

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO

Curso de Biomedicina

Nathália Santana Zaneti

**CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DE GENES QUE CODIFICAM
PARA “PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS” EXPRESSAS EM
EPIMASTIGOTAS E TRIPOMASTIGOTAS METACÍCLICOS DE
*Trypanosoma cruzi***

São Paulo

2017

Nathália Santana Zaneti

**CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DE GENES QUE CODIFICAM
PARA “PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS” EXPRESSAS EM
EPIMASTIGOTAS E TRIPOMASTIGOTAS METACÍCLICOS DE
*Trypanosoma cruzi***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina, do Centro Universitário São Camilo, orientado pelo Prof. Dr. Fábio Mitsuo Lima, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

São Paulo

2017

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Padre Radrizzani

Zaneti, Nathalia Santana

Clonagem e caracterização de genes que codificam para “proteínas hipotéticas” expressas em epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos de *Trypanosoma cruzi* / Nathalia Santana Zaneti. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2017.

36 p.

Orientação de Fábio Mitsuo Lima

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2017.

1. Clonagem molecular 2. Doenças de Chagas 3. Gene 4.
Trypanosoma cruzi I. Lima, Fábio Mitsuo II. Centro Universitário São Camilo III. Título

CDD: 574.8

Nathália Santana Zaneti

**CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DE GENES QUE CODIFICAM
PARA “PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS” EXPRESSAS EM
EPIMASTIGOTAS E TRIPOMASTIGOTAS METACÍCLICOS DE
*Trypanosoma cruzi***

São Paulo, 31 de outubro de 2017

Prof. Dr. Fábio Mitsuo Lima

Prof. Dr. Renata Cristina Pardos Baida Andreoli

Meu eterno agradecimento à minha mãe, que sempre batalhou muito para me proporcionar a melhor educação que tivesse ao seu alcance, por sempre acreditar em minha capacidade, por me dar forças para continuar e pelo amor incondicional.

Agradeço ao Gustavo Cavalcante Navarro, que me acompanha desde o meu primeiro ano de faculdade e por sempre estar ao meu lado me apoiando, por todos os momentos de felicidade, por todas as brincadeiras e risadas, pelo incentivo e por todo amor e carinho.

Às minhas amigas Luana e Renata, pessoas que posso sempre contar, pelo exemplo de amizade e por todo apoio emocional.

Aos meus colegas de classe, pela parceria de sempre e por ter feito essa época de graduação que é tão difícil e assustadora, ter sido uma das melhores em minha vida.

Aos meus professores exemplares que me ensinaram de maneira excepcional todas as informações que puderam oferecer, em especial ao meu professor e orientador Dr. Fabio Mitsuo Lima, que me deu as melhores aulas de biologia molecular e por me apresentar a ideia desse trabalho que não poderia ter sido melhor orientado.

Por fim, agradeço toda a gestão do curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, pela excelência em ter proporcionado todo apoio e qualidade de ensino, em especial a Coordenadora Dr. Renata Cristina Pardos Baida Andreoli, que trabalhou para que o desenvolvimento desse projeto fosse custeado e realizado.

Zaneti, Nathália Santana. Clonagem e caracterização de genes que codificam para “proteínas hipotéticas” expressas em epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos de *Trypanosoma cruzi*. 2017. 48f. Dissertação (Bacharel em Biomedicina) – Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2017.

O protozoário *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas e, apesar da queda de transmissão dos últimos anos, ainda atinge um número considerável de indivíduos no Brasil e no mundo. A infecção ocorre pela entrada de tripomastigotas metacíclico, forma infectante do parasito, na corrente sanguínea do hospedeiro, transmitidas de diversas formas. Pouco se sabe sobre as proteínas menos abundantes inicialmente caracterizadas como “proteínas hipotéticas” e seu papel na infecção e transmissão. Estas proteínas podem estar relacionadas a internalização do parasito ou até mesmo na sua viabilidade dentro da célula do hospedeiro e, conseqüentemente, na progressão da doença. Ainda não há cura para os indivíduos portadores da doença de Chagas crônica, portanto a investigação dessas proteínas é de extrema relevância para a descoberta de intervenções que possam prevenir de forma mais eficiente e/ou eliminar a doença de Chagas. O objetivo deste trabalho foi clonar genes que codificam “proteínas hipotéticas” para que futuramente auxilie em estudos que irão elucidar as funções dessas proteínas. Para isso, foi feita uma análise por filtros dos genes anotados como “proteínas hipotéticas” de *Trypanosoma cruzi* no banco de dados Tritypdb, dos quais 3 genes, nomeados como 03.100, 21.20 e 41.250, foram selecionados para a clonagem. Foi visto que os genes 03.100 e 21.20 possuem sintenia com outras espécies de *Trypanosoma*, portanto são genes conservados, e apresentam domínio de dimerização-ancoragem da superfamília de subunidade reguladora de PKA. Já o gene 41.250 é um gene espécie-específico de *Trypanosoma cruzi*, pois não foi encontrado em outros organismos e apresenta domínio semelhante às proteínas da família PLAC8, um domínio originalmente encontrado em proteínas placentárias de mamíferos. Além disso, uma análise de comparação por BLAST dos três genes, não evidenciou similaridade deles com outros previamente conhecidos. Desta forma, esses genes foram clonados, sequenciados e estarão disponíveis para que novos estudos evidenciem as funções de cada proteína no parasita.

PALAVRAS CHAVES: 1. Clonagem molecular 2. Doenças de Chagas 3. Gene 4. *Trypanosoma cruzi*

Zaneti, Nathália Santana. Gene cloning and characterization of "hypothetical proteins" expressed in epimastigotes and metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. 2017. 48f. Dissertation (Bachelor's degree in Biomedicine) – Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2017.

The protozoan *Trypanosoma cruzi* is the etiological agent of Chagas disease and despite the transmission declined in recent years, the disease affects a considerable number of people in Brazil and in the world. Infection occurs by metacyclic trypomastigotes invasion, infective forms of the parasite, into the bloodstream of its host's cells, transmitted of various forms. The main protein components of *Trypanosoma cruzi* are well characterized but little is known about "hypothetical proteins" and their role in infection and transmission. These proteins may be directly or indirectly related to the internalization of the parasite or even in its viability within the host cell, and consequently in disease progression. There is still no cure for individuals with chronic Chagas' disease, so the investigation of these proteins is extremely relevant for the discovery of interventions that can be more effectively to prevent and/or eliminate Chagas' disease. The objective of this work was to clone genes coding for "hypothetical proteins" to be useful in future studies that will elucidate the functions of these proteins. To do so, it was analyzed the genes annotated as "hypothetical proteins" of *Trypanosoma cruzi* in the Tritrypdb database, of which 3 genes, named as 03.100, 21.20 and 41.250, were selected for cloning. According to the current data from Tritrypdb, it has been seen that genes 03.100 and 21.20 present synteny with other *Trypanosoma* species, therefore they are conserved genes, and they have dimerization-anchoring domain of the PKA regulatory subunit superfamily. The 41.250 gene is a species-specific gene of *Trypanosoma cruzi*, it has not been found in other organisms and it has a domain similar to PLAC8 family proteins, a domain originally found in mammalian placental proteins. In addition, a comparison analysis by BLAST of the three genes did not show similarity of these three genes to other genes previously known. Thus, these cloned genes will be available for further studies to prove the functions of each protein in the parasite.

KEY WORDS: 1. Molecular cloning 2. Chagas disease. 3. Gene 4. *Trypanosoma cruzi*.

LISTA FIGURAS

Figura 1: Formas evolutivas do <i>T. cruzi</i> por micrografia de luz	5
Figura 2: Ciclo biológico do <i>T. cruzi</i>	8
Figura 3: Mapa físico do vetor pGEM-T Easy Vector da Promega.....	15
Figura 4: Ortologia do gene 20.21	20
Figura 5: Ortologia do gene 03.100	21
Figura 6: Ortologia do gene 41.250	22
Figura 7: Resultado da eletroforese em gel de agarose.....	23
Figura 8: Resultado da purificação em eletroforese em gel de agarose	24
Figura 9: Alinhamento do gene 03.100 com os clones HP-1 e HP-2	25
Figura 10: Alinhamento do gene 41.250 com os clones HP-5 e HP-6	25

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Aids	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
DAG	Diacilglicerol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
GPI	Glicosil Fosfatidil Inositol
gRNA	Ácido ribonucleico guia
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IP3	Inositol Trifosfato
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-americana da Saúde
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PKC	Proteína quinase C
PKT	Proteína tirosina quinase
PLC	Fosfolipase C
PSAM	Proteínas de superfície associadas à mucina
RNA	Ácido ribonucleico
SBRI	Instituto de Pesquisa Biomédica de Seattle
SL	Sequencia líder
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
T _m	Temperature melting
TS	Transialidase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 A doença de Chagas	1
1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
1.3 Ciclo biológico	7
1.4 Aspectos genômicos	8
1.5 Proteínas hipotéticas	9
2 OBJETIVO	11
3 MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Análise por bioinformática e seleção de genes	12
3.2 Obtenção de DNA de <i>T. cruzi</i>	12
3.3 Desenho dos primers	12
3.4 Amplificação dos genes	13
3.5 Eletroforese em gel de agarose	14
3.6 Purificação do produto de PCR	14
3.7 Clonagem e transformação bacteriana	14
3.8 Sequenciamento dos genes clonados	16
3.9 Alinhamento de sequência de DNA	17
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1 Análise por bioinformática	18
4.2 Amplificação e purificação	22
4.3 Clonagem e transformação bacteriana	23
4.4 Análise do sequenciamento e alinhamento das sequências	24
4.5 Características dos genes selecionados para o estudo	25
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
REFERÊNCIAS	30

1 INTRODUÇÃO

1.1 A doença de Chagas

Doença de Chagas ou tripanossomíase americana, descrita inicialmente em 1909, pelo pesquisador e médico brasileiro Carlos Chagas, é classificada como uma antropozoonose potencialmente fatal, causada por um protozoário flagelado, o qual Carlos Chagas batizou de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), em homenagem a Oswaldo Cruz (BRASIL, 2017). Pode ser diagnosticada na fase clínica aguda, e pode ou não ser detectada, pois a maioria dos casos não possui sintomas, e evoluir para uma fase crônica, a qual pode se apresentar de quatro formas: indeterminada, digestiva, cardíaca e cardiodigestiva, caso não seja tratada precocemente (MS, 2016). A doença é curável se o tratamento é iniciado logo após a infecção (WHO, 2016).

Estima-se que cerca de 6-7 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas pelo *T. cruzi* (WHO, 2016) com uma incidência anual de até 200.000 casos em áreas endêmicas (MS, 2016). A doença é encontrada principalmente em áreas endêmicas de 21 países latino-americanos, em virtude da distribuição de mais de 140 espécies do inseto vetor (*Triatominae*, *Hemiptera*, *Reduviidae*) (WHO, 2016). Estima-se que, no Brasil, cerca de 1-2 milhões de pessoas estejam infectadas, dos quais 60% vivem em áreas urbanas, tratando-se de gerações de indivíduos vivendo com a doença (MS, 2016).

Após a incubação, os indivíduos infectados podem apresentar sintomas como febre, náusea, vômito, irritação meníngea e lesão inflamatória cutânea. A lesão inflamatória cutânea, mais conhecida como chagoma, geralmente desenvolve-se na área de entrada do parasito, assim como o sinal de Romaña, um edema inflamatório unilateral e bipalpebral, associado a conjuntivite, cuja presença é indicativo da doença de Chagas (RASSI; MARIN-NETO, 2010). Entre dois a quatro meses de infecção, a maioria dos indivíduos infectados consegue controlar os sintomas sem necessidade de tratamento, porém alguns pacientes, aproximadamente 2%, não sobrevivem a fase aguda da infecção (MACHADO et al., 2012).

No desenvolvimento clínico, o sistema imune desencadeia uma resposta perante a presença do parasito, diminuindo a parasitemia, e a doença se desenvolve para uma fase crônica indeterminada, fase em que não há sintomas e é caracterizada por apresentar sorologia positiva, podendo evoluir para uma fase crônica sintomática grave (CAROD-ARTAL; VARGAS; FALCAO, 2011).

Durante a fase crônica da doença de Chagas, cerca de 30% dos indivíduos desenvolvem a forma cardíaca, possuindo papel principal pela alta morbimortalidade da doença (MS, 2015). É nessa fase que ocorre acometimentos cardíacos como insuficiência cardíaca congestiva (ICC) e miocardiopatia dilatada, complicações que podem acarretar em procedimentos de custo elevado, como transplante de coração, uso de desfibrilador e marca-passo (MS, 2009).

A transmissão ocorre por diferentes formas, sendo a principal através do inseto vetor hematófago, por meio das formas infectantes do *T. cruzi* encontradas no intestino posterior e nas fezes desses insetos, eliminadas após o repasto sanguíneo. Também foram evidenciadas outras formas de transmissão da doença como transplante de órgãos infectados pelo parasita, transfusão de sangue, transmissão congênita da mãe para o feto e transmissão oral por alimentos contaminados (COURA et al., 2007).

A importância epidemiológica da transmissão oral de *T. cruzi* está associada, geralmente, a surtos ou microepidemias no Brasil, principalmente na região do Amazonas (COURA, 2015). Um estudo de Shikanai-Yasuda e Carvalho (2012), evidenciou casos no Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Bahia, Ceará, Paraíba e Pará, além de outros países como Venezuela e Colômbia.

O Ministério da Saúde (2015) contabilizou 1.081 casos confirmados de doença de Chagas aguda por transmissão oral, entre os anos 2000 e 2013, indicando que a forma de transmissão oral foi a mais frequente comparada com as outras formas, como podemos observar na tabela 1.

Tabela 1: Casos confirmados de doença de Chagas aguda, segundo ano de notificação e forma de transmissão. Brasil, 2000 a 2013.

Forma de transmissão	Ano de notificação														Total	%
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013		
Oral	31	18	64	47	51	27	106	92	68	169	68	117	127	96	1.081	68,9
Ignorada*	10	6	11	8	9	3	8	59	24	34	36	61	49	54	372	23,7
Vetorial	-	-	-	1	1	-	4	4	11	16	25	10	8	20	100	6,4
Outras**	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	3	4	11	0,7
Vertical	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	2	6	0,4
Total	41	24	75	56	61	30	118	156	104	220	131	190	188	176	1.570	100,0

*Foram incluídos os casos com a variável "forma provável de transmissão" em branco.

**Transmissão acidental e transfusional.

Fonte: Sinan e CGDT/DEVIT/SVS/MS. Atualizado em maio/2014. Dados sujeitos a alteração.

Fonte: (BRASIL, 2015).

A fonte de infecção sugerida é a ingestão de alimentos contaminados com *T. cruzi* como açaí, bacaba, jaci (coquinho), caldo de cana, palmito de babaçu, leite materno com diagnóstico de doença de Chagas aguda ou de co-infecção *T. cruzi*-HIV em fase avançada da síndrome da imunodeficiência adquirida (aids), ingestão de carne crua ou mal cozida de mamíferos infectados ou até mesmo pela ingestão de triatomíneos por hábitos primitivos ou exóticos (ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DA SAÚDE, 2009; BRASIL, 2015).

Apesar da interrupção da transmissão vetorial pelo *Triatoma infestans*, concedida em 2006 pela OPAS/OMS, além dos avanços tecnológicos e científicos existentes, a doença de Chagas ainda é um grave problema de saúde pública no mundo, levando um número considerável de pessoas a óbito, principalmente na América Latina (DIAS, 2007). Apesar da doença ser endêmica na América latina, já foram registrados casos no Canadá, EUA e alguns países da Europa, devido a imigração de indivíduos infectados assintomáticos para esses países (MARTINS et al., 2012).

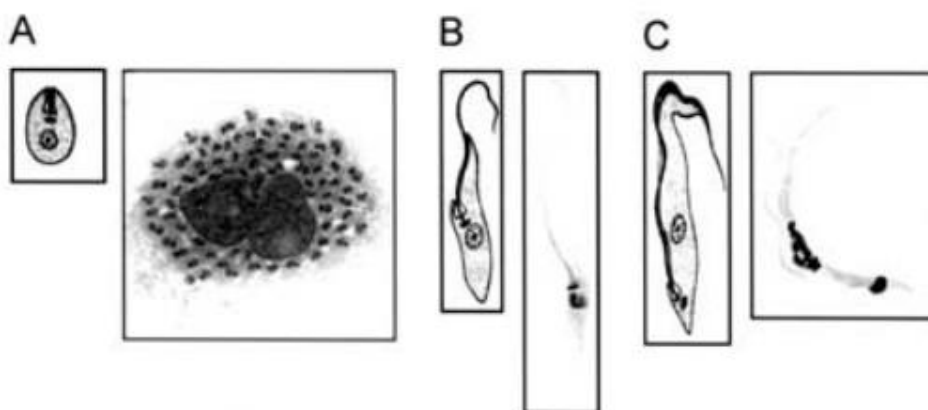
Vários estudos já foram realizados possibilitando avanços no entendimento da doença e do parasito *Trypanosoma cruzi*. No entanto, ainda não foram desenvolvidos métodos profiláticos mais eficazes, sendo hoje a principal forma de controle da doença a erradicação do inseto vetor (BRASIL, 2014). Portanto, desde a sua descoberta por Carlos Chagas, tanto a doença quanto o *Trypanosoma cruzi* vêm sendo estudados por diversos pesquisadores pelo mundo.

1.2 *Trypanosoma cruzi*

Pertencente à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae, o protozoário *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas e é caracterizado por possuir um flagelo e uma única mitocôndria modificada denominada cinetoplasto. O cinetoplasto está situado próximo ao núcleo e possui uma grande quantidade de DNA mitocondrial, denominado kDNA, composto por moléculas circulares como minicírculos e maxicírculos. A forma e organização estrutural do cinetoplasto variam de acordo com a fase de desenvolvimento do protozoário (LUKES et al., 2002).

Há diferentes fases de desenvolvimento morfológico e fisiológico do *T. cruzi* (Figura 1), que podem ser identificadas pela posição do núcleo e cinetoplasto, e localização do flagelo, como os tripomastigotas, cujo seu flagelo é livre na região anterior e se origina depois do núcleo alongado. O cinetoplasto é pouco compactado e se localiza posteriormente ao núcleo. São conhecidos como formas infectivas, porém não se replicam. Os tripomastigotas podem ser sanguíneos, quando estão localizados no sangue do hospedeiro ou metacíclicos, quando encontrados na porção posterior do intestino e nas fezes do inseto vetor triatomíneo. As formas intracelulares são conhecidas como amastigotas, são arredondadas, se multiplicam por divisão binária e possuem um flagelo curto interno, cinetoplasto com formato de bastão e núcleo grande (SOUZA, 2002). As formas não infectivas em mamíferos são denominadas epimastigotas. Essas formas são alongadas, se replicam por fissão binária no trato intestinal do triatomíneo, seu cinetoplasto está localizado na parte anterior do núcleo e também possui formato de bastão, e com flagelo livre na região anterior do parasito (PAULIN, 1975).

Figura 1: Formas evolutivas do *T. cruzi* por micrografia de luz. A: Amastigota intracelular. B: Epimastigota. C: Tripomastigota.



Fonte: (SOUZA, 2002).

Além do cinetoplasto, o *T. cruzi* possui outras organelas como o acidocalcissomo e glicosossomo. O acidocalcissomo é uma organela ácida eletrodensa, composta por uma única membrana, contém uma grande quantidade de Ca^{2+} e está presente em maior número nas formas amastigotas (SCOTT et al., 1997). Sua principal função é participar da osmorregulação e contribuir para homeostasia do parasito (DOCAMPO et al., 2013). Nos glicosossomos ocorrem as reações de glicólise. Essas organelas se assemelham aos peroxissomos de células eucarióticas e encontram-se em todas as fases de vida do *T. cruzi* (SOUZA, 2009).

O citoesqueleto dos tripanossomatídeos é formado pela membrana plasmática seguida de uma camada rígida denominada de rede de microtúbulos subpeliculares. A membrana plasmática é composta por proteínas periféricas e integrais, fosfolipídeos e glicoproteínas, essas as mais abundantes nas formas tripomastigotas, com função importante na interação do parasito na célula do hospedeiro (MARTINS et al., 2012).

As glicoproteínas ancoradas pelo glicosil fosfatidil inositol (GPI) e os complexos glicosil fosfolipídeos relacionados ao GPI são codificadas por famílias multigênicas e incluem proteínas de superfície associadas às mucinas (PSAM) e trans-sialidades (TS), essa última, uma proteína do *T. cruzi* que catalisa a transferência de ácido siálico de moléculas do hospedeiro para glicoproteínas do parasito, promovendo um aumento

da interação do parasito com a célula hospedeira (NEIRA et al., 2002). No entanto, os genes que codificam proteínas de superfície são altamente distintos, o que é compatível com adaptações específicas e estratégias de sobrevivência (ANDERSSON, 2011).

As trans-sialidades formam uma família de proteínas que também desempenham um importante papel na interação de *T. cruzi* com a célula hospedeira, o qual interage com o receptor p74 das células fagocíticas e não fagocíticas do hospedeiro (VILLALTA et al., 2001). Além disso, o *T. cruzi* possui proteínas como a gp85, que se ligam a fibronectina e laminina, e a penetrina, relacionadas ao processo de invasão celular, utilizado pelos tripomastigotas, e glicoproteínas gp82, molécula de adesão que se liga na célula hospedeira via receptores específicos, levando a uma via de sinalização essencial para a internalização de tripomastigotas metacíclicos (YOSHIDA et al., 2000).

A invasão de tripomastigotas metacíclicos mediada pela gp82 desencadeia cascatas de sinalização nas células alvo que resultam na mobilização citosólica de cálcio (RUIZ et al., 1998). Após o reconhecimento da gp82 por receptor ainda desconhecido, de acordo com os estudos recentes, o Ca^{2+} é liberado de estoques sensíveis a tapsigargina, independentemente do inositol 1,4,5-trifosfato (IP3), ou após a ativação da fosfolipase C (PLC), gerando diacilglicerol (DAG) e IP3, sendo que o primeiro ativa uma proteína intracelular, a proteína quinase C (PKC) e o último promove a elevação de Ca^{2+} a partir de compartimentos sensíveis ao IP3, como o retículo endoplasmático (FERREIRA et al., 2006; MAEDA et al., 2012). Além disso, também há ativação da proteína tirosina kinase (PKT), proteína intracelular, que desencadeia a fosforilação de outra proteína intracelular indetectável em epimastigotas não infecciosos, chamada p175 (FAVORETO et al., 1998).

Uma outra glicoproteína que também eleva a concentração de cálcio intracelular, é a gp35/50, porém em um grau menor que a gp82 (RUIZ et al., 1998). Nessa interação, há uma remoção de ácido siálico pela gp35/50, pois os pesquisadores sugerem que os resíduos de ácido siálico prejudicam a interação parasito-célula hospedeira e essa remoção aumenta a capacidade de desencadear a resposta de Ca^{2+} da célula alvo, o que potencializa a invasão do tripomastigota metacíclico (SCHENKMAN et al., 1991). Ferreira et al. (2006) propõem ainda, que a invasão mediada pela gp35/50 requer recrutamento de F-actina, um evento que pode

estar associado à ativação da adenilato ciclase que gera adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC).

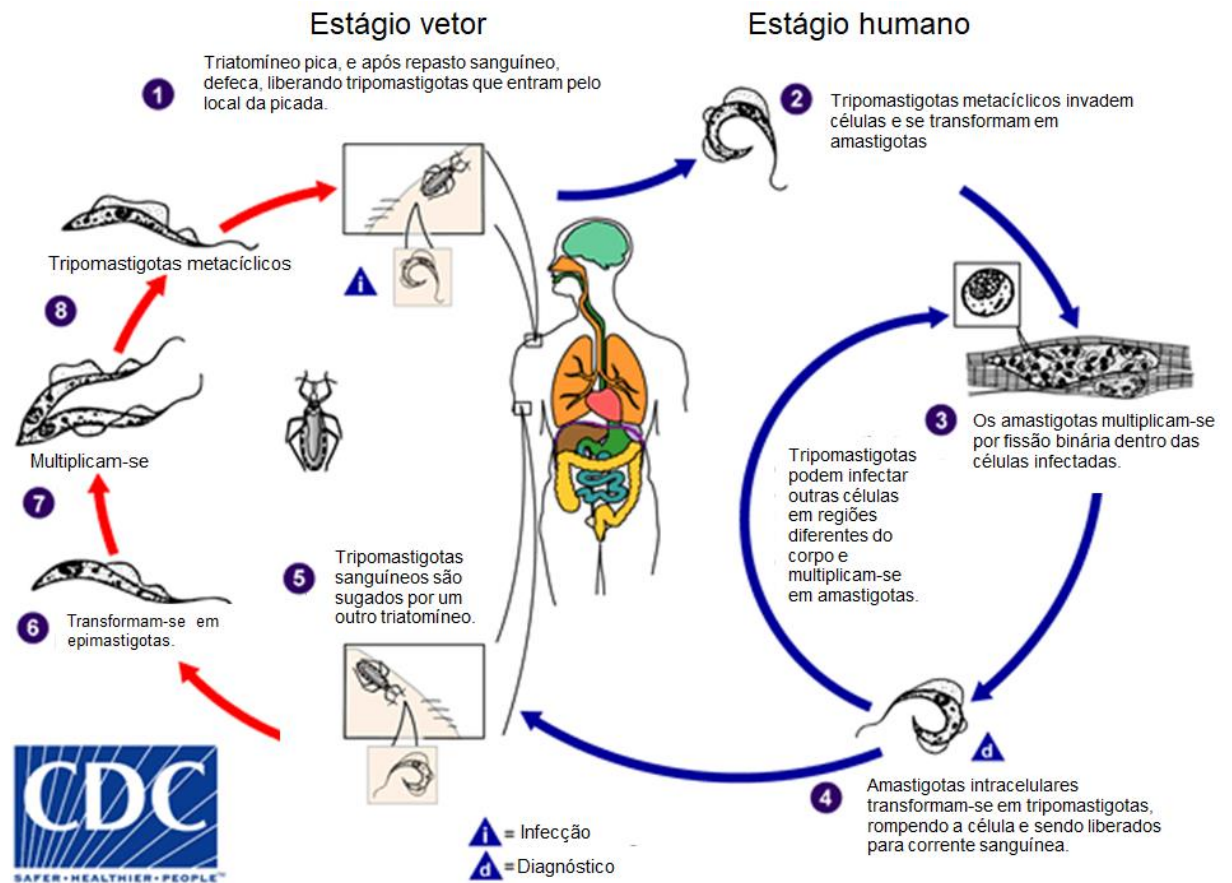
Embora os principais componentes proteicos do *T. cruzi* estejam bem caracterizados, pouco se sabe sobre as proteínas menos abundantes inicialmente caracterizadas como “proteínas hipotéticas” e seu papel na infecção e transmissão.

1.3 Ciclo biológico

O ciclo de vida do parasito ocorre entre um inseto hematófago triatomíneo (família Reduviidae) e um hospedeiro mamífero (Figura 2). Quando o triatomíneo se alimenta do sangue de um hospedeiro mamífero infectado, ocorre a ingestão das formas tripomastigotas sanguíneas pelo inseto. No intestino médio do inseto, estas formas irão se diferenciar em epimastigotas, que se replicam e migram para o intestino posterior, onde irão se desenvolver em tripomastigotas metacíclicas, formas infectivas para o hospedeiro mamífero. O inseto vetor excreta, pelas fezes e urina, as formas infectivas após seu repasto sanguíneo e essas formas metacíclicas entram através da lesão provocada pelo inseto ou através de membranas mucosas do mamífero, invadindo vários tipos de células do hospedeiro, por adesão à superfície celular, sendo internalizados através de pseudópodes (SOUZA, 2002).

Após a internalização, os tripomastigotas metacíclicos ficam em um vacúolo parasitóforo, que se funde ao lisossomo da célula onde ocorre a diferenciação de tripomastigotas metacíclicos para amastigotas, devido ao pH baixo do microambiente celular ali formado. Em seguida, são liberados no citoplasma, onde ocorrem sucessivas multiplicações, por fissão binária, e retornam para a forma tripomastigota. Posteriormente, rompem a célula e são liberados na circulação sanguínea do hospedeiro (BURLEIGH; WOOLSEY, 2002). A ruptura da célula pode acontecer antes dos amastigotas se diferenciarem para tripomastigotas, gerando outras formas no meio externo, os quais poderão infectar outras células e/ou reiniciar o ciclo, caso o inseto vetor se alimente desse sangue (EPTING; COATES; ENGMAN, 2010).

Figura 2: Ciclo biológico do *T. cruzi*.



Fonte: (adaptado de CDC, 2017)

O desenvolvimento da forma epimastigota para a forma tripomastigota metacíclico é denominado metaciclogênese. Essa etapa é fundamental no ciclo de vida do parasito, pois o parasito torna-se infectivo aos seus hospedeiros mamíferos. Esse processo se tornou um importante modelo de estudo de mecanismos envolvidos na diferenciação celular e regulação da expressão gênica do parasito (KRIEGER et al., 1999; PRETI, 2007; GODOY et al., 2012).

1.4 Aspectos genômicos

Estima-se que o genoma diploide do *Trypanosoma cruzi* possui entre 106,4 e 110,7 Mb, sendo que seu material genético está localizado no núcleo e cinetoplasto (CANO et al., 1995). O DNA do cinetoplasto (kDNA) corresponde a cerca de 10 a 25% do DNA total do *T. cruzi* e é constituído por aproximadamente uma dúzia de maxicírculos (WESTENBERGER et al., 2006) e de 10.000 a 20.000 minicírculos, dependendo da espécie (AVILA; SIMPSON, 1995). Os maxicírculos e minicírculos participam de um processo de edição que envolve RNAs mensageiros (mRNAs),

codificados pelos maxicírculos, e RNA guias (gRNA), codificados pelos minicírculos por adição ou deleção de bases do mRNA dos maxicírculos, principalmente uridinas, resultando em um RNA maduro (LUKES et al., 2002; STUART et al., 2005).

Embora os tripanossomatídeos também apresentem um processo de transcrição contendo maquinaria de remoção de íntrons, a maturação do mRNA difere do processo da maioria dos eucariotos. Até o momento, foi identificado apenas um gene possuindo íntron (PALFI; LANE; BINDEREIF, 2002). O processo de transcrição nesses parasitos gera RNAs policistrônicos, produtos transcritos correspondentes a moléculas únicas de RNA contendo diversos genes. Uma molécula de RNA policistrônico gera unidades monocistrônicas traduzíveis por um processo denominado *trans-splicing*. Nesse processo, ocorre a separação das unidades monocistrônicas e adição da sequência líder (SL), sequência conservada que contém 39 nucleotídeos do mRNA maduro, na extremidade 5', e cauda de poli-A, na extremidade 3' (LIANG et al., 2003).

Ainda não foi evidenciada a existência de promotores que regulam a transcrição dos genes codificadores de proteínas em tripanossomatídeos, mas acredita-se que há um mecanismo de regulação posteriormente à transcrição, sendo denominado regulação pós-transcricional (KRAMER, 2012).

1.5 Proteínas hipotéticas

Com o sequenciamento completo do genoma do *T. cruzi*, houve um acúmulo de informações de dados genômicos do parasito, que não foi acompanhado pelo entendimento funcional de algumas proteínas sequenciadas, levando muitas dessas a serem consideradas “proteínas hipotéticas”. Alguns autores evidenciaram, por meio de estudos proteômicos, a presença de proteínas hipotéticas em tripomastigotas metacíclicos, formas celulares que iniciam a infecção no hospedeiro mamífero via transmissão vetorial, o que demonstra a importância do estudo dessas proteínas hipotéticas (CORDERO et al., 2009; QUEIROZ et al., 2014).

Proteínas hipotéticas, em geral, são espécie-específicas e não apresentam homologia com qualquer proteína já descrita na literatura. A sua caracterização é de extrema importância para a elucidação funcional dos mecanismos pelos quais o *T. cruzi* utiliza em seu ciclo biológico e, conseqüentemente, proporcionando um avanço para a erradicação da doença (EL-SAYED, 2005; CORDERO et al., 2009; QUEIROZ

et al., 2014). Além disso, essas proteínas têm potencial para serem utilizadas no desenvolvimento de testes diagnósticos moleculares e imunocromatográficos e até mesmo como alvo terapêutico, se considerarmos a possibilidade de inibição de alguma proteína do parasito que seja importante para o desenvolvimento da doença de Chagas.

2 OBJETIVO

Os objetivos do presente projeto são:

1. Identificar, por bioinformática, genes que codificam proteínas hipotéticas em epimastigotas e tripomastigota metacíclicos.
2. Comparar a sequência gênica com outros tripanosomatídeos.
3. Clonar e sequenciar genes que codificam “proteínas hipotéticas” espécie-específicos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Análise por bioinformática e seleção de genes

A seleção dos genes para o presente estudo foi por meio de análise por filtros em um banco de dados genômicos de parasitas cinetoplastídeos, o TriTrypDB, que fornece suporte a uma variedade de consultas para fins de pesquisa. Os colaboradores para o desenvolvimento do banco são: EuPathDB, GeneDB e pesquisadores do Instituto de Pesquisa Biomédica de Seattle (SBRI).

O filtro utilizado foi: *Trypanosoma cruzi* CL Brener – evidência de espectrometria de massas – proteínas hipotéticas - eliminando transmembrana.

A estratégia de seleção dos genes escolhidos se baseou em analisar, no TriTrypDB, o organismo do qual esses genes se encontram, a proteômica, e a estrutura da proteína predita. Os genes estão anotados como codificadores de proteínas “hipotéticas” ou “hipotéticas conservadas”, presentes apenas no gênero *Trypanosoma*, bem como não expressam domínio transmembrana, de acordo com as informações atualizadas do TriTrypDB. Portanto, a escolha foi de genes que preenchessem apenas os requisitos estabelecidos pelo filtro descrito acima.

3.2 Obtenção de DNA de *T. cruzi*

Foi utilizado o DNA genômico do clone CL Brener, extraído segundo protocolo de Souza et al. (2011), cedido gentilmente pelo Prof. Dr. José Franco da Silveira, departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UNIFESP.

3.3 Desenho dos primers

Para que os genes selecionados fossem amplificados, foi necessário desenhar os primers *forward* e *reverse*, de acordo com a sequência e região codificadora de cada gene. Após a análise dessas regiões codificadoras, foram desenhados os oligonucleotídeos que variaram de 25 nucleotídeos a 31 nucleotídeos. Foram adicionadas à região 5' dos primers *forwards* o sítio para a enzima EcoRI, e para a região 5' dos primers *reverse*, o sítio para enzima HindIII. As sequências e Tm dos oligonucleotídeos utilizados estão apresentadas no quadro 1.

Quadro 1: Primers utilizados no presente estudo. Tm = temperature melting.

ID GENE	NOME	SEQUÊNCIA DOS PRIMERS (5' – 3')	Tm
<u>TcCLB.506921.20</u>	Gene 21.20 forward	TGAATTCATGGACTATAATCTTGAATACAGC	57,0
	Gene 21.20 reverse	TAAGCTTCTATCCCTCCATTTCAAC	56,3
<u>TcCLB.507641.250</u>	Gene 41.250 forward	TGAATTCATGGGCTTTACTGTTGGT	56,3
	Gene 41.250 reverse	TAAGCTTCTAACGCATGGGAACATT	56,3
<u>TcCLB.508503.100</u>	Gene 03.100 forward	TGAATTCATGCAGAGCAGAACAGGG	59,6
	Gene 03.100 reverse	TAAGCTTTTACGTCGTGGGGTGTGT	59,6

3.4 Amplificação dos genes

A amplificação dos genes foi realizada pelo método de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) utilizando a enzima iTaq DNA polimerase (Bio Rad). As condições para as amplificações foram padronizadas de acordo com Tm dos primers, com um volume total de 50 μ L, e as reações foram submetidas a 35 ciclos, mostrado no quadro 2.

Como as temperaturas de melting dos primers não são iguais, ocorreram duas PCR com temperaturas de anelamento diferentes, uma amplificando os genes 21.20 e 41.250, utilizando um Tm de 57°C, e a outra amplificando o gene 03.100, utilizando um Tm de 60°C.

Quadro 2: Condições padronizadas para amplificação dos genes.

PCR (50µL)	PROGRAMA TERMOCICLADOR Gene 21.2 e Gene 41.250 (35 ciclos)		PROGRAMA TERMOCICLADOR Gene 03.100 (35 ciclos)	
	T°C	Tempo	T°C	Tempo
Tampão (5µL)	95	5'	95	5'
MgCL ₂ (1,5 µL)	95	20''	95	20''
dNTP (1,0 µL)	57	20''	60	20''
primers <i>forward</i> (1,0 µL)	72	1'	72	1'
primers <i>reverse</i> (1,0 µL)	72	5'	72	5'
H ₂ O (39 µL)	4	∞	4	∞
iTaq DNA polimerase (0,5 µL)				
DNA genômico 50 ng (1,0 µL)				

Para saber se houve algum tipo de contaminação e/ou erro no procedimento, foi acrescentado um controle negativo, que continha apenas um mix de reagentes sem o DNA genômico, submetido às mesmas condições que as outras reações citadas.

3.5 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos das PCRs foram analisados por eletroforese em gel de agarose. Foi feito agarose a 2% com TAE 1X e os produtos separados a 65 volts por 50 minutos. Foi utilizado o padrão de peso molecular HighRanger 1kb DNA Ladder (NORGEN), com fragmentos que possuem entre 300 e 10.000 pares de base.

3.6 Purificação do produto de PCR

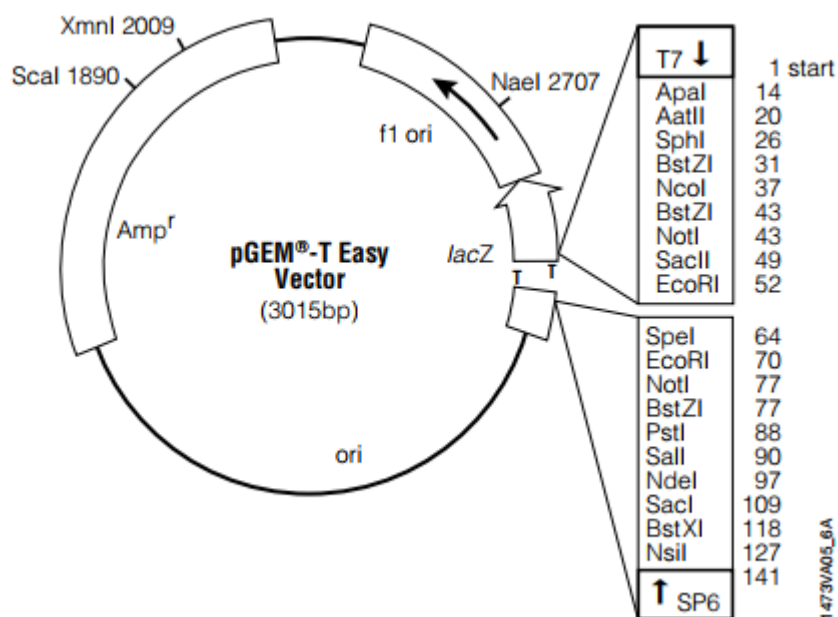
Com o objetivo de remover os primers utilizados e outros componentes da reação, foi realizada a purificação dos produtos de PCR de acordo com o protocolo do kit Invisorb® Fragment CleanUp.

3.7 Clonagem e transformação bacteriana

As sequências purificadas dos genes de interesse foram inseridas no vetor pGEM-T Easy Vector (Promega) (Figura 3) através da reação de ligação. Foram feitos uma reação para cada gene, sendo que em cada tubo foram adicionados 5 µL de tampão 2X, 1 µL do vetor pGEM-T Easy Vector, 1 µL da enzima T4 DNA ligase e 3 µL

do produto de PCR purificado, portanto, com um volume final de 10 μ L. As reações foram mantidas por 2 horas a temperatura ambiente. Após esse período, os produtos das clonagens foram utilizados para transformar *E. coli* (DH5 α) competentes, por choque térmico a 42 $^{\circ}$ C.

Figura 3: Mapa físico do vetor pGEM-T Easy Vector da Promega.



Fonte: (PROMEGA, 2017)

Para semear as bactérias transformadas com as reações de ligação, foram adicionados ao meio de cultura LB contendo ampicilina 100 μ g/mL: 40 μ L de IPTG (100mM) e 120 μ L de X-Gal (20mg/ml). Como controle da transformação, foi utilizado o plasmídeo pUC18 vazio. As placas foram mantidas a 37 $^{\circ}$ C por 16 horas.

Após o crescimento em placa, os clones foram semeados em meio LB líquido com ampicilina (100 μ g/mL) e cresceram por 16 horas a 37 $^{\circ}$ C sob agitação para posteriormente extrair o DNA plasmidial.

A extração do DNA plasmidial foi feita de acordo com o protocolo Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification (Promega), que consistiu nas seguintes etapas:

Para lisar as células:

- O pellet foi ressuscitado com 250 μ L de Cell Resuspension Solution
- Foi adicionado 250 μ L do Cell Lysis Solution e invertido 4 vezes

- Adicionou-se 10 μ L da Alkaline Protease Solution, invertido 4 vezes e incubado a 5 minutos em temperatura ambiente

- Adicionou-se 350 μ L do Neutralization Solution e foi invertido 4 vezes

- O mix foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos.

Para a ligação do plasmídeo em coluna:

- Inseriu-se a coluna de ligação em um tubo de 2mL

- Os lisados foram transferidos para a coluna de ligação

- Centrifugou-se a 13.000 rpm por 1 minuto. Retirou-se a coluna de ligação do tubo para que o eluato fosse descartado e então a coluna foi reinserida no tubo.

Para a lavagem:

- Foi adicionado 750 μ L de Wash Solution na coluna e foi centrifugado a 13.000 rpm por 1 minuto. Descartou-se o eluato. Esse processo foi repetido com 250 μ L de Wash Solution e centrifugado por 2 minutos.

Para a eluição:

- A coluna foi transferida para um microtubo de 1,5 ml estéril, e foi adicionado 100 μ L de água Milli-Q a coluna. Centrifugou-se a 13.000 rpm por 1 minuto.

Com isso, os plasmídeos foram purificados e mantidos a - 20°C.

3.8 Sequenciamento dos genes clonados

Os plasmídeos purificados foram quantificados por espectrofotometria utilizando o equipamento Nanodrop e a concentração ajustada para 100 ng/ μ L. Foram nomeados e enviados em tubos de 0.2mL para o laboratório do Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco do Instituto de Biociências – Universidade de São Paulo, para o sequenciamento de Sanger junto aos primers T7 e SP6 (quadro 3). Os nomes e a especificação de cada tubo estão apresentados no quadro 4.

Quadro 3: Primers utilizados para o sequenciamento.

NOME	SEQUÊNCIA DOS PRIMERS (5' – 3')	TM
SP6 (<i>Forward</i>)	TATTTAGGTGACACTATAG	46,5
T7 (<i>Reverse</i>)	TAATACGACTCACTATAGGG	51,3

Quadro 4: Nome e especificação dos tubos.

Nome do tubo	Gene correspondente
HP-1	03.100
HP-2	03.100
HP-3	21.20
HP-4	21.20
HP-5	41.250
HP-6	41.250

3.9 Alinhamento de sequência de DNA

Os resultados do sequenciamento foram analisados por BLAST no Tritypdb a fim de observar a similaridade com sequências depositadas no banco de dados e alinhados por meio do editor de alinhamento de sequências Bioedit.

Para o alinhamento, foram anotadas as posições do primeiro e do último nucleotídeo (observados nos resultados do BLAST) que alinhavam com as sequências depositadas no Tritypdb. No Bioedit, as sequências provenientes do sequenciamento foram editadas deletando-se os nucleotídeos que correspondiam ao vetor pGEM-T Easy, criando-se um arquivo novo para cada gene editado. Além disso, foram criados arquivos no formato FASTA, obtidos no Tritypdb, correspondentes aos genes 03.100, 21.20 e 41.250 para alinhamento com os genes editados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise por bioinformática

Com a análise por bioinformática, foram encontrados 51 genes codificadores de proteínas hipotéticas de acordo com os filtros previamente estabelecidos (Quadro 5), citados na página 12. Foram selecionados 3 genes, identificados apenas em *Trypanosoma*, sem ortólogos em outros organismos que não sejam *Trypanosoma*, para a realização do presente estudo, sendo um gene anotado apenas como “proteína hipotética” e os outros dois genes anotados como “proteína hipotética conservada”, listados com suas características no quadro 6.

Quadro 5: Genes codificadores de proteínas hipotéticas de acordo com o filtro pré-estabelecido no banco de dados Tritypdb.

Gene ID	DESCRIÇÃO DO PRODUTO
TcCLB.503557.14	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.503757.30	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.503855.60	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.503887.40	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.504105.120	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.504153.30	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.504575.20	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.506163.50	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.506247.210	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.506625.240	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.506629.150	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.506753.150	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.506921.20	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.507001.34	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.507047.100	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.507053.40	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.507159.14	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.507485.80	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.507641.250	Proteína hipotética
TcCLB.507771.70	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.507777.20	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.508059.50	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.508153.1050	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.508177.90	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.508231.40	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.508503.100	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.508549.20	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.508637.120	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.508899.54	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.508955.20	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.509011.60	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.509053.160	Proteína hipotética, conservada

Gene ID	DESCRIÇÃO DO PRODUTO
TcCLB.509177.59	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.509245.10	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.509747.40	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.509749.30	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.509911.74	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.509965.200	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.509965.220	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.510089.210	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.510173.130	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.510335.10	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.510357.40	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.510421.220	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.510565.125	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.510565.141	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.510719.140	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.510719.40	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.511303.64	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.511363.4	Proteína hipotética, conservada
TcCLB.511691.39	Proteína hipotética, conservada (fragmento)

Nota: Em negrito, os genes selecionados para o presente estudo.

Fonte: Tritrypbd

Quadro 6: Características dos genes selecionados.

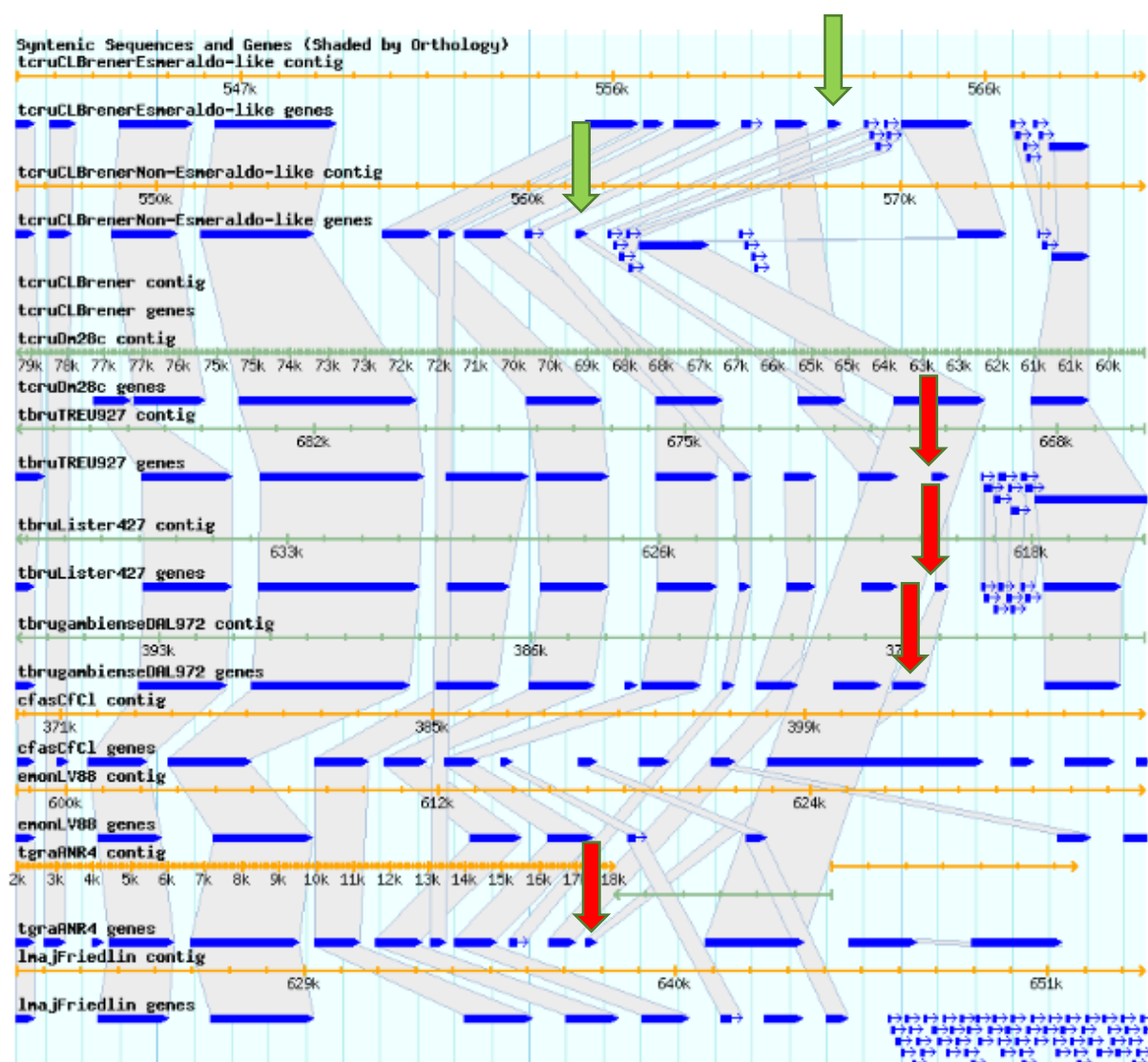
ID GENES ESCOLHIDOS	NOME PARA O TRABALHO	LOCALIZAÇÃO DO GENE	PRODUTO	DOMÍNIO
TcCLB.506921.20	Gene 21.20	TcChr33-P:561,243..561,560(+)	Proteína hipotética conservada	Dimerização-ancoragem de superfamília de subunidade reguladora de PK dependente de AMPc.
TcCLB.508503.100	Gene 03.100	TcChr33-P:559,878..560,087(+)	Proteína hipotética conservada	Dimerização-ancoragem de superfamília de subunidade reguladora de PK dependente de AMPc.
TcCLB.507641.250	Gene 41.250	TcChr37-S:1,199,465..1,199,818(-)	Proteína hipotética	Família PLAC8

Nota: Em localização do gene, é demonstrado um código para cada gene que representa sua localização no genoma do parasito, onde “TcChr” demonstra o cromossomo que o gene se encontra, a letra “S” significa haplótipo Esmeraldo – like, e a letra “P”, haplótipo Non-Esmeraldo like. A numeração é a posição dos nucleotídeos, o “(-)” representa a sequência no sentido 3’ – 5’ e o “(+)” no sentido 5’ – 3’

Fonte: Tritrypbd

O gene 21.20, expresso em *Trypanosoma cruzi* CL Brener Non-Esmeraldo like e Esmeraldo like, foi evidenciado em formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos do parasita por espectrometria de massa no trabalho de Godoy et al. (2012), possuindo sintenia com outras espécies de *Trypanosoma* (Figura 4). Foi visto que a sequência desse gene é idêntica a outro gene listado no quadro 5, identificado como TcCLB.510565.141, sugerindo então, que esse gene esteja presente em mais de uma região do genoma do parasito.

Figura 4: Ortologia do gene 21.20.

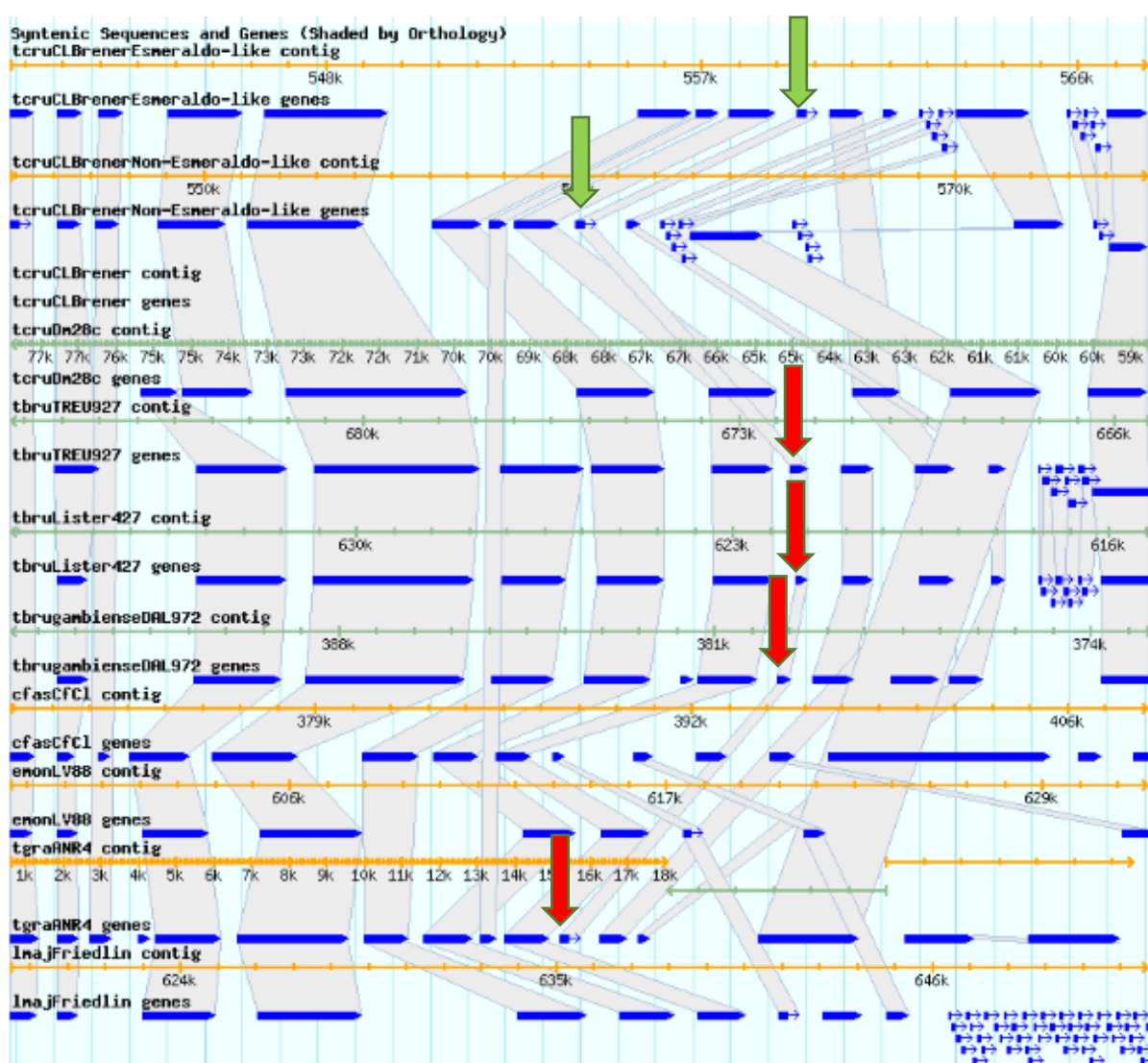


Nota: o gene é identificado pela seta verde e as setas vermelhas demonstram a posição de seus ortólogos, em outros organismos.

Fonte: Tritypdb

O gene 03.100 também foi evidenciado em formas epimastigotas e tripomastigota metacíclicos do parasita por espectrometria de massa no trabalho de Godoy et al. (2012) e expresso em *Trypanosoma cruzi* CL Brener Non-Esmeraldo like e Esmeraldo like. Também possui sintenia com outras espécies de *Trypanosoma*, mostrado na figura 5, sugerindo que, caso essa proteína tenha uma relação relevante na invasão do parasito na célula hospedeira humana ou até mesmo na sua sobrevivida, podemos interferir em mais de uma espécie usando apenas *T. cruzi* como modelo, tornando o alvo terapêutico mais amplo.

Figura 5: Ortologia do gene 03.100.

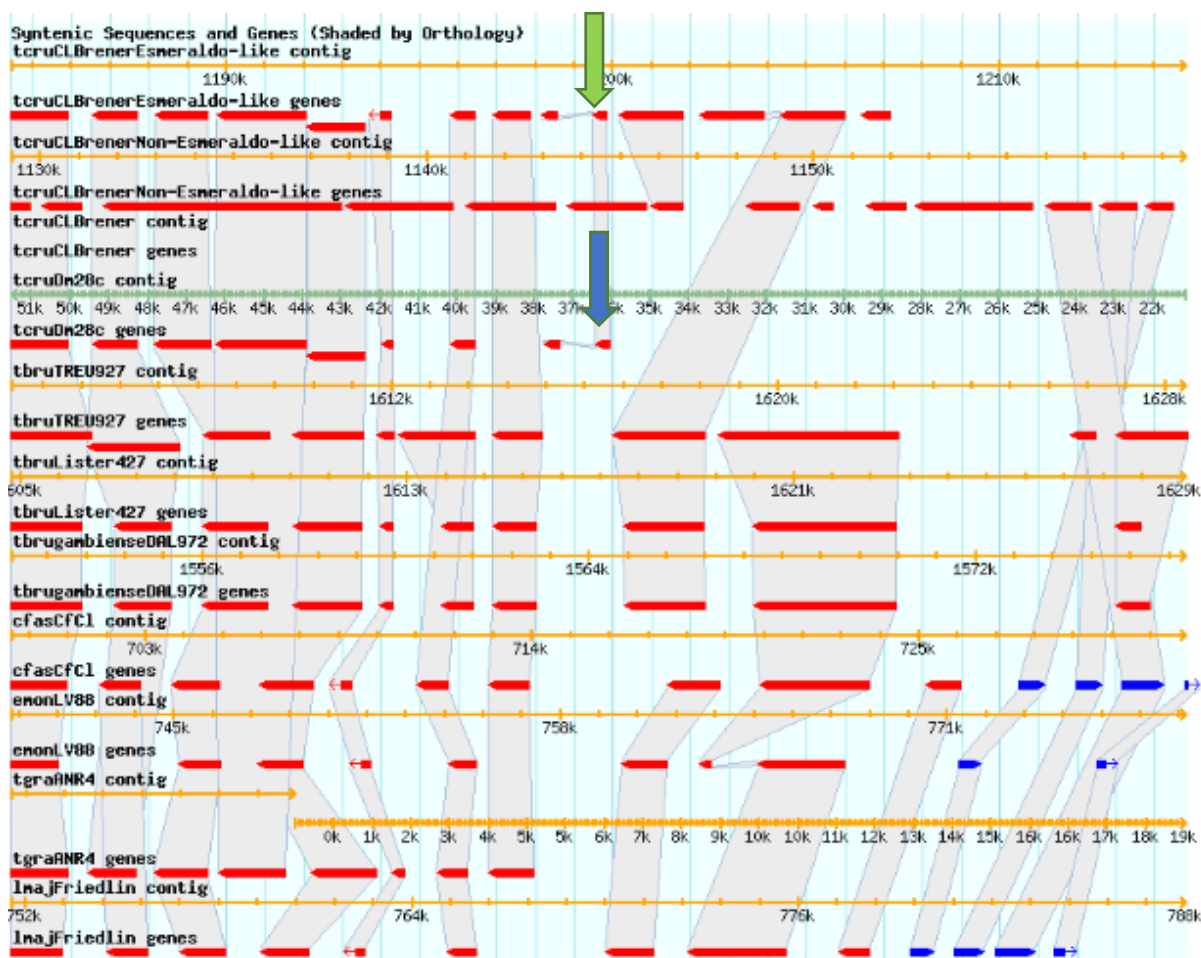


Nota: o gene é identificado pela seta verde e as setas vermelhas demonstram a posição de seus ortólogos, em outros organismos.

Fonte: Tritrypdb

Já o gene 41.250 foi evidenciado por Cordero et al. (2009), também em tripomastigotas metacíclicos do parasita por espectrometria de massa, expresso em *Trypanosoma cruzi* CL Brener Non-Esmeraldo like e Esmeraldo like e não está anotado como “proteína hipotética conservada”, explicando porque esse gene não foi encontrado em outras espécies além do *T. cruzi*, (Figura 6).

Figura 6: Ortologia do gene 41.250.



Nota: o gene é identificado pela seta verde e a seta azul demonstra o local onde há presença deste gene em outra cepa de *T. cruzi*.

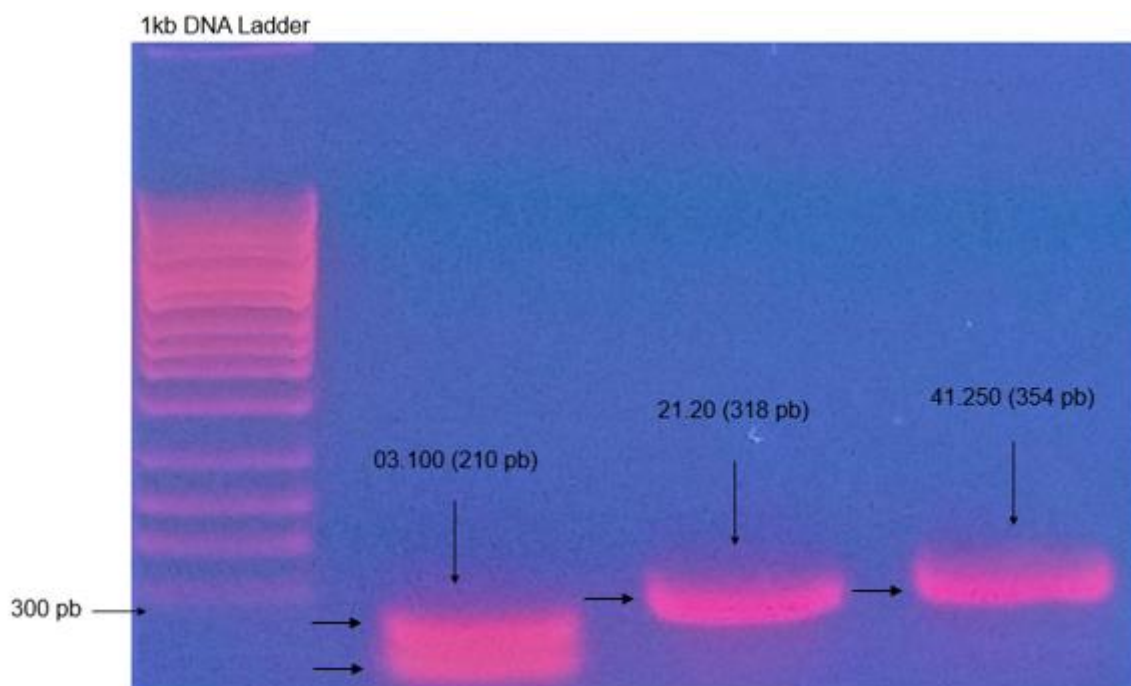
Fonte: Tritrypdb

4.2 Amplificação e purificação dos genes selecionados

Após a amplificação por PCR dos três genes selecionados, foi verificado o tamanho dos produtos por eletroforese em gel de agarose. Para dois destes genes (21.20 e 41.250) verificou-se bandas de tamanho esperados, de 318 pb e 354 pb, respectivamente. Por outro lado, foi observada a amplificação de duas bandas para o

gene 03.100, ao invés de uma como esperado. O padrão de amplificação dos três genes é demonstrado na figura 7.

Figura 7: Resultado da eletroforese em gel de agarose.



Nota: eletroforese em gel de agarose mostrando a separação dos produtos de PCR purificados com o kit Invisorb® Fragment CleanUp. Da esquerda para a direita: padrão de tamanho molecular, gene 03.100, 21.20 e 41.250.

Após a análise em gel de agarose, os produtos foram purificados pelo kit Invisorb® Fragment CleanUp, que fornece uma purificação diretamente de produtos de PCR, sem ter que necessariamente correr em gel de agarose. Além disso, não possui etapa de lavagem, o que tornou o processo mais rápido.

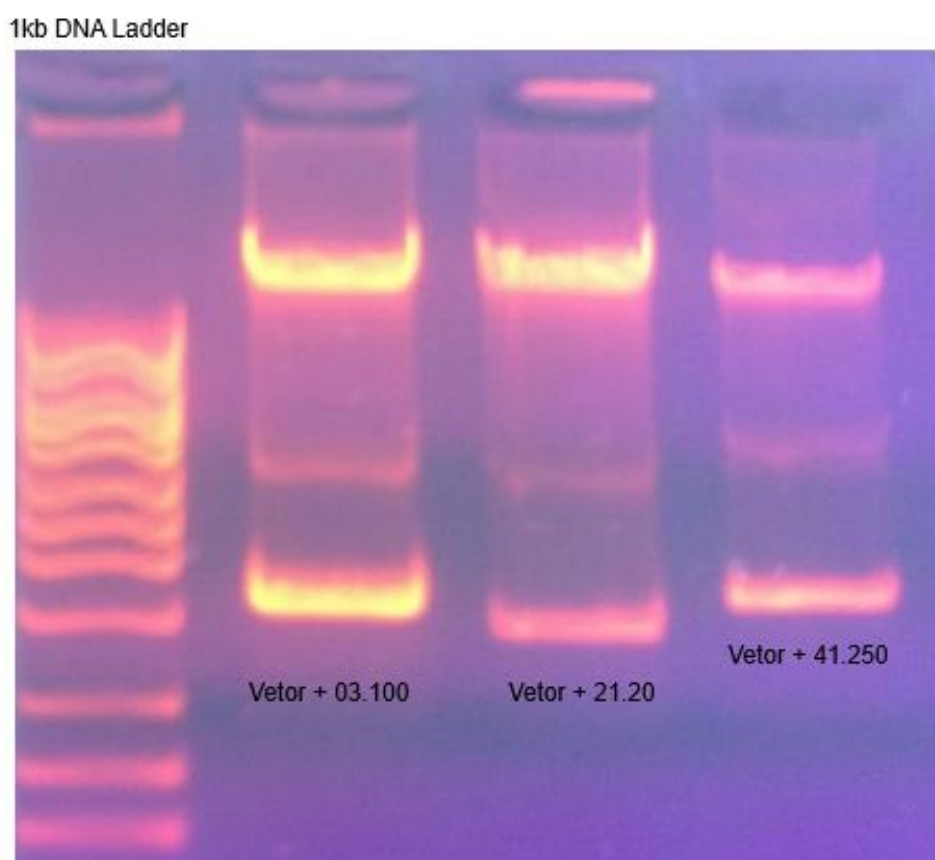
4.3 Clonagem e transformação bacteriana

O plasmídeo utilizado para a clonagem (pGEM-T Easy) apresenta 3015 pb, possuindo duas regiões de seleção ao longo de sua sequência, sendo um gene que confere resistência a ampicilina e outro que codifica para a enzima β -galactosidase localizado em seu sítio múltiplo de clonagem, facilitando a seleção dos clones positivos, pois o inserto no plasmídeo impediu que a proteína fosse produzida para clivar seu substrato X-Gal, deixando as colônias positivas com a coloração branca e as negativas azuis. Para a clonagem, foram utilizados os produtos de PCR purificados inclusive o material correspondente ao gene 03.100. Desta forma, a clonagem e a

transformação de bactérias posteriormente semeadas em placas contendo o antibiótico ampicilina, o indutor IPTG e o X-Gal foram satisfatórias.

Foram selecionadas aleatoriamente colônias brancas para serem semeadas em tubos estéreis contendo meio LB líquido com ampicilina e, após o crescimento dessas colônias, seus plasmídeos foram purificados e quantificados, obtendo os clones HP-1 e HP-2, HP-3 e HP-4, HP-5 e HP-6, como descrito anteriormente, para serem sequenciados (Figura 8).

Figura 8: Resultado da purificação em eletroforese em gel de agarose.



Nota: eletroforese em gel de agarose mostrando a separação dos produtos da extração de DNA plasmidial. Da esquerda para a direita: padrão de tamanho molecular, gene 03.100, 21.20 e 41.250.

4.4 Análise do sequenciamento e alinhamento das sequências

O sequenciamento pelo método de Sanger foi satisfatório para dois genes, utilizando os primers T7 e SP6, que anelaram nas sequências dos promotores T7 e SP6 presentes no vetor, os quais flanqueiam a região de clonagem. Os resultados do

BLAST mostraram 100% de similaridade com os genes selecionados 03.100 e 41.250. Estes foram, posteriormente, editados e alinhados utilizando o software Bioedit, como descrito no item 3.9.

O resultado dos clones HP-3 e HP-4, correspondentes ao gene 21.20, foi de baixa qualidade, não sendo possível a realização do alinhamento, porém será repetido após a apresentação deste estudo, não sendo descrito nesta dissertação. Podemos observar o resultado do alinhamento com os genes 03.100 e 41.250 nas figuras 9 e 10, respectivamente.

Figura 9: Alinhamento do gene 03.100 com os clones HP-1 e HP-2.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      10
TeCLB.508503.100 Trypanosoma c .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
HP-1 ATGCAGAGCAGAACAGGGGGCCACAACATCAGCAGCATCCAGAAGGATCAGGCGTACCTCCACTCCCAACAGTCCGCGGTATAAATCGAGAGGCTCGTTCG
HP-2 ATGCAGAGCAGAACAGGGGGCCACAACATCAGCAGCATCCAGAAGGATCAGGCGTACCTCCACTCCCAACAGTCCGCGGTATAAATCGAGAGGCTCGTTCG

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     20
TeCLB.508503.100 Trypanosoma c .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
HP-1 CTGACGTA CTCCGCGATAAACCCAGAGAACGCCTGTGAGTACATGGCGCAGTGGGCAGCCAGGCAGAGGGCGGCAGCGGCATCCACGGCAGACACACACC
HP-2 CTGACGTA CTCCGCGATAAACCCAGAGAACGCCTGTGAGTACATGGCGCAGTGGGCAGCCAGGCAGAGGGCGGCAGCGGCATCCACGGCAGACACACACC

      210
TeCLB.508503.100 Trypanosoma c .....|.....|
HP-1 CACGACGTAA
HP-2 CACGACGTAA
  
```

Nota: o gene 03.100 possui 210 pb, podendo-se observar seu alinhamento completo com os clones HP1 (sequenciamento com primer T7) e HP2 (sequenciamento com primer SP6).

Figura 10: Alinhamento do gene 41.250 com os clones HP-5 e HP-6.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      10
TeCLB.507641.250 Trypanosoma c .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
HP-5 ATGGGCTTTACTGTTGGTTTGTGAGTTGCTGTGAGGATATGGGCACGTGCTGTGACGTTTGTGTTGCTTTGCGTGCAACACAAGTCCCCAGTGGAGTG
HP-6 ATGGGCTTTACTGTTGGTTTGTGAGTTGCTGTGAGGATATGGGCACGTGCTGTGACGTTTGTGTTGCTTTGCGTGCAACACAAGTCCCCAGTGGAGTG

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     20
TeCLB.507641.250 Trypanosoma c .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
HP-5 CTGCTGAAGGCATACCCACAACCTGTGGCTGCTGCTGCTCTGGGGTCATGCTTCTTCCCATGATTACCAAGTGCCTTCTTCTGTAGAAATTTGCTGTC
HP-6 CTGCTGAAGGCATACCCACAACCTGTGGCTGCTGCTGCTCTGGGGTCATGCTTCTTCCCATGATTACCAAGTGCCTTCTTCTGTAGAAATTTGCTGTC

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     30
TeCLB.507641.250 Trypanosoma c .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
HP-5 GATGTACTTTCTGCAGGAGAAATTTGCTTACCCTACTGATTGGTTGGTTTTGCTCCCGTGTCTCGGCTGCCAGACACATCGCGAGCTCACGTTGCGT
HP-6 GATGTACTTTCTGCAGGAGAAATTTGCTTACCCTACTGATTGGTTGGTTTTGCTCCCGTGTCTCGGCTGCCAGACACATCGCGAGCTCACGTTGCGT

      310     320     330     340     350
TeCLB.507641.250 Trypanosoma c .....|.....|.....|.....|.....|
HP-5 GGGCCAAACCCCGCGGCTGCTGTGCCAACCAAGCAATGTTCCCATGCGTTAG
HP-6 GGGCCAAACCCCGCGGCTGCTGTGCCAACCAAGCAATGTTCCCATGCGTTAG
  
```

Nota: o gene 41.250 possui 354 pb, podendo-se observar seu alinhamento completo com os clones HP5 (sequenciamento com primer T7) e HP6 (sequenciamento com primer SP6).

4.5 Características dos genes selecionados para o estudo

O gene 21.20, ID TcCLB.506921.20, codifica uma proteína hipotética conservada presente em *Trypanosoma cruzi* CL Brener Non-Esmeraldo like e Esmeraldo like, possui 318 pares de bases e está localizado no cromossomo 33. A proteína codificada tem o domínio de dimerização-ancoragem da superfamília de subunidade reguladora de PK dependente de AMPc ou PKA.

As proteínas cinases representam a maior família de proteínas em células eucarióticas, relacionadas principalmente com a comunicação no controle intracelular e transdução de sinais (A ENGH; BOSSEMEYER, 2001).

A PKA fosforila grupos específicos de serina e treonina, alterando as atividades de proteínas-alvo. A forma inativa da PKA contém duas subunidades catalíticas (C) e duas subunidades de regulação (R) formando um complexo (C₂R₂), e esse complexo é cataliticamente inativo, pois há a ocupação de um domínio inibitório em cada fenda da subunidade C impedindo a ligação de substrato. As sequências aminoterminais das subunidades de R interagem para formar um dímero (R₂), sítio de ligação para uma proteína de ancoragem, a cinase A (AKAP). Quando as subunidades R estão ligadas a AMPc, passam por uma alteração na conformação, que afasta o domínio autoinibitório de R do domínio catalítico de C e esse complexo se dissocia, originando duas subunidades C livres e cataliticamente ativas (NELSON; COX, 2014).

O gene 03.100, ID TcCLB.508503.100, codifica uma proteína hipotética conservada de 210 pares de bases, e assim como o gene 21.20, está presente em *Trypanosoma cruzi* CL Brener Non-Esmeraldo like e Esmeraldo like, localizado no cromossomo 33 e com o domínio em dimerização-ancoragem da superfamília de subunidade reguladora de PK dependente de AMPc ou PKA. Esse resultado sugere que ambas as proteínas hipotéticas podem apresentar funções semelhantes e/ou complementares em *T. cruzi*.

Bao et al. (2008), demonstraram que a atividade de PKA em *T. cruzi* é essencial para sua viabilidade, e além disso, viram que 38 genes codificavam substratos de PKA de *T. cruzi* por fosforilação in vitro, sendo que desses 38 genes, 18 codificam para proteínas hipotéticas e 12 dessas proteínas hipotéticas contêm locais típicos de fosforilação de PKA.

O gene 41.250, ID TcCLB.507641.250, localizado no cromossomo 37, codifica uma proteína hipotética de 354 pares de bases e está presente em *Trypanosoma cruzi* CL Brener Non-Esmeraldo e Esmeraldo like. Sem ortologia com outros organismos, de acordo com os dados atuais, é encontrado apenas na espécie de *Trypanosoma cruzi*, podendo ser uma proteína específica desse parasito. O produto desse gene apresenta um domínio semelhante ao domínio presente em proteínas da família PLAC8.

PLAC8 foi originalmente identificado em proteínas placentárias em mamíferos, do qual sua expressão é restrita à camada de espongiotrofoblasto durante o desenvolvimento placentário (GALAVIZ-HERNANDEZ et al., 2003). A função deste domínio ainda não está esclarecida, e pode ser encontrado em proteínas de plantas, fungos, algas e de animais, possuindo diferentes funções.

Em alguns fungos e plantas, algumas proteínas que apresentam domínio semelhante a proteínas da família PLAC8 estão envolvidas no transporte de metais pesados de células que contribuem para a desintoxicação celular, conferindo maior resistência ao excesso de metais pesados presentes no meio ambiente (SONG, 2004). Por um outro lado, existem outras proteínas em plantas que também apresentam esse domínio, mas estão relacionadas na determinação do tamanho do fruto e do número de células (FRARY, 2000; GUO et al., 2010). Em algumas algas, as proteínas com alta similaridade às proteínas da família PLAC8, são de membranas flagelar, e estão associadas à orientação do movimento celular para a luz (IOMINI et al., 2006).

Uma comparação de sequência de nucleotídeos, por meio de BLAST no Tritypdb, da região do gene 41.250 que contém esse domínio semelhante as proteínas da família PLAC8 (nucleotídeo 3 ao 93), com apenas *Trypanosomas*, resultou em muitas proteínas ainda anotadas como “proteínas hipotéticas”, além de algumas proteínas não tão semelhantes, como a glicoproteína variável de superfície de *Trypanosoma evansi* (E value = 3.4), principal glicoproteína composta na superfície do parasita, responsável pela variação antigênica (VERLOO; MAGNUS; BÜSCHER, 2001). A comparação com outros tripanosomatídeos contidos no Tritypdb, também não resultou em proteínas conhecidas com alta semelhança, mostrando proteínas de maior semelhança anotadas como “proteínas hipotéticas”. Um exemplo de proteína conhecida foi, porém com baixa semelhança, proteína AMA-1 (Antígeno da membrana

apical 1) de *Endotrypanum monterogeii* (E value = 0.079). AMA-1 foi originalmente encontrada na superfície de membrana de *Plasmodium vivax* e está relacionada com a invasão do parasito do filo Apicomplexa dos eritrócitos (HOWELL et al., 2001).

Novos estudos serão necessários para elucidar os mecanismos e especificidades de substratos conservados de proteínas que contém domínio semelhante às proteínas da família PLAC8, facilitando a compreensão da função dessas proteínas em diferentes organismos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa de marcadores gênicos em *Trypanosoma cruzi* é de extrema importância para o entendimento mais aprofundado da biologia molecular deste parasita tão complexo. Sabendo disso, o presente trabalho deu início à caracterização de três proteínas anotadas no sequenciamento do genoma do *Trypanosoma cruzi* como sendo “hipotética” e “hipotética conservada”, cujos genes se encontram em epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos.

Foi possível a realização da clonagem dos três genes com a metodologia citada, porém um gene não teve o resultado satisfatório no sequenciamento de Sanger, até o momento, outras tentativas serão realizadas e possivelmente publicadas em trabalhos futuros.

Acredita-se que algumas proteínas hipotéticas de *Trypanosoma cruzi* podem estar associadas à sobrevivência ou a internalização do parasito no hospedeiro, o que demonstra a importância na busca da função dessas proteínas. Desse modo, o presente trabalho foi importante para iniciar a busca da função de cada proteína para que no futuro consigam utilizar essas informações e desenvolverem métodos a fim de erradicar a doença de Chagas.

REFERÊNCIAS

- A ENGH, Richard; BOSSEMEYER, Dirk. The protein kinase activity modulation sites. **Advances In Enzyme Regulation**, [s.l.], v. 41, n. 1, p.121-149, maio 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0065-2571\(00\)00010-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0065-2571(00)00010-8).
- ANDERSSON, Björn. The Trypanosoma cruzi genome; conserved core genes and extremely variable surface molecule families. **Research In Microbiology**, [s.l.], v. 162, n. 6, p.619-625, jul. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2011.05.003>
- AVILA, Herbet A.; SIMPSON, Larry. Organization and complexity of minicircle-encoded guide RNAs in Trypanosoma cruzi. **Rna**, Los Angeles, v. 1, n. 9, p.939-947, 1 nov. 1995.
- BAO, Y. et al. Role of Protein Kinase A in Trypanosoma cruzi. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 76, n. 10, p.4757-4763, 11 ago. 2008. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.00527-08>.
- BARBOSA, Paulo Roberto Benchimol. The oral transmission of Chagas' disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks. **International Journal Of Cardiology**. Rio de Janeiro, p. 132-133. 10 set. 2006. Disponível em: <[http://www.internationaljournalofcardiology.com/article/S0167-5273\(06\)00117-3/fulltext](http://www.internationaljournalofcardiology.com/article/S0167-5273(06)00117-3/fulltext)>. Acesso em: 29 maio 2017.
- BRASIL, Biblioteca Virtual em Saúde. **Trajetória Carlos Chagas**. 2017. Disponível em: <<http://www.bvschagas.coc.fiocruz.br/php/trajetoria.php>>. Acesso em: 19 maio 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Boletim Epidemiológico**. Vol 46. Brasília: Ministério da Saúde; 2015. Acesso em 17 de Agosto de 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica**. 7. ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2009. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Acesso em 10 de Dezembro de 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica**. 7. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. 816 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**. Brasília: Ministério da Saúde, p. 513, 2014. Acesso em 13 de Dezembro de 2016.

BURLEIGH, Barbara A.; WOOLSEY, Aaron M.. Cell signalling and Trypanosoma cruzi invasion. **Cellular Microbiology**, [s.l.], v. 4, n. 11, p.701-711, nov. 2002. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1462-5822.2002.00226.x>.

CANO, Maria I. et al. Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the Trypanosoma cruzi Genome Project. **Molecular And Biochemical Parasitology**, [s.l.], v. 71, n. 2, p.273-278, maio 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0166-6851\(95\)00066-a](http://dx.doi.org/10.1016/0166-6851(95)00066-a).

CAROD-ARTAL, Francisco Javier; VARGAS, Antonio Pedro; FALCAO, Thiago. Stroke in Asymptomatic Trypanosoma cruzi-Infected Patients. **Cerebrovascular Diseases**, [s.l.], v. 31, n. 1, p.24-28, 2011. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000320248>.

CDC - Center for Disease Control and Prevention. **Life cycle**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>>. Acesso em: 18 maio 2017.

CORDERO, Esteban M. et al. Proteomic Analysis of Detergent-Solubilized Membrane Proteins from Insect-Developmental Forms of Trypanosoma cruzi. **J Proteome Res**, Botucatu, v. 7, n. 8, p.3642-3652, set. 2009.

COURA, José Rodrigues et al. La enfermedad de Chagas, a la puerta de los 100 años del conocimiento de una endemia americana ancestral: Uma visão sistêmica da endemia chagásica. **Organización Panamericana de La Salud**. Rio de Janeiro, p. 25-35. jan. 2007.

COURA, José Rodrigues. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 110, n. 3, p.277-282, maio 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0074-0276140362>.

DOCAMPO, Roberto et al. New Insights into Roles of Acidocalcisomes and Contractile Vacuole Complex in Osmoregulation in Protists. **International Review Of Cell And Molecular Biology**, [s.l.], p.69-113, 2013. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-407695-2.00002-0>.

EL-SAYED, N. M. The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. **Science**, [s.l.], v. 309, n. 5733, p.409-415, 15 jul. 2005. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1112631>.

EL-SAYED, N. M.. Comparative Genomics of Trypanosomatid Parasitic Protozoa. **Science**, [s.l.], v. 309, n. 5733, p.404-409, 15 jul. 2005. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1112181>.

EPTING, Conrad L.; COATES, Bria M.; ENGMAN, David M.. Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, [s.l.], v. 126, n. 3, p.283-291, nov. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2010.06.023>.

FAVORETO, Silvio; DORTA, Miriam L.; YOSHIDA, Nobuko. *Trypanosoma cruzi* 175-kDa Protein Tyrosine Phosphorylation Is Associated with Host Cell Invasion. **Experimental Parasitology**, [s.l.], v. 89, n. 2, p.188-194, jun. 1998. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/expr.1998.4285>.

FERREIRA, D. et al. Actin Cytoskeleton-Dependent and -Independent Host Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi* Is Mediated by Distinct Parasite Surface Molecules. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 74, n. 10, p.5522-5528, 20 set. 2006. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.00518-06>.

FRARY, A.. Fw2.2: A Quantitative Trait Locus Key to the Evolution of Tomato Fruit Size. **Science**, [s.l.], v. 289, n. 5476, p.85-88, 7 jul. 2000. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.289.5476.85>.

GALAVIZ-HERNANDEZ, Carlos et al. Plac8 and Plac9, novel placental-enriched genes identified through microarray analysis. **Gene**, [s.l.], v. 309, n. 2, p.81-89, maio 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1119\(03\)00508-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1119(03)00508-0).

GODOY, Lyris Martins Franco de et al. Quantitative proteomics of *Trypanosoma cruzi* during metacyclogenesis. **Proteomics**, [s.l.], v. 12, n. 17, p.2694-2703, ago. 2012. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.201200078>.

GUO, Mei et al. Cell Number Regulator1 Affects Plant and Organ Size in Maize: Implications for Crop Yield Enhancement and Heterosis. **The Plant Cell**, [s.l.], v. 22, n. 4, p.1057-1073, abr. 2010. American Society of Plant Biologists (ASPB). <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.109.073676>.

HOWELL, Steven A. et al. Proteolytic Processing and Primary Structure of *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen-1. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 276, n. 33, p.31311-31320, 8 jun. 2001. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m103076200>.

IOMINI, Carlo et al. Two Flagellar Genes, AGG2 and AGG3, Mediate Orientation to Light in *Chlamydomonas*. **Current Biology**, [s.l.], v. 16, n. 11, p.1147-1153, jun. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2006.04.035>.

KRAMER, Susanne. Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: The case of kinetoplastids. **Molecular And Biochemical Parasitology**, [s.l.], v. 181, n. 2, p.61-72, fev. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2011.10.002>.

KRIEGER, Marco Aurelio et al. Differential Gene Expression during *Trypanosoma cruzi* Metacyclogenesis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 1, p.165-168, set. 1999.

LIANG, X.-h. et al. Trans and cis Splicing in Trypanosomatids: Mechanism, Factors, and Regulation. **Eukaryotic Cell**, [s.l.], v. 2, n. 5, p.830-840, 1 out. 2003. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/ec.2.5.830-840.2003>.

LUKES, J. et al. Kinetoplast DNA Network: Evolution of an Improbable Structure. **Eukaryotic Cell**, [s.l.], v. 1, n. 4, p.495-502, 1 ago. 2002. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/ec.1.4.495-502.2002>.

MACHADO, Fabiana S. et al. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. **Seminars In Immunopathology**, [s.l.], v. 34, n. 6, p.753-770, 18 out. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00281-012-0351-7>.

MAEDA, Fernando Yukio et al. Mammalian cell invasion by closely related Trypanosoma species T. dionisii and T. cruzi. **Acta Tropica**, [s.l.], v. 121, n. 2, p.141-147, fev. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.10.017>.

MARTINS, A. V. et al. Biology of Trypanosoma cruzi: an update. **Infectio**, v. 16, p. 45-58, 2012.

MATTHEWS, K. R.. The developmental cell biology of Trypanosoma brucei. **Journal Of Cell Science**, [s.l.], v. 118, n. 2, p.283-290, 15 jan. 2005. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.01649>.

NEIRA, I.; FERREIRA, A. T.; YOSHIDA, N. Activation of distinct signal transduction pathways in Trypanosoma cruzi isolates with differential capacity to invade host cells. **International Journal of Parasitology**, v. 32, p. 405–414, 2002.

NELSON, David L.; COX, Michael M.. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2014. 1336 p.

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DA SAÚDE, **Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos**. Rio de Janeiro: PANAFTOSA-VP/OPAS/OMS, 2009.

PALFI, Zsofia; LANE, William S.; BINDEREIF, Albrecht. Biochemical and functional characterization of the cis-spliceosomal U1 small nuclear RNP from Trypanosoma brucei. **Molecular And Biochemical Parasitology**, [s.l.], v. 121, n. 2, p.233-243, maio 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0166-6851\(02\)00044-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0166-6851(02)00044-0).

PAULIN, Jerome J.. THE CHONDRIOME OF SELECTED TRYPANOSOMATIDS: A Three-Dimensional Study Based on Serial Thick Sections and High Voltage Electron Microscopy. **The Journal Of Cell Biology**, Georgia, v. 66, n. 0, p.404-413, jun. 1975.

PRETI, Henrique. **Caracterização funcional de genes codificadores de proteínas hipotéticas diferencialmente expressos durante a metacicloênese de trypanosoma cruzi**. 2007. 174 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

PROMEGA. **PGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems: TECHNICAL MANUAL**. Disponível em: <<https://www.promega.com/>>

/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol.pdf>. Acesso em: 10 out. 2017.

QUEIROZ, Rayner M. L. et al. Cell Surface Proteome Analysis of Human-Hosted *Trypanosoma cruzi* Life Stages. **Journal Of Proteome Research**, [s.l.], v. 13, n. 8, p.3530-3541, ago. 2014. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/pr401120y>.

RASSI, Anis; MARIN-NETO, José Antonio. Chagas disease. **The Lancet**, [s.l.], v. 375, n. 9723, p.1388-1402, abr. 2010. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(10\)60061-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(10)60061-x).

RUIZ, C. Rita et al. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity. **Biochemical Journal**, [s.l.], v. 330, n. 1, p.505-511, 15 fev. 1998. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/bj3300505>.

SCHENKMAN, Sergio et al. A novel cell surface trans-sialidase of *trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. **Cell**, [s.l.], v. 65, n. 7, p.1117-1125, jun. 1991. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90008-m](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(91)90008-m).

SCOTT, D. A. et al. In Situ Compositional Analysis of Acidocalcisomes in *Trypanosoma cruzi*. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 272, n. 44, p.28020-28029, 31 out. 1997. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.44.28020>.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B.. Oral Transmission of Chagas Disease. **Clinical Infectious Diseases**, [s.l.], v. 54, n. 6, p.845-852, 11 jan. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cir956>.

SONG, W.-y.. A Novel Family of Cys-Rich Membrane Proteins Mediates Cadmium Resistance in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 135, n. 2, p.1027-1039, 4 jun. 2004. American Society of Plant Biologists (ASPB). <http://dx.doi.org/10.1104/pp.103.037739>.

SOUZA, Renata T. et al. Genome Size, Karyotype Polymorphism and Chromosomal Evolution in *Trypanosoma cruzi*. **Plos One**, [s.l.], v. 6, n. 8, p.1-14, 12 ago. 2011. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0023042>.

SOUZA, Wanderley de. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 104, n. 1, p.89-100, jul. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762009000900014>.

SOUZA, Wanderley. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current Pharmaceutical Design**, [s.l.], v. 8, n. 4, p.269-285, 1 fev. 2002. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1381612023396276>.

STUART, Kenneth D. et al. Complex management: RNA editing in trypanosomes. **Trends In Biochemical Sciences**, [s.l.], v. 30, n. 2, p.97-105, fev. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2004.12.006>.

VERLOO, D.; MAGNUS, E.; BÜSCHER, P.. General expression of RoTat 1.2 variable antigen type in *Trypanosoma evansi* isolates from different origin. **Veterinary Parasitology**, [s.l.], v. 97, n. 3, p.185-191, jun. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0304-4017\(01\)00412-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0304-4017(01)00412-5).

VILLALTA, F. et al. A ligand that *Trypanosoma cruzi* uses to bind to mammalian cells to initiate infection. **FEBS Letters**, v. 505, p. 383-388, 2001.

WESTENBERGER, Scott J et al. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial maxicircles display species- and strain-specific variation and a conserved element in the non-coding region. **Bmc Genomics**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.7-60, 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-7-60>.

YOSHIDA, N. et al. Signal transduction induced in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes during the invasion of mammalian cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 269-278, 2000.

ZANFORLIN, Tamiris et al. Molecular Characterization of *Trypanosoma cruzi* SAP Proteins with Host-Cell Lysosome Exocytosis-Inducing Activity Required for Parasite Invasion. **Plos One**, [S.l.], v. 8, n. 12, p.1-6, 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0083864>.