

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SHARON DE TOLEDO MARTINS

CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS *TIA-LIKE* EM *Trypanosoma cruzi*

**CURITIBA
2009**

SHARON DE TOLEDO MARTINS

CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS *TIA-LIKE* EM *Trypanosoma cruzi*

Monografia apresentada à disciplina Estágio em Biologia Celular do curso de graduação em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador Interno: Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade

Orientador externo: Dr. Samuel Goldenberg

**CURITIBA
2009**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meus pais pela vida, pelo incentivo constante e por terem valorizado e priorizado sempre minha educação, apesar de todas as dificuldades. A minha irmã Samantha por todo o apoio durante os anos de faculdade, pela oportunidade de convivência e pelo exemplo de esforço e perseverança.

Ao meu orientador Samuel e co-orientadora Lysângela, do Instituto Carlos Chagas, pela oportunidade de aprendizado, pela confiança depositada em mim e por todo o conhecimento transmitido, e ao professor Edvaldo, por ser meu orientador interno da UFPR.

Aos colegas do Laboratório de Regulação da Expressão Gênica que me auxiliaram direta ou indiretamente durante esses dois anos, a Priscila do laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos da UEL pelo auxílio na obtenção de um dos antisoros, e a todos os colegas do Instituto Carlos Chagas que me apoiaram na execução deste trabalho.

Ao meu namorado Henrique pelo carinho e apoio, e por aturar pacientemente meus intermináveis monólogos sobre proteínas.

Aos colegas do curso de Ciências Biológicas e a todos os amigos que de perto ou de longe compartilharam comigo momentos felizes e me ajudaram a seguir em frente nas horas difíceis, e ao meu afilhado Haico por tornar meus dias mais alegres.

A todas as pessoas que ao longo de minha graduação tiveram um papel importante na minha formação, em especial aos amigos do departamento de Biologia Celular da UFPR por todos os bons momentos compartilhados.

A todos vocês, muito obrigada!

“O impossível existe até quando alguém duvide dele e prove o contrário.”
Albert Einstein

RESUMO

Trypanosoma cruzi, o agente etiológico da doença de Chagas, é um organismo amplamente estudado devido a sua importância médica e também por possuir características peculiares que o tornam um bom modelo de estudo para questões biológicas básicas. A repressão de RNAs mensageiros em grânulos citoplasmáticos compostos de complexos mRNA-proteína (mRNPs) é uma importante via de regulação pós transcricional em eucariotos e, recentemente, foi demonstrado que grânulos de RNA estão presentes em *T. cruzi*. Alguns ortólogos de proteínas humanas envolvidas em mecanismos de regulação foram encontrados nestas estruturas e caracterizados, mas a função e composição de grânulos de mRNA neste modelo experimental permanecem desconhecidas. Em humanos e outros eucariotos, condições de estresse como calor, radiação UV, presença de agentes citotóxicos ou deficiência de glucose podem induzir a formação de grânulos de estresse, um tipo de estrutura citoplasmática envolvida em repressão, separação e armazenamento de mRNA durante condições adversas. Foram encontradas, em banco de dados de *T. cruzi*, três sequências de proteínas que possuem certa similaridade estrutural com as proteínas humanas TIA1 e TIAR. Os genes correspondentes foram clonados utilizando-se a tecnologia Gateway®, para a obtenção de proteínas recombinantes. As proteínas purificadas foram utilizadas para produzir anticorpos policlonais em camundongos, os quais puderam elucidar a localização celular e padrões de expressão destas proteínas durante o ciclo de vida do parasita. A caracterização destas proteínas pode ajudar a elucidar melhor os mecanismos de regulação pós transcricional em *T. cruzi*.

Palavras-chave: TIA1/TIAR. *Trypanosoma cruzi*. Regulação da expressão gênica.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi, the etiological agent of Chagas' disease, is an organism widely studied due to its medical importance and particular features that make it an alternative model for basic biological studies. Repression of messenger RNAs in cytoplasmic granules composed of mRNA-protein (mRNP) complexes is an important pathway of posttranscriptional regulation in eukaryotes, and recently was shown that mRNA granules are present in *T. cruzi*. A few orthologs of human proteins involved in mRNA metabolism were found and characterized on these structures, but the function and composition of mRNA granules in this organism remain unknown. In humans and other eukaryotes, stress conditions such as heat, UV radiation, presence of cytotoxic agents or glucose starvation can induce the formation of stress granules, cytoplasmic structures involved in mRNA repression, sorting and storage during adverse conditions. Three protein sequences that have a certain structural similarity with the human TIA1/TIAR proteins were found in the *T. cruzi* data bank. The genes encoding these three proteins were cloned using the Gateway® technology and the recombinant proteins were obtained. The purified proteins were used to produce polyclonal antibodies in mice and the cellular localization and expression patterns of these proteins during the parasite's life cycle were performed. The characterization of these proteins can help to elucidate the mechanisms of posttranscriptional regulation in *T. cruzi*.

Keywords: TIA1/TIAR. *Trypanosoma cruzi*. Regulation of gene expression.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – CICLO DE VIDA DO <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
FIGURA 2 – MODELO DE AGREGAÇÃO DOS GRÂNULOS DE ESTRESSE.....	15
FIGURA 3 – SÍTIOS NECESSÁRIOS À CONSTRUÇÃO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA O USO NO SISTEMA GATEWAY®.....	24
FIGURA 4 – ESQUEMA DA RECOMBINAÇÃO MEDIADA PELA ENZIMA BP CLONASE.....	27
FIGURA 5 – MODELO DE PLACA REFERÊNCIA.....	26
FIGURA 6 – ESQUEMA DA RECOMBINAÇÃO MEDIADA PELA ENZIMA LR CLONASE.....	28
FIGURA 7 – MAPA ILUSTRATIVO DO VETOR DE EXPRESSÃO pDEST™17.....	29
FIGURA 8 – MAPA ILUSTRATIVO DO VETOR pTcPR-GFPN	30
FIGURA 9 – QUADRO INDICATIVO DAS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS PARA OS GÉIS DESNATURANTES DE POLIACRILAMIDA.....	33
FIGURA 10 – EXEMPLO DO SISTEMA UTILIZADO NA TRANSFERÊNCIA DE PROTEÍNAS.....	34
FIGURA 11 – ALINHAMENTOS DE PROTEÍNAS DE <i>T. cruzi</i> e <i>H. sapiens</i> ATRAVÉS DE BLASTP.....	42
FIGURA 12 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS DOMÍNIOS PRESENTES NAS PROTEÍNAS 85.70, 65.180 e 47.80.....	43
FIGURA 13 – SEQUÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DOS GENES EM ESTUDO.....	44
FIGURA 14 – PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE PCR PURIFICADOS PARA OS GENES 85.70, 47.80 E 65.180.....	45
FIGURA 15 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE AMPLICONS OBTIDOS A PARTIR DE PCR DE COLÔNIA DE BACTÉRIAS TRANSFORMADAS COM OS CLONES DE ENTRADA.....	46
FIGURA 16 – RESULTADOS DOS ALINHAMENTOS DO TIPO BLASTx ENTRE OS FRAGMENTOS SEQUENCIADOS E PROTEÍNAS PROVENIENTES DE BANCO DE DADOS DE <i>T. cruzi</i>	47
FIGURA 17 – VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE SEQUÊNCIAS DE VETOR NO AMPLICON SUBMETIDO A ANÁLISES ANTERIORES	48
FIGURA 18 – ALINHAMENTO ENTRE AS PROTEÍNAS 65.180 (ACIMA) E 806865.1 (ABAIXO).....	49
FIGURA 19 – ALINHAMENTO ENTRE AS PROTÉINAS 47.80 (ACIMA) E 817185.1(ABAIXO).....	50
FIGURA 20 – PERFIL ELETROFORETICO DOS AMPLICONS PROVENIENTES DE PCR DE COLÔNIA DE BACTÉRIAS TRASNFORMADAS COM OS CLONES DE EXPRESSÃO.....	51
FIGURA 21 – PERFIL ELETROFORETICO DOS VETORES DE EXPRESSÃO ISOLADOS DE BACTÉRIAS TRANSFORMADAS COM PLASMÍDEOS CONTENDO O GENE 65.180.....	52

FIGURA 22 – PERFIL ELETROFORÉTICO DOS AMPLICONS PROVENIENTES DE PCR DA MINIPREPARAÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO PARA O GENE 65.180.....	52
FIGURA 23 – SELEÇÃO DE CLONES POSITIVOS PARA 47.80 – GFP ATRAVÉS DE TOOTHPICK (A) E PCR DE MINIPREPARAÇÃO (B).....	53
FIGURA 24 – SELEÇÃO DE CLONES POSITIVOS PARA 85.70 – GFP ATRAVÉS DE TOOTHPICK (A) E PCR DE MINIPREPARAÇÃO (B).....	53
FIGURA 25 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE EXTRATOS DE BACTÉRIAS TRANSFORMADAS COM VETORES DE EXPRESSÃO, INDUZIDAS E NÃO – INDUZIDAS.....	54
FIGURA 26 – PROTEÍNAS EXTRAÍDAS NA INDUÇÃO EM LARGA ESCALA.....	55
FIGURA 27 – PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS PURIFICADAS POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE.....	56
FIGURA 28 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES 47.80 (A); 85.70 (B) e 65.180 (C) ELETROELUÍDAS DE GEL PREPARATIVO.....	57
FIGURA 29 – IMUNODETECÇÃO DA CAUDA DE HISTIDINA NAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES 47.80 (A); 85.70 (B) e 65.180(C) PURIFICADAS	58
FIGURA 30 – TESTE DOS ANTISOROS ANTI-PROTEÍNA RECOMBINANTE 47.80.....	59
FIGURA 31 – TESTE DOS ANTISOROS ANTI- PROTEÍNA RECOMBINANTE 65.180.....	60
FIGURA 32 – TESTE PRELIMINAR DO ANTISORO ANTI – PROTEÍNA RECOMBINANTE 85.70.....	61
FIGURA 33 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA 47.80 (A) DURANTE O CICLO DE VIDA.....	62
FIGURA 34 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA 65.180 (A) DURANTE O CICLO DE VIDA.....	62
FIGURA 35 - IMUNOLOCALIZAÇÃO DA PROTEÍNA 47.80 EM PARASITAS EPIMASTIGOTAS SOB CONDIÇÕES NORMAIS (A) E SUBMETIDOS A ESTRESSE NUTRICIONAL(B).....	65
FIGURA 36 - IMUNOLOCALIZAÇÃO DA PROTEÍNA 65.180 EM PARASITAS EPIMASTIGOTAS SOB CONDIÇÕES NORMAIS (A) E SUBMETIDOS A ESTRESSE NUTRICIONAL(B).....	66

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	09
1.1 CICLO DE VIDA DO <i>Trypanosoma cruzi</i>	10
1.2 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSOMATÍDEOS.....	12
1.3 GRÂNULOS DE REPRESSÃO DE mRNA EM EUCARIOTOS	13
1.4 AS PROTEÍNAS TIA1 E TIAR.....	16
1.5 GRÂNULOS DE PROCESSAMENTO DE mRNA EM <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
1.6 JUSTIFICATIVA.....	17
2. OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES.....	19
3.1.1 Soluções utilizadas.....	19
3.1.2 Procedência dos reagentes.....	20
3.2 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA.....	21
3.2.1 Análises de similaridade de sequência primária.....	21
3.2.2 Desenho de oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação dos genes.....	22
3.3 CLONAGEM MOLECULAR UTILIZANDO O SISTEMA .GATEWAY@.....	23
3.3.1 Amplificação dos genes através de Reação em cadeia da polimerase (PCR) e purificação dos amplicons.....	23
3.3.2 Eletroforese de DNA.....	24
3.3.3 Clonagem dos amplicons no vetor de entrada pDONR™221.....	24
3.3.4 Transformação de bactérias cálcio-competentes com os plasmídeos e cultivo em meio sólido.....	25
3.3.5 Identificação das colônias bacterianas.....	25
3.3.6. Busca de clones positivos através de Ensaio de <i>Toothpick</i> ou PCR de colônia.....	26
3.3.7 Mini preparação de plasmídeos.....	27
3.3.8 Sequenciamento.....	27
3.3.9 Subclonagem em vetor de expressão pDEST™17.....	27
3.3.10 Subclonagem em vetor contendo região codificante para <i>Green fluorescent protein (GFP)</i>	29
3.4 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	31
3.4.1 Transformação de bactérias cálcio competentes com o vetor de expressão.....	31
3.4.2 Testes de indução e indução em larga escala.....	31
3.4.3 Produção de extratos de <i>E. coli</i>	32
3.4.3 Eletroforese de proteínas em gel desnaturante de poliacrilamida.....	32
3.4.4 Técnica de <i>Western Blot</i> – Protocolo base.....	33
3.4.5 Extração das proteínas expressas.....	34
3.4.6 Purificação das proteínas por cromatografia de afinidade e eletroeluição.....	35
3.4.7 Detecção da cauda de histidina nas proteínas recombinantes.....	36
3.5 OBTENÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	36
3.5.1 Teste do soro pré-imune	37
3.5.2 Inoculações em camundongos e obtenção do antisoro policlonal.....	37

3.5.3 Obtenção de soro a partir do sangue dos animais.....	38
3.5.4 Obtenção de anticorpos policlonais a partir do lavado peritoneal de camundongos	38
3.5.5 Teste dos antisoros	38
3.6 IMUNOENSAIOS COM OS ANTICORPOS OBTIDOS.....	39
3.6.1 Detecção de proteínas em extratos protéicos de <i>T. cruzi</i> em diferentes etapas do ciclo de vida.....	39
3.6.2 Verificação da localização celular das proteínas	39
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Análises de Bioinformática.....	41
4.1.1 Alinhamentos de sequência primária (BLAST).....	41
4.1.2 Análise dos domínios das proteínas	42
4.3 CLONAGEM MOLECULAR UTILIZANDO O SISTEMA GATEWAY®	44
4.3.1 Síntese de oligonucleotídeos iniciadores e amplificação dos genes por Reação em cadeia da Polimerase (PCR).....	44
4.3.2 Clonagem no vetor de entrada pDONR™ 221.....	45
4.3.3 Sequenciamento.....	46
4.3.4 Subclonagem no vetor de expressão pDEST™17.....	51
4.3.5 Subclonagem em vetor contendo <i>GFP</i>	53
4.4 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	54
4.4.1 Testes de expressão das proteínas recombinantes.....	54
4.4.2 Expressão em larga escala e extração das proteínas recombinantes.....	55
4.4.3 Purificação por cromatografia de afinidade.....	55
4.4.4 Purificação por gel preparativo.....	57
4.4.5 Identificação da cauda de histidina nas proteínas purificadas.....	57
4.5 OBTENÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	58
4.5.1 Inoculação em camundongos.....	58
4.5.2 Teste dos antisoros.....	59
4.6 IMUNOENSAIOS COM OS ANTICORPOS OBTIDOS.....	61
4.6.1 Detecção de proteínas em extratos protéicos de <i>T. cruzi</i> em diferentes etapas do ciclo de vida.....	61
4.6.2 Verificação da localização celular das proteínas através da técnica de imunofluorescência.....	63
5.CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS	69

1. INTRODUÇÃO

Trypanosoma cruzi é um protozoário flagelado pertencente à ordem kinetoplastida (LEVINE, 1980), família tripanosomatidae (CHAGAS, 1909). Ao infectar o homem, *T. cruzi* pode causar a doença de Chagas, um mal que pode se tornar crônico e ocasionar uma severa cardiomiopatia. Desde a descoberta da doença por Carlos Chagas há 100 anos, *T. cruzi* vem sendo alvo de muitos estudos, porém, até hoje, não há vacina ou tratamento quimioterápico eficiente para a doença de Chagas. O fato de ser uma doença bastante debilitante e que atinge milhares de pessoas, principalmente na América latina, justifica o grande interesse no estudo deste parasita (<http://apps.who.int/tdr/svc/diseases/chagas>). Além disso, *T. cruzi* possui muitos aspectos peculiares em sua estrutura e funcionamento celular, sendo um modelo alternativo para pesquisa básica de mecanismos biológicos (DE SOUZA, 1984).

O controle pós-transcricional da expressão gênica parece ter um papel muito importante na biologia de *T. cruzi* e estudos recentes demonstram que estes parasitas apresentam, em seu citoplasma, grânulos de mRNA formados por complexos mRNP (HOLETZ *et al*, 2007). Estes grânulos apresentam grande importância no controle pós-transcricional de outros eucariotos, e dois tipos principais são estudados, os grânulos de estresse e os *P-bodies* (corpos de processamento). Grânulos de estresse aparecem como parte do processo de remodelamento traducional ocorrido nas células durante condições de estresse e são prováveis sítios de repressão e triagem de mRNA, enquanto os *P-bodies* possuem em sua composição proteínas indicadoras de que esta seja uma estrutura de degradação de mRNAs. Esses grânulos podem aparecer simultaneamente nas células e há evidências de que haja uma interação entre eles (ANDERSON & KEDERSHA, 2006).

Este projeto tem como objetivos a clonagem, expressão e produção de antisoro policlonal contra três prováveis proteínas de ligação a mRNA de *T. cruzi* que possuem similaridade de sequência primária com as proteínas *TIA1* e *TIAR* de *Homo sapiens*. Estas são importantes proteínas de regulação de expressão gênica em eucariotos superiores, envolvidas na formação de complexos *mRNP* e grânulos de repressão de mRNA sob condições de estresse, e são consideradas marcadores de grânulos de

estresse, já que não são observadas em outros tipos de grânulos. Com os antisoros produzidos, objetiva-se caracterizar os padrões de expressão gênica e localização celular destas proteínas e se possível, verificar seu envolvimento com mecanismos de regulação da expressão gênica neste parasita.

1.1 CICLO DE VIDA DO *Trypanosoma cruzi*

Em seu ciclo de vida na natureza, *T. cruzi* possui pelo menos quatro estágios distintos de diferenciação: epimastigota, amastigota, tripomastigota metacíclico e tripomastigota sanguíneo, sendo os dois primeiros caracterizados como estágios replicativos, e os outros como não-replicativos (infectivos). Os estágios amastigota e tripomastigota sanguíneo são encontrados em hospedeiros vertebrados, enquanto epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos se desenvolvem nos insetos vetores (DE SOUZA, 1984).

Em ambiente natural, *T. cruzi* possui como hospedeiros vertebrados mamíferos de pequeno porte (como roedores, marsupiais e carnívoros) e, em grande parte dos casos, a infecção pelo parasita não causa danos aos hospedeiros. A partir do momento em que houve contato direto dos vetores com o homem, inicia-se uma nova forma de ciclo incluindo o hospedeiro humano, para o qual a infecção por *T. cruzi* tem diversas consequências fisiológicas que, em conjunto, são denominadas “Doença de Chagas” (revisito por DIAS, 2000). Os vetores são insetos hematófagos que transmitem o parasita durante sua alimentação, conhecidos popularmente no Brasil como “barbeiros”. Estes podem pertencer a distintas espécies dentro da subfamília Triatominae (pertencente à família Reduviidae da ordem Hemiptera), sendo *Triatoma infestans*, *T. dimidiata*, *T. brasiliensis*, *T. sordida*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* as espécies de maior importância epidemiológica (SHERLOCK, 2000; GARCIA e AZAMBUJA, 2000).

As principais formas de contaminação humana são a vetorial, a transfusional e a congênita, e há ainda uma pequena incidência de contaminação por acidentes laboratoriais e transplantes de órgãos. Na forma clássica de contaminação ou vetorial, os insetos vetores infectados alimentam-se do sangue do hospedeiro e eliminam fezes

contendo tripomastigotas metacíclicos, que são internalizados quando o hospedeiro coça o local da picada (criando uma escoriação que facilita a entrada pela pele) ou através de mucosas e membranas conjuntivas (revisto por TEIXEIRA, 2006). Ao atingir a corrente sanguínea, os parasitas podem infectar os mais variados tipos de células e são internalizados em vesículas que, após a fusão com lisossomos, se transformam em vacúolos parasitóforos. Neste compartimento de pH ácido, os parasitas se modificam para o estágio amastigota e, após o rompimento da membrana do vacúolo, passam a se dividir no citoplasma da célula infectada. Após sucessivas divisões, os parasitas transformam-se em tripomastigotas sanguíneos, rompem a célula e são liberados na corrente sanguínea. A partir desta etapa, podem então infectar novas células ou serem ingeridos por um inseto que se alimente do sangue do hospedeiro. Quando o inseto ingere o sangue, já em seu estômago grande parte dos tripomastigotas sanguíneos se transforma em epimastigotas, que migram e se aderem à porção posterior do intestino. Neste ambiente pobre em nutrientes os parasitas passam a sofrer estresse nutricional, o que desencadeia o processo da metaciclogênese (BONALDO,1988), ou seja, a transformação dos parasitas em tripomastigotas metacíclicos infectivos, completando assim o ciclo (revisto por BRENER, 1973 e TYLER e ENGMAN, 2001), como demonstrado na figura 1.

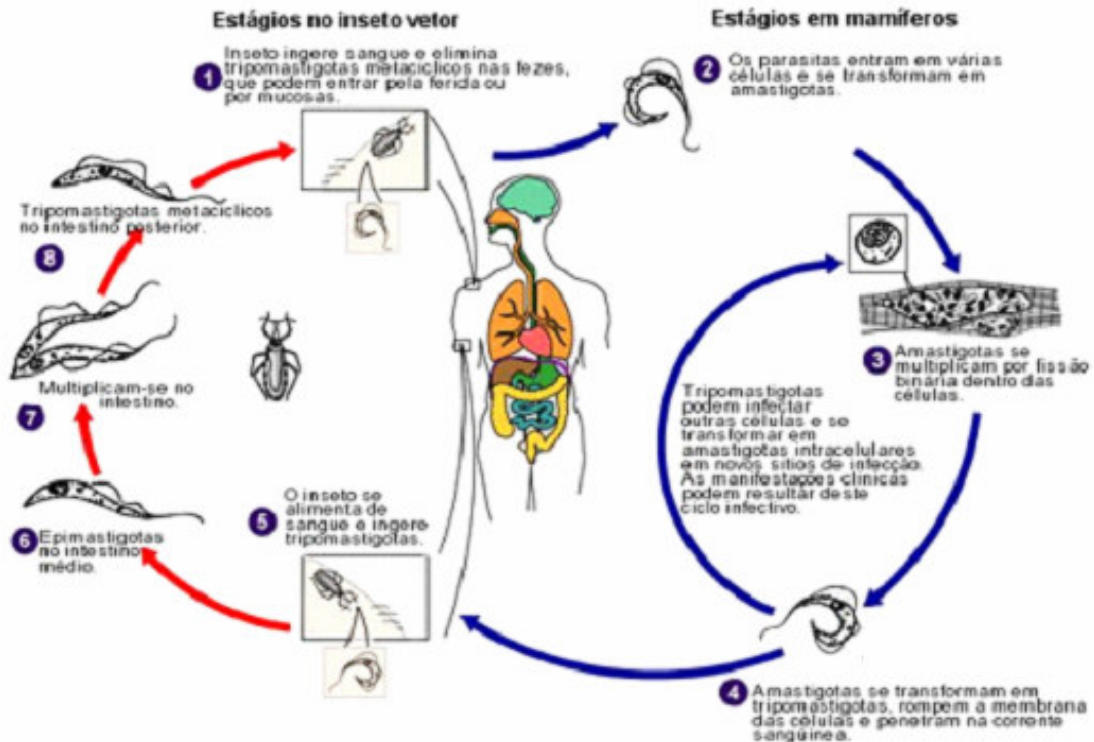


FIGURA 1 – CICLO DE VIDA DO *Trypanosoma cruzi*
 MODIFICADO DE: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/>

1.2 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSOMATÍDEOS

A variedade de formas e hospedeiros que o parasita apresenta durante seu ciclo de vida envolve muitas alterações morfológicas e funcionais que demandam grandes mudanças no perfil de expressão gênica desses organismos.

A regulação da expressão gênica em tripanosomatídeos possui algumas peculiaridades em relação à de outros eucariotos. Vários genes apresentam-se organizados em repetições em *tandem* e são separados por regiões intergênicas. A ocorrência de íntrons não é comum e genes próximos fisicamente não são necessariamente relacionados em função. Os pré-mRNAs são transcritos de forma policistrônica, e para originar mRNAs maduros sofrem *trans-splicing*, que consiste na adição de uma sequência comum de nucleotídeos à extremidade 5' do mRNA, denominada *splice leader* (SL) ou mini-exon (PALENCHAR e BELLOFATO, 2005;

LIANG *et al*, 2003). O *cap* 5' também está presente, apesar de bastante modificado em relação aos de outros eucariotos, e a extremidade 3' é poliadenilada. Os mRNAs também apresentam regiões 3' e 5' não traduzidas (UTR), que parecem determinar a abundância do mRNA na célula por modular sua degradação (COUGHLIN *et al*, 2000; QUIJADA *et al*, 2000; BRITTINGHAM *et al*, 2001). A transcrição policistrônica permite que sejam produzidos muitos mRNAs maduros em uma única síntese, o que torna o processo mais ágil em resposta as alterações ambientais rápidas as quais o parasita está sujeito (PALENCHAR e BELLOFATO, 2005; LIANG *et al*, 2003)

A transcrição policistrônica e a ausência de promotores clássicos de RNA polimerase II (PALENCHAR e BELLOFATO, 2005) indicam que o início da transcrição não é uma etapa crucial para regulação da expressão gênica em *T. cruzi* (CLAYTON, 2002). Acredita-se que a maior parte da regulação ocorra a nível pós-transcricional, através de processamento do transcrito primário, transporte dos transcritos do núcleo para o citoplasma, estabilização do mRNA e controle da tradução. Para vários genes, as sequências 3' não traduzidas (3'-UTR) do mRNA servem como sitio de ligação a proteínas relacionadas à repressão e processamento dos transcritos, funcionando como alvos de regulação por RBPs em várias destas etapas (COUGHLIN *et al*, 2000).

1.3 GRÂNULOS DE REPRESSÃO DE mRNA EM EUCARIOTOS

Os mRNAs existem nas células eucarióticas em um equilíbrio dinâmico entre a tradução e estados de repressão traducional que ocorre nos *P-bodies* e grânulos de estresse. Os *P-bodies* servem como sítios de repressão de mRNAs que não estão sendo traduzidos em células submetidas a estresse ou não. São também prováveis sítios de degradação, já que em sua composição apresentam proteínas envolvidas com o *decapping* do mRNA (COUGOT, BABAICO e SERAPHIN, 2004). Fatores de iniciação da tradução estão ausentes nos *P-bodies*, com exceção da proteína ligante de *cap* eIF4E (FERRAIUOLO *et al*, 2005). Os mRNAs são essenciais para a formação dos *P-bodies*, e tem sido demonstrado que o tamanho e número dos grânulos citoplasmáticos são proporcionais à quantidade de mRNAs que não estão sendo traduzidos (TEIXEIRA *et al*, 2005).

Quando células eucarióticas são expostas a condições adversas como calor, radiação UV ou condições oxidativas a tradução é reprogramada para que a célula possa resistir ao estresse de forma mais eficiente, e neste processo são formadas estruturas citoplasmáticas denominadas grânulos de estresse (ANDERSON e KEDERSHA, 2002). Para o início da tradução, sob condições celulares normais, forma-se um complexo de pré-iniciação na extremidade 5' de mRNAs que possuem *cap*. Nesse complexo estão presentes vários fatores de iniciação da tradução eucarióticos (eIF-1, eIF-2, eIF-3 e eIF-5), além da subunidade ribossomal 40s. Durante a primeira etapa da formação dos grânulos de estresse ocorre a fosforilação do eIF-2 por quinases como PKR, GCN2 e HR1, o que torna os complexos de pré-iniciação não funcionais (formando complexos de preiniciação 48s), bloqueando o início da tradução e causando dissociação de polissomos (revisto por HOLCIK, 2005). Na segunda etapa ocorre então o início da nucleação dos grânulos de estresse, quando proteínas como TIA1 (*T-cell Intracellular Antigen 1*), TTP (*Tristetraprolin*), FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*) e GBP3 (*Guanylate Binding Protein 3*) se ligam a RNAs presentes neste complexo 48S formando pequenos grânulos, caracterizando o início da nucleação. Após a sua formação estes pequenos grânulos são unidos pela proteína PABP1, formando estruturas macroscopicamente visíveis. Através de interação proteína-proteína, os grânulos de estresse vão se tornando maiores, e algumas proteínas que se ligam às proteínas de nucleação têm papéis importantes em outras funções celulares, indicando que essa agregação de proteínas nos grânulos de estresse promove uma integração de outras funções celulares com a via de resposta a estresse, como demonstrado esquematicamente na figura 2.

Os mRNAs aprisionados nos grânulos são sujeitos a triagem dentro dessas estruturas, pois se ligam a várias proteínas com afinidade por RNA. Uma das vias de desestabilização dos grânulos ocorre quando a proteína Hsp70 se liga a domínios *prion like* (ricos em glutamina) de algumas proteínas que estruturam os grânulos de estresse (incluindo a TIA-1), bloqueando a agregação destas proteínas, o que promove a desassociação dos grânulos (revisto por ANDERSON & KEDERSHA, 2007).

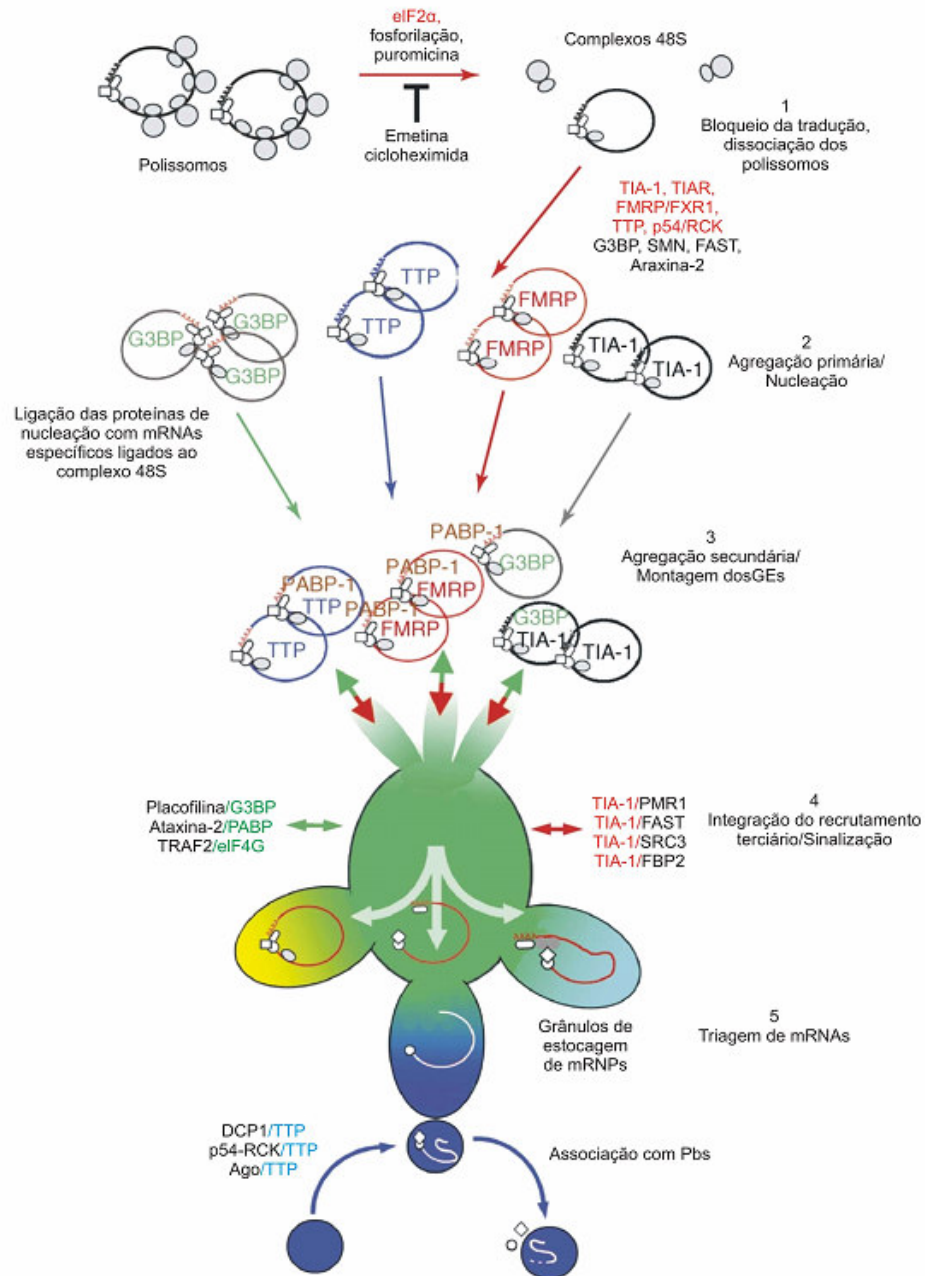


FIGURA 2 – MODELO DE AGREGAÇÃO DOS GRÂNULOS DE ESTRESSE MODIFICADO DE : ANDERSON & KEDERSHA, 2007

Os grânulos de estresse estão relacionados aos *P-bodies* tanto em composição como em função, e acredita-se que eles coordenem juntos os processos de repressão e degradação de mRNA nas células eucarióticas (ANDERSON e KEDERSHA, 2006).

1.4 AS PROTEÍNAS TIA1 E TIAR

TIA1 e *TIAR* são proteínas de ligação a RNA de grande importância em eucariotos superiores, relacionadas a eventos de regulação da expressão gênica. Estas proteínas possuem grandes semelhanças estruturais entre si e possuem domínios conservados do tipo RRM (*RNA Recognition Motifs*), que conferem a elas a capacidade de se ligar a RNA. *TIA1* e *TIAR* se ligam preferencialmente a regiões 3' *UTR* de vários transcritos instáveis de mRNA, principalmente os que contêm motivos ricos em Adenina e Uridina (ARE's) (STOECKLIN e ANDERSON, 2006) e são capazes de regular a expressão de proteínas sem afetar os níveis de transcrição (PIECYK *et al*, 2000).

Sob condições celulares normais apresentam-se com localização nuclear envolvidas em outras funções que não a resposta a estresse, como *splicing* de pré-mRNAs (LE GUINER *et al*, 2001). Já em condições adversas *TIA1* e *TIAR* são caracterizadas como proteínas promotoras de nucleação de grânulos de estresse, pois são capazes de promover a agregação dos grânulos. Quando superexpressas se tornam parte dos grânulos que ajudam a formar e necessitam dos complexos 48S para que realizem uma agregação “espontânea” desses grânulos. A necessidade de movimentação entre o núcleo e o citoplasma torna o mecanismo de transporte um fator crítico na disponibilidade das proteínas para a formação dos grânulos de estresse, sendo a via de transporte um possível alvo de modulação quando há a necessidade de se alterar a velocidade da repressão de mRNA (ANDERSON & KEDERSHA, 2007).

1.5 GRÂNULOS DE PROCESSAMENTO DE mRNA EM *Trypanosoma cruzi*

Dados obtidos há mais de vinte anos demonstram a existência de mRNAs estocados no citoplasma em regiões diferentes dos polissomos em *Trypanosoma cruzi* (GOLDENBERG *et al*, 1985). A recente identificação de grânulos de mRNA tipo *P-*

bodies ou grânulos de estresse nesse organismo (HOLETZ *et al*, 2007) e as várias lacunas existentes para o entendimento da regulação da expressão gênica, levantam a hipótese de que os grânulos de mRNA sejam importantes sítios de estocagem e/ou degradação dos mRNAs nesse organismo. Ainda não se sabe se os grânulos de mRNA em *T. cruzi* possuem a mesma composição e fisiologia dos grânulos de eucariotos superiores. O estudo de proteínas de ligação a RNA em *T. cruzi* que possuam semelhanças com proteínas formadoras de grânulos de outros eucariotos pode ser útil para elucidar melhor o papel dessas estruturas em nosso modelo experimental.

1.6 JUSTIFICATIVA

O entendimento da regulação da expressão gênica de *Trypanosoma cruzi*, além de gerar novos conhecimentos, pode contribuir para a identificação de novos alvos de drogas específicas e mais eficientes contra essa grave parasitose, que ainda não possui cura e afeta milhares de pessoas, principalmente na América latina.

Há várias evidências de que a regulação pós-transcricional seja uma das principais vias de regulação da expressão gênica em *T. cruzi*. Neste contexto, é de extrema importância o estudo de proteínas de ligação a mRNA, já que é grande o envolvimento destes tipos de proteínas nos processos de degradação, triagem e armazenamento de mRNAs, funções vitais em uma célula eucariótica. Proteínas com motivos RRM (motivo de ligação a RNA) são um alvo interessante de estudos, principalmente aquelas que apresentam similaridade com proteínas de eucariotos superiores que possuem funções conhecidas de regulação gênica e formação de grânulos. A caracterização de proteínas que possivelmente estejam envolvidas na regulação da expressão gênica pode ajudar a elucidar melhor os mecanismos pelo qual esse parasita modula a expressão de seus genes.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar três proteínas de *Trypanosoma cruzi* que possuem domínios de ligação a RNA e similaridade com as proteínas *TIA* de *Homo sapiens*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Análises de bioinformática

- Busca de proteínas similares a *TIA1* e *TIAR* de *Homo sapiens*.
- Análise dos domínios das proteínas selecionadas.

Clonagem molecular utilizando o sistema *Gateway*®

- Amplificação de genes e clonagem no vetor de entrada pDONR™221.
- Confirmação das clonagens por *PCR* de colônia e sequenciamento.
- Subclonagem no vetor de expressão pDEST™17.

Expressão de proteínas

- Padronização das condições de expressão para cada proteína.
- Expressão de proteínas em larga escala.
- Purificação das proteínas obtidas.

Obtenção de anticorpos contra as proteínas recombinantes

- Imunização de camundongos com as proteínas obtidas.
- Análise da qualidade dos anticorpos por *Western blot*.

Imunoensaios

- Imunolocalização das proteínas em *Trypanosoma cruzi*.
- Verificação do padrão de expressão durante o ciclo de vida do parasita.

3. METODOLOGIA

3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

3.1.1 Soluções utilizadas

- **Azul de comassie** - Comassie R-250 0,1% ; metanol 45% ; ácido acético 10%.
- **Ficoll (estoque 10x)**: azul de bromofenol 0,21%; xileno cianol FF 0,21%; EDTA 0,2 M pH 8,0; glicerina 50%.
- **Gel de empilhamento para proteínas**: 4,75% de acrilamida 33/0,9%; Tris-HCl 120 mM pH 6,8; SDS 0,1%; persulfato de amônio 0,075%; TEMED 0,07%.
- **Gel de corrida de proteínas**: acrilamida:bisacrilamida 33%:0,9% na concentração necessária de acordo com o tamanho da proteína; Tris-HCl 400 mM pH 8,8; SDS 0,1%; persulfato de amônio 0,075% e TEMED 0,07%.
- **Ponceau S**: Ponceau S Sigma P-3504 0,5%, ácido acético 1%.
- **Solução de bloqueio**: 5% de leite em pó desnatado em PBS 1X e Tween 0,1%.
- **Solução de descoloração**: metanol 4%; ácido acético 7,5%.
- **Solução de lise para *toothpick***: NaOH 50 mM; glicerol 5%; SDS 0,5%; EDTA 5 mM e azul de bromofenol 0,025%.
- **Solução de purificação**: Triton 2%; NaH₂PO₄ 100 mM; Tris - Hcl 10 mM; Uréia 2M; NaCl 0,5M.
- **Tampão de amostra 4x**: Tris-HCl 40 mM pH 6,8; SDS 1%; β-mercaptoetanol 2,5%; glicerol 6% e azul de bromofenol 0,005%.
- **Tampão de eluição (coluna de níquel)**: Uréia 8M; NaCl 300mM ; NaH₂PO₄ 50mM; Imidazol 300 mM.
- **Tampão de ligação (coluna de níquel)**: Uréia 8M; NaCl 300 mM; NaH₂PO₄ 50mM; Imidazol 10mM.

- **Tampão de revelação com fosfatase alcalina (*AP Buffer*):** Tris-HCl 100 mM pH 9,5 ; NaCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM.
- **Tampão de ressuspensão de proteínas:** NaH₂PO₄ 100 mM; Tris-HCl 10 mM; Uréia 8M pH 8,0.
- **Tampão de *SDS-page*** : Tris-base 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 1%.
- **Tampão de sonicação:** NaCl 500 mM; Triton 2% ; Tris-HCl 20 mM pH 8,0.
- **Tampão TBE (Solução estoque 10X):** Tris-base 89 mM; Ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM pH 8.0
- **Tampão de transferência (*western blot*)** :Tris-base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%.
- **TE:** Tris HCl 10 mM pH 7,5 e EDTA 1 mM.

3.1.2 PROCEDÊNCIA DOS REAGENTES

- **Amersham-Pharmacia Biotech:** dNTPs.
- **Amersham Biosciences:** Membrana de nitrocelulose.
- **Invitrogen:** acrilamida, anticorpo secundário alexa 488, bis-acrilamida, BP clonase *enzyme mix*, DAPI, LR clonase *enzyme mix*, marcadores de peso molecular *Benchmark Protein Ladder* e *1Kb Plus DNA ladder*, *Platinum Taq DNA polimerase*, PEG/MgCl₂, Proteinase K, Taq DNA polimerase, vetores Gateway® pDEST™17 e Gateway® pDONR™221.
- **Merck:** ácido clorídrico, cloreto de amônio, cloreto de sódio, etanol absoluto, fosfato de potássio monobásico, fosfato de sódio dibásico, hidróxido de sódio, SDS.
- **Promega:** Fosfatase alcalina, NBT, BCIP, anticorpo Goat *Anti-Mouse IgG Alkaline Phosphatase Conjugate*
- **Qiagen:** Coluna Ni-NTA, QIAprep *Spin Miniprep Kit*
- **Sigma-Aldrich:** membranas de diálise.
- **Sigma:** adjuvante completo de freund, agarose ultra pura, ampicilina, azul de comassie, β-mercaptoetanol, brometo de etídeo, BSA, canamicina, cloranfenicol,

ficoll, imidazol, IPTG, n-propil-galacto, paraformaldeído, poli-L-lisina, TEMED (*Tetramethylethylenediamine*), triton x-100, tween 20.

- **Syntec**: cetamina.
- **USB**: sacarose, uréia, persulfato de amônio.
- **Vetbrands**: xilazina.

3.2 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA

3.2.1 Análises de similaridade de sequência primária

A escolha inicial de proteínas para este trabalho foi feita utilizando-se as sequências das proteínas humanas TIA1 e TIAR como semente de busca (*query*) para análise de conservação de sequência de aminoácidos em relação a *Trypanosoma cruzi*. A partir dessa busca, algumas seqüências de *T. cruzi* foram selecionadas e comparadas contra o genoma de *Homo sapiens* para confirmação dos resultados. Sequências de proteínas TIA presentes em outros eucariotos também foram comparadas com aquelas existentes no banco de dados de *T. cruzi*, para se verificar a conservação das mesmas. As sequências referentes às proteínas estão disponíveis no banco de dados GenBank do *National Center of Biotechnology Information - NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para as buscas foi utilizada a ferramenta de *Blast P* (*Basic alignment search tool*), amplamente utilizadas para o alinhamento de sequências de proteínas. Foi utilizado também o banco de dados www.genedb.org para a obtenção das sequências de *Trypanosoma cruzi*.

A ferramenta *BLAST x*, também presente no *NCBI*, foi utilizada para o alinhamento de fragmentos nucleotídicos (sequenciados durante o trabalho) com proteínas de *T. cruzi*, e análise de similaridade entre estas sequências.

Através da ferramenta *Conserved Domains* presente na mesma página da internet os domínios das proteínas selecionadas para estudo foram analisados, a fim de identificar prováveis regiões conservadas, preferencialmente de ligação a RNA.

Foi utilizada ainda a ferramenta CLUSTAL W para a realização de alinhamentos de sequências de proteínas (www.ebi.ac.uk/clustalw/).

3.2.2 Desenho de oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação dos genes selecionados

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

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

Attb1

Attb2

Sequência específica para cada gene

FIGURA 3 – SÍTIOS NECESSÁRIOS PARA A CONSTRUÇÃO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA O USO NO SISTEMA *GATEWAY*®.

ATTB1 E ATTB2: Sequências que permitem a recombinação específica entre o amplicon purificado e o vetor de entrada do sistema *Gateway*® pDONR™221; **SEQUÊNCIA ESPECÍFICA:** Região de anelamento específica para cada gene a ser amplificado.

3.3 CLONAGEM MOLECULAR UTILIZANDO O SISTEMA GATEWAY®

3.3.1 Amplificação dos genes através de Reação em cadeia da polimerase (PCR) e purificação dos *amplicons*

Os genes foram amplificados utilizando-se a técnica de Reação em cadeia da polimerase (PCR). O volume total das reações foi de 20 μ L e as amplificações foram feitas utilizando-se 100 ng de DNA genômico de *T. cruzi* como molde. A enzima utilizada foi a *Taq Polimerase* (Invitrogen), 20 mM de dNTP, 10 mM de $MgCl_2$, tampão específico para a enzima utilizada, 10 pmol dos oligonucleotídeos iniciadores e água ultrapura suficiente para completar o volume para 20 μ L. Os ciclos de amplificação foram montados da seguinte forma: 94° C por 3 minutos iniciais para desnaturação do DNA seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94° C, 30 segundos de anelamento (temperaturas específicas para cada gene, vide anexo), e por fim 72° C para extensão. O tempo de extensão foi variável de acordo com o tamanho do gene e foi seguida a regra de 1 minuto de extensão para cada mil pares de base.

Os *amplicons* foram purificados com uma solução de 30% PEG 8000/30mM $MgCl_2$, fornecida pelo sistema de purificação da plataforma *Gateway*®. O DNA foi diluído em quatro volumes de TE e adicionado a meio volume de solução de PEG/ $MgCl_2$. A mistura foi agitada vigorosamente e centrifugada por 15 minutos a 16.000 g. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente e o sedimento contendo o DNA foi seco a 60°C por 15 minutos. O sedimento foi ressuspenso em 10 μ L de tampão TE e as amostras foram dosadas em espectrofotômetro, submetidas a eletroforese em gel de agarose e armazenadas a - 20°C.

3.3.2 Eletroforese de DNA

O perfil eletroforético das amostras de DNA utilizadas neste trabalho foi analisado utilizando-se géis de agarose 1% ou 0,8%. O marcador de peso molecular utilizado como referência foi o 1kb *Plus* (Invitrogen).

Após a aplicação das amostras, os géis foram submetidos a uma corrente constante de 100 V, imersos em tampão TBE 1X. Posteriormente foram corados em uma solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por aproximadamente 20 minutos. Após o tratamento com este agente intercalante, o DNA pôde ser observado sob luz UV (comprimento de onda na faixa de 260nm) e fotografado através do sistema de captação de imagens *UV White Darkroom* (*UVP Bioimaging Systems*).

3.3.3 Clonagem dos amplicons no vetor de entrada pDONR™221

A reação de recombinação entre os *amplicons* flanqueados por sítios *AttB* e o vetor de entrada da plataforma *Gateway*® pDONR™221, mediada pela enzima BP clonase, foi feita de acordo com o manual do fabricante (Invitrogen - Catalog nos. 12535-019 e 12535-027). Foram utilizados de 20 a 50 fentomol dos produtos de PCR purificados para a recombinação com 150 ng de vetor. O vetor pDONR™221 contém um gene de resistência à canamicina utilizado para selecionar as colônias bacterianas e regiões *attP1* e *attP2*, utilizadas na recombinação com os produtos de PCR flanqueados por regiões *attB*. A enzima BP clonase utiliza os sítios *AttB* do amplicon e *AttP* do vetor pDONR para realizar uma recombinação específica que dará origem ao vetor de entrada contendo o gene de interesse e a um produto secundário linear, como demonstrado na figura 4.

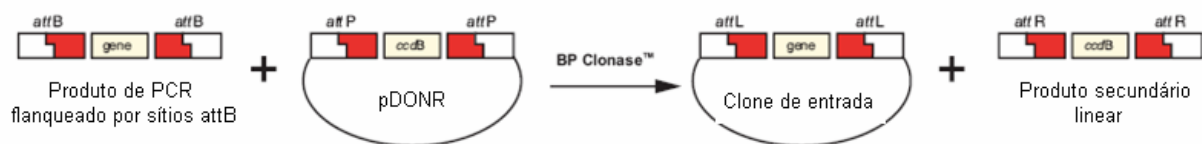


FIGURA 4 – ESQUEMA DA RECOMBINAÇÃO MEDIADA PELA ENZIMA BP CLONASE
MODIFICADO DE: www.invitrogen.com

3.3.4 Transformação de bactérias cálcio-competentes

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

Para cada transformação foram plaqueados 100 uL e 900 uL da cultura, a fim de obter colônias isoladas. As placas foram incubadas por 18 horas a 37 °C para o crescimento das colônias.

3.3.5 Identificação das colônias bacterianas

Após 18 horas de incubação, as colônias isoladas foram transferidas para uma placa referência contendo meio LB + antibióticos. Cada colônia foi depositada em uma região numerada, para a identificação das mesmas. As placas foram incubadas por 18 horas a 37°C.

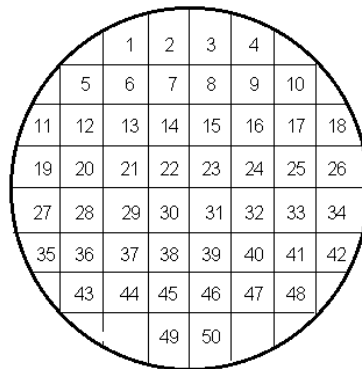


FIGURA 5 – MODELO DE PLACA REFERÊNCIA, EVIDENCIANDO AS REGIÕES NUMERADAS ONDE SÃO INOCULADAS AS COLÔNIAS
 FONTE: www.fgsc.net/fgn48/Image9.gif

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

A *PCR* colônia é uma técnica utilizada para se verificar o sucesso da recombinação. A amplificação é feita diretamente a partir de uma colônia bacteriana. Para isso foi feita uma *PCR* semelhante à convencional, porém utilizou-se como base para a amplificação uma alíquota da colônia bacteriana transformada com o vetor de interesse. As amostras foram incubadas por 10 minutos a 94^o C no termociclador para lisar a parede bacteriana, e o ciclo de *PCR* prosseguiu normalmente depois desta etapa. Esta técnica pode gerar um resultado falso-negativo, caso a lise não seja eficiente. Para genes em que não se conseguiu uma amplificação por *PCR* de colônia, partiu-se para a abordagem de *toothpick* / *PCR* de minipreparação.

Através do ensaio de *toothpick* pode-se checar se o vetor está presente na bactéria e se possui tamanho diferente do vetor controle (o mesmo vetor utilizado na recombinação, porém sem inserto). Cerca de 15 colônias foram coletadas da placa referência com um palito estéril e transferidas para tubos de polipropileno. A cada tubo foram adicionados 15 µl de solução de lise. A solução foi agitada vigorosamente e a mistura foi incubada a 65 °C por 10 minutos. Após a incubação as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8%, com uma corrente de 80 V, utilizando-se o plasmídeo sem o inserto como controle. As colônias cujos plasmídeos migraram de forma diferente do controle foram utilizadas no preparo de um inóculo em

meio LB para posterior extração dos plasmídeos por minipreparação (como descrito no item 3.3.7). Após esta etapa, foi feita uma PCR da minipreparação para confirmar a presença de insertos.

3.3.7 Mini preparação de plasmídeos

A minipreparação foi feita a fim de se isolar das bactérias os plasmídeos contendo os insertos corretos e purificá-los. Foi utilizado o método da lise alcalina, através do kit *Qiaprep[®] Spin Miniprep Kit (QIAGEN)*. As colônias positivas selecionadas foram inoculadas em 2 mL de meio LB líquido com o antibiótico canamicina na concentração de 50 µg/mL (bactérias contendo plasmídeos pDONRTM221 mais inserto de interesse) ou 100 µg/mL de ampicilina (bactérias contendo plasmídeos pDESTTM17 mais inserto de interesse). As culturas foram incubadas a 37 ° C durante 18 horas sob agitação constante de 200 rpm. Após as culturas serem centrifugadas a 12.000 x g por 1 minuto, os plasmídeos foram purificados utilizando-se o kit, segundo as recomendações do fabricante, seguindo-se o protocolo para uso em microcentrifuga. Após os procedimentos de lavagem, os plasmídeos foram eluídos em água ultrapura, dosados e armazenados a -20°C.

3.3.8 Sequenciamento

As amostras foram seqüenciadas para checagem da seqüência e a presença de mutações que pudessem prejudicar a expressão da proteína.

Os vetores de entrada contendo os insertos foram sequenciados de acordo com as especificações do kit *BigDyeTM terminator (Applied Biosystems)*, utilizando-se o sequenciador *Automatic sequencer 3730xl (Applied Biosystems)*.

3.3.9 Subclonagem em vetor de expressão pDESTTM17

A reação de recombinação entre o vetor de entrada contendo o gene de interesse e o vetor de destino pDESTTM17 , mediada pela enzima LR clonase, foi feita

de acordo com o manual do fabricante (Invitrogen - Catalog nos. 12535-019 e 12535-027). A enzima LR clonase utiliza os sítios *attL* do vetor de entrada e *attR* do vetor pDEST™17 para realizar uma recombinação específica que dará origem ao clone de expressão e a um produto secundário circular, como demonstrado na figura 6.



FIGURA 6 – ESQUEMA DA RECOMBINAÇÃO MEDIADA PELA ENZIMA LR CLONASE
 FONTE: MODIFICADO DE www.invitrogen.com

O vetor pDEST™17 é amplamente utilizado para a expressão de proteínas recombinantes em *E.coli*. Possui um promotor para a polimerase T7, um sítio de ligação a ribossomos e um códon de iniciação ATG, que permitem a expressão do gene incluso no vetor. Possui ainda uma região codificante para uma cauda de 6 histidinas (que pode ser utilizado posteriormente para a purificação das proteínas recombinantes), um gene de resistência à ampicilina (utilizado para selecionar as colônias positivas através de meio seletivo), e regiões *attR1* e *attR2*, utilizadas para a recombinação com o vetor de entrada pDONR™221, além de regiões para contra-seleção e manutenção do plasmídeo.

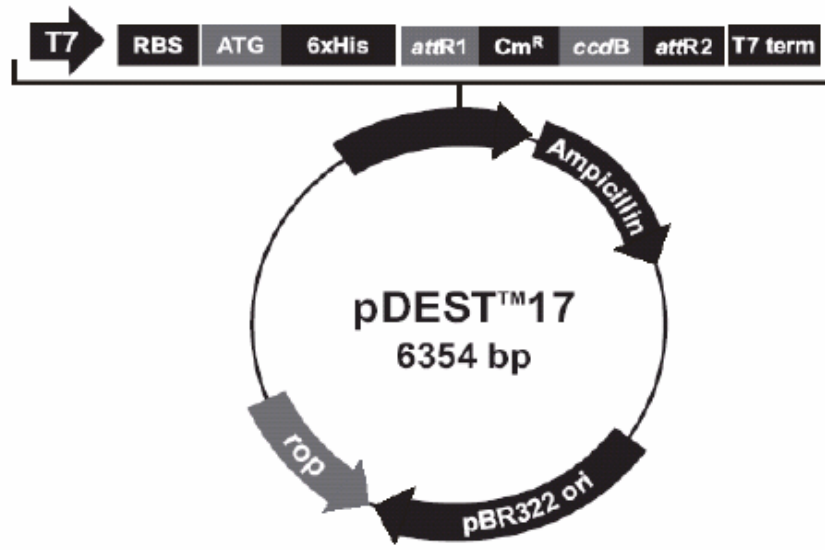


FIGURA 7 – MAPA ILUSTRATIVO DO VETOR DE EXPRESSÃO pDEST™17.

FONTE: www.invitrogen.com

T7: promotor para a RNA polimerase T7; **RBS**: Sequência de ligação a ribossomos; **ATG**: Códon de início; **6XHIS**: região codificadora para seis histidinas; **ATTR1 E ATTR2**: sequências que permitem a recombinação com o vetor pDONR™221; **CMR**: gene de resistência ao cloranfenicol para contra-seleção do plasmídeo **CCDB**: gene letal que evita o crescimento de colônias com o plasmídeo pDEST 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 do DNA para manutenção do plasmídeo;

3.3.10 Subclonagem em vetor contendo região codificante para *Green fluorescent protein (GFP)*.

Foi realizada a clonagem dos genes em estudo no vetor de superexpressão pTcPR-GFPN, que possui uma região codificadora para a *Green Fluorescent Protein (GFP)*. Este vetor foi construído no Instituto Carlos Chagas como parte de uma dissertação de mestrado (BATISTA, 2008) e, através dele, é possível expressar a proteína de interesse fusionada a GFP, e realizar ensaios de localização celular. Assim como o vetor pDEST, o pTcPR-GFPN possui regiões de recombinação com o vetor de entrada da plataforma *Gateway*. Sua construção foi baseada na estrutura do vetor

pTcPRHisN (demonstrado esquematicamente na figura 8) com substituição da sequência N-terminal das seis histidinas pelo gene da proteína GFP.

A recombinação nos vetores contendo GFP foi realizada de maneira semelhante à recombinação com pDEST17. Os vetores não foram transfectados, pois bons resultados de imunolocalização foram obtidos através do uso de antisoro, que demonstra de forma mais fiel interações protéicas nas células, já que não há necessidade de haver superexpressão. Porém, os vetores poderão ser futuramente utilizados em ensaios de dinâmica celular e para uso em questões que não possam ser respondidas através da utilização de anticorpos.

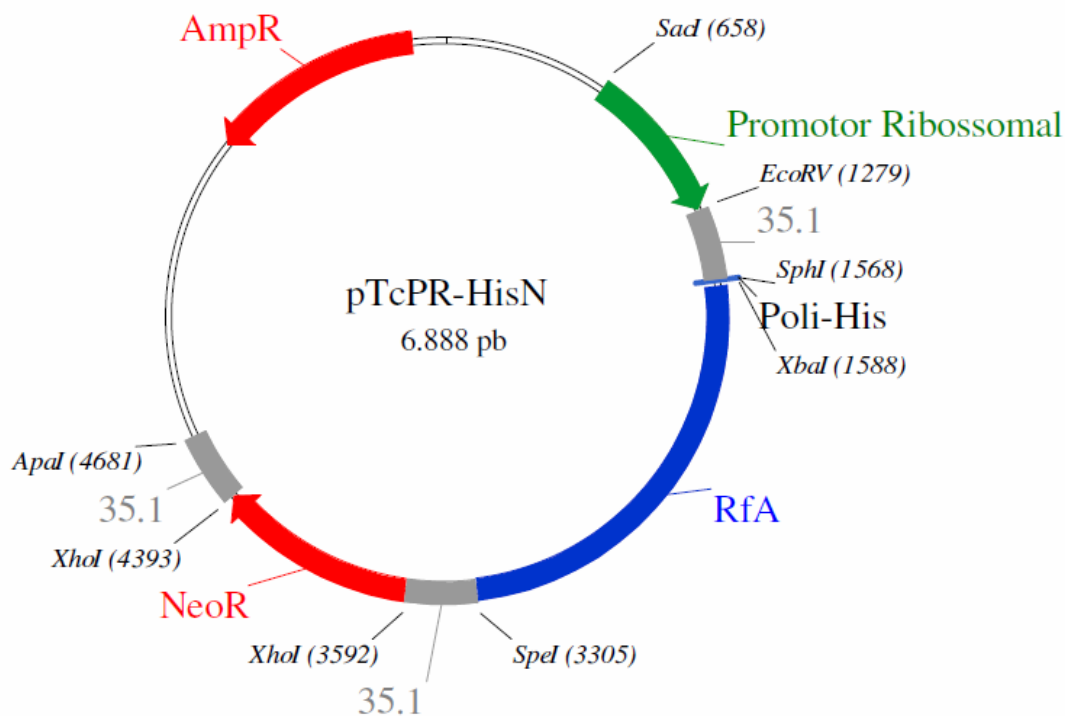


FIGURA 8 – MAPA ILUSTRATIVO DO VETOR DE EXPRESSÃO pTcPR-HisN.

35.1: Regiões intergênicas; **Sad, EcoRV, SphI, XbaI, SpeI, XhoI e ApaI:** Sítios alvo para as respectivas enzimas de restrição; **POLI-HIS:** região codificadora para seis histidinas; **RfA:** região de conversão para o sistema GATEWAY® (contem as regiões *attR1* e *attR2*); **NeoR:** gene de resistência à neomicina.

FONTE: BATISTA (2008)

3.4 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

3.4.1 Transformação de bactérias cálcio competentes com o vetor de expressão

A transformação foi feita da maneira descrita no item 3.3.4, porém foram utilizadas bactérias da cepa de expressão *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Esta bactéria contém um gene codificante para a RNA polimerase T7 sob controle do promotor *lacUV5*. O IPTG, um análogo sintético da lactose, liga-se ao repressor do operon *lacUV5* e permite que a RNA polimerase se ligue ao promotor *lac*, possibilitando a expressão da polimerase T7. Esta enzima se liga ao promotor T7 presente no vetor pDEST™17, possibilitando a expressão do inserto presente no vetor. O plasmídeo pLysS presente nesta cepa confere resistência ao antibiótico cloranfenicol e codifica para a produção da lisozima T7, que impede a expressão da RNA polimerase T7 na ausência do IPTG, o que inibe a expressão basal da proteína recombinante.

3.4.2 Testes de indução e indução em larga escala

Foram realizados alguns testes de indução em pequenos volumes para verificar se os clones selecionados expressavam as proteínas de interesse, e sob quais condições. O pré-inóculo de uma colônia bacteriana em meio de cultura LB contendo antibióticos (ampicilina 100µg/mL e cloranfenicol 34µg/mL), foi crescido a 37°C por 18 horas, sob agitação constante de 200 rpm. Após esse tempo uma alíquota da cultura foi incubada em 3mL de LB com antibióticos, na proporção de 1:50, e incubada sob as mesmas condições por 2 horas, para que as bactérias atingissem crescimento exponencial até uma densidade óptica de 0,6 a 0,8. Foi adicionado um análogo sintético da lactose (IPTG) à cultura em concentração final de 1 mM para a indução da expressão das proteínas. A partir desta etapa os protocolos de indução foram diferentes para as três proteínas: a proteína 65.180 foi induzida por 3 horas e então extraída da cultura. Para as proteínas 85.70 e 47.80 a indução foi feita por 2 horas. Todas as induções ocorreram sob agitação de 200 rpm, a 37°C. Paralelamente foram realizados

cultivos sem adição de IPTG (controle não induzido), e foram feitos extratos com ambas as culturas para o teste de expressão.

A expressão de proteínas para a inoculação em animais e obtenção de antisoro foi feita em um volume de 200 mL, sob as condições padronizadas anteriormente, e neste caso a extração das proteínas da cultura foi feita como descrito em 3.4.5.

3.4.3 Produção de extratos de *E. coli*

Para a produção de extratos foi coletado 1 mL das culturas bacterianas induzidas e não induzidas, e as bactérias foram sedimentadas por centrifugação a 5.000g por 5 minutos. O sedimento foi ressuspensão em PBS e após a adição de tampão de amostra a solução foi agitada vigorosamente e aquecida a 100 °C por 5 minutos. Os extratos foram centrifugados a 16.000g por 1 minuto e analisados em gel desnaturante de poliacrilamida (3.4.3).

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

As proteínas recombinantes e extratos utilizados neste trabalho foram analisados em gel desnaturante de poliacrilamida (*SDS-PAGE*). Este possui uma região de empilhamento (com concentração constante de acrilamida a 4,75%) e uma região de análise que possui concentração variável, dependente do peso molecular da proteína a ser estudada. Para a eletroforese de extratos (*T. cruzi* ou *E. coli*) foram utilizados géis de concentração 13%. As concentrações dos géis utilizados na análise das proteínas recombinantes foram estabelecidas variando inversamente ao peso molecular da proteína utilizada, de acordo com o padrão abaixo.

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

FIGURA 9 – QUADRO INDICATIVO DAS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS PARA OS GÉIS DESNATURANTES DE POLIACRILAMIDA

As proteínas foram misturadas com tampão de amostra, aplicadas em gel e submetidas à eletroforese com amperagem de 30 mA por gel . O marcador de peso molecular utilizado foi o *BenchMark™ Protein Ladder* (Invitrogen). Os géis foram corados com Azul de comassie R-250 por cerca de 20 minutos, e em seguida o excesso de corante foi removido com solução de descoloração.

3.4.4 Técnica de *Western Blot*

O ensaio de *Western Blot* foi utilizado para o teste das proteínas expressas (*Western Blot* anti-histidina), teste dos antisoros e avaliação do padrão de expressão das proteínas durante o ciclo de vida do *T. cruzi*.

A eletroforese em gel de proteínas desnaturante em poliacrilamida foi feita como descrito no item 3.4.3. O gel foi colocado sobre uma membrana de nitrocelulose, e o sistema foi cercado por papel filtro e encaixado em uma cuba apropriada. As amostras foram submetidas a uma corrente elétrica de 20 v por 18 horas, na presença de tampão de transferência. Desta forma as proteínas foram transferidas para a membrana, mantendo a mesma disposição espacial que apresentavam no gel de poliacrilamida, como demonstrado na figura 10.

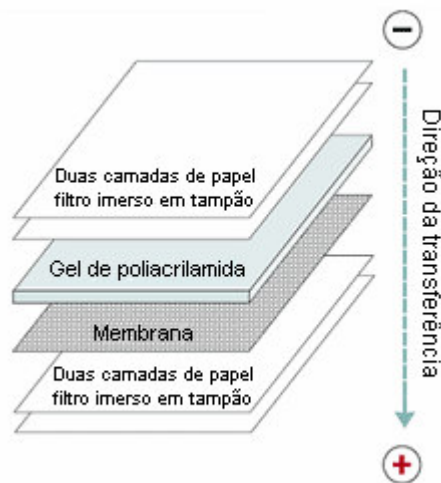


FIGURA 10 – EXEMPLO DO SISTEMA UTILIZADO NA TRANSFERÊNCIA DE PROTEÍNAS
 FONTE: MODIFICADO DE <http://www.fermentas.com/techinfo/electrophoresis/img/blotting.gif>

A membrana foi então corada com *Ponceau S* por 5 minutos e lavada com água destilada. A canaleta correspondente ao marcador foi recortada da membrana e guardada, para posterior análise dos resultados. A parte restante da membrana foi então imersa em solução de bloqueio por 1 hora. A membrana foi lavada por três vezes em PBS-Tween 0,1% e submetida à agitação de 100 rpm por 5 minutos. A partir desta etapa prosseguiu-se a incubação com os anticorpos primário e secundário de acordo com o objetivo pretendido. Após cada incubação, foram feitas três lavagens de 5 minutos com PBS-Tween 0,1%. A revelação foi feita com uma solução de 10 mL de tampão de revelação, 33 µl BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt) e 66 µl NBT (Nitro-Blue Tetrazolium Chloride). As membranas foram imersas na solução e mantidas no escuro por um intervalo variável de 2 a 15 minutos. Após este período, a reação de revelação foi interrompida através da imersão da membrana em uma solução de EDTA 10mM.

3.4.5 Extração das proteínas expressas

Após as 2 horas de indução, as culturas foram centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 7.000 g. O sobrenadante foi descartado e o sedimento bacteriano ressuspensado em tampão de sonicação. As células foram sonicadas (Homogenizador

4710 - *Cole Parmer*) durante 15 segundos na potência 9 por 5 vezes, de modo a lisar as células bacterianas. A cultura foi novamente centrifugada e o sobrenadante coletado e denominado “fração solúvel”. O sedimento restante foi ressuspenso em uma solução de purificação, que contém uréia 2M e a mistura foi agitada vigorosamente e centrifugada. O sobrenadante foi descartado e a lavagem foi repetida. Após a purificação o sedimento foi misturado ao tampão de ressuspensão de proteínas, contendo 8M de uréia, e a mistura foi sonicada novamente nas mesmas condições anteriores. Após a centrifugação de 10 minutos a 7.000xg o sobrenadante foi coletado e denominado “fração insolúvel”. Uma alíquota de cada fração foi retirada e misturada a tampão de amostra, para análise em gel desnaturante de poliacrilamida. As amostras foram armazenadas a - 20°C.

3.4.6 Purificação das proteínas por cromatografia de afinidade e eletroeluição

As proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade com coluna de Níquel-ácido nitrilotriacético. A fração contendo a proteína recombinante a ser purificada, equivalente a um volume de 5 mL, foi incubada com 1 mL de resina Ni-NTA (*Qiagen*) em agitador orbital por 1 hora a 4°C. Após esse tempo, o material não ligado à resina foi coletado por gravidade e chamado de “*flow through*”. Foram feitas três lavagens da coluna com 5 mL de tampão de ligação, e uma amostra de 1 mL do primeiro lavado foi coletada. Após as lavagens, foram feitas 5 eluições com 500 µL de tampão de eluição contendo imidazol. O imidazol compete com a histidina na ligação ao níquel e desta forma promove o desligamento das proteínas com cauda de histidina da coluna de purificação. Após esse processo, foi feita uma eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (item 3.4.3), onde foi analisada a qualidade da purificação.

Foi feita também uma segunda etapa de purificação por eletroeluição das proteínas de um gel preparativo. As frações eluídas da coluna foram misturadas a tampão de ligação em volume final de 5 mL. A amostra foi submetida a eletroforese em um gel desnaturante por 16 h a 20 mA. O gel foi então colocado em uma solução de KCl 100mM e a região do gel onde se encontrava a proteína de interesse foi cortada e colocada em uma membrana de diálise contendo cerca de 1 mL de tampão SDS-PAGE.

O sistema foi imerso no mesmo tampão e submetido a uma corrente de 60V por 2 horas. Após esse período, as proteínas eletroeluídas foram coletadas da membrana de diálise e quantificadas utilizando-se o espectrofotômetro *nanodrop ND- 1000 (Thermo scientific)*.

3.4.7 Detecção da cauda de histidina nas proteínas recombinantes

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

Foram aplicados 10 µL da proteína recombinante diluída em tampão de amostra e 5µl do marcador BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen) no gel de poliacrilamida e as etapas de eletroforese, transferência e bloqueio da membrana foram feitas como descrito anteriormente. Após a lavagem da membrana, esta foi incubada com o anticorpo anti-histidina diluído em PBS-Tween 0,1% na proporção 1:10.000, à temperatura ambiente. Após 1 hora de incubação, a membrana foi lavada por 3 vezes de 5 minutos com PBS-Tween 0,1%, e incubada com o anticorpo secundário *anti-mouse* conjugado à enzima fosfatase alcalina, diluído 1:10.000 em PBS-Tween 0,1%. Após a incubação de uma hora, foram feitas mais 3 lavagens do mesmo modo anterior, e prosseguiu-se com a revelação como descrita em 3.4.4.

3.5 OBTENÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-PROTEÍNA RECOMBINANTE

As proteínas obtidas foram inoculadas em camundongos para a obtenção de anti-soros policlonais anti-proteína recombinante, posteriormente utilizados para ensaios de imunolocalização e verificação de padrões de expressão destas proteínas em *T.cruzi*.

3.5.1 Teste do soro pré-imune

Antes das inoculações, houve a necessidade de verificar se, no soro dos animais utilizados, existia algum anticorpo que pudesse produzir uma reação cruzada com proteínas presentes no extrato de *T. cruzi*. Para realizar este teste foi retirada uma alíquota de 100 a 200 µl de sangue da cauda de cada camundongo, que foi processado conforme 3.5.3, para a obtenção do soro.

O antisoro foi testado por *Western Blot* contra extrato protéico de *T. cruzi*, como descrito anteriormente. A diluição usada neste caso foi de 1:200 e o tempo de revelação das membranas foi padronizado para 5 minutos.

3.5.2 Inoculações em camundongos e obtenção do antisoro policlonal

Foram utilizados para as inoculações, camundongos machos da linhagem *Swiss*, com mais de 40 dias de vida. Na primeira inoculação foi preparada uma solução contendo 50 µg de proteína para cada camundongo e o adjuvante completo de *Freund*, na proporção 1:1 com a solução de proteína diluída em PBS 1X. A partir da segunda inoculação, foram utilizados 20µg de proteína por camundongo, diluída em solução salina 0,9% (NaCl 150 mM) e 77µL do adjuvante Alu-gel para cada proteína inoculada. As inoculações foram feitas de forma intraperitoneal, de 10 em 10 dias. Uma semana após a 4^o inoculação, uma alíquota de 100µl de sangue foi retirada da cauda e o soro obtido como descrito em 3.5.3. O soro foi testado por *Western Blot*, e nos casos em que a produção de anticorpos foi insuficiente, uma quinta inoculação foi realizada. Ao se verificar a produção de anticorpos, os animais foram sedados com quetamina e anestesiados com xilazina e o sangue retirado por punção cardíaca. Após a retirada do sangue, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

3.5.3 Obtenção de soro a partir do sangue dos animais

O sangue obtido dos animais foi incubado à temperatura ambiente por 15 minutos e em seguida a 37°C por 15 minutos, e posteriormente centrifugado a 5.000rpm por 10 minutos. O sobrenadante (soro) foi coletado e transferido para um outro tubo, que foi armazenado a -20°C.

3.5.4 Obtenção de anticorpos policlonais a partir do lavado peritoneal de camundongos

Para um melhor aproveitamento dos animais utilizados no experimento foram obtidos, para uma das proteínas, anticorpos policlonais provenientes do lavado peritoneal dos camundongos. Após o sacrifício do animal, foi realizada uma injeção intraperitoneal de 3mL de PBS. O abdômen foi massageado por alguns segundos e o PBS recolhido novamente na seringa. A solução contendo anticorpos foi testada da mesma forma que os soros. Esta técnica foi testada pois possibilita um melhor aproveitamento dos animais de experimentação, e obtenção de uma maior quantidade de anticorpos a partir do mesmo animal.

3.5.5 Teste dos antisoros

Para o teste de qualidade dos antisoros produzidos, foi aplicado em um gel de poliacrilamida extrato protéico de *T. cruzi* (epimastigota com 3 ou 5 dias de cultivo), correspondente a 5×10^6 células por canaleta do gel. A proteína recombinante purificada foi também aplicada como um controle positivo.

O gel de proteína SDS-PAGE e o *Western Blot* foram realizados como descrito anteriormente. Antes da incubação com a solução de bloqueio, todas as regiões da membrana correspondentes às canaletas do gel foram cortadas individualmente e identificadas. Várias diluições dos anti-soros foram testadas. Após uma hora de incubação a 37°C foram feitas as lavagens, incubação com o anticorpo secundário e revelação, como descrito em 3.4.4.

3.6 IMUNOENSAIOS COM OS ANTICORPOS OBTIDOS

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

Um ensaio de *Western Blot* foi realizado com extratos de parasitas em diversas etapas do ciclo de vida. O ciclo de vida foi feito com extratos de epimastigotas com 3 e 5 dias de cultivo, parasitas sobre estresse nutricional, tripomastigotas metacíclicos e amastigotas. Foi utilizado extrato equivalente a 5×10^6 parasitas por canaleta do gel de poliacrilamida aplicado para a transferência. Após a coloração da membrana com *ponceau*, esta foi fotografada como um controle de que em todas as canaletas havia a mesma quantidade de extrato. Para uma das proteínas, foi utilizado como controle um *western blot* dos extratos utilizados com marcação da proteína GAPDH, que não sofre modulações drásticas de expressão durante o ciclo de vida do *T. cruzi*.

As membranas foram incubadas com os anti-soros nas diluições padronizadas anteriormente e com anticorpo secundário *anti-mouse* conjugado à fosfatase alcalina, e reveladas segundo o protocolo padrão.

3.6.2 Verificação da localização celular das proteínas

A localização celular das proteínas estudadas foi verificada através da realização de ensaios de imunofluorescência, utilizando-se parasitas epimastigotas com 3 ou 5 dias de cultivo e epimastigotas sob estresse nutricional.

As culturas foram centrifugadas a 5000g por 2 minutos, e os parasitas foram lavados duas vezes e ressuspensos em PBS 1,5X. Foram então submetidos à adesão sobre lâminas histológicas (previamente tratadas com poli-L-lisina por 30 minutos) numa concentração de 2×10^6 parasitas por campo da lâmina. Os parasitas foram fixados com paraformaldeído a 4% em PBS, por 10 minutos à temperatura ambiente, seguido de lavagens com PBS. Os radicais aldeídicos livres, provenientes do paraformaldeído, foram bloqueados pela incubação com solução de 50 mM de cloreto de amônio em PBS. Posteriormente, o parasita foi permeabilizado pela incubação com 0,1% de Triton X-100

em PBS por 2 minutos, seguido pelo bloqueio dos sítios de ligação inespecíficos, realizado pela incubação com solução contendo PBS-BSA 1% por 16 horas a 4°C em câmara úmida. Após o bloqueio, as lâminas foram incubadas por uma hora a 37°C com o soro contendo anticorpo primário, anti-proteína recombinante, diluído em BSA 1%. Após a incubação as lâminas foram lavadas por 3 vezes em PBS e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo, conjugado com *Alexa fluor* 488, na diluição de 1:400. As condições de incubação foram as mesmas que para o anticorpo primário.

Após as lavagens do anticorpo secundário, as lâminas foram incubadas por 10 minutos com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) na diluição 1:1000 em PBS, e a incubação foi seguida de três lavagens. Após a adição do meio de montagem n-propil-galato foi colocada uma lamínula sobre a lâmina, e o conjunto foi selado com esmalte.

As lâminas foram observadas em microscópio *Nikon E600* e as imagens capturadas com a utilização de câmara CoolSnap (*Media Cybernetics*). As análises e aquisição de imagens foram feitas com o programa *Image Pro-Plus* v. 4.5.1.22 (*Media Cybernetics*).

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA

4.1.1 Alinhamentos de sequência primária de proteínas (BLASTp)

Duas isoformas da proteína TIA1 (isoforma 1 - ref|NP_071320.2|, isoforma 2 ref|NP_071505.2|) e duas da TIAR (isoforma 1 - ref|NP_003243.1|, isoforma 2 - ref|NP_001029097.1|) de *Homo sapiens* foram utilizadas como sementes de busca para verificação da conservação da sequência primária em relação a *T. cruzi*. Algumas proteínas foram identificadas e comparadas contra o banco de dados de *Homo sapiens* para a confirmação dos resultados. Três proteínas que possuíam similaridade significativa com as proteínas humanas (tanto utilizando-se o alinhamento de proteínas humanas contra o banco de dados de *T. cruzi*, quanto utilizando proteínas de *T. cruzi* contra banco de dados de *H. sapiens*) foram utilizadas para o estudo.

- TIA1 Isoforma 1 de *Homo sapiens* x Banco de dados de *T. cruzi*

	Score	P(N)	N
Tc00.1047053506885.70 polyadenylate-binding protein 1, ...	216	2.4e-16	1
Tc00.1047053509965.180 RNA-binding protein, putative T...	169	4.3e-14	2
Tc00.1047053510747.80 hypothetical protein, conserved ...	127	4.3e-08	2

- TIA1 Isoforma 2 de *Homo sapiens* x Banco de dados de *T. cruzi*

Tc00.1047053506885.70 polyadenylate-binding protein 1, ...	216	2.4e-16	1
Tc00.1047053509965.180 RNA-binding protein, putative T...	169	4.3e-14	2
Tc00.1047053510747.80 hypothetical protein, conserved ...	127	4.3e-08	2

TIAR isoforma 1 de *Homo sapiens* x Banco de dados de *T. cruzi*

	Score	P(N)	N
Tc00.1047053506885.70 polyadenylate-binding protein 1, ...	216	2.4e-16	1
Tc00.1047053509965.180 RNA-binding protein, putative T...	169	4.3e-14	2
Tc00.1047053510747.80 hypothetical protein, conserved ...	127	4.3e-08	2

TIAR Isoforma 2 de *Homo sapiens* x Banco de dados de *T. cruzi*

Tc00.1047053506885.70	polyadenylate-binding protein 1,...	<u>176</u>	1.1e-11	1
Tc00.1047053509965.180	RNA-binding protein, putative T...	<u>169</u>	1.3e-11	2
Tc00.1047053510747.80	hypothetical protein, conserved ...	<u>159</u>	5.2e-10	1

Tc00.1047053506885.70 x Banco de dados de *Homo sapiens*

ref NP_071320.2	TIA1 protein isoform 1 [Homo sapiens]	87.0	4e-17
ref NP_071505.2	TIA1 protein isoform 2 [Homo sapiens]	85.9	1e-16
ref NP_003243.1	TIA-1 related protein isoform 1 [Homo sapiens]	77.0	4e-14

Tc00.1047053510747.80 x Banco de dados de *Homo sapiens*

ref NP_001029097.1	TIA-1 related protein isoform 2 [Homo sap...]	57.8	2e-08
ref NP_003243.1	TIA-1 related protein isoform 1 [Homo sapiens]	51.2	2e-06
ref NP_071320.2	TIA1 protein isoform 1 [Homo sapiens]	45.4	9e-05
ref NP_071505.2	TIA1 protein isoform 2 [Homo sapiens]	42.7	6e-04

Tc00.1047053509965.180 x Banco de dados de *Homo sapiens*

ref NP_071505.2	TIA1 protein isoform 2 [Homo sapiens]	82.8	1e-15
ref NP_071320.2	TIA1 protein isoform 1 [Homo sapiens]	81.6	2e-15
ref NP_003243.1	TIA-1 related protein isoform 1 [Homo sapiens]	73.9	5e-13
ref NP_001029097.1	TIA-1 related protein isoform 2 [Homo sap...]	68.2	3e-11

FIGURA 11 – ALINHAMENTOS DE PROTEÍNAS DE *T. cruzi* e *H. sapiens* ATRAVÉS DE BLASTP

4.1.2 Análise dos domínios das proteínas

Após a análise de similaridade de sequências de aminoácidos foi realizada uma busca por domínios conservados, preferencialmente de ligação a RNA. Foi observado que as três proteínas selecionadas inicialmente possuíam domínios denominados RRM (*RNA Recognition motifs*).

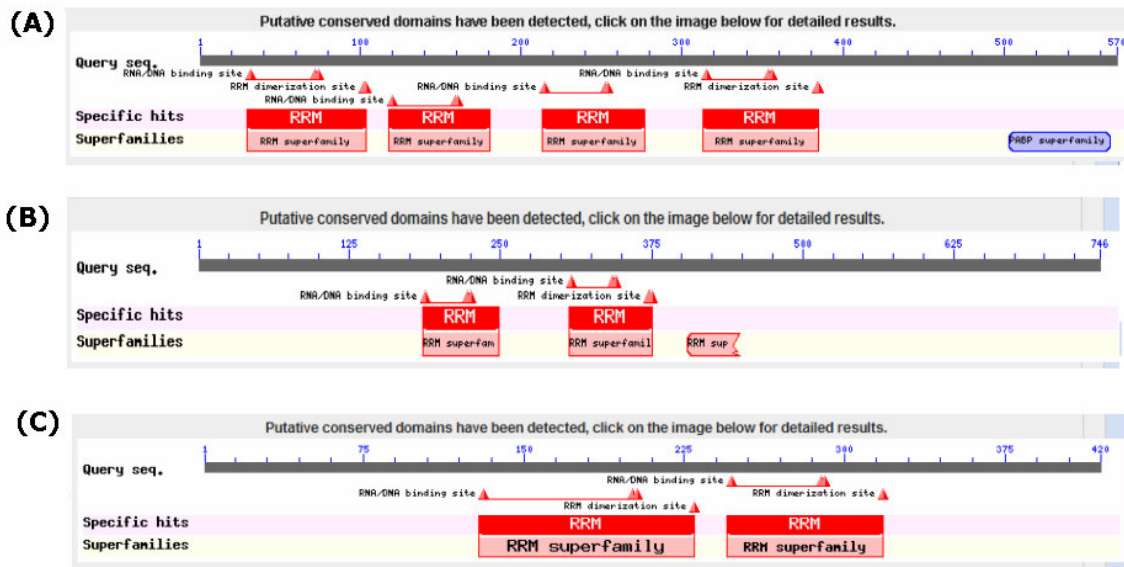


FIGURA 12 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS DOMÍNIOS PRESENTES NAS PROTEÍNAS 85.70 (A), 65.180 (B) e 47.80 (C)

FONTE: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Os domínios RRM, também chamados de RBD (*RNA Binding Domains*) ou RNP (*Ribonucleoprotein domains*) são domínios muito abundantes em eucariotos. São encontrados preferencialmente em proteínas que possuem funções relacionadas a mecanismos de regulação pós-transcricional, como processamento e controle da estabilidade de RNA mensageiro, processamento de RNA ribossomal e exportação de RNA do núcleo. Podem ser ainda encontrados em proteínas nucleares envolvidas em *splicing* alternativo, como as hnRNPs (*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*). Os domínios RRM costumam interagir com RNA simples fita, mas também podem interagir com DNA simples fita e com proteínas. O sítio de ligação aos alvos tem tamanho variável para cada proteína (variando de 2 a 8 nucleotídeos), e geralmente localizam-se nos motivos RNP1 e RNP2, regiões bastante conservadas presentes nos domínios RRM (revisto por MARIS, DOMINGUEZ e ALLAIN, 2005).

As três proteínas foram selecionadas para o prosseguimento dos estudos, pois além da similaridade de sequência, possuem domínios RRM similares àqueles presentes nas proteínas que foram utilizadas como semente de busca para os alinhamentos.

4.3 CLONAGEM MOLECULAR UTILIZANDO O SISTEMA *GATEWAY*®

4.3.1 Síntese de oligonucleotídeos iniciadores e amplificação dos genes por Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação inicial dos genes em estudo foram construídos de acordo com os requerimentos do sistema *Gateway*® (3.2.2), e os genes foram amplificados por PCR (Figura 13).

85.70 F	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGGAAGGAGATAATGCTGGCAGTAAATAAACC 3'
85.70 R	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGCCTTTAGGACGCAGAGT 3'
65.180 F	5' GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGGAAGGAGATAATGAGTGGGCCACTGCAGAAACC 3'
65.180 R	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGCCTTCTTTCGTAAGCAGCG 3'
47.80 F	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGGAAGGAGATAATGTCACTGACGGAAGAAT 3'
47.80 R	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTCCGGGTTTCGCATCTT 3'

FIGURA 13 – SEQUÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DOS GENES EM ESTUDO

Alíquotas dos *amplicons* purificados foram misturadas ao tampão de aplicação *Ficoll* e submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%. O tamanho dos *amplicons* corresponde ao esperado para os 3 genes: 1713 pares de base (pb) para 85.70, 1266 pb para 47.80 e 2241pb para 65.180 , possibilitando a purificação e posterior clonagem no vetor de entrada do sistema *Gateway*® pDONR™ 221 (Figura 14).

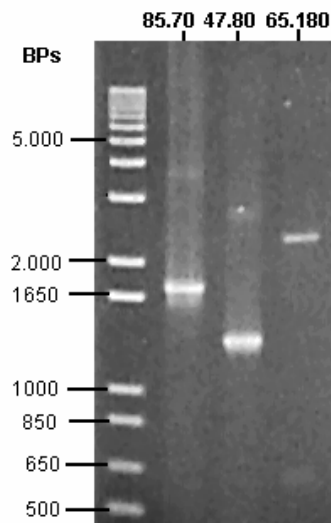


FIGURA 14 – PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE PCR PURIFICADOS PARA OS GENES 85.70, 47.80 E 65.180

BPs: marcador de peso molecular estipulado em pares de base.

4.3.2 Clonagem no vetor de entrada pDONR™ 221

Os *amplicons* de interesse foram clonados no vetor pDONR™221 (3.3.3) e utilizados para transformar bactérias *E.coli* cálcio-competentes da cepa DH5α. As bactérias transformadas foram crescidas em uma placa de meio sólido seletivo e as colônias obtidas foram transferidas para uma placa referência onde foram numeradas.

Para identificar clones positivos, ou seja, que continham o gene de interesse, foi realizada PCR de colônia de 5 colônias para cada gene, e foi observado que para todos os três genes houve ao menos um clone positivo (Figura 15). Foram utilizados para prosseguir os experimentos o clone 1 de 85.70, clone 1 de 47.80 e o clone 8 de 65.180. Os plasmídeos foram extraídos das bactérias selecionadas através da técnica de minipreparação (3.3.7).

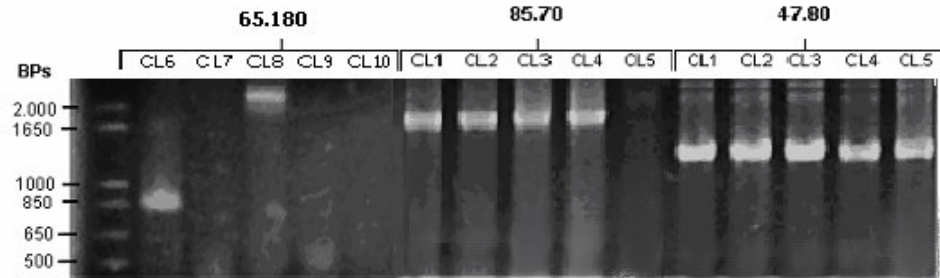


FIGURA 15 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE AMPLICONS OBTIDOS A PARTIR DE PCR DE COLÔNIA DE BACTÉRIAS TRANSFORMADAS COM OS CLONES DE ENTRADA

BPs: marcador de peso molecular (em pares de base); **CL(1 a 10):** numeração dos clones testados, obtida através da distribuição das colônias na placa referência; **85.70, 47.80 e 65.180:** clones correspondentes aos respectivos genes.

4.3.3 Sequenciamento

Após a clonagem no vetor de entrada, cada gene foi sequenciado com seus iniciadores específicos *Forward* e *Reverse*. As sequências nucleotídicas obtidas foram traduzidas e alinhadas com sequências protéicas do banco de dados *GenBank* através da ferramenta *Blastx*, disponível para uso no *site* do *National Center of Biotechnology Information - NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) como demonstrado na figura 16.

(A) Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value	
ref XP_821518.1 polyadenylate-binding protein 1 [Trypanosoma...	53.5	2e-07	G
ref XP_821609.1 poly(A)-binding protein [Trypanosoma cruzi s...	38.1	0.007	G
ref XP_810891.1 hypothetical protein [Trypanosoma cruzi stra...	32.0	0.49	G

(B) Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value	
ref XP_821518.1 polyadenylate-binding protein 1 [Trypanosoma...	157	6e-39	G
ref XP_819655.1 dispersed gene family protein 1 (DGF-1) [Try...	31.6	0.63	G
ref XP_807178.1 hypothetical protein [Trypanosoma cruzi stra...	31.6	0.63	G

(C) Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value	
ref XP_808733.1 helicase-like protein [Trypanosoma cruzi str...	37.7	2e-04	G

(D) Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value	
ref XP_820235.1 RNA-binding protein [Trypanosoma cruzi strai...	45.8	2e-05	G
ref XP_806865.1 RNA-binding protein [Trypanosoma cruzi strai...	45.8	2e-05	G
ref XP_808733.1 helicase-like protein [Trypanosoma cruzi str...	28.5	0.043	G

(E) Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value	
ref XP_817185.1 hypothetical protein [Trypanosoma cruzi stra...	166	2e-41	G
ref XP_815201.1 hypothetical protein [Trypanosoma cruzi stra...	163	1e-40	G
ref XP_814427.1 hypothetical protein [Trypanosoma cruzi stra...	30.0	1.8	G

(F) Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value	
ref XP_817185.1 hypothetical protein [Trypanosoma cruzi stra...	139	2e-33	G
ref XP_815201.1 hypothetical protein [Trypanosoma cruzi stra...	137	1e-32	G
ref XP_807628.1 hypothetical protein [Trypanosoma cruzi stra...	30.4	1.4	G

FIGURA 16 – RESULTADOS DOS ALINHAMENTOS DO TIPO BLASTx ENTRE OS FRAGMENTOS SEQUENCIADOS E PROTEÍNAS PROVENIENTES DE BANCO DE DADOS DE *T.cruzi*. Alinhamentos com os fragmentos sequenciados 85.70 *forward* (A); 85.70 *reverse* (B); 65.180 *forward* (C); 65.180 *reverse* (D); 47.80 *forward* (E) e 47.80 *reverse* (F). As proteínas de interesse estão marcadas em verde.

Cada gene foi sequenciado com os iniciadores *forward* e *reverse*. Para 85.70 a proteína correta apareceu como primeiro *hit* no alinhamento, e as outras proteínas que apareceram apresentaram um valor de E muito alto, o que torna o alinhamento das

sequências pouco confiável. Isso ocorreu tanto para o fragmento sequenciado com o oligonucleotídeo *forward* quando para o *reverse*.

Para o gene 65.180, o fragmento amplificado com *forward* reconheceu uma proteína semelhante a uma helicase, que não possui semelhanças significantes com a proteína 65.180 de *T. cruzi*, o que foi verificado através de BLASTp utilizando-se as sequências para as duas proteínas presentes no banco de dados do NCBI. Foi utilizada então a ferramenta *vecscreen* do NCBI para localizar prováveis regiões de vetor na sequência, uma vez que a presença destes fragmentos pode levar a um falso resultado.

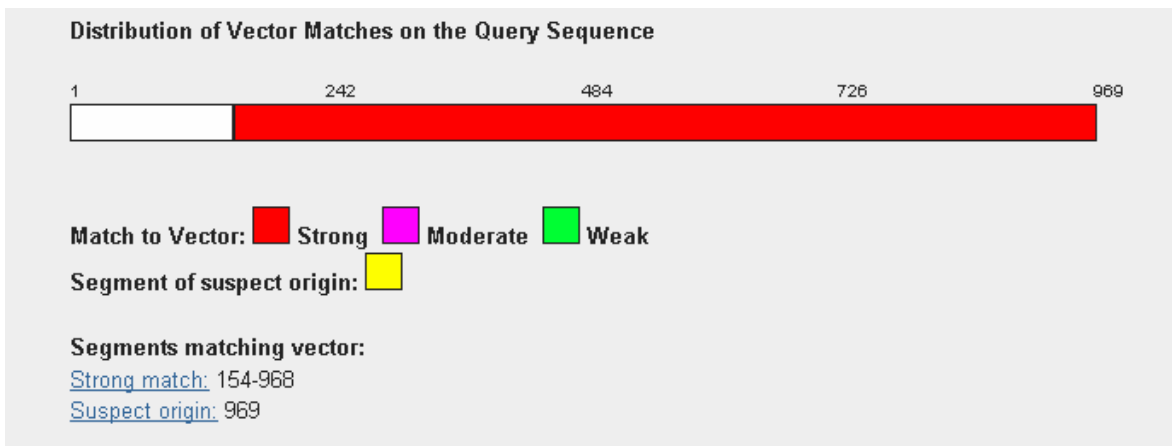


FIGURA 17 – VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE SEQUÊNCIAS DE VETOR NO *AMPLICON* SUBMETIDO A ANÁLISES ANTERIORES

FONTE: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Uma grande parte da sequência apresentou similaridade forte com o vetor de clonagem, e somente um fragmento de 154 nucleotídeos correspondia ao inserto (Figura 17). O pequeno tamanho da sequência alinhada pode ter levado a um resultado pouco específico. Para o fragmento 65.180 *reverse*, o primeiro *hit* do alinhamento foi a proteína de interesse, porém no segundo *hit* também apareceu uma proteína bastante similar ao fragmento (806865.1). Foi realizado então um alinhamento das sequências das proteínas 65.180 e 806865.1, através da ferramenta *CLUSTAL W* (www.ebi.ac.uk/clustalw/).

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

gi|71666555|ref|XP_820235.1|      MSGPLQNPGGFIPREPPGMPPLPPGFKIPPGMTFPZAPPMPPGGAZMPFNL 50
gi|71408993|ref|XP_806865.1|      -----

gi|71666555|ref|XP_820235.1|      RVGAPPQPRIQVGNMGSAAGAPVPMPPGQYTMPPGKYPQPPAHLVPRPR 100
gi|71408993|ref|XP_806865.1|      -----

gi|71666555|ref|XP_820235.1|      GDVHGFQMHQQLLPPGLVRNPNEMYAARDHAPVLLPGADPHGYPASSY 150
gi|71408993|ref|XP_806865.1|      -----

gi|71666555|ref|XP_820235.1|      PQGPTGSAVQPEAGDHRGCHLYRGEREDELREPTMTWVGNLDELHETEE 200
gi|71408993|ref|XP_806865.1|      -----

gi|71666555|ref|XP_820235.1|      VLRSEFSEFGRWIRIARVDPKSYCFVHFRTVEEARNAVEALZARGSLGRA 250
gi|71408993|ref|XP_806865.1|      -----

gi|71666555|ref|XP_820235.1|      RPNYGMFEXTQEELMPDQVTHRPERRGREEDRHMDDRRRRERREEE 300
gi|71408993|ref|XP_806865.1|      -----

gi|71666555|ref|XP_820235.1|      RMEPTNVLGLDLPTVSNELNEMFKVF GKINTISRLDSRNMAFIHFET 350
gi|71408993|ref|XP_806865.1|      -----

gi|71666555|ref|XP_820235.1|      IEDCTQALDLMEDQPIGGARVVLNYSRQRMPTS TETGLTPDGIQVNETP 400
gi|71408993|ref|XP_806865.1|      -----P 1
*

gi|71666555|ref|XP_820235.1|      TNWVYLQQLASDWTGEGDGEDLFEPFEGFINSKFIQS 3GIAPGHFDSIEHA 450
gi|71408993|ref|XP_806865.1|      TNWVYLQQLASDWTGEGDGEDLFEPFEGFINSKFIQS 3GIAPGHFDSIEHA 51
*****

gi|71666555|ref|XP_820235.1|      RARRIALNNALLRGAPLEISFGKSNHTMTMADFMRRGKPAFLGNDSDNGD 500
gi|71408993|ref|XP_806865.1|      RARRIALNNALLRGATLRIISFGKSNHTMTMADFMRRGKPAFLGNDSDANGD 101
*****

gi|71666555|ref|XP_820235.1|      FTAMPPPALGLGGVNGALVAGPGAPADA GANVS LPTMGVMVGSQAAPP 550
gi|71408993|ref|XP_806865.1|      FTAMPPPALGLGGVNGALVAGPGAPADA GANVS LPTMGVMVGSQAAPP 151
*****

gi|71666555|ref|XP_820235.1|      PTFTRERPTPEMTLDARLQSLLGATYNNCGEADKSVSPSVIQAIICLDVD 600
gi|71408993|ref|XP_806865.1|      PTFTRERPTPEMTLDARLQSLLGATYNNCGEADKSVSPSVIQAIICLDVD 201
*****

gi|71666555|ref|XP_820235.1|      GCVDEQSMKRLDDTIFLYTPLNSSHVFGILAKRIHDYFNDDPHKLLVLY 650
gi|71408993|ref|XP_806865.1|      GCVDEQSMKRLDDTIFLYTPLNSSHVFGILAKRIHDYFNDDPHKLLVLY 251
*****

gi|71666555|ref|XP_820235.1|      ASTRALLGANTDYLLFTKAALNAYLMLLFVASEGQTPGGMEMLTSI IENV 700
gi|71408993|ref|XP_806865.1|      ASTRALLGANTDYLLFTKAALNAYLMLLFVASEGQTPGGMEMLTSI IENV 301
*****

gi|71666555|ref|XP_820235.1|      HRMPFIERQELDAEFIEVFREQLDEIHRRAKVEQDLASLLTKRRR 746
gi|71408993|ref|XP_806865.1|      HRMPFIERQELDAEFIEVFREQLDEIHRRAKVEQDLASLLTKRRR 347
*****

```

FIGURA 18 – ALINHAMENTO ENTRE AS PROTEÍNAS 65.180 (ACIMA) E 806865.1 (ABAIXO). O símbolo “*” representa aminoácidos idênticos entre as sequências comparadas, enquanto “.” representa substituição semi-conservativa de aminoácidos.

FONTE: www.ebi.ac.uk/clustalw/

Através deste alinhamento observou-se que a proteína 806865.1 possui cerca de metade do tamanho da proteína 65.180 e semelhança quase total em seus

aminoácidos, sugerindo que esta sequência presente no banco de dados seja proveniente do sequenciamento de uma proteína truncada ou um sequenciamento parcial, já que não há no início da sequência um códon ATG (Metionina), característico do início de proteínas. Portanto as sequências para 65.180 foram consideradas corretas.

Os alinhamentos para os fragmentos *forward* e *reverse* de 47.80 indicaram a proteína no segundo *hit*. A proteína identificada no primeiro *hit*, também com bastante similaridade com o fragmento (817185.1), teve sua sequência comparada à da proteína 47.80, da mesma forma feita anteriormente com 65.180.

```

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

gi|71653118|ref|XP_015201.1|      MSLTEELFGLP GP3LAAGVTNERDVP EEMPL3FAPTAKA&FDL&ALAPQV 50
gi|71657236|ref|XP_017185.1|    MSLTEELFGLP GP3SAAG IKNERDVP EGMPL3FAPA&KKA&FDL&ALAPQV 50
*****:*****:*****:*****:*****

gi|71653118|ref|XP_015201.1|      KKPTRKQQLLELQKTF&EKDGTQGGEGSDBQEA&GDPFKTVLLTEELGV 100
gi|71657236|ref|XP_017185.1|    KKPTRKQQLLELQKTF&DKDGTQGGEGSDBQEA&GDPFKTVLLTEELGV 100
*****:*****:*****:*****:*****

gi|71653118|ref|XP_015201.1|      GKAAEKKG IKS NKHLR&ALHEMKEEE SETVFGNLYMDGKBRIVKIFMN 150
gi|71657236|ref|XP_017185.1|    GKAAEKKG IKS NKHLR&ALHEMKEEE SETVFGNLYMDGKBRIVKIFMN 150
*****:*****:*****:*****:*****

gi|71653118|ref|XP_015201.1|      CGAIECVIRIQA&LEG GGEGERNENRHKSVGSAIRVLRGEIKKGDQTS& 200
gi|71657236|ref|XP_017185.1|    CGAIECVIRIQA&LEG GGEGERNENRHKSVGSAIRVLRGEIKKGDQTS& 200
*****:*****:*****:*****:*****

gi|71653118|ref|XP_015201.1|      V&YVLFKDEGS VTK&LEMNGVVDGRHIVVTMD&E SREY&PETSVFIGN 250
gi|71657236|ref|XP_017185.1|    V&YVLFKDEGS VTK&LEMNGVVDGRHIVVTMD&E SREY&PETSVFIGN 250
*****:*****:*****:*****:*****

gi|71653118|ref|XP_015201.1|      I&YDTMEEMW&NFLENGVTDVRRVRLVDRDITG SCNGFGYVEFRSP&SV 300
gi|71657236|ref|XP_017185.1|    I&YDTMEEMW&NFLENGVTDVRRVRLVDRDITG SCNGFGYVEFRSP&SV 300
*****:*****:*****:*****:*****

gi|71653118|ref|XP_015201.1|      S&A I&VRGSHLNGREMRI VHWQKS&V&S&TKPS&REK&K&EA&QT&A&GRGQ 350
gi|71657236|ref|XP_017185.1|    S&A I&VRGSHLNGREMRI VHWQKS&V&S&TKPS&REK&K&EA&QT&A&GRGQ 350
*****:*****:*****:*****:*****

gi|71653118|ref|XP_015201.1|      NDEKTKKLR&EENGT&RQ&NA&EG&F&S&M&GV&V&P&R&K&K&PK&DLR&PL&VE&GK 400
gi|71657236|ref|XP_017185.1|    NDEKTKKLR&EENGT&R&H&A&NA&EG&F&S&M&GV&V&P&R&K&K&PK&DLR&PL&VE&GK 400
*****:*****:*****:*****:*****

gi|71653118|ref|XP_015201.1|      RGR&PASGL&R&P&V&K&R&M&R&N&P&EK 421
gi|71657236|ref|XP_017185.1|    RGR&PASGL&R&P&V&K&R&M&R&N&P&EK 421
*****:*****:*****:*****:*****

```

FIGURA 19 – ALINHAMENTO ENTRE AS PROTÉINAS 47.80 (ACIMA) E 817185.1 (ABAIXO). O símbolo “*” representa aminoácidos idênticos entre as sequências comparadas, enquanto “.” representa substituição semi-conservativa de aminoácidos, e “:” representa substituições conservativas.

FONTE: www.ebi.ac.uk/blast/

Foi observada uma grande quantidade de aminoácidos idênticos entre as duas proteínas, levando a crer que 817185.1 seja uma cópia de 47.80 presente no genoma.

Portanto os três vetores de entrada contendo os insertos sequenciados foram utilizados para prosseguir o trabalho.

4.3.4 Subclonagem no vetor de expressão pDEST™17

Após a confirmação, foi feita a recombinação dos vetores de entrada contendo os genes de interesse com o vetor de expressão pDEST™17 e transformação de bactérias *E.coli* DH5α cálcio-competentes com o vetor de expressão, seguida de crescimento em placa contendo meio de cultura seletivo sólido. Em seguida foi feito o teste para a presença de insertos através de PCR de colônia. Foi realizada a PCR de 18 colônias, 9 testadas para o gene 47.80 e 9 para o gene 85.70. Foram encontradas colônias positivas para ambos, e o clone 1 de 85.70 e o clone 12 de 47.80 foram utilizados para prosseguir o trabalho.

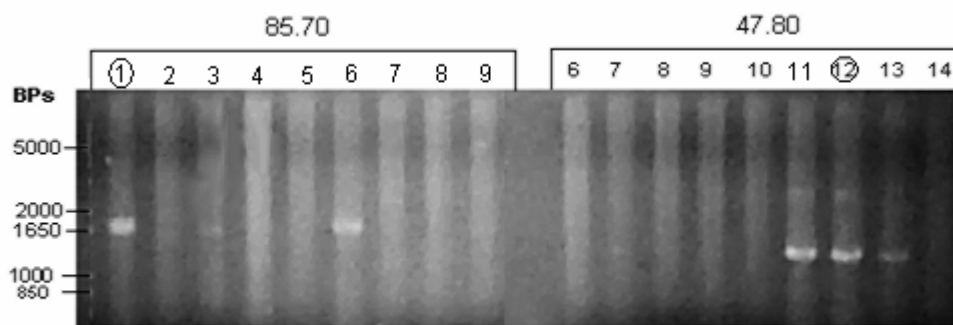


FIGURA 20 – PERFIL ELETROFORÉTICO DOS AMPLICONS PROVENIENTES DE PCR DE COLÔNIA DE BACTÉRIAS TRANSFORMADAS COM OS CLONES DE EXPRESSÃO

BPs: Marcador de peso molecular, em pares de base; **1 a 9** : Números dos clones utilizados para o gene 85.70; **6 a 14**: Números dos clones utilizados para o gene 85.70; **NUMEROS CIRCULADOS:** Números dos clones selecionados para minipreparação.

Não foram identificadas colônias positivas para o gene 65.180 e foi então realizado um *toothpick* de 15 colônias da placa referência de 65.180, pois a técnica de PCR de colônia pode gerar resultados falso-negativos. Dois perfis de migração dos plasmídeos foram encontrados através da técnica de *toothpick*, portanto dois clones

foram selecionados (2 e 7) e, com eles, foi realizada uma minipreparação de DNA plasmidial.

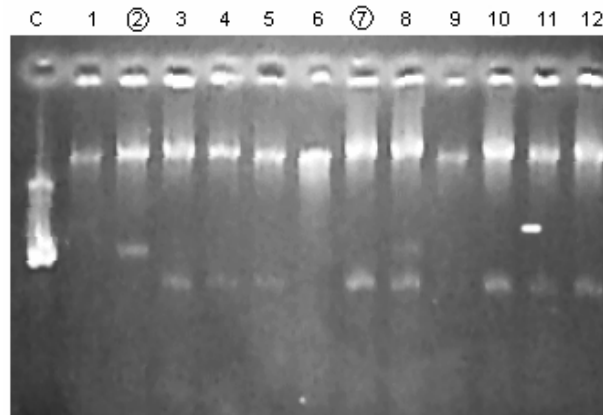


FIGURA 21– PERFIL ELETROFORÉTICO DOS VETORES DE EXPRESSÃO ISOLADOS DE BACTÉRIAS TRANSFORMADAS COM PLASMÍDEOS CONTENDO O GENE 65.180

C: vetor que não sofreu recombinação com amplicons, utilizado como controle; **1 a 12:** numeros dos clones bacterianos testados por *toothpick*. **Números circulos:** clones utilizados para isolamento de plasmídeos (minipreparação

Foi realizada uma PCR dos plasmídeos isolados obtidos por minipreparação, e observou-se que um dos clones apresentou o tamanho esperado de 2241 pares de base. O clone 2, de tamanho correto, foi então utilizado para prosseguir os experimentos.

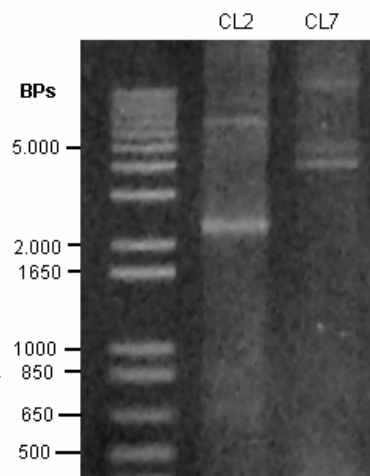


FIGURA 22 – PERFIL ELETROFORÉTICO DOS AMPLICONS PROVENIENTES DE PCR DA MINIPREPARAÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO PARA O GENE 65.180

CL2 E CL7: amplicons provenientes dos clones bacterianos 2 e 7, respectivamente.

4.3.5 Subclonagem em vetor contendo uma região codificante para *GFP*

Foi realizada outra subclonagem, em vetor que permite a expressão da proteína de interesse fusionada a *GFP* (3.3.10), seguida de transformação em bactérias cálcio competentes, da mesma forma feita para seleção dos clones presentes nos vetores de expressão. Para confirmação das clonagens de todos os genes foi utilizada a técnica de *toothpick* seguida de minipreparação de dois clones com perfis eletroforéticos diferentes do controle e PCR dos plasmídeos purificados.

Foram obtidos dois clones positivos para 47.80 (28 e 29) e dois para 85.70 (22 e 26). Os plasmídeos não chegaram a ser transfectados em *T. cruzi* para uso neste trabalho, e foram armazenados a -20°C . Para a proteína 65.180 foram feitas duas tentativas de recombinação, porém nenhuma delas gerou clones positivos.

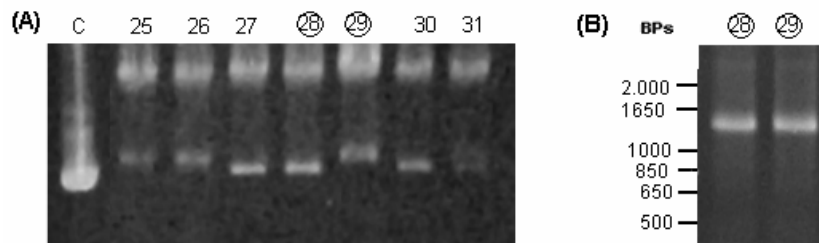


FIGURA 23 – SELEÇÃO DE CLONES POSITIVOS PARA 47.80 – GFP ATRAVÉS DE *TOOTHPICK* (A) E PCR DE MINIPREPARAÇÃO (B)

C: plasmídeo que não sofreu recombinação, utilizado como controle; **25 a 31:** números dos clones bacterianos testados; **Números circulosados:** clones selecionados para minipreparação.

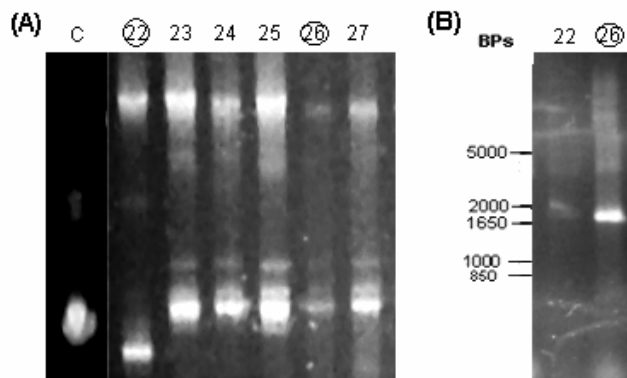


FIGURA 24 – SELEÇÃO DE CLONES POSITIVOS PARA 85.70 – GFP ATRAVÉS DE *TOOTHPICK* (A) E PCR DE MINIPREPARAÇÃO (B)

C: plasmídeo que não sofreu recombinação, utilizado como controle. **22 a 27:** números dos clones bacterianos testados. **Números circulosados:** clones selecionados para minipreparação.

4.4 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

4.4.1 Testes de expressão das proteínas recombinantes

As bactérias transformadas com os vetores de expressão foram utilizadas para a realização de testes de indução (3.4.2). Os extratos bacterianos induzidos foram analisados por SDS-PAGE e comparados a extratos bacterianos obtidos de culturas não-induzidas. As três proteínas recombinantes foram obtidas com pequenas variações no protocolo de indução utilizado para cada uma delas (3.4.2), e apresentaram cerca de 10 Kilodaltons (kDa) a mais do que a proteína original encontrada no parasita, devido à cauda de histidina e à ausência de códons de parada nos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação dos genes, o que torna as proteínas ligeiramente maiores. O tamanho final das recombinantes foi aproximadamente 93 kDa para 65.180, 57 kDa para 47.80 e cerca de 70 kDa para 85.70, quando seus tamanhos originais deveriam ser 83kDa, 47kDa e 63kDa, respectivamente.

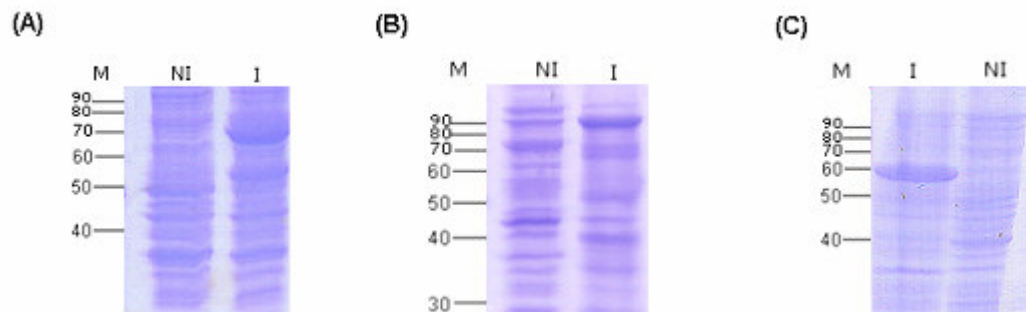


FIGURA 25 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE EXTRATOS DE BACTÉRIAS TRANSFORMADAS COM VETORES DE EXPRESSÃO, INDUZIDAS E NÃO -INDUZIDAS
Análise por SDS-PAGE dos extratos de bactérias induzidas para a proteína 85.70 (A), 65.180 (B) e 47.80 (C); Marcador de peso molecular; NI: controle negativo não – induzido; I: Extrato de bactérias induzidas.

Este teste permitiu a padronização das condições de indução, que foram posteriormente utilizadas para a expressão em maior escala das proteínas recombinantes.

4.4.2 Expressão em larga escala e extração das proteínas recombinantes

Após a padronização das condições de expressão as proteínas foram expressas em um volume de 200 mL de meio de cultura, utilizando-se as mesmas condições anteriores. Após o cultivo as células foram lisadas e as proteínas extraídas em duas frações distintas, solúvel e insolúvel (3.4.5).

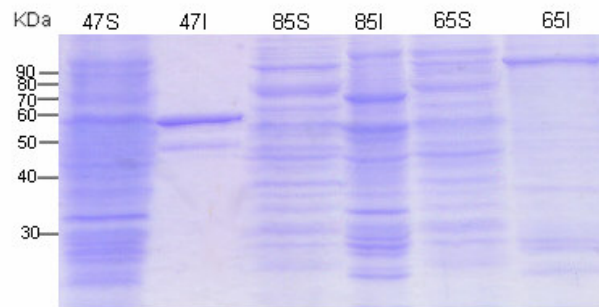


FIGURA 26 –PERFIL ELETROFORETICO DAS PROTEÍNAS EXTRAÍDAS NA INDUÇÃO EM LARGA ESCALA. As proteínas foram extraídas em frações distintas, solúvel e insolúvel. **47S** : 47.80 solúvel; **47I**: 47.80 insolúvel; **85S**: 85.70 solúvel; **85I**: 85.70 insolúvel; **65S**: 65.180 solúvel; **65I**: 65.180 insolúvel.

Grande parte das proteínas foi obtida na forma insolúvel, devido à formação de corpos de inclusão, característicos quando se realiza expressão heteróloga de proteínas recombinantes em *E. coli*. A extração dessas proteínas foi realizada sob condições desnaturantes (tampão contendo alta concentração de uréia). Uma pequena parte foi obtida na forma solúvel, provavelmente mantendo sua estrutura nativa.

4.4.3 Purificação por cromatografia de afinidade

As proteínas obtidas foram purificadas por cromatografia de afinidade (3.4.6), através de incubação da fração insolúvel em coluna contendo níquel, que possui afinidade pela cauda de histidina presente nas proteínas, induzindo a ligação à coluna. Após as lavagens com tampão de ligação, cada coluna foi lavada por cinco vezes com tampão contendo imidazol, provocando a eluição da proteína recombinante por

competição. Foram coletadas as frações eluídas de 1 a 5, assim como uma alíquota da primeira lavagem com tampão de ligação, para análise por SDS-PAGE.

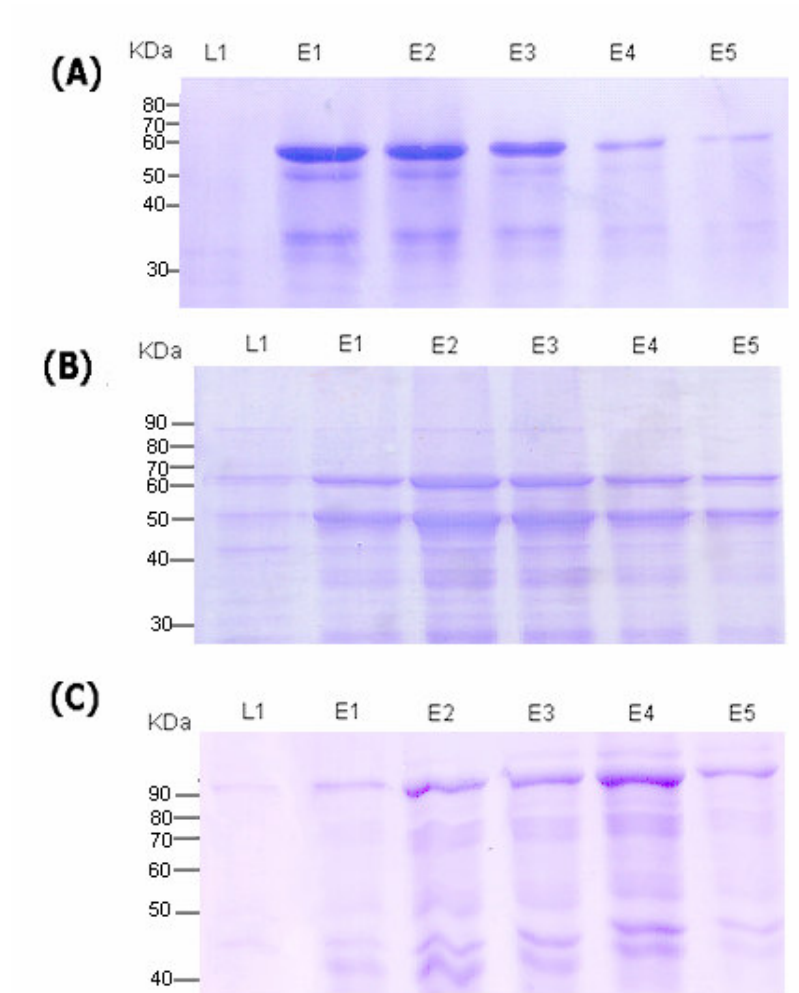


FIGURA 27 – PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS PURIFICADAS POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

L1: alíquota da primeira lavagem; **E1 E2 E3 E4 e E5**: 1^a 2^a 3^a 4^a e 5^a frações eluídas da coluna em tampão contendo imidazol para as proteínas 47.80 (A) ,85.70 (B) e 65.180(C).

Foram observadas, nos géis, outras proteínas além da recombinante de interesse, portanto foi necessária a utilização de outras estratégias de purificação.

4.4.4 Purificação por gel preparativo

Como a etapa anterior não foi suficiente para a obtenção da proteína recombinante purificada, foi realizada uma segunda etapa de purificação. As frações eluídas da coluna NI-NTA foram misturadas com tampão de amostra e submetidas a eletroforese em um gel preparativo, e posteriormente a proteína do interesse foi eletroeluída do gel (3.4.6). Os eletroeluídos foram analisados por SDS-PAGE, e observou-se que as três proteínas foram eficientemente purificadas através desta técnica. Foram obtidos aproximadamente 2 mL de cada proteína. A proteína 47.80 foi obtida na concentração de 0,23 mg/mL, 85.70 na concentração de 0,19 mg/mL e 65.180 na concentração de 0,09 mg/mL. A proteína 65.180 foi concentrada e dosagem final foi 0,35 mg/mL.

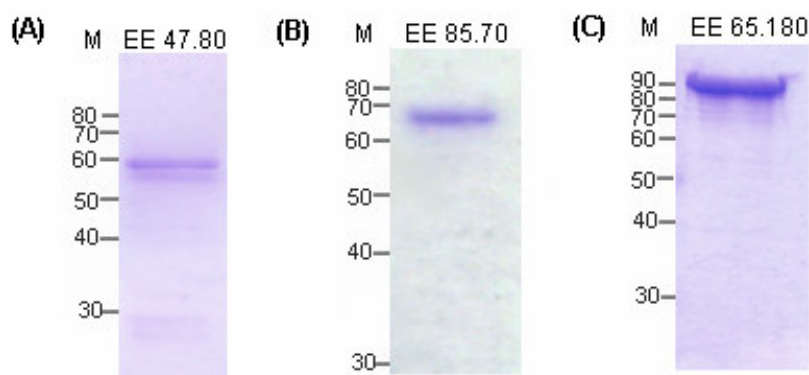


FIGURA 28 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES 47.80 (A); 85.70 (B) e 65.180 (C) ELETROELUÍDAS DE GEL PREPARATIVO

M: marcador de peso molecular em kDa; **EE47.80**, **EE85.70** e **EE65.180**: eletroeluídos referentes às proteínas 47.80, 85.70 e 65.180, respectivamente.

4.4.5 Identificação da cauda de histidina nas proteínas purificadas

Como uma última confirmação de que as proteínas purificadas eram as de interesse, foi realizado um ensaio de *western blot* utilizando-se um anticorpo primário anti-histidina produzido em camundongos (3.4.7). Para as três proteínas estudadas foi verificado um tamanho correto e reconhecimento da cauda de histidina.

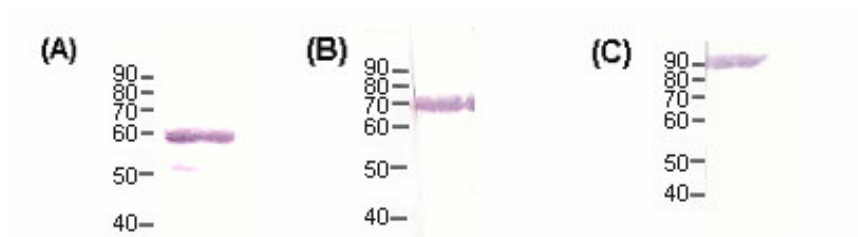


FIGURA 29 – IMUNODETECÇÃO DA CAUDA DE HISTIDINA NAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES 47.80 (A); 85.70 (B) e 65.180(C) PURIFICADAS

4.5 OBTENÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-PROTEÍNA RECOMBINANTE

4.5.1 Inoculação em camundongos

Os soros pré-ímmunes foram analisados antes das inoculações e o soro de nenhum dos camundongos utilizados reconheceu proteínas presentes no extrato de *T. cruzi* em epimastigota 3 ou 5 dias.

Inicialmente, foram separados 5 camundongos para a inoculação da proteína 47.80, dois para a inoculação de 65.180 e dois para 85.70. Porém, dois camundongos morreram antes da obtenção dos antisoros (um no qual estava sendo inoculada a proteína 47.80, e outro imunizado com a proteína 85.70). Por esse motivo, foram obtidos antisoros de quatro camundongos para 47.80, de dois animais para 65.180 e de somente um camundongo para a proteína 85.70.

A proteína 47.80 foi inoculada na Universidade Estadual de Londrina UEL, em parceria com o laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos (NIP5), e a isso se deve a quantidade diferente de camundongos utilizados. Para a inoculação das outras 2 proteínas, feitas no próprio ICC, só houve a disponibilidade de 2 camundongos por proteína.

4.5.2 Teste dos antisoros

A especificidade dos antisoros obtidos foi testada através de *western blot*. Foram utilizados extratos de parasitas epimastigotas com 3 ou 5 dias de cultivo, aplicados nos géis de modo a se obter extrato equivalente a $5 \cdot 10^6$ células por canaleta. Em algumas canaletas foi aplicada a proteína recombinante purificada, para teste de reconhecimento pelos anticorpos presentes no soro. Foram testadas várias diluições dos antisoros de modo a verificar a mínima diluição necessária para a obtenção de um bom resultado.

A proteína 65.180 apareceu com o tamanho esperado (cerca de 83 kDa), porém em cerca de 65 kDa apareceu também uma outra banda de aspecto arrastado. Apesar disso, experimentos com este antisoro foram continuados.

A proteína 47.80 nativa tem um peso molecular de cerca de 47 kDa, e foi reconhecida no extrato aproximadamente do tamanho da proteína recombinante (com cerca de 10 kDa a mais), apesar da grande especificidade de quase todos os soros. O motivo desta provável migração anômala é desconhecido e será posteriormente investigado.

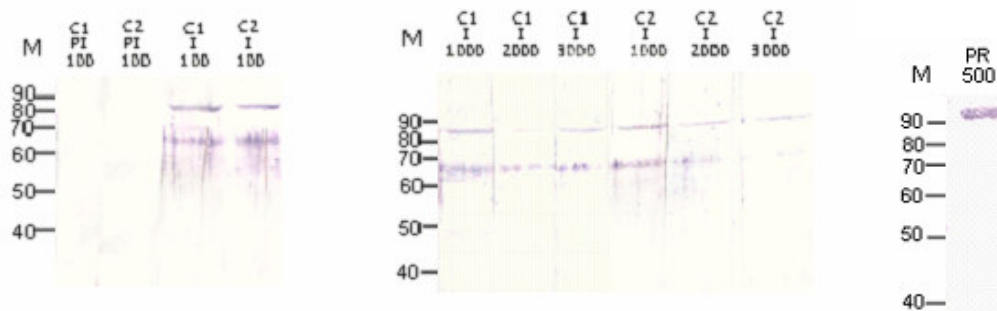


FIGURA 30 – TESTE DOS ANTISOROS ANTI- PROTEÍNA RECOMBINANTE 65.180

M: marcador de peso molecular; **C1 e C2:** soros obtidos dos camundongos 1 e 2, respectivamente; **PI:** soros pré-ímmunes, coletados dos camundongos antes das imunizações; **I:** soros coletados após as imunizações; **PR:** canaleta na qual foi adicionada proteína recombinante; **100, 500, 1000, 2000, 3000:** diluições dos antisoros utilizados para o teste – 1:100, 1:500 e 1:1000, 1:2000 e 1:3000, respectivamente.

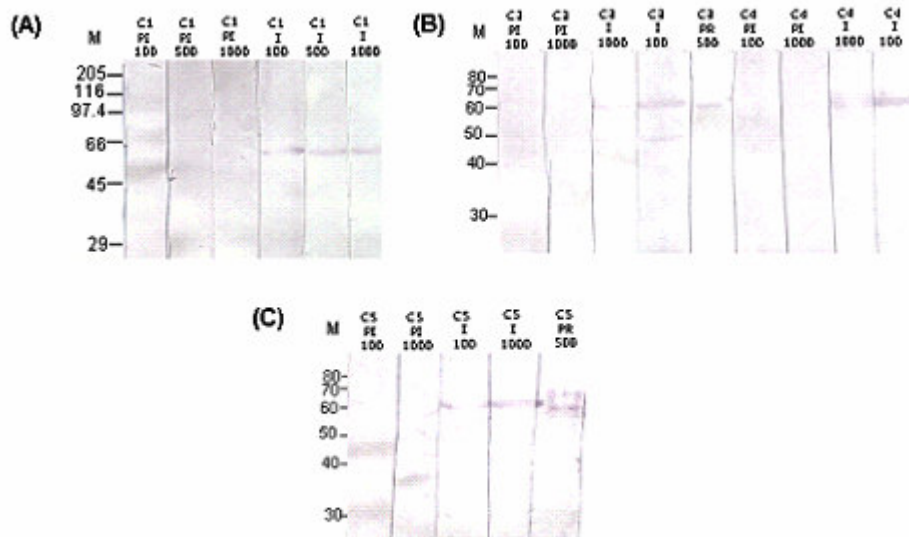


FIGURA 31 – TESTE DOS ANTISOROS ANTI-PROTÍNA RECOMBINANTE 47.80

M: marcador de peso molecular. **C1, C3, C4 e C5:** soros obtidos dos camundongos, 1, 3, 4 e 5, respectivamente; **PI:** soros pré-ímenes, coletados dos camundongos antes das imunizações; **I:** soros coletados após as imunizações; **PR:** canaletas nas quais foi adicionada proteína recombinante em vez de extrato de parasitas; **100, 500 e 1000:** diluições dos antisoros utilizados para o teste – 1:100, 1:500 e 1:1000, respectivamente

O soro anti 85.70 foi produzido para fins de colocalização, já que esta proteína é similar à proteína PABP1, que é também um importante marcador de grânulos de estresse em mamíferos, além da proteína TIA. No processo de produção dos antisoros, uma semana após a última inoculação de proteína nos camundongos, é realizado um teste com a retirada de uma pequena quantidade de sangue do animal, para verificar se a resposta de produção de anticorpos está satisfatória. Este teste preliminar foi realizado para a proteína 85.70 e o bom resultado possibilitou o sacrifício do animal e obtenção do soro total, além da solução proveniente de lavado peritoneal, que provavelmente contém anticorpos. Não houve tempo hábil para a inclusão de resultados do teste definitivo do soro e do lavado peritoneal neste trabalho, mas o teste preliminar indicando a resposta do soro imune contra extrato de *T. cruzi* e a proteína recombinante está apresentado na figura abaixo.

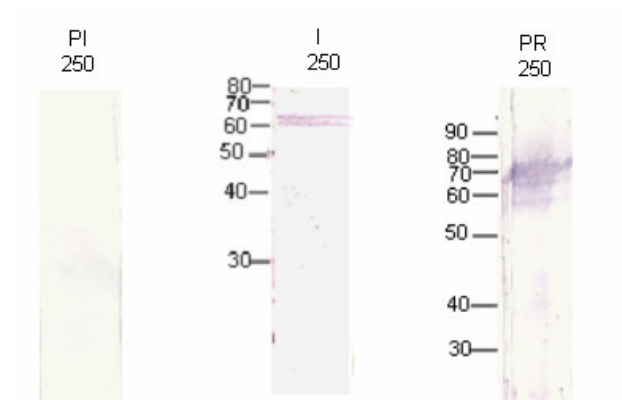


FIGURA 32 – TESTE PRELIMINAR DO ANTISORO ANTI-PROTEÍNA RECOMBINANTE 85.70

M: marcador de peso molecular. **PI 250:** teste do soro pré-imune contra extrato de *T. cruzi* na diluição 1:250; **I 250:** teste do soro imune contra extrato de *T. cruzi* na diluição 1:250; **PR 250:** teste do antisoro na diluição 1:250 contra proteína recombinante.

4.6 IMUNOENSAIOS COM OS ANTICORPOS OBTIDOS

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

Ensaio de western blot com extratos de parasitas em diferentes etapas do ciclo de vida foram realizados com os antisoros obtidos na diluição de 1:1000, para a verificação dos padrões de expressão das proteínas em estudo durante o ciclo de vida de *T. cruzi*.

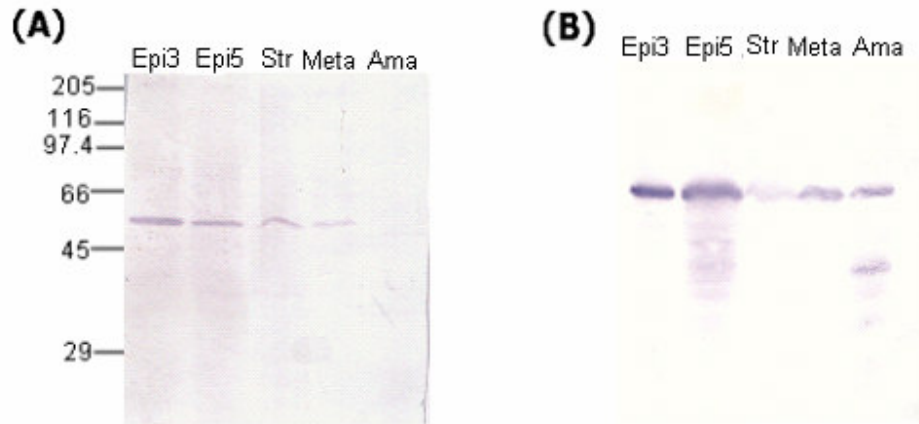


FIGURA 33 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA 47.80 (A) DURANTE O CICLO DE VIDA. Testes realizados com extratos de *T. cruzi* nas formas epimastigotas com 3 e 5 dias de cultivo (**Epi3** e **Epi5**); parasitas submetidos a estresse nutricional (**Str**); Tripomastigotas metacíclicos (**Meta**) e amastigotas (**Ama**). No controle (B) é demonstrado o padrão de expressão da proteína GAPDH nos extratos utilizados em A.

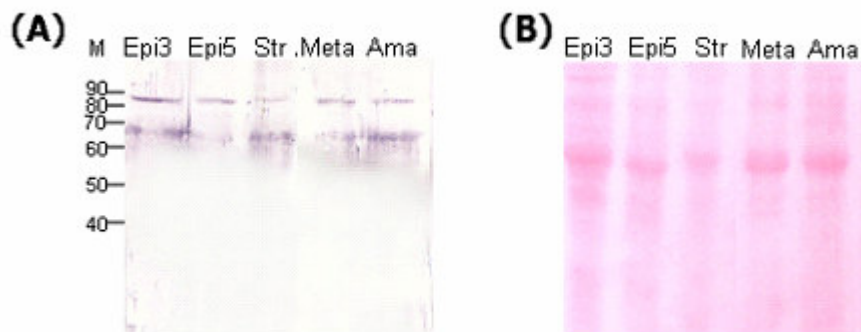


FIGURA 34 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA 65.180 (A) DURANTE O CICLO DE VIDA. Testes realizados com extratos de *T. cruzi* nas formas epimastigotas com 3 e 5 dias de cultivo (**Epi3** e **Epi5**); parasitas submetidos a estresse nutricional (**Str**); Tripomastigotas metacíclicos (**Meta**) e amastigotas (**Ama**). No controle (B) é demonstrada a presença de quantidades semelhantes de extrato nas canaletas, através de coloração da membrana com *Ponceau S* antes da incubação dos anticorpos.

A proteína 47.80 não foi expressa em formas amastigotas, porém, em todas as outras etapas do ciclo de vida, os padrões de expressão foram constantes, para ambas

as proteínas analisadas. As duas proteínas foram expressas em epimastigotas submetidos a estresse nutricional e os ensaios utilizando parasitas nesta fase de diferenciação puderam ser prosseguidos. A realização de experimentos com parasitas submetidos a condições de estresse é bastante interessante para este trabalho pelo fato de que as proteínas utilizadas como semente de busca para a seleção das proteínas de *T. cruzi* em estudo estão envolvidas em mecanismos de resposta a estresse. Além disso, os domínios RRM presentes nas proteínas sugerem envolvimento nesses mecanismos.

4.6.2 Verificação da localização celular das proteínas através da técnica de imunofluorescência

Com os antisoros obtidos foram realizados ensaios de imunolocalização por microscopia de fluorescência, utilizando-se parasitas epimastigotas em crescimento exponencial e sob estresse nutricional. Em paralelo foram realizados os mesmos ensaios com os soros pré-ímmunes, que não apresentaram sinal de fluorescência significativo em comparação aos soros ímmunes (Figuras 35 e 36).

A proteína 47.80 apresentou um padrão disperso pelo citoplasma em epimastigotas e foi observada uma marcação um pouco mais forte na região anterior, entre o flagelo e o cinetoplasto. A região anterior em que esta proteína se encontra é uma possível região de localização da bolsa flagelar. Futuramente, serão realizados ensaios de imunolocalização através de microscopia eletrônica de transmissão, pois através de uma técnica que permita a obtenção de imagens com uma maior ampliação será possível analisar mais precisamente a localização celular desta proteína. Em epimastigotas submetidos a estresse nutricional observa-se que a marcação dispersa torna-se mais fraca, enquanto a localização na região anterior parece mais intensa. Já foi descrita a presença de uma proteína relacionada a regulação da expressão gênica na membrana da bolsa flagelar de *Trypanosoma brucei* (MORAES *et al*, 2007), e sugere-se que possa haver um papel desta estrutura em mecanismos de regulação, mas pouco ainda é conhecido sobre este assunto.

A proteína 65.180 apresentou um padrão de localização nuclear em parasitas epimastigotas, condizendo com a localização celular das proteínas *TIA1* e *TIAR* em condições celulares normais. Porém, em parasitas sob estresse nutricional a localização nuclear foi mantida. Futuramente serão testadas outras formas de estresse para verificar o padrão de localização.

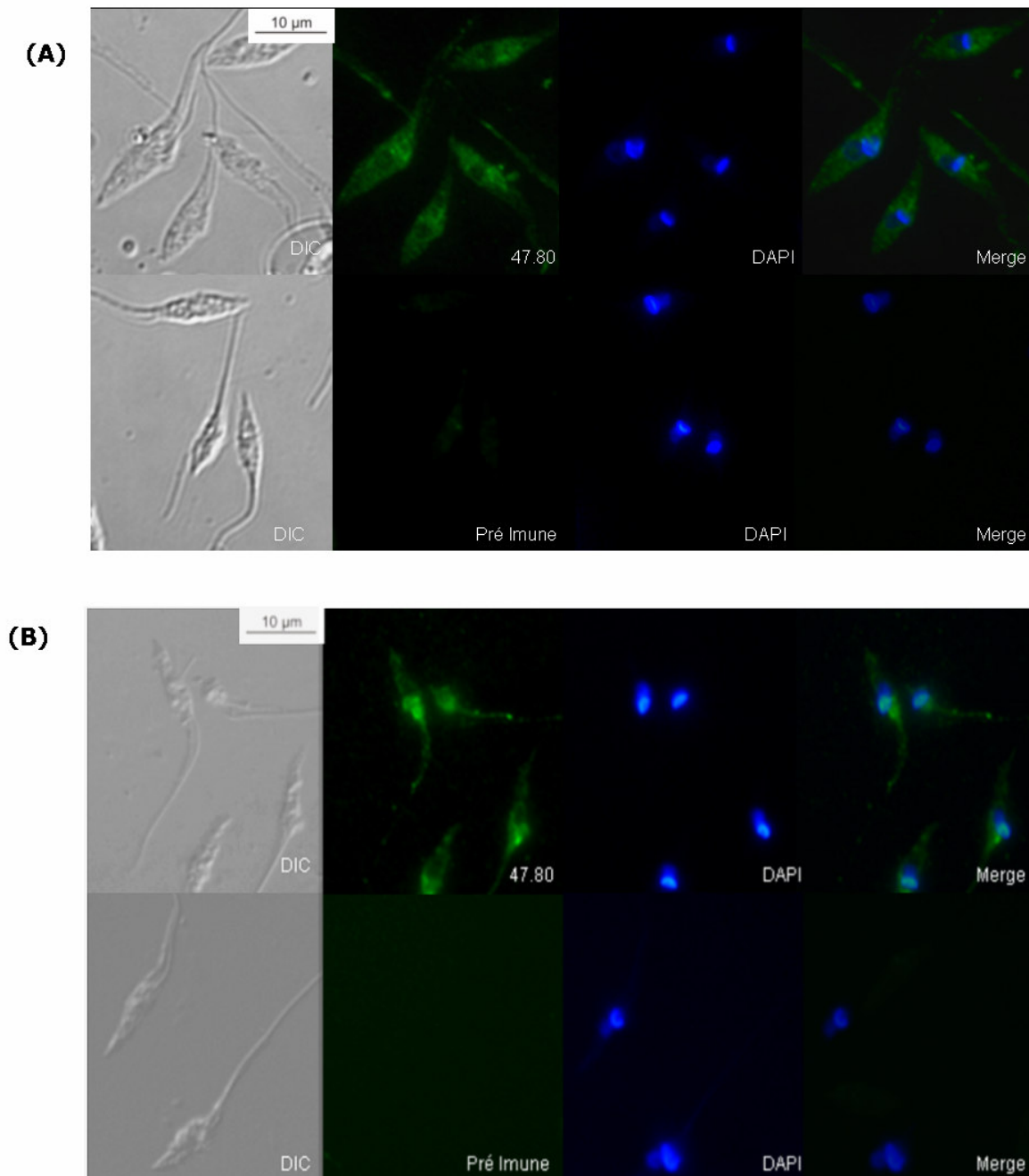


FIGURA 35 - IMUNOLocalIZAÇÃO DA PROTEÍNA 47.80 EM PARASITAS EPIMASTIGOTAS SOB CONDIÇÕES NORMAIS (A) E SUBMETIDOS A ESTRESSE NUTRICIONAL (B)

DIC: Imagens dos parasitas obtidas através de contraste por interferência diferencial; **47.80:** visualização da marcação obtida através da incubação dos parasitas com o soro imune anti - proteína 47.80; **Pré imune:** marcação relativa aos anticorpos presentes no soro pré-imune; **DAPI:** marcação de DNA presente no núcleo e no cinetoplasto; **MERGE:** sobreposição das marcações provenientes dos soros com a marcação pelo DAPI. Na parte de cima das figuras estão as imagens provenientes de parasitas incubados com soro imune, enquanto as fotos abaixo são referentes a parasitas incubados com soro pré-imune.

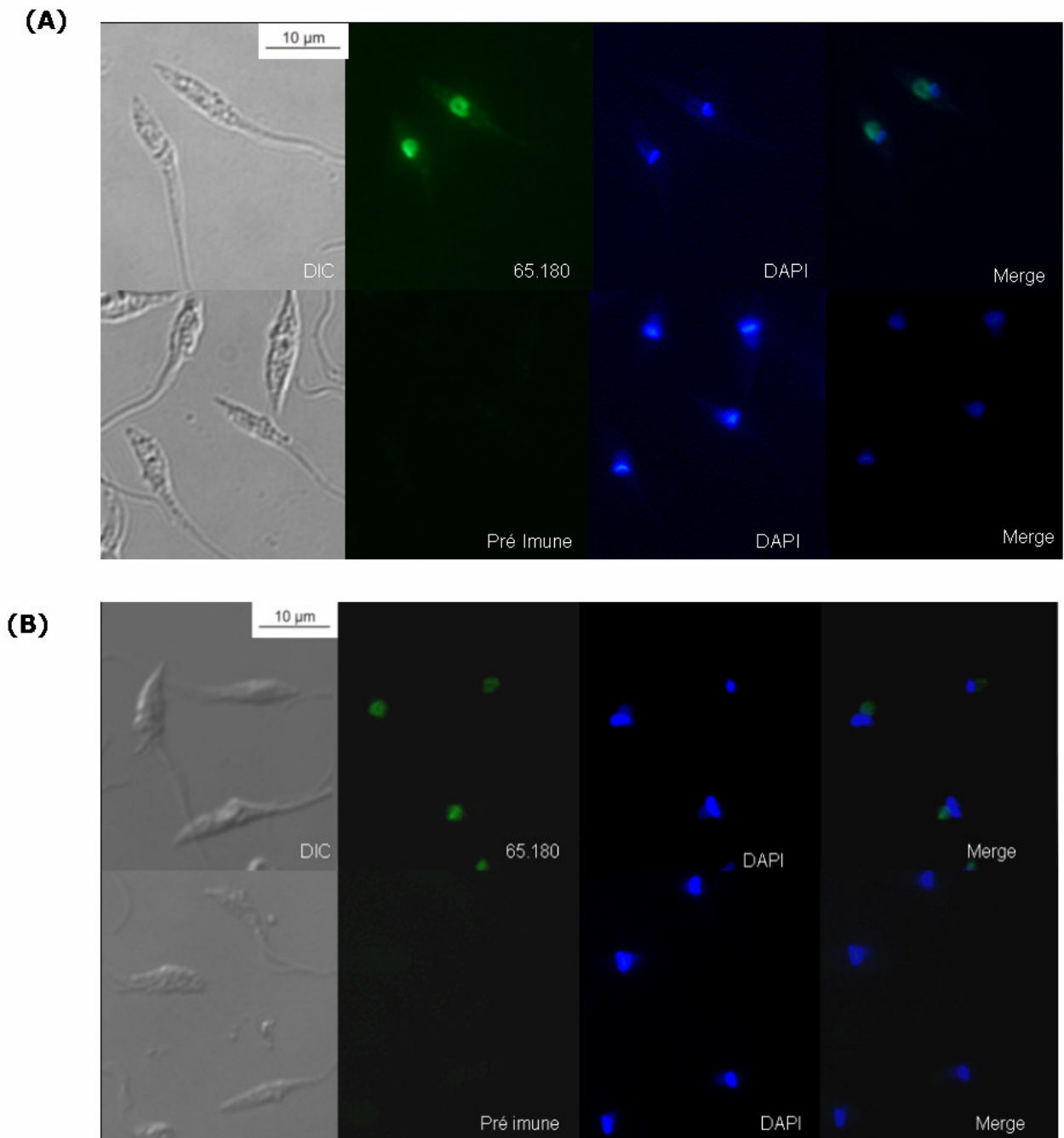


FIGURA 36 - IMUNOLocalização DA PROTEÍNA 65.180 EM PARASITAS EPIMASTIGOTAS SOB CONDIÇÕES NORMAIS (A) E SUBMETIDOS A ESTRESSE NUTRICIONAL(B)

DIC: Imagens dos parasitas obtidas através de contraste por interferência diferencial; **65.180:** visualização da marcação obtida através da incubação dos parasitas com o soro imune anti - proteína 65.180; **Pré imune:** marcação relativa aos anticorpos presentes no soro pré-imune; **DAPI:** marcação de DNA presente no núcleo e no cinetoplasto; **MERGE:** sobreposição das marcações provenientes dos soros com a marcação pelo DAPI. Na parte de cima das figuras estão as imagens provenientes de parasitas incubados com soro imune, enquanto as fotos abaixo são referentes a parasitas incubados com soro pré-imune.

5. CONCLUSÃO

Os objetivos deste trabalho eram clonar, expressar proteínas recombinantes, produzir antisoros policlonais e iniciar a caracterização de três proteínas presentes no genoma de *T. cruzi* que possuem similaridade de sequência primária com as proteínas *TIA1* e *TIAR* de *Homo sapiens*. As etapas de clonagem e expressão das proteínas foram cumpridas para os três genes abordados neste estudo. Os antisoros produzidos em camundongos reconheceram as proteínas recombinantes e proteínas em extrato de *T. cruzi*.

O antisoro de uma delas (denominada 47.80 durante o trabalho) reconhece no extrato de parasitas uma proteína ligeiramente maior do que o tamanho esperado. Os antisoros obtidos de três dos quatro camundongos utilizados reconheceram somente uma proteína no ensaio de *western blot* com marcação bastante específica, mesmo quando a membrana foi revelada por um período de tempo mais longo do que o habitual. Além disso, o antisoro reconheceu esta proteína no extrato mesmo quando relativamente diluído (diluição 1/3000), levando a crer que a ligação do anticorpo a essa proteína seja específica. O motivo deste maior tamanho poderá ser posteriormente investigado realizando-se uma imunoprecipitação da proteína diretamente do extrato de *T. cruzi*, seguida de análise do material imunoprecipitado por espectrometria de massas. A localização celular desta proteína por imunofluorescência indireta retornou um resultado curioso, com uma localização citoplasmática, porém com um sinal de fluorescência mais forte na região anterior do parasita, que se reforçou durante a condição de estresse nutricional. Análises da localização celular desta proteína por microscopia eletrônica de transmissão poderão ser realizadas para verificar a exata localização desta proteína. Pela região celular em que se encontra existe a possibilidade que a localização seja próxima à bolsa flagelar, uma estrutura ainda pouco estudada. Um trabalho recente relaciona a bolsa flagelar a uma proteína de *Trypanosoma brucei* semelhante a uma quinase de eIF2alfa, que em mamíferos é uma proteína-chave na regulação pós transcricional em resposta a estresse.

Para a segunda proteína, denominada 65.180, as etapas de clonagem e expressão foram um pouco mais difíceis e demoradas, porém foi obtida proteína

suficiente para a inoculação em dois camundongos. O antisoro obtido reconheceu uma proteína de tamanho correto em extrato de *T. cruzi*, porém foi reconhecida também uma outra proteína (ou resultado de degradação da mesma) que aparece sempre com aspecto arrastado nas membranas de *western blot*. O aspecto da proteína de tamanho correto é normal, apesar de a proteína não parecer muito abundante. Apesar disto, na localização por imunofluorescência pode-se observar um sinal nuclear extremamente específico, tanto em epimastigotas quanto sob condições de estresse nutricional. Em outros organismos a localização das proteínas TIA sob condições de estresse é citoplasmática, portanto poderão ser testados outros tipos de estresse, induzidos por agentes citotóxicos, para observar se a localização desta proteína de *T. cruzi* se altera sob condições celulares desfavoráveis.

A proteína 85.70 foi produzida para fins de colocalização, e um teste preliminar do antisoro revelou o reconhecimento da proteína recombinante e de uma proteína de tamanho esperado no extrato.

Os objetivos propostos para o trabalho foram cumpridos e os resultados obtidos abrem perspectivas para ensaios futuros visando uma melhor caracterização destas proteínas, como ensaios de imunoprecipitação, colocalização com outras proteínas de *T. cruzi* envolvidas em mecanismos de processamento de mRNA, imunolocalização por microscopia eletrônica de transmissão e verificação do padrão de localização sob diferentes condições celulares.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, P.; KEDERSHA, N. Stressful initiations. **Journal of Cell Science**, v. 115, p. 3227–3234, 2002.
- ANDERSON, P.; KEDERSHA, N. Stress granules: the Tao of RNA triage. **Trends in biochemical sciences**, v.33, p. 141-150, 2007.
- ANDERSON, P.; KEDERSHA, N. RNA granules. **The Journal of Cell Biology**, v.172, p. 803–808, 2006.
- BATISTA, M. **Construção de Vetores para Caracterização de Genes de Trypanosoma cruzi em um Sistema para Clonagem em Alta Demanda**. 124 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- BONALDO, M.C.; SOUTO-PADRON, T.; DE SOUZA, W., GOLDENBERG, S. Cell-substrate adhesion during Trypanosoma cruzi differentiation. **The Journal of Cell Biology**, v. 106, p. 1349-1358, 1988
- BRENER, Z. Biology of Trypanosoma cruzi. **Ann Rev of Microbiology**, v. 27, p. 347-82, 1973.
- BRITTINGHAM, A.; MILLER, M. A.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. Regulation of GP63 mRNA stability in promastigotes of virulent and attenuated Leishmania chagasi. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.112, p. 51-59, 2001.
- CHAGAS, C. Nova triponosomíase humana. Estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Trypanosoma cruzi gen. Sp., agente etiológico da nova entidade mórbida no homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909.
- CLAYTON, C. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. **The EMBO Journal**, v 21, n.8, p. 1881-1888, 2002.
- COUGHLIN B.C.; TEIXEIRA, S.M.; KIRCHOFF, L. V.; DONELSON, J. E. Amastin mRNA abundance in Trypanosoma cruzi is controlled by a 3'-untranslated region position-dependent cis-element and an untranslated region-binding protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n.16, p. 12051-60, 2000.
- COUGOT, N.; BABAICO, S.; SERAPHIN, B. Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. **The Journal of Cell Biology**, v.165, n.1, p. 31-40, 2004.
- DE SOUZA, W. Cell biology of Trypanosoma cruzi. **International Review of Cytology**, v. 86, p. 197-283, 1984.

FERRAIUOLO, M.A.; BASAK, S.; DOSTIE, J. et al. A role for the eIF4E-binding protein 4E-T in P-body formation and mRNA decay. **The Journal of Cell Biology**, v.170, p. 913–924, 2005.

FUNGAL GENETICS STOCK CENTER. Disponível em <www.fgsc.net/fgn48/Image9.gif>. Acesso em: 15/04/2009

GARCIA, E. S.; AZAMBUJA, P. Fisiologia de triatomíneos: desenvolvimento, reprodução e interação com *T. cruzi*. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL NETTO, M. (eds), **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**, 2a Ed., Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, p. 41-7, 2000.

GOLDENBERG, S.; SALLES, J.M.; CONTRERAS, V. T. et al. Characterization of messenger RNA from epimastigotes and metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **FEBS Journal**, v.180, n.2, p. 265-270, 1985.

HOLCIK, M.; SONENBERG, N. Translational control in stress and apoptosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, V. 6, P. 318-327, 2005.

HOLETZ, F.B.; CORREA, A.; AVILA, A.R. et al. Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 356, n.4, p.1062-1067, 2007.

INVITROGEN. Disponível em: <www.invitrogen.com>. Acesso em: 18/04/2009

LABORATORY IDENTIFICATION OF PARASITES OF PUBLIC HEALTH CONCERNS. Disponível em <<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>>. Acesso em 20/03/2009.

LE GUINER, C.; LEJEUNE, F.; GALIANA, D.; KISTER, L.; BREATHNACH, R.; STEVENIN, J.; KONCZAK, F. D. G. TIA-1 and TIAR activate splicing of alternative exons with weak 5' splice sites followed by a U-rich stretch on their own pre-mRNAs. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 44, p. 40638-40646, 2001.

LEVINE, N.D. ; CORLISS, J. O.; COX F. E. G. et al. A newly revised classification of the Protozoa. **The journal of protozoology**, v.1, n. 27, p. 37-58, 1980.

LIANG, X.; HARITAN, A.; ULIEL, S.; MICHAELI, S. trans and cis Splicing in Trypanosomatids: Mechanisms, Factors and Regulation. **Eukaryotic Cell**, v.5, n.2, p.830-840, 2003.

MARIS, C.; DOMINGUEZ, C.; ALLAIN, FH. The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post – transcriptional gene expression. **The FEBS Journal**, v. 272, p. 2118-2131, 2005.

MORAES, M.C.; JESUS, T.C.L.; HASHIMOTO, N.N.; DEY, M.; SCHWARTZ, K.J.; ALVES, V.S.; AVILA, C. C.; BANGS, J.D.; DEVER, T.E.; SCHENKMAN, S.; CASTILHO,

B. A. Novel membrane-bound eIF2 α Kinase in the flagellar pocket of *Trypanosoma brucei*. **Eukaryotic Cell**, V.6, n. 11, p. 1979-1991, 2007.

National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 25/03/2009

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais (TDR). Disponível em: <<http://apps.who.int/tdr/svc/diseases/chagas>>. Acesso em: 10/05/2009.

PALENCHAR, J.B.; BELLOFATO, V. Gene transcription in trypanosomes, **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 146, p. 135-141, 2005.

PIECYK, M.; WAX, S.; BECK, A. et al. TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF- α . **The EMBO Journal**, v.19, 4154–4163, 2000.

QUIJADA, L.; SOTO, M.; ALONSO, C.; REQUENA, J. M. Identification of a putative regulatory element in the 3'-untranslated region that controls expression of HSP70 in *Leishmania infantum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 110, p. 79-91, 2000.

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

STOECKLIN, G.; ANDERSON, P. (2006). Posttranscriptional mechanisms regulating the inflammatory response. **Advances in immunology**, v.89, p. 1–37, 2006.

TEIXEIRA, A. R. L.; NITZ, N.; GUIMARO, M.C.; GOMES, C.; SANTOS-BUCH, C.A. Chagas Disease. **Postgraduate Medical Journal**, v. 82, p. 788-798, 2006.

TEIXEIRA, D.; SHETH, U.; VALENCIA-SANCHEZ, M.A. et al. Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. **RNA**, v.11, p. 371-382, 2005.

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

