

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FLÁVIA SÁ PEREIRA DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA TcKAP3 DO CINETOPLASTO DO
PROTOZOÁRIO *Trypanosoma cruzi***

**CURITIBA
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FLÁVIA SÁ PEREIRA DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA TcKAP3 DO CINETOPLASTO DO
PROTOZOÁRIO *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Stenio Perdigão Fragoso

**CURITIBA
2009**

Aos melhores pais do mundo... Os meus!!!
Obrigada por vocês serem meu exemplo de vida...
Obrigada por tudo que me proporcionaram até hoje...
Obrigada por estarem sempre por perto quando precisei...
Obrigada por me ensinarem o valor e a importância das pequenas coisas...
Obrigada por me incentivarem sempre...
Obrigada por me fazerem sentir capaz...
Obrigada por todos os ensinamentos...
Obrigada pelo carinho, pelo colinho...
Vocês são meu porto seguro...
Amo muito vocês !!!

Ao melhor marido do mundo... O meu!!!
Obrigada por todo nosso amor...
Obrigada pela sua paciência e compreensão quando eu não podia estar ao seu lado...
Obrigada por me dar forças sempre...
Obrigada pelo homem maravilhoso que você é...
Obrigada por estar ao meu lado não só nos momentos felizes...
Obrigada por me ajudar sempre que precisei...
Obrigada por fazer parte desta etapa da minha vida...
Obrigada por entender tudo isso...
Te amo Mozão!!!

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Stenio Perdigão Fragoso, meu mestre, em primeiro lugar, pelo exemplo de pessoa e pesquisador a ser seguido. Com sua paciência e sabedoria, tudo se torna menos complexo e mais interessante de se estudar. Acredito que algumas pessoas já nascem com um dom. Você nasceu com o dom de ensinar chefe! Obrigada por toda dedicação que você tem conosco, e olha que não é pouca, por todo seu incentivo, quando queremos desanimar, por todas as sugestões, as críticas e por todos os momentos passados com nós, seus alunos, em nosso lab! Orientador igual a você não existe! Desculpem-me os demais, mas eu tirei a sorte grande. Obrigada por fazer parte do meu crescimento nesta etapa tão importante da minha vida.

Ao Instituto Carlos Chagas, pela bolsa de estudo a mim concedida, em especial ao Dr. Samuel Goldenberg, Dr. Marco Aurélio Krieger e Dra. Cláudia Nunes Duarte dos Santos pela oportunidade que me proporcionaram de desenvolver este trabalho no Instituto Carlos Chagas e pelo exemplo de pesquisadores que vou levar sempre comigo aonde for.

À Msc. Rita de Cássia Rampazzo, pela amizade e grande ajuda nos experimentos de Célula Vero, *T. cruzi* e qualquer outro que eu precisasse você estava sempre disposta a ajudar! Pelas nossas conversinhas científicas e não-científicas que nos proporcionaram muitas discussões. Obrigada meu bem!

Ao Dr. Lauro Manhães pela amizade, pelos ensinamentos, pelas grandes ajudas nos experimentos de *T. cruzi* e pelos momentos de descontração que tornavam os experimentos demorados e trabalhosos muito menos cansativos. Obrigada Lauro!

Ao Dr. Maurílio Soares pelo exemplo de pesquisador, por sua imensa paciência e boa vontade nas ajudas com as microscopias, com a formatação das figuras deste

trabalho e com muitas outras “coisitas” que ele sempre dá um jeitinho de nos ajudar! Pelos ensinamentos e momentos divertidos que passamos. Obrigada Mau!

À Dra. Danielle Pereira Cavalcanti, mais conhecida como Dani Cavalcanti, que com seu jeitinho carioca me mostrou o mundo das KAPs, fazendo com que eu desse continuidade ao seu trabalho. Obrigada pelos seus ensinamentos e pela sua amizade. Valeu Dani!

Ao Dr. Christian Probst, pelas ajudas bioinformáticas que tiveram grande importância para realização deste trabalho.

À Dra. Gisele Picchi que me iniciou no mundo da ciência, me orientando na graduação e me incentivando sempre! Sem a sua ajuda eu não estaria aqui Gi!

Aos amigos do Lab: Aldinha, Didi, Dani Fiori, Léo, Marcinha, Odinéia, Pá e Rô pelos momentos que vocês me proporcionaram, aqueles que só nos sabemos quais foram! Pela amizade, pelas risadas, pelos “pitacos”, por aquela mãozinha, pelos conselhos, ensinamentos, pela convivência maravilhosa com vocês! Poucos têm o privilégio de trabalhar em um ambiente tão gostoso! Vocês são especiais!

À Edilaine, Luiz e Maria Cristina por toda a ajuda, não só na parte administrativa, mas toda ajuda que precisamos. Com bom humor, competência e simpatia eles estão sempre dispostos a ajudar.

Ao Nilson, Rafael, Vanessa, Jana e Paulo pelo apoio técnico, pela amizade, pela paciência e competência. Neste trabalho tem muita “mãozinha” de vocês!

A todos os amigos e pesquisadores do Instituto Carlos Chagas pelos ensinamentos, pelas trocas de experiências e pelos nossos momentos de descontração.

"Tudo o que somos é resultado do que pensamos"

Buda (563 a.C - 483 a.C)

RESUMO

O DNA do cinetoplasto (kDNA) dos tripanossomatídeos consiste num arranjo raro de moléculas circulares catenadas numa única rede. Esta rede é constituída por (1) dezenas de maxicírculos, que codificam para algumas subunidades de enzimas mitocondriais e rRNA num padrão criptografado (edição de RNA), e (2) milhares de minicírculos que codificam para os RNAs guias (gRNAs). Estudos em *Crithidia fasciculata* mostraram que proteínas associadas ao cinetoplasto (KAPs) são capazes de condensar a rede de kDNA. No entanto, pouco é conhecido sobre as KAPs de *Trypanosoma cruzi*, um protozoário parasita que mostra padrões distintos de condensação de kDNA durante seu complexo desenvolvimento morfogénico. Neste trabalho nós clonamos um gene de *T. cruzi* que codifica uma proteína, TcKAP3 (*kinetoplast-associated-protein 3*), expressa em todos os estágios do parasita. *Tckap3* é um gene de cópia-única e é transcrito em um mRNA de 1,8 kb. Anticorpos de camundongo gerados contra a proteína recombinante reconheceram uma proteína de 25 kDa em epimastigotas que está associada ao cinetoplasto. Várias características de TcKAP3 tal como seu tamanho pequeno, natureza básica e a similaridade com CfKAP3, são coerentes com um papel na neutralização de carga e na condensação do DNA, sugerindo que esta proteína possa estar envolvida na organização da rede de kDNA. Mutantes de *T. cruzi* para *Tckap3* são capazes de diferenciar *in vitro* sem perda da capacidade infectiva e não apresentam modificações na estrutura e morfologia do cinetoplasto.

ABSTRACT

The kinetoplast DNA (kDNA) of trypanosomatids consists of an unusual arrangement of two types of circular molecules catenated into a single network: (1) A few maxicircles, that encode for some subunits of mitochondrial enzymes and rRNA in a cryptic pattern, and (2) thousands of minicircles that encode for the guide RNA (gRNAs). Studies in *Crithidia fasciculata* showed that the kDNA is associated with proteins, known as kinetoplast-associated proteins (KAPs), which are capable of condensing the kDNA network. However, little is known about the KAPs of *Trypanosoma cruzi*, a parasitic protozoon that shows distinct patterns of kDNA condensation during their complex morphogenetic development. In this work we have cloned a gene of *T. cruzi* which encodes the protein TcKAP3 (kinetoplast-associated protein 3). *Tckap3* is a single-copy gene that is transcribed into a 1.8 kb mRNA and expressed in all stages of the parasite. Mouse antiserum raised against the recombinant TcKAP3 recognized a 25 kDa protein which was found, by indirect immunofluorescence, to be associated with the kinetoplast of *T. cruzi*. Several features of TcKAP3 such as its small size, basic nature and similarity with CfKAP3, are consistent with a role in DNA charge neutralization and condensation, suggesting that this protein could be involved in organizing the kDNA network. Gene deletion was used to investigate the function of TcKAP3. *Tckap3* null mutants can differentiate *in vitro* without losing their infective capacity, with no modification in the structure and morphology of kinetoplast.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 1 - | DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA DOENÇA DE CHAGAS..... | 15 |
| FIGURA 2 - | CICLO DE VIDA DO <i>Trypanosoma cruzi</i> | 18 |
| FIGURA 3 - | ESQUEMA GERAL DAS PRINCIPAIS ESTRUTURAS CELULARES DE <i>T. cruzi</i> | 19 |
| FIGURA 4 - | DIFERENTES PADRÕES DE ORGANIZAÇÃO DO CINETOPLASTO..... | 25 |
| FIGURA 5 - | REDE DE kDNA..... | 26 |
| FIGURA 6 - | DIFERENTES ARRANJOS DO CINETOPLASTO DE <i>T. cruzi</i> | 28 |
| FIGURA 7 - | REPLICAÇÃO DO kDNA..... | 30 |
| FIGURA 8 - | ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DOS VETORES UTILIZADOS PARA O NOCAUTE DO GÊNE <i>Tckap3</i> | 49 |
| FIGURA 9 - | REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS GENES ENOLASE, KAP3, NEO, HIGRO E CDK..... | 52 |
| FIGURA 10 - | COMPARAÇÃO ENTRE AS SEQÜÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DOS ALELOS DO GENE <i>KAP3</i> DE <i>T. cruzi</i> DM28C E CL BRENER..... | 60 |
| FIGURA 11 - | COMPARAÇÃO ENTRE AS SEQÜÊNCIAS DE KAP3 EM DIFERENTES TRIPANOSOMATÍDEOS..... | 62 |
| FIGURA 12 - | SINTENIA DE <i>Tckap3</i> COM OUTROS TRIPANOSOMATÍDEOS..... | 63 |
| FIGURA 13 - | LOCALIZAÇÃO DO MINI-EXON DE <i>Tckap3</i> | 64 |
| FIGURA 14 - | COMPARAÇÃO ENTRE AS PRÉ-SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DAS PROTEÍNAS ASSOCIADAS AO CINETOPLASTO (KAPS) DE <i>C. fasciculata</i> | 65 |
| FIGURA 15 - | COMPARAÇÃO ENTRE AS SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DE CfKAP3 E TcKAP3..... | 65 |
| FIGURA 16 - | ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE <i>Tckap3</i> NAS DIFERENTES FORMAS EVOLUTIVAS DE <i>T. cruzi</i> | 66 |
| FIGURA 17 - | IMUNOLocalização DE TcKAP3 EM EPIMASTIGOTAS DE <i>T. cruzi</i> | 68 |
| FIGURA 18 - | ENSAIOS DE PCR UTILIZANDO DNA DE <i>T. cruzi</i> ^{KAP3+} (WT) E <i>T. cruzi</i> ^{ΔKAP3::NEO/HIGRO} (NO) COM DIFERENTES PRIMERS..... | 71 |
| FIGURA 19 - | REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS SÍTIOS DA ENZIMA <i>KpnI</i> NO LOCUS DO GENE <i>KAP3</i> DE <i>T. cruzi</i> CL Brener..... | 72 |
| FIGURA 20 - | ANÁLISE DA ORGANIZAÇÃO DOS GENES <i>TCKAP3</i> , <i>NEO</i> E <i>HIGRO</i> POR ENSAIO DO TIPO SOUTHERN BLOT..... | 75 |

| | | |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 21 - | ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE <i>Tckap3</i> POR ENSAIO DO TIPO <i>NORTHERN BLOT</i> | 77 |
| FIGURA 22 - | COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE <i>TcKAP3</i> POR WESTERN BLOT..... | 78 |
| FIGURA 23 - | ESQUEMA MOSTRANDO O GENE DA ENOLASE E OS PRIMERS UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DE SEU FRAGMENTO QUE FOI SUBMETIDO A SEQUENCIAMENTO..... | 79 |
| FIGURA 24 - | COMPARAÇÃO ENTRE AS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO GENE DA ENOLASE DO <i>T. cruzi</i> DM28C (KAP3+) E DO <i>T. cruzi</i> NOCAUTEADO (Δ KAP3::NEO/HIGRO)..... | 80 |
| FIGURA 25 - | COMPARAÇÃO DA SEQÜÊNCIA PARCIAL DE AMINOÁCIDOS DA ENOLASE DE <i>T. cruzi</i> DM28C TIPO SELVAGEM E <i>T. cruzi</i> NOCAUTEADO (Δ KAP3::NEO/HIGRO)..... | 81 |
| FIGURA 26 - | COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DA ENOLASE..... | 82 |
| FIGURA 27 - | COLORAÇÃO PELO MÉTODO PANÓTICO RÁPIDO, DOS PARASITAS NOCAUTEADOS..... | 83 |
| FIGURA 28 - | COMPARAÇÃO ENTRE A ULTRAESTRUTURA DO CINETOPLASTO DO <i>T. cruzi</i> DM28C TIPO SELVAGEM (A) E DO MUTANTE DE <i>T. cruzi</i> PARA <i>Tckap3</i> (B) POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO..... | 84 |
| FIGURA 29 - | CURVA DE CRESCIMENTO DO MUTANTE DE <i>T. cruzi</i> PARA <i>Tckap3</i> (Δ kap3::neo/higro) E DO <i>T. cruzi</i> DM28C SELVAGEM (KAP3+)..... | 85 |
| FIGURA 30 - | METACICLOGÊNESE <i>IN VITRO</i> DE <i>T. cruzi</i> DM28C TIPO SELVAGEM E <i>T. cruzi</i> NOCAUTEADO..... | 86 |
| FIGURA 31 - | INFECÇÃO DE CÉLULAS VERO COM O MUTANTE DE <i>T. cruzi</i> PARA <i>Tckap3</i> | 87 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| TABELA 1 - | RELAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DOS GENES NEO E HIGRO.....46 |
| TABELA 2 - | RELAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA A CLONAGEM DA REGIÃO UPSTREAM DE <i>TcKAP3</i> NO VETOR PKS-NEO.....47 |
| TABELA 3 - | RELAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA A CLONAGEM DA REGIÃO DOWNSTREAM DE <i>TcKAP3</i> NO VETOR PKS-NEO.....48 |
| TABELA 4 - | RELAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA A CLONAGEM DA REGIÃO UPSTREAM DE <i>TcKAP3</i> NO VETOR PKS-HIGRO.....48 |
| TABELA 5 - | RELAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA A CLONAGEM DA REGIÃO DOWNSTREAM DE <i>TcKAP3</i> NO VETOR PKS-HIGRO.....48 |

SUMÁRIO

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> e Doença de Chagas..... | 14 |
| 1.2 Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> | 16 |
| 1.3 Aspectos celulares de <i>T. cruzi</i> | 18 |
| 1.4 O genoma de <i>T. cruzi</i> | 21 |
| 1.5 Expressão gênica de <i>Trypanosoma cruzi</i> | 22 |
| 1.6 Cinetoplasto..... | 24 |
| 1.6.1 Histórico..... | 24 |
| 1.6.2 Organização do kDNA..... | 24 |
| 1.6.3 A rede de kDNA..... | 26 |
| 1.6.4 Replicação da rede de kDNA..... | 28 |
| 1.7 Proteínas associadas ao cinetoplasto (KAPs)..... | 30 |
| 2. OBJETIVOS..... | 32 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 33 |
| 3.1 Reagentes e Soluções Utilizados..... | 33 |
| 3.1.1 Reagentes..... | 33 |
| 3.1.2 Tampões e Soluções..... | 34 |
| 3.1.3 Meios de cultura..... | 36 |
| 3.2 Cultivo do <i>Trypanosoma cruzi</i> | 36 |
| 3.2.1 Epimastigotas..... | 36 |
| 3.2.2 Tripomastigotas metacíclicos..... | 36 |
| 3.2.3 Tripomastigotas de cultura de células..... | 37 |
| 3.2.4 Amastigotas..... | 38 |
| 3.3 Curva de crescimento de <i>T. cruzi</i> | 38 |
| 3.4 Obtenção de DNA de <i>T. cruzi</i> | 38 |
| 3.5 Obtenção de RNA de <i>T. cruzi</i> | 39 |
| 3.6 Obtenção de extrato proteico de <i>T. cruzi</i> | 39 |
| 3.7 Clonagem do gene <i>Tckap3</i> | 40 |
| 3.8 Obtenção do cDNA de <i>Tckap3</i> através de ensaio de RT-PCR..... | 40 |
| 3.9 Clonagem dos genes que codificam as enzimas GAPDH e ENOLASE de <i>T. cruzi</i> | 41 |
| 3.10 Seleção dos clones recombinantes..... | 43 |
| 3.10.1 Técnica de palitagem (toothpick)..... | 43 |
| 3.10.2 Técnica de PCR de colônia..... | 43 |
| 3.11 Preparação de plasmídeo em pequena escala (miniprep)..... | 43 |
| 3.12 Expressão e purificação da TcKAP3, GAPDH e enolase de <i>T. cruzi</i> | 44 |
| 3.13 Obtenção de antisoro policlonal contra TcKAP3, GAPDH e enolase..... | 45 |
| 3.14 Análise da expressão do gene <i>Tckap3</i> por ensaio tipo western blot..... | 45 |
| 3.15 Deleção do gene <i>Tckap3</i> por nocaute gênico..... | 46 |
| 3.15.1 Amplificação e clonagem dos genes <i>npt</i> e <i>hph</i> | 46 |
| 3.15.2 Amplificação e clonagem das regiões a montante e a jusante do gene <i>Tckap3</i> | 47 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.15.3 Amplificação dos cassetes UPS-NEO-DOWN e UPS-HIGRO-DOWN para transfecção de <i>T. cruzi</i> | 50 |
| 3.15.4 Transfecção do <i>T. cruzi</i> com o cassete ups-neo-down..... | 50 |
| 3.15.5 Extração de DNA dos transfectantes..... | 51 |
| 3.15.6 Análise por PCR do DNA dos parasitas transfectados com o cassete NEO..... | 51 |
| 3.15.7 Transfecção do <i>T. cruzi</i> com o cassete ups-higro-down..... | 53 |
| 3.15.8 Análise por PCR do DNA dos parasitas transfectados com o cassete ups higro-down..... | 53 |
| 3.16 Análise da organização do gene <i>Tckap3</i> e da eficiência de seu nocaute através de ensaios tipo Southern blot..... | 54 |
| 3.17 Análise da expressão do gene <i>Tckap3</i> por ensaio tipo northern blot..... | 55 |
| 3.18 Localização celular da proteína TcKAP3 através de ensaio de imunofluorescência..... | 55 |
| 3.19 Análise da ultraestrutura do cinetoplasto do mutante de <i>T. cruzi</i> para <i>Tckap3</i> por microscopia eletrônica de transmissão..... | 56 |
| 3.20 Coloração dos parasitas transfectados..... | 56 |
| 3.21 Infecção de células Vero com o mutante de <i>T. cruzi</i> para <i>Tckap3</i> | 57 |
| 3.22 Coloração das células Vero infectadas usando método de GIEMSA..... | 57 |
| 4. RESULTADOS..... | 59 |
| 4.1 Clonagem e caracterização do gene <i>Tckap3</i> | 59 |
| 4.2 Análise da expressão de <i>Tckap3</i> | 66 |
| 4.3 Localização celular de <i>Tckap3</i> através de ensaio de imunofluorescência..... | 66 |
| 4.4 Deleção do gene <i>Tckap3</i> por nocaute gênico..... | 69 |
| 4.4.1 Análise por PCR do DNA dos parasitas transfectados com os cassetes UPS-NEO-DOWN e UPS-HIGRO-DOWN..... | 69 |
| 4.4.2 Análise da organização dos genes <i>Tckap3</i> , <i>neo</i> e <i>higro</i> por ensaio do tipo southern blot..... | 72 |
| 4.5 Análise da expressão do gene <i>tckap3</i> por northern blot..... | 76 |
| 4.6 Comparação da expressão do gene <i>Tckap3</i> por western blot..... | 78 |
| 4.7 Análise da expressão do gene da enolase (eno)..... | 79 |
| 4.8 Análise da morfologia e da ultraestrutura do cinetoplasto do mutante de <i>T. cruzi</i> para <i>Tckap3</i> | 82 |
| 4.9 Multiplicação, diferenciação e infectividade do mutante de <i>T. cruzi</i> para <i>Tckap3</i> | 85 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 88 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 93 |
| REFERÊNCIAS..... | 94 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, é um protozoário flagelado, eucarionte e heteroxênico, ou seja, possui mais de um hospedeiro: (1) o hospedeiro invertebrado (insetos da família Triatominae, principalmente *Rhodnius prolixus* e *Triatoma infestans*, popularmente conhecidos como barbeiros e (2) o hospedeiro vertebrado (diversos mamíferos, entre eles o homem). Além disso, é um dos modelos parasitários mais estudados no mundo, não apenas em função da relevância associada à moléstia, como também devido à sua posição na escala evolutiva, como um dos mais antigos organismos eucarióticos conhecidos.

Este protozoário pertence à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae. A principal característica dessa ordem é a presença de uma estrutura singular, o cinetoplasto, que abriga em uma massa de DNA extranuclear concentrado na mitocôndria única deste protista (MOREIRA *et al.*, 2004). A família Trypanosomatidae inclui os seguintes gêneros importantes: *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Endotrypanum*, *Herpetomonas*, *Leishmania*, *Leptomonas*, *Phytomonas* e *Trypanosoma*. O gênero *Trypanosoma* é um dos mais importantes dentro da família Trypanosomatidae por incluir uma série de espécies causadoras de doenças humanas importantes como o *Trypanosoma cruzi*, agente da doença de Chagas; *Trypanosoma rhodesiense* e *Trypanosoma gambiense*, agentes da doença do sono; e de animais o *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma equiperdum* e *Trypanosoma equinum*.

A primeira descrição do *T. cruzi*, em 1909, no estado de Minas Gerais, por Carlos Chagas, descreveu além do agente causador, o transmissor e o modo de transmissão da doença e comprovou a existência de vertebrados que são reservatórios silvestres e domésticos do parasita, esclarecendo assim os aspectos básicos da epidemiologia da doença (CHAGAS, 1909).

A transmissão natural da Doença de Chagas é a vetorial, que consiste na transmissão do *T. cruzi* através do inseto-vetor hematófago. Existem dois ciclos de

transmissão vetorial: o doméstico e o silvestre (BRENER *et al.*, 2000). O doméstico caracteriza-se pela introdução do *T. cruzi* em ambientes de urbanização e o silvestre pela circulação do parasita entre os hospedeiros vertebrados e invertebrados em um ambiente silvático. Porém, a transmissão também pode ocorrer por transfusão sanguínea ou transplacentária (TEIXEIRA *et al.*, 2006).

Distribuída pelas Américas desde os EUA até a Argentina (FIGURA 1), a Doença de Chagas compreende, basicamente, duas fases: a fase aguda e a fase crônica. Na fase aguda apresenta-se alta parasitemia e pode ocorrer febre, mal estar e edemas e na fase crônica ocorrem manifestações cardíacas (cardiopatia) ou digestivas (esofagia e colopatia, principalmente) As características de cada fase, dependem de diversos fatores ligados ao *T. cruzi*, como cepa, virulência e tamanho do inóculo e ao homem como idade, sexo e etnia (COURA & CASTRO, 2002).

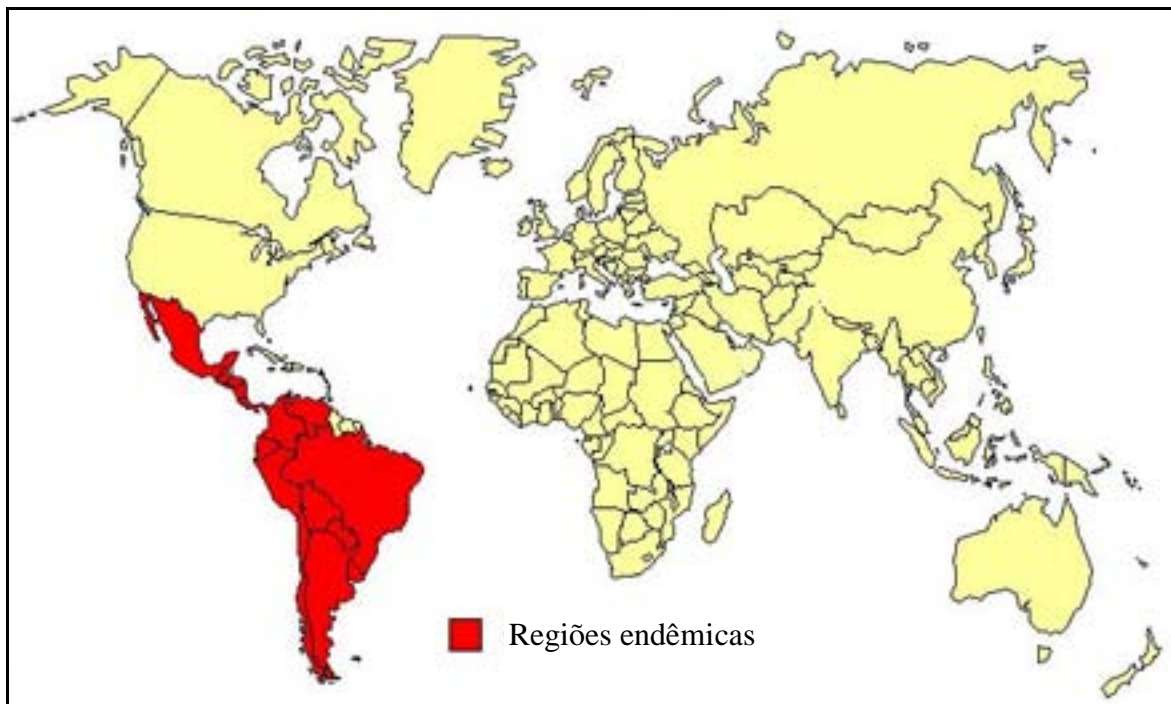


FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA DOENÇA DE CHAGAS

FONTE: Modificado de: <http://www.who.int/en/>

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a prevalência da infecção humana por *T. cruzi* é estimada em 16 a 18 milhões de casos na América Latina com mais de 60 milhões de pessoas sob risco de transmissão. Entretanto, Dias (2007) estima que este número seja em torno de 12-14 milhões de indivíduos na América Latina e em alguns países da Europa e América do Norte, estes na maioria das vezes resultantes de migração. Apesar de existirem drogas (Nifurtimox e Benzonidazol) para o tratamento da doença, sua ineficácia no estágio crônico e sua ação tóxica acabam prejudicando o paciente, sem conseguir eliminar o parasita (BRENER *et al.*, 2000).

Com isso, vem a importância do desenvolvimento de pesquisas sobre a biologia básica e a patogênese da doença, voltadas para a melhoria do tratamento.

1.2 Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* possui um ciclo de vida complexo entre um hospedeiro vertebrado (mamífero) e um hospedeiro invertebrado (inseto), sofrendo mudanças estruturais, bioquímicas e morfológicas, de acordo com o ambiente em que se encontra. No hospedeiro invertebrado estão caracterizadas duas formas: epimastigota (forma replicativa não infectiva) e tripomastigota metacíclica (forma infectiva não replicativa). Por sua vez, no hospedeiro vertebrado, o *Trypanosoma cruzi* apresenta-se em duas formas bem distintas e caracterizadas: amastigota (forma replicativa intracelular) e tripomastigota (forma infectiva não replicativa) (FIGURA 2) (DE SOUZA, 1999).

O ciclo no hospedeiro vertebrado se inicia quando o inseto vetor, durante seu repasto sanguíneo, elimina junto com as fezes e urina formas tripomastigotas metacíclicas, que podem infectar células da pele ou mucosas do mamífero. Logo que o parasita se adere à célula hospedeira, ocorre uma série de modificações na membrana em ambas as células. Ao mesmo tempo acontece o recrutamento dos lisossomos no sítio de entrada do protozoário. Os lisossomos se fusionam, envolvem o parasita e formam o vacúolo parasitóforo. No interior das células, os parasitas diferenciam-se em amastigotas e rompem a membrana do vacúolo parasitóforo, invadindo o citoplasma da célula hospedeira. Após sucessivas divisões no citoplasma, as formas amastigotas se diferenciam em tripomastigotas e as células hospedeiras rompem, liberando os

parasitas na corrente sanguínea (tripomastigotas sanguíneas) (DE CARVALHO & DE SOUZA 1989; ANDREWS *et al.*, 1990).

O ciclo no hospedeiro invertebrado se inicia quando o inseto vetor, durante seu repasto sanguíneo, ingere formas tripomastigotas sanguíneas, que ao chegarem no trato digestivo do inseto se diferenciam em epimastigotas. Após diversas divisões por fissão binária, os parasitas migram para a porção posterior do intestino, onde após adesão às células do epitélio intestinal, se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas, formas não replicativas capazes de infectar o hospedeiro vertebrado (DE SOUZA, 2002).

A transformação da forma epimastigota do *T. cruzi* em tripomastigota metacíclica, denominada metaciclogênese, é de grande interesse de estudo, pois neste processo ocorrem diversas alterações morfológicas, metabólicas e de expressão gênica (GOLDENBERG *et al.*, 1985). A metaciclogênese, que ocorre naturalmente no intestino do inseto vetor, pode ser mimetizada *in vitro* utilizando-se meio quimicamente definido que simula as condições da urina do inseto vetor (CONTRERAS *et al.*, 1985).

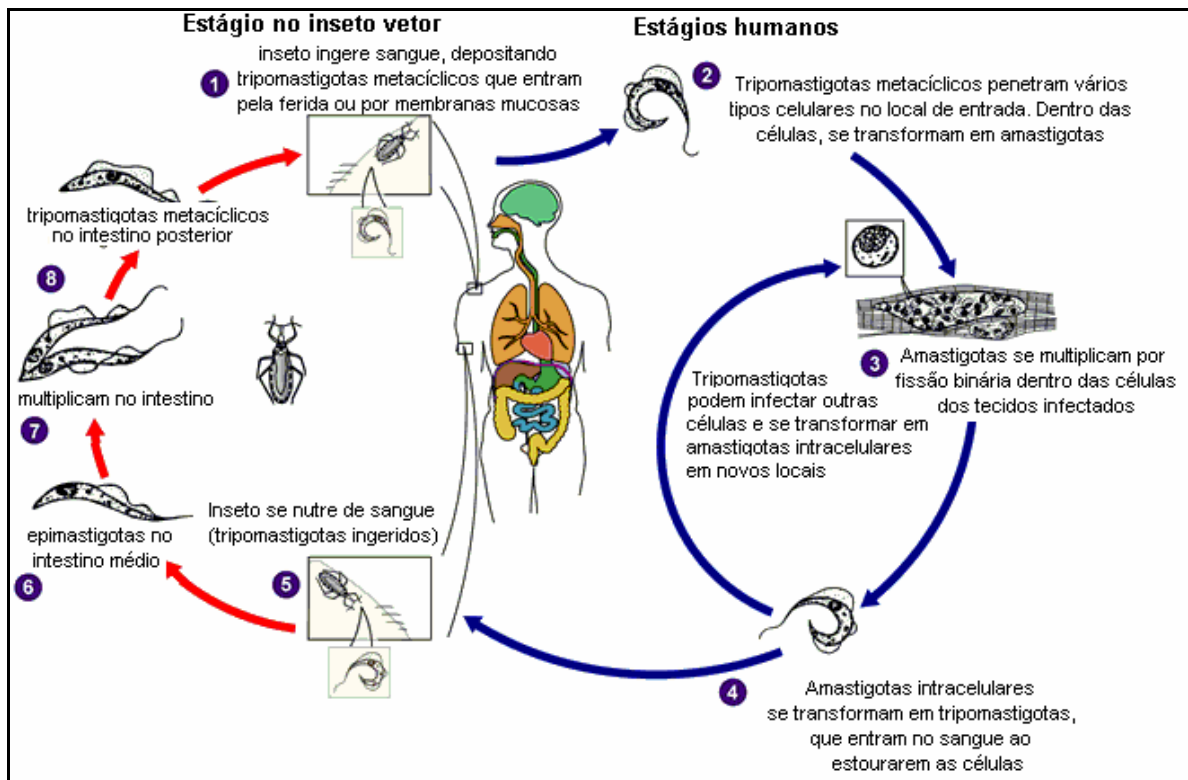


FIGURA 2 - CICLO DE VIDA DO *Trypanosoma cruzi*
 FONTE: Modificado de www.dpd.cdc.gov/dpdx

1.3 Aspectos celulares de *T. cruzi*

O *Trypanosoma cruzi*, apresenta, além das organelas típicas da maioria das células eucarióticas, como núcleo, retículo endoplasmático, aparato de Golgi e mitocôndria, algumas estruturas peculiares (FIGURA 3), como os microtúbulos subpeliculares, a estrutura paraflagelar, os reservossomos, o cinetoplasto, os glicosossomos e os acidocalcisomos (revisto por DE SOUZA, 1984, 1999, 2002).

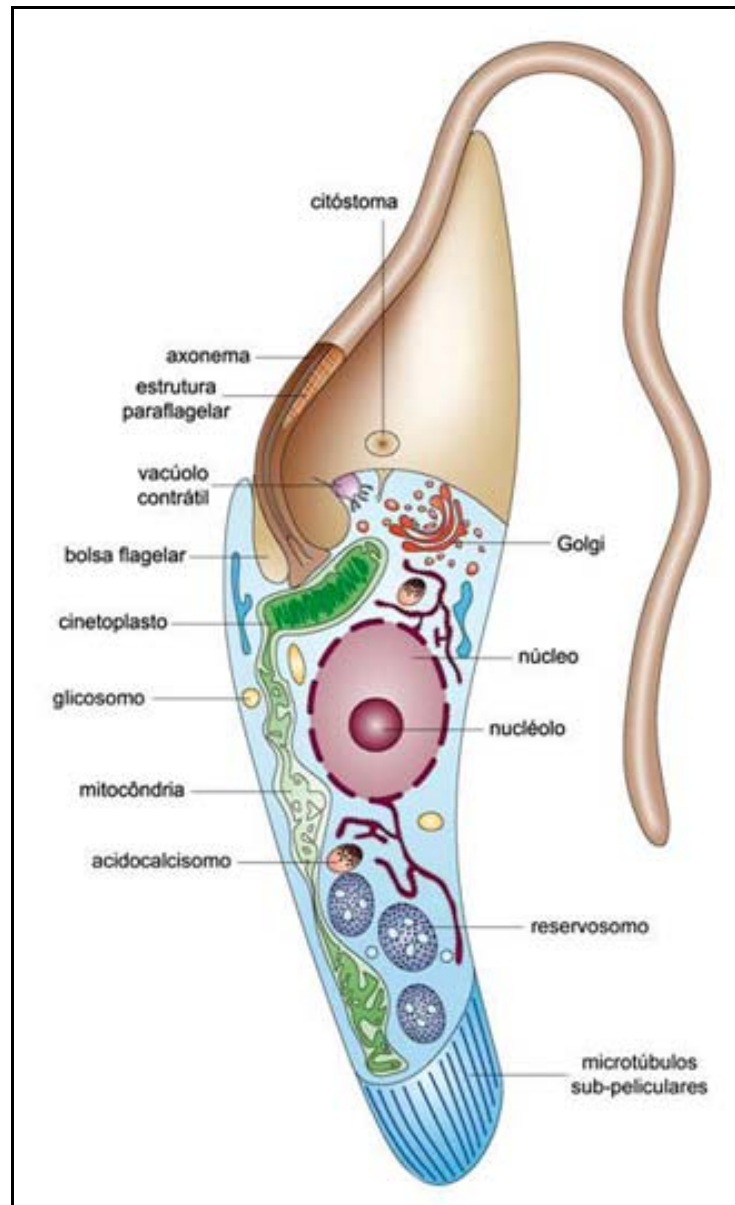


FIGURA 3 - ESQUEMA GERAL DAS PRINCIPAIS ESTRUTURAS CELULARES DE *T. cruzi*
 FONTE: DOCAMPO *et al.*, 1975.

A superfície celular dos tripanosomatídeos é composta pela membrana plasmática e logo abaixo dela encontra-se uma camada de microtúbulos subpeliculares, os quais estão distribuídos por todo o corpo do protozoário, exceto na região de ligação do flagelo ao corpo celular e na região da bolsa flagelar (DE SOUZA, 1984, 1999, 2002), conferindo rigidez à célula e resistência ao rompimento mecânico.

Todos os membros da família Trypanosomatidae apresentam um flagelo, que emerge de uma área de invaginação da membrana plasmática conhecida como bolsa

flagelar. Devido à localização específica de vários receptores nesta área, acredita-se que a maior parte do tráfego vesicular e entrada de nutrientes ocorram nesta região. Outra invaginação menor, localizada próxima à bolsa flagelar, o citóstomo, também está envolvida com a absorção de nutrientes (PORTO-CARREIRO *et al.*, 2000). O flagelo do *T. cruzi* apresenta uma estrutura básica semelhante a outros flagelos, sendo envolvido por uma membrana flagelar e contendo um axonema típico, que apresenta um padrão de nove pares de microtúbulos periféricos e um par central. Associado ao flagelo deste parasita é encontrado um complexo arranjo de filamentos protéicos, denominado de estrutura paraflagelar (revisto por GULL, 1999).

Na parte posterior da célula, existem organelas usualmente esféricas denominadas reservossomos. Os reservossomos são organelas ácidas que possuem em seu interior proteinases principalmente a cruzipaina (uma cisteíno-proteinase) e proteínas ingeridas, que chegam dentro de vesículas endocíticas, oriundas da bolsa flagelar e do citóstomo. Com base nisso foi proposto que os reservossomos seriam compartimentos pré-lisossomais (SOARES *et al.*, 1992). Também tem sido proposta a participação dos reservossomos no processo de metaciclogênese, como principal fonte de energia para esta atividade (SOARES, 1999).

O *T. cruzi*, assim como todos os membros da família Tripanosomatidae, apresenta uma mitocôndria única e ramificada que se estende por todo o corpo do protozoário. Como em todas as células eucarióticas, a mitocôndria dos tripanosomatídeos também apresenta DNA mitocondrial, também conhecido como kDNA ou DNA do cinetoplasto, que se concentra em uma determinada região da mitocôndria localizada logo abaixo do corpúsculo basal, dando origem a uma estrutura intramitocondrial chamada de cinetoplasto. O cinetoplasto abriga o kDNA, o qual é constituído por moléculas circulares que se encontram interligadas formando uma extensa rede entre si (SHLOMAI, 1994).

Distribuídos pelo citoplasma estão os glicossomos, um tipo especializado de peroxissomo. Estes acumulam enzimas da via glicolítica, envolvidas na conversão da glicose a 3-fosfoglicerato, que em outros organismos, localizam-se no citoplasma (HANNAERT *et al.*, 2003).

Outra particularidade dos tripanossomatídeos está na estocagem intracelular de cálcio. Este íon, importante nos processos de sinalização celular, é estocado em organelas denominadas acidocalcissomos. Os acidocalcissomos provavelmente estão envolvidos em diversos processos biológicos, tais como o armazenamento de cálcio e polifosfatos, adaptação dos tripanosomatídeos a condições de estresse ambiental, manutenção do pH intracelular e osmorregulação (revisto por DOCAMPO *et al.*, 2005).

1.4 O genoma de *T. cruzi*

O genoma de *T. cruzi* é referente à cepa CL-Brener, por ser bem caracterizada experimentalmente (ZINGALES *et al.*, 1997) e seu tamanho está em torno de 106,4 – 110,7 Mb maior do que foi descrito anteriormente pela técnica de eletroforese em campo pulsante (*Pulsed-field gel electrophoresis*, PFGE).

Análises demonstram que o genoma diplóide contém cerca de 22.570 genes. No entanto, cerca de 50% do genoma consiste em sequências repetitivas, basicamente constituídas por grandes famílias gênicas, como por exemplo, as proteínas de superfície, retrotransposons e repetições subteloméricas (EL-SAYED *et al.*, 2005).

A comparação das estruturas genômicas e proteínas preditas, obtidas a partir do sequenciamento, de *Trypanosoma cruzi* com as de *Leishmania major* e *Trypanosoma brucei* indica mais similaridade entre *T. cruzi* e *T. brucei*, uma grande conservação entre os respectivos proteomas (exceto para antígenos de superfície) e uma sintenia bastante conservada entre os três tripanosomatídeos, apesar da divergência há 200-500 milhões de anos atrás (BERRIMAN *et al.*, 2005; EL SAYED *et al.*, 2005; IVENS *et al.*, 2005). Os tripanosomatídeos possuem, além do genoma nuclear, um grande genoma mitocondrial (kDNA), que tem sido extensivamente estudado, sendo único em estrutura, função e mecanismo de replicação. O kDNA é formado por milhares de moléculas circulares, topologicamente relaxadas e interligadas umas as outras. Este arranjo contém aproximadamente 20 - 30% do DNA total dos tripanosomatídeos e é composto por 2 tipos de moléculas circulares: os maxicírculos e os minicírculos. Os maxicírculos apresentam um tamanho entre 22-37 kb e contém basicamente os genes codificadores de proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa e

RNA ribossômico. Os minicírculos, com um tamanho que varia de espécie para espécie (0,5 a 2,5 kb), contém os genes que codificam os RNAs guia envolvidos na editoração do RNA (STUART *et al.*, 1989; SHAPIRO & ENGLUND, 1995; MADISON-ANTENUCCI, *et al.*, 2002; SIMPSON *et al.*, 2003; ONN *et al.*, 2006; GLUENZ *et al.*, 2007).

1.5 Expressão gênica de *Trypanosoma cruzi*

A expressão gênica de *T. cruzi* é regulada por diversos fatores, já que o mesmo está sujeito às constantes mudanças de ambientes decorrentes da passagem por diferentes hospedeiros durante seu ciclo de vida (temperatura, pH, quantidade de nutrientes, evasão do sistema imune). Com isso, vem a importância de uma adaptação rápida e eficiente do parasita a estas diferentes condições.

O *T. cruzi*, como os demais eucariotos, apresenta três RNAs polimerases: a RNA polimerase I, transcreve os genes para RNAs ribossômicos; a RNA polimerase II, os genes que codificam proteínas e a RNA polimerase III, pequenos RNAs, como o tRNA (RNA de transferência). Nos tripanosomatídeos, promotores para as RNA polimerase I e III já foram identificados, porém ainda não foram identificados promotores para os genes transcritos pela RNA polimerase II, com exceção de um promotor associado ao gene do mini-exon (GILLINGER & BELLOFATTO, 2001; revisto por CAMPBELL *et al.*, 2003).

Os genes dos tripanosomatídeos estão organizados em unidades policistrônicas e não apresentam interrupções por íntrons, com exceção do gene da poli-A polimerase (MAIR *et al.*, 2000).

Uma vez que em *T. cruzi*, como nos demais eucariotos, somente mRNAs monocistrônicos são traduzidos, os precursores de mRNA policistrônicos devem ser processados até mRNAs individuais. Como característica desta família, os transcritos de mRNA são processados por mecanismos de *trans-splicing* (AGABIAN, 1990) e poliadenilação (LEBOWITZ *et al.*, 1993; MATTHEWS *et al.*, 1994; VANHAMME & PAYS, 1995).

No processo de *trans-splicing*, as unidades codificadoras são separadas e é adicionada na extremidade 5' uma sequência extremamente conservada, espécie-

específica, de 39 nucleotídeos, denominada seqüência líder (SL) ou miniéxon (McCARTHY-BURKE *et al.*, 1989; NILSEN, 1992; VANHAMME & PAYS, 1995). Nesta reação, participam duas moléculas de RNA, uma doadora e outra aceptora. A doadora é um precursor do mini-exon, e, em *T. cruzi*, possui cerca de 110 nucleotídeos (ZWIERZYNSKI & BUCK, 1991). A aceptora é o transcrito derivado da unidade policistrônica ao qual o mini-exon é transferido. O complexo enzimático envolvido nesta reação é semelhante ao descrito para a de *cis-splicing* (LAIRD, 1989).

Os transcritos processados são estabilizados pela estrutura cap 4 do mini-exon (ULLU & TSCHUDI, 1991) e pela adição de uma cauda poli-A, à extremidade 3', sendo que a adição de ambos os elementos ocorrem em conjunto (LEBOWITZ *et al.*, 1993). Regiões ricas em resíduos de pirimidinas, além da seqüência consenso (AG) para o *trans-splicing*, regulam a adição do mini-exon e da cauda poli-A. Deleções nestas regiões impedem o correto processamento destes transcritos (MATTHEWS *et al.*, 1994).

A ocorrência de transcrição policistrônica, associada à ausência de promotores para RNA polimerase II e à presença de níveis distintos de mRNA originados de uma mesma unidade policistrônica, sugerem que a regulação da expressão gênica nesses protozoários ocorra a nível pós-transcricional, baseada, principalmente, em mecanismos que controlam a estabilidade e a tradução dos mRNAs (CLAYTON, 2002; BOUCHER *et al.*, 2002).

1.6 Cinetoplasto

1.6.1 Histórico

Os primeiros indícios da existência do cinetoplasto surgiram há mais de 100 anos quando Ziemann (1898), através de técnicas de coloração da época, observou tal estrutura localizada próxima à base do flagelo dos tripanosomas.

O cinetoplasto caracteriza-se por apresentar um caráter ácido (STEINERT *et al.*, 1958), devido à alta concentração de DNA encontrada em seu interior. Porém, esta estrutura só passou a ser conhecida por esse nome a partir de 1917, quando foi nomeada por Alexeieff. O nome cinetoplasto vem de *cineto*=movimento e *plasto*=organela. Este nome foi dado, pois, acreditava-se que o mesmo fosse responsável pelo movimento do flagelo. Porém, foi nos anos 60, depois dos primeiros estudos com microscopia eletrônica, que a configuração molecular do cinetoplasto foi elucidada (revisto por SHAPIRO & ENGLUND, 1995; MASLOV *et al.*, 2001).

Atualmente, já é possível afirmar que, o cinetoplasto caracteriza-se por ser uma estrutura peculiar, inserida no interior da mitocôndria única e ramificada, a qual se estende por todo o corpo celular dos tripanosomatídeos abrigando fibrilas de DNA, conhecidas como kDNA.

1.6.2 Organização do kDNA

A estrutura do kDNA vista sob a forma de uma rede de moléculas concatenadas entre si, nem sempre é observada nos diferentes organismos pertencentes à ordem Kinetoplastida.

Na década de 70, estudos com microscopia eletrônica já mostravam que em algumas espécies o kDNA encontrava-se disperso através da matriz mitocondrial, ao invés de estar condensado em uma região, como é encontrado nas espécies que apresentam uma rede de kDNA. Isto ficou mais claro, nas décadas seguintes, quando estudos revelaram que o kDNA de *Bodo caudatus*, protozoário flagelado de vida livre, pertencente à ordem Kinetoplastida, continha minicírculos que não eram concatenados

(HAJDUK *et al.*, 1986). Mais recentemente o trabalho de LUKES *et al.*, (2002) mostrou diversos outros cinetoplastídeos que apresentam diferentes padrões de organização (FIGURA 4).

Na figura 4A, o kDNA de *Bodo caudatus* e de espécies do gênero *Cryptobia* se distribui através da matriz mitocondrial, recebendo o nome de pancinetoplasto. Logo, na figura 4B o kDNA de espécies do gênero *Dimastigella* está distribuído como grânulos distintos pelo lúmen da mitocôndria, sendo denominado de policinetoplasto. A figura 4C mostra o kDNA dos tripanosomatídeos e de seu ancestral, o protozoário de vida livre *Bodo saltans*, concentrado como uma única massa próxima ao flagelo, conhecido como eucinetoplasto.

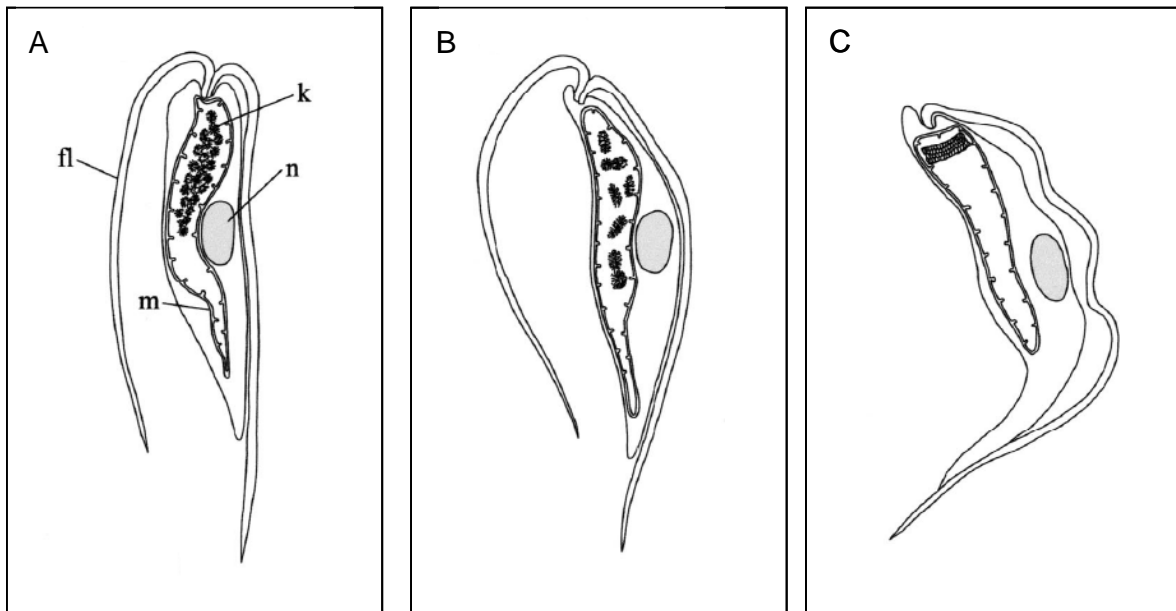


FIGURA 4 - DIFERENTES PADRÕES DE ORGANIZAÇÃO DO CINETOPLASTO

LEGENDA: Nesta ilustração estão demonstrados os diferentes padrões de organização do cinetoplasto: A) kDNA disperso ao longo da matriz mitocondrial (pancinetoplasto). B) kDNA disperso sob a forma de grânulos (policinetoplasto). C) kDNA concentrado próximo ao flagelo (eucinetoplasto). m mitocôndria, fl: flagelo, k: cinetoplasto e n: núcleo.

FONTE: Modificado de LUKES *et al.*, 2002.

1.6.3 A rede de kDNA

Os tripanosomatídeos possuem, como descrito anteriormente, além do genoma nuclear, um grande genoma mitocondrial (kDNA), que tem sido extensivamente estudado, sendo único em estrutura, função e mecanismo de replicação.

O DNA do cinetoplasto, ou kDNA, apresenta um arranjo raro de moléculas circulares, topologicamente relaxadas e interligadas umas as outras. Este arranjo contém aproximadamente 20 a 30% do DNA total dos tripanosomatídeos e é composto por moléculas circulares concatenadas, denominadas de minicírculos e maxicírculos. Aproximadamente 10.000 minicírculos e 50 maxicírculos estão concatenados entre si formando uma única rede com a matriz do cinetoplasto (SHAPIRO & ENGLUND, 1995) (FIGURA 5).

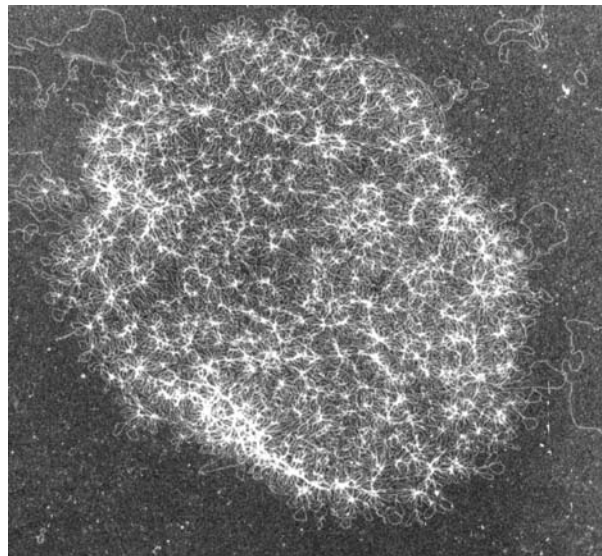


FIGURA 5 - REDE DE kDNA

FONTE: <http://www.ebi.ac.uk/parasites/kDNA/Source.html>.

No início da década de 80 surgiram as primeiras questões relacionadas ao arranjo das moléculas na rede do kDNA dos tripanosomatídeos, onde foi sugerido que tal organização poderia ter evoluído como um maneira mais eficaz de armazenar uma grande quantidade de material em um pequeno espaço (HAJDUK *et al.*, 1986).

Também foi sugerido que estas moléculas estariam assim organizadas a fim de manter uma mesma segregação durante a divisão celular (BORST, 1991), embora não seja muito provável, pois os bodonídeos, como reportado anteriormente, apresentam suas moléculas não catenadas, indicando que a catenação não está relacionada com a segregação. Entretanto, pode facilitar a interação dos transcritos dos maxicírculos e minicírculos para que ocorra a edição dos mRNAs (SHAPIRO & ENGLUND, 1995).

Os maxicírculos caracterizam-se por apresentar um tamanho de 22 a 37 kb e são considerados análogos ao DNA mitocondrial dos demais eucariontes, pois codificam RNAs ribossomais e diversas proteínas da cadeia respiratória, incluindo subunidades da citocromo oxidase e NADH desidrogenase. Alguns dos transcritos dos maxicírculos são processados para formar mRNAs funcionais, através da edição do RNA (SHAPIRO & ENGLUND, 1995; ONN *et al.*, 2006; GLUENZ *et al.*, 2007).

A edição do RNA ocorre em vários passos conduzidos por pequenos RNAs guias, produzidos pelos minicírculos, e por diversas enzimas que compõem um complexo denominado editossomo. O mecanismo baseia-se em ciclos de inserção e deleção de uridinas em sítios específicos dos RNAs transcritos pelos maxicírculos. Esse processo constitui uma forma de regular pós-transcricionalmente a expressão de genes mitocondriais nas diferentes formas evolutivas do parasita (SIMPSON, 1997; SIMPSON *et al.*, 2000; STUART & PANIGRAHI, 2002; SIMPSON *et al.*, 2003). Os minicírculos caracterizam-se por apresentar um tamanho de 0,5 a 2,5 kb e por transcrever os RNAs guia (gRNA), responsáveis pela especificidade da edição dos mRNAs codificados pelos maxicírculos, por meio de uma seqüência presente na porção central desses gRNAs (BENNE, 1994; STUART *et al.*, 2005). A significância da variação em tamanho e organização entre as espécies ainda não é aparente, contudo a diversidade das seqüências dos minicírculos está correlacionada com a necessidade de mais ou menos edição de mRNA, de cada organismo (STUART, 1991). Apesar desta diversidade, os minicírculos apresentam pelo menos duas regiões conservadas: o dodecâmero GGGGTTGGTGTA, conhecido como seqüência universal dos minicírculos (UMS) e o hexâmero ACGCCC, que correspondem à origem de replicação da fita L (*light*) e da fita H (*heavy*), respectivamente (BIRKENMEYER & RAY, 1986; BIRKENMEYER *et al.*, 1987; RAY, 1989; SHLOMAI, 1994; HINES & RAY, 2008).

Embora o cinetoplasto de todos os tripanosomatídeos seja formado por moléculas circulares relaxadas e catenadas, diferentes arranjos da rede de kDNA podem ser observados entre diferentes estágios do ciclo de vida desses protozoários (Figura 6). Por exemplo, nas formas amastigota (FIGURA 6A) e epimastigota (FIGURA 6B) de *T. cruzi*, as fibrilas de kDNA se apresentam bastante compactadas em forma de bastão. Em tripomastigotas (FIGURA 6C) de *T. cruzi*, a rede de kDNA torna-se menos compacta e a forma em bastão do cinetoplasto dá lugar a uma forma arredondada (DE SOUZA, 1984). Os vários graus de compactação do kDNA em tripanosomatídeos podem estar relacionados com a ação de proteínas que condensam o DNA, como será visto mais adiante.

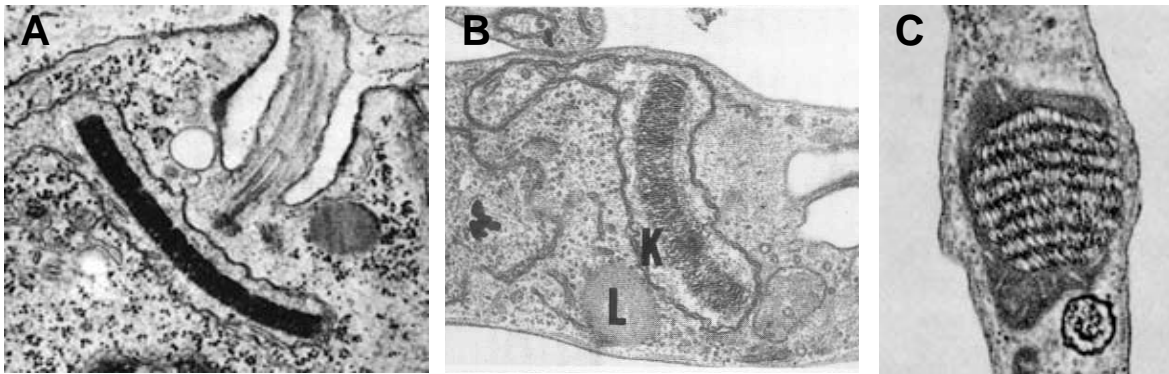


FIGURA 6 – DIFERENTES ARRANJOS DO CINETOPLASTO DE *T. cruzi*

LEGENDA: As fibrilas de kDNA se apresentam bastante compactadas em forma de bastão nas formas amastigotas (A) e epimastigotas (B), enquanto nas formas tripomastigotas a rede de kDNA torna-se menos compacta e a forma em bastão do cinetoplasto dá lugar a uma forma arredondada (C).

FONTE: DE SOUZA & SOUTO-PADRON, 1980 e DE SOUZA, 1984.

1.6.4 Replicação da rede de kDNA

A replicação do kDNA em tripanosomatídeos é restrita a fase S do ciclo celular, ao contrário do que acontece na maioria dos eucariotos, onde a replicação do DNA mitocondrial ocorre ao longo do ciclo celular (LIU *et al.*, 2005).

Os minicírculos não se replicam enquanto estão ligados à rede, por isso são liberados individualmente da rede, pela enzima topoisomerase II, para serem replicados

e retornam para a rede, com a ajuda da mesma enzima, ao término da replicação (SHAPIRO & ENGLUND, 1995).

Ainda antes da replicação, no momento em que são liberados da rede, os minicírculos vão em direção à zona cinetoflagelar (KFZ), uma região especializada da matriz mitocondrial, localizada entre o kDNA e o corpo basal (FIGURA 7), onde são encontradas proteínas que dão início a replicação, são elas: proteínas que se ligam à seqüência universal de minicírculos (UMSBP), primases e polimerases. Estas, juntamente com outras proteínas, geram uma forquilha de replicação que se propaga, unidirecionalmente, ao redor do minicírculo, formando uma estrutura tipo θ intermediária (LIU *et al.*, 2005; GLUENZ *et al.*, 2007).

Após replicação, os minicírculos migram da KFZ para dois complexos proteicos situados nos pólos diametralmente opostos do cinetoplasto, onde acontece a remoção dos *primers*, por endonucleases, o preenchimento de intervalos entre os fragmentos de Ogazaki, pela DNA polimerase β e a união dos cortes (nicks) pela DNA ligase (ENGEL & RAY, 1998; HINES *et al.*, 2001; LIU & ENGLUND, 2007).

Em relação à replicação dos maxicírculos, pouco é conhecido, o que se sabe é que também possuem replicação unidirecional, iniciada em regiões não codificantes, formando estruturas θ (CARPENTER & ENGLUND, 1995).

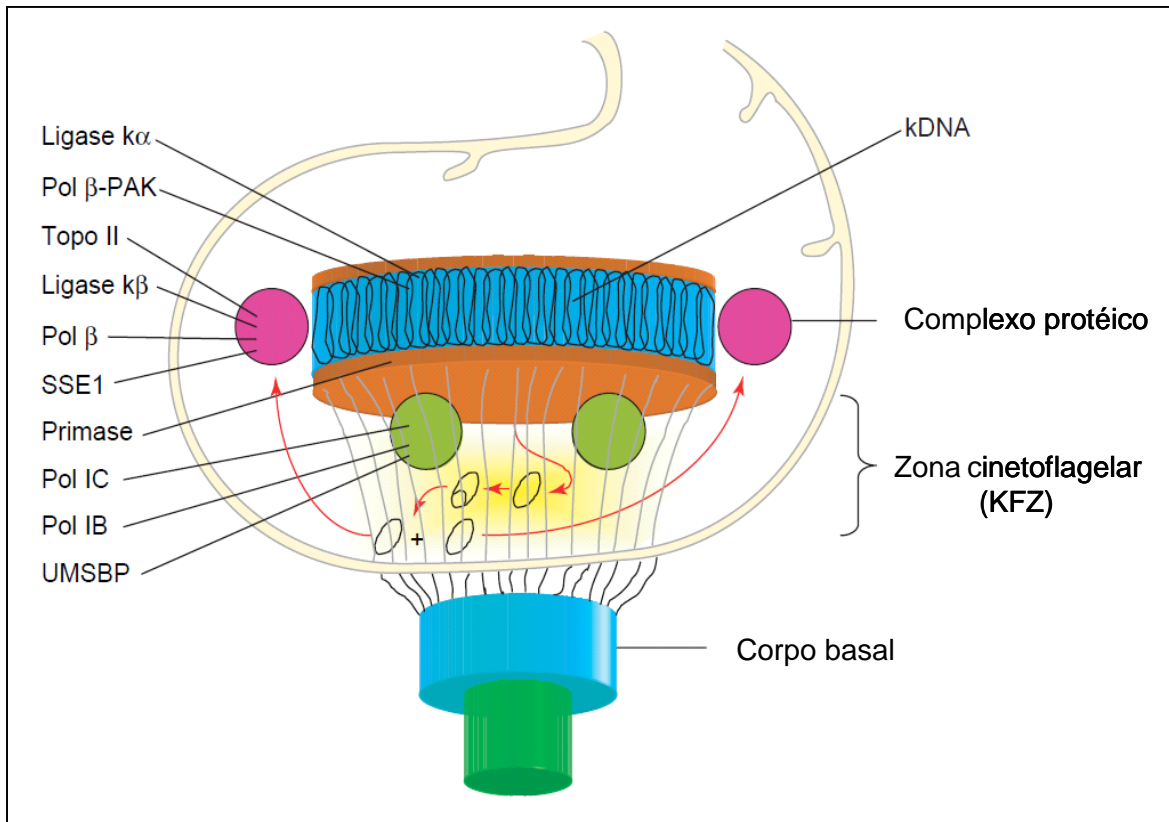


FIGURA 7 - REPLICAÇÃO DO kDNA

LEGENDA: O kDNA encontra-se cercado por proteínas de replicação e os minicírculos replicados migram da KFZ (setas vermelhas) para os complexos proteicos (roxo).

FONTE: Modificado de LIU *et al.*, 2005.

1.7 Proteínas associadas ao cinetoplasto (KAPs)

O genoma mitocondrial (kDNA) dos tripanosomatídeos parece ser compactado por proteínas com características das histonas H1.

As histonas são proteínas solúveis em água, possuem baixa massa molecular e apresentam uma grande percentagem de aminoácidos básicos (lisina e arginina), que interagem com a carga negativa das moléculas de DNA. Estas proteínas formam uma pequena família de proteínas: H1, H2A, H2B, H3 e H4. As proteínas histônicas (H2, H3 e H4) atuam na formação do nucleossomo (estrutura fundamental no acondicionamento da fibra de cromatina dos eucariotos), enquanto que as histonas H1 participam na interação com o DNA *linker* e histonas nucleosomais, auxiliando na compactação da cromatina (ALBERTS *et al.*, 2004).

Proteínas associadas com genoma mitocondrial (KAPs) dos tripanosomatídeos e que compartilham características com histonas H1 foram inicialmente identificadas no cinetoplasto de *C. fasciculata*. Quatro KAPs de *C. fasciculata* foram caracterizadas: CfKAP1, CfKAP2, CfKAP3 e CfKAP4 (XU & RAY, 1993; XU *et al.*, 1996; HINES & RAY, 1998). Particularmente, essas proteínas dispõem de uma pré-sequência clivável de nove aminoácidos, a qual está provavelmente envolvida na importação da proteína para a mitocôndria. Através de ensaios de imunofluorescência foi possível confirmar que estas proteínas estão presentes em toda a rede de kDNA. Pela facilidade encontrada nas KAPs purificadas de condensar a rede de kDNA *in vitro*, sugere-se que estas estejam envolvidas na organização e condensação do kDNA *in vivo* (LUKES *et al.*, 2001).

As técnicas de deleção de genes são uma ótima ferramenta para elucidar as possíveis funções que um gene pode apresentar. Em *C. fasciculata* foi utilizada a técnica de nocaute gênico para o gene *Cfkap1*, onde mutantes viáveis foram obtidos, mostrando que a forma e a dimensão do cinetoplasto não foram alterados ao contrário da organização da rede de kDNA, que passou a apresentar fibrilas de DNA espessas e uma camada elétron-densa no centro do disco. Quando foi realizada a reintrodução do gene na forma episomal o fenótipo normal da rede de kDNA foi restaurado (LUKES *et al.*, 2001). Também foi realizado o duplo nocaute dos genes *Cfkap2* e *Cfkap3*, o qual da mesma maneira produziu mutantes viáveis, porém com o crescimento bastante reduzido, uma redução na respiração e um aumento nos níveis de mRNAs codificados pelos maxicírculos. Apesar de todas estas alterações o kDNA permaneceu inalterado, mostrando que as proteínas CfKAP2 e CfKAP3 desempenham um papel diferente ao da CfKAP1, pois estão envolvidas com o metabolismo mitocondrial e proliferação celular ao invés de estarem envolvidas na organização estrutural do kDNA (AVLIYAKULOV *et al.*, 2004).

Com base nesses estudos surgiu o interesse de nosso grupo no estudo de KAPs em *T. cruzi*, visando verificar qual o papel dessas proteínas na organização da rede de kDNA e sua importância nos diferentes estágios do ciclo de vida do parasita.

2. OBJETIVOS

Analisar a expressão da proteína TcKAP3 e avaliar a sua importância na biologia e no ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*, clone Dm28c. Para tanto, o gene que codifica TcKAP3 será caracterizado e clonado em vetor de expressão bacteriano para a produção da proteína recombinante, que será utilizada na imunização de camundongos, a fim de gerar antisoro policlonal específico, que por sua vez será usado em ensaios de *western blot*, para avaliar a expressão de *Tckap3* nas diferentes formas evolutivas do parasita, bem como identificar a região do corpo do parasita onde a proteína TcKAP3 está localizada, por ensaios de imunofluorescência. Concomitantemente, um mutante de *T. cruzi* para o gene *Tckap3* será gerado, utilizando as técnicas de nocaute gênico, a fim de se avaliar qual é a viabilidade desse parasita na ausência de expressão do gene *Tckap3*, quer durante a sua proliferação, quer durante a sua diferenciação, de modo a tentar compreender o papel da proteína TcKAP3 na fisiologia do parasita.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e Soluções Utilizados

3.1.1 Reagentes

Amersham Bioscience: α -[P³²]-dCTP (10 μ Ci/ μ l; 3000 Ci/mmol); dNTPs; Hybond C; Hybond N; kit ECL de *western blotting*, ProbeQuant Sephadex G-50, filmes de raio-X Hyperfilm[®], anticorpo monoclonal anti-Histidina.

Bio-Rad: Acrilamida; Agarose (UltraPure DNA grade); Azul de Bromofenol; Bis-Acrilamida; Persulfato de Amônia.

Cult-lab: RPMI 1640.

Difco: Bacto-Ágar; Bacto triptona; Extrato de levedura; Infuso de fígado; Triptose.

GIBCO: Soro Fetal Bovino.

Invitrogen Inc.: EDTA; Fenol; TRIS; Nick Translation kit; Taq DNA polymerase; IPTG; Agarose; X-Gal; DNA de λ /*HindIII*; Marcador de massa molecular Benchmark, Alexa Flúor 458.

Merck: Acetato de Sódio; Ácido Acético Glacial; Cloreto de Cálcio; Cloreto de Potássio; Cloreto de Sódio; Etanol Absoluto; Formaldeído; Formamida; Glicina; Glicose; Tolueno; Hidróxido de sódio; Isopropanol; HCl, Na₂HPO₄.

New England Biolabs: Endonucleases de restrição, 1 kb Plus DNA Ladder.

Roche: High Pure PCR Product Purification kit

Serva Electrophoresis: Alu-Gel S.

Sigma: Acetato de amônia; Ampicilina; Brometo de Etídeo; BSA; Kanamicina; Glicerol; Hepes; Cloreto de Magnésio; Tetraciclina; β -mercaptoetanol; DEAE-celulose; Tween 20; adjuvante completo de Freund; iodeto de propídeo.

USB: T4 DNA ligase

3.1.2 Tampões e Soluções

PBS: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 4,3 mM e KH₂PO₄ 1,5 mM.

PSG: Na₂HPO₄ (anidro) 47,47 mM, NaH₂PO₄ · H₂O 2,5 mM, NaCl 36,76 mM, e glicose 55,5 mM.

Solução de suspensão de corpúsculo: Tris-HCl 20 mM pH 8,0; NaCl 0,5 M e Triton X-100 2%.

Solução de tripsinização: tripsina 0,05% (m/v) e EDTA 0,02% (m/v) em PBS pH 8,0.

Solução de bloqueio para imunofluorescência: PBS e BSA 1% (albumina sérica bovina).

Solução de bloqueio para *western blot*: TBST e leite em pó desnatado 5%.

Solução de lise para *Toothpick*: NaOH 50 mM, Glicerol 5%, SDS 0,5%, EDTA 5 mM e azul de bromofenol 0,025 %.

Solução Ponceau S: Ponceau S 0,5% em ácido acético 1%.

Solução de coloração para géis de proteína: Coomassie blue R-250 0,1% em metanol/ácido acético (45%/10%).

Solução para descoloração de géis de proteína: Metanol 4%, ácido acético 7,5 %.

Solução de lise para extração de RNA total: Isotiocianato de guanidina 5M, EDTA 10 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, β-mercaptoetanol 8%.

Solução de ressuspensão de RNA total: Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, e SDS 0,1%.

Solução de azul de metileno: azul de metileno 0,004% em acetato de sódio 0,5 M pH 5,2.

Solução de depuração para *Southern blot*: HCl 0,25 M.

Solução desnaturante para *Southern blot*: NaOH 0,5 M e NaCl 1,5 M.

Solução neutralizante para *Southern blot*: Tris-HCl 0,5 M pH 7,5 e NaCl 1,5 M.

Solução de *Denhardt* (50X): ficoll 0,5%, polivinilpirrolidona 0,6% e albumina de soro bovino 0,2%.

Solução de hibridação para *Southern blot*: DNA de esperma de salmão do tipo III 0,1 mg/ml fragmentado por ultra-som e desnaturado, SSC 6X, solução de *denhardt* 6X e SDS 1%.

Solução de hibridação de *northern blot*: formamida 60%, SSC 6X, 20 mM NaHPO₄ pH 7,0, *denhardt* 6X, SDS 0,5%, DNA de esperma de salmão do tipo III (fragmentado por ultra-som) 100 µg/ml.

SSC 20X: NaCl 3 M pH 7,0 e citrato de sódio 0,3 M.

Solução de baixa estringência: SSC 2X e SDS 0,1%.

Solução de média estringência: SSC 1X e SDS 0,1%.

Solução de alta estringência: SSC 0,1X e SDS 0,1%

Tampão de eletroporação para *T. cruzi*: NaCl 140 mM; HEPES (ácido) 25 mM e Na₂HPO₄ 0,74 mM pH 7,5.

Tampão TELT: Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 62,5 mM pH 9,0, LiCl 2,5 M e Triton X-100 4%.

Tampão de amostra para DNA 10X: Ficoll 400 25%, azul de bromofenol 0,25% e xileno cianol FF 0,25%.

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

Tampão de eletroforese para SDS-PAGE 1X: Tris-base 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%.

Tampão para transferência (*western blotting*) 1X: Tris-base 25 mM, glicina 192 mM e metanol 20%.

Tampão TBE: Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM.

TBS: Tris-HCl 20 mM pH 8,0 e NaCl 150 mM.

TBST TBS e Tween 20 0,1%.

TE: Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM.

Tampão MOPS: MOPS 20 mM, acetato de sódio 5 mM e EDTA 2 mM, pH 7,5.

Tampão de amostra de RNA: Formamida 80%, formaldeído 5%, tampão MOPS 1X, 15 % de corante (MOPS 1X, glicerol 25%, azul de bromofenol 0,025%).

3.1.3 Meios de cultura

LB: Triptona 1%, extrato de levedura 5% e NaCl 1%.

Meio LIT (*liver infusion tryptose*): infuso de fígado 0,5%, NaCl 75,3 mM, KCl 5,4 mM, glicose 10 mM, bacto-triptose 0,5%, Na₂HPO₄ 56,4 mM, hemina 0,0025%, soro fetal bovino 10% e extrato de levedura 15 g/l.

Meio TAU: NaCl 190 mM, KCl 17 mM, MgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 2 mM e tampão fosfato 8 mM pH 6,0.

Meio TAU3AAG: meio TAU suplementado com L-prolina 10 mM, glutamato sódico 50 mM, aspartato sódico 2 mM e glicose 10 mM.

3.2 Cultivo do *Trypanosoma cruzi*

Neste trabalho, foi utilizado o clone Dm28c de *T. cruzi* (CONTRERAS *et al.*, 1985, CONTRERAS *et al.*, 1988) nas formas: (a) epimastigota, (b) tripomastigota metacíclico, (c) tripomastigota obtido de cultura de células e (d) amastigota obtido de cultura de células.

3.2.1 Epimastigotas

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT (CAMARGO, 1964) a 28 °C com passagens a cada três dias e inóculo de 1 x 10⁶ células/ml. As formas epimastigotas foram coletadas por centrifugação no terceiro dia de cultivo (correspondente a fase logarítmica de crescimento, baseada em curva de crescimento realizada nas mesmas condições), quando a densidade celular apresentava-se entre de 1 - 3 x 10⁷ células/ml.

3.2.2 Tripomastigotas metacíclicos

As formas metacíclicas foram obtidas através do processo de diferenciação *in vitro* (BONALDO *et al.*, 1988). Formas epimastigotas em final de fase logarítmica de crescimento (densidade celular entre 5 - 7 x 10⁷ células/ml) foram coletadas por

centrifugação a 7000 x g, por 5 minutos, a 10 °C, e ressuspendidas em meio TAU, na concentração de 5×10^8 células/ml e mantidas a 28 °C por 2 horas. Após este período, correspondente ao estresse nutricional, as células foram transferidas para garrafas de 300 cm² contendo 200 ml de meio TAU3AAG (concentração final de 5×10^6 células/ml). Uma proporção dos parasitas que se aderiram à superfície da garrafa de cultivo se diferenciou em metacíclicos, os quais foram liberados no sobrenadante (BONALDO *et al.*, 1988). Estas formas foram purificadas pela passagem através de uma coluna de afinidade contendo a resina DEAE celulose equilibrada em PSG (SOUSA, 1983).

Este procedimento foi realizado com o tipo selvagem, para obtenção de extrato protéico e também com o mutante de *T. cruzi* para *Tckap3*, para verificação da capacidade de diferenciação e infectividade, onde o número de metacíclicos no sobrenadante foi contado após 24, 48, 72 e 96 horas da incubação em meio TAU3AAG.

3.2.3 Tripomastigotas de cultura de células

Células Vero (ATCC[®] Número: CRL-2783[™]) foram cultivadas em garrafas de 150 cm² contendo meio RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino (GIBCO), penicilina 100 UI/ml, streptomina 10 µg/ml e glutamina 2 mM a 37 °C com 5% de CO₂. Ao atingirem a confluência (80% a 100%) realizou-se a passagem através de tripsinização e foi feito um inóculo de 1×10^7 células para cada nova garrafa de 150 cm². Após 24 horas, estas células (50% – 70% de confluência) foram infectadas com formas metacíclicas na razão de 10 parasitas para 1 célula. Após 24h de contato, os parasitas livres no sobrenadante foram retirados com a troca do meio RPMI 1640. Após 96h do contato inicial ocorreu o pico de liberação das formas tripomastigotas após o completo desenvolvimento do ciclo intracelular. As formas tripomastigotas foram então utilizadas para obtenção de extrato protéico (1×10^6 /µl). O mesmo procedimento foi realizado para verificar a capacidade infectiva do mutante de *T. cruzi* para *Tckap3*, onde as células Vero foram infectadas na razão de 150 parasitas para 1 célula hospedeira.

3.2.4 Amastigotas

A infecção das células Vero foi realizada como descrito no item 3.2.3, mantendo a razão de 10 parasitas por cada célula hospedeira. Após 96h ocorreu o pico de liberação de tripomastigotas, momento em que o sobrenadante foi coletado e que o meio RPMI 1640 foi adicionado às células infectadas. Nos dias subsequentes iniciou-se a liberação de tripomastigotas e amastigotas, que foram coletadas e separadas por centrifugação diferencial. Entre o décimo e décimo segundo dia pós-infecção a proporção de amastigotas para tripomastigotas estava aumentada em torno de 70% a 80%, por isso utilizou-se o décimo primeiro dia para a coleta. A centrifugação diferencial consistiu numa centrifugação a 400 x g por 10 min, que serviu para a retirada de restos celulares. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e realizou-se nova centrifugação a 3.000 x g por 15 min. No sobrenadante encontravam-se formas tripomastigotas, que neste caso foram descartadas e as formas amastigotas do sedimento foram coletadas.

3.3 Curva de crescimento de *T. cruzi*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* clone Dm28c e do mutante de *T. cruzi* para *Tckap3* foram cultivadas como descrito no item 4.2.1 até atingirem a fase estacionária, para a comparação da taxa de crescimento de ambas. Foram inoculadas 1×10^6 epimastigotas por ml de meio LIT em garrafas de 25 cm² e incubadas em seguida a 28 °C. Diariamente foi realizada a contagem das culturas em câmaras de Neubauer, em diluições apropriadas até o décimo dia. O gráfico da curva de crescimento comparativa entre a cultura selvagem e a nocaute foi feito utilizando o programa Microsoft Excel.

3.4 Obtenção de DNA de *T. cruzi*

A extração de DNA foi realizada conforme descrito por Medina-Acosta & Cross (1993). Epimastigotas (1×10^7 células) foram coletadas por centrifugação a 7.000 x g por 5 min, lavadas em PBS e ressuspendidas em 350 µl de tampão TELT. Após 5 min

de incubação, à temperatura ambiente, foi adicionado à amostra 1 volume de fenol/clorofórmio e o material foi centrifugado a 13.000 x g por 5 min. A fase aquosa foi recolhida e o DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto e coletado por centrifugação a 13.000 x g por 10 min. O DNA presente no sedimento foi lavado com etanol 70%, seco e em seguida ressuspensionado em tampão TE contendo RNase a 20 µg/ml.

3.5 Obtenção de RNA de *T. cruzi*

O RNA total dos parasitas foi obtido segundo o método de Karlinsey e colaboradores (1989), com modificações. As células (1×10^{10}) foram centrifugadas a 9.500 x g por 10 min, lavadas em PBS e lisadas em solução de lise para extração de RNA. Em seguida, foram adicionados 7 volumes de LiCl 4M ao material e este foi guardado a 4 °C por 16 h. Após este período, a amostra foi centrifugada a 12.000 x g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado. O sedimento (RNA total) foi ressuspensionado em 50 ml de LiCl 3M e centrifugado a 12.000 x g por 15 min a 4 °C. O sedimento foi lavado mais duas vezes com LiCl 3M e centrifugado nas mesmas condições anteriores. O RNA foi ressuspensionado em solução de ressuspensão de RNA. O RNA foi extraído uma vez com fenol saturado e em seguida com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e precipitado com 1 volume de isopropanol a -20 °C. O RNA foi ressuspensionado em água ultra pura tratada com DEPC 0,1%.

3.6 Obtenção de extrato proteico de *T. cruzi*

Os parasitas (epimastigotas, metacíclico, tripomastigota e amastigota) foram cultivados como descrito nos itens anteriores (3.2.1, 3.2.2, 3.2.3 e 3.2.4). As células foram coletadas por centrifugação (7.000 x g, 15 min a 10 °C) e lavadas duas vezes em PBS pH 7,5. Após as lavagens os parasitas foram ressuspensionados em PBS e tampão de amostra 4x foi adicionado de tal maneira que a concentração final fosse de 1×10^6 células equivalentes/µl. Os extratos foram fervidos por 5 min e armazenados a -70 °C.

3.7 Clonagem do gene *Tckap3*

A região codificante do gene *Tckap3* (ID: Tc00.1047053511529.80) foi obtida através de buscas no banco de dados do genoma do *T. cruzi* (TIGR – The Institute for Genomic Research, www.tigr.org) e amplificada com os *primers* KAP3ABF (5' – GGGGGATCCATGCTTCGACGCACGATGACGG - 3') e KAP3BR2 (CCCAAGCTTTCATTGTTTCTTGTATCCCTTCGCCCCTGT), a partir do DNA genômico de *T. cruzi* Dm28c. A seqüência de reconhecimento da enzima de restrição *Bam*HI foi adicionada na extremidade 5' do primer KAP3ABF, enquanto a seqüência de reconhecimento da enzima de restrição *Hind*III foi adicionada à extremidade 5' do primer KAP3BR2. As condições da reação de PCR foram as seguintes: 100 ng de DNA total *T. cruzi*, 10 pmol de cada *primer*, 200µM de cada dNTP, MgCl₂ 1,5 mM, tampão Taq DNA polimerase 1x, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen). A reação de PCR foi processada no termociclador modelo 9700 (Applied Biosystems, EUA) com a desnaturação do material por 4 min a 94 °C, seguida de 30 ciclos constando de desnaturação a 94 °C por 30 s, hibridização dos *primers* a 58 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 1 min. O material amplificado foi purificado usando o kit High Pure PCR Purification (Roche) e digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III, com uso de 20 U de cada enzima e seus respectivos tampões em volume final de 20µl, por 4 h a 37 °C. O material foi novamente purificado e utilizado para ligação com o vetor pGEXB (VALLE *et al*, 1993) digerido com as respectivas enzimas. Bactérias *E. coli* cepa XL1-Blue foram transformadas com a ligação. A seleção dos clones foi realizada através da técnica de palitagem ou de PCR de colônia (itens 3.10.1 e 3.10.2).

3.8 Obtenção do cDNA de *Tckap3* através de ensaio de RT-PCR

Com o intuito de verificar a posição do mini-exon de *Tckap3*, realizamos o ensaio de RT-PCR para a obtenção do cDNA de *Tckap3*.

O protocolo utilizado, foi baseado no manual técnico da Promega (ImProm-II™ Reverse Transcription System) assim como os reagentes utilizados para essa reação. Aproximadamente 10 µg de RNA foram incubados com o oligonucleotídeo KAP3BR2,

por 10 min a 70 °C e imediatamente transferidos para o gelo. À mistura foi adicionada uma solução de dNTPs (concentração final de 0,5 mM para cada dNTP), MgCl₂ (120 µM), RNase OUT (2 unidades) (Invitrogen), Transcriptase reversa ImProm-II e respectivo tampão. A reação foi incubada por 2 h a 42 °C. As amostras de cDNA foram purificadas por Microcon YM-30 (Millipore), conforme descrição do fabricante e armazenadas a -20 °C.

Posteriormente, foi realizada uma reação de PCR utilizando as seguintes condições: 10 ng do cDNA de *Tckap3* de *T. cruzi*, 10 pmol do *primer* ME (5'-ACAGTTTCTGTACTATATTG -3') e 10 pmol do *primer* KAP3BR2, 200 µM de cada dNTP, MgCl₂ 1,5 mM, tampão Taq DNA polimerase 1x, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen). A reação de PCR foi processada no termociclador modelo 9700 (Applied Biosystems, EUA) com a desnaturação do material por 3 min a 94 °C, seguida de 35 ciclos constando de desnaturação a 94 °C por 30 s, hibridização dos primers a 55 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 1 min. O material amplificado foi purificado usando o kit High Pure PCR Purification (Roche) e clonado diretamente no vetor pGEM®-T Easy (Promega). Bactérias *E. coli* cepa TOP10F' foram transformadas com a ligação e os plasmídeos recombinantes foram selecionados pela técnica da palitagem ou de PCR de colônia (itens 3.10.1 e 3.10.2). Após a minipreparação (item 3.11), o material foi submetido a seqüenciamento.

3.9 Clonagem dos genes que codificam as enzimas GAPDH e ENOLASE de *T. cruzi*

As seqüências dos genes que codificam a enzima GAPDH (39 kDa) (forma citosólica) (ID: Tc00.1047053506943.60) e enolase (57,2 kDa) (ID: Tc00.1047053511529.90) de *T. cruzi* foram obtidas através de buscas no banco de dados do genoma do *T. cruzi* (TIGR – The Institute for Genomic Research, www.tigr.org).

A região codificante do gene da GAPDH (1080 pb) foi amplificada usando os *primers* GAPDHF (5'- TTG**GGATCC**ATGCCATCAAGGTCGGTATC -3') e GAPDHR (5'- ATTT**GTCGAC**CTACAACCTTTGCCGAACGATCC -3'), enquanto a região codificante do

gene da enolase (1563 pb) foi amplificada usando os *primers* ENOF (5'–AAAGGTACCATGGAACCTCTTCGGTGAAG –3') e ENOR (5'–AAAGGTACCTCACTTCTTCCGCTTCTTCTT –3'), a partir do DNA genômico de *T. cruzi* Dm28c. Também foi realizada a amplificação de parte do gene da enolase, para posterior seqüenciamento, usando os *primers* ENOF2 (5'–CCAGGTGATGCGGATGTTTC –3') e ENOR (5'–AAAGGTACCTCACTTCTTCCGCTTCTTCTT –3'). O sítio para a enzima de restrição *Bam*HI foi adicionado à extremidade 5' do *primer* GAPDHF e o sítio para a enzima de restrição *Sa*II foi acrescentado à extremidade 5' do *primer* GAPDHR. Nos *primers* do gene da enolase foi adicionado o sítio para a enzima de restrição *Kpn*I, tanto para a extremidade 5' do *primer* ENOF, quanto para a extremidade 5' do *primer* ENOR.

As reações de PCR foram realizadas nas seguintes condições: 100 ng DNA total *T. cruzi*, 10 pmol de cada *primer*, 200 µM de cada dNTP, MgCl₂ 1,5 mM, tampão Taq DNA polimerase 1x, 2,5 U de *Platinum* Taq DNA polimerase high fidelity (Invitrogen). A reação de PCR foi processada no termociclador modelo 9700 (Applied Biosystems, EUA) com a desnaturação do material por 3 min a 94 °C, seguida de 35 ciclos constando de desnaturação a 94 °C por 30 s, hibridização dos *primers* a 55 °C por 30 s e extensão a 68 °C por 1 min. O material amplificado foi purificado usando o kit High Pure PCR Purification (Roche) e digerido com as enzimas de restrição correspondentes, com uso de 20 U de cada enzima e seus respectivos tampões em volume final de 20µl, por 4 h a 37 °C. O material foi novamente purificado e inserido no vetor de expressão pQE30 (Qiagen), o qual acrescenta seis códons para o aminoácido histidina na extremidade 5' do inserto. Bactérias *E. coli* cepa TOP10F' (pREP4) foram transformadas com a ligação. Plasmídeos recombinantes foram selecionados pela técnica da palitagem ou de PCR de colônia (itens 3.10.1 e 3.10.2).

O fragmento (596 pb) do gene da enolase amplificado pelos *primers* ENOF2 e ENOR foi purificado usando o kit High Pure PCR Purification (Roche) e clonado diretamente no vetor pGEM®-T Easy (Promega). Bactérias *E. coli* cepa TOP10F' também foram transformadas com a ligação e os plasmídeos recombinantes foram selecionados pela técnica da palitagem ou de PCR de colônia (itens 3.10.1 e 3.10.2). Após a minipreparação (item 3.11), o material foi submetido a seqüenciamento.

3.10 Seleção dos clones recombinantes

3.10.1 Técnica de palitagem (toothpick)

As colônias foram coletadas com o auxílio de palitos de dente (toothpick) estéreis e transferidas para o fundo de tubos de micro-centrífuga e para a superfície do meio LB solidificado para a obtenção de uma réplica das colônias que foram analisadas (placa-mãe). A cada um dos tubos foram acrescentados 10 μ l do tampão de lise. Os tubos foram incubados em banho-maria a 65 °C por 10 min. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%, usando o plasmídeo nativo como controle. Posteriormente, o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 μ g/ml) por aproximadamente 20 min, lavado com água e analisado sob luz ultravioleta. O gel foi fotografado no sistema de foto-documentação UVP (Biorad).

3.10.2 Técnica de PCR de colônia

Depois de selecionadas, as colônias foram transferidas para tubos de PCR, contendo os reagentes da PCR e os *primers* que hibridizam com regiões que flanqueiam o fragmento de DNA clonado, em um volume total de 10 μ l. As amostras foram incubadas a 94 °C por 3 min e submetidas a 35 ciclos de PCR com as seguintes etapas: 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s e 72 °C por 1 min, finalizando com uma etapa de extensão à 72 °C por 10 min. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1%. Posteriormente, o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 μ g/ml) por aproximadamente 20 min, lavado com água e analisado sob luz ultravioleta. O gel foi fotografado no sistema de foto-documentação UVP (Biorad).

3.11 Preparação de plasmídeo em pequena escala (miniprep)

Os clones recombinantes foram cultivados em 2 ml de meio LB, contendo o antibiótico apropriado, durante 18 h. Uma alíquota de 1,5 ml da cultura foi então centrifugada a 12.000 x g por 1 min a temperatura ambiente e os plasmídeos

recombinantes purificados com o sistema de minipreparação de plasmídeo (Miniprep Qiagen Kit) (QIAGEN) de acordo com as recomendações do fabricante.

3.12 Expressão e purificação da TcKAP3, GAPDH e enolase de *T. cruzi*

Colônias de *E. coli* contendo plasmídeos recombinantes foram cultivadas em meio LB contendo 100µg/ml de ampicilina a 37 °C por 18 h, sob agitação (pré-inóculo). Após este período, 10% do pré-inóculo foram transferidos para novos tubos contendo meio LB-ampicilina por 1 h e cultivados a 37 °C, sob agitação constante. Após este tempo, IPTG (isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosídeo) foi adicionado às culturas na concentração final de 0,3 mM, para bactérias transformadas com plasmídeos recombinantes derivados do vetor pGEXB, e 2 mM para bactérias transformadas com plasmídeos recombinantes derivados do vetor pQE30. A incubação prosseguiu por mais 3 h nas mesmas condições. Um controle negativo foi feito como descrito acima, exceto que neste controle não foi adicionado IPTG às culturas (culturas não induzidas). Alíquotas das culturas induzidas e não induzidas com IPTG foram processadas para análise em SDS-PAGE.

As proteínas recombinantes foram purificadas em larga escala a partir de 300 ml de cultura. As bactérias foram coletadas por centrifugação a 6.000 x g, por 10 min, a 4 °C, lavadas em PBS e lisadas por ultrassom (Ultrasonic homogenizer, Cole-Parmer) com 5 pulsos de 10 s cada, a 4 °C, potência 8. Após sonicação, o lisado foi centrifugado e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuspensionado em 15 ml de Solução de suspensão de corpúsculo, centrifugado a 12.000 x g a 4 °C e o sobrenadante descartado. Repetiu-se essa lavagem por mais 2 vezes. O material então foi lavado com 10 ml de PBS e centrifugado por 10 min a 12.000 x g a 4 °C. O sedimento formado foi ressuspensionado em 2 ml de PBS. Tampão de amostra de proteínas 4x (1 ml) foi adicionado à suspensão, a qual foi fervida por 5 min antes de ser submetida à SDS-PAGE. Após a eletroforese, o gel foi incubado com KCl 0,1 M gelado para visualização da banda correspondente à proteína recombinante. A banda de interesse foi cortada do gel com ajuda de uma lâmina de bisturi, colocada dentro de membrana de diálise (Spectaphor, MW cut-off 12.000) e submetida a eletroforese, em tampão de SDS-

PAGE, a 100 V por 2h, para a eluição da proteína do gel. Em seguida, o material foi recolhido e dialisado em PBS e analisado em SDS-PAGE.

3.13 Obtenção de antisoro policlonal contra TcKAP3, GAPDH e enolase

As proteínas recombinantes purificadas foram inoculadas em camundongos da linhagem BALBc, por via intraperitoneal, com 4 aplicações de aproximadamente 20-50µg de antígeno em intervalos de 15 dias, seguida de obtenção do soro após 1 semana da última inoculação. O antígeno foi emulsificado em adjuvante completo de Freund, na primeira inoculação e com adjuvante a base de hidróxido de alumínio (Alu-Gel, Serva) nas inoculações posteriores.

3.14 Análise da expressão do gene *Tckap3* por ensaio tipo western blot

Este procedimento foi executado segundo o método de Towbin e colaboradores (1979). Alíquotas de extratos de *T. cruzi* equivalentes a 1×10^7 células foram submetidos à SDS-PAGE. Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond C, Amersham Biosciences), em tampão de western por 2 h, a 60 V ou 20 V por 16 h. Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau S e descorado suavemente com água bidestilada para a identificação das bandas do marcador de massa molecular. A membrana foi então incubada em solução de bloqueio por 30 min sob agitação suave e, em seguida, incubada com o antisoro anti-TcKAP3, diluído (1:500) em solução de bloqueio, por 1 h à temperatura ambiente sob agitação. Após a remoção do antisoro, a membrana foi lavada 3 vezes com TBST por 10 min. Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (1:7500) (Amersham Biosciences) por 1 hora à temperatura ambiente. Após a incubação, a membrana foi lavada com TBST por 5 minutos. O procedimento de lavagem foi repetido mais 4 vezes. O produto da reação enzimática foi detectado por quimioluminescência, usando o kit ECL “western blotting” (Amersham Biosciences) de acordo com as normas do fabricante.

3.15 Deleção do gene *Tckap3* por nocaute gênico

3.15.1 Amplificação e clonagem dos genes *npt* e *hph*

O gene *npt* codifica a enzima neomicina fosfotransferase que confere resistência ao antibiótico neomicina (G418), enquanto que o gene *hph* codifica a enzima higromicina fosfotransferase que confere resistência ao antibiótico higromicina B. Neste trabalho, para facilitar o entendimento do processo de nocaute gênico, o gene *npt* foi chamado de *neo* e o gene *hph* foi chamado de *higro*, referindo-se às marcas de seleção.

Os genes *neo* e *higro* foram amplificados respectivamente a partir dos plasmídeos pSV2-neo e pPGK-Hyg, gentilmente cedidos pelo Dr. Gregory Buck da Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia, EUA, usando os primers mostrados na TABELA 1.

TABELA 1 - RELAÇÃO DOS *PRIMERS* UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DOS GENES *NEO* E *HIGRO*

| | |
|--------|-------------------------------------------------------|
| NEOF | GGGG T CGACATGATTGAACAAGATGGATTG |
| NEOR | GGG G AATTCAGAAGAACTCGTCAAG |
| HIGROF | AGCTT C TAGAAATGAAAAAGCCTGAACTCACC |
| HIGROR | TCGGT C G A AT C CACTCTATTCTTTGC |

Os sítios das enzimas de restrição adicionados aos *primers* estão em negrito.

Os primers NEOF e NEOR contém, respectivamente, os sítios *Sal*I e *Eco*RI, enquanto os primers HIGROF e HIGROR contém, respectivamente, os sítios *Xba*I e *Bam*HI.

A amplificação destes genes foi realizada nas seguintes condições: 100 ng do plasmídeo correspondente, 10 pmol dos oligonucleotídeos F e R, 200 μ M de cada dNTP, MgCl₂ 1,5 mM, tampão Taq DNA polimerase 1x, 2,5 unidades de *Platinum* Taq DNA polimerase high fidelity (Invitrogen, EUA). A reação de PCR foi processada no termociclador modelo 9700 (Applied Biosystems, EUA) nas seguintes condições:

Desnaturação do material por 4 min a 94 °C, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 92 °C por 30 s, hibridização dos oligonucleotídeos a 55 °C por 30 s e extensão a 68 °C por 1 min. O material amplificado foi purificado usando o kit High Pure PCR Purification (Roche, Alemanha). O DNA purificado foi digerido com enzimas de restrição apropriadas para a clonagem dos fragmentos no vetor pBluescript II KS (Stratagene, EUA), o qual foi digerido com as mesmas enzimas para a inserção dos genes *neo* (extremidades *SalI* / *EcoRI*) e *higro* (extremidades *XbaI* / *BamHI*). Os plasmídeos recombinantes foram denominados de pKS-*neo* e pKS-*higro*.

3.15.2 Amplificação e clonagem das regiões a montante e a jusante do gene *Tckap3*

As regiões a montante (*upstream*) e a jusante (*downstream*) do gene *Tckap3*, respectivamente denominadas de UPSKAP3 (920 pb) e DOWNKAP3 (371 pb), foram amplificadas por PCR, usando os primers descritos nas TABELAS 2 E 3. Cada região acima foi amplificada obedecendo a disposição dos sítios de clonagem que flanqueiam imediatamente os genes *neo* e *higro* nos vetores pKS-*neo* (sítios *SalI* e *EcoRI*) e pKS-*higro* (sítios *XbaI* e *BamHI*). Desse modo, os primers para a amplificação da região UPSKAP3 para clonagem no vetor pKS-*neo* contém sítio *SalI* e os primers da região DOWNKAP3 contém o sítio *EcoRI* (TABELAS 2 e 3). Os primers para a amplificação das mesmas regiões para clonagem no vetor pKS-*higro* contém, respectivamente os sítios *XbaI* e *BamHI* (TABELAS 4 E 5).

TABELA 2 - RELAÇÃO DOS *PRIMERS* UTILIZADOS PARA A CLONAGEM DA REGIÃO UPSTREAM DE *TcKAP3* NO VETOR PKS-NEO

| <i>Região upstream para clonagem no vetor pKS-<i>neo</i></i> | |
|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| UKAP3NEO F | AAAG TCGACT GCACGGACTTTGTGGTTTACG |
| UKAP3NEO R | AAAG TCGACT GAAATTCAGCAGTGCGATCTGT |

O sítio da enzima de restrição *SalI* adicionado aos *primers* está em negrito.

TABELA 3 - RELAÇÃO DOS *PRIMERS* UTILIZADOS PARA A CLONAGEM DA REGIÃO DOWNSTREAM DE *TcKAP3* NO VETOR PKS-NEO

| Região downstream para clonagem no vetor pKS-neo | |
|---------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| DKAP3NEO F | AAAG GAATTC AAGGGAGAACTGGGGTGATGC |
| DKAP3NEO R | AAAG GAATTC GACGAAACGAGAAGCGGAGC |

O sítio das enzima de restrição *EcoRI* adicionado aos *primers* está em negrito.

TABELA 4 - RELAÇÃO DOS *PRIMERS* UTILIZADOS PARA A CLONAGEM DA REGIÃO UPSTREAM DE *TcKAP3* NO VETOR PKS-HIGRO

| Região upstream para clonagem no vetor pKS-higro | |
|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| UKAP3HIG F | AAAT CTAGAT GGCACGGACTTTGTGGTTTACG |
| UKAP3HIG R | AAAT CTAGAT GAAATTCAGCAGTGCATCTGT |

O sítio das enzima de restrição *XbaI* adicionado aos *primers* está em negrito.

TABELA 5 - RELAÇÃO DOS *PRIMERS* UTILIZADOS PARA A CLONAGEM DA REGIÃO DOWNSTREAM DE *TcKAP3* NO VETOR PKS-HIGRO

| Região downstream para clonagem no vetor pKS-higro | |
|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| DKAP3HIG F | AAAG GGATCC AAGGGAGAACTGGGGTGATGC |
| DKAP3HIG R | AAAG GGATCC GACGAAACGAGAAGCGGAGC |

O sítio da enzima de restrição *BamHI* adicionado aos *primers* está em negrito.

As reações de PCR foram realizadas nas seguintes condições: 100 ng de DNA total de *T. cruzi* Dm28c, 10 pmol dos oligonucleotídeos F e R, 200 μ M de cada dNTP, $MgCl_2$ 1.5 mM, tampão Taq DNA polimerase 1x, 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen, EUA). A reação de PCR foi processada no termociclador modelo 9700 (Applied Biosystems, EUA) nas seguintes condições: Desnaturação do material por 4 min a 94 °C, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 92 °C por 30 s, hibridização dos oligonucleotídeos a 56 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 1 min. O material amplificado foi purificado usando o kit High Pure PCR Purification (Roche). O DNA purificado foi digerido com enzimas de restrição apropriadas para a clonagem dos fragmentos nos

vetores pKS-neo ou pKS-higro. Os plasmídeos resultantes da clonagem das regiões UPSKAP3 e DOWNKAP3 foram denominados de pKS-ups-neo-down e pKS-ups-higro-down (FIGURA 8).

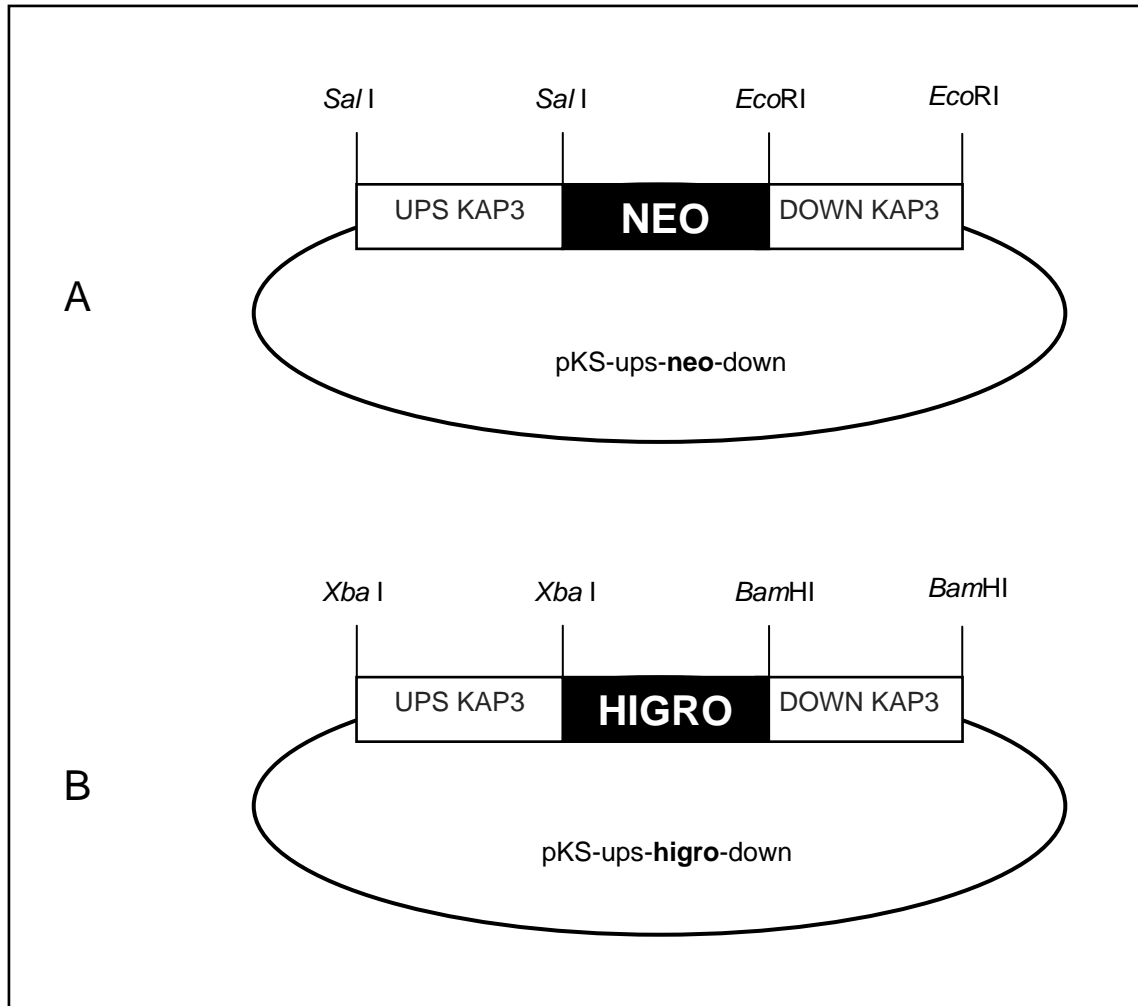


FIGURA 8 - ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DOS VETORES UTILIZADOS PARA O NOCAUTE DO GENE *Tckap3*

LEGENDA: Nesta figura é observada a inserção do gene *NEO* (A) e *HIGRO* (B) e das seqüências flanqueadoras do gene *Tckap3*, juntamente com os respectivos sítios para cada enzima de restrição, no vetor de clonagem pBluescript II KS.

3.15.3 Amplificação dos cassetes UPS-NEO-DOWN e UPS-HIGRO-DOWN para transfecção de *T. cruzi*

Os 2 plasmídeos recombinantes foram purificados pelo método da lise alcalina, usando o kit de minipreparação de plasmídeos (Qiagen). As minipreps foram utilizadas para a amplificação da região UPS-**NEO**-DOWN (cassete NEO) e da região UPS-**HIGRO**-DOWN (cassete HYG) por PCR, usando os *primers* UKAP3NEOF e DKAP3NEOR para o cassete ups-neo-down e UKAP3HIGF e DKAP3HIGR para o cassete ups-higro-down. As reações de PCR foram realizadas nas seguintes condições: 20 ng do plasmídeo pKS-ups-neo-down ou pKS-ups-higro-down, 10 pmol dos respectivos oligonucleotídeos F e R, 200 μ M de cada dNTP, MgCl₂ 1.5 mM, tampão Taq DNA polimerase 1x, 2,5 unidades de *Platinum* Taq DNA polimerase high fidelity (Invitrogen, EUA). A reação de PCR foi processada no termociclador modelo 9700 (Applied Biosystems, EUA) nas seguintes condições: Desnaturação do material por 4 min a 94 °C, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 92 °C por 30 s, hibridização dos oligonucleotídeos a 56 °C por 30 s e extensão a 68 °C por 2 min. O material amplificado foi submetido à eletroforese em gel preparativo de agarose 1%. O gel foi corado com brometo de etídeo (1 μ g/ml) e a banda correspondente a cada cassete foi removida do gel com auxílio de uma lâmina de bisturi. O DNA foi purificado por eletroeluição, dentro de saco de diálise, nas condições de 100 V por 1 hora em tampão TBE. Para obter massa de DNA suficiente para a transfecção (25 μ g), foram feitas 10 reações de PCR com 100 μ l cada uma.

3.15.4 Transfecção do *T. cruzi* com o cassete ups-neo-down

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT até 2×10^7 células/ml. Os parasitas (1×10^8 células) foram coletados por centrifugação a 6.000 x g por 10 min a 4 °C. O sedimento celular foi lavado com PBS estéril e ressuspenso em 1 ml de solução de eletroporação. Volumes correspondentes a 0,4 ml da suspensão de células foram transferidos para cubetas de eletroporação estéreis (0,2 cm de GAP) (BioAgency) e pré-resfriadas. Em uma delas foram adicionados de 40 μ g do fragmento

representando o cassete NEO. A outra cubeta contendo apenas a suspensão de parasitas foi usada como controle. Após 10 minutos no gelo, as amostras contidas nas cubetas foram submetidas a 2 pulsos de 450 volts, 500 μ F, utilizando o eletroporador GenePulser[®] II Apparatus (Bio-Rad). As amostras foram incubadas novamente por 5 a 10 minutos no gelo, em seguida foram transferidas para garrafas de cultura de 25 cm², contendo 10 ml de meio LIT (suplementado com 10.000 U de penicilina e estreptomicina a 10 μ g/ml). As culturas foram então incubadas a 28 °C. Após 24 horas de incubação adicionou-se o antibiótico G418 na concentração de 300 μ g/ml. As culturas foram mantidas por sucessivas passagens (diluição de 1:10) em meio LIT suplementado com G418 a cada 8-10 dias, até a ausência de proliferação celular na cultura controle. Após 3 ou 4 passagens, um volume da cultura (5×10^5 parasitas) resistente ao antibiótico G418 (transfectada com o cassete NEO) foi então espalhado sobre meio LIT solidificado, suplementado com G418 300 μ g/ml (LIT+G418), para obtenção de clones de parasitas. Os parasitas, nos quais *Tckap3* foi substituído pelo gene *neo*, foram denominados de *T. cruzi* ^{Δ kap3::neo} e foram testados para a correta inserção do gene *neo* no locus genômico de *Tckap3*.

3.15.5 Extração de DNA dos transfectantes

Clones de *T. cruzi* transfectados com o cassete NEO (*T. cruzi* ^{Δ kap3::neo}) foram cultivados em meio LIT suplementado com G418 (300 μ g/ml) até uma densidade de 3×10^7 células/ml. Os parasitas foram coletados por centrifugação por 1 minuto a $6.000 \times g$ e lavados com PBS. Em seguida, os parasitas foram lisados gentilmente em 350 μ l de tampão TELT, conforme descrito no item 3.4.

3.15.6 Análise por PCR do DNA dos parasitas transfectados com o cassete NEO

As reações de PCR foram realizadas nas seguintes condições: 100 ng do DNA total de *T. cruzi* Dm28c (*T. cruzi*^{kap3+} ou tipo selvagem) ou do DNA do *T. cruzi* ^{Δ kap3::neo}, (mutante simples nocaute); 10 pmol dos oligonucleotídeos NEOF e NEOR, 200 μ M de cada dNTP, MgCl₂ 1,5 mM, tampão Taq DNA polimerase 1x, 2,5 unidades de Taq DNA

polimerase (Invitrogen, EUA). A reação de PCR foi processada no termociclador modelo 9700 (Applied Biosystems, EUA) nas seguintes condições: Desnaturação do material por 4 min a 94 °C, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 92 °C por 30 s, hibridização dos oligonucleotídeos a 55 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 2 min.

Também foi realizada uma reação de PCR utilizando os oligos ENOF (5'-AAAGGTACCATGGAAGCTCTTCGTGGAAG -3') e NEOR (5'-GGGGAATTCAGAAGAACTCGTCAAG -3'), para confirmar a amplificação de NEO juntamente com o gene para a enolase que está à montante de *TcKap3* no genoma do *T. cruzi* (FIGURA 9). O material amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose.

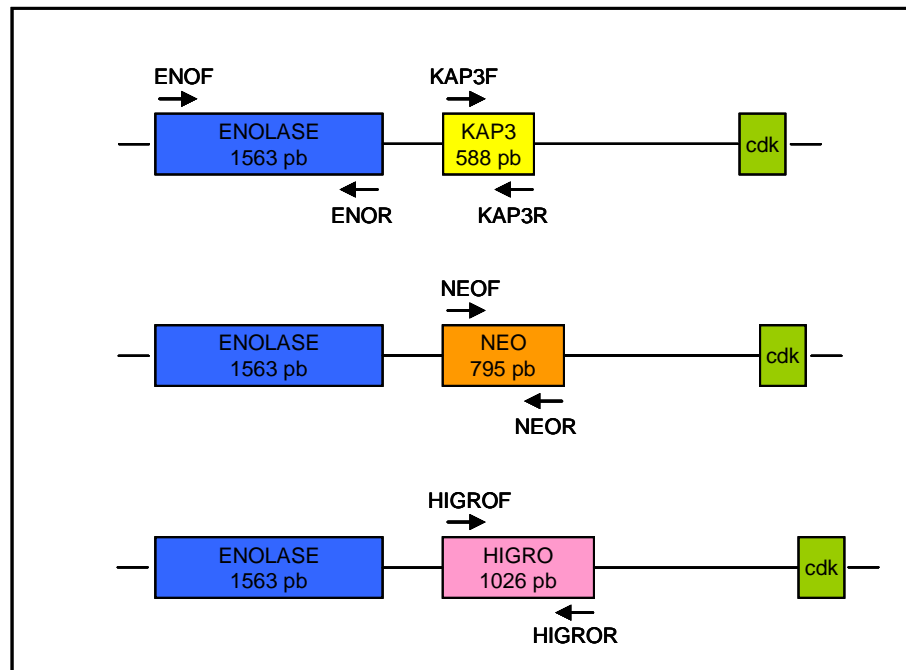


FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS GENES ENOLASE, KAP3, NEO, HIGRO E CDK

LEGENDA: A) Representação esquemática da organização dos genes enolase (azul), kap3 (amarelo) e cdk (verde), a partir do sequenciamento do genoma do *T. cruzi* (www.genedb.org) B) representação esquemática mostrando a substituição do gene *Tckap3* pelo gene neo. C) Inserção do gene neo (laranja) e C) representação esquemática mostrando a substituição do gene *Tckap3* pelo gene higo (rosa). Os *primers* utilizados nas PCRs descritas nos itens 4.15.6 e 4.15.8 estão indicados por setas.

3.15.7 Transfecção do *T. cruzi* com o cassete ups-higro-down

Formas epimastigotas do clone de *T. cruzi* ^{Δ kap3::neo} foram cultivadas em meio LIT, suplementado com G418 (300 µg/ml) até a densidade de 2×10^7 células/ml. Os parasitas (1×10^8 células) foram coletados por centrifugação a $6.000 \times g$ por 10 min a 4 °C e submetidos ao processo de eletroporação, como descrito no item 4.15.4. Para a transfecção foram usados 25 µg do fragmento representando o cassete ups-higro-down. As culturas (transfectada e controle) foram então incubadas a 28 °C em LIT suplementado de G418. Após 24 horas de incubação foi adicionado o antibiótico higromicina ao meio de cultura na concentração de 300 µg/ml. As culturas foram mantidas por sucessivas passagens (diluição de 1:10) em meio LIT suplementado com G418 e higromicina a cada 8-10 dias, até a ausência de proliferação celular na cultura controle. Mutantes, nos quais os dois alelos de *Tckap3* foram removidos e substituídos pelos genes *neo* e *higro*, foram denominados com genótipo *T. cruzi* ^{Δ kap3::neo/higro}. A extração de DNA desta população foi realizada conforme mencionado no item 3.14.5. Posteriormente, o DNA obtido foi utilizado em reações de PCR para a confirmação da inserção do gene *higro* no locus genômico de *Tckap3*.

3.15.8 Análise por PCR do DNA dos parasitas transfectados com o cassete ups-higro-down

As reações de PCR foram realizadas nas seguintes condições: 100 ng do DNA total de *T. cruzi*^{kap3+} ou do DNA do *T. cruzi* ^{Δ kap3::neo/higro}, 10 pmol dos oligonucleotídeos HIGROF (5'- AGCTT**CTAGA**ATGAAAAAGCCTGAACTCACC -3') e HIGROR (5'- TCGGT**CGGAATCC**ACTCTATTCCTTTGC -3'), 200 µM de cada dNTP, MgCl₂ 1,5 mM, tampão Taq DNA polimerase 1x, 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen, EUA). A reação de PCR foi processada no termociclador modelo 9700 (Applied Biosystems, EUA) nas seguintes condições: Desnaturação do material por 4 min a 94 °C, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 92 °C por 30 s, hibridização dos oligonucleotídeos a 55 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 2 min.

Em paralelo foi realizada uma reação de PCR, utilizando os oligos ENOF (5'-AAAGGTACCATGGAACTCCTTTTCGTGGAAG -3') e HIGROR (5'-TCGGTCGGAATCCACTCTATTCCTTTGC -3'), para confirmar a amplificação de HIGRO juntamente com parte do gene para a enolase que está à montante de *Tckap3* no genoma do *T. cruzi*. O material amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose.

3.16 Análise da organização do gene *Tckap3* e da eficiência de seu nocaute através de ensaios tipo Southern blot

O DNA genômico (5 µg) de *T. cruzi*^{kap3+}, *T. cruzi*^{Δkap3::neo} e *T. cruzi*^{Δkap3::neo/higro} foi submetido a digestões simples com a enzima de restrição *KpnI*, de acordo com as especificações do fornecedor. Após 3 horas, o DNA digerido foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TBE a 100V. O gel foi corado por brometo de etídio (0,5µg/mL) e fotografado sob a luz ultravioleta (310 nm). Posteriormente, o gel foi tratado com soluções de depuração por 15 minutos, de desnaturação por 30 minutos (2 vezes) e solução de neutralização por 30 minutos (2 vezes). O DNA foi transferido para uma membrana de *nylon* (Hybond N, Amersham Biosciences) por capilaridade (SAMBROOK *et al.*, 1989), utilizando-se de uma “ponte” de papel 3 MM embebido em SSC 20X. Após a transferência o DNA foi fixado à membrana por exposição à luz ultravioleta com uma dose de 120 mJ/cm², usando o aparelho Spectrolinker (Spectronics corp., USA). A membrana contendo o DNA de *T. cruzi* foi pré-hibridizada em solução de hibridização de DNA por 1 hora a 65 °C, seguido da adição da sonda marcada radioativamente com ³²P-dCTP (10 µCi/µl; 3.000 Ci/mmol) (Amersham Biosciences), preparada segundo método de *nick translation*, descrito por Rigby *et al.* (1977), utilizando-se o Nick Translation Kit (Amersham Biosciences) ou segundo o método de iniciação por random primers (Amersham random primer DNA labeling kit - Amersham Biosciences), conforme recomendações do fabricante.

Neste trabalho foram utilizadas 5 sondas, são elas: os genes *Tckap3*, *neo* e *higro*, e as regiões ups e down. Após a marcação, as sonda foram purificadas em

colunas de Sephadex G-50 (ProbeQuant - Amersham Biosciences) e adicionadas ao tampão de hibridização na concentração de 5×10^6 cpm/ml. As membranas foram incubadas por 16 horas a 65 °C e, em seguida, lavadas nesta temperatura duas vezes por 30 minutos com soluções de alta, média e baixa estringência. As membranas foram expostas a filme de raio-X (Hyperfilm[®]) na presença de tela intensificadora (Dupont Cronex Lightning Plus), por tempo que varia entre 1 a 3 dias a -70 °C.

3.17 Análise da expressão do gene *Tckap3* por ensaio tipo northern blot

O RNA total (10µg) de *T. cruzi*^{kap3+} e *T. cruzi*^{Δkap3::neo/higro} foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,2% contendo formaldeído 2,2 M em tampão MOPS e, em seguida, transferido para membrana de nylon (Hybond-N, Amersham Biosciences), utilizando o protocolo descrito por Sambrook e colaboradores (1989). Após a transferência, a membrana foi incubada em solução de hibridização por 1 h a 42 °C, hibridizada por 16 h com a sonda marcada radioativamente (1×10^6 cpm/ml), como descrito no item 4.16. A membrana foi lavada duas vezes, por 15 min cada, em soluções com concentrações decrescentes de SSC a 42 °C (SSC 2 x / SDS 0,1%, SSC 1 x / SDS 0,1% e SSC 0,5 x / SDS 0,1%). Em seguida, a membrana foi exposta a filme de raio-X (Hyperfilm, Amersham) na presença de tela intensificadora (Dupont Cronex Lightning plus) a -70 °C.

3.18 Localização celular da proteína TcKAP3 através de ensaio de imunofluorescência

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram obtidas como descrito no item 4.2.1. Os parasitas foram coletados por centrifugação (4.000 x g, 15 min a 10 °C), lavados duas vezes em PBS e depositados sobre lâminas de vidro previamente tratadas com poli-L-lisina 0,01% diluída em PBS. Os parasitas foram então fixados com paraformaldeído 4 % em PBS, permeabilizados com Triton X-100 0,1 % em PBS, por 2 min à temperatura ambiente e incubados a 4 °C durante 16 h em solução de bloqueio para

imunofluorescência (PBS 1X + BSA 1 %). Após o bloqueio, os parasitas foram incubados à temperatura ambiente por 1 h com o antisoro produzido contra a proteína TcKAP3 recombinante em uma diluição de 1:300 em solução de bloqueio para imunofluorescência. Depois disso, as lâminas foram submetidas a 5 lavagens de 5 min cada, em PBS. Em seguida, os parasitas foram incubados à temperatura ambiente por 1 hora com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor 458 (Invitrogen) diluído 1:600 em solução de bloqueio, contendo iodeto de propídeo a 0,1 mg/ml. As lâminas foram então lavadas 5 vezes em PBS, com troca do tampão a cada 5 min, montadas em N-propil galato (Sigma). As amostras foram visualizadas por microscopia de fluorescência, usando o microscópio Nikon modelo E600.

3.19 Análise da ultraestrutura do cinetoplasto do mutante de *T. cruzi* para *Tckap3* por microscopia eletrônica de transmissão

Os parasitas foram coletados, lavados com PBS e fixados em solução contendo 2,5% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído e tampão cacodilato 0,1 M. Em seguida, os parasitas foram fixados por 1 h em solução de 1% de tetróxido de Ósmio e 0,8% de ferricianeto de potássio, diluídos em tampão cacodilato 0,1 M. As células foram então desidratadas em solução contendo concentrações crescentes de acetona e incluídas em Epon. Após a obtenção de cortes ultrafinos dos parasitas, os mesmos foram contrastados em acetato de uranila e citrato de Chumbo antes de serem observados e fotografados no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 900.

3.20 Coloração dos parasitas transfectados

A coloração dos parasitas foi realizada pelo método panótico rápido (Laborclin Pinhais Paraná Brasil) modificado.

Formas epimastigotas e metacíclicas do mutante de *T. cruzi* para *Tckap3* foram cultivadas como descrito nos itens 3.2.1 e 3.2.2. Os parasitas foram coletados por centrifugação de 1 min a 7.000 x g e ressuspensos em PBS. Desta suspensão uma

gota foi retirada e depositada sobre lâminas previamente limpas. Quando secas, as lâminas das formas epimastigotas e metacíclicas foram imersas, individualmente, na Solução 1 (Fixador), por 15 s e 2 min, respectivamente. Em seguida, foram retiradas e imersas na Solução 2 (Revelador) e na Solução 3 (Corante), nos mesmos tempos descritos anteriormente. Após este processo, as lâminas foram lavadas suavemente em água corrente, secas à temperatura ambiente e cobertas com Permalt e lamínula. Os parasitas foram visualizados em microscópio Nikon E600.

3.21 Infecção de células Vero com o mutante de *T. cruzi* para *Tckap3*

Células Vero, obtidas conforme item 3.2.3, foram infectadas com formas metacíclicas obtidas da diferenciação do mutante de *T. cruzi* para *Tckap3*, em microplacas de 24 poços, contendo lamínulas de vidro com diâmetro de 13 mm. A cada poço foram adicionadas 2×10^4 células Vero. Após 24 horas de cultivo, as células foram infectadas com tripomastigotas metacíclicos (obtidos do sobrenadante das culturas de *T. cruzi* diferenciados em meio TAU3AAG, sem purificação na coluna de DEAE celulose). A infecção das células Vero foi acompanhada diariamente por microscopia de contraste de fase. A fixação e a coloração das células infectadas foram realizadas após 72 horas de infecção.

3.22 Coloração das células Vero infectadas usando método de GIEMSA

As células Vero infectadas com o mutante, obtidas no item anterior, foram fixadas em Bouian sob uma lamínula por 5 min, em seguida adicionou-se etanol 70%. O etanol foi removido e a lamínula foi coberta com metanol 100%. Após evaporação do metanol, a lamínula foi incubada com etanol 70% (3 vezes por 3 min), tratadas com HCl 5M por 10 min e lavadas abundantemente com água. Após secas foram tratadas com PBS por 3 min e lavadas rapidamente com água. Finalmente, as células foram coradas com Giemsa 5% em PBS numa diluição de 1:10. Após 70 min de coloração, o corante foi retirado e as células foram lavadas abundantemente com água, secas e submetidas a uma bateria de desidratação/clarificação, onde foram imersas durante 10s nas

seguintes soluções: Acetona 100% (2 vezes), Acetona 70%/Xilol 30% (1 vez), Acetona 100%/Xilol 100% (1 vez), Xilol 70%/Acetona 30% (1 vez) e Xilol 100% (2 vezes). Imediatamente, as lâminas foram cobertas com Permount e lamínula. A visualização das mesmas foi realizada no microscópio Nikon E600.

4. RESULTADOS

4.1 Clonagem e caracterização do gene *Tckap3*

Seqüências de genes que codificam KAPs em *Crithidia fasciculata* [*Cfkap2* (764 pb) (número de acesso GenBank AF008943), *Cfkap3* (405 pb) (número de acesso GenBank AY143553) e *Cfkap4* (384 pb) (número de acesso PIR JC6092)] foram comparadas com seqüências do genoma do *T. cruzi* (www.tigr.org e www.genedb.org). A busca por similaridade foi realizada com auxílio do algoritmo BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990) a partir do portal na internet do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) <<www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Essas análises permitiram a identificação de um gene em *T. cruzi* com identidade de 36,4 % com *Cfkap3*, sendo, portanto, denominado de *Tckap3* (CAVALCANTI, 2006). Também foram identificados outros genes com identidade com aqueles que codificam KAPs em *C. fasciculata*, cuja caracterização foi objeto de outro estudo do nosso grupo em colaboração com a Dra. Cristina Motta da Universidade Federal do Rio de Janeiro (CAVALCANTI, 2006; CAVALCANTI *et al.*, submetido).

No genoma do *T. cruzi* cepa CL Brener (EL-SAYED *et al.*, 2005) foram identificados dois alelos do gene *Tckap3*, que foram denominados, neste trabalho, de alelo A (Tc00.1047053511029.20) e alelo B (Tc00.1047053511529.80). Os dois alelos apresentam polimorfismo (588 pb e 624 pb, respectivamente) e possuem uma identidade de 92,1 %, codificando proteínas de 22,5 kDa e 23,7 kDa respectivamente.

Oligonucleotídeos, construídos no início e no final da região codificante (ORF) dos dois alelos da cepa CL Brener, foram usados para amplificar o gene *Tckap3* a partir do genoma do clone Dm28c de *T. cruzi*. Clones obtidos a partir da clonagem dos fragmentos de PCR foram sequenciados (Cavalcanti, 2006) e usados nesse estudo. A comparação das seqüências mostrou que os alelos do gene *Tckap3* do *T. cruzi* Dm28c tem 95,8 % e 95,1 % de identidade com os alelos A e B, respectivamente, da cepa CL Brener (FIGURA 10).

```

          *      20      *      40      *      60      *
KAP3A_Dm28c : ATGCTTCGACGCACGATGACGGCGCTGCGTGTGTCAGCCCCTACTCCATATTTCTGCAGGAATTGGCGAGGA : 70
KAP3A_CL    : ATGCTTCGACGCACGATGACGGCGCTGCGTGTGTCAGCCCCTACTCCATATTTCTGCAGGAATTGGCGAGGA : 70
KAP3B_Dm28c : ATGCTTCGACGCACGATGACGGCGCTGCGTGTGTCAGCCCCTACTCCATATTTCTGCAGGAATTGGCGAGGA : 70
KAP3B_CL    : ATGCTTCGACGCACGATGACGGCGCTGCGTGTGTCAGCCCCTACTCCATATTTCTGCAGGAATTGGCGAGGA : 70

          80      *      100      *      120      *      140
KAP3A_Dm28c : AAAGGGAGCTGTCGGGGCTGCCATTGAAGGATTGCTCAGCTATCGGCTCCCGTATGTACCGCGCCCTCCC : 140
KAP3A_CL    : AAAGAGAGCTGTCGGGGCTGCCATTGAAGGATTGCTCAGCTATCGGCTCCCGTATGTACCGCGCCCTCCC : 140
KAP3B_Dm28c : AAAGGGAGCTGTCGGGGCTGCCATTGAAGGATTGCTCAGCTATCGGCTCCCGTATGTACCGCGCCCTCCC : 140
KAP3B_CL    : AAAGGGAGCTGTCGGGGCTGCCATTGAAGGATTGCTCAGCTATCGGCTCCCGTATGTACCGCGCCCTCCC : 140

          *      160      *      180      *      200      *
KAP3A_Dm28c : TCCCGAGAAGTTGAGCGCACTGAAGGCGCGTCCCGTAAAGAAGAGGTACCCCGCTCTCGATTCCCTTTAAT : 210
KAP3A_CL    : TCCCGAGAAGTTGAGTGCCTGAAGGCGCGTCCCGTAAAGAAGAGGTACCCCGCTCTCGATTCCCTTTAAT : 210
KAP3B_Dm28c : TCCCGAGAAGTTGAGCGCACTGAAGGCGCGTCCCGTAAAGAAGAGGTACCCCGCTCTCGATTCCCTTTAAT : 210
KAP3B_CL    : TCCCGAGAAGTTGAGCGCACTGAAGGCGCGTCCCGTAAAGAAGAGGTACCCCGCTCTCGATTCCCTTTAAT : 210

          220      *      240      *      260      *      280
KAP3A_Dm28c : CGCTTTCAGCAGCAGCAGGCTTTTCGCTTCACGCACCTCAGCAATCCGCAGCGCCAACGGATCATTGGGA : 280
KAP3A_CL    : CGCTTTCAGCGGCAGCAGGCTTTTCGCTTCACGCACCTCAGCAATCCGCAGCGCCAACGGCTCATTGGGA : 280
KAP3B_Dm28c : CGCTTTCAGCAGCAGCAGGCTTTTCGCTTCACGCACCTCAGCAATCCGCAGCGCCAACGGATCATTGGGA : 280
KAP3B_CL    : CGCTTTCAGCGGCAGCAGGCTTTTCGCTTCACGCACCTCAGCAATCCGCAGCGCCAACGGCTCATTGGGA : 280

          *      300      *      320      *      340      *
KAP3A_Dm28c : GGATGTGGCGTGAAGTGAAGCAAAAAGAGATGCAGGCGAAGAACTGAAGCAAAAAGAGACTGGCGGCTGC : 350
KAP3A_CL    : GGATGTGGCGTGAAGTGAAGCAAAAAGAGATGCAGGCGAAGAACTGAAGCAAAAAGAGACTGGCGGCTGC : 350
KAP3B_Dm28c : GGATGTGGCGTGAAGTGAAGCAAAAAGAGATGCAGGCGAAGAACTGAAGCAAAAAGAGACTGGCGGCTGC : 350
KAP3B_CL    : GGATGTGGCGTGAAGTGAAGCAAAAAGAGATGCAGGCGAAGAACTGAAGCGAAAAGAGACTGGCGGCTGC : 350

          360      *      380      *      400      *      420
KAP3A_Dm28c : CAAACGTAAGGCGGCCCTTGAAACGTAAGCAATTTTGAAACTTAAGGCAGCTCTCAAACGTAAGGCAGCT : 420
KAP3A_CL    : CAAACGTAAGGCGGCCCTTGAAACGTAAGCAATTTTGAAACTTAAGGCAGCTCTCAAACGTAAGGCAGCT : 420
KAP3B_Dm28c : CAAACGTAAGGCGGCCCTTGAAACGTAAGCAATTTTGAAACTTAAGGCAGCTCTCAAACGTAAGGCAGCT : 420
KAP3B_CL    : CAAACGTAAGGCGGCCCTTGAAACGTAAGCAATTTTGAAACTTAAGGCAGCTCTCAAACGTAAGGCAGCT : 420

          *      440      *      460      *      480      *
KAP3A_Dm28c : CTCAAACG-----TAAGGCAGTTTTTAAGGCAGTTTTTAAGGCAGTTTTTAAGGCAGTTTT : 454
KAP3A_CL    : TTAAACGCAAGGCAGCTTTGAAACGTAAGGCAGCTTTGAAACGTAAGGCAGCTTTGAAACGTAAGGCAGCTTTGAAACGTAAGGCAG : 490
KAP3B_Dm28c : CTCAAACG-----TAAGGCAGTTTTTAAGGCAGTTTTTAAGGCAGTTTTTAAGGCAGTTTT : 454
KAP3B_CL    : TTAAACG-----TAAGGCAGTTTTTAAGGCAGTTTTTAAGGCAGTTTTTAAGGCAGTTTT : 454

          500      *      520      *      540      *      560
KAP3A_Dm28c : TTTTGAACGTAAGGCGGCCCTTGAAAAGTAAGACGGGCCCAAAGCGCAAGGCGGCTTTGAAGCGCAAGGC : 524
KAP3A_CL    : CTTTGAACGTAAGGCGGCCCTTGAAAAGTAAGACGGGCCCAAAGCGCAAGGCGGCTTTGAAGCGCAAGGC : 560
KAP3B_Dm28c : TTTTGAACGTAAGGCGGCCCTTGAAAAGTAAGACGGGCCCAAAGCGCAAGGCGGCTTTGAAGCGCAAGGC : 524
KAP3B_CL    : CTTTGAACGTAAGGCGGCCCTTGAAAAGTAAGACGGGCCCAAAGCGCAAGGCGGCTTTGAAGCGCAAGGC : 524

          *      580      *      600      *      620
KAP3A_Dm28c : ATC-----AATGAAGGGCAAGACAGGGGCGAAGCGGATACAAGAAACAATGA : 570
KAP3A_CL    : AACTCCGAAGCGCAAGGCATCAATGAAGGGCAAGACAGGGGCGAAGCGGATACAAGAAACAATGA : 624
KAP3B_Dm28c : AACTCCGAAGCGCAAGGCATCAATGAAGGGCAAGACAGGGGCGAAGCGGATACAAGAAACAATGA : 588
KAP3B_CL    : AACTCCGAAGCGCAAGGCATCAATGAAGGGCAAGACAGGGGCGAAGCGGATACAAGAAACAATGA : 588

```

FIGURA 10 - COMPARAÇÃO ENTRE AS SEQÜÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DOS ALELOS DO GENE *KAP3* DE *T. cruzi* DM28C E CL BRENER

LEGENDA: As posições com nucleotídeos idênticos em todas as seqüências estão coloridas em preto.

Embora o gene *Tckap3* (588 e 624 pb) não possua grande identidade com os genes ortólogos em *Trypanosoma brucei*, *Tbkap3* (975 pb) (Tb11.01.8090), *Leishmania major*, *Lmkap3* (411 pb) (LmjF32.3780), *Leishmania infantum* *Likap3* (411 pb) (LinJ32.4290) e *Leishmania braziliensis* *Lbkap3* (432 pb) (LbrM32_V2.4020), cujos genomas também foram seqüenciados (BERRIMAN *et al.*, 2005; IVENS *et al.*, 2005; PEACOCK *et al.*, 2007), as sequências de aminoácidos das respectivas proteínas deduzidas a partir desses genes, ainda compartilham certo grau de similaridade entre si, principalmente na região amino-terminal (FIGURA 11).

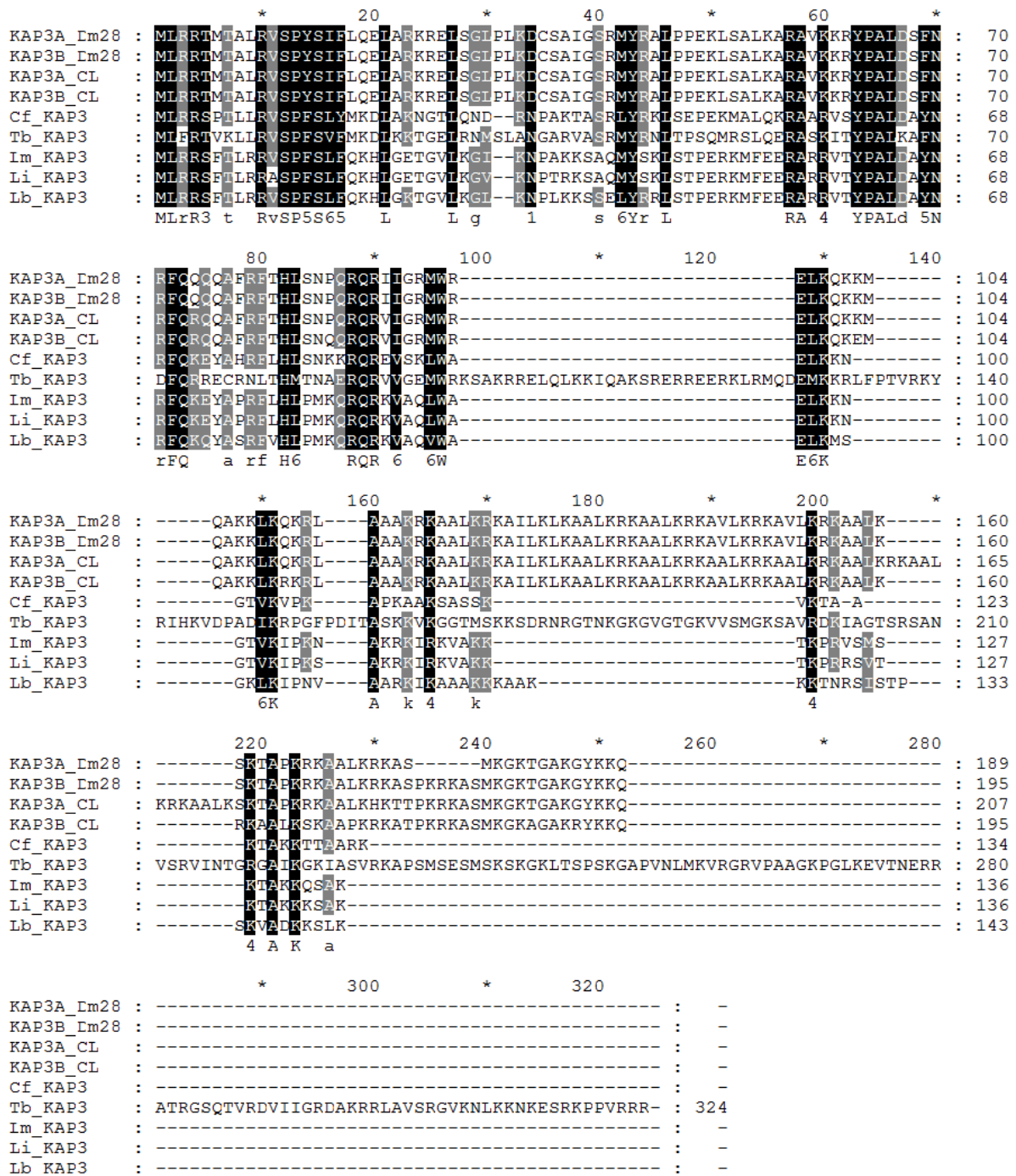


FIGURA 11 - COMPARAÇÃO ENTRE AS SEQÜÊNCIAS DE KAP3 EM DIFERENTES TRIPANOSOMATÍDEOS

LEGENDA: Em preto encontram-se os resíduos conservados em todas as seqüências e em cinza os resíduos conservados na maioria delas.

Mesmo apresentando pouca identidade e variação de tamanho, alguns dados do genoma sugerem que esses genes são ortólogos entre si. O primeiro é o fato da existência de sintenia entre seus loci nas várias espécies de tripanosomatídeos, como pode ser visualizado na figura 3. Em segundo lugar, os genes para KAP3 de *Leishmania sp.* (*Lmkap3*, *Likap3* e *Lbkap3*) (411 pb, 411 pb e 432 pb) tem grande identidade (69,6%, 71,9% e 64,2%) com *Cfkap3* (405 pb) (FIGURA 12) e estão localizados na mesma região cromossômica que os genes *kap3* de *T. cruzi* e *T. brucei*. O grau de similaridade entre as proteínas LmKAP3, LiKAP3, LbKAP3 e CfKAP3 é de aproximadamente 80%.

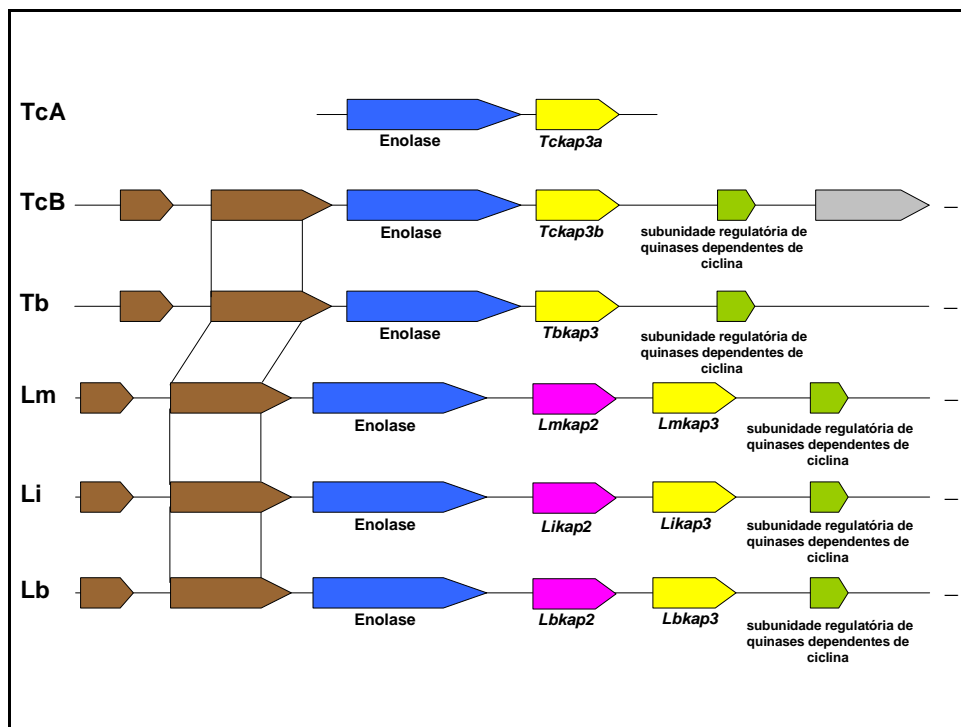


FIGURA 12- SINTENIA DE *Tckap3* COM OUTROS TRIPANOSOMATÍDEOS

LEGENDA: Os dois contigs de *Tckap3* (TcA e TcB) estão representados nesta figura, juntamente com os contigs de outros tripanosomatídeos (Tb= *T. brucei*; Lm= *L. major*; Li= *L. infantum* e Lb= *L. brasiliensis*), mostrando que *kap3*, representado pela cor amarela, apresenta uma sintenia entre seus loci em todas as espécies mostradas. Ao lado direito de *kap3* está o gene de uma subunidade regulatória de uma quinase dependente de ciclina, representado pela cor verde. Ao lado esquerdo, encontra-se o gene da enolase, representado em azul. O gene *kap2*, presente em *Leishmania sp.*, está representado na cor rosa.

A expressão de vários genes mitocondriais de *C. fasciculata* e *L. major* é regulada durante o ciclo celular, em parte por uma seqüência consenso [(C/A)AUAGAA(G/A)] presente nas regiões 5' e 3'-UTR dos respectivos mRNAs (BROWN & RAY, 1997; MAHMOOD *et al.*, 1999; MAHMOOD & RAY, 1998; PASION *et al.*, 1996; ZICK *et al.*, 2005).

Assim resolvemos caracterizar a região 5'-UTR do transcrito *Tckap3* na tentativa de identificar sinais com identidade com aqueles encontrados em *C. fasciculata*. Na figura 13 está representada região 5'-UTR do transcrito *Tckap3*, com a seqüência parcial do mini-exon, proveniente do *primer* usado na técnica de RT-PCR, bem como parte da região codificante do gene. O mini-exon está situado a 100 bases a jusante do início da região codificante do transcrito *Tckap3* e define, portanto, uma região 5'-UTR de 139 bases, considerando que o tamanho do mini-exon é de 39 bases. A análise da seqüência não mostrou nenhum elemento com as características daquele envolvido na regulação de genes em *C. fasciculata*.

```

ME_KAP3 :      20              40              60
           : ACAGTTTCTGTACTATATTCCTGACGTTTGTCTTCTCACAGATCGCACTGCTGAATTCAGCCGTTATTTT : 70

ME_KAP3 :      80              100             120             140
           : GTTCATCCATCCATCAACGGGGAGTGAAGAGCCAACAGCAATAAAAAATGCTTCGACGCACGATGACC : 140

ME_KAP3 :      160             180             200
           : GCGCTGCGTGTCAGCCCTACTCCATATTTCTGCAGGAATTGGCGAGGAAAAGGGAGCTGTCGGGGCTGC : 210

ME_KAP3 :      220             240
           : CATTGAAGGATTGCTCAGCTATCGGCTCCCGTATGT : 246

```

FIGURA 13 - LOCALIZAÇÃO DO MINI-EXON DE *Tckap3*

LEGENDA: O mini-exon de *Tckap3* (sequencia parcial, em preto) está localizado a 120 pb da região codante (representada, em parte, pela cor verde).

As KAPs de *C. fasciculata* além de apresentarem características de histonas-like, são ricas em resíduos de lisina e arginina (proteínas básicas), apresentam baixa massa molecular (13 – 26 kDa) e uma pré-sequência de nove aminoácidos básicos

envolvida na importação da proteína para a mitocôndria. Na figura 14 está uma comparação dos aminoácidos presentes nas KAPs de *C. fasciculata*.

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| KAP1 | Met | Leu | Arg | Val | Ser | Val | Arg | Ser | Leu | Val | Arg | Lys | Ala | Ser | Ser | Lys |
| KAP2 | Met | Leu | Arg | Arg | Thr | Val | Ser | Asn | Phe | Ala | Met | Ser | Pro | Tyr | Met | Leu |
| KAP3 | Met | Leu | Arg | Arg | Ser | Pro | Thr | Leu | Leu | Arg | Val | Ser | Pro | Phe | Ser | Leu |
| KAP4 | Met | Leu | Arg | Phe | Val | Pro | Arg | Arg | Leu | Ala | Ile | Gly | Ala | Tyr | Thr | Leu |

FIGURA 14 - COMPARAÇÃO ENTRE AS PRÉ-SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DAS PROTEÍNAS ASSOCIADAS AO CINETOPLASTO (KAPS) DE *C. fasciculata*

LEGENDA: Em negrito está representada a pré-sequência de nove aminoácidos de cada KAP. Nas caixas amarelas estão as regiões de maior homologia.

FONTE: HINES & RAY, 1998.

Com o intuito de verificar se em TcKAP3 havia algum sinal de endereçamento similar ao das KAPs de *C. fasciculata*, foi realizada uma análise da seqüência de aminoácidos de TcKAP3, onde foi possível perceber a presença de uma região, localizada na extremidade N-terminal, muito similar a pré-sequência clivável de nove aminoácidos de *C. fasciculata* (FIGURA 15).

```

KAP3_C.fasciculata : MLRRSPILLRVSPFSLYMKDLAKNGTLOND--RNPAKTASRLYRKLSEPEKM-ALOKRAARVSYPALDAYNRFQK : 72
KAP3_Dm28c       : MLRRSPILLRVSPYSIFLQELARKRVL SGLPLKDCSAIGSRMYRSLP-PEKLSALKARAVKRYPALDSPNRFQK : 74

KAP3_C.fasciculata : EYAHRFTHLSNKKRQRQVSKLWAEIK-----KNGTVKVPKAPK----- : 110
KAP3_Dm28c       : QCAFRTTHLSNPQRQRITGRMWRELKQKKMQAKKLGKRLAAAKRKAALKRKAALKRKAALKRKAALKRKAALKRKAAL : 149

KAP3_C.fasciculata : ---AAKSASSKVKTAAKT---AKKTTAARK----- : 134
KAP3_Dm28c       : KAVLKRKAALKSKTAPKRKAALKRKAASPKRKASMKGKTGAKGYKKQ- : 195

```

FIGURA 15 - COMPARAÇÃO ENTRE AS SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DE CfKAP3 E TcKAP3

LEGENDA: Em preto encontram-se os resíduos conservados em todas as seqüências. Na caixa amarela está a pré-sequência clivável de nove aminoácidos de TcKAP3. Nas caixas azul e vermelha estão representadas repetições de alguns resíduos.

4.2 Análise da expressão de *Tckap3*

O antisoro contra TcKAP3 (anti-TcKAP3), obtido a partir da imunização de camundongos com a proteína recombinante TcKAP3, foi utilizado em ensaios do tipo western blot, para analisar a expressão dessa proteína nas diferentes formas evolutivas do *T. cruzi*. Os resultados mostram que o soro anti-TcKAP3 reconhece um polipeptídeo de aproximadamente 25 kDa, em todas as formas evolutivas do parasita analisadas (FIGURA 16), compatível com a massa molecular deduzida a partir da seqüência do gene *Tckap3*.

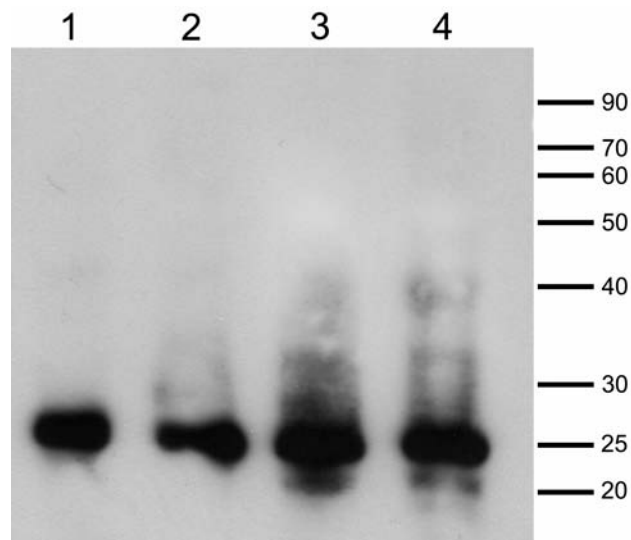


FIGURA 16 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE *Tckap3* NAS DIFERENTES FORMAS EVOLUTIVAS DE *T. cruzi*

LEGENDA: Análise da expressão de *Tckap3* em formas epimastigotas (1), tripomastigotas metacíclicas (2), amastigotas (3) e tripomastigotas de cultura (4) de *T. cruzi* reagidos com o soro anti-TcKAP3. À direita estão indicadas as posições das bandas do marcador de massa molecular em kDa.

4.3 Localização celular de *Tckap3* através de ensaio de imunofluorescência

Na figura 8 está mostrado o resultado do ensaio de imunofluorescência, usando o soro anti-TcKAP3. Nessa figura pode-se observar que o antisoro reconhece fortemente um antígeno no cinetoplasto das formas epimastigotas do *T. cruzi* (FIGURA

17 C, D, E, F), indicando que TcKAP3, uma proteína tipo histona H1, está realmente associada com o kDNA do parasita. Além disso, é possível observar uma marcação na região entre o cinetoplasto e o flagelo.

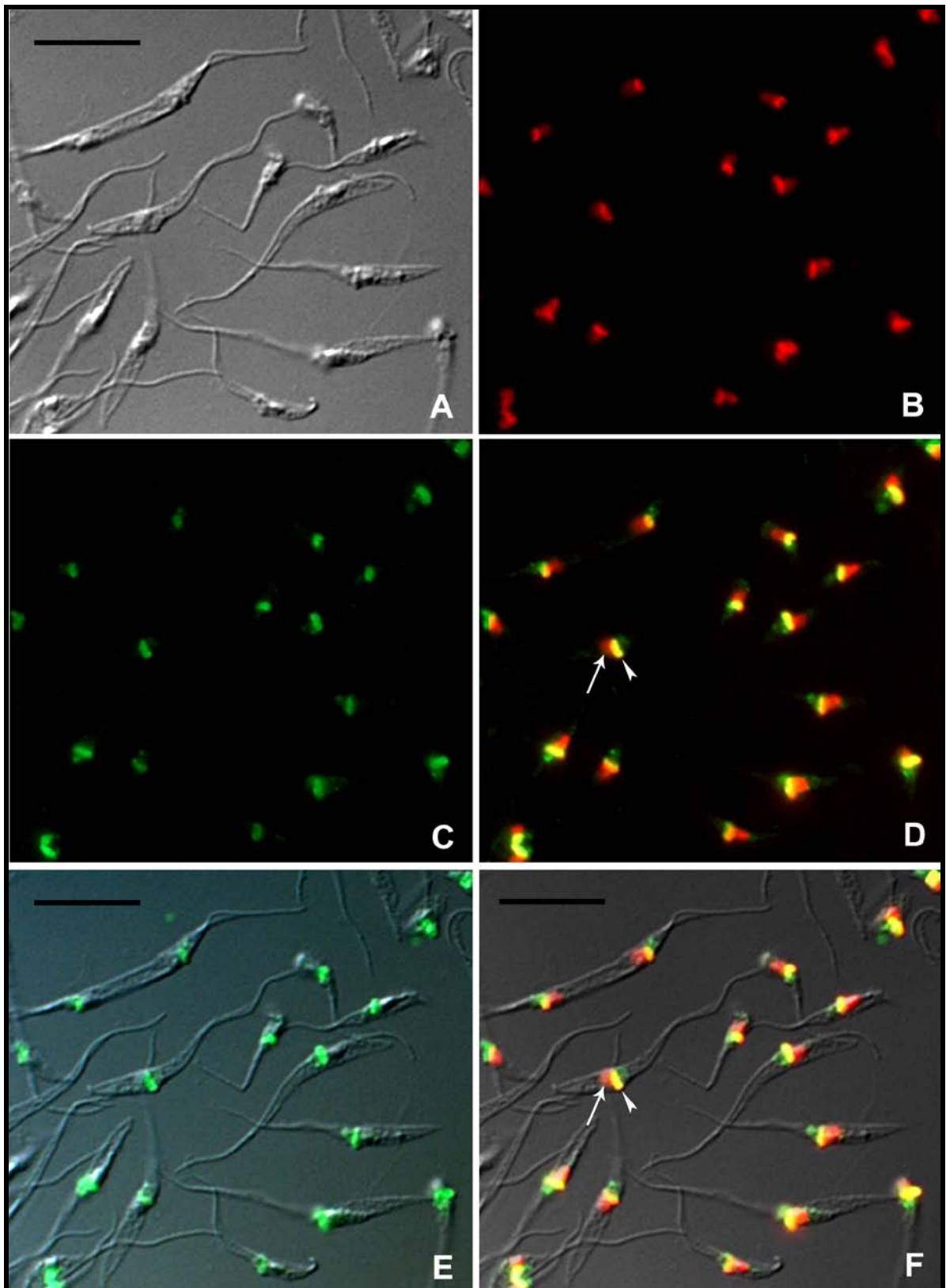


FIGURA 17 - IMUNOLocalIZAÇÃO DE TCKAP3 EM EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi*

LEGENDA: A: contraste interferencial diferencial (DIC). B: iodeto de propídeo (IP), marcando o núcleo e o cinetoplasto. C: fluorescência, mostrando a localização de TcKAP3 mais intensa no cinetoplasto dos protozoários. D: sobreposição das imagens B e C, mostrando em vermelho o núcleo, em amarelo o cinetoplasto. Uma região abaixo do cinetoplasto permanece marcada em verde. E: sobreposição das imagens A e C, evidenciando a marcação de TcKAP3 no cinetoplasto. F: sobreposição das imagens A, B e C,. A seta → indica o núcleo e a seta ► indica o cinetoplasto. Barra=10µm

4.4 Deleção do gene *Tckap3* por nocaute gênico

As técnicas que permitem a remoção de um gene e sua substituição por genes repórteres, através do processo de recombinação, têm sido usadas com sucesso para verificação da função gênica em tripanosomatídeos (SWINDLE & TAIT, 1996). O nocaute gênico consiste na inserção de marcadores genéticos de seleção (gene codificando resistência a neomicina ou higromicina, entre outros), flanqueados por seqüências pertencentes ao locus cromossômico de interesse. Através do processo de recombinação homóloga, o marcador pode então substituir o gene que se quer estudar. Desse modo, pode ser possível analisar a função de determinado gene, através das alterações - decorrentes de sua ausência - na fisiologia do parasita. No presente estudo, os genes repórteres que codificam resistência aos antibióticos G418 e higromicina foram flanqueados por seqüências a montante e a jusante da região codificante do gene *Tckap3*. As construções foram usadas para transfectar *T. cruzi* e gerar mutantes para o gene *Tckap3*, a fim de se estudar o efeito que a ausência do gene *Tckap3* causa no metabolismo do parasita.

Após obtenção de uma população de *T. cruzi* mutante para o gene *Tckap3* ($\Delta kap3::neo/higro$), resistente a ambos antibióticos, neomicina e G418, o DNA desta população foi extraído para análise por PCR e Southern blot, a fim de confirmar a eficiência do nocaute.

4.4.1 Análise por PCR do DNA dos parasitas transfectados com os cassetes UPS-NEO-DOWN e UPS-HIGRO-DOWN

Foram realizadas várias reações de PCR a fim de confirmar a deleção do gene *Tckap3* do genoma do *T. cruzi* Dm28c e a substituição dos seus alelos pelos genes *neo* e *higro*. A amplificação do gene da enolase (*eno*), que está a montante de *Tckap3*, foi usada como controle positivo. As reações de PCR foram feitas com DNA de *T. cruzi*^{kap3+} (tipo selvagem) e com DNA de *T. cruzi*^{Δkap3::neo/higro}. Na figura 18A observa-se que o gene *Tckap3* (588 pb) foi amplificado somente na PCR realizada com DNA de *T. cruzi* tipo selvagem, enquanto que os genes *neo* (795 pb) e *higro* (1026 pb) só foram amplificados nas reações que contém DNA da população do *T. cruzi*^{Δkap3::neo/higro}. O gene da enolase (*eno*), como esperado, foi amplificado em ambas amostras de DNA.

Na figura 18B foi utilizado o primer ENOF, que hibridiza no início da região codificante do gene *eno* em combinação com os primers KAP3R, HIGROR e ENOR, que hibridizam no final da região codificante dos respectivos genes (*Tckap3*, *neo*, *higro* e *eno*). O resultado mostra novamente que os produtos das amplificações ENOF+KAP3R, ENOF+NEOR, ENO+HIGROR só foram observados quando DNA do *T. cruzi*^{Δkap3::neo/higro} foi usado. Já o produto da amplificação ENOF+ENOR foi encontrado tanto quando o DNA do *T. cruzi*^{kap3+} como o DNA do *T. cruzi*^{Δkap3::neo/higro} foram usados. Essas amplificações tendo o gene *eno* como âncora, confirmam a inserção correta dos genes *neo* e *higro* no locus genômico de *Tckap3* e a ausência do gene *Tckap3* no *T. cruzi* nocauteado (*T. cruzi*^{Δkap3::neo/higro}). A figura 18C mostra um esquema da localização dos primers utilizados nas reações de PCR.

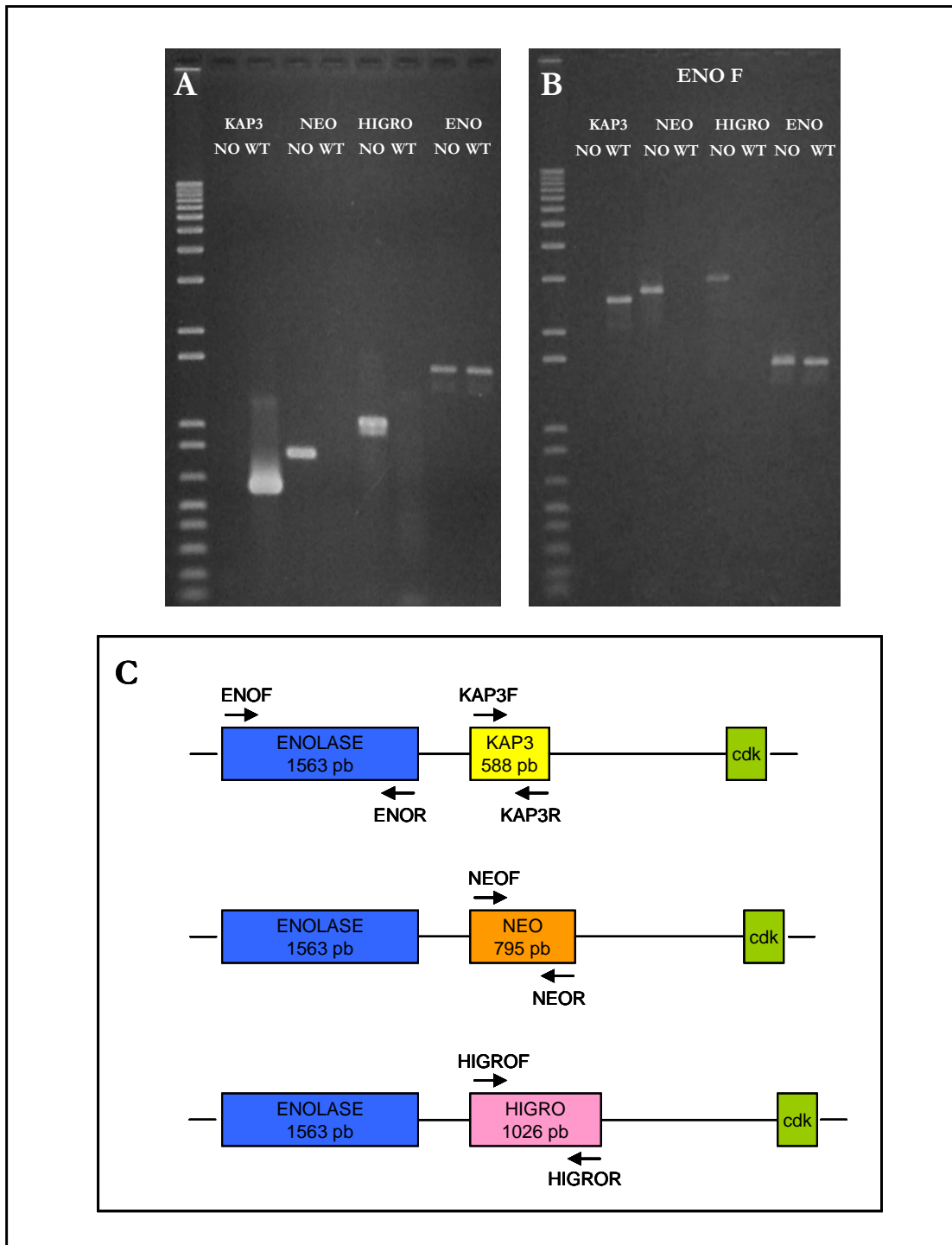


FIGURA 18 - ENSAIOS DE PCR UTILIZANDO DNA DE *T. cruzi*^{KAP3+} (WT) E *T. cruzi*^{ΔKAP3::NEO/HIGRO} (NO) COM DIFERENTES PRIMERS

LEGENDA: No quadro A foram utilizados os primers F e R de cada gene e no quadro B foi utilizado o primer R de cada gene com o primer ENOF. No quadro C está um esquema da localização dos primers utilizados.

4.4.2 Análise da organização dos genes *Tckap3*, *neo* e *higro* por ensaio do tipo southern blot

Neste ensaio foi utilizado DNA total extraído de: (1) *T. cruzi*^{kap3+} (tipo selvagem), (2) *T. cruzi*^{Δkap3::neo} (simples nocaute) e (3) *T. cruzi*^{Δkap3::neo/higro} (duplo nocaute). Foram utilizadas cinco sondas: (1) o gene *Tckap3*, (2) o gene *neo*, (3) o gene *higro*, a região a montante (UPS) (4) e a jusante (DOWN) (5) do gene *Tckap3*, as mesmas que foram usadas na construção dos cassetes UPS-NEO-DOWN e UPS-HIGRO-DOWN.

O DNA total das três amostras foi digerido com a enzima de restrição *KpnI*, que pela análise de restrição dos contigs contendo o gene *Tckap3* da cepa CL Brener, cliva apenas uma vez a região codificante do referido gene (posição 189). Além disso, dois sítios para essa enzima são encontrados a 3,8 kb e a 3,0 kb, respectivamente a montante e a jusante do sítio interno ao gene *Tckap3* (FIGURA 19).

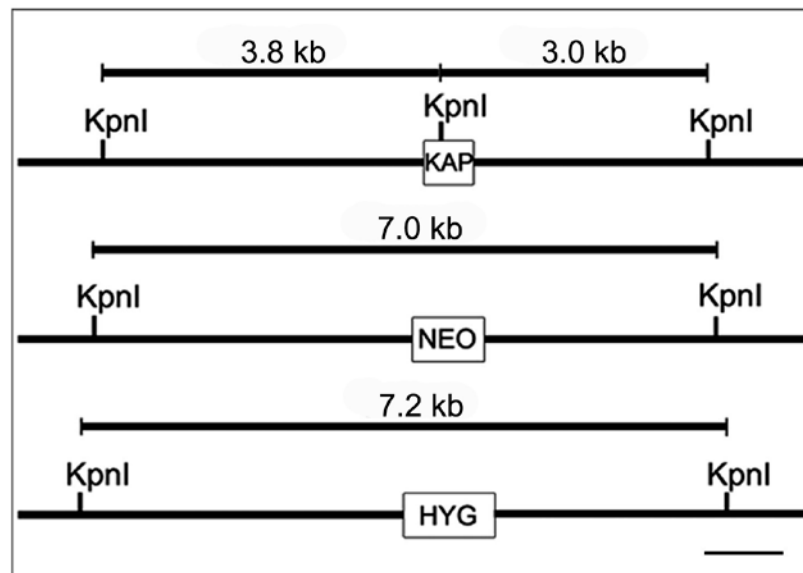


FIGURA 19 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS SÍTIOS DA ENZIMA *KpnI* NO LOCUS DO GENE *KAP3* DE *T. cruzi* CL Brener

LEGENDA: Este esquema representa esquematicamente, em escala, os genes *kap3*, *neo* e *higro*, as regiões upstream e downstream e os sítios de clivagem da enzima *KpnI*. A barra deste esquema corresponde a 1 kb.

A disposição dos sítios *KpnI* ao redor do gene *Tckap3* permitiu uma rápida análise da organização desse gene, bem como da inserção dos genes *neo* e *higro*, uma vez que estes dois últimos não são clivados pela enzima *KpnI*. Desse modo, a sonda *kap3* deve reconhecer duas bandas (3,0 kb e 3,8 kb) apenas na hibridização com as amostras contendo o DNA do *T. cruzi* selvagem e o DNA do *T. cruzi* $\Delta\text{kap3}::\text{neo}$, como mostrado na figura 20I-A1 e 2. Como esperado, no *T. cruzi* $\Delta\text{kap3}::\text{neo/higro}$ nenhum sinal de hibridização foi observado (FIGURA 20I-A3).

Quando as amostras DNAs clivadas com *KpnI* foram hibridizadas com a sonda *neo*, apenas uma banda de 7,0 kb foi observada e somente nos parasitas nocauteados (simples e duplo nocaute). Esse resultado é esperado, já que o gene *neo* não é clivado pela enzima *KpnI*, e é compatível com a inserção de *neo* no lugar de *Tckap3*.

De modo semelhante, a hibridização com o gene *higro*, mostra o aparecimento de uma banda de 7,2 kb, como esperado, apenas no DNA dos parasitas duplamente nocauteados (FIGURA 20-III A3). O tamanho da banda observada é compatível também com a inserção de *higro* no lugar de um dos alelos de *Tckap3*, pois o gene *higro* também não possui sítio de reconhecimento para a enzima *KpnI* e seu tamanho é 200 pb maior que o gene *neo*.

Na figura 20-IV, a sonda utilizada foi a região UPS. Pode-se perceber no DNA selvagem (linha 1), a presença de uma única banda (3,8 kb), correspondente principalmente à região a montante do gene *Tckap3* reconhecida pela sonda. Na amostra contendo o DNA do *T. cruzi* simples nocaute (linha 2), percebe-se a presença de 2 bandas: uma correspondente àquela reconhecida pela sonda UPS no *T. cruzi* selvagem, e outra, com tamanho de 7,0 pb, correspondente ao tamanho reconhecido pela sonda na presença do gene *neo*, indicando que nesse parasita apenas um dos alelos *kap3* foi substituído pelo gene *neo*. Já no DNA do *T. cruzi* mutante para ambos os alelos de *Tckap3* (duplo nocaute), percebe-se uma banda na mesma altura da reconhecida pela sonda na presença do gene *neo*, porém mais forte, indicando que os dois alelos de *kap3* foram substituídos, um pelo gene *neo* e o outro pelo gene *higro*. A banda forte é, na verdade, uma banda dupla não resolvida no gel e cuja diferença de tamanho é de 200 pb (diferença entre o tamanho do gene *neo* e o gene *higro*). Na figura 20-V, observa-se o mesmo padrão encontrado na figura 20-IV, porém agora foi

utilizada a sonda DOWN, correspondente à região à jusante do gene *kap3*, existindo apenas uma diferença no tamanho das bandas nas amostras do *T. cruzi* selvagem e do *T. cruzi* simples nocaute, já que esta região possui um tamanho diferente da região reconhecida pela sonda UPS.

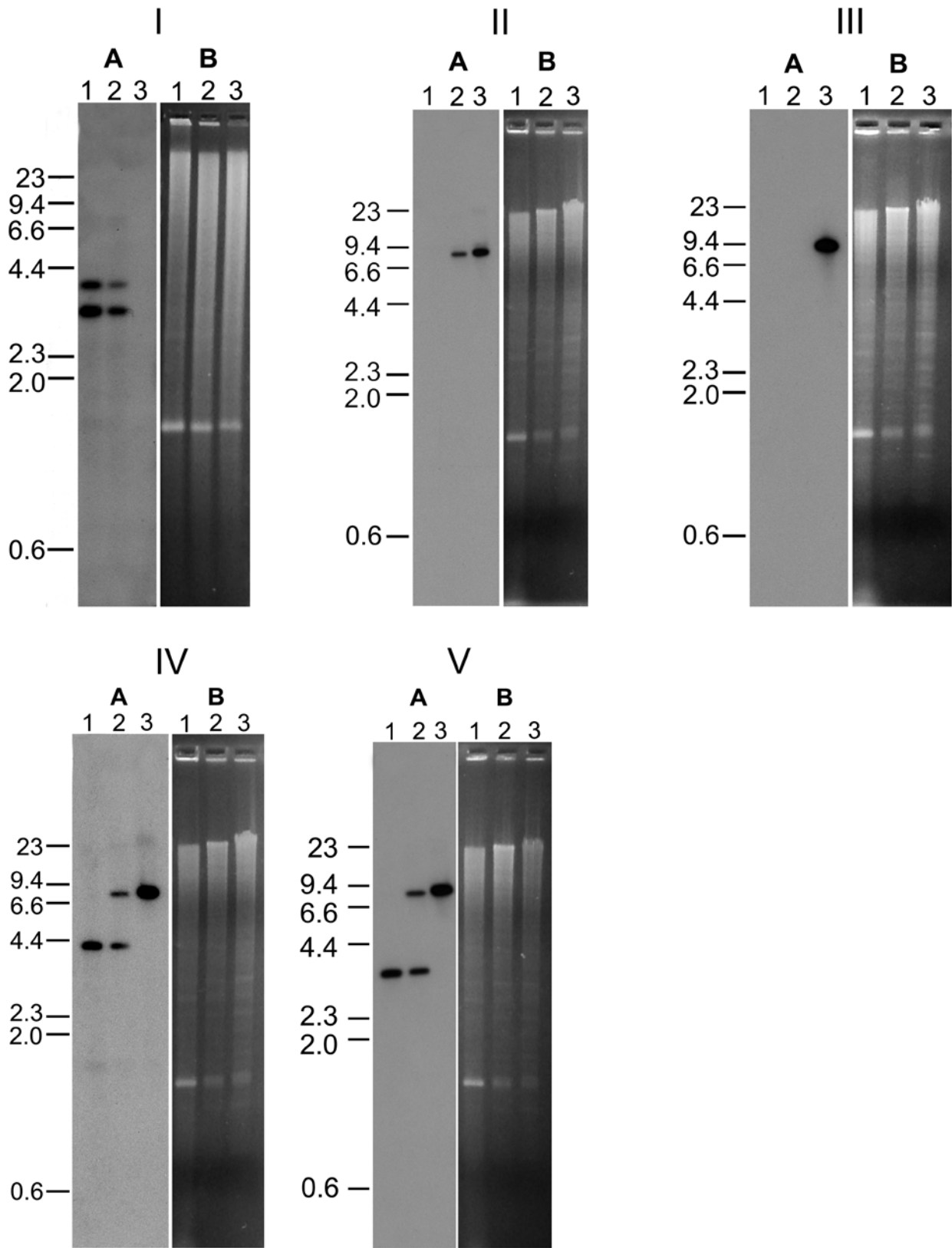


FIGURA 20 – ANÁLISE DA ORGANIZAÇÃO DOS GENES *TCKAP3*, *NEO* E *HIGRO* POR ENSAIO DO TIPO SOUTHERN BLOT

LEGENDA: O quadro **I** representa os resultados da hibridização com a sonda kap3. O quadro **II** representa os resultados obtidos com a hibridização com a sonda neo. O quadro **III** representa os resultados obtidos com a hibridização com a sonda higo. O quadro **IV** representa os resultados obtidos com a hibridização da sonda ups. O quadro **V** representa os resultados obtidos com a hibridização da sonda down. **A** representa autorradiograma e **B** representa os perfis de migração dos DNAs isolados dos parasitas e digeridos com *KpnI*, em gel de agarose. Na **linha 1** encontra-se o DNA de *T. cruzi*^{kap3+} (selvagem), na **linha 2** o DNA de *T.cruzi*^{Δkap3::neo} (simples nocaute) e na **linha 3** o DNA de *T. cruzi*^{Δkap3::neo/higo} (duplo nocaute). Os números à esquerda da figura representam os tamanhos das bandas do marcador de peso molecular (DNA do fago λ digerido com a enzima de restrição *HindIII*).

4.5 Análise da expressão do gene *Tckap3* por northern blot

A fim de confirmar a ausência da expressão do gene *Tckap3*, realizamos um ensaio de northern blot utilizando RNA total extraído do *T. cruzi*^{kap3+} (selvagem) e do *T. cruzi*^{Δkap3::neo/higo} (duplo nocaute) e usando como sonda a região codificante do gene *Tckap3*. Na figura 21 é possível observar uma banda correspondente a uma espécie de mRNA de aproximadamente 1,8 kb, apenas na amostra de RNA purificada a partir do *T. cruzi* selvagem (linha 1). Como esperado, na amostra do duplo nocaute, nenhuma banda é observada, visto que esse RNA não é mais transcrito, corroborando com os resultados anteriores de southern blot.

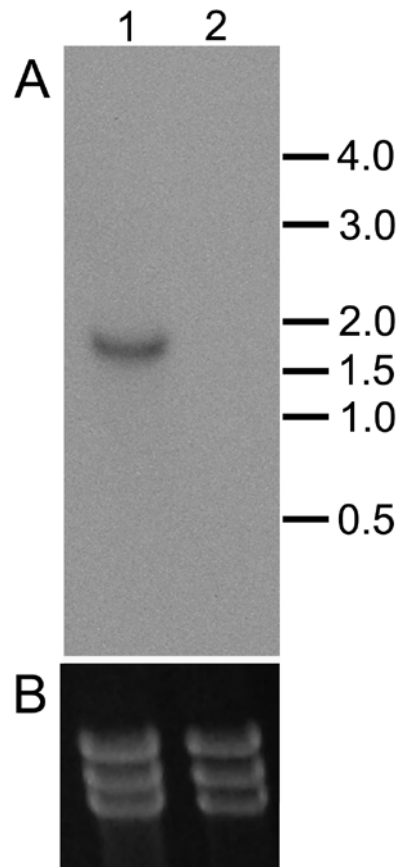


FIGURA 21 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE *Tckap3* POR ENSAIO DO TIPO *NORTHERN BLOT*

LEGENDA: A) RNA total das formas epimastigotas de *T. cruzi* (kap3+ (1) e RNA total das formas epimastigotas de *T. cruzi* duplo nocaute (2).

B) gel de agarose corado com brometo de etídeo das amostras de RNA analisadas em A, mostrando especificamente as bandas dos RNAs ribossômicos de *T. cruzi* (kap3+) (1) e *T. cruzi* duplo nocaute (2), indicando que as amostras não estavam degradadas e que quantidades quase equivalentes foram aplicadas no gel de agarose/formaldeído.

Os números à direita da figura indicam o tamanho das bandas do marcador de peso molecular (RNA ladder – Invitrogen)

4.6 Comparação da expressão do gene *Tckap3* por western blot

O antisoro contra a proteína TcKAP3, obtido após imunização dos camundongos, foi utilizado em ensaio do tipo western blot, para avaliar se *Tckap3* ainda estava sendo expresso no *T. cruzi* após o nocaute gênico.

O que se observou foi, novamente como esperado, que a proteína TcKAP3 não é mais expressa no *T. cruzi* ^{Δ kap3::neo/higro} (figura 22). Pode-se observar a presença de TcKAP3 no extrato das formas epimastigotas de *T. cruzi*^{kap3+} (figura 22.1A) mas não no extrato de epimastigotas de *T. cruzi* ^{Δ kap3::neo/higro} (figura 22.2B). Como controle, foi realizado um experimento usando o antisoro contra a proteína GAPDH de *T. cruzi*, onde foi visto que a mesma é expressa tanto no extrato das formas epimastigotas de *T. cruzi*^{kap3+}, quanto no das formas epimastigotas de *T. cruzi* ^{Δ kap3::neo/higro} (figura 22.3).

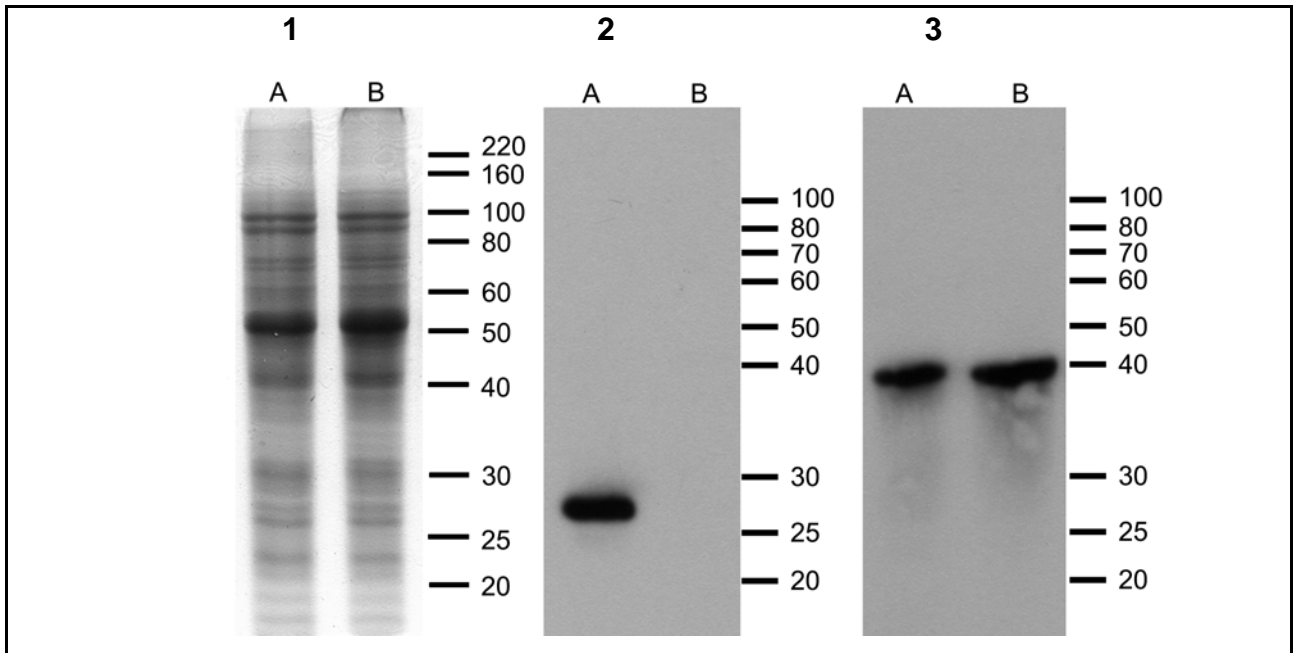


FIGURA 22 - COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *Tckap3* POR WESTERN BLOT

LEGENDA: 1) Gel de poliacrilamida 13%/SDS corado com Coomassie R-250, mostrando o perfil dos extratos de epimastigotas de *T. cruzi*^{kap3+} (A) e de *T. cruzi* ^{Δ kap3::neo/higro} (B), utilizados nos imunoblots.

2) Imunoblot de extratos de epimastigotas de *T. cruzi*^{kap3+} (A) e de *T. cruzi* ^{Δ kap3::neo/higro} (B) reagidos com anti-TcKAP3.

3) Imunoblot de extratos de epimastigotas de *T. cruzi*^{kap3+} (A) e de *T. cruzi* ^{Δ kap3::neo/higro} (B) reagidos com anti-TcGAPDH. Os números à direita da figura representam os tamanhos das bandas do marcador de massa molecular (Benchmark) (Invitrogen).

4.7 Análise da expressão do gene da enolase (eno)

Como pode ser visto na figura 23, o primer UPSKAP3F, usado para a amplificação da região UPS (presente nos cassetes UPS-NEO-DOWN e UPS-HIGRO-DOWN), está contido na região codificante do gene da enolase de *T. cruzi* (533 pb da extremidade 3' do gene *eno*). Existia a possibilidade de que o gene da enolase tivesse sofrido alguma mudança de fase durante os eventos de recombinação homóloga, usando os cassetes descritos acima, gerando um mutante não só para o gene *Tckap3*, mas também para o gene da enolase. Portanto, a fim de verificar se o gene da enolase continuava inalterado após o duplo evento de recombinação que gerou o nocaute para *Tckap3*, um fragmento do gene *eno* contendo o sítio do primer UPSKAP3F foi amplificado por PCR, usando o primer ENOF2 (596 pb da extremidade 3' do gene *eno*) e o primer ENOR, que hibridiza com o final da região codante do gene *eno* (967 pb a 1563 pb). O mesmo procedimento foi feito com a amostra de DNA do *T. cruzi* Dm28c selvagem. Os fragmentos amplificados nas duas amostras de DNA foram seqüenciados e comparados entre si.

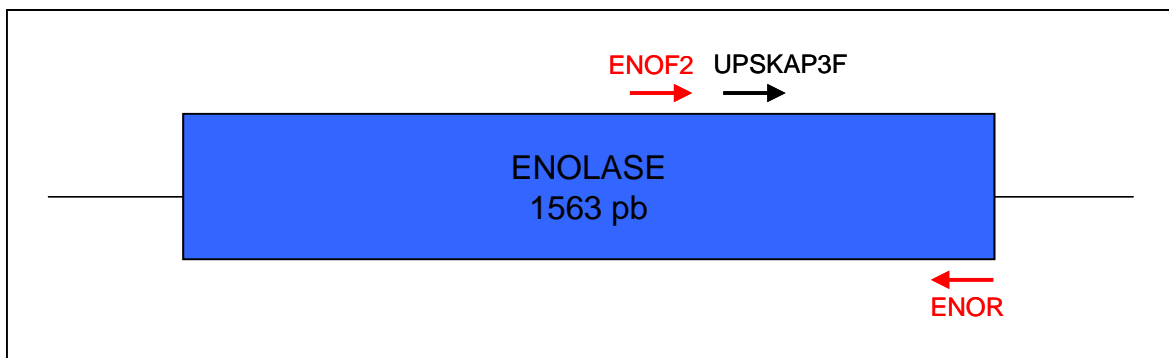


FIGURA 23 - ESQUEMA MOSTRANDO O GENE DA ENOLASE E OS PRIMERS UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DE SEU FRAGMENTO QUE FOI SUBMETIDO A SEQÜENCIAMENTO

LEGENDA: Em vermelho estão os primers ENOF2 e ENOR utilizados para a amplificação do fragmento que foi seqüenciado e em preto está o primer UPSKAP3F, utilizado para a amplificação da região UPS do gene *Tckap3*

A figura 24 mostra a substituição de três nucleotídeos (3 transições, T>C) no *T. cruzi*^{Akap3::neo/higro}. Contudo, apenas uma substituição não-sinônima de um aminoácido

(W421R) próximo da extremidade C-terminal da proteína foi gerada (FIGURA 25), sugerindo que o gene da enolase não foi afetado pelos eventos de recombinação.

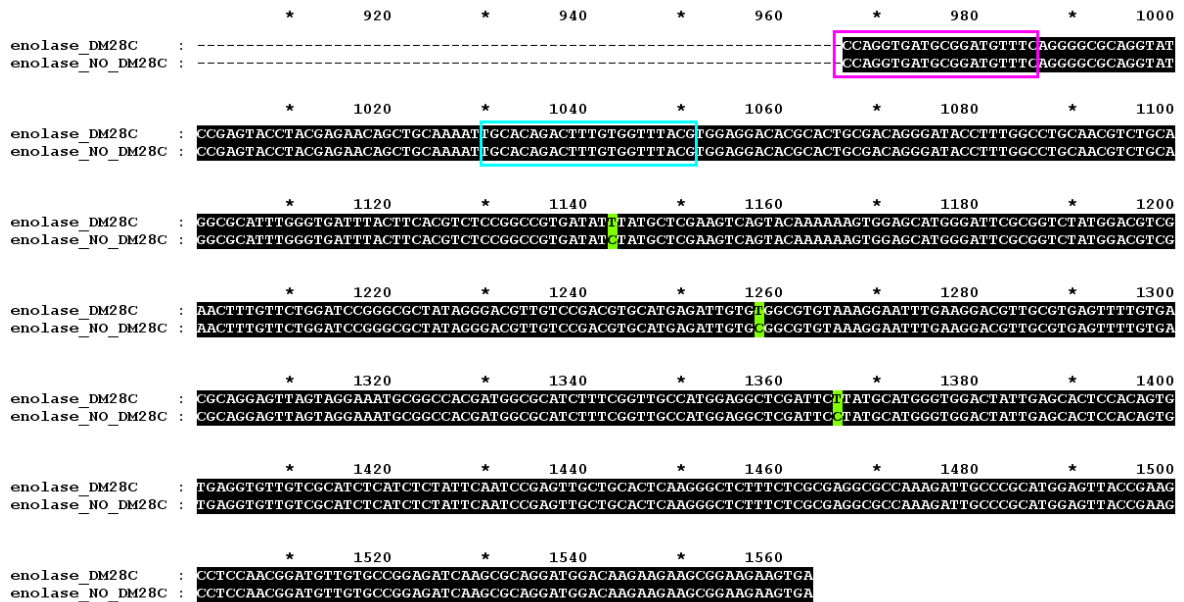


FIGURA 24 - COMPARAÇÃO ENTRE AS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO GENE DA ENOLASE DO *T. cruzi* DM28C (KAP3+) E DO *T. cruzi* NOCAUTEADO (Δ KAP3::NEO/HIGRO)

LEGENDA: Coloridos em preto estão os nucleotídeos idênticos e em verde os que diferem entre si. O retângulo rosa indica o primer ENOF2, utilizado para a amplificação de parte do gene enolase e o retângulo azul indica a posição dos primers UKAP3NEOF e UKAP3HIGF, utilizados na construção dos cassetes neo e higo para a substituição do gene kap3.

```

          *           340           360           *
Enolase_Dm28c : ----PGDADVSGAQVSEYLREQLQNCCTDFVVYVEDTHCDRDTFGLQRLQAHLG
Enolase_NO_Dm28c: ----PGDADVSGAQVSEYLREQLQNCCTDFVVYVEDTHCDRDTFGLQRLQAHLG

          380           *           400           *           420
Enolase_Dm28c : DLLHVSGRDIYARSQYKKVEHGIRGLWTSNFVLDPGAIGTLSDVHEIVWRVKE
Enolase_NO_Dm28c: DLLHVSGRDIYARSQYKKVEHGIRGLWTSNFVLDPGAIGTLSDVHEIVRRVKE

          *           440           *           460           *
Enolase_Dm28c : FEGRCVSFVTQELVGNAATMAHLSVAMEARFLCMGLLSTPQCEVLSHLISIQ
Enolase_NO_Dm28c: FEGRCVSFVTQELVGNAATMAHLSVAMEARFLCMGLLSTPQCEVLSHLISIQ

          480           *           500           *           520
Enolase_Dm28c : SELLHSRALSREAPKIARMELPKPPTDVVPEIKRRMDKKKRRKK
Enolase_NO_Dm28c: SELLHSRALSREAPKIARMELPKPPTDVVPEIKRRMDKKKRRKK

```

FIGURA 25- COMPARAÇÃO DA SEQÜÊNCIA PARCIAL DE AMINOÁCIDOS DA ENOLASE DE *T. cruzi* DM28C TIPO SELVAGEM E *T. cruzi* NOCAUTEADO (Δ KAP3::NEO/HIGRO)

LEGENDA: O quadro em vermelho indica a região correspondente à posição do *primer* UPSKAP3F e NO significa nocaute

A expressão do gene da enolase também foi analisada por ensaio do tipo western blot. Para tanto, o gene que codifica para a enzima enolase (57,2 kDa) foi expresso em *E. coli*, a partir da clonagem no vetor de expressão pQE30. A proteína recombinante foi purificada e utilizada para a obtenção de antisoro policlonal, que reconheceu a proteína enolase tanto em extratos de *T. cruzi* selvagem, quanto em extratos do mutante de *T. cruzi* para *Tckap3* (FIGURA 26).

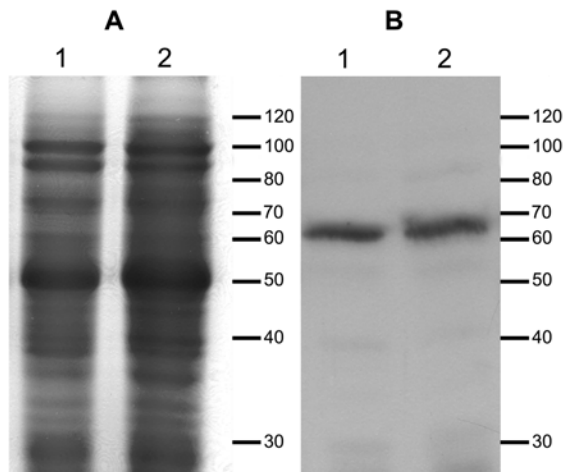


FIGURA 26 - COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DA ENOLASE

LEGENDA: (A) SDS-PAGE com o perfil dos extratos totais de *T. cruzi* Dm28c tipo selvagem (1) e *T. cruzi* nocauteado (B). (B) Análise da expressão da ENOLASE por western blot. (1) Extrato total de formas epimastigotas de *T. cruzi* Dm28c tipo selvagem e (2) extrato total de *T. cruzi* nocauteado.

4.8 Análise da morfologia e da ultraestrutura do cinetoplasto do mutante de *T. cruzi* para *Tckap3*

Sabendo-se que TcKAP3 está associada ao cinetoplasto e pode estar envolvida na compactação do kDNA do *T. cruzi*, como foi mostrado para as KAPs de *Crithidia fasciculata* (XU & RAY, 1993; XU et al., 1996; HINES & RAY, 1998); sua ausência poderia levar a alteração na estrutura do DNA mitocondrial dos parasitas nocauteados. Portanto, o primeiro passo foi verificar se havia alterações na morfologia do parasita. Formas epimastigotas e tripomastigotas do mutante de *T. cruzi*, foram analisadas ao microscópio óptico, após coloração. Como pode ser observado na figura 27, epimastigotas do mutante de *T. cruzi* para *Tckap3* apresentam uma morfologia fusiforme com o cinetoplasto característico em forma de barra localizado anteriormente ao núcleo, não se evidenciando portanto nenhuma alteração em relação à morfologia dos parasitas do tipo selvagem (figura 27A). Nenhuma alteração morfológica foi observada nas formas metacíclicas do mutante de *T. cruzi*. Estas se apresentam na forma alongada, com o cinetoplasto arredondado localizado na região posterior ao núcleo, característico das formas metacíclicas de *T. cruzi* (figura 27B).



FIGURA 27 - COLORAÇÃO PELO MÉTODO PANÓTICO RÁPIDO, DOS PARASITAS NOCAUTEADOS

LEGENDA: A) formas epimastigotas; B) formas tripomastigotas metacíclicas. A seta indica o núcleo e a cabeça de seta indica o cinetoplasto. Barra=10 μ m.

Formas epimastigotas de parasitas do tipo selvagem e nocauteados foram então analisados pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão, para visualizar com mais detalhe o cinetoplasto e verificar se sua estrutura estava alterada pela ausência da TcKAP3 (FIGURA 28). A figura 28A, mostra um corte ultrafino de um epimastigota de *T. cruzi* do tipo selvagem, que apresenta o cinetoplasto compacto e em forma de bastão, característico de formas epimastigotas, sem nenhuma alteração aparente. O mesmo pode ser visto na figura 28B, para o epimastigota de *T. cruzi* nocauteado. A disposição, estrutura e aspecto do cinetoplasto de ambos os parasitas, selvagem e nocauteado, não apresentaram nenhuma diferença entre si, mostrando que mesmo após o nocaute da KAP3, a estrutura do cinetoplasto permanece aparentemente inalterada.

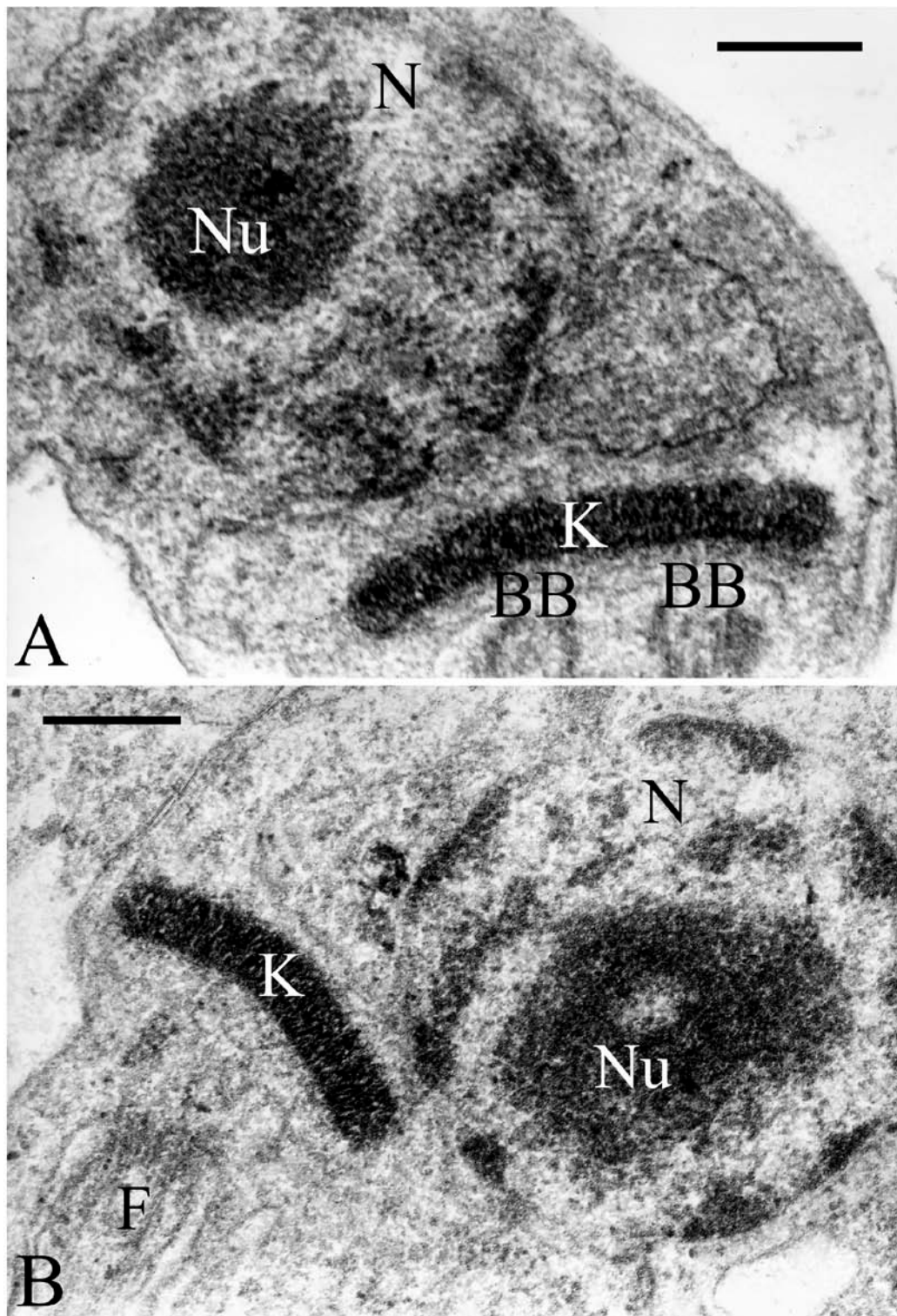


FIGURA 28 - COMPARAÇÃO ENTRE A ULTRAESTRUTURA DO CINETOPLASTO DO *T. cruzi* DM28C TIPO SELVAGEM (A) E DO MUTANTE DE *T. cruzi* PARA *Tckap3* (B) POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

LEGENDA: N = núcleo, Nu = nucléolo, K = cinetoplasto e BB = corpo basal. Barra=0,5µm.

4.9 Multiplicação, diferenciação e infectividade do mutante de *T. cruzi* para *Tckap3*

Os parasitas mutantes foram analisados a fim de verificar se alterações na estrutura do kDNA, pela ausência de KAP3, não estavam levando a alterações na fisiologia do parasita, alterando sua multiplicação, diferenciação e infectividade.

Inicialmente foi analisado o perfil da curva de crescimento das formas epimastigotas. Observou-se que não havia diferença na curva de crescimento dos parasitas nocauteados em relação ao parasita selvagem (figura 29).

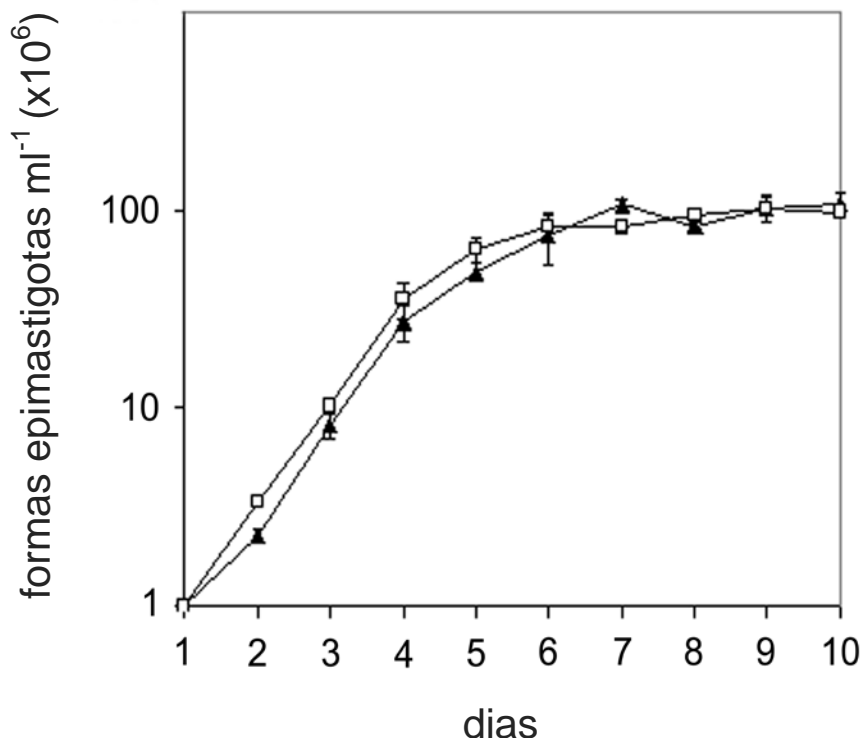


FIGURA 29 - CURVA DE CRESCIMENTO DO MUTANTE DE *T. cruzi* PARA *Tckap3* ($\Delta kap3::neo/higro$) E DO *T. cruzi* DM28C SELVAGEM (KAP3+)

LEGENDA: Curva de crescimento do mutante de *T. cruzi* para *Tckap3* (□) e do *T. cruzi* Dm28c (kap3+) (▲).

Em seguida, os parasitas nocauteados foram analisados quanto a sua capacidade de diferenciação em tripomastigotas metacíclicas. Nenhuma alteração foi observada quando os parasitas nocauteados foram submetidos ao processo de metaciclogênese *in vitro* (figura 30). Ou seja, pode-se afirmar que mesmo após o nocaute do gene *Tckap3* as formas epimastigotas do parasita conseguem se diferenciar em formas metacíclicas.

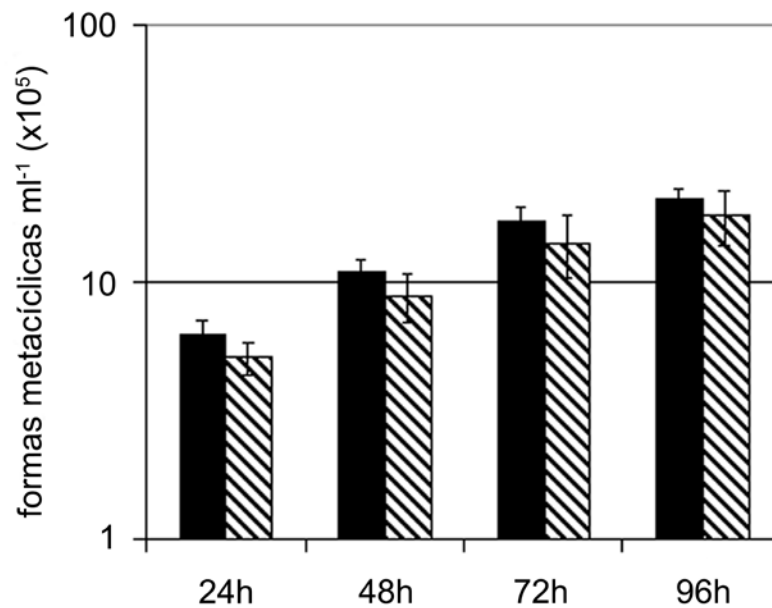


FIGURA 30 - METACICLOGÊNESE *IN VITRO* DE *T. cruzi* DM28C TIPO SELVAGEM E *T. cruzi* NOCAUTEADO

LEGENDA: Metaciclogênese *in vitro* de *T. cruzi* Dm28c tipo selvagem e *T. cruzi* nocauteado ($\Delta kap3::neo/higro$) (colunas listradas).

Uma vez que os parasitas nocauteados foram capazes de se diferenciar de epimastigota a tripomastigota metacíclico, perguntamos se estes eram capazes de infectar células *in vitro*. Na figura 31 é possível perceber as formas amastigotas dentro de células VERO em cultura, mostrando que o parasita não perdeu sua capacidade de infecção. Assim, podemos concluir que além de sofrer diferenciação, os mutantes de *T. cruzi* para *kap3* também mantiveram sua capacidade de infecção.

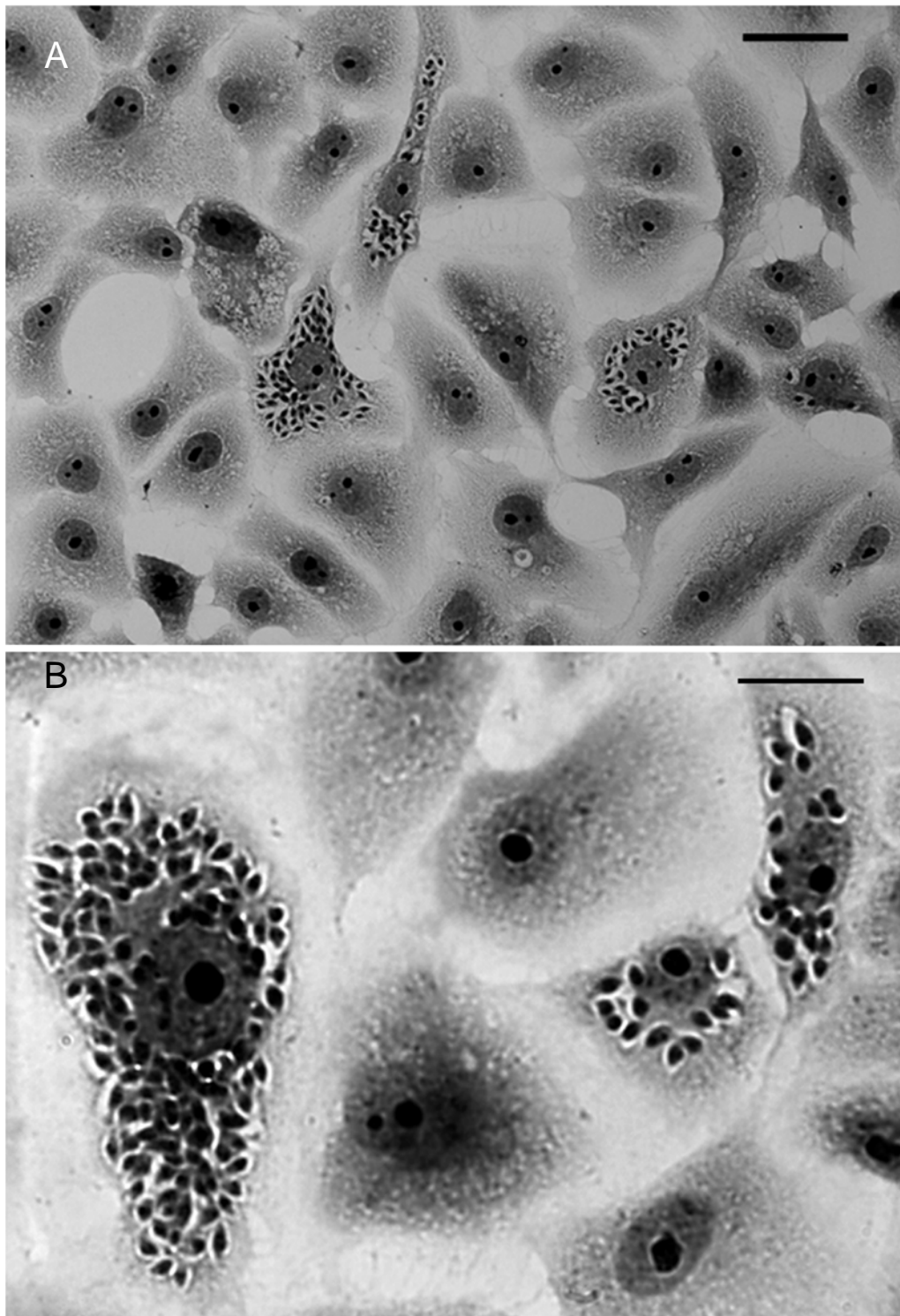


FIGURA 31 - INFEÇÃO DE CÉLULAS VERO COM O MUTANTE DE *T. cruzi* PARA *Tckap3*

LEGENDA: A) cultura de células infectadas fotografada com objetiva de 40x (Barra=40µm). B) cultura de células infectadas fotografada com objetiva de 100x (Barra=20µm).

5. DISCUSSÃO

O *Trypanosoma cruzi*, pertence a um grupo que divergiu muito cedo na linhagem eucariótica, apresentando diversas características únicas em relação a outros eucariotos. Uma dessas características é a presença de uma mitocôndria única ramificada pelo corpo do protozoário, contendo uma região especializada, o cinetoplasto, onde reside o DNA mitocondrial, também conhecido como kDNA. O kDNA é composto por uma rede de moléculas interligadas entre si, os maxicírculos e os minicírculos (SHAPIRO & ENGLUND, 1995). Mais de 30 proteínas envolvidas na replicação e na manutenção do kDNA já foram identificadas e acredita-se que um número aproximado de 100 proteínas, muitas delas presentes apenas em cinetoplastídeos, possam estar envolvidas nesses processos (LIU *et al.*, 2005). A maioria dessas proteínas foi identificada em *T. brucei* e *C. fasciculata* e, possivelmente várias delas, principalmente aquelas envolvidas em replicação, devem estar codificadas no genoma do *T. cruzi*.

Embora muitos dos componentes da maquinaria de replicação dos minicírculos e maxicírculos sejam conhecidos, o mesmo não se pode dizer para as proteínas envolvidas na manutenção da estrutura do kDNA. Com exceção de 4 proteínas com características de histonas H1 (KAP1 a 4) encontradas associadas ao cinetoplasto de *C. fasciculata*, pouco é conhecido sobre as proteínas que participam da organização do kDNA em outros tripanosomatídeos.

Zavala-Castro e colaboradores (2002) identificaram sete proteínas, variando de 19 a 31 kDa, associadas ao kDNA de formas epimastigotas de *T. cruzi*, a partir de kDNA extraído de células fixadas com formaldeído. Os tamanhos observados são compatíveis com aqueles das KAPs encontradas por Xu e Ray (1993), usando experimento similar em *C. fasciculata*, contudo, nenhuma das possíveis KAPs descritas por Zavala-Castro e colaboradores foi caracterizada.

Nós iniciamos estudos objetivando identificar proteínas envolvidas na organização e segregação do kDNA de *T. cruzi*, a partir dos dados fornecidos pelo sequenciamento do genoma desse parasita, fazendo uma comparação com as KAPs de *C. fasciculata*. Estudos realizados por Cavalcanti e colaboradores (submetido),

usando como modelo as sequências de KAPs de *C. fasciculata*, identificaram 35 proteínas relacionadas em diferentes tripanosomatídeos, cujos genomas estão sequenciados (11 em *T. cruzi*; 7 em *L. braziliensis*; 6 em *L. major* and *L. infantum*; and 5 em *T. brucei*). Essas sequências puderam ser agrupadas em 7 tipos diferentes de KAPs (KAP1 a 7). Das 7 KAPs, *T. cruzi* possui 5 (TcKAP3 a 7), cuja a sintenia gênica é uma das características marcantes, já que alguns genes divergem em relação ao tamanho e portanto no tamanho da proteína codificada. As KAPs de *T. cruzi* e *T. brucei* são maiores do que as de *C. fasciculata* e *Leishmania spp.* Isso pode sugerir que KAPs possam ter evoluído para um tamanho que comporte basicamente suas funções de associação com o kDNA de maneira mais eficiente, por exemplo.

Os resultados obtidos por Cavalcanti e colaboradores para TcKAP4 e TcKAP6 mostraram que em epimastigotas e amastigotas, estas duas proteínas estão distribuídas ao longo de toda a rede de kDNA, consistente com o que foi observado em *C. fasciculata*, (XU *et al.*, 1996; HINES & RAY, 1998), embora CfKAP4 tenha também mostrado um padrão de acumulação nos pólos opostos do kDNA, sugerindo que essa KAP em particular se associe aos minicírculos recém-replicados antes de sua reintegração à rede de kDNA (XU *et al.*, 1996). Contudo, em tripomastigotas de *T. cruzi*, estas duas proteínas estão distribuídas na periferia da rede de kDNA (CAVALCANTI, 2006, CAVALCANTI *et al.*, submetido), indicando que diferente de *C. fasciculata*, elas apresentam uma dinâmica de associação que depende da forma evolutiva do parasita, possivelmente, refletindo distintas interações com proteínas da rede de kDNA em epimastigotas e tripomastigotas.

No presente trabalho, ampliamos o conhecimento sobre as KAPs de *T. cruzi*, estudando o papel da KAP3 na fisiologia desse parasita. KAP3 é codificada por um gene de cópia única e possui uma pré-sequência de 9 aminoácidos comparável aquelas encontradas em proteínas mitocondriais de *C. fasciculata* (XU & RAY, 1993). Análise por imunofluorescência indireta mostrou que KAP3 está presente ao longo de todo o cinetoplasto de *T. cruzi*, sugerindo que ela tenha funções de compactação/organização da rede de kDNA. Essa conclusão é baseada em experimentos com CfKAPs que mostraram que CfKAP2, 3 e 4 podem complementar defeitos de segregação do nucleóide de *E. coli* e compactar redes de kDNA *in vitro* (XU *et al.*, 1996).

Em *C. fasciculata* a regulação da expressão de vários genes que codificam proteínas mitocondriais ocorre durante o ciclo celular, em parte por uma sequência consenso [(C/A)AUAGAA(G/A)] presente nas regiões 5' e 3'-UTR dos respectivos mRNAs (BROWN & RAY, 1997; MAHMOOD *et al.*, 1999; MAHMOOD & RAY, 1998; PASION *et al.*, 1996). O mesmo foi observado para *L. major*, onde uma sequência parecida com aquela encontrada em *C. fasciculata* (CATAGA), foi identificada nas regiões 5' e 3' de vários genes, cuja a expressão era maior na fase S do ciclo celular (ZICK *et al.*, 2005). Analisando as regiões 5' e 3' do transcrito do gene *TOP2* de *T. cruzi*, que codifica a topo II mitocondrial, descrito por Frago e Goldenberg (1992), também podemos observar a sequência CATAGA repetida duas vezes na região 5'UTR e uma vez na região 3'-UTR do transcrito desse gene.

Como relatamos neste trabalho, a sequência da região 5'-UTR do transcrito *Tckap3* não mostrou nenhum elemento com as características daquele envolvido na regulação de genes expressos na fase S do ciclo celular de outros tripanosomatídeos. Contudo, a análise do contig que contém o gene *Tckap3*, mostra a presença de uma sequência CATAGA distante 689 pb do final da região codante desse gene, sugerindo que o transcrito da KAP3, assim como aquele da topo II, possam ser regulados durante o ciclo celular, muito embora não tenhamos a certeza que essa sequência esteja contida na região 3'-UTR do transcrito da KAP3.

A proteína TcKAP3 está expressa em todas as formas evolutivas do parasita analisadas, da mesma maneira como foi encontrado para outras KAPs em *T. cruzi* (CAVALCANTI, 2006; CAVALCANTI *et al.*, submetido). Em relação à localização de TcKAP3 verificamos, através de ensaios de imunofluorescência, a distribuição de TcKAP3 por toda a rede de kDNA das formas epimastigotas de *T. cruzi*, porém ainda não analisamos como esta proteína está distribuída nas formas tripomastigotas, que possuem a rede de kDNA com formato arredondado e menos compactada.

No ensaio de imunofluorescência realizado neste trabalho, também foi possível observar, além da marcação no cinetoplasto, como mencionado anteriormente, uma marcação na região entre o cinetoplasto e a bolsa flagelar (região cinetoflagelar), onde são encontradas várias proteínas responsáveis pela replicação dos minicírculos (KLINGBEIL & ENGLUND, 2004; LIU *et al.*, 2005; ONN *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2007; LIU

& ENGLUND, 2007). Uma das hipóteses para esta localização é que TcKAP3 se associe inicialmente com os minicírculos que estão sendo replicados fora da rede, na região cinetoflagelar. A segunda hipótese é que os minicírculos que estão sendo liberados da rede pela ação da topoisomerase II, para serem replicados na região cinetoflagelar, permanecem associados com a KAP3.

Embora ainda não saibamos como KAP3 se associa com o kDNA de *T. cruzi*, é possível que isso ocorra de duas maneiras: através de ligações eletrostáticas não-específicas ou de interações com regiões específicas dos minicírculos. Nos tripanosomatídeos a rede de kDNA assume a forma de um disco achatado, perpendicular ao flagelo, onde os minicírculos estão alinhados em fibrilas, orientadas paralelamente ao eixo do disco (LIU *et al.*, 2005). Acredita-se que a ordenação e compactação dos minicírculos estão relacionadas à própria estrutura da molécula de minicírculo. Os minicírculos apresentam regiões ricas em A+T que podem causar curvaturas na molécula (MARINI *et al.*, 1984; NTAMBI *et al.*, 1984), facilitando sua inserção de forma ordenada no disco de kDNA, além disso possuem regiões conservadas onde estão localizadas as origens de replicação. Essas regiões, por sua vez podem ser reconhecidas por proteínas, tais como a KAP3 que ajudam a estabilizar a estrutura. Portanto, uma das perspectivas deste trabalho é a realização de ensaios de alteração de mobilidade eletroforética (EMSA) para verificar a existência de uma interação entre os minicírculos e a TcKAP3. Estes ensaios consistem em uma separação eletroforética de uma mistura de DNA-proteína em um gel de agarose ou poliacrilamida por um curto período de tempo, onde a velocidade que as diferentes moléculas se movem através do gel é determinada pelo seu tamanho e sua carga. Também são necessários estudos que elucidem como esta proteína determina a organização da rede de kDNA em *T. cruzi*. Os resultados com *C. fasciculata* mostram que KAP2, 3 e 4 se ligam em regiões específicas dos minicírculos, ricas em A+T, mas que não são aquelas que geram a curvatura das moléculas (XU *et al.*, 1996). Contudo, KAP1 se liga de maneira inespecífica aos minicírculos (HINES & RAY, 1998).

Para investigar a importância de TcKAP3 no *T. cruzi* e seu envolvimento, ou não, com o rearranjo topológico do kDNA durante o processo de diferenciação do parasita, realizamos a deleção do gene *Tckap3*. Nenhuma alteração estrutural ou morfológica na

rede de kDNA foi observada no mutante de *T. cruzi* para *Tckap3*. Do mesmo modo, o parasita mutante não apresentou perfil de crescimento alterado, e foi capaz de se diferenciar nas formas tripomastigotas metacíclicas e infectar células VERO, onde se diferenciaram em formas amastigotas.

Uma das hipóteses para explicar esse fato é que alguma outra KAP de *T. cruzi* possa estar assumindo o papel da TcKAP3. A redundância no papel das KAPs pode representar um mecanismo para assegurar que a rede de kDNA seja compactada e segregada corretamente, mesmo na ausência de uma delas. De fato, o nocaute do gene *Cfkap2* ou do gene *Cfkap3* separadamente não mostrou nenhuma alteração no fenótipo de *C. fasciculata*. Porém, a deleção de ambos os genes causou diversas alterações: aumento nos níveis de mRNAs mitocondriais, redução na respiração, inibição da divisão celular e acúmulo de células com morfologias anormais (AVLIYAKULOV *et al.*, 2004). Assim, iremos usar o mutante de *T. cruzi* para *Tckap3* para nocautear outros genes que codificam KAPs em *T. cruzi* e verificar quais as alterações que isso acarreta no parasita.

Esperamos que o conhecimento das diversas moléculas envolvidas na organização e replicação da rede de kDNA, assim como o entendimento dos mecanismos fisiológicos que ocorrem nesta estrutura tão peculiar que é o cinetoplasto dos tripanosomatídeos, possam nos ajudar a esclarecer vários aspectos relacionados a biologia destes eucariotos primitivos e a evolução do genoma mitocondrial ao longo do processo evolutivo.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados observados neste trabalho, foi possível concluir:

1 – A proteína TcKAP3 é uma proteína associada ao cinetoplasto, de *T. cruzi* e possui características que a identificam como KAPs do tipo histona H1, incluindo seu tamanho e sua composição de aminoácidos.

3 – TcKAP3 é produzida em todos os estágios do ciclo de vida do *T. cruzi*.

4 – O mutante de *T. cruzi* para *Tckap3*, não apresentou alteração na estrutura do cinetoplasto e na morfologia do parasita.

5 – A proliferação e a diferenciação do *T. cruzi* não foram alteradas, quando o parasita teve o gene *Tckap3* deletado do genoma.

REFERÊNCIAS

AGABIAN, N. **Trans splicing of nuclear pre-mRNAs.** Cell 61: 1157-1160, 1990.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Biologia Molecular da Célula.* 4. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2004.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. **Basic local alignment search tool.** J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990.

ANDREWS, N. W.; ABRAMS, C. K.; SLATIN, S. L.; GRIFFITHS, G. **A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH.** Cell 61(7): 1277-1287, 1990.

AVLIYAKULOV, N. K.; LUKES, J. & RAY, D. S. **Mitochondrial histone-like DNA-binding proteins are essential for normal cell growth and mitochondrial function in *Crithidia fasciculata*.** Eukaryot. Cell 3: 518-26, 2004.

BENNE, R. **RNA editing in trypanosomes.** Eur. J. Biochem. 221(1): 9-23, 1994.

BERRIMAN, M.; GHEDIN, E.; HERTZ-FOWLER, C.; BLANDIN, G.; RENAULD, H.; BARTHOLOMEU, D. C.; LENNARD, N. J.; CALER, E.; HAMLIN, N. E.; HAAS, B.; BOHME, U.; HANNICK, L.; ASLETT, M. A.; SHALLOM, J.; MARCELLO, L.; HOU, L.; WICKSTEAD, B.; ALSMARK, U. C. M.; ARROWSMITH, C.; ATKIN, R. J.; BARRON, A. J.; BRINGAUD, F.; BROOKS, K.; CARRINGTON, M.; CHEREVACH, I.; CHILLINGWORTH, T. J.; CHURCHER, C.; CLARK, L. N.; CORTON, C. H.; CRONIN, A.; DAVIES, R. M.; DOGGETT, J.; DJIKENG, A.; FELDBLYUM, T.; FIELD, M. C.; FRASER, A.; GOODHEAD, I.; HANCE, Z.; HARPER, D.; HARRIS, B. R.; HAUSER, H.; HOSTETLER, J.; IVENS, A.; JAGELS, K.; JOHNSON, D.; JOHNSON, J.; JONES, K.; KERHORNOU, A. X.; KOO, H.; LARKE, N.; LANDFEAR, S.; LARKIN, C.; LEECH, V.; LINE, A.; LORD, A.; MACLEOD, A.; MOONEY, P. J.; MOULE, S.; MARTIN, D. M. A.; MORGAN, G. W.; MUNGALL, K.; NORBERTCZAK, H.; ORMOND, D.; PAI, G.; PEACOCK, C. S.; PETERSON, J.; QUAIL, M. A.; RABBINOWITSCH, E.; RAJANDREAM, M. A.; REITTER, C.; SALZBERG, S. L.; SANDERS, M.; SCHOBEL, S.; SHARP, S.; SIMMONDS, M.; SIMPSON, A. J.; TALLON, L.; TURNER, C. M. R.; TAIT, A.; TIVEY, A. R.; VAN AKEN, S.; WALKER, D.; WANLESS, D.; WANG, S.; WHITE, B.; WHITE, O.; WHITEHEAD, S.; WOODWARD, J.; WORTMAN, J.; ADAMS, M. D.; EMBLEY, T. M.; GULL, K.; ULLU, E.; BARRY, J. D.; FAIRLAMB, A. H.; OPPERDOES,

F.; BARRELL, B. G.; DONELSON, J. E.; HALL, N.; FRASER, C. M.; MELVILLE, S.E.; EL-SAYED, N. M. **The Genome of the African Trypanosome *Trypanosoma brucei***. Science 309 (5733): 416-422, 2005.

BIRKENMEYER, L. & RAY, D. S. **Replication of kinetoplast DNA in isolated kinetoplasts from *Crithidia fasciculata***. J. Biol. Chem. 261: 2362–2368, 1986.

BIRKENMEYER, L.; SUGISAKI, H.; RAY, D. S. **Structural characterization of site-specific discontinuities associated with replication origins of minicircle DNA from *Crithidia fasciculata***. J. Biol. Chem. 262: 2384–2392, 1987.

BONALDO, M. C.; SOUTO-PADRON, T.; DE SOUZA, W.; GOLDENBERG, S. **Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation**. J. Cell. Biol. 106: 1349-1358, 1988.

BORST, P. **Why kinetoplast DNA networks?** Trends Genet. 7(5): 139-141, 1991.

BOUCHER, N.; WU, Y.; DUMAS, C.; DUBÉ, M.; SERENO, D.; BRETON, M.; PAPADOPOULOU, B. **A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'-untranslated region element**. J. Biol. Chem. 277(19): 511-520, 2002.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. ***Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas**. Ed Guanabara Koogan. 2ª edição. 2000.

BROWN, L. M. & RAY, D. S. **Cell cycle regulation of RPA1 transcript levels in the trypanosomatid *Crithidia fasciculata***. Nucleic Acids Res. 25: 3281–3289, 1997.

CAMARGO, E. P. **Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*: I. Origin of metacyclic trypomastigotes in liquid media**. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 6: 93-100, 1964.

CAMPBELL, D. A.; THOMAS, S.; STURN, N. **Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal?** Microbes Infect. 5: 1231-1240, 2003.

CARPENTER, L. R.; ENGLUND, P. T. **Kinetoplast maxicircle DNA replication in *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma brucei***. Mol. Cell. Biol. 15: 6794–6803, 1995.

CAVALCANTI, D. P. **Caracterização ultraestrutural e molecular de proteínas associadas ao cinetoplasto de tripanosomatídeos.** [Dissertação de Mestrado] Universidade Federal do Rio de Janeiro. Centro de Ciências da Saúde. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2006.

CAVALCANTI, D. P.; SHIMADA, M. K.; PROBST, C. M.; SOUTO-PADRON, T. C. B. S.; DE SOUZA, W.; GOLDENBERG, S.; FRAGOSO, S. P.; MOTTA, M. C. M. **Expression and subcellular localization of kinetoplast-associated proteins in the different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*.** BMC Microbiol. (submitted), 2009.

CHAGAS, C. **Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1: 159-218, 1909.

CLAYTON, C. E. **Life without transcriptional control? From fly to man and back again.** EMBO J. 21: 1881-1888, 2002.

CONTRERAS, V. T.; SALLES, J. M.; THOMAS, N.; MOREL, C. M.; GOLDENBERG, S. **In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions.** Mol. Biochem. Parasitol. 16: 315-327, 1985.

CONTRERAS, V. T.; ARAUJO-JORGE, T. C.; BONALDO, M. C.; THOMAS, N.; BARBOSA, H. S.; MEIRELLES, M. N. L.; GOLDENBERG, S. **Biological aspects of the DM 28C clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz 83: 123-133, 1988.

COURA, J. R. & CASTRO, S. L. **A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97(1): 3-24, 2002.

DE CARVALHO, T. U. & DE SOUZA, W. 1986. **Infectivity of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*.** Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 28(4): 205-212, 1986.

DE SOUZA, W. & SOUTO-PADRON, W. **The paraxial structure of the flagellum of trypanosomatidae.** J. Parasitol. 66(2): 229-236, 1980.

DE SOUZA, W. **Cell biology of *Trypanosoma cruzi*.** Int. Rev. Cytol. 86: 197-283, 1984.

DE SOUZA, W. O parasito e sua interação com os hospedeiros. In: ***Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas***. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro: 75-86, 1999.

DE SOUZA, W. **Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi***. Current Pharmaceutical Design 8: 269-285, 2002.

DIAS, J. C. P. **Globalization, inequity and Chagas disease**. Cad. Saúde Pública. Rio de Janeiro. 23(1): S13-S22, 2007.

DOCAMPO, R.; DE SOUZA, W.; MIRANDA, K.; ROHLOFF, P.; MORENO, S. N. **Acidocalcisomes – conserved from bacteria to man**. Nat. Rev. Microbiol. 3: 251-261, 2005.

EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BARTHOLOMEU, D. C.; NILSSON, D.; AGGARWAL, G.; TRAN, A. N.; GHEDIN, E.; WORTHEY, E. A.; DELCHER, A. L.; BLANDIN, G.; WESTENBERGER, S. J.; CALER, E.; CERQUEIRA, G. C.; BRANCHE, C.; HAAS, B.; ANUPAMA, A.; ARNER, E.; ASLUND, L.; ATTIPOE, P.; BONTEMPI, E.; BRINGAUD, F.; BURTON, P.; CADAG, E.; CAMPBELL, D. A.; CARRINGTON, M.; CRABTREE, J.; DARBAN, H.; DA SILVEIRA, J. F.; DE JONG, P.; EDWARDS, K.; ENGLUND, P. T.; FAZELINA, G.; FELDBLYUM, T.; FERELLA, M.; FRASCH, A. C.; GULL, K.; HORN, D.; HOU, L.; HUANG, Y.; KINDLUND, E.; KLINGBEIL, M.; KLUGE, S.; KOO, H.; LACERDA, D.; LEVIN, M. J.; LORENZI, H.; LOUIE, T.; MACHADO, C. R.; MCCULLOCH, R.; MCKENNA, A.; MIZUNO, Y.; MOTTRAM, J. C.; NELSON, S.; OCHAYA, S.; OSOEGAWA, K.; PAI, G.; PARSONS, M.; PENTONY, M.; PETTERSSON, U.; POP, M.; RAMIREZ, J. L.; RINTA, J.; ROBERTSON, L.; SALZBERG, S. L.; SANCHEZ, D. O.; SEYLER, A.; SHARMA, R.; SHETTY, J.; SIMPSON, A. J.; SISK, E.; TAMMI, M. T.; TARLETON, R.; TEIXEIRA, S.; VAN AKEN, S.; VOGT, C.; WARD, P. N.; WICKSTEAD, B.; WORTMAN, J.; WHITE, O.; FRASER, C. M.; STUART, K. D.; ANDERSSON, B. **The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease**. Science 309(5733): 409-415, 2005.

ENGEL, M. L. & RAY, D. S. **A structure-specific DNA endonuclease is enriched in kinetoplasts purified from *Crithidia fasciculata***. Nucleic Acids Res. 26(20): 4733-8, 1998.

FRAGOSO, S. P. & GOLDENBERG, S. **Cloning and characterization of the gene encoding *Trypanosoma cruzi* DNA topoisomerase II**. Mol. Biochem. Parasitol. 55: 127-34, 1992.

GILLINGER, G. & BELLOFATTO, V. **Trypanosome spliced leader RNA genes contains the first identified RNA polymerase II promoter in these organisms.** Nucleic Acids Res. 29: 1556-1564, 2001.

GLUENZ, E.; SHAW, M. K.; GULL, K. **Structural asymmetry and discrete nucleic acid subdomains in the *Trypanosoma brucei* kinetoplast.** Mol. Microbiol. 64(6): 1529-1539, 2007.

GOLDENBERG, S.; CONTRERAS, V. T.; SALLES, J. M.; BONALDO, M. C.; LIMA FRANCO, M. P. A.; LINSS, J.; LAFAILLE, J.; VALLE, D.; MOREL, C. M. **Facts and hypothesis on *Trypanosoma cruzi* differentiation.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz 79: 39-44, 1985.

GULL, K. **The cytoskeleton of trypanosomatid.** Annu. Rev. Microbiol. 53: 629-655, 1999.

HAJDUK, S. L.; SIQUEIRA, A. M. & VICKERMAN, K. **Kinetoplast DNA of *Bodo caudatus*: a noncatenated structure.** Mol. Cell Biol. 6: 4372-4378, 1986.

HANNAERT, V.; BRINGAUD, F.; OPPERDOES, F. R.; MICHELS, P. A. **Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida.** Kinetoplastid Biol. Dis. 2(1): 11, 2003.

HINES, J. C. & RAY, D. S. **The *Crithidia fasciculata* KAP1 gene encodes a highly basic protein associated with kinetoplast DNA.** Mol. Biochem. Parasitol. 94: 41-52, 1998.

HINES, J. C.; ENGEL, M. L.; ZHAO, H.; RAY, D. S. **RNA primer removal and gap filling on a model minicircle replication intermediate.** Mol. Biochem. Parasitol. 115(1): 63-67, 2001.

HINES, J. C. & RAY, D. S. **Structure of discontinuities in kinetoplast DNA-associated minicircles during S phase in *Crithidia fasciculata*.** Nucleic Acids Res. 36(2): 444-450, 2008.

IVENS, A. C.; PEACOCK, C. S.; WORTHEY, E. A.; MURPHY, L.; AGGARWAL, G.; BERRIMAN, M.; SISK, E.; RAJANDREAM, M. A.; ADLEM, E.; AERT, R.; ANUPAMA, A.;

APOSTOLOU, Z.; ATTIPOE, P.; BASON, N.; BAUSER, C.; BECK, A.; BEVERLEY, S. M.; BIANCHETTIN, G.; BORZYM, K.; BOTHE, G.; BRUSCHI, C. V.; COLLINS, M.; CADAG, E.; CIARLONI, L.; CLAYTON, C.; COULSON, R. M.; CRONIN, A.; CRUZ, A. K.; DAVIES, R. M.; DE GAUDENZI, J.; DOBSON, D. E.; DUESTERHOEFT, A.; FAZELINA, G.; FOSKER, N.; FRASCH, A. C.; FRASER, A.; FUCHS, M.; GABEL, C.; GOBLE, A.; GOFFEAU, A.; HARRIS, D.; HERTZ-FOWLER, C.; HILBERT, H.; HORN, D.; HUANG, Y.; KLAGES, S.; KNIGHTS, A.; KUBE, M.; LARKE, N.; LITVIN, L.; LORD, A.; LOUIE, T.; MARRA, M.; MASUY, D.; MATTHEWS, K.; MICHAELI, S.; MOTTRAM, J. C.; MULLER-AUER, S.; MUNDEN, H.; NELSON, S.; NORBERTCZAK, H.; OLIVER, K.; O'NEIL, S.; PENTONY, M.; POHL, T. M.; PRICE, C.; PURNELLE, B.; QUAIL, M. A.; RABBINOWITSCH, E.; REINHARDT, R.; RIEGER, M.; RINTA, J.; ROBBEN, J.; ROBERTSON, L.; RUIZ, J. C.; RUTTER, S.; SAUNDERS, D.; SCHAFFER, M.; SCHEIN, J.; SCHWARTZ, D. C.; SEEGER, K.; SEYLER, A.; SHARP, S.; SHIN, H.; SIVAM, D.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; TOSATO, V.; VOGT, C.; VOLCKAERT, G.; WAMBUTT, R.; WARREN, T.; WEDLER, H.; WOODWARD, J.; ZHOU, S.; ZIMMERMANN, W.; SMITH, D. F.; BLACKWELL, J. M.; STUART, K. D.; BARRELL, B. AND MYLER, P. J. **The genome of the kinetoplastid parasite *Leishmania major***. *Science* 309 (5733): 436-442, 2005.

KARLINSEY, J.; STAMATOYANNOPOULOS, G.; ENVER, T. **Simultaneous purification of DNA and RNA from small numbers of eukaryotic cells**. *Anal. Biochem.* 180(2): 303-306, 1989.

KLINGBEIL, M. M. & ENGLUND, P. T. **Closing the gaps in kinetoplast DNA network replication**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(13):4333-4334, 2004.

LAIRD, P. W. **Trans splicing in trypanosomes - archaism or adaptation?** *Trends Genet.* 5(7): 204-208, 1989.

LEBOWITZ, J. H.; SMITH, H. Q.; RUSCHE, L.; BEVERLEY, S. M. **Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania***. *Genes Dev.* 7: 996-1007, 1993.

LI, Y.; SUN, Y.; HINES, J. C.; RAY, D. S. **Identification of new kinetoplast DNA replication proteins in Trypanosomatids based on predicted s-phase expression and mitochondrial targeting**. *Eukaryotic Cell* 6(12): 2303-2310, 2007.

LIU, B.; LIU, Y.; MOTYKA, S. A.; AGBO, E. E. C.; ENGLUND, P. T. **Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA**. *Trends Parasitol.* 21: 363-369, 2005.

LIU, Y. & ENGLUND, P. T. **The rotational dynamics of kinetoplast DNA replication.** Mol. Microbiol. 64(3): 676-690, 2007.

LUKES, J.; HINES, J. C.; EVANS, C. J.; AVLIYAKULOV, N. K.; PRABHU, V. P.; CHEN, J. & RAY, D. S. **Disruption of the *Crithidia fasciculata* KAP 1 gene results in structural rearrangement of the kinetoplast disc.** Mol. Biochem. Parasitol. 117: 179-186, 2001.

LUKES, J.; GUILBRIDE, D. L.; VOTÝPKA, J.; ZÍKOVÁ, A.; BENNE, R.; ENGLUND, P. T. **Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure.** Eukaryot. Cell 1(4): 495-502, 2002.

MADISON-ANTENUCCI, S.; GRAMS, J.; HAJDUK, S. L. **Editing machines: The complexities of trypanosome RNA editing.** Cell 108: 435-438, 2002.

MAHMOOD, R. & RAY, D. S. **Nuclear extracts of *Crithidia fasciculata* contain factors that bind to the 5' untranslated regions of *TOP2* and *RPA1* mRNAs containing sequences required for their cell cycle regulation.** J. Biol. Chem. 273: 23729-23734, 1998.

MAHMOOD, R.; HINES, J. C.; RAY, D. S. **Identification of *cis* and *trans* elements involved in the cell cycle regulation of multiple genes in *Crithidia fasciculata*.** Mol. Cell. Biol. 19: 6174-6182, 1999.

MAIR, G.; SHI, H.; LI, H.; DJIKENG, A.; AVILES, H. O.; BISHOP, J. R.; FALCONE, F. H.; GAVRILESCU, C.; MONTGOMERY, J. L.; SANTORI, M. I.; STERN, L. S.; WANG, Z.; ULLU, E.; TSCHUDI, C. **A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA.** RNA 6(2): 163-169, 2000.

MARINI, J. C.; EFFRON, P. N.; GOODMAN, T. C.; SINGLETON, C. K.; WELLS, R. D.; WARTELL, R. M.; ENGLUND, P. T. **Physical characterization of a kinetoplast DNA fragment with unusual properties.** J. Biol. Chem. 259(14): 8974-8979, 1984.

MASLOV, D. A.; PODLIPAEV, S. A. & LUKES, J. **Phylogeny of the kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz 96(3): 397-402, 2001.

MATTHEWS, K. R.; TSCHUI, C.; ULLU, E. **A common pyrimidine rich motif governs *trans*-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes.** *Genes Dev.* 8: 491-501, 1994.

McCARTHY-BURKE, C.; TAYLOR, Z. A.; BUCK, G. A. **Characterization of the spliced leader genes and transcripts in *Trypanosoma cruzi*.** *Gene* 82(1): 177-89, 1989.

MEDINA-ACOSTA, E. & CROSS, G. A. **Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure.** *Mol. Biochem. Parasitol.* 59: 327-329, 1993.

MOREIRA, D.; LÓPEZ-GARCIA, P. & VICKERMAN, K. **An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea.** *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54(5): 1861-1875, 2004.

NILSEN, T. W. **Trans-splicing in protozoa and helminths.** *Infect. Agents Dis.* 1(4): 212-218, 1992.

NTAMBI, J. M.; MARINI, J. C.; BANGS, J. D.; HAJDUK, S. L.; JIMINEZ, H. E.; KITCHIN, P. A.; KLEIN, V. A.; RYAN, K. A.; ENGLUND, P. T. **Presence of a bent helix in fragments of kinetoplast DNA minicircles from several trypanosomatid species.** *Mol. Biochem. Parasitol.* 12(3): 273-286, 1984.

ONN, I.; KAPELLER, I.; ABU-ELNEEL, K.; SHLOMAI, J. **Binding of the universal minicircle sequence binding protein at the kinetoplast DNA replication origin.** *J. Biol. Chem.* 281(49): 37468-37476, 2006.

PASION, S. G.; HINES, J. C.; OU, X.; MAHMOOD, R.; RAY, D. S. **Sequences within the 5' untranslated region regulate the levels of a kinetoplast DNA topoisomerase mRNA during the cell cycle.** *Mol. Cell. Biol.* 16: 6724-6735, 1996.

PEACOCK, C. S.; SEEGER, K.; HARRIS, D.; MURPHY, L.; RUIZ, J. C.; QUAIL, M. A.; PETERS, N.; ADLEM, E.; TIVEY, A.; ASLETT, M.; KERHORNOU, A.; IVENS, A.; FRASER, A.; RAJANDREAM, M. A.; CARVER, T.; NORBERTCZAK, H.; CHILLINGWORTH, T.; HANCE, Z.; JAGELS, K.; MOULE, S.; ORMOND, D.; RUTTER, S.; SQUARES, R.; WHITEHEAD, S.; RABBINOWITSCH, E.; ARROWSMITH, C.; WHITE, B.; THURSTON, S.; BRINGAUD, F.; BALDAUF, S. L.; FAULCONBRIDGE, A.; JEFFARES, D.; DEPLEDGE, D. P.; OYOLA, S. O.; HILLEY, J. D.; BRITO, L. O.; TOSI,

L. R.; BARRELL, B.; CRUZ, A. K.; MOTTRAM, J. C.; SMITH, D. F.; BERRIMAN, M. **Comparative genomic analysis of three Leishmania species that cause diverse human disease.** Nat. Genet. 39(7): 839-47, 2007.

PORTO-CARREIRO, I.; ATTIAS, M.; MIRANDA, K.; DE SOUZA, W.; CUNHA-E-SILVA, N. **Trypanosoma cruzi epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytosome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes.** Eur. J. Cell. Biol. 79: 858-869, 2000.

RAY, D. S. **Conserved sequence blocks in kinetoplast minicircles from diverse species of trypanosomes.** Mol. Cell. Biol. 9: 1365–1367, 1989.

RIGBY, P. W.; DIECKMANN, M.; RHODES, C.; BERG, P. **Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I.** J. Mol. Biol. 113(1): 237-251, 1977.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A laboratory manual.** Cold Spring Harbor, N.Y. USA, 1989.

SHAPIRO, T. A. & ENGLUND, P. T. **The structure and replication of kinetoplast DNA.** Annu. Rev. Microbiol. 49: 117-143, 1995.

SHLOMAI, J. **Assembly of kinetoplast DNA.** Parasitol. Today 10: 341-346, 1994.

SHLOMAI, J. **The structure and replication of kinetoplast DNA.** Curr. Mol. Med. 4(6): 623-647, 2004.

SIMPSON, L. **The genomic organization of guide RNA genes in kinetoplastid protozoa: several conundrums and their solutions.** Mol. Biochem. Parasitol. 86(2): 133-141, 1997.

SIMPSON, L.; THIEMANN, O. H.; SAVILL, N. J.; ALFONZO, J. D.; MASLOV, D. A. **Evolution of RNA editing in trypanosome mitochondria.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(13): 6986-93, 2000.

SIMPSON, L.; SBICEGO, S.; APHASIZHEV, R. **Uridine insertion/deletion RNA editing in trypanosome mitochondria: a complex business.** RNA 9: 265–276, 2003.

SOARES, M.J.; SOUTO-PADRÓN, T; DE SOUZA, W. **Identification of a large prelysosomal compartment in the pathogenic protozoon *Trypanosoma cruzi***. J Cell Sci. 102(1): 157-167, 1992.

SOARES, M.J. **The reservosome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: an organelle of the endocytic pathway with a role on metacyclogenesis**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 94(1): 139-141, 1999.

SOUZA, M. A. **A simple method to purify biologically and antigenically preserved bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* using Deae-cellulose columns**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 78(3): 317-333, 1983.

STEINERT, G.; FIRKET, H. & STEINERT, M. **Synthèse d'acide désoxyribonucléique dans le corps parabasal de *Trypanosoma mega***. Exp. Cell Res. 15: 632-35, 1958.

STUART, K.; FEAGIN, J. E.; ABRAHAM, J. M. **RNA editing: the creation of nucleotide sequences in mRNA—a minireview**. Gene 82: 155–160, 1989.

STUART, K. **RNA editing in trypanosomatid mitochondria**. Annu. Rev. Microbiol. 45: 327-344, 1991.

STUART, K. & PANIGRAHI, A. K. **RNA editing: complexity and complications**. Mol. Microbiol. 45(3): 591-596, 2002.

STUART K.D.; SCHNAUFER, A.; ERNST, N.L.; PANIGRAHI. A.K. **Complex management: RNA editing in trypanosomes**. Trends Biochem. Sci. 30(2): 97-105, 2005.

SWINDLE, J. & TAIT, A. **Trypanosomatid genetics. In Molecular biology of parasitic Protozoa**. D. F. Smith and M. Parsons (eds.). Oxford University Press, Oxford, U.K: 6–34, 1996.

TEIXEIRA, A. R. L.; NITZ, N.; GUIMARO, M. C.; GOMES, C.; SANTOS-BUCH, C. A. **Chagas Disease**. Postgrad. Med. J. 82: 788-798, 2006.

TOWBIN, H.; STAEBLIN, T.; BORDON, J. **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.** Proc. Natl. Acad. USA 76: 4350-4354, 1979.

ULLU, E. & TSCHUDI, C. **Trans splicing in trypanosomes requires methylation of the 5' end of the spliced leader RNA.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88(22): 10074-10078, 1991.

VALLE, D.; KUN, J.; LINSS, J.; GARCIA, E. S. & GOLDENBERG, S. **cDNA Cloning and expression of *Rhodnius prolixus* vitellogenin.** Insect Biochem. Molec. Biol. 23 (4): 457-465, 1993.

VANHAMME, L. & PAYS, E. **Control of Gene Expression in Trypanosomes.** Microbiol. Rev. 59(2): 223-240, 1995.

XU, C. & RAY, D. S. **Isolation of proteins associated with kinetoplast DNA networks *in vivo*.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 1786-1789, 1993.

XU, C. W.; HINES, J. C.; ENGEL, M. L.; RUSSEL, D. G.; RAY, D. S. **Nucleus-encoded histone H1-like proteins are associated with kinetoplast DNA in the trypanosomatid *Crithidia fasciculata*.** Mol. Cell. Biol. 16: 564-576, 1996.

ZAVALA-CASTRO, J. E.; ACOSTA-VIANA, K.; BAYLON-PACHECO, L.; GONZÁLEZ-ROBLES, A.; GUZMÁN-MARÍN, E.; ROSALES-ENCINA, J. L. **Kinetoplast DNA-binding protein profile in the epimastigote form of *Trypanosoma cruzi*.** Arch. Med. Res. 33(3):250-256, 2002.

ZICK, A.; ONN, I.; BEZALEL, R.; MARGALIT, H.; SHLOMAI, J. **Assigning functions to genes: identification of S-phase expressed genes in *Leishmania major* based on post-transcriptional control elements.** Nucleic Acids Res. 33: 4235-4242, 2005.

ZINGALES, B.; PEREIRA, M. E.; OLIVEIRA, R. P.; ALMEIDA, K. A.; UMEZAWA, E. S.; SOUTO, R. P.; VARGAS, N.; CANO, M. I.; DA SILVEIRA, J. F.; NEHME, N. S.; MOREL, C. M.; BRENER, Z.; MACEDO, A. ***Trypanosoma cruzi* genome project: biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener.** Acta Trop. 68(2): 159-173, 1997.

ZWIERZYNSKI, T. A. & BUCK, G. A. **RNA-protein complexes mediate *in vitro* capping of the spliced-leader primary transcript and U-RNAs in *Trypanosoma cruzi*.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88(13): 5626-5630, 1991.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)