

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
INSTITUTO CARLOS CHAGAS – FIOCRUZ/PR

HELISA HELENA WIPPEL

CARACTERIZAÇÃO DE DUAS PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO RNA COM DOMÍNIO
RRM EM *Trypanosoma cruzi* IDENTIFICADAS A PARTIR DE PROTEÔMICA DE
mRNPs

CURITIBA
2013

HELISA HELENA WIPPEL

CARACTERIZAÇÃO DE 2 PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO RNA COM DOMÍNIO RRM EM *Trypanosoma cruzi* IDENTIFICADAS A PARTIR DE PROTEÔMICA DE mRNPs

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

Orientadora externa: Dra. Lysangela Ronalte Alves

Curitiba
2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pela vida, pelo amor incondicional e por sempre incentivarem minha educação. As minhas irmãs Rafaela e Haline pela amizade de uma vida, pela alegria e pelo companheirismo nos momentos necessários. A minha madrinha Deusdedith por ter sido minha segunda mãe e amiga querida nos momentos de dificuldade.

À orientadora Dra. Lysangela Ronalte Alves, que me acolheu no Instituto Carlos Chagas e depositou em mim a confiança de realizar este trabalho. Agradeço por todos os ensinamentos e momentos de apoio, amizade e compreensão.

Ao professor Edvaldo Silva Trindade, por ter aceitado o convite de ser meu orientador interno e por demonstrar amizade e paciência nos momentos de dúvida.

À Juliane Malgarin e Bruno Accioly Alves Romagnoli pela amizade, parceria durante os experimentos e pelas discussões científicas no laboratório. À Beatriz Borges pela paciência, amizade e ajuda na confecção desse trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Regulação da Expressão Gênica que me auxiliaram durante esse ano de iniciação científica, especialmente ao Haruo e à Priscila, que pacientemente me apoiaram na execução deste trabalho.

Aos colegas de Ciências Biológicas pelas risadas e tardes de estudo durante esses quatro anos de faculdade. A todos os amigos que compartilharam comigo momentos felizes ou de angústia, e que de alguma maneira me incentivaram a continuar minha caminhada.

A todos vocês, muito obrigada!

“If I have seen a little further it is by standing on the shoulders of Giants.”

Sir Isaac Newton, matemático inglês.

RESUMO

Trypanosoma cruzi é um protozoário da ordem kinetoplastidae e família tripanosomatidae causador da doença de Chagas que afeta milhões de pessoas no mundo. O ciclo de vida do *T. cruzi* envolve dois hospedeiros (inseto triatomíneo e mamífero) e três estágios de desenvolvimento bem definidos: epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas. A regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos difere daquela de outros eucariotos, por não possuir controle transcricional para a maioria dos seus genes. Apesar de demonstrado a mobilização diferencial em *T. cruzi* e a importância da regulação pós-transcricional, poucas proteínas de ligação ao RNA foram caracterizadas até o momento: poli(A) *binding protein*, *spliced leader RNA-binding protein*, proteínas Pumilio, *RNA binding proteins* com motivos CCCH, UBP1 e UBP2. O domínio RRM (*RNA Recognition Motif*) de ligação ao RNA é um dos mais abundantes domínios encontrados em proteínas de ligação a RNA em eucariotos superiores. Proteínas que contêm esse domínio RRM estão envolvidas na maioria dos processos pós-transcricionais de regulação da expressão gênica como, por exemplo, processamento de mRNA e rRNA, exportação de RNAs e estabilidade destes transcritos. Este domínio possui cerca de 90 aminoácidos e pode se ligar com fraca ou forte afinidade e especificidade a RNAs e interagir com transcritos de diferentes comprimentos. Esse domínio também pode interagir com outros RRM o que pode explicar o motivo pelos quais proteínas-RRM são tão numerosas e tem um papel importante no metabolismo de RNA da célula. Esse domínio de vital importância em eucariotos superiores está também presente em *T. cruzi* sendo que algumas proteínas já foram caracterizadas como a TcUBP1. Esta proteína de ligação a RNA contém um único motivo RRM. Atua como um fator trans na desestabilização de mRNAs por se ligar a elementos ricos em AU das regiões 3' não traduzidas do mRNA da SMUG mucina. O papel vital de proteínas RRM em outros eucariotos sugere que essas possam ser importantes na regulação da expressão gênica em *T. cruzi*. Durante a identificação de proteínas associadas a mRNAs formando complexos ribonucleoproteicos (mRNPs), várias foram identificadas e selecionadas para caracterização mais específica. Tendo em vista que poucas proteínas de ligação a RNA foram caracterizadas neste parasita até o momento e da importância dos mRNPs na regulação da expressão gênica, este trabalho trata da caracterização funcional de duas proteínas de ligação a mRNAs que apresentam domínios RRM, previamente identificadas em uma análise de proteínas de interação a RNA utilizando uma abordagem proteômica em larga escala, e na elucidação de seu papel na regulação da expressão gênica em *T. cruzi*.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*; regulação pós-transcricional; RNA; domínio RRM.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is a protozoan of the order Kinetoplastidae and family Trypanosomatidae causing Chagas disease that affects millions of people worldwide. The life cycle of *T. cruzi* involves two hosts (triatomine insect and mammalian) and three well-defined developmental stages: epimastigotes, trypomastigotes and amastigotes. The regulation of gene expression in trypanosomes differs from that of other eukaryotes, it has no transcriptional control for most of its genes. Although a differential mobilization has been shown in *T. cruzi* and the importance of post-transcriptional regulation, few RNA binding proteins have been characterized so far: poly (A) binding protein, spliced leader RNA-binding protein, Pumilio proteins, RNA binding proteins with CCCH motifs, UBP1, and UBP2. The RRM domain (RNA Recognition Motif) is one of the most abundant domains found in RNA -binding proteins in higher eukaryotes. Proteins with this domain are involved in most post-transcriptional regulation of gene expression processes, for example, rRNA and mRNA processing, export of RNAs and stability of these transcripts. This domain has about 90 amino acids and can bind with weak or strong affinity and specificity to RNAs and interact with transcripts of different lengths. This domain can also interact with other RRM proteins, which may explain the reason for which RRM proteins are so numerous and plays an important role in RNA metabolism of the cell. The RRM domain, which plays a vital role in higher eukaryotes, is also present in *T. cruzi* proteins, some of which have been characterized, as TcUBP1. This RNA binding protein contains a single RRM motif and acts as a trans-factor in the destabilization of mRNAs by binding to AU -rich elements in the 3' untranslated regions of mRNAs of SMUG mucin. The vital role of RRM proteins in other eukaryotes suggests that these may be important in the regulation of gene expression in *T. cruzi*. During the identification of mRNAs associated with proteins to form ribonucleoproteic complexes (mRNPs), several proteins were identified and selected for further specific characterization. Given that few RNA binding proteins have been characterized so far in *T. cruzi* and the importance of mRNPs in the regulation of gene expression, this work's goal is the functional characterization of two mRNAs binding proteins that present the RRM domains, previously identified in an analysis of proteins-RNA interaction using a proteomic approach on a large scale, and to elucidate its role in the regulation of gene expression in *T. cruzi*.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, post-transcriptional regulation, RNA, RRM domain.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
1.2 Regulação da expressão gênica em tripanosomatídeos	11
1.3 Proteínas de ligação a RNA	12
1.4 Justificativa	13
2. OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
2.2.1 Análises de bioinformática	15
2.2.2 Amplificação e Clonagem no sistema Gateway®	15
2.2.3 Expressão de proteínas	15
2.2.4 Obtenção de anticorpos contra as proteínas recombinantes	16
2.2.5 Imunoensaios	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 SOLUÇÕES UTILIZADAS	17
3.2 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA	18
3.2.1 Alinhamentos de sequência primária de proteínas (BLASTp)	18
3.2.2 Desenho de oligonucleotídeos para a amplificação dos genes selecionados	18
3.3 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE INTERESSE E CLONAGEM NO SISTEMA GATEWAY®	19
3.3.1 Reação em cadeia da polimerase e purificação dos amplicons	19
3.3.2 Eletroforese de DNA	20
3.3.3 Clonagem dos amplicons no vetor de entrada pDONR™221	20
3.3.4 Transformação de bactérias cálcio-competentes com os plasmídeos e cultivo em meio sólido	21
3.3.5 Identificação das colônias bacterianas	21
3.3.6. Busca de clones positivos através de Ensaio de <i>Toothpick</i> ou <i>PCR</i> de colônia	22
3.3.7 Sequenciamento	23
3.3.8 Minipreparação de plasmídeos	23
3.3.9 Subclonagem em vetor de expressão pDEST™17	24
3.4 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS	25
3.4.1 Transformação de bactérias cálcio competentes com o vetor de expressão	25
3.4.2 Testes de expressão	26
3.4.3 Eletroforese de proteínas em gel desnaturante de poli-acrilamida (SDS-PAGE)	27
3.4.4 Ensaio de Western Blot – Protocolo base	28
3.4.5 Expressão de proteínas em larga escala	29
3.4.6 Purificação das proteínas obtidas por cromatografia de afinidade e eletroeluição	30
3.4.7 Detecção da proteína recombinante através do ensaio de <i>Western Blot</i> com anticorpos anti-histidina	30
3.5 OBTENÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA AS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	31
3.5.1 Teste do soro pré-imune	31
3.5.2 Inoculações em animais para a obtenção de antisoro	32
3.5.3 Inoculações em camundongos	32
3.5.4 Teste dos antisoros	32
3.6 IMUNOENSAIOS COM OS ANTICORPOS OBTIDOS	33
3.6.1 Detecção de proteínas em extratos protéicos de <i>T. cruzi</i> em diferentes etapas do ciclo de vida	33
3.6.2 Imunofluorescência	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA	35
4.1.1 Alinhamentos de sequências primárias de proteínas (BLASTp)	35
4.1.2 Síntese de oligonucleotídeos iniciadores	36
4.2 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE INTERESSE E CLONAGEM NO SISTEMA GATEWAY®	36
4.2.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR) e purificação dos amplicons	36
4.2.2 Clonagem dos amplicons no vetor de entrada pDONR™221	38
4.2.3 Sequenciamento	38
4.2.4 Subclonagem no vetor de expressão pDEST™17	39
4.3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	39
4.3.1 Testes de expressão da proteína recombinante	39
4.3.2 Expressão em larga escala da proteína recombinante	41
4.3.3 Purificação por cromatografia de afinidade e eletroeluição	42
4.3.4 Purificação por eletroeluição em gel preparativo	44
4.3.5 Confirmação da purificação das proteínas purificadas por <i>Western Blot</i>	45
4.4 OBTENÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA A PROTEÍNA RECOMBINANTE	45
4.4.1 Inoculação em camundongos e teste do anticorpo	45
4.5 IMUNOENSAIOS COM O ANTICORPO OBTIDO	51
4.5.1 Detecção de proteínas em extratos protéicos de <i>T. cruzi</i> em diferentes etapas do ciclo de vida	51
4.5.2 Verificação da localização celular da proteína TcRBP9A através da técnica de imunofluorescência	53
6. CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS	57

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado pertencente à ordem Kinetoplastida (LEVINE, 1980) e família Tripanosomatidae (CHAGAS, 1909). A ordem Kinetoplastida apresenta como características a presença de uma estrutura proeminente, conhecida como cinetoplasto, que corresponde a uma condensação de DNA localizado no interior de uma mitocôndria única e ramificada por todo o corpo do protozoário (DE SOUZA, 2002) e a presença de glicossomas, organelas tipo peroxissomos onde estão compartmentalizadas várias vias metabólicas, tais como a maior parte das enzimas da via glicolítica (MICHELS *et al.*, 2006).

Esse parasita possui em seu ciclo de vida quatros estágios distintos de diferenciação (epimastigota, tripomastigota metacíclico, amastigota e tripomastigota sanguíneo). Dois desses estágios ocorrem no hospedeiro vertebrado mamífero (como roedores, marsupiais e carnívoros) e dois no inseto vetor, um hemíptero hematófago da subfamília Triatominae, popularmente conhecido no Brasil como “barbeiro”. Os parasitas infectivos são liberados pelo inseto no momento em que este se alimenta do sangue do hospedeiro, e costumam penetrar pela pele no local da picada. 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”, um mal que pode se tornar crônico e ocasionar uma severa cardiomiopatia, que pode se desenvolver anos após a infecção (DIAS, 2000).

As principais formas de contaminação humana são a vetorial, a transfusional e a congênita, podendo ocorrer ainda a contaminação laboratorial ou por transplante de órgãos. A descrição do ciclo biológico de *T. cruzi* na Figura 1 baseou-se na transmissão natural da infecção (TYLER & ENGMAN, 2001). No inseto vetor, o parasita se prolifera no lúmen do trato gastrintestinal sob a forma não infectiva epimastigota e, quando migra para o reto, é exposto ao estresse nutricional, aderindo à glândula retal. Neste local, assim, transforma-se morfogeneticamente na

forma infectiva tripomastigota metacíclica (ZELEDÓN *et al.*, 1984), processo de transformação celular denominado de metaciclogênese. Os tripomastigotas são eliminados junto às fezes e urina quando o triatomíneo hematófago se alimenta no hospedeiro vertebrado. Estas formas infectivas podem entrar em contato com soluções de continuidade da pele ou mucosas desse hospedeiro e, conseqüentemente, invadir células adjacentes. Após a invasão, os tripanossomatídeos se evadem dos vacúolos fagolisossomais incorporando o conteúdo dessas organelas ao vacúolo parasitóforo, tornando o interior ácido. Em seguida, os tripomastigotas alteram sua forma para um modelo arredondado e sofrem encurtamento do flagelo com mudança na posição do cinetoplasto, assumindo a forma intracelular amastigota, que se multiplica por divisão binária. Assim, o parasita fica em contato direto com o citoplasma da célula invadida. Após se replicarem, os amastigotas iniciam um processo inverso de transformação, ou seja, reestruturam-se para a forma tripomastigota e, posteriormente, com a ruptura da membrana plasmática da célula hospedeira, alcançam a corrente sanguínea e se alastram para outras células. Quando o triatomíneo ingere sangue de animais ou do homem infectado com *T. cruzi* durante o hematofagismo, o ciclo é reiniciado.

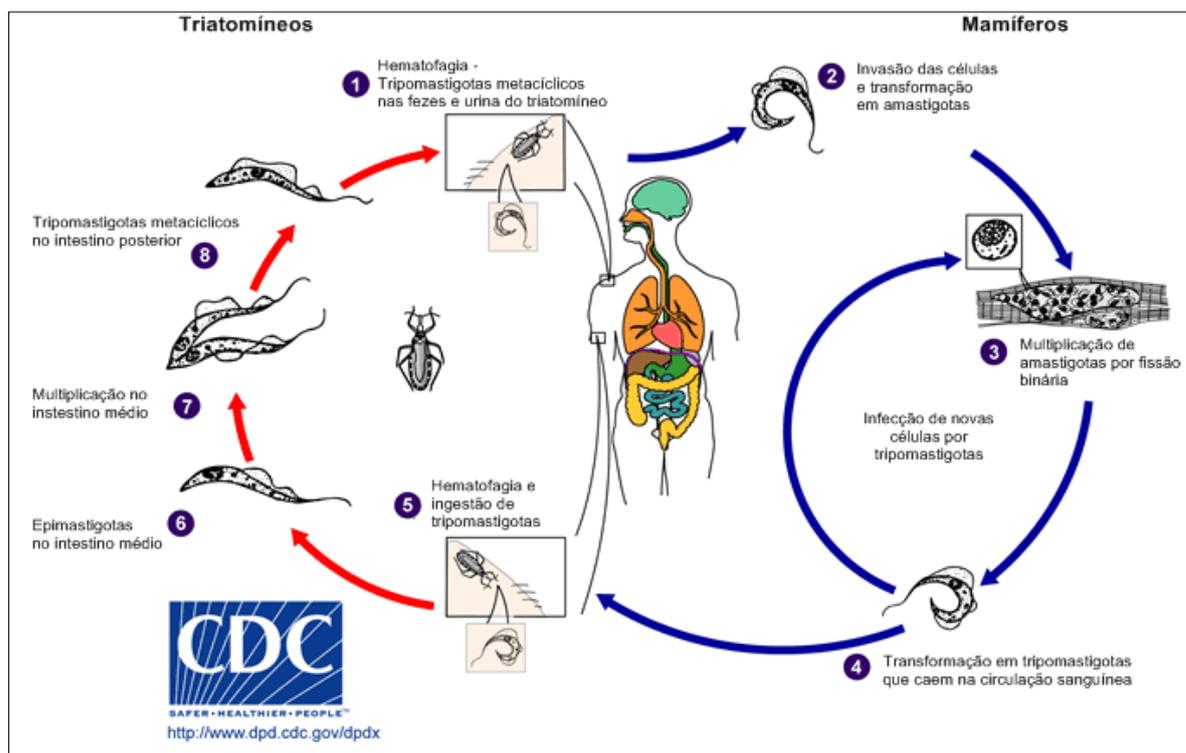


FIGURA 1 - CICLO EVOLUTIVO DO *TRYPANOSOMA CRUZI* [ADAPTADO DE CDC (2011)]. Ver texto para descrição detalhada.

O controle pós-transcricional da expressão gênica parece ter um papel muito importante na biologia do *T. cruzi*, e estudos demonstram que complexos formados de RNAs mensageiros (mRNAs) e proteínas, chamados de complexos mRNPs, possuem grande importância no controle pós-transcricional de eucariotos (CLAYTON, 2002; KEENE, 2007).

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. Os genes apresentam-se organizados em repetições em *tandem* separados por regiões intergênicas, a ocorrência de íntrons não é comum. 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-éxon (LIANG *et al*, 2003; PALENCHAR e BELLOFATO, 2005). 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 (BRITTINGHAM *et al*, 2001; COUGHLIN *et al*, 2000; QUIJADA *et al*, 2000). 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. Os RNAs que são co-transcritos na unidade policistrônica não são necessariamente relacionados em função e os níveis do mRNA maduro pode variar entre os transcritos (LIANG *et al*, 2003; PALENCHAR e BELLOFATO, 2005).

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 nestes organismos

deva ocorrer 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 destes transcritos, ressaltando o papel das proteínas de ligação a RNA nestes processos.

1.3 Proteínas de ligação a RNA

O domínio RRM (*RNA Recognition Motif*) de ligação ao RNA, também chamados de RBD (RNA Binding Domains), mostrado na Figura 2, é um dos mais abundantes domínios encontrados em proteínas de ligação a RNA em eucariotos superiores (VENTER *et al.*, 2001). Proteínas que contém esse domínio RRM estão envolvidas na maioria dos processos pós-transcricionais de regulação da expressão gênica como, por exemplo, processamento de mRNAs e rRNA, exportação de RNAs do núcleo, *trans-splicing* e adição de mini-éxon, e estabilidade destes transcritos (revisto por DREYFUSS *et al.*, 2002). Este domínio possui cerca de 90 aminoácidos e pode se ligar com fraca ou forte afinidade e especificidade a RNAs e interagem com transcritos de diferentes comprimentos (revisto por CLÉRY *et al.*, 2008). Esse domínio também pode interagir com outros RRM, o que pode explicar o motivo pelos quais proteínas-RRM são tão numerosas e tem um papel importante no metabolismo de RNA da célula (revisto por CLÉRY *et al.*, 2008). O domínio RRM, de vital importância em eucariotos superiores, está também presente em *T. cruzi* sendo que algumas proteínas já foram caracterizadas, como a TcUBP1. Esta proteína de ligação a RNA contém um único motivo RRM e atua como um fator *trans* na desestabilização de mRNAs por se ligar a elementos ricos em AU (AREs) das regiões 3' não traduzidas do mRNA da SMUG mucina (D'ORSO e FRASCH, 2002; DE GAUDENZI *et al.*, 2005).

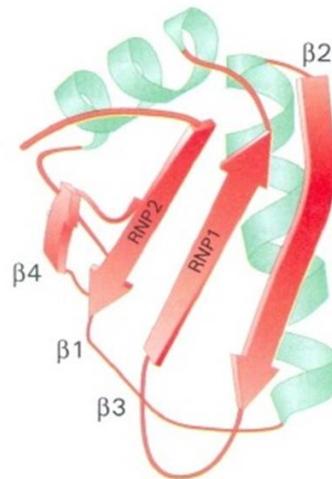


FIGURA 2 – DOMÍNIO RRM (*RNA RECOGNITION MOTIF*) PRESENTE EM PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO A RNA. Imagem mostrando as quatro folhas β contendo os sítios de reconhecimento e ligação a RNA, RNP1 E RNP2.

Esses domínios RRM 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).

1.4 Justificativa

O entendimento dos mecanismos moleculares da regulação de expressão gênica do *Trypanosoma cruzi* é fundamental para que se possa conhecer 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 *Trypanosoma 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 de infectividade e auxiliar no combate à doença de chagas, uma parasitose bastante debilitante e que possui profundas implicações sociais nos países em que está presente.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar as proteínas RBP9A e RBP10B de *Trypanosoma cruzi* que possuem domínios de ligação a RNA com domínios RRM.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Realizar análises de bioinformática

a) Desenhar oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação dos genes selecionados.

2.2.2 Amplificar e Clonar no sistema Gateway®

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

b) Clonar no vetor de entrada pDONR™221.

c) Confirmar as clonagens por *toothpick*, PCR de colônia e sequenciamento.

d) Extrair os plasmídeos dos clones positivos e subclonar no vetor de expressão pDEST™17.

e) Confirmar a subclonagem e seleção do clone positivo para expressão.

2.2.3 Expressar proteínas

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

b) Expressar em larga escala.

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

2.2.4 Obter anticorpos contra as proteínas recombinantes

- a) Imunização de coelhos e camundongos com as proteínas obtidas.
- b) Análise da qualidade dos anticorpos por *Western blot*.

2.2.5 Imunoensaios

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

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SOLUÇÕES UTILIZADAS

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

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

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

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

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

Solução de bloqueio 5% : 5% de leite em pó desnatado em TBS-Tween 0,05%

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

Solução de lise para *toothpick* : NaOH 50 mM; glicerol 5%; SDS 0,5%; EDTA 5 mM; azul de bromofenol 0,025% e H₂O q.s.p.

Solução de purificação: Triton 2%; NaH₂PO₄ 100mM; Tris - Hcl 10 mM; Uréia 2M; Nacl 0,5M.

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

Tampão de eluição (coluna de níquel): Uréia 8M; Nacl 300mM ; 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 100mM; Tris-Hcl 10mM; Uréia 8M PH 8,0.

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

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

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

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

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

3.2 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA

3.2.1 Alinhamentos de sequência primária de proteínas (BLASTp)

Para as análises, foi utilizada a ferramenta de BLASTp (Basic Alignment Search Tool), amplamente utilizadas para o alinhamento de sequências de proteínas, disponível para uso no site do *National Center of Biotechnology Information* - NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Foi utilizado também o banco de dados www.genedb.org para a obtenção das sequências de *Trypanosoma cruzi*.

3.2.2 Desenho de oligonucleotídeos para a amplificação dos genes selecionados

Para a amplificação dos genes de interesse através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é necessário um par de oligonucleotídeos iniciadores para cada gene (“*Foward* e *Reverse*”). As sequências nucleotídicas dos genes selecionados de *T. cruzi* foram retiradas do banco de dados do site <http://www.genedb.org>, e a partir delas os oligonucleotídeos foram desenhados através da ferramenta *PrimerSelect* do software *Lasergene* (DNASTAR, Inc.). O desenho foi feito de modo a permitir a recombinação dos *amplicons* com o vetor de entrada pDONR™221 da tecnologia *Gateway*® (Invitrogen). Os oligonucleotídeos a serem utilizados nesta tecnologia de clonagem devem possuir regiões codificadoras para sítios *AttB* 1 e 2, necessários para a recombinação do *amplicon* purificado com o vetor pDONR™221. Códon de parada são opcionais, e os oligonucleotídeos para os três genes estudados foram

desenhados sem códon de parada, de modo a permitir uma posterior agregação de seqüências codificadoras para *tags* na região 3', como regiões codificadoras para GFP (*Green fluorescent protein*).

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

Attb1

Shine-dalgarno (ribosome binding)

START

Attb2

Seqüência específica para cada gene

FIGURA 3 – SÍTIOS NECESSÁRIOS À CONSTRUÇÃO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA USO NA PLATAFORMA GATEWAY®. Attb1 E Attb2: Sequências que permitem a recombinação específica entre o *amplicon* purificado e o vetor de entrada da plataforma Gateway® PDONR™221; **Shine Dalgarno:** Sequência de ligação a ribossomos; **Start:** Códon necessário ao início da tradução; **Seqüência específica:** Região de anelamento específica para cada gene a ser amplificado.

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

3.3.1 Reação em cadeia da polimerase e purificação dos amplicons

Os genes foram amplificados utilizando-se a técnica de PCR (Reação em cadeia da polimerase). As amplificações foram feitas utilizando-se 100 ng de DNA genômico de *T. cruzi* como molde. A enzima utilizada foi a *Taq Polimerase* (Invitrogen), além de 200mM de DNTP, 10mM de MgCl₂, tampão específico para a enzima utilizada, 10 pmol de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores e água ultrapura suficiente para completar o volume da reação. Os ciclos de amplificação foram montados da seguinte forma: 94° C por 3 minutos iniciais para desnaturação do DNA seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94° C, 30 segundos de anelamento (temperaturas específicas para cada gene), e por fim 72° C para extensão. O tempo

de extensão é variável de acordo com o tamanho do gene, e será 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 MgCl₂, fornecida pelo sistema de purificação da plataforma Gateway®. O DNA foi ressuspense em TE e adicionada a solução de PEG/MgCl₂, em volume de 1:1. A mistura foi agitada vigorosamente e centrifugada por 15 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente e o sedimento contendo o DNA foi seco a 60°C por 15 minutos. O sedimento foi ressuspense em 10 µL de tampão TE e as amostras foram armazenadas a - 20°C.

3.3.2 Eletroforese de DNA

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

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

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

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

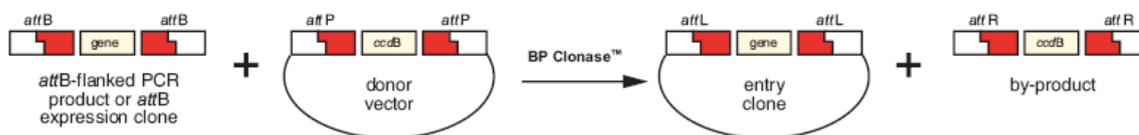


FIGURA 4 – ESQUEMA DA REAÇÃO BP (MANUAL DO FABRICANTE). A enzima BP clonase utiliza os sítios *attB* do *amplicon* e *attP* do vetor pDONR para realizar uma recombinação específica que dará origem ao vetor de entrada contendo o gene de interesse e a um produto secundário linear.

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

Os plasmídeos recombinados foram incubados com bactérias *Escherichia coli* cálcio-competentes (DH5alfa) 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 3 minutos as suspensões bacterianas foram imediatamente colocadas no gelo por 2 minutos. Após este tempo foi adicionado 1 ml de meio de cultura Luria-Bertani (LB) sem antibiótico, e as células incubadas sob agitação constante a 37 °C por 45 minutos, para que pudessem se recuperar e começar a expressar os genes de resistência aos antibióticos antes de serem colocadas em um meio seletivo. Após esse período as bactérias foram espalhadas em placas contendo 25 ml de meio sólido LB + ágar e antibióticos específicos de acordo com a resistência que cada vetor confere às bactérias transformadas (pDONR™221 – canamicina 50 ug/ml , pDEST™17 – ampicilina 100 ug/ml e cloranfenicol 34 ug/ml). As placas foram incubadas por 18 horas a 37 °C para o crescimento das colônias.

3.3.5 Identificação das colônias bacterianas

Após 18 horas de incubação as placas foram recolhidas e as colônias isoladas replaqueadas em uma placa referência contendo meio LB + antibióticos. Cada colônia foi riscada em uma região numerada, de modo a realizar a identificação das colônias. As placas foram incubadas por 18 horas a 37°C.

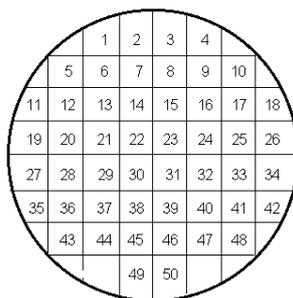


FIGURA 5 – MODELO DE PLACA REFERÊNCIA. É colocado na parte de baixo da placa contendo meio de cultura sólido um papel com regiões numeradas. Em cada uma das regiões será adicionada uma colônia bacteriana, que poderá ser identificada posteriormente por um número.

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

A técnica de *toothpick* é feita a fim de se verificar o sucesso da recombinação e da transformação. Através desse ensaio pode-se checar se o vetor está presente na bactéria e se possui tamanho diferente do vetor controle (o mesmo vetor utilizado na recombinação, porém sem inserto). Cerca de 15 colônias foram coletadas da placa referência com um palito estéril e transferidas para tubos de polipropileno. A cada poço foram adicionados 15 µl de solução de lise. A solução foi agitada vigorosamente e a mistura foi incubada a 65 °C por 10 minutos. Após a incubação as amostras foram submetidas à eletroforese em um gel de agarose 0,8%, com uma corrente de 80V, utilizando-se o plasmídeo sem o inserto como controle do gel. As colônias com tamanho diferente do plasmídeo controle foram coletadas e os plasmídeos purificados por minipreparação (como descrito no item 3.3.8). Após esta etapa, foi feita uma PCR convencional da minipreparação para se verificar a presença de insertos.

Outra maneira de se verificar o sucesso da transformação é a PCR de colônia, quando a amplificação é feita diretamente a partir de uma colônia bacteriana. Para isso foi feita uma PCR parecida com a convencional, porém em vez de DNA genômico utilizou-se como base para a amplificação uma alíquota da colônia bacteriana transformada com o vetor de interesse. As amostras foram incubadas por 10 minutos a 94° C no termociclador para lisar a parede bacteriana e o ciclo de PCR prosseguiu normalmente depois desta etapa. As outras etapas da

reação da reação de PCR foram feitas de maneira convencional, assim como a eletroforese, descritas em 3.3.1 e 3.3.2. Esta técnica pode gerar um resultado falso-negativo, caso a lise não seja eficiente. Para genes em que não se conseguir uma amplificação por PCR de colônia, pode-se utilizar a abordagem de toothpick/PCR de minipreparação.

3.3.7 Sequenciamento

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

3.3.8 Minipreparação de plasmídeos

A minipreparação foi feita a fim de se isolar das bactérias os plasmídeos contendo os insertos corretos e purificá-los. Será utilizado o 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 pDONR[™]221 mais inserto de interesse) ou 100µg/ml de ampicilina (bactérias contendo plasmídeos pDEST[™]17 mais inserto de interesse) . As culturas foram incubadas a 37 ° C durante 18 horas sob agitação constante de 200 rpm. Após as culturas serem centrifugadas a 12.000 x g por 1 minuto os plasmídeos foram purificados utilizando-se o kit, segundo as recomendações do fabricante, utilizando-se o protocolo para uso em microcentrífuga. Após os procedimentos de lavagem os plasmídeos foram eluídos em H₂O ultrapura e armazenados a -20°C.

3.3.9 Subclonagem em vetor de expressão pDEST™17

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



FIGURA 6 – ESQUEMA DA REAÇÃO LR (MANUAL DO FABRICANTE). A Enzima LR clonase utiliza os sítios *attL* do vetor de entrada e *attR* do vetor pDEST™17 para realizar uma recombinação específica que dará origem ao clone de expressão e a um produto secundário circular.

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

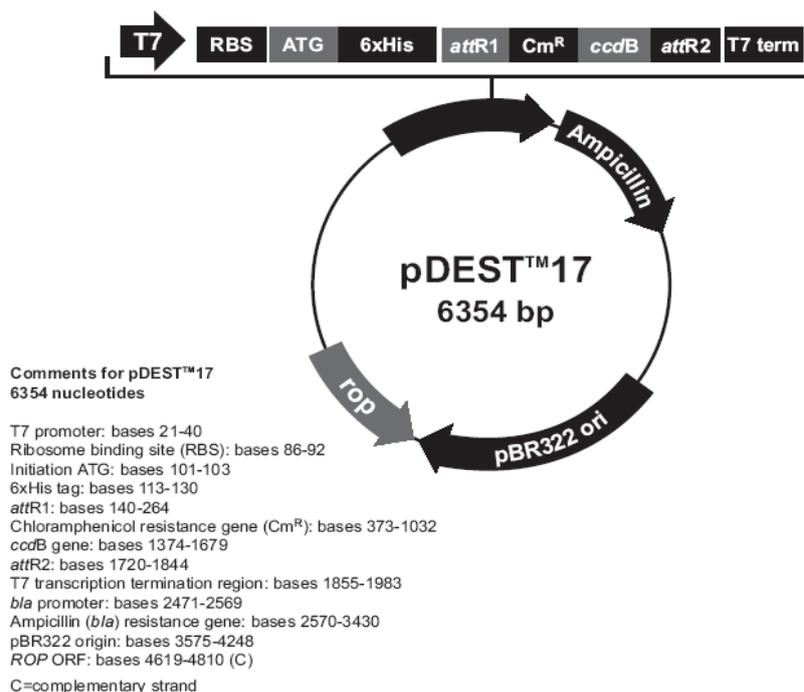


FIGURA 7 – MAPA ILUSTRATIVO DO VETOR DE EXPRESSÃO pDEST™17. T7: Promotor para RNA polimerase T7; RBS: Sequência de ligação a ribossomos; ATG: Códon de início; 6xHis: Região codificadora para um tag de seis histidinas; attR1 e attR2: Sequências que permitem a recombinação com o vetor pDONR™221; Cm^r: Gene de resistência ao cloranfenicol para contra-seleção do plasmídeo; ccdB: Gene letal que evita o crescimento de colônias com plasmídeo pDEST sem o gene de interesse; T7 Term: sequência que permite o término da transcrição; Ampicillin: Gene de resistência ao antibiótico ampicilina; pBR322 Ori: Origem da replicação para duplicação do DNA e manutenção do plasmídeo.

3.4 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS

3.4.1 Transformação de bactérias cálcio competentes com o vetor de expressão

A transformação foi feita da maneira descrita em 3.3.4, porém as bactérias utilizadas eram 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 expressão

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

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

As bactérias foram sedimentadas por centrifugação a 5.000g por 5 minutos, e o sedimento bacteriano ressuspenso em PBS. Foi adicionado tampão de amostra 4x à solução em quantidade suficiente para que a concentração final de 1x. Os extratos protéicos foram homogeneizados em um homogenizador compacto tipo vórtex e desnaturados por aquecimento a 100 °C por 5 minutos seguidas de centrifugação a 16.000g por 1 minuto e analisados em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE – como descrito em 3.4.4).

Para verificar a eficácia da indução, deve-se observar no gel uma banda do tamanho esperado da proteína (comparando-se ao marcador de peso molecular), e que só exista ou seja significativamente maior no extrato induzido, quando comparada ao controle negativo. Se ainda houver dúvidas se a proteína observada no gel é a de interesse, pode-se realizar um ensaio de *Western Blot* e marcar a membrana com um anticorpo anti-histidina, o que evidencia somente a proteína recombinante com sua cauda de histidina.

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

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

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

QUADRO 1 – CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS PARA OS GÉIS DESNATURANTES DE POLIACRILAMIDA. A concentração utilizada no gel varia inversamente ao peso molecular da proteína a ser analisada.

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

3.4.4 Ensaio de Western Blot – Protocolo base

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

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

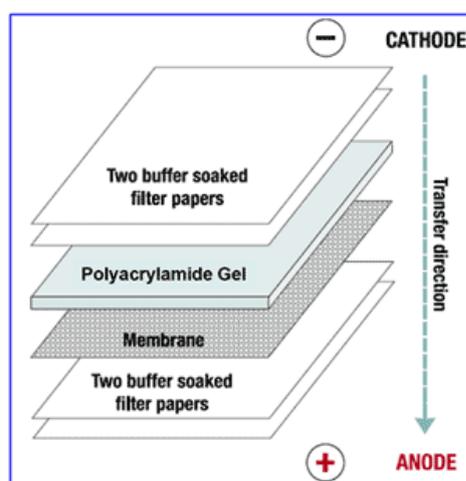


FIGURA 8 – ESQUEMATIZAÇÃO DO SISTEMA UTILIZADO NA TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS PARA A MEMBRANA NA TECNICA DE WESTERN BLOT. Uma membrana de nitrocelulose é colocada sobre o gel de poliacrilamida, e o sistema é cercado por papel filtro e encaixado em uma cuba de transferência. a direção da corrente faz com que as proteínas saiam do gel e se fixem à membrana. <http://www.fermentas.com/techinfo/electrophoresis/img/blotting.gif>

A membrana foi então corada com *Ponceau S* por 10 minutos e lavada delicadamente com água destilada. Após esta lavagem, podem-se observar as bandas controle presentes na canaleta do marcador de peso molecular. As bandas foram marcadas com um lápis e a canaleta correspondente ao marcador foi recortada da membrana e guardada, para posterior comparação com a membrana

marcada. A parte restante da membrana foi então imersa em solução de bloqueio por 1 hora. Foram feitas 3 lavagens de 5 minutos com o tampão PBS-Tween 0,1%, e a partir desta etapa segue-se a incubação com o anticorpos primário e secundário de acordo com o objetivo pretendido (descrito em 3.4.4 e 3.4.7). Após as incubações foi preparada uma solução de revelação 10 ml de tampão de revelação com fosfatase alcalina, 33 μ l BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt) e 66 μ l NBT (Nitro-Blue Tetrazolium Chloride). A membrana foi revelada no escuro por um intervalo de 2 a 15 minutos. Após este período a reação de revelação foi interrompida através da imersão da membrana em uma solução de água destilada + EDTA. As membranas foram secas a temperatura ambiente.

3.4.5 Expressão de proteínas em larga escala

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

Após as 2 horas de indução as culturas foram centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 7.000 g. O sobrenadante foi descartado e o sedimento bacteriano 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 ressuspensado na solução de purificação, que contém uréia 2M, e a mistura foi agitada vigorosamente e centrifugada. O sobrenadante foi descartado e a lavagem repetida. Após a purificação, o sedimento foi misturado ao tampão de ressuspensão de proteínas, contendo 8M de uréia, e a mistura sonicada novamente nas mesmas condições anteriores. Após a centrifugação de 10 minutos a 7.000g o sobrenadante foi coletado e denominado “fração insolúvel”. As amostras foram armazenadas a -20°C.

3.4.6 Purificação das proteínas obtidas por cromatografia de afinidade e eletroeluição

As proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade com coluna de Níquel-ácido nitrilotriacético. A solução contendo a proteína recombinante a ser purificada, equivalente a um volume de 5 ml, foi incubada com 1 mL de resina Ni-NTA (*Qiagen*) em agitador orbital por 1 hora a 4°C. Após esse tempo, o material não ligado à resina foi coletado por gravidade e chamado de “*flow through*”. Foram feitas três lavagens de 5 ml com o tampão de ligação, sendo que foi coletada uma amostra de 1 ml do primeiro lavado. Após as lavagens, foram feitas 6 eluições com 500 µl de tampão de eluição contendo imidazol. O imidazol compete com a histidina na ligação ao níquel e desta forma promove o desligamento das proteínas com cauda de histidina da coluna de purificação. Após esse processo, foi feita uma eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (item 3.4.3).

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

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

Como um controle de que a proteína expressa observada no gel de poliacrilamida corresponde a proteína recombinante de interesse, foi realizado um

ensaio de *Western Blot* e marcação da membrana de nitrocelulose com um anticorpo primário anti-histidina e um anticorpo secundário conjugado a fosfatase alcalina.

Foram aplicados 10 µl da proteína recombinante diluída em tampão de amostra e 5µl do marcador BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen) no gel de poliacrilamida e as etapas de eletroforese, transferência e bloqueio da membrana serão feitas como descrito anteriormente. Após a lavagem da membrana esta foi incubada com o anticorpo anti-histidina diluído em PBS-Tween 0,05% na proporção 1:3000, à temperatura ambiente. Após 1 hora de incubação, a membrana foi lavada por 3 vezes de 5 minutos com PBS-Tween 0,05% e incubada com o anticorpo secundário *anti-mouse* conjugado à enzima fosfatase alcalina, diluído 1:10.000 em PBS-Tween 0,05%. Após a incubação de uma hora foram feitas mais 3 lavagens do mesmo modo anterior, e revelação como descrita em 3.4.4.

3.5 OBTENÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA AS PROTEINAS RECOMBINANTES

3.5.1 Teste do soro pré-imune

Antes das inoculações é necessário verificar se no soro dos animais que serão utilizados existe algum anticorpo que possa possuir 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 incubada a temperatura ambiente por 15 minutos e a 37°C por 15 minutos, e posteriormente centrifugada a 5.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante (soro pré-imune) foi coletado e transferido para outro tubo, que foi armazenado a -20°C.

O antisoro foi testado por *Western Blot* contra extrato protéico de *T. Cruzi*, como descrito anteriormente. A diluição usada neste caso foi a menor diluição utilizada para o teste do soro imune.

3.5.2 Inoculações em animais para a obtenção de antisoro

As proteínas foram inoculadas em camundongos da linhagem *Swiss* e o antisoro obtido foi utilizado em ensaios de imunofluorescência, visando conhecer a localização intracelular da proteína, e em ensaios de *Western Blot* para análise da expressão da proteína durante diferentes etapas do ciclo de vida do parasita. O soro imune poderá ser utilizado posteriormente para ensaios como imunoprecipitação de complexos contendo as proteínas em questão.

3.5.3 Inoculações em camundongos

Os camundongos utilizados na inoculação foram da linhagem *Swiss*, com mais de 40 dias de vida. A escolha do sexo foi feita de acordo com a disponibilidade do biotério, mas foram todos do mesmo sexo, ao menos para cada uma das proteínas. Na primeira inoculação, foi preparada uma solução contendo 50 µg de proteína para cada camundongo e o adjuvante completo de *Freund*. A proporção adjuvante / solução de proteína foi de 1:1 e o volume da solução de proteína foi completado com solução salina a 0,9%. A partir da segunda inoculação, foram utilizados 20µg de proteína por camundongo e 77µl do adjuvante Alu-gel. As inoculações intraperitoneais foram feitas de 15 em 15 dias. Uma semana após a 4ª inoculação, uma alíquota de 100 a 200µl de sangue foi retirada através da cauda e o soro obtido. O soro foi testado por *Western Blot*, e caso não houvesse produção de anticorpos contra a proteína recombinante, poderia ser feita uma quinta inoculação nos mesmos moldes das anteriores. Ao se verificar a produção de anticorpos, os animais foram sedados com quetamina e anestesiados com xilazina e o sangue retirado por punção cardíaca.

3.5.4 Teste dos antisoros

Para o teste de qualidade dos antisoros produzidos, foi aplicado em um gel de poli-acrilamida o extrato protéico de *T. cruzi* (epimastigota com 3 dias de cultivo), de

modo que houvesse extrato correspondente a 5×10^6 células por canaleta do gel. O ensaio de *Western Blot* foi realizado como descrito anteriormente.

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

3.6 IMUNOENSAIOS COM OS ANTICORPOS OBTIDOS

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

Um ensaio de *Western Blot* foi realizado com extratos de parasitas em diversas etapas do ciclo de vida para se verificar o padrão de expressão destas proteínas durante as etapas do desenvolvimento do parasita. A análise do ciclo de vida foi feito com extratos de epimastigotas com 3 dias de cultivo, tripomastigotas metacíclicos, amastigotas e tripomastigotas sanguíneos. 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, uma proteína de aproximadamente 37 kDa que não sofre modulações drásticas de expressão durante o ciclo de vida do *T. cruzi*. As membranas foram incubadas com os antisoros nas diluições padronizadas anteriormente e com anticorpo secundário anti-mouse conjugado à fosfatase alcalina, e reveladas segundo o protocolo padrão.

3.6.2 Imunofluorescência

Os parasitas suspensos em PBS foram submetidos à adesão sobre lâminas histológicas, previamente tratadas com poli-L-lisina por 20 minutos. A seguir, os parasitas foram fixados com paraformaldeído a 4% em PBS, por 5 minutos a 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 5 minutos, seguido pelo bloqueio dos sítios de ligação inespecíficos, que foi realizado pela incubação com solução contendo soro de cabra 25% em PBS, por 16 horas a 4°C em câmara úmida. Após o bloqueio, as lâminas foram lavadas e incubadas por uma hora a 37°C com o soro contendo anticorpo primário, anti-proteína recombinante. Os soros imune e pré-imune foram diluídos em PBS contendo soro de cabra a 25%. Após o período de incubação, foram realizadas lavagens com PBS, para a retirada do excesso de anticorpos. Posteriormente, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo, conjugado com *Alexa fluor 488*), na diluição de 1:500 por uma hora a 37°C, seguido de lavagens com PBS.

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

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

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA

4.1.1 Alinhamentos de seqüências primárias de proteínas (BLASTp)

Para o desenvolvimento deste projeto foram selecionados os genes Tc00.1047053510507.50 (10507), com seqüência de 990 pares de base, e Tc00.1047053511127.10 (1127), de 723 pares de base. A escolha desses genes foi feita com base em um alinhamento realizado em *T. cruzi* utilizando um gene codificador para uma proteína com domínio RRM de ligação a RNA, a partir de uma caracterização prévia de proteína presentes em mRNPs (complexos ribonucleoproteicos) em *T. cruzi* (ALVES *et al.*, 2010). Esses genes codificam, respectivamente, para as proteínas RBP10B e RBP9A (DE GAUDENZI, 2005). A RBP9A tem peso molecular de 26 kDa e sequencia de 240 aminoácidos, e a RPB10B peso de 36 kDa e 329 aminoácidos. A figura 9 mostra os domínios RRM presentes nas duas proteínas selecionadas para estudo.

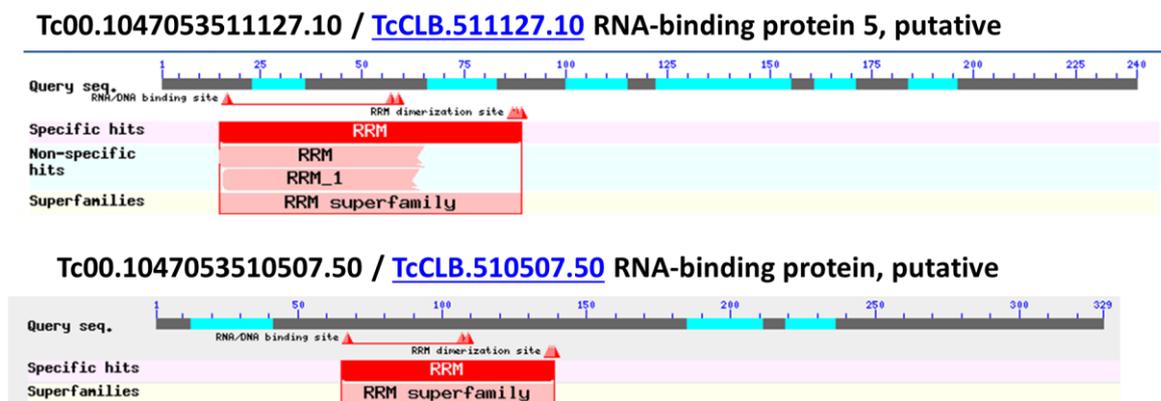


FIGURA 9 - ESQUEMA DOS DOMÍNIOS RRM (RNA RECOGNITION MOTIF) PRESENTES NAS PROTEÍNAS RBP9A E RBP10B: (A) TcCLB.511127.10 E (B) TcCLB.510507.50. Os genes foram selecionados a partir de uma caracterização prévia de proteínas que compõem os mRNPs em *T. cruzi* (ALVES *et al.*, 2010).

4.1.2 Síntese de oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 1) utilizados para a amplificação inicial dos genes 1127 e 10507 foram construídos de acordo com os requerimentos do sistema Gateway® (3.2.2).

TABELA 1 - SEQUÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DOS GENES EM ESTUDO. Genes que expressam as proteínas RBP9A e RBP10B.

RBP9A F	ATGGGCAGTCCATCACCAAC
RBP9A R	TTGCGTTGTCTGGCAAAGC
RBP10B F	CTTTGACGTGAAAACCCCT
RBP10B R	AGACGACTGGGGATACAG

4.2 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE INTERESSE E CLONAGEM NO SISTEMA GATEWAY®

4.2.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR) e purificação dos *amplicons*

Inicialmente, fez-se a amplificação das sequências de nucleotídeos dos dois genes por PCR (Figura 10). Para todas as temperaturas testadas e com o uso da Taq Polimerase e da Taq Polimerase *High Fidelity* (Invitrogen), houve amplificação do gene 1127. Já o gene 10507 não amplificou especificamente em nenhuma das temperaturas testadas. Os *amplicons* do gene 1127 foram purificados conforme descrito em 3.3.1.

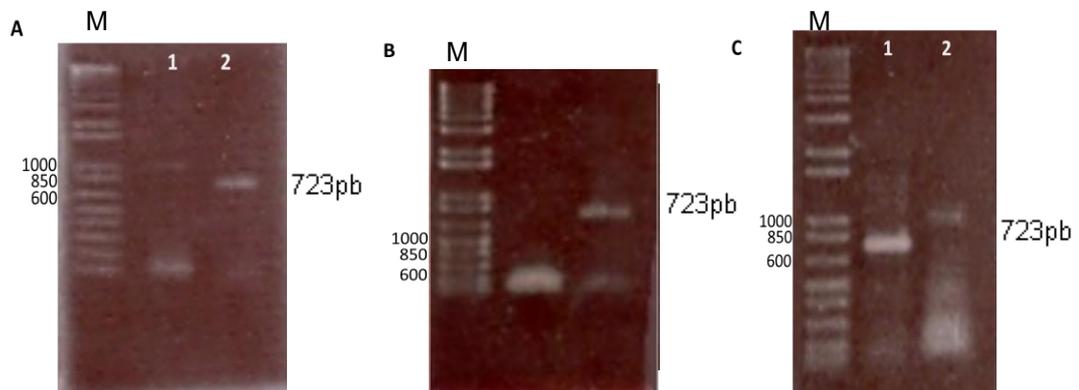


FIGURA 10 - ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DOS *AMPLICONS* DOS GENES 10507 E 1127. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% CORADO COM BROMETO DE ETÍDIO (CONCENTRAÇÃO 1 μ G/ML). M: marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). A: PCR com Taq Polimerase (*Invitrogen*), temperatura de anelamento de 55°C - (1) *Amplicons* do gene 10507; (2) *Amplicons* do gene 1127.10. B: PCR com Taq Polimerase *High Fidelity* (*Invitrogen*), temperatura de anelamento de 55°C - (1) Gene 10507; (2) Gene 1127. C: PCR com Taq Polimerase (*Invitrogen*), temperatura de anelamento de 60°C - (1) Gene1127; (2) Gene 10507.

A figura 11 mostra a amplificação do gene 10507 (RBP10B), resultado de uma PCR com o uso da Taq polimerase (*Invitrogen*), utilizando temperatura de anelamento do primer de 50°C.

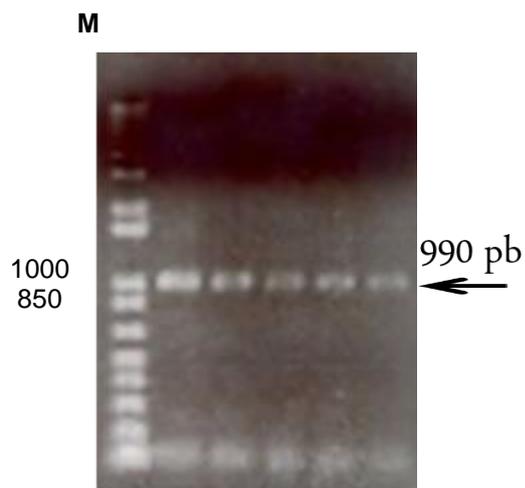


FIGURA 11 - ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DOS *AMPLICONS* DO GENE 10507, COM 990 pb. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (concentração 1 μ g/ml). M: marcador 1 kb Plus DNA Ladder (*Invitrogen*). PCR com Taq Polimerase (*Invitrogen*), temperatura de anelamento de 50°C.

4.2.2 Clonagem dos *amplicons* no vetor de entrada pDONR™221

Após várias tentativas de recombinação do gene da proteína TcRBP10B no vetor de entrada pDONR™221 (Gateway), optou-se por iniciar a clonagem somente do gene 1127, codificador da proteína TcRBP9A. Após a transformação em célula competente *Dh5α*, três colônias apresentavam o vetor de entrada pDONR recombinado com o gene de interesse 1127 (Figura 12).

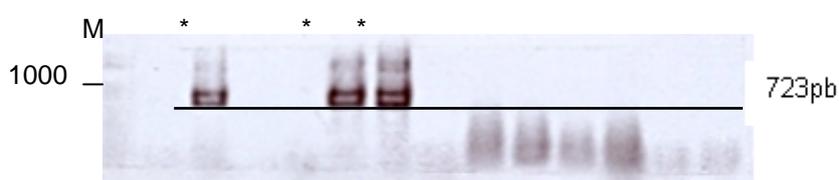


FIGURA 12 - ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DOS *AMPLICONS* GERADOS POR PCR DE COLÔNIA. (*) Clones positivos da recombinação do vetor de entrada pDONR™221 com o gene de interesse 1127, de 723 pares de base. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (concentração 1 µg/ml). M: marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

4.2.3 Sequenciamento

Após a purificação do DNA plasmidial por minipreparação (*QIAprep Miniprep*), uma amostra de 10 µl contendo o gene 1127 recombinado no vetor pDONR™221, em concentração de DNA de 100 ng/µl, foi enviada para sequenciamento. 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>). O resultado de sequenciamento confirmou a identidade do gene RBP9A e dessa forma procedeu-se para a etapa de subclonagem.

4.2.4 Subclonagem no vetor de expressão pDEST™17

Confirmou-se a recombinação no vetor de entrada pDONR™221 por eletroforese em gel de agarose e realizou-se a recombinação dos plasmídios em vetor de expressão pDEST™ (*Gateway*®). A recombinação foi confirmada através de PCR de colônia dos clones positivos, após transformação em células cálcio-competentes *DH5α* (Figura 13). Realizou-se em seguida a minipreparação plasmidial, após inóculo das colônias 1 e 2, e a confirmação foi realizada por eletroforese em gel de agarose.

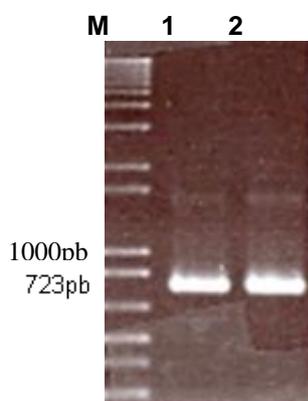


FIGURA 13 - ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DOS *AMPLICONS* GERADOS POR PCR DE COLÔNIA. Clones positivos da recombinação do vetor de entrada pDEST™ com gene de interesse 1127. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (concentração 1 µg/ml). m: marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). 1,2: Clones positivos contendo vetor pDEST recombinado com gene 1127.

4.3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

4.3.1 Testes de expressão da proteína recombinante

Partiu-se para a transformação na cepa de expressão BL21(DE3)pLysS para expressão heteróloga da proteína RBP9A. A presença do vetor contendo o inserto de interesse na cepa BL21(DE3) foi confirmada por PCR de colônia dos clones positivos presentes nas placas (Figura 14).

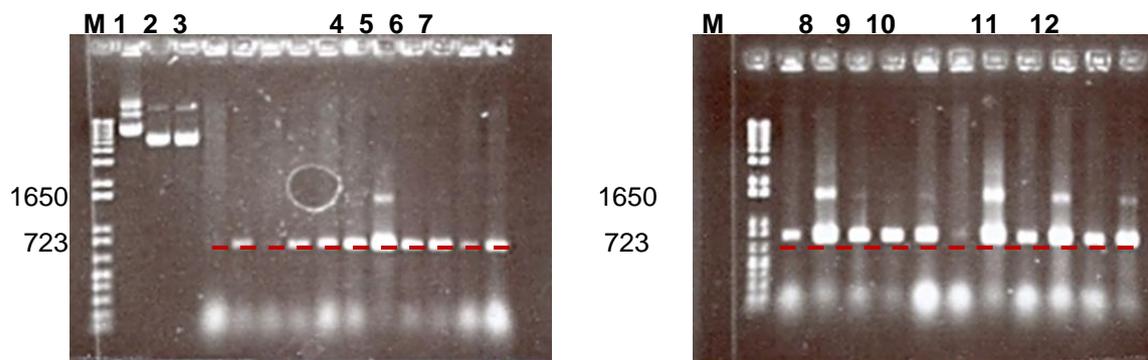


FIGURA 14 - ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DOS *AMPLICONS* GERADOS POR PCR DE COLÔNIA. CLONES POSITIVOS DA TRANSFORMAÇÃO DO VETOR pDEST CONTENDO GENE 1127 EM CEPA DE EXPRESSÃO BL21(DE3). Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (concentração 1 µg/ml). M: Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). 1: Vetor pDEST sem gene recombinado. 2,3: Vetor pDEST recombinado com gene 1127. 4, 5, 6, 7: Clones positivos escolhidos para expressão da placa de “resto”. 8-12: Clones positivos escolhidos da placa de “100 ul”.

Após indução da cultura de bactérias por três horas a 37°C, com IPTG 1mM, observou-se a expressão da proteínas pelas colônias selecionadas previamente (Figura 15).

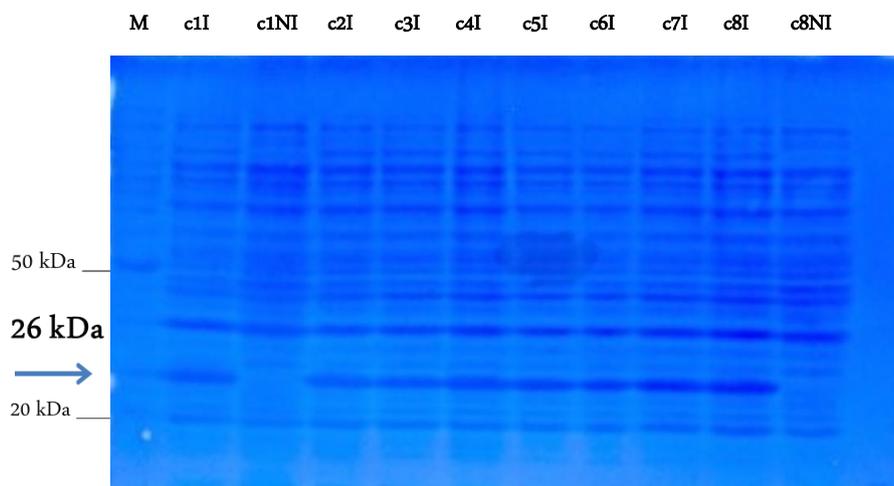


FIGURA 15 - ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DA PROTEÍNA RBP9A EM DE GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) 13%. Teste de expressão da proteína RBP9A (26 kDa) pela cepa BL21(DE3)pLysS induzida por IPTG 1mM, por 3 horas a 37°C. M: Marcador Bench Mark Protein Ladder (Invitrogen). C1I: Colônia 1 induzida. C1NI: Colônia 1 não-induzida. C2I-C8I: colônias induzidas. C8NI: Colônia 8 não-induzida.

A colônia 8 foi selecionada para o teste de expressão da proteína RBP9A nas formas solúvel e insolúvel. Na figura 16, pode-se observar o padrão de expressão da proteína RBP9A somente na forma insolúvel. Devido à fusão da cauda de histidina à proteína, seu peso molecular foi aumentado para aproximadamente 30 kDa. Optou-se por indicar o peso da proteína recombinante TcRBP9A nos géis de poliacrilamida como 26 kDa.

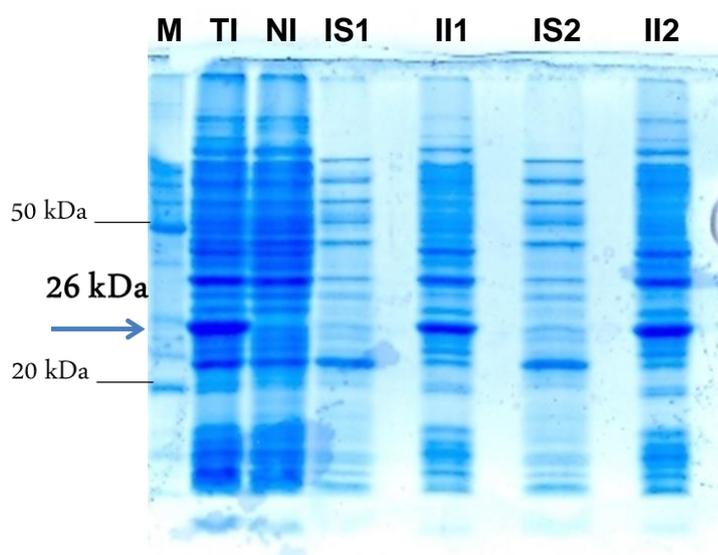


FIGURA 16 - ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DA PROTEÍNA RBP9A EM DE GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) 15%. Teste de expressão da proteína RBP9A (26 kDa) nas formas solúvel e insolúvel. Indução por IPTG 1 mM, por 3 horas a 37°C. M: Marcador Bench Mark Protein Ladder (Invitrogen). TI: proteína total induzida. NI: proteína total não-induzida. IS1: amostra 1 da proteína induzida, solúvel. II1: amostra 1 da proteína induzida, insolúvel. IS2: amostra 2 da proteína induzida, solúvel. II2: amostra 2 da proteína induzida, insolúvel.

4.3.2 Expressão em larga escala da proteína recombinante

Com esse resultado, partiu-se para a expressão em larga escala da proteína para posterior purificação por cromatografia de afinidade, utilizando coluna de níquel-ácido nitrilotriacético. Primeiramente, foi feito um ensaio de *Western Blot* para confirmação da presença da proteína expressa, já que em sua sequência está contido um resíduo de seis histidinas, que é reconhecido pelo anticorpo primário anti-histidina (Figura 17).

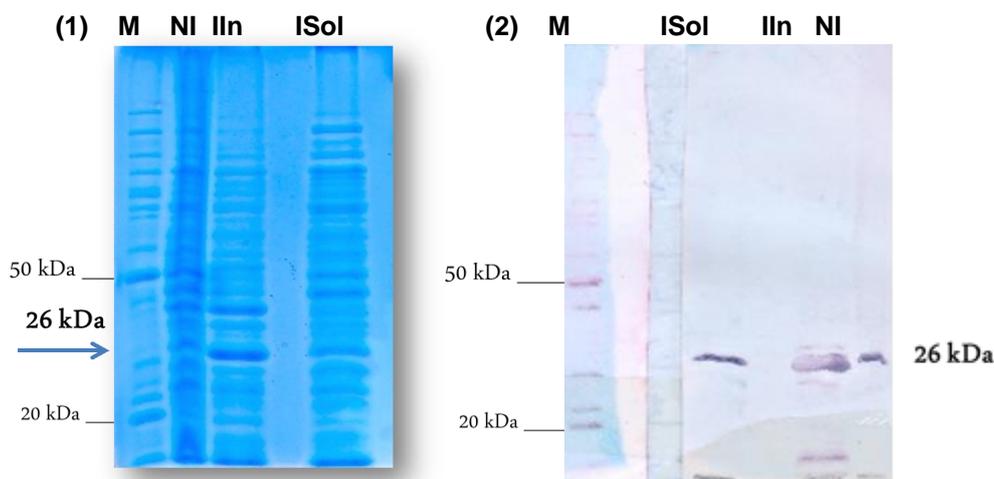


FIGURA 17 - (1) ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DA PROTEÍNA RBP9A EM DE GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) 15%. M: Marcador Bench Mark Protein Ladder (Invitrogen). NI: Proteína total não-induzida. IIn: Proteína induzida, insolúvel. ISol: Proteína induzida, solúvel. Diluição: 1:20. Indução por 3 horas, 37°C. (2) Ensaio de *western blot* para teste da proteína expressa com *tag* de histidina. M: Marcador Bench Mark Protein Ladder (Invitrogen). NI: Proteína total não-induzida. IIn: Proteína induzida, insolúvel. ISol: Proteína induzida, solúvel. Anticorpo primário: anti-histidina 1:3.000. Anticorpo secundário: anti-mouse AP 1:10.000.

O resultado mostrado na figura acima indica que houve expressão da proteína solúvel, apesar de estar presente em menor quantidade que a insolúvel. Pode-se observar também o reconhecimento da proteína pelo anticorpo na membrana NI (não-induzido), o que pode ser interpretado como um escape de expressão da proteína RBP9A pela cepa BL21(DE3), apesar da bactéria possuir sistemas de regulação da expressão da polimerase T7 na ausência de IPTG.

4.3.3 Purificação por cromatografia de afinidade e eletroeluição

Confirmada a presença da proteína de interesse na forma insolúvel, realizou-se a purificação da mesma marcada com cauda de histidina por cromatografia de afinidade com coluna de Ni-NTA agarose, 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 com tampão contendo concentrações crescentes de imidazol, provocando a eluição da proteína recombinante por competição. Essa purificação foi verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (Figura 18).

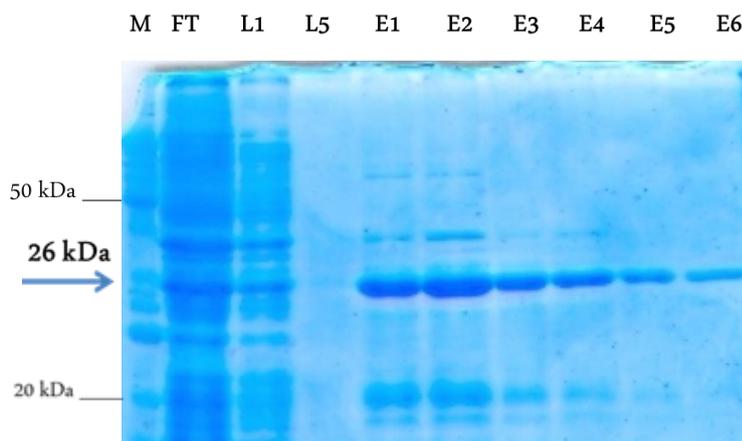


FIGURA 18 - ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DA PROTEÍNA RBP9A INSOLÚVEL PURIFICADA, EM DE GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) 15%. M: Marcador Bench Mark Protein Ladder (Invitrogen). FT: Flow-through, 10 ml *buffer* B (NaCl 300 mM; NaH₂PO₄ 100 mM; Tris-HCl 10 mM pH 8,0; Imidazol 10 mM, Ureia 8 M). L1/L5: Lavados 1 e 5, 1 ml tampão de lavagem (Imidazol 10 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, Ureia 8 M). E1,2,3. Eluidos. 500 µl tampão de eluição (Imidazol 300 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, Ureia 8 M). E 4,5,6. Eluidos. 500 µl tampão de eluição (Imidazol 500 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, Ureia 8 M).

Substituindo o sal presente no tampão de eluição de NaH₂PO₄ para Tris-HCl, obteve-se o resultado mostra abaixo na figura 19, em que a proteína purificada se concentrou praticamente na primeira eluição.

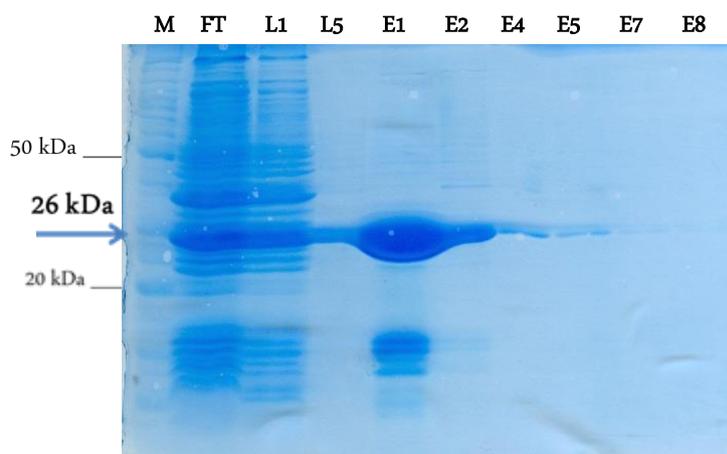


FIGURA 19 - ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DA PROTEÍNA RBP9A INSOLÚVEL PURIFICADA, EM DE GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) 15%. M: Marcador Bench Mark Protein Ladder (Invitrogen). FT: Flow-through, 10 ml buffer B (NaCl 300 mM; NaH₂PO₄ 100 mM; Tris-HCl 10 mM pH 8,0; Imidazol 10 mM ,Ureia 8 M). L1/L5: Lavados 1 e 5, 1 ml tampão de lavagem (Imidazol 10 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 300 mM, Ureia 8 M). E 1,2: Eluidos. 500 µl tampão de eluição (Imidazol 300 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 300 mM, Ureia 8 M). E 4,5: Eluidos. 500µl tampão de eluição (Imidazol 500 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 300 mM, Ureia 8 M). E 7,8: Eluidos. 500 µl tampão de eluição (Imidazol 750 mM, Tris HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 300 mM, ureia 8 M).

4.3.4 Purificação por eletroeluição em 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).

4.3.5 Confirmação da purificação das proteínas purificadas por *western blot*

A proteína eletroeluída foi utilizada em um ensaio de *western blot* para a confirmação da purificação (Figura 20). Após essa etapa de confirmação da purificação, partiu-se para a quantificação da proteína por *Qubit*®.

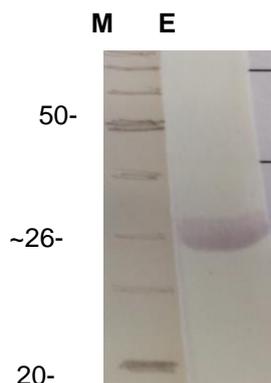


FIGURA 20 - IMUNODETECÇÃO DA CAUDA DE HISTIDINA NA PROTEÍNA RECOMBINANTE RBP9A. M: marcador de peso molecular em kDa. E: Eletroeluído referente à proteína RBP9A.

4.4 OBTENÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA A PROTEÍNA RECOMBINANTE

4.4.1 Inoculação em camundongos e teste do anticorpo

A proteína purificada foi concentrada com uso de membranas *Microcon*® e foi obtida uma concentração de 1.350 µg/ml, quantidade suficiente para iniciar a inoculação de 25 µg de proteína/inoculação em camundongos da linhagem *Swiss*, a fim de se obter anticorpo policlonal contra a proteína RBP9A. Foi feita a coleta do soro pré-imune de três camundongos e realizado um ensaio de *western blot* para verificar a existência de anticorpos que poderiam apresentar reação cruzada com proteínas presentes no extrato de *T. cruzi*. Como mostrado na figura 18, não houve reconhecimento dos anticorpos presentes no soro por nenhuma proteína do extrato proteico de *T. cruzi*. O ensaio foi repetido em (2) (Figura 21) para confirmação do resultado.

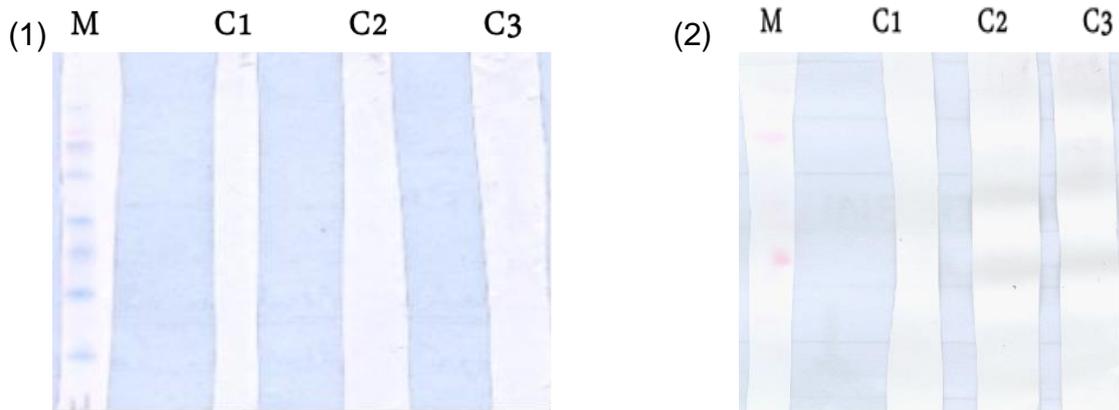


FIGURA 21 - (1), (2). ENSAIO DE *WESTERN BLOT* REALIZADO PARA ANÁLISE DO SORO PRÉ-IMUNE. Soro de três camundongos da linhagem *Swiss* contra extrato proteico de *T. cruzi* forma epimastigota com 3 dias de desenvolvimento. M: marcador Bench Mark Protein Ladder (Invitrogen). Anticorpo primário: soro pré-imune, 1:250. Anticorpo secundário: anti-mouse AP, 1:10.000. C1, C2, C3: camundongos 1, 2 e 3, todos da linhagem *Swiss*.

Foram realizadas três inoculações por via peritoneal nos camundongos, e após a terceira, foi coletada uma alíquota do soro imunizado de cada camundongo e analisado por *Western Blot* (Figura 22). O ensaio mostrou que apenas o camundongo 3 (C3) gerou anticorpos contra proteína de *T. cruzi*, mas a proteína marcada não apresentou o tamanho esperado da RBP9A, de 26 kDa, ficando próximo dos 50 kDa. O ensaio foi repetido em (2) para confirmação do resultado.

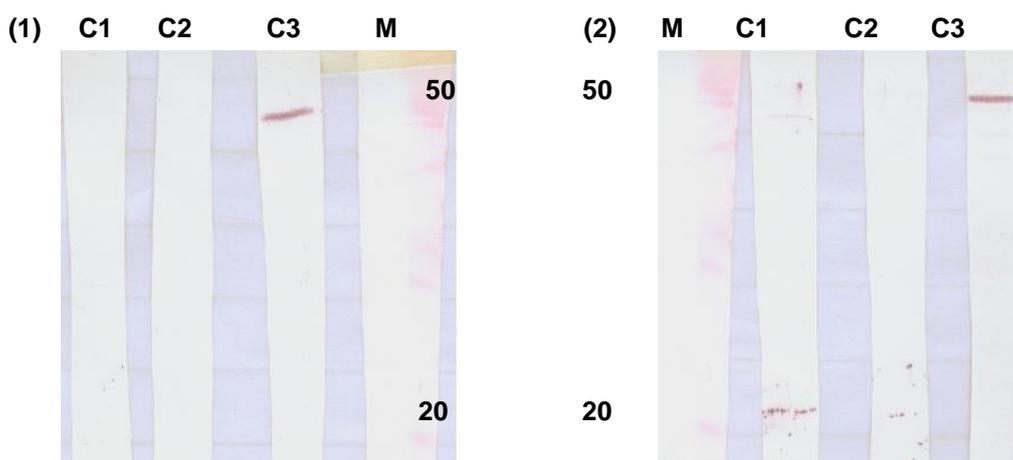


FIGURA 22 - (1), (2). ENSAIO DE *WESTERN BLOT* REALIZADO PARA ANÁLISE DO SORO IMUNE. Soro de três camundongos *Swiss* contra extrato proteico de *T. cruzi* forma epimastigota com 3 dias de desenvolvimento, após a terceira inoculação de 25 µg de proteína. M: marcador Bench Mark Protein Ladder (Invitrogen). Anticorpo primário: soro imune, 1:250. Anticorpo secundário: anti-mouse AP, 1:10.000. C1, C2, C3: camundongos 1, 2 e 3.

Segundo os resultados da figura acima, os camundongos 1 e 2 não apresentaram resposta imune à proteína, portanto a quarta inoculação foi feita pela via intravenosa. A figura 23 mostra ensaio de *Western Blot* em que (1) foi repetido o teste com o soro imune após três inoculações, e (2) o teste com o soro de dois camundongos após a quarta inoculação intravenosa.

Após a quarta inoculação da proteína purificada, os dois camundongos apresentaram resposta imune à proteína de peso molecular de aproximadamente 50 kDa, diferente da proteína RBP9A (26 kDa).

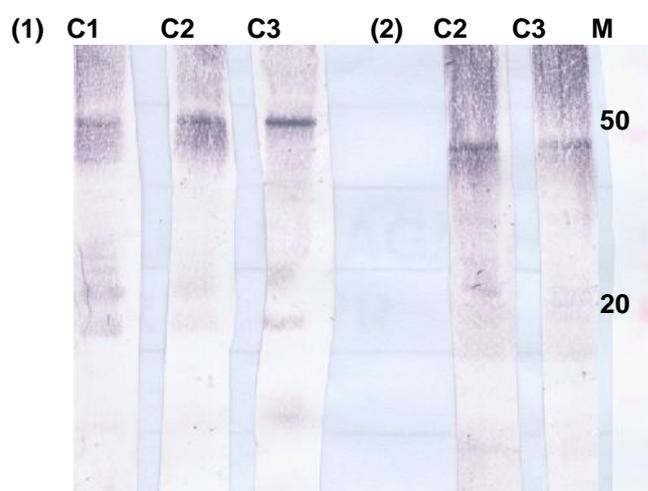


FIGURA 23 - ENSAIO DE *WESTERN BLOT* REALIZADO PARA ANÁLISE DO SORO IMUNE DE TRÊS. Soro de camundongos *Swiss* contra extrato proteico de *T. cruzi* forma epimastigota com 3 dias de desenvolvimento, após as (1) terceira inoculação peritonial e (2) quarta inoculação intravenosa de 25ug de proteína. C1, C2, C3: camundongos 1, 2 e 3. M: marcador Bench Mark Protein Ladder (Invitrogen). Anticorpo primário: soro imune, 1:250. Anticorpo secundário: anti-mouse AP, 1:10.000.

Para confirmar que o anticorpo reconhecendo uma proteína do extrato de *T. cruzi* era específico para a proteína recombinante RBP9A, realizou-se um ensaio de *Dot Blot* (Figura 24), em que a proteína purificada e concentrada é aplicada diretamente na membrana de nitrocelulose, e, após secagem, imersa em solução de bloqueio. A partir de então, seguem-se os mesmos passos do *western blot* (3.4.4).

Como se pode observar, o anticorpo reconheceu a proteína recombinante, corroborando a hipótese de que estaria ocorrendo uma ligação específica entre eles. O soro pré-imune foi utilizado como controle negativo, na mesma diluição que o soro imune (1:250).

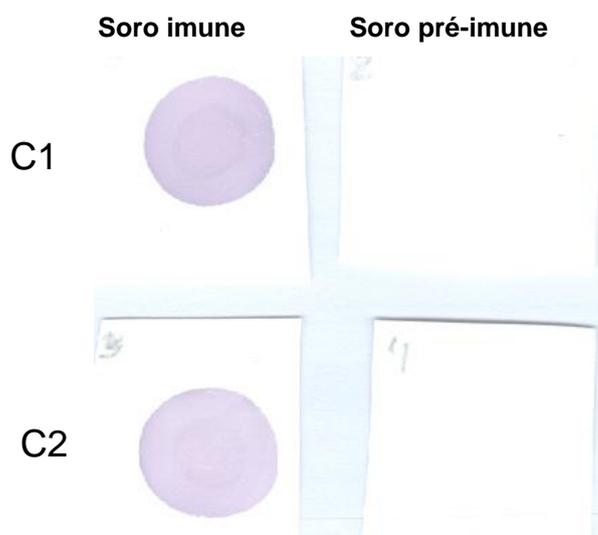


FIGURA 24 – ENSAIO DE *DOT BLOTTING* REALIZADO PARA ANÁLISE DO SORO IMUNE CONTRA PROTEÍNA RECOMBINANTE RBP9A. C1: camundongo 1. C2: camundongo 2. Anticorpo primário: soros imune e pré-imune (controle negativo), 1:250. Anticorpo secundário: anti-mouse AP, 1:10.000.

A partir desses resultados, iniciou-se um processo de interpretação em relação ao tamanho da proteína reconhecida pelo anticorpo produzido pelos camundongos, e possíveis estados em que a proteína de interesse poderia se encontrar no extrato proteico, como, por exemplo, formando dímeros da proteína. Optou-se por acrescentar DTT (ditiotreitól) 1 mM, um forte agente redutor mais estável e menos volátil que o β -mercaptoetanol, ao extrato proteico de epimastigota 3 dias utilizado nos ensaios de *Western Blot*. Com o objetivo de buscar um método mais sensível de revelação da membrana no ensaio de *Western Blot*, foi utilizada a detecção do anticorpo por Odyssey® (Figura 25). Esse método de detecção utiliza lasers para excitar fluoróforos de comprimento de onda entre 700nm e 800 nm. A emissão dos anticorpos conjugados com fluoróforos é detectada para gerar uma imagem da amostra.

Observou-se uma banda com peso molecular próximo a 25 kDa, possivelmente a proteína de interesse RBP9A, de 26 kDa.

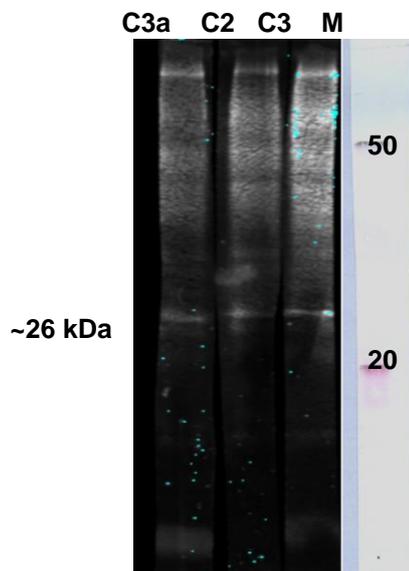


FIGURA 25 - ENSAIO DE *WESTERN BLOT* REALIZADO PARA ANÁLISE DO SORO IMUNE. Soro de dois camundongos *Swiss* contra extrato proteico de *T. cruzi* forma epimastigota com 3 dias de desenvolvimento, após a terceira inoculação peritoneal em C3a e a quarta inoculação intravenosa de 25ug de proteína em C2 e C3. C2, C3a e C3: camundongos 2 e 3. M: marcador Bench Mark Protein Ladder (Invitrogen). Anticorpo primário: soro imune, 1:250. Anticorpo secundário: anti-mouse Odyssey 1:4.000.

Como forma de confirmar o resultado acima, foi utilizada uma técnica diferente de revelação da membrana do *western blot*, agora por fosfatase alcalina (Figura 26). Nesse ensaio, foi feita a mesma diluição do anticorpo primário (soro imune) usada na figura 25, de 1:250. Como controle, foram aplicados dois extratos proteicos diferentes de *T. cruzi* na forma epimastigota (a, b).

Apesar do *background* presente acima da banda reconhecida pelo anticorpo, provavelmente devido a um curto tempo de bloqueio ou falha durante as lavagens da membrana, observa-se a presença de uma banda marcada próximo a 30 kDa, provavelmente a proteína RBP9A reconhecida especificamente pelo anticorpo primário, corroborando o resultado da figura 25.

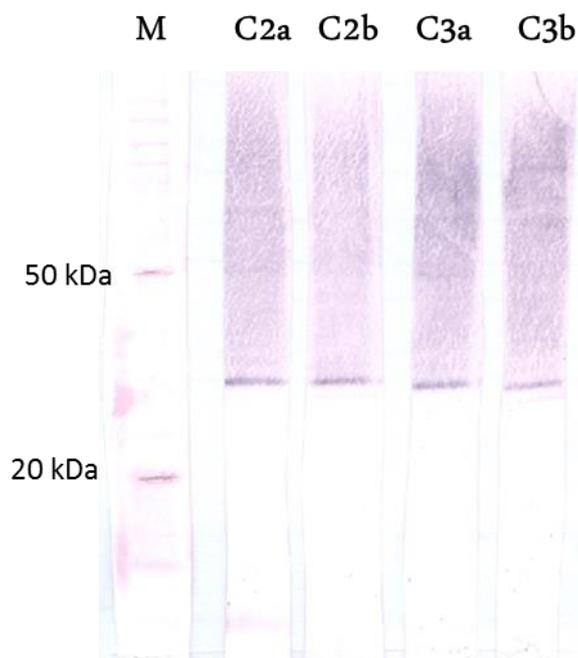


FIGURA 26 - ENSAIO DE *WESTERN BLOT* REALIZADO PARA ANÁLISE DO SORO IMUNE. Soro de dois camundongos *Swiss* contra extrato proteico de *T. cruzi* forma epimastigota com 3 dias de desenvolvimento, após a quarta inoculação intravenosa de 25 µg de proteína em C2 e C3. C2, C3: camundongos 2 e 3. a,b: dois diferentes amostras de extrato de *T. cruzi* forma epimastigota 3 dias de desenvolvimento. M: marcador Bench Mark Protein Ladder (Invitrogen). Anticorpo primário: soro imune, 1:250. Anticorpo secundário: anti-mouse AP, 1:10.000.

Esse resultado demonstra que a proteína RBP9A apresenta conformação *in vivo* distinta da proteína recombinante e, uma vez que a proteína presente no extrato e que é reconhecida pelo anticorpo está próxima a 50 kDa, praticamente o dobro do tamanho da proteína recombinante (26 kDa), sugere-se que a RBP9A estaria formando dímeros de proteína quando presente no parasita, o que não ocorre na proteína recombinante de expressão heteróloga.

Estudos prévios indicam que a dimerização de proteínas fornece dois sítios de reconhecimento para a ligação de RNA e pode ainda gerar uma interação cooperativa que fortalece a afinidade da proteína com o RNA. Também cria uma interface que inibe a poliadenilação por interação direta com a poli(A) polimerase. Além de gerar sítios de ligação estendidos de domínios de proteínas pequenas e estabilizar a posição relativa dos aminoácidos que estão envolvidos no reconhecimento do RNA (LUNDE *et al*, 2007).

4.5 IMUNOENSAIOS COM O ANTICORPO OBTIDO

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

Ensaio de *western blot* com extratos de *T. cruzi* em diferentes etapas do ciclo de vida foram realizados com os antisoros obtidos para a verificação dos padrões de expressão da proteína RBP9A durante o ciclo de vida do parasita (Figuras 27 e 28). A proteína não foi expressa em formas amastigotas, porém, em todas as outras etapas do ciclo de vida, os padrões de expressão foram constantes. Notar que o extrato de parasitas na forma amastigota (A) se encontra em menor quantidade que os demais extratos no controle positivo (GAPDH), apesar da padronização de aplicação de 5×10^6 células por canaleta da membrana. Isso pode ter levado a uma detecção ineficiente da proteína nessa forma replicativa, esse resultado não exclui a possibilidade de RBP9A estar presente em todas as formas de desenvolvimento do *T. cruzi*.

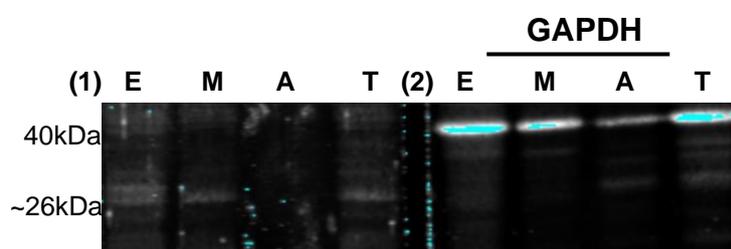


FIGURA 27 – ENSAIO DE WESTERN BLOT REALIZADO PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA RBP9A DURANTE O CICLO DE VIDA DE *T. cruzi*. E: forma epimastigota. M: forma tripomastigota metacíclica. A: forma amastigota. T: forma tripomastigota sanguíneo. (1) Anticorpo primário: soro imune, 1:250. Anticorpo secundário: anti-mouse AP, 1:10.000. (2) GAPDH: proteína de aproximadamente 37 kDa utilizada como controle positivo. Anticorpo primário: anti-GAPDH, 1:1000. Anticorpo secundário: anti-mouse Odyssey 1:4.000.

Como tentativa de confirmar o resultado acima, foi utilizada uma técnica diferente de revelação da mesma membrana utilizada na figura 24, agora por fosfatase alcalina (Figura 28). Pode-se observar que não houve expressão

detectável da proteína RBP9A na forma replicativa amastigota (A), apesar de o controle positivo (GAPDH) também apresentar uma marcação mais fraca nessa forma (A).

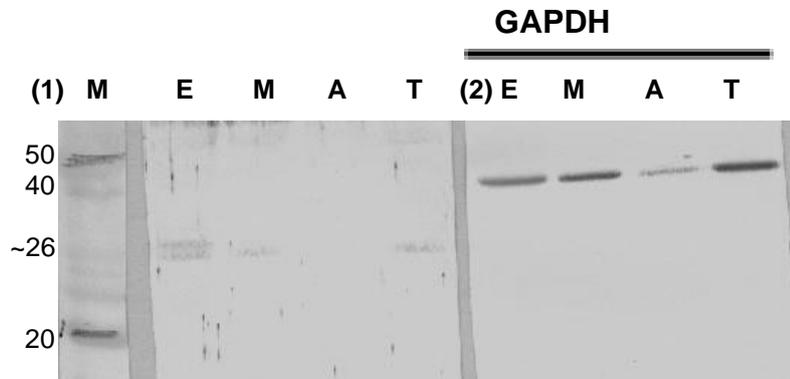


FIGURA 28 - ENSAIO DE WESTERN BLOT REALIZADO PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA RBP9A DURANTE O CICLO DE VIDA DE *T. cruzi*. M: marcador molecular Bench Mark Protein Ladder (Invitrogen) em kDa. E: forma epimastigota. M: forma tripomastigota metacíclica. A: forma amastigota. T: forma tripomastigota sanguíneo. (1) Anticorpo primário: soro imune, 1:250. Anticorpo secundário: anti-mouse AP, 1:10.000. (2) GAPDH: proteína de aproximadamente 37 kDa utilizada como controle positivo. Anticorpo primário: anti-GAPDH, 1:1000. Anticorpo secundário: anti-mouse AP, 1:10.000.

Uma vez que *T. cruzi* sofre variações ambientais contínuas, faz-se necessária a regulação da expressão de várias proteínas para que ocorra sua adaptação, através do recrutamento de complexos específicos de proteínas durante o ciclo celular e/ou estágios de desenvolvimento. Apesar de a proteína TcRBP9A não ter sido detectada na forma amastigota, sabe-se que proteínas de ligação a RNA com domínios RRM estão presentes em todas as formas de desenvolvimento do parasita, participando desse processo de regulação da expressão gênica (DE GAUDENZI, 2003).

4.5.2 Verificação da localização celular da proteína TcRBP9A através da técnica de imunofluorescência

Com o uso do anticorpo policlonal anti-RBP9A, foi possível realizar ensaios de imunofluorescência para verificar a localização celular da proteína na forma epimastigota do parasita *T. cruzi*. Em paralelo, foram realizados os mesmos ensaios com os soros pré-ímmunes, que não apresentaram sinal de fluorescência significativo em comparação aos soros ímmunes.

A proteína apresentou um padrão de localização citoplasmático em parasitas epimastigotas, condizendo com a localização de proteínas RBPs em condições celulares normais (Figura 29). Foi observada uma distribuição dispersa pelo citoplasma, levemente granular, e uma concentração maior da proteína ao redor do núcleo.

Futuramente, serão realizados ensaios de imunofluorescência durante a metaciclogênese do parasita, utilizando as formas tripomastigota metacíclico em condições normais, aderido ao substrato e sob estresse nutricional. Esse ensaio poderá mostrar se ocorre mudança no padrão de localização da proteína RBP9A em diferentes condições ambientais e de nutrição do parasita.

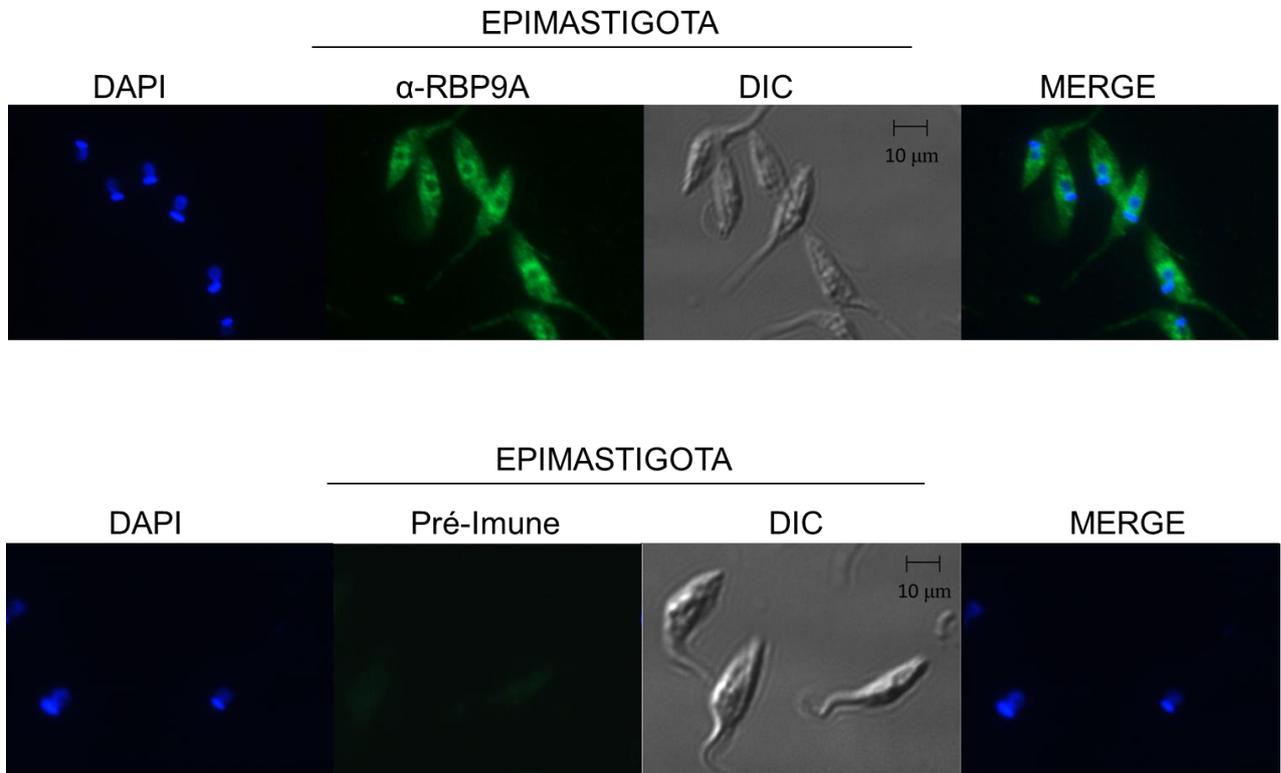


FIGURA 29 – IMUNOLOCALIZAÇÃO DA PROTEÍNA RBP9A EM PARASITAS EPIMASTIGOTAS. DIC: imagens dos parasitas obtidas através de contraste por interferência diferencial. α -RBP9A: visualização da marcação obtida através da incubação dos parasitas com o soro imune anti-proteína RBP9A. Pré-imune: marcação relativa 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.

6. CONCLUSÕES

O gene Tc00.1047053510507.50, que codifica para a proteína RBP10B, não amplificou por PCR com as temperaturas de anelamento testadas inicialmente, mas amplificou a 50°C para anelamento. Devido à dificuldade em recombinar os *amplicons* gerados por PCR no vetor de entrada pDONR (Gateway), optou-se por trabalhar com o gene da proteína TcRBP9A inicialmente e posteriormente retomar as tentativas de recombinação pela plataforma Gateway (Invitrogen) do gene da proteína TcRBP10B.

O gene Tc00.1047053511127.10, que codifica para a proteína RBP9A, apresentou amplificação em todas as temperaturas de anelamento do primer testadas durante PCRs, permitindo sua recombinação pela plataforma Gateway e expressão da proteína de interesse pela cepa de expressão BL21(DE3). Após expressão em larga escala e purificação por coluna de níquel e eletroeluição, foi iniciado o processo de inoculação da proteína em camundongos para obtenção do anticorpo. Após quatro inoculações, foi detectado por ensaio de *Western Blot* um anticorpo que reconhece uma proteína com peso molecular de aproximadamente 50 kDa, diferente do peso da RBP9A, de 26 kDa.

Esse resultado proporcionou a busca por uma interpretação correta dos dados, sobretudo sobre as diferenças no estado da proteína *in vivo* no parasita e a proteína recombinante inoculada nos camundongos, contendo a cauda de histidina. Como o anticorpo é analisado por *western blot* utilizando um extrato proteico de *T. cruzi*, a detecção da proteína pelo anticorpo pode diferir, resultando em diferentes pesos moleculares de proteínas detectadas durante esse ensaio. O primeiro passo foi utilizar o agente redutor DTT (ditiotreitól) e analisar o padrão de detecção do anticorpo por ensaio de *western blot*. Verificou-se, então, uma mudança na marcação da membrana de nitrocelulose quando revelada, marcando uma banda próximo a 25 kDa. O anticorpo reconheceu uma proteína com peso molecular de aproximadamente 25 kDa, possivelmente a proteína de interesse RBP9A, de 26 kDa. Esse fato foi interpretado como uma possível dimerização da proteína ocorrendo no parasita, já que utilizando o extrato sem tratamento com DTT no ensaio de *western blot*, o anticorpo reconhece uma proteína próxima de 50 kDa, que

seria o dobro da RBP9A. Estudos já haviam indicado que proteínas de ligação a RNA com domínios RRM podem sofrer dimerização e que esse processo fornece dois sítios de reconhecimento para a ligação de RNA e pode ainda gerar uma interação cooperativa que fortalece a afinidade da proteína com o RNA (LUNDE *et al*, 2007).

Com a confirmação da especificidade do anticorpo contra a proteína TcRBP9A, foram realizados imunoenaios, como ensaio de *western blot* para verificar o padrão de expressão da proteína durante o ciclo de vida do *T. cruzi* e a localização da proteína por microscopia de fluorescência.

Pelo ensaio de *western blot*, foi mostrado que a proteína é expressa principalmente nas formas epimastigota, tripomastigota metacíclico e tripomastigota sanguíneo, apesar da literatura relatar a expressão de RBPs em todos os estágios de desenvolvimento desse parasita. Os ensaios de imunolocalização da proteína mostraram que ela se encontra expressa principalmente no citoplasma do parasita, estando mais concentrada ao redor do núcleo.

Os objetivos propostos para o trabalho foram alcançados somente para a proteína RBP9A, e os resultados obtidos abrem perspectivas para ensaios futuros visando uma melhor caracterização dessa proteína, 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

ALVES, L. R.; ÁVILA, A. R.; CORREA, A.; HOLETZ, F. B.; MANSUR, F. C. B.; MANQUE, P. A.; MENEZES, J. P. B.; BUCK, G. A.; KRIEGER, M. A.; GOLDENBERG, S. Proteomic analysis reveals the dynamic association of proteins with translated mRNAs in *Trypanosoma cruzi*. **Gene**, 36672, p. 7, 4C, 2010.

BRITTINGHAM, A.; MILLER, M. A.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. Regulation of GP63 mRNA stability in promastigotes of virulent and attenuated *Leishmania chagasi*. **Mol. Biochem. Parasitol**, 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.

CLÉRY, A.; BLATTER, M.; ALLAIN, F.H. RNA recognition motifs: boring? Not quite, **Curr Opin Struct Biol**, v. 18, n. 3, p. 290-298.

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. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n.16, p. 12051-60, 2000.

D'ORSO I.; FRASCH A.C. TcUBP-1, an mRNA destabilizing factor from trypanosomes, homodimerizes and interacts with novel AU-rich element and Poly (A)-binding proteins forming a ribonucleoprotein complex. **J. Biol. Chem.** V. 277, p. 50520-50528, 2002.

DE GAUDENZI, J; D'ORSO, I; FRASCH, A C C. RNA Recognition Motif-type RNA-binding Proteins in *Trypanosoma cruzi* Form a Family Involved in the Interaction with Specific Transcripts in Vivo. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 278, p. 18884-18894, 2003.

DE GAUDENZI J.; FRASCH A.C.; CLAYTON C. RNA-binding domain protein in kinetoplastids: a comparative analysis. **Eukaryotic Cell**, v. 4, p. 2106-2114, 2005.

DE SOUZA, W. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Int. Rev. Cyt.** 1984, 86, 197-283.

DE SOUZA, W. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Curr. Pharm. Des.** 2002, 8, 269 - 285.

DIAS, J.C.M. In: Brenner Z., Andrade A.Z. e Barrel-Neto M. (eds) **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2ª edição, Guanabara-Koogan, 2000.

DREYFUSS G, KIM VN, KATAOKA N. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v. 3, n. 3, p. 195-205, 2002.

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.

KEENE J.D. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. **Nat. Rev. Genet.** v. 8, p. 533-543, 2007.

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.

LUNDE, M. B., MOORE, C., VARANI, G. RNA-binding proteins: modular design for efficient function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** v.8, p. 479-490, 2007.

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.

MICHELS P.A.; Bringaud F.; Herman M.; Hannaert V. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. **Biochim. Biophys. Acta.** 2006, 1763(12): 1463-1477.

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

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.

VENTER JC, ADAMS MD, MYERS EW, LI PW, MURAL RJ, SUTTON GG, SMITH HO, YANDELL M, EVANS CA, HOLT RA, GOCAYNE JD, AMANATIDES P, BALLEW RM, HUSON DH, WORTMAN JR, ZHANG Q, KODIRA CD, ZHENG XH, CHEN L, SKUPSKI M, SUBRAMANIAN G, THOMAS PD, ZHANG J, GABOR MIKLOS GL, NELSON C, BRODER S, CLARK AG, NADEAU J, MCKUSICK VA, ZINDER N, LEVINE AJ, ROBERTS RJ, SIMON M, SLAYMAN C, HUNKAPILLER M,

BOLANOS R, DELCHER A, DEW I, FASULO D, FLANIGAN M, FLOREA L, HALPERN A, HANNENHALLI S, KRAVITZ S, LEVY S, MOBARRY C, REINERT K, REMINGTON K, ABU-THREIDEH J, BEASLEY E, BIDDICK K, BONAZZI V, BRANDON R, CARGILL M, CHANDRAMOULISWARAN I, CHARLAB R, CHATURVEDI K, DENG Z, DI FRANCESCO V, DUNN P, EILBECK K, EVANGELISTA C, GABRIELIAN AE, GAN W, GE W, GONG F, GU Z, GUAN P, HEIMAN TJ, HIGGINS ME, JI RR, KE Z, KETCHUM KA, LAI Z, LEI Y, LI Z, LI J, LIANG Y, LIN X, LU F, MERKULOV GV, MILSHINA N, MOORE HM, NAIK AK, NARAYAN VA, NEELAM B, NUSSKERN D, RUSCH DB, SALZBERG S, SHAO W, SHUE B, SUN J, WANG Z, WANG A, WANG X, WANG J, WEI M, WIDES R, XIAO C, YAN C, YAO A, YE J, ZHAN M, ZHANG W, ZHANG H, ZHAO Q, ZHENG L, ZHONG F, ZHONG W, ZHU S, ZHAO S, GILBERT D, BAUMHUETER S, SPIER G, CARTER C, CRAVCHIK A, WOODAGE T, ALI F, AN H, AWE A, BALDWIN D, BADEN H, BARNSTEAD M, BARROW I, BEESON K, BUSAM D, CARVER A, CENTER A, CHENG ML, CURRY L, DANAHER S, DAVENPORT L, DESILETS R, DIETZ S, DODSON K, DOUP L, FERRIERA S, GARG N, GLUECKSMANN A, HART B, HAYNES J, HAYNES C, HEINER C, HLADUN S, HOSTIN D, HOUCK J, HOWLAND T, IBEGWAM C, JOHNSON J, KALUSH F, KLINE L, KODURU S, LOVE A, MANN F, MAY D, MCCAWLEY S, MCINTOSH T, MCMULLEN I, MOY M, MOY L, MURPHY B, NELSON K, PFANNKOCH C, PRATTS E, PURI V, QURESHI H, REARDON M, RODRIGUEZ R, ROGERS YH, ROMBLAD D, RUHFEL B, SCOTT R, SITTER C, SMALLWOOD M, STEWART E, STRONG R, SUH E, THOMAS R, TINT NN, TSE S, VECH C, WANG G, WETTER J, WILLIAMS S, WILLIAMS M, WINDSOR S, WINN-DEEN E, WOLFE K, ZAVERI J, ZAVERI K, ABRIL JF, GUIGÓ R, CAMPBELL MJ, SJOLANDER KV, KARLAK B, KEJARIWAL A, MI H, LAZAREVA B, HATTON T, NARECHANIA A, DIEMER K, MURUGANUJAN A, GUO N, SATO S, BAFNA V, ISTRAIL S, LIPPERT R, SCHWARTZ R, WALENZ B, YOOSEPH S, ALLEN D, BASU A, BAXENDALE J, BLICK L, CAMINHA M, CARNES-STINE J, CAULK P, CHIANG YH, COYNE M, DAHLKE C, MAYS A, DOMBROSKI M, DONNELLY M, ELY D, ESPARHAM S, FOSLER C, GIRE H, GLANOWSKI S, GLASSER K, GLODEK A, GOROKHOV M, GRAHAM K, GROPMAN B, HARRIS M,

HEIL J, HENDERSON S, HOOVER J, JENNINGS D, JORDAN C, JORDAN J, KASHA J, KAGAN L, KRAFT C, LEVITSKY A, LEWIS M, LIU X, LOPEZ J, MA D, MAJOROS W, MCDANIEL J, MURPHY S, NEWMAN M, NGUYEN T, NGUYEN N, NODELL M, PAN S, PECK J, PETERSON M, ROWE W, SANDERS R, SCOTT J, SIMPSON M, SMITH T, SPRAGUE A, STOCKWELL T, TURNER R, VENTER E, WANG M, WEN M, WU D, WU M, XIA A, ZANDIEH A, ZHU X. The sequence of the Human genome. **Science**. v. 291, n. 5507, p. 1304-1351, 2001.

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

ZELEDÓN, R.; BOLAÑOS, R.; ROJAS, M. Scanning electron microscopy of the final phase of the life cycle of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector. **Acta Tropica**, v.41, p.39-43, 1984.