

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ



NORMANDA SOUZA MELO

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DAS δ -AMASTINAS DE
Trypanosoma cruzi

CURITIBA

2012

NORMANDA SOUZA MELO

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DAS δ -AMASTINAS DE

Trypanosoma cruzi

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre em Ciências –
Bioquímica, no Curso de Pós-Graduação em
Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Wanderson Duarte Da
Rocha

CURITIBA

2012

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Melo, Normanda Souza
Caracterização funcional das δ -amastinas de *Trypanosoma cruzi*. /
Normanda Souza Melo. – Curitiba, 2012.
94 p.: il.

Orientador: Wanderson Duarte Da Rocha

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências -
Bioquímica.

1. *Trypanosoma cruzi* 2. Chagas, Doença de 3. Proteínas I. Título II.
Rocha, Wanderson Duarte da III. Universidade Federal do Paraná. Setor
de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências-
Bioquímica.

CDD (22. ed.) 616.9363

TERMO DE APROVAÇÃO

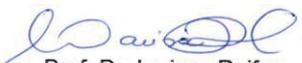
NORMANDA SOUZA MELO

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DAS δ -AMASTINAS DE
*Trypanosoma cruzi***

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. Wanderson D. da Rocha
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR



Prof. Dr. Larissa Reifur
Departamento Patologia Básica, UFPR



Prof. Dr. Fabricio Klerlynton Marchini
Fundação Oswaldo Cruz, Curitiba-PR

Curitiba, 29 de Fevereiro de 2012

Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais Rubens e Fátima, aos meus irmãos Rubinho e Larissa, a meu pai de coração Antônio e aos meus amigos irmãos. Vocês foram peças essenciais na concretização deste sonho, a vocês a minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado forças para alcançar mais este sonho, e ter me carregado nas horas em que nem eu acreditava em mim. Obrigada Senhor.

Ao meu orientador Wanderson da Rocha pela paciência em primeiro lugar e por me aceitar como orientanda. Você é um exemplo de pesquisador e superação é prazeroso ver o quanto que o nosso laboratório cresceu profissionalmente.

Aos professores Santuza Teixeira, Larissa Magalhães e Renato Mortara, pela colaboração em nosso trabalho.

Ao Núcleo de fixação de nitrogênio por ceder o seu espaço e equipamentos para a realização dos experimentos.

As minhas amigas de laboratório Brow (Mônica) e Leti, por participarem dos momentos bons e ruins de experimentos e confusão mental. Obrigada pela sensibilidade de cada dia (não sei o que seria de mim sem ela), por me ensinarem a falar e ouvir melhor e compartilharem comigo a trilha sonora de cada dia (Always – Bon Jovi e Dias incertos – Blindagem).

Aos ICs Laiane, Rodrigo e Ana Paula, pela amizade e ajuda nos experimentos. Em especial a Laiane que sempre me ajudou a achar as minhas chaves e meu celular todos os dias, obrigada por ser o meu terceiro olho.

À Juliana Kenski e Fernanda Barbosa das oxidações, por me ajudarem nas análises de citometria de fluxo.

À Fhernanda Smiderle e Yanna dos carboidratos, e Alessandra e Juliana da patologia, pelo apoio técnico, carinho e atenção. Muito obrigada mesmo, não sei o que teria sido dos meus *Westerns blot* sem vocês.

Ao Walter e Dona Rose Prado pelo suporte técnico e atenção. Em especial ao Walter pelas piadas e a “super” musicalidade.

Ao Gustavo e seu Nino da Biologia celular, pela ajuda na captação de imagem no confocal.

Aos meus pais e minha família pelo amor incondicional e por abdicarem muitas vezes dos seus sonhos para que esta vitória fosse alcançada. Quero agradecer por confiarem em mim, mesmo quando eu não confiava e acreditava. Amo muito vocês.

Aos meus irmãos Rubinho e Larissa, que suavizaram as dificuldades que encontrei por esses dois anos. Obrigada pelo carinho e companheirismo. Amo vocês.

Aos meus Nenês (Camila e Carina) vocês são as minhas irmãs adotadas. Obrigada por entenderem as minhas imperfeições e se tornarem perfeitas para mim com as suas imperfeições. Não encontro uma palavra científica-filosófica-emocional uai, que expresse o quão grande é o meu carinho por vocês. Amo vocês.

Aos meus amigos irmãos Isadora, Raquel, Ana Clara, Valessa, Nessana, Danilo, João, Jason e Felipe por acreditarem em mim. Obrigada pelo carinho, cuidado e pelas palavras de consolo nos momentos difíceis.

Aos amigos da pós-graduação em especial a Vânia, Marina, Dida, Anelis, Liziane, Carina, Cris, Ju Amorim, Bruno, Evandro, Rhayla, Paty, Marília, Louise, Luciano, Eduardo, Marco Aurélio, Danilo, Arqui, Tuca e Carol, pelos sorrisos, carinho, bons dias, ois e os “vamos para o América? Afinal hoje é aniversário de (?)”.

Aos coordenadores do Curso de Pós-Graduação, Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá e Prof^a Dr^a Sílvia M. Cadena por toda dedicação prestada a nós.

A todos os professores, pós-graduandos e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR.

À CAPES, Fundação Araucária e CNPq pelo apoio financeiro.

Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais. A vida não é rigorosa, ela propicia erros e acertos. Os erros podem ser transformados em acertos quando com eles se aprende. Melhor é errar por tentar do que errar por omitir!”

(Augusto Cury)

RESUMO

A doença de Chagas tem como agente etiológico o *Trypanosoma cruzi*. O estudo da composição proteica da superfície do parasito é de extrema importância, visto que nela se encontra a primeira linha de contato com a célula hospedeira. A forma replicativa no hospedeiro vertebrado (amastigota) possui a sua composição proteica da superfície ainda pouco descrita, mas sabe-se que algumas das proteínas já identificadas são de grande relevância para a resposta imune e persistência da infecção no decorrer da doença. Dentre as proteínas identificadas para esta forma destacam-se as amastinas, que são 50 vezes mais expressas em amastigota em comparação com as demais formas e possuem expressão diferenciada em linhagens de *T. cruzi*. Elas são codificadas por famílias multigênicas é composta por 174 aminoácidos com 4 regiões transmembranas (sendo que no N-terminal existe um provável peptídeo sinal) e 3 hidrofílicas. Nessas proteínas é possível identificar vários sítios potenciais de O-glicosilação. No genoma de *T. cruzi*, cepa CL Brener, é possível encontrar 3 tipos de amastinas as δ -amastinas, $\rho\delta$ -amastina e β -amastinas. A fim de elucidar a função das amastinas, investigamos as alterações fenotípicas causadas pela superexpressão de δ -amastinas mutadas fusionadas com GFP em epimastigotas de cepa G *T. cruzi* (cepa que não expressa amastina). Nós optamos pelas mutações, porque estudos de função gênica das amastinas em *T. cruzi* são limitados, devido a sua estrutura multigênica e a ausência da maquinaria iRNA neste tripanossomatídeo. Neste trabalho substituímos em δ -amastina (TcA21) fusionada com GFP, resíduos de aminoácidos conservados de treonina nas posições 37, 40, 44, 55 e 60 (5TM), possíveis pontos de O-glicosilação, e cisteína na posição 42 (1CM), que pode formar pontes dissulfeto, por alanina. Também fizemos outra construção contendo a região do provável peptídeo sinal fusionado com GFP (SP). Os clones dos parasitos transfectados superexpressando as amastinas selvagens em fusão com GFP (AF) e 1CM, apresentaram as proteínas em fusão com GFP localizadas na membrana citoplasmática, já o para o transfectado 5TM foi possível notar que além da localização de membrana citoplasmática o parasito apresenta uma localização dispersa no citoplasma. A localização do SP é evidenciada principalmente no envoltório perinuclear, mas também apresenta uma localização dispersa no citoplasma. As análises dos *Western blots* do extrato protéico total confirmaram a expressão das proteínas com os tamanhos esperados de 44,16 kDa para AF, 5TM e 1CM e 33,31 kDa para o SP. Os *Western blots* das frações enriquecidas solúveis citoplasmáticas e organelares e fração enriquecida de membrana, confirmaram a localização das construções AF, 5TM, 1CM e SP nas frações enriquecidas de membrana. As análises dos *Western blots* em diferentes condições de desnaturação sugerem que a amastina não seja glicosilada e que a banda de alto peso molecular encontrada seja um artefato, devido a agregação protéica gerada pela alta temperatura e a concentração de β -mercaptoetanol. As culturas dos transfectados não apresentam diferenças na taxa de crescimento, mas apresentam uma alteração no número de tripomastigota em cultura envelhecida. O transfectado AF apresenta uma taxa de diferenciação significativamente superior a dos demais. Já os mutantes 5TM e 1CM se comportam como o selvagem.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, amastigota, amastina.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is the etiologic agent of Chagas disease. The study of protein composition of the surface of the parasite is extremely important, since it is the first line of contact with the host cell. The replicative form in the vertebrate host (amastigotes) has its protein composition of the surface still poorly described, but it is known that some of the proteins already identified are of great relevance for the immune response and persistence of infection during the disease. Among the proteins identified for this form amastins stand out, which is 50 times as expressed in amastigotes in comparison with other forms and has differential expression in strains of *T. cruzi*. They are encoded by multigene families are composed of 174 amino acids with four transmembrane regions (where the N-terminus has a potential signal peptide) and third hydrophilic proteins can be identified that several potential sites for O-glycosylation. *T. cruzi* CL is possible to find three types of the amastin, the δ -amastins, $\rho\delta$ -amastin and β -amastins. In order to elucidate the function of amastins, we investigated the phenotypic changes caused by over expression of δ -amastinas mutated fused with GFP in epimastigotes of strain G *T. cruzi* (strain that does not express amastin). We opted for change because studies of gene function in *T. amastins cruzi* infection are limited due to its structure and the absence of multigene machinery IRNA this trypanosomatid. In this work we replace in δ -amastin (TcA21) fused to GFP, the amino acid residues conserved threonine at positions 37, 40, 44, 55 and 60 (5TM), possible points of O-glycosylation, and cysteine at position 42 (1cm) , which may form disulfide bonds, by alanine. We also made another construct containing the region of probable signal peptide fused to GFP (SP). Clones of transfected parasites over expressing the wild amastins fused with GFP (AF) and 1CM were located in the cytoplasmic membrane, as for the transfected 5TM was possible to note that beyond the cytoplasmic membrane localization of the parasite is located in a dispersed in the cytoplasm and nuclear envelope, the same marking on the nuclear envelope and cytoplasmic was observed in transfected SP (which has no marking on the cytoplasmic membrane). Analyses of Western blots of total protein extracts confirmed the expression of proteins with the expected sizes of 44.16 kDa for AF and 5TM and 1CM and 33.31 kDa for the SP. The Western blots of fractions enriched organelares soluble cytoplasmic and membrane-enriched fraction and confirmed the location of buildings AF, 5TM, 1CM and SP fractions enriched in the membrane. The analysis of Western blots in different denaturing conditions suggests that amastina not glycosylated and that the band of high molecular weight found to be an artifact due to protein aggregation generated by the high temperature and concentration of β -mercaptoethanol. The transfected cultures do not exhibit the differentiation in growth rate, but have a change in the number of aged trypomastigote in culture. The transfected AF has a significantly higher rate of differentiation of the other. Since the mutants 5TM 1CM and behave like the wild.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, amastigote, amastin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DAS ESTRUTURAS CELULARES DO <i>T. cruzi</i> | 22 |
| FIGURA 2 – CICLO BIOLÓGICO DO <i>Trypanosoma cruzi</i> | 24 |
| FIGURA 3 – ESQUEMA DE INVASÃO DA CÉLULA HOSPEDEIRA PELO <i>T. cruzi</i> | 25 |
| FIGURA 4 – MODELO DE EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSOMATÍDEOS..... | 30 |
| FIGURA 5 – CONSERVAÇÃO DE RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS DAS SEQUÊNCIAS DE AMASTINAS DE SEIS CEPAS DE <i>T. cruzi</i> PERTENCENTES ÀS LINHAGENS I E II..... | 34 |
| FIGURA 6 – ESQUEMA DA ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DAS AMASTINAS NA CEPA CL BRENER DE <i>T. cruzi</i> | 35 |
| FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO DO ALINHAMENTO DAS DIFERENTES SUBFAMÍLIAS DE AMASTINAS PRESENTES NO GENOMA DE CL BRENER DE <i>T. cruzi</i> | 37 |
| FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO DO ALINHAMENTO DAS δ -AMASTINAS PRESENTES NO GENOMA DE CL BRENER DE <i>T. cruzi</i> | 39 |
| FIGURA 9 – MAPA DO VETOR PTREXGFPNEO | 45 |
| FIGURA 10 – MAPA DO VETOR pTREXAmaFGFPNeo | 46 |
| FIGURA 11 – ESTRATÉGIA DE CLONAGEM PARA A CONSTRUÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO DE δ -AMASTINA (TcA21) COM MUTAÇÕES SÍTIO DIRIGIDAS PARA AS TREONINAS 37, 40, 44, 55 E 60. | 48 |
| FIGURA 12 – ESTRATÉGIA DE CLONAGEM PARA A CONSTRUÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO DE δ -AMASTINA (TcA21) COM MUTAÇÕES SÍTIO DIRIGIDAS NAS CISTEÍNAS 42 E 139 | 51 |
| FIGURA 13 – ESQUEMA DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO E VETORES DE EXPRESSÃO DAS FORMAS DE δ -AMASTINAS MUTADAS..... | 63 |
| FIGURA 14 – GEL DE PURIFICAÇÃO DO MEGAPRIMER PARA A INSERÇÃO DAS MUTAÇÕES NAS CISTEÍNAS. | 64 |
| FIGURA 15 – PERFIL DE RESTRIÇÃO DOS VETORES DIGERIDOS COM AS ENDONUCLEASES Xba I E Xho I. | 65 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 16 – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS DA δ -AMASTINA TcA21 COM O MUTANTE 5TM..... | 66 |
| FIGURA 17 – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS DA δ -AMASTINA TcA21 COM O MUTANTE 2CM. | 67 |
| FIGURA 18 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS CULTURAS DE EPIMASTIGOTAS ANALISADAS POR CITOMETRIA DE FLUXO..... | 69 |
| FIGURA 19 – LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DAS PROTEÍNAS δ -AMASTINA SELVAGEM E MUTADAS EM FUSÃO COM GFP EXPRESSAS EM FORMAS EPIMASTIGOTAS DA CEPA G DE <i>T. cruzi</i> | 71 |
| FIGURA 20 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DESNATURANTES POR MEIO DE WESTERN BLOT..... | 73 |
| FIGURA 21 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO MUTADAS E SELVAGENS..... | 74 |
| FIGURA 22 – LOCALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS DAS FRAÇÕES SUBCELULARES DOS EPIMASTIGOTAS TRANFECTADOS..... | 76 |
| FIGURA 23 – CURVA DE CRESCIMENTO DOS EPIMASTIGOTAS TRANFECTADOS E SELVAGEM..... | 78 |
| FIGURA 24 – PORCENTAGEM DE TRIPOMASTIGOTAS DOS TRANFECTADOS EM CULTURA ENVELHECIDA. | 79 |
| FIGURA 25 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE CITOMETRIA DE FLUXO USADA PARA DETERMINAR A FLUORESCÊNCIA DE GFP NAS CULTURAS ENVELHECIDAS POR 13 DIAS DA CEPA G WT E TRANFECTADAS | 80 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1 – INICIADORES | 43 |
| TABELA 2 – MICRORGANISMOS | 43 |
| TABELA 3 – PLASMÍDEOS | 44 |
| TABELA 4 – LISTA DOS FRAGMENTOS LIBERADOS DOS VETORES APÓS DIGESTÃO COM AS ENZIMAS Xba I E XhoI..... | 54 |

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE – amastigota extracelular

AI – amastigota intracelular

ATP – adenosina trifosfato

CFr – fração solúvel enriquecida de proteínas citoplasmáticas

cSSR – UTPs orientadas de forma convergente

dSSR – UTPs orientadas de forma divergente

DTU – *discrete typing units*

GP– glicoproteína

GPI – glicosilfosfatidilinositol

gRNA – RNA guia

iTSS – sítio de início de transcrição da RNA Pol II no interior da UTP kDNA – DNA presente no cinetoplasto

LIT - *liver infusion triptose*

MASPs – proteínas de superfície associadas a mucinas

mRNA – RNA mensageiro

PCR – reação em cadeia da polimerase

PFGE – eletroforese em gel de campo pulsado

PoliPi – região rica em polipirimidinas

RNA pol II – RNA polimerase II

RNAi – RNA de interferência

SFB – soro fetal bovino

SL – *spliced leader*

SP – Peptídeo sinal

tRNA – RNA transportador

TS – trans-sialidade

TSS – sítio de início de transcrição da RNA Pol II

TTS – região de término da transcrição

UTP – unidade de transcrição policistrônicas

UTR – região não traduzida

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 17 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 19 |
| 2.1. A DOENÇA DE CHAGAS | 19 |
| 2.2. ASPECTOS GERAIS E BASES MOLECULARES DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> | 21 |
| 2.3. PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS EM <i>T. CRUZI</i> | 31 |
| 2.4. AMASTINAS..... | 33 |
| 3. JUSTIFICATIVA | 41 |
| 4. OBJETIVOS | 42 |
| 4.1. OBJETIVO GERAL..... | 42 |
| 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 42 |
| 5. MATERIAIS E MÉTODOS | 43 |
| 5.1. INICIADORES, MICRORGANISMOS E PLASMÍDEOS | 43 |
| 5.2. VETORES | 44 |
| 5.3. PREPARO DE CÉLULA COMPETENTE..... | 52 |
| 5.4. TRANSFORMAÇÃO EM CÉLULA <i>ESCHERICHIA COLI</i> DH10B | 53 |
| 5.5. SELEÇÃO DOS CLONES BACTERIANOS POSITIVOS..... | 53 |
| 5.6. OBTENÇÃO DE DNA PLASMIDIAL EM PEQUENA ESCALA – MINIPREP | 54 |
| 5.7. OBTENÇÃO DE DNA PLASMIDIANO EM LARGA ESCALA – MIDIPREP | 54 |
| 5.8. SEQUENCIAMENTO DOS VETORES pT5TM E pT1CM | 55 |
| 5.9. CULTURAS DE <i>T. CRUZI</i> | 55 |
| 5.10. TRANSFEÇÃO DE FORMAS EPIMASTIGOTAS DO <i>TRYPANOSOMA</i> <i>CRUZI</i> | 56 |
| 5.11. SELEÇÃO DOS PARASITOS TRANSFECTADOS | 56 |
| 5.12. MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA E CONFOCAL | 57 |
| 5.13. ANÁLISE DO <i>T. CRUZI</i> POR CITOMETRIA DE FLUXO..... | 57 |

| | |
|--|-----------|
| 5.14. CURVA DE CRESCIMENTO DOS PARASITOS TRANSFECTADOS.. | 58 |
| 5.15. DIFERENCIAÇÃO CELULAR DE EPIMASTIGOTAS EM TRIPOMASTIGOTAS..... | 58 |
| 5.16. OBTENÇÃO DE EXTRATO PROTÉICO TOTAL DE EPIMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i> | 59 |
| 5.17. OBTENÇÃO DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA DE MEMBRANA DE EPIMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i> | 59 |
| 5.18. SDS-PAGE DO EXTRATO PROTÉICO TOTAL E DAS FRAÇÕES ENRIQUECIDAS..... | 60 |
| 5.19. COLORAÇÃO COM AZUL DE COMASSIE | 60 |
| 5.20. COLORAÇÃO COM PRATA..... | 60 |
| 5.21. WESTERN BLOT DE PROTEÍNAS DE EPIMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i> | 61 |
| 6. RESULTADOS..... | 62 |
| 6.1. CONSTRUÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO ECTÓPICA DE Δ - AMASTINAS MUTADAS EM <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> | 62 |
| 6.2. OBTENÇÃO DOS TRANSFECTANTES COM OS VETORES pT5TM, pT1CM E pTSP..... | 68 |
| 6.3. AVALIAÇÃO E LOCALIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS FLUORESCENTES..... | 70 |
| 6.4. CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO NA SUPERFÍCIE DE EPIMASTIGOTAS..... | 75 |
| 7. DISCUSSÃO | 81 |
| 8. CONCLUSÕES..... | 88 |
| 9. PERSPECTIVAS..... | 89 |
| REFERÊNCIAS..... | 90 |

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é uma parasitose que acomete cerca 8 milhões da população mundial e tem como agente etiológico o *Trypanosoma cruzi* (WHO, 2010). Estima-se que aproximadamente 30% dos afetados possam evoluir para a fase crônica, culminando no óbito, devido a complicações decorrentes de insuficiência cardíaca e/ou digestiva.

Diferente de outros eucariotos superiores, a transcrição gênica em tripanossomatídeos ocorre por meio de unidades de transcrição policistrônicas (UTP) que são processadas por reações acopladas de *trans-splicing* e poliadenilação, originando RNAs mensageiros (mRNA) maduros monocistrônicos. A regulação ocorre principalmente a nível pós-transcricional, devido à falta de promotor clássico para RNA polimerase II, gerando níveis proteicos diferenciais estágio específico. Uma das classes de genes diferencialmente expressos em *T. cruzi* são da família amastina, proteínas de superfície que podem desempenhar um importante papel durante o processo infeccioso.

As amastinas apresentam ~174 aminoácidos (~20 kDa) organizados estruturalmente em quatro regiões hidrofóbicas e três porções hidrofílicas com alto grau de variabilidade. Em *T. cruzi* existem três subfamílias das amastinas, delta (δ), pseudo-delta ($\rho\delta$) e beta (β). As amastinas do tipo δ de *T. cruzi* são diferencialmente expressas em amastigotas, apresentando um nível de mRNA 50 vezes maior nesta forma quando comparado às demais. As funções destas proteínas são desconhecidas, contudo acredita-se que possam estar envolvidas com as interações parasito-hospedeiro e/ou na transdução de sinal ligado à membrana. A amastina encontram-se entre os antígenos mais imunogênicos em *Leishmania* spp., sendo uma forte candidata a vacina e biomarcador relevante para diagnóstico sorológico.

Estudos de função gênica das amastinas em *T. cruzi* são limitados, devido a sua estrutura multigênica e ausência (ineficiência) do mecanismo de interferência de RNA (iRNA) para silenciamento gênico no parasito.

A fim de elucidar a função das amastinas, neste trabalho foi realizado a superexpressão de formas selvagem e mutadas de δ -amastina em epimastigotas. As formas mutadas contêm mutações pontuais em treoninas

(prováveis sítios de O-glicosilação) ou cisteínas que são conservadas na estrutura primária das amastinas. Estas abordagens tem como finalidade a análise de alterações fenotípicas no parasito, que podem fornecer indícios do papel das amastinas em *T. cruzi*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A DOENÇA DE CHAGAS

A Doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana é uma parasitose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e acomete cerca 8 milhões da população mundial, principalmente na América Latina (WHO, 2010). A região endêmica abrange todos os países da América Central, do Sul e o México. As maiores taxas de prevalência são encontradas na Bolívia (6,75%), Argentina (4,13%) e Paraguai (2,54%). O Brasil e México possuem prevalência de 1% (BERN e MONTGOMERY, 2009; VAZQUEZ-PROKOPEC *et al.*, 2009; BERN *et al.*, 2011). Apesar da grande abrangência da infecção, nos últimos anos houve uma redução substancial, devido ao êxito do controle vetorial e a programas de triagem dos sistemas de hemoterapia (WHO, 2010).

A forma de transmissão do parasito com maior prevalência ocorre por via vetorial, por insetos hematófagos da subfamília Triatominae. Durante o repasto sanguíneo os parasitos são eliminados nas excretas infectando o hospedeiro mamífero por meio das descontinuidades da pele ou mucosas (COURA; DIAS, 2009). Outras formas de transmissão incluem a transfusão sanguínea, o transplante de órgãos, transmissão congênita, acidentes laboratoriais e recentemente a transmissão por via oral (COURA e DIAS, 2009; BELTRÃO *et al.*, 2009; BERN *et al.*, 2011).

A sintomatologia da doença de Chagas é variável, dependente da cepa infectante do parasito, resposta imunológica do hospedeiro e fase de curso da doença (WAGNER *et al.*, 1990).

O período de incubação é de 1 a 2 semanas. Instalada a doença, a fase aguda perdura de 8 a 12 semanas, sendo caracterizada pela circulação de tripomastigotas na corrente sanguínea. A maioria dos pacientes são assintomáticos ou apresentam sintomatologia inespecífica. Em alguns casos a manifestação clínica aguda mais comum é o inchaço no local da inoculação conhecida como Chagoma (BARRET *et al.*, 2003; MONCAYO *et al.*, 2009; RASSI *et al.*, 2010).

A infecção aguda oral pelo *T. cruzi* está associada a uma maior mortalidade (BELTRÃO *et al.*, 2009). Dados recentes sugerem que o contato do parasito com o suco gástrico do hospedeiro torna a forma tripomastigota mais

invasiva, pois favorece a modificação da superfície celular com glicoproteínas mais resistentes a ação do suco gástrico (COVARRUBIAS *et al.*, 2007).

Após 12 semanas de infecção, a parasitemia diminui e os indivíduos passam para a fase crônica da infecção chagásica. Nesta fase, mesmo com baixa parasitemia no sangue periférico, o potencial de transmissão é mantido tanto para o vetor triatomíneo, quanto para outros mamíferos (BERN *et al.*, 2011). A forma indeterminada da fase crônica é caracterizada pela ausência de sintomatologia, exames radiológicos do tórax, esôfago e cólon normais e sorologia anti-*T. cruzi* positiva. A evolução desta fase pode perdurar por toda a vida do paciente. Estima-se que aproximadamente 30% dos indivíduos nesta fase progridam para as formas mais severas, como cardíacas e/ou gastrointestinal (BERN *et al.*, 2011; MONCAYO *et al.*, 2009).

O tratamento da doença de Chagas é feito com Nifurtimox e Benzonidazol. Fármacos que têm como mecanismo de ação a formação de radicais livres e metabólitos eletrofílicos. No entanto, podem gerar efeitos citotóxicos. Estas drogas são eficazes na fase aguda da doença e apresentam baixa eficácia na fase crônica (DIAS *et al.*, 2009; GONZÁLEZ *et al.*, 2011).

2.2. ASPECTOS GERAIS E BASES MOLECULARES DO *Trypanosoma cruzi*

2.2.1. Classificação taxonômica e aspectos celulares

Trypanosoma cruzi é um eucarionte unicelular flagelado, do reino Protista, da Ordem Kinetoplastida, da Família Trypanosomatidae, Gênero *Trypanosoma* e espécie *Trypanosoma cruzi*.

Os principais membros da Família Trypanosomatidae de importância médica são: *Trypanosoma cruzi*, agente causador da Doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana, *Trypanosoma brucei*, agente etiológico da Doença do Sono ou Tripanossomíase Africana e Nagana e *Leishmania* spp., agentes causadores das Leishmanioses (OPS/WHO/NTD/IDM, 2006).

Recentemente foi proposta a subdivisão da espécie de *T. cruzi* em seis grupos distintos (DTUs), nomeados Tc I – VI (ZINGALES *et al.*, 2009). Os grupos foram definidos de acordo com parâmetros de complexidade eco-epidemiológica, bioquímica e genética das linhagens, entre outros. As linhagens referências para cada DTU são: Sylvio X10 cl1 (TcI), Esmeraldo cl3 (TcII), M5631 cl5 (TcIII), Can III cl1 (TcIV), Sc43 cl1 (TcV) e CL Brener (TcVI). As cepas pertencentes à DTU TcI estão associadas principalmente ao ciclo silvestre da doença, sendo os mamíferos de pequeno porte como *Didelphis marsupialis* o principal hospedeiro definitivo. As outras DTUs possuem uma maior associação ao ciclo doméstico sendo o *Homo sapiens* o hospedeiro principal. As cepas TcV e TcVI são híbridos das linhagens TcII com TcIII (MILES *et al.*, 2009; ZINGALES *et al.*, 2009).

Quanto à biologia celular de Tripanossomatídeos pode-se destacar a compartimentalização de vias metabólicas e/ou especialização de organelas não usuais em outros eucariotos. Estruturalmente, *T. cruzi* apresenta superfície celular composta por membrana plasmática associada a camada de microtúbulos sub-peliculares (Figura 1). Possui flagelo único com comprimento variável que emerge de uma estrutura denominada bolsa flagelar, região de invaginação da membrana plasmática isolada do meio extracelular especializada em atividades endocítica e exocítica (DeSOUZA, 2009). O retículo endoplasmático está distribuído ao longo do corpo do parasito, enquanto as cisternas do complexo de Golgi estão localizadas na porção anterior do corpo celular próximo ao cinetoplasto e à bolsa flagelar. Assim como todos os

organismos pertencentes à Ordem Kinetoplastida, o *T. cruzi* possui uma mitocôndria única, com um complexo arranjo de fibrilas de DNA na matriz mitocondrial que forma uma estrutura conhecida como Cinetoplasto (DeSOUZA, 2009).

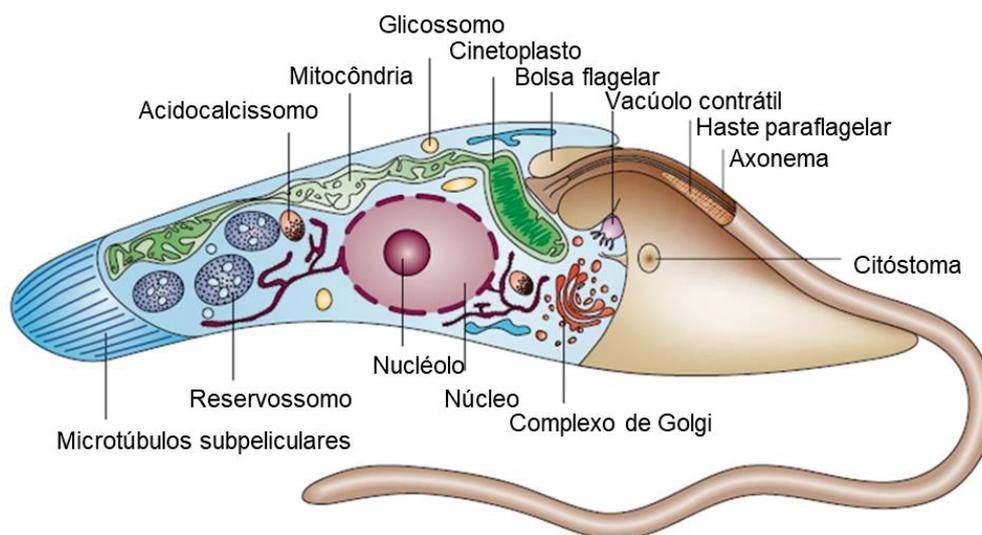


FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DAS ESTRUTURAS CELULARES DO *T. cruzi*
FONTE: Modificado de DoCAMPO *et al.*, 2005.

O núcleo possui forma e localização variável, entretanto é composto por membrana nuclear porosa como as demais células eucarióticas e possui uma continuidade da membrana nuclear externa com o retículo endoplasmático (DeSOUZA, 2009).

Os glicossomos, são organelas ricas em catalases, contêm enzimas responsáveis pela realização da β -oxidação e apresentam as sete primeiras enzimas de conversão da glicose a 3-fosfoglicerato da via glicolítica e enzimas do metabolismo de pirimidina e da via das pentoses fosfato, exceto das purinas (PENHA *et al.*, 2009).

Os acidocalcissomos são organelas capazes de armazenar prótons e cálcio, possuem grânulos de polifosfato inorgânico (PoliP), que são polímeros de fosfato responsável pela acidez da organela. Várias enzimas já foram detectadas nesta organela, como polifosfato quinase, exopolifosfatase, pirofosfatase, para compostos solúveis inorgânicos, e metacaspase. (DeSOUZA, 2009; DoCAMPO e MORENO, 2011).

Os reservossomos são organelas responsáveis pela digestão celular do material endocitado e são compostos principalmente por lipídeos (colesterol e ergosterol). As análises proteômicas dos reservossomos isolados e fração de membrana identificaram a presença de diversas proteases e enzimas associadas ao metabolismo de lipídios, bem como proteínas transportadoras ABC e um homólogo da proteína Rab 18 de mamíferos que tem a capacidade de se associar a GTP ou GDP (HUTAGALUNG e NOVICK, 2011; PEREIRA *et al.*, 2011).

2.2.2. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*

O ciclo de vida do parasito *Trypanosoma cruzi* é heteroxênico (Figura 2), envolvendo hospedeiros vertebrados (mamíferos) e invertebrados (vetores triatomíneos), com formas parasitárias específicas. No ciclo natural de infecção as formas tripomastigostas metacíclicas (formas infectivas para o hospedeiro vertebrado) são eliminadas nas excretas do triatomíneo no ato do repasto sanguíneo. Ao penetrarem no local lesionado, interagem com as células da pele e/ou mucosa (YOSHIDA 2009; KEMMERLING, 2010). O mecanismo de entrada dos tripomastigotas metacíclicos em células depende primeiramente do reconhecimento e ligação aos receptores de superfície. Isso é possível devido ao enorme número de proteínas de superfície do parasito (SIBLEY, 2011). As principais proteínas de superfície desta forma são glicoproteínas (GP), mucinas, mucinas associadas a proteínas de superfície (MASPs) e trans-sialidase (TS) (BARTHOLOMEU *et al.*, 2009; YOSHIDA, 2009).

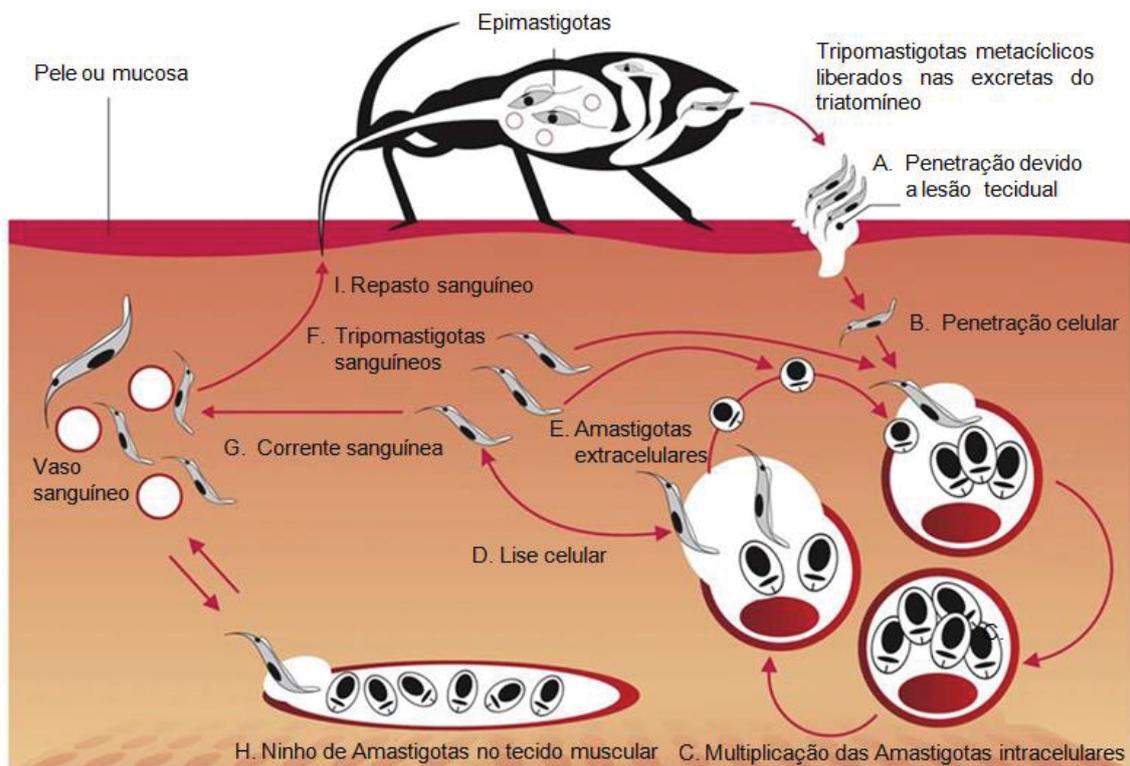


FIGURA 2 – CICLO BIOLÓGICO DO *Trypanosoma cruzi*

FONTE: Modificado de LIMA *et al.*, 2010.

NOTA: Os epimastigotas presentes no intestino médio do triatomíneo (vetor hematófago) diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos e são liberados nas excretas durante o repasto sanguíneo e penetram nas células locais por meio da lesão tecidual após a picada (A, B). Os parasitos sofrem internalização e permanecem por algumas horas no interior do vacúolo parasitóforo, que sofre lise, devido à acidificação do meio, ativando assim fatores líticos. Ao atingirem o citoplasma o tripomastigotas metacíclicos diferenciam-se em amastigotas, que sofrem sucessivas divisões binárias (C). As formas amastigotas no interior da célula se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos (F) que são liberados após o rompimento celular, atingindo assim a corrente sanguínea infectando outros tecidos (G, H) ou outro triatomíneo (I). Alternativamente, os amastigotas que são prematuramente liberados das células infectadas, ou derivados da diferenciação de tripomastigotas extracelulares, também podem invadir células e sustentar assim um ciclo infeccioso (E).

Os passos do processo de interação *T. cruzi* – células hospedeiras podem ser divididos em três fases: adesão/reconhecimento, sinalização e invasão (DeSOUZA *et al.*, 2010). A etapa de adesão envolve o reconhecimento das moléculas presentes nas superfícies parasitária e hospedeira, não excluindo a possibilidade de moléculas secretadas também desempenharem um papel importante neste processo. Diferentes cepas bem como diferentes formas parasitárias expressam em sua superfície moléculas distintas, como por exemplo, gp85 nas formas tripomastigotas e amastina em amastigota (TEIXEIRA *et al.*, 1994).

A invasão pode acontecer por três mecanismos distintos de entrada na célula hospedeira (Figura 3): via lisossomo dependente, ativada pelo Cálcio (Ca^{2+}) que promove o recrutamento de lisossomos para o sítio de entrada do parasito; via dependente de actina, que há despolimerização da actina do citoesqueleto, promovendo expansão da membrana plasmática e via lisossomo independente, provocando invaginação da membrana, devido ao acúmulo de PIP_3 (produto de ativação da fosfatidilinositol-3-cinase). Estas 3 vias culminam na fusão da membrana da célula hospedeira e formação do vacúolo parasitóforo (MORTARA, 1991; DeSOUZA *et al.*, 2010).

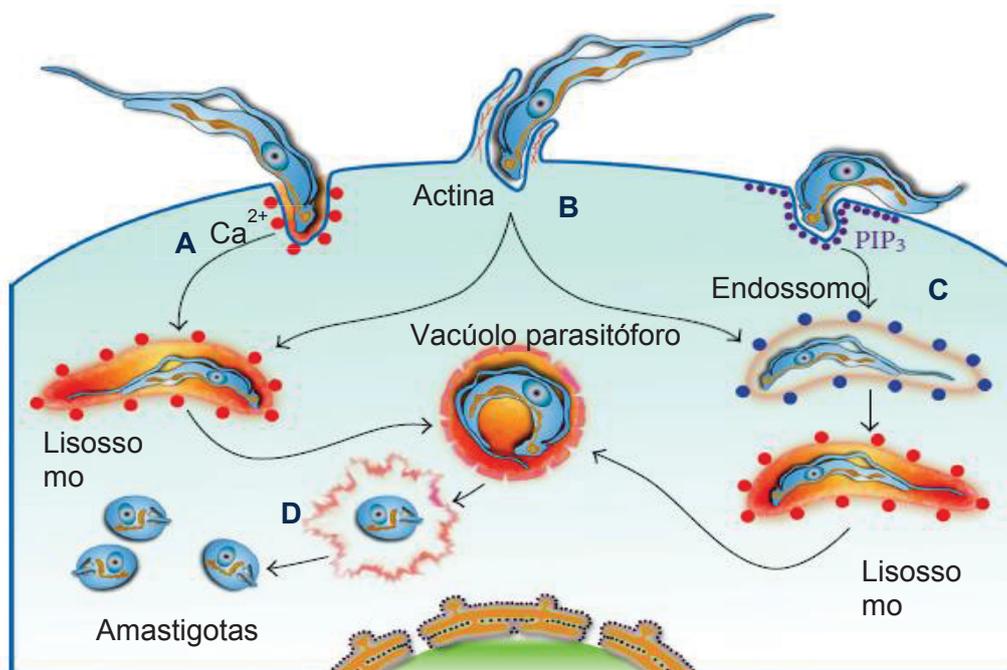


FIGURA 3 – ESQUEMA DE INVASÃO DA CÉLULA HOSPEDEIRA PELO *T. cruzi*

FONTE: Modificado de DeSOUZA *et al.*, 2010.

NOTA: A) Via lisossomo-dependente. B) Via dependente de actina. C) Via lisossomo independente. D) Diferenciação em amastigotas.

Após a finalização do processo de internalização e formação do vacúolo parasitóforo, há acidificação do meio e secreção de fatores líticos, promovendo a ruptura do vacúolo parasitóforo, dando ao parasito livre acesso ao citoplasma da célula hospedeira. Uma vez no citoplasma os tripomastigotas metacíclicos se diferenciam em amastigotas (amastigogênese) que se replicam por divisões binárias, diferenciando-se em formas tripomastigotas sanguíneas não-

replicativas, as quais podem infectar diferentes tecidos, ou serem ingeridas pelos triatomíneos durante o ato de hematofagia (LIMA *et al.*, 2010).

No sistema digestório do inseto, as tripomastigotas sanguíneas entram em contato com o suco gástrico diferenciando em epimastigotas (formas replicativas no hospedeiro invertebrado) que migram para o intestino médio, local em que realizam divisões binárias simples. Estas formas migram para a porção terminal do tubo digestório, onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas (metaciclogênese) que são eliminadas nas excretas durante a hematofagia, reiniciando assim o ciclo no hospedeiro vertebrado (OPS/WHO/NTD/IDM, 2006).

Uma estratégia alternativa de infecção é a liberação prematura de formas amastigotas extracelulares ou diferenciação de tripomastigotas em amastigotas extracelulares em ambiente com baixo pH. Esta via parece contribuir para a persistência da infecção, contudo não é bem conhecida, acredita-se que algum epítipo de carboidrato de glicoproteína de superfície possa estar envolvido neste processo (LIMA *et al.*, 2010).

A mimetização dos processos de metaciclogênese e amastigogênese pode facilitar a elucidação dos mecanismos envolvidos na diferenciação, associados à regulação da expressão gênica em *T. cruzi*. Grande parte dos estudos de diferenciação é voltada para a metaciclogênese por disponibilizar um maior número condições de cultivos axênicos (ÁVILA *et al.*, 2003; LOUIS *et al.*, 2011).

A metaciclogênese *in vitro* pode ser induzida pelo cultivo de formas epimastigotas em fase estacionária em meio pobre de nutrientes que simula a urina de triatomíneo, denominado TAU (*Triatomine Artificial Urine*) seguido de incubação em meio TAU suplementado com os aminoácidos L-prolina, L-aspartato, L-glutamato e glicose (TAU3AAG) incubados a 28 °C (CONTRERAS *et al.*, 1984; ÁVILA *et al.*, 2003; LOUIS *et al.*, 2011).

Em condições de estresse nutricional (meio deficiente em carboidratos – principal fonte de carbono) o parasito passa a metabolizar as fontes secundárias de energia como proteínas, aminoácidos e lipídeos, gerando metabólitos secundários como amônia e íons H⁺, que favorecem a metaciclogênese (ÁVILA *et al.*, 2003; LOUIS *et al.*, 2011). Os aminoácidos mais utilizados são o glutamato e a prolina (aminoácidos presentes em maior quantidade na hemolinfa do triatomíneo), sendo que esta última pode estar envolvida na potencialização da

infectividade e é a segunda maior fonte de carbono mais utilizada pelo parasito. Em *Trypanosoma brucei brucei* EATRO 1125 a L-prolina é essencial para o crescimento das formas procíclicas independentemente da concentração de glicose (BRINGAUD *et al.*, 2012).

A amastigogênese *in vitro* também pode ser induzida pelo estresse fisiológico. Existem 2 tipos de amastigogênese: a primária, em que as amastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas, sem a necessidade de invasão de uma célula hospedeira e a secundária em que há uma necessidade prévia da invasão (CONTRERAS *et al.*, 2002; NAVARRO *et al.*, 2003). A amastigogênese primária pode ser induzida pelo meio MEMTAU, uma combinação entre o meio MEM (*Minimum Essential Medium*) e o meio TAU3AAG, enriquecido com soro fetal bovino e cultivado a 37 °C por 48 horas. Neste processo, epimastigotas são cultivadas em meio TAU3AAG, diferenciando-se em tripomastigotas metacíclicas que são purificadas e incubadas em meio MEMTAU. Acredita-se que o meio MEMTAU provoca alterações nos padrões moleculares das formas tripomastigotas metacíclicas, levando a diferenciação em amastigotas (CONTRERAS *et al.*, 2002).

Na amastigogênese secundária as formas tripomastigotas metacíclicas provindas do meio TAU3AAG, são purificadas e incubadas com células de mamíferos para proceder o processo de infecção. As tripomastigotas liberadas no meio são cultivadas em meio MENTAU pH 5 a 37 °C, com 5% de CO₂ por 12 horas diferenciam-se em amastigotas extracelulares (HERNÁNDEZ-OSORIO *et al.*, 2010). As amastigotas intracelulares são obtidas rompendo-se as células hospedeiras infectada por tripomastigotas (NAVARRO *et al.*, 2003).

2.2.3. O Genoma do *Trypanosoma cruzi*

A espécie *T. cruzi* apresenta uma alta heterogeneidade de cepas, com grandes variações fenotípicas, reflexo do polimorfismo cromossômico entre as cepas. O genoma diploide da cepa CL Brener apresenta tamanho de ~101 Mpb. Há uma estimativa de 82 cromossomos no genoma diploide da cepa CL Brener com tamanho variando entre 78 Kb a 2,3 Mb, entretanto, esta estimativa é imprecisa devido à dificuldade em obter-se cromossomos metafásicos no *T. cruzi*. A abordagem mais utilizada para a identificação de bandas

cromossômicas em *Trypanosoma* é a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), que permite a identificação de moléculas grandes de DNA e pode ser associada com técnicas de hibridização *in situ* (CANO *et al.*, 1995; SOLARI *et al.*, 1995; HENRIKSSON *et al.*, 2002).

A análise recente das sequências genômicas da cepa Sylvio X10 (Tcl) mostra menor complexibilidade do genoma e uma variação de ~10 Mb a menos em relação ao tamanho do genoma haploide da cepa híbrida CL Brener. A variação mais significativa no genoma foi observada no tamanho das famílias multigênicas que codificam proteínas de superfície. Tendo variação de até 40% no conteúdo total de DNA entre as cepas e clones de *T. cruzi* (FRAZÉN *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2011).

Os dados de sequenciamento do genoma da cepa CL Brener, mostraram a presença de 50% de sequências repetitivas, que são constituídas principalmente por famílias multigênicas, que codificam proteínas de superfície, retrotransposons e repetições sub-teloméricas. As principais proteínas de superfícies codificadas são as MASPs, trans-sialidases, mucinas e gp63 (glicoproteína 63), que estão intimamente relacionadas com os mecanismos de evasão do sistema imunológico e patogenicidade do parasito (REQUENA *et al.*, 1996; EL-SAYED *et al.*, 2005; BRANCHES *et al.*, 2006).

A maior família multigênica é das trans-sialidases, que tem como principal função a hidrólise do ácido siálico das células hospedeira, formando glicoconjugados com as mucinas presentes na superfície parasitária. Como o parasito não sintetiza ácido siálico, este processo de sialização rápida é uma estratégia de evasão utilizada como proteção contra o sistema imunológico. Outros grupos de trans-sialidases estão envolvidos com a adesão, invasão celular e regulação do sistema complemento (FREITAS *et al.*, 2011).

Uma parte correspondente a 20% do DNA celular é pertencente ao Cinetoplasto (kDNA). O kDNA é composto DNAs circulares, mini-círculos e maxi-círculos (JUNQUEIRA *et al.*, 2005). Os mini-círculos possuem um elevado número de cópias e seus transcritos não são traduzidos em peptídeos, funcionam como RNAs guia (gRNAs), que estão envolvidos no processo de edição dos mRNAs mitocondriais. Os maxi-círculos apresentam um baixo número de cópias, entretanto demonstram uma alta analogia com DNA mitocondrial de outros eucariotos e contém os genes responsáveis pela

manutenção das funções do cinetoplasto (JUNQUEIRA *et al.*, 2005; VELAZQUEZ *et al.*, 2008).

2.2.4. Expressão gênica em *Trypanosoma cruzi*

Em tripanossomatídeos, diferente de outros eucariotos superiores, conjuntos de genes não relacionados funcionalmente são transcritos em unidades policistrônicas (UTPs), de forma similar aos *operons* bacterianos. Este conjunto de genes podem estar organizados no genoma de forma divergente ou convergente, como indicado na Figura 4. Este tipo de transcrição associada à ausência de promotor clássico para RNA polimerase II (RNA Pol II) é um forte indicativo que o início da transcrição não é um fator limitante na regulação transcricional desses parasitos (CLAYTON *et al.*, 1999; HAILE *et al.*, 2007; ELIAS *et al.*, 2009).

Com exceção do promotor do *spliced leader* (SL), até o momento não foi reconhecido outros promotores para a Pol II, contudo alguns fatores, como variantes de histonas (H2AZ e H2BV), histonas modificadas por acetilação e metilação (H4K10ac, H3K9,14ac e K4me), fator de bromodomínio (BDF3) e fatores de transcrição (TRF4 e SNAP50), estão intimamente associados a cromatina em regiões de início de transcrição da RNA Pol II (TSS) localizados a montante do primeiro gene da UTP, ou internamente na UTP sendo denominados de iTSS (MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2012).

O processamento dos RNAs policistrônicos ou pré-mRNA, é feito por reações acopladas de *trans-splicing* e poliadenilação originando os RNAs monocistrônicos (CLAYTON 1999; HAILE *et al.*, 2007). No *trans-splicing* há adição de uma sequência de 39 nucleotídeos (SL) ou mini-éxon, não codificante capeado, a jusante da região rica em polipirimidina (PoliPi). Na poliadenilação uma cauda poliA é adicionada a montante da região PoliPi (CLAYTON 1999; HAILE *et al.*, 2007; CAMPOS *et al.*, 2008). Tem sido descrito em alguns casos processamento alternativo do pré-mRNAs acarretando mudanças no códon de iniciação (AUG), alterando a tradução da proteína, resultando em segmentação e ou perda da função proteica gerada. O *splicing* alternativo e poliadenilação

podem levar a inclusão e/ou exclusão de elementos regulatórios presentes nas regiões UTRs (TEIXEIRA *et al.*, 2012).

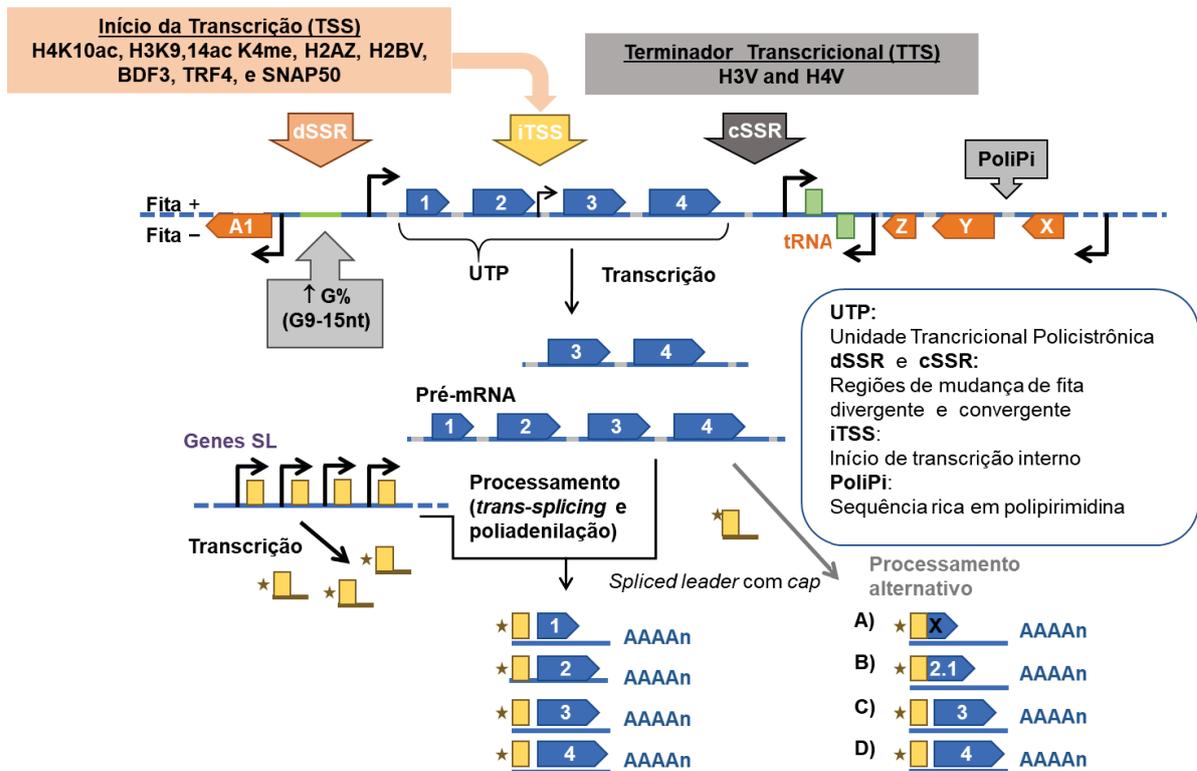


FIGURA 4 – MODELO DE EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSOMATÍDEOS

FONTE: Modificado de TEIXEIRA *et al.*, 2012

NOTA: As unidades de transcrição policistrônicas (UTP) podem estar orientadas de forma convergente ou divergente. A região genômica entre duas UTP divergentes é tida como região de mudança de fita transcrita divergente (dSSR) e em região de convergência de UTPs como cSSR. A dSSR é rica em guanina (G). Os sítios de início de transcrição da RNA Pol II (TSS) geralmente estão localizados a montante do primeiro gene da UTP ou internamente (iTSS). Na TSS são as variantes das histonas (H2AZ e H2BV), histonas modificadas (H4K10ac, H3K9,14ac e K4me), fator de bromodomínio (BDF3) e/ou fatores de transcrição (TRF4 e SNAP50), que podem levar a modificações na cromatina. Os pré-mRNAs são processados em mRNA monocistrônicos após reação de *trans-splicing*, adição de uma sequência líder capeada (SL) a jusante da região de polipirimidina (PoliPi) e poliadenilação com adição de cauda de poliA a montante desta região. Os mRNAs maduros são exportados para o citoplasma local onde podem sofrer estabilização, principalmente por elementos *cis-regulatórios* presentes nas regiões não traduzidas (UTRs). Os pré-mRNAs podem sofrer processamento alternativo, culminando em mudanças no iniciador AUG, alterando a tradução (A), a segmentação e/ou função protéica (B). O *splicing* alternativo e poliadenilação, também podem resultar na inclusão ou exclusão de elementos regulatórios nas 5'UTRs (C) ou 3'UTRs (D), alterando assim a expressão gênica. A terminação transcricional pode acontecer nas regiões de término da transcrição (TTS) rica em H3V e H4V e/ou genes codificadores de tRNA.

A terminação da transcrição pode está relacionada com os sítios de terminação da transcrição (TTS) das unidades policistrônicas, cuja cromatina

contém um aumento no conteúdo de formas variantes das histonas H3 e H4 (H3V e H4V, respectivamente) e sequências gênicas de RNAs transportadores (tRNA). Sendo assim, apesar de pouco estudada a transcrição policistrônica por RNA Pol II em tripanossomatídeos parece ser regulada por fatores epigenéticos (SIEGEL *et al.*, 2009; MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 2010).

Depois de processados, os mRNAs maduros são exportados para o citoplasma, onde a estabilidade pode ser alterada pela ação de fatores protéicos, que se ligam a sequências específicas presentes em regiões não traduzidas (UTR). Acredita-se que este processo pode contribuir de maneira substancial na modulação nos níveis de expressão (TEIXEIRA *et al.*, 1994 e 1995; NOZAKI *et al.*, 1995; BOUCHER *et al.*, 2002; ARAÚJO e TEIXEIRA *et al.*, 2011).

Vários trabalhos têm sido realizados para identificar os elementos regulatórios nas regiões 3'UTR que controlam a expressão dos níveis de mRNA em resposta a cada estágio específico, dentre estes podemos citar a regulação da expressão da trans-sialidase, alfa- e beta-tubulina em epimastigostas, trans-sialidase gp85, gp82 e FL-160 em tripomastigotas e amastina em amastigotas (TEIXEIRA *et al.*, 1995; COUGHLIN *et al.*, 2000 ARAÚJO e TEIXEIRA 2011).

Outra forma de regulação pós-transcricional se dá pela intensificação na taxa de tradução de um mRNA pela formação de polissomos, que uma vez formados aumentam a meia vida do mRNA (CONTRERAS *et al.*, 1985). Em *Leishmania major* a amastina tem a expressão regulada por um elemento em sua região 3'UTR que acredita ser modulado pela associação do transcrito deste gene a polissomos aumentando sua tradução (BOUCHER *et al.*, 2002).

2.3. PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS EM *T. cruzi*

A análise proteômica dos quatro estágios do ciclo de vida do *T. cruzi*, conduziu a identificação de 5720 peptídeos que foram pareados em 1168 grupos de proteínas, contendo 2784 genes no total. Desse total de genes as principais classes identificadas foram: proteínas funcionais como ribossômicas e proteassoma/ubiquitina, proteínas de choque térmico, proteínas de transcrição e histonas, famílias multigênicas como trans-sialidasas, proteínas retrotransposon *hot spot* (RHS), gp63, cisteína protease, MASP e mucinas, e genes hipotéticos.

Porém mais da metade destes genes hipotéticos possuem genes ortólogos em *Leishmania major* e/ou *T. brucei* (ATWOOD, *et al.*, 2005).

As proteínas que compõem as classes funcionais listadas tendem a ser expressas em níveis semelhantes nos quatro estágios de vida do parasito. Todavia os genes originados de famílias multigênicas apresentam uma maior diferença no nível de expressão nas diferentes formas do parasito (ATWOOD *et al.*, 2005).

A família das trans-sialidases (TS) é altamente polimórfica e apenas alguns membros possuem atividade catalítica. Esta atividade possibilita a incorporação de ácido siálico do hospedeiro nas mucinas, proteínas ancoradas a membrana parasitária por glicosilfosfatidilinositol (GPI). Até o momento 8 grupos de TS têm sido descritos com base na similaridade das sequências e propriedades funcionais. A TS I é representada pelas enzimas com atividade catalítica, que são compostas por um domínio amino-terminal, que contém o sítio catalítico e um carboxi-terminal que apresenta um número variado de unidades repetitivas de 12 aminoácidos, denominados SAPA (*Shed Acute Phase Antigen*), por gerarem forte resposta imune em pacientes infectados na fase aguda e são expressas principalmente em tripomastigotas e epimastigotas. A TS II é composta pelas glicoproteínas de superfície gp85, TSA-1, SA85, gp90, gp82 e ASP-2, que estão associados a invasão e fixação a célula hospedeira. A TS III é representada pelo FL-160, uma proteína reguladora do sistema complemento (CRP) que inibe a via clássica de ativação do complemento. A TS 13 cuja função é desconhecida, é representante do grupo IV, porém contém o motivo VTVxNVxLYNR conservado, que é compartilhado por todos os membros conhecidos (ATWOOD *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 1997; VERDUN *et al.*, 1998; SIBLEY, 2011; FREITAS *et al.*, 2011). Algumas sequências são altamente conservadas nas TS como, a VTVTNVFLYNRPLN, que é denominado motivo FLY que está conservado na extremidade carboxi-terminal e pode atuar como fator de virulência, o *ASP Box* (SXDYGXTW) e os motivos FRIP (xRxP) podem estar associados a propriedade de ligação a carboidratos (FREITAS *et al.*, 2011).

As amastinas foram descritas inicialmente como glicoproteínas de membrana expressas diferencialmente em formas amastigotas de *T. cruzi* (TEIXEIRA *et al.*, 1994). Encontram-se entre os antígenos mais imunogênicos em *Trypanosoma* e *Leishmania*, sendo um forte candidato a vacina e

biomarcador relevante para diagnóstico sorológico (STOBER *et al.*, 2006; RAFATI *et al.*, 2006). Acredita-se que possa estar envolvida na interação parasito-hospedeiro e na transdução de sinal ligada à membrana, permitindo deste modo uma modificação do ambiente intracelular, contudo a sua função permanece desconhecida (ROCHETTE *et al.*, 2005; JACKSON, 2010).

O fato de ser uma proteína estágio específico de amastigota têm chamado atenção, por ser esta forma responsável pela manutenção do parasito no hospedeiro vertebrado.

2.4. AMASTINAS

As amastinas são codificadas por famílias multigênicas com aproximadamente 12 cópias no genoma haploide do *T. cruzi* da cepa CL Brener. Estes genes são compostos por uma região 5'UTR curta, seguida de uma ORF (*open reading frame*) e uma região 3' UTR longa (TEIXEIRA *et al.*, 1994).

A cadeia peptídica apresenta ~172 aminoácidos e massa molecular de ~20 kDa, a qual é arranjada em quatro regiões hidrofóbicas (transmembrana) e três regiões hidrofílicas, duas extracelulares e uma intracelular (Figura 5). Na maioria das amastinas a primeira região hidrofóbica localizada na extremidade amino-terminal é corresponde a um provável peptídeo sinal de endereçamento ao retículo endoplasmático rugoso. A quarta região hidrofóbica está localizada no carboxi-terminal, que alguns autores sugerem ser um potencial sinal de ancoragem a membrana por GPI (ROCHETTE *et al.*, 2005; CERQUEIRA *et al.*, 2008).

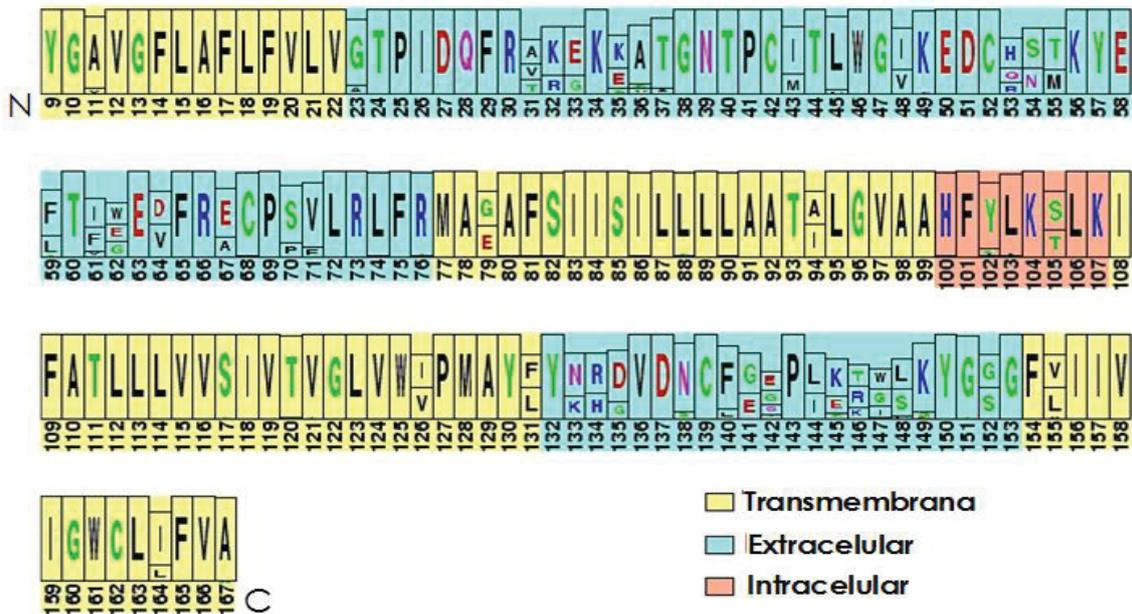


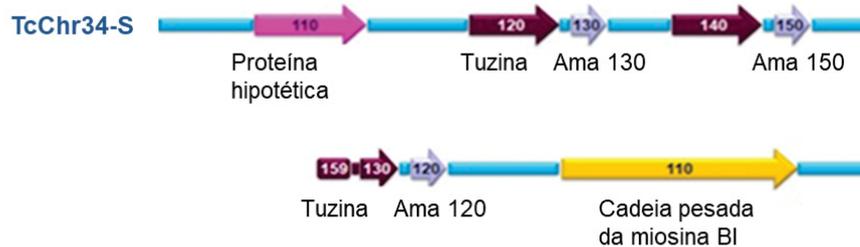
FIGURA 5 – CONSERVAÇÃO DE RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS DAS SEQUÊNCIAS DE AMASTINAS DE SEIS CEPAS DE *T. cruzi* PERTENCENTES ÀS LINHAGENS I E II.

FONTE: Modificado de Cerqueira *et al.*, 2008.

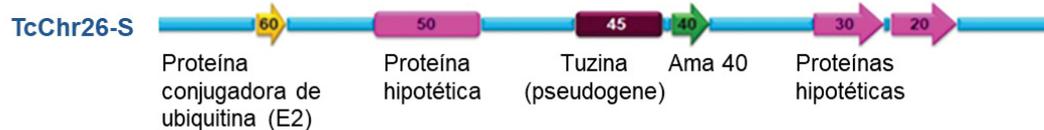
NOTA: Conservação das amastinas em *T. cruzi*. A altura das caixas envolvendo cada resíduo de aminoácidos com código de uma letra representa a frequência do aminoácido para cada posição.

As amastinas, de acordo com proposição recente, são classificadas em pelo menos quatro subfamílias: α (alfa) amastinas, β (beta) amastinas, δ (Delta) amastinas e γ (gama) amastinas. Entretanto para *T. cruzi* até o momento foram descritas somente δ - e β -amastinas (Figura 6) [JACKSON, 2010].

(A) δ -amastinas



(B) $\rho\delta$ -amastinas



(C) β -amastinas



FIGURA 6 – ESQUEMA DA ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DAS AMASTINAS NA CEPA CL BRENER DE *T. cruzi*.

FONTE: O Autor (2011)

NOTA: (A) organização genômica das δ -amastinas (Ama 130, 150 e 120) no cromossomo 34 (TcChr34-S) intercalada a genes de Tuzina e genes vizinhos. (B) $\rho\delta$ -amastina (Ama 40), no cromossomo 26 (TcChr26-S), intercalada a pseudogene de Tuzina. (C) β -amastinas (Ama 394 e 390) no cromossomo 32 (TcChr32-S) e genes vizinhos.

As α -amastinas são conservadas entre os tripanossomatídeos como um par de isoformas estruturalmente distintas e podem ser encontradas em *Leishmania* spp., *Crithidia* spp. e *Trypanosoma brucei*. As β -amastinas são isoformas estruturalmente distintas descritas em *Leishmania major*, *Leishmania infantum*, *Leishmania brasiliensis*, *Crithidia* sp. e *Leptomonas seymouri*. Em *T. cruzi* são encontradas no cromossomo 32 (Ama390 e 394). As γ -amastinas também são ausentes em *T. cruzi*, contudo apresentam alta conservação em *Leishmania* spp. As δ -amastinas em *T. cruzi* são isoformas altamente conservadas e estão localizadas no cromossomo 34 (Ama 130, 150 e 120) [JACKSON, 2010]. Os genes deste subgrupo são intercalados a genes de tuzina na mesma UTP, todavia não é descrito relação entre eles (TEIXEIRA, et

al., 1994). As $\rho\delta$ -amastinas são intercaladas a pseudogene de tuzina na mesma UTP no cromossomo 26 (Ama40) em *T. cruzi* [JACKSON, 2010].

Apesar das amastinas se diferenciarem quanto a localização nos cromossomos, o número de cópias e subfamília as quais fazem parte, quando comparadas elas apresentam uma conservação de aminoácidos, principalmente nas transmembranas, sugerindo uma provável conservação funcional entre as amastinas de *T. cruzi* (Figura 7). A maior variabilidade presente nas sequências das amastinas está localizada nas regiões hidrofílicas, principalmente nas regiões extracelulares, que possuem uma maior superfície de contato com meio externo, podendo facilitar deste modo a interação com uma gama de moléculas (CERQUEIRA *et al.*, 2008).

Ensaio de imunolocalização utilizando anticorpos anti-peptídeos de amastinas realizados por Teixeira e colaboradores (1994), mostram uma localização de membrana plasmática em amastigotas intracelulares de *T. cruzi*. Em *Leishmania major* também foi descrita a mesma localização de superfície em amastigotas expressando a proteína δ -amastina fusionada a GFP.

A taxa de transcrição dos genes de δ -amastinas é semelhante nos quatro estágios de vida do parasito, porém os níveis de mRNA são 50 vezes mais abundantes em amastigotas, para as δ -amastinas, quando comparado a epimastigotas (TEIXEIRA *et al.*, 1994). O acúmulo diferencial de mRNA de amastina em amastigotas sugere uma regulação pós-transcricional. Para as δ -amastinas de *Leishmania* foi descrito um domínio de 200 nucleotídeos localizados na porção 3'UTR, onde se liga um fator proteico que estabiliza o mRNA em amastigotas, favorecendo um aumento nos níveis proteicos de amastinas neste estágio (COUGHLIN *et al.*, 2000).

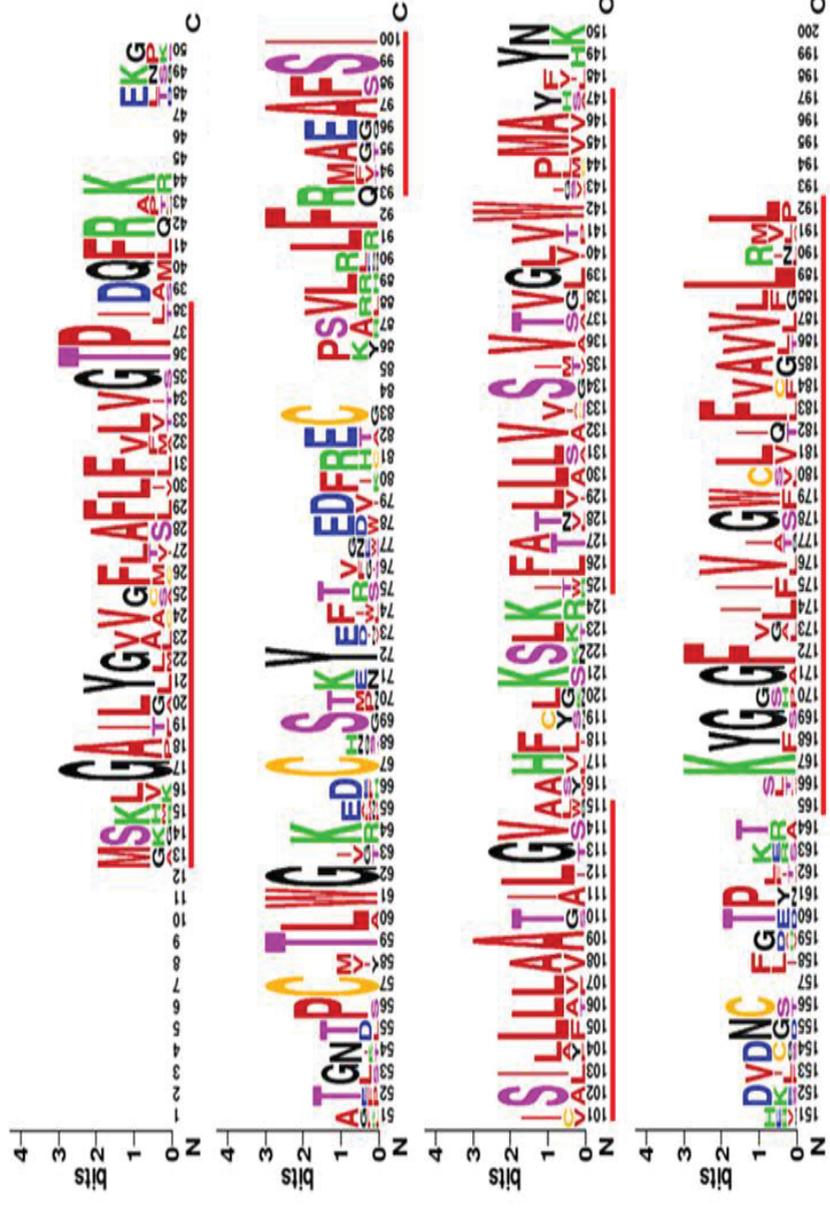


FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO DO ALINHAMENTO DAS DIFERENTES SUBFAMILIAS DE AMASTINAS PRESENTES NO GENOMA DE CL BRENER DE *T. cruzi*

FONTE: O Autor (2011)

NOTA: Os aminoácidos representados por letras maiores são mais conservados quando feita a comparação das diferentes classes de amastinas. As regiões sublinhadas destacam as regiões hidrofóbicas e as não sublinhadas as hidrofílicas.

Análises de *Northern blot* comparando os níveis de expressão das diferentes subfamílias de amastinas no clone CL Brener de *T. cruzi* mostram que as δ - e $\rho\delta$ -amastinas apresentam regulação diferencial com maiores níveis de RNA nas formas amastigotas, já os mRNAs das β -amastinas são acumulados em formas epimastigotas (Kangussu-Marcolino e Araújo, artigo em preparação).

Neste presente trabalho propomos caracterizar parcialmente as δ -amastinas encontradas em múltiplas cópias no cromossomo 34 de *T. cruzi*. Estas isoformas de amastinas apresentam um grau de similaridade de 91% (Figura 8).

Recentemente, o grupo de pesquisa do Prof. Dr Renato Arruda Mortara (Unifesp-SP) em colaboração com nosso grupo identificou que a cepa G de *T. cruzi*, possui δ -amastinas em seu genoma, contudo não é capaz de expressá-las em níveis detectáveis e de forma diferencial em amastigotas, contrapondo as cepas Tulahuén e CL Brener (Cruz *et al.*, artigo em preparação). Cabe destacar que os tripomastigotas da cepa G exibem baixa virulência na infecção em camundongo (parasitemia não detectável) contrariamente a Cepa CL Brener (YOSHIDA, 2006). Por outro lado, as formas amastigotas extracelulares da cepa G apresentam alta infectividade em cultura de células (MORTARA *et al.*, 2005). Na tentativa de avaliar o papel das δ -amastinas em *T. cruzi*, Cruz e colaboradores (artigo em preparação) geraram uma população da cepa G superexpressando δ -Amastina em fusão a GFP que foi analisada fenotipicamente. Os resultados mostraram que os parasitos superexpressores apresentam uma maior taxa de diferenciação de formas epimastigotas em tripomastigotas e parasitemia tecidual precoce em camundongos quando comparadas com a selvagem (Cruz, *et al.*, artigo em preparação).

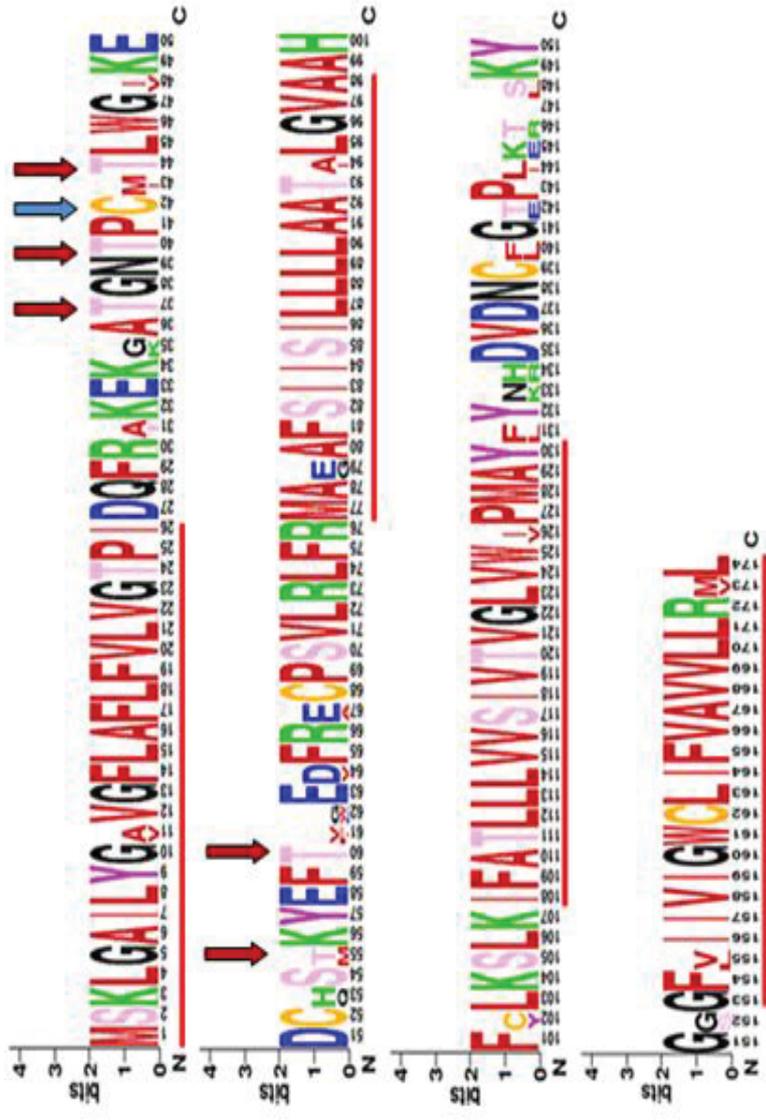


FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO DO ALINHAMENTO DAS δ-AMASTINAS PRESENTES NO GENOMA DE CL BRENER DE *T. cruzi*

FONTE: O Autor (2011)

NOTA: Os aminoácidos representados por letras maiores são mais conservado quando feita a comparação entre a subfamília das δ-amastinas e apresentam muitos pontos de *O-glicosilação*. As regiões sublinhadas destacam as regiões hidrofóbicas e as não sublinhadas as hidrofílicas. As setas vermelhas indicam as posições dos aminoácidos treoninas (37, 40, 44, 55 e 60) escolhidos para a realização de mutações pontuais por alaninas e a seta azul para a mutação da cisteína (42) por alanina.

A análise fenotípica de mutantes tem sido uma importante abordagem para a determinação da função dos genes. Usualmente, a função de um gene pode ser bloqueada principalmente pela deleção do gene e interferência de RNA (RNAi). Um nocaute verdadeiro ou mutação nula obtêm redução funcional completa ou parcial do gene codificado, possibilitando uma posterior análise fenotípica e genotípica. Estudos de função gênica de amastina em *T. cruzi* são limitados devido a sua estrutura multigênica (CERQUEIRA *et al.*, 2008). Além da estrutura multigênica das amastinas, DaRocha e colaboradores (2004) mostraram que o mecanismo de RNAi neste parasito é ineficiente, devido à ausência completa ou parcial da maquinaria envolvida no bloqueio da expressão gênica por RNAi, diferentemente do *T. brucei*.

Avaliando todas as dificuldades de silenciamento e deleção das amastinas, neste presente trabalho optamos pela análise fenotípica de transfectantes superexpressores de formas mutadas das δ -amastinas em aminoácidos com um alto grau de conservação na primeira região extracelular, onde se encontra a assinatura amastina (C-[IVLYF]-[TS]-[LF]-[WF]-G-X-[KRQ]-X-[DENT]-C) descrita por Rochette e colaboradores (2005).

Em nossas análises *in silico* avaliamos aminoácidos com características peculiares como treoninas que podem sofrer modificações pós-traducionais como O-glicosilação e cisteínas que possuem um papel estrutural importante por formarem pontes dissulfeto inter e intra cadeias proteicas. Nas δ -amastinas identificamos 5 prováveis sítios de O-glicosilação na primeira região transmembrana nos resíduos de treoninas 37, 40, 44, 55 e 60 e duas cisteína altamente conservada na posição 42 e 139 (Figura 8). Partindo destas análises, geramos formas de amastinas mutadas nestes resíduos para uma avaliação preliminar do impacto funcional e estrutural deste resíduos na proteína e/ou fenótipo do parasito.

3. JUSTIFICATIVA

O estudo funcional das amastinas é relevante para um melhor entendimento da proteína nos processos biológicos do parasito, especialmente nas interações parasito/célula hospedeira. Pesquisas de homologia em bancos de dados têm mostrado que as amastinas são específicas de tripanossomatídeos, não apresentando ortólogos em mamíferos, uma característica interessante em candidatos a alvo quimioterápicos.

As δ -amastinas são altamente expressas na membrana citoplasmática das formas amastigotas, estágio replicativo no hospedeiro vertebrado. Estas formas contribuem para a manutenção da infecção no hospedeiro vertebrado. Uma vez que as δ -amastinas estão na superfície do parasito, estas provavelmente podem contribuir na interação com o hospedeiro.

Estudos de função gênica das amastinas em *T. cruzi* são limitados devido a sua estrutura multigênica que desfavorece a geração de nocautes verdadeiros e além disso não é possível a utilização de mecanismos de silenciamento gênico por RNAi, devido a sua inexistência neste tripanossomatídeo. Uma alternativa é a superexpressão de δ -amastinas. Resultados preliminares apontam a amastina como um fator de virulência de *T. cruzi*. No presente estudo avaliamos as alterações fenotípicas causadas pela superexpressão de amastinas mutadas em resíduos de aminoácidos conservado que podem ser potenciais alvos de O-glicosilação (Treoninas) ou participar de interações inter e intramoleculares.

A identificação das regiões funcionais dentro da proteína facilita o entendimento da função ou possíveis interatores da amastina no contexto biológico na relação parasito/hospedeiro.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar alterações fenotípicas causadas pela superexpressão de formas mutadas de δ -amastina na cepa G de *Trypanosoma cruzi*.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Superexpressar δ -amastina selvagem e mutantes em fusão a GFP na cepa G de *Trypanosoma cruzi*. Sendo as formas mutantes, 5TM contendo cinco resíduos de treoninas substituídos por alaninas e 2CM com duas cisteínas substituídas por alanina, ambas as mutações inseridas na primeira região extracelular da amastina.
- Caracterizar alterações fenotípicas de parasitos superexpressores da forma selvagem e mutantes de δ -amastina em fusão a GFP.
- Avaliar a expressão ectópica das proteínas de fusão nos parasitos selvagem e superexpressores.
- Determinar a localização subcelular das δ -amastinas selvagem e mutadas.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. INICIADORES, MICRORGANISMOS E PLASMÍDEOS

Os iniciadores, microrganismos e plasmídeos utilizados neste trabalho estão nomeados nas Tabelas 1, 2 e 3 respectivamente.

TABELA 1 – INICIADORES

| NOME | SEQUÊNCIA | SÍTIO DE RESTRIÇÃO |
|------------|---|--------------------|
| Ama 5' | 5'-CAT <u>CTAGA</u> AAGCAATGAGCAAAC-3' | <i>Xba</i> I |
| Ama 5' OUT | 5'-CT <u>GGATCC</u> CTAGCATACGCAGAAGCAC-3' | <i>Bam</i> HI |
| GFP50EcoRI | 5'-GAT <u>GAATTC</u> ATGAGTAAAGGAG-3' | <i>Eco</i> RI |
| GAPDHBspEI | 5'-ATATTG <u>TCCGGAG</u> GGGTTCGCTC-3' | <i>Bsp</i> EI |
| 3TMut | 5'-GGGAGCC <u>G</u> CTGGCAAT <u>G</u> CGCCGTGCATAG CGTTGTGG-3' * | — |
| 2TMut | 5'-CCAACGG <u>C</u> GAATTCATACTTCG <u>C</u> GCTGTG G-3' * | — |
| 1Cm | 5'-CAATACGCC <u>G</u> GCATAACG-3' * | — |
| 2Cm | 5'-TTCAAAG <u>G</u> CATTGTCCACG-3' * | — |
| HX1 | 5'-TTCTTCAAATATGCAGCGG-3' | — |

* Em destaque as bases mutadas

TABELA 2 – MICRORGANISMOS

| MICROORGANISMO | FENÓTIPO | RESISTÊNCIA | REFERÊNCIA |
|---|---|----------------|--|
| <i>E. coli</i> DH10B | F ⁻ ; <i>endA1</i> ; <i>recA1</i> ; <i>alE15</i> ; <i>galK16</i> ; <i>nupG</i> ; <i>rpsL</i> ; Δ <i>lacX74</i> ; Φ 80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> ; <i>araD139</i> ; Δ (<i>ara</i> , <i>leu</i>) 7697; <i>mcrA</i> ; Δ (<i>mrr</i> - <i>hsdRMS-mcrBC</i>) λ | Estreptomicina | Invitrogen |
| <i>T. cruzi</i> cepa G, forma epimastigota | Estirpe selvagem | — | Cedido por Mário Costa Cruz-UNIFESP |

TABELA 3 – PLASMÍDEOS

| PLASMÍDEO | CARACTERÍSTICA | RESITÊNCIA | REFERÊNCIA |
|-----------------|--|------------------------|-------------------------------|
| pBlueScriptNeo1 | Cassete de neomicina clonado <i>EcoRI/HindIII</i> no vetor pBlueScript II KS | Ampicilina e neomicina | Stratagene |
| pTREXGFP | Gene reporte para GFP | Neomicina | DaRocha, <i>et al.</i> , 2004 |
| pROCKGFP | Gene repórter para GFP | Neomicina | DaRocha, <i>et al.</i> , 2004 |
| pTREXAmaWTGFP | Região codificadora da amastina TcA21 | Neomicina | — |

5.2. VETORES

5.2.1. Vetor pTREXFGFPNeo (pTREXGFP ou pTGFP)

O vetor pTREXGFP é um vetor de expressão transiente ou estável derivados do vetor pTREX (VAZQUEZ e LEVIN, 1999), que possui os sítios de *Xba* I e *Xho* I utilizados na inserção da região codificadora de GFP (DaROCHA *et al.*, 2004). Este plasmídeo é composto por: região promotora de RNA ribossômico (rRNA), que assegura um alto nível de transcrição; região 5'UTR do gene TcP2beta (HX1), sinal altamente eficiente para processamento do mRNA por *trans-splicing*; região codificadora de GFP; região intercodificadora dos genes de gGAPDH I e II, que funcionam como sinais para poliadenilação de GFP e *trans-splicing* do mRNA de Neo e região codificadora para a neomicina fosfotransferase (Neo) que confere resistência a neomicina e ao seu análogo G418. Na mesma fase de leitura do gene de resistência a neomicina contém a região intercodificadora do gene de gGAPDH II, que sinaliza a poliadenilação de Neo (Figura 9).

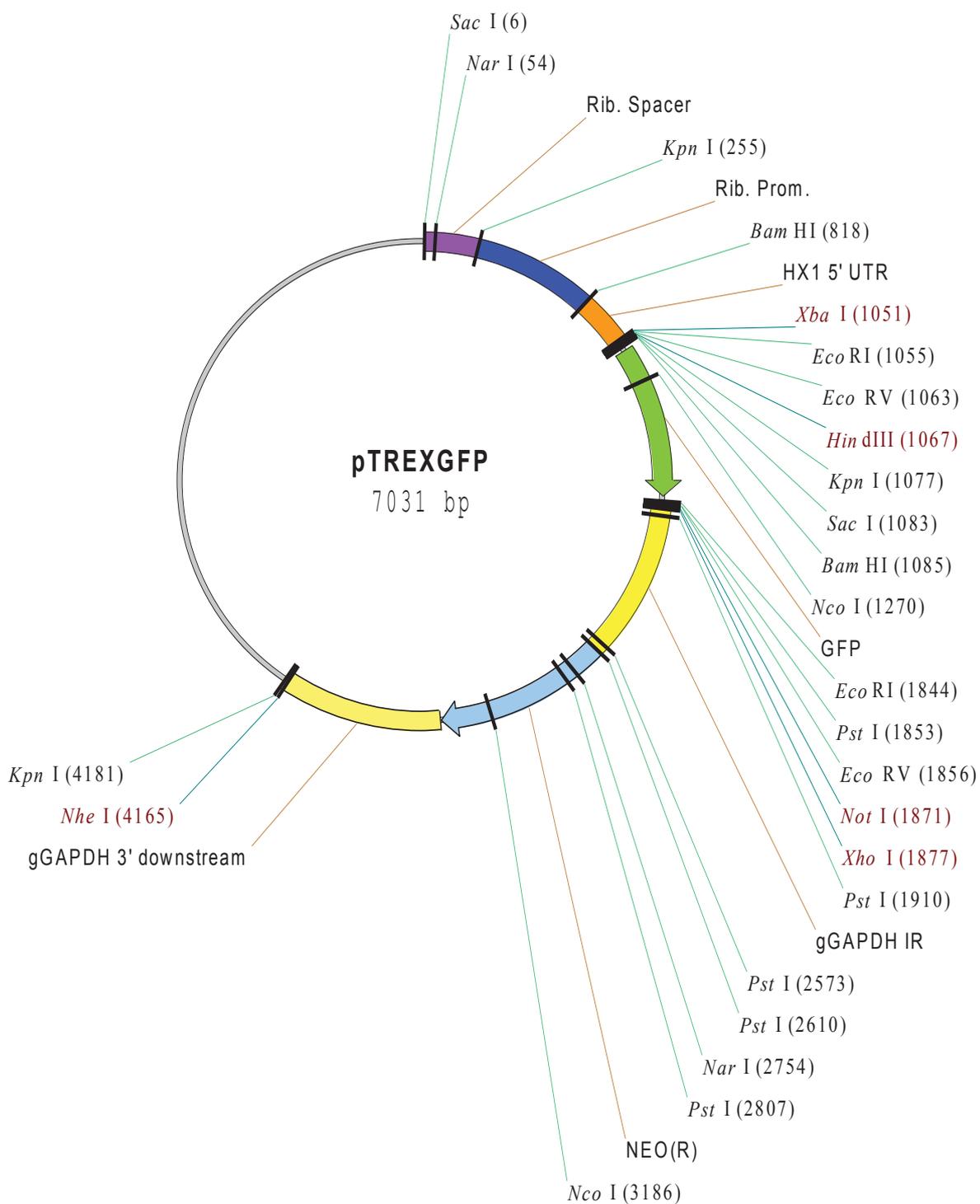


FIGURA 9 – MAPA DO VETOR PTREXGFPNEO

FONTE: DaROCHA *et al.*, 2004.

NOTA: Mapa esquemático do vetor pTREXGFPNeo, com os principais sítios de digestão. Em destaque as regiões codificadoras de neomicina (Neo) e GFP e as promotoras de rRNA, HX1 e gGAPDH I e II.

5.2.2. Vetor pTREXAmaFGFPNeo (pTAF)

Para superexpressar a amastina na cepa G de *T. cruzi*, a sequência codificadora da amastina do clone de cDNA da TcA21 (Teixeira *et al.*, 1994; número de acesso U04339) foi amplificada por PCR utilizando iniciador senso Ama 5' (5'-CATCTAGAAAGCAATGAGCAAAC-3') e anti-senso Ama 5' OUT (5'-CTGGATCCCTAGCATACGCAGAAGCAC-3'), que contêm sítios de restrição para as enzimas *Xba* I e *Bam* HI, respectivamente. O produto amplificado foi digerido com *Xba* I e *Bam* HI, tratado com a enzima SAP (fosfatase alcalina de camarão) e ligado ao vetor pTREXGFPNeo digerido com *Bam* HI/*Xho* I, gerando o vetor pTREXAmaFGFPNeo. A confirmação da construção feita por sequenciamento e digestão com as enzimas *Xba* I e *Xho* I (Figura 10).

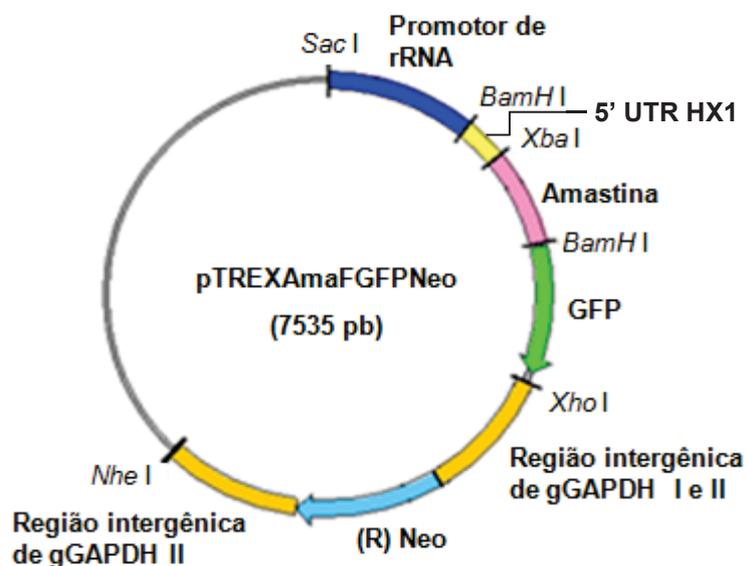


FIGURA 10 – MAPA DO VETOR pTREXAmaFGFPNeo

FONTE: O autor 2011.

NOTA: Mapa esquemático do vetor pTREXAmaFGFPNeo, com os principais sítios de digestão. Em destaque as regiões codificadoras da amastina, neomicina (Neo) e GFP e as promotoras de rRNA, HX1 e gGAPDH I e II

5.2.3. Vetor pTREXAmastina5TmFGFPNeo (pT5TM)

A construção do vetor pT5TM com mutações sítio dirigidas para os 5 resíduos de treoninas foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando um megaprimer (Figura 11). Inicialmente, a região codificadora da amastina em fusão a GFP (AmastinaF::GFP) foi removida do vetor pTREXAmastinaFGFP por restrição com as endonucleases *Xba* I e *Xho* I e ligada para o vetor pBluescript, previamente digerido com as mesmas enzima, dando origem ao vetor denominado pBSAmaFGFP.

Para gerar a proteína mutada com 5 resíduos de treonina substituídos para alanina (Amastina5Tm), foi realizada uma PCR com *Pfu* DNA polimerase (Stratagene), com o DNA molde pBSAmaFGFP e os iniciadores 3TMut, que anela na região correspondente as treoninas 37, 40 e 44, substituindo o códon de treonina para alanina e 2TMut que anela na região correspondente as treoninas 55 e 60, substituindo o códon de treonina para alanina. A condição da reação de PCR foi: Desnaturação inicial 95 °C por 2 minutos, 30 ciclos de amplificação com desnaturação a 95 °C por 20 segundos, anelamento 55 °C por 20 segundos e amplificação 72 °C por 2 minutos e 30 segundos. Após os ciclos de repetição a reação foi mantida a 72° C por 3 minutos e 4 °C por 10 minutos.

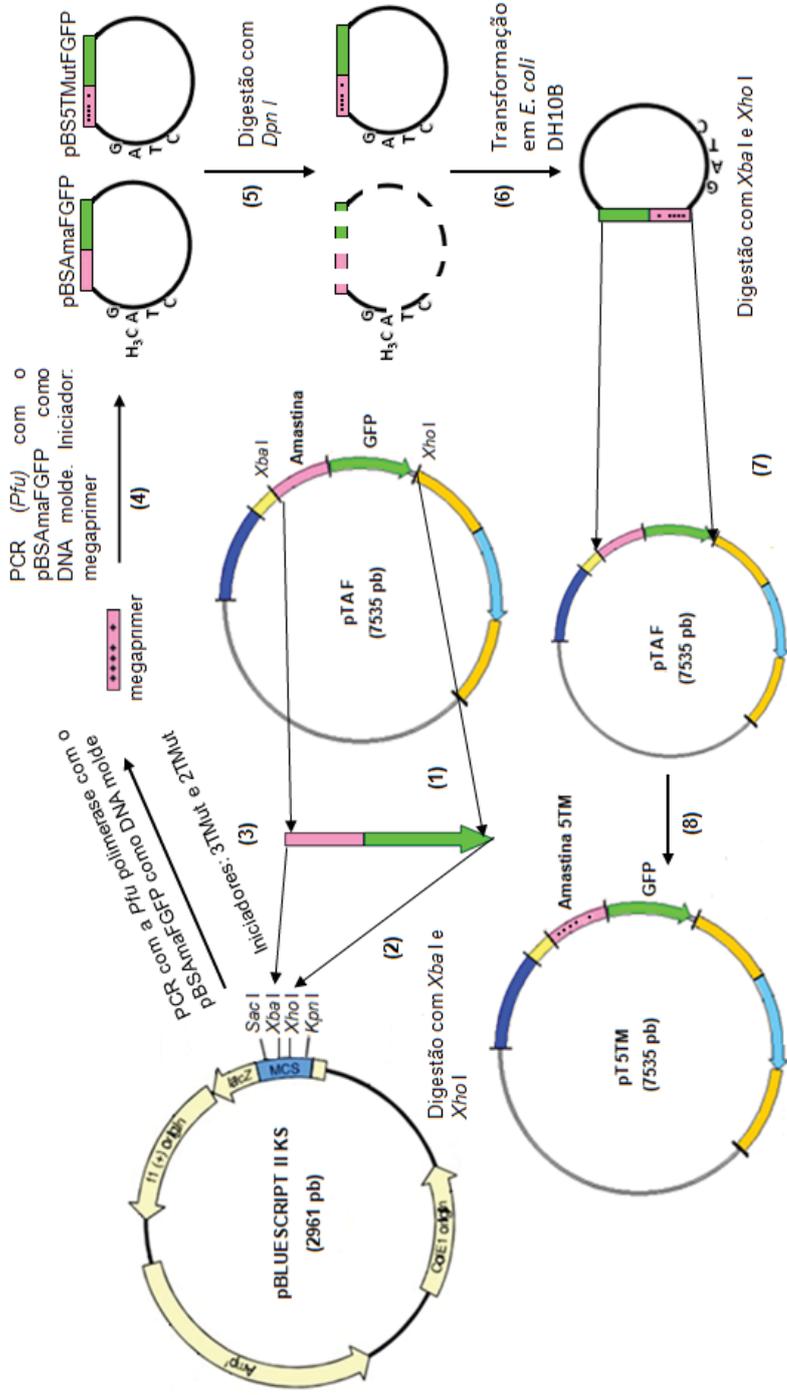


FIGURA 11 – ESTRATÉGIA DE CLONAGEM PARA A CONSTRUÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO DE δ -AMASTINA (TcA21) COM MUTAÇÕES SÍTIO DIRIGIDAS PARA AS TREONINAS 37, 40, 44, 55 E 60. FONTE: O autor (2011)

NOTA: (1) mostra a digestão do vetor pTAF com as endonucleases *Xba*I e *Xho*I, para a obtenção do fragmento Amastina::GFP (1300 pb), clonado (2) no vetor pBLUESCRIPT II KS, previamente digerido com as mesmas endonucleases, gerando o vetor pBSAmaFGFP. (3) reação de PCR com *Pfu* DNA polimerase, utilizando como DNA molde o pBSAmaFGFP e dois iniciadores: 3TMut que anela na região correspondente as treoninas 37, 40 e 44; 2TMut que anela na região correspondente as treoninas 55 e 60. O produto gênico amplificado (84 pb) é denominado megaprimer. (4) Segunda reação de PCR com o vetor pBSAmaFGFP e megaprimer como único iniciador. O produto desta amplificação com as cinco treoninas mutadas é denominado pBS5TMutFGFP. Para a remoção do DNA molde pBSAmaFGFP do produto de amplificação a enzima *Dpn*I foi adicionada (5). Posteriormente o pBS5TMutFGFP foi transformado em *E. coli* DH10B (6), para a extração do DNA plasmidial e posterior digestão com *Xba*I e *Xho*I para a liberação do fragmento da região codificadora da amastina com as mutações inseridas. Este fragmento foi clonado (7) no vetor pTAF originando assim o vetor pT5TM (8) com as cinco mutações nas treoninas.

O produto da amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% e corado em solução de brometo de etídio 0,1 mg/mL. A banda visualizada foi de aproximadamente 84 pb, tamanho esperado para o fragmento correspondente ao megaprimer. Esta banda foi purificada utilizando o Kit de purificação de banda de DNA do gel (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante e utilizada em uma segunda reação de PCR.

A fim de obter o vetor pBS5TMutFGFP, foi realizada uma segunda reação de PCR com pBSAmaFGFP como molde e o megaprimer como iniciador único. A condição da reação de PCR foi a mesma da anterior, entretanto ao produto da amplificação foi adicionado 1 U *Dpn* I - endonuclease que reconhece a sequência metilada 5'-G^{m6}ATC-3' da fita parental e a degrada deixando somente o DNA com as mutações (WEINER, 1994). O produto com *Dpn* I foi incubado por 2 horas à 37 °C. Ao final da digestão, a *Dpn* I foi inativada por 20 min à 80 °C. O produto pBS5TMutFGFP foi transformado, o DNA plasmidial obtido e sequenciado para a confirmação das mutações.

Para a obtenção do vetor de expressão em *T. cruzi* com a Amastina5TmFGFP. O vetor pBS5TMutFGFP foi digerido com *Xba*I e *Xho*I, para a obtenção do fragmento Amastina5TmFGFP (1300 pb). O fragmento foi purificado e ligado ao vetor pTREXAmastinaFGFP previamente digerido com as mesmas enzimas, substituindo desta forma a proteína de fusão não-mutada (AmastinaFGFP) pela Amastina5TmFGFP. Dando origem ao vetor pTREXAmastina5TmFGFP que foi transformado e sequenciado para confirmação das mutações.

5.2.4. Vetor pTREXAmastina2CmFGFPNeo (pT2CM)

Para a construção do vetor pT2CM optamos por modificar a estratégia de clonagem utilizada anteriormente para as cinco treoninas (Figura 12). Nesta estratégia utilizamos o pTREXAmastinaFGFP na primeira reação para a amplificação do megaprimer com os códons das cisteínas mutadas.

Foram utilizados os iniciadores 1Cm que anela na região correspondente a cisteína 42, mutando o códon de cisteína para alanina e 2Cm para modificar o

códon da cisteína 139. O protocolo da reação de PCR utilizado foi semelhante ao do item 5.2.3.

O megaprimer de 267 pb foi purificado e utilizado como iniciador da segunda reação de PCR utilizando pTREXAmastinaFGFP como DNA molde. A reação foi tratada com *Dpn* I, deixando somente o vetor de expressão em *T. cruzi* com os códons de cisteínas mutados para alanina, pTREXAmastina2CmFGFPNeo. Este vetor foi transformado e as mutações confirmadas por sequenciamento.

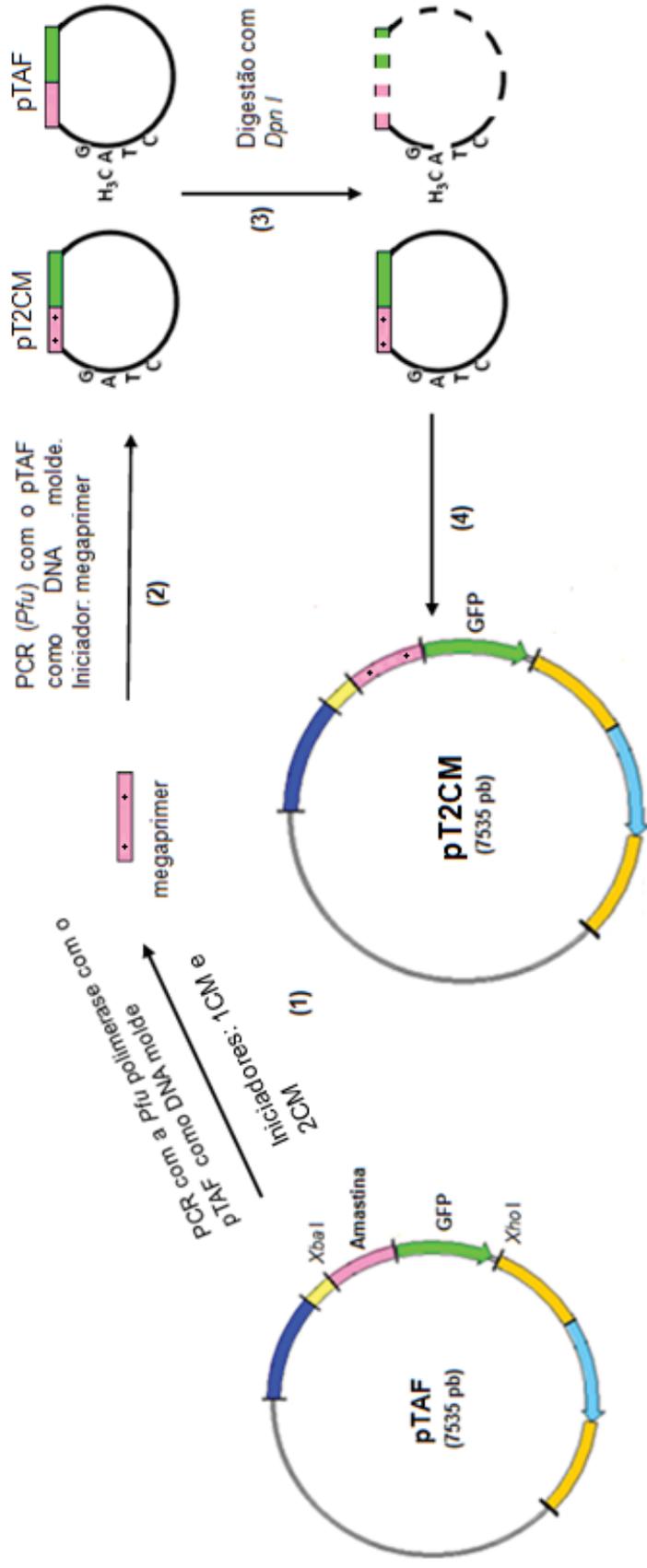


FIGURA 12 – ESTRATÉGIA DE CLONAGEM PARA A CONSTRUÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO DE δ -AMASTINA (TcA21) COM MUTAÇÕES SÍTIO DIRIGIDAS NAS CISTEÍNAS 42 E 139
 FONTE: O autor (2001)

NOTA: (1) mostra a primeira reação de PCR com a *Pfu* DNA polimerase, utilizando como DNA molde o pTAF e os iniciadores: 1CM e 2CM. O produto gênico amplificado megaprimer apresenta 267 pb. (2) megaprimer utilizado com único iniciador na segunda PCR que tem como DNA molde o pTAF. O produto de amplificação desta reação com as possíveis cisteínas mutadas é denominado pT2CM. (3) remoção do DNA parental pTAF com *Dpn I*. (4) Vetor de expressão em *T. cruzi* com as cisteínas 42 e 139 da amastina mutada para alanina pT2CM.

5.2.5. Vetor pTREXSPFGFPNeo (pTSP)

Para superexpressar a primeira porção hidrofóbica (provável peptídeo sinal de endereçamento a membrana) da amastina na cepa G de *T. cruzi*, a sequência codificadora de GFP foi amplificada do vetor de expressão pROCKGFP (que não possui o sítio de *Eco* RI) com os iniciadores GFP50*Eco*RI (senso) e GAPDHIR *Bsp* EI (anti-senso) que contêm locais de restrição para as enzimas *Eco*RI e *Bsp* EI, respectivamente. O produto amplificado foi digerido com *Eco*RI e *Bsp* EI e tratado com a enzima SAP. O produto foi purificado e clonado no vetor pTREXAmastinaWT (que contém somente a amastina TcA21 não fusionada a GFP) previamente digerido com as enzimas *Eco*RI e *Xho* I originando o vetor pTSP. O vetor pTSP foi verificado por sequenciamento.

5.3. PREPARO DE CÉLULA COMPETENTE

As células bacterianas da estirpe *Escherichia coli* DH10B, foram cultivadas a partir do estoque de glicerol 50% estriado em placa contendo meio LA suplementado com Estreptomicina (80 µg/mL), incubada em estufa à 37 °C. Após o crescimento durante à noite, uma colônia foi coletada e feito um pré-inóculo em 4 mL de LB suplementado com antibiótico e incubado à 37 °C por cerca de 16 h sob agitação constante de 150 rpm. Decorrido este tempo o pré-inóculo foi diluído 100 vezes em meio LB sem antibiótico e cultivado nas mesmas condições até atingir a DO 0,4 a 0,6. A cultura foi mantida em banho de gelo por 20 minutos, com posterior centrifugação de 4000 rpm 8 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, o precipitado foi suspenso em 30 mL de MgCl₂ 100 mM e foi centrifugado nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado, o precipitado suspenso em 30 mL de CaCl₂ 100 mM e incubado em banho de gelo por 30 minutos. Em seguida, foi centrifugado a 4000 rpm 8 minutos 4° C, subsequentemente o sobrenadante foi descartado e o precipitado suspenso em 2 mL de uma solução CaCl₂ 85 mM Glicerol 15%. Foram feitas alíquotas de 200µL e estocadas a -80° C (SAMBROOK *et al.*, 1989).

5.4. TRANSFORMAÇÃO EM CÉLULA *Escherichia coli* DH10B

As reações de interesse (produto de PCR, ligação ou plasmídeo purificado) foram incubadas com 200 μL da suspensão de *E. coli* quimiocompetente por 30 minutos em banho de gelo. Passado este tempo, foi feito um choque térmico pela incubação à 42 °C por 2 minutos, seguido de incubação de 3 minutos no gelo e posterior adição de 800 μL de meio LB para incubação sob agitação constante de 150 rpm à 37 °C por 45 minutos.

Alíquotas de 100 μL e 900 μL foram espalhadas em meio LA suplementado com ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e incubadas à 37 °C por 16 horas. As colônias crescidas nessas condições foram analisadas conforme descrito nos itens a seguir.

5.5. SELEÇÃO DOS CLONES BACTERIANOS POSITIVOS

As colônias selecionadas após transformação foram repicadas em placas estéreis de LA e meio LB contendo 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina. Os clones crescidos em meio LB foram coletados para extração de DNA plasmidial. Ao final do processo as amostras foram ressuspensas e armazenadas a -20 °C até a sua utilização. A quantificação do DNA foi realizada por espectrofotometria no aparelho NanoDrop™.

As digestões diagnósticas foram realizadas com as endonucleases *Xba* I e *Xho* I (Fermentas) para confirmar a clonagem dos vetores pTGFP, pTAF, pT5TM, pT2CM e pTSP. Os tamanhos dos fragmentos esperados para cada digestão estão listados na tabela 4.

TABELA 4 – LISTA DOS FRAGMENTOS LIBERADOS DOS VETORES APÓS DIGESTÃO COM AS ENZIMAS Xba I E XhoI

| VETOR | FRAGMENTO | TAMANHO DO FRAGMENTO (pb) |
|-------|----------------------------------|---------------------------|
| pTGFP | GFP | 826 |
| pTAF | amastina + GFP | 1330 |
| pT5TM | amastina 5Tm + GFP | 1330 |
| pT2CM | amastina 2Cm + GFP | 1330 |
| pTSP | peptídeo sinal da amastina + GFP | 914 |

5.6. OBTENÇÃO DE DNA PLASMIDIAL EM PEQUENA ESCALA – MINIPREP

Os clones bacterianos positivos foram inoculados em 4 mL de meio LB suplementado com 100 µg/mL de ampicilina e incubados a 37 °C por 16 h sob agitação a 150 rpm. Após o tempo de crescimento a cultura foi então coletada e o DNA plasmidial extraído pelo método de lise alcalina como descrito por Sambrook e colaboradores, 1989. O DNA foi precipitado com isopropanol 0,61 volumes, lavado com etanol 70%, ressuspenso em 30 µL de água ultrapura e mantido a -20 °C até a sua utilização. A quantificação do DNA plasmidial foi realizada por espectrofotometria no aparelho NanoDrop.

5.7. OBTENÇÃO DE DNA PLASMIDIANO EM LARGA ESCALA – MIDIPREP

Quantidades maiores de DNA plasmidial com uma melhor qualidade foram extraídas utilizando o *Kit QIAGEN Plasmid Plus Midi*, conforme descrito no manual da QIAGEN. Foi feito um pré-inóculo das colônias positivas em 4 mL de meio LB suplementado com 100 µg/mL de ampicilina e incubadas a 37 °C por 16 h sob agitação constante de 150 rpm. Transcorrido este tempo, a cultura foi diluída 100 vezes em 200 mL de meio LB suplementado com 100 µg/mL de ampicilina e novamente incubada nas mesmas condições anteriores. As culturas foram centrifugadas a 5000 rpm e o DNA foi extraído conforme instruções do

fabricante. O DNA foi suspenso em 100 µL de água ultrapura e mantido a -20 °C até a sua utilização. A quantificação do DNA foi realizada por espectrofotometria no aparelho NanoDrop.

5.8. SEQUENCIAMENTO DOS VETORES pT5TM E pT1CM

Os sequenciamentos dos vetores foram realizados para confirmar a as substituições dos resíduos de treonina e cisteína. O método realizado foi o de terminação de Sanger e colaboradores (1977), com o iniciador HX1 e Ama 5'OUT. As amostras foram sequenciadas no sequenciador automáticos 3500 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) e as sequências geradas foram analisadas para confirmar as mutações usando o programa Clustal WI.

5.9. CULTURAS DE *T. cruzi*

Neste trabalho foram utilizados os parasitos da cepa G (grupo I, Amazonas-Brasil Opossum) [ZINGALES *et al.*, 2009]. As culturas axênicas das formas epimastigotas destas estirpes foram mantidas em fase logarítmica de crescimento, com densidade celular entre 1 e 2 x 10⁷ parasitos/mL, em meio Liver Infusion Tryptose – LIT, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino - SFB (TEIXEIRA e YOSHIDA, 1986).

5.10. TRANSFEÇÃO DE FORMAS EPIMASTIGOTAS DO *Trypanosoma cruzi*

As culturas de epimastigotas em fase logarítmica de crescimento foram transfectadas segundo o protocolo de DaRocha e colaboradores (2004) modificado. Um total de 4×10^7 parasitos foi utilizado por eletroporação. Os parasitos foram coletados por centrifugação a 5000 rpm por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado 1X com tampão de eletroporação gelado. Seguidamente o precipitado foi suspenso em 400 µL de tampão de eletroporação gelado e foram adicionados 50 µg de DNA plasmidial (diluído para ficar em um volume final de 50 µL). O homogenato (450 µL) parasito/DNA foi transferido para a cubeta de eletroporação estéril (Bio-Rad, 0,2 cm de GAP), pré-resfriada. As amostras foram submetidas a 3 pulsos de 300 volts, 500 µF, utilizando o eletroporador GenePulser® II Apparatus (Bio-Rad) com intervalos de 60 segundos entre eles. Os parasitos foram mantidos em banho de gelo entre os pulsos.

Após a eletroporação as cubetas foram transferidas para um banho de gelo por 3 minutos, sendo os parasitos em seguida transferido para garrafas de cultura estéril (25 cm²) contendo 5 mL de meio LIT suplementado com 10% de SFB. Esta cultura foi incubada por 24 h a 28 °C.

5.11. SELEÇÃO DOS PARASITOS TRANSFECTADOS

Vinte quatro horas após a eletroporação foram adicionados ao meio 200 µg/mL de G418 (análogo da Neomicina) para iniciar a seleção, que foi considerada eficiente após a morte do controle negativo (MOCK), representado pelos parasitos selvagens da cepa G que passaram por todos os passos da transfecção mas não receberam nenhum vetor.

Os parasitos transfectados com as construções pTREXGFPNeo, pTREXAmastinaFGFPNeo pTREX5TMutFGFPNeo, pTREXCys1MutFGFPNeo e pTREXSPFGFPNeo foi acrescido ao meio LIT com 10% de SFB doses crescentes de G418 (100-500 µg/mL) para a obtenção dos parasitos estáveis por 30 dias. Posteriormente foi realizado um decréscimo gradual das doses de 500 a 100 µg/mL de G418 para a manutenção da cultura. Para a cepa G selvagem (MOCK) a dosagem letal para a seleção foi de 500 µg/mL de G418.

5.12. MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA E CONFOCAL

Após a obtenção dos parasitos por transfecção transiente (1 dia após a transfecção), 200 µL da cultura foi centrifugado a 3000 rpm 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e acrescido ao precipitado 600 µL de paraformaldeído 4 %. A suspensão foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos em seguida centrifugada nas mesmas condições anteriores para a remoção do paraformaldeído. Ao precipitado foi adicionado e 600 µL de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 1,0 µg/mL diluído em PBS 1 X e incubado em temperatura ambiente 5 minutos. Em seguida os parasitos passaram por uma nova centrifugação, foi descartado o sobrenadante e o precipitado foi ressuscitado em 20 µL de fluoromount. A lâmina foi montada com 4 µL da suspensão e analisadas nos microscópios de fluorescência (Zeiss) e/ou confocal (Radiance 2100, Bio Rad, Hemel Hempstead, UK) [PIRES *et al.*, 2008].

5.13. ANÁLISE DO *T. cruzi* POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para avaliar a população de parasitos fluorescentes nas culturas selecionadas, epimastigotas de *T. cruzi* em meio LIT em fase logarítmica de crescimento, foram diluídas em LIT para uma densidade de 2×10^6 parasitos/mL e analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson). Os parâmetros estabelecidos para a análise foram fixados baseados no valor de corte da autofluorescência das formas selvagens da cepa G de *T. cruzi*. A fluorescência de GFP foi determinada em filtro FL1 (530/30), no total de 10.000 eventos. Os dados gerados pela citometria de fluxo foram analisados pelo programa Cyflogic versão 1.2.1

5.14. CURVA DE CRESCIMENTO DOS PARASITOS TRANSFECTADOS

As formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento foram avaliadas quanto a sua taxa de crescimento partindo-se de um inóculo de 0.5×10^6 parasitos/mL em meio LIT suplementado com 10% com ausência de G418. Durante 7 dias uma alíquota foi retirada e as células foram contadas em câmara de Neubauer em duplicata nos quadrantes menores em microscópio óptico (Leica) na objetiva de 40X. A análise estatística foi verificada mediante três experimentos independentes, pelo programa GraphPad Prism 5, utilizando o teste de two-way Anova.

5.15. DIFERENCIAÇÃO CELULAR DE EPIMASTIGOTAS EM TRIPOMASTIGOTAS

A metaciclogênese foi analisada por meio do crescimento de epimastigotas em meio LIT suplementado com 10% de SFB sem G418 por 13 dias. Durante este período, o metabolismo celular intenso gera um meio deficiente de nutrientes e com pH mais ácido, ambiente ideal para o processo de metaciclogênese. Este experimento foi realizado em conjunto com a curva de crescimento de epimastigotas. Nos dias 6, 9 e 13 foram retiradas alíquotas de 10 μ L da curva, que foram pipetadas em lamínulas de vidro e permaneceram à temperatura ambiente até a sua secagem na capela de fluxo laminar. Em seguida os parasitos foram fixados com metanol por 10 minutos, lavados 2X com água de torneira, corados com Giemsa na diluição 1:9 por 40 minutos e lavados 3X com água de torneira. Após a coloração, as lamínulas foram lavadas com água destilada e após secagem foram montadas com Entellan®. A contagem diferencial das formas em culturas envelhecidas foi realizada ao microscópio óptico e as porcentagens de tripomastigotas metacíclicos foram determinadas após contagem de 300 células de cada ponto. A análise estatística foi realizada em 3 experimentos independentes como descrito no item anterior.

5.16. OBTENÇÃO DE EXTRATO PROTÉICO TOTAL DE EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi*

Para avaliar o nível de expressão das proteínas em formas epimastigotas do *T. cruzi* foram preparados extratos proteicos totais das cepas selvagens (*wild-type* "WT") e superexpressores. Um total de 1×10^7 parasitos foram coletados por centrifugação a 5000 rpm por 5 minutos a 4 °C e lisados em 100 µL de tampão de amostra SDS-PAGE 1X, as amostras foram desnaturadas por 5 minutos a 95 °C e passadas extensivamente em seringa de 1 mL com agulha de 3,8 mm de diâmetro. As amostras foram mantidas a -80 °C até a sua utilização.

5.17. OBTENÇÃO DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA DE MEMBRANA DE EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi*

O fracionamento de proteínas membranares foi realizado para investigar a presença de δ-amastina WT e mutantes de acordo com o protocolo de Berger e Kretzler (2002) modificado. Epimastigotas em fase logarítmica de crescimento (1×10^9 parasitos), foram coletadas por centrifugação a 5000 rpm por 5 minutos a 4 °C, lavadas uma vez em PBS 1X e suspensas em 3 mL de tampão de extração de fração de membrana. Em seguida os parasitos foram lisados em 5 ciclos de congelamento no nitrogênio líquido e descongelamento em água a 50 °C. O lisado foi centrifugado a 5000 rpm por 10 min e o sobrenadante (extrato proteico total - ET) foi submetido à ultracentrifugação a 105.000 g, 4 °C por 1 h. O sobrenadante desta centrifugação continha a fração enriquecida de proteínas citoplasmáticas (CFr) e o sedimento a fração enriquecida de membrana (MFr). A fração enriquecida de membrana foi suspensa em 100 µL de tampão de extração de proteína de membrana. As concentrações proteicas das amostras foram determinadas segundo o método quantitativo de Bradford (1976) pela leitura das absorbâncias a 600 nm, comparando os resultados com uma curva padrão de BSA. As amostras foram armazenadas a -80 °C até a sua utilização.

5.18. SDS-PAGE DO EXTRATO PROTÉICO TOTAL E DAS FRAÇÕES ENRIQUECIDAS

Para análises de eletroforese em gel SDS-PAGE, a quantidade de proteína aplicada foi normalizada pelo número de parasitos por canaleta (1×10^6 parasitos/canaleta). Cerca de 10 μ L do extrato proteico total (1×10^7 parasitos/mL) foram submetidos à separação eletroforética em gel de poliacrilamida 12% (solução 29:1 de acrilamida 4% e bisacrilamida 0.1%; Tris-HCl 375 mM pH 8.8; 0.1% de SDS) [SOBIESZEK, 1994]. A corrida foi feita em cuba de eletroforese vertical (Bio-Rad) com tampão SDS-PAGE 1X a 100 V até o desaparecimento do marcador de peso molecular.

5.19. COLORAÇÃO COM AZUL DE COMASSIE

Os géis corados com Azul de Coomassie foram incubados em uma solução de Azul de Coomassie (0.1% de azul de coomassie em solução de metanol: ácido acético: água, na razão 5:2:2) por 3h, seguida de descoramento em solução de metanol 30% e ácido acético 10%.

5.20. COLORAÇÃO COM PRATA

Depois de realizada a corrida eletroforética, gel foi lavado por 5 minutos com água destilada e fixados em solução fixadora (etanol 40%; ácido acético 12% e formaldeído 0.02%) por no máximo 16 h. Em seguida foi lavado 2X com etanol 30% por 10 minutos e 1X com água destilada por 20 minutos sob agitação. Foi então sensibilizado com tiosulfato de sódio 0.02% por 1 minuto e lavado 3X com água destilada. Subsequentemente, foi corado com nitrato de prata 0.1% sob agitação em banho de gelo por 20 minutos. Transcorrido este tempo foi lavado 5X com água destilada e revelado em solução de revelação (carbonato de sódio 3% e formaldeído 0.05%) até o aparecimento das bandas. Após este passo foi lavado 3X com água destilada e a revelação foi interrompida com a adição de ácido acético 5% por 1 minuto. O gel foi lavado 3X com água destilada

por 10 minutos e armazenado com água destilada em frasco vedado a 4 °C por no máximo 3 dias.

5.21. WESTERN BLOT DE PROTEÍNAS DE EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi*

As proteínas submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 12% foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose Hybond-C (Amersham) e incubadas com o anti-soro primário de interesse por 1 h (anti-GFP camundongo Santa Cruz 1:3000, cedido gentilmente pela Prof.^a Dr.^a Santuza Teixeira - UFMG; anti-PEPCK coelho 1:200 cedido gentilmente pelo Dr. Stênio Perdigão Fragoso ICC-FIOCRUZ e anti-TcHOLA coelho 1:1000 cedido gentilmente pela Dr.^a Daniela Fiori Gradia ICC-FIOCRUZ). Posteriormente foram incubadas 1h com IgG conjugado a peroxidase de camundongo (BioRad 1:5000) ou coelho (BioRad 1:1000) e reveladas por quimioluminescência (Kit Amersham ECL Western blotting detection reagent).

6. RESULTADOS

6.1. CONSTRUÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO ECTÓPICA DE δ -AMASTINAS MUTADAS EM *Trypanosoma cruzi*

Para investigar a função das proteínas δ -amastinas, foram construídas versões do vetor expressão de *T. cruzi* pTREXGFPNeo, contendo a δ -amastina TcA21 selvagem e formas mutadas. Para isso foram feitas 4 construções fusionadas ao gene repórter GFP: δ -amastina selvagem (AF); δ -amastina com 5 resíduos de treoninas conservados (posições 37, 40, 44, 55 e 60), na primeira região extracelular das δ -amastinas, mutados para alanina (5TM); amastina com 2 resíduos de cisteínas conservados (posições 42 e 139), mutados para alanina (2CM) e proteína truncada contendo somente a primeira região transmembrana, provável peptídeo sinal de endereçamento a membrana (SP) [Figura 13 A].

Na geração dos vetores com as formas mutantes foi utilizada uma técnica chamada PCR megaprimer, que é um método com duas etapas de PCR. Etapa 1: Reação de PCR utilizando iniciadores para a inserção das mutações no amplicon chamado megaprimer. Etapa 2: Reação de PCR utilizando o megaprimer para a amplificação do vetor inteiro (Figura 13 B).

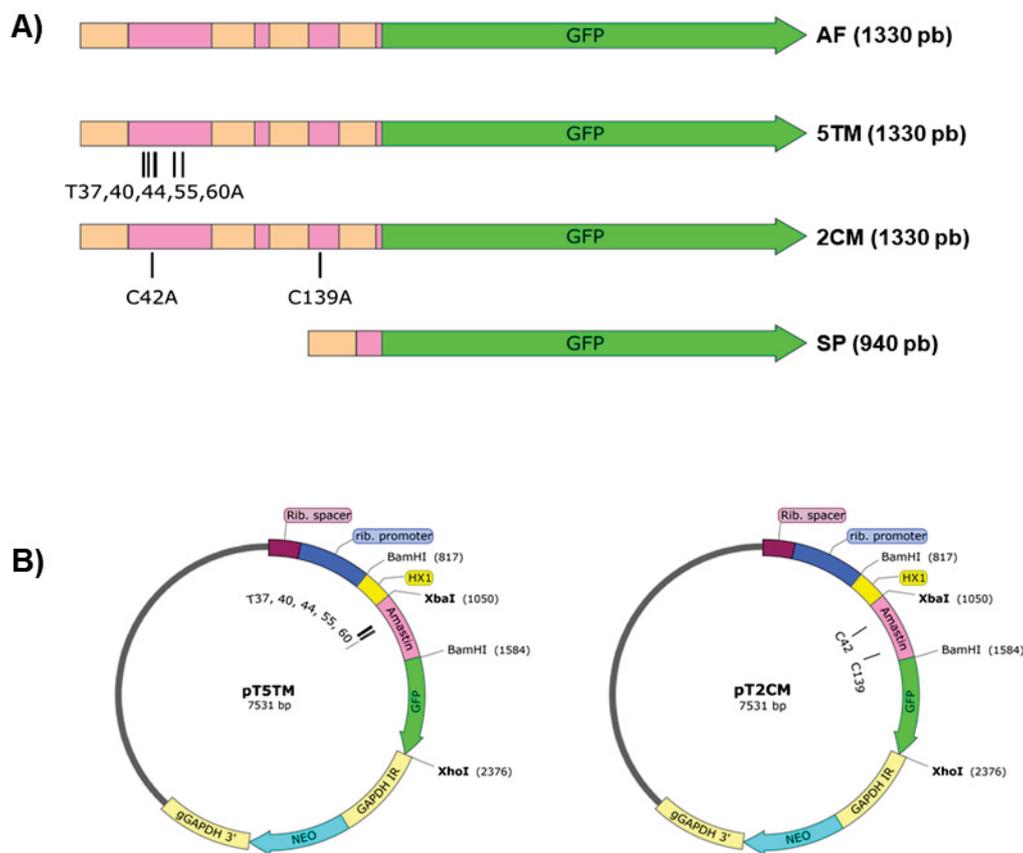


FIGURA 13 – ESQUEMA DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO E VETORES DE EXPRESSÃO DAS FORMAS DE δ -AMASTINAS MUTADAS.

FONTE: O autor (2011).

NOTA: (A) Representação esquemática das proteínas geradas fusionadas a GFP. AF: δ -amastina selvagem em fusão a GFP. 5TM: δ -amastina com mutações pontuais nas 5 treoninas para alaninas (T37A, T40A, T44A, T55A e T60A) em fusão a GFP. 2CM: δ -amastina com mutações pontuais em 2 cisteínas (C42A, C139A) em fusão a GFP. SP: proteína truncada contendo apenas o peptídeo sinal de endereçamento para membrana em fusão a GFP. As regiões hidrofóbicas estão destacadas em rosa e hidrofílicas em laranja. As linhas pretas estão destacando os locais de inserção das mutações nas treoninas e cisteínas. A região em verde representa o gene repórter GFP fusionado na região C-terminal de cada proteína. (B) Desenho esquemático dos vetores pT5TM e pT1CM.

Para as construções feitas com essa metodologia utilizamos nas reações de PCR a *Pfu* DNA polimerase que com alta capacidade revisora. Na construção da δ -amastina com 5 treoninas mutadas para alaninas (Amastina5Tm), fizemos a primeira reação para gerar o megaprimer de 84 pb contendo os códons modificados para alaninas nas posições (T37A, T40A, T44A, T55A e T60A). Para as cisteínas o megaprimer gerado foi de 267 pb com as mutações C42A e C139A. Os pesos moleculares de cada megaprimer purificado após a reação foram confirmados por eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 14).

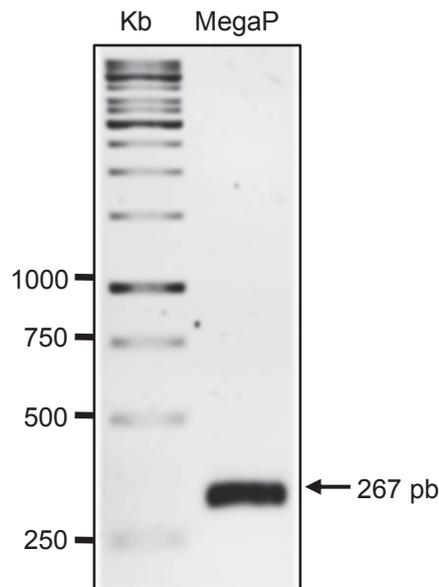


FIGURA 14 – GEL DE PURIFICAÇÃO DO MEGAPRIMER PARA A INSERÇÃO DAS MUTAÇÕES NAS CISTEÍNAS.

FONTÉ: O autor (2011).

NOTA: Gel contendo a purificação do megaprimer (MegaP) – 267 pb – amplificado pela reação de PCR com a *Pfu* DNA polimerase, utilizando os primers (1CM e 2CM) para inserir os códons mutados nas cisteínas 42 e 139. Os valores à esquerda do gel correspondem ao tamanho dos fragmentos em pares de base do marcador (Kb).

Os megaprimers purificados foram utilizados em uma segunda reação de PCR como descrito anteriormente, e os produtos de amplificação foram tratados com *Dpn* I para a degradação do DNA parental.

Para certificar que os plasmídeos extraídos das bactérias transformadas possuíam os tamanhos correto, foram realizadas digestões com as endonucleases *Xba* I e *Xho* I, indicando que os vetores continham os fragmentos de tamanho esperado (Figura 15). Para o controle pTGFP de 826 pb, correspondente ao tamanho da região codificadora de GFP e um fragmento de 1330 pb para os vetores pTAF, pT5TM e pT1CM, correspondente ao peso molecular do fragmento de amastina (selvagem ou mutante) em fusão a GFP. A proteína truncada pTSP possui um fragmento de 914 pb, peso molecular da região codificadora da primeira transmembrana em fusão com GFP (possível peptídeo sinal).

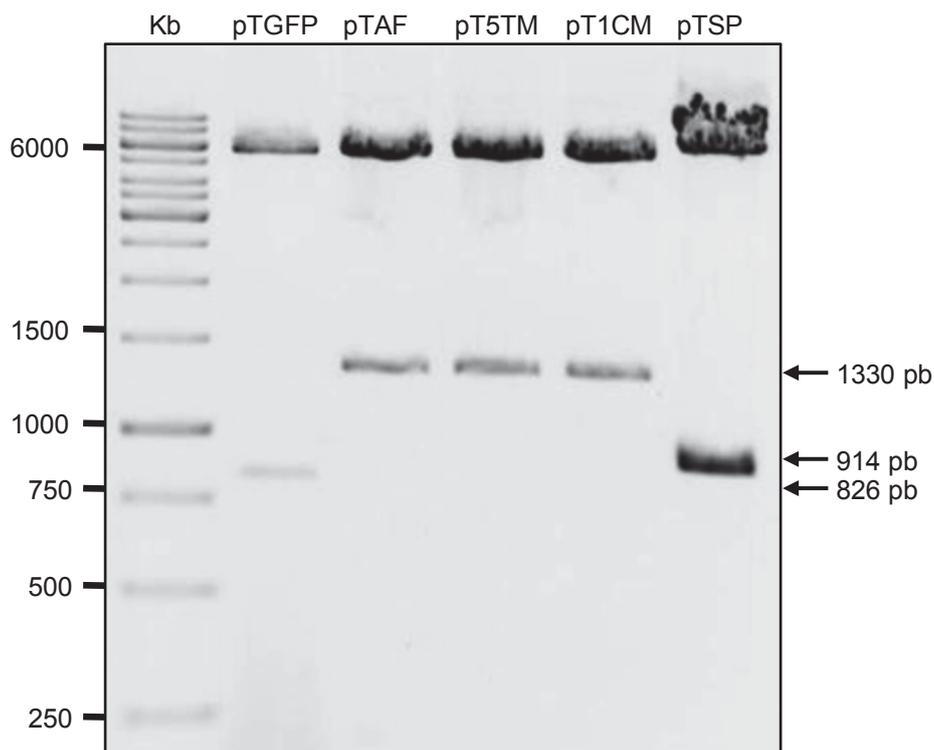


FIGURA 15 – PERFIL DE RESTRIÇÃO DOS VETORES DIGERIDOS COM AS ENDONUCLEASES Xba I E Xho I.

FONTE: O autor (2011).

NOTA: A primeira canaleta mostra o marcador de peso molecular, com os valores em pares de bases para cada fragmento a esquerda. As demais canaletas exibem o perfil de restrição para cada vetor pTGFP (826 pb), pTAF, pT5TM e pT1CM (1330 pb) e pTSP (914 pb).

As clonagens dos vetores com as mutações foram confirmadas por sequenciamento utilizando o primer HX1 que anela no final da região HX1 do vetor pTREX. Os resultados dos sequenciamentos mostram as inserções corretas das mutações das 5 treoninas para alaninas (Figura 16 A e B) e somente a cisteína 42 mutada para alanina (Figura 17 A e B). Os passos para a mutação da cisteína 139 foram repetidos, mas não obtivemos êxito nas estratégias utilizadas. Devido ao fato de somente a cisteína 42 ser mutada nós renomeamos o vetor pT2CM para pT1CM.

A) TcA21 ----ATGAGCAAACCTTGGCGCGATTCTCTACGGTGTGGTGGGCTTCCTTGCCTTCCTGT 55
5TM AGCAATGAGCAAACCTTGGCGCGATTCTCTACGGTGTGGTGGGCTTCCTTGCCTTCCTGT 240

TcA21 TCGTGCTGGTTGGGACGCCGATAGACCAGTTCCGCGCGAAAAGAGAAGGGAGCCACTGGCA 115
5TM TCGTGCTGGTTGGGACGCCGATAGACCAGTTCCGCGCGAAAAGAGAAGGGAGCCGCTGGCA 300

TcA21 ACACGCCGTGCATAACGTTGTGGGGAATTAAGGAAGACTGCCACAGCACGAAGTATGAAT 175
5TM ACACGCCGTGCATAACGTTGTGGGGAATTAAGGAAGACTGCCACAGCACGAAGTATGAAT 360
** *****

TcA21 TCACCGTTGGGGAAGATTTTCGTGAATGCCCTCAGTCTTGAGGCTGTTCAGGATGGCCG 235
5TM TCACCGTTGGGGAAGATTTTCGTGAATGCCCTCAGTCTTGAGGCTGTTCAGGATGGCCG 420
** *****

TcA21 AGGCGTTCTCCATTATTTCCATTTTGTGCTGCTTGTGCTGCCACCGCACTTGGCGTGGCGG 295
5TM AGGCGTTCTCCATTATTTCCATTTTGTGCTGCTTGTGCTGCCACCGCACTTGGCGTGGCGG 480

TcA21 CACACTTCTGCCTAAAATCTCTCAAGATCTTTGCGACCCTGCTGTTGGTGGTCAGCATTG 355
5TM CACACTTCTGCCTAAAATCTCTCAAGATCTTTGCGACCCTGCTGTTGGTGGTCAGCATTG 540

TcA21 TGACGGTTGGGCTCGTTTGGATACCCATGGCCTACTTTTACAACCATGACGTGGACAATT 415
5TM TGACGGTTGGGCTCGTTTGGATACCCATGGCCTACTTTTACAACCATGACGTGGACAATT 600

TcA21 GCTTTGGAACACCGCTCAAAACAGGTTTCAAATACGGTGGTGGCTTGTGCATCATTGTGA 475
5TM GCTTTGGAACACCGCTCAAAACAGGTTTCAAATACGGTGGTGGCTTGTGCATCATTGTGA 660

TcA21 TTGGATGGTGCCTGATATTTGTGCGCGTGTGCTTCTGCGTATGCTAGGGATCC----- 529
5TM TTGGATGGTGCCTGATATTTGTGCGCGTGTGCTTCTGCGTATGCTAGGGATCCAAGGAG 720

B) 5TM 228 LXFLFVLVGTPIDQFRAKEKGAAGNAPCIALWGIKEDCHSAKYEFVVGEDFRECPVLRRL 407
L FLFVLVGTPIDQFRAKEKGAAGNAPCIALWGIKEDCHSAKYEFVVGEDFRECPVLRRL
TcA21 15 LAFLFVLVGTPIDQFRAKEKGAAGNAPCIALWGIKEDCHSAKYEFVVGEDFRECPVLRRL 74

5TM 408 FRMAEAFSIIISILLLLAATALGVAAHFCLKSLKIFATLLLVVSIIVTVGLVWIPMAYFYNH 587
FRMAEAFSIIISILLLLAATALGVAAHFCLKSLKIFATLLLVVSIIVTVGLVWIPMAYFYNH
TcA21 75 FRMAEAFSIIISILLLLAATALGVAAHFCLKSLKIFATLLLVVSIIVTVGLVWIPMAYFYNH 134

5TM 588 DVDNCFGTPLKTGSKYGGGFVIVIGWCLIFVAVVLLRML 707
DVDNCFGTPLKTGSKYGGGFVIVIGWCLIFVAVVLLRML
TcA21 135 DVDNCFGTPLKTGSKYGGGFVIVIGWCLIFVAVVLLRML 174

FIGURA 16 – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS DA δ-AMASTINA TcA21 COM O MUTANTE 5TM.

FONTE: O autor (2011).

NOTA: (A) mostra o alinhamento das sequências de nucleotídeos da TcA21 e 5TM realizado pelo programa Clustal IW 2 e a marcação em verde destaca as mudanças dos 5 códons de treoninas para alaninas. No painel (B) a comparação de aminoácidos da TcA21 e 5TM utilizando como ferramenta de bioinformática blastx e em verde a confirmação das 5 mutações T/A.

A) 2CM ATGAGCAAACCTGGCGCGATTCTCTACGGTGTGGTGGGCTTCCTTGCCTTCCTGTTC 240
TcA21 ATGAGCAAACCTGGCGCGATTCTCTACGGTGTGGTGGGCTTCCTTGCCTTCCTGTTC 57

2CM GTGCTGGTTGGGACGCCGATAGACCAGTTCGCGCGAAAAGAGAAGGGAGCCACTGGCAAC 300
TcA21 GTGCTGGTTGGGACGCCGATAGACCAGTTCGCGCGAAAAGAGAAGGGAGCCACTGGCAAC 117

2CM ACGCCGGCCATAACGTTGTGGGAATTAAGGAAGACTGCCACAGCACGAAGTATGAATTC 360
TcA21 ACGCCGTGCATAACGTTGTGGGAATTAAGGAAGACTGCCACAGCACGAAGTATGAATTC 177

2CM ACCGTTGGGGAAGATTTTCGTGAATGCCCTCAGTCTTGAGGCTGTTTCAGGATGGCCGAG 420
TcA21 ACCGTTGGGGAAGATTTTCGTGAATGCCCTCAGTCTTGAGGCTGTTTCAGGATGGCCGAG 237

2CM GCGTTCCTCATTATTTCCATTTTGTGTGCTGCTTGCTGCCACCGCACTTGGCGTGGCGGCA 480
TcA21 GCGTTCCTCATTATTTCCATTTTGTGTGCTGCTTGCTGCCACCGCACTTGGCGTGGCGGCA 297

2CM CACTTCTGCCTAAAATCTCTCAAGATCTTTCGACCCCTGCTGTTGGTGGTCAGCATITGG 540
TcA21 CACTTCTGCCTAAAATCTCTCAAGATCTTTCGACCCCTGCTGTTGGTGGTCAGCATITGG 357

2CM ACGGTTGGGCTCGTTTGGATACCCATGGCCTACTTTTACAACCATGACGTGGACAATTGC 600
TcA21 ACGGTTGGGCTCGTTTGGATACCCATGGCCTACTTTTACAACCATGACGTGGACAATTGC 417

2CM TTTGGAACACCGCTCAAAACAGGTTTCGAAATACGGTGGTGGCTTTGTCATCATTGTGATT 660
TcA21 TTTGGAACACCGCTCAAAACAGGTTTCGAAATACGGTGGTGGCTTTGTCATCATTGTGATT 477

2CM ACGGAAANTACC 852
TcA21 -----

B) 2CM 238 FVLVGTPIDQFRAKEKGATGNTPCITLWGIKEDCHSTKYEFTVGEDFRECPSVLRLFRMA 417
FVLVGTPIDQFRAKEKGATGNTPCITLWGIKEDCHSTKYEFTVGEDFRECPSVLRLFRMA
TcA21 19 FVLVGTPIDQFRAKEKGATGNTPCITLWGIKEDCHSTKYEFTVGEDFRECPSVLRLFRMA 78

2CM 418 EAFSIIISILLLLAATALGVAAHFCLKSLKI FATLLLVSIVTVGLVWIPMAYFYNHVDVN 597
EAFSIIISILLLLAATALGVAAHFCLKSLKI FATLLLVSIVTVGLVWIPMAYFYNHVDVN
TcA21 79 EAFSIIISILLLLAATALGVAAHFCLKSLKI FATLLLVSIVTVGLVWIPMAYFYNHVDVN 138

2CM 598 CFGTPLKTGSKYGGGFVIIVIGWCLIFVAVVLLRML 705
CFGTPLKTGSKYGGGFVIIVIGWCLIFVAVVLLRML
TcA21 139 CFGTPLKTGSKYGGGFVIIVIGWCLIFVAVVLLRML 174

FIGURA 17 – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS DA δ-AMASTINA TcA21 COM O MUTANTE 2CM.

FONTE: O autor (2011).

NOTA: (A) mostra o alinhamento das sequências de nucleotídeos da TcA21 e 2CM realizado pelo programa Clustal IW 2 e a marcação em amarelo destaca a mudança do códon da cisteína 42 para alanina (C42A) e em azul mostra que o códon da cisteína 139 não foi mutado. O painel (B) mostra a comparação de aminoácidos da TcA21 e 2CM utilizando como ferramenta de bioinformática blastx, em amarelo a confirmação da mutação C42A e em azul a confirmação a não mutação da cisteína 139.

6.2. OBTENÇÃO DOS TRANSFECTANTES COM OS VETORES pT5TM, pT1CM E pTSP

As culturas de epimastigotas da cepa G de *T. cruzi* foram transfectadas por eletroporação com aproximadamente 100 µg de cada vetor não linearizado. Após vinte quatro horas da eletroporação, foi acrescentada a cultura 100 µg/mL de G418 e as células resistentes à droga foram selecionadas com um aumento gradual de G418 a cada semana por 30 dias até atingir 500 µg/mL. Os parasitos considerados resistentes foram os que se apresentaram viáveis ao término destes 30 dias quando comparados com o controle negativo (parasitos eletroporados sem DNA).

Neste tempo de seleção também foi verificada a seleção por meio da expressão do gene repórter GFP. Observamos que a eficiência da transfecção pela quantidade de parasito expressando GFP após 24 horas foi menor que 1%, mas ao fim da seleção (30 dias após a transfecção), a quantidade de parasitos fluorescentes aumentou consideravelmente, como mostram os resultados de citometria de fluxo dos parasitos transfectados (Figura 18). A figura 18 A mostra as porcentagens de epimastigotas expressando o gene repórter GFP para as culturas controle transfectadas com o pTGFP e pTAF cedidas pelo grupo do Prof. Dr Renato Motara da UNIFESP. Podemos observar que 97,58% da cultura transfectada com pTGFP, expressa o gene repórter mostrando a homogeneidade de fluorescentes da cultura. Isto também é observado nos parasitos expressando amastina em fusão com GFP (AF::GFP) com uma porcentagem de 86,43% de fluorescentes.

Quando comparados com as demais culturas, os parasitos carregando formas mutadas de amastina apresentaram uma redução considerável da porcentagem de parasitos fluorescentes, principalmente para o mutante expressando 5TM::GFP (Figura 18 B) que foi de 4,36% e SP::GFP 44,58% (Figura 18 D). Já o mutante 1CM::GFP (Figura 18 C) apresentou uma maior homogeneidade de fluorescentes 78,5%, um valor bem próximo aos dos controles.

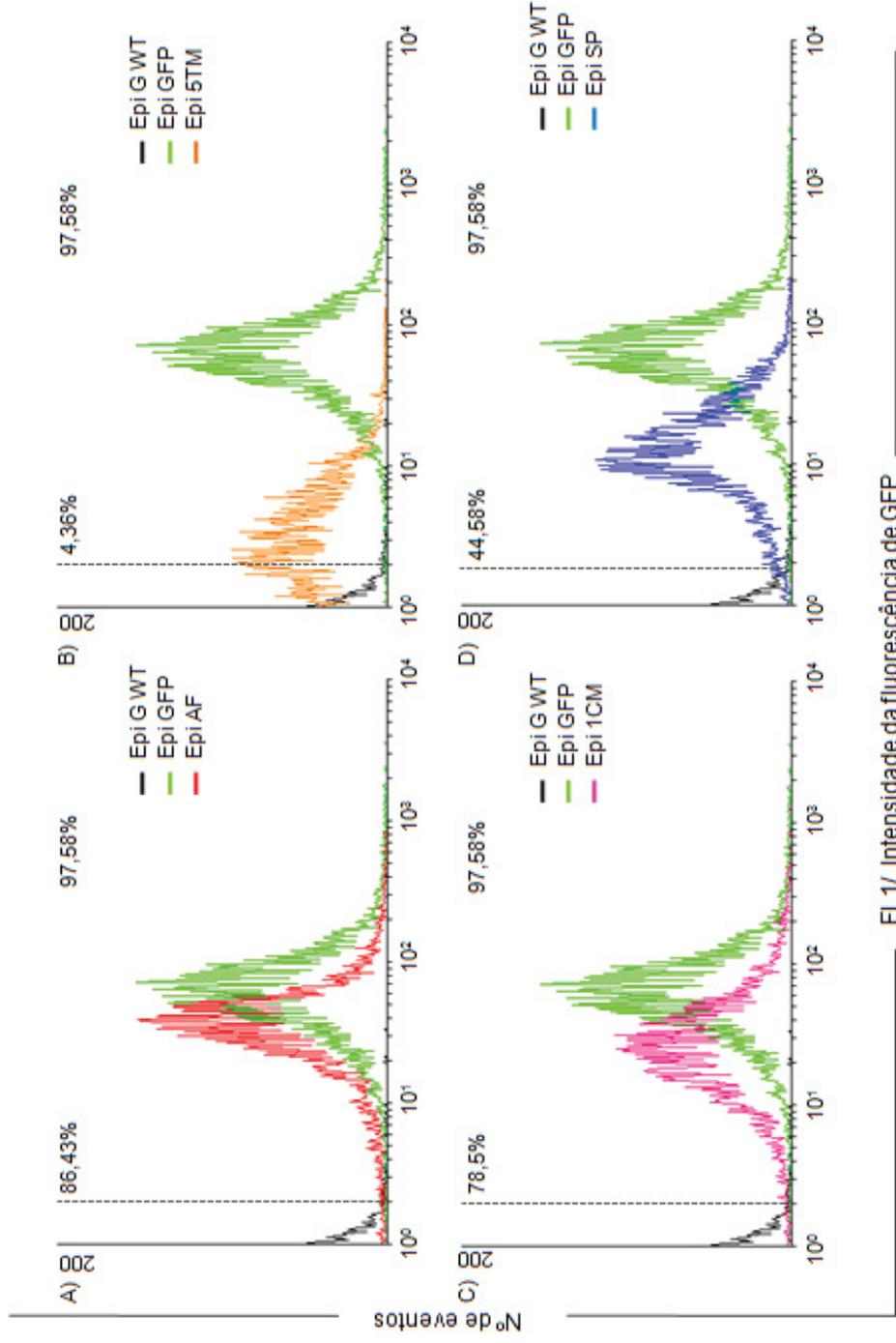


FIGURA 18 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS CULTURAS DE EPIMASTIGOTAS ANALISADAS POR CITOMETRIA DE FLUXO. FONTE: O autor (2011).

NOTA: No eixo X a intensidade de fluorescência de GFP, adquirida no filtro FL1 que capta a frequência de 530 nm. As porcentagens indicadas na porção superior de cada gráfico são referentes às porcentagens, de GFP ao lado direito e de GFP fusionado com a amastina selvagem ou mutante do lado esquerdo. (A) mostra as epimastigotas selvagens da cepa G (WT) utilizadas para zerar as análises (linha tracejada a esquerda do gráfico) e as epimastigotas expressando GFP (GFP) e amastina em fusão com GFP (AF::GFP), utilizadas como controle para a comparação com as proteínas mutadas. Em (B) a representação gráfica da fluorescência dos epimastigotas 5TM::GFP, em (C) da 1CM::GFP e em (D) SP::GFP. Foram analisados 10000 eventos para cada cultura.

6.3. AVALIAÇÃO E LOCALIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS FLUORESCENTES

A localização das proteínas selvagem (AF::GFP) e mutadas (5TM::GFP e 1CM::GFP) com GFP fusionada no N-terminal, foi realizada após a seleção dos parasitos transfectados. Para averiguar as suas localizações foram preparadas lâminas para análise de microscopia confocal e extrato protéico total para a confirmação por meio de *Western blots* com anti-GFP.

As lâminas para as análises por microscopia confocal das culturas de epimastigotas expressando GFP, AF::GFP, 5TM::GFP, 1CM::GFP e SP::GFP em fase exponencial de crescimento foram preparadas por centrifugação a 3000 rpm 10 minutos, ressuspendidas em PBS 1X para lavagem e tratadas com DAPI para a coloração do núcleo e cinetoplasto. Posteriormente foram realizadas as localizações no microscópio confocal a laser. A Figura 19 mostra os parasitos transfectados expressando 5TM::GFP, 1CM::GFP e SP::GFP e os controles de GFP e AF::GFP.

Observa-se que no parasito expressando GFP (Figura 19 A-C) a marcação da proteína está fortemente dispersa por toda a célula indicando uma marcação citoplasmática. Já no expressando AF::GFP há uma marcação de membrana plasmática e um sinal fraco disperso no citoplasma (Figura 19 D-F).

Para as δ -amastinas mutantes é observado um padrão de localização de membrana para a 1CM::GFP, semelhante aos observados na AF::GFP (Figura 19 J-M). Entretanto a 5TM::GFP apresenta um sinal diferenciado, com pouca marcação de membrana, acúmulo citoplasmático, possivelmente em alguma organela, e envoltório perinuclear (Figura 19 G-I). A localização da SP::GFP (Figura 19 N-P) é perinuclear com marcação dispersa em organelas citoplasmáticas.

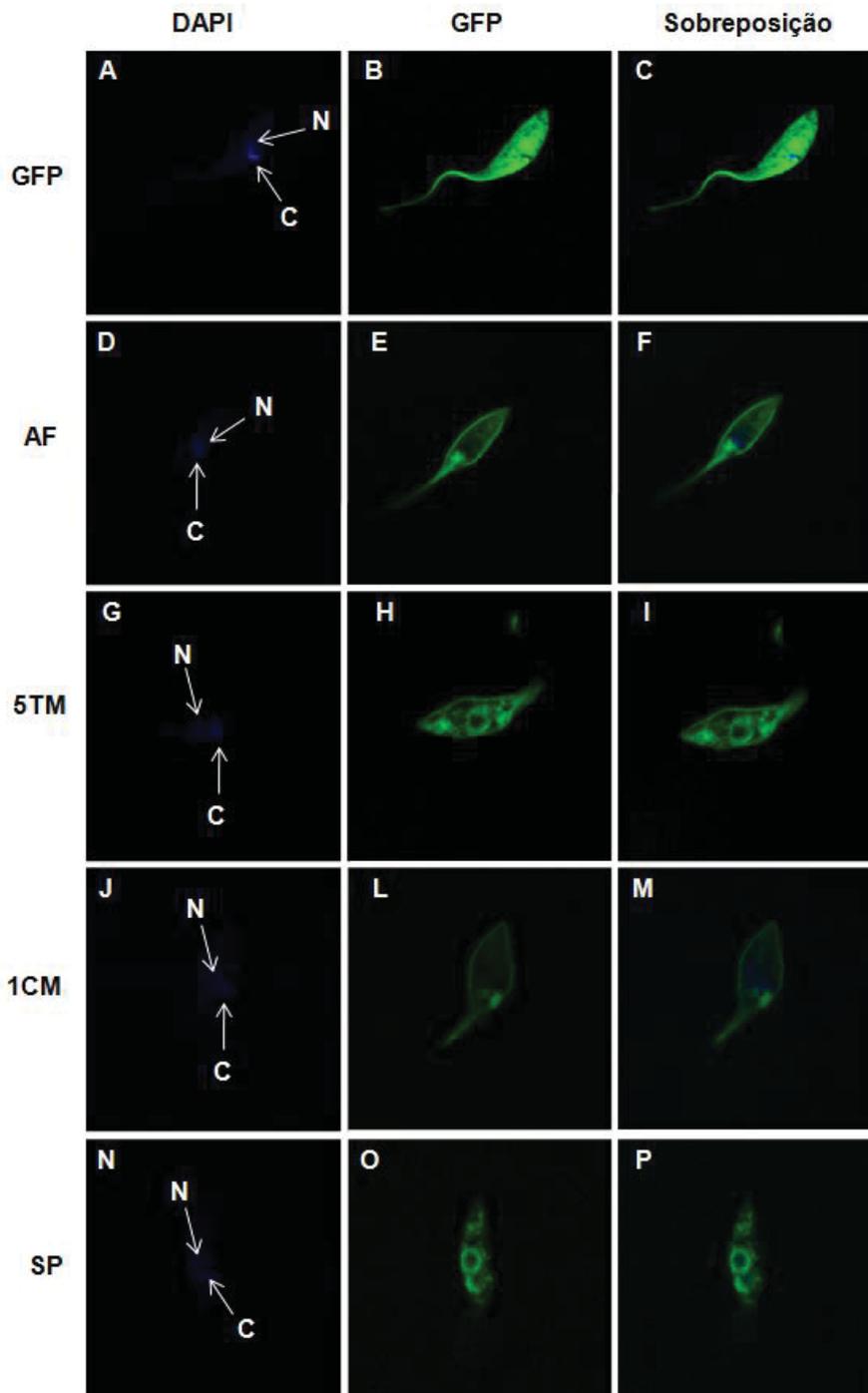


FIGURA 19 – LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DAS PROTEÍNAS δ -AMASTINA SELVAGEM E MUTADAS EM FUSÃO COM GFP EXPRESSAS EM FORMAS EPIMASTIGOTAS DA CEPA G DE *T. cruzi*.

FONTE: O autor (2011).

NOTA: As imagens foram obtidas por microscopia confocal utilizando a objetiva de 100x e zoom de 2,2x (Confocal Radiance 2100, Bio Rad, Hemel Hempstead, UK). (A-C) superexpressão de GFP (proteína verde fluorescente). (D-F) δ -amastina (TcA21) em fusão com GFP (AF). (G-I) δ -amastina com as 5 mutações treoninas/alaninas (5TM) em fusão com GFP. (J-M) δ -amastina com 1 mutação cisteína/alanina (1CM) em fusão com GFP. (N-P) possível peptídeo sinal da δ -amastina em fusão com GFP. (A, D, G, J e N) marcação do cinetoplasto "C" e do núcleo "N" com DAPI. (B, E, H, L e O) marcação do GFP com o filtro de FITC. (C, F, I, M e P) sobreposição das imagens com a marcação de DAPI e GFP.

A fim de confirmar a expressão correta destas proteínas realizamos ensaios de *Western blot* com anticorpos específicos anti-GFP e anti-PEPCK em diferentes condições. A Figura 20 mostra os resultados do *Western blots* das amostras do extrato protéico total de epimastigotas WT, GFP e AF::GFP em diferentes condições.

Os dados do imunoblote mostram uma proteína de 26,8 kDa para o superexpressor de GFP e 44,16 kDa para a proteína AF::GFP, tamanhos preditos por análises *in silico*. No entanto ao alterarmos as condições de preparo das mostras notamos alterações neste perfil esperado. Notamos que ao aquecer as amostras a 100 °C por 10 minutos na presença do agente redutor β -mercaptoetanol a migração da proteína é alterada (Figura 20 A). A banda que é de 44,16 kDa apresenta com um peso maior que 66 kDa. Nas demais condições este padrão não é encontrado.

Como controle de aplicação das amostras, avaliamos a presença da proteína glicossomal chamada fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), com o anticorpo anti-PEPCK e observamos que todas as amostras apresentaram quantidades semelhantes da proteína e seu padrão de migração não foi afetado nas diferentes condições desnaturantes (peso molecular teórico ~58,9 kDa).

Na Figura 20B é possível observar que as amostras não fervidas não exibem alteração no padrão de migração das proteínas GFP e AF::GFP nos diferentes tratamentos. Este resultado sugere a formação de um artefato de migração, como formação de aglomerados proteicos devido a utilização do agente redutor β -mercaptoetanol somado à fervura da amostra e não um aumento do peso molecular por glicosilação da proteína como se pensava.

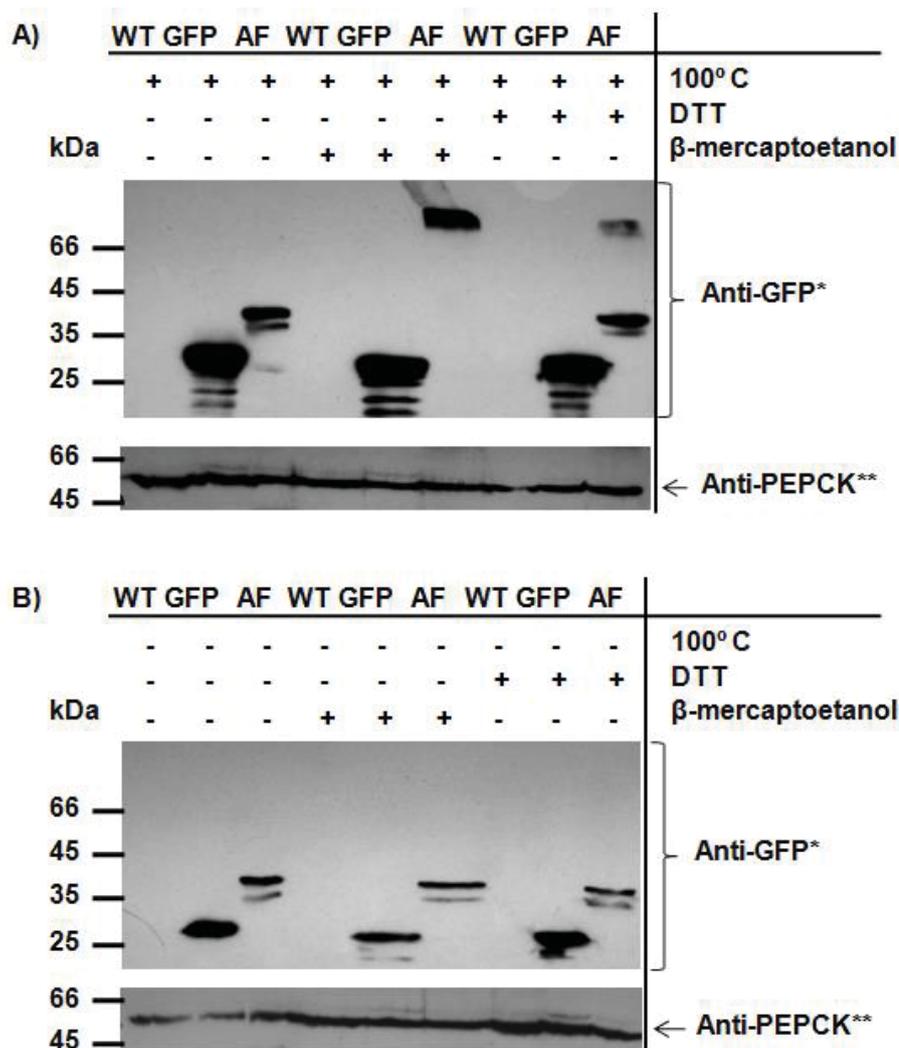


FIGURA 20 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DESNATURANTES POR MEIO DE *WESTERN BLOT*.

FONTE: O autor (2011).

NOTA: Extratos protéicos totais de $0,8 \times 10^7$ parasitos por poço foram analisados com anticorpo monoclonal anti-GFP (1:3000) e com anti-PEPCK (1:200). Nos painéis (A e B) os números do lado esquerdo representam os pesos moleculares do marcador molecular e as nomenclaturas na porção superior os parasitos analisados. WT = *T. cruzi* da cepa G selvagem, GFP = transfectante expressando GFP, AF = transfectante expressando δ -amastina (TcA21) em fusão com GFP. As diferentes condições desnaturantes estão representadas na porção direita dos painéis: DTT 5mM, β -mercaptoetanol 5% e aquecimento de 100° C por 10 min. (A) apresenta as amostras fervidas e (B) as não fervidas. A proteína controle utilizada foi a PEPCK. Todas as amostras foram tratadas com tampão SDS-PAGE (Tris-HCl 50mM, pH 6,8, Glicerol 10%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1%). * GFP peso molecular 26,8 kDa. **PECK peso molecular de 58,9 kDa.

Depois de analisadas as diferentes condições de preparo das amostras para eletroforese, optamos por não aquecermos as amostras e tratarmos com 5 mM de DTT. Fixada estas condições realizamos outro *Western blot* com as

amostras dos extratos protéicos dos parasitos transfectados GFP, AF::GFP, 5TM::GFP, 1CM::GFP e SP::GFP (Figura 21).

Observamos a presença das proteínas com os tamanhos esperados de aproximadamente 26,8 kDa para o GFP, 44,16 kDa para as proteínas AF::GFP, 5TM::GFP e 1CM::GFP e 33,31 kDa para SP::GFP (Figura 21A).. A intensidade da banda corrobora com os dados de citometria de fluxo, que mostram a baixa expressão de GFP para o transfectado 5TM quando comparado com os demais. Na Figura 21B foi possível observar que a quantidade da proteína controle PEPCK (58,9 kDa) não foi alterada em todas as amostras.

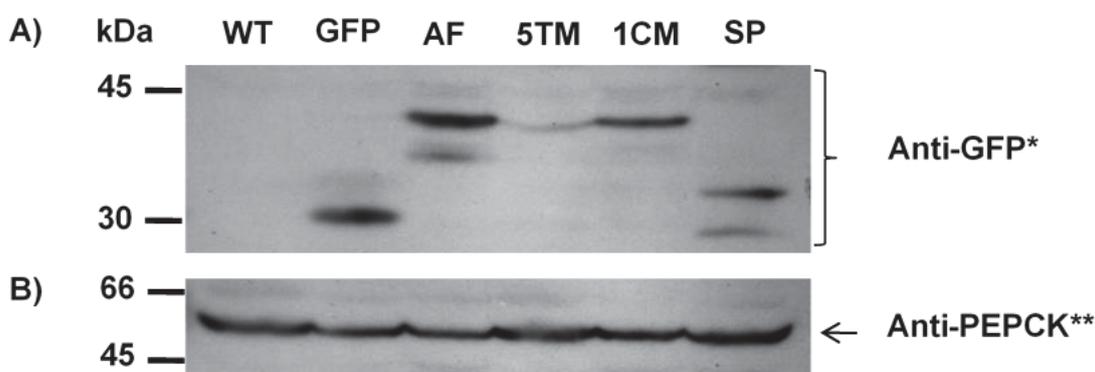


FIGURA 21 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO MUTADAS E SELVAGENS.

FONTE: O autor (2011).

NOTA: Extratos protéicos totais de $0,8 \times 10^7$ parasitos por poço foram analisados com anticorpo monoclonal anti-GFP (1:3000) no painel A e com anti-PEPCK (1:200) no painel B. No painel (A) os números do lado esquerdo representam os pesos moleculares das proteínas do marcador molecular e as nomenclaturas na porção superior os parasitos analisados. WT = *T. cruzi* da cepa G selvagem, GFP = transfectado expressando GFP, AF = transfectado expressando δ -amastina (TcA21) em fusão com GFP, 5TM = transfectado expressando δ -amastina com 5 treoninas mutadas em fusão com GFP, 1CM = transfectado expressando δ -amastina com 1 cisteína mutada em fusão com GFP e SP = região do provável peptídeo sinal da δ -amastina fusionado com GFP. Em (B) a análise da proteína PEPCK utilizada como controle nesta análise. As amostras foram tratadas com tampão SDS-PAGE com 5mM de DTT e não foram aquecidas a 100° C. * GFP peso molecular 26,8 kDa. **PECK peso molecular de 58,9 kDa.

6.4. CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO NA SUPERFÍCIE DE EPIMASTIGOTAS

Depois de verificar a expressão das proteínas mutadas por microscopia confocal e *Western blot* do extrato protéico total, nós decidimos obter frações enriquecidas de membranas em condições não desnaturantes, uma vez que temos como perspectiva utilizar essas frações em ensaios de co-precipitação para identificar proteínas parceiras. Previamente, as culturas de epimastigotas transfectadas em fase exponencial foram homogeneizadas com tampão de extração de fração de membrana e armazenados por 48 horas a -20 °C. Posteriormente, estes parasitos foram lisados com cinco ciclos de congelamento e descongelamento, centrifugados a 3000 rpm e ultracentrifugados a 105.000 g, o sobrenadante da ultracentrifugação corresponde a fração de proteínas solúveis citoplasmáticas e organelares (S) e precipitado com a fração enriquecida de membrana (M).

Estas frações foram submetidas à coloração com prata (dados não mostrados) e análises por *Western blot* utilizando o anticorpo anti-GFP e anti-TcHOLA, como mostrado na Figura 22. Na Figura 22A, com a incubação com anticorpo anti-GFP, podemos observar um enriquecimento de GFP (26,8 kDa) na fração S e ausência na fração M, confirmando os dados de localização citoplasmática por microscopia confocal.

Para os parasitos expressando a AF::GFP, 5TM::GFP e 1CM::GFP (44,16 kDa) e SP::GFP (33,31 kDa) é possível observar o inverso, com um maior enriquecimento M e ausência na fração S. Estes dados também corroboram os dados de microscopia, para a AF::GFP e 1CM::GFP que possuem localização de membrana. Ele também torna mais conciso os dados da localização da 5TM::GFP que é dispersa no citoplasma, envoltório perinuclear e membrana, mostrando que a mutação levou a uma localização diferenciada, mas que a proteína continua localizada na membrana, sendo parte localizada na membrana plasmática e parte na membrana de outras organelas.

A eficiência do fracionamento subcelular foi confirmada por meio do *Western blot* (Figura 22A) dessas frações utilizando anti-TcHOLA diluído (1:1000). A TcHOLA é uma GTPase de 45 kDa que pode se encontrar associada a ribossomos, podendo fazer parte do complexo de ribonucleoproteínas relacionadas com o processo traducional em *T. cruzi* (GRADIA, *et al.*, 2009).

Porém de acordo com os resultados encontrados, notamos que não foi uma boa escolha para a confirmação da eficiência, visto que pode ser encontrada associada ou não a ribossomos, isto explica o seu aparecimento tanto na fração enriquecida de membrana quanto na fração solúvel.

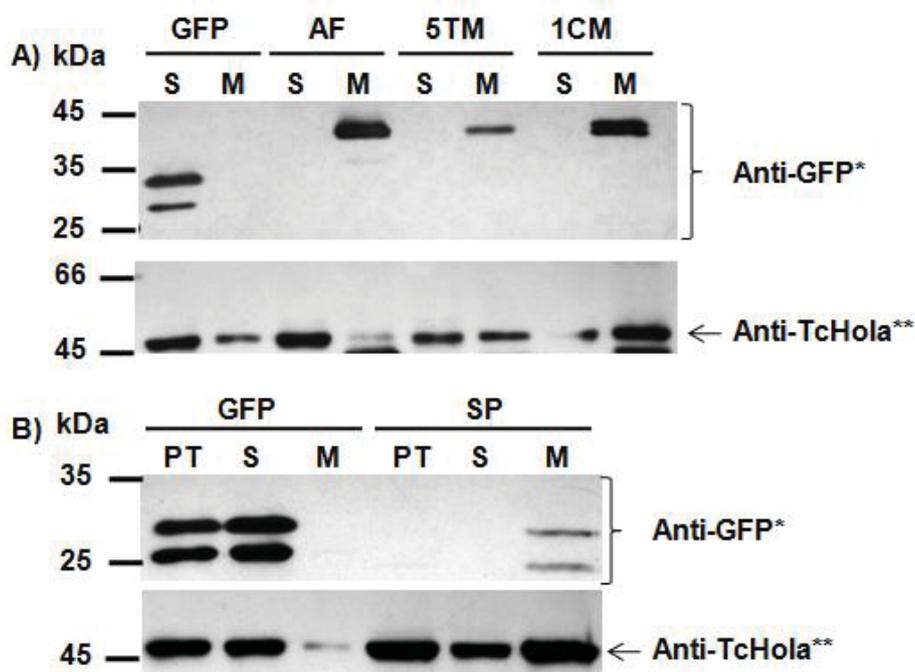


FIGURA 22 – LOCALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS DAS FRAÇÕES SUBCELULARES DOS EPIMASTIGOTAS TRANFECTADOS.

FONTE: O autor (2011).

NOTA: As frações enriquecidas foram analisadas com anticorpo monoclonal anti-GFP (1:3000) e com anti-TcHOLA (1:1000) no painel A e B. Os números do lado esquerdo representam os pesos moleculares das proteínas do marcador molecular e as nomenclaturas na porção superior os parasitos analisados e as respectivas. GFP = transfectado expressando GFP, AF = transfectado expressando δ -amastina (TcA21) em fusão com GFP, 5TM = transfectado expressando δ -amastina com 5 treoninas mutadas em fusão com GFP, 1CM = transfectado expressando δ -amastina com 1 cisteína mutada em fusão com GFP e SP = região do provável peptídeo sinal da δ -amastina fusionado com GFP, PT = proteínas totais, S = fração solúveis citoplasmática e organelares enriquecida e M = fração de membrana enriquecida. As amostras foram tratadas com tampão SDS-PAGE com 5mM de DTT e não foram aquecidas a 100° C. * GFP peso molecular 26,8 kDa. **TcHOLA peso molecular de 45 kDa.

A figura 22B, mostra o *Western blot* mostra o enriquecimento da proteína contento o SP::GFP na fração de membrana (33,31 kDa), corroborando com os dados de microscopia. A TcHOLA também foi utilizada como controle no experimento.

6.5. ANÁLISES FENOTÍPICAS DOS TRANSFECTANTES

6.5.1. Morfologia dos transfectados

A morfologia dos parasitos foi observada após seleção. As culturas dos epimastigotas transfectados expressando GFP, AF::GFP, 5TM::GFP e 1CM::GFP em fase de crescimento exponencial (1×10^7 parasitos/mL), foram coradas com Giemsa e analisadas ao microscópio ótico. Não foi possível observar alterações morfológicas visíveis nas epimastigotas transfectadas quando comparadas aos parasitos selvagens. Todos os parasitos apresentaram aspectos típicos de epimastigotas, com flagelo longo, núcleo e cinetoplasto na porção anterior (dados não mostrados).

6.5.2. Taxa de crescimento dos parasitos transfectados

Os parasitos foram avaliados quanto a sua capacidade de crescimento após seleção. Os parasitos WT e superexpressores em fase exponencial de crescimento foram diluídos para uma densidade de 5×10^5 parasitos/mL em meio LIT sem antibiótico e foram mantidos durante 7 dias a 28°C (Figura 23). Não observamos diferença significativa na taxa de crescimento entre os parasitos analisados.

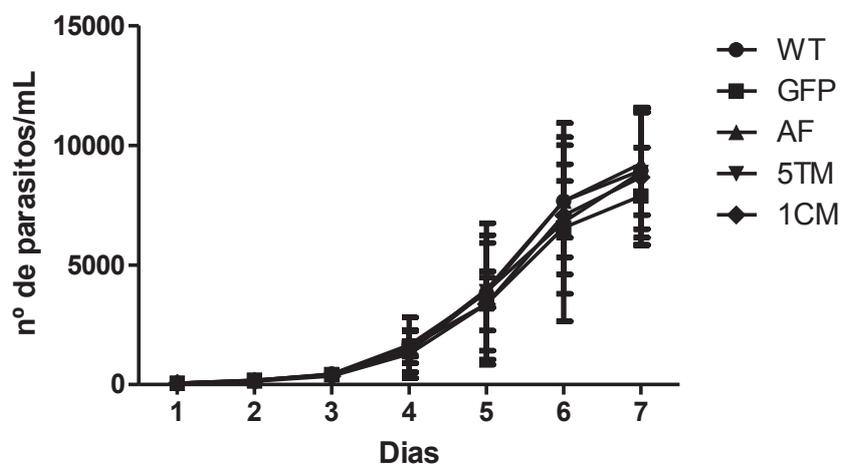


FIGURA 23 – CURVA DE CRESCIMENTO DOS EPIMASTIGOTAS TRANSFECTADOS E SELVAGEM.

FONTE: O autor (2011).

NOTA: O número de parasitos por mL é representado no eixo Y e o tempo de contagem no eixo X. A curva em azul representa a taxa de crescimento do epimastigota selvagem (*T. cruzi* G WT) e os demais dos transfectados selecionados. Os dados representam três experimentos independentes analisados estatisticamente no programa GraphPad Prism 5, todos apresentaram $p > 0,05$.

6.5.3. Metaciclogênese in vitro dos parasitos transfectados

A taxa de diferenciação de formas epimastigotas em tripomastigotas foi analisada nos parasitos transfectados. A metaciclogênese foi feita em culturas envelhecidas mantidas por 13 dias a 28° C sem realização de repiques. A contagem foi realizada nas lâminas coradas com Giemsa no microscópio ótico. Foram contados 500 parasitos nos dias 6, 9 e 13 e analisada a porcentagem de tripomastigotas metacíclicos para cada contagem (Figura 24).

Observamos que os superexpressores de AF::GFP possuem uma capacidade de diferenciação mais precoce que os parasitos WT, ou os expressando GFP, 5TM::GFP e 1CM::GFP. Foi possível notar este aumento para o AF::GFP a partir do dia 9 ($p < 0,001$). Ao analisarmos os mutantes 5TM::GFP e 1CM::GFP notamos que o comportamento de diferenciação é semelhante ao WT.

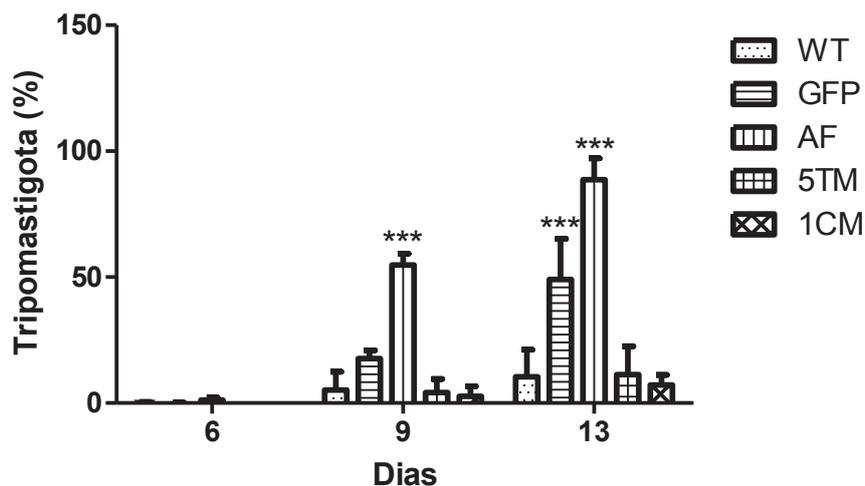


FIGURA 24 – PORCENTAGEM DE TRIPOMASTIGOTAS DOS TRANSFECTADOS EM CULTURA ENVELHECIDA.

FONTE: O autor (2011).

NOTA: A porcentagem de tripomastigotas a cada 500 parasitos contados na cultura envelhecida é representada no eixo Y e os dias de contagem no eixo X. Os dados representam três experimentos independentes analisados estatisticamente no programa GraphPad Prism 5.

*** p<0,001

Para observarmos a fluorescência das culturas envelhecidas de parasito selvagem (WT), ou expressando GFP, AF::GFP, 5TM::GFP, 1CM::GFP e SP::GFP foi realizada a citometria de fluxo com os parasitos das culturas envelhecidas no 13º dia de crescimento (Figura 25). A figura 25 A mostra a fluorescência do WT, AF::GFP e GFP, observamos que a fluorescência do AF::GFP (98,6%) e GFP (99,72%) manteve-se elevada, resultados estes semelhantes aos encontrados para a fluorescência das epimastigotas analisadas por citometria de fluxo apresentados anteriormente (Figura 18A). Já o transfectado 5TM::GFP (Figura 25 B) houve um aumento na quantidade de fluorescentes (40,57%), que para as epimastigotas era de 4,36% (Figura 18 B). Os transfectados 1CM::GFP e SP::GFP (Figura 25 C e D) tiveram redução da fluorescência nas culturas envelhecidas de aproximadamente 35% e 44% respectivamente, quando comparados com os epimastigotas analisados (Figura 18 C e D).

Culturas envelhecidas por 13 dias

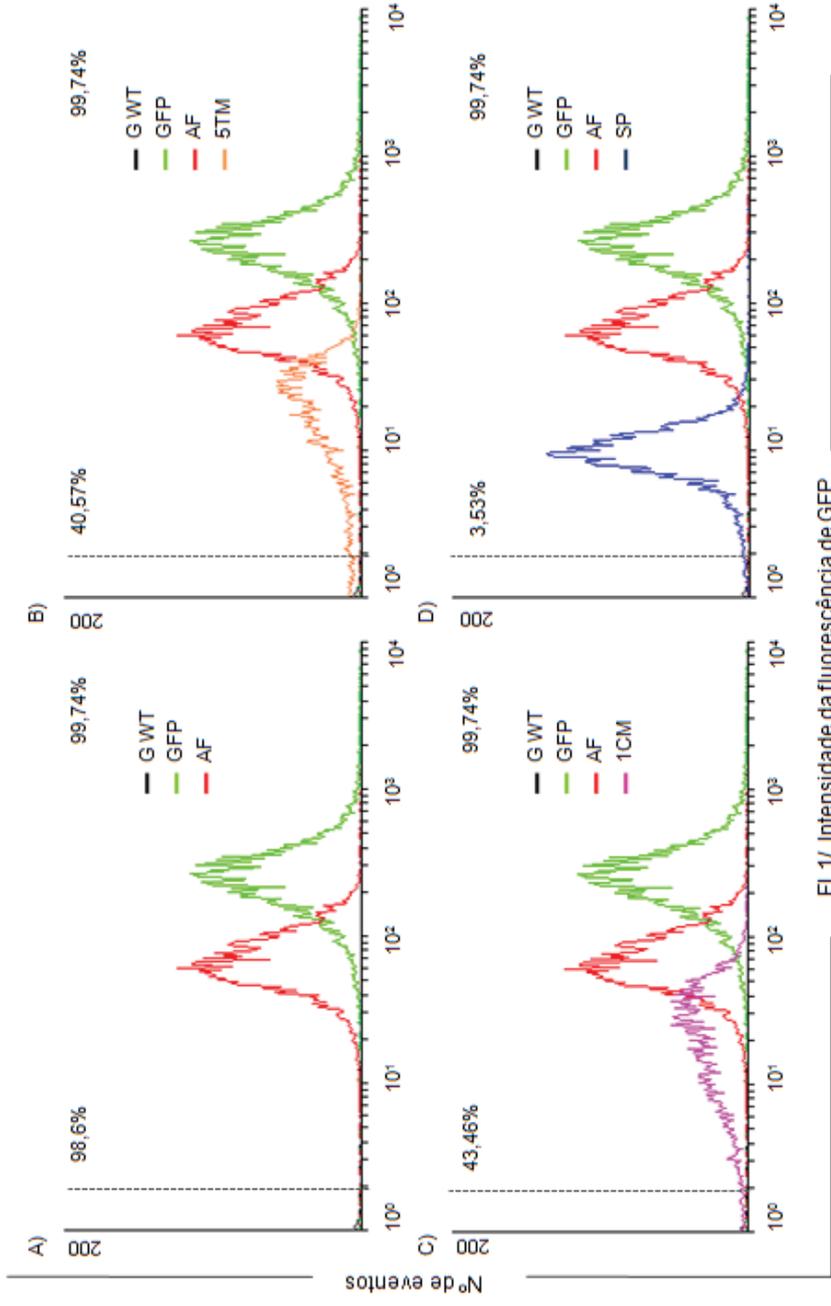


FIGURA 25 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE CITOMETRIA DE FLUXO USADA PARA DETERMINAR A FLUORESCÊNCIA DE GFP NAS CULTURAS ENVELHECIDAS POR 13 DIAS DA CEPA G WT E TRANSFECTADAS

FONTE: O autor (2011).

NOTA: No eixo Y é representado o número de evento e no eixo X a intensidade de fluorescência de GFP, adquirida no filtro FL1 que capta a frequência de 530 nm. As porcentagens indicadas na porção superior do lado esquerdo de cada gráfico são referentes às porcentagens, de GFP ao lado direito e de GFP fusionado com a amastina selvagem ou mutante do lado esquerdo. (A) mostra as a cultura envelhecida da cepa G (WT) utilizada para zerar as análises (linha tracejada a esquerda do gráfico) e as culturas envelhecidas expressando GFP (GFP) e amastina em fusão com GFP (AF), utilizadas como controle para a comparação com as proteínas mutadas. Em (B) a representação gráfica da fluorescência da cultura envelhecida do 5TM, em (C) da 1CM e em (D) SP. Foram analisados 10000 eventos.

7. DISCUSSÃO

As amastinas são glicoproteínas codificadas por grandes famílias multigênicas que apresentam aproximadamente 23 cópias no genoma do *T. cruzi* da cepa Tulahuén. Sua função é desconhecida, mas acredita-se está envolvida na interação parasito-hospedeiro e transdução de sinal ligada à membrana (TEIXEIRA *et al.*, 1994; ROCHETTE *et al.*, 2005; JACKSON, 2010).

A distribuição genômica das amastinas é distinta nos cromossomos, entre as cepas de *T. cruzi* e o tipo de subfamília da amastina também é variável entre as cepas. Elas são classificadas em α -amastinas, β -amastinas, δ -amastinas, $\rho\delta$ -amastinas e γ -amastinas. Em *T. cruzi* da cepa CL Brener as subfamílias encontradas são as β -amastinas (Ama390 e 394) no cromossomo 32, δ -amastinas (Ama 130, 150 e 120) no 34, $\rho\delta$ -amastinas (Ama 40) no 26 (JACKSON, 2010). As δ -amastinas são as amastinas clássicas, representadas por isoformas com similaridade de ~91%, intercaladas a genes de tuzina. Os níveis de mRNA desta subfamília são 50 vezes mais abundantes em amastigotas quando comparado a epimastigotas. Acredita-se que estes altos níveis podem estar relacionados com uma estabilização pós-transcricional na região 3'UTR (TEIXEIRA *et al.*, 1994; COUGHLIN *et al.*, 2000).

A amastina é composta estruturalmente por quatro regiões hidrofóbicas e três regiões hidrofílicas que possuem numerosos sítios conservados com grande potencial para O-glicosilação localizados na superfície do parasito (TEIXEIRA *et al.*, 1994; ROCHETTE *et al.*, 2005). A maioria das amastinas apresenta um provável peptídeo sinal na extremidade N-terminal que acredita ser o responsável por direcionar a proteína para o retículo endoplasmático rugoso. A extremidade C-terminal é considerada um potencial sinal de ancoragem a membrana por GPI (ROCHETTE *et al.*, 2005; CERQUEIRA *et al.*, 2008).

Neste trabalho avaliamos o papel das proteínas δ -amastinas de *T. cruzi* por meio da superexpressão de formas mutadas desta proteína na cepa G de *T. cruzi*, cepa que naturalmente expressa baixos níveis dessa amastina comparadas a cepas CL Brener, Y e Tulahuén. Esta estratégia se deve a dificuldade da geração de nocautes (por ser codificada por uma família multigênica) e silenciamento gênico por iRNA ser dificultado por falta da maquinaria necessária neste tripanossomatídeo.

Após a obtenção dos epimastigotas de *T. cruzi* da cepa G transfectados, nós primeiramente detectamos a presença dos vetores pT5TM, pT1CM e pTSP, através da fluorescência das proteínas fusionadas ou não com GFP em microscopia de fluorescência e citometria de fluxo. Observamos que após 24 horas de transfecção a quantidade de parasitos fluorescentes era menor que 1%, contudo com a seleção com G418 em doses crescentes em até 500 µg/mL por 30 dias, foi possível notar um aumento de fluorescência considerável de 78,5% e 44,58% para os transfectados expressando as proteínas 1CM::GFP e SP::GFP respectivamente, já para a 5TM::GFP a taxa de fluorescência não ultrapassou os 5%.

Os nossos dados corroboram com os encontrados por Vazquez e Levin (1999), que ao transfectarem parasitos com o vetor pTREXn (que contém como gene repórter clorafenicol acetiltransferase “CAT”) observaram que com o aumento de G418 em até 500 µg/mL houve um aumento na atividade da CAT e uma seleção dos parasitos em até 10 dias de tratamento. Neste mesmo estudo mostram que o vetor pTREX integra no *locus* ribossomal, mesmo quando introduzido como DNA circular para a cepa Tulahuén de *T. cruzi*. A nossa evidência de que o vetor está integrado é a manutenção da fluorescência mesmo na ausência de seleção do G418, porém pretendemos realizar outros ensaios como *Southern blot* e PFGE para identificarmos se realmente está havendo a integração no genoma e em qual cromossomo.

É importante ressaltar que em estudos realizados por DaRocha e cols. (2004) com o clone CL Brener e por Pires e cols. (2008) com as cepas CL Brener, Tulahuén e Colombiana, utilizando o pTREXGFP a eficiência da transfecção não ultrapassou 10%, e mesmo na presença da droga a fluorescência decaiu drasticamente com o passar de 12 dias. Isto sugere que para o pTREXGFP a eficiência de integração pode variar entre as cepas, por isso a necessidade de mais ensaios.

Em 1994, Teixeira e cols. fizeram ensaios de crioimunomicroscopia utilizando anticorpos contra peptídeos de amastina em amastigota e observaram uma localização na superfície celular dos parasitos, estes mesmos dados foram observados por Rochette e cols. (2005) para amastigotas de *Leishmania* spp. em parasitos transfectados com amastina em fusão com GFP. De modo similar em nossos estudos também observamos uma localização das proteínas

AF::GFP, 5TM::GFP e 1CM::GFP na superfície celular de epimastigotas da cepa G de *T. cruzi*. Observamos que a localização da proteína 1CM::GFP é semelhante a da AF::GFP, mostrando que a substituição no resíduo de cisteína 42 por alanina não afetou significativamente a localização na superfície celular, entretanto para a proteína 5TM::GFP foi possível observar uma marcação mais dispersa principalmente em organelas citoplasmáticas, entretanto ainda é possível observar uma marcação na superfície celular. Assim podemos sugerir que as substituições das treoninas nas posições 37, 40, 44, 55 e 60 são importantes para a localização da amastina, que pode estar sendo acumulada em alguma organela devido um mal dobramento da proteína. A proteína SP::GFP que contém o provável peptídeo sinal fusionado a GFP apresenta uma localização perinuclear, como o esperado para a via de síntese de proteínas de membrana.

Com o intuito de investigarmos a expressão das proteínas nos parasitos selecionados, fizemos o *Western blot* do extrato protéico total dos epimastigotas expressando as proteínas GFP, AF::GFP, 5TM::GFP, 1CM::GFP e SP::GFP utilizando anti-GFP. Nestes ensaios identificamos as bandas de aproximadamente 26,8 kDa (GFP), 44,16 kDa (AF::GFP, 5TM::GFP e 1CM::GFP) e 33,31 kDa (SP::GFP). A banda de 44,16 kDa corresponde ao peso da amastina em fusão com GFP sem o provável peptídeo sinal (massa molecular predita pelo programa PeptideMass), que possivelmente pode está sendo removido durante o processo de síntese protéica. Porém este dado de clivagem para o peptídeo sinal não pode ser confirmado certamente pelo dado da eletroforese, já que a diferença de massa para a proteína SP::GFP com e sem o peptídeo sinal é pequena. Dados publicados por Souza *et al.* (2011) mostram que para algumas proteínas de membrana este peptídeo pode ser clivado. Neste estudo eles observaram que para proteínas de membrana externa a clivagem do peptídeo sinal era mais comum, pois geralmente ele não fazia parte da estrutura transmembrana, ficando mais acessível à ação de peptidases, porém os autores ressaltam que se o peptídeo sinal for parte da transmembrana ele geralmente não é clivado, por causa da inacessibilidade da peptidase ao local de clivagem. Para uma maior confirmação destes resultados pretendemos realizar ensaios de espectrometria de massa.

O *Western blot* utilizando o anti-GFP das frações enriquecidas solúveis citoplasmáticas/organelares e de membrana, evidenciaram uma forte marcação na fração enriquecida de membrana para as proteínas AF::GFP, 5TM::GFP, 1CM::GFP e SP::GFP, sugerindo que por mais que a localização protéica seja alterada, a proteína se encontra acoplada a membrana plasmática da superfície do parasito ou associada a membrana de outras organelas. As bandas encontradas de 44,16 kDa (AF::GFP, 5TM::GFP e 1CM::GFP) e 33,31 kDa são correspondentes as esperadas. Desta forma é importante salientar que a proteína AF::GFP e 1CM::GFP apresentam a mesma localização de membrana da amastina encontrada no estudos de Teixeira e cols. (1994) e Rochette e cols. (2005).

Em dados não publicados de *Western blot* realizados por Teixeira *et al.* (1994) utilizando anticorpos anti-peptídeos sintéticos para a amastina foi relatado uma banda de alto peso molecular que se liga a concanavalina A, que é uma proteína globular de origem vegetal, utilizada para identificar glicoproteínas e polissacarídeos. Esses dados sugerem que a amastina é uma provável glicoproteína que pode sofrer inúmeras modificações pós-traducionais, dentre elas O-glicosilações nos resíduos de treoninas. Entretanto os dados encontrados em nosso trabalho vão de encontro aos dados apresentados neste trabalho, já que o peso encontrado em nossos estudos para a amastina foi de aproximadamente 44,16 kDa, peso esse semelhante ao predito *in silico*. Os dados apresentados por nós em diferentes condições de temperatura e redução para as amostras não aquecidas mostram que em diferentes condições redutoras (DTT 5 mM e β -mercaptoetanol 5 %) não é observada alteração no padrão de migração das proteínas dos extratos protéicos totais dos transfectados GFP e AF. Entretanto quando aquecidas a 100 °C é possível notar uma alteração no padrão de migração da proteína AF::GFP na presença de β -mercaptoetanol.

No extrato protéico do superexpressor AF::GFP tratado com 5 % de β -mercaptoetanol nós observamos uma banda de alto peso molecular, que não migra para o gel de separação (nas condições de eletroforese utilizada), esta banda seria semelhante à encontrada por Teixeira e cols. (1994). Nós sugerimos que esta banda encontrada seja um artefato de preparação da amostra. Em estudos realizados por Tasheva e Dessev em 1983, foi observado que amostras

de extrato proteico total de células de carcinoma mamário (tumor de Ehrlich) tratadas com β -mercaptoetanol e aquecimento de 96° C por 5 minutos, apresentaram bandas com alto peso molecular correspondente a 68 e 54 kDa, eles sugerem que estes resultados sejam devido a artefatos de eletroforese, causado por agregação protéica.

Os pesquisadores Kaur e Bachhawat em 2008 realizaram experimentos para aumentar a sensibilidade de detecção de proteínas no *Western blot*, eles observaram que para o transportador de glutationa em levedura (Hgt1p), que é uma proteína de membrana, a fervura da amostra a 100° C pode aumentar a agregação. Isto se deve principalmente a maior tendência apresentada por proteínas de membrana a se agregarem em ebulição. Os autores nesse trabalho ressaltam que a utilização de baixas concentrações de β -mercaptoetanol (2%) em conjunto com uma temperatura de 55° C ou menos, pode favorecer a ligação de anticorpos por diminuir a agregação protéica tornando os epítomos mais acessíveis aos anticorpos. Em 1978, Shepherd e Kaplan também encontraram agregados protéicos de 100 a 200 kDa em amostras de polipeptídeos de membrana de *Rhodopseudomonas sphaeroides*, tratados com β -mercaptoetanol e aquecimento a 100° C por 2 minutos.

Desta forma os resultados encontrados em nossos trabalhos nos levam a inferir que a δ -amastina em formas epimastigotas não seja glicosilada, pois apresentam a massa predita de aproximadamente 20 kDa e que a banda de alto peso molecular não seja representativa de uma proteína glicosilada e sim um artefato de manipulação da amostra. Deste modo, torna-se necessário testar em outras formas do parasito. Os nossos dados sugerem que na amastina não deve existir âncora GPI, pois na fusão a amastina tem GFP no C-terminal (o possível local de ancoragem) e ela continua indo para a membrana. A predição da proteína AF::GFP utilizando programa: big-PI Predictor Version 3.0 (2005), mostra que a proteína não tem potencial sítio de modificação GPI.

As investigações fenotípicas nós observamos que a taxa de crescimento dos mutantes não foi alterada significativamente, quando comparada com o selvagem. Entretanto ao analisarmos a quantidade de tripomastigotas nas culturas envelhecidas observamos uma grande alteração para o superexpressor de δ -amastina selvagem, principalmente a partir de 9° dia de cultivo dos epimastigotas em meio LIT sem G418. Nos transfectados superexpressando

AF::GFP a porcentagem de tripomastigotas é maior que nos demais (selvagem e mutantes), este dado pode sugerir que a amastina pode estar envolvida no processo de diferenciação celular e logo também no processo de invasão celular por tripomastigotas. Outra observação plausível é que nos parasitos mutados a quantidade de tripomastigotas metacíclicas formadas é dificultada. Desse modo podemos propor que esses resíduos de treoninas e cisteínas mutados podem ser importantes para que a proteína exerça a sua função de maneira correta, ou não apresentam níveis de expressão satisfatórios.

Em estudos realizados em colaboração com Mário Costa Cruz da UNIFESP, com o objetivo de identificar possíveis moduladores negativos da invasão celular pelos amastigotas extracelulares de *T. cruzi*, foi possível observar que para essas formas extracelulares as cepas que expressam altos níveis de δ -amastina, como a CL, apresentam menor capacidade de invasão que a cepa G que exibe baixos níveis de expressão desta proteína. Neste mesmo estudo foi possível observar que células de mamíferos pré-incubadas com a proteína recombinante purificada contendo a primeira região hidrofílica da amastina fusionada com GST (glutathione-S-transferase), diminuem em ~34% a capacidade de invasão das amastigotas extracelulares da cepa G de *T. cruzi*, funcionando assim como um modulador negativo para esta forma.

Neste trabalho também foi observado que as formas amastigotas extracelulares da cepa G superexpressando a proteína AF::GFP, apresentaram menor capacidade de invasão quando comparado com o parasito selvagem e o expressando GFP, corroborando com os dados de inibição observados nas células de mamíferos tratadas com a proteína purificada em fusão com GST. Contudo, quando o número de tripomastigotas de cultura de tecidos liberados no sobrenadante de células HeLa infectadas 96 e 120h após a invasão foi avaliado, este se apresentou maior nas células infectadas com os parasitos que superexpressam a amastina, sugerindo que a amastina pode estar relacionada com o crescimento e diferenciação celular dos amastigotas intracelulares.

Mais ensaios são necessários para a investigação da verdadeira função da amastina. Nós pretendemos realizar ensaios de metaciclogênese e amastigogênese *in vitro*, acompanhados por ensaios de infecção *in vitro* e *in vivo*. Também pretendemos realizar: transfecção da cepa CL (cepa que expressa altos níveis de amastina) com a construção 1CM::GFP, para ensaios de

dominante negativo; análises de expressão de outras proteínas de superfície; análises de proteômica comparativa das frações de membrana, já que a resolução da metodologia de proteômica de gel 2D dos extratos totais não apresenta boa resolução para as proteínas de membrana e ensaios de co-immunoprecipitação a fim de obter e identificar proteínas que interajam com a amastina. Nós acreditamos que com estes dados possamos agregar mais informações referentes à função desta proteína.

8. CONCLUSÕES

1. Os parasitos transfectados superexpressando δ -amastina selvagem em fusão com GFP (AF::GFP) e 1CM::GFP apresentaram as proteínas de fusão localizadas preferencialmente na membrana citoplasmática. Já os parasitos expressando 5TM::GFP, além da localização de membrana, apresentou localização perinuclear e possíveis membranas organelares.
2. Os parasitos expressando SP::GFP apresentaram as proteínas localizadas no envoltório perinuclear e em organelas citoplasmáticas.
3. As análises de *Western blots* de extratos protéicos totais dos parasitos transfectados de forma estável confirmaram a expressão das proteínas com os tamanhos esperados para proteínas não modificadas pós-traducionalmente, surgindo que as δ -amastinas não sejam glicosiladas. Esta conclusão só foi possível quando os extratos em presença β -mercaptoetanol não foram fervidos. A presença do agente redutor seguida de aquecimento propicia a formação de artefato de alto peso molecular sugerindo que as δ -amastinas não são glicoproteínas.
4. Os *Westerns blots* das frações enriquecidas de proteínas de membrana confirmaram a localização das proteínas de fusão AF::GFP, 5TM::GFP, 1CM::GFP e SP nas membranas celulares, sugerindo que amastina não seja ancorada a GPI.
5. As análises fenotípicas das culturas de parasitos transfectados não apresentam diferenças na taxa de crescimento, contudo apresentam uma alteração na diferenciação de formas epimastigotas em tripomastigotas em culturas envelhecidas. Esta alteração ocorre apenas em parasitos expressando AF::GFP. Estes resultados sugerem que as δ -amastinas devem contribuir na diferenciação celular e que os resíduos conservados de treoninas (37, 40, 44, 55 e 60) ou cisteína (42) são importantes para sua função.

9. PERSPECTIVAS

1. Analisar integração dos vetores no genoma por ensaios de *Southern blot* e PFGE.
2. Realizar a clonagem dos transfectados para obter maior homogeneidade de expressão nos parasitos expressando as proteínas mutadas em fusão com GFP.
3. Realizar a transfecção de 1CM::GFP na cepa CL de *T. cruzi* (cepa que expressa amastina) com região regulatória de δ -amastina, para o estudo de dominante negativo.
4. Analisar a expressão de outras proteínas de superfície como gp82, gp90, gp30 e gp35/50.
5. Realizar ensaios de proteômica comparativa nas frações de membrana.
6. Realizar ensaios de co-immunoprecipitação utilizando anticorpo anti-FGP, a fim de obter e identificar proteínas que interajam com a amastina.
7. Realizar imunocitoquímica com anti-BIP para a marcação de retículo endoplasmático, para confirmar a marcação das proteínas SP::GFP.
8. Realizar ensaios de metaciclogênese e amastigogênese *in vitro* e *in vivo* dos transfectados 5TM::GFP e 1CM::GFP.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, P. R.; TEIXEIRA, S. M. R. Regulatory elements involved in the post-transcriptional control of stage-specific gene expression in *Trypanosoma cruzi*: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 106, p. 257 – 266, May 2011.

ATWOOD, J. A. et al. The *Trypanosoma cruzi* Proteome. *Science*, v. 309, p. 473 – 476, July 2005.

AVILA AR, DALLAGIOVANNA B, YAMADA-OGATTA SF, MONTEIRO-GOES V, FRAGOSO SP, KRIEGER MA, GOLDENBERG S. Stage-specific gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Genet Mol Res*. (2003)

BARRETT MP, BURCHMORE RJ, STICH A, LAZZARI JO, FRASCH AC, CAZZULO JJ, KRISHNA S. The trypanosomiases. *Lancet*. 2003

BARTHOLOMEU, D. C. et al. Genomic organization and expression profile of the mucin-associated surface protein (MASP) family of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic acids research*, v. 37, p. 3407 – 3417, April 2009.

BELTRAO HB, CERRONI MP, FREITAS DR, PINTO AY, VALENTE VC, VALENTE SA, COSTA EG, SOBEL J. Investigation of two outbreaks of suspected oral transmission of acute Chagas disease in the Amazon region, Para State, Brazil, in 2007. *Trop Doct*. 2009

BERN C, KJOS S, YABSLEY MJ, MONTGOMERY SP. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. *Clin Microbiol Rev*. 2011
BERN, C.; MONTGOMERY S. P. An Estimate of the Burden of Chagas Disease in the United States, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 49, Issue 5, 1 September 2009

BOUCHER N, WU Y, DUMAS C, DUBE M, SERENO D, BRETON M, PAPADOPOULOU B. A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'-untranslated region element. *J Biol Chem*. 2002

CANO MI, GRUBER A, VAZQUEZ M, CORTÉS A, LEVIN MJ, GONZÁLEZ A, DEGRAVE W, RONDINELLI E, ZINGALES B, RAMIREZ JL, et al. Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project. *Mol Biochem Parasitol*. 1995

CERQUEIRA, G. C. et al. Sequence diversity and evolution of multigene families in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, v. 157, p. 65 – 72, October 2008.

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 morbida do homem. *Memória do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 1, n. 2, p. 159 – 218, August 1909.

- CLAYTON CE. Genetic manipulation of kinetoplastida. *Parasitol Today*. 1999
- CONTRERAS, V. T. et al. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Molecular and biochemical parasitology*, v. 16, p. 315 – 327, 9 1984.
- CONTRERAS, Víctor T *et al.* Production of amastigotes from metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2002.
- COUGHLIN, B. C. et al. Amastin mRNA abundance in *Trypanosoma cruzi* is controlled by a 3'-untranslated region position-dependent cis-element and an untranslated region-binding protein. *The Journal of biological chemistry*, v. 275, p. 12051 – 12060, April 2000.
- COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 31 – 40, September 2009.
- COVARRUBIAS C, CORTEZ M, FERREIRA D, YOSHIDA N. Interaction with host factors exacerbates *Trypanosoma cruzi* cell invasion capacity upon oral infection. *Int J Parasitol*. 2007
- DaROCHA, W. D. et al. Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and biochemical parasitology*, v. 133, p. 175 – 186, December 2004.
- DeSOUZA, W.; CARVALHO, T. M. U. de; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *International journal of cell biology*, v. 2010, September 2010.
- DIAS, LC. *et al.* Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. *Quím. Nova [online]*. 2009
- DOCAMPO R, JIMENEZ V, KING-KELLER S, LI ZH, MORENO SN. The role of acidocalcisomes in the stress response of *Trypanosoma cruzi*. *Adv Parasitol*. 2011.
- ELIAS MC, NARDELLI SC, SCHENKMAN S. Chromatin and nuclear organization in *Trypanosoma cruzi*. *Future Microbiol*. 2009
- EL-SAYED, N. M. et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, v. 309, p. 409 – 415, July 2005.
- FRANZÉN, O. et al. Shotgun Sequencing Analysis of *Trypanosoma cruzi* I Sylvio X10/1 and Comparison with T. cruzi VI CL Brener. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 5, n. 3, p. 984, March 2011.
- FREITAS LM, DOS SANTOS SL, RODRIGUES-LUIZ GF, MENDES TA, RODRIGUES TS, GAZZINELLI RT, TEIXEIRA SM, FUJIWARA RT, BARTHOLOMEU DC. Genomic analyses, gene expression and antigenic profile

of the trans-sialidase superfamily of *Trypanosoma cruzi* reveal an undetected level of complexity. *PLoS One*. 2011

HAILE, S.; PAPADOPOULOU, B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Current opinion in microbiology*, v. 10, p. 569 – 577, January 2007.

HERNÁNDEZ-OSORIO, L. A. et al. Improved method for in vitro secondary amastigogenesis of *Trypanosoma cruzi*: morphometrical and molecular analysis of intermediate developmental forms. *Journal of biomedicine & biotechnology*, v. 2010, p. 1 – 10, December 2010.

Hutagalung AH, Novick PJ. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell JACKSON, A. P. The evolution of amastin surface glycoproteins in trypanosomatid parasites. *Molecular biology and evolution*, v. 27, p. 33 – 45, September 2010.

JUNQUEIRA, A. C. V.; DEGRAVE, W.; BRANDÃO, A. Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. *Trends in parasitology*, v. 21, p. 270 – 272, June 2005.

KAUR J, BACHHAWAT AK. A modified Western blot protocol for enhanced sensitivity in the detection of a membrane protein. *Anal Biochem*. 2009

KEMMERLING, ULRIKE; BOSCO, CLEO Y GALANTI, NORBEL. Infection and invasion mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in the congenital transmission of Chagas' disease: A proposal. *Biol. Res*. 2010

LIMA, F. M. et al. The challenge of Chagas' disease: has the human pathogen, *Trypanosoma cruzi*, learned how to modulate signaling events to subvert host cells? *New biotechnology*, v. 27, p. 837 – 43, 2 2010.

MARTÍNEZ-CALVILLO S, VIZUET-DE-RUEDA JC, FLORENCIO-MARTÍNEZ LE, MANNING-CELA RG, FIGUEROA-ANGULO EE. Gene expression in trypanosomatid parasites. *J Biomed Biotechnol*. 2010

MILES MA, LLEWELLYN MS, LEWIS MD, YEO M, BALEELA R, FITZPATRICK S, GAUNT MW, MAURICIO IL. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitology*. 2009

MONCAYO A, SILVEIRA AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009

MORTARA, R. A. *Trypanosoma cruzi*: Amastigotes and Trypomastigotes Interact with Different Structures on the Surface of HeLa Cells. *Experimental Parasitology*, v. 74, p. 1 – 14, January 1991.

NAVARRO, M. C. et al. Morphological Comparison of Axenic Amastigogenesis of Trypomastigotes and Metacyclic Forms of *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 1, p. 83 – 91, January 2003.

PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. et al. Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti-alpha-galactosyl antibodies. *Journal of cell science*, v. 113, p. 1299 – 1307, March 2000.

PIRES, S. F. et al. Cell culture and animal infection with distinct *Trypanosoma cruzi* strains expressing red and green fluorescent proteins. *International journal for parasitology*, v. 38, p. 289 – 97, October 2008.

RAFATI, S. et al. Amastin peptide-binding antibodies as biomarkers of active human visceral leishmaniasis. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, v. 13, p. 1104 – 1110, October 2006.

RASSI A JR, RASSI A, MARIN-NETO JA. Chagas disease. *Lancet*. 2010
RASSI JR, A.; RASSI, A.; REZENDE, J. M. de. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infectious disease clinics of North America*, v. 26, n. 2, p. 275 – 291, June 2010.

Requena JM, López MC, Alonso C. Genomic repetitive DNA elements of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today*. 1996

ROCHETTE, A. et al. Characterization and developmental gene regulation of a large gene family encoding amastin surface proteins in *Leishmania* spp. *Molecular & Biochemical Parasitology*, v. 140, p. 205 – 220, January 2005.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory manual*. 2. ed. [S.I.]: New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANTOS MA, GARG N, TARLETON RL. The identification and molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* amastigote surface protein-1, a member of the trans-sialidase gene super-family. *Mol Biochem Parasitol*. 1997

SHEPHERD, W. D.; KAPLAN, S. Effect of heat and 2-mercaptoethanol on intracytoplasmic membrane polypeptides of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Journal of Bacteriology*, v. 135, n. 2, p. 656 – 667, August 1978.

Sibley LD. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. *Immunol Solari AJ*. Mitosis and genome partition in trypanosomes. *Biocell*. 1995

STOBER, CARMEL B. *et al.* “From genome to vaccines for leishmaniasis: screening 100 novel vaccine candidates against murine *Leishmania major* infection.” *Vaccine* 2006.

TEIXEIRA, S. M. et al. A differentially expressed gene family encoding “amastin,” a surface protein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *The Journal of biological chemistry*, v. 269, p. 20509 – 20516, August 1994.

TEIXEIRA, S. M. et al. Trypanosomatid comparative genomics: Contributions to the study of parasite biology and different parasitic diseases. *Genetics and molecular biology*, v. 35, p. 1 – 17, April 2012.

TEIXEIRA, S. M.; KIRCHHOFF, L. V.; DONELSON, J. E. Post-transcriptional elements regulating expression of mRNAs from the amastin/tuzin gene cluster of *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of biological chemistry*, v. 270, p. 22586 – 22594, September 1995.

VAZQUEZ-PROKOPEC GM, SPILLMANN C, ZAIDENBERG M, KITRON U, GÜRTLER RE. Cost-effectiveness of chagas disease vector control strategies in Northwestern Argentina. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009

VERDUN RE, DI PAOLO N, URMENYI TP, RONDINELLI E, FRASCH AC, SANCHEZ DO. Gene discovery through expressed sequence Tag sequencing in *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 1998

WAGNER W, SO M. Genomic variation of *Trypanosoma cruzi*: involvement of multicopy genes. *Infect Immun*. 1990

WHO. World Health Organization. 2010. Disponível em:
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>.

YOSHIDA, Nobuko. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(Suppl. 1), 101-107. (2009).

ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 104, n. 7, p. 1051 – 1054, November 2009.