene bead) conjugate by actomyosin motor system. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 6(3), p. 279-86, 2010.

KELLY, J. M.; WARD, H. M.; MILES, M. A.; KENDALL, G. A. shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. **Nucleic Acids Research**, v. 20(15), p. 3963-3969, 1992.

KOHL, L.; GULL, K. Molecular architecture of the trypanosome cytoskeleton. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 93, p. 1-9, 1998.

KOPITO, R.R. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. **Trends in Cell Biology**, v. 10(12), p. 524-30, 2000.

KRENDEL, M.; MOOSEKER, M. Myosins: Tails (and heads) of functional diversity. **Physiology**, v. 20, p. 239-251, 2005.

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

MADDEN, K.; SNYDER, M. Cell polarity and morphogenesis In budding yeast. **Annual Review of Microbiology**, v. 52, p. 687-744, 1998.

MAIR, G.; SHI, H.; LI, H.; DJIKENG, A.; AVILES, H.O.; BISHOP, J.R.; *et al.* A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. **RNA**, v. 2, p. 163-9, 2000.

MANFRED, S.; GÜNTHER, W. Molecular motors. **Nature**, v. 422, p. 17, 2003.

MEDINA-ACOSTA, E. & CROSS, G. A. Rapid isolation of DNA from trypanosomatids protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 59, p. 327-329, 1993.

MOLL, R. Cytokeratins in the histological diagnosis of malignant tumors. **International Journal of Biological Markers**, v. 9, p. 63-69, 1994.

NOLAN, D. P.; GARCIA-SALCEDO, J. A. Loss of actin does not affect export of newly synthesized proteins to the surface of *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 157, p. 233-235, 2007.

ODRONITZ, F.; KOLLMAR, M. Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2269 manually annotated myosins from 328 species. **Genome Biology**, v. 8, n. 9, p. 196, 2007.

PHICHITH, D.; TRAVAGLIA, M.; YANG, Z.; LIU, X.; ZONG, A. B.; SAFER, D.; SWEENEY, H. L. Cargo binding induces dimerization of myosin VI. **Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.**, v. 13, p. 17320-4, 2009.

POLLARDI, T. D.; KORN, E. D. Acanthamoeba Myosin I. Isolation from acanthamoeba castellanii of an enzyme similar to muscle myosin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 248, n. 13, p. 4682-4690, 1973.

PORTO-CARREIRO, I.; ATTIAS, M.; MIRANDA, K.; DE SOUZA, W.; CUNHA-E-SILVA, N. *Trypanosoma cruzi* epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes. **European Journal of Cell Biology**, v. 79, p. 858-869, 2000.

PUIG, O.; CASPARY, F.; RIGAUT, G.; RUTZ, B.; BOUVERET, E.; BRAGADONILSSON, E.; WILM, M.; SÉRAPHIN, B. The Tandem Affinity Purification (TAP) Method: A General Procedure of Protein Complex Purification. **Methods**, v. 24, p. 218-229, 2002.

PUIGBÓ, J.J.; ACQUATELLA, H.; GIORDANO, H.; SUÁREZ, C. Analisis de los factores de riesgo em la cardiopatia chagássica crónica. Em: Actualizaciones **en la Enfermedad de Chagas**, Madoery, R., Madoery, C., Cámara, M. L. (orgs.). Buenos Aires, Congresso Nacional de Medicina, pp 57-78, 1993.

QUINTERO, O. A.; DiVITO, M. M.; ADIKES, R. C.; KORTAN, M. B.; CASE, L. B.; LIER, A. J.; PANARETOS, N. S.; SLATER, S. Q.; RENGARAJAN, M.; FELIU, M.; CHENEY, R. E. Human Myo19 Is a Novel Myosin that Associates with Mitochondria. **Current Biology**, v. 19(23), p. 2008-2013, 2009.

RIGAUT, G.; SHEVCHENKO, A.; RUTZ, B.; WILM, M.; MANN, M.; SÉRAPHIN, B. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. **Nature Biotechnology**, v. 17, p. 1030-1032, 1999.

RUDOLPH, R.; LILIE, H. In vitro folding of inclusion body proteins. **FASEB Journal**, v. 10(1), p. 49-56, 1996.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: A laboratory manual. **Cold Spring Harbor**, N.Y, USA. 1989.

SHLOMAI, J. Assembly of kinetoplast DNA. **Parasitology Today**, v. 10, 341-346, 1994.

SOARES, M.J. The reservosome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: an organelle of the endocytic pathway with a role on metacyclogenesis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94(1), p. 139-141, 1999.

SOARES, M.J.; SOUTO-PADRÓN, T; DE SOUZA, W. Identification of a large prelysosomal compartment in the pathogenic protozoon *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Cell Science**, v. 102(1), p. 157-167, 1992.

SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current Pharmaceutical**, v. 8(4), p. 269-85, 2002.

SOUZA, W. Electron microscopy of trypanosomes - A historical view. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103(4), p. 313-25, 2008.

SOUZA, W. de O Parasito e sua Interação com os Hospedeiros. In: Brenner Z, Andrade AZ e Barral-Netto M (eds) ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***, 2a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA, 2000.

SPITZNAGEL, D.; O'ROURKE, J. F.; LEDDY N.; HANRAHAN, O.; NOLAN, D. P. Identification and Characterization of an Unusual Class I Myosin Involved in Vesicle Traffic in *Trypanosoma brucei*. **Plos One**, v. 5, n. 8, p. 12282, 2010.

TAO, LI.; SCHOLEY, J. M. Purification and assay of mitotic motors. **Methods**, 10.1016/j.ymeth, 2010.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, v. 76, p. 4350, 1979.

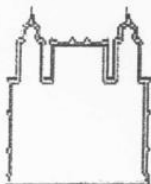
VAN-DEN-HURK, R.; DIJKSTRA, G.; VAN-MIL, F. N.; HUISHOF, S. C.; VAN-DEN-INGH, T. S. Distribution of the intermediate filament proteins vimentin, keratin, and desmin in the bovine ovary. **Molecular Reproduction and Development**, v. 41, p. 459-467, 1995.

WILKINSON, S. R.; KELLY, J. M. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 11, e31, 2009.

WOOLNER, S.; BEMENT, W. M. Unconventional myosins acting unconventionally. **Trends in Cell Biology**, v. 19, n. 6, p. 245-252, 2009.

YE, J.; ZHAO, J.; HOFFMANN-ROHRER, U.; GRUMMT, I. Nuclear myosin I acts in concert with polymeric actin to drive RNA polymerase I transcription. **Genes and Development**, v. 1;22(3), p. 322, 2008.

ANEXO



MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA-FIOCRUZ

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo intitulado :

" *Caracterização de proteínas de Trypanosoma cruzi.* "

número P-434/07, proposto por Marco Aurélio Krieger, foi licenciado pelo
Nº L-005/09.

Sua licença de Nº L-005/09 autoriza o uso anual de :

- *200 Mus musculus*

Esse protocolo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - FIOCRUZ). Na presente formatação, este projeto está licenciado e tem validade até 21 de janeiro de 2013.

Rio de Janeiro, 21/01/2009 .

Dra. Norma Vollmer Labarthe
Coordenadora da CEUA
FIOCRUZ