

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MICHEL BATISTA

**CONSTRUÇÃO DE VETORES PARA CARACTERIZAÇÃO
DE GENES DE *Trypanosoma cruzi* EM UM SISTEMA PARA
CLONAGEM EM ALTA DEMANDA**

**CURITIBA
2008**

MICHEL BATISTA

**CONSTRUÇÃO DE VETORES PARA CARACTERIZAÇÃO
DE GENES DE *Trypanosoma cruzi* EM UM SISTEMA PARA
CLONAGEM EM ALTA DEMANDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Dr. Marco Aurélio Krieger

**CURITIBA
2008**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

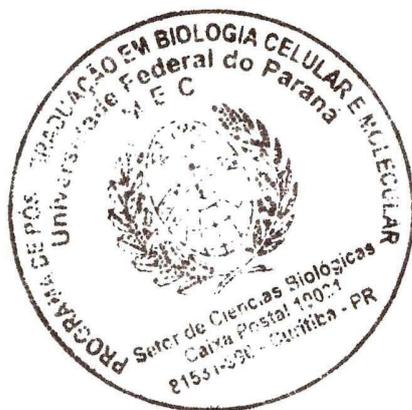
Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná
Instituto de Biologia Molecular do Paraná

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que Michel Batista, no dia 18 de julho de 2008, defendeu sua Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Molecular intitulada: "Construção de vetores para expressão de proteínas em *Trypanosoma cruzi* e *Crithidia fasciculata*", com a Banca Examinadora constituída pelos professores: Dr. Stenio Perdigão Fragoso (Instituto de Biologia Molecular do Paraná - IBMP), Dr. Christian Macagnan Probst (Instituto de Biologia Molecular do Paraná - IBMP) e Dr. Marco Aurélio Krieger (orientador e presidente da Banca Examinadora do Instituto de Biologia Molecular do Paraná - IBMP), e tendo sido Aprovado recebendo o título de Mestre em Biologia Celular e Molecular, desde que apresente a versão definitiva da dissertação conforme regimento interno do Programa.

Curitiba, 18 de julho de 2008.


Prof. Dr. Ricardo Fernandez Pérez
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
Biologia Celular e Molecular



À minha querida e adorável esposa, Kilma, e à nossa filha, Mirela.
Aos meus pais, Lucila e Alcides (*in memoriam*).
Ao meu irmão, Murillo.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Marco Aurélio Krieger e ao Dr. Samuel Goldenberg, por terem me dado a oportunidade de iniciar a carreira científica.

Ao doutorando Fabricio Klerynton Marchini, pelos ensinamentos e pela ativa participação neste trabalho.

Ao Dr. Stenio Perdigão Fragoso, pela constante boa vontade em ajudar.

Ao Dr. Christian Macagnan Probst e ao doutorando Henrique Preti, pela ajuda durante este trabalho.

Aos meus amigos do IBMP, pelo carinho e apoio.

À minha família, pelo estímulo e por acreditar nos meus propósitos.

RESUMO

Em *Trypanosoma cruzi*, as informações provenientes do projeto genoma, o grande número de proteínas hipotéticas, as limitações da expressão protéica heteróloga em bactérias e a baixa quantidade de genes caracterizados constituem o cenário atual deste organismo. Esses fatores demonstram a necessidade da obtenção de ferramentas que permitam a caracterização em larga escala de genes deste organismo. Entre estas ferramentas, estão os vetores para expressão de proteínas em tripanossomatídeos, que, através da genética reversa, combinada com eficiência, plasticidade e compatibilidade permitem a caracterização de genes de forma rápida. Diante desta necessidade, foram construídos vetores para expressão de proteínas em *Trypanosoma cruzi* e *Crithidia fasciculata* que permitem a rápida clonagem de genes através do sistema Gateway[®] (Invitrogen). As construções para *T. cruzi* possuem a região 35.1 como intergênica, além de diferentes etiquetas (hexâmero de histidinas, *c-myc*, GFP, CFP, YFP e TAP), promotores (ribossomal de *T. cruzi* Dm28c e do bacteriófago T7) e resistências a antibióticos (higromicina e G418), permitindo a caracterização de genes por diversas abordagens. Além disso, a utilização de *C. fasciculata* como sistema de expressão protéica heteróloga tem como vantagens a sua proximidade evolutiva com *T. cruzi* e o fato de não parasitar seres humanos. Tal sistema é baseado nos vetores pNUS, com a adição do promotor do bacteriófago T7 e região operadora de tetraciclina. A validação desta plataforma foi realizada com 3 genes de *T. cruzi*, utilizando anticorpos contra as proteínas recombinantes para a confirmação da expressão, localização e obtenção de complexos protéicos. Os resultados obtidos demonstraram a funcionalidade e plasticidade dos vetores gerados, tornando factíveis as caracterizações gênicas em larga escala.

ABSTRACT

The availability of the *Trypanosoma cruzi* genome is only a small piece of the puzzle of this parasite's biology. A high percentage of hypothetical proteins, few genes characterized and limitations on heterologous protein expression are the present scenario for this biological model. Thus, the need for development of a high-throughput gene characterization platform becomes evident. Ideally, such platform should allow efficient cloning and disponsibility of different applications. In this context, the goal of this study was to use the Gateway® technology (Invitrogen) to construct plasmid vectors suitable for different uses. Our constructs contained 35.1 intergenic regions, *T. cruzi* Dm28c 18S ribosome or the T7 bacteriophage promoters, antibiotic resistance genes, and several tags for multiple purposes. Besides *T. cruzi* vectors, a *Crithidia fasciculata* heterologous protein expression system was created based on pNUS-H1 and modified for use of the bacteriophage T7 RNA polymerase. The advantages of the *C. fasciculata* system are that it is related to *T. cruzi* but it is not pathogenic for humans. Three *T. cruzi* genes were used to validate our strategy. Antibodies against the products of these genes were used to detect the presence of the recombinant proteins in *T. cruzi* and *C. fasciculata* extracts, and to compare the localization of the native proteins with that of the recombinant proteins tagged with *c-myc* epitope or fluorescent proteins GFP, CFP and YFP in *T. cruzi*. The results obtained with these antibodies corroborated the results obtained with our system. TAP tag protein complex purification was also used for strategy validation. Our results show that this platform is a fast and efficient cloning system that allows the characterization of *Trypanosoma cruzi* genes by different biological approaches. The development of this high-throughput platform is a step further to large scale applications such as the *T. cruzi* ORFeome.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> (CHAGAS, 1909).....	13
1.1.1 Ciclo de Vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
1.1.2 Doença de Chagas.....	15
1.1.3 Características Celulares de <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
1.1.4 Genoma de <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
1.1.5 Características da Metaciclologênese.....	19
1.1.6 Expressão Gênica em <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
1.2 <i>Crithidia fasciculata</i> (LEGER, 1902).....	20
1.3 Genética Clássica versus Reversa.....	20
1.4 Análises Gênicas Através de Vetores.....	21
1.4.1 Vetores para Expressão Protéica em Tripanossomatídeos.....	22
1.4.2 Vetores com Expressão Regulada.....	23
1.4.3 Localização Celular de Proteínas.....	24
1.4.4 Purificação de Proteínas Contendo Etiqueta de Poli-Histidina.....	26
1.4.5 Purificação de Complexos Protéicos por TAP tag.....	26
1.5 Sistemas de Clonagem: Gateway® versus Clonagem Clássica.....	27
1.6 Desenvolvendo um Sistema para Caracterização de Genes de <i>Trypanosoma cruzi</i> em Larga Escala.....	30
2 OBJETIVO GERAL.....	32
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Organismos.....	33
3.2 Meios de Cultura.....	33
3.3 Reagentes e Genes Sintéticos.....	33
3.4 Soluções e Tampões.....	36
3.5 Composição SDS-PAGE.....	38
3.6 Equipamentos e Acessórios.....	38
3.7 Softwares.....	40
3.8 Desenho dos Oligonucleotídeos (Iniciadores).....	41

3.9	Reações de PCR.....	43
3.10	Reações de Digestão	44
3.11	Reações de Ligação.....	45
3.12	Validação dos Resultados	46
3.13	Transformação em <i>Escherichia coli</i>	47
3.14	Seleção e Confirmação dos Clones e Preparação dos Plasmídeos	48
3.15	Construção dos Vetores para Transfecção em <i>Crithidia fasciculata</i>	49
3.16	Construção dos Vetores para Transfecção em <i>Trypanosoma cruzi</i> .	52
3.17	Determinação das Dosagens de Higromicina e G418 Utilizados na Seleção dos Transfectantes.....	56
3.18	Transfecção dos Parasitas	56
3.19	Detecção do Vetor pNUS-T7N em <i>Crithidia fasciculata</i>	57
3.20	Procedimento para Obtenção de População Clonal em <i>Crithidia fasciculata</i> Transfectante	57
3.21	Visualização das Proteínas Fluorescentes e Imunofluorescência....	58
3.22	Preparação dos Extratos Protéicos em Tampão Desnaturante.....	59
3.23	Ensaio de Western Blot	60
3.24	Ensaio de Southern Blot.....	60
3.25	Ensaio de Northern Blot	62
3.26	Obtenção de Extrato Citoplasmático e Purificação Protéica em Resina de Cobalto.....	63
3.27	Obtenção de Extrato Protéico e Purificação de Complexos por TAP tag	64
4	RESULTADOS	66
4.1	Construção e Caracterização dos Vetores pNUS-T7N e pNUS-PT7- RfAH	66
4.1.1	Processos de Clonagem.....	66
4.1.2	Seqüenciamento do DNA.....	68
4.1.3	Avaliação do Crescimento de <i>Crithidia fasciculata</i> em Diferentes Concentrações de G418 e Higromicina	68
4.1.4	Ensaio de Transfecção e Obtenção de População Clonal em <i>Crithidia fasciculata</i>	69
4.1.5	Caracterização Molecular e Detecção dos Transcritos em <i>Crithidia fasciculata</i> Transfectada com pNUS-T7N e pNUS-PT7-RfAH.....	72

4.1.6	Ensaio de Western Blot.....	77
4.2	Construção e Caracterização dos Vetores pTcPR-HisN e Derivados e pTcPT7-HisN.....	79
4.2.1	Processos de Clonagem.....	79
4.2.2	Seqüenciamento do DNA.....	83
4.2.3	Avaliação do Crescimento de <i>Trypanosoma cruzi</i> em Diferentes Concentrações de G418.....	84
4.2.4	Transfecções em <i>Trypanosoma cruzi</i>	84
4.2.5	Caracterização Molecular de pTcPR-HisN e Derivados.....	89
4.2.6	Avaliação da Expressão e Localização das Proteínas Recombinantes.....	91
4.2.7	Purificação de Complexos Protéicos (TAP tag) e Proteínas Contendo Cauda de Histidinas.....	99
5	DISCUSSÃO	101
6	CONCLUSÃO.....	110
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1.1.1: Desenho esquemático do ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> .	14
Figura 1.1.1.2: Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> considerando-se as formas evolutivas intermediárias.	15
Figura 1.4.2.1: Modelo esquemático da regulação da expressão gênica por tetraciclina.	24
Figura 1.5.1: Diagrama esquemático mostrando a recombinação entre os sítios <i>attB</i> e <i>attP</i> , para a obtenção do clone de entrada.	28
Figura 1.5.2: Diagrama esquemático mostrando a recombinação entre os sítios <i>attL</i> e <i>attR</i> , para a obtenção do clone de expressão.	29
Figura 1.5.3: Representação esquemática da plataforma Gateway® demonstrando as suas diversas aplicabilidades a partir de um clone de entrada.	29
Figura 1.5.4: Representação esquemática do cassete RfA.	30
Figura 3.15.1: Desenho esquemático do clone pNUS-T7N.	50
Figura 3.15.2: Desenho esquemático do vetor pNUS-PT7-RfAH.	51
Figura 3.16.1: Desenho esquemático do vetor pTcPR-HisN.	54
Figura 3.16.2: Desenho esquemático do vetor pTcPT7-HisN.	54
Figura 3.16.3: Seqüência nucleotídica dos adaptadores e cassetes sintéticos utilizados.	55
Figura 4.1.1.1: Seleção dos clones e avaliação da orientação do gene da T7 RNA Polimerase.	67
Figura 4.1.1.2: Seleção e confirmação dos clones contendo RfA.	67
Figura 4.1.3.1: Curvas de crescimento de <i>Crithidia fasciculata</i> na presença de diferentes concentrações de G418.	69
Figura 4.1.3.2: Curvas de crescimento de <i>Crithidia fasciculata</i> na presença de diferentes concentrações de higromicina.	69
Figura 4.1.4.1: Seleção das culturas de <i>C. fasciculata</i> selvagem transfectado com pNUS-PT7-RfAH.	71
Figura 4.1.4.2: Relação entre as culturas de <i>C. fasciculata</i> selvagem transfectado e a cultura controle.	71
Figura 4.1.4.3: Seleção das culturas de <i>C. fasciculata</i> clone 1 transfectado com pNUS-PT7-RfAH.	72
Figura 4.1.4.4: Relação entre as culturas de <i>C. fasciculata</i> clone 1 transfectado e a cultura controle.	72
Figura 4.1.5.1: Recuperação do vetor pNUS-T7N, a partir de <i>Crithidia fasciculata</i> , pré e pós cultivo em meio sólido.	73
Figura 4.1.5.2: Análise por Southern blot de <i>Crithidia fasciculata</i> transfectado com pNUS-T7N.	75
Figura 4.1.5.3: Avaliação da presença e estrutura dos vetores em <i>Crithidia fasciculata</i> após transfecção.	76
Figura 4.1.5.4: Análise por northern blot de <i>Crithidia fasciculata</i> transfectado com pNUS-T7N.	77
Figura 4.1.6.1: Análise por western blot de <i>C. fasciculata</i> transfectado utilizando anticorpo anti-histidina.	78
Figura 4.1.6.2: Análise por western blot de <i>C. fasciculata</i> transfectado utilizando anticorpos contra as proteínas recombinantes.	79
Figura 4.2.1.1: Seleção e confirmação dos clones obtidos durante a troca dos cassetes.	83

Figura 4.2.3.1: Curvas de crescimento de <i>Trypanosoma cruzi</i> na presença de diferentes concentrações de G418.....	84
Figura 4.2.4.1: Acompanhamento da seleção de <i>T. cruzi</i> transfectado com pTcPR-HisN-A1	85
Figura 4.2.4.2: Relação entre a cultura de <i>T. cruzi</i> transfectado com pTcPR-HisN-A1 e a cultura controle.....	85
Figura 4.2.4.3: Acompanhamento das seleções de <i>T. cruzi</i> transfectado com diversos vetores	86
Figura 4.2.4.4: Relação entre as culturas de <i>T. cruzi</i> transfectado com diversos vetores e a cultura controle.	86
Figura 4.2.4.5: Acompanhamento das seleções de <i>T. cruzi</i> transfectado com pTcPR-mycN e pTcPR-YFPN-C1	87
Figura 4.2.4.6: Relação entre as culturas de <i>T. cruzi</i> transfectado com pTcPR-mycN ou pTcPR-YFPN-C1 e a cultura controle.	87
Figura 4.2.4.7: Acompanhamento das seleções de <i>T. cruzi</i> transfectado com pTcPR-YFP	88
Figura 4.2.4.8: Relação entre as culturas de <i>T. cruzi</i> transfectado com pTcPR-YFP e a cultura controle.....	88
Figura 4.2.5.1: Avaliação da presença e estrutura dos vetores em <i>Trypanosoma cruzi</i>	90
Figura 4.2.5.2: Avaliação complementar do vetor pTcPR-HisN-A1 em <i>Trypanosoma cruzi</i>	91
Figura 4.2.6.1: Análise dos extratos de <i>T. cruzi</i> transfectado com pTcPR-HisN por western blot com anticorpo monoclonal anti-histidina	92
Figura 4.2.6.2: Análise dos extratos de <i>T. cruzi</i> transfectado com pTcPR-HisN por western blot com anticorpos contra as proteínas recombinantes.....	93
Figura 4.2.6.3: Análise dos extratos de <i>T. cruzi</i> transfectado com pTcPR-GFPN por western blot com anticorpos contra as proteínas recombinantes e contra GFP.....	93
Figura 4.2.6.4: Análise dos extratos de <i>T. cruzi</i> transfectado com pTcPR-CFPN através de western blot com anticorpos contra as proteínas recombinantes	94
Figura 4.2.6.5: Análise dos extratos de <i>T. cruzi</i> transfectado com pTcPR-YFPN através de western blot com anticorpos contra as proteínas recombinantes	95
Figura 4.2.6.6: Análise dos extratos de <i>T. cruzi</i> transfectado com pTcPR-mycN por western blot com anticorpos contra as proteínas recombinantes e contra <i>c-myc</i>	95
Figura 4.2.6.7: Análise dos extratos de <i>T. cruzi</i> transfectado com pTcPR-TAPN por western blot com anticorpos contra as proteínas recombinantes.....	96
Figura 4.2.6.8: Controle negativo da localização celular utilizando parasitas não transfectados.....	97
Figura 4.2.6.9: Localização celular da proteína A1	97
Figura 4.2.6.10: Localização celular da proteína C1	98
Figura 4.2.6.11: Localização celular da proteína C4	99
Figura 4.2.7.1: Avaliação dos complexos protéicos eluídos após purificação por TAP-tag	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.4.1.1: Exemplos de vetores utilizados em ensaios de transfecção em tripanossomatídeos.	22
Tabela 3.8.1: Oligonucleotídeos empregados nas ampliações das diversas ORFs e cassetes utilizados na construção dos vetores.	40
Tabela 3.8.2: Oligonucleotídeos utilizados no seqüenciamento dos vetores construídos.	42
Tabela 3.8.3: Oligonucleotídeos utilizados exclusivamente nas PCRs para caracterização molecular dos vetores.	43
Tabela 3.12.1: Recombinações com genes de <i>T. cruzi</i> para validação dos vetores.	47
Tabela 3.14.1: Oligonucleotídeos utilizados nas PCRs de colônia para confirmação das recombinações Gateway® e clonagem do adaptador PT7.	49
Tabela 6.1: Progresso na construção e caracterização dos vetores.	110

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909)

Descrito no início do século XX pelo cientista Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Sua interação com o homem pode resultar na doença de Chagas, que acomete 15 milhões de pessoas na América (Organização Mundial da Saúde, 2006). Sua transmissão ocorre através das fezes de insetos vetores hematófagos contaminados, da ordem Hemiptera, família *Reduviidae*, conhecidos popularmente como barbeiros.

O gênero *Trypanosoma* pode ser dividido em dois grupos, conforme o seu desenvolvimento no inseto hospedeiro:

Stercoraria – os parasitas se desenvolvem no tubo digestivo do hospedeiro e são liberados pela excreção intestinal, como por exemplo o *Trypanosoma cruzi*.

Salivaria – os parasitas se desenvolvem no tubo digestivo do hospedeiro e migram para as glândulas salivares, sendo então transmitidos através da inoculação, como por exemplo *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma rangeli*.

1.1.1 *Ciclo de Vida de Trypanosoma cruzi*

T. cruzi possui um ciclo de vida complexo contendo um hospedeiro intermediário inseto e um hospedeiro definitivo mamífero. No tubo digestivo do inseto, as formas evolutivas epimastigotas (não-infectivas e replicativas) se replicam por fissão binária. Durante a migração ao longo do tubo digestivo, os parasitas se diferenciam nas formas infectivas tripomastigotas metacíclicas (não-replicativas e infectivas). As formas tripomastigotas metacíclicas podem ser liberadas junto com as fezes do inseto durante o repasto alimentar podendo penetrar no hospedeiro vertebrado através de descontinuidades da pele ou mucosas. No hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas metacíclicos invadem diversos tipos celulares e se diferenciam nas formas amastigotas (replicativas e infectivas), as quais se replicam e

se diferenciam nas formas tripomastigotas sangüíneas (não-replicativas e infectivas), que, após liberadas, infectam novas células ou podem ser ingeridas pelo inseto fechando o ciclo (DE SOUZA, 1984) (**Figura 1.1.1.1**).

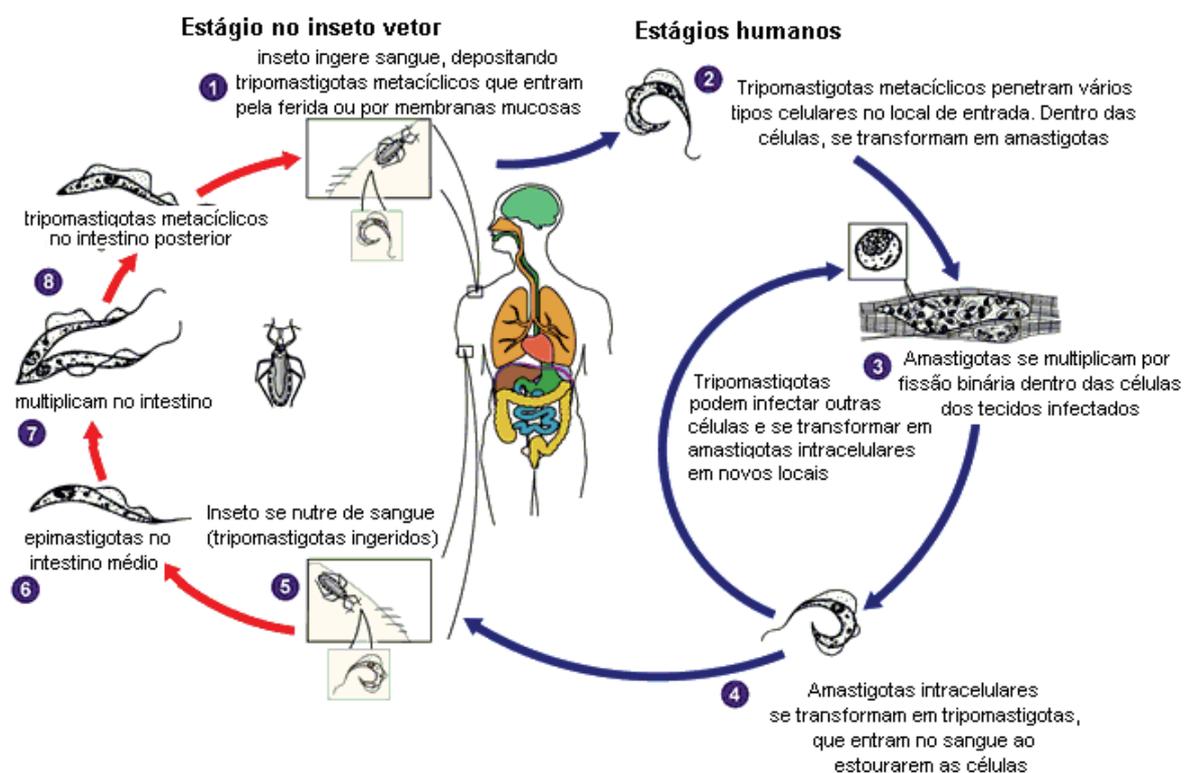


Figura 1.1.1.1: Desenho esquemático do ciclo de vida de *T. cruzi*. (adaptado de www.dpd.cdc.gov/dpdx).

A descrição clássica do ciclo de vida de *T. cruzi* feita por DE SOUZA (1984), considera quatro formas evolutivas morfologicamente distintas: epimastigota, amastigota, tripomastigota metacíclica e tripomastigota sangüínea. Alguns autores, no entanto, consideram formas evolutivas intermediárias. No sangue periférico do mamífero pode existir uma população pleomórfica de tripomastigotas, constituída de uma mistura de duas morfologias básicas descritas como *slender* e *broad* (TYLER & ENGMAN, 2001). Além disso, no intestino médio do inseto, as formas tripomastigotas sangüíneas, durante sua diferenciação a epimastigotas, passam por uma forma intermediária descrita como esferomastigota (BRACK, 1968) (**Figura 1.1.1.2**).

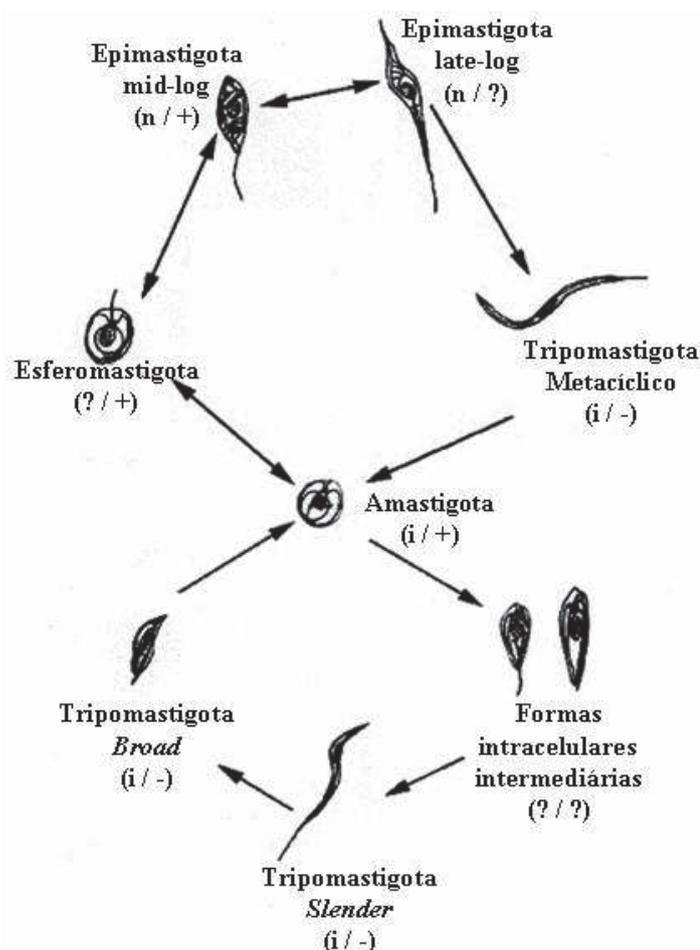


Figura 1.1.1.2: Ciclo de vida do *T. cruzi* considerando-se as formas evolutivas intermediárias. (i) forma infectiva, (n) não-infectiva, (+) forma proliferativa, (-) não-proliferativa (adaptado de TYLER & ENGMAN, 2001).

1.1.2 Doença de Chagas

A doença de Chagas apresenta uma fase aguda, iniciada logo após a infecção caracterizada por parasitemia alta e colonização de tecidos, a qual apresenta apenas sintomas leves. Entretanto, crianças e, menos freqüentemente, adultos podem desenvolver sintomas severos após um período de incubação de 7 a 14 dias (TANOWITZ *et al.*, 1992). A fase aguda evolui para a fase crônica na qual a grande maioria dos casos não apresenta sintomas ou exames clínicos alterados, sendo denominada de forma crônica indeterminada. Todavia, cerca de 20 a 30% dos casos podem evoluir para as formas crônicas determinadas: forma cardíaca, apresentando arritmias cardíacas, eventos de tromboembolia ou insuficiência cardíaca congestiva (TANOWITZ *et al.*, 1992), ou forma digestiva, apresentando distúrbios gastrointestinais (Revisão por TEIXEIRA *et al.*, 2006).

Outras formas de contágio pelo *Trypanosoma cruzi* incluem a oral, transplacentária, por acidentes de laboratório e a sangüínea, entre outras. Na infecção por via oral, as formas tripomastigotas metacíclicas penetram no epitélio das mucosas, se transformam em amastigotas e se replicam intracelularmente (HOFT *et al.*, 1996). Mais da metade dos casos agudos da doença de Chagas, registrados na Amazônia brasileira entre 1968 e 2000, pode ser atribuído à transmissão por via oral através de alimentos contaminados (COURA *et al.*, 2002).

Também é importante salientar a forma de transmissão que ocorre por transfusão sangüínea. O controle desta forma de transmissão tem sido realizado por testes laboratoriais empregando metodologias, tais como, ELISA e hemaglutinação.

Várias pesquisas são realizadas no intuito de gerar novos alvos para quimioterápicos, no entanto, até o momento não existem medicamentos capazes de curar ou impedir a evolução da doença, assim como também não se dispõe de vacina para sua prevenção.

1.1.3 Características Celulares de *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi é uma célula eucariótica que apresenta algumas particularidades. Nesta seção serão descritas estruturas peculiares com papel importante na biologia deste parasita. *T. cruzi* possui um único flagelo, o qual pode variar em tamanho desde menos de 2 µm a mais de 20 µm durante o seu ciclo de vida. O axonema é formado por microtúbulos na conformação 9 + 2. Ao seu lado existe uma estrutura semi-cristalina característica chamada estrutura paraflagelar (*Paraflagelar rod* – PFR). Estudos por RNA antisense demonstraram o requerimento desta estrutura para a motilidade normal em *Trypanosoma brucei* (BASTIN *et al.*, 1998).

Em relação ao seu citoesqueleto, uma característica dos tripanossomatídeos é a presença de uma camada de microtúbulos localizada abaixo da membrana plasmática, designados microtúbulos sub-peliculares (DE SOUZA, 2003). Adicionalmente, *T. cruzi* possui genes que codificam para formas distintas de actina, embora não haja evidências da presença de microfilamentos e filamentos intermediários. Em estudos com RNA de interferência (RNAi) foi possível verificar a participação de actina nos processos de endocitose em *Trypanosoma brucei* (GARCIA-SALCEDO *et al.*, 2004).

Na região anterior da célula, de onde emerge o flagelo, existe uma invaginação na junção entre as membranas plasmática e flagelar chamada de bolsa flagelar (SOUTO-PADRON & DE SOUZA, 1979). Esta é a única região da célula onde não existem microtúbulos associados à membrana (OVERATH *et al.*, 1997). 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 (TYLER *et al.*, 2003).

Principalmente 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 metacicloênese, como principal fonte de energia para esta atividade (SOARES, 1999).

Distribuídas pelo citoplasma da célula, existem organelas de aproximadamente 0,7 μm denominadas glicossomos. Estas estruturas são responsáveis por armazenar enzimas da via glicolítica em tripanossomatídeos, além de compartimentalizar vias metabólicas como a de fixação de dióxido de carbono e a de síntese de pirimidina *de novo* (DE SOUZA, 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. Além da importância destas organelas na estocagem de cálcio, o que garante o aporte de cálcio em ambientes com baixa concentração deste íon, os acidocalcissomos também podem participar de outros processos, tais como estocagem de energia na forma de pirofosfato, regulação do pH citoplasmático através de uma H^+ -ATPase presente na membrana da organela e controle da osmoregulação, assim como faz outra organela conhecida como acidossomos presentes em *Dictyostelium discoideum* (DOCAMPO & MORENO, 1999, 2001).

O DNA em *T. cruzi* está presente no núcleo e no cinetoplasto. O cinetoplasto é uma estrutura característica da ordem Kinetoplastida, localizado em uma porção

da mitocôndria única deste organismo, formado por moléculas de DNA circulares catenadas (RIOU & DELAIN, 1969; Revisto por SHAPIRO & ENGLUND, 1995). Estas moléculas constituem os maxicírculos e minicírculos e podem representar até 30% do DNA total (Revisto por SILVEIRA, 2000). Enquanto os maxicírculos codificam RNAs ribossomais (rRNAs) e algumas das proteínas mitocondriais necessárias para os processos bioenergéticos, os minicírculos codificam RNAs guias que atuam na edição de alguns transcritos dos maxicírculos (MORRIS, 2001).

A replicação celular do *T. cruzi* parece ser predominantemente clonal, embora ocorram ocasionalmente eventos de recombinação gênica. O *T. cruzi* pode ser dividido em duas grandes linhagens, denominadas I e II, sendo que a linhagem II possui cinco subdivisões (IIa-IIe). A linhagem I está associada ao ciclo silvestre e a linhagem II ao ciclo doméstico (BRISSE *et al.*, 2000).

1.1.4 Genoma de *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* possui um genoma nuclear com grande variabilidade intra-específica, onde o número de cromossomos pode variar de 30 a 40, com tamanhos entre 0,45 e 4 Megabases cada (CANO *et al.*, 1995). Embora ainda incerto, estudos indicam diploidia neste parasita. Análises de polimorfismos em sítios de restrição em genes *housekeeping* apoiam esta hipótese (BOGLIOLO *et al.*, 1986; 1996).

Em *T. cruzi*, os cromossomos homólogos podem diferir no tamanho devido principalmente à alterações associadas ao número de elementos repetitivos que apresentam (Revisto por SILVEIRA, 2000).

Os genes que codificam proteínas podem aparecer em cópia única ou como repetições em tandem contendo o mesmo (ou similar) quadro aberto de leitura (ORF) e regiões espaçadoras não relacionadas (VANHAMME e PAYS, 1995).

Em 2005, um consórcio formado pelos Institutos *The Institute for Genomic Research* (TIGR), *Seattle Biomedical Research Institute* (SBRI) e *Karolinska Institutet* (KI), concluiu o projeto de seqüenciamento do genoma de *Trypanosoma cruzi*. Este projeto consolidou muitas informações sobre *T. cruzi*, como por exemplo, o tamanho do genoma diplóide de *T. cruzi* estimado em aproximadamente 110 megabases, cada haplótipo contendo cerca de 12.000 genes e as seqüências repetitivas representando mais de 50% do genoma para a cepa seqüenciada CL Brener (EL-SAYED *et al.*, 2005).

1.1.5 Características da Metaciclogênese

O processo de diferenciação do *T. cruzi*, da forma epimastigota para a forma tripomastigota metacíclica, que ocorre no intestino do inseto vetor, é conhecido como metaciclogênese. Neste processo ocorrem diversas alterações morfológicas, metabólicas e de expressão gênica (GOLDENBERG *et al.*, 1985).

Para o melhor entendimento do processo de metaciclogênese, foram desenvolvidos sistemas de diferenciação *in vitro*, dentre os quais pode-se citar os métodos elaborados por Sullivan (1982) e Contreras e colaboradores (1985). Neste trabalho foi elaborado um meio de cultura denominado *Triatomine Artificial Urine* suplementado com prolina (TAUP), mais tarde acrescido de glutamato, aspartato e glicose sendo denominado TAU3AAG (GOLDENBERG *et al.*, 1987). Esta metodologia reprodutível utiliza condições químicas definidas que mimetizam as condições de estresse nutricional encontradas na urina do triatomíneo, onde formas intermediárias podem ser obtidas.

1.1.6 Expressão Gênica em *Trypanosoma cruzi*

Na maioria dos eucariotos, o principal ponto de controle da expressão gênica é o início da transcrição, que normalmente é monocistrônica, ou seja, cada RNA mensageiro (mRNA) é transcrito separadamente. Durante a transcrição ocorre a remoção dos íntrons por um processo chamado *cis-splicing*, uma vez que os íntrons se encontram na mesma molécula que os éxons.

Os tripanossomatídeos apresentam transcrição policistrônica (JOHNSON *et al.*, 1987; KOOTER *et al.*, 1987) e a presença de íntrons foi descrita apenas em alguns casos, como para a proteína poli-A polimerase (PAP) (MAIR *et al.*, 2000). Como característica desta família, os transcritos de mRNA são processados por *trans-splicing* (VAN DER PLOEG *et al.*, 1982). Neste processo, uma seqüência líder denominada *spliced leader* ou mini-éxon, composta por 39 nucleotídeos (seqüência espécie-específica) e localizada em outra molécula de RNA, é adicionada à região 5' do mRNA (LUO *et al.*, 1999), que também recebe poliadenilação na região 3'. A seqüência líder recebe capeamento e tal evento precede o *trans-splicing* (LAIRD *et al.*, 1985).

Além das peculiaridades descritas acima, em *T. cruzi* foram caracterizados apenas promotores ribossomais e para o gene do mini-éxon (DIETRICH *et al.*, 1993;

NUNES *et al.*, 1997), desconhecendo-se promotores para genes que codificam proteínas. Isto fornece indícios para a ocorrência de transcrição ubíqua (VANHAMME e PAYS, 1995; CLAYTON, 2002). A ocorrência de transcrição policistrônica, associada à ausência de *operons* e à presença de níveis distintos de mRNA originados de uma mesma unidade policistrônica, sugerem que a regulação da expressão gênica seja pós-transcricional.

1.2 *Crithidia fasciculata* (LEGER, 1902)

Este protozoário, assim como *T. cruzi*, pertence à família *Trypanosomatidae*. *C. fasciculata* é um organismo tripanossomatídeo que parasita uma variedade de insetos, mas não é patogênico para humanos (WALLACE, 1966, *apud*: TASANOR *et al.*, 2006).

C. fasciculata ocorre no intestino de insetos em dois estágios de desenvolvimento, um estágio sem motilidade aderido à parede do intestino e outro com uma forma mais alongada livre na luz do intestino (BROOKER, 1971).

Além de não ser patogênico para humanos, este parasita é facilmente cultivável em grandes quantidades e constitui um importante modelo de estudo dos processos bioquímicos, celulares e genéticos exclusivos dos tripanossomatídeos. Na tentativa de desenvolver terapias para doenças causadas por tripanossomatídeos patogênicos, tais estudos visam descobrir moléculas ou processos celulares que possam ser explorados (TASANOR *et al.*, 2006).

1.3 Genética Clássica versus Reversa

A genética clássica ou *forward* tem como abordagem central o estudo de um gene, ou grupo de genes, a partir da análise de fenótipos mutantes. Tais fenótipos são obtidos por mutações no DNA, que podem ser espontâneas ou provocadas por agentes químicos (ADAMS & SEKELSKY, 2002). Após a identificação dos fenótipos alterados, busca-se identificar o gene ou genes responsáveis.

A genética reversa é caracterizada por estudar a função dos genes, partindo-se da informação da seqüência dos mesmos, obtida através do genoma ou de uma proteína de interesse isolada da célula. Diversas metodologias podem ser utilizadas

nas análises por genética reversa, por exemplo, silenciamento, super expressão ou nocaute gênico e RNAi. Atualmente a genética reversa utilizando vetores para expressão gênica tem sido largamente empregada na caracterização de vários genes de função desconhecida.

1.4 Análises Gênicas Através de Vetores

Os vetores em biologia molecular são utilizados como veículos na transferência de material genético exógeno para dentro das células. Possuem uma grande variedade de destinações a partir da clonagem de genes ou seqüências de DNA, entre elas: seqüenciamento de DNA, produção de moléculas de RNA *in vitro*, expressão de proteínas, construção de bibliotecas genômica e de cDNA.

Os vetores de clonagem têm como exemplos mais difundidos os plasmídeos, cosmídeos, vírus, cromossomos artificiais de levedura (YACs) e de bactéria (BACs). Este último é derivado do plasmídeo F, que ocorre naturalmente em *Escherichia coli*. O desenvolvimento deste projeto é baseado em vetores plasmidiais, cuja estrutura será descrita a seguir.

O termo plasmídeo foi proposto em 1952 por Joshua Lederberg, inicialmente para designar qualquer partícula genética extracromossomal (LEDERBERG, 1997). Os plasmídeos são moléculas dupla fita de DNA circular que ocorrem naturalmente em bactérias, se replicam dentro delas e podem ser purificados através de métodos que evitam a contaminação com DNA genômico. Os vetores plasmidiais são construídos a partir de plasmídeos naturais, contendo uma origem de replicação, uma região promotora, um sítio múltiplo de clonagem (MCS) e carregam genes de resistência a antibióticos para seleção. O MCS é formado por vários sítios para endonucleases de restrição, o que fornece várias alternativas para clonagem. Os antibióticos comumente utilizados na engenharia genética são ampicilina, kanamicina, tetraciclina e cloranfenicol.

Os genes podem ser clonados em plasmídeos após digestão com endonucleases de restrição, e posteriormente selecionados ao serem inseridos em bactérias, em um procedimento denominado transformação. Antes disso, as bactérias passam por um tratamento e são chamadas competentes, podendo ser eletrocompetentes ou quimiocompetentes (cálcio-competentes). Estas células

contendo os plasmídeos com o gene de interesse se multiplicam carregando este clone, em seguida pode-se purificar este DNA plasmidial para diferentes fins.

Alguns exemplos de plasmídeos utilizados em *Escherichia coli* são os da série pUC, pBluescript II, pQE-30, pGEM, entre outros. Os plasmídeos também podem ser utilizados em outros organismos, como eucariotos por exemplo. Para isso, é necessária a adição de elementos distintos, entre eles sinais para processamento de RNA e promotores específicos para os organismos estudados. Em tripanossomatídeos, a aplicação de vetores na caracterização de genes pode ser feita através de vários mecanismos, tais como regulação transcricional induzível e fusão com etiquetas para localização e purificação dos produtos gênicos.

1.4.1 Vetores para Expressão Protéica em Tripanossomatídeos

Diferentemente dos vetores utilizados em procariotos, os vetores para tripanossomatídeos possuem elementos adicionais ou diferenciados, que permitem a sua utilização nestes organismos. Com a intenção de intensificar a expressão gênica, os vetores podem possuir regiões promotoras, sendo comum o emprego de promotores ribossomais de tripanossomatídeos (TYLER-CROSS *et al.*, 1995; BIEBINGER & CLAYTON, 1996; MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 1997). Outro promotor comumente utilizado em *T. brucei* é o do gene que codifica a proteína *procyclic acidic repetitive protein* (PARP) (WIRTZ & CLAYTON, 1995).

Nos casos onde é necessária a regulação da expressão gênica promovida por vetores, dispõe-se de mecanismos baseados nos *operons* bacterianos. Em tripanossomatídeos, a regulação da expressão gênica de forma induzível em vetores utiliza freqüentemente o sistema baseado no mecanismo bacteriano de resistência à tetraciclina (WIRTZ & CLAYTON, 1995; BIEBINGER *et al.*, 1997; RAMAKRISHNAN *et al.*, 1997; WIRTZ *et al.*, 1998, 1999; WEN *et al.*, 2001; TAYLOR & KELLY, 2006; YAO *et al.*, 2007).

Devido à presença de *trans-splicing* nos tripanossomatídeos, é necessária a presença de seqüências sinalizadoras para tal evento. Tais seqüências também fornecem sinal para poliadenilação dos transcritos e podem ser encontradas em regiões intergênicas (RIs). Dentre estas regiões, pode-se destacar as RIs dos genes gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (KELLY *et al.*, 1992; TAYLOR &

KELLY, 2006), actina e aldolase (WIRTZ *et al.*, 1994; WIRTZ & CLAYTON, 1995; WIRTZ *et al.*, 1999) e ubiquitina (WEN *et al.*, 2001).

Os genes para seleção conferem resistência aos antibióticos com atividade em eucariotos. Alguns antibióticos interferem na tradução protéica, como é o caso dos aminoglicosídeos neomicina e higromicina. Outros possuem atividade de clivagem do DNA, como é o caso da zeocina, membro da família bleomicina/fleomicina.

De maneira semelhante aos vetores utilizados em outros organismos, os vetores de expressão protéica para tripanossomatídeos podem dispor de seqüências codificadoras de etiquetas que serão fusionadas aos genes analisados. Diversos vetores têm sido construídos, auxiliando na caracterização de genes de tripanossomatídeos (**Tabela 1.4.1.1**).

Tabela 1.4.1.1: Exemplos de vetores utilizados em ensaios de transfecção em tripanossomatídeos.

VETOR	ORGANISMO	REFERÊNCIA
pAL5	<i>Leptomonas seymouri</i>	BELLOFATTO & CROSS, 1989
pEX	<i>Leishmania</i>	LEBOWITZ <i>et al.</i> , 1990
pTcSL	<i>Trypanosoma cruzi</i>	LU & BUCK, 1991
pTEX	<i>T. cruzi</i> e <i>Leishmania</i>	KELLY <i>ET al.</i> , 1992
pHD330/308	<i>Trypanosoma brucei</i>	WIRTZ <i>ET al.</i> , 1994
pHD360	<i>Trypanosoma brucei</i>	WIRTZ & CLAYTON, 1995
pTc-pa	<i>Trypanosoma cruzi</i>	TYLER-CROSS <i>et al.</i> , 1995
pHD299	<i>Crithidia fasciculata</i>	BIEBINGER & CLAYTON, 1996
pHD437	<i>Trypanosoma brucei</i>	BIEBINGER <i>et al.</i> , 1997
pRIBOTEX	<i>Trypanosoma cruzi</i>	MARTÍNEZ-CALVILLO <i>et al.</i> , 1997
pTRES-n	<i>Trypanosoma cruzi</i>	VAZQUEZ & LEVIN, 1999
pLEW13/20	<i>Trypanosoma brucei</i>	WIRTZ <i>ET al.</i> , 1999
pPATAN	<i>Trypanosoma cruzi</i>	WEN <i>et al.</i> , 2001
pNUS	<i>C. fasciculata</i> e <i>Leishmania</i>	TETAUD <i>et al.</i> , 2002
pTcINDEX	<i>Trypanosoma cruzi</i>	TAYLOR & KELLY, 2006
pTuT7RpolHyg	<i>Leishmania chagasi</i>	YAO <i>et al.</i> , 2007

1.4.2 Vetores com Expressão Regulada

Um sistema de regulação da expressão gênica que permite expressão controlada de genes constitui uma importante ferramenta para o estudo funcional de genes (WEN *et al.*, 2001). Este tipo de controle é importante para a análise de genes pouco expressos ou cujo produto é tóxico (WEN *et al.*, 2001).

O controle da transcrição em vetores pode ser feito baseando-se nos modelos bacterianos de *operon*. Dentre os sistemas mais utilizados, pode-se destacar o *operon lac* e o *operon tet*. Este último possui regulação baseada no sistema bacteriano de resistência à tetraciclina, no qual a expressão do gene de resistência (*TetA*) é bloqueada pelo repressor de tetraciclina (*TetR*). Na ausência de tetraciclina, *TetR* se liga ao operador de 19 pares de bases (*TetO*) e bloqueia o início da transcrição (HILLEN *et al.*, 1984). A expressão de *TetA* ocorre quando *TetR* se dissocia do operador para se ligar preferencialmente à tetraciclina (**Figura 1.4.2.1**). Com diferentes concentrações de tetraciclina é possível alcançar diferentes níveis de controle. Em variações deste sistema, com a alteração de alguns aminoácidos em *TetR*, este se liga ao operador somente na presença de tetraciclina, inibindo a transcrição de *tetA*.

O primeiro sistema regulado desenvolvido para uso em células de mamíferos foi elaborado fusionando-se o repressor de tetraciclina com o domínio de ativação transcricional VP16 do vírus herpes simplex (*tTA*). Neste sistema, o gene cuja transcrição será regulada se encontra sob o controle do promotor para citomegalovírus, precedido por sete cópias de *TetO* (GOSSEN & BUJARD, 1992). Na presença de tetraciclina ocorre a repressão da expressão do gene regulado, pois neste sistema é necessário que o repressor, fusionado com VP16, se ligue à região promotora para que ocorra a expressão gênica.

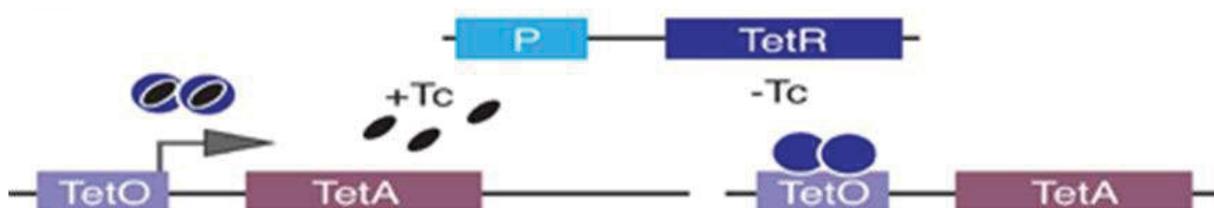


Figura 1.4.2.1: Modelo esquemático da regulação da expressão gênica por tetraciclina. À esquerda, na presença de tetraciclina (Tc), que se liga ao repressor *TetR* (círculos azuis), ocorre a transcrição de *TetA* (indicada pela seta). À direita, na ausência de tetraciclina, o repressor *TetR* se liga ao operador *TetO* reprimindo a transcrição de *TetA*. (Adaptado de <http://nfs.unipv.it/nfs/minf/dispense/immunology/trgen.html>).

1.4.3 Localização Celular de Proteínas

Na caracterização de genes, um importante dado a ser considerado é a localização das proteínas por eles codificadas. O emprego de moléculas fluorescentes na microscopia permite tal abordagem. As moléculas fluorescentes absorvem luz em um determinado comprimento de onda e emitem em outro.

Utilizando-se um fundo escuro e através de filtros é possível visualizar somente a luz emitida. As moléculas fluorescentes podem ser conjugadas com anticorpos, a fim de localizar proteínas de forma específica na célula. Estes anticorpos podem ser direcionados contra as próprias proteínas ou contra etiquetas fusionadas a estas. As moléculas fluorescentes também podem ocorrer naturalmente em alguns organismos, sendo que o isolamento destas e a possibilidade de fusão das suas regiões codificadoras com genes permitiram a localização de proteínas sem a necessidade de obtenção de anticorpos. Uma proteína fluorescente amplamente utilizada em ensaios de localização celular é a proteína fluorescente verde (*Green Fluorescent protein* – GFP), purificada e estudada pela primeira vez na década de 1960 (SHIMOMURA *et al.*, 1962). A GFP é isolada do organismo invertebrado marinho *Aequorea victoria* (água viva) e o seu emprego como ferramenta molecular tem sido de grande utilidade em diversos experimentos biológicos (TSIEN, 1998).

A GFP é composta por 238 aminoácidos (26,9 kDa), sendo formada por 11 folhas β em estrutura de barril com um cromóforo em seu interior. Diversas mutações na seqüência gênica da GFP foram estudadas, algumas mudando comprimento de onda excitatório, outras favorecendo o dobramento desta proteína e finalmente mutações que causam mudança no comprimento de onda emitido, alterando a cor detectada, por exemplo, para a faixa do amarelo (*Yellow Fluorescent Protein* – YFP) ou para a faixa do ciano (*Cyan Fluorescent Protein* – CFP).

A GFP, YFP e CFP podem ser fusionadas às proteínas de interesse por técnicas de engenharia genética utilizando vetores de expressão protéica, permitindo assim, através da detecção de fluorescência, a localização celular das proteínas estudadas.

Outra abordagem para localização celular de proteínas é a fusão destas com epítomos, cujos anticorpos sejam comercialmente disponíveis. Um exemplo é o epítomo *c-myc*, que faz parte do proto-oncogene humano *c-myc*. Sua expressão aberrante tem sido implicada com neoplasias em várias espécies de aves e mamíferos (EVAN *et al.*, 1985). O epítomo *c-myc* utilizado neste projeto possui 11 aminoácidos (EQKLISEFELN) modificados em relação ao original, resultando em melhor ligação com o anti-*c-myc* (HILPERT *et al.*, 2001). Através de um anticorpo monoclonal contra este epítomo, pode-se realizar vários tipos de ensaios com a proteína de interesse fusionada ao mesmo. Além da localização celular da proteína, é possível a realização de ensaios como western blot, imunoprecipitação e ELISA.

1.4.4 Purificação de Proteínas Contendo Etiqueta de Poli-Histidina

O sistema IMAC (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*) foi introduzido em 1975, sendo descrito como uma técnica para separação de proteínas através de afinidade grupo-específica (PORATH *et al.*, 1975). Esta técnica consiste na interação reversível entre as cadeias laterais de aminoácidos (histidina, cisteína e triptofano) com íons metálicos de transição e Zn^{2+} imobilizados. A purificação ocorre por afinidade das histidinas a um íon metálico, como por exemplo, o cobalto, fixado a uma resina.

Com o advento da tecnologia do DNA recombinante, o desenho e produção de proteínas recombinantes contendo uma etiqueta de poli-histidina tornaram-se mais simples (HOCHULI *et al.*, 1987; 1988), consistindo na fusão de 6 aminoácidos histidina (6xHis) à proteína de interesse. Esta fusão, carbóxi ou amino-terminal, pode ocorrer no DNA por PCR ou por clonagem em vetores contendo esta etiqueta.

1.4.5 Purificação de Complexos Protéicos por TAP tag

O entendimento dos sistemas biológicos depende da análise das redes de regulação gênica, além da determinação da identidade, modificação e nível de expressão das proteínas codificadas, bem como a definição das interações entre elas (PUIG *et al.*, 2001). Alguns métodos foram desenvolvidos para atender a esta última proposta, dentre eles pode-se destacar um protocolo genérico de purificação denominado *tandem affinity purification* (TAP tag) (RIGAUT *et al.*, 1999). Este protocolo compreende um sistema de alta afinidade para purificação de complexos protéicos realizado em duas etapas. Uma das suas características é a de permitir a purificação de complexos protéicos com níveis de expressão protéica próximos aos naturais, ou seja, sem ocorrer super expressão, o que pode levar à formação de complexos não-fisiológicos (RIGAUT *et al.*, 1999).

Esta etiqueta de purificação pode ser fusionada à proteína de interesse e é composta por duas unidades de Proteína A (da bactéria *Staphylococcus aureus*) com afinidade por IgG, um sítio de clivagem para a protease TEV (do vírus *Tobacco Etch Virus*) e um peptídeo de ligação à calmodulina (*calmodulin-binding peptide*, CBP). Na primeira etapa, as unidades de Proteína A se ligarão especificamente a uma matriz contendo IgG, sendo este complexo clivado com a adição de TEV e posteriormente eluído. Então, uma segunda purificação com grânulos cobertos por

calmodulina é realizada para retirar TEV e contaminantes da etapa anterior. A segunda etapa ocorre na presença de cálcio e a eluição final é feita na presença de um agente quelante de cálcio (EGTA).

1.5 Sistemas de Clonagem: Gateway® versus Clonagem Clássica

Os métodos de clonagem clássica envolvem enzimas de restrição para inserção de segmentos de DNA em vetores. Estas enzimas clivam ou digerem especificamente regiões dentro da seqüência de DNA, podendo produzir extremidades coesivas. Isso permite a ligação de segmentos de DNA como a inserção de genes em vetores. Para isso, é necessária a digestão tanto do vetor quanto do gene a ser clonado com enzimas que gerem extremidades compatíveis. Os sítios para estas enzimas podem ser inseridos nos genes por PCR, através de iniciadores desenhados para esta finalidade. No entanto, nos vetores comerciais estes sítios geralmente já estão presentes.

O processo de clonagem clássica apresenta algumas dificuldades, dentre as quais: (i) baixa eficiência na obtenção de clones, causada pela ineficiência da digestão das moléculas e/ ou proporção do vetor : inserto; (ii) baixa eficiência na digestão de produtos de PCR; (iii) disponibilidade limitada de sítios de restrição para alguns genes; (iv) pouca adaptabilidade na transferência de genes entre vetores com aplicabilidades distintas.

Na tentativa de facilitar o processo de clonagem, foi desenvolvida uma plataforma de clonagem chamada Gateway® (Invitrogen) baseada nas propriedades de recombinação do bacteriófago lambda (LANDY, 1989). O bacteriófago lambda se integra no cromossomo da bactéria *Escherichia coli* alternando entre os ciclos lisogênico (integração) e lítico (excisão) (PTASHNE, 1992). A integração ocorre com a participação das proteínas Integrase do bacteriófago lambda e Fatores de Integração do Hospedeiro de *E. coli*, que no sistema Gateway® são combinados na produção da BP clonase® *Enzyme mix*. A excisão utiliza estas mesmas proteínas acrescidas da Excisionase do bacteriófago lambda, reunidas no sistema Gateway® formando a LR clonase® *Enzyme mix*. Esta recombinação ocorre através de seqüências específicas chamadas *attachment (att) sites*, presentes na bactéria e no bacteriófago, sendo esta reação direcional e específica.

No sistema Gateway® a clonagem é realizada em duas reações. Na primeira reação (**Figura 1.5.1**), chamada de reação BP, ocorre a recombinação entre os sítios *attB1/attB2*, inseridos por PCR no gene a ser clonado, e os sítios *attP1/attP2*, presentes no vetor de entrada (pDONR), gerando um clone de entrada no sistema. Na segunda reação (**Figura 1.5.2**), chamada de reação LR, pode-se verificar como ocorre a recombinação entre os sítios *attL1/attL2*, presentes no clone de entrada, e os sítios *attR1/attR2*, presentes no vetor de destinação escolhido, gerando um clone de destinação.

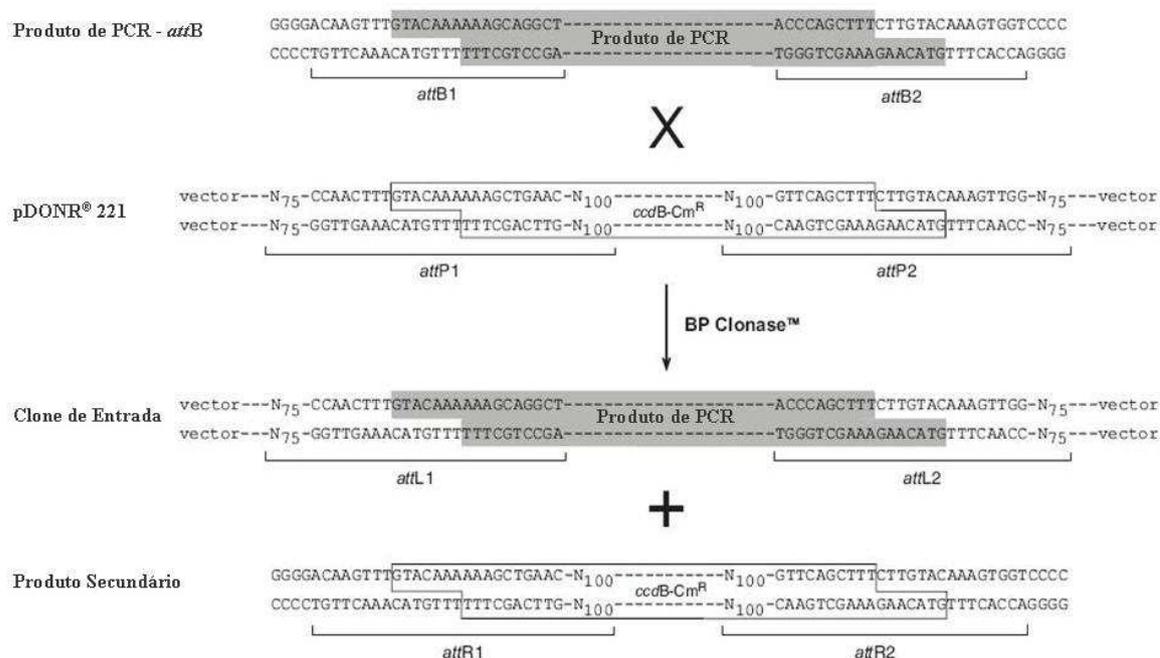


Figura 1.5.1: Diagrama esquemático mostrando a recombinação entre os sítios *attB* e *attP*, para a obtenção do clone de entrada. pDONR 221 é um dos vetores disponíveis para entrada no sistema (Adaptado de Manual Gateway® Technology).

Pela eficiência, adaptabilidade e compatibilidade apresentadas pelo sistema Gateway® (HARTLEY *et al.*, 2000; WALHOUT *et al.*, 2000a,b; CHEO *et al.*, 2004; DUPUY *et al.*, 2004), torna-se extremamente favorável a utilização desta plataforma na construção de vetores de expressão, pois a possibilidade de realizar a transferência dos genes de interesse para diferentes vetores de destinação com aplicações distintas (**Figura 1.5.3**) acelera sobremaneira os estudos de caracterização de genes.

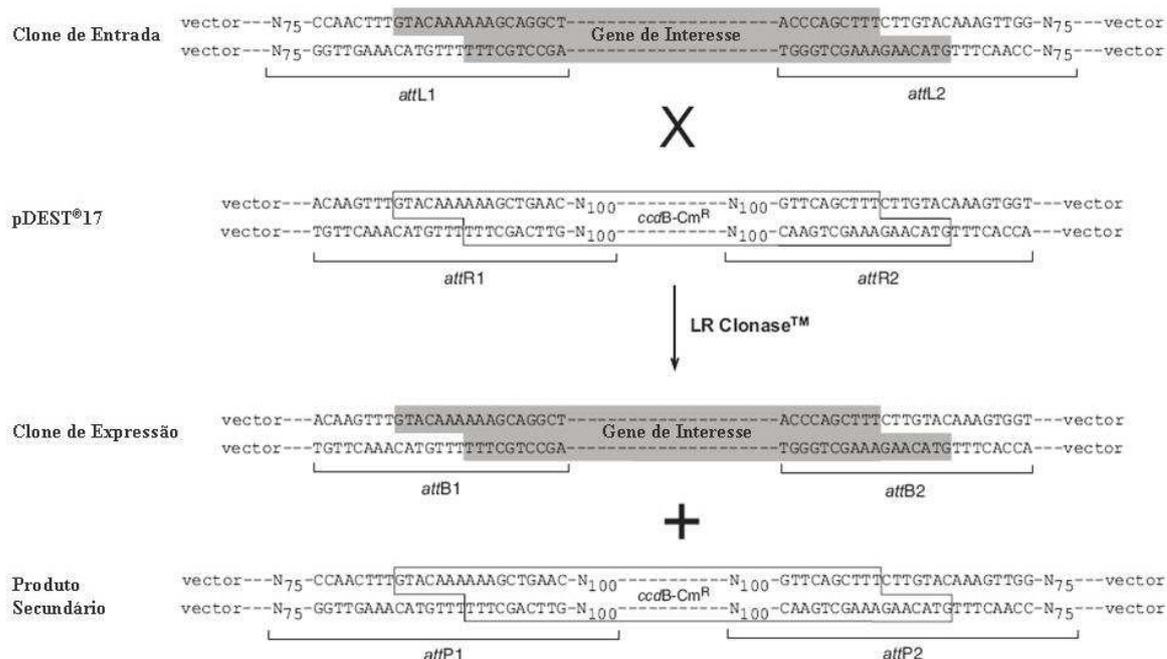


Figura 1.5.2: Diagrama esquemático mostrando a recombinação entre os sítios *attL* e *attR*, para a obtenção do clone de expressão. pDEST17 foi usado como exemplo de vetor de destinação (Adaptado de Manual Gateway® Technology).

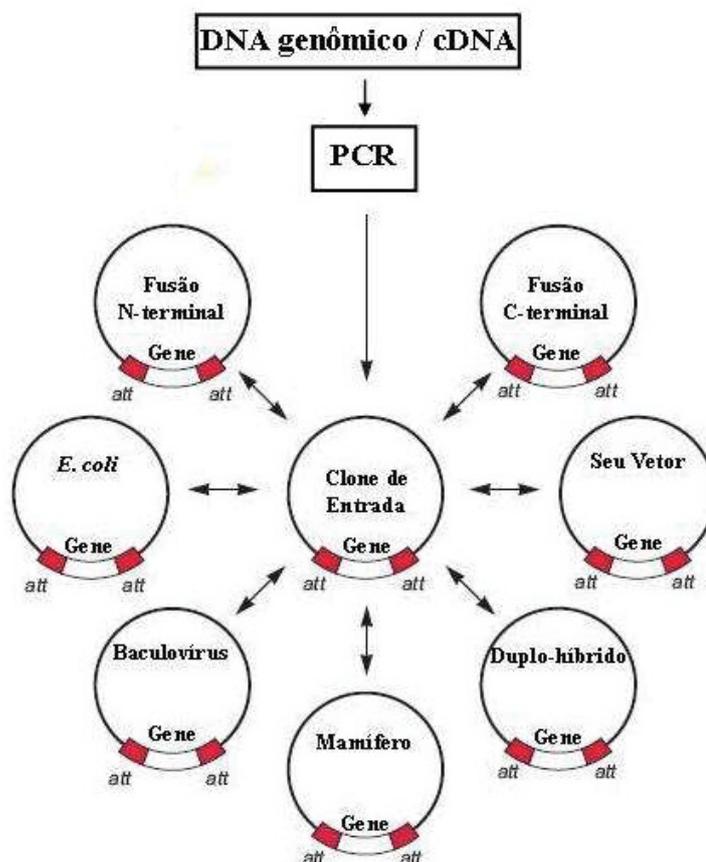


Figura 1.5.3: Representação esquemática da plataforma Gateway® demonstrando as suas diversas aplicabilidades a partir de um clone de entrada. (Adaptado de Manual Gateway® Technology).

A conversão de vetores para a plataforma Gateway® é realizada através da inserção do cassete de conversão RfA (**Figura 1.5.4**), gerando um vetor de destinação. Este cassete possui os sítios *attR1* e *attR2*, cada um contendo 125 pares de base. A recombinação destes sítios com os sítios *attL1* e *attL2* (clone de entrada) é unidirecional e específica.

Para seleção negativa, o RfA possui o gene *ccdB* (*ccd=control of cell death*). O gene *ccdB* (101 aminoácidos) está localizado no *locus ccd*, onde também está localizado o gene *ccdA* (72 aminoácidos). Este *locus* participa na manutenção do plasmídeo F, matando as células que não o contêm (Jaffe *et al.*, 1985). A proteína *ccdA* atua inibindo a proteína *ccdB* que, na ausência de *ccdA*, torna-se tóxica para a célula por interferir com a DNA girase bacteriana. Esta enzima auxilia a diminuição da tensão sofrida pelo DNA nos processos de replicação e transcrição, por exemplo, e com a sua inibição ocorrem quebras no DNA e morte celular.

Também está presente no cassete RfA o gene que confere resistência ao cloranfenicol (Cm^R). O cloranfenicol inibe a tradução protéica atuando na subunidade ribossomal 50S, mais especificamente impedindo a elongação. A resistência a este antibiótico permite a seleção dos plasmídeos de destinação contendo RfA (ρ DEST, por exemplo) em meio de cultura com cloranfenicol.



Figura 1.5.4: Representação esquemática do cassete RfA. As setas indicam a orientação dos genes Cm^R e *ccdB*, a área em cor rosa representa os nucleotídeos que serão conservados após a recombinação LR. (Manual Gateway® Technology).

1.6 Desenvolvendo um Sistema para Caracterização de Genes de *Trypanosoma cruzi* em Larga Escala

Técnicas de transformação estável aplicáveis aos tripanossomatídeos têm sido disponibilizadas há vários anos. Tais técnicas têm sido essenciais nas análises funcionais dos genes destes parasitas, tendo importante papel na caracterização de genes cruciais para o desenvolvimento e virulência dos parasitas, na análise das interações parasita-hospedeiro, no estudo dos mecanismos de expressão gênica, entre outros (TAYLOR & KELLY, 2003).

Em *Trypanosoma cruzi*, fatores como a disponibilidade do genoma seqüenciado, o grande número de proteínas com função desconhecida e as dificuldades encontradas na aplicação de genética *forward* nos estimularam a desenvolver um sistema para expressão protéica, combinando eficiência, adaptabilidade e compatibilidade e proporcionando assim uma ferramenta que permite análises por genética reversa em uma plataforma em larga escala.

2 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar vetores para expressão de proteínas em *Trypanosoma cruzi* e *Crithidia fasciculata*, utilizando diferentes promotores e resistências a antibióticos, etiquetas para purificação e localização intracelular destas proteínas em ensaios de transfecção em um sistema para clonagem em alta demanda.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Organismos

Escherichia coli:

- cepa DH5 α : (F⁻ *recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺) *supE44* λ *thi-1 gyrA96 relA1*);
- cepa *ccdB* resistente: (F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1 ara* Δ 139 Δ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG tonA::P_{trc}-ccdA*);
- cepa XL1-Blue: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* (F' *proAB lacIqZ* Δ M15 Tn10 (Tetr)).

Crithidia fasciculata: Isolado de *Anopheles quadrimaculatus*, como descrito por Noguchi & Tilden (1926) e cedido pelo laboratório da Dra. Maria Cristina Machado Motta, UFRJ.

Trypanosoma cruzi: Formas epimastigotas do clone Dm28c (GOLDENBERG *et al.*, 1984).

3.2 Meios de Cultura

LB (*Luria Bertani*): triptona 10 g/l, extrato de levedura 5 g/l, NaCl 5 g/l.

LIT B (*Liver Infusion Tryptose*) acrescido de penicilina: extrato de levedura 15 g/l, fosfato dibásico de sódio 11,56 g/l, glicose 2,2 g/l, hemina 0,02 g/l, infuso de fígado 5 g/l, KCl 0,4 g/l, NaCl 4,4 g/l, soro fetal bovino 10 % (v/v), triptose 5 g/l, penicilina 63 mg/l, pH ajustado para 7,2 com HCl.

3.3 Reagentes e Genes Sintéticos

Amersham-Pharmacia Biotech:

- Anticorpo monoclonal anti-histidina 1,4 – 2,8 mg/ml;
- Calmoduline Sepharose;
- dCTP *Phosphorus-32*;

- Endonucleases de restrição *Sall*, *HindIII* e *NdeI*;
- Ficoll 400;
- *Hybond* membrana de náilon e nitrocelulose;
- *Hyperfilm* MP;
- IgG *Sepharose*.

Becton Dickinson:

- Extrato de levedura;
- Trypticase.

Boehringer Mannheim:

- Endonucleases de restrição *SacI* e *XbaI*;
- *SuRE/Cut buffers*.

Clontech Laboratories, Inc.:

- *TALON Metal Affinity Resins*.

Difco:

- Infuso de fígado;
- Tryptose.

Eppendorf:

- *Triple Master* DNA Polimerase.

Fisher Scientific:

- Meio de cultura *Luria Bertani*.

GenScript:

- GSNEO (gene sintético da neomicina fosfotransferase, inserido entre as regiões intergênicas 35.1);
- GSPDM28c (gene sintético do promotor ribossomal 18S do clone Dm28c de *Trypanosoma cruzi*, seguido da região intergênica 35.1 e da região codificadora para 6 histidinas);
- GSPT7 (gene sintético do promotor do bacteriófago T7, seguido de 3 cópias do operador de tetraciclina, da intergênica 35.1 e da região codificadora para 6 histidinas);
- Oligonucleotídeos.

Gibco:

- PBS estéril;
- RNA 0,24-9,5 kb *Ladder*.

Invitrogen:

- 1 Kb Plus DNA *Ladder*;
- Alexa Fluor 488 anti-camundongo 2 mg/ml;
- BenchMark *Ladder*;
- Cassete RfA (Gateway®);
- Enzima TEV;
- LR Clonase II *enzyme mix*;
- *Nick Translation System*;
- Proteinase K;
- *Taq DNA Polimerase*.

Millipore:

- Colunas microcon 30 (Microcon® Amicon Bioseparations).

Molecular Probes:

- Anticorpo monoclonal anti-GFP mAB 3E6 1 mg/ml.

New England Biolabs:

- Endonucleases de restrição *Apal*, *BamHI*, *EcoRI*, *KpnI*, *SpeI*, *SphI* e *XhoI*;
- *NEBuffers*;
- BSA (albumina sérica bovina).

Promega:

- pGEM T – *easy Vector System*;
- BCIP (*Bromo-Chloro-Indolyl Phosphate*);
- NBT (*NitroBlue Tetrazolium*);
- Fosfatase Alcalina de Camarão;
- *Wizard PCR Preps DNA Purification System*.

Qiagen:

- *QIAprep Spin Miniprep Kit*;
- *HiSpeed Plasmid Midi Kit*.

RDI-Fitzgerald:

- Anticorpo monoclonal anti-*c-myc* 1 mg/ml, clone 9E10.

Roche:

- *High Pure PCR Product Purification Kit*.

Sigma-Aldrich:

- Agarose;

- Albumina Sérica Bovina Fração V;
- Ampicilina;
- Anticorpo anti-camundongo IgA conjugado à fosfatase alcalina;
- Cloranfenicol;
- G418;
- Higromicina B;
- Ponceau S;
- Tampão de amostra para RNA.

Stratagene:

- pBluescript II KS(-);
- *Pfu* Ultra DNA Polimerase.

The Mid Land:

- Oligonucleotídeos.

USB:

- pUC 18;
- T4 DNA ligase.

Virginia Commonwealth University:

- Oligonucleotídeos.

3.4 Soluções e Tampões

AP Buffer (tampão para fosfatase alcalina): tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM;

Brometo de Etídio: solução 2,5 µg/ml;

Coomassie: azul de Coomassie R-250 0,1%, metanol 4,5%, ácido acético 10%, H₂O 45%;

Denhardt's 50x: Ficoll tipo 400 10 g/l, polivinilpirrolidone 10 g/l, albumina de soro bovina (BSA) fração V 10 g/l;

Fenol/clorofórmio/álcool isoamílico: fenol saturado 25 partes, clorofórmio 24 partes, álcool isoamílico 1 parte, tris-HCl 100 mM pH 8,0 10 partes;

Gel de agarose desnaturante: agarose 0,75% em MOPS, formaldeído 2,2 M;

MOPS (ácido 3-morfolinopropanosulfônico): acetato de sódio 5 mM, EDTA 2 mM pH 7,5, MOPS 20 mM;

PBS (solução salina de fosfato) 10x: KCl 2,7 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4,3 mM, NaCl 137 mM;

Solução de descoloração para SDS-PAGE: metanol 30%, ácido acético 10%, H_2O 60%;

Solução de eletroporação: NaCl 140 mM, HEPES ácido 25 mM, Na_2HPO_4 0,74 mM;

Solução de pré-hibridização para northern blot: formamida desionizada 50%, SSC 5x, Denhardt's 5x, SDS 0,5%, DNA fita simples de esperma de salmão 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$;

Solução de hibridização para northern blot: formamida desionizada 50%, SSC 5x, Denhardt's 5x, SDS 0,5%;

Solução de hibridização para Southern-blot: SSC 6x, Denhardt's 5x, SDS 0,1%, DNA fita simples de esperma de salmão 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$;

SSC (solução salina de citrato) 20x: citrato de sódio 0,3 M pH 7,0, cloreto de sódio 3 M;

Tampão de amostra para eletroforese de DNA 6x: azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%, glicerol em H_2O 30%;

Tampão de amostra para SDS-PAGE 4x: tris-HCl 160 mM pH 6,8, SDS 4%, β -mercaptoetanol 10%, glicerol 24%, azul de bromofenol 0,02%;

Tampão de eluição C: tris-HCl 10 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, NP-40 0,1%, β -mercaptoetanol 10 mM, acetato de magnésio 1 mM, imidazol 1 mM, EGTA 20 mM;

Tampão de ligação C: tris-HCl 10 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, NP-40 0,1%, β -mercaptoetanol 10 mM, acetato de magnésio 1 mM, imidazol 1 mM, CaCl_2 4 mM;

Tampão de ligação IgG: tris-HCl 10 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, NP-40 0,1%;

Tampão de lise celular para TAP tag: tris-HCl 10 mM pH 8,0, MgCl_2 5 mM, NP-40 0,5%, DTT 0,5 mM, EDTA 1 mM, KCl 0,1 M, glicerol 17%, PMSF 1 mM, E64 10 μM ;

Tampão de lise celular para técnica da palitagem: glicerol 5%, SDS 0,5%, EDTA 5 mM, NaOH 50 mM, azul de bromofenol;

Tampão para SDS-PAGE: tris-base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%;

Tampão TEV: tris-HCl 10 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, NP-40 0,1%, DTT 1 mM, EDTA 0,5 mM;

Tampão TMK: tris-HCl 20 mM pH 8,0, MgCl_2 10 mM, KCl 50 mM;

Tampão TMK, RNase, inibidores de proteases e imidazol: tampão TMK, heparina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, E 64 10 μM , PMSF 1 mM, RNase A 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, imidazol 10 mM;

Tampão TMK para lise celular 10x: tampão TMK, sacarose 2 M, NP-40 10%.

TBE 1x: tris-base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM;

TE: tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8,0;

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

3.5 Composição SDS-PAGE

Gel 13 %: acrilamida (33/0,9%) 3,8 ml, H₂O 4,6 ml, tris-HCl 2,5 M pH 8,0 1,6 ml, SDS 100 µl, persulfato de amônio 70 µl, TEMED 7 µl;

Gel 15 %: acrilamida (33/0,9%) 4,4 ml, H₂O 4,0 ml, tris-HCl 2,5 M pH 8,0 1,6 ml, SDS 100 µl, persulfato de amônio 70 µl, TEMED 7 µl;

Gel de empilhamento (*stacking*): acrilamida (33/0,9%) 0,7 ml, H₂O 3,7 ml, tris-HCl 1 M pH 6,8 0,6 ml, SDS 50 µl, persulfato de amônio 35 µl, TEMED 7 µl.

3.6 Equipamentos e Acessórios

Amersham-Pharmacia Biotech:

- Cuba de eletroforese vertical – EPS 301;
- Espectrofotômetro GeneQuant *pro*.

Applied Biosystems:

- Gene Amp PCR System 9700;
- ABI Prism 3100 Analisador Genético.

Axygen:

- Ponteiras 1-10 µl, 2-200 µl, 200-1000 µl;
- Tubos de 0,2 e 1,5 ml.

Bio-Rad:

- Eletroporador Gene Pulser II.

Biocycler:

- Peltier Thermal Cycler MJ96G.

Casplast:

- Capela de exaustão de gases / CPE.

ELGA:

- Sistema de ultrapurificação de água modelo MLB 186487.

Eppendorf:

- Centrifugas modelos 5415 D, 5417 R e 5810 R;
- Thermomixer Comfort;
- Termociclador *Mastercycler*.

Fanem:

- Banho-Maria modelos 102R e 100;
- Estufa incubadora para B.O.D. modelo 347;

Gilson:

- Micropipetas pipetman P2, P10, P200 e P1000.

Hitachi:

- Himac CR 21G – High-Speed Refrigerated Centrifuge.

Hoefer Scientific Instruments:

- Sistema para eletroforese vertical *mighty small II SE 250*;
- Sistema para eletroforese horizontal *mini horizontal submarine unit*;
- Sistema para transferência de proteínas gel-membrana *mighty small transphor TE 22*;
- Estufa para hibridização (northern, Southern blot) Red Roller II *hybridization oven*.

Jouan-Precision:

- Incubadora 37 °C.

Mini-Instruments:

- Mini-monitor Geiger-Müller *tube*.

National Labnet:

- *Vortex mixer S 1000*.

New Brunswick Scientific:

- Agitador orbital;
- Incubador agitador Innova 4080.

Nikon:

- Microscópios Eclipse TS 100, Eclipse E 400 e Eclipse E 600.

Ohaus Corporation:

- Balança modelo NOB110.

Orion:

- pHmetro modelo 520A.

Roper Scientific Photometrics:

- Câmera CCD *CoolSNAP-Pro cf Color*

Scie-Plas:

- Sistema para eletroforese horizontal modelos HU 6, HU 10 e HU 13.

Sorvall:

- Centrifuga refrigerada modelo RC 5B *Plus*.

Spectromics Corporation:

- *Spectrolinker XL-1500 UV crosslinker*.

Techne:

- *Hybridiser HB-1D*.

TPP:

- Frascos de 25 cm² para cultura celular;
- Pipetas estéreis de 1, 2, 5, 10 e 25 ml.

UVP:

- *UV White Darkroom*.

Veco:

- Fluxo laminar VLFS 12 classe 2.

3.7 Softwares

DNASTAR:

- EditSeq, MapDraw, MegAlign, PrimerSelect, SeqMan.

Invitrogen:

- *Vector NTI 10.3.0*.

Laboratório do Dr. Phil Green:

- Phred, Phrap, Consed.

Media Cybernetics:

- Image-Pro Plus.

NCBI:

- Blast.

UVP:

- LabWorks *Analysis Software*.

3.8 Desenho dos Oligonucleotídeos (Iniciadores)

Os oligonucleotídeos foram desenhados através do programa PrimerSelect, buscando-se, quando possível, condições de baixa energia para formação de dímeros e grampos nas reações de PCR. Os oligonucleotídeos apresentaram *tm* (*temperature melting*) entre 60 e 75 °C (**Tabela 3.8.1 e Tabela 3.8.2**).

Dentre os oligonucleotídeos, aos quais foram incorporados sítios de restrição, a maior parte teve a extremidade 5' determinada em função de melhorar a eficiência da digestão dos produtos de PCR. Para tal, seguiram-se as especificações contidas no *site* da empresa *New England Biolabs*. Os oligonucleotídeos empregados nas ampliações durante a construção dos vetores estão especificados na **Tabela 3.8.1**.

Tabela 3.8.1: Oligonucleotídeos empregados nas ampliações das diversas ORFs e cassetes utilizados na construção dos vetores.

CDS/CASSETTE	DNA MOLDE	<i>tm</i> (°C)	OLIGONUCLEOTÍDEOS 5'→3'
T7RNAPol	pGEM-T easy	62,1	A1-CGgaattcATGAACACGATTAACATC
		70,7	R1-CGgaattcTTACGCGAACGCGAAGTCCG
RfA (1)	pCR-Blunt	65,5	A2-GGAATTCcatatgATCACAAGTTTGTACAAAAAAG
		68,8	R2-GGggtaccCATCACCACCTTTGTACAAGAAAG
RfA (2)	pCR-Blunt	63,1	A3-GCtctagaATCACAAGTTTGTACAAAAAAG
		64,3	R3-GGactagtATCACCACCTTTGTACAAGAAAG
RfA (3)	pCR-Blunt	63,1	A4-GCtctagaATCACAAGTTTGTACAAAAAAG
		67,6	R4-GGggtaccATCACCACCTTTGTACAAGAAAG
GFP	pEGFP-3	75,2	A5-GGgcatgcATGAGCAAGGGCGAGGAGCTG
		66,6	R5-GGtctagaCTTGTACAGCTCGTCCATG
CFP/YFP	pDH3/5	66,4	A6-GGgcatgcATGAGTAAAGGAGAAGAAC
		60,7	R6-GGtctagaTTTGTATAGTTCATCCATG
TAP-tag	pW9	71,2	A7-GGgcatgcATGAAAGCTGATGCGCAAC
		59,7	R7-GGtctagaTATAAATATGTAGATAGGGAC

(1) - Cassete clonado no vetor pNUS-PT7H. (2) - Cassete clonado no vetor pTcPR-HisN. (3) - Cassete clonado no vetor pTcPT7-HisN-HisN. A = anterógrado, R = retrógrado. *tm* = *temperature melting*. Em caixa baixa estão representados os sítios de restrição para *EcoRI* (gaattc), *NdeI* (catatg), *KpnI* (ggtacc), *XbaI* (tctaga), *SpeI* (actagt) e *SphI* (gcatgc).

Os oligonucleotídeos utilizados no seqüenciamento (**Tabela 3.8.2**) foram desenhados de acordo com as duas seguintes regras: (i) O local de anelamento dos oligonucleotídeos deveria estar, no mínimo, 100 pares de bases a montante do início do segmento de DNA analisado; (ii) Os sítios de anelamento dos oligonucleotídeos internos deveriam possuir entre eles um intervalo entre 400 e 500 pares de bases. Estas regras foram adotadas com base nos dados obtidos em outros seqüenciamentos realizados pelo mesmo equipamento, de modo a obter uma boa qualidade em toda região seqüenciada.

Tabela 3.8.2: Oligonucleotídeos utilizados no seqüenciamento dos vetores construídos.

REGIÃO SEQÜENCIADA	<i>tm</i> (°C)	OLIGONUCLEOTÍDEOS 5' → 3'
pBluescript/GSNEO	59,6	R*-CACAGGAAACAGCTATGACC
GSNEO	67,6	A8-CCGCTCGAGATGATTGAACAAGATGGATT
	69,5	R8-CCGCTCGAGTCAGAAGAAGCTCGTCAAGAA
	62,1	R9-CAGTTCATTTCAGGGCACCG
RfA/GSNEO	63,2	A9-CAGCCACCGCGAAAATGAC
RfA	63,1	A10-GCTCTAGAATCACAAGTTTGTACAAAAAAG
	65,5	A11-GGAATTCCATATGATCACAAGTTTGTACAAAAAAG
	62,4	A12-TATCCCAATGGCATCGTAAAGAAC
	61	A13-CAGGTTTCATCATGCCGTTTG
	64,3	R10-GGACTAGTATCACCCTTTGTACAAGAAAG
	67,6	R11-GGGGTACCATCACCCTTTGTACAAGAAAG
	68,8	R12-GGGGTACCCATCACCCTTTGTACAAGAAAG
RfA/GSPT7 ou GSPDm28c ou Etiquetas	62,1	R13-CTTCCTTAGCTCCTGAAAATCTCG
GSPDm28c/RfA ou RI 35.1/Etiquetas	62,6	A14-GTGTGGGTCGCAAATGTCA
GSPDm28c/pBluescript	66,1	R14-CACGCACAGCACGCAAATAAACAT
pBluescript/GSPDm28c	62,3	A*-GTTGTAAAACGACGGCCAGT
TcExp02A01/6 Histidinas	77,2	R15-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT... ...CATCTACACGGCGATCATTGCG
CFP ou YFP/RfA	66,4	A15-GGGCATGCATGAGTAAAGGAGAAGAAC
GFP/RfA	75,2	A16-GGGCATGCATGAGCAAGGGCGAGGAGCTG
TAP-tag/RfA	71,2	A17-GGGCATGCATGAAAGCTGATGCGCAAC
T7RNApol	64,1	A18-CTGCCGCCAAGCCTCTC
	62,5	A19-CAAATGCTGGCGTAGTAGGTC
	64,5	A20-CAAGGCTCGCAAGTCTCGC
	64,1	A21-CTCCGAGATGAGGTAGGTGGTC
	62,5	A22-GCTGCTGAGGTCAAAGATAAGAAG
	63,1	A23-CTTTTGCCTGATTCACGACTCC
T7/PGKB5'	63,7	R16-GGGAGTAGGGTAGTGATGAGAGG
PGKA3'/T7	61,9	R17-GATGAAGGAGTGCCCAAGAAG

As regiões separadas por barra correspondem às fusões destas. Etiquetas = GFP, CFP, YFP, TAP-tag, *c-myc*. * = iniciadores universais M13. A10 foi utilizado para os vetores pTcPT7-HisN e pTcPR-HisN. A11 e R12 foram utilizados para pNUS-PT7-RfAH. R10 foi utilizado para pTcPR-HisN. R11 foi utilizado para pTcPT7-HisN. *tm* = *temperature melting*. A = anterógrado, R = retrógrado.

Tabela 3.8.3: Oligonucleotídeos utilizados exclusivamente nas PCRs para caracterização molecular dos vetores.

VETOR OU CLONE	<i>tm</i> (°C)	OLIGONUCLEOTÍDEOS 5' → 3'
pNUS-T7N	69,5	R18-CCGCTCGAGTCAGAAGAACTCGTCAAGAA
pNUS-PT7-RfAH	71,6	R19-GGCTCGAGCTATTCCTTTGCCCTCGGAC
	68	A24-GGCTCGAGATGAAAAAGCCTGAACTCAC
pTcPR-HisN e derivados	65	R20-TCTAGAGTGATGGTGATGGTGATGC

tm = *temperature melting*. A = anterógrado, R = retrógrado.

3.9 Reações de PCR

Para as reações realizadas a partir de plasmídeos como molde, foram utilizados 2 a 10 ng de DNA e, partindo-se de DNA genômico, 50 ng. Para a amplificação dos insertos aplicados nas clonagens foi utilizada enzima de alta fidelidade (*Pfu* Ultra DNA Polimerase) e para as reações de PCR de colônia e confirmação das clonagens utilizou-se enzima de alta processividade (*Taq* DNA Polimerase).

A maioria das reações de PCR foi realizada com a seguinte programação: 94 °C por 4 min, (94 °C por 30 s / Y °C por 30 s / 72 °C por X min) durante 30 ciclos, 72 °C por 7 min, onde X variou de acordo com o tamanho da seqüência, sendo usada a relação de 1 min para cada 1.000 pares de base de DNA. A letra Y é relativa à temperatura de anelamento selecionada que foi de aproximadamente 5 °C abaixo da *tm* de cada par de iniciadores (**Tabela 3.8.1**). Os reagentes utilizados nas reações de PCR e suas respectivas concentrações finais foram: dNTPs (0,1 a 0,25 mM cada), cloreto de magnésio (1,5 mM, somente para as reações com *Taq* DNA Polimerase), iniciadores (0,2 a 0,4 µM), *Taq* ou *Pfu* DNA Polimerase (0,5 U/10 µl de reação) e tampão 1x para as enzimas.

As PCRs feitas para caracterização molecular dos vetores foram realizadas com *Taq* DNA Polimerase e seguiram as seguintes condições para anelamento e extensão: temperatura de anelamento de 55 °C e 3 diferentes tempos de extensão, sendo de 2 min para os produtos de até 2 kb, 4 min para os produtos entre 2 e 4,6 kb e 6 min para os produtos com tamanho a partir de 4,6 kb.

Após a avaliação da PCR por eletroforese em gel de agarose, fez-se a purificação dos produtos de PCR através de *kits* comerciais da Promega e Roche, que utilizam isotiocianato de guanidina e colunas de fibra de vidro para purificação do DNA amplificado.

As PCRs de colônia seguiram as mesmas condições descritas acima, no entanto, o DNA molde estava contido nas colônias bacterianas transformadas. Para cada reação utilizou-se uma colônia, a qual foi transferida da placa de cultura para o tubo de PCR ou placa de 96 poços e posteriormente para outra placa de cultura (placa-mestre), através de um palito de madeira. Este processo foi realizado antes da adição da mistura de reagentes ao tubo de PCR.

3.10 Reações de Digestão

As reações de digestão foram realizadas a partir de 2 a 5 µg de DNA e 10 a 20 U de endonuclease de restrição, num volume final de 30 a 60 µl. Conforme especificação do fabricante fez-se ou não a suplementação com BSA. O tempo de incubação foi de 3 horas, para digestão de vetores, e de 16 a 20 horas, para digestão de produtos de PCR. As incubações ocorreram a uma temperatura de 37 °C (exceto para *Apal*, a 25 °C).

Para digestões com duas enzimas, fez-se apenas uma reação nos casos em que houve compatibilidade dos tampões de reação, caso contrário, as digestões foram feitas separadamente. A inativação das digestões foi feita pelo calor (65 °C por 20 min), quando possível, ou através de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, para o qual seguiu-se o seguinte protocolo: aumentou-se o volume da reação com H₂O para 100 µl e fez-se a adição do mesmo volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico. Então a amostra foi submetida à agitação em *vortex* e centrifugada por 3 min a 13.000 rpm e, a seguir, fez-se a coleta da fase superior e precipitação do material com 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M e 2 a 3 vezes o volume de etanol 100%. Esta mistura foi incubada em gelo seco por 20 min, centrifugada por 20 min a 13.000 rpm, a seguir descartou-se o sobrenadante e lavou-se 3 vezes com 1 ml de etanol 70% centrifugando por 5 min a 13.000 rpm para cada lavagem. O sedimento obtido foi seco a temperatura ambiente ou a 50 °C por 10 min e ressuspenso em 10 a 20 µl de H₂O.

Nas digestões duplas feitas separadamente, nos casos em que a inativação da primeira enzima pudesse ser feita pelo calor, fez-se o uso de colunas microcon 30 para a lavagem e troca de tampões. Este procedimento foi realizado adicionando-se à coluna o volume da reação e H₂O, para 500 µl e, então centrifugando-se esta

durante aproximadamente 12 min a 14.000 g. Em seguida, fez-se a inversão da coluna em outro tubo, centrifugando-se por 3 min a 1.000 g, obtendo-se a amostra de DNA. As digestões de vetores foram confirmadas através de eletroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídio e visualizado com exposição à luz ultravioleta, fazendo-se comparação com a amostra não-digerida.

As digestões de pUC57, contendo os cassetes GSNEO, GSPT7 e GSPDm28c, foram submetidas a eletroforese em gel de agarose para purificação das bandas correspondentes a estes cassetes. Estas bandas foram preservadas do contato com brometo de etídio e luz UV, utilizando-se como guias para os cortes uma pequena quantidade das mesmas digestões, aplicadas nas canaletas adjacentes do gel. Os géis foram cortados, corando-se apenas as amostras guias, então fez-se a excisão das bandas de interesse com bisturi. O DNA foi separado da agarose através de purificação em ponteiras com filtro, centrifugando-se a 6.000 rpm por 5 min. Finalmente estas amostras foram concentradas por precipitação com etanol ou microcon, como descrito neste item.

3.11 Reações de Ligação

Após a digestão dos insertos e dos plasmídeos, procedeu-se a ligação dos mesmos catalisada pela enzima T4 DNA ligase. As reações foram realizadas com 30 a 50 ng de vetor, excesso molar de 3 a 10 vezes do inserto (exceto para *c-myc*, onde usou-se um excesso de 100 vezes), 1 U de ligase, tampão para ligase 10x e H₂O para 10 a 50 µl. A incubação foi realizada a 16 °C em banho seco durante 16 horas. O excesso molar diferencial para *c-myc* foi usado devido à baixa eficiência na hibridização das fitas dos seus oligonucleotídeos.

Para se determinar a quantidade de inserto a ser utilizada, fez-se a relação entre a massa e o número de moléculas do vetor e do inserto. Este cálculo foi realizado da mesma maneira para todas as clonagens, diferindo apenas no excesso de inserto usado.

A determinação da concentração das amostras foi realizada em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 260 nm. Para as ligações realizadas a partir de digestão com duas enzimas, foram realizados controles, como ligação sem o inserto e ligação sem o inserto e sem a DNA ligase. Para as ligações

entre vetor e inserto, digeridos com apenas uma enzima ou com *Xba*I/*Spe*I, pois estas geram extremidades coesivas idênticas, realizou-se tratamento prévio do vetor com fosfatase alcalina de camarão através do seguinte protocolo: 200 a 500 ng do vetor digerido, purificado com etanol ou microcon, 1 U de fosfatase alcalina de camarão, tampão 10x para a fosfatase e H₂O para um volume final de 30 a 50 µl. Esta reação foi incubada em banho-maria a 37 °C durante 1 hora e inativada a 65 °C por 15 min. Em seguida, procedeu-se a ligação como descrito.

3.12 Validação dos Resultados

Para validar os resultados com os vetores construídos durante este trabalho, os vetores de destinação pTcPR-HisN e seus derivados contendo GFP, CFP, YFP, TAP tag e *c-myc* e o vetor pNUS-PT7-RfAH foram recombinados, através da reação LR Gateway®, com 3 genes de *T. cruzi* originando 21 clones de destinação (**Tabela 3.12.1**). Estes genes foram estudados em outro projeto desenvolvido no IBMP (PRETI, 2007), sendo que já estavam inseridos na plataforma Gateway® através da clonagem em pDONR 221. O primeiro gene, Tc00.1047053510877.30 (A1), possui 693 pb e codifica uma proteína hipotética de 25 kDa. O segundo gene, Tc00.1047053507001.70 (C1), possui 909 pb e codifica uma proteína de 35,5 kDa, anotada como uma suposta syntaxina. Por último, o terceiro gene, Tc00.1047053506559.380 (C4), contém 546 pb e codifica uma proteína de 21 kDa, supostamente fazendo parte do grupo das centrinas.

Para cada reação foram utilizados 120 ng do clone de entrada e 120 ng do vetor de destinação, 2 µl da enzima LR Clonase II e o volume foi completado para 10 µl com TE pH 8,0. As reações foram incubadas por 2 horas em banho seco a 25 °C e inativadas com 1 µl de proteinase K por 10 min em banho-maria a 37 °C, totalizando 21 recombinações. As transformações com estas reações seguiram o protocolo conforme o item 3.13.

Tabela 3.12.1: Recombinações com genes de *T. cruzi* para validação dos vetores.

VETOR	GENE		
	A1	C1	C4
pTcPR-HisN	pTcPR-HisN(A1)	pTcPR-HisN(C1)	pTcPR-HisN(C4)
pTcPR-GFPN	pTcPR-GFPN(A1)	pTcPR-GFPN(C1)	pTcPR-GFPN(C4)
pTcPR-CFPN	pTcPR-CFPN(A1)	pTcPR-CFPN(C1)	pTcPR-CFPN(C4)
pTcPR-YFPN	pTcPR-YFPN(A1)	pTcPR-YFPN(C1)	pTcPR-YFPN(C4)
pTcPR-TAPN	pTcPR-TAPN(A1)	pTcPR-TAPN(C1)	pTcPR-TAPN(C4)
pTcPR-mycN	pTcPR-mycN(A1)	pTcPR-mycN(C1)	pTcPR-mycN(C4)
pNUS-PT7-RfAH	pNUS-PT7-RfAH(A1)	pNUS-PT7-RfAH(C1)	pNUS-PT7-RfAH(C4)

3.13 Transformação em *Escherichia coli*

Após as reações de ligação, ou simplesmente para propagação de algum plasmídeo, realizou-se a transformação em *E. coli*, utilizando-se tanto bactérias quimiocompetentes quanto eletrocompetentes. Para a transformação, um volume de 2 µl (clonagens clássicas) ou 5 a 10 µl (recombinações Gateway®) das ligações foi misturado com aproximadamente 50 µl de células. As clonagens clássicas e propagações de plasmídeos utilizaram cepas DH5α, XL1-Blue e *ccdB* resistentes (plasmídeos contendo RfA) quimio ou eletro-competentes. As recombinações Gateway® utilizaram exclusivamente a cepa DH5α.

Para as células quimiocompetentes, seguiu-se o seguinte protocolo de transformação: 30 min no gelo, 2 min em banho-maria a 42 °C, 5 min no gelo. Para as células eletrocompetentes, fez-se a eletroporação em cubetas de 0,2 cm, a 2,5 kV, 25 µF e 200 a 500 Ω. Em seguida, adicionou-se 1 ml de meio LB e incubou-se a 37 °C durante 1 hora com agitação de aproximadamente 220 rpm. Em seguida, fez-se o plaqueamento de 5 a 100 µl das culturas ou reduziu-se o volume por centrifugação durante 2 min a 6.000 rpm para o plaqueamento de toda a amostra. Foram utilizadas placas contendo meio LB e antibióticos específicos para as seleções, sendo eles ampicilina 100 µg/ml e/ou cloranfenicol 34 µg/ml ou kanamicina 50 µg/ml. Após crescimento de 16 a 20 horas em estufa a 37 °C, fez-se a seleção dos clones.

3.14 Seleção e Confirmação dos Clones e Preparação dos Plasmídeos

Para a seleção dos clones nos processos de clonagem clássica, cujos insertos possuíam mais de 300 pb, foi utilizada a técnica de palitagem, tendo-se como controle de tamanho o vetor sem o inserto (em bactéria). Esta técnica foi realizada transferindo-se colônias, resultantes das transformações em *E. coli*, para tubos de 1,5 ml ou placa de 96 poços com o auxílio de palitos de madeira (uma colônia por tubo ou poço). Uma porção destas colônias foi concomitantemente transferida para a placa mestre, a fim de se recuperar os clones encontrados. Em seguida, adicionou-se 20 µl de tampão de lise aos tubos ou poços contendo as colônias e incubou-se a 65 °C por 10 min. Estas amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,8%.

Para a seleção dos clones a partir das clonagens do adaptador PT7 e das recombinações Gateway® foi realizada PCR de colônia, cujos iniciadores estão especificados na **Tabela 3.14.1**. O número de colônias analisadas variou de acordo com a dificuldade na obtenção dos clones, no entanto, geralmente iniciou-se com 30 colônias para as clonagens clássicas e 5 colônias para as recombinações Gateway®.

Após a seleção dos clones, a partir da placa mestre, fez-se o inóculo das colônias em meio LB líquido (5 a 50 ml), contendo o antibiótico apropriado. Estas culturas cresceram a 37 °C com agitação de 220 rpm durante 16 a 18 horas. Após centrifugação a 6.800 g por 3 min (culturas de 5 ml) ou 10 min (culturas de 50 ml), obteve-se o sedimento, o qual foi submetido à lise alcalina segundo o protocolo do *kit* comercial *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen), que utiliza colunas de sílica para purificação do DNA plasmidial em pequena e média escalas.

Independente da maneira de seleção dos clones, todas as clonagens foram confirmadas por digestão das minipreparações dos clones com as mesmas enzimas utilizadas nos processos de clonagem (exceto para a clonagem do epítopo *c-myc* e para as recombinações Gateway®). A orientação do gene da T7 RNA Polimerase foi verificada após digestão com *XbaI* e *KpnI* ou *XbaI* e *NdeI*. Também foi realizado seqüenciamento a cada etapa de clonagem (exceto para a maioria das

recombinações Gateway®), o qual foi realizado pelo método de Sanger através do analisador ABI Prism 3100.

Tabela 3.14.1: Oligonucleotídeos utilizados nas PCRs de colônia para confirmação das recombinações Gateway® e clonagem do adaptador PT7.

Clonagem	<i>tm</i> (°C)	Oligonucleotídeos 5' → 3'
A1	77,3	A25- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCCTGCGTATCCGTCCC
	77,2	R21- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCATCTACACGGCGATCATTGCG
C1	77	A26- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCGTCACGGGATCGTAC
	77,4	R22- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCGTCACCGCCTTCAAAAAGAG
C4	77,5	A27- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCTCGACAACACGCGCTGCTG
	77,1	R23- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCGTAATCCTCATCCTCTAGCA... ...TGATGGC
Adaptador	59,6	A28-TCAGTGATAGCGGGATAGTC
PT7	61,8	R24-GAAGTGGACAGAGCGGAATG

A = anterógrado, R = retrógrado.

3.15 Construção dos Vetores para Transfecção em *Crithidia fasciculata*

Os plasmídeos base escolhidos na construção dos vetores para *C. fasciculata* foram pNUS-HcN e pNUS-HcH (TETAUD *et al.*, 2002). Estes vetores possuem as seguintes regiões intergênicas (RI) de *Crithidia fasciculata*: 3'UTR fosfoglicerato quinase A (PGKA), 5'UTR fosfoglicerato quinase B (PGKB) e 3'UTR glutationilespermidine sintetase (GspS). Tais vetores não possuem promotor, no entanto as RIs dirigem a transcrição, além de permitirem os processos de *trans-splicing* e poliadenilação dos genes clonados. Outras características destes vetores é a presença de um sítio de clonagem múltipla (MCS), uma etiqueta C-terminal para 6 histidinas e resistência aos antibióticos neomicina ou higromicina.

A estratégia do sistema desenvolvido neste trabalho consiste na utilização conjunta de dois vetores. Um deles expressando a RNA Polimerase do bacteriófago T7 (T7RNP), que promove a transcrição no vetor contendo promotor de T7RNP. Neste outro vetor foi clonado o promotor para a T7RNP (PT7), seguido de 3 cópias do operador de tetraciclina (*TetO*), arranjo que permite a regulação da expressão gênica induzível por tetraciclina. Para tornar este sistema compatível com a

plataforma de clonagem Gateway®, também foi clonado o cassete *reading frame A* (RfA) neste vetor.

No vetor pNUS-HcN foi clonada a região codificadora (CDS) da T7RNP (2.652 pares de base), a qual estava originalmente clonada no vetor pGEM-T *easy*. Esta foi amplificada (conforme o item 3.9) inserindo-se nas suas extremidades o sítio para endonuclease de restrição (ER) *EcoRI* (oligonucleotídeos iniciadores demonstrados na **Tabela 3.8.1**). A escolha desta enzima é explicada pela disponibilidade do sítio de restrição no vetor e possibilidade de retirar o MCS juntamente com a seqüência para 6 histidinas. Após digestão com *EcoRI* (conforme o item 3.10), foi realizada ligação através da T4 DNA ligase (conforme o item 3.11) originando-se o clone pNUS-T7N (**Figura 3.15.1**). O clone com a orientação correta foi identificado após digestão com endonucleases de restrição. Tais digestões deveriam produzir fragmentos de tamanhos diferentes conforme a orientação do clone.

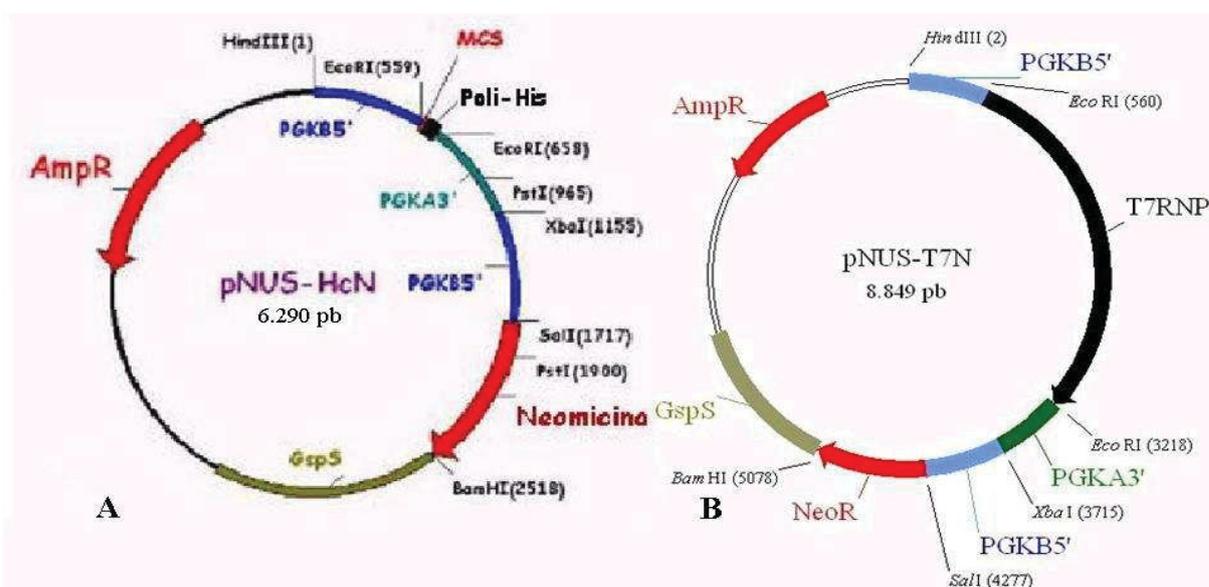


Figura 3.15.1: Desenho esquemático do clone pNUS-T7N. Em A, vetor pNUS-HcN original. Em B, clone pNUS-T7N, originado pela substituição do MCS e poli-histidina pela T7RNP em pNUS-HcN. PGK = fosfoglicerato quinase, GspS = glutacionilpermidine sintetase, T7RNP = RNA Polimerase do bacteriófago T7 (figura A adaptada de TETAUD *et al.*, 2002).

Com a finalidade de regular a expressão pela T7RNP, foram desenhados oligonucleotídeos que, ao serem hibridizados, formariam um adaptador (62 pares de bases) contendo as seqüências do PT7 e 3 repetições de *TetO*. As extremidades do adaptador foram desenhadas a fim de serem coesivas para *HindIII*, no entanto, ao ser clonado em pNUS-HcH, não formaria sítios para esta, pois foi realizada uma alteração nucleotídica na região de dupla fita do adaptador. Isto permitiu a seleção,

buscando-se os clones resistentes à digestão com *Hind*III. A hibridização do adaptador foi feita misturando-se as fitas senso e anti-senso em uma solução de NaCl 10 mM. A seguir, esta mistura foi colocada a 95 °C por 10 min em banho seco, seguida por um lento decréscimo da temperatura. A hibridização foi confirmada por eletroforese de DNA fazendo-se comparação com a mistura das fitas de DNA sem tratamento por temperatura.

O adaptador foi clonado no sítio *Hind*III do vetor pNUS-HcH, originando o vetor pNUS-PT7H. Em seguida, foi clonado neste mesmo vetor o cassete Gateway® RfA (1.711 pares de bases), o qual encontrava-se clonado no vetor pCR-Blunt (Invitrogen). Para isso, incorporou-se ao RfA os sítios de restrição para clonagem em *Nde*I e *Kpn*I, tomando-se o cuidado de verificar a fase de leitura. Estes sítios de clonagem, presentes no vetor, foram escolhidos pelo fato das respectivas enzimas não clivarem nenhum dos elementos. Esta clonagem deu origem ao vetor pNUS-PT7-RfAH (**Figura 3.15.2**). A etiqueta C-terminal de histidinas, presente originalmente no vetor, foi mantida para que ocorresse a fusão do gene clonado com a etiqueta de histidinas.

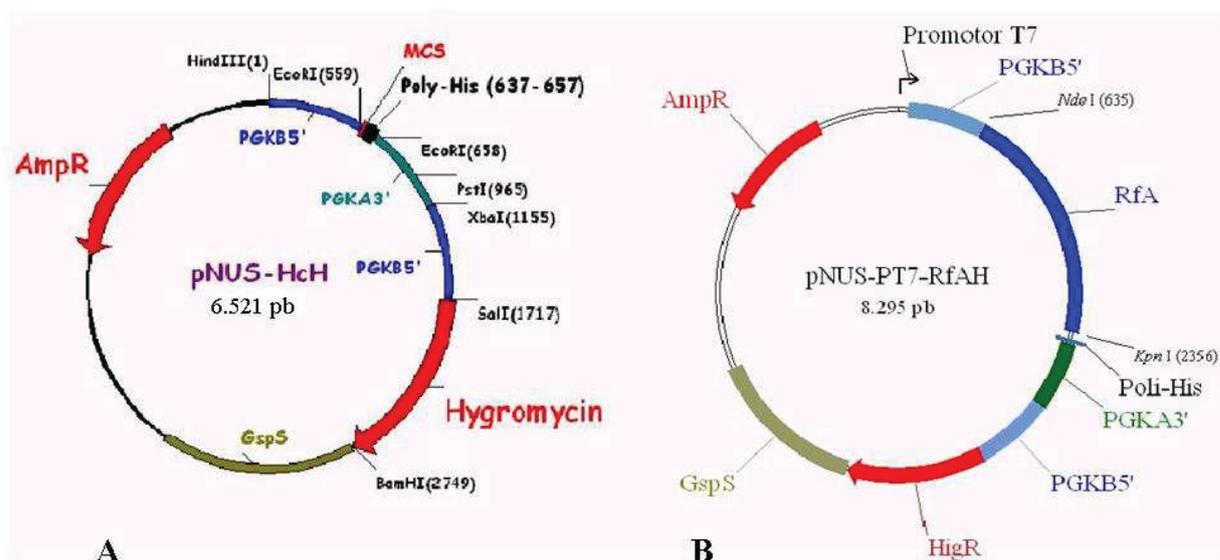


Figura 3.15.2: Desenho esquemático do vetor pNUS-PT7-RfAH. Em A, vetor pNUS-HcH original. Em B, vetor pNUS-PT7-RfAH, originado após a clonagem do PT7, TetO e RfA em pNUS-HcH. PGK = fosfoglicerato quinase, GspS = glutacionilpermidina sintetase (figura A adaptada de TETAUD *et al.*, 2002).

3.16 Construção dos Vetores para Transfecção em *Trypanosoma cruzi*

A construção dos vetores para *Trypanosoma cruzi* foi fundamentada na estratégia de obtenção de vetores com as seguintes aplicabilidades: possibilidade de super expressão gênica e purificação dos produtos, regulação induzível da expressão gênica, localização celular de proteínas e identificação de interações protéicas. Para isso, foram construídos dois sistemas, cuja principal diferença está no tipo de promotor utilizado. A escolha dos plasmídeos a serem utilizados como base foi feita com o auxílio do programa MapDraw (DNASTAR). Foram analisados os sítios de restrição presentes nos plasmídeos pBluescript II KS(-), pGem 4z e pUC18. Através desta análise, verificaram-se quais endonucleases de restrição poderiam ser utilizadas, pois não clivariam os cassetes que fariam parte dos vetores. Pelo fato de disporem de sítios de restrição adequados para as clonagens pretendidas, fez-se a opção pela utilização de pBluescript II KS(-) (pBS) e pUC18 (pUC).

A fim de se obter os elementos necessários para os vetores, como resistência a antibióticos, regiões intergênicas e promotores, foram desenhados 3 cassetes contendo genes sintéticos (**Figura 3.16.3**). O cassette do gene sintético de resistência à neomicina (GSNEO) possui 1.381 pares de bases e é constituído pelo gene sintético da neomicina fosfotransferase, flanqueado pelas regiões intergênicas 35.1 (SWINDLE *et al.* 1988), e acrescido de um terminador T7 na extremidade 3'. Estas intergênicas, devido ao tamanho relativamente pequeno (278 pb) são convenientes para a utilização em vetores. Os cassetes sintéticos contendo os promotores T7 (GSPT7) e ribossomal 18S de *T. cruzi* Dm28c (GSPDm28c) possuem 384 e 940 pb, respectivamente. Além do promotor, possuem também uma região intergênica 35.1 e uma etiqueta que codifica 6 histidinas. No cassette GSPT7, logo após o promotor, foram incluídas 3 cópias do operador de tetraciclina (*TetO*).

O desenho destes cassetes e dos iniciadores empregados nestas construções foi analisado, a fim de manter a fase de leitura correta, permitindo a funcionalidade dos vetores. Os cassetes foram encomendados para a empresa GenScript, que os sintetizou e clonou no plasmídeo pUC57.

Para a construção do vetor com expressão regulada, o plasmídeo pUC18 foi definido como base. Sendo assim, este plasmídeo carregaria o promotor e o terminador T7, pois não possui este promotor originalmente, como é o caso de pBluescript II KS(-).

O cassete GSNEO foi utilizado para as duas construções, por isso possui 4 sítios de restrição, 2 para utilização em pBluescript II KS(-) (*Apal* e *SpeI*) e 2 para pUC18 (*KpnI* e *SacI*). A digestão de GSNEO com *Apal*, ao contrário de *SacI*, exclui o terminador T7 do cassete. O emprego de sítios de restrição distintos, *KpnI* e *SpeI*, na extremidade 5' do cassete foi justificado pela presença ou não destes sítios nos plasmídeos base.

O desenho dos vetores foi realizado objetivando plasticidade na troca dos elementos, como a resistência a antibióticos, as regiões intergênicas, a etiqueta a ser fusionada e o promotor, todos estes podendo ser prontamente substituídos.

A primeira clonagem, realizada para os dois vetores, foi a do cassete sintético GSNEO. Neste processo de clonagem foram utilizadas as ERs *SpeI* e *Apal* ou *KpnI* e *SacI*, originando os vetores pBS-GSNEO e pUC-GSNEO, respectivamente. A segunda clonagem, também realizada para os dois vetores, foi a do cassete RfA, originalmente clonado em pCRBlunt (Invitrogen). O RfA foi amplificado por PCR, em 2 reações distintas, cada uma incorporando os sítios de restrição *XbaI* e *SpeI* ou *XbaI* e *KpnI* (iniciadores demonstrados na **Tabela 3.8.1**). Nesta etapa de clonagem, após digestão com *XbaI* e *SpeI* ou *XbaI* e *KpnI*, foram originados os vetores pBS-RfA-GSNEO e pUC-RfA-GSNEO, respectivamente.

A clonagem das seqüências contendo os promotores foi realizada a partir dos cassetes GSPDm28c e GSPT7. Nestas clonagens foram utilizadas as ERs *SacI* e *XbaI* ou *HindIII* e *XbaI*, originando, respectivamente, os vetores pBS-GSPDm28c-RfA-GSNEO, identificado como pTcPR-HisN (**Figura 3.16.1**), e pUC-GSPT7-RfA-GSNEO, identificado como pTcPT7-HisN (**Figura 3.16.2**).

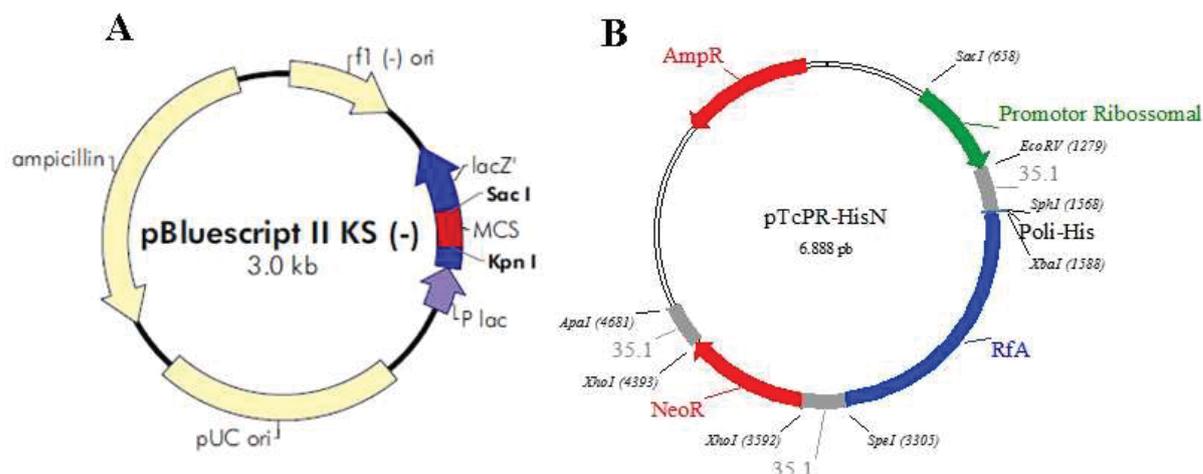


Figura 3.16.1: Desenho esquemático do vetor pTcPR-HisN. Em A, vetor pBluescript II KS(-). Em B, vetor pTcPR-HisN. 35.1 = regiões intergênicas. (Figura A, manual de instruções pBluescript II – Stratagene).

Somente no caso do vetor pTcPR-HisN, a etiqueta N-terminal de histidinas foi substituída pelas regiões codificadoras de GFP (*Green Fluorescent Protein*), CFP (*Cyan Fluorescent Protein*), YFP (*Yellow Fluorescent Protein*), TAP tag (*tandem affinity purification*) e *c-myc*, originalmente clonados, exceto o último, em pEGFP-3, pDH3, pDH5 e pW9, respectivamente. A região codificadora destas etiquetas, exceto *c-myc*, foram amplificadas por PCR, recebendo sítios para *Sph*I e *Xba*I (iniciadores especificados na **Tabela 3.8.1**). Após digestão com estas enzimas, foi realizada a clonagem destes segmentos de DNA no vetor pTcPR-HisN, fazendo-se assim a substituição da seqüência N-terminal de 6 histidinas. Estas clonagens deram origem aos vetores pTcPR-GFPN, pTcPR-CFPN, pTcPR-YFPN e pTcPR-TAPN.

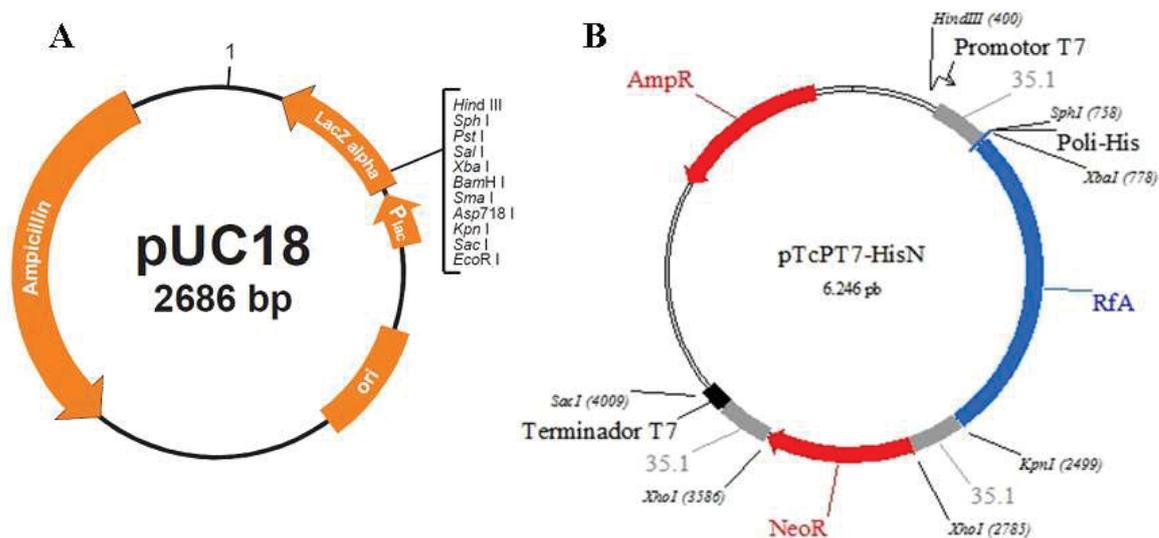


Figura 3.16.2: Desenho esquemático do vetor pTcPT7-HisN. Em A, vetor pUC18. Em B, vetor pTcPT7-HisN. 35.1 = regiões intergênicas. (Figura A, www.invitrogen.com).

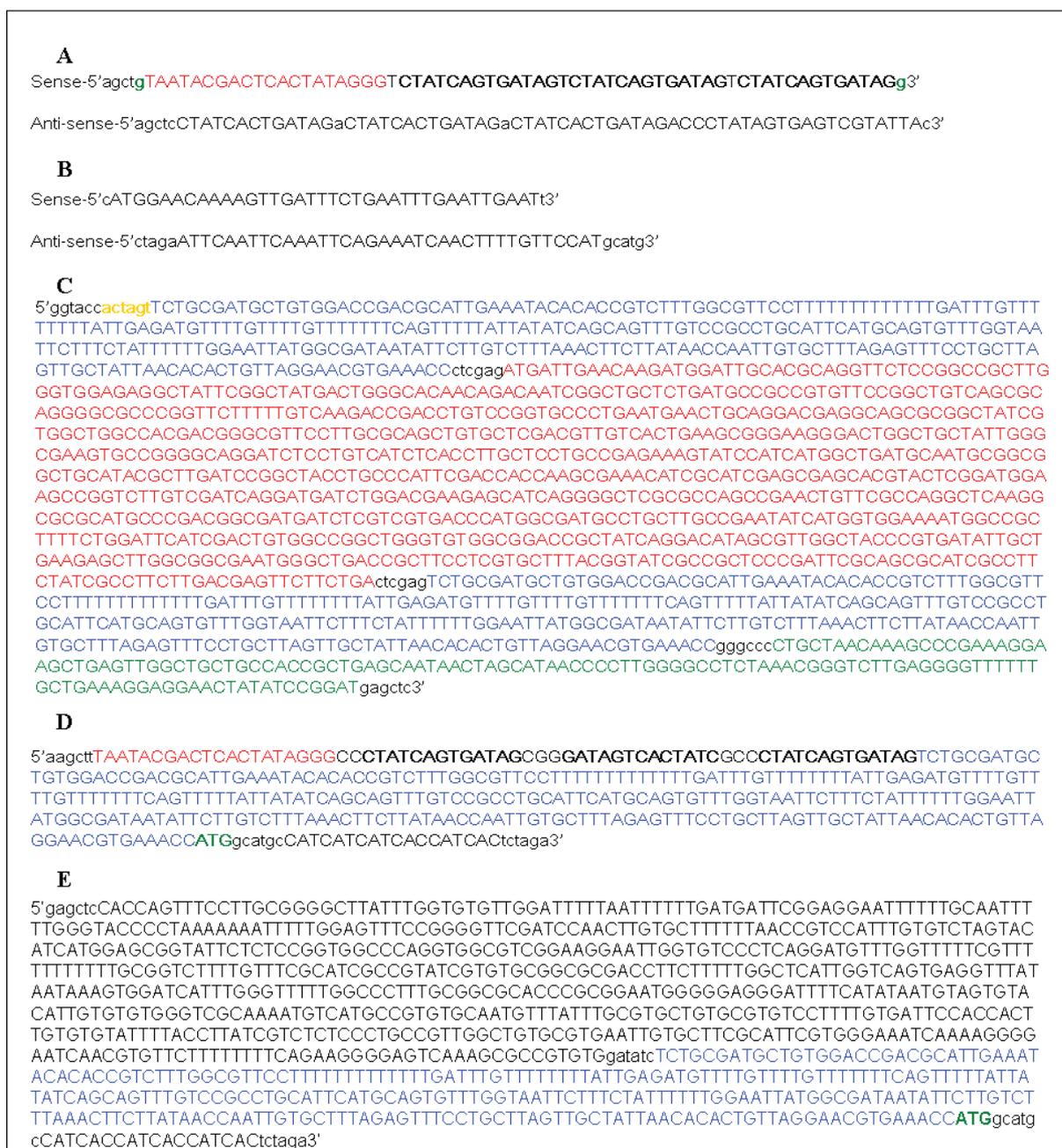


Figura 3.16.3: Sequência nucleotídica dos adaptadores e cassetes sintéticos utilizados. A - Adaptador contendo o promotor T7 (vermelho) e 3 repetições do operador de tetraciclina (negrito), as mutações nos sítios para *HindIII* (caixa baixa) estão indicadas em verde. B - Adaptador contendo a sequência para o epítipo *c-myc* e as extremidades coesivas para *SphI* e *XbaI* (caixa baixa), 5' e 3', respectivamente. C - Cassete GSNEO contendo as regiões intergênicas 35.1 (azul) flanqueando a resistência à neomicina (vermelho) e o terminador T7 (verde). De 5' para 3' estão representados os sítios para *KpnI*, *SpeI* (amarelo), *XhoI*, *XhoI*, *Apal* e *SacI* (todos em caixa baixa). D - Cassete GSPT7 contendo promotor T7 (vermelho), 3 repetições do operador de tetraciclina (negrito), a região intergênica 35.1 (azul), a sequência para 6 histidinas e os sítios para *HindIII*, *SphI* e *XbaI* (caixa baixa), representados de 5' para 3'. E - Cassete GSPDm28c contendo o promotor ribossomal 18S da cepa Dm28c de *T. cruzi*, a região intergênica 35.1 (azul) e a sequência para 6 histidinas. De 5' para 3' estão representados os sítios para *SacI*, *EcoRV*, *SphI* e *XbaI* (caixa baixa). Em D e E, o primeiro ATG após o sítio para trans-splicing está representado em verde.

O epítipo *c-myc* foi sintetizado como oligonucleotídeos simples fita, as quais foram transformadas em dupla fita por hibridização, apresentando extremidades

coesivas compatíveis com *SphI* e *XbaI* (**Figura 3.16.3**). A hibridização foi realizada a partir de 1,28 µg da fita sense mais 1,5 µg da fita anti-sense, através do protocolo descrito no item 3.15. Diferentemente das outras etiquetas, a clonagem do epítipo *c-myc* foi realizada a partir do vetor pTcPR-YFPN, substituindo-se a etiqueta YFP e gerando o vetor pTcPR-mycN.

3.17 Determinação das Dosagens de Higromicina e G418 Utilizados na Seleção dos Transfectantes

Foram realizadas curvas de crescimento dos parasitas utilizando-se diferentes concentrações de antibiótico. Neste experimento foram utilizadas culturas em fase exponencial de crescimento, iniciando-se com 1×10^6 células por ml, em um volume de cultura entre 10 e 15 ml. As concentrações de G418 utilizadas para *Crithidia fasciculata* foram 10, 50, 250 e 1.250 µg/ml e para *Trypanosoma cruzi* foram 250, 500 e 1.000 µg/ml. No caso da avaliação com higromicina foram utilizadas as seguintes concentrações: 50, 150 e 300 µg/ml, para *Crithidia fasciculata* e 250, 500 e 750 µg/ml, para *Trypanosoma cruzi*. Para as 4 avaliações realizadas foram feitos controles, através de culturas sem a adição de antibiótico. As contagens foram realizadas a cada 24 horas, num período que variou entre 47 e 144 horas.

3.18 Transfecção dos Parasitas

Foram utilizadas culturas de *C. fasciculata* e *T. cruzi*, cultivadas em meio LIT B acrescido de penicilina, em fase logarítmica de crescimento. Destas culturas foram utilizadas 4×10^7 células para cada transfecção, as quais foram centrifugadas por 5 min a 6.000 rpm. O sedimento formado foi lavado com PBS estéril, novamente centrifugado por 5 min a 6.000 rpm e ressuspensão com solução de eletroporação (0,4 ml para cada 4×10^7 células). Foram transferidos 0,4 ml desta suspensão de células para cubeta de eletroporação de 0,2 cm pré-resfriada e em seguida foram adicionados de 40 a 150 µg de DNA.

Para cada tipo de antibiótico utilizado, por exemplo, G418 ou higromicina, fez-se um controle, ao qual não foi adicionado DNA. Após 10 minutos no gelo, estas cubetas foram submetidas à eletroporação com 2 pulsos de 450 V e 500 µF,

incubadas novamente por 5 a 10 minutos no gelo. Em seguida, as células foram transferidas para garrafas de cultura de 25 cm² contendo 10 ml de meio LIT B acrescido de penicilina e incubadas a 28 °C.

Baseado nos dados dos experimentos descritos no item 3.17, após 24 horas de incubação adicionou-se antibiótico às culturas nas seguintes concentrações iniciais: G418 – 100 µg/ml para *C. fasciculata* e 250 µg/ml para *T. cruzi*, higromicina – 100 µg/ml para *C. fasciculata* e 250 µg/ml para *T. cruzi*. Após 72 horas de incubação, a concentração de G418 foi aumentada para 500 µg/ml, para *T. cruzi* e 285 µg/ml, para *C. fasciculata*; da mesma forma higromicina foi aumentada para 500 µg/ml, para *T. cruzi* e 150 µg/ml, para *C. fasciculata*. Num intervalo entre 10 e 20 dias foram selecionadas células resistentes. Foi realizado acompanhamento das culturas contando-se o número de células através de câmara de Neubauer, num intervalo aproximado de 5 dias, fazendo-se diluições destas culturas a fim de se manter a concentração celular em torno de 1×10^6 células/ml.

3.19 Detecção do Vetor pNUS-T7N em *Crithidia fasciculata*

Após seleção dos transfectantes de *C. fasciculata*, contendo o vetor pNUS-T7N, realizou-se procedimento para recuperação deste vetor. A partir de 10 ml de cultura em fase exponencial de crescimento, realizou-se lise alcalina através de *kit* comercial da Qiagen, segundo protocolo do fabricante. A solução de DNA obtida foi concentrada através de precipitação com etanol, seguindo protocolo descrito no item 3.10. Foram transformados 2 µl deste DNA em *E. coli* XL1-Blue eletrocompetente para recuperação do vetor. Através das colônias obtidas, fez-se a seleção do clone por palitagem. Para confirmação, o clone isolado foi digerido com *EcoRI* e submetido à PCR para amplificação da T7RNApol, conforme os itens 3.10 e 3.9, respectivamente.

3.20 Procedimento para Obtenção de População Clonal em *Crithidia fasciculata* Transfectante

Foi cultivado *C. fasciculata* em meio sólido para isolamento de uma população clonal. O meio teve a seguinte composição: agarose de baixo ponto de fusão 0,65%

(peso/vol.) em LIT B, HEPES 0,5% (peso/vol.), glutamato de sódio 2 mM, piruvato de sódio 2 mM e G418 250 µg/ml. Foram plaqueadas 5×10^6 células num volume de 500 µl. Das colônias obtidas, 5 foram analisadas por PCR de colônia com iniciadores para T7RNAPol (iniciadores especificados na **Tabela 3.8.1**) e ao mesmo tempo foram inoculadas e cultivadas a 28 °C em 2 ml de LIT B. Após análise, prosseguiu-se o cultivo da cultura selecionada mantendo-se a concentração de G418. Com esta cultura foram realizados ensaios de Southern e northern blot.

3.21 Visualização das Proteínas Fluorescentes e Imunofluorescência

As células de *T. cruzi* transfectadas com os vetores pTcPR-GFPN(A1), pTcPR-GFPN(C1), pTcPR-GFPN(C4), pTcPR-CFPN(A1), pTcPR-CFPN(C1), pTcPR-CFPN(C4), pTcPR-YFPN(A1), pTcPR-YFPN(C1) e pTcPR-YFPN(C4) foram visualizadas ao microscópio de fluorescência após o seguinte procedimento: fez-se o preparo das lamínulas adicionando-se 10 a 20 µl de poli-L-lisina e deixando-se a 37 °C por 20 min, em seguida lavou-se as lamínulas com H₂O e deixou-se secar a 37 °C. Um volume de cultura contendo 5×10^6 células em fase logarítmica de crescimento foi centrifugado por 1 min a 6.000 rpm e lavado 2 vezes com PBS 1x nas mesmas condições de centrifugação. O sedimento de células lavadas foi ressuspenso em 50 µl de PBS 1x e 10 µl destes foram adicionados às lamínulas e incubados por 2 a 3 min e, em seguida, fez-se a lavagem deixando-se escorrer PBS 1x pelas lamínulas. Estas lamínulas foram colocadas sobre lâminas de vidro, de maneira que as células ficassem entre elas, seladas com esmalte e visualizadas ao microscópio de fluorescência Nikon Eclipse E 600.

Para a realização da imunofluorescência, utilizou-se lâmina contendo 10 poços, a qual recebeu o mesmo tratamento descrito acima para lamínula. As células foram processadas como descrito acima e da suspensão de células lavadas foram adicionados 20 µl por poço (2×10^6 células) e, a seguir, a lâmina foi deixada a temperatura ambiente por 30 min em câmara úmida. Nos últimos 10 min da incubação foram adicionados 20 µl de paraformaldeído 4%, logo após, a lâmina foi lavada com PBS 1x e a cada poço acrescentou-se 50 µl de cloreto de amônio 50 mM por 10 min e, em seguida, lavou-se com PBS 1x. A permeabilização das células

foi feita com Triton X-100 0,1% por 2 min, então, lavou-se a lâmina com PBS 1x e fez-se o bloqueio durante a noite a 4 °C com 50 µl de PBS 1x contendo soro de cabra 25%, em câmara úmida. Após o tratamento da lâmina com cada reagente, fez-se a verificação das células ao microscópio de contraste de fase.

No dia seguinte, fez-se a incubação por 1 hora a 37 °C com 20 µl do anticorpo primário anti-*c-myc* (40 µg/ml, diluído em PBS 1x contendo soro de cabra 25%), lavou-se 3 vezes por 5 min com PBS 1x, a seguir, a partir deste ponto protegendo-se da luz, incubou-se por 1 hora a 37 °C com 20 µl do anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (5 µg/ml diluído em PBS 1x contendo soro de cabra 25 %). Logo após, retirou-se o excesso e incubou-se por 10 min com 20 µl de DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole), na concentração de 1 µg/ml diluído com PBS 1x contendo soro de cabra 25%. As lavagens finais foram realizadas com PBS 1x por 5 min, repetindo-se 6 vezes. A lâmina foi seca, então, adicionou-se 1 gota de N-propil-galato a cada poço e cobriu-se com lamínula. Utilizou-se esmalte para selar e em seguida a lâmina foi visualizada ao microscópio de fluorescência Nikon Eclipse E 600.

Os tempos de exposição para captura das imagens utilizando fluorescência variou entre 1,2 s e 4,2 s, enquanto que para campo claro a exposição foi de 0,2 s.

3.22 Preparação dos Extratos Protéicos em Tampão Desnaturante

Neste procedimento foram utilizadas culturas de *C. fasciculata* e *T. cruzi* em fase logarítmica de crescimento. Os extratos foram preparados a partir de 5 ml das culturas, cuja concentração celular foi previamente avaliada, centrifugados 3 min a 6.000 rpm e lavados 2 vezes com PBS 1x nas mesmas condições de centrifugação. Ao sedimento celular obtido foi adicionado tampão de amostra para SDS-PAGE até o volume de 100 µl (culturas com menor densidade celular) ou 250 µl (culturas com maior densidade celular).

As amostras foram, então, submetidas à agitação em *vortex*, incubadas a 99 °C em banho seco por 5 min, incubadas em gelo por 2 min, submetidas novamente à agitação, centrifugadas 2 min a 13.200 rpm e o sobrenadante transferido para outro tubo. Os extratos foram armazenados a -20 °C até a utilização. Desta forma foram obtidos extratos com diferentes concentrações (número de células por µl). Tal

característica foi levada em consideração para o cálculo do volume a ser aplicado no gel de poliacrilamida, normalizando assim os extratos, através do número de células.

3.23 Ensaio de Western Blot

Os ensaios de western blot foram realizados a partir de SDS-PAGE com concentrações de acrilamida que variaram de 13 a 15 %. Os géis foram carregados com extratos protéicos equivalentes a 1×10^7 células. A transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada em sistema Hoefer durante 2 horas a 50 V, envolvendo-se a cuba em gelo ou durante a noite a 20 V a 4 °C. Em seguida fez-se o bloqueio da membrana com PBS 1x, tween 20 0,1%, leite em pó 5% por 1 hora e, então, lavou-se a membrana por imersão e agitação com PBS 1x e tween 20 0,1% por 5 minutos. A seguir, incubou-se com anticorpo primário diluído com PBS 1x e tween 20 0,1% nas seguintes titulações: monoclonal anti-histidina 1,4 a 2,8 µg/ml, anti-A1 1:400, anti-C1 1:250, anti-C4 1:300, monoclonal anti-*c-myc* 10 µg/ml ou monoclonal anti-GFP 10 µg/ml. Esta incubação foi de 1 hora a 37 °C com agitação de 100 rpm e, então, lavou-se com PBS 1x e tween 20 0,1 % por 5 minutos 3 vezes. Logo após, fez-se a incubação por 1 hora agitando-se a 100 rpm com anticorpo secundário anti-camundongo conjugado à fosfatase alcalina e diluído 1:10.000 com PBS 1x e tween 20 0,1%. A lavagem final da membrana foi com PBS 1x e tween 20 0,1% por 5 min repetido 3 vezes. A revelação foi realizada em solução contendo 33 µl de BCIP (*Bromo-Chloro-Indolyl Phosphate*), 66 µl de NBT (*NitroBlue Tetrazolium*) e 10 ml de tampão para fosfatase alcalina.

3.24 Ensaio de Southern Blot

As extrações de DNA foram realizadas a partir de *C. fasciculata*, transfectado com pNUS-T7N; *T. cruzi*, transfectado com pTcPR-HisN(A1) e de culturas não transfectadas destes parasitas.

Foram utilizados 5×10^8 parasitas, no caso de *C. fasciculata* e 1×10^9 parasitas, no caso de *T. cruzi*. As extrações foram feitas segundo MEDINA-ACOSTA & CROSS (1993), com as seguintes alterações: fez-se a centrifugação das culturas por 10 min a 5.000 g a 4 °C e ao sedimento de células adicionaram-se 1,5 ml de

solução TELT. A seguir, cada extração foi dividida em 3 tubos de 1,5 ml e procedeu-se a purificação com 500 µl (mesmo volume a ser purificado) de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico. A mistura foi homogeneizada e centrifugada por 5 min a 13.000 g, então, coletou-se a fase superior, a qual foi submetida ao processo de purificação mais 2 vezes, alterando-se o volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico adicionado, de acordo com o volume da fase coletada. A precipitação do material foi realizada com 2 volumes de etanol 100%, incubação durante a noite a 4 °C, centrifugação por 10 min a 16.100 g, seguida de 4 lavagens por 5 min na mesma rotação com 1 ml de etanol 70%. Logo após, o sedimento foi seco à temperatura ambiente ou a 50 °C por 10 min e ressuspensão em 100 a 200 µl de tampão TE pH 8,0. Após a solubilização do material, adicionou-se 10 µg de RNase A e incubou-se em banho-maria a 37 °C por 1 hora.

A partir de 5 µg do DNA extraído dos parasitas transfectados e não transfectados, foi realizada digestão durante a noite com 45 U da endonuclease de restrição *Sall* (para DNA de *C. fasciculata*) e 15 U de *PstI* (para DNA de *T. cruzi*), num volume final de 50 µl. Para *C. fasciculata*, foram utilizadas como controle amostras de DNA extraídas do parasita não-transfectado (5 µg), misturadas ao vetor pNUS-T7N (100 ng), digeridas e não digeridas com *Sall*, além de amostras formadas apenas pelo vetor pNUS-T7N não digerido (10 ng) e digerido (100 ng). O controle utilizado no ensaio com *T. cruzi* foi o vetor pTcPR-HisN(A1) digerido e não digerido (aproximadamente 500 ng).

As amostras de DNA extraídas de *C. fasciculata* e *T. cruzi*, digeridas e não digeridas, mais os controles citados acima, foram misturadas com tampão de amostra para DNA, na proporção de 5:1, e submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8%. A corrida foi de aproximadamente 3 horas a 100 V. Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídio e exposto à luz UV para visualização e captura das imagens. No momento da captura das imagens, utilizou-se uma régua excitável por luz UV, colocada ao lado do gel para correlacionar o marcador de peso molecular do gel com as bandas obtidas nos filmes, ao final do processo.

Após a eletroforese, o gel de DNA foi tratado com HCl 0,25 M por 15 min, NaOH 0,5 M / NaCl 1,5 M por 30 min com 2 repetições e tris-HCl 0,5 M pH 7,5/NaCl 1,5 M por 30 min. A transferência do DNA para as membranas de náilon (Hybond-Amershan) foi realizada durante a noite por capilaridade com tampão SSC 20X (cloreto de sódio/citrato de sódio). Após a transferência, o DNA foi fixado nas

membranas com luz ultravioleta (302 nm) e, em seguida, foi realizada pré-hibridização por 1 hora a 65 °C com solução de hibridização.

As sondas para a hibridização foram preparadas por PCR e marcadas radioativamente pela técnica de *nick translation* (*nick translation system*-Invitrogen). Estas reações continham 100 ng de DNA, 2,5 U DNA Polimerase I, 2 mU DNase I, dNTPs exceto dCTP 0,1 mM cada, 20 a 80 µCi de αdCTP ³²P e H₂O para completar 50 µl. Em seguida, incubou-se a 16 °C por 1 hora em banho seco e fez-se a purificação centrifugando-se por 2 min a 2.000 g em colunas G-50 (Invitrogen). A seguir, as amostras foram incubadas a 99 °C por 5 min e deixadas no gelo por mais 5 min, estando assim prontas para hibridização. Foram utilizados como sondas os genes de resistência à neomicina e de T7 RNA Polimerase (*C. fasciculata*) e os genes de resistência à neomicina e A1 (*T. cruzi*). A hibridização com as sondas foi realizada durante a noite nas mesmas condições da pré-hibridização.

Após a hibridização, as membranas foram lavadas 6 vezes por 15 min na mesma temperatura de hibridização com SSC e SDS 0,1%, decrescendo-se a concentração de SSC a cada 2 lavagens (2x, 1x, 0,1x). A exposição foi feita em filme Kodak durante 1 hora a temperatura ambiente, para as amostras de *C. fasciculata*, e durante até 5 dias em gelo seco, para as amostras de *T. cruzi*. A revelação foi obtida na ausência de luz, incubando-se os filmes por 2 min em solução de revelação, por 2 min em H₂O e por 2 min em solução de fixação.

3.25 Ensaios de Northern Blot

As extrações de RNA foram realizadas a partir de *C. fasciculata*, transfectado com pNUS-T7N, e de uma cultura não transfectada deste parasita. Foram utilizados 1×10^7 parasitas e as extrações foram realizadas através do *kit* comercial RNeasy (Qiagen), que utiliza colunas de sílica para purificação, segundo protocolo do fabricante.

A eletroforese do RNA (5 a 10 µg) foi realizada em gel de agarose desnaturante 0,75%. Todo o material utilizado na eletroforese foi previamente tratado com etanol 70% e H₂O 18,2 MΩ.cm. Antes de serem aplicadas no gel, as amostras foram misturadas com tampão de amostra de RNA na proporção de 1:2, incubadas a 65 °C por 5 min e resfriadas em gelo. O gel foi corado e visualizado da

mesma maneira descrita no item 3.24. Após ser fotografado, o gel foi submetido à transferência do RNA para uma membrana de náilon durante a noite com solução de SSC 10x. O RNA foi fixado da mesma maneira que o DNA (item 3.24).

As sondas utilizadas foram as mesmas descritas para *C. fasciculata* nos ensaios de Southern blot. A pré-hibridização foi a 42 °C por 1 hora e a hibridização ocorreu durante a noite, na mesma temperatura. As lavagens foram idênticas às realizadas nos ensaios de Southern blot. A exposição ocorreu durante 24 horas em gelo seco e a revelação procedeu da mesma forma que no item 3.24.

3.26 Obtenção de Extrato Citoplasmático e Purificação Protéica em Resina de Cobalto

Para obtenção de extrato citoplasmático, foram utilizadas células de *T. cruzi* transfectadas com pTcPR-HisN(A1) em fase logarítmica de crescimento. 6×10^9 células foram centrifugadas a 6.500 g a 4 °C por 5 min e lavadas 3 vezes com PBS 1x nas mesmas condições de centrifugação. O sedimento celular obtido foi ressuspenso em 3 ml de tampão TMK, RNase, inibidores de proteases e imidazol. A lise celular foi realizada adicionando-se lentamente a esta suspensão 330 µl de tampão TMK para lise celular 10x, mantendo-se os tubos de reação em gelo. Esta mistura foi brevemente agitada e submetida à centrifugação durante 10 min a 4 °C na velocidade de 16.000 rpm. Então, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e a centrifugação foi repetida.

Para purificação do extrato citoplasmático, utilizaram-se 100 a 400 µl de resina de cobalto (TALON-Clontech), equilibrada com tampão TMK, RNase, inibidores de proteases e imidazol (concentrações descritas no item 3.4). O extrato foi incubado com a resina em tubo de 1,5 ml ou coluna de purificação durante 2 horas a 4 °C com leve agitação e, logo após, fez-se a coleta do sobrenadante (fração não ligante). A seguir, lavou-se a resina 2 a 4 vezes com 50 a 500 µl da solução utilizada para equilibrá-la, contendo 20 mM de imidazol. Então, fez-se 2 a 4 eluições com 50 µl desta mesma solução contendo 300 mM de imidazol. As coletas das frações não ligantes, lavagens e eluídos foram realizadas ou por centrifugação a 700 g por 30 segundos ou pela coluna de purificação, dependendo da quantidade de resina utilizada. As frações obtidas foram submetidas a SDS-PAGE e western blot.

3.27 Obtenção de Extrato Protéico e Purificação de Complexos por TAP tag

Na obtenção de extrato protéico foram utilizados 50 ml de cultura de parasitas (aproximadamente 2×10^9 células). As células foram coletadas por centrifugação e lavadas 2 vezes com PBS 1x. O precipitado de células foi ressuspensão em 10 ml de tampão de lise, brevemente agitado em *vortex* e submetido a 2 ciclos de congelamento e descongelamento rápidos (incubação em gelo seco com etanol por 30 segundos, seguido de incubação em banho-maria a 37 °C por 10 segundos). Após a lise, o extrato foi clareado por centrifugação a 10.000 g durante 20 min e o sobrenadante, contendo complexos protéicos, foi recuperado.

A primeira etapa de purificação envolve a ligação da etiqueta de proteína A a uma coluna de esferas de IgG (IgG *Sepharose*, Amersham), através da incubação de 10 ml do extrato total de proteínas do parasita com 150 μ L de esferas, previamente lavadas com 10 ml de tampão de ligação IgG. A ligação ocorreu por 3 horas a 4 °C e com leve agitação. Posteriormente, a coluna foi lavada com 30 ml de tampão de ligação IgG para remoção de contaminantes e 10 ml de tampão TEV para equilíbrio pré-digestão. A digestão do sítio TEV foi feita incubando-se as esferas de *Sepharose* IgG com 1 ml de tampão TEV e 100 unidades da enzima TEV (Invitrogen). O tubo foi mantido sob leve agitação por 16 horas a 4 °C. Todo o eluído resultante da digestão foi transferido para a coluna de calmodulina.

A segunda etapa de purificação envolve a ligação da etiqueta de proteína de ligação à calmodulina a uma coluna de calmodulina, por incubação de 1 ml do produto da digestão por TEV com 150 μ L de esferas de calmodulina (*Calmoduline Sepharose*) e 3 μ L de CaCl_2 1 M. As esferas da coluna foram previamente lavadas com tampão de ligação C, sem β -mercaptoetanol. A ligação foi conduzida por 2 horas a 4 °C e com leve agitação. Os contaminantes foram lavados da coluna com 30 ml de tampão de ligação C. Então, o complexo foi eluído da coluna de calmodulina com 800 μ L de tampão de eluição C.

As proteínas do eluído foram precipitadas com 10 % de TCA por 1 hora no gelo e centrifugação a 10.000 g por 15 min. O precipitado foi lavado 2 vezes com acetona 100% e uma vez com acetona 80% e ressuspensão em 20 μ L de tampão de amostra para SDS-PAGE. Todas as proteínas recuperadas foram separadas por

SDS-PAGE e visualizadas por coloração com prata baseada no método de BLUM *et al.*, 1987.

4 RESULTADOS

4.1 Construção e Caracterização dos Vetores pNUS-T7N e pNUS-PT7-RfAH

4.1.1 Processos de Clonagem

No processo de construção do vetor pNUS-T7N, a seleção dos clones foi realizada comparando-se o tamanho do vetor sem inserto com os possíveis clones, que deveriam possuir um tamanho maior, por possuírem o inserto. Através de palitagem e eletroforese de DNA, foi possível identificar 4 clones. Dentre estes clones, foi necessário identificar qual possuía a orientação correta da T7RNP, isto foi verificado por digestão das mini-preparações dos clones. Fazendo-se a digestão com *Xba*I e *Kpn*I ou *Xba*I e *Nde*I, no caso da orientação estar correta, seriam liberados fragmentos de aproximadamente 700 pb. Apenas o clone 69 apresentou a orientação correta (**Figura 4.1.1.1**). Uma alíquota da cultura contendo este clone foi estocada em glicerol a -70 °C.

A construção do vetor pNUS-PT7-RfAH foi iniciada com a clonagem em pNUS-HcH do adaptador PT7, seguida pela clonagem do cassete RfA. Os clones foram selecionados por PCR de colônia, no caso da primeira clonagem, ou por palitagem, no caso da segunda clonagem. A seleção dos clones contendo RfA foi facilitada através da utilização de 2 antibióticos, um para o vetor (ampicilina 100 µg/ml) e outro para o inserto (cloranfenicol 34 µg/ml). Durante a seleção dos clones contendo RfA, foram visualizados 6 possíveis clones, comparando-se com o tamanho do controle (vetor sem inserto). Dentre estes, os clones 5 e 11 foram submetidos à digestão para confirmação da clonagem. Digerindo-se os clones somente com *Nde*I, observou-se, somente para o clone 5, um tamanho correspondente ao vetor pNUS-PT7-RfAH linearizado (aproximadamente 8 kilobases-kb). A digestão com *Nde*I e *Kpn*I gerou bandas de aproximadamente 1,7 kb, compatíveis com o tamanho do RfA, para os dois clones digeridos. No entanto, foram visualizadas 3 bandas para o clone 11 (**Figura 4.1.1.2**). Estes resultados confirmam previamente a clonagem do RfA somente para o clone 5, pois o clone 11,

apesar de apresentar uma banda correspondente ao tamanho do inserto, não demonstrou tamanho compatível com o esperado para o vetor, além de possuir provavelmente mais de um sítio para *KpnI*, o que explica o aparecimento de 3 bandas, quando digerido com as duas enzimas. Este evento pode ter sido gerado durante o processo de clonagem do RfA.

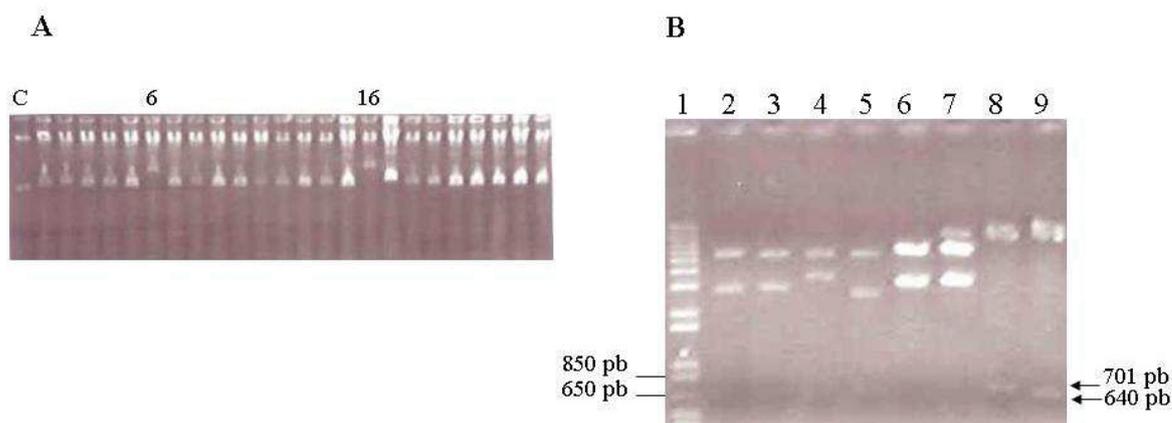


Figura 4.1.1.1: Seleção dos clones e avaliação da orientação do gene da T7 RNA Polimerase. A - Seleção dos clones por palitagem visualizada através de eletroforese em gel de agarose 0,8%. Canaletas C = controle (vetor sem inserto), 6 e 16 = clones a serem confirmados, demais canaletas sem numeração = plasmídeos não compatíveis com o tamanho esperado para o clone. Os clones 42 e 69 não estão demonstrados. B - Avaliação da orientação do gene da T7 RNA Polimerase através de eletroforese dos produtos de digestão dos clones em gel de agarose 0,8%. Canaletas 1 = 1 kb Plus (Invitrogen), 2 e 3 = clone 6, 4 e 5 = clone 16, 6 e 7 = clone 42, 8 e 9 = clone 69. As canaletas identificadas com numeração ímpar correspondem às digestões com *XbaI* e *NdeI* e as identificadas com numeração par correspondem às digestões com *XbaI* e *KpnI*. As setas indicam os fragmentos liberados a partir do clone 69, que confirmam a orientação desejada.

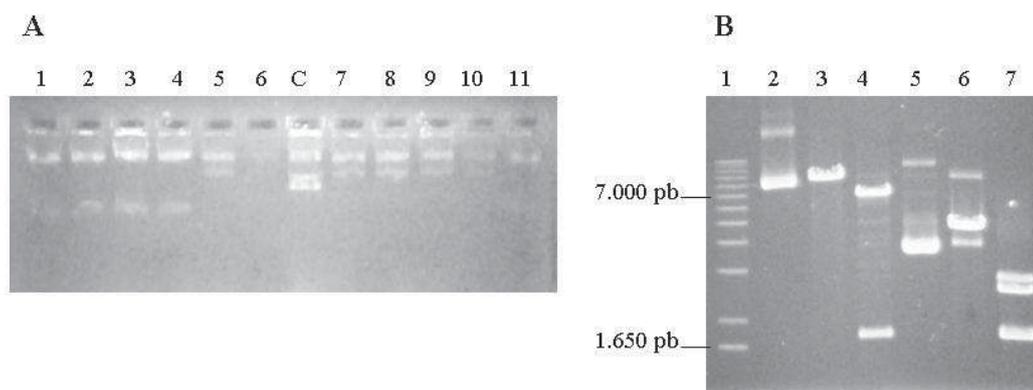


Figura 4.1.1.2: Seleção e confirmação dos clones contendo RfA. A - Seleção dos clones por palitagem visualizada em gel de agarose 0,8%. Canaletas 1-4 e 6 = plasmídeos não compatíveis com o tamanho esperado para o clone, 5 e 7-11 = clones a serem confirmados, C = controle (vetor sem inserto). B - Visualização em gel de agarose 0,8% da digestão dos clones 5 e 11 com *NdeI* e/ou *KpnI*. Canaletas 1 = 1 kb Plus (Invitrogen), 2 = clone 5, 3 = clone 5 com *NdeI*, 4 = clone 5 com *NdeI* e *KpnI*, 5 = clone 11, 6 = clone 11 com *NdeI*, 7 = clone 11 com *NdeI* e *KpnI*. A canaleta 6 apresenta mais de uma banda, indicando possível digestão incompleta do clone 11.

4.1.2 Seqüenciamento do DNA

Foram seqüenciadas as regiões correspondentes aos insertos clonados, incluindo as inserções entre vetor e inserto. No caso do clone pNUS-T7N, o seqüenciamento cobriu aproximadamente 75% da seqüência do gene da T7 RNA Polimerase. Foram verificadas duas mutações, das quais apenas uma causou alteração do aminoácido. Uma glutamina, na posição 143, foi alterada para arginina. A origem desta mutação não foi analisada, podendo estar presente no DNA molde usado na amplificação da T7 RNA Polimerase, ou ter sido gerada nos processos durante a clonagem. Para avaliar estas possibilidades, são necessários outros seqüenciamentos. Apesar da cobertura parcial do seqüenciamento, as regiões de inserção do gene com o vetor não apresentaram alterações de seqüência.

O vetor pNUS-PT7-RfAH teve toda a região do promotor T7 e operador de tetraciclina seqüenciada. O cassete RfA teve uma cobertura de seqüenciamento de aproximadamente 10%, compreendendo as regiões próximas às suas extremidades. A região entre o RfA e a etiqueta de histidinas foi seqüenciada evidenciando a correta fase de leitura.

4.1.3 Avaliação do Crescimento de *Crithidia fasciculata* em Diferentes Concentrações de G418 e Higromicina

Os dados deste experimento auxiliaram a escolha das concentrações utilizadas nos ensaios de transfecção, pois foi possível avaliar a taxa de crescimento dos parasitas não transfectados na presença de antibiótico. No ensaio com 250 µg/ml de G418 observou-se no final da fase exponencial uma taxa de divisão celular aproximadamente 100 vezes inferior ao controle (**Figura 4.1.3.1**). As curvas de crescimento realizadas com higromicina demonstraram que com uma concentração de 150 µg/ml ocorreu inibição semelhante à descrita para G418 (**Figura 4.1.3.2**).

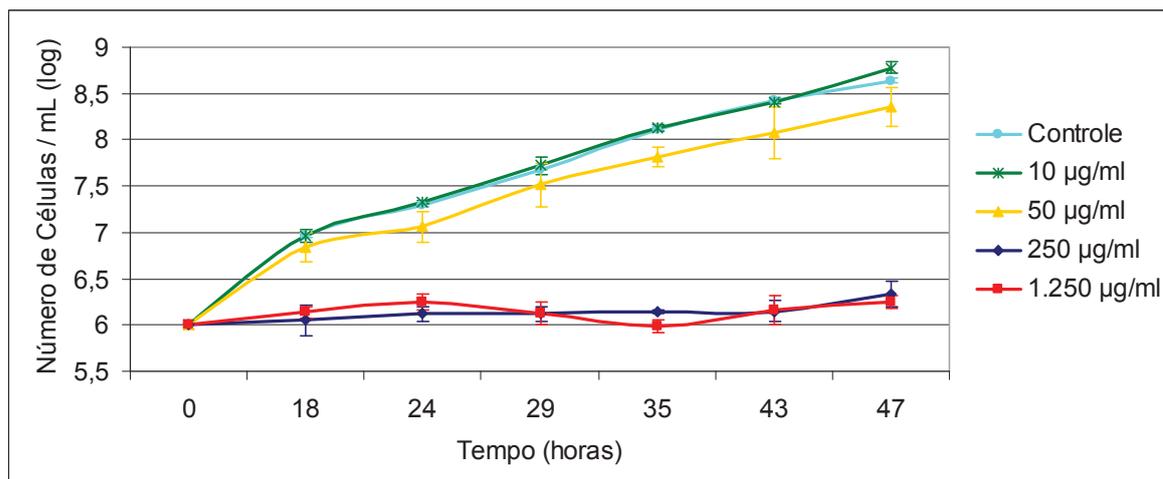


Figura 4.1.3.1: Curvas de crescimento de *Crithidia fasciculata* na presença de diferentes concentrações de G418. As barras verticais indicam o desvio padrão.

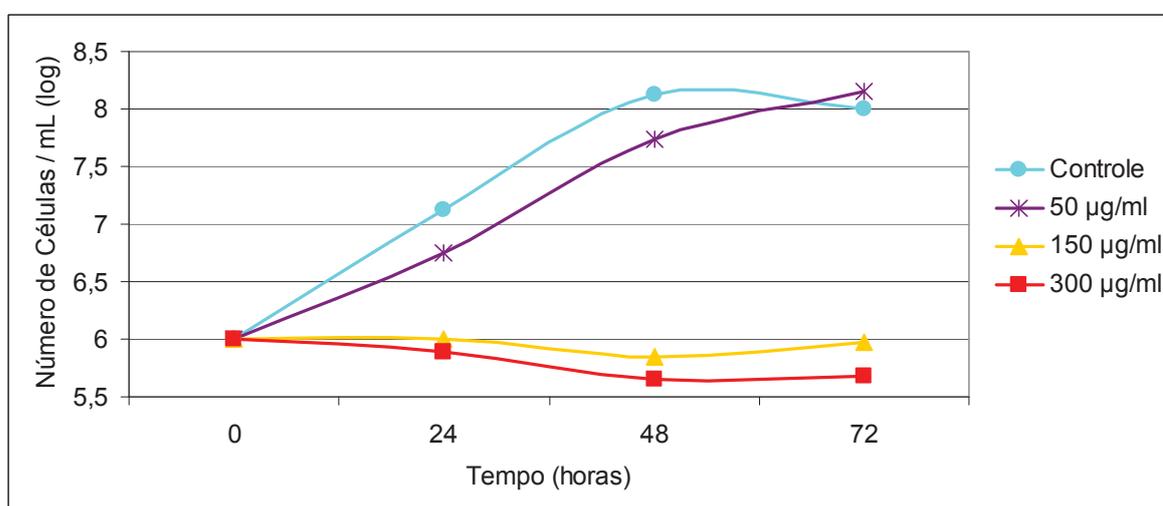


Figura 4.1.3.2: Curvas de crescimento de *Crithidia fasciculata* na presença de diferentes concentrações de higromicina.

4.1.4 Ensaios de Transfecção e Obtenção de População Clonal em *Crithidia fasciculata*

A primeira transfecção foi realizada com aproximadamente 50 µg do vetor pNUS-T7N. A seleção dos transfectantes procedeu de acordo como descrito (item 3.18), exceto pelo fato de que o acompanhamento da seleção foi feito por visualização ao microscópio invertido, sem contagem das células. Após um período de 15 dias, não foram detectados parasitas vivos na cultura controle, enquanto a cultura de células transfectadas permanecia crescendo.

Na tentativa de se obter uma população clonal, o procedimento descrito no item 3.20 foi realizado. Em aproximadamente 5 dias observou-se o crescimento de

colônias, dentre as quais 5 foram selecionadas aleatoriamente. A partir destas colônias realizou-se PCR para amplificação dos genes de resistência à neomicina e da T7 RNA Polimerase. Uma das colônias apresentou resultado positivo para as 2 PCRs (**Figura 4.1.5.1-D**), sendo então cultivada em meio líquido, nas mesmas condições anteriores ao cultivo em meio sólido. Esta cultura, nomeada de clone 1, foi utilizada para extração de DNA plasmidial e DNA total, utilizados na caracterização molecular do vetor (item 4.1.5).

O vetor pNUS-PT7-RfAH foi recombinado, pela plataforma Gateway® (Invitrogen), com os genes Tc00.1047053510877.30 (A1), Tc00.1047053507001.70 (C1) e Tc00.1047053506559.380 (C4), originando os clones pNUS-PT7H-A1, pNUS-PT7H-C1 e pNUS-PT7H-C4, respectivamente. Estes foram transfectados em *Crithidia fasciculata* selvagem e *Crithidia fasciculata* clone 1. Foram utilizados para cada transfecção 45 µg, 70 µg e 100 µg dos clones A1, C1 e C4, respectivamente. As culturas de *Crithidia fasciculata* clone 1 transfectadas e uma cultura de *Crithidia fasciculata* clone 1 sem a transfecção, servindo como controle, foram selecionadas com G418 e/ou higromicina. Neste caso, a concentração de G418 utilizada desde o início da seleção foi de 285 µg/ml, pois a população celular do clone 1 já havia sido previamente selecionada. As culturas de *Crithidia fasciculata* transfectadas apenas com pNUS-PT7-RfAH e o respectivo controle foram selecionados somente com higromicina. O acompanhamento destas seleções foi realizado por contagem do número de células, num intervalo de 4 a 6 dias (**Figura 4.1.4.1 a Figura 4.1.4.4**). Após um período de 11 a 15 dias, o número de parasitas nas culturas controles foi inferior a 1×10^5 células/ml.

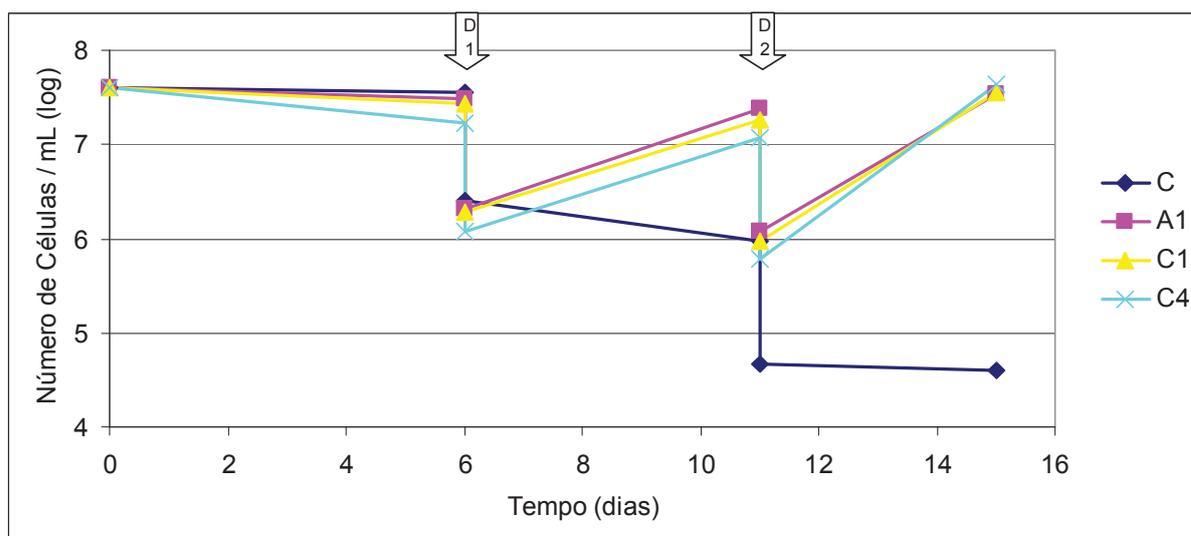


Figura 4.1.4.1: Seleção das culturas de *C. fasciculata* selvagem transfectado com pNUS-PT7-RfAH. Legenda: C = controle (não transfectado), A1, C1, C4 = genes transfectados através do vetor pNUS-PT7-RfAH. No eixo das abscissas, D1 e D2 correspondem às diluições das culturas, realizadas durante a seleção no 6º e 11º dias, respectivamente. D1 = 1:14,28, D2 = 1:20. Após a transfecção (Tempo 0), a taxa de morte celular devido a este procedimento não foi avaliada.

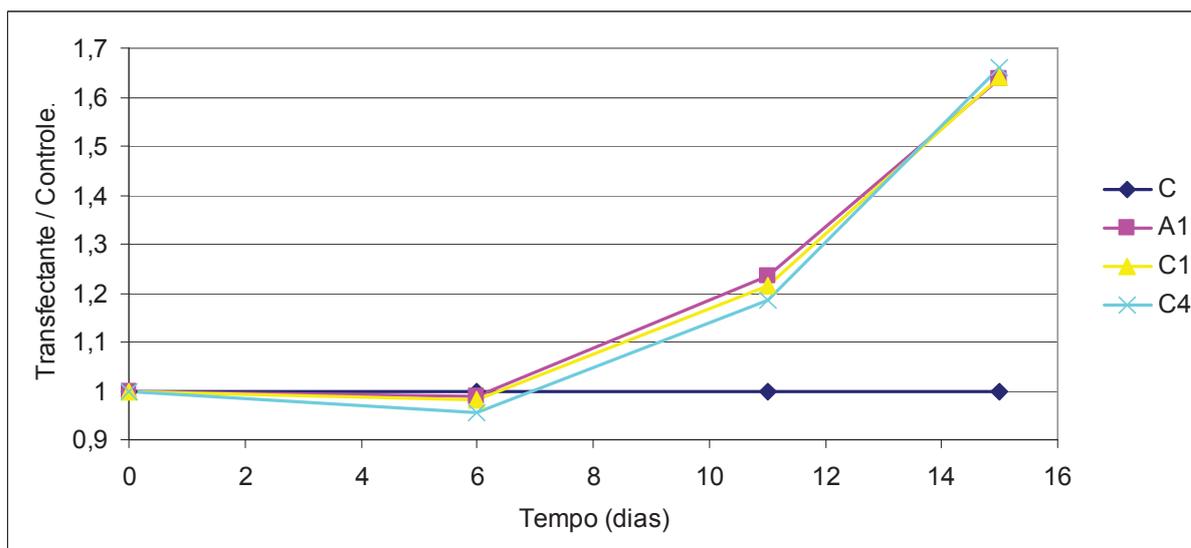


Figura 4.1.4.2: Relação entre as culturas de *C. fasciculata* selvagem transfectado e a cultura controle. Legenda: C = controle (não transfectado), A1, C1, C4 = genes transfectados através do vetor pNUS-PT7-RfAH.

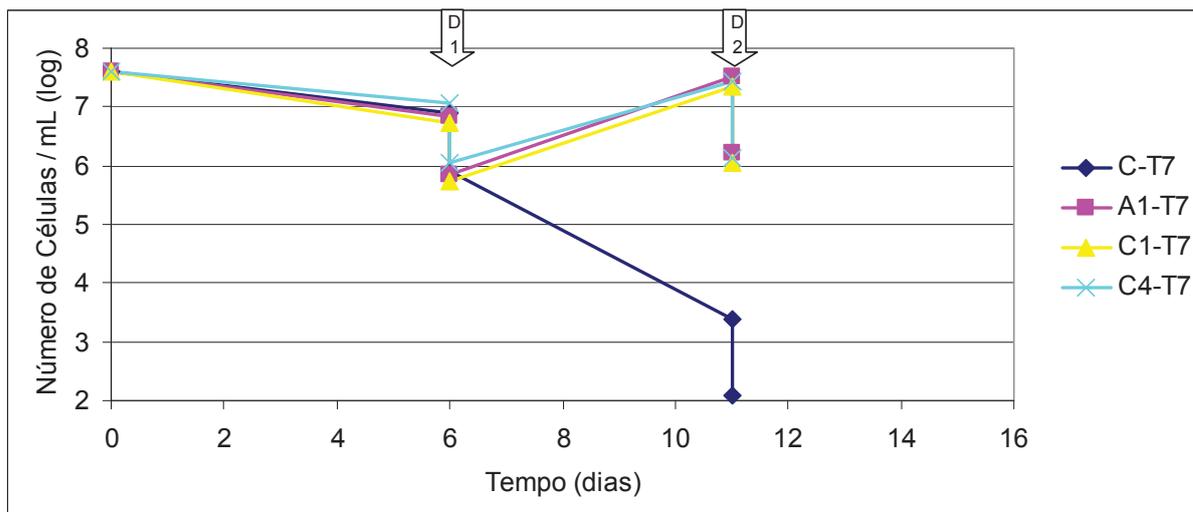


Figura 4.1.4.3: Seleção das culturas de *C. fasciculata* clone 1 transfectado com pNUS-PT7-RfAH. Legenda: C-T7 = controle (clone 1), A1-T7, C1-T7, C4-T7 = genes transfectados através do vetor pNUS-PT7-RfAH em parasitas previamente transfectados com o gene da T7 RNA Polimerase. No eixo das abscissas, D1 e D2 correspondem às diluições das culturas, realizadas durante a seleção no 6º e 11º dias, respectivamente. D1 = 1:10, D2 = 1:20. Após a transfecção (Tempo 0), a taxa de morte celular devido a este procedimento não foi avaliada.

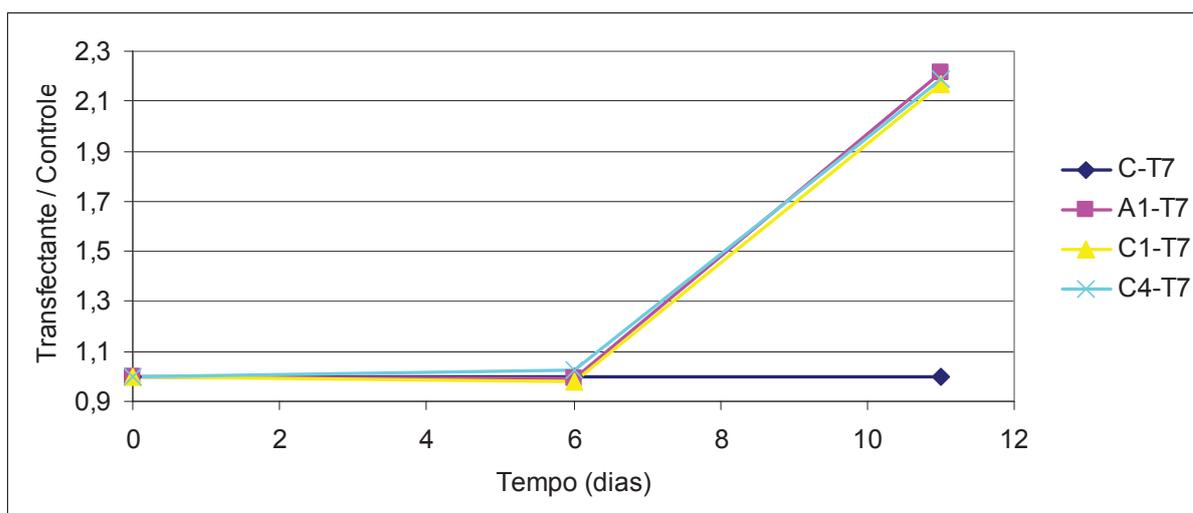


Figura 4.1.4.4: Relação entre as culturas de *C. fasciculata* clone 1 transfectado e a cultura controle. Legenda: C-T7 = controle (clone 1), A1-T7, C1-T7, C4-T7 = genes transfectados através do vetor pNUS-PT7-RfAH em parasitas previamente transfectados com o gene da T7 RNA Polimerase.

4.1.5 Caracterização Molecular e Detecção dos Transcritos em *Crithidia fasciculata* Transfectada com pNUS-T7N e pNUS-PT7-RfAH

Para detectar a presença de formas epissomais, verificando a estrutura dos clones pNUS-T7N, utilizou-se o procedimento descrito no item 3.19, empregando DNA dos parasitas pré-cultivo em meio sólido. Foram analisadas 12 colônias bacterianas e apenas uma apresentou tamanho do plasmídeo compatível com o

vetor pNUS-T7N (**Figura 4.1.5.1-A**). A partir desta colônia realizou-se extração do DNA plasmidial, com o qual foi realizada uma digestão com a endonuclease de restrição *EcoRI* para liberação do inserto e uma PCR para amplificação do gene da T7 RNA Polimerase. O fragmento liberado pela digestão e o produto de PCR demonstraram tamanho compatível com o gene da T7 RNA Polimerase (**Figura 4.1.5.1-B e C**).

Também se realizou este procedimento a partir do DNA do clone 1. Foram analisadas 30 colônias por palitagem, dentre as quais 12 apresentaram tamanhos compatíveis com o vetor em questão. As colônias contendo plasmídeos de tamanhos menores não foram analisadas (**Figura 4.1.5.1-E**). O DNA total foi utilizado para ensaios de Southern blot.

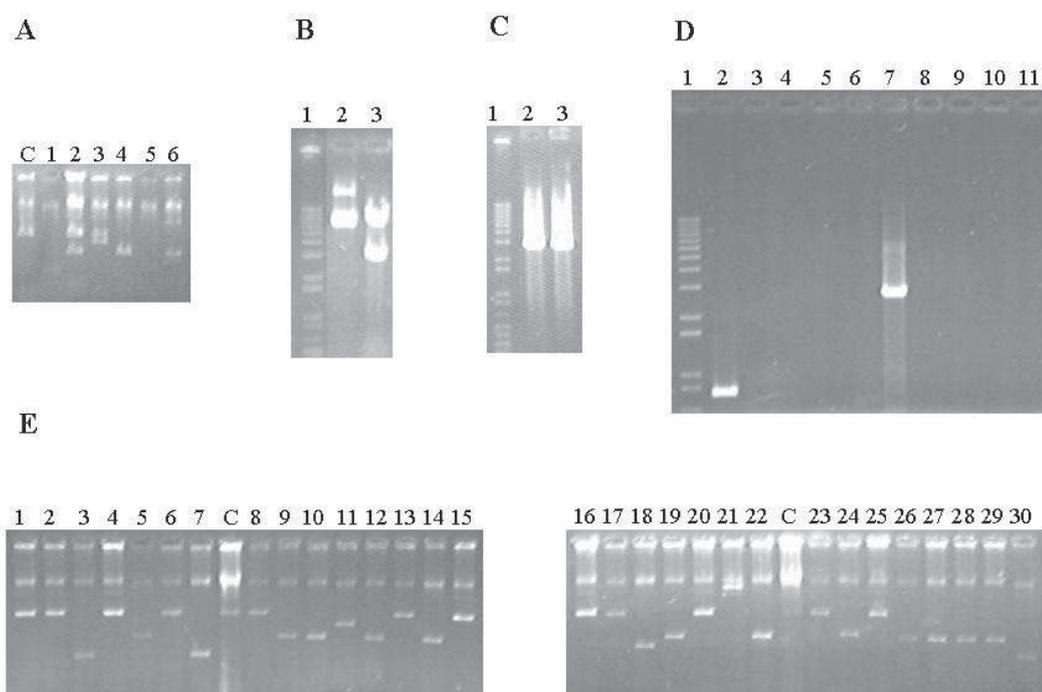


Figura 4.1.5.1: Recuperação do vetor pNUS-T7N, a partir de *Crithidia fasciculata*, pré e pós cultivo em meio sólido. A – Visualização de palitagem para 12 colônias de *Escherichia coli*. Canaletas C = controle (pNUS-T7N), 1-6 = colônias analisadas (2 por canaleta), o plasmídeo com tamanho compatível com o controle foi detectado apenas na canaleta 2. B – Digestão com *EcoRI* do plasmídeo com tamanho correto, visualizado em A. Canaletas 1 = 1 kb Plus (Invitrogen), 2 = plasmídeo não digerido, 3 = plasmídeo digerido. C – PCR para T7 RNA Polimerase a partir do mesmo plasmídeo utilizado em B. Canaletas 1 = 1 kb Plus, 2 = controle positivo, 3 = plasmídeo utilizado em B. D – PCR a partir de 5 colônias de *Crithidia fasciculata*. Canaletas 1 = 1 kb Plus, 2-6 = colônias 1 a 5 com iniciadores para resistência à neomicina, 7-11 = colônias 1 a 5 com iniciadores para T7 RNA Polimerase. E – Palitagem de 30 colônias de *Escherichia coli*, obtidas por transformação do DNA plasmidial isolado a partir do clone 1. Canaletas C = controle (pNUS-T7N), 1, 2, 4, 6, 8, 13, 15, 16, 17, 20, 23 e 25 = plasmídeos com tamanhos compatíveis com o controle. Em A, B, C e D utilizou-se gel de agarose 0,8%.

A fim de se fazer a caracterização molecular dos vetores pNUS-T7N e pNUS-PT7-RfAH em *Crithidia fasciculata*, foram realizados ensaios de Southern-blot (item 3.24) e PCR. O ensaio de Southern-blot foi realizado somente a partir da cultura de *Crithidia fasciculata* transfectada com pNUS-T7N, identificada como clone 1 (item 3.20). A enzima escolhida para digestão do DNA foi *Sall*, por clivar o vetor pNUS-T7N somente uma vez, fornecendo informações sobre o tamanho total do vetor linearizado. No Southern-blot foram utilizados alguns controles a fim de se obter comparações com o perfil eletroforético do DNA do parasita transfectado. Em um dos controles, misturou-se DNA do parasita não transfectado com DNA plasmidial de pNUS-T7N (controle 1), submetidos ou não à digestão com *Sall*. Também foram utilizadas como controle amostras de DNA plasmidial digeridas (controle 2) e não digeridas (controle 3), além de DNA de parasita não transfectado digerido com *Sall* (controle 4).

Na **Figura 4.1.5.2**, as bandas visualizadas a partir de DNA do parasita transfectado digerido apresentaram tamanhos compatíveis com as bandas presentes nos controles 1 digerido e 2, sugerindo a presença de plasmídeos nas formas epissomais nos parasitas transfectados. As bandas visualizadas no controle 1 não digerido e na canaleta 7B (banda superior) apresentaram tamanhos similares. Este dado pode justificar a presença desta banda, que pode ser devido à digestão insuficiente do material. Esta banda não aparece na canaleta 7A, mas uma possível explicação pode ser embasada no fato da digestão do material presente na canaleta 7B ter sido realizada separadamente da digestão do material presente na canaleta 7A, no entanto, tal constatação necessita de novos ensaios. A banda detectada na canaleta com DNA não digerido do parasita transfectado pode representar a forma concatenada do plasmídeo, conforme já descrito (TETAUD *et al.*, 2002). A ausência de sinal no controle 3 possivelmente se deve à quantidade de material aplicado no gel.

A fim de complementar a caracterização por Southern blot, foram avaliadas a presença e a manutenção da disposição dos cassetes que compõe os vetores pNUS-T7N e pNUS-PT7H-A1. Para isso, foram realizadas PCRs utilizando-se como molde DNA dos parasitas transfectados com pNUS-T7N (clone 1), pNUS-PT7-RfA(A1) e com ambos vetores. As reações foram feitas de acordo com o item 3.9, sendo utilizados iniciadores para a amplificação de alguns cassetes que formam os vetores, de maneira que os tamanhos dos produtos obtidos fossem comparados com

controles positivos, cujas reações foram realizadas a partir de DNA plasmidial como molde.

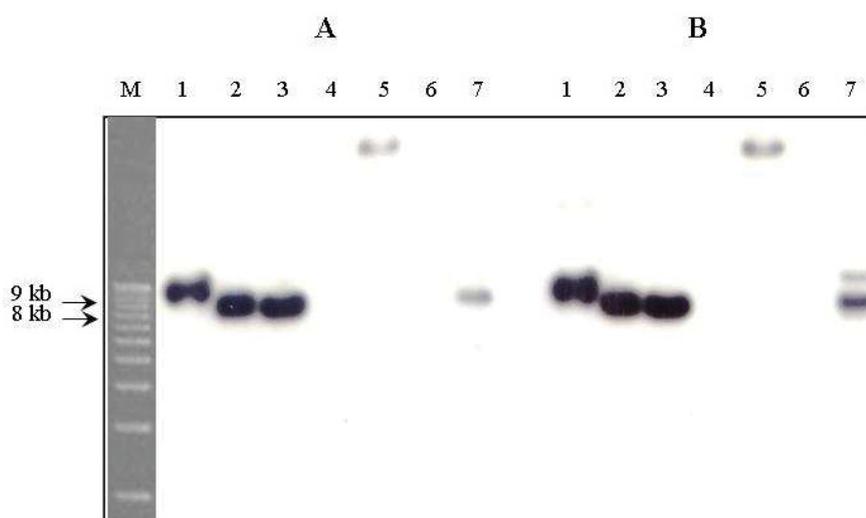


Figura 4.1.5.2: Análise por Southern blot de *Crithidia fasciculata* transfetado com pNUS-T7N. Utilizaram-se as sondas (A) NEO e (B) T7. Canaletas 1 = controle 1 (5 µg de DNA do parasita não transfetado misturado com 100 ng de pNUS-T7N), 2 = controle 1 digerido com *Sall*, 3 = controle 2 (100 ng de pNUS-T7N digerido com *Sall*), 4 = controle 3 (10 ng de pNUS-T7N), 5 = 5 µg de DNA do parasita transfetado, 6 = controle 4 (5 µg de DNA do parasita não transfetado digerido com *Sall*), 7 = 5 µg de DNA do parasita transfetado digerido com *Sall*), M = 1 kb Plus (Invitrogen).

A fim de facilitar a apresentação dos dados, os conjuntos de iniciadores foram enumerados e se destinam a amplificar as seguintes seqüências de DNA: (i) iniciadores A1 e R17, amplificando o gene da T7 RNA Polimerase + PKGA3' (2,9 kb); (ii) iniciadores A1 e R8, cassete contendo T7RNAPol + PGKA3' + PGKB5' + Neomicina (4,5 kb); (iii) iniciadores A8 e R17, extensão de aproximadamente 7,8 kb do vetor pNUS-T7N; (iv) iniciadores A19 e R16, extensão de aproximadamente 8,8 kb do vetor pNUS-T7N; (v) iniciadores A25 e R19, cassete contendo A1-PGKA3' + PGKB5' + higromicina (2,8 kb); (vi) iniciadores fita senso do adaptador PT7 (**Figura 3.16.3**) e R19, cassete contendo adaptador PT7 + PGKB5' + A1 + PGKA3' + PGKB5' + higromicina (3,5 kb); (vii) iniciadores e A24 e R17, extensão de aproximadamente 6,1 kb do vetor pNUS-PT7H-A1.

Na avaliação do vetor pNUS-T7N (**Figura 4.1.5.3-A**), detectaram-se produtos de PCR nos tamanhos esperados para os iniciadores (i), (ii) e (iii), no entanto com algumas ressalvas: (1ª) O controle positivo para o iniciador (i) (canaleta 3-A) não foi aplicado no gel devido a uma falha na montagem das reações na placa de 96 poços e (2ª) nas reações com os iniciadores (iii) também foram observados produtos de tamanhos inespecíficos (aproximadamente 0,7 kb), no controle positivo mais

intensamente e na amostra avaliada de maneira mais discreta. As reações com os iniciadores (iv) apresentaram produtos de tamanhos inespecíficos (um pouco acima de 3 kb).

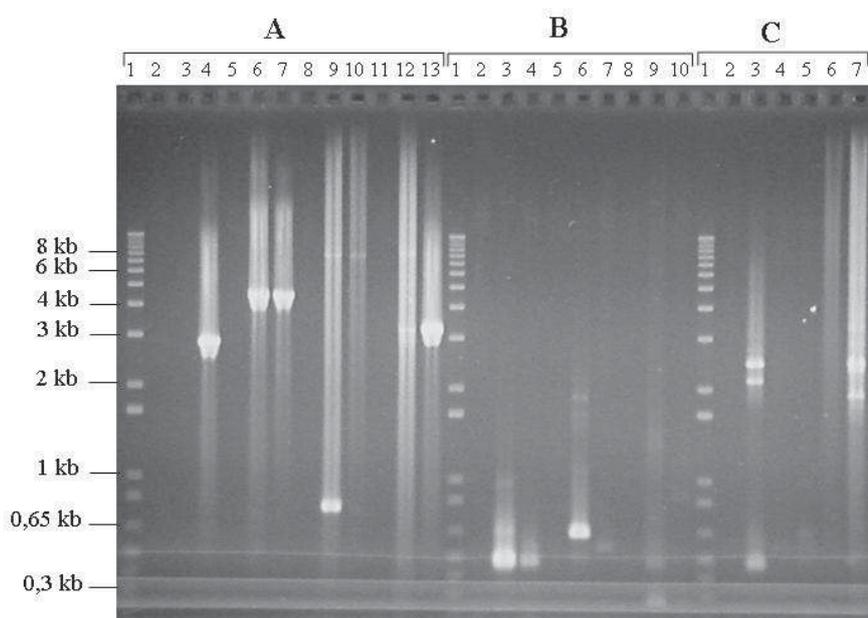


Figura 4.1.5.3: Avaliação da presença e estrutura dos vetores em *Crithidia fasciculata* após transfecção. Através de reações de PCR, foram analisados os vetores (A) pNUS-T7N e (B,C) pNUS-PT7H-A1. Nas reações foram utilizados 50 ng de DNA total dos parasitas ou 2 ng dos plasmídeos (controles positivos). Ao lado da identificação dos iniciadores está o tamanho em kb esperado para o produto de PCR. Em A, canaletas 1 = 1 kb Plus (Invitrogen), 2 = DNA do parasita não transfectado (controle negativo 1) + iniciadores para o gene da T7 RNA Polimerase (iniciadores (i) – 2,8 kb), 3 = pNUS-T7N + iniciadores (i), 4 = DNA do parasita transfectado com pNUS-T7N (Cf-T7) + iniciadores (i), 5 = controle negativo 1 + iniciadores para o cassete contendo T7RNAPol-PGKA3'-PGKB5'-NEO (iniciadores (ii) – 4,5 kb), 6 = pNUS-T7N + iniciadores (ii), 7 = Cf-T7 + iniciadores (ii), 8 = controle negativo 1 + iniciadores para a extensão de 7,8 kb do vetor (iniciadores (iii) – 7,8 kb), 9 = pNUS-T7N + iniciadores (iii), 10 = Cf-T7 + iniciadores (iii), 11 = controle negativo 1 + iniciadores para a extensão de 8,8 kb do vetor (iniciadores (iv) – 8,8 kb), 12 = pNUS-T7N + iniciadores (iv), 13 = Cf-T7 + iniciadores (iv). Em B, canaletas 1 = 1 kb Plus, 2 = controle negativo 1 + iniciadores para o cassete contendo A1-PGKA3'-PGKB5'-HIGRO (iniciadores (v)– 2,8 kb), 3 = pNUS-PT7-RfA(A1) + iniciadores (v), 4 = DNA do parasita transfectado com pNUS-PT7-RfA(A1) (Cf-A1) + iniciadores (v), 5 = controle negativo 1 + iniciadores para o cassete contendo adaptadorPT7-PGKB5'-A1-PGKA3'-PGKB5'-HIGRO (iniciadores (vi) – 3,5 kb), 6 = pNUS-PT7-RfA(A1) + iniciadores (vi), 7 = Cf-A1 + iniciadores (vi), 8 = controle negativo + iniciadores para a extensão de 6,1 kb do vetor (iniciadores (vii) – 6,1 kb), 9 = pNUS-PT7-RfA(A1) + iniciadores (vii), 10 = Cf-A1 + iniciadores (vii). Em C, canaletas 1 = 1 kb Plus, 2 = Cf-T7 + iniciadores (v), 3 = DNA do parasita transfectado com pNUS-T7N e pNUS-PT7-RfA(A1) (Cf-T7-A1) + iniciadores (v), 4 = Cf-T7 + iniciadores (vi), 5 = Cf-T7-A1 + iniciadores (vi), 6 = Cf-T7 + iniciadores (vii), 7 = Cf-T7-A1 + iniciadores (vii).

As PCRs para avaliação do vetor pNUS-PT7H-A1 em *Crithidia fasciculata* transfectado ou não com pNUS-T7N (**Figura 4.1.5.3-C e B**, respectivamente) não apresentaram produtos com os tamanhos esperados, tanto para os controles positivos, como para as amostras avaliadas. Na canaleta 3-C observaram-se 2

bandas entre 2 e 3 kb, no entanto o controle positivo para esta reação, presente na canaleta 3-B, não apresentou a banda com o tamanho esperado.

Com a intenção de verificar a presença de mRNAs correspondentes aos genes da T7 RNA Polimerase e resistência à neomicina, realizou-se northern blot utilizando-se o mesmo clone e sondas utilizados para Southern blot. Como controle foi utilizado RNA do parasita não transfectado. Na **Figura 4.1.5.4**, foram visualizadas bandas nas canaletas contendo RNA do parasita transfectado, detectadas com ambas as sondas, indicando a ocorrência de transcrição dos genes transfectados.

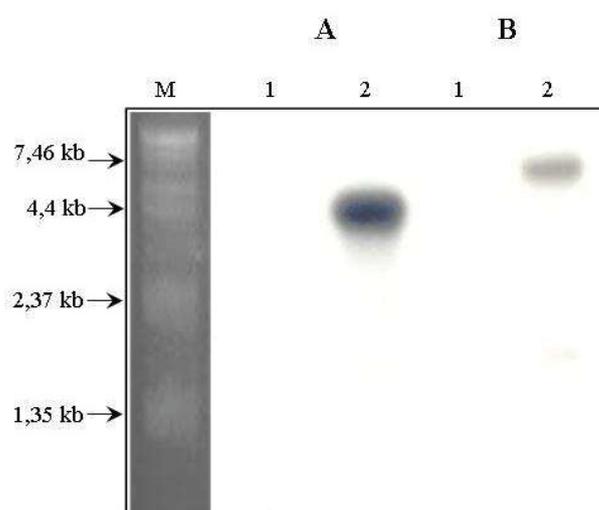


Figura 4.1.5.4: Análise por northern blot de *Crithidia fasciculata* transfectado com pNUS-T7N. Utilizaram-se as sondas (A) T7 e (B) NEO. Canaletas 1 = controle (5 µg de RNA do parasita não transfectado), 2 = 5 µg de RNA do parasita transfectado, M = 0,24-9,5 kb RNA ladder (Gibco).

4.1.6 Ensaio de Western Blot

Os extratos protéicos, obtidos a partir das culturas transfectadas e não transfectadas de *Crithidia fasciculata*, foram submetidos à metodologia descrita no item 3.23. Os tempos de revelação variaram entre 8 min 30 s e 10 min 30 s, utilizando anti-histidina e entre 1 min 30 s e 3 min 30 s, utilizando anticorpos contra as proteínas recombinantes. Os controles utilizados foram extratos de *Crithidia fasciculata* não transfectado, transfectado apenas com pNUS-T7N e proteínas recombinantes purificadas A1, C1 e C4, obtidas por expressão em *Escherichia coli*.

Estas proteínas recombinantes, por possuírem etiqueta de histidinas e sítios *attB* fusionados, contêm um tamanho adicional de aproximadamente 4 kDa. Através de SDS-PAGE não foram observadas diferenças entre os extratos das culturas transfectadas e não transfectadas, possivelmente devido ao nível de expressão

protéica obtido. As análises por western blot com anticorpo anti-histidina não detectaram a presença das proteínas recombinantes nos parasitas transfectados (Figura 4.1.6.1), mesmo utilizando uma concentração de anti-histidina três vezes maior que a recomendada pelo fabricante. Este resultado demonstra que, ou a quantidade de proteína recombinante nos extratos está abaixo da sensibilidade do anticorpo, ou estas proteínas não foram expressas.

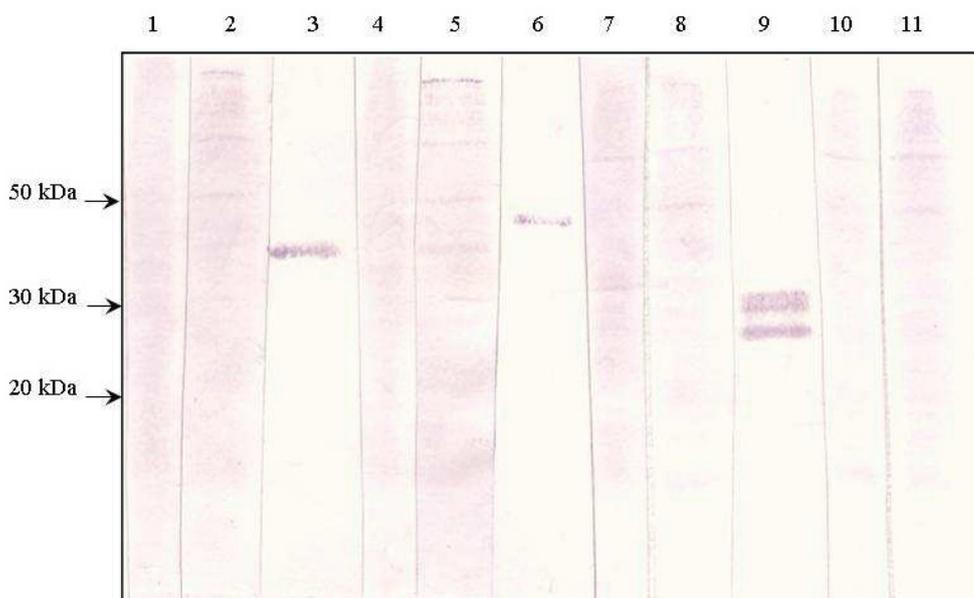


Figura 4.1.6.1: Análise por western blot de *C. fasciculata* transfectado utilizando anticorpo anti-histidina. Extratos de 1×10^7 células e $0,5 \mu\text{l}$ de proteínas recombinantes, produzidas em *Escherichia coli*, foram analisados com anticorpo monoclonal anti-histidina. Canaletas 1 = *Crithidia fasciculata* não transfectado (Cf), 2 = *Crithidia fasciculata* transfectado com pNUS-T7N (Cf-T7), 3 = A1 produzida em *Escherichia coli*, 4 = Cf transfectado com pNUS-PT7-RfA(A1), 5 = Cf-T7 transfectado com pNUS-PT7-RfA(A1), 6 = C1 produzida em *Escherichia coli*, 7 = Cf transfectado com pNUS-PT7-RfA(C1), 8 = Cf-T7 transfectado com pNUS-PT7-RfA(C1), 9 = C4 produzida em *Escherichia coli*, 10 = Cf transfectado com pNUS-PT7-RfA(C4), 11 = Cf-T7 transfectado com pNUS-PT7-RfA(C4). Utilizou-se Bench Mark (Invitrogen) como marcador de peso molecular.

Através de análise por western blot com anticorpos contra as proteínas recombinantes, foi possível a detecção de bandas correspondentes às proteínas recombinantes, exceto para C4 (**Figura 4.1.6.2**), reforçando a hipótese de sensibilidade insuficiente no ensaio com anticorpo anti-histidina. A proteína recombinante A1 apresentou migração eletroforética não condizente com o tamanho determinado *in silico* (**Figura 4.1.6.1 e Figura 4.1.6.2**), sendo que este fato já havia sido observado em estudo prévio envolvendo esta proteína. Visualmente não foi possível detectar diferenças entre os níveis de expressão das proteínas recombinantes em sistemas com e sem T7 RNA Polimerase. Somente para C4 foram detectadas bandas correspondentes ao tamanho da proteína nativa detectada

em extrato de *Trypanosoma cruzi* (aproximadamente 20 kDa). Estas bandas foram visualizadas nas membranas, tanto nos extratos dos controles quanto nos dos transfectados, no entanto, não foram detectadas na **Figura 4.1.6.2** devido à perda de sinal na imagem digitalizada.

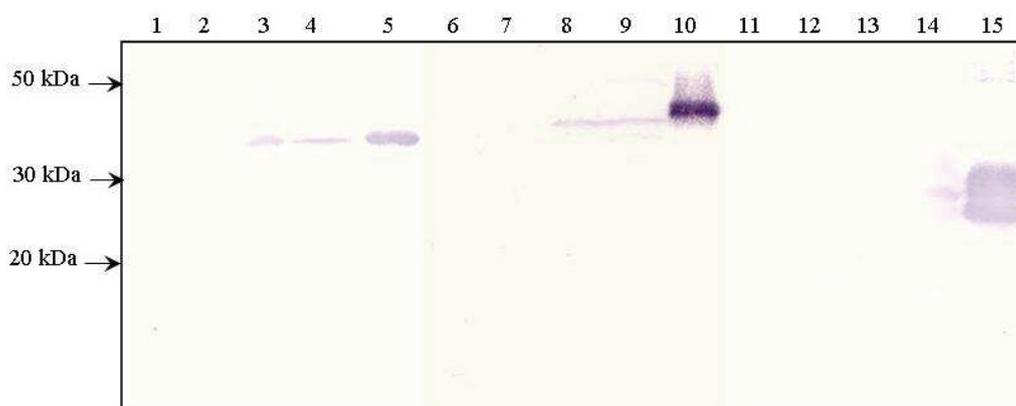


Figura 4.1.6.2: Análise por western blot de *C. fasciculata* transfectado utilizando anticorpos contra as proteínas recombinantes. Extratos de 1×10^7 células e $0,5 \mu\text{l}$ de proteínas recombinantes, produzidas em *Escherichia coli*, foram analisados com (1-5) anticorpo policlonal anti-A1, (6-10) anticorpo policlonal anti-C1, (11-15) anticorpo policlonal anti-C4. Canaletas 1, 6 e 11 = *Crithidia fasciculata* não transfectada (Cf), 2, 7 e 12 = *Crithidia fasciculata* transfectada com pNUS-PT7N (Cf-T7), 3 = Cf transfectado com pNUS-PT7-RfA(A1), 4 = Cf-T7 transfectado com pNUS-PT7-RfA(A1), 5 = A1 produzida em *Escherichia coli*, 8 = Cf transfectado com pNUS-PT7-RfA(C1), 9 = Cf-T7 transfectado com pNUS-PT7-RfA(C1), 10 = C1 produzida em *Escherichia coli*, 13 = Cf transfectado com pNUS-PT7-RfA(C4), 14 = Cf-T7 transfectado com pNUS-PT7-RfA(C4), 15 = C4 produzida em *Escherichia coli*. Utilizou-se Bench Mark (Invitrogen) como marcador de peso molecular.

4.2 Construção e Caracterização dos Vetores pTcPR-HisN e Derivados e pTcPT7-HisN

4.2.1 Processos de Clonagem

As etapas de clonagem na construção dos vetores pTcPR-HisN e pTcPT7-HisN ocorreram conforme descrito no item 3.16, no entanto, algumas etapas foram modificadas a fim de contornar alguns problemas encontrados. A clonagem do cassete RfA foi a etapa mais prolongada do trabalho, pois este cassete possui uma particularidade, suas extremidades 5' e 3' são muito parecidas, fato que dificulta a inserção por PCR de sítios de restrição específicos para cada extremidade. Outro fator complicante, no caso da clonagem do RfA em pBluescript II KS(-), foi a escolha das enzimas de restrição utilizadas nesta clonagem. Os sítios para estas enzimas, *Xba*I e *Spe*I, além de estarem localizados de forma adjacente em pBluescript II KS

(-), apresentam extremidades compatíveis após digestão, contribuindo para possibilidade de clonagem do cassete com a orientação invertida ou re-ligação do vetor sem que ocorra a clonagem.

A maioria dos clones selecionados após a clonagem do RfA, no momento da confirmação, não digeriam com *Xba*I. Diante deste fato, a seguinte estratégia foi seguida: O vetor foi digerido somente com *Spe*I e tratado com a enzima fosfatase alcalina de camarão para prevenir a re-ligação do vetor. O inserto foi digerido normalmente com *Xba*I e *Spe*I, sendo que, após a sua clonagem, a orientação deveria ser verificada. Para seleção da orientação correta, fez-se a digestão dos clones obtidos com *Xba*I e *Spe*I. A liberação do RfA, após digestão, confirmaria a orientação correta do inserto, pois como o vetor foi digerido somente com *Spe*I e o sítio *Xba*I presente originalmente no vetor foi conservado, na inserção 5' do cassete iria se formar um sítio inativo, oriundo de extremidades *Xba*I e *Spe*I, e na inserção 3' do cassete iria se reconstituir o sítio para *Spe*I. Na orientação invertida, o sítio inativo seria formado na inserção 3' do RfA, impedindo a sua liberação quando fosse realizada a digestão. Desta forma, selecionou-se um clone, com o qual se prosseguiu a construção clonando o cassete contendo o promotor.

Após o seqüenciamento verificou-se entre as 6 histidinas e o cassete RfA uma inserção de 27 nucleotídeos, provenientes do vetor de onde foi extraído o cassete contendo promotor. Esta inserção originou um códon de parada (TAG). Inicialmente tentou-se resolver este problema apenas clonando novamente o RfA, no entanto não se obteve sucesso. Devido aos problemas verificados anteriormente na amplificação do RfA, adotaram-se as seguintes estratégias: Como estava sendo observado anteriormente que após a clonagem do RfA em pBluescript II KS(-) não era possível a digestão do vetor com *Xba*I e devido a similaridade entre as extremidades 5' e 3' do RfA e, conseqüentemente, dos iniciadores anterógrado e retrógrado, suspeitou-se da ocorrência de um anelamento preferencial do iniciador retrógrado no lugar do anterógrado na amplificação do RfA. Esta hipótese foi testada realizando-se a amplificação do RfA somente com iniciador anterógrado ou somente com iniciador retrógrado. Foi verificada amplificação nas duas condições, no entanto, a amplificação na presença apenas do iniciador anterógrado só foi conseguida baixando-se a temperatura de anelamento de 60 para 50 °C nos 10 primeiros ciclos. Além disso, foi verificada a concentração da solução contendo os iniciadores e

verificou-se uma concentração aproximadamente 5 vezes maior na solução contendo o iniciador retrógrado.

Após a equiparação na concentração dos iniciadores, foram realizadas novas PCRs para amplificar o RfA utilizando-se temperaturas de anelamento de até 65 °C, a fim de favorecer o anelamento específico dos iniciadores. Além dos iniciadores utilizados anteriormente, foram empregados novos iniciadores anterógrados: 5'-GGactagtATCACAAGTTTGTACAAAAAAG-3', contendo o sítio *SpeI* (caixa baixa) e 5'-GCgagctcATCTAAtctagaATCACAAGTTTGTACAAAAAAG-3', contendo os sítios *SacI* e *XbaI* (caixa baixa), no entanto mantendo-se o mesmo iniciador retrógrado com sítio *SpeI*. Foram então realizadas ligações do vetor com o RfA, possuindo sítios de restrição variados. No processo de seleção dos clones, identificou-se um clone, cujo RfA era proveniente da amplificação com o iniciador anterógrado contendo os sítios *SacI* e *XbaI*. Nesta clonagem, o RfA foi clonado nos sítios *SacI* e *SpeI*, retirando o antigo RfA e o promotor, e em seguida o cassete contendo o promotor foi novamente clonado nos sítios *SacI* e *XbaI*.

Na construção do vetor pTcPT7-HisN, a clonagem do RfA em pUC18 também exigiu atenção especial. A concentração da solução contendo os iniciadores foi avaliada e verificou-se uma concentração 2 vezes maior da solução contendo o iniciador retrógrado em relação a contendo o iniciador anterógrado. As concentrações foram equiparadas e uma nova amplificação do RfA foi realizada, com temperatura de anelamento de 65 °C. Após a ligação foi selecionado e confirmado um clone contendo o RfA, além do cassete clonado anteriormente, o qual contém o gene para resistência.

Após estas clonagens, foi verificado um erro no desenho dos cassetes sintéticos, mais especificamente nas regiões intergênicas. Ao invés de terem o desenho baseado na seqüência genômica, foram desenhadas a partir de um clone de cDNA, contendo o mini-éxon e a 5'UTR do gene de ubiquitina. A fim de corrigir este erro, foi realizado novo desenho e encomenda dos novos cassetes. Com isso foi necessária somente a substituição dos cassetes clonados anteriormente pelos cassetes novos (**Figura 4.2.1.1**), com exceção do RfA, o qual não necessitou substituição. Os cassetes substituídos possuíam a mesma nomenclatura dos novos cassetes (GSPT7 e GSPDm28c), exceto o cassete contendo a resistência a antibiótico, que era identificado como GSHYG. As clonagens para substituição dos cassetes foram feitas após digestão e purificação em gel de agarose dos mesmos. A

seleção e confirmação dos clones contendo os novos cassetes foram feitas por PCR de colônia, exceto para a clonagem do cassete GSPT7 no vetor pTcPT7-HisN, onde não houve a troca de cassete, pois este ainda não havia sido clonado. Neste caso a seleção foi realizada por palitagem, tendo como controle o vetor sem o inserto. Na **Figura 4.2.1.1-H**, pode-se observar a confirmação do clone 7 (seleção demonstrada na **Figura 4.2.1.1**) pela liberação do cassete de aproximadamente 0,4 kb após digestão com *HindIII* e *XbaI*.

Para a confirmação dos clones contendo o novo cassete GSNEO, foram utilizados os iniciadores anterógrado 5'-CCGCTCGAGATGATTGAACAAGATGGATT-3' e retrógrado 5'-CCGCTCGAGTCAGAAGAACTCGTCAAGAA-3' para amplificação do gene de resistência à neomicina (aproximadamente 0,8 kb). Como controles negativos, utilizaram-se colônias possuindo o vetor contendo o cassete GSHYG, que conferia resistência à higromicina. Na **Figura 4.2.1.1 A e C**, pode-se observar que os controles negativos amplificaram produtos com tamanhos correspondentes ao gene de resistência à neomicina, no entanto com bandas mais fracas que a maioria das colônias analisadas. Apesar da baixa especificidade destas seleções, prosseguiu-se com a confirmação dos clones. Os clones avaliados na canaleta 7 (**Figura 4.2.1.1-A e C**) foram confirmados por digestão com *Apal* e *SpeI* (pTcPR-HisN) ou *Apal* e *KpnI* (pTcPT7-HisN) para liberação do cassete de aproximadamente 1,3 kb.

A seleção dos clones contendo o novo cassete GSPDm28c utilizou os iniciadores anterógrado 5'-GTGTGGGTCGCAAATGTCA3' e retrógrado 5'-CTTCCTTAGCTCCTGAAAATCTCG3' para amplificação de um segmento de aproximadamente 0,7 kb. Nestas PCRs utilizou-se o mesmo controle descrito acima, o qual produziria um fragmento de aproximadamente 0,5 kb. Na **Figura 4.2.1.1** pode-se verificar a seleção dos clones (E) e a confirmação do clone 10 (F) por liberação do cassete de aproximadamente 0,9 kb após digestão com *HindIII* e *XbaI*.

A substituição da etiqueta de 6 histidinas foi realizada através de digestões com *SphI* e *XbaI*, somente para o vetor pTcPR-HisN. Com isso, foram obtidos vetores contendo o epítipo *c-myc* ou as proteínas fluorescentes GFP, CFP ou YFP para localização celular. Outra etiqueta incorporada foi o cassete TAP tag para purificação de complexos protéicos.

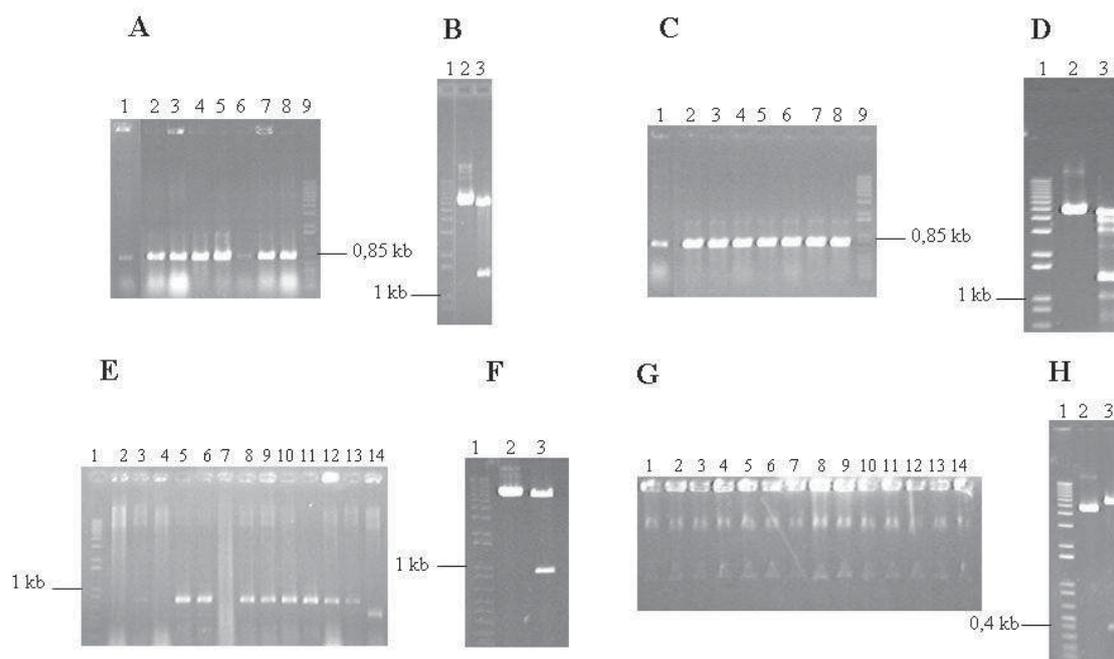


Figura 4.2.1.1: Seleção e confirmação dos clones obtidos durante a troca dos cassetes. Substituição do cassete GSNEO e GSPDm28c e clonagem do cassete GSPT7 em (A, B, E, F) pTcPR-HisN e (C, D, G, H), pTcPT7-HisN. A e C – Seleção dos clones contendo o novo cassete GSNEO através de PCR de colônia com iniciadores para amplificação da resistência à neomicina (0,8 kb). Canaletas 1 = controle negativo, 2-8 = colônias analisadas, 9 = 1 kb Plus (Invitrogen). B e D - Confirmação dos clones 7 (A e C) por digestão com *Apal* e *SpeI* (B) ou *Apal* e *KpnI*. (D) Canaletas 1 = 1 kb Plus, 2 = clones não digeridos, 3 = clones digeridos. E - Seleção dos clones contendo o novo cassete GSPDm28c através de PCR de colônia com iniciadores para amplificação de um segmento deste cassete (0,7 kb). Canaletas 1 = 1 kb Plus, 2-13 = colônias analisadas, 14 = controle. G – análise por palitagem para seleção do clone contendo o novo cassete GSPT7. Canaletas 1-7 e 9-14 = colônias analisadas, 8 = controle (clone 7 selecionado em C). F e H = Respectivamente a confirmação dos clones 10 (E) e 7 (G) por digestão com *SacI* e *XbaI* (F) ou *HindIII* e *XbaI*. (H). Canaletas 1 = 1 kb Plus, 2 = clones não digeridos, 3 = clones digeridos. Os controles utilizados em A, C e E foram obtidos a partir do vetor pTcPR-HisN contendo os cassetes GSPDm28c antigo e GSHYG. Todos os géis foram elaborados com agarose 0,8%.

4.2.2 Seqüenciamento do DNA

O desenho dos iniciadores empregados no seqüenciamento ocorreu como descrito no item 3.8. Os dados demonstraram ausência de mutações nas regiões de inserção dos cassetes e genes nos vetores. O seqüenciamento completo dos cassetes sintéticos foi realizado pela GenScript, não sendo observadas alterações. O RfA e as etiquetas não tiveram seqüenciamento completo, devido a baixa eficiência obtida com alguns oligonucleotídeos. Novos oligonucleotídeos são necessários para o fechamento do seqüenciamento destes segmentos.

4.2.3 Avaliação do Crescimento de *Trypanosoma cruzi* em Diferentes Concentrações de G418

As curvas de crescimento foram realizadas na presença de G418 nas concentrações de 250, 500 e 1.000 $\mu\text{g/ml}$. Como controle, utilizou-se uma cultura sem a adição de antibiótico. Os dados obtidos (**Figura 4.2.3.1**) demonstraram que com a concentração de 500 $\mu\text{g/ml}$, o número de células após 120 horas foi aproximadamente 15 vezes menor comparando-se com o controle. Com isso, esta concentração foi escolhida para realizar a seleção das células de *Trypanosoma cruzi* transfectadas.

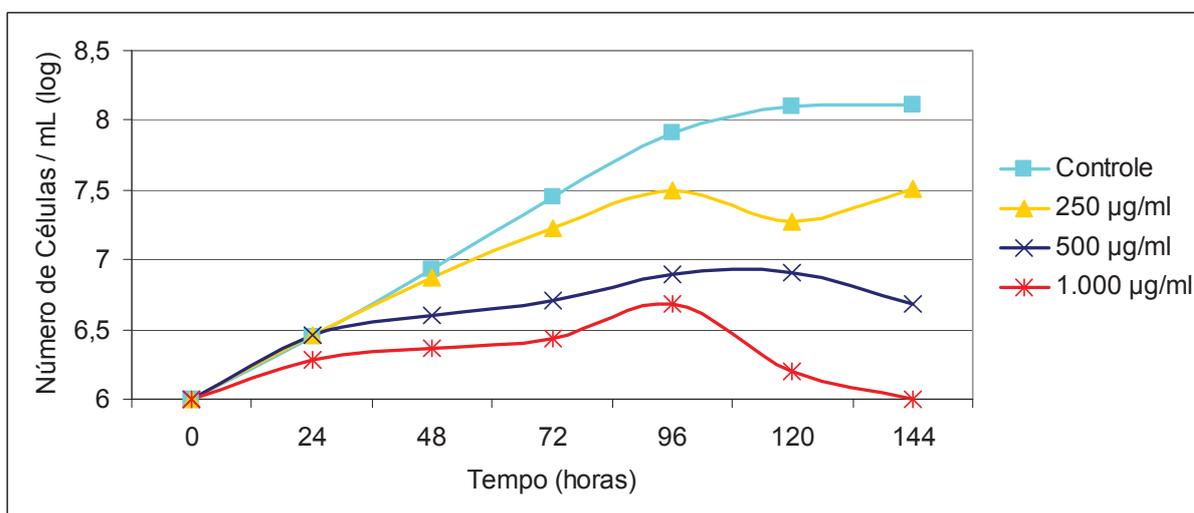


Figura 4.2.3.1: Curvas de crescimento de *Trypanosoma cruzi* na presença de diferentes concentrações de G418.

4.2.4 Transfecções em *Trypanosoma cruzi*

Da mesma forma que para os vetores de *Crithidia fasciculata*, os vetores de *Trypanosoma cruzi* pTcPR-HisN, pTcPR-GFPN, pTcPR-CFPN, pTcPR-YFPN, pTcPR-mycN e pTcPR-TAPN foram recombinados com os mesmo três genes de *Trypanosoma cruzi* (A1, C1 e C4). As transfecções foram realizadas com 65 a 110 μg de DNA. O acompanhamento da seleção foi através da contagem do número de células em câmara de Neubauer, mantendo-se o número de células em torno de 1×10^6 células/ml através de diluições (**Figura 4.2.4.1 a Figura 4.2.4.7**). Num período entre 18 e 24 dias foram obtidas populações resistentes ao antibiótico, apresentando uma taxa de multiplicação celular próxima às das culturas não transfectadas e sem antibiótico. As transfecções foram realizadas em 4 grupos para facilitar o

gerenciamento das culturas. Em alguns casos, como na transfecção com pTcPR-HisN-A1 (grupo 1), a contagem do número de células da cultura controle no décimo dia de seleção foi inferior a $2,5 \times 10^3$ células/ml (**Figura 4.2.4.1**).

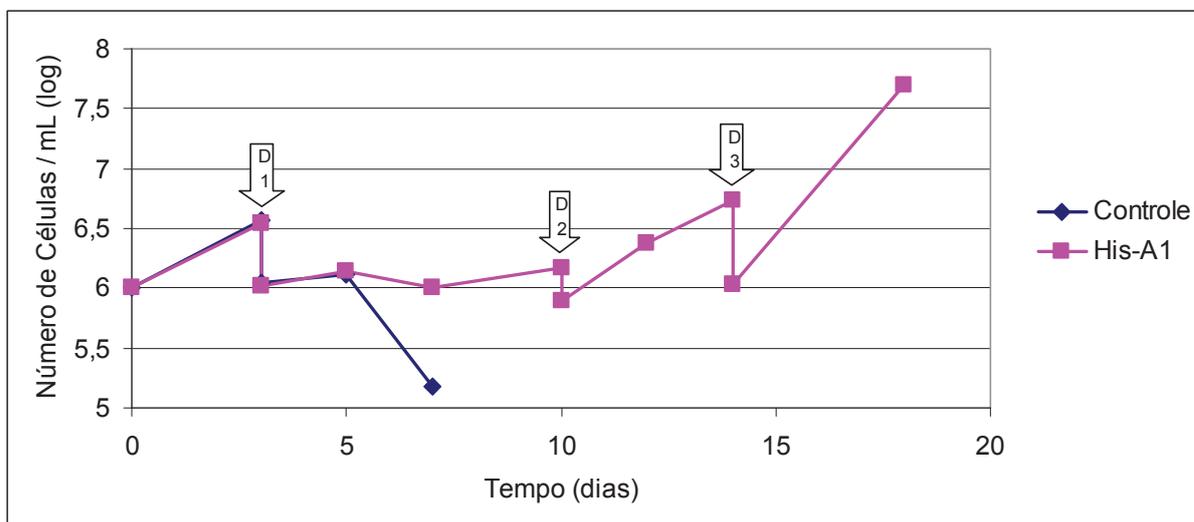


Figura 4.2.4.1: Acompanhamento da seleção de *T. cruzi* transfetado com pTcPR-HisN-A1. Legenda: His-A1 = pTcPR-HisN-A1. Diluições das culturas: D1 = 1:3,33 no 3º dia. D2 = 1:1,92 no 10º dia, somente para His-A1. D3 = 1:5 no 14º dia, somente para His-A1. No 10º dia o controle apresentou número de células inferior a $2,5 \times 10^3$ /ml.

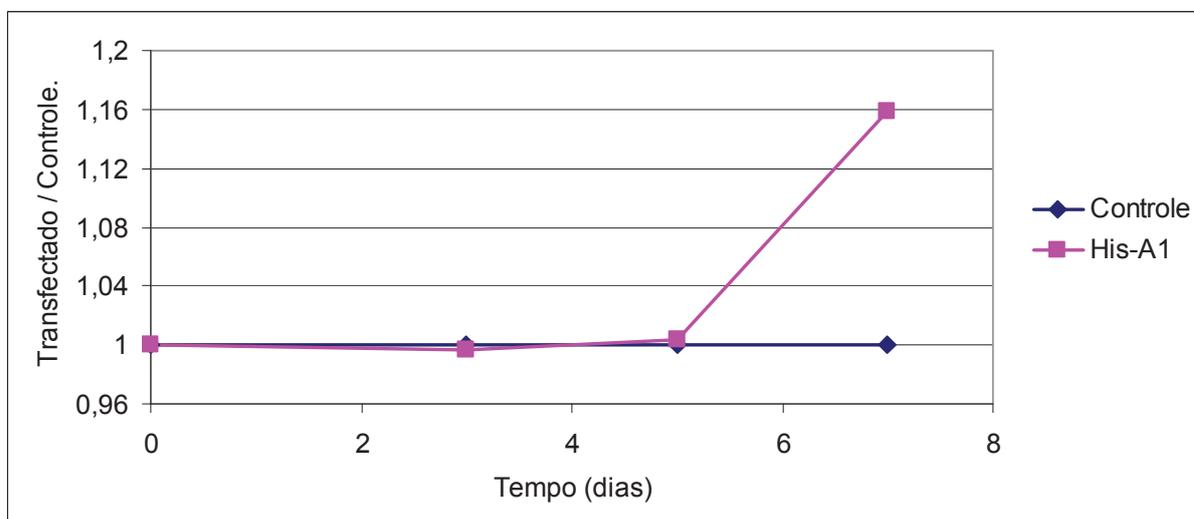


Figura 4.2.4.2: Relação entre a cultura de *T. cruzi* transfetado com pTcPR-HisN-A1 e a cultura controle. Legenda: His-A1 = pTcPR-HisN-A1.

No segundo grupo de transfecções (**Figura 4.2.4.3**), a segunda diluição não foi efetuada para o controle e para 4 das 12 culturas, CFP-C1, TAP-C1, GFP-C1 e GFP-C4, pois apresentavam contagem de células inferior às demais. Vale ressaltar que, dentre estas, 3 haviam sido transfectadas com C1, com quantidades de DNA semelhantes às demais.

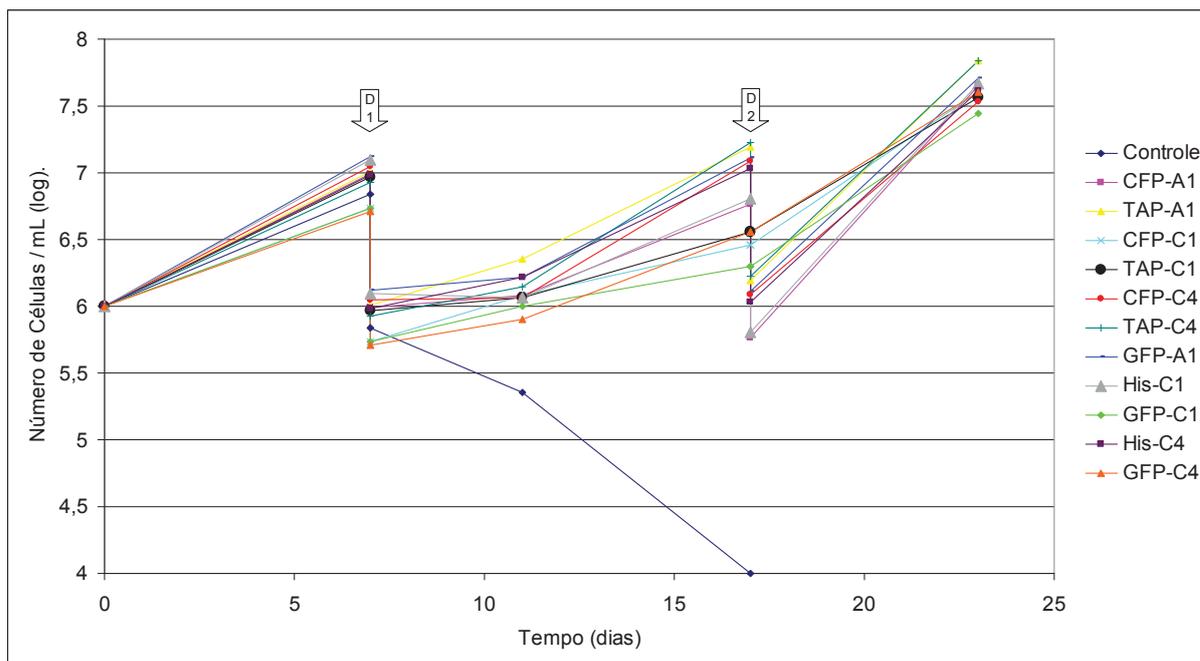


Figura 4.2.4.3: Acompanhamento das seleções de *T. cruzi* transfectado com diversos vetores. Legenda: CFP-A1 = pTcPR-CFPN-A1, TAP-A1 = pTcPR-TAPN-A1, CFP-C1 = pTcPR-CFPN(C1), TAP-C1 = pTcPR-TAPN-C1, CFP-C4 = pTcPR-CFPN(C4), TAP-C4 = pTcPR-TAPN-C4, GFP-A1 = pTcPR-GFPN-A1, His-C1 = pTcPR-HisN-C1, GFP-C1 = pTcPR-GFPN-C1, His-C4 = pTcPR-HisN-C4, GFP-C4 = pTcPR-GFPN-C4. Diluições das culturas: D1 = 1:10 no 7º dia. D2 = 1:10 no 17º dia, somente para CFP-A1, TAP-A1, CFP-C4, TAP-C4, GFP-A1, His-C1 e His-C4.

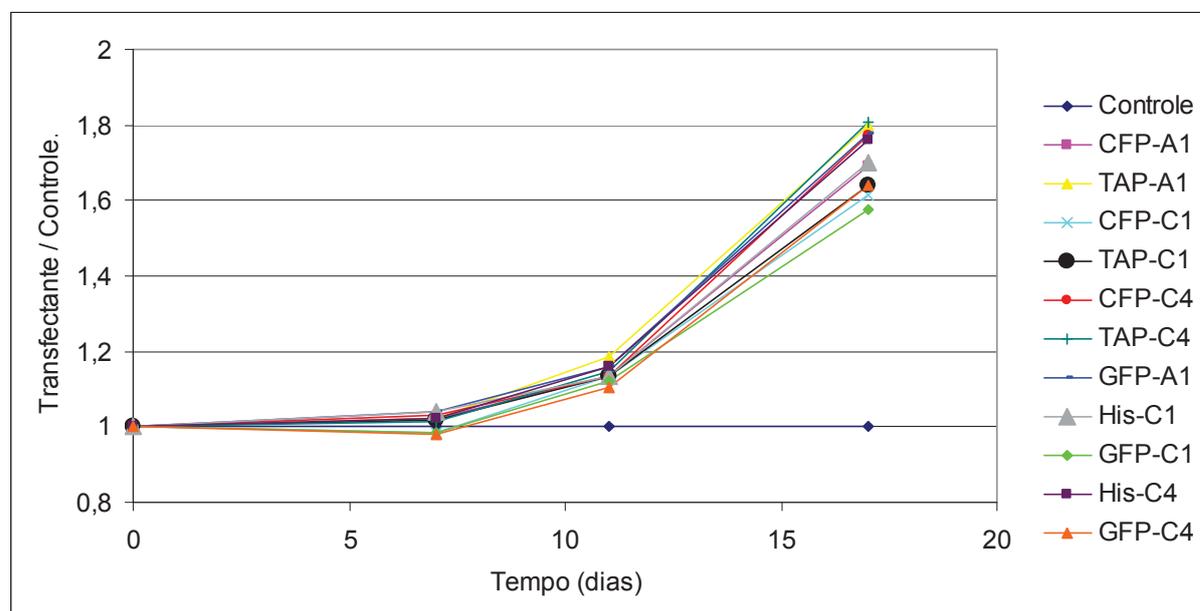


Figura 4.2.4.4: Relação entre as culturas de *T. cruzi* transfectado com diversos vetores e a cultura controle. Legenda: CFP-A1 = pTcPR-CFPN-A1, TAP-A1 = pTcPR-TAPN-A1, CFP-C1 = pTcPR-CFPN(C1), TAP-C1 = pTcPR-TAPN-C1, CFP-C4 = pTcPR-CFPN(C4), TAP-C4 = pTcPR-TAPN-C4, GFP-A1 = pTcPR-GFPN-A1, His-C1 = pTcPR-HisN-C1, GFP-C1 = pTcPR-GFPN-C1, His-C4 = pTcPR-HisN-C4, GFP-C4 = pTcPR-GFPN-C4.

Caso semelhante ao ocorrido no grupo 2, também pode ser observado no terceiro grupo de transfecções (**Figura 4.2.4.5**), envolvendo as culturas Myc-C1 e YFP-C1.

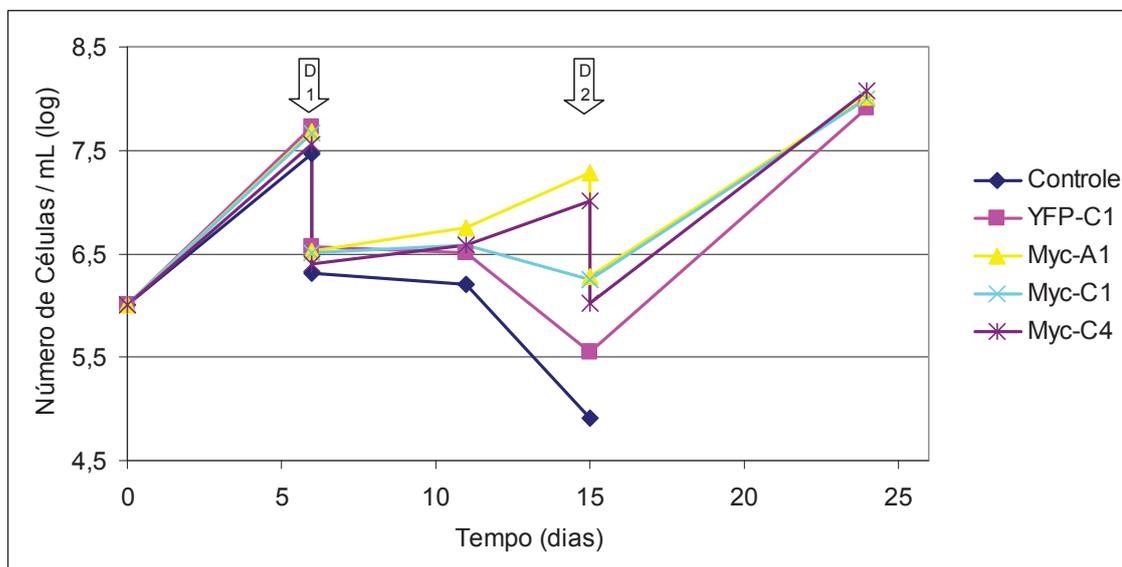


Figura 4.2.4.5: Acompanhamento das seleções de *T. cruzi* transfetado com pTcPR-mycN e pTcPR-YFPN-C1. Legenda: YFP-C1 = pTcPR-YFPN-C1, Myc-A1 = pTcPR-mycN-A1, Myc-C1 = pTcPR-mycN-C1, Myc-C4 = pTcPR-mycN-C4. Diluições das culturas: D1 = 1:14,28 no 6º dia. D2 = 1:10 no 15º dia, somente para Myc-A1 e Myc-C4.

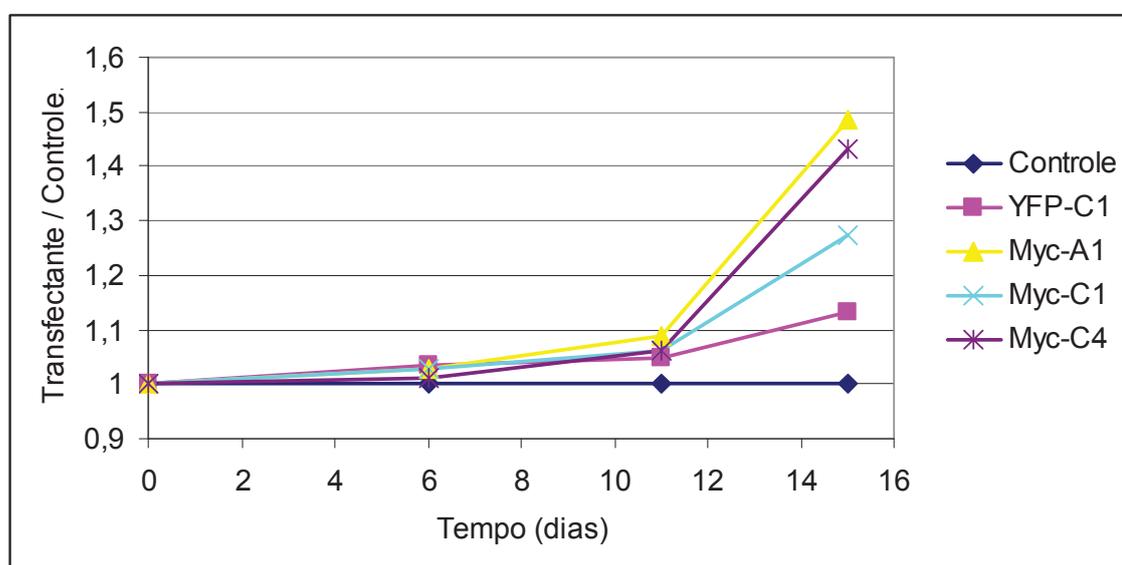


Figura 4.2.4.6: Relação entre as culturas de *T. cruzi* transfetado com pTcPR-mycN ou pTcPR-YFPN-C1 e a cultura controle. . Legenda: YFP-C1 = pTcPR-YFPN-C1, Myc-A1 = pTcPR-mycN-A1, Myc-C1 = pTcPR-mycN-C1, Myc-C4 = pTcPR-mycN-C4.

Na **Figura 4.2.4.7** pode-se avaliar o desenvolvimento das culturas do grupo 4 em um intervalo de 10 dias, sem intervenção de diluições. A diferença entre o controle e os transfetados foi na grandeza de 10^3 , após 10 dias de seleção.

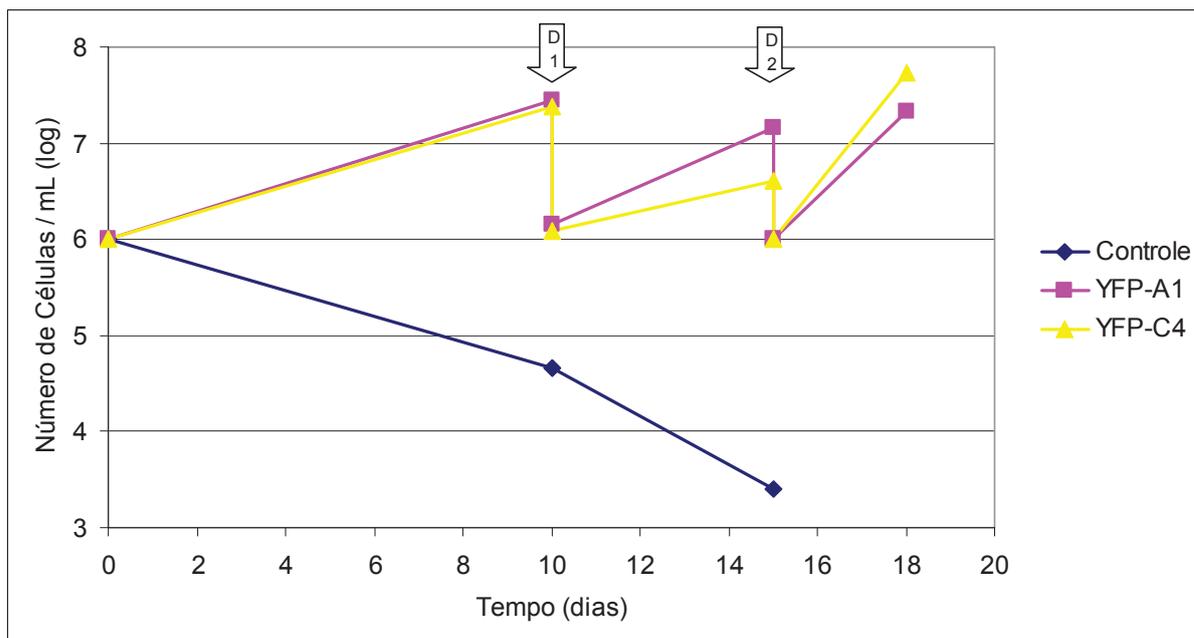


Figura 4.2.4.7: Acompanhamento das seleções de *T. cruzi* transfetado com pTcPR-YFP. Legenda: YFP-A1 = pTcPR-YFPN-A1, YFP-C4 = pTcPR-YFPN(C4). Diluições das culturas: D1 = 1:20 no 10º dia, menos para o controle. D2 = 1:14,28 para YFP-A1 e 1:4 para YFP-C4 no 15º dia.

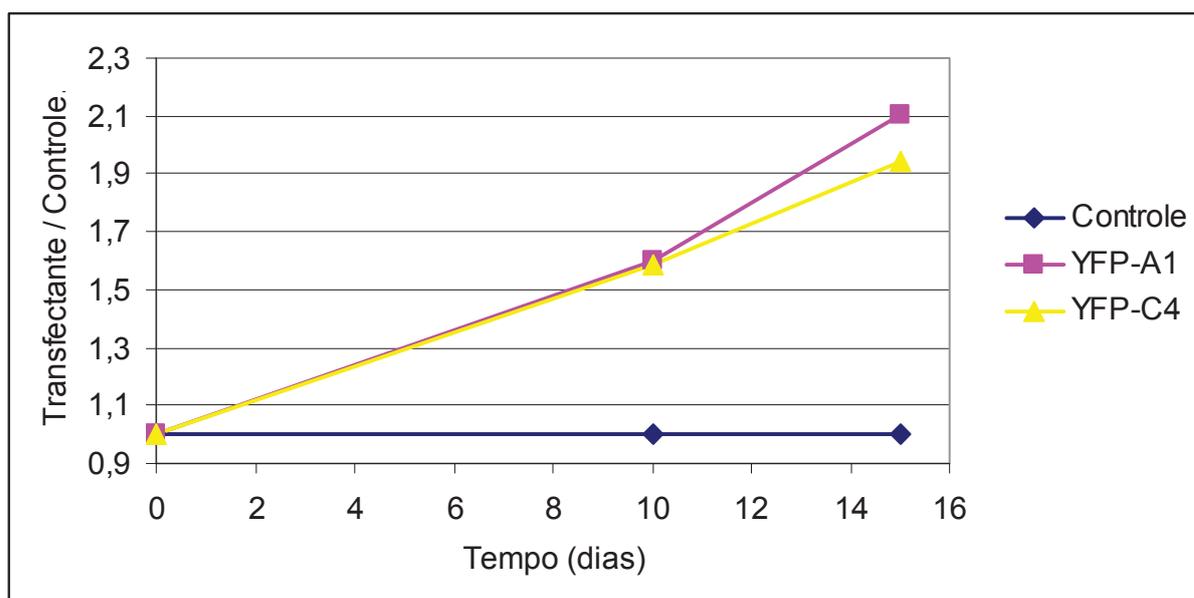


Figura 4.2.4.8: Relação entre as culturas de *T. cruzi* transfetado com pTcPR-YFP e a cultura controle. Legenda: YFP-A1 = pTcPR-YFPN-A1, YFP-C4 = pTcPR-YFPN(C4).

O vetor pTcPT7-HisN não foi caracterizado, pois ainda não dispõe-se de um sistema para expressão da T7 RNA Polimerase e do repressor de tetraciclina em *Trypanosoma cruzi*.

4.2.5 Caracterização Molecular de pTcPR-HisN e Derivados

Alguns vetores possuem a característica de integração cromossômica, como por exemplo, o vetor pLEW13 (WIRTZ *et al.*, 1999) em *Trypanosoma brucei*, enquanto outros permanecem epissomais, como pTEX (KELLY *et al.*, 1992) em *Trypanosoma cruzi*. Alguns testes foram realizados a fim de verificar a ocorrência ou não de integração, além da manutenção da estrutura dos vetores. A estratégia consiste no uso de conjuntos de oligonucleotídeos, anelando em cassetes próximos, o que resultaria na amplificação por PCR de produtos com tamanhos conhecidos. Outra possibilidade, no caso de existirem formas epissomais no parasita, é a amplificação do vetor inteiro. Utilizando-se DNA dos parasitas transfectados, foram realizadas PCRs para amplificação de diversos segmentos que constituem os vetores. Os vetores analisados foram pTcPR-HisN e derivados, recombinados com o gene A1.

Nas PCRs foram utilizados iniciadores para os seguintes segmentos dos vetores: (i) iniciadores A* e R14, amplificando o promotor (0,4 kb); (ii) iniciadores A14 e R5/R6/R7/R20/fita anti-senso do adaptador *c-myc* (**Figura 3.16.3**), (promotor + intergênica + etiquetas - 0,5 a 1,2 kb); (iii) iniciadores A5/A6/A7/fita senso do adaptador *c-myc* e R21, (etiqueta + A1 - 0,7 a 1,4 kb) ou, no caso do vetor contendo etiqueta de histidinas, iniciadores A14 e R20, (promotor + intergênica + etiqueta + A1 - 1,2 kb); (iv) iniciadores A25 e R8, (A1 + intergênica + neomicina - 1,8 kb); (v) iniciadores A8 e R*, (neomicina + intergênica - 1,1 kb); (vi) iniciadores A* e R*, (GSPDm28c + RfA + GSNEO - 3,1 a 3,8 kb); (vii) iniciadores A14 e R14, (vetor inteiro - 5,8 a 6,5 kb). Os iniciadores estão especificados na Tabela 3.8.1, Tabela 3.8.2 e Tabela 3.8.3.

Na **Figura 4.2.5.1**, foi possível verificar amplificação para a maioria dos segmentos de DNA, em seis vetores analisados. As amplificações não ocorreram ou resultaram em bandas de tamanhos inespecíficos apenas para os segmentos compreendendo o vetor inteiro e o cassete GSPDm28c + RfA + GSNEO. Os controles positivos, onde se utilizou DNA plasmidial como molde, também não demonstraram amplificação para os dois maiores produtos, segmentos (vi) e (vii), além das bandas observadas para o segmento (i) apresentarem tamanhos superiores aos esperados. Os controles negativos não apresentaram bandas em nenhuma das amplificações.

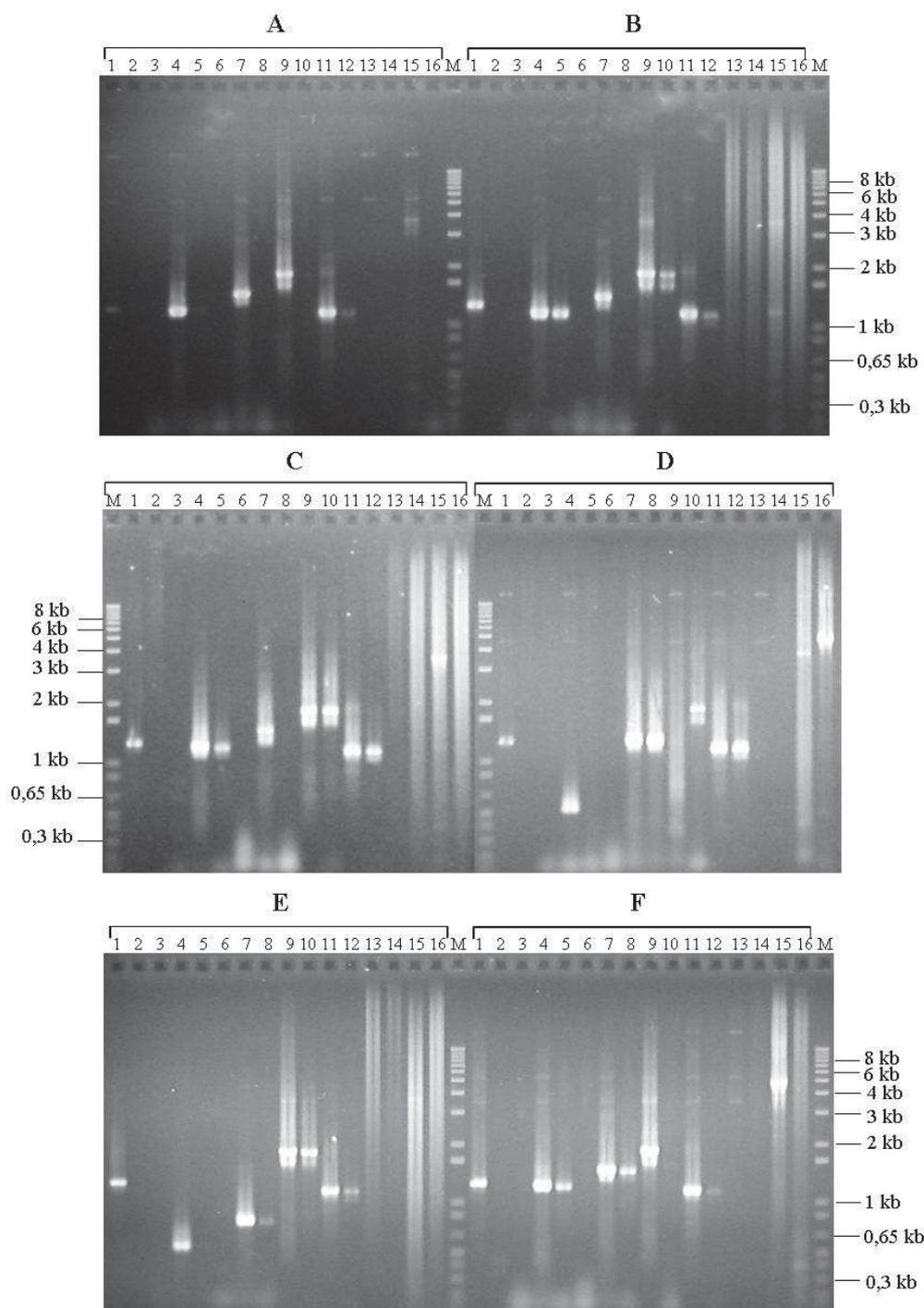


Figura 4.2.5.1: Avaliação da presença e estrutura dos vetores em *Trypanosoma cruzi*. Através de reações de PCR foram analisados os vetores (A) pTcPR-CFPN-A1, (B) pTcPR-TAPN-A1, (C) pTcPR-GFPN-A1, (D) pTcPR-HisN-A1, (E) pTcPR-mycN-A1 e (F) pTcPR-YFPN-A1. Nas reações foram utilizados 50 ng de DNA total dos parasitas ou 2 ng dos plasmídeos (controles positivos). DNA molde utilizado: Canaletas 1, 4, 7, 9, 11, 13, e 15 = controles positivos, 2, 5, 8, 10, 12, 14 e 16 = DNA dos parasitas transfectados, 3 e 6* = DNA dos parasitas não transfectados (controles negativos). Iniciadores utilizados para amplificação dos seguintes segmentos: Canaletas 1 e 2 = promotor (0,4 kb), 3-5 = promotor + intergênica + etiquetas (0,5 a 1,2 kb), 6-8** = etiqueta + A1 (0,7 a 1,4 kb), 9 e 10 = A1 + intergênica + neomicina (1,8 kb), 11 e 12 = neomicina + intergênica (1,1 kb), 13 e 14 = GSPDm28c + RfA + GSNEO (3,1 a 3,8 kb), 15 e 16 = vetor inteiro (5,8 a 6,5 kb). Canaletas M = 1 kb Plus (Invitrogen). * = Foram apresentados controles negativos apenas para dois segmentos (canaletas 3 e 6). ** = em A foi amplificado promotor + intergênica + etiqueta + A1 (1,2 kb).

Complementando os testes acima, um segmento de aproximadamente 4 kb foi analisado por PCR, apenas para o vetor pTcPR-HisN-A1. O iniciador retrógrado (R14, Tabela 3.8.2) deveria anelar na região promotora e o iniciador anterógrado (A8, Tabela 3.8.2), na resistência a neomicina. Foi amplificado um fragmento de aproximadamente 4 kb (**Figura 4.2.5.2**), estando de acordo com a análise *in silico*.

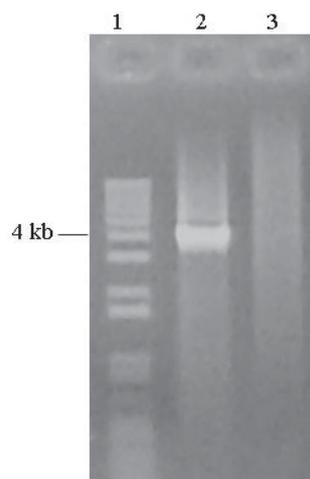


Figura 4.2.5.2: Avaliação complementar do vetor pTcPR-HisN-A1 em *Trypanosoma cruzi*. PCR realizada com 100 ng de DNA e visualizada em gel de agarose 0,8%. Canaletas 1 = 1 kb Plus (Invitrogen), 2 = DNA do parasita transfectado, 3 = DNA do parasita não transfectado. Foram utilizados iniciadores para amplificação de um fragmento de aproximadamente 4 kb.

4.2.6 Avaliação da Expressão e Localização das Proteínas Recombinantes

Nesta etapa, através da análise do gel SDS-PAGE, corado com Coomassie, não foram observadas diferenças entre os extratos das culturas de *T. cruzi* transfectadas e não transfectadas. Após transferência dos extratos para membrana de nitrocelulose, fez-se a incubação com anticorpo monoclonal anti-histidina (**Figura 4.2.6.1**). Nesta análise, além de se observar a presença das proteínas recombinantes nos extratos, fez-se a comparação de tamanho com as proteínas produzidas em *Escherichia coli*. Foram detectadas bandas de intensidade fraca para os extratos e com tamanhos similares aos das proteínas produzidas em *E. coli*, exceto para C4, a qual apresentou uma diferença de aproximadamente 5 kDa.

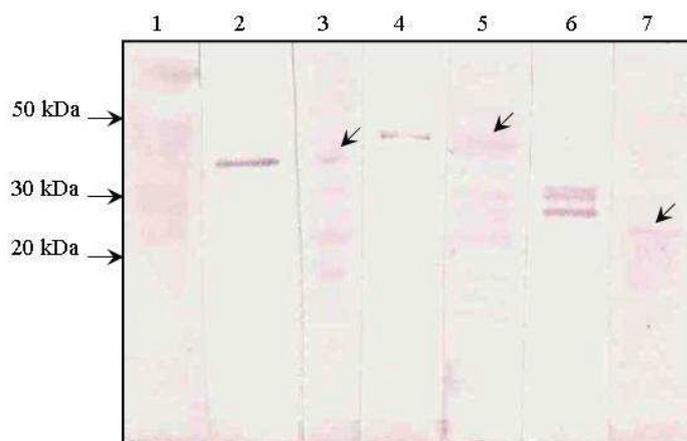


Figura 4.2.6.1: Análise dos extratos de *T. cruzi* transfetado com pTcPR-HisN por western blot com anticorpo monoclonal anti-histidina. Extratos de 1×10^7 células e 0,5 μ l de proteínas recombinantes, produzidas em *Escherichia coli*, foram analisados. O tempo de revelação para cada canaleta está entre parênteses. Canaletas 1 = *T. cruzi* não transfetado (9 min), 2 = A1 produzida em *E. coli* (5 min), 3 = *T. cruzi* transfetado com pTcPR-HisN-A1 (9 min), 4 = C1 produzida em *E. coli* (9 min), 5 = *T. cruzi* transfetado com pTcPR-HisN-C1 (9 min), 6 = C4 produzida em *E. coli* (5 min), 7 = *T. cruzi* transfetado com pTcPR-HisN-C4 (9 min). As setas em 3, 5 e 7 indicam as proteínas recombinantes nos extratos. Utilizou-se Bench Mark (Invitrogen) como marcador de peso molecular.

Os extratos analisados acima também foram incubados com anticorpos contra as proteínas recombinantes (**Figura 4.2.6.2**). Diferentemente do anticorpo anti-histidina, estes anticorpos possuem especificidade para as proteínas nativas de *T. cruzi*, além das proteínas recombinantes. Nos extratos foram verificadas bandas correspondentes aos dois tipos de proteínas, com diferenças de tamanhos de aproximadamente 5 kilodáltons. Neste ensaio também foram adicionadas proteínas produzidas em *E. coli* e como visto no ensaio com anti-histidina, a proteína recombinante C4 presente no extrato apresentou tamanho diferente da proteína produzida em *E. coli*.

A expressão protéica nos parasitas transfetados com pTcPR-GFPN foi avaliada com anticorpo monoclonal anti-GFP, além de anticorpos contra as proteínas recombinantes (**Figura 4.2.6.3**). A diferença de tamanho entre as proteínas recombinantes e as proteínas nativas foi de aproximadamente 30 kilodáltons. A banda correspondente à proteína recombinante C1 com anti-GFP foi visualizada somente na membrana, devido à perda de sinal na imagem digitalizada.

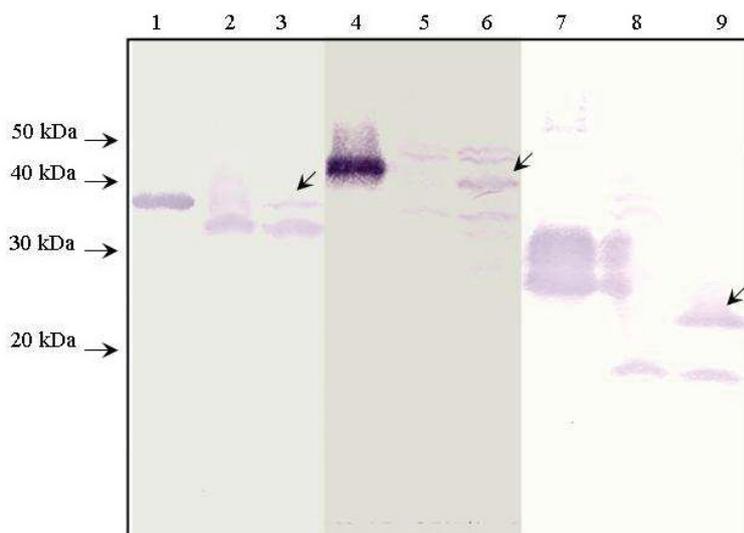


Figura 4.2.6.2: Análise dos extratos de *T. cruzi* transfetado com pTcPR-HisN por western blot com anticorpos contra as proteínas recombinantes. Extratos de 1×10^7 células e $0,5 \mu\text{l}$ de proteínas recombinantes, produzidas em *Escherichia coli*, foram analisados com anticorpos contra (1-3) A1, (4-6) C1 e (7-9) C4. O tempo de revelação para cada canaleta está entre parênteses. Canaletas 1 = A1 produzida em *E. coli* (1 min e 30 s), 2 = *T. cruzi* não transfetado (1 min e 30 s), 3 = *T. cruzi* transfetado com pTcPR-HisN-A1 (1 min e 30 s), 4 = C1 produzida em *E. coli* (3 min e 30 s), 5 = *T. cruzi* não transfetado (3 min e 30 s), 6 = *T. cruzi* transfetado com pTcPR-HisN-C1 (3 min e 30 s), 7 = C4 produzida em *E. coli* (1 min e 30 s), 8 = *T. cruzi* não transfetado (1 min e 30 s), 9 = *T. cruzi* transfetado com pTcPR-HisN-C4 (1 min e 30 s). As setas em 3, 6 e 9 indicam as proteínas recombinantes nos extratos. Utilizou-se Bench Mark (Invitrogen) como marcador de peso molecular.

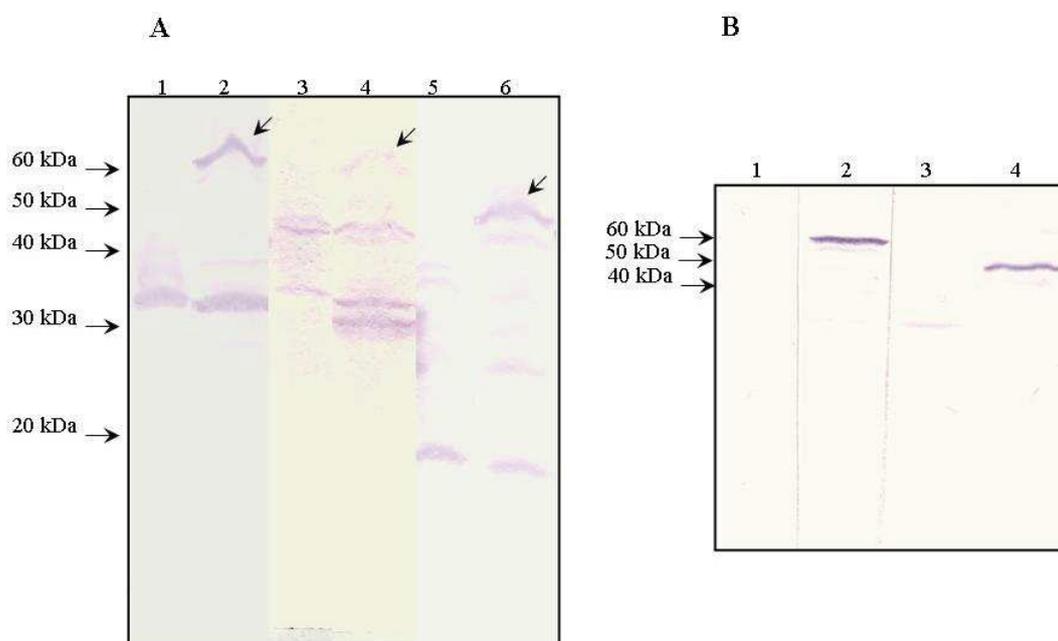


Figura 4.2.6.3: Análise dos extratos de *T. cruzi* transfetado com pTcPR-GFPN por western blot com anticorpos contra as proteínas recombinantes e contra GFP. Extratos de 1×10^7 células foram analisados com anticorpos contra A1 (A - 1 e 2), C1 (A - 4 e 5), C4 (A - 6 e 7) e GFP (B). Em A, canaletas 1, 3 e 5 = *T. cruzi* não transfetado, 2 = *T. cruzi* transfetado com pTcPR-GFPN-A1, 4 = *T. cruzi* transfetado com pTcPR-GFPN-C1, 6 = *T. cruzi* transfetado com pTcPR-GFPN-C4. As setas em 2, 4 e 6 indicam as proteínas recombinantes. Em B, canaletas 1 = *T. cruzi* não transfetado, 2 = *T. cruzi* transfetado com pTcPR-GFPN-A1, 3 = *T. cruzi* transfetado com pTcPR-GFPN-C1, 4 = *T. cruzi* transfetado com pTcPR-GFPN-C4. O tempo de revelação para cada canaleta em A foi igual ao da Figura 4.2.6.2, em B foi de 4 min (2) e 11 min (1, 3 e 4). Utilizou-se Bench Mark (Invitrogen) como marcador de peso molecular.

A avaliação dos extratos dos parasitas transfectados com pTcPR-CFPN e pTcPR-YFPN foi feita somente com anticorpos contra as proteínas recombinantes (**Figura 4.2.6.4 e Figura 4.2.6.5**). O resultado foi semelhante ao obtido na avaliação do vetor pTcPR-GFPN, no entanto a intensidade da banda correspondente à proteína recombinante C1 na **Figura 4.2.6.4** foi mais forte. Na **Figura 4.2.6.5**, canaleta 5, referente ao extrato do parasita não transfectado incubado com anticorpo contra C4, foi observada uma banda adicional entre 30 e 40 kilodáltons. Esta banda pode ser detectada nas outras figuras, utilizando o mesmo extrato e anticorpo, no entanto, com intensidade mais fraca.

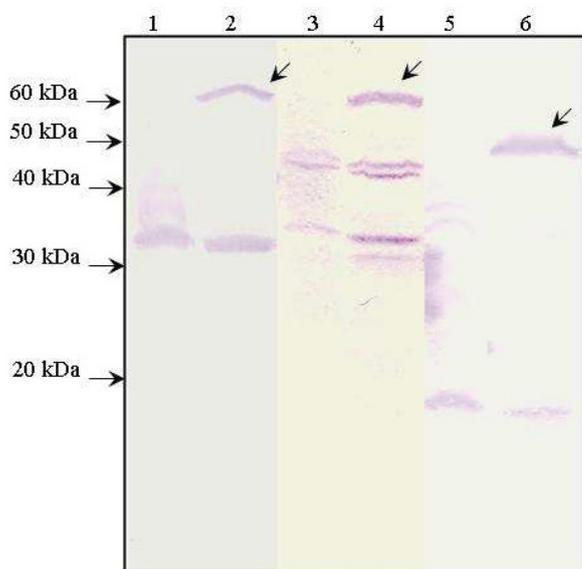


Figura 4.2.6.4: Análise dos extratos de *T. cruzi* transfectado com pTcPR-CFPN através de western blot com anticorpos contra as proteínas recombinantes. Extratos de 1×10^7 células foram analisados com anticorpos contra (1 e 2) A1, (4 e 5) C1, (6 e 7) C4. Canaletas 1, 3 e 5 = *T. cruzi* não transfectado, 2 = *T. cruzi* transfectado com pTcPR-CFPN-A1, 4 = *T. cruzi* transfectado com pTcPR-CFPN(C1), 6 = *T. cruzi* transfectado com pTcPR-CFPN(C4). As setas em 2, 4 e 6 indicam as proteínas recombinantes. O tempo de revelação para cada canaleta foi igual ao da Figura 4.2.6.2. Utilizou-se Bench Mark (Invitrogen) como marcador de peso molecular.

A expressão protéica nos parasitas transfectados com pTcPR-mycN e pTcPR-TAPN foi avaliada com anticorpos contra as proteínas recombinantes. No caso de pTcPR-mycN, também utilizou-se anticorpo monoclonal anti-*c-myc* (**Figura 4.2.6.6 e Figura 4.2.6.7**). A análise com anticorpo anti-*c-myc*, semelhante à com anti-GFP, apresentou para a proteína recombinante C1 uma banda com intensidade mais fraca, comparando-se com as demais proteínas recombinantes.

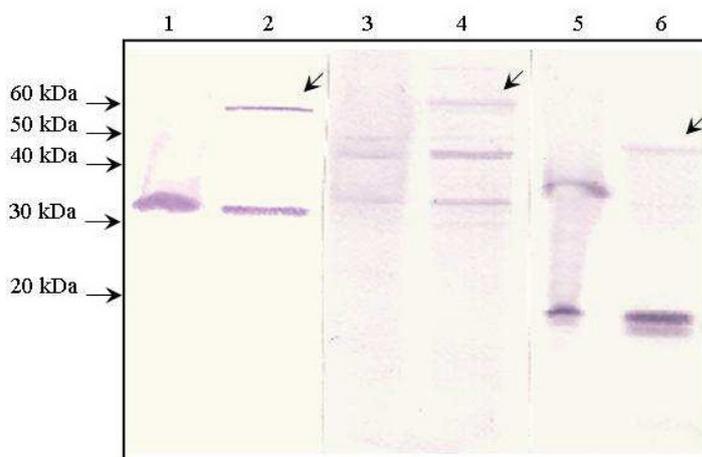


Figura 4.2.6.5: Análise dos extratos de *T. cruzi* transfetado com pTcPR-YFPN através de western blot com anticorpos contra as proteínas recombinantes. Extratos de 1×10^7 células foram analisados com anticorpos contra (1 e 2) A1, (4 e 5) C1, (6 e 7) C4. O tempo de revelação para cada canaleta está entre parênteses. Canaletas 1 = *T. cruzi* não transfetado (1 min e 30 s), 2 = *T. cruzi* transfetado com pTcPR-YFPN-A1 (1 min e 30 s), 3 = *T. cruzi* não transfetado (8 min e 50 s) 4 = *T. cruzi* transfetado com pTcPR-YFPN-C1 (8 min e 50 s), 5 = *T. cruzi* não transfetado (6 min e 20 s) 6 = *T. cruzi* transfetado com pTcPR-YFPN(C4) (6 min e 20 s). As setas em 2, 4 e 6 indicam as proteínas recombinantes. Bench Mark (Invitrogen) como marcador de peso molecular.

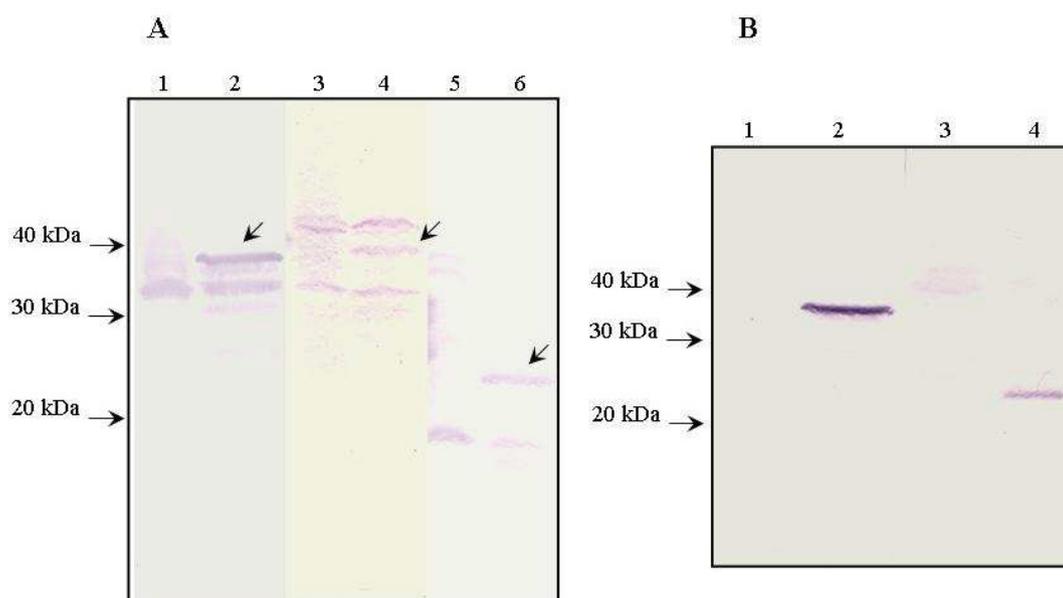


Figura 4.2.6.6: Análise dos extratos de *T. cruzi* transfetado com pTcPR-mycN por western blot com anticorpos contra as proteínas recombinantes e contra *c-myc*. Extratos de 1×10^7 células foram analisados com anticorpos contra (A - 1 e 2) A1, (A - 4 e 5) C1, (A - 6 e 7) C4 e (B) *c-myc*. Em A, canaletas 1, 3 e 5 = *T. cruzi* não transfetado, 2 = *T. cruzi* transfetado com pTcPR-mycN-A1, 4 = *T. cruzi* transfetado com pTcPR-mycN-C1, 6 = *T. cruzi* transfetado com pTcPR-mycN-C4. As setas em 2, 4 e 6 indicam as proteínas recombinantes. Em B, canaletas 1 = *T. cruzi* não transfetado, 2 = *T. cruzi* transfetado com pTcPR-mycN-A1, 3 = *T. cruzi* transfetado com pTcPR-mycN-C1, 4 = *T. cruzi* transfetado com pTcPR-mycN-C4. O tempo de revelação para cada canaleta em A foi igual ao da Figura 4.2.6.2, em B foi de 6 min (1 e 2) e 12 min (3 e 4). Utilizou-se Bench Mark (Invitrogen) como marcador de peso molecular.

O ensaio com os extratos dos transfectantes contendo etiqueta TAP tag, apresentou bandas para as 3 proteínas recombinantes (A1, C1 e C4) (**Figura**

4.2.6.7). Tais bandas possuem tamanhos compatíveis com as proteínas recombinantes fusionadas com TAP tag.

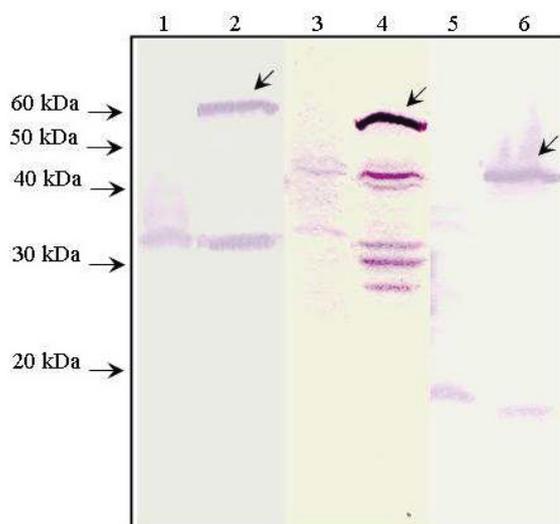


Figura 4.2.6.7: Análise dos extratos de *T. cruzi* transfetado com pTcPR-TAPN por western blot com anticorpos contra as proteínas recombinantes. Extratos de 1×10^7 células foram analisados com anticorpos contra A1 (A - 1 e 2), C1 (A - 4 e 5) e C4 (A - 6 e 7). Canaletas 1, 3 e 5 = *T. cruzi* não transfetado, 2 = *T. cruzi* transfetado com pTcPR-TAPN-A1, 4 = *T. cruzi* transfetado com pTcPR-TAPN-C1, 6 = *T. cruzi* transfetado com pTcPR-TAPN-C4. As setas em 2, 4 e 6 indicam as proteínas recombinantes. O tempo de revelação para cada canaleta foi igual ao da Figura 4.2.6.2. Utilizou-se Bench Mark (Invitrogen) como marcador de peso molecular.

Os ensaios de localização celular através das proteínas fluorescentes GFP, CFP e YFP demonstraram correlação com o padrão de localização obtido com os anticorpos, para pelo menos duas das três proteínas utilizadas no processo de validação destes vetores. Além dos parasitas transfetados, também foram utilizados parasitas não transfetados, servindo como controle negativo (**Figura 4.2.6.8**).

O gene A1 codifica uma proteína hipotética conservada, a qual possui um domínio PFAM denominado ALBA (*Acetylation Lowers Binding Affinity*). Acredita-se que esta proteína tenha capacidade de ligar-se ao RNA, podendo estar associada com metabolismo e estabilidade do mesmo (ARAVIND *et al.*, 2003; MARSH *et al.*, 2005). A localização realizada em outro projeto (PRETI, 2007), obtida com anticorpo, apresentou um padrão de distribuição pelo citoplasma na forma de grânulos. As proteínas recombinantes apresentaram um padrão de localização similar (**Figura 4.2.6.9**).

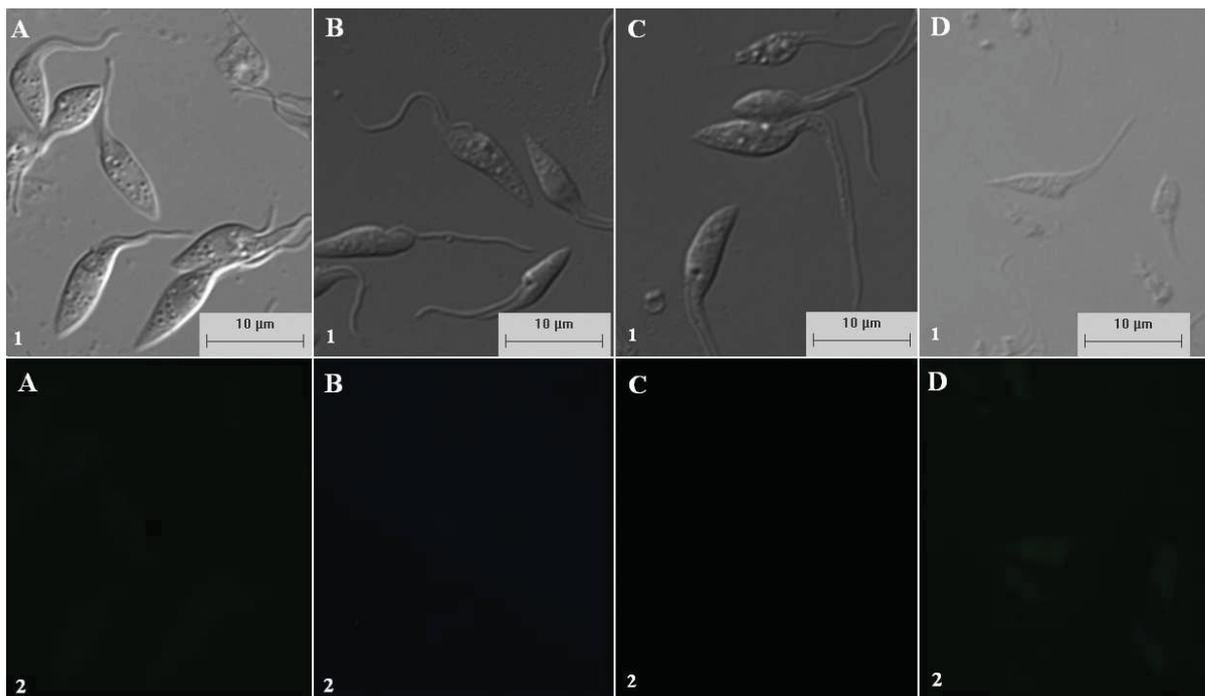


Figura 4.2.6.8: Controle negativo da localização celular, utilizando parasitas não transfectados. 1 = contraste diferencial de fase, 2 = microscopia utilizando os filtros (A) para GFP, (B) CFP, (C) YFP. Em D utilizou-se anticorpo anti-*c-myc*.

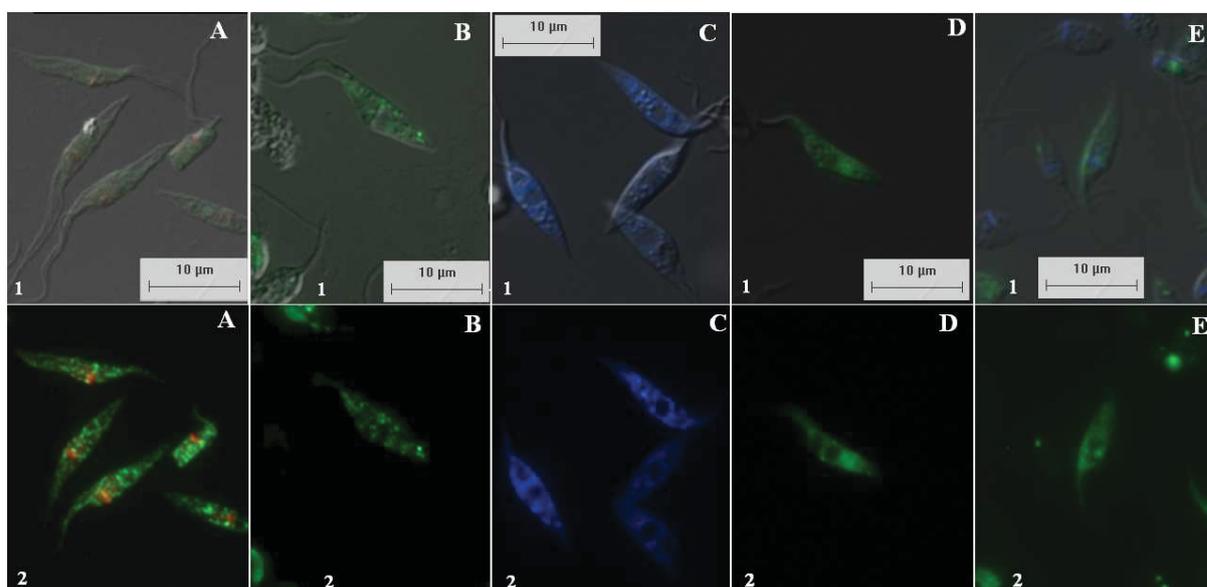


Figura 4.2.6.9: Localização celular da proteína A1. A = imunofluorescência usando anticorpo anti-A1, B = GFP, C = CFP, D = YFP e E = imunofluorescência usando anticorpo anti-*c-myc*. 1 = sobreposição da imagem 2 com a imagem do contraste diferencial de fase, 2 = detecção da fluorescência. Em A (vermelho) e E (azul), utilizou-se corante para DNA.

A proteína codificada pelo gene C1 está anotada como sintaxina e possui um domínio PFAM denominado SNARE. Este domínio possui relação com tráfego de vesículas dentro da célula. A localização obtida com anticorpo contra esta proteína demonstrou sua presença numa região próxima ao cinetoplasto, estando entre este

e o flagelo. As proteínas recombinantes apresentaram localização divergente, ou distribuída pelo citoplasma ou posterior ao núcleo (**Figura 4.2.6.10**).

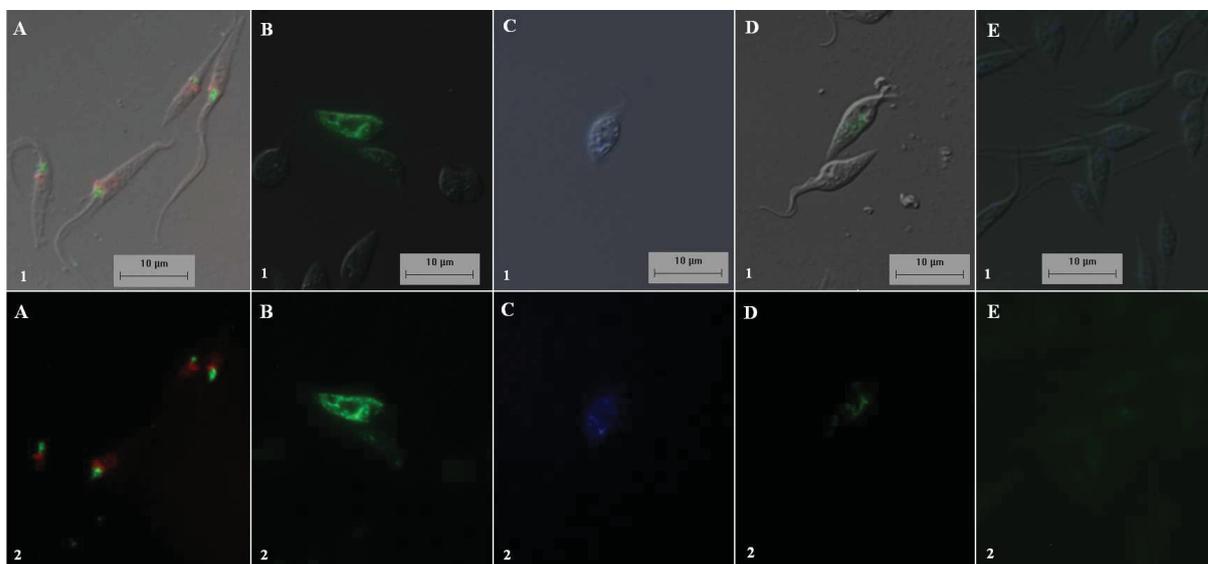


Figura 4.2.6.10: Localização celular da proteína C1. A = imunofluorescência usando anticorpo anti-C1, B = GFP, C = CFP, D = YFP e E = imunofluorescência usando anticorpo anti-*c-myc*. 1 = sobreposição da imagem 2 com a imagem do contraste diferencial de fase, 2 = detecção da fluorescência. Em A (vermelho) e E (azul), utilizou-se corante para DNA.

A terceira proteína utilizada na validação, codificada pelo gene C4, apresenta três domínios denominados *EF-hand*, sendo uma suposta centrina. As centrinas são proteínas pertencentes à grande família das proteínas ligadoras de cálcio e fazem parte do centrossomo, que está associado aos centríolos. Na imunofluorescência, apresentou co-localização com o cinetoplasto. Um resultado aparentemente similar foi encontrado na localização das proteínas recombinantes (**Figura 4.2.6.11**).

As localizações por imunofluorescência com anticorpo anti-*c-myc* foram mais evidentes apenas para a proteína codificada pelo gene A1, onde a localização foi similar à obtida com anticorpo contra a proteína recombinante (**Figura 4.2.6.9**). As outras duas proteínas utilizadas na validação foram fracamente detectadas, sugerindo talvez uma questão de baixo sinal, relacionada à disponibilidade de epítomos.

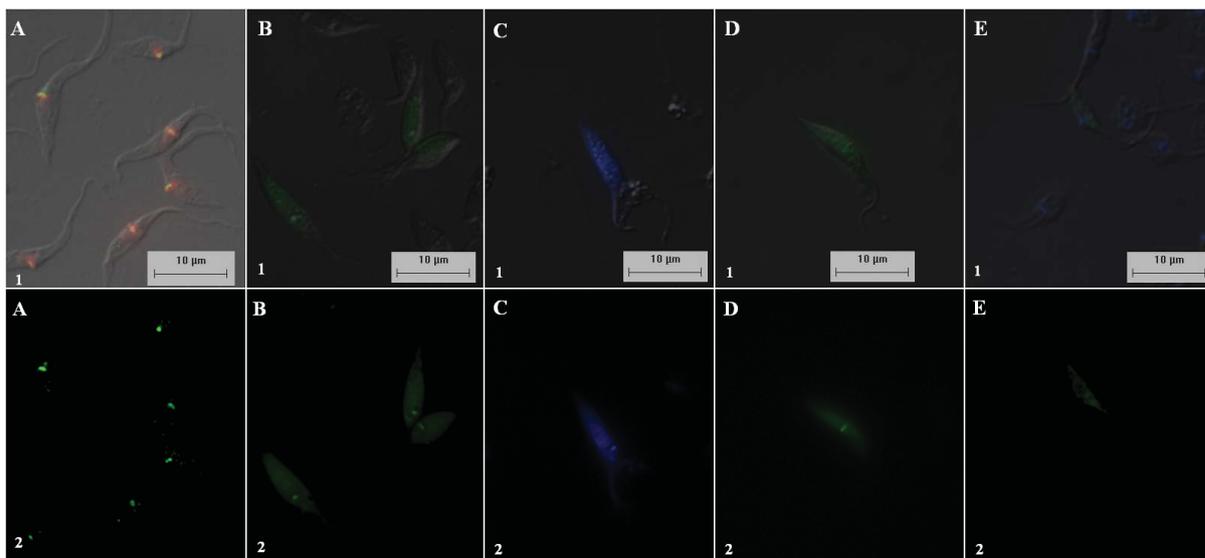


Figura 4.2.6.11: Localização celular da proteína C4. A = imunofluorescência usando anticorpo anti-C4, B = GFP, C = CFP, D = YFP e E = imunofluorescência usando anticorpo anti-*c-myc*. 1 = sobreposição da imagem 2 com a imagem do contraste diferencial de fase, 2 = detecção da fluorescência. Em A (vermelho) e E (azul), utilizou-se corante para DNA.

4.2.7 Purificação de Complexos Protéicos (TAP tag) e Proteínas Contendo Cauda de Histidinas

A validação do vetor pTcPR-TAPN foi feita utilizando-se os genes A1 e C4. Os extratos obtidos em condições não desnaturantes foram purificados seqüencialmente em duas colunas. Os eluídos contendo os complexos protéicos foram concentrados e avaliados por SDS-PAGE. Na **Figura 4.2.7.1**, foi possível observar padrões eletroforéticos distintos entre os eluídos, sugerindo a presença de proteínas específicas para os complexos analisados.

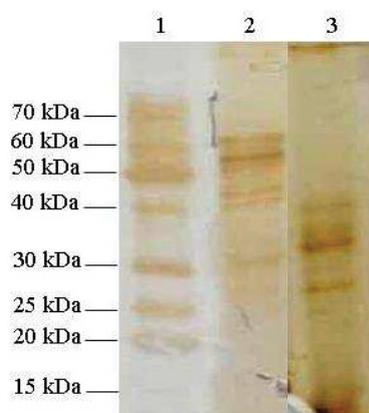


Figura 4.2.7.1: Avaliação dos complexos protéicos eluídos após purificação por TAP tag. 20 µl dos concentrados dos eluídos foram submetidos a SDS-PAGE, posteriormente corado por prata. Canaletas 1 = Bench Mark (Invitrogen), 2 = eluído correspondente ao parasita transfetado com pTcPR-TAPN-A1, 3 = eluído correspondente ao parasita transfetado com pTcPR-TAPN-C4.

A purificação protéica por IMAC foi realizada somente para a proteína A1. Com os resultados obtidos não foi possível a detecção da proteína no eluído. Este ensaio deverá ser otimizado, trabalhando-se com o número de células utilizadas, a quantidade de resina e os diferentes protocolos para eluição.

5 DISCUSSÃO

Informações crescentes sobre as seqüências gênicas de diferentes organismos, com a execução de projetos de seqüenciamento de genomas, marcam uma nova era na pesquisa biológica. Ferramentas têm sido desenvolvidas para permitir tanto a manipulação da nova informação gerada quanto para permitir a avaliação funcional deste conjunto de dados genômicos disponibilizados. Graças a este conjunto de ferramentas, torna-se possível investigar uma célula pelo conjunto de genes expressos frente a uma condição em particular. Assim, é possível identificar os genes que são expressos ou reprimidos em determinadas situações biológicas, fazendo com que o estudo dos fenômenos biológicos seja possível de ser feito de forma global.

Entre as ferramentas desenvolvidas nos últimos anos, estão os microarranjos (*biochips*) de DNA (SCHENA *et al.*, 1995). O Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP) trabalha com microarranjos de DNA desde o ano 2000 e a versão atual do *biochip* conta com aproximadamente 10.000 sondas. Com este recurso, o IBMP emprega esforços na seleção de genes diferencialmente expressos nos processos de diferenciação do *T. cruzi*, sendo estes candidatos a serem estudados.

Uma importante forma para o estudo de genes é a caracterização por genética reversa, que utiliza ferramentas, tais como plasmídeos, cosmídeos e cromossomos artificiais (BACs ou YACs). Neste trabalho foram desenvolvidos vetores que permitem a rápida e eficiente clonagem para expressão protéica nos tripanossomatídeos *Crithidia fasciculata* e *Trypanosoma cruzi*.

Estas construções são formadas por elementos, tais como promotores, regiões intergênicas e resistências a antibióticos. Na escolha destes elementos, alguns fatores foram levados em conta. Iniciando-se pela avaliação dos promotores disponíveis, pode-se considerar que em tripanossomatídeos poucos promotores foram caracterizados (VANHAMME e PAYS, 1995). Dentre estes, estão os promotores para as glicoproteínas variantes de superfície (VSGs) e prociclinas em *T. brucei* e para a seqüência líder e RNA ribossomal em *T. cruzi* (SHEA *et al.*, 1987; MCCARTHY-BURKE *et al.* 1989; CLAYTON *et al.*, 1990; TYLER-CROSS *et al.*, 1995).

A ocorrência independente do capeamento e da transcrição de mRNAs em tripanossomatídeos torna possível a transcrição de genes codificadores de proteínas por promotores para RNA Polimerase I (RUDENKO *et al.* 1991; ZOMERDIJK *et al.*, 1991; SHERMAN *et al.*, 1991; RUDENKO *et al.* 1992; BROWN *et al.*, 1992; JANZ e CLAYTON, 1994). Isto permite a utilização de promotores ribossomais em vetores para expressão protéica nestes organismos (TYLER-CROSS *et al.*, 1995; BIEBINGER & CLAYTON, 1996; MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 1997).

Os promotores para RNA ribossomal têm demonstrado serem espécie-específicos para vários eucariotos (GRUMMT *et al.*, 1982; MISHIMA *et al.*, 1982; LEARNED *et al.*, 1985; BELL *et al.*, 1990). Além disso, em ensaios de transfecção em *T. cruzi* com vetor carregando este promotor, foi observada a existência de especificidade intra-espécie (NUNES *et al.*, 1997).

Outro promotor comumente empregado em vetores é o do bacteriófago T7, que também tem sido usado em vetores para tripanossomatídeos (WIRTZ *et al.*, 1994; 1998; 1999; WEN *et al.*, 2001). Este promotor pode ser combinado com operadores bacterianos, a fim de possibilitar a regulação da expressão gênica pela T7 RNA Polimerase (T7RNP). Em *T. cruzi*, o uso deste sistema tem demonstrado aumento de mais de 100 vezes no nível do mRNA analisado e o nível de expressão gênica basal na ausência de indução apresentou-se baixo (TAYLOR & KELLY, 2006).

Entre as possibilidades de aplicação da expressão gênica regulada, estão as situações experimentais onde a expressão de produtos gênicos tóxicos é bastante informativa. Pode-se citar como exemplos a expressão dominante negativa de subunidades inativas de complexos protéicos. Outras situações que requerem o uso de expressão gênica regulada são os casos onde a expressão de um produto gênico é inapropriada em determinado estágio do ciclo de vida, ou quando a super expressão não é requerida, nos casos de genes pouco expressos na célula (BIEBINGER *et al.*, 1997).

Diante dos dados apresentados, foram escolhidos os promotores do bacteriófago T7 e ribossomal 18S de *T. cruzi* clone Dm28c para as construções aqui demonstradas. Embora freqüentemente utilizada em tripanossomatídeos, a expressão exógena regulada tem sido pouco empregada em *Crithidia fasciculata*. O sistema para *C. fasciculata* apresentado neste trabalho é baseado em vetores já descritos, nos quais a expressão gênica ocorre sem a presença de promotor

(TETAUD *et al.*, 2002). A fim de incrementar este sistema, foi utilizada a transcrição dirigida por T7RNP, combinando a utilização concomitante de dois vetores. Um deles expressando a T7RNP (pNUS-T7N) e outro contendo o gene de interesse sob controle do promotor T7 (pNUS-PT7-RfAH). Este sistema ainda não apresenta a possibilidade de regulação da expressão gênica, pois, apesar de possuir 3 cópias do operador de tetraciclina imediatamente após o promotor T7, ainda não foi introduzido o repressor de tetraciclina. Este se liga ao operador prevenindo a ligação da T7RNP.

Este sistema combinando promotor T7 e operador de tetraciclina também foi utilizado na construção de um dos vetores para *T. cruzi* (pTcPT7-HisN), mas ainda não conta com a expressão do repressor de tetraciclina e da T7RNP. Os outros vetores construídos, pTcPR-HisN e seus derivados, apresentam o promotor ribossomal 18S de *T. cruzi* clone Dm28c.

Outro elemento bastante importante empregado em vetores são as regiões que fornecem sinal para o processamento do RNA transcrito. Tais regiões de eucariotos superiores não são funcionais em tripanossomatídeos. O processamento e a expressão são mais eficientes quando são empregados segmentos 5' e 3' de espécies homólogas (CLAYTON, 2000). Nas construções dos vetores para *T. cruzi* foram empregados segmentos contendo sinal para *trans-splicing* e poliadenilação, denominados de regiões intergênicas (RIs). As RIs usadas nos vetores para *T. cruzi* pertencem à região genômica dos genes de ubiquitina de *T. cruzi*, sendo descritas por SWINDLE *et al.* (1988). A denominação 35.1 para as RIs utilizadas aqui segue a designação feita para um clone contendo a região codificadora do gene de ubiquitina, isolado de uma biblioteca de cDNA (MCCARTHY-BURKE *et al.*, 1989). Estas regiões, por conterem os sinais necessários para o processamento do RNA transcrito e por serem pequenas (278 pares de bases), têm sido utilizadas em vetores para tripanossomatídeos (WEN *et al.*, 2001).

Os vetores pNUS-T7N e pNUS-PT7-RfAH possuem regiões intergênicas do gene fosfoglicerato quinase (PGK) A e B e do gene glutationilpermidine sintetase (GspS) (SWINKELS *et al.*, 1988; TETAUD *et al.*, 1998). Essas regiões intergênicas permitem o processamento dos RNAs transcritos a partir dos genes clonados nestes vetores (TETAUD *et al.*, 2002).

Após a determinação das RIs a serem utilizadas, foram avaliadas as modalidades de antibióticos para seleção dos transfectantes. Dentre as modalidades existentes está a classe dos antibióticos aminoglicosídeos. Estes antibióticos são

inibidores bem caracterizados do crescimento e da síntese protéica em procaríotos e eucariotos (VAZQUEZ, 1978). Exemplos desta classe são geneticina (G418), higromicina, paromicina e kanamicina. Levando em consideração a estratégia de utilização concomitante de pelo menos dois vetores, os antibióticos a serem escolhidos deveriam apresentar mecanismos de ação distintos. Isto pode ser observado em relação aos antibióticos G418 e higromicina, que interferem na síntese protéica de eucariotos em diferentes etapas da tradução (EUSTICE & WILHELM, 1984). Isto favoreceu a escolha das resistências a estes dois antibióticos como elementos de seleção. Outro antibiótico com potencialidade de uso concomitante, pertencente à família bleomicina/fleomicina, é a zeocina, cujo mecanismo de ação envolve clivagem de DNA.

Os elementos descritos foram organizados em cassetes, os quais foram sinteticamente produzidos. Após as clonagens destes cassetes e do cassete RfA de conversão para o sistema Gateway® nos plasmídeos base, realizou-se as análises para validação dos vetores. O processo de validação destes vetores inclui a caracterização molecular, detecção da expressão protéica, ensaios de localização celular e obtenção de complexos protéicos purificados. Para isso, três genes de *T. cruzi*, previamente inseridos na plataforma Gateway®, foram utilizados. A seleção de populações resistentes ocorreu num intervalo entre 11 e 24 dias, sendo normalmente mais rápida para *C. fasciculata*. Algumas explicações para isso seriam o tempo menor para divisão celular em *C. fasciculata*, permitindo a multiplicação mais rápida da população celular resistente e/ou a presença maior em *T. cruzi* de resistência natural ao antibiótico.

A caracterização molecular prévia do vetor para *C. fasciculata* pNUS-H1 (pNUS-HcH sem os sítios de clonagem), feita por TETAUD *et al.* (2002), não detectou integração cromossômica no parasita. A caracterização molecular do vetor pNUS-T7N demonstrou a presença de formas plasmidiais episomais no parasita. Os dados de Southern blot detectaram a forma linear do vetor pNUS-T7N, após digestão do DNA do parasita (Figura 4.1.5.2). No entanto, sem a digestão do DNA, não foi evidenciada migração das moléculas do vetor como cópias únicas circulares. Ao invés disso foram detectadas bandas que co-migraram com DNA genômico de alto peso molecular (Figura 4.1.5.2). Isto tem sido observado na caracterização de outros vetores, incluindo pNUS-H1, onde as moléculas parecem formar grandes

concatâmeros (KELLY *et al.*, 1992; BIEBINGER & CLAYTON, 1996, TETAUD *et al.*, 2002).

Outros dados sobre a caracterização molecular do vetor pNUS-T7N foram obtidos com a recuperação deste em bactéria. Foi possível isolar plasmídeos com tamanhos compatíveis com o vetor em questão, apesar da presença de plasmídeos com tamanhos variados. O seqüenciamento destes plasmídeos com tamanhos variados pode auxiliar na determinação da origem desta ocorrência. Além dos ensaios citados, reações de PCR sugerem a manutenção da estrutura do vetor pNUS-T7N, com a amplificação de alguns cassetes componentes deste vetor (Figura 4.1.5.3). Esta estratégia não obteve sucesso na avaliação de pNUS-PT7-RfAH. A caracterização molecular completa do sistema depende de avaliações envolvendo o vetor pNUS-PT7-RfAH.

As tentativas iniciais de caracterização molecular do sistema para *T. cruzi*, através de Southern blot, não foram conclusivas. Uma estratégia similar à descrita, através de reações de PCR, foi então usada (**Figura 4.2.5.1** e **Figura 4.2.5.2**). Com exceção do vetor pTcPT7-HisN, todos os outros vetores, contendo as diferentes etiquetas e o gene A1 de *T. cruzi* clonado, foram avaliados. Uma análise global dos resultados destas PCRs sugere a manutenção da estrutura dos vetores após transfecção em *T. cruzi*. Os dados obtidos aqui não fornecem base para discussão sobre a possibilidade de integração, no entanto, é importante salientar alguns dados existentes na literatura. Em construções utilizando promotor ribossomal de *T. cruzi*, realizadas em outros trabalhos, foi observada integração cromossômica dos vetores no *locus* ribossomal, através de recombinação (MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 1997; VAZQUEZ & LEVIN, 1999; LORENZI *et al.*, 2003). Igualmente ao sistema para *C. fasciculata*, análises adicionais como Southern blot, eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), entre outras, são necessárias para a completa caracterização molecular deste sistema.

O passo seguinte no processo de validação foi a detecção da expressão protéica. Em *C. fasciculata*, o sistema foi avaliado na presença e ausência da T7RNP. Na avaliação dos extratos dos parasitas por SDS-PAGE não foram evidenciadas diferenças, comparando-se os parasitas transfectados com os não transfectados. A detecção da expressão foi então realizada por western blot utilizando anticorpos contra as diversas etiquetas e contra as proteínas utilizadas na validação. Dos 24 extratos analisados, em 22 foi possível a detecção da proteína

recombinante, com pelo menos um dos anticorpos utilizados. As únicas exceções foram os produtos do gene C4 de *T. cruzi* em *C. fasciculata*.

Concomitantemente à detecção das proteínas, foram realizados ensaios de localização celular em *T. cruzi* através da fusão N-terminal com o epítipo *c-myc* e com as proteínas fluorescentes GFP, CFP e YFP. As localizações das proteínas recombinantes foram comparadas aos padrões de localização das proteínas nativas, obtidos por imunofluorescência com anticorpos contra estas proteínas. Os resultados foram satisfatórios em 2 das 3 localizações realizadas. A proteína, cuja localização não corroborou os dados obtidos com anticorpos, tem função suposta de syntaxina. Nos ensaios com esta proteína contendo as etiquetas GFP, CFP, YFP e *c-myc*, detectou-se poucas células emitindo fluorescência. A sua localização através das etiquetas indicou distribuição inespecífica pelo citoplasma ou concentração na região posterior da célula (**Figura 4.2.6.10**). No entanto, a imunofluorescência com anticorpo localizou esta proteína na região entre o flagelo e o cinetoplasto, corroborando o seu possível envolvimento no tráfego vesicular.

A possibilidade de obtenção de localização celular incorreta para algumas proteínas vem sendo alvo de debate há vários anos. Alguns trabalhos têm demonstrado localização incorreta a partir de fusão com proteínas fluorescentes (SIMPSON *et al.*, 2000; KUMAR *et al.*, 2002; MATSUYAMA *et al.*, 2006). Etiquetas repórteres rotineiramente são fusionadas N- ou C-terminal a genes alvos. Esta escolha pode ser crítica na obtenção de dados corretos de localização (KUMAR *et al.*, 2002). Por exemplo, sinais de endereçamento organela-específicos para mitocôndria e núcleo estão freqüentemente localizados na porção N-terminal (SILVER, 1991, *apud*: KUMAR *et al.*, 2002). Um estudo empregando proteínas fluorescentes demonstrou localização correta para cinco proteínas mitocondriais humanas apenas para as construções contendo fusão C-terminal. As construções com fusão N-terminal indicaram localização citosólica ou nuclear (SIMPSON *et al.*, 2000). Além disso, dados incorretos de localização podem estar associados ao alto nível de expressão protéica (MATSUYAMA *et al.*, 2006).

Diante dos dados descritos, fica clara a necessidade da flexibilidade na fusão de genes com etiquetas para localização. Recentemente, vários projetos de ORFeoma produziram clones que permitem fusão N- ou C-terminal de etiquetas (LABAER *et al.*, 2004). Apesar da possibilidade da obtenção de dados incorretos, a localização celular por proteínas fluorescentes é uma importante técnica, podendo

ser empregada nos estudos em larga escala. Num estudo envolvendo a localização celular de 100 proteínas humanas através de etiquetas fluorescentes, para os cDNAs onde as análises bioinformáticas foram capazes de predizer a suposta identidade, os dados de localização das proteínas corroboraram tais predições em 75% dos casos (SIMPSON *et al.*, 2000). Além disso, a integração de outros dados, como por exemplo os de interações protéicas por análises de duplo-híbrido e TAP tag, pode fornecer maior acurácia na caracterização de genes. Outro dado obtido aqui nos ensaios de localização diz respeito ao fraco sinal observado para o epítipo *c-myc*. Apenas a proteína A1 foi claramente detectada, apesar dos ensaios de western blot demonstrarem a presença das outras duas proteínas recombinantes. Uma estratégia para aumentar o sinal emitido é a utilização de várias cópias do epítipo, fornecendo sítio de ligação para mais moléculas de anticorpo.

O último ensaio para validação do sistema envolveu a purificação de complexos protéicos por TAP tag. Esta metodologia possui aplicação similar à análise por duplo-híbrido. Uma vantagem sobre tal sistema é a possibilidade da detecção de interações diretas e indiretas em um único experimento (RIGAUT *et al.*, 1999). Além disso, também permite o isolamento de complexos protéicos a partir dos seus ambientes nativos. Alguns problemas podem ser encontrados no uso do TAP tag, tais como a exposição insuficiente da etiqueta a fim de permitir a ligação aos grânulos de afinidade, a alteração da função protéica pela fusão com a etiqueta e, apesar de bastante incomum, a presença de sítios para TEV nas proteínas do complexo alvo (PUIG *et al.*, 2001). Aqui neste trabalho, foram obtidos complexos protéicos distintos, analisados por SDS-PAGE, para duas proteínas de *T. cruzi*. A ocorrência de proteínas com padrões eletroforéticos distintos entre as duas análises sugere a presença de proteínas específicas em cada complexo. Uma validação mais abrangente do sistema pode ser alcançada empregando-se espectrometria de massa e comparação com dados obtidos por outras metodologias, como imunoprecipitação e duplo-híbrido.

Após os procedimentos para validação do sistema, algumas considerações podem ser feitas a respeito desta plataforma. A tentativa de isolamento de uma população clonal, a partir do cultivo de *C. fasciculata* em meio sólido, não apresentou dados relevantes, pois não foram realizados ensaios comparando a expressão gênica entre as populações pré e pós-isolamento. Os níveis de expressão gênica observados em *C. fasciculata* não apresentaram diferença na presença ou

ausência da T7RNP, nos ensaios por western blot. A esta constatação, podem ser adicionadas algumas observações: (i) no seqüenciamento do clone pNUS-T7N, detectou-se a mutação de um nucleotídeo, resultando na alteração de um aminoácido da T7RNP. (ii) a análise por northern blot detectou transcrição da T7RNP em *C. fasciculata*. (iii) não foram realizados ensaios para detecção da expressão da T7RNP em *C. fasciculata*.

As evidências apresentadas apoiam as seguintes hipóteses excludentes em relação ao sistema: (a) a expressão protéica da T7RNP não está ocorrendo. (b) ocorreu a perda de função da T7RNP, devido à mutação observada aqui neste trabalho. (c) a transcrição dirigida por T7RNP está sendo regulada pós-transcricionalmente.

Numa avaliação da hipótese (b), analisando-se dados sobre os mecanismos moleculares da T7RNP, obtidos com experimentos de mutagênese (Revistos por KOCHETKOV *et al.*, 1998), não se observou relato sobre a mutação encontrada na T7RNP do clone pNUS-T7N. Para a determinação da hipótese correta são necessários ensaios adicionais, permitindo a detecção da T7RNP e a quantificação dos mRNAs referentes às regiões codificadoras testadas neste sistema na presença e ausência da T7RNP.

Em *T. cruzi*, os níveis de expressão observados por western blot foram variáveis entre as proteínas e as etiquetas avaliadas. Além disso, diferentes intensidades de fluorescência foram observadas entre as células e também entre as proteínas avaliadas. Diferenças nos níveis de expressão entre indivíduos pertencentes a uma mesma população têm sido alvo de estudos. Trabalhos demonstram este fato como uma característica inerente ao processo de regulação gênica em eucariotos (MCADAMS & ARKIN, 1997). Apesar destes dados, a eficiência dos processos de seleção dos parasitas transfectantes deve ser melhor avaliada. Em relação aos baixos níveis de expressão, verificados principalmente para o gene C1 de *T. cruzi*, uma explicação seria a presença marcante do controle pós-transcricional em *T. cruzi*, associada à natureza das proteínas analisadas. Uma das estratégias para tentar otimizar a expressão gênica através de vetores é a utilização de diferentes elementos visando aumentar a estabilidade do mRNA na célula. Um exemplo são as regiões 3' não traduzidas (3'UTRs) dos mRNAs, cujo papel na regulação pós-transcricional das VSGs foi demonstrado em *T. brucei* (BERBEROF *et al.*, 1995).

Uma característica marcante de todos os vetores aqui apresentados é a facilidade de clonagem, resultante da conversão destes para a plataforma Gateway® (Invitrogen). Diversos trabalhos têm utilizado tal plataforma em projetos de clonagem em larga escala para vários organismos, como os projetos de ORFeoma (PARRISH *et al.*, 2004; GELPERIN *et al.*, 2005; MATSUYAMA *et al.*, 2006; LAMESCH *et al.*, 2007). Tais projetos, além da construção do ORFeoma, empregam esforços na obtenção de sistemas para caracterizações gênicas em larga escala, sendo que os vetores de destinação contendo aplicabilidades distintas fazem parte destes sistemas. O sistema apresentado aqui fornece características importantes, não observadas em grande parte das construções existentes. Além das vantagens já descritas do sistema Gateway® em relação às clonagens tradicionais, outros aspectos merecem destaque neste sistema. Um destes aspectos é a plasticidade oferecida, através da possibilidade de substituição de todos os elementos componentes dos vetores, principalmente observada nos vetores para *T. cruzi*. Dentro desta característica, diferentes regiões intergênicas contendo elementos reguladores, etiquetas e resistências a antibióticos podem ser avaliadas, não descartando a hipótese de utilização de cassetes Gateway® adicionais, outros RfAs por exemplo, para tal finalidade.

Outra característica é relacionada à estabilidade do sistema utilizado em *Trypanosoma cruzi*, a qual vem sendo testada. Níveis de expressão gênica foram detectados durante pelo menos dois meses na ausência de antibiótico. Outro aspecto relevante do sistema é a possibilidade da expressão heteróloga de proteínas de *T. cruzi* em *C. fasciculata*, que além de não ser patogênico para humanos, representa um importante modelo nos estudos envolvendo tripanossomatídeos.

Finalizando o conjunto de características, o processo de validação utilizado aqui emprega a utilização de genes de *T. cruzi*, o que fornece dados reais sobre as vantagens do sistema, mas principalmente demonstra os pontos que ainda são alvo de melhorias. Em vários trabalhos, as aplicabilidades dos vetores são demonstradas apenas como projetos pilotos, utilizando genes repórteres na avaliação do sistema.

Algumas etapas ainda são necessárias na construção dos sistemas apresentados neste trabalho, como a conclusão do processo de validação, o estabelecimento de linhagens de *T. cruzi* e *C. fasciculata* expressando ambos T7RNP e repressor de tetraciclina e a avaliação dos transcritos gerados.

6 CONCLUSÃO

Este trabalho apresentou o desenvolvimento de um sistema para análise por genética reversa, através da construção de vetores para expressão protéica em tripanossomatídeos. Estes vetores foram caracterizados utilizando genes de *Trypanosoma cruzi*, através das diferentes fusões proporcionadas pelo sistema, possibilitando a detecção das proteínas recombinantes, suas localizações celulares, bem como a purificação de complexos protéicos. Estes dados demonstraram a funcionalidade dos vetores, que, com a utilização da plataforma Gateway® de clonagem (Invitrogen), constituem importantes ferramentas de grande utilidade na caracterização de genes de *Trypanosoma cruzi*.

As perspectivas deste trabalho estão concentradas na adaptação e plasticidade dos vetores, de modo a permitir: fusões C-terminal, utilização em outros tripanossomatídeos, otimização da expressão gênica através da troca das regiões intergênicas, ensaios de co-transfecção, incremento do sinal obtido com o epítipo *c-myc*, utilização de outras etiquetas que permitam métodos eficientes de purificação protéica, entre outros.

Tabela 6.1: Progresso na construção e caracterização dos vetores.

VETORES	ETAPAS						
	1	2	3	4	5	6	7
pTcPR-HisN	■	■	■	■	■	■	■
pTcPR-CFPN	■	■	■	■	■	■	■
pTcPR-GFPN	■	■	■	■	■	■	■
pTcPR-YFPN	■	■	■	■	■	■	■
pTcPR-MycN	■	■	■	■	■	■	■
pTcPR-TAPN	■	■	■	■	■	■	■
pTcPT7-HisN	■	■	□	□	■	■	■
pNUS-PT7-RfAH	■	■	■	■	■	■	■
pNUS-T7N	■	■	■	□	■	■	■

■ = concluído ■ = avaliação parcial ou preliminar ■ = falhou □ = não realizado ■ = não aplicável

1 = construção, 2 = seqüenciamento, 3 = caracterização molecular, 4 = western blot, 5 = localização celular de proteínas, 6 = purificação de complexos protéicos, 7 = purificação protéica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M.D.; SEKELSKY, J.J. From sequence to phenotype: reverse genetics in *Drosophila melanogaster*. **Nat Rev Genet**, 3(3): 189-98, 2002.

ARAVIND, L.; IYER, L.M.; ANANTHARAMAN, V. The two faces of Alba: the evolutionary connection between proteins participating in chromatin structure and RNA metabolism. **Genome Biol**, 4(10): 2003.

BASTIN, P.; SHERWIN, T.; GULL, K. Paraflagellar rod is vital for trypanosome motility. **Nature**, 391(6667): 548, 1998.

BELL, S.P.; JANTZEN, H.M.; TJIAN, R. Assembly of alternative multiprotein complexes directs rRNA promoter selectivity. **Genes Dev**, 4(6): 943-54, 1990.

BELLOFATTO, V.; CROSS, G.A.M. Expression of a Bacterial Gene in a Trypanosomatid Protozoan. **Science**, 244(4909): 1167-9, 1989.

BERBEROF, M; VANHAMME, L; TEBABI, P; PAYS, A; JEFFERIES, D; WELBURN, S; PAYS, E. The 3'-terminal region of the mRNAs for VSG and procyclin can confer stage specificity to gene expression in *Trypanosoma brucei*. **EMBO J**, 14(12): 2925-34, 1995.

BIEBINGER, S.; CLAYTON, C. A plasmid shuttle vector bearing an rRNA promoter is extrachromosomally maintained in *Crithidia fasciculata*. **Exp Parasitol**, 83(2): 252-8, 1996.

BIEBINGER, S; WIRTZ, LE.; LORENZ, P.; CLAYTON, C. Vectors for inducible expression of toxic gene products in bloodstream and procyclic *Trypanosoma brucei*. **Mol Biochem Parasitol**, 85(1): 99-112, 1997.

BLUM, H., BEIER H., GROSS H.J. Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, 8: 93-99, 1987.

BOGLIOLO, A.R.; CHIARI, E.; SILVA-PEREIRA, R.O.; SILVA-PEREIRA, A.A. A comparative study of *Trypanosoma cruzi* enzyme polymorphism in South America. **Braz J Med Biol Res**, 19(6): 673-83, 1986.

BOGLIOLO, A.R.; LAURIA-PIRES, L.; GIBSON, W.C. Polymorphisms in *Trypanosoma cruzi*: evidence of genetic recombination. **Acta Trop**, 61(1): 31-40, 1996.

BRACK, C. Elektronenmikroskopische untersuchungen zum lebenszyklus von *Trypanosoma cruzi* unter besonderer berucksichtigung der entwicklungsformen im ubertrager *Rhodnius prolixus*. **Acta Trop**. 25(4): 289-356, 1968.

BRISSE, S.; DUJARDIN, J.C.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. **Mol Biochem Parasitol**, 111(1): 95-105, 2000.

BROOKER, B.E. Flagellar attachment and detachment of *Crithidia fasciculata* to the gut wall of *Anopheles gambiae*. **Protoplasma**, 73(2): 191-202, 1971.

BROWN, S.D.; HUANG, J.; VAN DER PLOEG, L.H.T. The promoter for the procyclic acidic repetitive protein (PARP) genes of *Trypanosoma brucei* shares features with RNA polymerase I promoters. **Mol Cell Biol**, 12(6): 2644-2652, 1992.

CANO, M.I.; GRUBER, A.; VASQUEZ, M.; CORTES, A.; LEVIN, M.J.; GONZALES, A.; DEGRAVE, W.; RONDINELLI, E.; ZINGALES, B.; RAMIREZ, J.L., *et al.* Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project. **Mol Biochem Parasitol**, 71(2): 273-278, 1995.

CHAGAS, C. Nova tripanozomiaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiolojico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 1(2): 159-218, 1909.

CHEO, D.L.; TITUS, S.A.; BYRD, D.R.N.; HARTLEY, J.L.; TEMPLE, G.F.; BRASCH, M.A. Concerted assembly and cloning of multiple DNA segments using in vitro site-specific recombination: Functional analysis of multi-segment expression clones. **Genome Res**, 14(10B): 2111-20, 2004.

CLAYTON, C.E; FUERI, J.P; ITZHAKI, J.E; BELLOFATTO, V; SHERMAN, D.R; WISDOM, G.S; VIJAYASARATHY, S; MOWATT, M.R. Transcription of the procyclic acidic repetitive protein genes of *Trypanosoma brucei*. **Mol Cell Biol**, 10(6): 3036-47, 1990.

CLAYTON, C.E; HÁ, S; RUSCHÉ, L; HARTMANN, C; BEVERLEY, S.M. Tests of heterologous promoters and intergenic regions in *Leishmania major*. **Mol Biochem Parasitol**, 105(1): 163-7; 2000.

CLAYTON, C.E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. **EMBO J**, 8(21): 1881-1888, 2002.

COLLI, W.; ALVES, M.J.M. Relevant glycoconjugates on the surface of *Trypanosoma cruzi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 94 (Suppl. 1): 37-49, 1999.

CONTRERAS, V.T.; SALLES, J.M.; THOMAS, N.; MOREL, C.M. and GOLDENBERG, S. *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Mol Biochem Parasitol**, 16(3): 315-327, 1985.

COURA, J.R.; JUNQUEIRA, A.C.V.; FERNANDES, O.; VALENTE, S.A.S.; MILES, M.A. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. **Trends Parasitol**, 18(4): 171-176, 2002.

DE SOUZA, W. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. **International Reviews in Cytology**, 86: 197-283, 1984.

DE SOUZA, W. Novel Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. In: **World Class Parasites**: vol 7 American Trypanosomiasis. TYLER, K.M.; MILES, M.A. (Eds), Kluwer Academic Publishers, p. 13-24, 2003.

DIETRICH, P.; SOARES, M.B.; AFFONSO, M.H.; FLOETER-WINTER, L.M. The *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA-encoding gene: analysis of promoter and upstream intergenic spacer sequences. **Gene**, 125(1): 103-107, 1993.

DOCAMPO, R; MORENO S.N.J. Acidocalcisome: A novel Ca²⁺ storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites. **Parasitol Today**, 15(11): 443-448, 1999.

DOCAMPO, R; MORENO, S.N.J. The acidocalcisome. **Mol Biochem Parasitol**, 114(2): 151-159, 2001.

DUPUY, D.; LI, Q.-R.; DEPLANCKE, B.; BOXEM, M.; HAO, T.; LAMESCH, P.; SEQUERRA, R.; BOSAK, S.; DOUCETTE-STAMM, L.; HOPE, I.A., *et al.* A first version of the *Caenorhabditis elegans* promoterome. **Genome Res**, 14(10B). 2004.

EL-SAYED, N.M.; MYLER, P.J.; BARTHOLOMEU, D.C. *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi* etiologic agent of Chagas disease. **Science**, (309)5733: 409-415, 2005.

EUSTICE, D.C; WILHELM, J.M. Mechanisms of action of aminoglycoside antibiotics in eucaryotic protein synthesis. **Antimicrob Agents Chemother**, 26(1): 53-60, 1984.

EVAN, G.I.; LEWIS, G.K.; RAMSAY, G.; BISHOP, J.M. Isolation of monoclonal antibodies specific for human *c-myc* proto-oncogene product. **Mol Cell Biol**, 5(12): 3610-6, 1985.

GADELHA, A.A.; VERCOSA, A.F.; LORENA, V.M.; NAKAZAWA, M.; CARVALHO, A.B.; SOUZA, W.W.; FERREIRA, A.G.; SILVA, E.D.; KRIEGER, M.A.; GOLDENBERG, S.; GOMES, Y.M. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of recombinant ELISA with conventional ELISA and the haemagglutination test. **Vox Sanguinis**, 85(3): 165-170, 2003.

GARCIA-SALCEDO, J.A.; PEREZ-MORGA, D.; GIJON, P.; DILBECK, V.; PAYS, E.; NOLAN, D.P. A differential role for actin during the life cycle of *Trypanosoma brucei*. **EMBO Journal**, 23(4): 780-9, 2004.

GELPERIN, D.M; WHITE, M.A; WILKINSON, M.L; KON, Y; KUNG, L.A; WISE, K.J; LOPEZ-HOYO, N; JIANG, L; PICCIRILLO, S; YU, H; GERSTEIN, M; DUMONT, M.E; PHIZICKY, E.M; SNYDER, M; GRAYHACK, E.J. Biochemical and genetic analysis of the yeast proteome with a movable ORF collection. **Genes Dev**, 19(23): 2816-26, 2005.

GOLDENBERG, S.; CONTRERAS, V.T.; SALLES, J.M.FRANCO, M.P.A.L.; BONALDO, M.C.; VALLE, D.; GONÇALVES, A.M.; MOREL, C.M. Perspectives of vaccination against Chagas Disease through biotechnology. II – Gene expression in *T. cruzi* trypomastigotes and cell-free translation of mRNAs coding for relevant surface antigens. In: **New Approaches to Vaccine Development**. TORRIGIANI, O. (Ed). Schwabe & Co., Basel, Switzerland, p. 442-459, 1984.

GOLDENBERG, S.; SALLES, J.M.; CONTRERAS, V.T.; LIMA FRANCO, M.P.; KATZIN, A.M.; COLLI, W.; MOREL, C.M. Characterization of messenger RNA from epimastigotes and metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **FEBS Lett**, 180(2): 265-70, 1985.

GOLDENBERG, S.; CONTRERAS, V.T.; BONALDO, M.C.; SALLES, J.M.; LIMA FRANCO, M.P.A.; LAFAILLE, J; GONZALES PERDOMO, M; LINSS, J. and MOREL, C.M. *In vitro* differentiating systems for the study of differential gene expression during *Trypanosoma cruzi* development. In: **Molecular Strategies of Parasitic Invasion**: vol 42 UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology. AGABIAN, N.; GOODMAN, H. and NOGUEIRA, N. (Eds). Alan R. Liss, Inc., New York, p. 203-212, 1987.

GOSSEN, M.; BUJARD, H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 89(12): 5547-51, 1992.

GRUMMT, I; ROTH, E; PAULE, M.R. Ribosomal RNA transcription in vitro is species specific. **Nature**, 296(5853): 173-4, 1982.

HARTLEY, J.L.; TEMPLE, G.F.; BRASCH, M.A. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. **Genome Res**, 10(11): 1788-1795, 2000.

HILLEN, W.; SCHOLLMEIER, K.; GATZ, C. Control of expression of the Tn10-encoded tetracycline resistance operon. II. Interaction of RNA polymerase and TET repressor with the tet operon regulatory region. **J Mol Biol**, 172(2): 185-201.1984.

HILPERT, K.; HANSEN, G.; WESSNER, H.; KÜTTNER, G., WELFLE, K.; SEIFERT M.; HÖHNE, W. Anti-c-myc antibody 9E10: epitope key positions and variability characterized using peptide spot synthesis on cellulose. **Protein Eng**, 14(10): 803-6, 2001.

HOCHULI, E.; DÖBELI, H.; SCHACHER, A. New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighboring histidine residues. **J. Chromatogr**, 411: 177-184, 1987.

HOCHULI, E.; BANNWARTH, W.; DÖBELI, H.; GENTZ, R.; STÜBER, D. Genetic approach to facilitate purification of novel recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. **Bio/Technology**, 6: 1321-1325, 1988.

HOFT, D.F.; FARRAR, P.L.; KRATZ-OWENS K.; SHAFFER, D. Gastric invasion by *Trypanosoma cruzi* and induction of protective mucosal immune responses. **Infection and Immunity**, 64(9): 3800-10, 1996.

JANZ, L.; CLAYTON, C. The PARP and rRNA promoters of *Trypanosoma brucei* are composed of dissimilar sequence elements that are functionally interchangeable. **Mol Cell Biol**, 14(9): 5804-5811, 1994.

JOHNSON, P.J.; KOOTER, J.M.; BORST, P. Inactivation of transcription by UV irradiation of *T. brucei* provides evidence for a multicistronic transcription unit including a VSG gene. **Cell**, 51(2): 273-281, 1987.

KELLY, J.M.; WARD, H.M.; MILES, M.A.; KENDALL, G. A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. **Nucleic Acids Res**, 20(15): 3963-9, 1992.

KOCHETKOV, S.N; RUSAKOVA, E.E; TUNITSKAYA, V.L. Recent studies of T7 RNA polymerase mechanism. **FEBS Lett**, 440(3): 264-7, 1998.

KOOTER, J.M.; VAN DER SPEK, H.J.; WAGTER, R.; D'OLIVEIRA, C.E.; VAN DER HOEVEN, F.; JOHNSON, P.J.; BORST, P. The anatomy and transcription of a telomeric expression site for variant-specific suRfAce antigens in *T. brucei*. **Cell**, 51(2): 261-272, 1987.

KUMAR, A; AGARWAL, S; HEYMAN, J.A; MATSON, S; HEIDTMAN, M; PICCIRILLO, S; UMANSKY, L; DRAWID, A; JANSEN, R; LIU, Y; CHEUNG, K.H; MILLER, P; GERSTEIN, M; ROEDER, G.S; SNYDER, M. Subcellular localization of the yeast proteome. **Genes Dev**, 16(6): 707-19, 2002.

LABAER, J; QIU, Q; ANUMANTHAN, A; MAR, W; ZUO, D; MURTHY, T.V; TAYCHER, H; HALLECK, A; HAINSWORTH, E; LORY, S; BRIZUELA, L. The *Pseudomonas aeruginosa* PA01 gene collection. **Genome Res**, 14(10B):2190-200, 2004.

LAIRD, P.W.; KOOTER, J.M.; LOOSBROEK, N.; BORST, P. Mature mRNAs of *Trypanosoma brucei* possess a 5' cap acquired by discontinuous RNA synthesis. **Nucleic Acids Res**, 13(12): 4253-66, 1985.

LAMESCH, P; LI, N; MILSTEIN, S; FAN, C; HAO, T; SZABO, G; HU, Z; VENKATESAN, K; BETHEL, G; MARTIN, P; ROGERS, J; LAWLOR, S; MCLAREN, S; DRICOT, A; BORICK, H; CUSICK, M.E; VANDENHAUTE, J; DUNHAM, I; HILL, D.E; VIDAL, M. hORFeome v3.1: a resource of human open reading frames representing over 10,000 human genes. **Genomics**, 89(3): 307-15, 2007.

LANDY, A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. **Annu Rev Biochem**, 58: 913-949, 1989.

LEARNED, R.M; CORDES, S; TJIAN, R. Purification and characterization of a transcription factor that confers promoter specificity to human RNA polymerase I. **Mol Cell Biol**, 5(6): 1358-69; 1985.

LEBOWITZ, J.H.; COBURN, C.M.; MCMAHON-PRATT, D.; BEVERLEY, S.M. Development of a stable *Leishmania* expression vector and application to the study of parasite surface antigen genes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 87(24): 9736-40, 1990.

LEDERBERG, J. Plasmid (1952-1997). **Plasmid**, 39(1):1-9, 1998.

LORENZI, H.A.; VAZQUEZ, M.P.; LEVIN, M.J. Integration of expression vectors into the ribosomal locus of *Trypanosoma cruzi*. **Gene**, 310: 91-9, 2003.

LU, H.Y.; BUCK, G.A. Expression of an exogenous gene in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Mol Biochem Parasitol**, 44(1): 109-14, 1991.

LUO, H.; GILINGER, G.; MUKHERJEE, D.; BELLOFATTO, V. Transcription initiation at the TATA-less spliced leader RNA gene promoter requires at least two DNA-binding proteins and a tripartite architecture that induces an initiator element. **J Biol Chem**, 274(45): 31947-31954, 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): 163-9, 2000.

MARSH, V.L.; PEAK-CHEW, S.Y.; BELL, S.D. Sir2 and the acetyltransferase, Pat, regulate the archaeal chromatin protein, Alba. **J Biol Chem**, 280(22): 21122-8, 2005.

MARTÍNEZ-CALVILLO, S.; LÓPEZ, I.; HERNÁNDEZ, R. pRIBOTEX expression vector: a pTEX derivative for a rapid selection of *Trypanosoma cruzi* transfectants. **Gene**, 199(1-2): 71-6, 1997.

MATSUYAMA, A; ARAI, R; YASHIRODA, Y; SHIRAI, A; KAMATA, A; SEKIDO, S; KOBAYASHI, Y; HASHIMOTO, A; HAMAMOTO, M; HIRAOKA, Y; HORINOUCHE, S; YOSHIDA, A.M. ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Nat Biotechnol**, 24(7): 841-7, 2006.

MCADAMS, H.H; ARKIN, A. Stochastic mechanisms in gene expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 94(3): 814-9, 1997.

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(2): 327-9, 1993.

MISHIMA, Y; FINANCSEK, I; KOMINAMI, R; MURAMATSU, M. Fractionation and reconstitution of factors required for accurate transcription of mammalian ribosomal RNA genes: identification of a species-dependent initiation factor. **Nucleic Acids Res**, 10(21): 6659-70; 1982.

MORRIS, J.C.; DREW, M.E.; KLINGBEIL, M.M.; MOTYKA, S.A.; SAXOWSKY, T.T.; WANG, Z.; ENGLUND, P.T. Replication of kinetoplast DNA: an update for the new millennium. **International Journal of Parasitology**, 31(5): 453-458, 2001.

NOGUCHI, H.; TILDEN, E.B. Comparative studies of herpetomonads and leishmanias: I. Cultivation of herpetomonads from insects and plants. **The Journal of Experimental Medicine**, 44: 307-325, 1926.

NUNES, L.R.; CARVALHO, M.R.; SHAKARIAN, A.M.; BUCK, G.A. The transcription promoter of the spliced leader gene from *Trypanosoma cruzi*. **Gene**, 2(188): 157-168, 1997.

OVERATH, P.; STIERHOF, Y.D.; WIESE, M. Endocytosis and secretion in trypanosomatid parasites - Tumultuous traffic in a pocket. **Trends Cell Biol**, 7(1): 27-33, 1997.

PARRISH, J.R; LIMJINDAPORN, T; HINES, J.A; LIU, J; LIU, G; FINLEY, R.L.JR. High-throughput cloning of *Campylobacter jejuni* ORfs by in vivo recombination in *Escherichia coli*. **J Proteome Res**, 3(3):582-6, 2004.

PORATH, J.; CARLSSON, J.; OLSSON, I.; BELFRAGE, G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. **Nature**, 258(5536): 598-599, 1975.

PRETI, H. Caracterização funcional de genes codificadores de proteínas hipotéticas diferencialmente expressos durante a metaciclo-gênese de *Trypanosoma cruzi*. 160 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular). Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

PTASHNE, M. A Genetic Switch: Phage (Lambda) and Higher Organisms (Cambridge, MA: Cell Press), 1992.

PUIG O, CASPARY F, RIGAUT G, RUTZ B, BOUVERET E, BRAGADO-NILSSON E, WILM M, SÉRAPHIN B. The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. **Methods**, 24(3): 218-29, 2001.

RAMAKRISHNAN, G.; VINES, R.R.; MANN, B.J.; PETRI, W.A.; JR. A tetracycline-inducible gene expression system in *Entamoeba histolytica*. **Mol Biochem Parasitol**, 84(1): 93-100, 1997.

RIGAUT, G.; SHEVCHENKO, A.; RUTZ, B.; WILM, M.; MANN, M.; SÉRAPHIN, B. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. **Nat Biotechnol**, 17(10): 1030-2, 1999.

RIOU, G.; DELAIN, E. Electron microscopy of the circular kinetoplastic DNA from *Trypanosoma cruzi*: occurrence of catenated forms. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, 62(1): 210-7, 1969.

RUDENKO, G.; CHUNG, H.M.; PHAM, V.P.; VAN DER PLOEG, L.H. RNA polymerase I can mediate expression of CAT and neo protein-coding genes in *Trypanosoma brucei*. **EMBO J**, 10(11): 3387-97, 1991.

RUDENKO, G.; LEE, M.G.; VAN DER PLOEG, L.H.T. The PARP and VSG genes of *Trypanosoma brucei* do not resemble RNA polymerase II transcription units in sensitivity to Sarkosyl in nuclear run-on assays. **Nucleic Acids Res**, 20(2): 303-306, 1992.

SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R.W.; BROWN, P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**, 5235(270): 467-470, 1995.

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

SHEA, C; LEE, M.G; VAN DER PLOEG, L.H. VSG gene 118 is transcribed from a cotransposed pol I-like promoter. **Cell**, 50(4): 603-12, 1987.

SHERMAN, D.R.; JANZ, L.; HUG, M.; CLAYTON, C. Anatomy of the parp gene promoter of *Trypanosoma brucei*. **EMBO J**, 10(11): 3379-3386, 1991.

SHIMOMURA, O.; JOHNSON, F.H.; SAIGA, Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. **J Cell Comp Physiol**, 59: 223-239, 1962.

SILVEIRA, J.F. *In* BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL NETTO, M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, pp.127-152, 2000.

SIMPSON, J.C; WELLENREUTHER, R; POUSTKA, A; PEPPERKOK, R; WIEMANN, S. Systematic subcellular localization of novel proteins identified by large-scale cDNA sequencing. **EMBO Rep**, 1(3): 287-92, 2000.

SOARES, M.J.; SOUTO-PADRÓN, T; DE SOUZA, W. Identification of a large pre-lysosomal compartment in the pathogenic protozoon *Trypanosoma cruzi*. **J Cell Sci**, 102(Pt 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 Suppl 1: 139-141, 1999.

SOUTO-PADRÓN, T.; DE SOUZA, W. Cytochemical analysis at the fine-structural level of trypanosomatids stained with phosphotungstic acid. **J Protozool**, 26(4): 551-7, 1979.

SULLIVAN, J.J. Metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi* in vitro: a simplified procedure. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 76(3): 300-3, 1982.

SWINDLE, J.; AJIOKA, J.; EISEN, H.; SANWAL, B.; JACQUEMOT, C.; BROWDER, Z.; BUCK, G. The genomic organization and transcription of the ubiquitin genes of *Trypanosoma cruzi*. **EMBO J**, 7(4): 1121-7, 1988.

SWINKELS, B.W; EVERS, R; BORST, P. The topogenic signal of the glycosomal (microbody) phosphoglycerate kinase of *Crithidia fasciculata* resides in a carboxy-terminal extension. **EMBO J**, 7(4): 1159-65; 1988.

TANOWITZ, H.B.; KIRCHHOFF, L.V.; SIMON, D.; MORRIS, S.A.; WEISS, L.M.; WITTNER, M. Chagas' disease. **Clin Microbiol Rev**, 5(4): 400-19, 1992.

TASANOR, O.; ENGELMEIER, D.; BREM, B.; WIEDERMANN-SCHMIDT, U.; GREGER, H.; WERNSDORFER, W.H. Development of a pharmacodynamic screening model with *Crithidia fasciculata*. **Wien Klin Wochenschr**, 118(19-20 Suppl 3): 42-9, 2006.

TAYLOR, M.C.; KELLY, J.M. Functional Dissection of The *Trypanosoma cruzi* Genome: New approaches in a new era. In: **World Class Parasites**: vol 7 American Trypanosomiasis. TYLER, K.M.; MILES, M.A. (Eds), Kluwer Academic Publishers, p. 57-67, 2003.

TAYLOR, M.C.; KELLY, J.M. pTcINDEX: a stable tetracycline-regulated expression vector for *Trypanosoma cruzi*. **BMC Biotechnol**, 6:32, 2006.

TEIXEIRA, A.R.; NASCIMENTO, R.J.; STURM, N.R. Evolution and pathology in chagas disease-a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 101(5): 463-91, 2006.

TETAUD, E; MANAI, F; BARRETT, M.P; NADEAU, K; WALSH, C.T; FAIRLAMB, A.H. Cloning and characterization of the two enzymes responsible for trypanothione biosynthesis in *Crithidia fasciculata*. **J Biol Chem**, 273(31):19383-90; 1998.

TETAUD, E.; LECUIX, I.; SHELDRAKE, T.; BALTZ, T.; FAIRLAMB, A.H. A new expression vector for *Crithidia fasciculata* and *Leishmania*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, 120(2): 194-204, 2002.

TSIEN, R.Y. The green fluorescent protein. **Annu Rev Biochem**, 67: 509-44, 1998.

TYLER, K.M.; ENGMAN, D.M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**, 31(5-6): 472-481, 2001.

TYLER, K.M.; OLSON, C.L.; ENGMAN, D.M. The Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*. In: **World Class Parasites**: vol 7 American Trypanosomiasis. TYLER, K.M.; MILES, M.A. (Eds), Kluwer Academic Publishers, p. 1-11, 2003.

TYLER-CROSS, R.E.; SHORT, S.L.; FLOETER-WINTER, L.M.; BUCK, G.A. Transient expression mediated by the *Trypanosoma cruzi* rRNA promoter. **Mol Biochem Parasitol**, 72(1-2): 23-31, 1995.

VAN DER PLOEG, L.H.; LIU, A.Y.; MICHELS, P.A.; DE LANGE, T.; BORST, P.; MAJUMDER, H.K.; WEBER, H.; VEENEMAN, G.H.; VAN BOOM, J. RNA splicing is required to make the messenger RNA for a variant surface antigen in trypanosomes. **Nucleic Acids Res**, 10(12): 3591-604, 1982.

VANHAMME, L.; PAYS, E. Control of gene expression in trypanosomes. **Microbiol Rev**, 59(2): 223-240, 1995.

VAZQUEZ, D. Translation inhibitors. **Int Rev Biochem**, 18: 169-232; 1978.

VAZQUEZ, M.P.; LEVIN, M.J. Functional analysis of the intergenic regions of TcP2beta gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. **Gene**, 239(2): 217-25, 1999.

WALHOUT, A.J.; SORDELLA, R.; LU, X., HARTLEY, J.L.; TEMPLE, G.F.; BRASCH, M.A.; THIERRY-MIEG, N.; VIDAL, M. Protein interaction mapping in *C. elegans* using proteins involved in vulval development. **Science**, 287(5450): 116-122, 2000a.

WALHOUT, A.J.; TEMPLE, G.F.; BRASCH, M.A.; HARTLEY, J.L.; LORSON, M.A.; VAN DEN HEUVEL, S.; VIDAL, M. GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes. **Methods Enzymol**, 328: 575-592, 2000b.

WEN, L.M.; XU, P.; BENEGAL, G.; CARVAHO, M.R.; BUTLER, D.R.; BUCK, G.A. *Trypanosoma cruzi*: exogenously regulated gene expression. **Exp Parasitol**, 97(4): 196-204, 2001.

WIRTZ, E.; HARTMANN, C.; CLAYTON, C. Gene expression mediated by bacteriophage T3 and T7 RNA polymerases in transgenic trypanosomes. **Nucleic Acids Res**, 22(19): 3887-94, 1994.

WIRTZ, E.; CLAYTON, C. Inducible gene expression in trypanosomes mediated by a prokaryotic repressor. **Science**, 268(5214): 1179-83, 1995.

WIRTZ, E.; HOEK, M.; CROSS, G.A. Regulated processive transcription of chromatin by T7 RNA polymerase in *Trypanosoma brucei*. **Nucleic Acids Res**, 26(20): 4626-34, 1998.

WIRTZ, E.; LEAL, S.; OCHATT, C.; CROSS, G.A. A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. **Mol Biochem Parasitol**, 99(1): 89-101, 1999.

YAO C, LUO J, HSIAO CH, DONELSON JE, WILSON ME. *Leishmania chagasi*: a tetracycline-inducible cell line driven by T7 RNA polymerase. **Exp Parasitol**, 116(3): 205-13, 2007.

ZOMERDIJK, J.C.; KIEFT, R.; BORST, P. Efficient production of functional mRNA mediated by RNA polymerase I in *Trypanosoma brucei*. **Nature**. 353(6346): 772-5, 1991.