

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LAIANE LEMOS

Identificação e caracterização das α -amastinas de *Trypanosoma cruzi*

CURITIBA

2013

LAIANE LEMOS

Identificação e caracterização das α -amastinas de *Trypanosoma cruzi*

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

Orientador: Prof^o Dr. Wanderson Duarte da Rocha.

Co-Orientadora: Msc. Monica Mendes Kangussu-Marcolino.

CURITIBA

2013

RESUMO

A identificação de genes diferencialmente expressos durante o ciclo biológico de parasitos causadores de patologias é importante na busca por potenciais alvos para o desenvolvimento de vacinas e tratamentos. *Trypanosoma cruzi* é o agente causador da Doença de Chagas e possui proteínas estágio-específicas que vêm sendo bastante estudadas, como a família das transialidades, as mucinas e as amastinas. Amastinas são glicoproteínas de superfície inicialmente descritas como específicas de formas amastigotas de *T. cruzi* e *Leishmania donovani*. A partir de análises *in silico* de amastinas presentes em diferentes tripanossomatídeos, elas foram classificadas nas subfamílias α , β , γ e δ . Para *T. cruzi* (clone CL Brener), foi estimado um total de 14 cópias de genes de amastinas, dos quais duas seriam β -amastinas e 12 δ -amastinas. Contudo, a partir de buscas considerando fragmentos gerados durante o sequenciamento do clone CL Brener e que não foram atribuídos a cromossomos, encontramos sequências ainda não identificadas como amastinas, mas que possuem semelhança com as amastinas descritas anteriormente. Após análises *in silico* para presença de domínios, regiões transmembrana, conservação de sequências e organização genômica comparativamente às amastinas previamente descritas em tripanossomatídeos, propomos a presença de α -amastinas no genoma de *T. cruzi*, nomeadas aqui como $\alpha 1$ - e $\alpha 2$ -amastinas. Os dados de organização genômica *in silico* foram corroborados em parte por análises de *Southern blot*. Na tentativa de avaliar o perfil de expressão ao longo do ciclo de vida e localização subcelular foram realizados ensaios de *northern blot* e de expressão de proteínas fusionadas a GFP no parasito, contudo em ambos os ensaios não foi detectada a expressão dos mRNAs endógenos ou da proteína de fusão, o que torna necessária a realização de experimentos adicionais para avaliar a expressão destes genes no parasito. Apesar de não termos confirmado a expressão destes genes no parasito, as análises *in silico* apontam claramente a presença de uma nova classe de amastinas no genoma deste tripanossomatídeo que está mais próxima as α -amastinas de *Leishmania* e *Crithidia* sp.

Palavras-chave: alfa-amastina, superexpressão, localização.

ABSTRACT

The identification of differentially expressed genes during the life cycle of diseases causing parasites is relevant in the search for potential targets for the development of vaccines and treatments. *Trypanosoma cruzi* is the etiological agent of Chagas disease and has stage-specific proteins that have been extensively studied, such as the family of transialidases, mucins and amastins. Amastins are surface glycoproteins initially described as specific to amastigotes forms of *T. cruzi* and *Leishmania donovani*. From *in silico* analysis of amastins presented in different trypanosomatids, they were classified in four subfamilies α , β , γ and δ . *T. cruzi* (CL Brener clone) was estimated from a total of 14 gene copies of amastins, two of which are β -amastins and 12 δ -amastins. However, from searching among fragments generated during sequencing of clone CL Brener that have not been assigned to chromosomes, we found sequences not yet identified as amastins, but presenting similarities with the previously described amastins. After *in silico* analysis for the presence of domains, transmembrane regions, conservation of sequences and genome organization compared to previously described amastins in trypanosomatids, we propose the presence of α -amastins in the *T. cruzi* genome, named here as $\alpha 1$ - and $\alpha 2$ -amastins. The genomic organization data of *in silico* analysis were partially confirmed by Southern blot. In order to assess the expression profile throughout the life cycle and subcellular localization, we performed Northern blot and protein expression assays using $\alpha 1$ - and $\alpha 2$ -amastins fused to GFP into the parasite, but in both assays the expression of the endogenous mRNA or fused proteins was not detected, which makes it necessary to perform additional experiments to evaluate the expression of these genes in the parasite. Although this expression have not been confirmed in the parasite, *in silico* analysis clearly indicate the presence of a new class of amastins in this trypanosomatid genome that is closest to the α -amastins of *Leishmania* and *Crithidia* sp.

Key words: alpha amastin, overexpression, localization

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, pela vida abençoada que eu tenho.

A meus pais, que me deram os melhores exemplos de dedicação, força de vontade e generosidade, agradeço também porque sei que vocês refletiram e aceitaram muitas de minhas escolhas. Wil, minha irmã, também te agradeço pelo incentivo ao estudo.

Ao meu “companheirinho”, amor e amigo, que há muito tempo me incentiva a ir atrás de meus sonhos e não apenas olhar para os obstáculos encontrados pelo caminho. Certamente você sabe a importância que seu apoio representa para mim, Yuri.

Ao meu pai científico, professor Wanderson Duarte da Rocha, que, com muita paciência e dedicação, vem me ensinando a gostar e começar a entender e questionar o mundo da pesquisa. Obrigada também por ter me aceitado novamente em seu laboratório após meu intercâmbio.

À Monica Kangussu-Marcolino, cujos experimentos venho acompanhando desde o início de seu doutorado e que, durante o desenvolvimento deste trabalho, muito gentilmente realizou os experimentos que envolviam manipulação de parasitos vivos. Obrigada por me ajudar a ver as coisas com mais calma, a pensar em uma delas por vez e assim “surtar menos”. Foi um privilégio trabalhar com uma pessoa tão dedicada e inteligente como você.

Aos demais integrantes do laboratório GFP, Normanda (Norrma) Souza Melo, Letícia Adejani Laibida, Rodrigo “Jô” Soares, Ana Paula Cunha e Geison Cambri, vocês são ótimos companheiros de trabalho e amigos, obrigada pelo tranquilo convívio diário e por poder compartilhar experiências com vocês.

Aos amigos da turma de Biologia que iniciou em 2009, em especial a Laura Simões, Beatriz Borges, Camila Matos, Rodrigo Almeida, Jéssica Gaspar, Maiara Calixto, Luciane Hulyk e Leonardo Castro, vocês são demais e passar pela graduação ao lado de vocês foi muito bom!!

Aos amigos da ONG Sonhar Acordado Curitiba que me fazem ver como é gratificante e viciante o trabalho voluntário.

Aos professores Fábio Pedrosa e Emanuel Maltempi de Souza e aos técnicos, Valter de Baura e Rose Prado, do Instituto Nacional de Fixação Biológica de Nitrogênio, por todo suporte técnico-científico prestado.

À Prof. Dra. Santuza Maria Teixeira, do departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG, pela parceria em diversos projetos.

Aos integrantes do laboratório de imunoquímica, coordenado pelas professoras Juliana Ferreira de Moura e Larissa Magalhães Alvarenga, pelo companheirismo nesta nossa “vida científica”.

Ao pessoal dos laboratórios 275 e anexo, em especial a Drs. Marco Aurélio de Oliveira, Marco Antonio Kadowaki, e Msc. Adriano Alves Stefanello, sempre muito gentis e atenciosos.

Às agências financiadoras CNPq, CAPES, Fundação Araucária, PPSUS.

LISTA DE ABREVIATURAS

$[^{32}\text{P}]\text{dCTP}$	–	$\alpha[^{32}\text{P}]$ 5' trifosfato de 2' desoxicitidina
Amp ^r	–	Resistencia a Ampicilina
ASP	–	Proteínas de superfície de amastigotas (do inglês, <i>amastigote surface protein</i>)
BSA	–	Albumina de soro bovino (do inglês, <i>bovine serum albumin</i>)
cDNA	–	DNA complementar
Chr	–	Cromossomo (do inglês, <i>chromosome</i>)
Da	–	Dalton
DNA	–	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	–	Deoxinucleotídeo trifosfato
DTU	–	Unidade de tipagem discreta (do inglês, <i>Discrete Typing Unit</i>)
EDTA	–	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês, <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
G418	–	Geneticina
GFP	–	Proteína verde fluorescente (do inglês, <i>Green Fluorescent Protein</i>)
gGAPDH	–	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase glicossomal
gp63	–	Glicoproteína de 63 kDa
kb	–	Kilobases
LA	–	Luria-Bertani ágar
LB	–	Luria-Bertani
mRNA	–	RNA mensageiro
MASP	–	Proteínas de superfície associadas as mucinas (do inglês, <i>Mucin-associated surface protein</i>)
Mb	–	Mega bases

Mpb	–	Mega pares de base
Neo	–	Neomicina
nt	–	Nucleotídeo
ORF	–	Fase aberta de leitura (do inglês, <i>open read frame</i>)
pb	–	Pares de base
PCR	–	Reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	–	Polietilenoglicol
PFGE	–	Gel de eletroforese de campo pulsátil (do inglês, <i>pulsed field gel electrophoresis</i>)
RNA	–	Ácido Ribonucleico
RNAse	–	Ribonuclease
rpm	–	Rotação por minuto
rRNA	–	RNA ribossômico
SDS	–	Dodecil sulfato de sódio
SFB	–	Soro fetal bovino
TBE	–	Tris Borato EDTA
Tc	–	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TS	–	Transialidases
UTP	–	Unidade de transcrição policistrônica
Zeo	–	Zeocina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 DOENÇA DE CHAGAS E <i>Trypanosoma cruzi</i>	10
1.2 INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO E PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE	14
1.3 AMASTINAS.....	15
2. OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 ANÁLISES <i>IN SILICO</i> E DESENHO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS.....	20
3.2 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE α -AMASTINAS E CLONAGEM SEGUINDO O SISTEMA GATEWAY®.....	21
3.3 ELETROFORESE DE DNA.....	22
3.4 CLONAGEM DOS <i>AMPLICONS</i> E CONSTRUÇÃO DE VETORES.....	22
3.5 PREPARAÇÃO DE CÉLULAS TERMOCOMPETENTES.....	23
3.6 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA.....	24
3.7 PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS POR LISE ALCALINA	24
3.8 RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA.....	25
3.9 TRANSFEÇÃO EM <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
3.10 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
3.11 VERIFICAÇÃO DA LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DE α -AMASTINAS EM <i>T. cruzi</i>	26
3.12 MICROSCOPIA CONFOCAL	28
3.13 CITOMETRIA DE FLUXO	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISES <i>IN SILICO</i> DA NOVA CLASSE DE AMASTINAS...30	
4.2 ARRANJO GENÔMICO DA α -AMASTINAS DE <i>T. cruzi</i>	36
4.3 DETERMINAÇÃO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DAS α -AMASTINAS EM <i>Trypanosoma cruzi</i>	40
5. CONCLUSÕES.....	43
REFERÊNCIAS.....	44

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE CHAGAS E *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi é o agente etiológico da Doença de Chagas (CHAGAS, 1909), conhecida também como Tripanossomíase Americana, endêmica na América Latina. Estima-se que cerca de 8 milhões de pessoas estão infectadas em todo o mundo e mais de 25 milhões correm o risco de contrair a doença (World Health Organization, 2013). Além do homem, mamíferos silvestres e domésticos têm sido encontrados infectados pelo *T. cruzi*. Calcula-se que há cerca de 56.000 novos casos anuais e 12.000 mortes em todas as regiões endêmicas (Organização Panamericana de Saúde, 2013). No Brasil, estima-se que entre dois a três milhões de pessoas estão infectadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

A infecção pode acontecer pela via vetorial (na qual o ciclo biológico do parasito se completa), através das excretas de insetos hemípteros hematófagos, sendo *Triatoma infestans*, *T. brasiliensis*, *Panstrongylus megistus* e *T. sordida* consideradas as espécies mais importantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

No momento do repasto sanguíneo em mamíferos contaminados, os insetos ingerem a forma tripomastigota sanguínea. Passando pelo intestino médio, o parasito se transforma em epimastigota, (forma replicativa) e no intestino posterior há a conversão, pelo processo de metaciclogênese, em tripomastigota metacíclica (forma infectiva aos mamíferos e não-replicativa), excretada pelo inseto junto às fezes enquanto ele se alimenta. O contato de excretas com a pele do indivíduo picado pode levar à infecção. Após sua entrada, *T. cruzi* passa a invadir uma série de tipos celulares e, dentro da célula, se diferencia em amastigota. Depois da multiplicação, amastigotas se diferenciam em tripomastigotas sanguíneas, que rompem a célula, podem atingir células adjacentes e entrar na corrente sanguínea. A forma tripomastigota pode ser ingerida pelo inseto, dando continuidade ao ciclo (Figura 1)(BRENER, 1973; Revisão, TYLER, 2001; ÁVILA *et al.*, 2003).

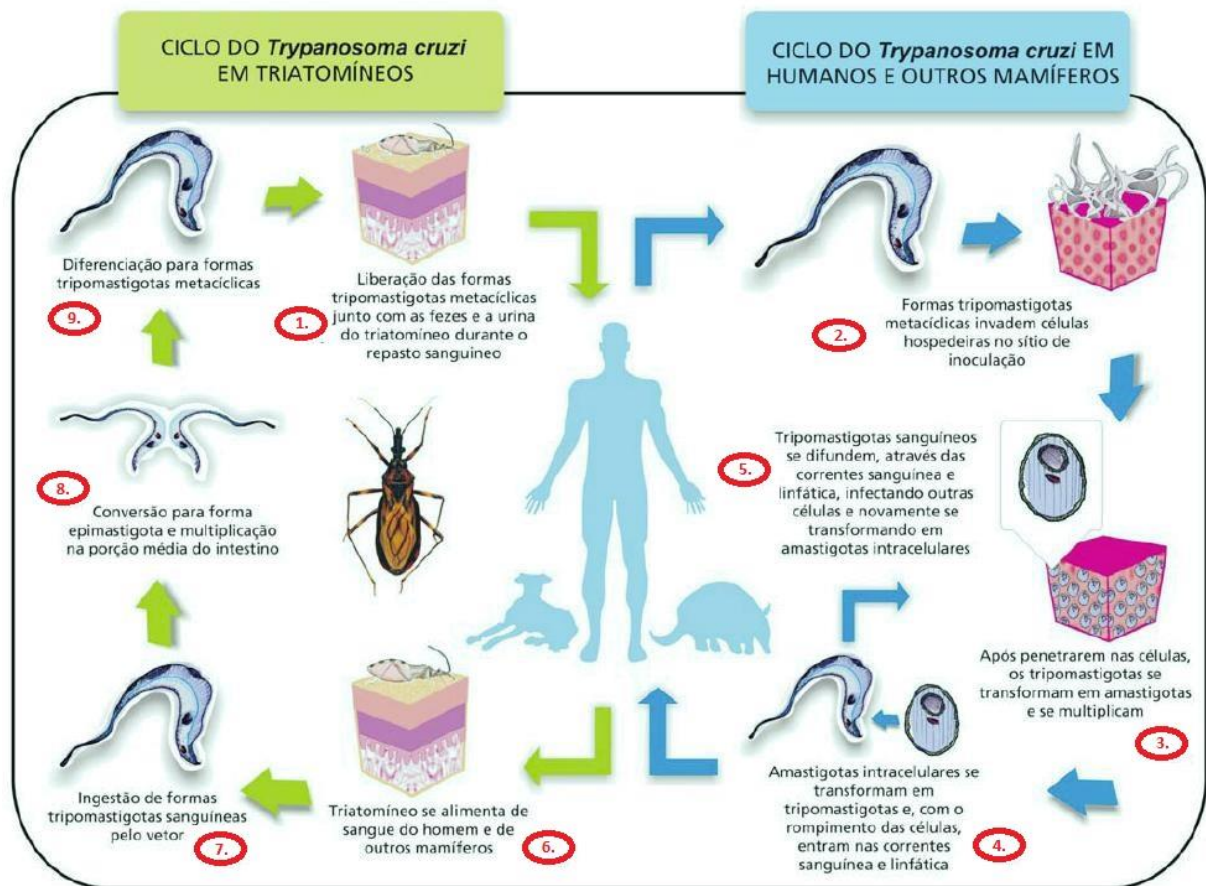


FIGURA 1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.

FONTE: Adaptado de ICICT/Fiocruz.

NOTA: 1) Durante o repasto sanguíneo, o inseto defeca e libera, junto às fezes, formas tripomastigotas metacíclicas, que ficarão próximas ao local da picada e entrarão em contato com o organismo do hospedeiro vertebrado pela lesão causada pelo triatomíneo (sendo possível também sua entrada através de mucosas intactas, como a oral); 2) no sítio de incursão e em regiões próximas ocorre invasão de células do hospedeiro pela forma tripomastigota metacíclica. 3) Após sua entrada nas células, o protozoário se transforma em amastigota e ocorre sua multiplicação por fissão binária. 4) Formas amastigotas se diferenciam em tripomastigotas que são então liberadas nas correntes sanguínea e linfática; 5) Esses tripomastigotas sanguíneos se difundem e invadem outros tecidos e células e, após sua entrada, se diferenciam em amastigotas intracelulares. 6) No momento da picada, o hospedeiro invertebrado ingere sangue contaminado pelo protozoário que, circulando pela corrente sanguínea, 7) está na forma de tripomastigota sanguíneo; 8) Na porção média do intestino do triatomíneo ocorre diferenciação do protozoário para a forma epimastigota, que se multiplica. 9) Na porção posterior do intestino do inseto ocorre o processo de metaciclogênese, quando o protozoário se diferencia em tripomastigota metacíclico.

Outros modos de infecção são: via oral (ingestão de alimentos contaminados por insetos infectos ou pelas fezes destes); transfusões sanguíneas ou transplante

de órgãos; via congênita e acidentes laboratoriais (seja na manipulação do inseto ou do próprio parasito) (FIOCRUZ, 2013).

O curso clínico da tripanossomíase americana depende, entre outros fatores, das características do parasito que infectou o organismo. E como é observada grande variedade genética entre as distintas linhagens de *T. cruzi*, foram sugeridas classificações, como ocorreu durante o simpósio realizado em comemoração ao centenário da descoberta da Doença e Chagas, quando foi sugerida uma classificação de *T. cruzi* em seis grupos distintos, os DTUs (*Discrete Typing Unit*), sendo DTU um conjunto de isolados geneticamente semelhantes que pode ser identificado por marcadores moleculares ou imunológicos comuns (TIBAYRENC, 1998; ZINGALES *et al.*, 2009). São referências para cada DTU as seguintes cepas e clones (cl): Sylvio X10/1 (cl1) (Tcl), Esmeraldo cl3 (TclI), M5631 cl5 (TclII), Can III cl1 (TclIV), Sc43 cl1 (TcV) e CL Brener (TcVI). Tcl possui cepas relacionadas ao ciclo silvestre de transmissão da doença enquanto as demais são associadas ciclo doméstico (ZINGALES *et al.*, 2009; ANDRADE *et al.*, 2011). Tcl e TclII correspondem aos grupos definidos em um encontro que ocorreu em 1999 (Anônimo, 1999) e as DTUs III-VI correspondem a organismos híbridos, originados após diferentes eventos de trocas genéticas (Revisão, ZINGALES, 2011).

Nos seus distintos estágios biológicos, além do parasito, estruturas como flagelo, núcleo e cinetoplasto (característico da ordem Kinetoplastida) passam por variações morfológicas. Em tripomastigotas, *T. cruzi* tem aspecto alongado, flagelo posterior, cinetoplasto arredondado e próximo ao núcleo; amastigotas têm forma arredondada, flagelo curto e cinetoplasto anterior ao núcleo; em epimastigotas a forma é alongada e o cinetoplasto está anterior ao núcleo (BRENER, 1973).

Frente a alterações tão pronunciadas de seu micro ambiente e morfologia, é esperados que estes organismos apresentem controles finos de expressão gênica. Neste ponto, pertencentes à ordem dos Kinetoplastídeos, estes organismos apresentam algumas peculiaridades em sua biologia molecular como transcrição policistrônica, processamento de pré-mRNA por *trans-splicing*, RNA polimerase I exercendo edição de RNA e transcrição de um conjunto de genes codificadores de proteínas (SOLARI, 1980; Revisão, CLAYTON, 2002).

A fim de se conhecer as bases moleculares destas características distintas, a obtenção de dados de genoma de *T. cruzi* é um importante propósito dos estudos relacionados a este parasito. Em 2005, foi publicado o sequenciamento do genoma

de *T. cruzi*, obtido através de estudos de um clone da cepa CL, denominado CL Brener (conseguido a partir de clonagem de tripomastigotas encontrados em camundongos contaminados), considerado estável, de fácil cultivo e representativo para outras cepas circulantes (ZINGALES *et al.*, 1997; EL-SAYED *et al.*, 2005; FIOCRUZ, 2013). Mais recentemente, o clone Sylvio X10/1 (isolado de caso humano) teve seu genoma sequenciado (POSTAM *et al.*, 1983; FRANZÉN *et al.*, 2011).

Após a publicação do sequenciamento do genoma do clone CL Brener, foi buscada a montagem destas sequências para atribuí-las a cromossomos e, estimou-se o número de 41 cromossomos, em tamanhos que variam de 78 kb a 2,3 Mb (WEATHERLY *et al.*, 2009). Também foram realizadas comparações entre o conteúdo genômico dos clones CL Brener e Sylvio X10/1, com tamanhos totais estimados em aproximadamente 55 Mb para o genoma haploide de CL Brener e cerca de 44 Mb para Sylvio X10/1, e a mais significativa variação encontrada está entre os tamanhos das famílias multigênicas que codificam para proteínas de superfície nestes clones (FRANZÉN *et al.*, 2011).

Sobre o clone CL Brener, é importante ressaltar estudos que apontam que cerca de 50% de seu conteúdo genômico é composto por sequências repetitivas, como famílias multigênicas que codificam para proteínas de superfície, retrotransposons e repetições na região subtelomérica (REQUENA, *et al.*, 1996; EL-SAYED *et al.*, 2005; BRANCES *et al.*, 2006;).

Estes estudos geraram um importante aporte de dados, proporcionando um vasto campo de trabalho para a genômica funcional, que investiga a função dos genes e sua expressão em diferentes situações biológicas. Partindo para este estudo mais específico, caminhamos para o melhor entendimento da biologia do parasito e a relação dele com o hospedeiro, incluindo invasão, replicação, manutenção e progressão clínica da doença. Este conhecimento torna mais próximo o desenvolvimento de tratamentos e vacinas contra *T. cruzi*.

1.2 INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO E PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE

A interação celular é essencial no desenvolvimento da infecção e manutenção da doença. Neste contexto, proteínas de superfície têm importante papel, pois o parasito altera o conteúdo proteico da superfície dependendo de seu estágio biológico e o micro ambiente onde ele se encontra. Dentre as principais proteínas de superfície de *T. cruzi*, podemos destacar as proteases gp63 (glicoproteína 63 kDa); DGF-1 (*dispersed gene family-1*) a superfamília das transialidases (TS); as mucinas e proteínas de superfície associadas a mucinas (MASP) (BARTHOLOMEU *et al.*, 2009; SIBLEY, 2011).

Acredita-se que gp63 auxilia principalmente na clivagem de macromoléculas do hospedeiro, seja para proteger ou fornecer nutrientes ao parasito; outra função seria o envolvimento durante a infecção de células (KULKARNI *et al.*, 2009). Foram gerados anticorpos contra gp63 e seu uso levou ao bloqueio parcial da invasão de células hospedeiras por tripomastigotas (CUEVAS *et al.*, 2003; YAO *et al.*, 2003). Já DGF-1 apresenta motivos similares aos da proteína integrina $\beta 7$ humana, relacionada a adesão celular; acredita-se que as proteínas DGF-1 também estejam implicadas nesses processos, sendo importantes durante a invasão de células hospedeiras (KAWASHITA *et al.*, 2009).

Assim como outros membros do gênero *Trypanosoma*, *T. cruzi* é incapaz de sintetizar ácido siálico, porém a superfamília das transialidases possui membros aptos a retirar este ácido da membrana da célula hospedeira e transferi-lo ao protozoário (CROSS E TAKLE, 1993; SCHENKMAN *et al.*, 1994; FREITAS *et al.*, 2011).

As mucinas são as principais aceptoras de ácido siálico, que cria uma carga negativa na membrana externa do parasito, promovendo reconhecimento, invasão celular e proteção de tripomastigotas sanguíneas (ACOSTA-SERRANO *et al.*, 2001; BUSCAGLIA *et al.*, 2006). Além disso, a ativação de resposta de Ca^{2+} por mucinas facilita estágios iniciais de invasão de células não fagocíticas (ACOSTA-SERRANO *et al.*, 2001). O reconhecimento de vários peptídeos de MASP por anticorpos de hospedeiros sugere que há implicação dessas proteínas durante a fase aguda em infecções experimentais (ALTWOOD *et al.*, 2005; DOS SANTOS *et al.*, 2012).

No estágio de amastigota, é importante o estudo da interação parasito-hospedeiro, já que sendo a forma replicativa dentro do hospedeiro, é responsável pela progressão clínica da doença (SOUZA *et al.*, 2010; SIBLEY, 2011). Assim, a identificação de proteínas envolvidas na interação com o hospedeiro pode revelar potenciais alvos para desenvolvimento de vacinas e novos tratamentos (DaROCHA *et al.*, 2002; VASCONCELOS *et al.*, 2004). As proteínas de superfície de amastigotas, ASP-1 e ASP-2, membros da superfamília das transialidases, são reconhecidas por linfócitos T CD8⁺ e ativam resposta imune citotóxica (SANTOS *et al.*, 1997; LOW E TARLETON, 1997; NOGUEIRA *et al.*, 2011). SA-85 e SSP4, identificadas com o uso de anticorpos gerados contra formas amastigotas, são outros exemplos de proteínas expressas principalmente nesse estágio de vida do parasito (ANDREWS *et al.*, 1988; KAHN *et al.*, 1990 e 1991; OLIVAS-RUBIO *et al.*, 2009). Analisando bibliotecas de cDNA, Teixeira e colaboradores encontraram, em 1994, uma nova família de glicoproteínas intimamente relacionadas, localizadas na superfície da forma amastigota de *T. cruzi*, denominadas amastinas. Tais proteínas ainda não têm sua função conhecida e serão o foco do nosso trabalho.

1.3 AMASTINAS

Amastinas foram descritas inicialmente como glicoproteínas de superfície de formas amastigotas codificadas por oito ou mais genes em sequência em *T. cruzi* (TEIXEIRA *et al.*, 1994). Os genes que codificam para essas proteínas localizam-se, em alguns casos, alternados por genes para a proteína tuzina, bem menos expressa e também de função desconhecida (TEIXEIRA *et al.*, 1995). Genes de amastina e tuzina são transcritos na mesma unidade policistônica nos três estágios de vida de *T. cruzi* (TEIXEIRA *et al.*, 1994).

A estrutura secundária da amastina contém quatro domínios hidrofóbicos, sugerindo que esta proteína pode abranger também a membrana externa do parasito. Mesmo não sendo de função conhecida, sua abundância e localização de superfície indicam que ela possa ter importante papel na interação entre amastigotas e seu ambiente citoplasmático (TEIXEIRA *et al.*, 1995). Essas proteínas já foram utilizadas com sucesso em protocolos de imunização de camundongos contra

infecção parasitária, o que pode indicar que as amastinas têm relação com a infectividade do parasito (STOBER *et al.*, 2006).

A partir de dados de sequências genômicas das amastinas em *Leishmania major*, e outros tripanossomatídeos, estas foram classificadas nas subfamílias α , β , γ , $p\delta$ e δ (JACKSON, 2010), presentes em todas as espécies de *Leishmania* sequenciadas, exibindo diferenças nos padrões de expressão no ciclo de vida (ROCHETTE *et al.*, 2005).

Com base nos dados de genoma, em *Trypanosoma cruzi*, clone CL Brener, foram encontradas três cópias de genes que codificam para δ -amastinas no cromossomo 34, sendo que aparecem acompanhadas por genes de tuzina. No Chr 26 localizou-se uma cópia, então denominada $p\delta$ -amastina. Já no cromossomo 32 foi estimado haver duas cópias de β -amastinas, que aparecem em sequência e são consideradas as mais divergentes (JACKSON, 2010).

A partir de análises utilizando dados gerados por TriTrypDB (TRITRYPDB, 2013), banco de dados que reúne informações referentes a organismos pertencentes à ordem Kinetoplastida e que são parasitos, nós selecionamos fragmentos de leitura contendo sequências homólogas de amastinas e, buscando por essas sequências em todo o conteúdo obtido para a montagem do genoma do clone CL Brener (que teve uma cobertura de 13 X) (EL-SAYED *et al.*, 2005), nós estimamos um total de 14 cópias de amastinas nessa cepa, sendo 12 δ -amastinas e 2 β -amastinas (KANGUSSU-MARCOLINO *et al.*, 2013).

Das amastinas encontradas em diferentes cepas de *T. cruzi*, as δ -amastinas presentes no cromossomo 34 apresentam um alto nível de identidade entre si (85 a 100%), estão na mesma unidade de transcrição policistrônica (UTP) e aparecem intercaladas por sequências que codificam para tuzina. Essas amastinas são consideradas “amastinas clássicas”. Em estudo recente, no qual foi utilizada a superexpressão das δ -amastinas em fusão à proteína verde fluorescente (GFP), observou-se que, entre outros resultados, as amastinas contribuíram para a sobrevivência do parasito, por aumentar sua taxa de metaciclogênese (diferenciação de epimastigotas para tripomastigotas metacíclicas, infectivas), além de elevar a parasitemia tecidual no organismo hospedeiro (CRUZ *et al.*, 2012).

A outra cópia de δ -amastina que aparece em *T. cruzi*, nomeada por Jackson como $p\delta$ -amastina, foi nomeada por nós como δ -Ama40 e δ -Ama50 (tendo em vista o genoma diplóide do parasito e os códigos referentes aos alelos onde essas

sequências codificadoras foram encontradas). Especula-se que a extensão C-terminal possa interferir no padrão de localização celular, uma vez que δ -Ama40 fusionada a GFP foi detectada em regiões pontuais do citoplasma e em frações de membrana, sugerindo que pode estar na membrana de alguma organela citoplasmática. Cabe ressaltar que δ -Ama40 e δ -Ama50 são mais divergentes, apresentando aproximadamente 50% de homologia com as outras δ -amastinas (KANGUSSU-MARCOLINO *et al.*, 2013).

As β -amastinas encontradas em *T. cruzi* divergem consideravelmente entre si, porém quando comparamos as sequências dessas proteínas em diferentes cepas, há grande similaridade. Nós as denominamos como β 1- e β 2-amastina, e assim como para as outras amastinas, ainda não foi possível descrever suas funções no parasito. Quanto à localização de amastinas em *T. cruzi*, vimos que as δ -amastinas aparecem na superfície celular do parasito, corroborando os dados de Teixeira e colaboradores, em 1995, assim como a β 1-amastina. Já as β 2-amastinas aparecem na superfície celular, mas também dispersas pelo citoplasma do protozoário, e semelhante às demais amastinas fusionadas a GFP, estas também aparecem em frações de membranas celulares (KANGUSSU-MARCOLINO *et al.*, 2013).

Neste trabalho em que caracterizamos diferentes classes de amastinas, mostramos também que os níveis de expressão de mRNA das δ -amastinas (incluindo δ -Ama40) estão aumentados na forma amastigota do parasito, enquanto as β -amastinas têm sua expressão acentuada em epimastigotas. Além disso, dependendo da cepa do parasito, pode haver transcritos alternativos e no caso da cepa G (considerada de baixa virulência) detectamos reduzida (ausência) expressão das δ -amastinas, em comparação com os níveis apresentados por cepas mais infectantes. Isso pode sugerir associação de amastinas com infectividade (KANGUSSU-MARCOLINO *et al.*, 2013).

Recentemente, realizamos buscas pelo banco de dados do consórcio TriTrypDB (TRITRYPDB, 2013) e, utilizando a ferramenta de alinhamento *tBlastn* (*Basic Local Alignment Search Tool*), que procura por correlações entre a sequência de interesse e (nesse caso) as proteínas presentes no banco de dados TriTrypDB (TRITRYPDB, 2013) encontramos regiões do genoma de *Trypanosoma cruzi* correspondentes a α -amastinas (dados não publicados). Essa nova subfamília

encontrada em *T. cruzi* foi localizada em fragmentos que não estão incluídos na montagem de cromossomos do clone CL Brener.

Uma vez que as amastinas constituem um potencial fator de virulência do parasito, e que evidenciamos a presença de nova classe de amastinas (potenciais α -amastinas) nesse organismo, nós propomos ampliar a caracterização destas proteínas de membrana. Para o estudo desta nova subfamília de proteínas encontradas em *T. cruzi* pretendemos realizar caracterizações *in silico*, ensaios para verificação de localização genômica e arranjo estrutural das α -amastinas em parasitos selvagens além de experimentos de localização subcelular utilizando vetores que carreguem as sequências codificadoras destas proteínas fusionadas a GFP.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Identificar e caracterizar as α -amastinas de *Trypanosoma cruzi*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar potenciais membros da família das α -amastinas por análises *in silico* utilizando o banco de dados TriTrypDB;
- Caracterizar *in silico* as α -amastinas quanto a conservação de aminoácidos entre os Tripanossomatídeos e presença dos domínios conservados;
- Determinar o arranjo genômico das α -amastinas no genoma de *T. cruzi* por ensaios de Polimorfismo no comprimento dos Fragmentos de Restrição (RFLP) e Eletroforese de campo pulsátil (PFGE);
- Avaliar a localização subcelular das α -amastinas utilizando proteínas de fusão a GFP.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANÁLISES *IN SILICO* E DESENHO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS

A partir da sequência de aminoácidos de uma δ -amastina (de código TcCLB.507739.120), foi realizado um alinhamento com a ferramenta tBlastn (*Basic Local Alignment Search Tool*), utilizando como alvo de comparação todo o genoma de *T. cruzi*, considerando desta forma todos os dados anotados do sequenciamento do clone CL Brener presentes no banco de dados do consórcio TriTrypDB (TRITRYPDB, 2013), e não apenas aqueles que foram incluídos na montagem de cromossomos.

Deste alinhamento foi possível verificar sequências do genoma de CL Brener que possuem similaridade. Algumas delas já estão nomeadas como proteínas amastina ou semelhante a amastina, porém foram encontradas outras regiões que não haviam sido identificadas como amastinas até o momento.

Para as análises *in silico* destas sequências, foram utilizados programas como ORFfinder, (ferramenta disponível na página do NCBI - *National Center for Biotechnology Information*), que procura por fases abertas de leitura (ORFs); SOSUI (HIROKAWA *et al.*, 1998) que faz previsões de estrutura secundária de proteínas de membrana; a ferramenta SMART v.7 (*Simple Modular Architecture Research Tool*) (LETUNIC *et al.*, 2012) para análise de domínios proteicos, além de CLUSTAL Omega (SIEVERS *et al.*, 2011) e SeaView (GOUY *et al.*, 2010), que realizam alinhamentos entre sequências e a ferramenta WebLogo3, que faz o alinhamento entre diversas sequências de genes e evidencia a conservação dos aminoácidos (CROOKS, *et al.*, 2004)

Para possibilitar as análises *in vitro*, foram desenhados oligonucleotídeos que amplificaram as regiões codificadoras das α -amastinas de *T. cruzi*. O desenho foi realizado pela ferramenta *oligo calc* (KIBBE, 2007) de modo a possibilitar a recombinação dos fragmentos amplificados no vetor de entrada pDONR™ Zeo, utilizando a tecnologia Gateway® (Invitrogen), que emprega as propriedades do bacteriófago lambda (LANDY, 1989), por isso, os oligonucleotídeos possuem regiões codificadoras para os sítios *AttB* 1 e 2 (necessários para a recombinação) (**Tabela**

1). Não foram incluídos códons de parada aos oligonucleotídeos, pois assim pudemos adicionar a sequência codificadora para a proteína verde fluorescente (GFP) na região 3' do fragmento amplificado, para que GFP pudesse servir como marcador e sua fluorescência pudesse ser visualizada e/ou quantificada.

TABELA 1. NOMES E SEQUÊNCIA DE INICIADORES UTILIZADOS NO PROJETO.

Nome do Iniciador	Sequência 5'→ 3'
TcAlpha1_For	GGGGacaagtttgtaaaaaagc aggct ccATGCCAACAGGGAGGCGGACAGG-
TcAlpha1_Rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTacCACTGTAAGAGCAAACAACGC
TcAlpha2_For	GGGGacaagtttgtaaaaaagc aggct cctgtgctgcccATGAGTTTTCTGCC
TcAlpha2_Rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGCTgATAAAAATGCGGCACGATAC

3.2 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE α -AMASTINAS E CLONAGEM SEGUINDO O SISTEMA GATEWAY®

As reações de amplificação deste trabalho foram feitas em termociclador Mastercycler® (ependorf) e os sistemas de reação continham 100 ng de DNA genômico de *T. cruzi* clone CL Brener, *Taq* DNA polimerase 1-5 unidades por reação de 20-100 μ L, tampão de PCR FERMENTAS® 10X *Taq* Buffer + KCl [100 mM Tris-HCl (pH8,8); KCl 500 mM; Nonidet P40 0,8% (v/v)], dNTP 0,2 mmol/L, MgCl₂ 1,5 mmol/L e 5-10 pmol de oligonucleotídeos iniciadores (AZEVEDO *et al.*, 2003-adaptado).

Os ciclos de amplificação seguidos foram: 94 °C por 3 minutos para desnaturação do DNA, seguido de 30 ciclos de: 30 segundos a 94 °C, 30 segundos para anelamento, e 3 minutos a 72 °C para extensão; 10 minutos a 72 °C e as amostras ficaram a 10 °C até que fossem retiradas do termociclador.

Os fragmentos amplificados foram purificados, com uso de solução de 30% PEG (polietilenoglicol) 8000/30 mM MgCl₂ (fornecida pelo sistema de purificação do kit Gateway®). O produto desta purificação foi ressuspensionado em tampão de eluição e a solução de PEG/MgCl₂ (na proporção 1:1) foi adicionada. Tal produto foi agitado vigorosamente e centrifugado por 15 minutos a 10.000 rpm. Depois de retirada do

sobrenadante, o *pellet* foi seco a 60 °C por 15 minutos, ressuspendido em 10 µL de tampão de eluição TE.

3.3 ELETROFORESE DE DNA

Antes da purificação dos produtos amplificados, eles foram submetidos a eletroforese para verificar a ocorrência de amplificação. A eletroforese de DNA foi realizada em gel horizontal de agarose como descrito por SAMBROOK e colaboradores (1989). O tampão utilizado foi TBE 1X (Tris-HCl 8,9 mM; ácido bórico 8,9 mM e EDTA 0,2 mM; pH 8,0). As amostras foram diluídas em tampão F.E.F Suds (azul de bromofenol 0,025% (p/v); xilenocianol 0,025% (p/v); SDS 0,1% (p/v); Ficoll® 20% em tampão T10E1). Foi utilizado marcador de peso molecular de 1 kb (Fermentas). Após o tempo de corrida, o gel foi tratado com solução de Brometo de Etídeo (0,05%) por 15 minutos e visualizado sob luz ultravioleta (302 nm) em transiluminador UV. As imagens foram obtidas utilizando o EC3™ Imagem System - UVP BioImaging Systems.

3.4 CLONAGEM DOS *AMPLICONS* E CONSTRUÇÃO DE VETORES

A reação que possibilitou a recombinação dos fragmentos amplificados (*amplicons*) das α -amastinas ao vetor de entrada do sistema *Gateway*® é mediada pelo mix enzimático BP clonase™ e foi realizada de acordo com os parâmetros especificados no manual do fabricante (Invitrogen – catálogos nº 12.535-019 e 15535-027). O vetor pDONR™/Zeo é fornecido pelo fabricante e contém a sequência do gene de resistência ao antibiótico zeocina, que foi útil na seleção de colônias bacterianas (prováveis clones positivos). pDONR™/Zeo também contém as regiões *AttP1* e *AttP2*, que recombinaíram com as regiões *AttB1* e *AttB2* dos *amplicons*, formando então os vetores de entrada pENTR1_Ama α 1 e

pENTR1_Ama α 2 , que contêm sítios *AttL1* e *AttL2* que, por ação do mix enzimático LR clonase™ recombinaram com os sítios *AttR1* e *AttR2* do vetor de destino pTcDEST_GFPNeo (dados não publicados), formando então os vetores pTcDEST_ α 1AmaGFPNeo e pTcDEST_ α 2AmaGFPNeo, que foram individualmente transfectados em *Trypanosoma cruzi*, clone Sylvio X10/1, com a intenção de que o parasito expressasse as α -amastinas em fusão a proteína verde fluorescente (GFP), possibilitando a realização de ensaios de localização subcelular por microscopia confocal e quantificação de fluorescência por citometria de fluxo.

3.5 PREPARAÇÃO DE CÉLULAS TERMOCOMPETENTES

Inicialmente foi preparado um pré-inóculo com a estirpe de *Escherichia coli* DH10B, com 4 mL de meio de cultura Luria Bertani líquido (LB) (5 g/L de extrato de levedura; 10 g/L de NaCl; 10 g/L de triptona) suplementado com 80 μ g/mL de Streptomicina, e incubado durante a noite a 37 °C sob agitação. No dia seguinte, um inóculo foi preparado com 100 mL de LB, sem adição de antibiótico e incubado a 37 °C sob agitação de 150 rpm por aproximadamente 2 horas.

O inóculo foi transferido para tubo plástico estéril e mantido no gelo por 20 minutos, com posterior centrifugação a 4000 rpm à 4 °C por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 30 mL de uma solução de MgCl₂ 100 mM. A suspensão foi centrifugada nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi novamente descartado e o *pellet* ressuspendido com 30 mL de CaCl₂ 100 mM. Depois de mantido no gelo por 30 minutos, o meio foi centrifugado seguindo as mesmas condições citadas anteriormente, o sobrenadante foi descartado e *pellet* ressuspendido em 2 mL de uma solução de CaCl₂ 85 mM em Glicerol 15% e aliqotado 200 μ L em tubos de 1,5 mL estéreis.

3.6 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

Os plasmídeos recombinados foram incubados com *E. coli* termocompetente por 30 minutos no gelo (0,1 µg de plasmídeo para 50 µL de célula competente). Posteriormente, as bactérias desta mescla foram submetidas a um choque térmico (42 °C por 3 minutos) e depois o tubo que contém a mescla foi colocado no gelo por 2 minutos. Passado o tempo no gelo, foi adicionado 1 mL de meio de cultura LB sem antibiótico. Os tubos foram então incubados a 37 °C por 45 minutos, sob agitação constante para que as bactérias pudessem se recuperar e iniciar a expressão dos genes de resistência ao antibiótico zeocina. Posteriormente, o conteúdo dos tubos foi espalhado em placas de *Petri* contendo meio sólido Luria Bertani ágar ou LA (15 g/L de ágar adicionado ao meio LB) e zeocina 50 µg/mL. Estas placas foram incubadas a 37 °C por 18 horas.

3.7 PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS POR LISE ALCALINA

As colônias obtidas a partir da transformação foram utilizadas para preparo de inóculos (4 mL de LB suplementado com 200 µg/mL de Ampicilina) que foram incubados durante a noite à temperatura de 37 °C sob agitação.

Em cada inóculo foi feita a purificação de plasmídeo pelo método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989, adaptado):

A cultura obtida pelo inóculo foi transferida a tubos plásticos de 2 mL, as células foram coletadas por centrifugação (14.000 rpm, 2 minutos) e ressuspensas em 250 µL de solução GET (Tris-HCl 25 mmol/L pH 8,0; glicose 50 mmol/L; EDTA 10 mmol/L) contendo 10 µg/mL de RNase. Em seguida, as células foram lisadas com adição de 250 µL de uma solução de lise (NaOH 0,2 mol/L e SDS 1% (m/v)). Em seguida, as proteínas, o DNA cromossômico, os restos celulares e o SDS foram precipitados com adição de 250 µL de acetato de potássio (3 mol/L, pH 4,8). O conteúdo do tubo foi centrifugado (14.000 rpm, 25 minutos) e o sobrenadante coletado foi precipitado pela adição de 0,6 volume de isopropanol, homogeneizado e essa solução será centrifugada (14.000 rpm, 20 minutos), sendo descartado o

sobrenadante, lavado o *pellet* com etanol 70% e depois centrifugado (14.000 rpm, 5 minutos). Após secagem, o *pellet* foi ressuspensionado com 30 μ L de água ultrapura autoclavada.

O DNA purificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%.

3.8 RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA

Para diagnóstico da construção dos vetores, foram realizadas reações individuais de restrição enzimática com os DNAs obtidos pelo método de lise alcalina e as endonucleases *EcoRI* e *KpnI*. Cada reação foi composta de cerca de 100 ng de DNA, uma Unidade de enzima, tampão recomendado com BSA 10X e água ultrapura autoclavada para completar o volume das reações, que ficaram durante a noite em estufa a 37°C.

Os locais dos sítios de restrição destas enzimas foram úteis para a verificação dos tamanhos de bandas a liberados e confirmação das clonagens. Tal observação foi possível por análise de eletroforese em gel de agarose 1%.

3.9 TRANSFEÇÃO EM *Trypanosoma cruzi*

Formas epimastigotas do clone Sylvio X10/1 em fase exponencial de crescimento foram lavada em tampão de eletroporação (DaROCHA *et al.*, 2004) a 4°C. Após ressuspensão em volume final de 10^8 células/mL no mesmo tampão, alíquotas de 0,4 mL (4×10^7 parasitos) foram misturadas a 50 μ g de cada plasmídeo, em uma solução de, no máximo, 50 μ L em cubetas de eletroporação de 0,2 mm de estéreis. A mistura de soluções foi eletroporada utilizando o aparelho Gene Pulser System (BioRad).

Para *T. cruzi*, a condição utilizada é 0,3 KV, capacitância de 500 μ F e 800 ohms e foram aplicados 2 pulsos em intervalo de 30 segundos.

Após a transfecção, os parasitos foram transferidos para garrafas de cultura estéreis contendo 5 mL de meio LIT e encubadas em 27 °C. No dia seguinte à eletroporação foi adicionado o antibiótico G418, análogo a Neomicina. Para acompanhar a seleção de parasitos resistentes, foi realizada uma transfecção seguindo os mesmos parâmetros já apresentados, porém sem adição dos plasmídeos. Considerou-se concluída a seleção a partir do momento que na cultura sem adição de DNA plasmidial não se encontrem indivíduos viáveis.

3.10 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE *Trypanosoma cruzi*

Para extração de DNA genômico, culturas de *T. cruzi* clones CL Brener e Sylvio X10/1, além das cepas Y e G, selvagens em fase exponencial, foram individualmente centrifugadas a 3000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Logo após, o sobrenadante foi descartado e as células lavadas com PBSG (NaH₂PO₄ 75 mM, NaCl 60 mM e Glicose 10%). Após nova centrifugação, cada *pellet* foi ressuspendido em tampão de lise/digestão a uma concentração de 5.10⁸ parasitos por mL e esta suspensão, com adição das enzimas Proteinase K e RNase, foi incubada a 37 °C durante a noite. No outro dia, o DNA foi extraído com 1 volume de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e a fase aquosa foi transferida para outro tubo. Os DNAs foram precipitado com 0,6 volume de isopropanol, lavados com etanol 70%, secos e ressuspendidos em água ultrapura.

3.11 VERIFICAÇÃO DA LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DE α -AMASTINAS EM *T. cruzi*

Para iniciar a caracterização genômica destas amastinas, foram realizados ensaios de polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) e PFGE (Eletroforese de Campo Pulsátil), utilizando DNA genômico de diferentes cepas e clones.

Os vetores de entrada pENTR_Ama α 1 e pENTR_Ama α 2 (que contêm as regiões codificadoras para as α -amastinas) serviram de molde para a construção das sondas de hibridização. Foram realizadas novas reações de PCR utilizando o DNA plasmidial destes vetores, e o produto de amplificação foi purificado de gel e utilizado em reação de marcação com [α ³²P]dCTP.

Na preparação das amostras de DNA do parasito para a PFGE, cultivos de *T. cruzi*, clones CL Brener e Sylvio X10/1, cepas G e Y (todos selvagens) foram individualmente centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Logo após, o sobrenadante foi descartado e as células lavadas com PBSG (NaH₂PO₄ 75 mM, NaCl 60 mM e Glicose 10%). Após nova centrifugação, o *pellet* foi ressuspenso cuidadosamente para haver, aproximadamente, 10⁷ parasitos em 50 μ L de PBSG. Igual volume de agarose de baixo ponto de fusão (LMP – *Low Melting Point*) 1%, à temperatura de aproximadamente 40 °C. Foi adicionado à suspensão de parasitos. Esta mistura foi, então, homogeneizada e distribuída em moldes com volume de 100 μ L com concentração final de parasitos de 10⁷.

Após solidificação, cerca de 10 min a 4°C, os blocos foram mergulhados em um solução ESP (EDTA 0,5 M, Lauroylsarcosine 1% e Pronase 0,5 mg/mL), e mantidos por 48 horas a 37 °C. Após lavagem em EDTA 0,5 M pH 8,0, os blocos foram armazenados a 4 °C nesta solução até o momento da eletroforese (ENGMAN *et al.*, 1987). Os blocos contendo moléculas de DNA dos parasitos foram submetidos à PFGE ao lado de um padrão comercial de peso molecular (cromossomos de *H. wingei*, BioRad). As bandas cromossômicas dos parasitos foram separadas através de eletroforese de campo pulsátil (PFGE) conforme descrito por Cano *et al.* (1995), com algumas modificações. Os géis de PFGE foram preparados com agarose 0,8% em TBE 0,5X (25 mM Tris-borato/0,5 mM EDTA, pH 8,0). As corridas eletroforéticas foram realizadas por 135 horas com voltagem constante (80 V) a 13 °C em aparelho “Gene Navigator System” (Pharmacia). Foram aplicados pulsos homogêneos (N/S, L/O) de 90 segundos por 30 horas, 120 segundos por 30 horas, 200 segundos por 24 horas, 350 segundos por 25 horas e 800 segundos por 26 horas, com interpolação. Após a separação cromossômica os géis foram corados com solução de brometo de etídeo (0,5 μ g/mL) e fotografados. Em seguida, o DNA foi transferido para uma membrana Hybond-N+ (AMERSHAM) e hibridizado com as sondas de α -amastinas anteriormente mencionadas.

Já para os ensaios de polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP), amostras de DNA dos clones CL Brener e Sylvio X10/1, e cepas Y e G, após extração descrita em 3.9, foram utilizadas em reações de digestão. Depois de confirmada a digestão completa por eletroforese em agarose 1%, as amostras foram aplicadas em agarose 0,8% e corridas em TBE 1X a 25 V por 13 horas. O gel foi corado brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e fotografado com régua para obtenção das posições das bandas do marcador de peso molecular 1 kb (Fermentas).

Para a transferência do DNA para uma membrana, o gel foi tratado de acordo com o protocolo descrito por Southern e colaboradores (1975), com algumas modificações: primeiramente, o DNA foi depurinado com uma solução 125 mM de HCl por 7 minutos. Em seguida, foi incubado com solução desnaturante (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M) por 30 minutos em agitador orbital. Na sequência, foi neutralizado em solução contendo Tris-HCl 0,5 M, pH 7,5 e NaCl 1,5 M. Por fim, o gel incubado por 10 minutos em SSC 10X. Foi então montado um sistema para transferência do DNA para membrana Hybond-N+ (AMERSHAM) por capilaridade com solução SSC 10X. O tempo de transferência foi de, aproximadamente, 30 horas.

Após transferência foi realizada a hibridação com as sondas de α -amastina

3.12 MICROSCOPIA CONFOCAL

Os parasitos transfectados com os vetores contendo as α -amastinas fusionadas a GFP foram centrifugados e lavados 2X com PBS 1X suplementado com 3% de soro fetal bovino e fixados com paraformaldeído 4% em PBS a temperatura ambiente por cerca de 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram novamente lavadas 2X em PBS e, em seguida, o DNA das células foi corado por 10 minutos a temperatura ambiente pelo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (0,1 µg/mL) e preparado sobre lâminas de vidro contendo um gota de 90% de glicerol e 10% de Tris-HCl 0,5M; pH 9,0.

3.13 CITOMETRIA DE FLUXO

Para análise de fluorescência e homogeneidade dos parasitos transfectados com os vetores pTcDEST_α1AmaGFPNeo e pTcDEST_α2AmaGFPNeo, foram realizados ensaios de citometria de fluxo. Cerca de 2×10^6 parasitos centrifugados por 5 minutos, 4000 rpm a 4°C, ressuspensos em 1 mL de tampão PBS 1X. A análise de células foi realizada pelo citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson) com fluorescência determinada pelo filtro FL1-H (emissão de 515 a 545 nm) considerando um total de 10.000 eventos. Os dados gerados neste ensaio foram analisados pelo programa Cyflogic versão 1.2.1 (<http://www.cyflogic.com/index.php?link1=1&link2=4>).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISES *IN SILICO* DA NOVA CLASSE DE AMASTINAS

Amastinas são glicoproteínas de superfície descritas inicialmente como estágio específicas de formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* (TEIXEIRA *et al.*, 1994). Tais proteínas também foram encontradas em outros tripanossomatídeos, como *Leishmania donovani* (WU *et al.*, 2000), *Leptomonas seymouri* e *Crithidia* spp (JACKSON, 2010).

A estrutura secundária predita para a maioria destas proteínas compreende quatro domínios transmembrana, dois domínios extracelulares e as extremidades N-terminal e C-terminal voltadas para o citosol (ROCHETE *et al.*, 2005). Nos domínios extracelulares de amastinas presentes em diferentes organismos, pode-se observar a presença de aminoácidos altamente conservados, como três resíduos de cisteína, um de glicina, um de triptofano e uma treonina (ROCHETE *et al.*, 2005). E a região entre as duas primeiras cisteínas é altamente conservada, considerando todos os genes homólogos de amastina dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*, sendo exclusiva para esta família de proteínas, é a “assinatura da amastina” (ROCHETE *et al.*, 2005).

A partir de análises filogenéticas de genes ortólogos de amastina em diferentes tripanossomatídeos, foi proposta a classificação dessas proteínas em subfamílias (α , β , γ , e δ) (JACKSON, 2010). Foram encontrados representantes das quatro subfamílias em diversas espécies de *Leishmania* e isoformas de δ , e β em *T. cruzi* (JACKSON, 2010; KANGUSSU-MARCOLINO *et al.*, 2013).

Recentemente, foi utilizada a sequência de aminoácidos de uma das δ -amastinas (TcCLB.507739.120) (descritas por TEIXEIRA *et al.*, 1994) numa pesquisa com a ferramenta de alinhamento tBlastn contra todos os dados de sequência, ou seja, inclui tanto sequências montadas em cromossomos e *contigs* de *T. cruzi* clone CL Brener existentes no banco de dados do consórcio TriTrypDB (TRITRYPDB, 2013).

Como resultado da busca, além das sequências já anotadas como amastinas e que estão montadas em cromossomos, foram encontrados *contigs* sem predição de genes (Tabela 2). Destes *contigs*, alguns (9) mostram alta similaridade e correspondem a δ -amastinas não montadas no genoma, outro corresponde a β 2-amastina e, os demais, a prováveis amastinas mais divergentes. Em uma inspeção visual, foi constatada, nestes *contigs*, a conservação de resíduos de aminoácidos presentes na assinatura das amastinas, tais como: cisteínas, triptofano, treonina e glicina. Também foi observado que os *contigs* Tcruzi_6279 e Tcruzi_12631 contêm as maiores regiões homólogas às amastinas da pesquisa. Sendo assim, as demais análises serão realizadas com estas sequências. Cabe ressaltar que este mesmo tipo de análise foi realizada utilizando outras amastinas na pesquisa, o que não alterou a identificação de novos *contigs* contendo sequências homólogas as amastinas.

Tabela 2: *Contigs* que codificam novas amastinas de *T.cruzi* (clone CL Brener) identificadas pelas análises de tBlastn depositados no TriTrypDB.

Contig	Tamanho (pb)	Orientação	Amastinas	e-value	Similaridade (%)
Tcruzi_17921	1007	Positiva	δ	4.2e-88	98
Tcruzi_16637	934	Positiva	δ	4.5e-88	98
Tcruzi_3954	1786	Positiva	δ	1.6e-75	89
Tcruzi_25863	957	negativa	δ	8.2e-55	92
Tcruzi_32657	1045	negativa	δ	7.7e-53	89
Tcruzi_11436	1051	Positiva	δ	1.2e-29	91
Tcruzi_24593	960	negativa	δ	8.9e-26	98
Tcruzi_24722	826	negativa	β 2	8.5e-15	45
Tcruzi_12631 ^a	2300	negativa	2	3.3e-07	41
Tcruzi_16532	1409	negativa	2	1.0e-06	41
Tcruzi_13226	3176	negativa	2	3.7e-06	41
Tcruzi_26643	992	negativa	1	0.00013	43
Tcruzi_6279 ^a	3854	negativa	1	0.00095	43
Tcruzi_17610	2176	Positiva	1	0.00096	43
Tcruzi_21390	4681	negativa	X ^b	0.16	37

^a *Contigs* que contêm distintas sequências homólogas às amastinas

^b *Contig* não analisado por apresentar sequência com e-value maior que 10^{-3} .

A partir dos *contigs* Tcruzi_6279 e Tcruzi_12631 foi realizada a predição de fase aberta de leitura utilizando ORFfinder (ferramenta disponível na página do NCBI - *National Center for Biotechnology Information*) e obtenção da sequência de aminoácidos que apresentou identidade de sequências com as amastinas. Como pode ser observado na tabela 3, estes *contigs* apresentam sequências que

codificam prováveis amastinas de tamanho bastante superior tanto às δ -amastinas quanto às β -amastinas (174 a 194 aminoácidos) de *T. cruzi*.

Tabela 3: Informações sobre as sequências de aminoácidos encontradas nos contigs Tcruzi_6279 e Tcruzi_12631

	ORF (posição)	Tamanho da Proteína (aa)	Massa molecular (kDa)	Ponto isoelétrico pI
Tcruzi_6279	249 – 1118	289	31,20	8,12
Tcruzi_12631	1060 – 2223	387	42,08	5,87

A fim de obter melhores evidências de que estas sequências correspondem a novas amastinas de *T. cruzi*, as sequências polipeptídicas foram submetidas a pesquisa por domínios conservados e predição de regiões transmembrana (software SMART, que pode utilizar informações de banco de dados de proteínas). Como pode ser visto na figura 2, tais sequências são reconhecidas como amastinas e a veracidade deste dado pode ser confirmada pelo baixo *e-value*. Podemos observar também a predição de quatro regiões transmembrana e uma longa extremidade N-terminal, o que leva a crer na ausência de peptídeo sinal (que estaria localizado na primeira região transmembrana). A presença de peptídeo sinal é relatada para as δ -amastinas enquanto sua ausência é constatada nas β -amastinas (JACKSON, 2010; KANGUSSU-MARCOLINO, *et al.*, 2013).

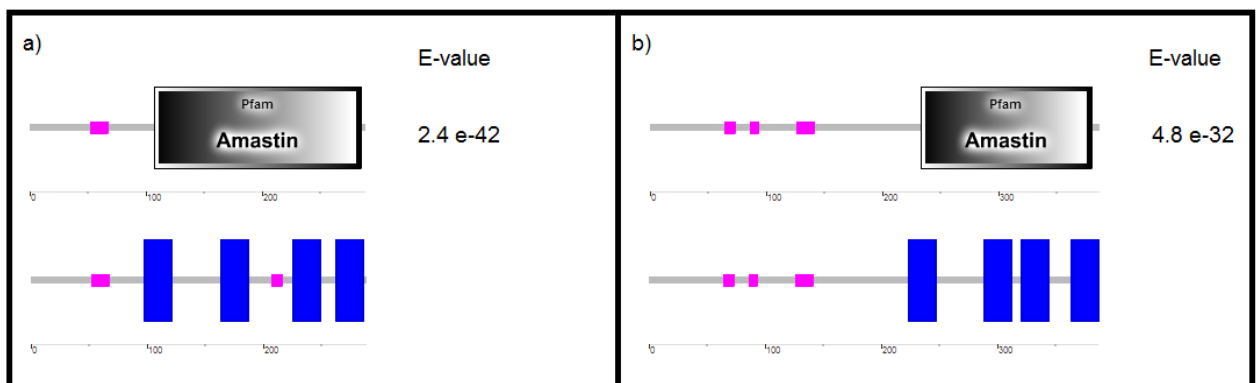


FIGURA 2. IDENTIFICAÇÃO DE DOMÍNIOS E REGIÕES TRANSMEMBRANA DAS PROVÁVEIS PROTEÍNAS AMASTINAS CODIFICADAS PELOS CONTIGS Tcruzi_6279 e Tcruzi_12631.

FONTE: o autor (2013).

NOTA: A partir de análises pelo programa SMART, que utilizou informações do banco de dados Pfam, foi confirmado que as regiões codificadoras encontradas nos *contigs* analisados são de membros da família multigênica das amastinas. A) uma das ORFs contidas no *contig* Tcruzi_6279 codifica para uma amastina (esta predição possui um *e-value* de 2.4 e-42) e pode-se observar a presença de 4 domínios transmembrana. B) a ORF contida no *contig* Tcruzi_12631 codifica para uma amastina (esta predição possui um *e-value* de 4.8 e-32) e pode-se observar a presença de 4 domínios transmembrana.

Uma vez que as determinações de prováveis domínios corroborou a hipótese que estas seriam novas amastinas de *T. cruzi*, realizou-se análises comparativas com as sequências de amastinas identificadas e classificadas por Jackson (2010) em *T. cruzi*, *Crithidia* sp. e *Leishmania major*, na tentativa de classificar as novas amastinas. Para isto, as sequências de todas as amastinas foram alinhadas utilizando ClustalO (Clustal Omega) seguida de análise filogenética utilizando o software Seaview4. Como pode ser visto na figura 3, estas duas novas amastinas estão agrupadas entre as α -amastinas de *Crithidia* sp e *L. major*. É importante destacar que a conservação de sequências entre as α -amastinas de *T. cruzi* é inferior a 30%.

Esta filogenia (com exceção da classificação de α -amastinas em *T. cruzi*), ratifica as análises realizadas em 2010 por Jackson, e em 2013 por Kangussu-Marcolino e colaboradores. Uma das α -amastinas presentes em *Leishmania major* (LmjF28.1390_alpha) e *Crithidia* sp (Csp_AS87874.1_alpha) parece mais próxima à amastina localizada no *contig* Tcruzi_6279 (nomeada aqui como α 1-amastina) e, as α -amastinas presentes em *Leishmania major* (LmjF28.1400_alpha) e *Crithidia* sp (Csp_AS87875_alpha) estão mais próximas à amastina localizada no *contig* Tcruzi_12631 (α 2-amastina). As α -amastinas de *Leishmania major* e *Crithidia* sp aparecem em sequência no genoma destes organismos, o que pode sugerir que esta localização se repita em *T. cruzi* (JACKSON, 2010; TRITRYPDB, 2013).

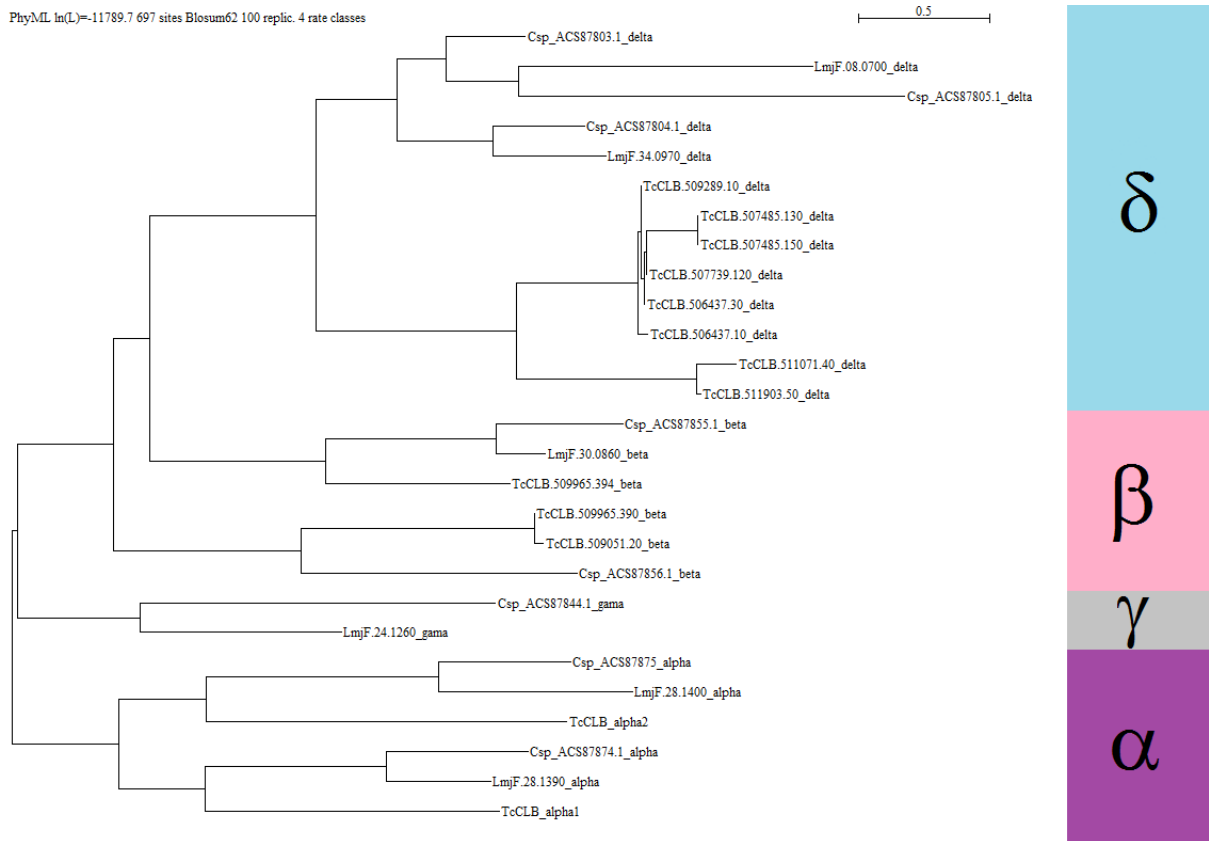


FIGURA 3. ANÁLISE FILOGENÉTICA DE MEMBROS DE DIFERENTES SUBFAMÍLIAS DE AMASTINAS.

FONTE: o autor (2013).

NOTA: A partir do alinhamento originado pelo programa Clustal Omega e que gerou um arquivo multifasta, foi realizada análise filogenética pelo programa Seaview4 que agrupou as diferentes amastinas identificadas em *T. cruzi*, *Crithidia* sp. e *Leishmania major* de forma semelhante a verificada na literatura, e classificou as ORFs contidas nos contigs Tcruzi_6279 e Tcruzi_12631 como membros da subfamília das α -amastinas. O *bootstrap* utilizado na análise foi 100.

Posterior a identificação das α -amastinas em *T. cruzi*, foi realizado, com uso da ferramenta WebLogo3 (CROOKS, *et al.*, 2004), um alinhamento entre sequências destas e de outras isoformas de amastinas (β e δ) encontradas no parasito (FIGURA 4). Vê-se a considerável conservação de alguns dos resíduos de cisteína, triptofano e glicina (mantidos em todas as sequências deste alinhamento). Além disso, pode-se observar o alto nível de conservação entre aminoácidos que compõe os prováveis domínios hidrofóbicos (representados por letras em vermelho) destas proteínas, como apontado por Rochette e colaboradores, em 2005.

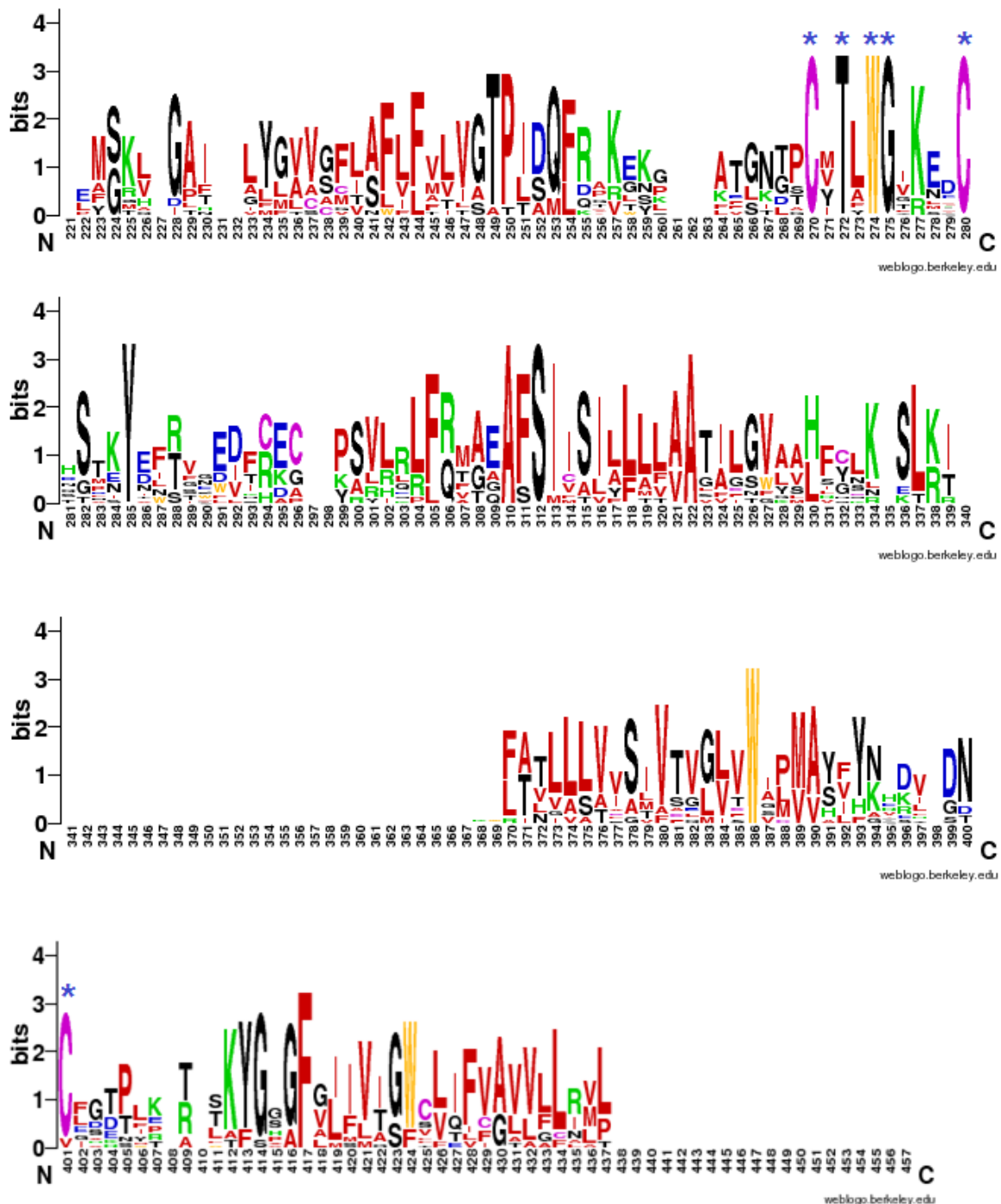


FIGURA 4. ALINHAMENTO ENTRE SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DE DIFERENTES ISOFORMAS DE AMASTINAS EM *T. cruzi*.

FONTE: o autor (2013).

NOTA: Um arquivo multifasta correspondente ao alinhamento gerado com o programa Clustal Omega foi submetido ao programa WebLogo a fim de evidenciar o grau de conservação dos aminoácidos das amastinas. Devido a diferença no número de aminoácidos que constituem as isoformas destas proteínas, o alinhamento inicia na posição 221 para destacar as regiões de alinhamento mais importantes. Letras que representam aminoácidos de caráter hidrofóbico aparecem em vermelho, cisteínas aparecem em cor de rosa, triptofano aparece em amarelo, tirosinas, glicinas e treoninas (além de outros aminoácidos) aparecem em preto. Os asteriscos azuis destacam os resíduos de aminoácidos mais conservados e pertencentes à “assinatura das amastinas”.

4.2 ARRANJO GENÔMICO DA α -AMASTINAS DE *T. cruzi*

Uma vez que as sequências das prováveis α -amastinas foram encontradas em regiões não montadas do genoma, não temos como determinar de forma acurada do número de cópias, nem o cromossomo onde elas estão localizadas por análises *in silico*. A fim de iniciar a caracterização genômica destes genes realizaram-se ensaios de polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) e PFGE (Eletroforese em Gel de Campo Pulsátil), utilizando DNA genômico de diferentes cepas e clones.

Para escolha das enzimas de restrição para realização do *RFLP*, primeiramente foram identificados todos os *contigs* contendo sequências de α -amastinas por meio de pesquisas *blastn* com as sequências codificadoras completa de cada α -amastina (ORF de Tcruzi_6279 Tcruzi_12631). Com essa abordagem foram selecionados os *contigs* da tabela 3, que possuem sequência completa ou parte das α -amastinas. De acordo com o observado por Jackson (2010) em *Crithidia* sp. e *Leishmanias* estas amastinas estão organizadas em *tandem* no genoma, o que foi confirmado pela detecção de 3 *contigs* contendo fragmentos de ambas α -amastinas.

Tabela 4: Contigs que codificam novas amastinas de *T. cruzi* (clone CL Brener) identificadas pelas análises de *tblastn* depositados no TriTrypDB.

	Contigs	Tamanho (pb)	Fita	Amastina	Posição da sequência de amastina	Tamanho da sequência
1	Tcruzi_6279 ^a	3854	Negativa	α 1	2737-3606 (CI)	867 ^a
2	Tcruzi_17610	2176	Positiva	α 1	816-1682	867 ^a
3	Tcruzi_26643	992	Negativa	α 1	1-604 (CI)	604
4	Tcruzi_14525 ^b	1289	Positiva	α 1 α 2	1-442 935-1289	442 335
5	Tcruzi_2878 ^b	1035	Positiva	α 1 α 2	1-400 892-1035	400 144
6	Tcruzi_2295	1216	Positiva	α 1	1018-1216	199
7	Tcruzi_24108 ^b	1327	Positiva	α 1 α 2	1-183 693-1327	183 635
8	Tcruzi_12631	2300	Negativa	α 2	78-1238 (CI) ^a	1161 ^a
9	Tcruzi_16532	1409	Positiva	α 2	1-1142	1142
10	Tcruzi_27955	1229	Positiva	α 2	481-1229	749
11	Tcruzi_13226	3176	Negativa	α 2	1-569 (CI)	569

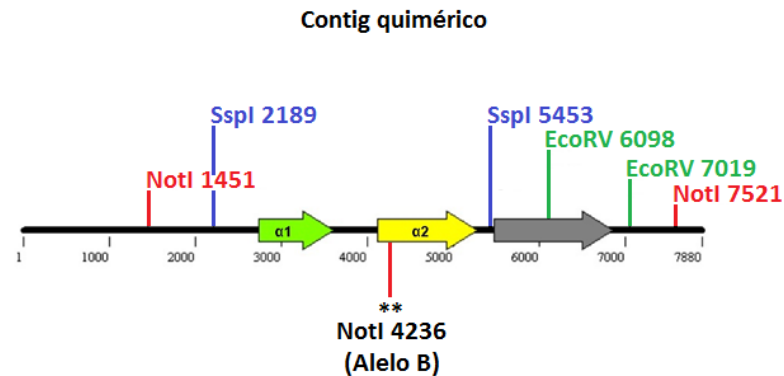
^a Regiões codificadoras completas.

^b Contigs contendo sequências homólogas a ambas alfa-amastinas.
CI – posições referentes a sequência completar invertida do *contig*.

Com base na sequência dos *contigs* da tabela 4 foi realizada uma montagem preliminar das sequências de nucleotídeos, utilizando os *contigs* contendo ambas as amastinas para fundir *contigs* maiores contendo as amastinas inteiras. Sendo assim um *contig* quimérico de 7880 nucleotídeos foi montado, pela sobreposição dos *contigs* Tcruzi_6279, Tcruzi_24108, Tcruzi_12631 e Tcruzi_13226 do clone CL Brener, e o mapa de restrição determinado (Figura 5A).

Baseado no mapa de restrição teórico (Figura 5A) foram escolhidas enzimas de restrição que flaqueassem as regiões codificadoras das α -amastinas, para avaliar o arranjo genômico de tais genes. Após a digestão, eletroforese e transferência do DNA, a membrana foi hibridada com sonda da região codificadora de α 1-amastina amplificada por PCR e marcada radioativamente com d-CTP[α -32P] (Figura 5B). Inicialmente, os fragmentos esperados para digestão com *NotI* e *SspI*, e hibridação eram ~6070 e ~3264 pb, respectivamente. Para a digestão com *EcoRV*, não havia um tamanho teórico esperado, já que o trecho analisado continha apenas um sítio para esta enzima de restrição. Para todas as cepas e clones analisados foram encontradas bandas nos tamanhos esperados, contudo em alguns casos bandas adicionais foram detectadas. No caso do clone CL Brener uma análise mais cuidadosa da sequência de nucleotídeos dos *contigs* apontou uma provável existência de alelo polimórfico para o sítio de *NotI*, o que explicaria a banda adicional de ~2785 pb. Esta variação de alelos no clone CL Brener era esperado por se tratar de uma clone híbrido do grupo TcruziVI (ZINGALES et al, 2009). O aparecimento das bandas adicionais em outras digestões pode ser explicado por uma potencial presença de múltiplas cópias no genoma ou pela ocorrência de restrição parcial. Desta forma, experimentos adicionais de restrição completa e utilização de sondas adicionais (p.ex. α 2-amastina) estão sendo conduzidos. De forma geral, cabe destacar que os DNAs dos diferentes *T. cruzi* sugerem uma organização cromossômica semelhante.

A)



(B)

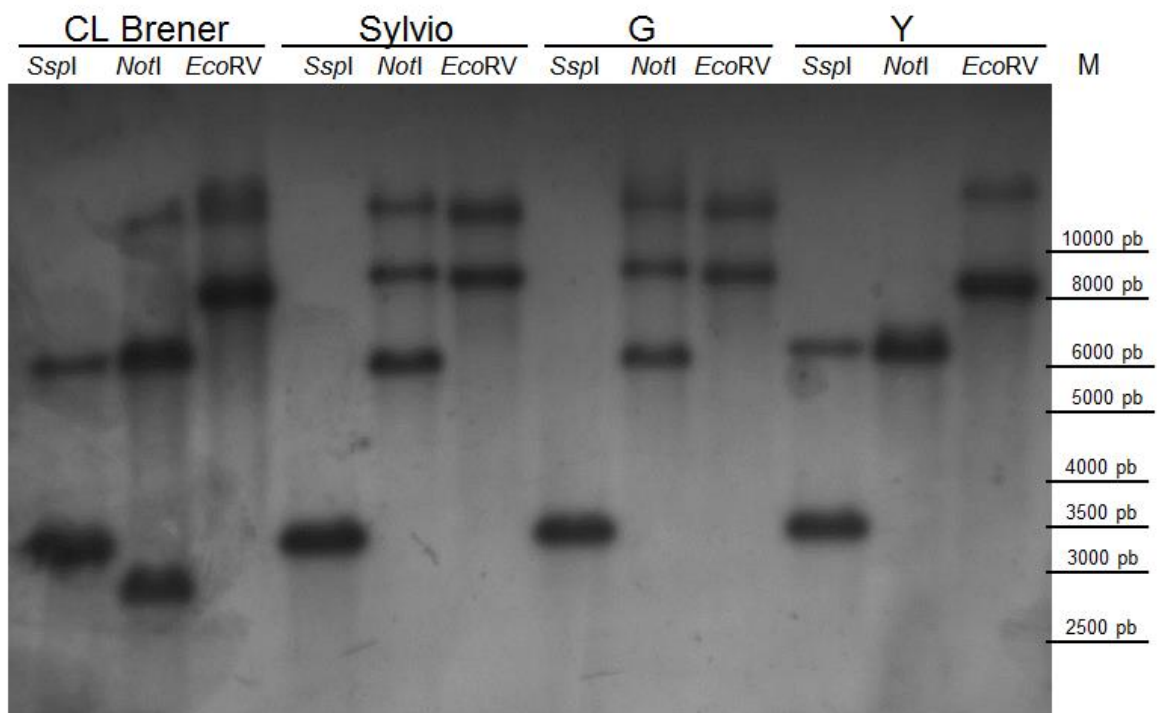


FIGURA 5. MAPA DE RESTRIÇÃO DE UM CONTIG QUIMÉRICO DE *Trypanosoma cruzi* E ENSAIO DE POLIMORFISMO NO COMPRIMENTO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO (RFLP) DE DNA GENÔMICO DE CLONES E CEPAS SELVAGENS DE *T. cruzi* PARA VERIFICAÇÃO DO ARRANJO GENÔMICO DE α 1-AMASTINA.

FONTE: o autor (2013).

NOTA: (A) O esquema mostra a montagem de sequências obtidas do genoma de CL Brener de regiões não montadas em cromossomos. A região codificadora de α 1-amastina está representada como seta verde e de α 2-amastina em seta amarela. Os sítios de restrição escolhidos para o ensaio de RFLP, mostrados em seguida, estão indicados com suas respectivas posições no cluster analisado. (B) O DNA genômico dos clones CL Brener e Sylvio X10/1, cepas G e Y foi digerido, em reações individuais, com as enzimas SspI, NotI e EcoRV. Após corrida de eletroforese, o gel foi tratado, transferido para membrana Hybond-N+ (AMERSHAM) e hibridado com sonda de α 1-amastina marcada radioativamente (dCTP [α 32P]).

A partir dos dados obtidos do genoma de CL Brener, não é possível saber em que cromossomo os genes de α -amastinas estão localizados. Para se conhecer esta informação, foi realizada a PFGE, que separou o DNA em bandas cromossômicas. A membrana obtida da transferência deste gel foi hibridizada com sonda da região codificadora de α 1-amastina marcada radioativamente com d-CTP[α -32P]. Como pode ser observado na figura 6, todas as cepas apresentaram um sinal mais forte aproximadamente no mesmo tamanho, o que confirma a presença do gene em um cromossomo de ~945 Mpb. Cabe ressaltar que este cromossomo é de tamanho diferente do encontrado para as outras amastinas (KANGUSSU-MARCOLINO *et al.*, 2013), e que diferentemente das δ -amastinas, as α -amastinas estão localizadas em uma única banda cromossômica.

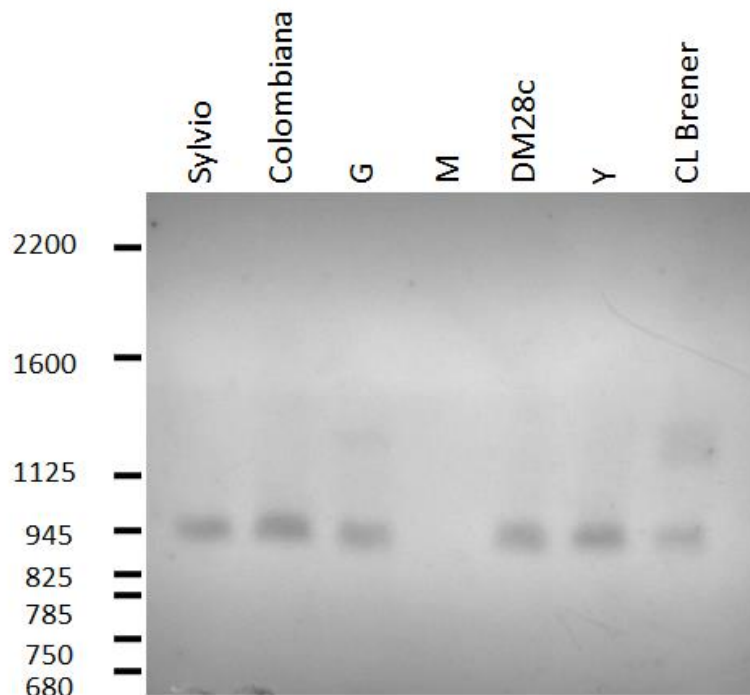


FIGURA 6. LOCALIZAÇÃO GENÔMICA DE α 1-AMASTINA EM DIFERENTES CLONES E CEPAS DE *T. cruzi*.

FONTE: o autor (2013)

NOTA: Bandas cromossômicas de distintos clones e cepas de *T. cruzi* obtidas por eletroforese de campo pulsátil (PFGE), transferidas para membrana e hibridizadas com sonda contendo a região codificadora de α 1-amastina marcada com dCTP [α -32P].

4.3 DETERMINAÇÃO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DAS α -AMASTINAS EM *Trypanosoma cruzi*

Em análises realizadas anteriormente, foi demonstrado que o nível de expressão das diferentes classes de amastinas em *T. cruzi* varia entre cepas, estágios biológicos e também entre isoformas. Por exemplo, δ -amastinas tendem a ter o nível de expressão mais alto em amastigotas e β -amastinas em epimastigotas. Além disso, para β -amastina foram detectados transcritos de tamanhos distintos em CL Brener (KANGUSSU-MARCOLINO *et al.*, 2013). Então, a fim de determinar o padrão de expressão das α -amastinas foi realizado ensaio de *northern blot* para α 1-amastina em diferentes estágios, contudo mesmo após períodos longos de exposição não foi detectada a expressão nas diferentes formas. Este resultado pode indicar baixa expressão ou até mesmo algum problema no experimento. Ensaio adicionais estão sendo realizados para determinação do padrão de expressão.

Paralelamente a análise de *northern blot*, decidimos avaliar o perfil de localização subcelular destas proteínas, uma vez que tem sido demonstrado que apesar de compartilharem a mesma topologia de regiões transmembrana, as amastinas apresentam diferenças no padrão de localização subcelular (KANGUSSU-MARCOLINO *et al.*, 2013).

Após análises *in silico*, foi traçada a estratégia de clonagem das regiões codificadoras das α -amastinas em vetores de expressão em *T. cruzi*. Foram desenhados oligonucleotídeos que amplificam tais regiões codificadoras e possibilitaram sua recombinação ao vetor de entrada de entrada pDONRTM/Zeo, utilizando a tecnologia Gateway® (Invitrogen), por isso, os oligonucleotídeos possuem regiões codificadoras para os sítios *attB* 1 e 2 (essenciais para a recombinação). A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada conforme descrito em 3.2 com DNA genômico do clone CL Brener (dados não mostrados). Os fragmentos amplificados foram utilizados nas reações de clonagem mediadas pelo mix enzimático de BP clonaseTM, que uniu *amplicons* flanqueados por sequências *attB* 1 e 2 ao vetor de entrada pDONRTM/Zeo, formando os vetores pENTR1_ α 1-Ama e pENTR1_ α 2-Ama. Após diagnóstico das clonagens dos vetores pENTR1_ α 1-Ama e pENTR1_ α 2-Ama por digestão enzimática com endonucleases de restrição (dados não mostrados), foi realizada a segunda etapa da clonagem pelo sistema

Gateway[®] (Invitrogen), possibilitando a transferência das regiões codificadoras de cada uma das α -amastinas por recombinação nos sítios *attR1* e *attR2* do vetor de destino para expressão em fusão a GFP em *T. cruzi*, pTcDEST_GFPNeo, formando então os vetores pTcDEST_ α 1-AmaGFPNeo (7953 pb) e pTcDEST_ α 2-AmaGFPNeo (8255 pb) (FIGURA 7). Foi realizado diagnóstico da clonagem por digestão enzimática com as enzimas *KpnI* (Figura 8).

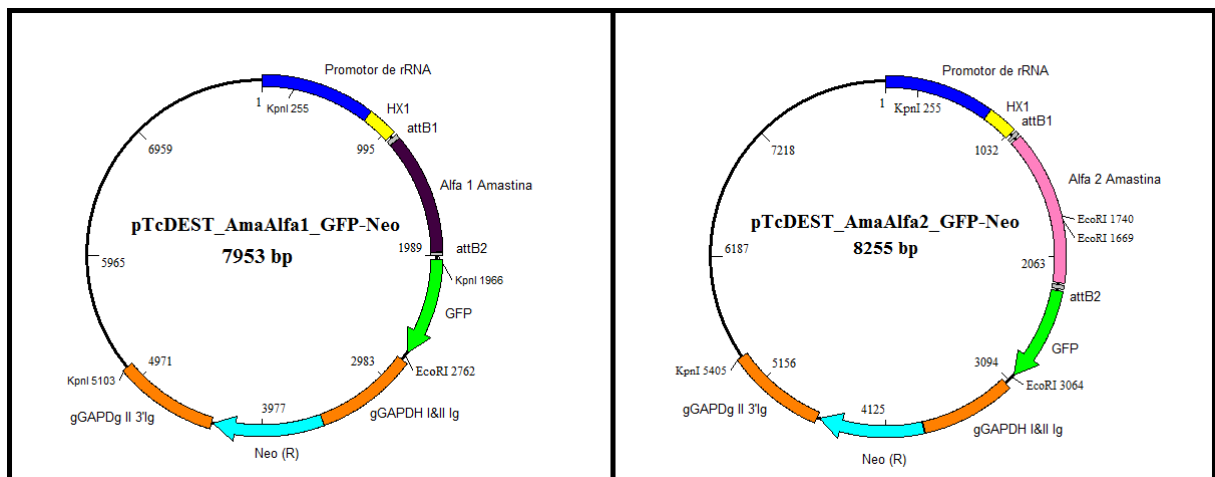


FIGURA 7. VETORES PARA EXPRESSÃO DE α -AMASTINAS EM *Trypanosoma cruzi*.

FONTE: o autor (2013).

NOTA: Após clonagem das regiões codificadoras das α -amastinas pelo sistema *Gateway*[®], foram montados os vetores pTcDEST_ α 1-AmaGFPNeo (7953 pb) e pTcDEST_ α 2-AmaGFPNeo (8255 pb), que foram transfectados em *T. cruzi*.

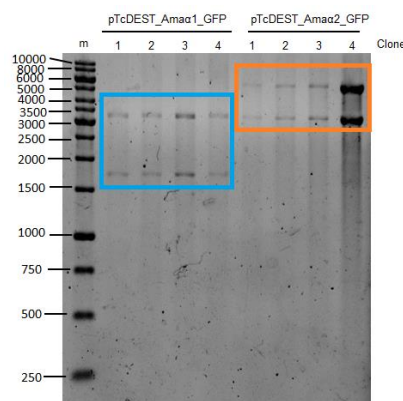


FIGURA 8. DIAGNÓSTICO DE CLONAGEM DOS VETORES DE EXPRESSÃO EM *T. cruzi* pTcDEST_ α 1-AmaGFPNeo e pTcDEST_ α 2-AmaGFPNeo.

FONTE: o autor (2013).

NOTA: Foram realizadas reações de digestão enzimática com o DNA obtido nas clonagens e a enzima *KpnI* o perfil eletroforético observado está de acordo com o esperado para pTcDEST_ α 1-AmaGFPNeo (clones 1, 2, 3 e 4 – liberação de bandas de 3137 pb, 3105 pb e 1711 pb, destacadas em azul) e pTcDEST_ α 2-AmaGFPNeo (clones 1, 2, 3 e 4 – liberação de bandas de 5150 pb e 3105 pb, destacadas em laranja).

Tais vetores possuem a região codificadora de cada uma das α -amastinas fusionadas à proteína verde fluorescente (GFP) flanqueada por sequências de regiões intercodificadoras de *T. cruzi* (HX1 e gGAPDH) – que garantirão correto processamento do RNA; regiões espaçadora e promotora de rRNA e sequência do gene que confere resistência a G418 (um análogo ao antibiótico Neomicina).

Dada a confirmação da construção dos vetores, o DNA plasmidial destes foi obtido como descrito em 3.7, porém com a utilização de maior volume de cultura, e transfectado como descrito em 3.9. Após seleção de parasitos resistentes a G418, que ocorreu aproximadamente 20 dias após a transfecção, iniciaram-se experimentos para verificação e avaliação de fluorescência emitida pelos parasitos. Foram realizados ensaios em microscopia confocal e citometria de fluxo, porém não foi possível observar e nem quantificar a fluorescência dos parasitos (dados não mostrados). Diante destes dados, estamos re-transfectando estes DNAs e analisando por sequenciamento. Apesar disto, não podemos descartar que os níveis de expressão sejam tão baixos que não seja possível detectar expressão. Esta baixa expressão pode ser atribuída a diversos fatores, um deles pode ser devido ao vetor utilizado, que sendo proveniente de sistema Gateway®, mantém algumas sequências relativamente longas em regiões anteriormente ao códon de início que podem afetar a tradução do mRNA. A fim de contornar este problema, estamos trabalhando na construção de vetores pTREX (VAZQUEZ *et al.*, 1999), com as ORFs de α -amastinas em fusão com GFP por clonagem clássica.

5. CONCLUSÕES

Foram identificados novos membros da família das amastinas em *Trypanosoma cruzi* (clone CL Brener), considerando as buscas em sequências que não foram possíveis de montar em cromossomos (provavelmente por estarem localizadas em região bastante repetitiva do genoma). Nesta análise, foram encontradas isoformas da subfamília α -amastina, que ainda não haviam sido identificados em *T. cruzi*. Cabe ressaltar que à montante da primeira α -amastina existe um segmento de GP63, uma glicoproteína de superfície codificada por uma família multigênica.

As α -amastinas identificadas constituem amastinas contendo uma longa extensão hidrofílica na extremidade N-terminal, acima da região da assinatura das amastinas (domínio pfam).

Tais sequências foram classificadas como α 1-amastina e α 2-amastina por apresentarem arranjo genômico semelhante as α -amastinas de *Crithidia* sp e *Leishmania*, além de conterem maior similaridade de sequência e topologia com estas amastinas .

As análises preliminares de expressão e localização destas amastinas foram infrutíferas e precisam ser repetidas.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA-SERRANO, A. *et al.* The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: structure and biological roles. **Mol. Biochem. Parasitol**, v.114, n.2 p.143-150, 2001.
- ANDREWS, N. W. *et al.* Stage-specific surface antigens during the morphogenesis of *Trypanosoma cruzi*: developmentally regulated expression of a glycosyl-phosphatidylinositol anchored glycoprotein of amastigotes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83 Suppl 1, p. 561-562, 1988.
- ANÔNIMO. Recommendations from a satellite meeting. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 94, (Supl. 1), 429-432, 1999.
- ÁVILA, A. R. *et al.* Stage-specific gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis **Genetics Molecular Research**. 2 (1): 159-168, 2003.
- ATWOOD, J. A. *et al.* The *Trypanosoma cruzi* proteome. **Science** v. 309, n. 5733, p. 473-476, 2005.
- BALASEGARAM, M. *et al.* Neglected Diseases in the News: A Content Analysis of Recent International Media Coverage Focussing on Leishmaniasis and Trypanosomiasis. **PLoS Negl Trop Dis** 2(5): e234. doi:10.1371/journal.pntd.0000234, 2008.
- BARTHOLOMEU, D. C. *et al.* Recruitment and endo-lysosomal activation of TLR9 in dendritic cells infected with *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol**, v. 181, p. 1333-1344, 2008.
- BARTHOLOMEU, D. C. *et al.* Genomic organization and expression profile of the mucin-associated surface protein (masp) family of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. **Nucleic Acids Res**. 37:3407–417, 2009
- BRANCHE, C. *et al.* Comparative karyotyping as a tool for genome structure analysis of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 147 p. 30-38, 2006.
- BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annu Rev Microbiol**, v. 27, p. 347-382, 1973.

BUSCAGLIA, C. A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nat. Rev. Microbiology**, v.4, n.3, p.229-236,2006.

CHAGAS, C. Nova Trypanozomíase Humana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**.p. 160-218, 1909.

CLAYTON, C.E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. **Embo J.** V. 21, p. 1881-1888, 2002.

CROOKS G. E., *et al.* WebLogo: A sequence logo generator, **Genome Research**, 14:1188-1190, 2004.

CROSS, G. A.; TAKLE, G. B. The surface trans-sialidase family of *Trypanosoma cruzi*. **Annu Rev. Microbiol.** v. 47, p. 385-411, 1993.

CRUZ, M.C. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Role of d-Amastin on Extracellular Amastigote Cell Invasion and Differentiation. **PLoS ONE** 7(12): e51804, 2012.

DaROCHA, W. D. *et al.* Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. **MolBiochemParasitol.** v. 133, p. 175-186, 2004.

DOS SANTOS, S. L. *et al.* The MASP Family of *Trypanosoma cruzi*: Changes in Gene Expression and Antigenic Profile during the Acute Phase of Experimental Infection. **PLoS Negl Trop Dis** 6(8): e1779. 2012.

EL-SAYED, N. M. *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v. 309, p. 409-415, 2005.

EPTING, C. L. *et al.* Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **ExpParasitol**, v. 126, p. 283-291, 2010.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, **Governo Federal. Doença de Chagas: Patologia.** Disponível em <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=93>>, último acesso em 18 de agosto de 2013.

FramePlot. **Frameplot 4.0 beta**. Disponível em <<http://nocardia.nih.gov/jp4>>último acesso em 28 de novembro de 2013.

FRANZÉN, O. *et al.* Shotgun Sequencing Analysis of *Trypanosoma cruzi* I Sylvio X10/1 and Comparison with *T. cruzi* VI CL Brener. **PLoS Negl Trop Dis** 5(3): e984. doi: 10.1371/journal.pntd.0000984, 2011.

FREITAS, L. M. *et al.* Genomic Analyses, Gene Expression and Antigenic Profile of the Trans-Sialidase Superfamily of *Trypanosoma cruzi* Reveal an Undetected Level of Complexity. **PLoS ONE** 6(10): e25914. doi:10.1371/journal.pone.0025914, 2011.

GOUY M., *et al.* SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. **Molecular Biology and Evolution** 27(2):221-224, 2010.

HIROKAWA T., Boon-Chieng S., and Mitaku S., SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. **Bioinformatics**, 14 378-9, 1998.

JACKSON, A. P. The evolution of amastin surface glycoproteins in trypanosomatid parasites. **Mol Biol Evol**, v. 27, p. 33-45, 2010.

KAHN, S. *et al.* The major 85-kDa surface antigen of the mammalian-stage forms of *Trypanosoma cruzi* is a family of sialidases. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, p. 4481-4485, 1991.

KAHN, S. *et al.* The major 85-kD surface antigen of the mammalian form of *Trypanosoma cruzi* is encoded by a large heterogeneous family of simultaneously expressed genes. **J Exp Med**, v. 172, p. 589-597, 1990.

KANGUSSU-MARCOLINO, M. *et al.* Distinct genomic organization, mRNA expression and cellular localization of members of two amastin sub-families present in *Trypanosoma cruzi*. **BMC Microbiology**.13:10, 2013.

KAWASHITA, S. Y. *et al.* Homology, paralogy and function of DGF-1, a highly dispersed *Trypanosoma cruzi* specific gene family and its implications for information entropy of its encoded proteins. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 165, p. 19-31, 2009.

KIBBE, W. A. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. **Nucleic Acids Res.** 35 (webserver issue), 2007. Disponível em <<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>>

KULKARNI, M. M. *et al.* *Trypanosoma cruzi* GP63 Proteins Undergo Stage-Specific Differential Posttranslational Modification and Are Important for Host Cell Infection. **Infection and Immunity.** v.77 p. 2193-2000, 2009.

LANDY A. Dynamic, Structural, and Regulatory Aspects of Lambda Site-specific Recombination. **Ann. Rev. Biochem.** 58, 913-949, 1989.

LETUNIC I., *et. al.*, SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res* 2012; doi:10.1093/nar/gkr931

LOW, H. P.; TARLETON, R. L. Molecular cloning of the gene encoding the 83 kDa amastigote surface protein and its identification as a member of the *Trypanosoma cruzi* sialidase superfamily. **MolBiochemParasitol**, v. 88, p. 137-149, 1997.

MAGANTO-GARCIA, E. *et al.* Rab5 activation by Toll-like receptor 2 is required for *Trypanosoma cruzi* internalization and replication in macrophages. **Traffic**.9:1299–1315, 2008

MINISTÉRIO DA SAÚDE, **Governo Federal. Doença de Chagas.** Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1530>, último acesso em 26 de novembro de 2013.

NCBI (National Center for Biotechnology Information). **tBlastn.** Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi#300312116>> último acesso em 16 de novembro de 2013.

NCBI (National Center for Biotechnology Information). **ORF Finder.** Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>> último acesso em 16 de novembro de 2013.

NOGUEIRA, R. T. *et al.* Biological and immunological characterization of recombinant Yellow Fever 17D Viruses expressing a *Trypanosoma cruzi* Amastigote Surface Protein-2 CD8+ T cell epitope at two distinct regions of the genome. **Virology**, v. 8, p. 127, 2011.

OLIVAS-RUBIO, M. *et al.* cDNA cloning and partial characterization of amastigote specific surface protein from *Trypanosoma cruzi*. **Infect Genet Evol**, v. 9, p. 1083-1091, 2009.

PAHO, Pan American Health Organization. **Chagas disease (American Trypanosomiasis)**. Disponível em <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=3591&Itemid=3921&lang=en>, último acesso em 16 de novembro de 2013.

POSTAN, M. *et al.* Studies of *Trypanosoma cruzi* Clones in Inbred Mice: I. A Comparison of the Course of Infection of C3H/HEN⁻ mice with two clones isolated from a common source. **Am J Trop Med Hyg**32:497-506, 1983.

PUNTA, M. *et al.* The Pfam protein families database. Disponível em <<http://pfam.sanger.ac.uk/>> **Nucleic Acids Research**. Database Issue 40:D290-D301

RAYMOND, F. *et al.* Genomic sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. **Nucleic Acids Research**, v.40, No. 3, p. 1131–1147, 2011.

REQUENA, J. M. *et al.* Genomic repetitive DNA elements of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology today**. v.12, p. 279-282, 1996.

ROCHETTE, A. *et al.* Characterization and developmental gene regulation of a large gene family encoding amastin surface proteins in *Leishmania* spp. **MolBiochemParasitol**, v. 140, p. 205-220, 2005.

SAMBROOK, J. *et al.* Molecular cloning: a laboratory manual. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SANTOS, M. A.; GARG, N.; TARLETON, R. L. The identification and molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* amastigote surface protein-1, a member of the trans-sialidase gene super-family. **MolBiochemParasitol**, v. 86, p. 1-11, 1997.

SCHENKMAN, S. *et al.* Structural and functional properties of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **Annu Rev Microbiol**, v. 48, p. 499-523, 1994.

SIBLEY, L. D. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. **ImmunolRev**, v. 240, p. 72-91, 2011.

SIEVERS, F. *et al.* Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. ***Molecular Systems Biology*** 7. Article number: 539, 2011.

SOLARI, A. J. The 3-dimensional fine structure of the mitotic spindle in *Trypanosoma cruzi*. ***Chromosoma.***, 78: 239-55, 1980.

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. ***J Mol Biol***, v. 98, p. 503-517, 1975.

SOUZA, W. Electron microscopy of trypanosomes, a historical view. ***Memórias do Instituto Oswaldo Cruz***, v. 103, p. 313-325, 2008.

STOBER, C. B. *et al.* From genome to vaccines for leishmaniasis: screening 100 novel vaccine candidates against murine *Leishmania major* infection. ***Vaccine***, v. 24, p. 2602-2616, 2006.

TARDIEUX, I. *et al.* Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. ***Cell.***; 71:1117–1130, 1992.

TEIXEIRA, S. M. *et al.* A differentially expressed gene family encoding "amastin," a surface protein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes. ***J BiolChem***, v. 269, p. 20509-20516, 1994.

TEIXEIRA, S. M. *etal.* Post-transcriptional elements regulating expression of mRNAs from the amastin/tuzin gene cluster of *Trypanosoma cruzi*. ***J BiolChem***, v. 270, p. 22586-22594, 1995.

TIBAYRENC, M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. ***International Journal for Parasitology*** 28, 85-104, 1998

TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae
Nucleic Acids Research 2010 38(Database issue):D457-D462;
doi:10.1093/nar/gkp851 último acesso em 19 de novembro de 2013.

TYLER, K. M. *et al.* The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. ***Int J Parasitol***, v. 31, p. 472-481, 2001.

- VASCONCELOS, J. R. *et al.* Protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse strain after vaccination with genes encoding the amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. ***Hum Gene Ther***, v. 15, p. 878-886, 2004.
- VAZQUEZ, M. P.; LEVIN, M. J. Functional analysis of the intergenic regions of TcP2b gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. ***Gene*** v. 239, 217–225, 1999.
- WEATHERLY, D. B. *et al.*, Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi* genome. ***BMC Genomics***. 10:255, 2009.
- WHO, Chagas Disease (American trypanosomiasis) factsheet nº 340. Atualizado em março de 2013. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>> último acesso em 16 de novembro de 2013.
- WU, Y. *et al.* A new developmentally regulated gene family in *Leishmania* amastigotes encoding a homolog of amastin surface proteins. ***Molecular and Biochemical Parasitology***. v. 110 p. 345-357, 2000.
- ZINGALES, B. *et al.* *Trypanosoma cruzi* genome project: biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener. ***Acta Tropica***, v. 68, p. 159-173, 1997.
- ZINGALES, B. *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. ***Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*** 104, 1051-1054, 2009.
- ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas? ***Revista da Biologia***, 6b 44:48, 2011.