

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
INSTITUTO CARLOS CHAGAS – FIOCRUZ/PR**

ALICE MARIA DA CUNHA

**PREPARAÇÃO DE FERRAMENTAS DE GENÉTICA REVERSA PARA O
ESTUDO FUNCIONAL DA PROTEÍNA DE UNIÃO AO RNA TcDRBD8 DE
Trypanosoma cruzi.**

CURITIBA

2015

ALICE MARIA DA CUNHA

**PREPARAÇÃO DE FERRAMENTAS DE GENÉTICA REVERSA PARA O
ESTUDO FUNCIONAL DA PROTEÍNA DE UNIÃO AO RNA TcDRBD8 DE
Trypanosoma cruzi.**

Monografia apresentada à disciplina de Estágio Supervisionado em Biologia 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.

Orientadora Interna: Prof^a Teresa Cristina César Ogliari

Orientadora Externa: Dra. Eloise Pavão Guerra Slompo

CURITIBA

2015

TERMO DE APROVAÇÃO

ALICE MARIA DA CUNHA

PREPARAÇÃO DE FERRAMENTAS DE GENÉTICA REVERSA PARA O ESTUDO FUNCIONAL DA PROTEÍNA DE UNIÃO AO RNA TcDRBD8 DE *Trypanosoma cruzi*.

Trabalho apresentado como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas, pela seguinte banca examinadora:

Profa. Msc. Teresa Cristina César Ogliari

Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná

Profa. Dra. Edneia Amancio de Souza Ramos Cavalieri

Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná

Profa. Dra. Eni Alcântara Picchioni

Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 18 de Dezembro de 2015.

*A Vinícius Kochinski das Neves,
por todo seu amor, incentivo e companheirismo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as coisas maravilhosas que me proporciona a cada dia e pelas pessoas incríveis que colocou em meu caminho. Também agradeço pela incrível oportunidade de estudar a vida e me fascinar cada dia mais com ela.

Ao meu noivo Vinícius por todo o apoio durante os dias difíceis, pelos momentos de compreensão, felicidade e até mesmo de “puxões de orelha”. Os quais, sem dúvida, foram imprescindíveis nesta caminhada. Agradeço por acreditar em minha capacidade, pela paciência, amor e companheirismo.

Aos meus pais Laci e Maria por investirem em minha educação, me incentivarem, e por todo o amor dedicado a mim durante toda a vida.

Aos meus amados Dido e Baba por todo o carinho. E aos tios Elcio e Elis por todas as oportunidades e apoio.

À orientadora Eloise Pavão Guerra Slompo, por ter me acolhido no Instituto Carlos Chagas e por todos os momentos de ensinamentos, amizade e paciência. Obrigada pela ajuda essencial na elaboração deste trabalho.

À professora Teresa Cristina César Ogliari, por ter aceitado ser minha orientadora interna e por todo o apoio prestado.

Às professoras Edneia Amancio de Souza Ramos Cavalieri e Eni Alcântara Picchioni, por terem aceitado o convite para compor minha banca avaliadora.

Aos colegas do laboratório de Regulação da Expressão Gênica, que me auxiliaram durante todas as fases do trabalho.

Às colegas do curso de Ciências Biológicas Bruna Aline, Paloma Gerlach e Viviana Stephanie, por todos os momentos de risadas, ajuda e incentivo.

A todos, muito obrigada!

“We can go anywhere you want to go”.

Angus & Julia Stone

RESUMO

A doença de Chagas tem como agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi* e é considerada um dos principais problemas de saúde pública na América Latina. O *Trypanosoma cruzi* apresenta quatro estágios já bem caracterizados durante o ciclo de vida, alternando-se entre um hospedeiro invertebrado, o barbeiro, e o hospedeiro vertebrado, um mamífero. Como os tripanosomatídeos não possuem promotores típicos para a regulação individual dos genes, acredita-se que a regulação de sua expressão gênica ocorra majoritariamente por mecanismos pós-transcricionais, permitindo uma rápida adaptação dos parasitas a diferentes condições. Os mecanismos pós-transcricionais de regulação da expressão gênica são mediados por proteínas de ligação ao RNA, as RBPs (*RNA Binding Proteins*). Algumas RBPs foram caracterizadas em *T. cruzi* e demonstraram a mobilização diferencial de RNAs e participação na regulação pós-transcricional destes organismos. Em eucariotos superiores, o domínio mais abundante em proteínas de ligação ao RNA é o domínio RRM (*RNA Recognition Motif*), sendo que as proteínas que apresentam este domínio estão relacionadas com grande parte dos processos pós-transcricionais responsáveis pela regulação da expressão gênica, como a exportação de RNAs, processamento de mRNA, estabilidade dos transcritos e mobilização para a tradução. Nosso grupo identificou previamente 81 proteínas contendo o domínio RRM em *T. cruzi*. Dentre elas encontra-se a TcDRBD8, que possui dois domínios RRM, é anotada como hipotética e é exclusiva de *T. cruzi*. Ainda, análises de perfil ribossomal sugerem fortemente que a TcDRBD8 seja expressa em maior quantidade na forma metacíclica de *T. cruzi* quando comparada à forma epimastigota, o que reforça o interesse em estudar o papel desta proteína. Assim, propomos neste projeto, construir ferramentas de genética reversa que permitam a posterior caracterização funcional da proteína TcDRBD8, que é uma RBP com dois domínios RRM, diferencialmente expressa no ciclo de vida do parasita e exclusiva de *T. cruzi*. A caracterização de proteínas que possam estar envolvidas na regulação da expressão gênica de *T. cruzi* podem auxiliar na compreensão dos mecanismos moleculares de diferenciação e infecção do parasita bem como desta importante patologia.

Palavras-chave: RBP, *Trypanosoma cruzi*, regulação da expressão gênica.

ABSTRACT

Chagas disease has as etiological agent the protozoan *Trypanosoma cruzi* and is considered one of the main public health issues in Latin America. *T. cruzi* has four well-characterized life cycle stages, alternating between an invertebrate host, a triatomine insect, and a vertebrate host, a mammal. Since trypanosomatids lack typical promoters for individual gene expression regulation, it is assumed that these events occurs mainly by post-transcriptional mechanisms, allowing for a rapid adaptation of the parasites when exposed to different conditions. RNA *Binding Proteins* (RBPs) are important kind of protein that regulate post-transcriptional mechanisms in gene expression of the *T. cruzi*. Some RBPs were characterized in *T. cruzi* and demonstrated differential mobilization of RNAs, and were indeed involved on post-transcriptional regulation in these organisms. In higher eukaryotes, the most abundant motif in RBPs is the RNA *Recognition Motif* (RRM). These proteins exhibit this domain are associated with the majority of post-transcriptional processes involved in the gene expression regulation, such as nucleocytoplasmic export, mRNA processing, regulation of transcripts stability and translation mobilization. Our group previously identified 81 proteins with RRM domain in *T. cruzi*. Among them is TcDRBD8, which contains two RRM domains, is annotated as a hypothetical protein and is *T. cruzi* exclusive. Furthermore, large-scale ribosome profiling analysis suggest that TcDRBD8 is more expressed in metacyclic tripomastigotes than in epimastigotes forms, which reinforces the interest in studying the role of this protein. Hence, we propose development a reverse genetic tool for functional characterization of TcDRBD8 protein, the RBP with two RRM domain, differentially expressed in the parasite life cycle and exclusive of *T. cruzi*. Characterizing the proteins involved in gene expression regulation in *T. cruzi* may help to elucidate the molecular mechanisms of parasite differentiation and infection.

Keywords: RBP, *Trypanosoma cruzi*, gene expression regulation.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 11 |
| 1.1 A Doença de Chagas..... | 11 |
| 1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i> | 13 |
| 1.2.1 Ciclo de vida | 13 |
| 1.3 Regulação da expressão gênica..... | 15 |
| 1.4 Proteínas de ligação ao RNA | 16 |
| 2. OBJETIVOS | 21 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL..... | 21 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 21 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 22 |
| 3.1 Soluções utilizadas | 22 |
| 3.2 Desenho dos oligonucleotídeos para amplificação do gene e regiões de interesse..... | 24 |
| 3.3 Amplificação dos genes e regiões de interesse e clonagem no sistema Gateway®..... | 27 |
| 3.3.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR) e purificação dos amplicons | 27 |
| 3.3.2 Eletroforese de DNA..... | 27 |
| 3.3.4. Transformação em bactérias quimio-competentes..... | 28 |
| 3.3.6. Minipreparação de plasmídeos..... | 30 |
| 3.3.7. Sequenciamento de DNA..... | 30 |
| 3.3.8. Recombinação nos vetores de destino | 30 |
| 3.3.8.1 Vetor de destino pDEST™17 | 31 |
| 3.3.8.2 Vetor de destino pTcFLAG | 32 |
| 3.3.9 Vetor de destino pTcGFP | 33 |
| 3.4. EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS..... | 33 |
| 3.4.1. Transformação de bactérias quimio-competentes com o vetor de expressão | 33 |
| 3.4.3. Eletroforese de proteínas em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE)..... | 36 |
| 3.4.4 Ensaio de <i>Western Blotting</i> | 36 |
| 3.4.5 Expressão de proteínas em larga escala | 37 |
| 3.4.6 Purificação da proteína obtida por cromatografia de afinidade..... | 38 |
| 3.5 ABORDAGENS DE CLONAGEM CLÁSSICA..... | 38 |
| 3.5.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR), purificação dos amplicons e eletroforese de DNA..... | 38 |
| 3.5.2 Clonagem no vetor pGEM-T-Easy | 39 |

| | | |
|---------|---|----|
| 3.5.3 | Subclonagem no vetor de superexpressão pTEX | 40 |
| 3.5.3.1 | Digestão do vetor pGEM-TEasy a purificação do inserto | 40 |
| 3.5.4 | Construção do cassete para nocaute do gene de <i>TcDRBD8</i> | 41 |
| 3.5.4.2 | Digestão do vetor pGEM-TEasy e purificação do inserto | 42 |
| 3.5.4.3 | Digestão do vetor pNEO com enzimas da região <i>upstream</i> e transformação em células quimio-competentes..... | 42 |
| 3. | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 44 |
| 4.1 | SELEÇÃO DO GENE..... | 44 |
| 4.2 | CLONAGEM NO SISTEMA GATEWAY®..... | 45 |
| 4.2.1 | Amplificação do gene para clonagem no sistema Gateway® | 45 |
| 4.3 | EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS | 49 |
| 4.3.1 | Testes de expressão | 49 |
| 4.3.3 | Expressão de proteínas em larga escala e purificação da proteína recombinante | 53 |
| 4.4.1 | Clonagem das regiões intergênicas no vetor pGEM-TEasy | 55 |
| 4. | CONCLUSÕES | 62 |
| 5. | REFERÊNCIAS..... | 64 |

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 A Doença de Chagas

Em 1909 Carlos Chagas comunicou a “tripla descoberta” (vetor, patógeno e infecção humana) de uma doença mórbida que acometia a região de Minas Gerais. A doença, denominada doença de Chagas, tem como agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909; revisado em KROPF, 2009).

No que diz respeito à morbidade e mortalidade, a doença é considerada um dos principais problemas de saúde pública da América Latina, sendo preocupante também para o Brasil (OLIVEIRA et al., 2008). Estimativas revelam que, no continente, existem entre 16 a 18 milhões de pessoas infectadas e cerca de 120 milhões de indivíduos expostos ao risco de contraí-la (PORTELA-LINDOSO et al., 2003). Chagas afirmou em vários trabalhos que a doença prejudicava o progresso do Brasil, por gerar decadência mental e física, principalmente nas áreas do interior do país, tendo também importância médica e veterinária apoiada por programas especiais da Organização Mundial da Saúde (OMS) (DE SOUZA, 2002).

Os vetores da doença são comumente conhecidos por “barbeiros”, hemípteros hematófagos pertencentes à família Reduviidae (REY, 2008). Insetos da família Reduviidae são percevejos com cabeça fina e alongada e pescoço bem marcado. A subfamília Triatominae é representada por 137 espécies já descritas (GALVÃO et al., 2003) e possui sete espécies consideradas os principais vetores da doença de Chagas: *Triatoma infestans*, *T. dimidiata*, *T. sordida*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius prolixus* (Revisado em ARGOLO et al., 2008).

A transmissão da doença pode ocorrer também por outras vias, como a congênita, a via oral (pela ingestão de alimentos contaminados), via transfusão sanguínea ou, até mesmo por acidente laboratorial. Graças ao maior controle do sangue utilizado nas transfusões sanguíneas, esta forma comum de transmissão se tornou menos expressiva nos últimos anos (TARLETON et al., 2007; WHO, 2012).

A doença de Chagas possui duas fases clínicas. A fase aguda, caso não seja tratada, pode evoluir para a fase crônica. Ambas as fases podem se apresentar tanto na forma sintomática quanto assintomática (REY, 2008).

Durante a fase aguda, a doença pode passar despercebida devido à semelhança com outras enfermidades. Os sintomas incluem febre, cefaléia, dores pelo corpo e anorexia. Ainda, durante esta fase, podem ser gerados nódulos inflamatórios subcutâneos conhecidos como chagomas de inoculação, que ocorrem devido à penetração dos parasitas na pele. Quando esta penetração ocorre na região ocular, um edema bupalpebral e unilaterial é capaz de originar o sinal de Romaña, amplamente conhecido na doença de Chagas (REY, 2008). Os sintomas da fase aguda desaparecem após 4 a 8 semanas, de maneira espontânea, mesmo se não tratada adequadamente. Em decorrência do fim da fase aguda, o nível de parasitemia diminui, porém, a doença evolui para a fase crônica (WHO, 2002).

Na fase crônica a doença pode se apresentar de três formas clínicas diferentes. A mais comum é a forma indeterminada, que é assintomática e apresenta diagnóstico incorreto (REY, 2008). Pode ocorrer, em 10% dos casos, a forma digestiva, na qual os pacientes apresentam alterações no aparelho digestivo, principalmente o megaeosôfago e o megacólon. Por fim, a forma cardíaca, também conhecida como cardiopatia chagásica crônica, é a principal responsável por óbitos durante a fase crônica, representando 30% dos casos (BRASIL, 2009).

Os principais métodos para o diagnóstico da doença de Chagas são os testes sorológicos e os parasitológicos (WHO, 2012). Já o tratamento específico para a doença é direcionado para a fase aguda, utilizando-se os medicamentos benzonidazol e nifurtimox (BRASIL, 2009). Estes medicamentos visam o alívio dos sintomas, combate à parasitemia e prevenção das complicações. O tratamento dura cerca de 60 a 90 dias, porém, o sucesso terapêutico depende da susceptibilidade da cepa de *T. cruzi* à droga utilizada (WHO, 2002).

1.2 *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado, pertencente à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae (HOARE, 1971), podendo apresentar cepas com diferentes variabilidades genéticas, inclusive em sua virulência e patogenicidade (BRENER, 1997; REY, 2008).

1.2.1 Ciclo de vida

O *Trypanosoma cruzi* apresenta quatro estágios distintos durante o ciclo de vida, alternando-se entre um hospedeiro invertebrado, o barbeiro, e um hospedeiro vertebrado mamífero (DE SOUZA, 2002).

Barbeiros como *Triatoma infestans*, *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata* habitam ambientes áridos e, devido à preferência por ambientes quentes e pouco iluminados, costumam se esconder em frestas, palhas do telhado ou entulhos, sendo comumente encontrados em casas de pau-a-pique (FORATTINI, 1980). À noite, os insetos costumam se alimentar por sucção, por meio de uma picada pouco dolorosa. A picada em si não é responsável pela transmissão da doença, visto que as formas diferenciadas do parasita é que são capazes de infectar o mamífero. Neste caso, após a alimentação, o barbeiro defeca e elimina os protozoários em suas fezes. Como ocorre uma coceira ou leve ardência no local da picada, a pessoa acaba introduzindo os parasitas em sua corrente sanguínea por descontinuidades na pele, gerando a infecção (Revisado em ARGOLO *et al.*, 2008). Além do processo de infecção ocorrer durante o repasto sanguíneo do inseto, pode ocorrer inoculação das formas tripomastigotas sanguíneas na mucosa ocular (DE SOUZA *et al.*, 2010). O ciclo de vida do *T. cruzi* pode ser observado na figura 1.

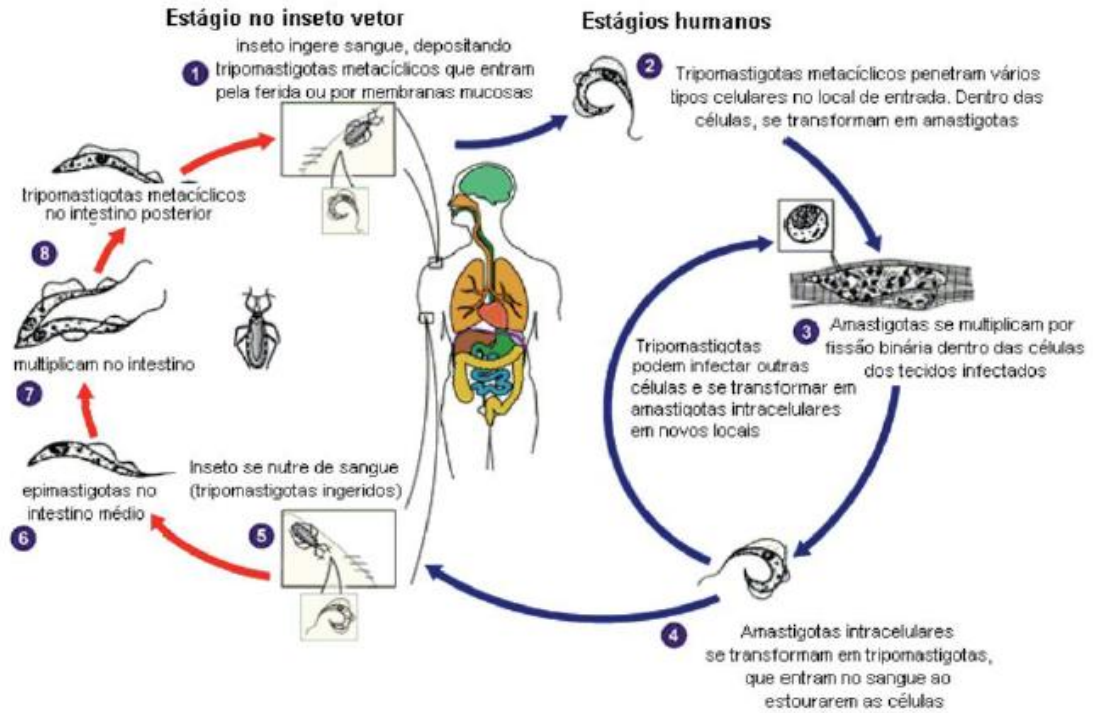


FIGURA 1 – CICLO DE VIDA DE *Trypanosoma cruzi* – O *Trypanosoma cruzi* apresenta diferentes formas durante o seu ciclo de vida, alternando entre um hospedeiro invertebrado e um vertebrado. ADAPTADO DE CDC (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>).

FONTE: ROMAGNOLI, 2013.

Uma vez nos tecidos do hospedeiro, o parasita é endocitado pelo sistema fagocítico. Após a penetração do parasita nas células do hospedeiro, há a formação do vacúolo endocítico, também conhecido como vacúolo parasitóforo. Em seguida, ocorrem mudanças morfológicas que permitem a transição para a forma amastigota e a liberação de fatores proteicos que geram a lise do vacúolo, liberando os parasitas para o citoplasma da célula, permitindo, assim, o contato com as organelas do hospedeiro (BRENER, 1997; FIELD *et al.*, 2009; DE CARVALHO *et al.*, 1989; MARTINS *et al.*, 2012).

As formas amastigotas sofrem divisão binária e, posteriormente, se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos, que lisam a célula infectada e se espalham pela corrente sanguínea, podendo penetrar em diferentes tipos celulares, como células musculares, nervosas e cardíacas (BRENER, 1997; FIELD *et al.*, 2009). Caso o hospedeiro seja picado por outro triatomíneo, pode

ocorrer a ingestão de tripomastigotas sanguíneos pelo inseto (MARTINS *et al.*, 2012).

No momento em que um triatomíneo suga o sangue de vertebrados infectados, ele ingere formas tripomastigotas sanguíneas presentes em sua corrente sanguínea. No estômago do inseto ocorre a lise da maioria das formas tripomastigotas (CASTRO *et al.*, 2007), sendo que as sobreviventes se transformam em formas epimastigotas que migram para o intestino. Ali, os epimastigotas sofrem intensa divisão celular e se aderem às membranas perimicrovilares, graças à participação de glicoconjugados de superfície, sendo este um importante processo na transição entre as formas epimastigotas e a tripomastigota metacíclica. A última corresponde à forma infectiva, que é liberada junto com as fezes e urina do animal, dando continuidade ao ciclo de vida (ALVES *et al.*, 2007; DE SOUZA *et al.*, 2010; GARCIA *et al.*, 2007, NOGUEIRA *et al.*, 2007).

Por fim, devido ao complexo ciclo de vida e à alternância entre hospedeiros vertebrados e invertebrados, o parasita é submetido a intensas mudanças morfológicas, bioquímicas e comportamentais, em resposta a diferentes fatores que encontra nos hospedeiros, como alterações na temperatura, no pH, diferentes mecanismos de defesa ou variação nos nutrientes. Sendo assim, todas estas adaptações requerem grande controle na programação da expressão gênica do parasita (VICKERMAN, 1985).

1.3 Regulação da expressão gênica

A expressão dos genes do *T cruzi* é regulada por uma série de eventos complexos que atuam a nível transcricional e pós-transcricional (SANCHEZ-DIAS & PENALVA, 2006). Para controlar a expressão gênica, os tripanossomatídeos não utilizam a iniciação da transcrição como fator regulatório para os genes individualmente. A transcrição dos genes ocorre de maneira policistrônica, seguida de processamento que inclui *trans-splicing* e

poliadenilação, a fim de gerar os mRNAs maduros monocistrônicos. (MARTINEZ-CALVILLO *et al.*, 2008).

Como os tripanosomatídeos não apresentam habilidade de regular os genes de maneira individual por promotores e outros fatores transcricionais, como em outros eucariotos, assume-se que a regulação de sua expressão gênica se dá a partir do nível pós-transcricional (OUELLETTE e PAPADOPOULOU, 2009). Esta regulação se dá por mudanças na estabilidade dos mRNAs, localização subcelular e também no acesso aos polissomos, permitindo uma rápida adaptação dos parasitas a condições às quais são expostos, estando também associada a um intenso controle na degradação do mRNA e outros RNAs (CLAYTON & SHAPIRA, 2007), OUELLETTE e PAPADOPOULOU, 2009).

A análise proteômica dos diferentes estágios durante o ciclo de vida do *T. cruzi* é uma importante evidência da expressão proteica estágio-específica do parasita. Proteínas expressas somente em uma fase do ciclo de vida ou em fases específicas podem servir como alvos para possíveis tratamentos ou vacinas, uma vez que podem ter envolvimento em aspectos fundamentais da diferenciação do parasita (CUERVO *et al.*, 2010; LEIFSO *et al.*, 2007).

1.4 Proteínas de ligação ao RNA

Os mecanismos pós-transcricionais de regulação da expressão gênica são mediados por proteínas de ligação ao RNA, as RBPs, e por elementos regulatórios das regiões não traduzidas (UTRs) dos mRNAs. Ambos se associam em complexos ribonucleoproteína (RNPs), definindo as redes de regulação, que são denominadas regulons de RNA. Os regulons tratam da regulação conjunta de mRNAs codificantes de proteínas funcionalmente relacionadas (KEENE, 2007), sendo orquestrado por elementos em *trans*–proteínas e RNAs regulatórios – que reconhecem os elementos em *cis*–sequências ou estruturas – presentes nos mensageiros.

As RBPs estão envolvidas na regulação pós-transcricional da expressão gênica e em processos essenciais para a célula eucariótica, estando presentes em todos os momentos da existência de um transcrito (DE GAUDENZI *et al.*, 2003; NOÉ *et al.*, 2008). A influência das RBPs sobre os mensageiros é observada nas seguintes etapas: processamento, transporte, taxa de tradução, localização e estabilidade (SANCHEZ-DIAS e PENALVA, 2006) (Fig. 2).

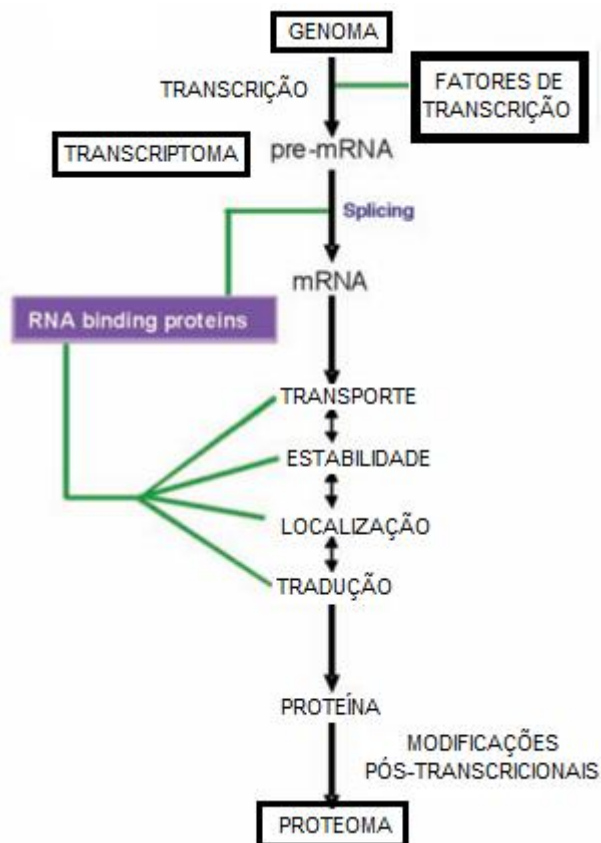


FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS NÍVEIS DE REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA – As RBSs atuam no nível pós-transcricional, diretamente no processamento, transporte, estabilidade, localização e tradução do mRNA.

FONTE: ADAPTADO DE SANCHEZ-DIAS& PENALVA, 2006.

O domínio de ligação ao RNA mais comum entre as RBPs é o *RNA Recognition Motif* (RRM), representado na figura 3. Este domínio possui cerca de 70 a 90 aminoácidos e dois motivos conservados contendo 8 e 5 aminoácidos, RNP-1 e RNP-2, respectivamente, que fazem a interação direta

com as moléculas de RNA (BURD e DREYFUSS, 1994). Desta maneira, o domínio pode se ligar a RNAs com maior ou menor afinidade, especificidade e estabilidade, sendo bem conservado entre os eucariotos (CLÉRY *et al.*, 2008).

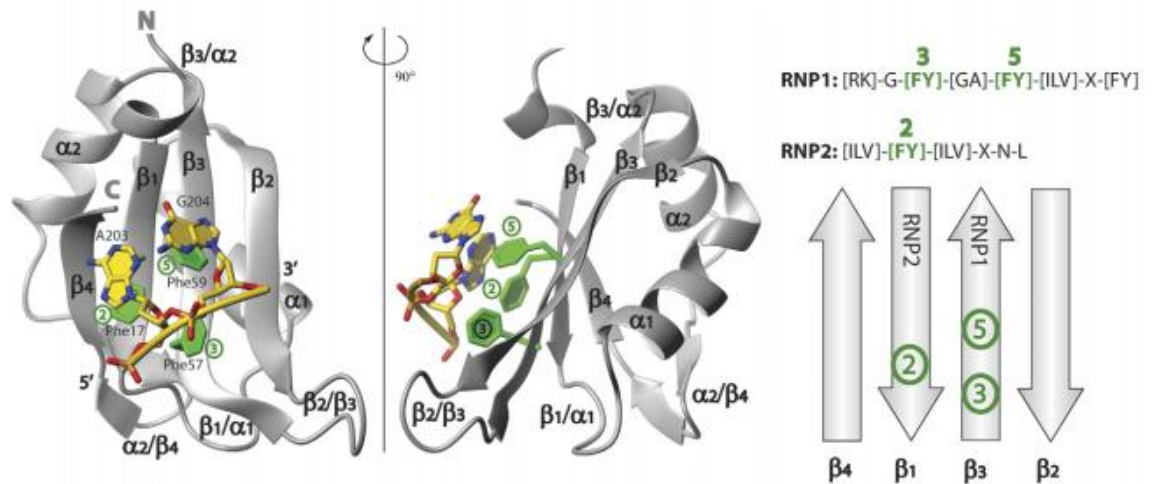


FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO DO DOMÍNIO RRM – A figura representa a constituição do domínio RRM, que é formado por duas α -hélices e quatro folhas β -pregueadas, além de seus motivos conservados RNP1 e RNP2 de interação com o RNA.

FONTE: ADAPTADO DE CLÉRY *et al.*, 2008.

A partir de análises bioinformáticas visando a busca de um domínio conservado baseado em ocorrência em outros organismos, nosso grupo identificou previamente 81 proteínas contendo o domínio RRM em *T. cruzi* (GUERRA-SLOMPO, 2012). Dentre as proteínas descritas, a TcDRBD8 foi selecionada para caracterização funcional. Esta proteína em particular possui dois domínios RRM de interação com RNA (Figura 4), além de ser exclusiva de *T. cruzi*, estando anotada como uma proteína hipotética.

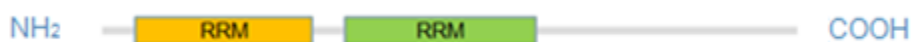


FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA TcDRBD8 – A TcDRBD8 é uma proteína que possui 34 kDa e dois domínios RRM mais próximos de sua porção amino-terminal (NH_2). A figura também apresenta a extremidade carboxi-terminal (COOH) da proteína.

Adicionalmente, dados acerca do seu perfil de expressão gênica, recentemente publicados por nosso grupo, indicam particular interesse no seu perfil de expressão gênica (SMIRCICH *et al.*, 2015).

A técnica de *Ribosome profiling* consiste no sequenciamento dos fragmentos de mRNAs protegidos pelo ribossomo no momento da tradução, sendo possível assim detectar os mensageiros sendo ativamente traduzidos na célula (IINGOLIA & WEISMANN, 2009). Em *T. cruzi*, a TcDRBD8 foi identificada como uma proteína diferencialmente expressa nas formas epimastigota e tripomastigota metacíclica (Figura 5), esta última considerada de especial interesse por se tratar da forma infectiva (SMIRCICH *et al.*, 2015). Houve maior associação ao ribossomo do seu mRNA codificante na forma tripomastigota metacíclica do que na epimastigota, podendo ser um indício de maior expressão da proteína nesta fase do ciclo de vida do parasita.

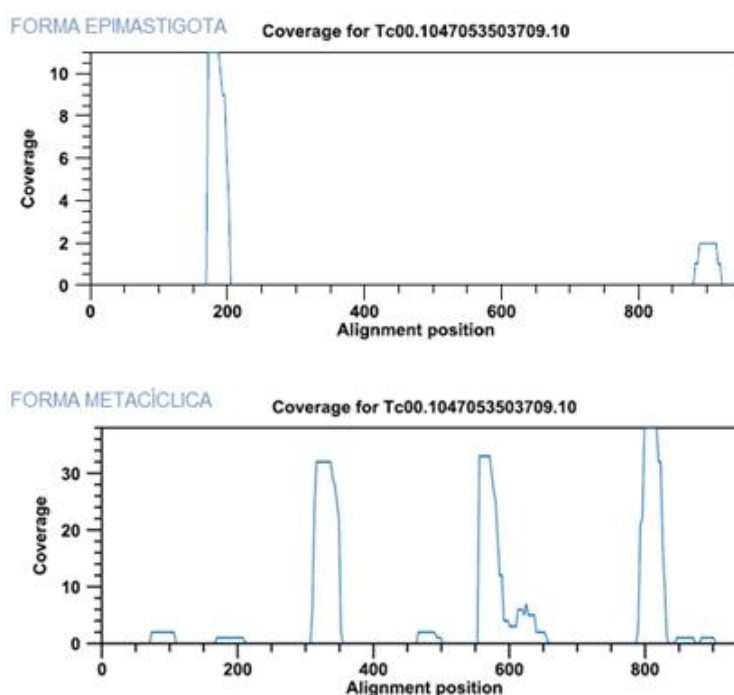


FIGURA 5 – ANÁLISE DE RIBOSOME PROFILING DE TcDRBD8 - Os picos retratam os números de fragmentos sequenciados do mRNA codificante da TcDRBD8 nas amostras de *Ribosome profiling*, indicando maior associação deste RNA aos ribossomos na forma metacíclica de *T. cruzi*. O valor de cobertura (eixo y) indica o número de fragmentos em cada posição do transcrito (eixo x).

O fato de a proteína TcDRBD8 ser mais expressa na forma infectiva sugere que a proteína possua um papel importante na regulação da expressão gênica durante o processo de infecção do parasita.

Assim, devido ao fato da TcDRBD8 ser uma RBP exclusiva de *T. cruzi*, possuir dois domínios RRM e ser diferencialmente expressa durante o ciclo de vida de *T. cruzi*, seu estudo é muito relevante. A caracterização de proteínas que possam estar envolvidas na regulação da expressão gênica de *T. cruzi* pode elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na sua diferenciação e contribuir para o entendimento do processo infeccioso do parasita.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Construir ferramentas de genética reversa que permitam a caracterização funcional da proteína TcDRBD8, exclusiva de *Trypanosoma cruzi*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Clonar o gene de *TcDRBD8* em vetores para superexpressão da proteína, permitindo avaliar seu papel funcional.

Clonar as regiões intergênicas do gene *TcDRBD8* em vetores para posterior ensaio de nocaute gênico, a fim de avaliar os efeitos da ausência da proteína na célula.

Clonar o gene *TcDRBD8* em vetores para fusão da proteína a etiquetas de captura por afinidade.

Clonar o gene de *TcDRBD8* em vetores para expressão da proteína heteróloga em sistema bacteriano, que permitam a purificação por afinidade, a realização de ensaios funcionais *in vitro* e produção de anticorpos policlonais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Soluções utilizadas

TABELA 1 – SOLUÇÕES UTILIZADAS – A tabela representa as soluções utilizadas nos experimentos, bem como seus componentes e respectivas concentrações.

| Solução | Reagentes | Concentração |
|------------------------------------|----------------------------------|---------------------|
| Azul de Comassie R-250 | Azul de Comassie R-250 | 0,1% |
| | Metanol | 45% |
| | Ácido Acético | 10% |
| Gel de empilhamento para proteínas | Acrilamida | 0,9% |
| | Tris-HCl pH 6,8 | 120 mM |
| | SDS | 0,1% |
| | Persulfato de Amônio | 0,075% |
| | TEMED | 0,07% |
| Gel de eletroforese de proteínas | Acrilamida | 0,9% |
| | Tris-HCl Ph 8,8 | 400 Mm |
| | SDS | 0,1% |
| | Persulfato de Amônio | 0,075% |
| | TEMED | 0,07% |
| Meio de Cultura LIT | Infuso de fígado (Difco) | 0,5% |
| | Bacto-triptose (Difco) | 0,5% |
| | Soro fetal Bovino (Cult Lab) | 10% |
| | Hemina | 0,0025% |
| | Glicose | 10 mM |
| | NaCl | 75,3 mM |
| | KCl | 5,4 mM |
| | Na ₂ HPO ₄ | 56,4 mM |
| Ponceau S | Ponceau S Sigma P-3504 | 0,5% |
| | Ácido Acético | 1% |
| | Leite em pó desnatado | 5% |

| | | |
|---------------------------------------|----------------------------------|---------|
| Solução de bloqueio 5% | PBS-Tween | 0,05% |
| Solução de bloqueio PBS-Tween 20 0,1% | NaH ₂ PO ₄ | 4,3 mM |
| | NaCl | 137 mM |
| | KCl | 2,7 mM |
| | KH ₂ PO ₄ | 1,5 mM |
| Solução de purificação | Triton | 2% |
| | NaH ₂ PO ₄ | 100 mM |
| | Tris-HCl | 10 mM |
| | Uréia | 2 M |
| | NaCl | 0,5 M |
| Tampão de Amostra (TA) | NaH ₂ PO ₄ | 28 mM |
| | NaHPO ₄ | 71 mM |
| | SDS | 1% |
| | β-mercaptoetanol | 1% |
| | Uréia | 6 M |
| | Azul de Bromofenol | 0,015% |
| Tampão de Amostra 4x | Tris-HCl pH 6,8 | 40 mM |
| | SDS | 1% |
| | β-mercaptoetanol | 2,5% |
| | Glicerol | 6% |
| | Azul de Bromofenol | 0,005% |
| Tampão de eletroforese | Azul de Bromofenol | 0,21% |
| | Xileno Cianol FF | 0,21% |
| | EDTA pH 8,0 | 0,2 M |
| | Glicerina | 50% |
| Tampão de eletroporação | NaCl | 140 mM |
| | Hepes Ácido | 25 mM |
| | Na ₂ HPO ₄ | 0,74 mM |
| Tampão de eluição (Coluna de Níquel) | Uréia | 8 M |
| | NaCl | 300 mM |
| | NaH ₂ PO ₄ | 50 mM |
| | Imidazol | 300 mM |
| | NaH ₂ PO ₄ | 100 mM |

| | | |
|--|----------------------------------|--------|
| Tampão de lavagem | NaCl | 300 mM |
| | Imidazol | 20 mM |
| | Uréia | 8 M |
| | Tris-HCl pH 8,0 | 20 mM |
| Tampão de ligação (Coluna de Níquel) | Uréia | 8 M |
| | NaCl | 300 mM |
| | NaH ₂ PO ₄ | 50 mM |
| | Imidazol | 10 mM |
| Tampão de revelação com fosfatase alcalina (<i>AP</i> <i>Buffer</i>) | Tris-HCl pH 9,5 | 100 mM |
| | NaCl | 100 mM |
| | MgCl ₂ | 5 mM |
| Tampão de ressuspensão de proteínas | NaH ₂ PO ₄ | 100 mM |
| | Tris-HCl pH 8,0 | 10 mM |
| | Uréia | 8 M |
| Tampão SDS-PAGE | Tris-base | 25 mM |
| | Glicina | 192 mM |
| | SDS | 0,1% |
| Tampão de sonicação | NaCl | 500 mM |
| | Triton | 2% |
| | Tris-HCl pH 8,0 | 20 mM |
| Tampão TBE (Solução estoque 10x) | Tris-base | 89 mM |
| | Ácido bórico | 89 mM |
| | EDTA pH 8,0 | 2 mM |
| Tampão de transferência de proteínas (<i>Western blotting</i>) | Tris-base | 25 mM |
| | Glicina | 192 mM |
| | Metanol | 20% |
| TE | Tris-HCl pH 7,5 | 10 mM |
| | EDTA | 1 mM |

3.2 Desenho dos oligonucleotídeos para amplificação do gene e regiões de interesse

Para a amplificação das sequências de interesse através de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) é necessário um par de oligonucleotídeos

iniciadores para cada sequência, o universal e o reverso. Os iniciadores foram desenhados através da ferramenta *Primer Select* do programa *Lasergene* (DNASTAR, Inc.).

Os iniciadores utilizados na clonagem pelo sistema Gateway® foram desenhados contendo os sítios *attB1* e 2, os quais são necessários para a recombinação do fragmento ao vetor pDONR™221.

Outros oligonucleotídeos foram desenhados sem códon de parada, permitindo uma posterior fusão de sequências codificadores para etiquetas na porção carboxi-terminal.

Visando a construção do cassete para nocaute do gene, foram construídos dois pares de oligonucleotídeos, para amplificação das regiões a montante e a jusante do gene.

A tabela 2 mostra os sítios necessários para a construção dos oligonucleotídeos iniciadores, bem como características essenciais para sua correta amplificação.

TABELA 2 – SÍTIOS NECESSÁRIOS PARA A CONSTRUÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS

– A tabela indica as regiões utilizadas para a construção de oligonucleotídeos, bem como a sequência do iniciador, enzimas de restrição para a região, finalidade da amplificação, tamanho do fragmento esperado e temperatura de anelamento.

| REGIÃO | INICIADOR 5'-3' | SÍTIOS DE RESTRIÇÃO | FINALIDADE DA AMPLIFICAÇÃO | TAMANHO DO FRAGMENTO ESPERADO | TEMPERATURA DE ANELAMENTO |
|---|--|-------------------------------|--|-------------------------------|---------------------------|
| Gene Inteiro Universal | TCGGGGATCCATGGA GTCTTCAAGGGAAAACAG T | <i>Bam</i> HI | Para transfecção e superexpressão no parasita | 942 pb* | 54,2 |
| Gene Inteiro Reverso | ATGCCTCGAGTTACA GGAGCATTGAATACCCAT G | <i>Xho</i> I | Para transfecção e superexpressão no parasita | 942 pb* | 54,8 |
| Gene Gateway® com códon de parada | GGGACCACCTTTGTA CAAGAAAGCTGGGTCTTA CAGGAGCATTGAATACCC ATG | <i>att</i> B2 | Para expressão da proteína heteróloga em <i>E. coli</i> e para transfecção e expressão fusionada no parasita | 942 pb* | 54,8 |
| Gene Gateway® sem códon de parada Universal | GGGACAAGTTTGTA CAAAAAGCAGGCTTCAT GGAGTCTTCAAGGGAAAA CAGT | <i>att</i> B1 | Para expressão da proteína heteróloga em <i>E. coli</i> e para transfecção e expressão fusionada no parasita | - | 54,2 |
| Gene Gateway® sem códon de parada Reverso | GGGACCACCTTTGTA CAAGAAAGCTGGGTCCA GGAGCATTGAATACCCAT GATT | <i>att</i> B2 | Para expressão da proteína heteróloga em <i>E. coli</i> e para transfecção e expressão fusionada no parasita | 939 pb* | 56 |
| Upstream Universal | TCAAGGTACCCTATG CCGGCCAAGATTCCACTA | <i>Kpn</i> I | Construção do cassete para nocaute do gene | 234 pb* | 59 |
| Upstream Reverso | ATGCGTCGACTTTAC CGTCTCCCAAGCGATAACC | <i>Sal</i> I | Construção do cassete para nocaute do gene | 234 pb* | 58,2 |
| Downstream Universal | TCGGGGATCCAGATC TTATCATCTCGCTTTATTT TGTTTTCGTC | <i>Bam</i> HI/ <i>Bgl</i> II | Construção do cassete para nocaute do gene | 424 pb* | 57,4 |
| Downstream Reverso | ATGCAAGCTTTCTAG ATGGGCATATCATTCTC ATCTTCATT | <i>Hind</i> III/ <i>Xba</i> I | Construção do cassete para nocaute do gene | 424 pb* | 56,9 |

LEGENDA: *pb (pares de bases).

3.3 Amplificação dos genes e regiões de interesse e clonagem no sistema Gateway®

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

Para amplificação do gene *TcDRBD8* foi utilizada a técnica de PCR. As amplificações foram feitas utilizando-se 150 ng de DNA genômico da cepa Dm28c de *T. cruzi* como molde. A enzima *Taq* DNA Polimerase (IBMP, protocolo NAT-HIV), foi adicionada à uma solução contendo 2,5 mM de dNTP, 3mM de MgCl₂ e o tampão específico para a enzima. As condições de amplificação foram 1 ciclo de 94 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento por 30 segundos (conforme temperaturas da tabela 2), e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos. Ao final, foi acrescentada uma etapa a 72°C por 5 minutos para garantir a completa extensão da sequência de interesse.

3.3.2 Eletroforese de DNA

Alíquotas de 5 µl dos produtos de PCR foram misturados ao tampão de corrida e submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%, na presença de tampão TBE, a fim de confirmar o tamanho dos mesmos. O marcador de peso molecular utilizado como referência foi o 1 Kb *Plus* (Invitrogen).

O gel foi submetido a uma corrente de 100 V, e posteriormente corado em uma solução de brometo de etídio (0,5 µg/ml) por aproximadamente 30 minutos. Após o tratamento com este agente intercalante o DNA pode ser observado sob luz UV e fotografado através do sistema de captação de imagens *UV White Darkroom* (*UVP Bioimaging Systems*).

Os fragmentos foram posteriormente purificados a partir do protocolo MinElute® PCR Purification Kit (Qiagen) e as amostras foram armazenadas a -20°C.

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

A reação de recombinação entre os fragmentos purificados e o vetor de entrada da plataforma Gateway® pDONR™221 é mediada pelo complexo BPClonase™, de acordo com o manual do fabricante (Invitrogen - Catalog nos. 12535-019 e 12535-027). Para a recombinação foram utilizados 150 ng do gene de interesse, 150 ng do vetor pDONR™221, enzima e tampão TE. A reação foi incubada a 25 °C por 18 horas e interrompida com 1 µL de proteinase K por 10 minutos a 37 °C.

A recombinação ocorre entre *amplicons* flanqueados por sítios *attB* e as regiões *attP* do vetor de entrada pDONR™221 (Figura 6). Para a seleção das colônias bacterianas, o vetor pDONR™221 oferece resistência ao antibiótico canamicina.



FIGURA 6 – RECOMBINAÇÃO SÍTIO-ESPECÍFICA - A enzima BP clonase utiliza o substrato *attB* do fragmento e o *attP* do vetor pDONR™221 para realizar a recombinação sítio-específica, gerando como produtos o vetor de entrada (*attL*) contendo o inserto (gene) de interesse e um produto secundário linear.

FONTE: MANUAL DO FABRICANTE.

3.3.4. Transformação em bactérias quimio-competentes

Os plasmídeos recombinados foram incubados com bactérias *Escherichia coli* DH5α quimio-competentes por 30 minutos no gelo, na proporção 1:50 (0,1 µg de plasmídeo para 50 µL de *E.coli*). Em seguida, as

bactérias foram submetidas a um choque térmico para permitir a entrada dos plasmídeos. Após serem incubadas a 42 °C por 2 minutos foram colocadas no gelo por 3 minutos. Após este período, foi adicionado 1 mL de meio de cultura Luria-Bertani (LB) sem antibiótico, e as células incubadas sob agitação constante a 37 °C por 1 hora, 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, o pellet foi espalhado em placas contendo meio sólido LB + ágar e antibióticos específicos de acordo com a resistência que cada vetor confere às bactérias transformadas (pDONR™221 – canamicina 100 µg/ml , pDEST™17 – ampicilina 100 µg/ml e cloranfenicol 34 µg/ml). As placas foram incubadas por 18 horas a 37 °C para o crescimento das colônias.

3.3.5 PCR de colônia

Após as 18 horas de incubação, as colônias isoladas foram replaqueadas em uma placa com meio LB + antibióticos. Cada colônia que cresceu foi plaqueada em uma região específica na nova placa, de modo a identificar posteriormente as colônias. As placas foram incubadas, novamente, por 18 horas a 37°C

A PCR de colônia foi realizada para verificar o sucesso da transformação. Para isso, após o preparo do mix contendo dNTP, iniciadores específicos, tampão e Taq Polimerase, as colônias foram coletadas da placa de transformação com um palito estéril e transferidas para um tubo de reação. Em seguida, adicionou-se os reagentes e as amostras foram submetidas aos ciclos de amplificação citados no item 3.3.1. Em seguida, amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%.

3.3.6. Minipreparação de plasmídeos

As colônias positivas, confirmadas por PCR de colônia, foram utilizadas para a minipreparação afim de isolar da célula bacteriana os plasmídeos com os insertos corretos e purificá-los. Para tal, as colônias foram inoculadas em meio LB líquido e com o antibiótico canamicina 100 µg/ml. As culturas foram incubadas a 37 °C durante 18 horas sob agitação constante de 200 rpm. Após a incubação, as culturas foram centrifugadas a 5.000 x *g* por 5 minutos e, em seguida, utilizou-se o protocolo Qiaprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN) segundo as recomendações do fabricante. Após os procedimentos e lavagens, os plasmídeos foram eluídos em 50 mL de água ultra-pura.

3.3.7. Sequenciamento de DNA

Os vetores clonados foram sequenciados pela empresa Macrogen, visando verificar se os insertos estavam posicionados corretamente nos vetores, bem como a presença de mutações que podem prejudicar a posterior expressão da proteína.

3.3.8. Recombinação nos vetores de destino

A reação de recombinação (Figura 7) entre o vetor de entrada contendo o gene de interesse e os vetores de destino, mediada pela enzima LR clonase™, foi realizada utilizando-se 100ng do vetor *pDONR™221-TcDRBD8* e os vetores *pDEST™17*, *pTcFLAG* e *pTcGFP*, de maneira isolada, segundo o manual do fabricante (Invitrogen - Catalog nos. 12535-019 e 12535-027). As reações foram incubadas a 25°C por 18 horas e interrompidas com 1 µL de proteinase K por 10 minutos a 37 °C.



FIGURA 7–ESQUEMA DA REAÇÃO MEDIADA PELA ENZIMA LRClonase™ - A enzima utiliza os sítios *attL* do vetor de entrada e *attR* do vetor de destino (pDEST™17, pTcFLAG ou pTcGFP) que dará origem ao clone de expressão e a um produto secundário circular.

FONTE: MANUAL DO FABRICANTE.

3.3.8.1 Vetor de destino pDEST™17

O pDEST™17 é muito utilizado como vetor para expressão de proteínas recombinantes em *E.coli*. Suas regiões *attR* permitem a reação de recombinação com o vetor de entrada pDONR™ 221. Dentre suas principais características, que podem ser observadas na figura 8, podemos citar: promotor para a polimerase T7, sítio de ligação ao ribossomo (RBS) e códon de iniciação ATG, permitindo a expressão do gene inserido no vetor. Também possui gene de resistência para a ampicilina, permitindo a seleção de colônias positivas através do uso de meio seletivo. A escolha do vetor deu-se pelo fato de conter uma região codificante para uma etiqueta de 6 histidinas, sendo útil na posterior purificação da proteína recombinante por meio de cromatografia de afinidade.

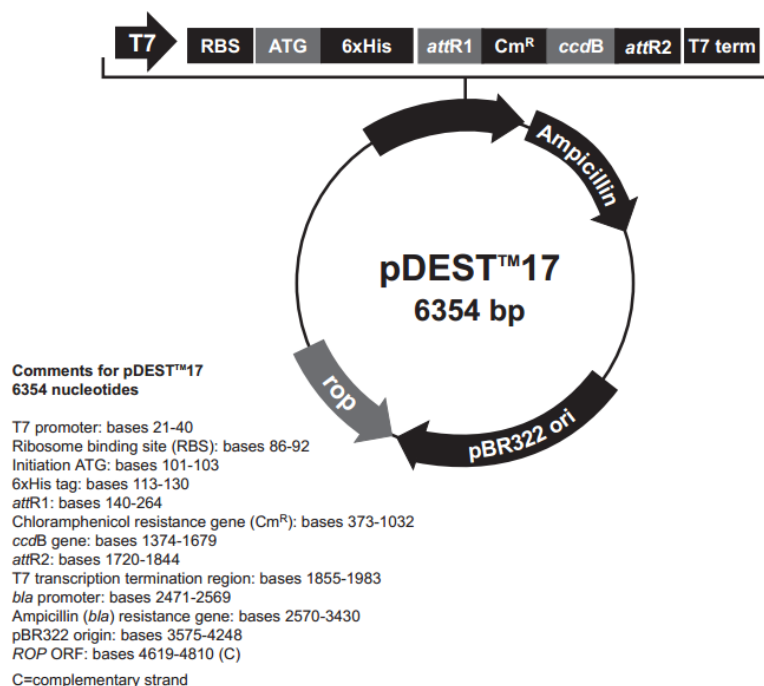


FIGURA 8 - MAPA ILUSTRATIVO DO VETOR DE EXPRESSÃO pDEST™17. T7: promotor para RNA polimerase T7; RBS: sítio de ligação a ribossomo; ATG: códon de início; 6xhis: região codificadora para um tag de seis histidinas; attR1 e attR2: seqüências que permitem a recombinação com o vetor pDONR™221; cmr: gene de resistência ao cloranfenicol para contra-seleção do plasmídeo; ccdB: gene letal que evita o crescimento de colônias com plasmídeo pDEST sem o gene de interesse; T7 term: seqüência que permite o término da transcrição; ampicillin: gene de resistência ao antibiótico ampicilina; pBR322 ori: origem da replicação para duplicação do DNA e manutenção do plasmídeo.

FONTE: MANUAL DO FABRICANTE.

3.3.8.2 Vetor de destino pTcFLAG

O vetor pTcFLAG (BATISTA *et al.*,2010) é um vetor episossomal que será utilizado para transfecção em *T. cruzi*. É baseado nos sítios de recombinação da plataforma Gateway™ e será utilizado, posteriormente, para localização celular indireta da proteína, através do anticorpo comercial anti-FLAG para localizar a etiqueta fusionada à proteína no parasita.

Após a recombinação dos *amplicons* no vetor de entrada pDONR™221 e minipreparação dos plasmídeos, foi feita a reação de recombinação entre 100 ng do vetor pDONR™221 e o vetor pTcFLAG, como citado no item 3.3.8.

Foi feita a minipreparação dos plasmídeos através do protocolo Qiaprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN) e confirmação por eletroforese em gel de agarose 1%. Após a confirmação, a transfecção em *T. cruzi* foi realizada.

3.3.9 Vetor de destino pTcGFP

O vetor pTcGFP (BATISTA *et al.*, 2010) é baseado nos sítios de recombinação da plataforma Gateway™. O vetor possui um gene que codifica para a proteína verde fluorescente GFP (*Green Fluorescent Protein*), além de possuir resistência à neomicina. Este vetor será utilizado para definir, posteriormente, a localização celular da proteína, pois estará fusionado à porção C-terminal desta.

A recombinação entre 100 ng de pDONR™221 (Gateway® Technology, Invitrogen) e 100 ng do vetor pTcGFP C-Terminal foi realizada conforme citado em 3.3.8. Em seguida, fez-se a minipreparação dos plasmídeos através do protocolo Qiaprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN) e observação por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Após a confirmação, a transfecção em *T. cruzi* foi realizada.

3.4. EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS

3.4.1. Transformação de bactérias quimio-competentes com o vetor de expressão

O vetor de expressão pDEST™17 (Gateway® Technology, Invitrogen), contendo o inserto, foi transformado em *E. coli* BL21(DE3)pLysS e BL21(DE3)StarCa²⁺-competente por choque térmico. As células foram cultivadas em meio LB contendo antibióticos para seleção. No caso da BL21(DE3)pLysS foram utilizados Ampicilina e Cloranfenicol, enquanto BL21(DE3)Star não possui seleção específica, sendo os transformantes selecionados apenas pelo cassete de resistência presente no vetor, para ampicilina.

3.4.2 Testes de expressão

Ambos os pré-inóculos, tanto das colônias originadas da transformação em BL21(DE3)pLysS quanto em BL21(DE3)Star, contendo meio de cultura LB e antibióticos (ampicilina 100 µg/ml e cloranfenicol 34 µg/ml), foram crescidos em uma estufa a 37°C por 18 horas, sob agitação constante de 200 rpm. Após este período, uma alíquota de cada foi diluída, separadamente, em 10 mL de meio LB com antibióticos, na proporção de 1:10, e incubada sob as mesmas condições até que as bactérias atingissem crescimento exponencial com densidade óptica a 600 nm variando entre 0,4 e 0,6. Foi adicionado à cultura IPTG em concentrações variadas entre 0,1 e 0,2mM, visando a indução da expressão da proteína. A incubação prosseguiu por mais 2, 3 ou 16 horas nas mesmas condições. Paralelamente, foi realizado um cultivo sem adição de IPTG, servindo como controle não induzido. Foram realizados vários experimentos, em diferentes condições, as quais podem ser observadas na tabela 3. Os testes serviram para determinar as melhores condições para expressão da proteína.

TABELA 3 – CONDIÇÕES DOS TESTES DE EXPRESSÃO REALIZADOS – A TABELA APRESENTA AS CEPAS DE *E. coli* UTILIZADAS NOS TESTES DE INDUÇÃO, BEM COMO O TEMPO, TEMPERATURA E DO₆₀₀ INICIAL DOS TESTES.

| CEPA DE <i>E. coli</i> | TEMPO E | |
|------------------------|---------------------------------|---------------------------|
| | TEMPERATURA DE INDUÇÃO COM IPTG | DO ₆₀₀ INICIAL |
| BL21(DE3)Star | 2h – 37°C | 0,6 |
| | 3h – 37°C | 0,6 |
| | 16h – 25°C | 0,4 |
| BL21(DE3)pLysS | 2h – 37°C | 0,6 |
| | 3h – 37°C | 0,6 |
| | 16h – 25°C | 0,4 |

Após a indução com IPTG, as bactérias foram sedimentadas por centrifugação a 5.000 x g por 5 minutos, e o sedimento bacteriano ressuspenso em PBS. Foi adicionado tampão de amostra 1 x à solução. Os extratos proteicos foram homogeneizados sob agitação vigorosa e desnaturados por aquecimento a 94°C por 5 minutos, seguidos de centrifugação a 16.000 x g por 1 minuto e analisados em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE).

A eficácia da indução é verificada pela presença de uma banda do tamanho esperado da proteína no gel SDS-PAGE. Para a observação de tamanho, é realizada uma comparação com o marcador de peso molecular aplicado em outro poço no gel. Caso ocorra a indução proteica, é possível observar uma banda significativamente maior no extrato induzido, quando comparado ao extrato não induzido com IPTG. Se ainda houver dúvidas quanto ao fato da banda observada realmente se tratar da proteína de interesse, pode-se realizar um ensaio de *Western blotting* e marcar a membrana com um anticorpo anti-histidina, evidenciando a proteína de interesse, que está fusionada a uma cauda de histidinas a ser reconhecida pelo anticorpo utilizado.

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

O gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) consiste de uma técnica que proporciona a separação das proteínas alvo de acordo com seu peso molecular. Para isto, foi utilizado um gel na concentração de 13%, que se enquadra no tamanho de aproximadamente 40 kDa da *TcDRBD8*, que corresponde aos 34 kDa da proteína e à cauda de histidinas fusionada à ela. Às amostras foi adicionado o tampão de amostra (TA), seguidas pela agitação vigorosa e incubadas a 94 °C por 5 minutos e centrifugadas a 13.000 x g, por 5 minutos. Para a eletroforese (SDS-PAGE) (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989), foi utilizado o tampão SDS-PAGE pH 8,8 sob amperagem de 30 mA por gel. O controle de peso molecular utilizado foi o *BenchMark™ Protein Ladder* (Invitrogen) e o gel foi corado de maneira irreversível com azul de Comassie R-250 por 15 minutos. Afim de visualizar a proteína recombinante, o excesso de corante foi removido com água, permitindo que apenas regiões onde existiam proteínas permanecessem coradas.

3.4.4 Ensaio de *Western Blotting*

Para realização da técnica de *Western blotting*, os extratos foram submetidos à eletroforese em géis de poliacrilamida 13% (SDS-PAGE) e transferidos para uma membrana de nitrocelulose (Hybond™C-Extra, Amersham Biosciences) por passagem de corrente de 20 V por 1 hora em cuba de transferência semi-seca, em tampão de transferência de proteínas. A membrana foi corada de maneira reversível com a solução Ponceau S para visualização das proteínas e marcação dos poços. Esta foi incubada com solução de bloqueio PBS, Tween-20 0,1%, leite em pó desnatado 5% por 1 hora sob agitação. Após, soros específicos para as proteínas foram incubados em solução de bloqueio por pelo menos 1 hora sob agitação constante (anticorpo anti-histidina (Invitrogen) na titulação 1:3.000).

As membranas foram então lavadas em PBS com Tween-20 0,1% por três vezes de 5 minutos cada, sob agitação. O anticorpo secundário (anti-mouse)

conjugado à enzima fosfatase alcalina foi incubado em solução de bloqueio na titulação 1:10.000, por 1 hora. Após nova lavagem, as membranas foram reveladas com NBT (Nitro-Blue Tetrazolium Chloride) a 0,33 mg/mL e BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt) a 0,165 mg/mL na presença de tampão para a reação enzimática (Tris-HCl pH 9,5 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM). A membrana foi revelada no escuro por um intervalo com variação entre 2 a 10 minutos. Após este período, as membranas foram secas à temperatura ambiente.

3.4.5 Expressão de proteínas em larga escala

A expressão de proteínas para purificação e inoculação em camundongos deve ser feita em grandes volumes, visto que se faz necessária uma quantidade considerável de proteína para estes procedimentos.

O protocolo de indução foi realizado conforme o teste em que se obteve expressão da proteína, mesmo que em baixas quantidades. O teste foi realizado conforme citado no item 3.4.2, porém, nas seguintes condições: D.O₆₀₀0,4, IPTG na concentração 0,2 mM e tempo de indução de 16 horas a 25°C.

Após a expressão, as culturas foram centrifugadas e o sedimento ressuspendido em tampão de lavagem, sendo o extrato tratado com 50 µg de DNase I e 50 µg de RNase, visando reduzir a viscosidade gerada pela abundância de ácidos nucléicos no lisado de células. Após isto, a sonicação (Ultrasonic Homogenizer 4710) foi realizada em quatro pulsos, cada um com duração de 15 segundos em potência máxima. Foram coletados 40 µL da fração total de proteínas e o restante do extrato centrifugado, de maneira que a fração solúvel de proteínas corresponde ao sobrenadante, que foi separado do precipitado. O precipitado insolúvel foi suspenso em tampão de solubilização, sonificado nas mesmas condições e centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos.

Antes da submissão à eletroforese, foi adicionado tampão de amostra (TA) às amostras, e estas foram submetidas a agitação vigorosa e incubadas a 94 °C por 5 minutos, em seguida foram centrifugadas a 10.000 x g, por 10

minutos. A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida 13% (SDS-PAGE) conforme descrito em 3.4.3.

3.4.6 Purificação da proteína obtida por cromatografia de afinidade

As proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade com coluna de Níquel-ácido nitrilotriacético. A solução contendo a fração insolúvel da proteína recombinante a ser purificada, equivalente a um volume de 7 mL, foi incubada com 250 µL de resina Ni-NTA (*Qiagen*) em agitador orbital por 2 horas na temperatura ambiente. Após esse tempo, o material não ligado à resina (*flow through*) foi coletado por gravidade. Foram feitas cinco lavagens: duas lavagens de 3,5mL e três lavagens de 4 mL com o tampão de ligação. As duas primeiras lavagens foram realizadas com 20 mM de imidazol por 10 minutos em agitação orbital. A terceira e quarta lavagens foram feitas com 50 mM de imidazol e a última com 75 mM, ambas sendo mantidas sob agitação orbital por 10 minutos.

Após as lavagens foram feitas 5 eluições com 500 µl de tampão de eluição contendo 250 mM de imidazol. O imidazol compete com a histidina na ligação ao níquel e promove o desligamento e liberação das proteínas com cauda de histidina da coluna de purificação. Após esse processo, foi feita uma eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante para verificar as frações da purificação de *TcDRBD8* (item 4.4.3).

3.5 ABORDAGENS DE CLONAGEM CLÁSSICA

3.5.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR), purificação dos *amplicons* e eletroforese de DNA

Para abordagens de clonagem clássica, os protocolos de PCR, purificação dos fragmentos e eletroforese de DNA, foram realizados como os citados nos itens 3.3.1 e 3.3.2.

3.5.2 Clonagem no vetor pGEM-T-Easy

O vetor pGEM-TEasy® (Promega), ilustrado na figura 9, é um plasmídeo linear que contém deoxitimidina (T) em cada uma de suas extremidades 3', permitindo a inserção direta de produtos de PCR adenilados. Graças à ação da enzima Taq DNA Polimerase, utilizada na amplificação, o produto de PCR recebe uma base extra adenina (A) nas porções 3' da dupla-fita, que permite a ligação do *amplicon* ao vetor. Com a inserção do produto de PCR adenilado, há a circularização do DNA e formação do plasmídeo recombinante.

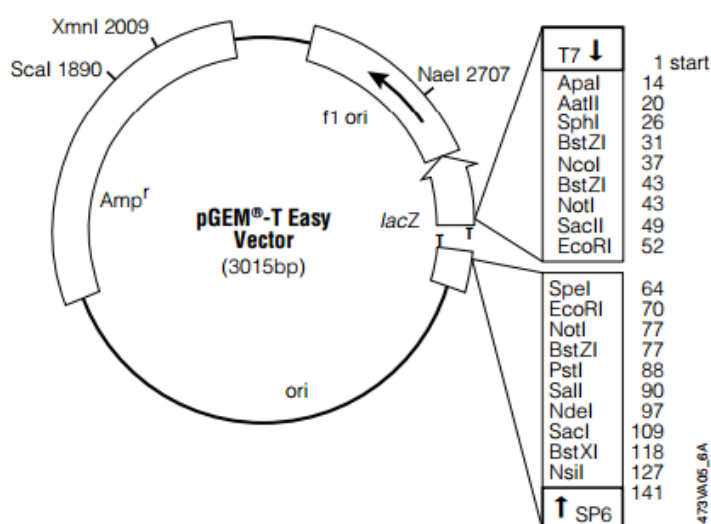


FIGURA 9 – MAPA DO VETOR pGEM-T-Easy – O mapa do vetor indica pontos de referência em sua sequência, como: start codon do gene *lacZ*, resistência a ampicilina, origem de replicação, enzimas de restrição que podem ser utilizadas nas digestões e também as extremidades T-T do vetor.

FONTE: MANUAL DO FABRICANTE.

Foi realizada a clonagem do gene de interesse e das regiões intergênicas a jusante e a montante do gene no vetor pGEM-TEasy por meio da reação de ligação utilizando a enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen), vetor pGEM-TEasy na concentração de 50 ng/μL, inserto (quantidade variando conforme o tamanho de cada inserto) e tampão T4 DNA Ligase Reaction

Buffer. Cada reação foi incubada a 16°C por 16 horas, e em seguida transformadas em *E. coli* DH5 α quimio-competentes.

A transformação em *E. coli* DH5 α quimio-competente foi realizada utilizando as mesmas condições descritas no item 3.3.4, porém, a triagem dos clones positivos foi feita pelo antibiótico ampicilina e a presença de X-gal e IPTG nas placas de cultivo. A seleção é possível graças à resistência a ampicilina promovida pelo vetor pGEM-T-Easy e pelo fato de o vetor ser baseado no gene *lacZ*. O gene *lacZ*, quando interrompido, não codifica para a enzima β -galactosidase. O X-gal é o substrato desta enzima, e na ausência de β -galactosidase, X-gal não é degradado e quando induzido por IPTG a colônia permanece branca, indicando que a bactéria recebeu o plasmídeo com inserto no interior do gene *lacZ*. As colônias negativas, ou seja, que não receberam o plasmídeo com inserto, se tornam azuis, isto porque os plasmídeos que não possuem o inserto são capazes de formar β -galactosidase, que, por sua vez, degrada X-gal, cujo produto da degradação torna as colônias azuis.

Em seguida, foi realizada a mini preparação dos plasmídeos pelo protocolo Qiaprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN). A eluição foi feita em 50 μ L de H₂O, sendo que os plasmídeos contendo os insertos corretos foram isolados por meio desta mini preparação para serem utilizados nas sub-clonagens e construções que serão descritas a seguir.

3.5.3 Subclonagem no vetor de superexpressão pTEX

3.5.3.1 Digestão do vetor pGEM-TEasy a purificação do inserto

O gene de interesse foi clonado no vetor pGEM-T-Easy (Promega) e a digestão de 10 μ g do vetor foi feita com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xho*I, na presença do tampão NEB3 e BSA, tendo volume final de 50 μ L. Estas enzimas de restrição são específicas para o vetor de superexpressão pTEX. Foram utilizadas 1 U/ μ g de cada enzima e a reação foi incubada durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, esta foi inativada a 65°C por 20 minutos. Após a digestão, a amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose

0,8% para purificação do inserto no gel utilizando o protocolo GE - Illustra™ GFX™ PCR DNA and gel band Purification Kit.

3.5.3.2 Ligação do inserto ao vetor pTEX e transformação em bactérias quimio-competentes

Após purificação, o inserto foi ligado a 100 ng do vetor pTEX por reação com 2 µL da enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen). A reação foi incubada a 16°C por 16 horas na presença de 4 µL de tampão T4 DNA Ligase Reaction Buffer. Após isto, ocorreu transformação em *E. coli* DH5α Ca²⁺-competente por choque térmico (2 minutos a 42 °C e 3 minutos a 4 °C) e a seleção dos clones feita pelo cultivo das células em meio LB por 1 hora para recuperação e plaqueadas em LB sólido com antibióticos apropriados. A ligação foi confirmada por PCR de colônia (o programa utilizado conteve desnaturação inicial de 10 minutos a 94 °C, seguida de 25 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto, finalizando com extensão final de 72°C por 5 minutos) e os produtos submetidos à eletroforese em gel de agarose para verificar o sucesso da transformação.

Após confirmação dos clones, a minipreparação foi realizada afim de isolar os plasmídeos contendo os insertos corretos para a transfecção no parasita.

3.5.4 Construção do cassete para nocaute do gene de *TcDRBD8*

A construção do cassete para nocaute do gene de *TcDRBD8* está representada na figura 10. O cassete apresenta resistência ao antibiótico neomicina, sendo selecionado no parasita pelo uso desta droga. Após amplificação, apenas o cassete para nocaute do gene, na ausência do resto do vetor, será transfecado em *T. cruzi* para avaliar o efeito da ausência da proteína na célula. Em seguida, para nocaute do segundo alelo, o gene de resistência para seleção pela droga higromicina.

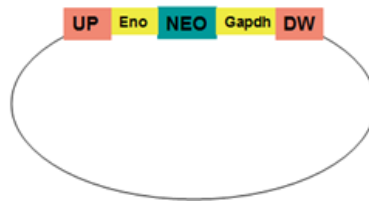


FIGURA 10 - CASSETE PARA NOCAUTE DO GENE TCDRBD8 - UP: intergênica *upstream* do gene *TcDRBD8*; DW: intergênica *downstream* do gene *TcDRBD8*; ENO: intergênica enolase dos genes de neomicina e higromicina; Gapdh: intergênica Gapdh dos genes de neomicina e higromicina.

3.5.4.2 Digestão do vetor pGEM-TEasy e purificação do inserto

Após clonagem do gene de interesse no vetor pGEM-TEasy (Promega), foi feita sua digestão com *KpnI* e *Sall*, enzimas de restrição da região *upstream*, utilizando os tampões NEB1 e NEB3, respectivamente, e BSA a 37°C por 30 minutos e posterior inativação a 65°C por 20 minutos.

Como as enzimas de restrição da região *upstream* atuam em diferentes pH (por isso o uso de tampões diferentes), é necessário que as digestões sejam feitas separadamente e que os produtos sejam purificados antes de tratados com a outra enzima. Para isto, primeiro foi realizada a digestão com *Sall*, reação a qual foi inativada à 65°C por 20 minutos e purificada com o kit (GE - Illustra™ GFX™ PCR DNA and gel band Purification Kit) para então ser digerida com *KpnI*. Após as digestões as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% para purificar o inserto no gel com o uso do kit (GE - Illustra™ GFX™ PCR DNA and gel band Purification Kit).

3.5.4.3 Digestão do vetor pNEO com enzimas da região *upstream* e transformação em células quimio-competentes

Para construção do cassete para nocaute do gene, as regiões intergênicas à montante e à jusante do gene serão clonadas no vetor pNEO por

clonagem clássica. O vetor pNEO foi digerido com enzimas de restrição da região *upstream*, *KpnI* e *Sall*, nas mesmas condições das digestões citadas anteriormente (37°C por 30 minutos e inativação à 65°C por 20 minutos), e as purificações realizadas com kit (GE - Illustra™ GFX™ PCR DNA and gel bandPurification Kit).

Então, foi feita a ligação da região *upstream* em 20 µg do vetor pNEO, por meio da enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen), com tampão 5x e H₂O em quantidade suficiente para 20 µL, sendo incubada por 16 horas à 16°C. A transformação da reação foi realizada em *E. coli* DH5α Ca²⁺-competente por choque térmico. Os clones transformados foram confirmados por PCR de colônia, como citado no item 3.3.7, e a minipreparação dos plasmídeos foi realizada por meio do Kit Qiaprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN).

Adicionalmente, para confirmar a ligação da região *upstream* ao pNEO, foi feita a digestão do vetor com as enzimas *KpnI* e *HindIII*, enzimas de restrição da região *upstream*, utilizando o tampão NEB2.1 a 37°C por 30 minutos e posterior inativação à 80°C por 20 minutos.

Após confirmação das inserções no vetor para nocaute gênico, o cassete contendo as intergênicas e o gene de resistência será amplificado e transfectado em *T. cruzi*.

3.6 Transfecção em *Trypanosoma cruzi*

Após confirmações, foi realizada a transfecção dos vetores pTcFLAG-*TcDRBD8*, pTcGFP-*TcDRBD8* e pTEX-*TcDRBD8* em *T. cruzi*. Em cada transfecção foram utilizados um total de 5 x 10⁷ parasitas em fase logarítmica de crescimento, e entre 10-20 µg de cada vetor em triplicata. Os parasitas foram centrifugados a 4.000 x g por 10 minutos, a 4 °C, lavados em 1 mL de PBS e ressuspensos em tampão de eletroporação pH 7,5. A suspensão foi incubada em gelo, juntamente com o vetor, por 10 minutos. Para a eletroporação, as células sofreram dois pulsos de 500 µF a 450 V, sendo incubadas por 10 minutos em gelo. Foram adicionados 10 mL de meio LIT em

garrafa de cultura com as células. Após incubação por cerca de 24 horas a 28°C, a droga Geneticina G418 (Sigma) a 250 µg/mL foi adicionada. Após 48h a concentração foi aumentada para 500 µg/mL e após crescimento as culturas diluídas 1:4, em 10 mL de meio LIT, para seleção. Novamente após etapas de crescimento as culturas foram diluídas 1:2 ou 1:4. Como controle, células sem a adição de vetor foram eletroporadas e incubadas nas mesmas condições, devendo ser observado o decaimento desta população ao longo do tempo de incubação. Visto que o aluno de Iniciação Científica não pode trabalhar com parasitas patogênicos, os experimentos de transfecção em *T. cruzi* foram realizados pela orientadora e o aluno acompanhou todas as atividades.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SELEÇÃO DO GENE

As sequências de *T. cruzi* foram obtidas no banco de dados *TriTrypDB*, no qual o gene codificante para proteína TcDRBD8 possui o ID Tc CLB.509581.50. Neste banco de dados, a proteína *TcDRBD8* está anotada como hipotética. A *TcDRBD8*, representada na figura 11, possui peso molecular de 34 kDa, ponto isoelétrico (PI) 7,91, sequência contendo 942 pares de bases que codificam a 313 aminoácidos.

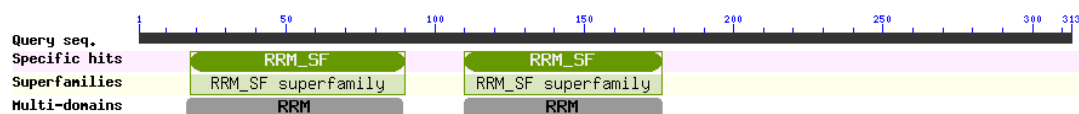


FIGURA 11 – REPRESENTAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE TcDRBD8 – A sequência de TcDRBD8 apresenta 313 aminoácidos e dois domínios RRM localizados próximos da extremidade amino-terminal da proteína. Figura gerada pelo BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

A *TcDRBD8* foi nomeada segundo De Gaundenzi e colaboradores (2005), como a oitava proteína “*Double RNA-Binding Domain (DRBD)*”

encontrada em *T. cruzi*, por possuir dois domínios RRM de ligação ao RNA. A proteína foi selecionada para este estudo devido à variação da sua expressão no ciclo de vida do parasita e sua exclusividade em *T. cruzi*, conforme previamente justificado na revisão bibliográfica.

4.2 CLONAGEM NO SISTEMA GATEWAY®

4.2.1 Amplificação do gene para clonagem no sistema Gateway®

Foi realizada a amplificação das sequências de nucleotídeos do gene *TcDRBD8* por PCR. A amplificação para clonagem na plataforma Gateway® foi realizada de duas maneiras: a primeira com o oligonucleotídeo reverso contendo o códon de parada, e a segunda sem o códon de parada. Este último foi usado visando posterior fusão de sequências codificadoras para etiquetas na porção 3'.

As amplificações das sequências de *TcDRBD8* por PCR tiveram seu perfil eletroforético analisado, conforme pode ser observado na figura 12.

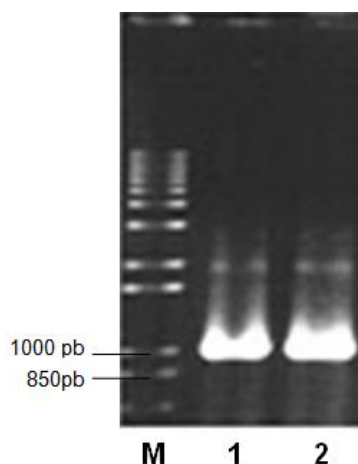


FIGURA 12 – ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DOS AMPLICONS DO GENE *TcDRBD8* PARA CLONAGEM NA PLATAFORMA GATEWAY® - Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. 1: gene *TcDRBD8* com códon de parada (939pb); 2: gene *TcDRBD8* sem códon de parada (942 pb); M: marcador 1Kb plus DNA ladder.

Com a análise do perfil eletroforético dos *amplicons*, foi confirmada a amplificação do gene *TcDRBD8* com e sem códon de parada, permitindo a realização da clonagem dos *amplicons* no vetor de entrada da plataforma Gateway® pDONR™221.

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

Após a transformação das bactérias quimiocompetentes e a seleção com antibióticos, as colônias supostamente positivas foram confirmadas pela reação de PCR. A reação de recombinação entre os *amplicons* e o vetor de entrada da plataforma Gateway® pDONR™221 foi confirmada com base na amplificação do gene presente nas colônias obtidas da transformação em células DH5α quimio-competentes. A partir desta transformação, foram selecionadas quatro colônias provenientes da recombinação entre gene *TcDRBD8* com códon de parada e vetor pDONR™221 e 5 colônias da recombinação entre gene *TcDRBD8* sem stop códon e vetor pDONR™221. O perfil eletroforético da PCR das colônias pode ser observado na figura 13.

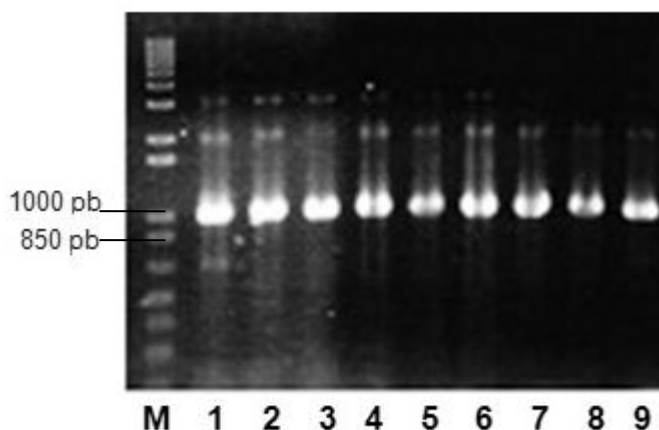


FIGURA 13 – ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DOS *AMPLICONS* GERADOS PELA RECOMBINAÇÃO DO GENE *TcDRBD8* E VETOR pDONR™221 - Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. 1 a 4: colônias da recombinação entre gene *TcDRBD8* com códon de parada (939pb) e vetor pDONR™221; 5 a 9: colônias da recombinação entre gene *TcDRBD8* com códon de parada (942pb) e vetor pDONR™221; M: marcador 1Kb plus DNA ladder (invitrogen).

A partir da análise do perfil eletroforético, foi confirmada a clonagem dos *amplicons* no vetor de entrada da plataforma Gateway® pDONR™221 e, em seguida, pode-se realizar a minipreparação dos plasmídeos, visando isolar o vetor correto para recombinação.

4.2.3 Sequenciamento de DNA

Após a purificação do DNA plasmidial por minipreparação, amostras contendo o gene TcDRBD8 recombinado no vetor pDONR™221, em concentração de DNA de 100 ng/μL, foram enviadas para sequenciamento. O resultado do sequenciamento mostrou que o gene estava corretamente inserido no vetor e, assim, procedeu-se para as etapas de recombinação.

4.2.4 Recombinações nos vetores de destino

Após a confirmação da recombinação do gene no vetor de entrada pDONR™221, foi feita a recombinação nos seguintes vetores de destino: pDEST™17, pTcFLAG e pTcGFP. Em seguida, a PCR das colônias geradas a partir das transformações em bactérias DH5α quimio-competentes foram analisadas para confirmar seu perfil eletroforético (Figuras 14, 15 e 16).

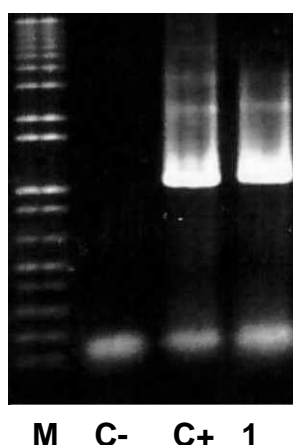


FIGURA 14– CONFIRMAÇÃO DA RECOMBINAÇÃO ENTRE pDONR™221 E pDEST™17 – Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. C- : controle negativo (apenas os reagentes da PCR, sem DNA genômico); C+ : controle positivo utilizando DNA

genômico de *T. cruzi*; 1: colônia da recombinação entre os vetores pDONR™221 e pDEST™17; M: marcador 1 Kb plus DNA ladder.

Após a confirmação por análise do perfil eletroforético, o clone positivo contendo o gene de interesse e o vetor de expressão pDEST™17 foi selecionado para os experimentos posteriores. Houve a análise de apenas um clone devido à dificuldade na obtenção de colônias.

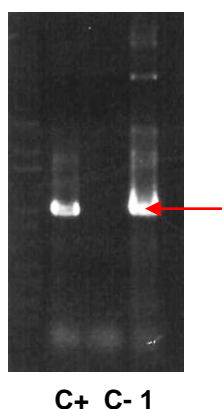


FIGURA 15 - ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DOS AMPLICONS DO VETOR pTcFLAG-TcDRBD8 - Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.1: clone 2 do vetor pFLAG (seta vermelha); C-: controle negativo; C+: controle positivo.

A partir do resultado da eletroforese de DNA obtida da PCR de colônia de pTcFLAG-*TcDRBD8*, foi confirmada a amplificação do gene *TcDRBD8*, prosseguindo à minipreparação e à transfecção do vetor em *T. cruzi*.

De modo semelhante à técnica anterior ou similar à após realizada a recombinação entre pDONR™221 (Gateway® Technology, Invitrogen) e pTcGFP, foi feita transformação em *E.coli* DH5 α . A partir da colônia resultante, a PCR de colônia foi realizada e a partir da eletroforese em gel de agarose 0,8% (Figura 15), o clone positivo foi confirmado. Depois de realizada a confirmação, o vetor pTcGFP-*TcDRBD8* foi transfectado em *T. cruzi*.



FIGURA 16—CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DE INSERTO (GENE *TcDRBD8*) NO VETOR pTcGFP - Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio para confirmar a presença de inserto (gene *TcDRBD8*) no vetor pTcGFP. 1: vetor pTcGFP com inserto (gene *TcDRBD8*) – indicado pela seta; C+: controle positivo; C-: controle negativo; M: marcador 1 Kb plus DNA ladder.

Para a localização celular da proteína TcDRBD8, duas estratégias serão abordadas em ensaios futuros: a imunofluorescência indireta com anticorpo específico para a proteína, ou a fusão a etiquetas para localização da proteína homóloga, também por imunofluorescência indireta (sendo utilizado, neste caso, anticorpo contra a etiqueta). O vetor pTcGFP será usado para definir a localização celular como alternativa, caso não seja possível obter o anticorpo policlonal para a caracterização funcional, ou, até mesmo, para validação do imunoenensaio.

4.3 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS

4.3.1 Testes de expressão

Para este ensaio, diferentes temperaturas (25°C ou 37°C), tempos de indução com IPTG (2 horas, 3 horas ou 16 horas), cepas bacterianas (BL21(DE3)pLysS e BL21(DE3)Star) e densidades óticas (variação entre 0,4 e

0,8) foram testadas determinar as melhores condições para expressão protéica.

A *E. coli* BL21(DE3)pLysS possui um gene codificante para a RNA polimerase T7, estando sob controle do promotor *lacUV5*. O IPTG, análogo sintético da lactose, liga-se ao repressor do operon *lacUV5*, permitindo que a RNA polimerase se ligue ao promotor *lac*, gerando a expressão da polimerase T7. A polimerase T7 se liga ao promotor T7 do vetor pDEST™17 e ocorre a expressão do inserto presente no vetor. Ainda, a presença do plasmídeo pLysS 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 (*isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido*), que serve como indutor da expressão. Desta maneira, a produção da lisozima T7 inibe a expressão basal da proteína recombinante.

A *E. coli* BL21(DE3)Star também possui um gene codificante para a RNA polimerase T7, estando sob controle do promotor *lacUV5*. Desta maneira, esta cepa também pode ter a indução da expressão da proteína de interesse por meio do IPTG. As particularidades da cepa conferem uma maior estabilidade do mRNA, visto que, devido a uma mutação no gene da enzima RNaseE, reduz a degradação de mRNAs. Assim, a estabilidade dos transcritos e, conseqüentemente, a produção da proteína, é aumentada. Porém, vale ressaltar que a cepa não possui controle da expressão basal da proteína recombinante, como ocorre em pLysS. Por esta razão ela não é utilizada para a expressão de genes tóxicos.

Os primeiros testes de indução da expressão apresentavam exacerbação de proteínas no gel, como pode ser observado na figura 16A. Primeiramente, os testes estavam sendo realizados nas condições: *E. coli* cepa BL21(DE3)pLysS, DO₆₀₀0,4, IPTG na concentração 0,5mM por 16 horas a 25°C. Devido à grande quantidade de proteínas, os outros géis passaram a ter uma aplicação menor de quantidade de amostra. Porém, o grande problema era não detectar uma expressão de proteína significativa na fração não induzida.

Ao testar as mesmas condições de expressão anteriores, apenas com mudança na cepa de *E. coli* para BL21(DE3)Star e tempo de indução de 3 horas a 37°C, obteve-se resultado satisfatório, apresentado na figura 16B.

Porém, nota-se maior indução da expressão na porção NI (não induzida com IPTG) do que na I (induzida). Acredita-se que houve vazamento de expressão na cepa BL21(DE3)Star. Contudo, apesar dos resultados observados, este padrão de expressão não conseguiu ser reproduzido em testes posteriores.

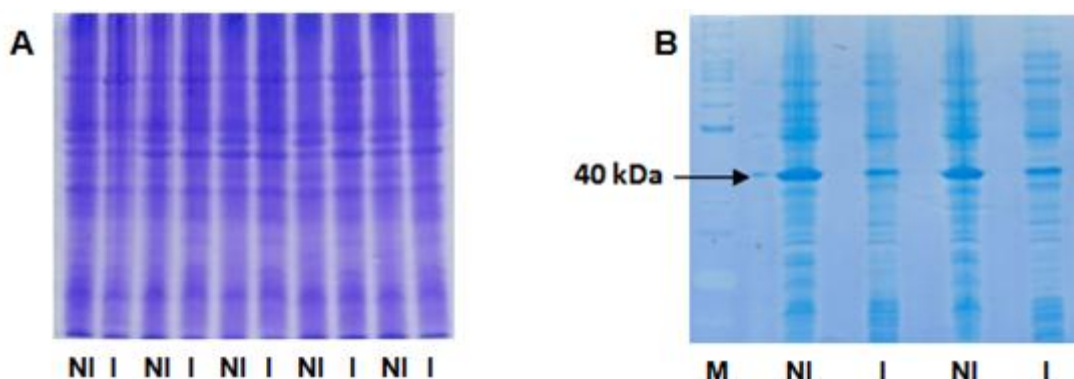


FIGURA 16 – ANÁLISE DOS TESTES DE INDUÇÃO DA *TcDRBD8* EM GEL SDS-PAGE - A: O gel do teste de indução da expressão apresenta excesso de proteínas, sem distinção da *TcDRBD8*, cada par de amostra NI (não induzida) e I (induzida) corresponde a um clone testado; **B:** o gel do teste de expressão apresenta indução da expressão de uma proteína de aproximadamente 40 kDa tanto nas porções NI (não-induzida com IPTG) quanto na I (induzida com IPTG).

Outros testes realizados, com condições variadas, não apresentaram indução da expressão. Também não houve diferença significativa no tempo de indução entre 2 horas, 3 horas ou 16 horas, pois os géis sempre apresentaram o perfil de expressão verificado na figura 16A. Sendo que quando a indução é realizada em 2 ou 3 horas, deve ser incubada em temperatura de 37°C, e a densidade ótica inicial deve ser de 0,6. Já a indução por 16 horas deve ser realizada à 25°C, devendo partir de uma densidade ótica de 0,4, visto que as bactérias terão muito mais tempo para crescer em 16 horas do que em 2 ou 3 horas.

Portanto, foi padronizado que as condições de expressão proteica se dão com adição de 0,2 mM de IPTG, na cepa bacteriana de *E.coli* BL21(DE3)Star. Ainda que baixa, nota-se que há expressão da proteína recombinante tanto nas frações induzidas quanto na não induzida com IPTG

(Figura 17) na altura de aproximadamente 40 kDa, o que corresponde ao tamanho aproximado da proteína (34 kDa) fusionada à cauda de histidinas.

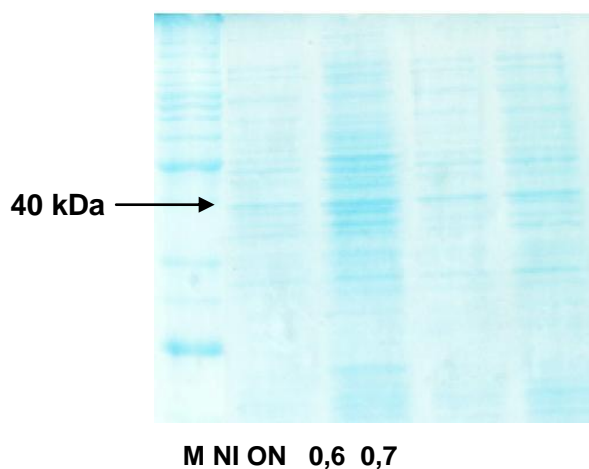


FIGURA 17 – EXPRESSÃO DA PROTEÍNA TcDRBD8 - M: marcador de massa molecular Bench Mark™; NI: amostra sem adição de IPTG; ON: amostra induzida com IPTG durante 16 horas (overnight) à 25°C; 0,6: amostra induzida com IPTG durante 2 horas à 37°C ao atingir a D.O. 0,6; 0,7: amostra induzida com IPTG durante 2 horas à 37°C ao atingir D.O. 0,7.

4.3.2 Ensaio de *Western Blotting*

Para confirmar se a banda com aproximadamente 40 kDa do experimento anterior se tratava da proteína recombinante de interesse, foi realizado um *Western Blotting* com anticorpo específico contra a cauda de histidinas fusionada à proteína (Figura 18).



FIGURA 18 – CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE – *Western blotting* anti-histidina da proteína expressa em diferentes condições. NI: amostra sem adição de IPFG; ON: amostra induzida com IPTG durante 16 horas (overnight - ON) à 25°C; 0,6: amostra induzida com IPTG durante 2 horas à 37°C ao atingir a D.O. 0,6; 0,7: amostra induzida com IPTG durante 2 horas à 37°C ao atingir D.O. 0,7; 40 kDa indica a massa da proteína.

Por meio desta técnica, foi confirmado que, apesar de baixa, obteve-se expressão da proteína recombinante. No gel SDS-PAGE da figura 18 também é possível observar algumas bandas abaixo da altura de 40 kDa, indicando que possa estar ocorrendo degradação da proteína. Assim, a partir das condições de expressão estabelecidas, realizou-se sua expressão em larga escala e purificação.

4.3.3 Expressão de proteínas em larga escala e purificação da proteína recombinante

Mesmo que em baixas quantidades, obteve-se a expressão da *TcDRBD8* e prosseguiu-se com a expressão de proteínas em larga escala nas seguintes condições: $DO_{600}0,4$, IPTG a 0,2 mM e tempo de indução de 16 horas a 25°C. Após a expressão em larga escala, a proteína induzida foi purificada por cromatografia de afinidade. Com a eletroforese de proteínas em gel SDS-PAGE foi possível verificar as frações ao longo das lavagens e

eluições para a purificação da TcDRBD8. Por meio da análise do gel SDS-PAGE verificou-se que a partir da quinta lavagem não são observadas proteínas no gel, e mesmo nas primeiras lavagens, não é possível observar uma banda específica para a proteína em questão. Devido ao fato de que não houve expressão significativa da proteína, é preciso retornar aos experimentos para otimização da expressão da proteína, devido à baixa taxa de expressão nesta indução, testando-a em outras cepas bacterianas e diferentes condições.

4.4 Amplificação das regiões intergênicas para clonagem clássica

Para as abordagens de clonagem clássica, os *amplicons* foram obtidos por meio da reação de amplificação com oligonucleotídeos específicos para cada região intergênica. As amplificações para construção do cassete para nocaute do gene utilizaram *primers* para as regiões intergênicas *upstream* e *downstream*.

A amplificação das regiões intergênicas *upstream* e *downstream* podem ser observadas na figura 19. Esta última apresentou um perfil eletroforético inespecífico com três fragmentos, ainda que após várias tentativas de otimização, como variação na concentração de $MgCl_2$ e alteração da enzima utilizada para amplificação. Devido ao perfil inespecífico, foram construídos diferentes oligonucleotídeos iniciadores para a região. Porém, mesmo após o uso de outros pares de *primers*, não foi possível observar variação do perfil eletroforético, que acabou sendo caracterizado pela presença de 3 bandas (Figura 19) e cuja região intergênica foi confirmada por sequenciamento de DNA.

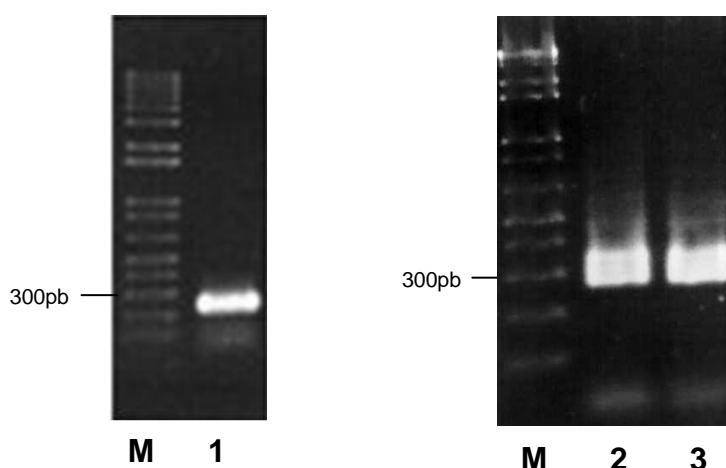


FIGURA 19 – AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO *UPSTREAM* E *DOWNSTREAM* DE *TcDRBD8* – Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. 1: amplificação da região intergênica *upstream* de *TcDRBD8* (234 pb); 2 e 3: amplificação da região intergênica *downstream* (pares de primers novos); M: marcador 1kb.

Os fragmentos da região *downstream* foram separadas por purificação do gel e foram clonadas separadamente no vetor pGEM-TEasy. Os próximos experimentos devem ser realizados afim de confirmar a região específica por sequenciamento. Pelo fato de ocorrer contratempos na definição de novos *primers* para a região, ainda não foi possível confirmar a clonagem no pGEM-TEasy.

4.4.1 Clonagem das regiões intergênicas no vetor pGEM-TEasy

Quando digestões são realizadas em fragmentos lineares, elas podem não ocorrer de maneira eficiente do que se realizadas em fragmentos circulares e grandes, como o vetor pGEM-TEasy. Assim, as clivagens dos fragmentos de interesse tendem a ser mais eficientes com o uso deste vetor. Esta clivagem pode ser confirmada por eletroforese em gel de agarose, na qual é possível observar a liberação do inserto do vetor. Por este motivo, foi escolhida a clonagem clássica inicial no vetor pGEM-T-Easy para realização das digestões dos fragmentos para subclonagem de maneira eficiente.

Foi feita a reação de ligação entre a região intergênica *upstream* e o vetor pGEM-TEasy, em seguida as reações foram transformadas em bactérias *E. coli* DH5 α quimio-competentes e o resultado da PCR das colônias foi analisado com base no perfil eletroforético, observado na figura 20. A partir dos resultados, confirmou-se a clonagem da região intergênica *upstream* no vetor pGEM-TEasy.

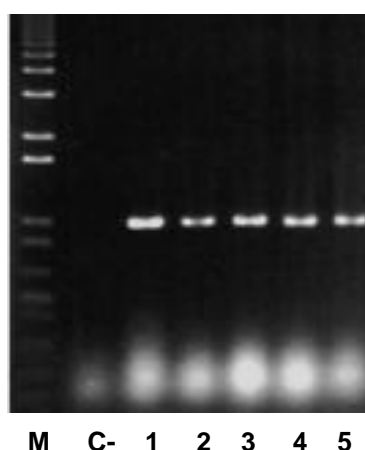


FIGURA 20 – CLONAGEM DO GENE DE TcDRBD8 NO VETOR pGEM-TEasy – Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo; C-: controle negativo; 1 a 5: colônias geradas pela transformação da reação de ligação em bactérias quimio-competentes; M: marcador 1Kb plus DNA ladder.

4.4.2 Construção do cassete para nocaute do gene *TcDRBD8*

O vetor pGEM-T-Easy foi digerido com enzimas de restrição da região upstream, *KpnI* e *SalI*, para a realização da construção do cassete para nocaute do gene de *TcDRBD8*. Foi necessária a realização de duas digestões, sendo a primeira feita com a *KpnI*, e, após purificação e digestão com a segunda enzima, *SalI*, os vetores foram purificados e submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% (Figura 21), confirmando as digestões.

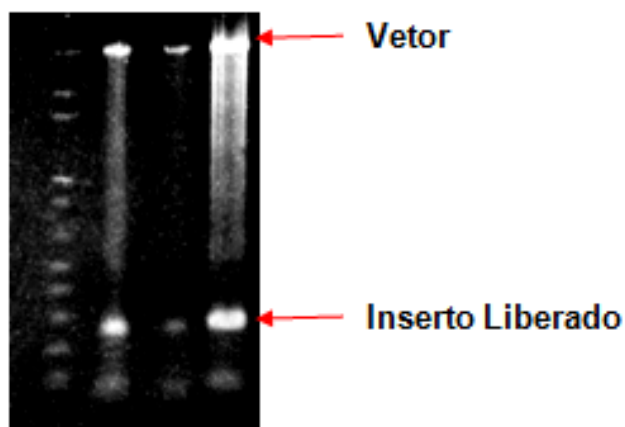


FIGURA 21 – DIGESTÃO DO VETOR pGEM-TEasy COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO DA REGIÃO *UPSTREAM* DO GENE DE TcDRBD8 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio da digestão do vetor pGEM-TEasy com as enzimas de restrição da região upstream, *Sall* + *KpnI*.

Paralelamente, o vetor pNEO foi digerido com as enzimas *KpnI* e *Sall* foi purificado. Então, foi feita a ligação da região *upstream* no vetor pNEO, transformação em *E.coli* DH5 α e minipreparação dos plasmídeos. Para confirmar se a construção (inserção da região upstream no vetor pNEO) está correta, ampliações com oligonucleotídeos para as regiões do vetor pNEO e intergênica *upstream* foram realizadas (Figura 22).

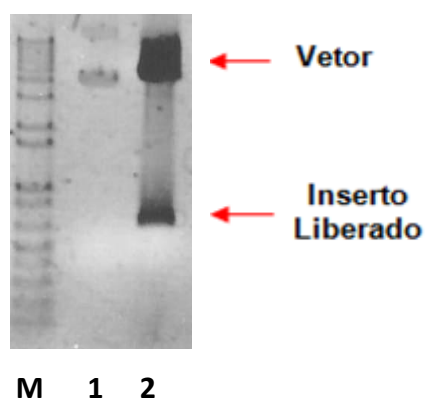


FIGURA 22 –CONFIRMAÇÃO DA LIGAÇÃO DA REGIÃO *UPSTREAM* NO VETOR pNEO – Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo da digestão do vetor pNEO com as enzimas da região *upstream* 1: minipreparação plasmidial do clone; 2: digestão do vetor pNEO com enzimas da região *upstream*; . M: marcador 1 Kb plus DNA ladder.

Após obter o fragmento referente à região *downstream*, o mesmo será clonado no vetor pNEO já contendo a região *upstream*, seguindo os mesmos procedimentos. Depois que ambas as regiões intergênicas, *upstream* e *downstream*, estiverem clonadas no vetor pNEO, este cassete será transfectado em *T. cruzi*, visando avaliar o efeito da ausência da proteína sobre o parasita. O resultado da transfecção do cassete para nocaute do gene *TcDRBD8* será muito importante para a caracterização funcional desta proteína, visto que, caso ela seja essencial para *T. cruzi*, provavelmente ocorra a morte do parasita na ausência do gene. Além disso, será possível avaliar o efeito sobre a diferenciação e infecção, bem como sobre seus alvos.

4.4 Amplificação do gene TcDRBD8 para clonagem clássica

As amplificações para clonagem em vetor de superexpressão consistiram na utilização de oligonucleotídeos para o gene *TcDRBD8*. Estes oligonucleotídeos, previamente citados na tabela 2, possuem sítios de restrição específicos para enzimas a serem utilizadas nas digestões, sendo utilizado para abordagens de clonagem clássica. O gene *TcDRBD8* também foi usado para a clonagem na plataforma Gateway®, porém, neste caso, os *primers* continham sítios de restrição para as regiões *attB1* e *B2*. Após a reação de PCR, a análise eletroforética foi realizada, e o resultado pode ser observado na figura 23.

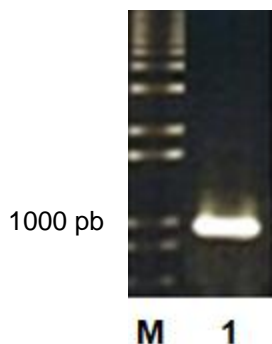


FIGURA 23 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE DE TcDRBD8 – Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. 1: amplificação do gene *TcDRBD8* para subclonagem no vetor pTEX(942 pb); M: marcador 1Kb plus DNA ladder.

4.5.1 Clonagem do gene TcDRBD8 no vetor pGEM-TEasy

Com os mesmos objetivos citados no item 4.4.1, foi feita a reação de ligação entre o gene TcDRBD8 e pGEM-T-Easy. As reações foram transformadas em bactérias *E. coli* DH5 α quimio-competentes e o resultado da PCR das colônias foi analisado com base no perfil eletroforético, observado na figura 24. A partir dos resultados, confirmou-se a clonagem do gene TcDRBD8 no vetor.

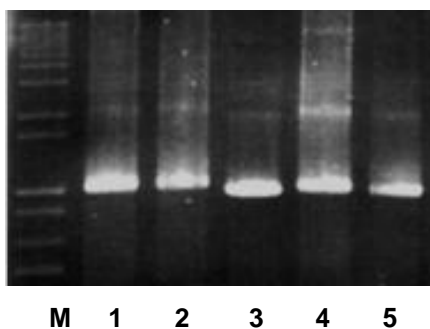


FIGURA 24 – CLONAGEM DA REGIÃO INTERGÊNICA *USPTREAM* DE TcDRBD8 NO VETOR pGEM-TEasy – Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. 1 a 5: colônias geradas pela transformação da reação de ligação em bactérias quimio-competentes; M: marcador 1Kb plus DNA ladder.

Após a digestão do vetor pGEM-TEasy com as enzimas de restrição do vetor pTEX, *Bam*HI + *Xho*I, a confirmação foi realizada por eletroforese em gel de agarose 0,8% (Figura 25), no qual verifica-se a correta digestão e liberação do inserto (gene *TcDRBD8*). Após esta confirmação, a purificação da digestão foi realizada. O fragmento para purificação foi recortado a partir do gel de agarose corado com brometo de etídeo.

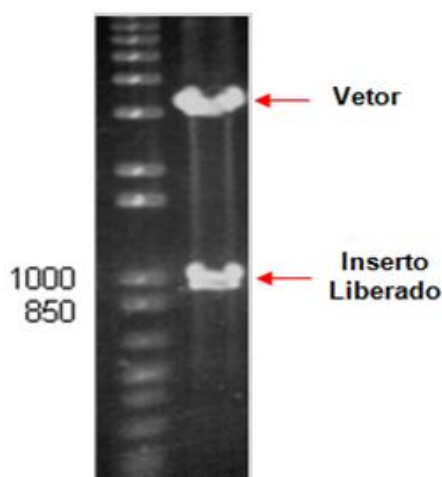


FIGURA 25 – DIGESTÃO DO VETOR PGEM-T EASY PARA LIBERAÇÃO DO GENE DE *TcDRBD8* - Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo da digestão do vetor pGEM-TEasy com as enzimas de restrição do vetor pTEX *Bam*HI + *Xho*I. M: marcador 1 Kb plus DNA ladder.

É possível verificar, com base no perfil eletroforético, a liberação do inserto coesivo para o sítio correto do vetor pTEX.

4.5.2 Clonagem do gene *TcDRBD8* no vetor de superexpressão pTEX

A clonagem do gene *TcDRBD8* no vetor pTEX foi feita por meio de uma reação de ligação pela T4 ligase. Esta ligação posteriormente foi transformada em *E. coli* DH5 α , originando colônias que foram submetidas à PCR e eletroforese em gel de agarose 0,8% (Figura 26). Houve amplificação de um

clone positivo, o qual foi selecionado para minipreparação plasmidial e transfecção no parasita.

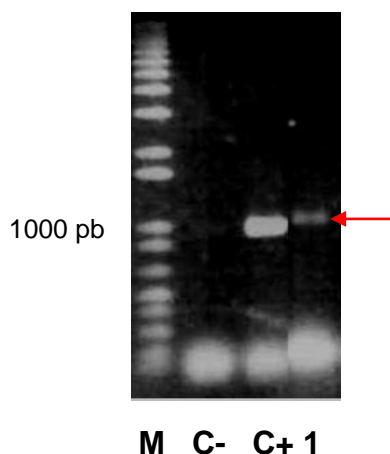


FIGURA 26 – CONFIRMAÇÃO DA LIGAÇÃO DO GENE *TcDRBD8* AO VETOR pTEX. Confirmação através de eletroforese em gel de agarose 0,8% da PCR de colônia, corado com brometo de etídeo. C-: controle negativo; C+: controle positivo; 1: clone selecionado para minipreparação plasmidial e transfecção no parasita (seta vermelha); M: marcador 1 Kb plus DNA ladder.

O vetor pTEX foi escolhido para análise do efeito da superexpressão da proteína *TcDRBD8* no parasita. Os resultados da transfecção indicarão se a superexpressão da proteína pode gerar alguma modificação no parasita, sendo importante para sua caracterização funcional.

4.5 Transfecção em *Trypanosoma cruzi*

A transfecção dos vetores pTcFLAG-*TcDRBD8*, pTcGFP-*TcDRBD8* pTEX-*TcDRBD8* em *Trypanosoma cruzi* foi realizada, contudo, a completa seleção dos parasitas somente ocorreu nos vetores pTcGFP-*TcDRBD8* e pTEX-*TcDRBD8*, dando prosseguimento aos experimentos com estes vetores. Os parasitas transfectados foram congelados em nitrogênio líquido para dar sequência ao projeto, se tratando, de fato, da caracterização funcional da proteína *TcDRBD8*.

4. CONCLUSÕES

O gene TcCLB.509581.50, que codifica para a proteína *TcDRBD8*, foi amplificado e clonado utilizando-se a plataforma Gateway®. Os vetores de destino escolhidos foram: pDEST™17, pTcGFP e pTcFLAG.

O vetor pDEST™17 foi escolhido para expressão heteróloga da proteína em sistema bacteriano. Após a realização dos testes de indução e determinação das condições ideais de expressão protéica, foi realizada a expressão em larga escala e purificação da proteína recombinante. Porém, como não houve expressão significativa da proteína, devem ser realizados novos testes de indução com variação nas cepas bacterianas e condições, visando otimizar a expressão da *TcDRBD8*. Assim que realizadas estas etapas, pode-se prosseguir com os experimentos afim de obter o anticorpo policlonal anti-*TcDRBD8*, visando a localização subcelular direta da proteína.

O gene *TcDRBD8* também foi amplificado e utilizado em abordagens de genética clássica, realizando sua clonagem no vetor de superexpressão pTEX. Por meio deste vetor, será possível avaliar o efeito da superexpressão da proteína no parasita assim que estes forem selecionados.

Tão importante quanto a análise da superexpressão da proteína, é verificar o efeito de sua ausência em *T. cruzi*. Para tanto, a construção do cassete para nocaute do gene foi iniciada. A região *upstream* já se encontra clonada no vetor pNEO, porém, devido às amplificações inespecíficas da região *downstream*, esta ainda precisa ser confirmada por sequenciamento para dar continuidade aos experimentos.

Os vetores pTcGFP e pTcFLAG foram transfectados em *T. cruzi* e após seleção dos parasitas serão caracterizados e, posteriormente, utilizados para determinar, de maneira indireta, a localização subcelular da proteína caso não seja possível obter seu anticorpo policlonal. Ou, até mesmo, como validação do resultado a ser obtido nas etapas posteriores de caracterização funcional.

Estas construções permitirão caracterizar uma proteína que apresenta indícios de ser uma importante chave na regulação da expressão gênica do parasita.

5. REFERÊNCIAS

ALVES, C. R.; ALBUQUERQUE-CUNHA, J. M.; MELLO, C. B. ***Trypanosoma cruzi*: attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus***. *Experimental Parasitology*, vol. 116, no. 1, pp. 44–52, 2007.

ARAÚJO, P. R.; TEIXEIRA, S. M. **Regulatory elements involved in the post-transcriptional control of stage-specific gene expression in *Trypanosoma cruzi* - A Review**. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 106(3): 257-266, May 2011.

ARGOLO, A. M.; FELIX, M.; PACHECO, R.; COSTA, J. **Doença de Chagas e seus Principais Vetores no Brasil**. *PIDC*. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

BATISTA, M.; MARCHINI, F. K.; CELEDON, P. A. F.; FRAGOSO, S.P.; PROBST, C. M.; PRETI, H.; OZALO, L. S.; BUCK, G. A.; GOLDENBERG, S.; KRIEGER, M. A. **A high-throughput cloning system for reverse genetics in *Trypanosoma cruzi***. *BMC Microbiology* 2010, 10:259.

BRASIL. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde/Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doença de Chagas, caderno 10. **Guia de vigilância epidemiológica**. Brasília, 7 ed., 2009.

BRENER, Z. **Intraspecific variations in *Trypanosoma cruzi*: two types of parasite populations presenting distinct characteristics**. *PAHO*. 1997;347:11;11-21

BRENER, Z. ***Trypanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo**. In: Clínica e Terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: *FIOCRUZ*, 1997.

BURD, C. G.; DREYFUSS, G. *Science* **265**, 615–621, 1994.

CASTRO, D. P.; SEABRA, S. H.; GARCIA, E. S.; DE SOUZA, W.; AZAMBUJA, P. ***Trypanosoma cruzi*: ultrastructural studies of adhesion, lysis and**

biofilm formation by *Serratia marcescens*. *Experimental Parasitology*, vol. 117, no. 2, pp. 201–207, 2007.

CHAGAS, C. **Nova Tripanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem.** 159-218: Memória Instituto Carlos Chagas. 1909.

CLAYTON, C. & SHAPIRA, M. **Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias.***Molecular & Biochemical Parasitology*, 13 July, pp. 93-101. 2007.

CLÉRY, A.; BLATTER, M.; ALLAIN, F.H. **RNA recognition motifs: boring? Not quite,** *Curr Opin Struct Biol*, v. 18, n. 3, p. 290-298, 2008.

CUERVO, P.; DOMONT, G. B.; JESUS G. B. **Proteomics of trypanosomatids of human medical importance.***J Proteomics*. 2010;73:845-67.

DE CARVALHO, T. U.; DE SOUZA, W. **Cytochemical localization of NADH and NADPH oxidases during interaction of *Trypanosoma cruzi* with activated macrophages.** *Parasitology Research*, vol. 73, no. 3, pp. 213–217, 1989.

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 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. **Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi***. *Current Pharmaceutical Design*, 2002, 8, p269-285.

DE SOUZA, W.;DE CARVALHO, T. M. U.;BARRIAS, E. S. **Review on *Trypanosoma cruzi* : Host Cell Interaction**.*International Journal of Cell Biology*, Volume 2010, Article ID 295394, 1-18.

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.

ESTÉVEZ, A. M. **The RNA-binding protein TbDRBD3 regulates the stability of a specific subset of mRNAs in trypanosomes**. *Nucleic Acids Res* 36: 4573–4586, 2008.

FIELD, M. C.; CARRINGTON, M. **The trypanosome flagellar pocket**. *Nat Rev Microbiol* 7:775-86, 2009.

FORATTINI, O.P. **Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil**. *Revista de Saúde Pública* 14. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo p. 265-299, 1980.

GALVÃO, C.; CARCAVALLO, R.; ROCHA, D.S.; JURBERG, J. **A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes**. *Zootaxa* 202. Auckland: Magnolia Press p.1-36, 2003.

GARCIA, E. S.; RATCLIFFE, N. A.; WHITTEN, M. M.; GONZALEZ, M. S.; AZAMBUJA, P. **Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions**.*Journal of Insect Physiology*, vol. 53, no. 1, pp.11–21, 2007.

GUERRA-SLOMPO, E. P.; PROBTS, C. M.; PAVONI, D. P.; GOLDENBERG, S.; KIEGER, M. A.; DALLAGIOVANNA, B. **Molecular characterization of the *Trypanosoma cruzi* specific RNA binding protein TcRBP40 and its associated mRNAs**. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 420, 302–307, 2012.

HOARE, C. A. **Rationalization of the terminology for the developmental stages of trypanosomatid flagellates.** *Med Parazitol (Mosk)* 40;307-9, 1971.

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

KELLY, J. M.; WARD, H. M.; MILES, A. M.; KENDALL, G. **A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*.** *Nucleic Acids Research*, Vol. 20, No. 15 3963 -3969.

KROPF, S. P. **Carlos Chagas e os debates e controvérsias sobre a doença do Brasil (1909-1923).** História, Ciências, Saúde – Manguinhos, Rio de Janeiro, v.16, supl.1, jul. 2009, p.205-227.

LEIFSO, K.; COHEN, FREUE, G.; DOGRA, N.; MURRAY, A.; MCMASTER, W.R.. **Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: the *Leishmania* genome is constitutively expressed.** *Mol Biochem Parasitol*. 2007;152;35-46.

MARTINEZ-CALVILLO, S.; VIZUET-DE-RUEDA, J. C.; FLORENCIO-MARTINEZ, L. E.; MANNING-CELA, R. G.; FIGUEIRO-ANGULO E. E. **Gene expression in trypanosomatid parasites.** *J Biomed Biotechnol* 2010; Epub 2010 Feb 2011.

MARTINS, A. V.; GOMES, A. G.; MENDONÇA, E. G.; FIETTO, J. L. R.; SANTANA, L. A.; OLIVEIRA, M. A. G.; GELLER, M.; SANTOS, R. F.; VITORINO, R. R.; SIQUEIRA-BATISTA, R. **Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update.** *Infectio*. 2012; 16 (1): 45-58.

NOÉ, G.; DE GAUDENZI, J. G.; FRASCH, A. C. **Functionally related transcripts have common RNA motifs for specific RNA-binding proteins in trypanosomes.** *BMC Molecular Biology* 2008, 9:107

NOGUEIRA, N. F. S.; GONZALEZ, M. S.; GOMES, E. ***Trypanosoma cruzi*: involvement of glycoinositolphospholipids in the attachment to the**

luminal midgut surface of *Rhodnius prolixus*. *Experimental Parasitology*, vol. 116, no. 2, pp. 120–128, 2007.

OLIVEIRA, M. F.; NAGAO-DIAS, A. T.; PONTES, V. M. O.; SOUZA JÚNIOR, A. S.; COELHO, H. L. L.; COELHO, I, C, B. **Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil.** *Revista de patologia tropical* - Vol. 37 (3): 209-228. jul.-set. 2008.

OUELLETTE, M.; PAPADOPOULOU, B. **Coordinated gene expression by post-transcriptional regulons in African trypanosomes.** *Journal of Biology*, p. 100. 2009.

PORTELA-LINDOSO, A. A. B.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. **Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase.** *Revista Saúde Pública* 37(1) :107-15, 2003.

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais.** 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. cap. 20, 21, 22 e 23, p. 280-343.

ROMAGNOLI, B. A. A. **Caracterização das proteínas ZFP11, ZFP29 e ZFPTTP em *Trypanosoma cruzi*.** Trabalho de Conclusão de Curso, UFPR, 2013.

SANCHEZ-DIAS, P; PENALVA, L. O. F. **Post-transcription meets post-genomic: the saga of RNA binding proteins in a new era.** *RNA Biology*3:3, 101-109, 2006.

SMIRCICH, P.; EASTMAN, G.; BISPO, S.; DUHAGON, M. A.; GUERRA-SLOMPO, E. P.; GARAT, B.; GOLDENBERG, S.; MUNROE, D. J.; DALLAGIOVANNA, B.; HOLETZ, F. B. **Ribosome profiling reveals translation control as a key mechanism generating differential gene expression in *Trypanosoma cruzi*.** *BMC Genomics*16:443, 2015.

TARLETON, R. L. **Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*.** *Current Opinion in Immunology*, vol. 19, no. 4, pp. 430–434, 2007.

VICKERMAN, K. **Developmental cycles and biology of pahotenic trypanosomes.** *Br Med Bull.*41:105-14, 1985.

WHO – World Health Organization. Control of Chagas Disease – Second Report of the WHO Expert Committee. **Who Technical Report Series.** n. 905. Geneva, 2002.