

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO

Curso de Biomedicina

CAMILA COLOMBARI MANTOVANI

**METODOLOGIA PARA BUSCA DE INIBIDORES DE SÍNTESE
PROTEICA ESPECÍFICOS PARA *Trypanosoma cruzi***

São Paulo

2022

CAMILA COLOMBARI MANTOVANI

**METODOLOGIA PARA BUSCA DE INIBIDORES DE SÍNTESE
PROTEICA ESPECÍFICOS PARA *Trypanosoma cruzi***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, campus Ipiranga, para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Mitsuo Lima.

Co-Orientador: Prof. Dr. Sergio Schenkman.

São Paulo

2022

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Padre Inocente Radrizzani

Mantovani, Camila Colombari

Metodologia para busca de inibidores de síntese proteica específicos para trypanosoma cruzi / Camila Colombari Mantovani. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2022.
62 p.

Orientação de Fábio Mitsuo Lima.

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação),
Centro Universitário São Camilo, 2022.

**TERMO DE AUTORIZAÇÃO
ENTREGA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO
GRADUAÇÃO**

Eu, Fabio Mitsuo Lima, curso de Biomedicina, orientador do Trabalho de Conclusão do Curso, título "METODOLOGIA PARA BUSCA DE INIBIDORES DE SÍNTESE PROTEICA ESPECÍFICOS PARA *Trypanosoma cruzi* da aluna Camila Colombari Mantovani, turma SPBME08AMI1, autorizo a entrega oficial através do Portal Acadêmico da versão final corrigida.

Caso o trabalho envolva aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CoEP), ou Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA), o parecer de aprovação deverá também ser anexado ao protocolo.

Assinatura do docente orientador:
(Somente assinatura manual)



Data: 01 / 06 / 2022

▷ Campus Ipiranga
Av Nazaré, 1501
04263-200 São Paulo SP

▷ Campus Pompeia
Rua Raul Pompéia, 144
05025-010 São Paulo SP

Aos meus pais, Sueli e Wilson, que sempre me incentivaram e a todos os professores que contribuíram com a minha educação.

Aos meus irmãos, Carolina e Adriano, e à minha avó Dilva, que sempre estiveram comigo independente das situações.

À Mei que foi minha companheira de estudos.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus, que sempre me guiou para o melhor caminho e a todas as pessoas da Seicho-No-Ie que me mostraram como a vida pode ser maravilhosa.

Aos meus pais, Sueli e Wilson, que me incentivaram e tiveram paciência para me ouvir falando sobre assuntos de biologia que não entendiam e sobre os problemas durante a graduação.

À minha irmã Carolina, que me abraçou quando eu chorei, me apoiou muito, me deu carona para a estação de trem e me levou para a Seicho-No-Ie.

Ao meu irmão Adriano, que me mandava vídeos engraçados para me fazer sorrir mesmo quando não estava em um dia bom.

À minha avó Dilva, que preparava coisas gostosas para levar de almoço para o laboratório e que me buscou várias vezes na estação depois da aula de anatomia.

Às minhas gatas Nina, Margô, Mia e Mei, que deixavam meu dia bem melhor só por existirem.

Às minhas primas Tainá e Ana Beatriz, que também me deram vários conselhos sobre a vida.

Aos meus padrinhos Sileide e Jefferson, que me animavam toda vez que tinha noite da pizza.

Às minhas amigas do ballet, que sempre ouviram meus desabafos e comemoraram minhas vitórias, em especial Mariana Marioto, Alice Lima, Thayná Leme, Ederli, Júlia Colonato, Lívia, Caroline Boer, Rafaela Colonato, Maria Luiza Braga, Maria Eduarda, Maysa, Fernanda Serroni e muitas outras com quem já dividi os palcos.

Às minhas professoras de ballet clássico e contemporâneo Vanessa e Gabrielle, que sempre me impulsionaram a não desistir da dança e me deram os melhores conselhos sobre tudo.

A todos os meus amigos, desde os do fundamental até os da faculdade, por tornarem o ambiente da sala de aula mais divertido. Obrigada Carolina Idalgo, Helena de Conti, Bianca Alavaski, Alessandra Araújo, Gabriella Nathaly, Rafaela Diniz, Raissa

Guerreiro, Vivian Sgarbi, Ana Júlia Seccatto, Maria Eduarda Prado, Gabriella Ariane e Rafael Alexandre.

Agradeço especialmente à Julia Rodrigues, minha melhor amiga da faculdade, que ouviu todos os desabafos sem nunca reclamar e sempre me fez sentir que eu não estava sozinha; à Nicholy, que me incentiva a continuar toda vez porque a pesquisa não é fácil e temos que seguir em frente sempre; à Gabriela Lima, que me fez companhia para as bienais do livro e embarcou nas minhas loucuras.

Ao pessoal do laboratório que me viu comemorar, sorrir, surtar e chorar, mas que sempre estiveram lá me apoiando. Obrigada Michel, Verônica, Paula, Santiago, Nadjania, Priscila, Mirella, Domingos, Tiago, Gabrieli, Milena, Gabriela, Brenno, Maiara, Luiz e Profa. Dra. Ana Torrecilhas.

Ao Prof. Dr. Sergio Schenkman, que me ensinou muito sobre fórmulas, lógica e vários assuntos diversos da biologia molecular que eu não fazia ideia do que eram até começar a utilizá-los, e por ter muita paciência comigo, principalmente quando algo dava errado no experimento ou quando eu não o consultava antes de jogar fora as amostras.

Ao Prof. Dr. Fábio, que também me auxiliou na escrita do TCC.

Ao Cláudio e à Claudeci por todo o apoio técnico.

Ao auxílio financeiro da FAPESP, Cnpq-Pibic, Capes e NIH, que tornaram esse trabalho possível de ser executado.

Muito obrigada por tudo.

RESUMO

A doença de Chagas (DC) constitui um problema de saúde pública e devido à emigração de pessoas infectadas para áreas não endêmicas, ela vem afetando uma parcela cada vez mais significativa da população mundial. Estima-se que cerca de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas e outras 75 milhões estejam em risco de se contaminarem. A doença é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, cuja síntese proteica difere de outros eucariotos por conta de diferenças significativas em seus ribossomos. Os antiparasitários disponíveis para o tratamento da DC muitas vezes causam efeitos colaterais, não sendo eficazes em grande parte dos casos. Após a infecção, os indivíduos podem apresentar uma sintomatologia geral que na maioria dos casos se resolve. Porém, em cerca de 30% dos pacientes, após vários anos na fase indeterminada da DC, se desenvolve uma fase sintomática, que leva a uma cardiomiopatia chagásica ou a síndromes inflamatórias do cólon ou esôfago. Diversos antimicrobianos hoje utilizados são dirigidos para bloquear a síntese de proteínas. Assim, com o intuito de se buscar alternativas terapêuticas para o tratamento da DC, nosso objetivo neste projeto foi estabelecer um ensaio utilizando um extrato celular de *T. cruzi* competente para traduzir um ácido ribonucleico (RNA) codificando uma enzima detectável pela emissão de luz. Neste trabalho obtivemos extratos competentes para a tradução e mostramos que podem ser usados para detectar inibidores da síntese proteica. Este ensaio permitirá encontrar novos inibidores da síntese proteica específicos para o *T. cruzi* que poderão ser utilizados no tratamento da DC.

Palavras-chave: doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, síntese proteica, inibidores.

ABSTRACT

Chagas disease (CD) is a public health issue and due to emigration of infected people to non-endemic, CD has been increasingly affecting the global population. It is estimated that over 6 to 7 million people worldwide are infected and about 75 million are at risk of contamination. The disease is caused by *Trypanosoma cruzi*, and its protein synthesis is distinct from other eukaryotic organisms because of significant differences in their ribosomes. The antiparasitic drugs available for CD treatment may cause many side effects and are ineffective in most cases. After infection, patients can present a general symptomatology that in most cases are self-resolved. However, about 30% of patients, after spending years in the indeterminate phase of Chagas disease, develop the symptomatic phase, leading to chagasic cardiomyopathy or inflammatory syndromes such as megacolon and megaesophagus. Blocking protein synthesis is the mechanism of many employed antimicrobials nowadays. Therefore, our main goal in this project was to establish a *T. cruzi* competent cellular extract assay that can translate a messenger RNA codifying the luciferase enzymes, which can be detected by light production in the presence of oxygen as purpose of finding new inhibitors to be used as therapeutic treatments for CD. In this work we obtained translation competent extracts that may be used to select compounds able to inhibit specifically *T. cruzi* protein synthesis. This assay may help finding new *T. cruzi* specific protein synthesis inhibitors that might be used in treatment of Chagas disease.

Keywords: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, protein synthesis, inhibitors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i> -----	13
Figura 2: Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> -----	15
Figura 3: Representação da transcrição e tradução -----	19
Figura 4: Processo de iniciação da tradução -----	20
Figura 5: Processo de tradução simplificado -----	21
Figura 6: Diferença da transcrição e tradução em procariotos e eucariotos -----	22
Figura 7: Diferentes mecanismos de <i>splicing</i> -----	23
Figura 8: RNAm maduro de <i>T. cruzi</i> -----	23
Figura 9: Inibidores de síntese proteica e seus respectivos locais de atuação -----	25
Figura 10: Mapas dos plasmídeos com enzimas de restrição -----	31
Figura 11: Géis de agarose 0,8% pBSK R-luc -----	33
Figura 12: Gel de agarose 0,8% pBSK F-luc T7 -----	33
Figura 13: Gel de agarose 0,8% pBSK F-luc SL -----	35
Figura 14: Gel de agarose 1% RNAm pBSK -----	37
Figura 15: Tradução <i>in vitro</i> utilizando extratos de <i>T. brucei</i> e <i>T. cruzi</i> H -----	42
Figura 16: Comparação da luminescência de Firefly Luciferase em tradução <i>in vitro</i> entre os extratos de <i>T. brucei</i> e <i>T. cruzi</i> H -----	43
Figura 17: Comparação da luminescência de Renilla Luciferase em tradução <i>in vitro</i> entre os extratos de <i>T. brucei</i> e <i>T. cruzi</i> H -----	44
Figura 18: Teste dos extratos de <i>T. brucei</i> e <i>T. cruzi</i> H com cicloheximida -----	45
Figura 19: Teste dos extratos de <i>T. brucei</i> e <i>T. cruzi</i> H com compostos inibidores de síntese proteica -----	46

Figura 20: Teste dos extratos de <i>T. brucei</i> e <i>T. cruzi</i> H com compostos utilizados para doença de Chagas e diferentes concentrações de hemina -----	47
Figura 21: Tradução <i>in vitro</i> utilizando extratos de <i>T. brucei</i> , <i>T. cruzi</i> H e <i>T. cruzi</i> DM28c WT -----	48
Figura 22: Comparação da luminescência de Firefly Luciferase em tradução <i>in vitro</i> entre os extratos de <i>T. brucei</i> , <i>T. cruzi</i> H e <i>T. cruzi</i> DM28c WT -----	49
Figura 23: Gráfico comparando quantidade de proteínas por sinal de luminescência - -----	51
Figura 24: Teste utilizando extratos de <i>Trypanosoma brucei</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i> H com RNAm contendo <i>Spliced Leader</i> -----	52

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados neste trabalho ----- 34

Tabelas II e III com resultados da quantificação de proteínas presentes nos extratos por meio da técnica de BCA ----- 50

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS - Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

Anti-SL – *Anti-Spliced Leader*

ATP – Adenosina Trifosfato

CCC – Cardiomiopatia Chagásica Crônica

CP – Fosfocreatina

DC – Doença de Chagas

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DTT – Ditioneitol

DTU – Unidade Discreta de Tipagem

EB – *Elution Buffer*

E. coli – *Escherichia coli*

ES – Segmentos de Expansão

F-luc – Firefly Luciferase

LB – Luria-Brentani

LIT – *Liver Infusion Tryptose*

Met – Metionina

NID – *Non-ionic detergents*

PEG – Polietilenoglicol

PCR – Reação de Polimerase em Cadeia

RLU – Unidade Relativa de Luz

R-luc – Renilla Luciferase

RNA – Ácido Ribonucleico

RNA_m – RNA mensageiro

RNA_r – RNA ribossômico

RNA_t – RNA transportador

SDM – *Schwarz Differential Medium*

SEB – *Sucrose Elution Buffer*

SFB – Soro Fetal Bovino

SL – *Spliced Leader*

TAE – Tris-acetato EDTA

TB – *Trypanosoma brucei*

T. brucei – *Trypanosoma brucei*

TCH – *Trypanosoma cruzi* H

T. cruzi – *Trypanosoma cruzi*

Trp – Triptofano

TC WT – *Trypanosoma cruzi* selvagem

UTR – Sequências não traduzidas

WT – Selvagem

Sumário

1. INTRODUÇÃO -----	12
2. JUSTIFICATIVA -----	26
3. OBJETIVOS -----	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS -----	28
5. RESULTADOS -----	40
6. DISCUSSÃO -----	53
7. CONCLUSÃO -----	55
8. REFERÊNCIAS -----	56

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas e *Trypanosoma cruzi*

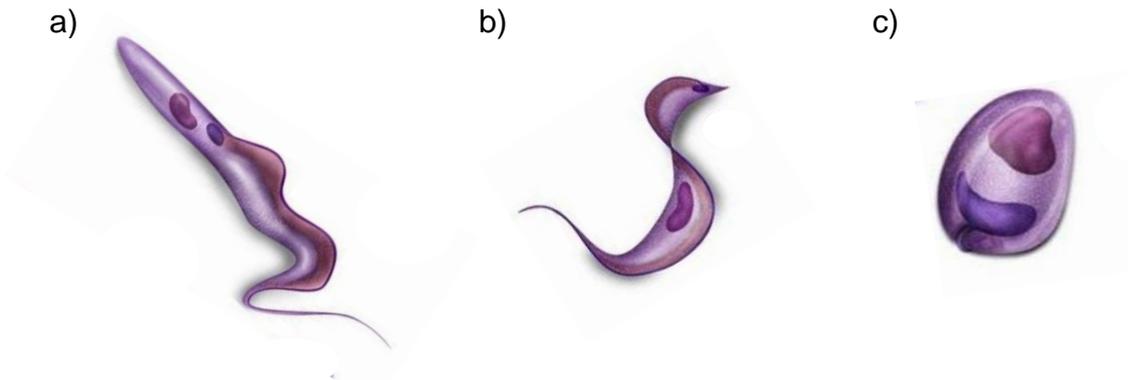
A doença de Chagas (DC), cujo agente etiológico é o *Trypanosoma cruzi*, constitui um problema de saúde pública com elevada carga de morbimortalidade (CARLOS PINTO DIAS et al., 2016). Até 1950 era considerada uma endemia rural dos países da América Latina, onde prevalecia a forma de transmissão vetorial (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). Devido à emigração de pessoas infectadas para áreas não endêmicas, como Estados Unidos, Europa, Japão, entre outros países asiáticos, e aos seus meios de transmissão (por transfusão sanguínea, oral, vertical e vetorial), a DC vem afetando uma parcela cada vez mais significativa da população mundial. Estima-se que cerca de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas e outras 75 milhões estejam em risco de se contaminarem (DNDi, 2021).

O *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* é um parasito monoflagelado que tem como vetor insetos triatomíneos hematófagos e como hospedeiros mamíferos, incluindo o homem (CIMERMAN, 2002). O *T. cruzi* pertence à ordem Kinetoplastida por apresentar o cinetoplasto (local onde está concentrado o DNA da sua única mitocôndria) (FERREIRA, 2015). Pelo menos três formas distintas do parasita são encontradas:

- a) Epimastigota: estágio proliferativo do parasito, encontrada no intestino do inseto vetor e que pode ser cultivada em laboratório. Tem forma alongada com flagelo se originando de uma bolsa flagelar na porção mediana do protozoário em direção a extremidade anterior do parasito e alinhada com o cinetoplasto e o núcleo, o primeiro em forma de disco e o segundo esférico (CIMERMAN, 2002; FERREIRA, 2015).
- b) Tripomastigota metacíclico/sanguíneo: estágio infectante e não proliferativo do parasito. Tem forma mais alongada que os epimastigotas com o flagelo também emergindo da bolsa flagelar, mas localizado na região posterior do parasita. O núcleo é alongado e o cinetoplasto assume uma forma esférica. São encontrados tanto nas porções distais do tubo digestivo do inseto, quanto na corrente sanguínea de hospedeiro mamífero (CIMERMAN, 2002; FERREIRA, 2015).
- c) Amastigota intracelular: estágio que prolifera no interior de células do hospedeiro mamífero. Tem forma ovalada ou esférica, pouca mobilidade e

um flagelo que se limita a bolsa flagelar (CIMERMAN, 2002; FERREIRA, 2015). Existe também o amastigota extracelular, que apesar de ter a morfologia parecida com a do amastigota intracelular, tem capacidade infectiva (DE SOUZA, 2002a).

Figura 1: Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*. a) Epimastigota; b) Tripomastigota; c) Amastigota.



Fonte: Bruno Eschenazi.

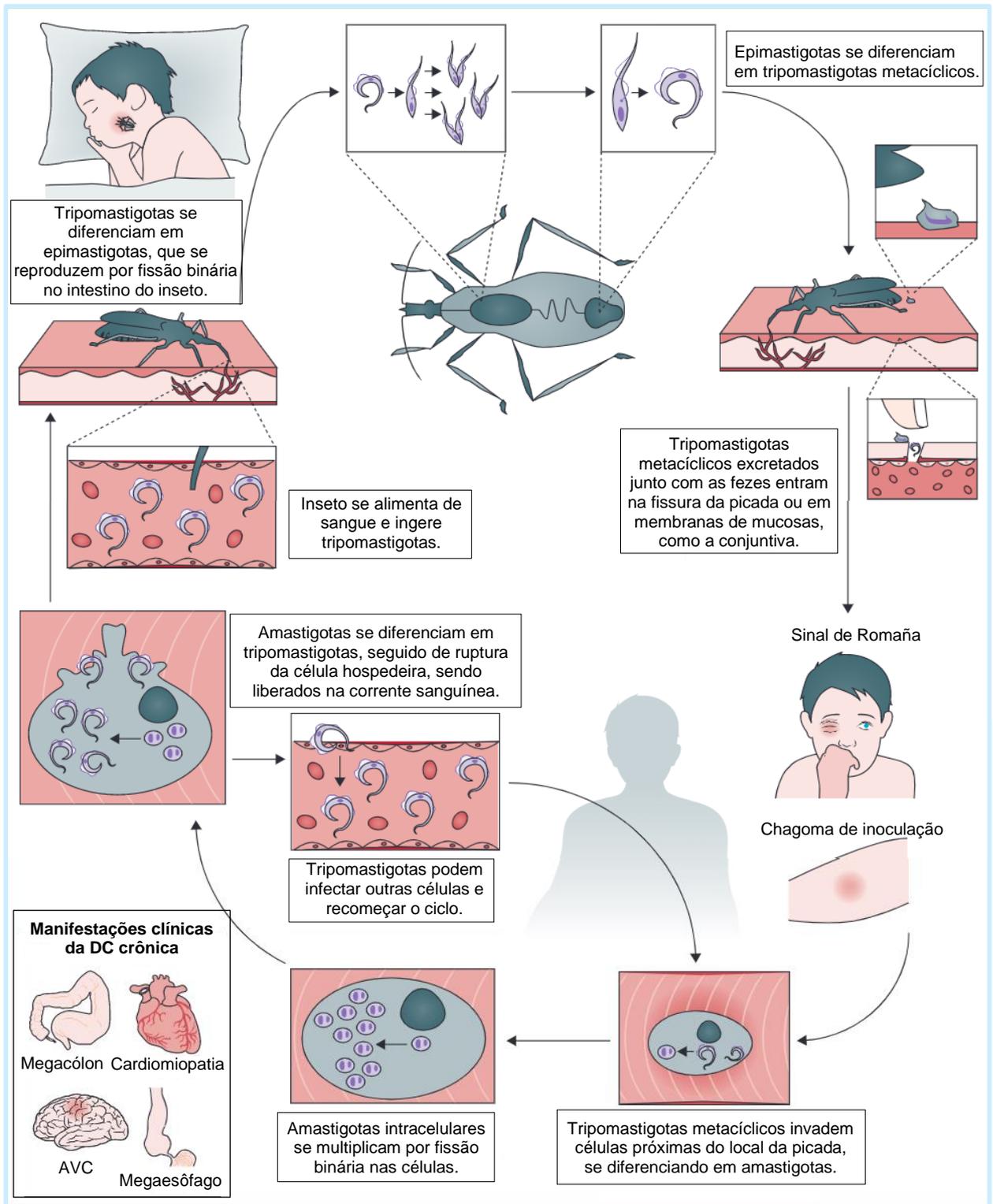
A transmissão vetorial era o modo mais comum de se contrair a doença. Durante a hematofagia, o inseto vetor deposita suas fezes contaminadas com o parasito próximo ao local de picada, promovendo coceira e permitindo que o parasito atinja a corrente sanguínea por meio de lesões próximas ou de mucosas, onde inicia seu ciclo infectivo (Figura 2) (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). Assim, a forma de tripomastigota metacíclico (forma infectiva), penetra em células e se diferencia em amastigota intracelular (ECHEVERRIA; MORILLO, 2019). O amastigota intracelular se multiplica por fissão binária no citosol das células infectadas até o momento em que ocorre sua transformação em tripomastigotas, seguido de lise da célula hospedeira e liberação de parasitos nas vias linfáticas e circulatórias, possibilitando recomeçar o ciclo em outras células e tecidos (DE SOUZA, 2002a; CALDERANO, 2008). Amastigotas extracelulares se formam quando ocorre a lise prematura da célula ou pela própria diferenciação extracelular dos tripomastigotas sanguíneos (LIMA et al., 2010).

A presença de parasitas no sangue ou de células circulantes também propicia a transmissão principalmente quando ocorre transfusão sanguínea (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). Com isto, a partir dos anos 1970 se implantou, nos países onde a doença é detectada, métodos de seleção de doadores que tenham adquirido a

doença. No entanto, países de fora da América Latina ou não adotam esta seleção de doadores, ou só adotaram recentemente permitindo uma grande expansão da doença no mundo (CHAO et al., 2020).

A partir dos anos 2000, com a implantação de ações de controle do inseto vetor e dos bancos de sangue, a transmissão vetorial vem diminuindo, restando ainda aquela decorrente da ingestão de alimentos contaminados com as fezes do inseto vetor contendo o parasito ou o próprio inseto contaminado macerado (CARLOS PINTO DIAS et al., 2016; DIAS, 2006). Mesmo assim, nas zonas rurais do norte da Argentina, Bolívia, Colômbia, Venezuela e América Central a transmissão vetorial ainda ocorre, devido à dificuldade de se eliminar os insetos transmissores (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

Figura 2: Ciclo de vida do Trypanosoma cruzi.



Fonte: Adaptado de Pérez-Molina, Molina, 2018.

Na maioria dos casos, apesar de não se eliminar o parasita, tratamentos de suporte associado a melhores condições de vida, e em alguns casos cirurgias de remoção de partes do intestino e esôfago, ou transplante cardíaco, têm sido utilizados (CARLOS PINTO DIAS et al., 2016). Porém, ainda há uma alta taxa de mortalidade da DC relacionada com a subnotificação dos casos agudos da doença (aproximadamente 10% das pessoas infectadas são diagnosticadas), e ao atraso ao iniciar o tratamento (menos de 1% dos infectados são tratados), que na maioria dos casos é ineficiente, o que favorece a passagem da doença da fase aguda para a fase crônica indeterminada e posterior fase sintomática (MARTÍN-ESCOLANO et al, 2020).

A fase aguda é caracterizada por alta parasitemia, possibilitando visualizar o parasito em exames de sangue a fresco (gota espessa) (COURA, 2007; CARLOS PINTO DIAS et al., 2016). Nessa fase inicial, há uma intensa resposta imune do organismo: tanto células do sistema fagocítico mononuclear quanto linfócitos fazem parte do processo de contenção do parasito (DE SOUZA; BARRIAS, 2017). Todas as células nucleadas dos mamíferos podem ser infectadas pelos tripomastigotas sanguíneos e amastigotas extracelulares, mas geralmente o parasito se instala em células cardíacas, musculatura lisa e esquelética, células endoteliais e células do tecido nervoso e adiposo (MACHADO et al., 2012). A infecção inicial gera uma sintomatologia que, quando presente, é facilmente confundida com outras enfermidades, por conta da febre, do mal-estar e da cefaleia, sendo na maior parte das vezes auto resolutiva (DIAS, 2006; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). Se a infecção for via vetorial, é possível notar em 75% dos casos a presença do chagoma de inoculação (conhecido como sinal de Romaña se ele for na conjuntiva ocular), mas nos outros 25% não há sinal de porta de entrada da infecção, o que prejudica o diagnóstico. Se a infecção for via oral, a penetração do parasita nas mucosas oral, esofagiana, gástrica e intestinal ocorre, levando à sinais e sintomas mais intensos, incluindo palidez, ulcerações na mucosa digestiva, edemas de face e membros inferiores, processos degenerativos, focos de necrose e sangramento (CARLOS PINTO DIAS et al., 2016; DIAS, 2006).

Aproximadamente 30% dos pacientes na fase crônica indeterminada evoluem para a fase crônica sintomática, onde a cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) é a forma mais prevalente da doença (90% dos pacientes sintomáticos), com características inflamatórias intensas, fibrose, arritmias ventriculares e distúrbios na

condução do estímulo elétrico do coração, além de elevada incidência de morte súbita (CARLOS PINTO DIAS et al., 2016; GUARNER, 2019). Outros 10% dos pacientes crônicos podem desenvolver complicações no trato digestivo (megacólon e megaesôfago), neurológico (meningoencefalite e acidente vascular cerebral) ou uma mistura delas (DUTRA et al., 2009; WHO, 2021).

Por muito tempo se questionou se a causa da cronicidade da doença de Chagas era devido a presença do parasito nos tecidos, pois as manifestações clínicas eram observadas décadas após os episódios de infecção e não se encontravam parasitos circulantes no sangue dos doentes, chegando-se a uma hipótese de que a provável causa do processo patológico era o próprio sistema imune, por conta da presença do *T. cruzi* no hospedeiro (GIRONÈS; FRESNO, 2003; DUTRA et al., 2009). Isto levou a muitos questionarem o uso de tratamentos antiparasitários nos doentes crônicos e à falta de investimento no desenvolvimento de quimioterápicos para o *T. cruzi*. Somente dois compostos se mostraram efetivos em eliminar os parasitas em cultura: o benzonidazol e o nifurtimox, que foram desenvolvidos há mais de 50 anos atrás e ainda são utilizados no tratamento (MOLINA et al., 2014). Seus efeitos tripanocidas ocorrem pela geração de radicais nitroaniônicos, que levam a lesões celulares devido a peroxidação de lipídeos e lesões na membrana, inativação enzimática e lesão do DNA (DE CASTRO, SOEIRO, 2017; MARTÍN-ESCOLANO et al., 2020). Entretanto, eles são bastante tóxicos, sendo pouco efetivos e com tratamento de longa duração, além de existirem linhagens parcialmente ou totalmente resistentes às drogas: “em um estudo feito com 179 pacientes tratados com benzonidazol em fase aguda da DC por transmissão oral, ocorreu cura sorológica em 26,3%, mais evidente durante o quarto ano após o tratamento” (CARLOS PINTO DIAS et al., 2016).

Com advento de técnicas mais sensíveis de detecção, como a reação de polimerase em cadeia (PCR), se comprovou a presença dos parasitas nos tecidos (CHAO et al., 2020). Além disso, se verificou a presença do parasita em pacientes que apresentaram queda de imunidade, por exemplo na síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS), que podem apresentar manifestações clínicas tais como febre, miocardite, meningoencefalite, acidente vascular cerebral, anorexia, mialgia e mal-estar (CARLOS PINTO DIAS et al., 2016). Ao completar 100 anos da doença de Chagas e com a percepção de que a sua transmissão também ocorria pela transfusão de sangue, resultando na infecção de indivíduos fora das áreas endêmicas, se

percebeu a necessidade de desenvolver novas terapias (DEGRAVE, 2017). Diversos grupos começaram então a buscar medicamentos alternativos.

Hoje se conhece bastante sobre o parasita, com intuito de se encontrar novos métodos diagnósticos, alvos terapêuticos e como prevenir a evolução da doença nos indivíduos infectados. Uma das questões principais foi reconhecer que o *T. cruzi* apresenta grande diversidade genética (DEGRAVE, 2017). Foram estabelecidos seis grupos (*T. cruzi* I - VI) de DTUs (unidades discretas de tipagem). Essa classificação considera isolados geneticamente similares com marcadores moleculares e imunológicos em comum (SANTANA, 2013). Além disso, é cada vez maior a percepção de que os parasitas se modificam à medida que infectam os diferentes hospedeiros, causando assim a possibilidade de não serem sensíveis às possíveis drogas existentes (MARTÍN-ESCOLANO et al., 2020).

Seu metabolismo é peculiar quando comparado ao de outros organismos aeróbios. Por exemplo, o *T. cruzi* não apresenta vias para síntese do grupo heme. O heme, composto por uma protoporfirina contendo um átomo de ferro, é um cofator importante para processos envolvendo transporte de oxigênio, síntese de ATP na cadeia respiratório, reações metabólicas de óxido-redução, afetando o crescimento e diferenciação celular (NOGUEIRA et al., 2017; PAGURA et al., 2020). O heme é incorporado nos parasitas e recentemente foi descrito a presença de um transportador específico para ele, chamado *TcHTE*, essencial para o crescimento do TC (PAGURA et al., 2020). Outro exemplo importante está relacionado a diferenças na estrutura dos ribossomos dos tripanossomatídeos, responsáveis pela síntese proteica. Estes apresentam peculiaridades entre os de células de mamífero, o que os tornam alvos interessantes para o desenvolvimento de inibidores que sejam altamente específicos para os parasitos (CLAYTON, 2019).

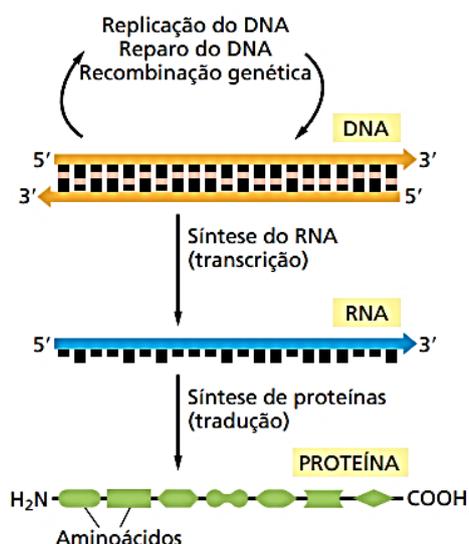
1.2 Síntese proteica

A síntese proteica é o processo de tradução do RNA mensageiro (RNAm) em proteína, cuja sequência é determinada pelo DNA (Figura 3). Ela ocorre nos ribossomos, tendo como substratos o RNAm que codifica a adição sequencial de aminoácidos da proteína e os RNAs transportadores (RNAt) que trazem os aminoácidos para serem incorporados na cadeia peptídica em crescimento. A sequência de bases do RNAm determina quais aminoácidos farão parte da proteína final e essa sequência de nucleotídeos é lida pelo pareamento de três bases

consecutivas, denominadas como códon. Os códon são reconhecidos por cada RNAt através de uma sequência também de 3 bases, o anticódon. Cada RNAt carrega um determinado aminoácido que então será disponibilizado para a formação da cadeia polipeptídica (ALBERTS, 2017).

A tradução ocorre em três etapas: iniciação, onde o ribossomo, juntamente com o RNAt iniciador, geralmente carregando uma metionina, e o RNAm formam o complexo de iniciação – é a etapa onde ocorre a adição e união do primeiro aminoácido; alongamento, que consiste em alongar a cadeia inicial de aminoácidos; e término, onde o ribossomo e o RNAm se desassociam, liberando a proteína recém produzida (ALBERTS, 2017).

Figura 3: Representação da transcrição e tradução. O DNA é transcrito em RNA, seguido de tradução do RNA em aminoácidos, formando a proteína.

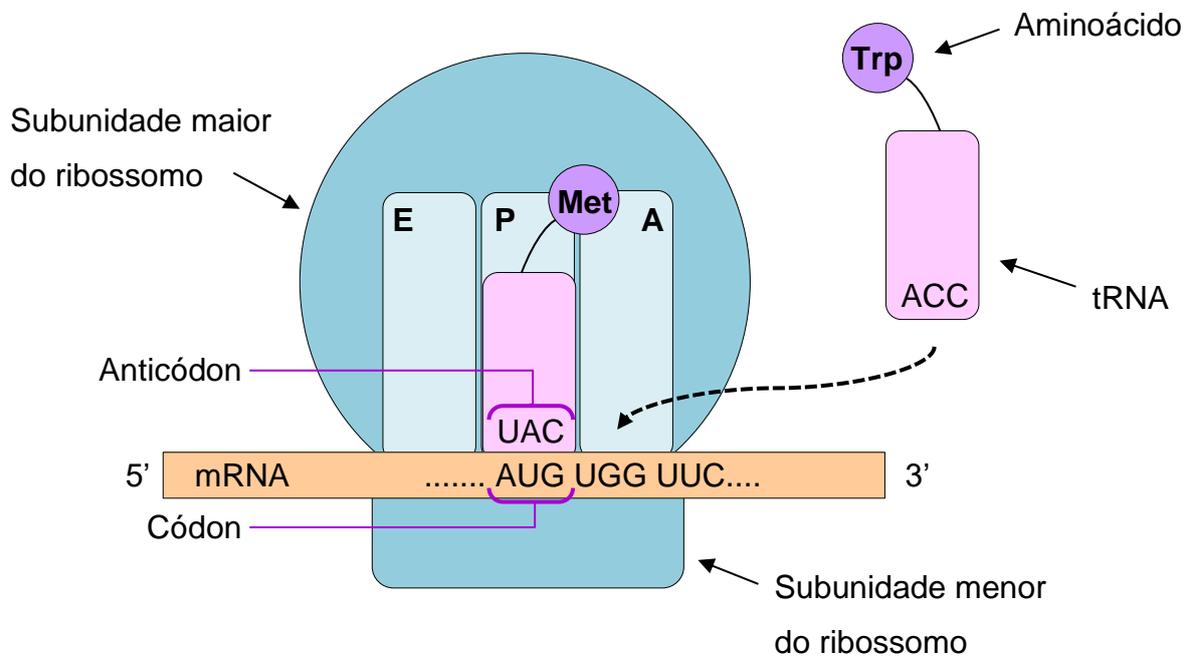


Fonte: Alberts – Biologia Molecular da Célula – 6ª edição, 2017; capítulo 6 “Como as células leem o genoma: do DNA à proteína”, figura 6-1.

Na primeira etapa, para que ocorra a união do primeiro aminoácido com o segundo, é preciso que o aminoacil-tRNA (RNAt ligado ao aminoácido específico) carregando a metionina entre no sítio P (sítio de ligação do peptidil-tRNA) do ribossomo, pareando o anticódon com o códon de iniciação; permitindo que o próximo aminoacil-tRNA entre no sítio A (sítio de ligação do aminoacil-tRNA, ou seja, sítio aonde chegam os RNAt seguintes). Esta aproximação permite que ocorra a formação da ligação peptídica entre os dois aminoácidos catalisada pela peptidil transferase

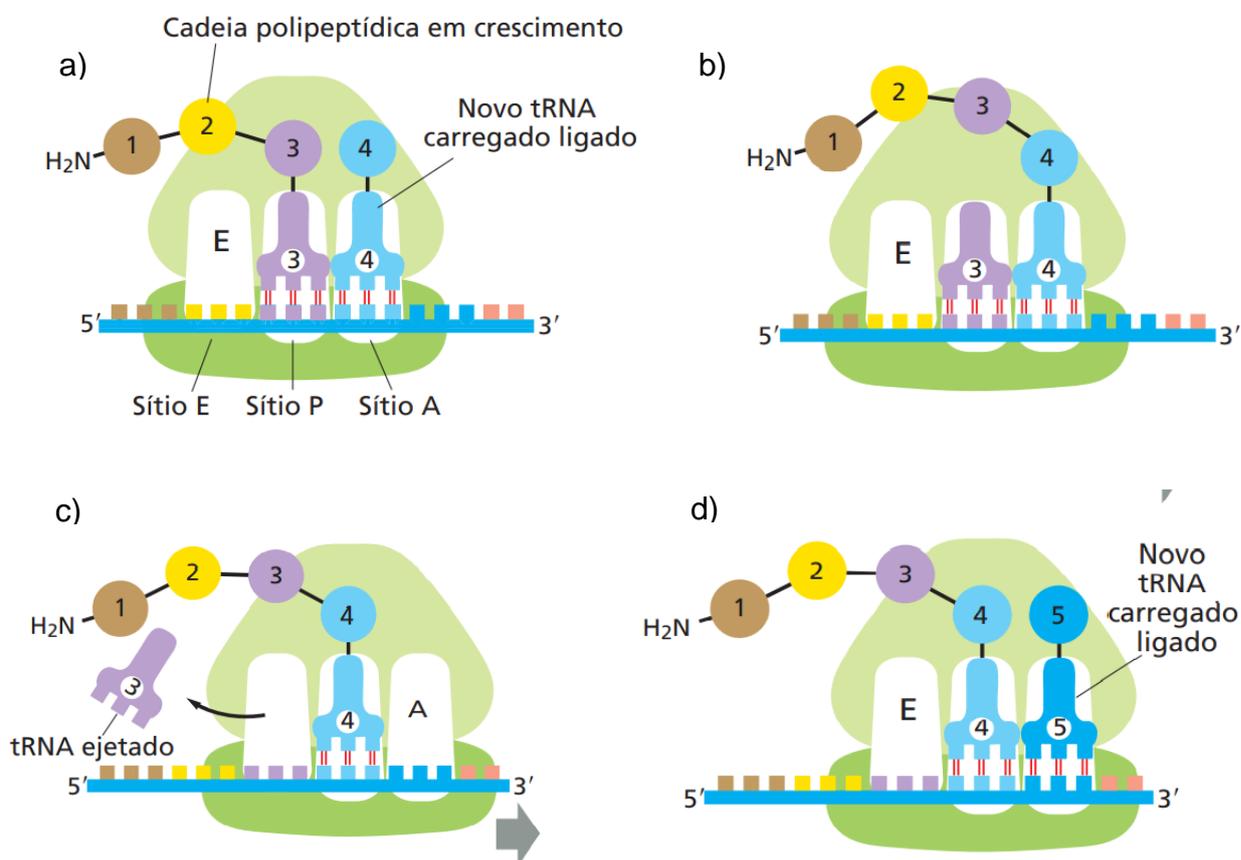
(Figura 4) (ARYAL, 2018). Esta é uma reação em que o aminoácido ligado covalentemente ao RNAt no sítio A passa a se ligar ao grupo carbonila do aminoácido ligado ao RNAt do sítio P. Depois que ocorre a ligação, o RNAt sem o aminoácido é translocado para o sítio E (sítio de saída), fazendo com que o RNAt que estava no sítio A passe para o P, deixando o sítio A livre para a entrada do próximo RNAt (Figura 5). Isso ocorre até que o códon de finalização seja lido na fita de RNAm (ALBERTS, 2017).

Figura 4: Processo de iniciação da tradução. Aminoacil-tRNA carregando a metionina entra no sítio P do ribossomo, seu anticódon pareando com o códon da sequência do RNAm, permitindo que o próximo aminoacil-tRNA entre no sítio A.



Fonte: Adaptado de: <https://www.coladaweb.com/biologia/genetica/duplicacao-do-dna-transcricao-e-traducao>.

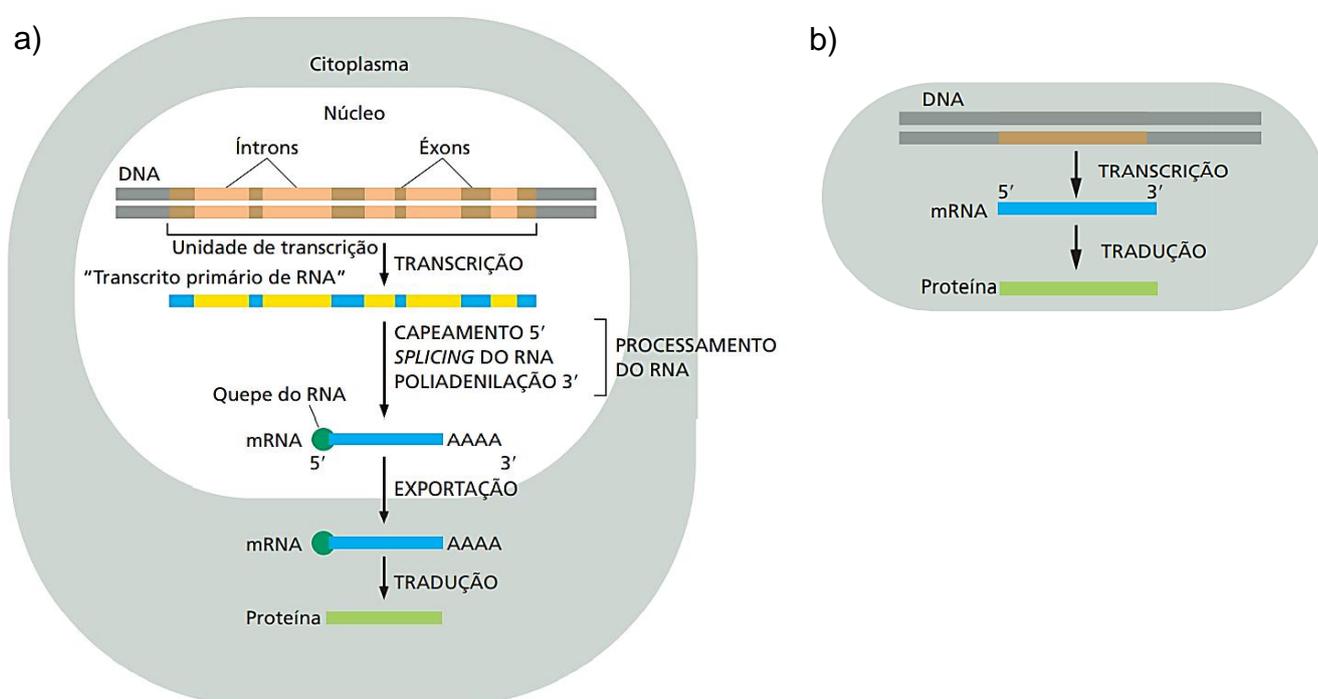
Figura 5: Processo de tradução simplificado. a) O aminoacil-tRNA liga ao sítio A que estava vazio; b) Ocorre a ligação peptídica entre os aminoácidos dos RNAt que estavam em P e A; c) O RNAt que estava no sítio P é ejetado e o RNAt que estava em A agora está em P; d) Um novo aminoacil-tRNA trazendo o próximo aminoácido pode entrar no sítio A.



Fonte: Adaptado de Alberts – Biologia Molecular da Célula – 6ª edição, 2017; capítulo 6 “Como as células leem o genoma: do DNA à proteína”, figura 6-64.

A tradução é feita diretamente após a transcrição em procariontes que não sofrem modificações em seu RNAm, ou seja, o código precisa estar na sequência exata para a proteína ser sintetizada (Figura 6). Já em eucariotes, existem modificações pós-transcricionais do RNAm, entre elas o *splicing*, que consiste em retirar íntrons (sequências de RNAm não codificadoras), e se necessário mudar éxons (sequência codificante) de local. Também é adicionado uma sequência na extremidade 5' do RNA denominada de *cap* (quepe), que consiste em uma guanina modificada; e uma cauda de 100-200 adeninas na extremidade 3', chamada de cauda de poli-A. Essas modificações são importantes para determinar o início da tradução, e regular a estabilidade dos RNAm (ALBERTS, 2017).

Figura 6: Diferença da transcrição e tradução em procariotos e eucariotos. a) Eucariotos: nas células eucarióticas, o RNAm produzido na transcrição contém sequências codificadoras (éxons) e não codificadoras (íntrons), sendo necessário editar o RNAm antes de traduzi-lo em proteína. Essa edição consiste em adicionar um *cap* (ou quepe) na extremidade 5' do RNAm e uma cauda de poli-A na extremidade 3', além de remoção dos íntrons. Somente depois desses três processos o RNAm maduro é transportado do núcleo para o citosol e pode ser traduzido. b) Nos procariotos, o RNAm transcrito já está pronto para ser traduzido em proteínas. A transcrição e a tradução nos procariotos ocorrem no mesmo compartimento, já que estes não têm núcleo, o que permite que o processo seja feito quase em conjunto.



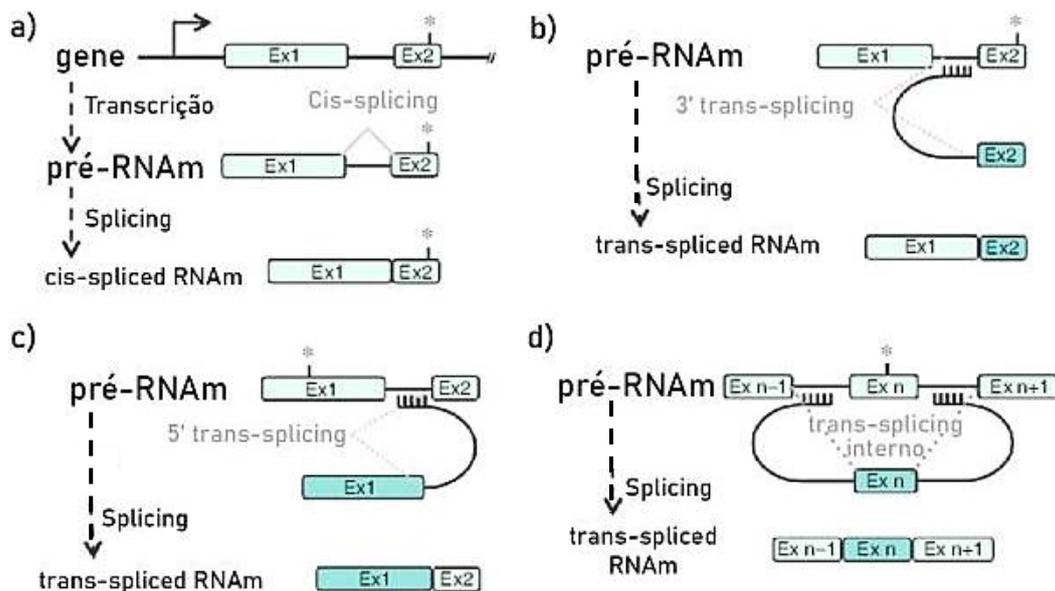
Fonte: Adaptado de Alberts – Biologia Molecular da Célula – 6ª edição, 2017; capítulo 6 “Como as células leem o genoma: do DNA à proteína”, figura 6-20.

O *T. cruzi* assim como outros protozoários da família Trypanosomatidae, diferentes de outros eucariotos, sofrem um *splicing* chamado de *trans-splicing* (Figura 7). Isso ocorre porque o RNAm transcrito é policistrônico (contém sequências codificadoras para mais de uma proteína) (CLAYTON, 2019). Para que a maquinaria do protozoário reconheça e traduza esse RNAm, é necessário que ele seja processado em RNAm monocistrônico, cada um contendo uma mensagem com *cap* e cauda poli-A (CAMPBELL; THOMAS; STURM, 2003).

O *trans-splicing* consiste em unir duas sequências a partir de duas moléculas precursoras de RNA. Na extremidade 5' do pré-RNAm, é adicionada uma sequência

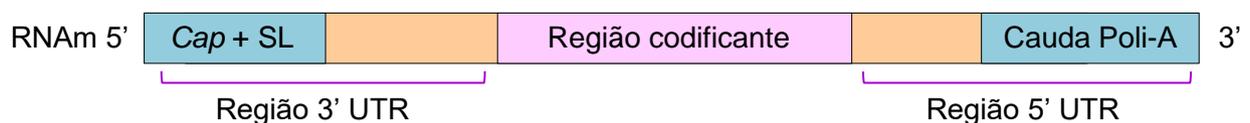
denominada de *Spliced Leader*, que é um éxon não codificante com 39 nucleotídeos e contendo o *cap*; e na extremidade 3' é feita a poliadenilação (CLAYTON; SHAPIRA, 2007). Isto faz com que do RNAm também tenha sequências não traduzidas (UTR), e que determinam a estabilidade do RNAm. Depois de todas essas modificações, o RNAm maduro pode ser traduzido normalmente (Figura 8).

Figura 7: Diferentes mecanismos de *splicing*. a) Mecanismo clássico de *splicing* (*cis-splicing*): remoção de sequências de íntrons; b) Mecanismo de 3' *trans-splicing*: junção de dois éxons de diferentes RNAm, com adição do éxon na região 3' do RNA; c) Mecanismo de 5' *trans-splicing*: junção de dois éxons de diferentes RNAm, com adição do éxon na região 5' do RNA; d) Mecanismo de *trans-splicing* interno: junção de um ou mais éxons no meio da sequência original do RNAm.



Fonte: Adaptado de Berber et al., 2016. Editado por Carolina Mantovani.

Figura 8: RNAm maduro de *T. cruzi*.



1.3 Inibidores de síntese proteica

A inibição de síntese proteica em procariotos (bactérias) ocorre por meio de modificações e interações de compostos com o seu ribossomo 70S, que é composto por duas subunidades: 30S e 50S. A subunidade 30S contém uma molécula de RNA ribossômico (RNAr) com 16S, enquanto a subunidade 50S contém duas moléculas de RNAr: 23S e 5S (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012). Muitos antibióticos atuam inibindo a síntese de proteínas nos ribossomos procarióticos. Os aminoglicosídeos por exemplo, como a gentamicina e a estreptomicina, se fixam à subunidade 30S, interferindo na função de decodificação dessa subunidade, comprometendo a síntese proteica. As tetraciclínas se ligam à essa mesma subunidade de forma irreversível. O cloranfenicol e a eritromicina (macrolídeo), por outro lado, se fixam à subunidade 50S, tendo também efeito inibitório (OVÇAR et al., 2017).

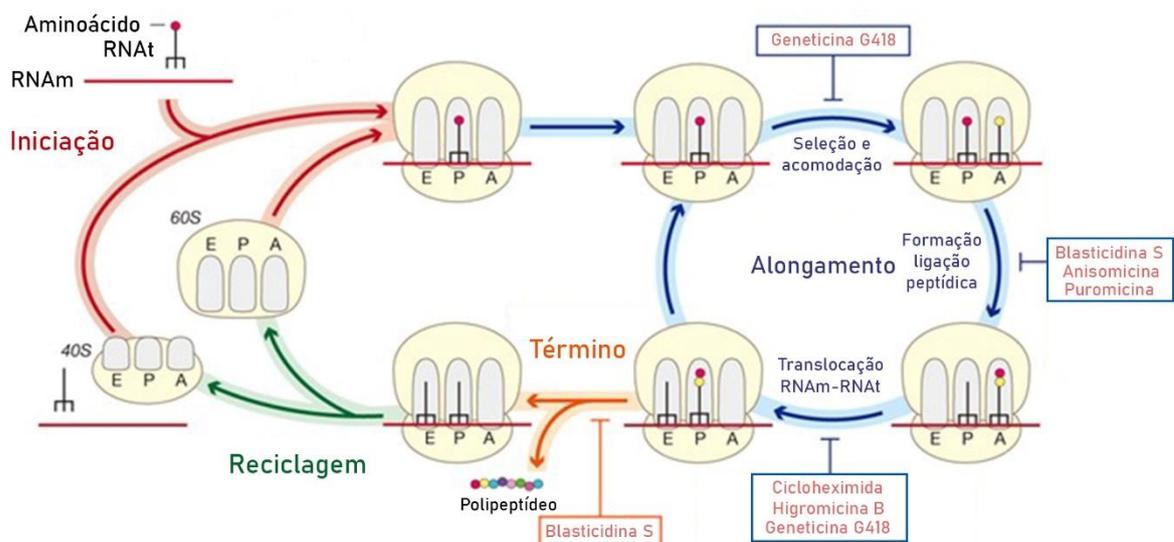
As subunidades ribossomais dos eucariotos são diferentes e, portanto, estes inibidores não atuam da mesma forma que em procariotos. O ribossomo eucarionte é composto por uma subunidade maior 60S, contendo três moléculas de RNAr (5S; 28S e 5,8S) e uma subunidade menor 40S contendo uma molécula de RNAr 18S (ALBERTS, 2017). No entanto, os ribossomos dos tripanossomatídeos, apesar de terem a estrutura geral dos eucariotos, são compostos por RNAs ribossomais fragmentados (GAO et al., 2005). A subunidade maior, análoga à subunidade 28S de outros eucariotos, é formada por um conjunto de oito pedaços de RNAr, sendo seis desses pedaços resultantes de cortes específicos de um mesmo RNAr precursor; além de ter grandes segmentos de expansão (ES), inserções de RNA que ainda não têm função conhecida, e variações nas proteínas-r (LIU et al., 2016). A subunidade menor apresenta dois segmentos de expansão na subunidade 18S, que formam uma ponte com a subunidade maior (GAO et al., 2005).

Os compostos inibidores da síntese proteica em eucariotos podem agir em diferentes locais, como por exemplo, no sítio da peptidil transferase (enzima catalisadora da ligação peptídica), no sítio E, no centro de ativação de enzimas presentes na subunidade 60S do ribossomo, no centro de codificação da subunidade 40S, além de interagirem com as proteínas que compõem os fatores de tradução (DMITRIEV et al., 2020). Alguns estão listados a seguir e sua atuação está ilustrada na Figura 9:

1. Edeína: inibe a formação do complexo de iniciação (POLIKANOV et al., 2018).

2. Geneticina G418: se liga ao sítio A da subunidade 16S do RNAr, impedindo que outro aminoacil-tRNA se coloque no sítio e continue a síntese proteica (VICENS; WESTHOF, 2003).
3. Anisomicina: impede a formação da ligação peptídica por meio de interação com a peptidil transferase (GARREAU DE LOUBRESSE et al., 2014).
4. Cicloheximida: se liga ao sítio E da subunidade ribossomal 60S (GARREAU DE LOUBRESSE et al., 2014).
5. Higromicina B: se liga a subunidade menor do ribossomo que leva a uma mudança conformacional que impede a movimentação dos RNAm e RNAt do sítio A para o sítio P, impedindo a continuação da tradução (DMITRIEV et al., 2020).
6. Blastidina S: além de deixar a ligação entre o RNAt e o sítio P mais forte, fazendo com que a entrada e saída de novos aminoacil-tRNA ocorra mais lentamente, a blastidina também interfere no alongamento da cadeia polipeptídica e no término da tradução (SVIDRITSKIY et al., 2013).
7. Puomicina: se insere no sítio A e causa uma terminação prematura da síntese proteica (DMITRIEV et al., 2020).
8. Pactamicina: interage com o sítio E da subunidade menor (GARREAU DE LOUBRESSE et al., 2014; DMITRIEV et al., 2020).

Figura 9: Inibidores de síntese proteica e seus respectivos locais de atuação.



Fonte: Adaptado de Garreau de Loubresse et al., 2014. Editado por Carolina Mantovani.

2. JUSTIFICATIVA

A inibição da síntese proteica é, portanto, uma forma bastante eficiente de impedir o crescimento e viabilidade de diversos organismos. Devido ao fato dos tripanossomatídeos apresentarem um processamento diferente de seus RNAm, o controle da expressão em seus genes é feito principalmente após a transcrição, possivelmente durante a tradução. De fato, tem se verificado que estes parasitas apresentam mais fatores envolvidos na tradução que muitos eucariotos e contém diferenças significativas na estrutura dos ribossomos (GAO et al., 2005; LIU et al., 2016). Desta forma, podem existir moléculas que inibam especificamente a tradução nestes organismos. Por isso, neste trabalho procuramos desenvolver um método para detectar *in vitro* possíveis compostos que inibam a síntese proteica de *T. cruzi*.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral:

Realizar ensaios com extrato de epimastigotas de *T. cruzi* para identificação de inibidores de síntese proteica específicos para esse parasita.

3.2. Específicos:

- Síntese *in vitro* de RNA mensageiro contendo repórter de síntese proteica (*Firefly* Luciferase ou *Renilla* Luciferase) específico para a tradução *in vitro* em *Trypanosoma*.
- Testes de tradução *in vitro* com extratos de *T. cruzi*.
- Ensaaios com inibidores que atuam em diversas etapas da síntese proteica em eucariotos: Cicloheximida; Anisomicina; Geneticina; Blastidina; Higromicina; Puromicina.
- Avaliar se os compostos utilizados para tratamento da doença de Chagas (Benzonidazol e Nifurtimox) afetam a tradução nos extratos de *T. cruzi*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Parasitas

Para testes iniciais, foi utilizada a forma procíclica de *Trypanosoma brucei* 427, cuja tradução *in vitro* já havia sido descrita (MORENO; IP; CROSS, 1991). Os parasitas foram cultivados em meio SDM-79 (*Schwarz Differential Medium*) a 28°C. O meio foi preparado utilizando-se 24,48 g/L SDM-79 (Gibco, ME090164 P1, EUA); 7,5 µg/mL hemina (Sigma-Aldrich, Alemanha); 59 µg/mL penicilina (Sigma-Aldrich); 133 µg/mL estreptomicina (Sigma-Aldrich) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco) de acordo com (SCHONENBERGER; BRUN, 1979).

A forma epimastigota do *T. cruzi* foi mantida a 28°C em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) contendo NaCl 75 mM; KCl 5,4 mM; Na₂HPO₄ 62 mM; glicose 0,2%; triptose 0,5% (Sigma-Aldrich); infusão de fígado 0,5% (BD, Brasil); hemina 10 µg/mL; 10% SFB (Gibco); 59 mg/mL penicilina; 133 µg/mL estreptomicina, ajustado para pH=7,2 (CAMARGO, 1964). Todos os componentes, exceto a glicose, SFB, hemina e os antibióticos; foram pesados, diluídos e esterilizados por 20 minutos em autoclave. Os demais componentes foram preparados na forma concentrada e esterilizados por filtração, sendo adicionados antes do uso. Foram utilizados parasitas da cepa DM28c selvagem (denominada WT) e da mesma cepa contendo os genes da T7 RNA polimerase e da proteína Cas9 de *Streptococcus pyogenes* inseridos no vetor pTREX, sendo menos infectivos, por não se converterem em tripomastigotas (artigo sendo redigido). Estes últimos, denominados TCH foram selecionados na presença de 100 µg/mL de higromicina e mantidos na presença de 250 µg/mL de higromicina (Invitrogen, EUA) e 250 µg/mL de geneticina G418 (Invivogen, EUA).

4.2. Extratos de parasitas

O extrato de proteínas para a expressão *in vitro* foi feito baseado no protocolo descrito por Kovtun e colaboradores que utilizaram o protocolo para *Leishmania tarentolae* (KOVTUN et al., 2011). As culturas de *T. cruzi* e *T. brucei* na fase log de crescimento foram centrifugados a 2.500 x g por 10 minutos a 4°C e, em seguida lavados em tampão SEB (*Sucrose Elution Buffer* – 45 mM HEPES-KOH pH=7,6 (Sigma-Aldrich); 250 mM sacarose (Sigma-Aldrich); 100 mM acetato de potássio (KOAc) (Sigma-Aldrich); 3 mM acetato de magnésio (Mg(OAc)₂) (Sigma-Aldrich)) a

4°C. Os parasitos foram ressuspensos para uma concentração de 1×10^{10} parasitas/mL, também em tampão SEB.

A suspensão de parasitas foi lisada por cavitação de nitrogênio, colocando a solução contendo os parasitos sob pressão de 70 bar de nitrogênio durante 120 minutos a 4°C. O lisado foi centrifugado a $10.000 \times g$ a 4°C por 20 minutos e recuperado $\frac{2}{3}$ do sobrenadante, que foi centrifugado a $30.000 \times g$ a 4°C por mais 20 minutos. Cada 3 mL do sobrenadante foi aplicado em uma coluna de 1 x 5 cm de Sephadex G-25 (Sigma-Aldrich) pré-equilibrada em tampão EB (*Elution Buffer* – 45 mM HEPES-KOH pH=7,6 (Sigma-Aldrich); 100 mM acetato de potássio (KOAc) (Sigma-Aldrich); 3 mM acetato de magnésio ($Mg(OAc)_2$) (Sigma-Aldrich)) para remoção da sacarose.

Os primeiros 3 mL foram descartados e o extrato recolhido após serem aplicados 4 mL de tampão EB. Aos extratos adicionou-se 20 μM do oligonucleotídeo de DNA anti-*Spliced Leader* (Anti-SL) para impedir que houvesse competição entre os transcritos endógenos e os RNAs que codificam para as sequências repórteres. O extrato foi aliquotado em pequenas quantidades (500 μL), congelado em gelo seco/etanol e depois armazenado a -70°C.

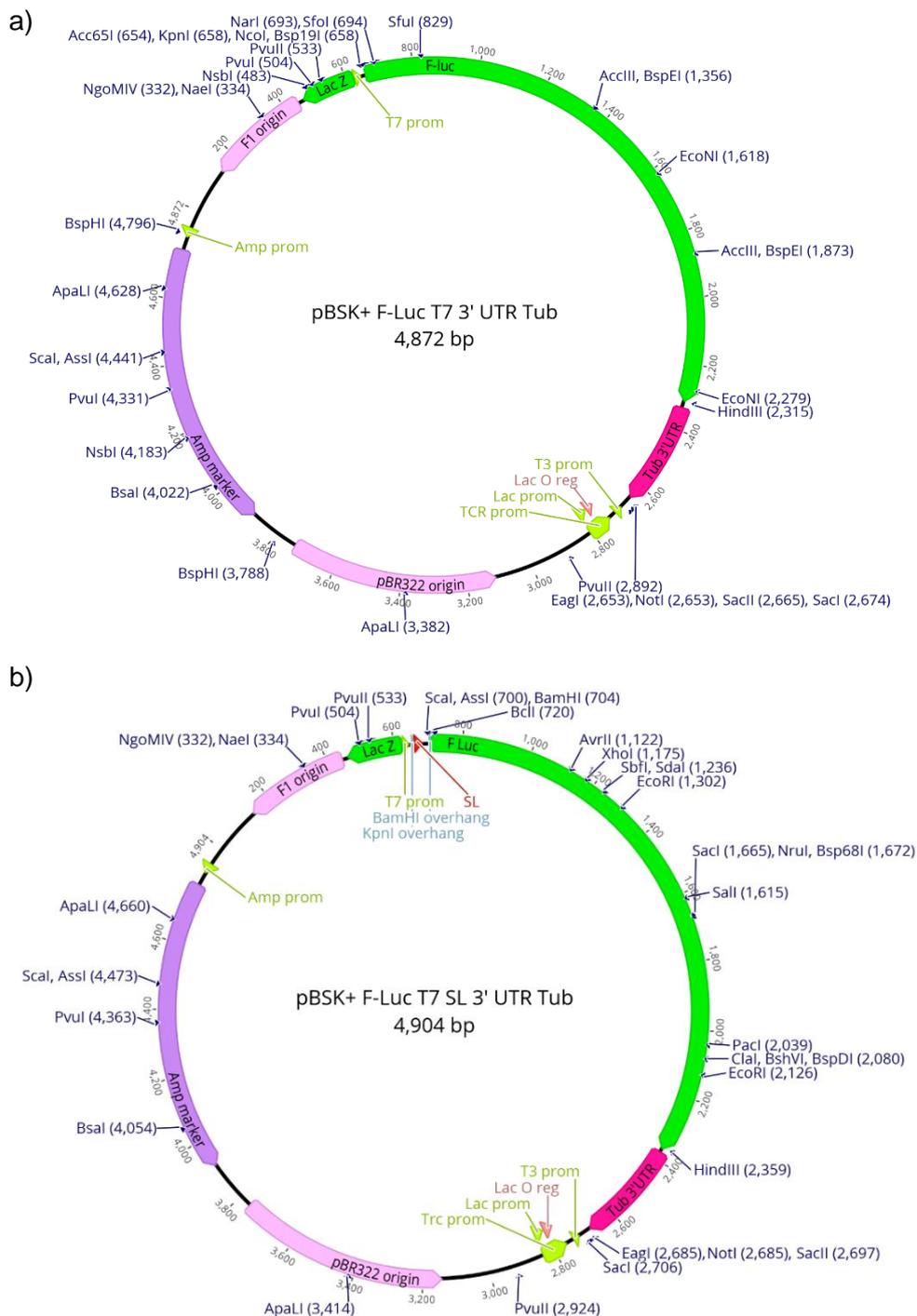
4.3. Construções para síntese de RNA mensageiro *in vitro*

Para a transcrição, foram utilizados os plasmídeos previamente preparados no laboratório do Prof. Bertal Husseyn Aktas (Brigham Womens Hospital, Boston, EUA, colaborador do projeto). Foi inserida uma sequência sintética de DNA contendo a sequência promotora T7 antes do *Spliced Leader* que é uma sequência presente na extremidade 5' não traduzida (5'UTR) de todos os RNAm de tripanossomatídeos. Para isto eles utilizaram o sítio da enzima *KpnI* dos plasmídeos pBSK (Stratagene, EUA), seguido da sequência contendo o gene para Renilla Luciferase (R-luc) ou Firefly Luciferase (F-luc), flanqueado com a porção 3'UTR do gene de tubulina do próprio *T. cruzi* (Figura 10).

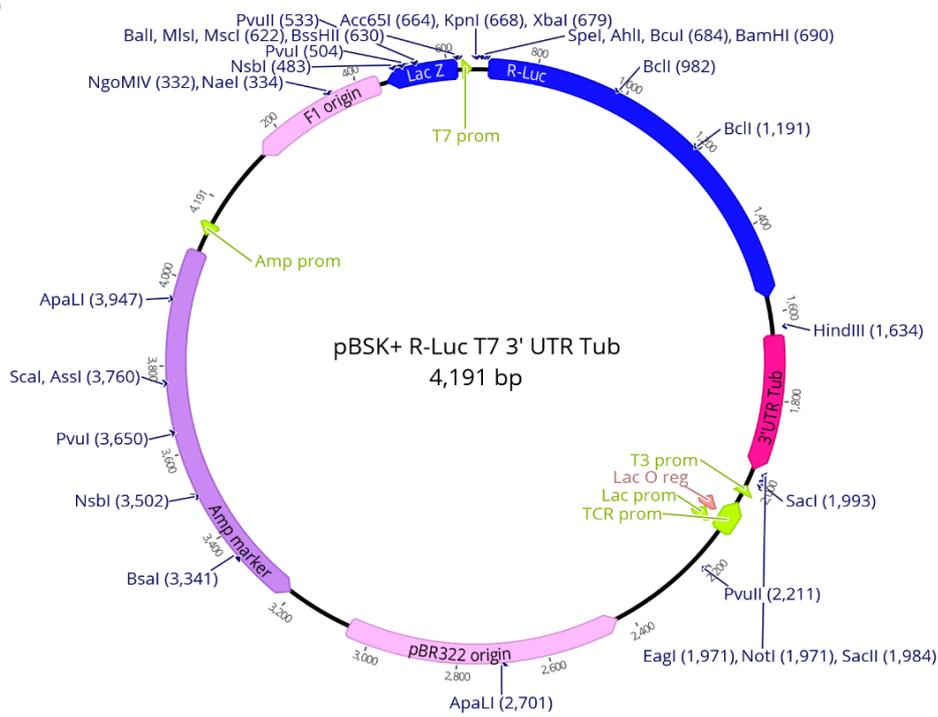
As luciferases são enzimas cujo produto da reação é a luz. Enquanto a Firefly Luciferase é ATP-dependente e emite luminescência de 550-570 nm, a Renilla não precisa de ATP para produzir luz azul (480 nm). Ambas atuam como repórteres de síntese proteica, visto que a luz emitida pela reação que catalisam é diretamente proporcional à quantidade de moléculas de enzimas.

O plasmídeo pBSK foi mantido e amplificado em *Escherichia coli* e purificado de bactérias crescidas em meio de Luria-Brentani (LB) contendo 100 µg/mL de ampicilina utilizando o kit *illustra™ plasmidPrep Midi Flow Kit* (GE Healthcare, EUA). O DNA purificado foi analisado pela digestão com enzimas de restrição *BamHI*, *XbaI*, *NotI* e *HindIII Fastdigest* (Thermo Fisher Scientific) e eletroforese em gel de 0,8% de agarose em tampão Tris-acetato EDTA (TAE) na presença de brometo de etídeo (Figura 11 e 12).

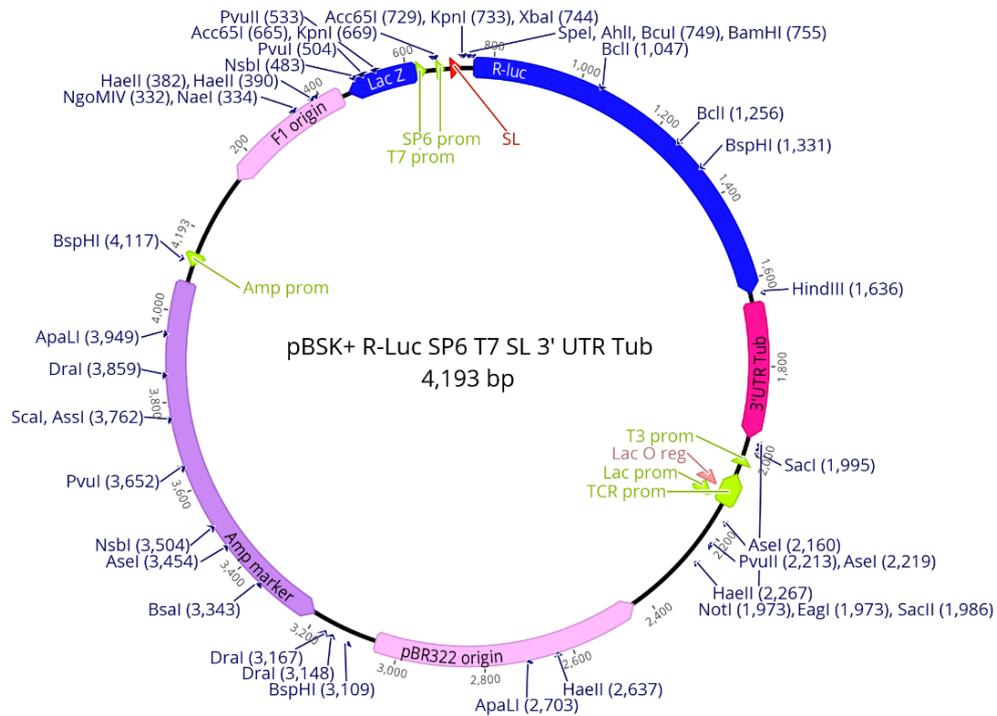
Figura 10: Mapas dos plasmídeos com enzimas de restrição. a) pBSK Firefly Luciferase; b) pBSK Renilla Luciferase; c) pBSK Firefly Luciferase SL; d) pBSK Renilla Luciferase SL. Plasmídeos contém os genes promotores Amp, TCR, T3 e T7; origens de replicação F1 e pBR322; o operon Lac, composto pelos genes Lac Z, promotor Lac, região regulatória Lac O; marcador de resistência à ampicilina (Amp marker); genes Firefly Luciferase (F-luc) e Renilla Luciferase (R-luc), seguido por uma região 3' UTR (*Untranslated Region*) de tubulina. Plasmídeos c) e d) têm sequência na região 5' UTR de *Spliced Leader*.



c)



d)



Mapas feitos utilizando *Geneious* versão 11.1 (Biomatters), disponível em: <www.geneious.com>.

As sequências dos plasmídeos foram confirmadas por reação de sequenciamento utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) F-luc reverso (FLucRev), R-luc reverso (RenRev) e Lac Z (LacZse) (Tabela I). A partir disso pudemos concluir que tínhamos dois tipos de clones de R-luc (com a sequência SL e sem), e apenas um tipo de clone de F-luc, que não continha a sequência SL, sendo necessário então construir um novo plasmídeo F-luc com SL a partir do que tínhamos.

Figura 11: Géis de agarose 0,8% pBSK R-luc. a) Representação padrão molecular lambda *HindIII*. Disponível em: <https://www.genebiosystems.com/products/lambda-dna-hind-iii-digest-molecular-weight-marker>; b) Gel da digestão com enzimas *BamHI* e *HindIII* dos plasmídeos R-luc T7 (1) e R-luc SL (2); c) Gel da linearização dos plasmídeos R-luc T7 (3) e R-luc SL (4) com a enzima *NotI*.

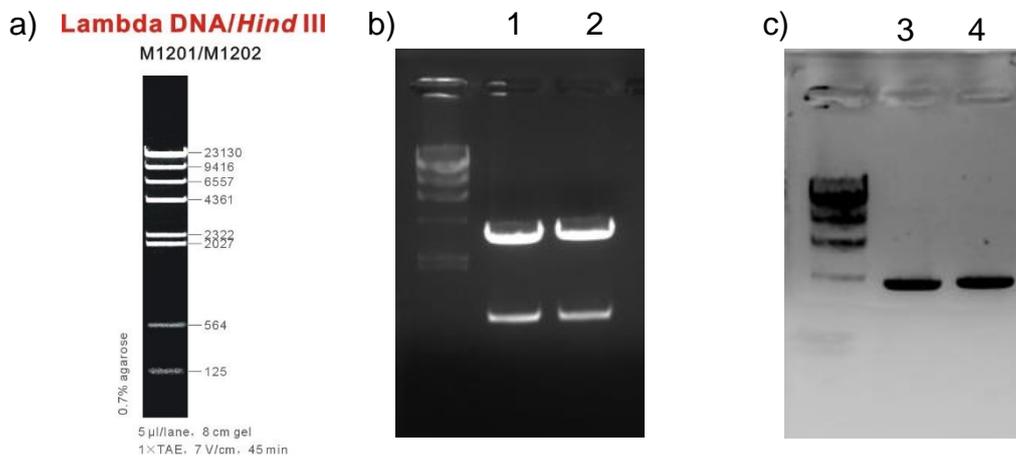


Figura 12: Gel de agarose 0,8% pBSK F-luc T7. a) Representação padrão molecular lambda *HindIII*. Disponível em: <https://www.genebiosystems.com/products/lambda-dna-hind-iii-digest-molecular-weight-marker>; b) Gel da digestão com enzimas *XbaI* e *HindIII* (1) e *NotI* e *HindIII* (2) do plasmídeo F-luc T7.

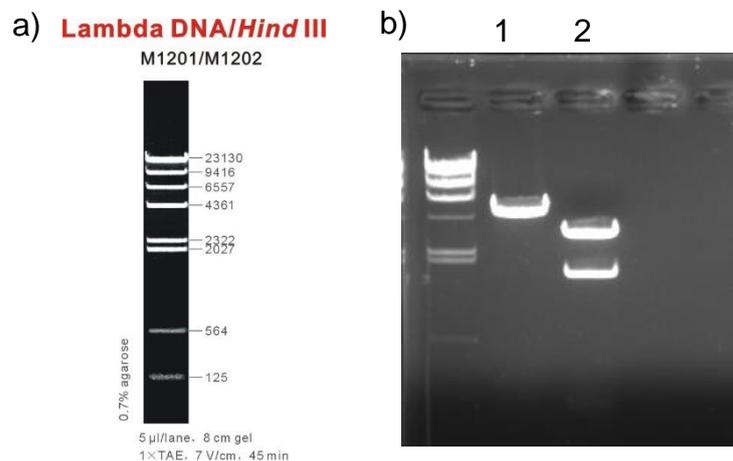


Tabela I. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

Nome do primer	Sequência (5'- 3')
Anti-SL	GAA TAT AGT ACA GAA ACT GTA TCA ATA ATA GCG TTA GTT
FLucRev	ATC GTT TCA TAG CTT CTG CC
RenRev	ATG TGG CAC AAC ATG TCG CC
KpnSLBamHFow	CGG ATA CAG TTT CTG TAC TAT ATT GGT TGT CTT GTC ATG AGT ACT G
KpnSLBamHRev	GAT CCA GTA CTC ATG ACA AGA CAA CCA ATA TAG TAC AGA AAC TGT ATC CGG TAC
LacZse	GCG ATT AAG TTG GGT AAC GCC

Para isso, desenhamos os oligonucleotídeos KpnSLBamHFow e KpnSLBamHRev, que continham a sequência SL e os sítios das enzimas *KpnI* e *BamHI* (locais onde nós clivamos o plasmídeo para anelar o primer contendo SL) e o da enzima *ScaI* (importante para verificar se a inserção deu certo, considerando que o plasmídeo F-luc original não tem esse sítio). 50 pmol de cada primer foram incubados, fervidos a 95°C por 5 minutos, deixados anelando por 30 minutos a 60°C e depois colocados no gelo.

Aproximadamente 2,5 µg do plasmídeo original F-luc foram digeridos com as enzimas *KpnI* e *BamHI*, ambas Fastdigest (Thermo Fisher Scientific) e 1 µL foi utilizado para conferir a digestão em eletroforese em gel de 0,8% de agarose em tampão Tris-acetato EDTA (TAE) na presença de brometo de etídeo. O fragmento entre esses dois sítios é de 50 pb, não sendo possível sua visualização no gel.

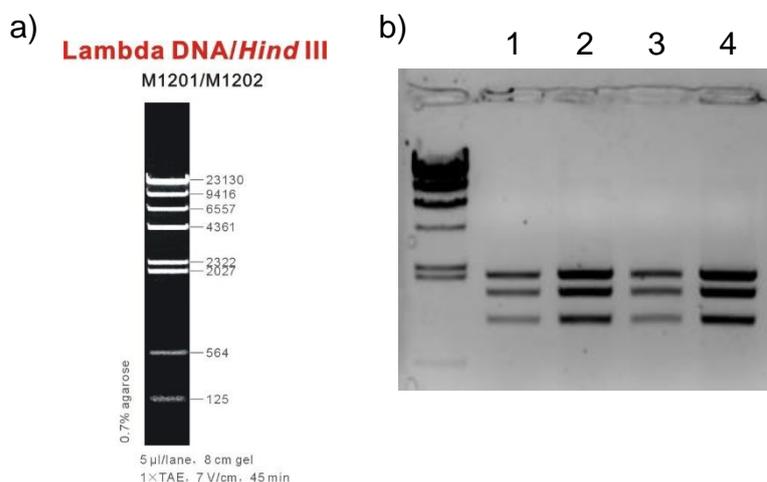
Depois, incubamos por 1 hora a temperatura ambiente aproximadamente 2 µg (8 µL) de plasmídeo com 2 µL dos primers alinhados; 1 µL da enzima T4 DNA ligase (Thermo Fisher Scientific) e 2 µL do tampão 10x da ligase, com volume final de 20 µL. Como controle, fizemos a reação sem primer.

Em seguida, transformamos 200 µL de bactérias competentes DH5 alfa com 10 µL do novo plasmídeo construído (F-luc SL) e, como controle, com 10 µL do plasmídeo da reação sem primer. As duas reações foram incubadas 30 minutos no gelo, seguido de choque a 42°C. À mistura de ligação adicionou-se 800 µL de meio SOC (20 mM glicose; 20 g/L triptona; 5 g/L yeast extract; 0,5 g/L NaCl; 2,5 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 5 mM MgSO₄; pH = 7,0). Após 1 hora a 37°C, 180 rpm, as bactérias foram centrifugadas por 5 minutos a 3.500 rpm 20°C. Foram removidos 800 µL de sobrenadante e as bactérias ressuspensas nos 200 µL restantes, dos quais 100 µL foram espalhadas em

uma placa de Petri contendo meio Luria-Brentani (LB), agarose 1,2%; e ampicilina 0,1 mg/mL. Os outros 100 μ L foram espalhados em outra placa de meio LB com canamicina (0,05 mg/mL). As placas foram deixadas a 37°C por 12 horas.

As colônias que cresceram somente na placa contendo ampicilina foram incubadas em 3 mL de meio LB com ampicilina (0,1 mg/mL) durante 12 horas a 180 rpm, 37°C. Os plasmídeos foram purificados utilizando o método NID (*Non-ionic detergents*) (LEZIN et al., 2011) que se baseia em utilizar um *Extraction Buffer* (5% sacarose; 50 mM EDTA; 50 mM Tris pH = 8,0; 0,75 mM NH₄Cl; 0,5% Triton X-100; lisozima 100 μ g/mL; RNase 25 μ g/mL) para extração do DNA. Em seguida, foi feita a digestão utilizando as enzimas *ScaI* e *HindIII* (Thermo Fisher Scientific), seguido de eletroforese em gel de 0,8% de agarose em tampão TAE na presença de brometo de etídeo para confirmar se a sequência contendo SL foi inserida com sucesso (Figura 13). Confirmada a presença de SL, os clones corretos (1 e 3) foram sequenciados para confirmar a construção.

Figura 13: Gel de agarose 0,8% pBSK F-luc SL. a) Representação padrão molecular lambda *HindIII*. Disponível em: <https://www.genebiosystems.com/products/lambda-dna-hind-iii-digest-molecular-weight-marker>; b) Gel da digestão dos clones de 1 a 4 do plasmídeo F-luc SL com enzimas *ScaI* e *HindIII*.



Este plasmídeo, bem como todos os plasmídeos utilizados tiveram suas sequências confirmadas.

4.4. Síntese do RNAm *in vitro*

Para a síntese de RNA os plasmídeos foram linearizados utilizando a enzima *NotI* (Thermo Fisher Scientific). Os plasmídeos linearizados foram então repurificados com o kit de purificação *PureLink Quick PCR Purification Kit* (Invitrogen) e utilizados para as reações de transcrição com a enzima T7 polimerase (Ambion, EUA). O volume final da reação foi de 20 μL , contendo 2 μL do tampão da RNA polimerase; 2 μL de cada NTP (ATP, GTP, CTP, UTP); 2 μL da T7 RNA-polimerase; 1 μg de DNA molde (plasmídeo controle, pBSK F-luc, pBSK R-luc). As reações foram feitas durante 3 horas a 37°C, como descrito no protocolo do *MEGAscript T7 Transcription Kit* (Invitrogen).

Depois de finalizadas as polimerizações, os RNAs foram precipitados pela adição de cloreto de lítio (0,5 volumes de uma solução a 7,5 M) e incubação por 30 minutos a -20°C. Os precipitados foram recolhidos por centrifugação de 20 minutos a 16.000 x g a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os precipitados lavados com etanol 80%, as amostras secas por 3 minutos a temperatura ambiente e ressuspensos em água livre de nucleases. Os RNAs produzidos foram quantificados utilizando o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, EUA), seguindo as recomendações do fabricante; 10 μg foram utilizadas para modificações das extremidades 5'UTR e 3'UTR.

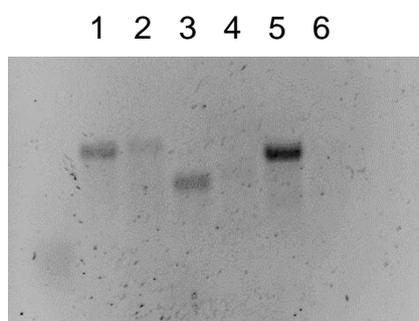
Na extremidade 5'UTR foi feito o capeamento. Para essa edição empregamos o sistema *Vaccinia Capping System* (New England Biolabs, EUA). Para 10 μg de RNA (F-luc, R-luc) o volume final foi ajustado para 15 μL com água RNase free, e a solução aquecida a 65°C por 5 minutos, resfriado no gelo por mais 5 minutos e depois foram adicionados 2 μL de *Capping Buffer* 10x; 1 μL de GTP (10 mM); 1 μL de S-adenosil metionina (SAM) 2 mM; 1 μL da enzima *Vaccinia Capping*; e incubados por 30 minutos a 37°C. Depois, adicionou-se 60 μL de etanol 100% e a mistura incubada por 30 minutos a -20°C. O RNA capeado foi obtido após centrifugação a 4°C 16.000 x g por 15 minutos, o sobrenadante foi removido e o precipitado foi lavado com 100 μL de etanol 70%, seguido de 10 minutos de centrifugação a 4°C 16.000 x g. O etanol foi removido e o precipitado foi deixado secando 10 minutos a temperatura ambiente, sendo depois ressuspensão em 15 μL de água RNase free.

A adição de uma cauda de poliadenina na extremidade 3'UTR foi feita com a enzima *E. coli Poly(A) Polymerase* (New England Biolabs), de acordo com as

recomendações da empresa. Aos 15 μL do RNA capeado foram adicionados 2 μL do tampão 10X; 2 μL de ATP (10 mM); 1 μL de enzima *E. coli Poly(A) Polymerase*; e a reação mantida por 30 minutos a 37°C. O RNA foi obtido da mesma maneira que o descrito após a reação de *capping*.

Ao final do processo, os RNAs foram ressuspensos em 60 μL de água ultrapura livre de RNase, quantificados pelo espectrofotômetro e por gel de agarose 1% com formaldeído (Figura 14); e estocados a -80°C. Nota-se que os RNAs capeados e poliadenilados tem uma migração menor, sugerindo estarem modificados.

Figura 14: Gel de agarose 1% RNAm pBSK. Gel de agarose com (1) RNAm F-luc; (2) RNAm F-luc capeado e com cauda de poli-A; (3) RNAm R-luc; (4) RNAm R-luc capeado e com cauda de poli-A; (5) RNAm controle T7; (6) RNAm controle T7 capeado e com cauda de poli-A.



4.5. Ensaio de tradução

Para a síntese proteica, nos baseamos no protocolo de Kirill Alexandrov e Wayne A. Johnston (ALEXANDROV; JOHNSTON, 2014). Para isto, alíquotas de 500 μL de lisado foram descongeladas e para cada uma, adicionado um suplemento de solução de *feeding* (200 μL). A solução de *feeding* foi composta por 6 mM ATP (Sigma-Aldrich); 0,68 mM GTP (Thermo Fisher Scientific); 22,5 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ (Sigma-Aldrich); 1,25 mM Espermidina (Thermo Fisher Scientific); 10 mM Ditioneitol (DTT) (Thermo Fisher Scientific); 200 mM Fosfocreatina (CP) (Sigma-Aldrich); 100 mM HEPES-KOH pH=7,6 (Sigma-Aldrich); 5% (v/v) Polietilenoglicol (PEG 3,350) (Sigma-Aldrich); Coquetel de Inibidores de Protease 5x a concentração recomendada (*Complete™ EDTA-free*) (Roche, Suíça); 0,68 mM de cada Aminoácido (*Amino Acids Mix Solution*) (Sigma-Aldrich), 200 U/mL Creatinofosfoquinase (*Creatine Phosphokinase from rabbit*) (Sigma-Aldrich).

As reações foram feitas em volume final de 20 μL , contendo 14 μL do lisado suplementado de parasita e 0,2 μg em 6 μL de RNA modificado (F-luc ou R-luc) em

cada poço de uma placa de 384 poços com fundo branco, em duplicata. Como controle negativo as reações foram feitas sem RNAm. As placas foram incubadas por 3 horas a 28°C.

Para analisar a expressão de Firefly Luciferase e de Renilla Luciferase foram utilizados os kits *SteadyLite Plus Reporter Gene Assay System* (PerkinElmer, EUA) e *Renilla Luciferase Assay System* (Promega, EUA), respectivamente. Foi preparado o reagente repórter seguindo as orientações do fabricante. Para Firefly, logo após a incubação, foram adicionados 20 µL do reagente em cada um dos poços (recomendação de 1:1 v/v do fabricante); para Renilla, foram adicionados aproximadamente 100 µL do reagente em cada poço (recomendação do fabricante).

A detecção da luminescência, ou unidade relativa de luz (RLU), foi feita a partir da adição dos reagentes, em leitor de placa SpectraMax® M3 *Microplate Reader* (Molecular Devices LLC, EUA), com integração de 500 ms.

Para testes com inibidores de síntese proteica e compostos anti-TC, foram preparadas soluções dos mesmos com concentração final de 1 µM. Em cada poço foi colocado 14 µL do lisado suplementado e 1 µL de cada composto (0,05 µM), incubados durante 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 0,2 µg de RNAm F-luc e as reações foram incubadas por 3 horas a 28°C, seguido de adição do reagente repórter de F-luc.

4.6. Dosagem de proteínas

Para dosagem de proteínas presentes nos extratos, foi feito o ensaio proteico de Pierce BCA com o Kit *Micro BCA™ Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific). Foi feita a curva de padronização com albumina sérica bovina (BSA) conforme descrito no manual. Foram coletadas alíquotas de 20 µL dos extratos logo após adicionar o *feeding solution*. A partir dessas alíquotas, foram feitas diluições seriadas: para 100x colocamos 10 µL de cada alíquota em 90 µL de água e utilizamos 10 µL dessa solução em 90 µL de água direto na placa de 96 poços transparente; para 200x colocamos 5 µL de cada alíquota em 95 µL de água e utilizamos 10 µL dessa solução em 90 µL de água direto na placa também. Depois de colocados os 100 µL finais de todas as amostras feitas em triplicata, adicionamos 100 µL do reagente final do kit preparado a partir dos 3 reagentes MA (50:100); MB (48:100) e MC (2:100); em cada

poço, seguido de incubação de 2 horas a 37°C. A leitura foi feita no leitor de placas SpectraMax® M3, no comprimento de onda de 562 nm.

5. RESULTADOS

Com objetivo de avaliar a síntese proteica *in vitro* utilizando extratos de *T. cruzi* e *T. brucei*, foi sintetizado o RNAm a partir dos plasmídeos modificados pBSK F-luc e pBSK R-luc, seguindo o procedimento descrito em preparo do RNA mensageiro.

Em seguida, foi feito o ensaio de tradução, tendo como resultado a síntese de luciferases. A Firefly teve sua luminescência detectada durante 40 minutos para confirmar o tempo de meia vida e em que momento ocorre o pico do sinal, utilizando como controle negativo o extrato sem adição de RNAm. Verificamos que ocorreu aparecimento de luz com o kit para Firefly somente com os extratos de *T. cruzi* e *T. brucei* contendo o RNAm F-luc (Figura 15).

Além disso, notamos que a melhor emissão e luz ocorreu após 15 minutos de detecção. Quando comparamos a atividade da enzima no ponto mais alto de luminescência fica evidente que o extrato promove o aparecimento da luciferase (Figura 16). O mesmo pode ser observado nas construções que tem a enzima de Renilla (Figura 17). A partir destes resultados, foi possível visualizar que o sistema de tradução do parasita é funcional em extratos de *T. cruzi*.

Para confirmar se o aparecimento de atividade de luciferase decorreu da síntese da proteína, utilizamos inibidores de tradução. A síntese de proteínas é diretamente inibida por cicloheximida, que interfere na etapa de translocação. Este inibidor cessou totalmente a quantidade de luz produzida nas concentrações utilizadas em dois extratos diferentes dos parasitas (Figura 18). Como esperado, a inibição total foi observada com outros inibidores de síntese proteica de eucariotos (Figura 19), em que o valor de luminescência estava muito próximo ao valor de referência do branco.

Com o objetivo de avaliar se outros compostos tripanocidas, como o benzonidazol e nifurtimox, poderiam afetar a tradução *in vitro*, testamos a produção de luciferase em extratos de *T. brucei* e *T. cruzi* incubados com 0,05 µM de cada composto. Foi possível verificar que eles não inibiram a síntese proteica (Figura 20), o que reforça a especificidade do nosso teste.

Em paralelo, também foram feitas comparações da tradução em diferentes concentrações de hemina, visto que uma das hipóteses para o insucesso da produção de extratos de lisado efetivos pelo nosso colaborador poderia ser a precipitação do grupo heme presente nas células do parasita. Não observamos, contudo, diferenças significativas na luminescência a partir da adição de hemina que é a forma do heme

onde o ferro está oxidado (Fe^{3+}), mostrando que esta molécula não causa diretamente alteração na síntese de proteínas. Este resultado, contudo, não afastou a possibilidade de que o heme que se acumula no *T. cruzi* poderia prejudicar a obtenção de extratos competentes, talvez se associando a componentes necessários à tradução, isto porque a linhagem de *T. cruzi* empregada em nossos testes não acumulava heme.

Assim, decidimos preparar novos extratos de *T. cruzi* da linhagem original, que acumula normalmente heme. Com este novo extrato, mostramos que estas formas, denominadas selvagem (WT), foram capazes de produzir a luciferase (Figura 21 e Figura 22). No entanto, verificamos que a quantidade de proteínas da linhagem WT é maior, o que poderia sugerir que a tradução seja menos eficiente neste caso, quando comparado com a linhagem mutante ou com *T. brucei* (Figura 23). Ainda não sabemos se a quantidade de extrato é limitante e nem se os níveis de ribossomos são semelhantes, o que será objeto de experimentos futuros.

A sequência de SL é adicionada a todos os RNAs mensageiros feitos nos *Trypanosomas*. Ela contém o *cap*, o que possibilita a migração do RNA do núcleo ao citosol. Juntamente com a cauda de poli-A ela permite a formação de complexos de iniciação da tradução associando os ribossomos com o RNAm. Assim, testamos se a presença da sequência de SL fazia diferença na tradução *in vitro*. Resultados preliminares mostraram que a tradução também ocorre quando o RNA modificado não contém a sequência SL (Figura 24). O experimento deverá ser repetido para comprovar o que foi visualizado, mas a partir dele e também levando em consideração os testes anteriores, podemos considerar que não há diferença na tradução, pois nenhuma tradução feita anteriormente tinha o RNAm contendo a sequência SL.

Figura 15: Tradução *in vitro* utilizando extratos de *T. brucei* e *T. cruzi* H. Diferentes quantificações de luminescência de F-luc a partir da tradução *in vitro* utilizando extratos de *T. brucei* e *T. cruzi* H. Foi feita incubação de RNAm de F-luc e R-luc (ambos sem SL) com extratos suplementados de TB e TCH por 3 horas. Como controle negativo, foram incubados os extratos sem RNAm, apenas com água. Os RNAm R-luc também foram considerados controles negativos, visto que o substrato repórter era específico para Firefly. Foi feita a adição do substrato repórter, seguido de quantificações da luminescência (unidades relativas de luz), pelo período de 40 minutos. Os pontos foram feitos a partir da média das duplicatas técnicas de cada amostra, subtraindo o valor do branco.

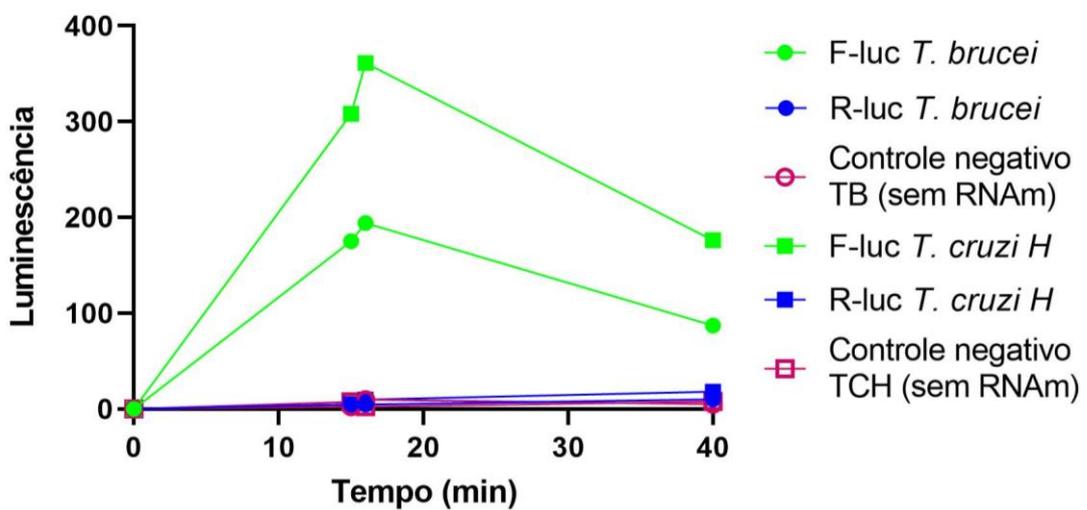


Figura 16: Comparação da luminescência de Firefly Luciferase em tradução *in vitro* entre os extratos de *T. brucei* e *T. cruzi* H. Foi feita incubação de RNAm de F-luc e R-luc com extratos suplementados de *T. brucei* e *T. cruzi* H durante 3 horas a 28°C. Como controle negativo, foram incubados os extratos sem RNAm, apenas com água. Os RNAm R-luc também foram considerados controles negativos, visto que o substrato repórter era específico para Firefly. Foi feita a comparação do maior sinal de luminescência obtido a partir da adição de substrato repórter ao sistema de tradução *in vitro*. As barras foram feitas a partir da média das duplicatas técnicas de cada amostra, subtraindo o branco.

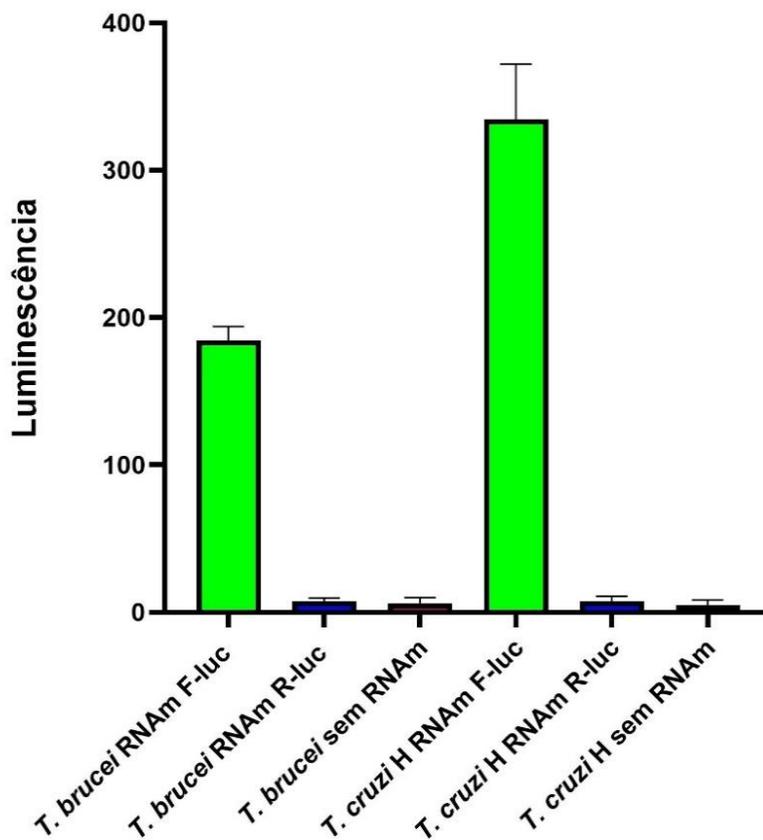


Figura 17: Comparação da luminescência de Renilla Luciferase em tradução *in vitro* entre os extratos de *T. brucei* e *T. cruzi* H. Foi feita a incubação de RNAm antigo e novo de R-luc com extratos suplementados de *T. brucei* e *T. cruzi* H durante 3 horas a 28°C. Como controle negativo, foram incubados os extratos sem RNAm, apenas com água, seguido de comparação do maior sinal de luminescência obtido a partir da adição de substrato repórter de R-luc ao sistema de tradução *in vitro*. As barras foram feitas a partir da média das duplicatas técnicas de cada amostra, subtraindo o branco.

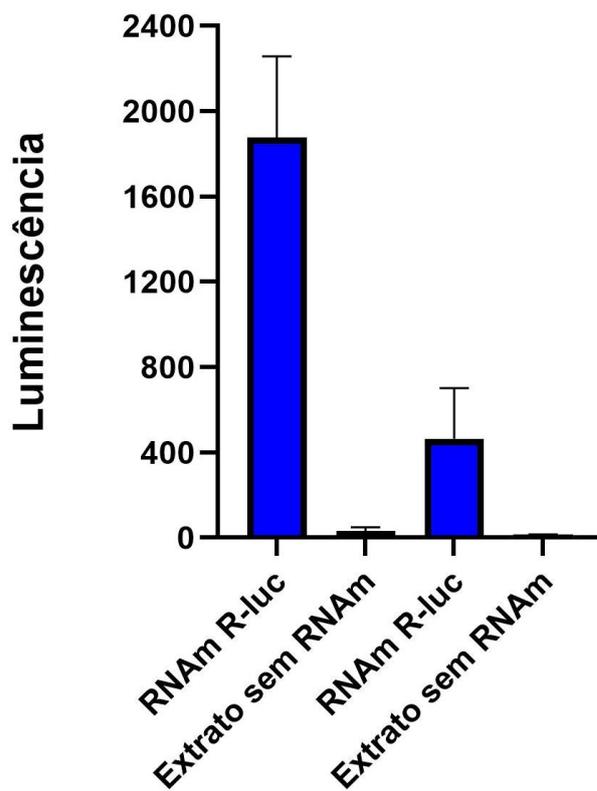


Figura 18: Teste dos extratos de *T. brucei* e *T. cruzi* H com cicloheximida. Comparação entre extratos antigos e novos de *T. brucei* e *T. cruzi* H do maior sinal de luminescência obtido a partir da adição de substrato repórter de F-luc. A cicloheximida em concentração de 0,05 μ M foi incubada por 5 minutos com os extratos suplementados de TB e TCH, seguido de adição do RNAm F-luc. Foi feito um controle positivo com a adição do RNAm aos extratos, sem adição do composto; e um controle negativo sem a adição do RNAm. Todos foram incubados a 28°C por 3 horas, seguido de adição do substrato repórter de F-luc. As barras foram feitas a partir da média das duplicatas técnicas de cada amostra, subtraindo o branco.

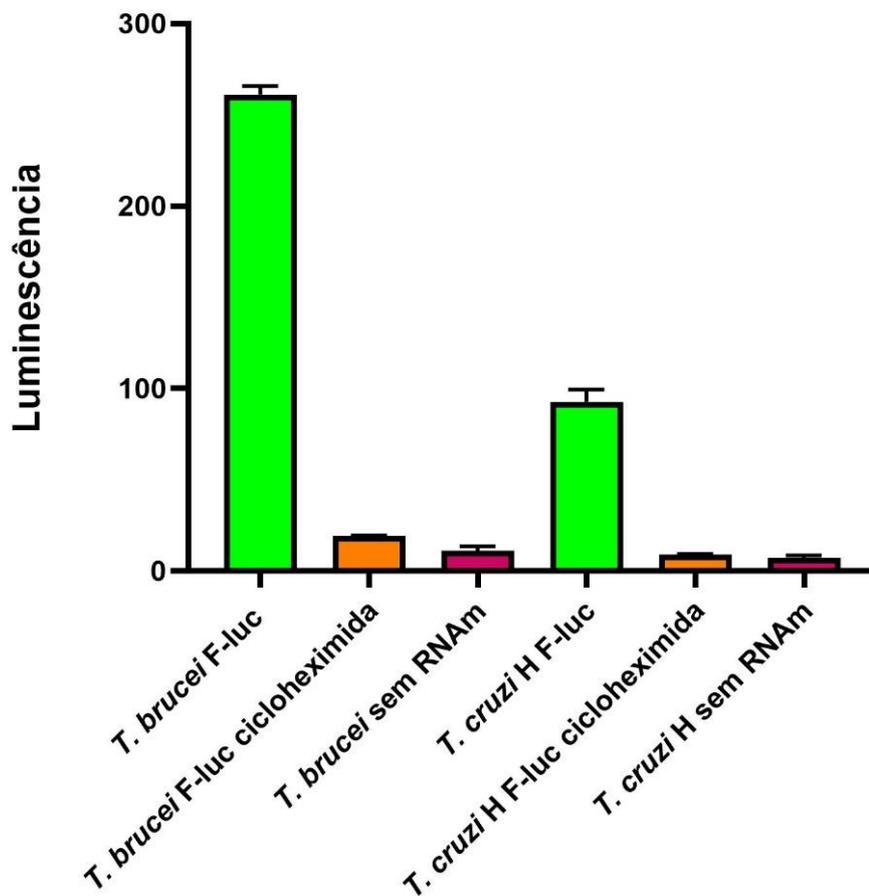


Figura 19: Teste dos extratos de *T. brucei* e *T. cruzi* H com compostos inibidores de síntese proteica. Comparação entre extratos de *T. brucei* e *T. cruzi* H do maior sinal de luminescência obtido a partir da adição de substrato repórter de F-luc. Os inibidores em concentrações de 0,05 μ M foram incubados por 5 minutos com os extratos suplementados de TB e TCH, seguido de adição do RNAm F-luc. Foi feito um controle positivo com a adição do RNAm aos extratos, sem adição dos compostos; e um controle negativo sem a adição do RNAm. Todos foram incubados a 28°C por 3 horas, seguido de adição do substrato repórter de F-luc. As barras foram feitas a partir da média das duplicatas técnicas de cada amostra, subtraindo o branco.

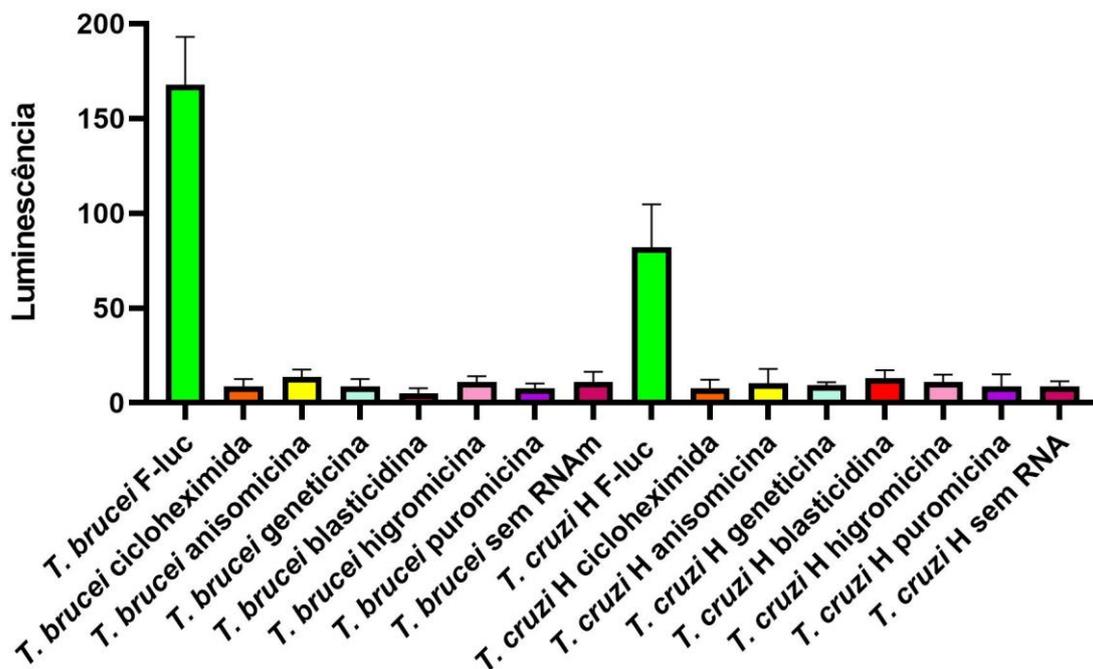


Figura 20: Teste dos extratos de *T. brucei* e *T. cruzi* H com compostos utilizados para doença de Chagas e diferentes concentrações de hemina. Comparação entre extratos de *T. brucei* e *T. cruzi* H do maior sinal de luminescência obtido a partir da adição de substrato repórter de F-luc. Os compostos (benzonidazol, nifurtimox e cicloheximida) em concentrações de 0,05 μ M foram incubados por 5 minutos com os extratos suplementados de TB e TCH, seguido de adição do RNAm F-luc. Foi feito um controle positivo com a adição do RNAm aos extratos, sem adição dos compostos; e dois controles negativos: um com adição de cicloheximida e um sem a adição do RNAm. A adição de hemina foi feita antes de adicionar o RNAm, com as diferentes concentrações descritas no gráfico. Todos foram incubados a 28°C por 3 horas, seguido de adição do substrato repórter de F-luc. As barras foram feitas a partir da média das duplicatas técnicas de cada amostra, subtraindo o branco.

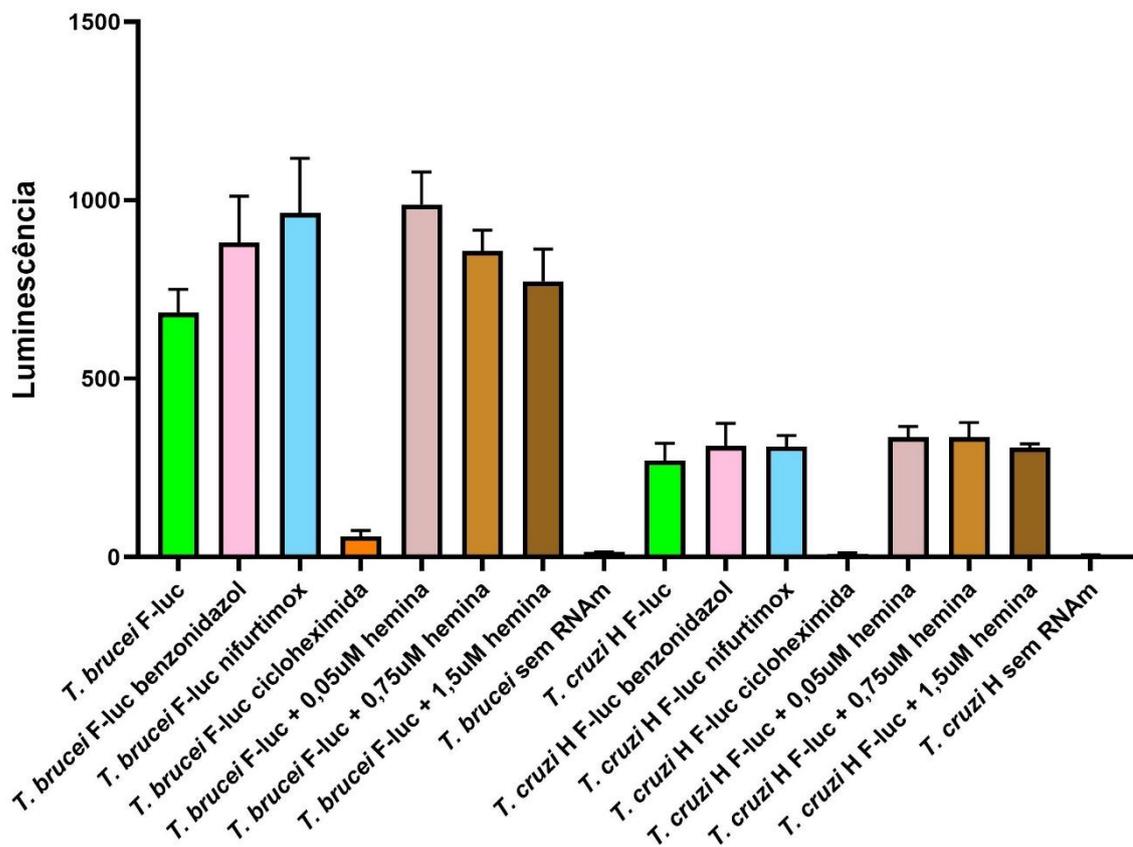


Figura 21: Tradução *in vitro* utilizando extratos de *T. brucei*, *T. cruzi* H e *T. cruzi* DM28c WT. Diferentes quantificações de luminescência de F-luc a partir da tradução *in vitro* utilizando extratos de *T. brucei*, *T. cruzi* H e *T. cruzi* DM28c WT. Foi feita incubação de RNAm de F-luc com extratos suplementados de TB, TCH e TC WT por 3 horas. Como controle negativo, foram incubados os extratos sem RNAm, apenas com água. Em seguida foi feita a adição do substrato repórter de F-luc, seguida de quantificações da luminescência (unidades relativas de luz), pelo período de 60 minutos. Os pontos foram feitos a partir da média das duplicatas técnicas de cada amostra, subtraindo o valor do branco.

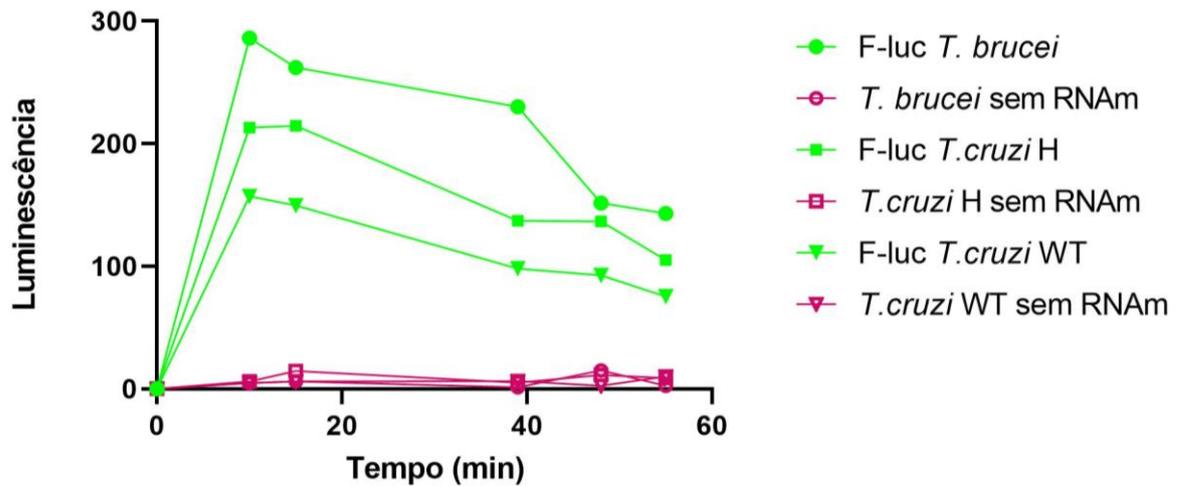
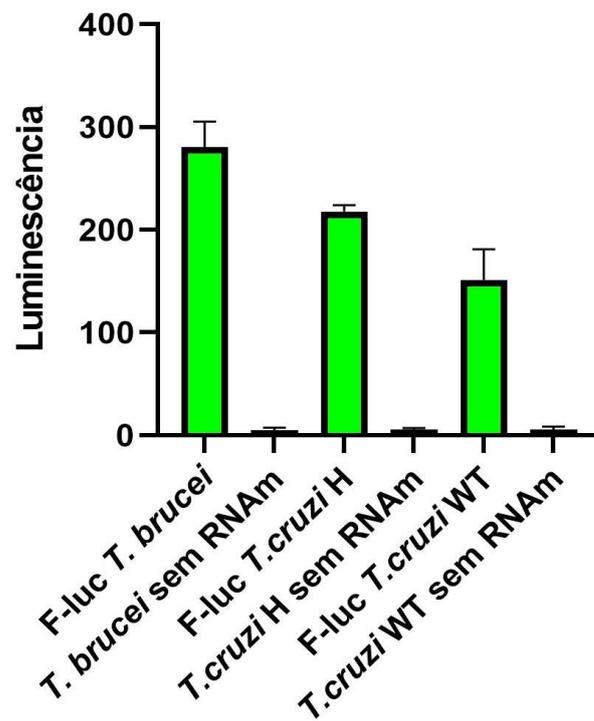


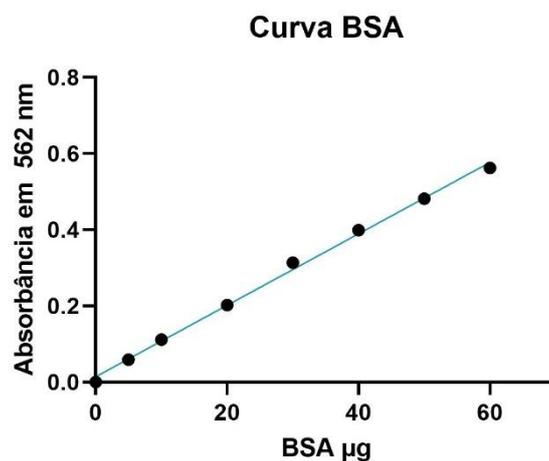
Figura 22: Comparação da luminescência de Firefly Luciferase em tradução *in vitro* entre os extratos de *T. brucei*, *T. cruzi* H e *T. cruzi* DM28c WT. Comparação entre extratos de *T. brucei*, *T. cruzi* H e *T. cruzi* DM28c WT do maior sinal de luminescência obtido a partir da adição de substrato repórter de F-luc. Foi feita incubação de RNAm de F-luc com extratos suplementados de TB, TCH e TC WT por 3 horas. Como controle negativo, foram incubados os extratos sem RNAm, apenas com água. Em seguida foi feita a adição do substrato repórter de F-luc, seguida da quantificação. As barras foram feitas a partir da média das duplicatas técnicas de cada amostra, subtraindo o branco.



Tabelas II e III com resultados da quantificação de proteínas presentes nos extratos por meio da técnica de BCA. Os resultados foram obtidos em duplicata técnica, subtraindo-se o valor do branco (SEB), seguindo de média deles. Utilizando como base a equação da reta obtida pelo gráfico de BSA ($Y = 0,009 * X + 0,01$), foram feitos os cálculos de concentração de proteínas por μL de amostra.

II

BSA (μg)	Média Abs subtraindo o branco
0	0,0
5	0,059
10	0,112
20	0,202
30	0,314
40	0,399
50	0,482
60	0,562



III

Extrato	Diluição	Absorbância (562 nm)	Proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
<i>Trypanosoma brucei</i>	100x	0,135	13,9
<i>Trypanosoma brucei</i>	200x	0,077	7,5
<i>Trypanosoma cruzi</i> H	100x	0,144	14,9
<i>Trypanosoma cruzi</i> H	200x	0,083	8,2
<i>Trypanosoma cruzi</i> DM28c WT	100x	0,186	19,6
<i>Trypanosoma cruzi</i> DM28c WT	200x	0,113	11,5

Figura 23: Gráfico comparando quantidade de proteínas por sinal de luminescência. A partir dos resultados obtidos na tabela III, foram calculados os valores totais de proteínas presentes nos extratos. Para cada reação foram utilizados 14 μ L de extrato. A comparação foi feita com a média do maior sinal de luminescência obtida, descrita na Figura 22.

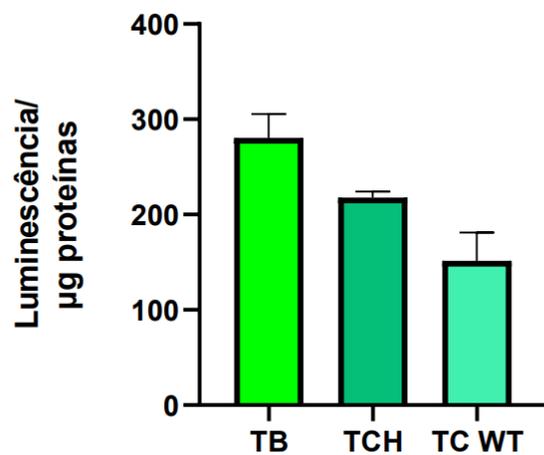
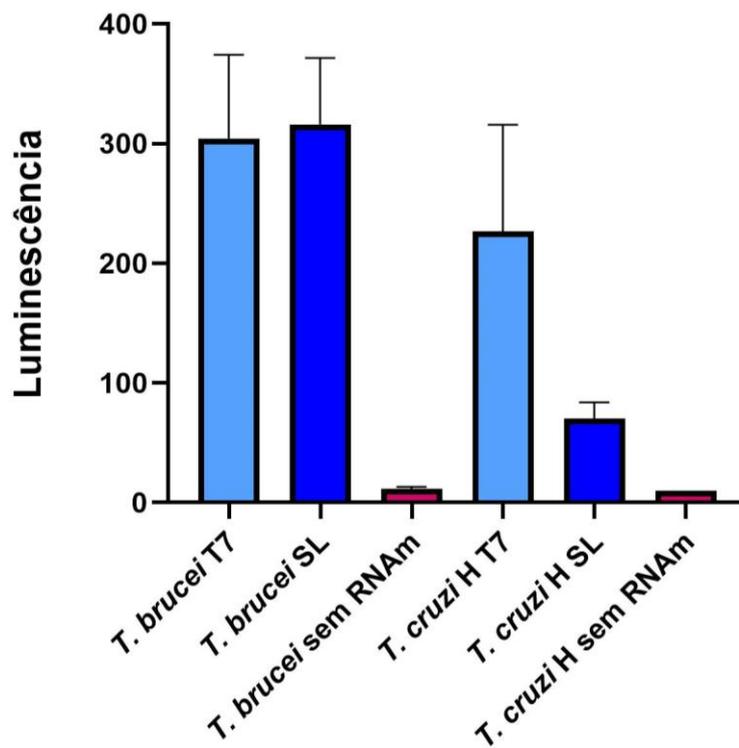


Figura 24: Teste utilizando extratos de *T. brucei* e *T. cruzi* H com RNAm contendo *Spliced Leader*. Foi feita a incubação de RNAm R-luc contendo a sequência de SL (*T. brucei* SL e *T. cruzi* H SL) e de RNAm sem a sequência SL, chamados de *T. brucei* T7 e *T. cruzi* H T7; com extratos suplementados de *T. brucei* e *T. cruzi* H durante 3 horas a 28°C. Como controle negativo, foram incubados os extratos sem RNAm, apenas com água, seguido de comparação do maior sinal de luminescência obtido a partir da adição de substrato repórter de R-luc ao sistema de tradução *in vitro*. As barras foram feitas a partir da média das duplicatas técnicas de cada amostra, subtraindo o branco.



6. DISCUSSÃO

O método de tradução *in vitro* descrito utilizando *L. tarentolae* foi adaptado com sucesso utilizando extratos de *T. brucei* e *T. cruzi* H, comprovando que o sistema de síntese proteica do parasito continua viável e que o ensaio pode ser adotado para testes com compostos inibidores de síntese proteica em tripanossomatídeos (ALEXANDROV; JOHNSTON, 2014). Os dados obtidos pela tradução *in vitro* utilizando dois tipos de luciferase (Firefly e Renilla) tiveram como produto da reação um sinal possível de ser quantificado (luminescência), o que não ocorre quando utilizamos o controle negativo sem RNAm. Outro fato que comprova isso é que quando utilizamos inibidores de síntese proteica em concentrações de 0,05 μM , cuja atuação está descrita na introdução, houve significativa diminuição da luminescência, com resultados muito próximos aos do controle sem RNAm. Os compostos utilizados para o tratamento da doença de Chagas, que não atuam na síntese proteica e causam lesões na membrana celular e no DNA, a peroxidação dos lipídeos e inativação enzimática, demonstram que a luminescência é resultado da tradução.

Nossos dados mostraram que a presença da sequência do *Spliced Leader* aparentemente não afeta a tradução no modelo *in vitro*, porque todos os RNAm utilizados nos testes anteriores ao da última figura foram sintetizados a partir de plasmídeos que não tinham a sequência SL, o que foi confirmado pelo sequenciamento; porém o teste utilizando o RNAm R-luc foi preliminar, tendo que ser repetido (Figura 24). Estamos fornecendo um RNAm com *cap* que não é exatamente o que ocorre no SL em tripanossomatídeos, onde além do grupo guanidina metilado, existem outras modificações (CAMPBELL; THOMAS; STURM, 2003). Até que ponto a falta destas outras modificações pode afetar a tradução poderá ser melhor avaliada no futuro.

O grupo heme é necessário para o crescimento e diferenciação do *T. cruzi*, porém o parasito não sintetiza essa molécula, retirando-a do meio em que está (PAGURA et al., 2020). Por conta da hipótese de que o heme dificultava na produção de extratos, utilizamos primeiramente uma cepa de *T. cruzi* modificada no laboratório que incorporava menos heme, o TCH. Esses parasitos, quando centrifugados, formam um pellet branco, diferente das cepas WT, que formam um pellet bem escuro por conta da incorporação da molécula de heme. Apesar disso, a hipótese de que o grupo heme

afetava a tradução *in vitro* foi descartada, primeiro porque quando adicionamos hemina ao extrato TCH, não houve diferença significativa na luminescência (Figura 20). Segundo pois ambos os extratos foram efetivos em sintetizar as luciferases, produzindo luminescência, mesmo que o WT tenha sido um pouco menos eficiente. Contudo é necessário verificar se a quantidade de extrato é limitante nos ensaios e testar a tradução variando-se a concentração do extrato.

A quantidade de proteínas presente nos extratos quantificada por método de BCA sugeriu que extratos que produzem mais luciferases (*T. brucei* e *T. cruzi* H) tem menor quantidade de proteínas totais, enquanto o extrato em que obtivemos menor sinal (*T. cruzi* Dm28c WT) foi o que mais apresentava proteínas. Existem três hipóteses possíveis para esse resultado: o extrato ter poucos ribossomos viáveis; os ribossomos foram degradados; podem existir inibidores de síntese proteica no próprio extrato. Para testar essas hipóteses, será necessário fazer uma extração de RNA ribossomal e sua quantificação por meio de eletroforese em gel de agarose 1%. Caso exista diferenças, será possível fazer uma comparação entre quantidade de proteínas, quantidade de RNA no gel e o sinal obtido.

Os nossos ensaios foram feitos em pequenos volumes que podem ser acomodados em placas de 96, 384 e até de 768 poços permitindo uma análise de um número muito grande de compostos. Em paralelo, os compostos deverão ser testados com ensaios utilizando-se extratos comerciais de reticulócitos de coelho, como controle para verificar quais compostos são funcionais somente em *T. cruzi*. Recentemente ensaios similares foram também desenvolvidos para o *Plasmodium falciparum* causador da malária (AHYONG et al., 2016). Baseado neste trabalho em que foram testados compostos já capazes de atuar na inibição o crescimento do *Plasmodium*, se encontrou alguns que atuam na síntese proteica. Desta forma, uma decorrência de nossos estudos será testar compostos que inibem o crescimento do *T. cruzi* e não são tóxicos para células humanas e cujo alvo não é conhecido. Neste sentido podem ser testados pelo menos 500 compostos identificados pelo Broad Institute (Pubchem AID 2294) e que atuam inibindo o *T. cruzi*.

7. CONCLUSÃO

A doença de Chagas constitui um problema de saúde mundial cujo tratamento, principalmente para doentes crônicos, muitas vezes é ineficiente. A síntese proteica é imprescindível para a sobrevivência de qualquer célula, seja procariota ou eucariota, sendo um ótimo alvo para impedir a progressão da infecção pelo *T. cruzi*. Concluímos com este trabalho que é possível utilizar extratos de *T. cruzi* para buscar compostos capazes de inibir a síntese proteica neste parasita. Esta metodologia, apesar de ter que ser melhorada, é um passo importante para nos levar a novas estratégias terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas.

8. REFERÊNCIAS

- AHYONG, V. et al. Identification of *Plasmodium falciparum* specific translation inhibitors from the MMV Malaria Box using a high throughput in vitro translation screen. **Malaria Journal**, v. 173, p. 15, 2016.
- ALBERTS, Bruce. **Biologia molecular da célula**. 6ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- ALEXANDROV, K.; JOHNSTON, W. A. Cell-Free Protein Synthesis Methods and Protocols. London: **Methos in Molecular Biology**, v. 1118, 2014.
- ARYAL, Sagar. **Translation (Protein Synthesis) in Eukaryotes**. [s. l.], 2018. Disponível em: <https://microbenotes.com/translation-protein-synthesis-in-eukaryotes/>. Acesso em: 10 de março de 2021.
- CALDERANO, S. G. **Dinâmica Molecular no Núcleo de *Trypanosoma cruzi***. Mestrado—São Paulo, SP: Universidade de São Paulo, 2008.
- CAMARGO, E. P. Growth and Differentiation in *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo**, v. 6, n. 3, p. 93–100, maio 1964.
- CAMPBELL, D. A.; THOMAS, S.; STURM, N. R. Transcription in kinetoplastid protozoa: Why be normal? **Microbes and Infection**, v. 5, n. 13, p. 1231–1240, 2003.
- CARLOS PINTO DIAS, J. et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 7–86, jun. 2016.
- CHAO, C.; LEONE, J. L.; VIGLIANO, C. A. Chagas disease: Historic perspective. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**. Elsevier B.V., 1 maio 2020.
- CIMERMAN, Benjamin; CIMERMAN, Sérgio. **Cimerman: parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2002.
- CLAYTON, C. Regulation of gene expression in trypanosomatids: Living with polycistronic transcription. **Open Biology**, v. 9, n. 6, 1 jun. 2019.

CLAYTON, C.; SHAPIRA, M. Post-transcriptional regulation of gene expression in *Trypanosomes* and *Leishmanias*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, dez. 2007.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 1, p. 113–122, 2007.

DE CASTRO, Solange L.; SOEIRO, Maria de Nazaré C. **Drogas tripanocidas**. Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, 2017. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/doenca/tratamento/>. Acesso em: 23 de abril de 2021.

DE SOUZA, Wanderley. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, p. 269–285, 2002.

DE SOUZA, Wanderley; BARRIAS, Emile S. **Hospedeiro Vertebrado**. Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, 2017. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/parasita/ciclo-evolutivo/>. Acesso em: 09 de março de 2021.

DEGRAVE, Win. **O genoma do *Trypanosoma cruzi***. Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, 2017. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/parasita/biologia-molecular/>. Acesso em: 09 de março de 2021.

DIAS, J. C. P. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bioecologias, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 4, p. 370–375, jul. 2006.

DMITRIEV, S. E.; VLADIMIROV, D. O.; LASHKEVICH, K. A. A Quick Guide to Small-Molecule Inhibitors of Eukaryotic Protein Synthesis. **Biochemistry (Moscow)**. Pleiades journals, 1 nov. 2020.

DNDi. **Doença de Chagas**. América latina, 2021. Disponível em: <https://www.dndial.org/doencas/doenca-chagas/>. Acesso em: 22 de maio de 2021.

ECHEVERRIA, L. E.; MORILLO, C. A. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**. W.B. Saunders, 1 mar. 2019.

FERREIRA, Marcelo Urbano. **Parasitologia contemporânea**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

- GAO, H. et al. The structure of the 80S ribosome from *Trypanosoma cruzi* reveals unique rRNA components. **PNAS**, v. 102, n. 29, p. 10206–10211, 19 jul. 2005.
- GARREAU DE LOUBRESSE, N. et al. Structural basis for the inhibition of the eukaryotic ribosome. **Nature**, v. 513, n. 7519, p. 517–522, 25 set. 2014.
- GIRONÈS, N.; FRESNO, M. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? **TRENDS in Parasitology**, v. 19, n. 1, p. 19–22, 2003.
- KOVTUN, O. et al. *Leishmania* cell-free protein expression system. **Methods**, v. 55, n. 1, p. 58–64, set. 2011.
- LEZIN, G. et al. A one-step miniprep for the isolation of plasmid DNA and lambda phage particles. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.
- 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**, 31 dez. 2010.
- LIU, Z. et al. Structure and assembly model for the *Trypanosoma cruzi* 60s ribosomal subunit. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 43, p. 12174–12179, 25 out. 2016.
- MACHADO, F. S. et al. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. **Seminars in Immunopathology**, nov. 2012.
- MARTÍN-ESCOLANO, J.; MEDINA-CARMONA, E.; MARTÍN-ESCOLANO, R. Chagas Disease: Current View of an Ancient and Global Chemotherapy Challenge. **ACS Infectious Diseases**. American Chemical Society, 13 nov. 2020.
- MOLINA, I. et al. Randomized Trial of Posaconazole and Benznidazole for Chronic Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 20, p. 1899–1908, 15 maio 2014.
- MORENO, S. N. J.; IP, H. S.; CROSS, G. A. M. An mRNA-dependent in vitro translation system from *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 46, p. 265–274, 1991.

NOGUEIRA, N. P. et al. Heme modulates *Trypanosoma cruzi* bioenergetics inducing mitochondrial ROS production. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 108, p. 183–191, 1 jul. 2017.

ORNELAS DUTRA, W. et al. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 208–218, 2009.

OVÇAR, E. C. ; et al. **Antimicrobianos Inibidores da Síntese Proteica Bacteriana**. Ourinhos - SP: 2017.

PAGURA, L. et al. **Trypanosoma cruzi senses intracellular heme levels and regulates heme homeostasis by modulating TcHTE protein expression**. [s. l.], 2020.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**. Lancet Publishing Group, 6 jan. 2018.

POLIKANOV, Y. S. et al. The mechanisms of action of ribosome-targeting peptide antibiotics. **Frontiers in Molecular Biosciences**. Frontiers Media S.A., 14 maio 2018.

SANTANA, R. A. G. **Caracterização genética de Trypanosoma cruzi em pacientes com a doença de Chagas crônica, no estado do Amazonas, Brasil**. Mestrado—Manaus, AM: Universidade do Estado do Amazonas, 2013.

SCHONENBERGER, M.; BRUN, R. Cultivation and in vitro cloning of procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined médium: short communication. **Acta Tropica**, v. 36, p. 289–292, 1979.

SVIDRITSKIY, E. et al. Blasticidin S inhibits translation by trapping deformed tRNA on the ribosome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 30, p. 12283–12288, 23 jul. 2013.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia**. 10ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2012.

VICENS, Q.; WESTHOF, E. Crystal structure of geneticin bound to a bacterial 16 S ribosomal RNA A site oligonucleotide. **Journal of Molecular Biology**, v. 326, n. 4, p. 1175–1188, 28 fev. 2003.