

LETICIA ADEJANI LAIBIDA

**CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DE VETORES DE EXPRESSÃO HETERÓLOGA  
EM *Angomonas deanei***

CURITIBA

2012

LETICIA ADEJANI LAIBIDA

**CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DE VETORES DE EXPRESSÃO HETERÓLOGA  
EM *Angomonas deanei***

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

Orientador: Prof. Dr. Wanderson Duarte Da Rocha  
Colaborador: Dr. Stenio Perdigão Fragoso  
(ICC/Fiocruz)

CURITIBA

2012

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Laibida, Leticia Adejani

Construção e avaliação de vetores de expressão heteróloga em  
*Angomonas deanei*. / Ana Carolina Portugal Portella. – Curitiba, 2012.  
107 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Wanderson Duarte da Rocha

Colaborador: Stenio Perdigão Fragoso

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

1. Interferência de RNA 2. Tripanossomo 3. *Angomonas deanei* I.  
Título II. Rocha, Wanderson Duarte da III. Fragoso, Stenio Perdigão IV.  
Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa  
de Pós-Graduação em Bioquímica.

CDD (20. ed.) 616.936

## TERMO DE APROVAÇÃO

LETICIA ADEJANI LAIBIDA

### CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DE VETORES DE EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM *Angomonas deanei*

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

Orientador:

  
Prof. Dr. Wanderson Duarte da Rocha

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR

  
Profa. Dra. Marcia Kiyoe Shimada

Departamento de Patologia Básica, UFPR

  
Prof. Dr. Marcel Ivan Ramirez Araya

Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro

Curitiba, 28 de fevereiro de 2012.

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Maria Lúcia Ganzert Laibida (*in memoriam*), pelo maior exemplo de mulher que uma filha poderia ter.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Wanderson Duarte da Rocha, pela dedicação e amizade constantes e por ser aos meus olhos um exemplo de pesquisador.

Ao meu pai, Albary Laibida, e ao meu irmão, Albary Laibida Jr., pelo apoio incondicional a tudo que tenho me aventurado em fazer.

À irmã que a vida me deu e que eu aceitei com a maior satisfação do mundo: Ana Paula Gregorczyk Kikuti. Você é “mara”!

À minha segunda família: os integrantes do laboratório GFP! Monica “Monicats” Marcolino, Normanda Melo, Laiane Lemos, Rodrigo Soares, Ana Paula Cunha, Ana Laura Grazziotin e Geison Cambri. Obrigada pela amizade e por aquele ombro amigo tão confortável nas horas difíceis. Tem sido uma honra trabalhar com vocês!

Aos meus queridos amigos da nobreza: Alessandra “A Destruidora” Biz e André “Deco” Valgrande, pelas rodas de charuto e pelos ótimos “papos *nerds*” que tivemos ao longo destes dois anos. Vida longa e próspera!

À queridíssima Patrícia Sotomaior, pelo apoio e excelente companhia na noite curitibana!

Ao Dr. Stenio Perdigão Fragoso, do Instituto Carlos Chagas (ICC) Curitiba por dar-me a oportunidade de trabalhar em seu laboratório e também pela boa vontade em ajudar no desenvolvimento desta dissertação.

Ao Dr. Samuel Gondenberg, do ICC-Curitiba, pelo auxílio técnico-científico e estrutural essenciais no desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Adriana Ludwig e ao Dr. Christian Probst pelo fornecimento das sequências de DNA genômico de *Angomonas deanei* e pela ajuda na interpretação dos dados do RNA de interferência.

Aos integrantes do ICC: Dra. Andréia Ávila, Dr. Maurílio Soares, Mariana Serpeloni, Lysângela Alves, Vanessa, Silvio, Tania, Nilson, Fernanda Kugeratski (minha conterrânea!) e Lígia Kalb, por toda ajuda e paciência a mim prestadas.

A todas as pessoas que pertencem ou que já passaram pelo Lab 2 do ICC: Daniela Fiori, Alda “Aldinha” Maria Ferreira, Adriana “Didi” Umaki, Gisele Picchi, Monica Alcântara, Flávia “Flavinha” Morini, Larissa Campos, Rosana Gonçalves,

Odinéia Forner, Bárbara Aliot, Luiz “Aleatório” Aleotti, Maurício “Carioca” Oliveira, Livia Pilatti, Douglas Messias, Fernando Yamamoto e André Lorusso. Muito obrigada pela grande amizade, por tudo o que me ensinaram e pelos ótimos momentos de descontração.

A Juliana Kenski, Glaucio Valdameri (Laboratório de Oxidações Biológicas) e Rafael Kessler (Instituto Carlos Chagas), pelo auxílio com os experimentos de citometria de fluxo.

Ao pesquisador Dr. Erik Svensjö, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, por fornecer gentilmente o composto FITC-dextrana usado nos ensaios de eletroporação.

Aos professores Fábio Pedrosa e Emanuel Maltempi de Souza e aos técnicos, Valter de Baura e Rose Prado, do Instituto Nacional de Fixação Biológica de Nitrogênio, por todo suporte técnico-científico prestado.

Aos amigos dos laboratórios 279, 275, 272 e 271, em especial aos Drs. Marco Aurélio de Oliveira e Marco Antonio Kadowaki, por me ajudarem desde meus tempos de iniciação científica.

Ao Arquimedes Santana e ao Daniel Ritter: tem sido muito bom rir com vocês!

A melhor turma de mestrado de todos os tempos: foi um prazer enorme estudar com vocês!

À Pós-Graduação em Ciências: Bioquímica, pela oportunidade de me aprofundar na área que sempre quis estudar.

Ao CNPq, pela bolsa institucional.

“Há mais mistérios entre o céu e a terra do que supõe nossa vã filosofia.”

William Shakespeare

## RESUMO

Os tripanossomatídeos são protozoários parasitos ancestrais com características genéticas peculiares e muitos deles causam graves doenças em humanos, como a doença de Chagas, a doença do sono e a leishmaniose. Uma das formas de produzir fármacos para estas doenças depende da expressão de proteínas e da manipulação genética nestes protozoários. Pelo fato destes organismos serem patogênicos aos humanos é necessário adotar procedimentos de biossegurança, o que demanda um gasto maior de tempo para a manipulação. Para reduzir estas dificuldades, o tripanossomatídeo *Angomonas deanei* foi utilizado com o intuito de desenvolver um sistema de expressão heteróloga e de manipulação da expressão gênica eucariótica. Este organismo não apresenta risco de infecção a mamíferos, é capaz de ser cultivado em meio mínimo e produzir alta quantidade de biomassa e também pode realizar modificações pós-traducionais de proteínas alvo, como glicosilação. A possibilidade de usar *A. deanei* como ferramenta para manipulação gênica nos motivou a aprofundar na caracterização, por meio de análises *in silico*, dos potenciais componentes da maquinaria de RNA de interferência (RNAi) deste organismo. Duas prováveis proteínas dessa maquinaria foram encontradas: uma Ago (AdAGO) e uma PIWI (AdPIWI). Em ambas as proteínas foram identificados tanto o domínio PIWI quanto o PAZ, característicos de proteínas da via de RNAi. O domínio PAZ é bastante divergente em relação às proteínas AGO/PIWI de outros eucariotos. Uma provável tríade catalítica característica das proteínas argonautas foi identificada na proteína AdPIWI. Dada sua presença nos tripanossomatídeos sem RNAi funcional, é provável que a proteína AdPIWI exerça outro papel regulatório importante neste organismo. Semelhante ao encontrado em *T. brucei*, em AdAGO não foi encontrada a tríade catalítica. É provável que a AdAGO tenha um sítio catalítico distinto ou que atue recrutando outras proteínas para clivar o RNA. Para testar futuramente a funcionalidade da via de RNAi em *A. deanei* e também para usar este organismo como sistema de expressão, dois vetores utilizando sequências de *A. deanei* foram criados. Um deles para integração no *locus* de  $\alpha$ -tubulina (pCDXTub) e outro para integração no *locus* do RNA ribossômico (pCDXRibo). Dados de *Southern blot* de parasitos transfectados de forma estável indicaram a integração destes vetores no genoma. Contudo, os testes de expressão para os genes repórteres GFP e RLUC foram sem sucesso. Apesar de não detectar a fluorescência, parasitos carregando o vetor pCDXTub GFP foram capazes de produzir um transcrito compatível com o tamanho do mRNA de GFP e da resistência a neomicina. As razões para a não expressão dos genes repórteres são desconhecidas e necessitam de ensaios adicionais para elucidação desses resultados. Apesar dos dados não apontarem *A. deanei* como um bom modelo para expressão heteróloga, o vetor pCDXTub poderá ser usado no estudo da via de RNAi, devido à sua estabilidade e à capacidade de integração ao genoma desse protozoário.

Palavras chave: *Angomonas deanei*. Expressão heteróloga. RNA de interferência.



## ABSTRACT

The Trypanosomatidae family comprises ancient parasitic protozoa with peculiar genetic features and many of them cause severe human diseases, such as Chagas disease, sleeping sickness, and leishmaniasis. One strategy to drug development against these diseases depends on protein expression and genetic manipulation in these protozoa. However, biosafety and time consuming methods are needed when manipulating these parasites, since some of them are pathogenic to humans. In order to reduce these difficulties, the trypanosomatid *Angomonas deanei* was used with the intention of developing tools for heterologous expression and gene manipulation. This protozoan grows in minimal medium (without fetal calf serum) to high cell density and represents no risk of infection for mammals, and it is also able to realize posttranslational modification of target proteins, such as glycosylation. The possibility of using *A. deanei* as a model for genetic manipulation prompted us to further characterization of the potential components of the RNA interference (RNAi) machinery in this organism by *in silico* analysis. Two putative proteins of this machinery were found: AGO (AdAGO) and PIWI (AdPIWI). The characteristic domains of RNAi proteins such as PIWI and PAZ domains were identified, however the PAZ domain in these proteins shares low homology with AGO/PIWI proteins from other eukaryotes. A putative catalytic triad common in argonautes was identified only in AdPIWI protein. Since AdPIWI orthologues are present in trypanosomatid protozoa with no functional RNAi machinery, it's likely that the AdPIWI protein plays a role in other regulatory process in this organism. As described for *Trypanosoma brucei* ortholog, the catalytic triad wasn't identified in AdAGO protein. It's possible that AdAGO has a different catalytic site or is capable to recruit other proteins with RNA slicer activity. For future experimental characterization of RNAi phenomenon, and also to use this organism as a protein expression system, two expression vectors were constructed. One of them for integration in the  $\alpha$ -tubulin *locus* (pCDXTub) and the other one to integrate into the rDNA *locus*. The southern blot data of stable transfected parasites indicate that both vectors can integrate in *A. deanei* genome, however, expression assays for the reporter genes GFP and luciferase failed to show any activity. Despite the lack of fluorescence detection, cells carrying the pCDXTub vector were able to express a transcript compatible with GFP and neomycin resistance mature mRNAs. The reasons for the lack reporter genes expression are unknown and require additional tests to elucidate these results. Although the data do not suggest that *A. deanei* is a proper model for protein expression, it's possible that pCDXTub vector can be used for the experimental test of RNAi pathway, because of its stability and ability to integrate this protozoan's genome.

Key words: *Angomonas deanei*. Heterologous expression. RNA interference.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 –	EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS.....	25
FIGURA 2 –	MECANISMO DE AÇÃO DA DICER.....	32
FIGURA 3 –	ESTRUTURA E MECANISMO DE AÇÃO DO MODELO <i>SLICER</i> DA AGO.....	34
FIGURA 4 –	MECANISMO DO SILENCIAMENTO POR siRNA.....	35
FIGURA 5 –	DESENHO ESQUEMÁTICO MOSTRANDO AS ETAPAS DE CLONAGEM PARA A CONSTRUÇÃO DOS VETORES pCDX....	52
FIGURA 6 –	REPRESENTAÇÃO DAS PROTEÍNAS COM MAIOR HOMOLOGIA ÀS PROTEÍNAS AGO E PIWI DE <i>A. deanei</i> .....	66
FIGURA 7 –	ALINHAMENTO MÚLTIPLO ENTRE PARTE DO DOMÍNIO PIWI DAS PROVÁVEIS PROTEÍNAS AGO E PIWI DE ALGUNS TRIPANOSSOMATÍDEOS.....	67
FIGURA 8 –	MODELAGEM TRIDIMENSIONAL DO DOMÍNIO PIWI DE AdPIWI.....	69
FIGURA 9 –	ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS PROTEÍNAS AGO E PIWI DE ALGUNS TRIPANOSSOMATÍDEOS.....	70
FIGURA 10 –	PERFIL DE SENSIBILIDADE DE <i>A. deanei</i> A HIGROMICINA EM MEIO M199.....	72
FIGURA 11 –	PERFIL DE SENSIBILIDADE DE <i>A. deanei</i> A G418 EM MEIO LIT COMPLETO.....	73
FIGURA 12 –	MAPA DOS VETORES pCDXTub E pCDXRibo MOSTRANDO A LOCALIZAÇÃO DOS GENES CLONADOS E OS SÍTIOS DE RESTRIÇÃO.....	75
FIGURA 13 –	EFICIÊNCIA DO PROTOCOLO DE ELETROPORAÇÃO USADO EM <i>A. deanei</i> .....	76
FIGURA 14 –	CONFIRMAÇÃO DA INTEGRAÇÃO DOS VETORES pCDX NO GENOMA DE <i>A. deanei</i> POR <i>SOUTHERN BLOT</i> .....	78
FIGURA 15 –	POSSIBILIDADE DE INTEGRAÇÃO DO VETOR pCDXRibo GFP DIGERIDO <i>KpnI</i> NA REGIÃO DO DNA RIBOSSOMAL 18S DE <i>A. deanei</i> .....	79

FIGURA 16 – AVALIAÇÃO DA EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DE GFP DAS POPULAÇÕES SELECIONADAS CONTENDO OS VETORES pCDXTub GFP e pCDXRibo GFP.....	81
FIGURA 17 – DETECÇÃO DOS TRANSCRITOS DE NEOMICINA E GFP PARA <i>A. deanei</i> CONTENDO OS VETORES pCDXRibo GFP E pCDXTub GFP.....	82
FIGURA 18 – SEQUÊNCIAS DAS REGIÕES INTERCODIFICADORAS PRESENTES NO VETOR pCDX.....	84
FIGURA 19 – VETORES pCDX COM GENE REPÓRTER RLUC.....	86
FIGURA 20 – ANÁLISE DA ATIVIDADE DE LUCIFERASE EM <i>A. deanei</i> CARREGANDO O VETOR pCDXTub HRLUC.....	87

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – NÚMERO DE IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS USADAS NAS ANÁLISES <i>IN SILICO</i> PARA VERIFICAR A EXISTÊNCIA DA MAQUINARIA DE RNAi EM <i>A. deanei</i> .....	43
QUADRO 2 – MICRORGANISMOS USADOS E SUAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS.....	43
QUADRO 3 – PLASMÍDEOS USADOS E SUAS CARACTERÍSTICAS.....	44
QUADRO 4 – ANTIBIÓTICOS USADOS E SUAS CONCENTRAÇÕES FINAL E ESTOQUE.....	45
QUADRO 5 – COMPOSIÇÃO DOS REAGENTES E TAMPÕES USADOS.....	46
QUADRO 6 – LISTA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES USADOS.....	49

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

3' UTR	– Região 3' não traduzida
5' UTR	– Região 5' não traduzida
Ad	– <i>Angomonas deanei</i>
APS	– Persulfato de amônio
ATP	– Adenosina trifosfato
bp	– Pares de base (do inglês, <i>base pairs</i> )
BSA	– Albumina de soro bovino (do inglês, <i>bovine serum albumin</i> )
CAT	– Cloranfenicol acetil transferase
CTP	– Citosina trifosfato
Da	– Dalton
DAPI	– 4',6-diamidino-2-Fenilindol
DEPC	– Dietil pirocarbonato
dNTP	– Deoxinucleotídeo trifosfato
DO	– Densidade óptica
dsRNA:	– RNA de dupla fita (do inglês, <i>double-stranded RNA</i> )
FACS	– Separação de células ativadas por fluorescência (do inglês <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> )
FITC	– Isotiocianato de fluoresceína
FLUC	– Luciferase de vagalume
GFP	– Proteína verde fluorescente
gGAPDH	– Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase glicossomal
Higro	– Higromicina
IGS	– Espaçador intergênico (do inglês, <i>intergenic spacer</i> )
Inter-CDS	– Região intercodificadora (do inglês, <i>inter-coding sequence</i> )
IPTG	– Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo
kb	– kilobases
kDa	– kilodalton
LA	– Luria-Bertani ágar
Lb	– <i>Leishmania braziliensis</i>
LB	– Luria-Bertani
LIT	– Infuso de fígado e triptose (do inglês, <i>liver infusion tryptose</i> )
MOPS	– Ácido 3-(N-morfolino) propanossulfônico

mRNA:	– RNA mensageiro
NCBI	– Centro Nacional de Informação Biotecnológica (do inglês, <i>National Center for Biotechnological Information</i> )
Neo	– Neomicina
nt	– Nucleotídeo
PCR	– Reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>polymerase chain reaction</i> )
PEG	– Polietilenoglicol
PGKA	– Fosfoglicerato quinase A
PGKB	– Fosfoglicerato quinase B
pI	– Ponto isoelétrico
Poli(A)	– Poliadenina
Poli(Y)	– Polipirimidina
PTU	– Unidade de transcrição policistrônica (do inglês, <i>polycistronic transcription unit</i> )
RFP	– Proteína vermelha fluorescente
RLUC	– luciferase de <i>Renilla</i>
rpm	– Rotação por minuto
rRNA	– RNA ribossômico
SAP	– Fosfatase alcalina de camarão (do inglês, <i>shrimp alkaline phosphatase</i> )
SDS	– Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	– Gel de eletroforese em poli(acrilamida e dodecil sulfato de sódio (do inglês, <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
SFB	– Soro fetal bovino
SL	– <i>spliced leader</i>
ssRNA	– RNA de fita simples (do inglês, <i>single-stranded RNA</i> )
TA	– Temperatura ambiente
Tc	– <i>Trypanosoma cruzi</i>
TEMED	– N, N, N', N'-Tetrametiletlenodiamina
Tris	– Tris(hidroximetil)aminometano
TSS <sup>1</sup>	– Sítio de início de transcrição (do inglês, <i>transcription start site</i> )

- TSS<sup>2</sup> – Solução de transformação e de armazenamento (do inglês, *transformation and storage solution*)
- UTR – Região não traduzida (do inglês, *untranslated region*)
- X-Gal – 5-Bromo-4-cloro-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	19
2.1. TRIPANOSSOMATÍDEOS.....	19
2.1.1. <i>Angomonas deanei</i> .....	20
2.1.2. Expressão gênica em tripanossomatídeos .....	23
2.2. SISTEMAS DE EXPRESSÃO EM TRIPANOSSOMATÍDEOS .....	26
2.3. RNA DE INTERFERÊNCIA (RNAi).....	30
2.3.1. A ribonuclease Dicer.....	32
2.3.2. Proteínas AGO e o complexo RISC.....	33
2.3.3. siRNA .....	34
2.3.4. RNAi em tripanossomatídeos .....	36
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	39
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	41
4.1. OBJETIVO GERAL .....	41
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	42
5.1. ANÁLISE <i>IN SILICO</i> PARA AVERIGUAR A EXISTÊNCIA DA MAQUINARIA DE RNAi EM <i>Angomonas deanei</i> .....	42
5.2. MICRORGANISMOS E PLASMÍDEOS.....	43
5.3. ANTIBIÓTICOS.....	45
5.4. MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO .....	46
5.5. REAGENTES.....	46
5.6. CURVA DE CRESCIMENTO PARA DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE A G418 E HIGROMICINA.....	47
5.7. CLONAGEM DAS SEQUÊNCIAS DE DNA PARA CONSTRUÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO.....	48
5.7.1. Extração do DNA genômico de <i>A. deanei</i> .....	48
5.7.2. Amplificação do DNA por PCR .....	48
5.7.3. Digestão dos amplicons e dos vetores .....	49
5.7.4. Construção dos vetores pCDXTub e pCDXRibo .....	50
5.7.5. Clonagem dos genes repórter de GFP e RLUC .....	53
5.7.6. Preparação de células de <i>Escherichia coli</i> quimiocompetentes .....	53
5.7.7. Transformação bacteriana e seleção dos clones .....	54
5.7.8. Estoque em glicerol das células de <i>Escherichia coli</i> .....	54
5.7.9. Extração do DNA plasmidial .....	54
5.7.10. Eletroforese de DNA em gel de agarose .....	55



5.7.11. Sequenciamento dos clones .....	55
5.8. TRANSFEÇÃO E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS VETORES.....	55
5.8.1. Contagem das células em câmara de Neubauer.....	55
5.8.2. Transfecção em <i>Angomonas deanei</i> .....	56
5.8.3. Seleção dos protozoários transfectados.....	56
5.8.4. Eletroporação de <i>A. deanei</i> com FITC-dextrana 150 kDa .....	56
5.8.5. Análise por microscopia de fluorescência.....	57
5.8.6. Análise de fluorescência por FACS .....	58
5.8.7. Extração de proteínas e análise por eletroforese em gel SDS-PAGE .....	58
5.8.8. <i>Western blot</i> .....	59
5.8.9. Tratamento dos materiais e soluções para eliminação de RNase .....	59
5.8.10. Extração de RNA de <i>Angomonas deanei</i> .....	60
5.8.11. Eletroforese em gel de agarose desnaturante.....	60
5.8.12. <i>Northern blot</i> .....	60
5.8.13. <i>Southern blot</i> .....	61
5.8.14. Marcação de sondas radioativas .....	61
5.8.15. Análise da atividade de luciferase .....	62
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>64</b>
6.1. ANÁLISE <i>IN SILICO</i> PARA VERIFICAR A EXISTÊNCIA DA MAQUINARIA DE RNAi EM <i>Angomonas deanei</i> .....	64
6.2. CONSTRUÇÃO DO SISTEMA DE EXPRESSÃO GÊNICA EM <i>A. deanei</i> .....	71
6.2.1. Teste de sensibilidade a G418 e higromicina .....	71
6.2.2. Construção dos vetores de expressão pCDXTub e pCDXRibo .....	73
6.2.3. Transfecção de <i>Angomonas deanei</i> com os vetores pCDX .....	75
6.2.4. Análise das populações de <i>A. deanei</i> resistentes a G418.....	77
6.2.5. Análise da expressão do gene repórter GFP nas populações resistentes a G418 .....	80
6.2.6. Avaliação da expressão heteróloga de RLUC em <i>Angomonas deanei</i> .....	85
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	<b>89</b>
<b>8. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>90</b>
<b>9. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>91</b>
<b>APÊNDICES</b> .....	<b>101</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os tripanossomatídeos são um grupo de protozoários parasitos ancestrais, alguns deles causadores de doenças em humanos, tais como *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* e *Leishmania* sp., agentes causais da doença de Chagas, doença do sono e leishmaniose, respectivamente. A ocorrência dessas doenças é endêmica em algumas regiões do mundo, na América Latina e na África. Devido ao fluxo migratório e às condições sócio econômicas de alguns países, um aumento na incidência de casos dessas doenças tem sido notificado nas últimas décadas. Embora muitos avanços em seu controle tenham sido alcançados, a terapêutica é eficaz somente em alguns estágios dessas patologias ou é consideravelmente tóxica ao paciente.

Para o desenvolvimento de novos fármacos contra essas doenças, uma das abordagens utilizadas é a superexpressão de proteínas alvos de drogas terapêuticas. Nesta abordagem, são determinadas a estrutura da proteína alvo e a interferência de sua atividade na presença de fármacos em potencial. Apesar de diversos sistemas de superexpressão estarem disponíveis, todos apresentam limitações, como a segurança biológica, a toxicidade para o microrganismo que a superexpressa e a produção de proteínas imperfeitas (sem modificações pós-traducionais apropriadas). Dessa maneira, um sistema funcional de superexpressão em um parasito análogo que possua uma maquinaria de expressão adequada seria uma ótima ferramenta na validação de novos fármacos. O protozoário *Angomonas deanei*, um protozoário tripanossomatídeo que carrega uma bactéria endossimbionte, coloniza apenas insetos e pode ser cultivado com alta produção de biomassa. Por sua semelhança morfológica com outros tripanossomatídeos patogênicos, seria de grande utilidade estudar um modelo de superexpressão de proteínas exógenas neste microrganismo.

A superexpressão de genes exógenos através de um vetor epissomal pode ser suprimida devido à atividade da maquinaria de RNA de interferência (RNAi), quando presente no microrganismo hospedeiro. Pela ação desta maquinaria, o RNA mensageiro é direcionado para a degradação através de sua identificação por um RNA complementar, resultando em baixos níveis do produto deste gene na célula hospedeira. Devido a este mecanismo, um vetor epissomal dificilmente será expresso ou mantido com sucesso, em virtude da transcrição nesses vetores ocorrer

em ambas as fitas. Dessa maneira, um RNA dupla fita poderá ser produzido e ativar seu silenciamento por meio do RNAi. Portanto, o vetor de superexpressão deve ser construído de modo a permitir também sua integração no genoma do organismo, o que reduz o efeito do silenciamento por meio do RNAi. Alguns tripanossomatídeos como *Trypanosoma brucei*, *Leishmania braziliensis* e *Crithidia fasciculata* possuem essa maquinaria funcional. Para os dois primeiros, já foi evidenciada a dificuldade de seleção desses protozoários contendo vetores episomais. O fenômeno do RNAi, no entanto, não está presente em *Trypanosoma cruzi* e em um grande número de espécies de *Leishmania*. Apenas a análise *in silico* não é capaz de afirmar se a maquinaria de RNAi é ativa, sendo necessário, portanto, outras estratégias experimentais que forneçam a evidência da atividade dessa via.

A manipulação da expressão gênica em um modelo compatível de expressão pode contribuir com o entendimento da biologia destes parasitos por permitir o estudo funcional de seus genes. A superexpressão de proteínas alvo pode ser útil no desenvolvimento de vacinas e novos fármacos para terapêutica das patologias causadas por eles. A existência da maquinaria de RNAi em *A. deanei* e sua caracterização pode fazer deste protozoário um modelo de estudo não apenas para o desenvolvimento de sistemas de expressão recombinante, mas também para sua utilização como modelo no estudo de função gênica de tripanossomatídeos, através do silenciamento de genes de interesse e seu efeito sobre a fisiologia do organismo.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. TRIPANOSSOMATÍDEOS

A classe Kinetoplastida é formada por microrganismos eucarióticos interessantes tanto do ponto de vista médico quanto evolucionário. Esta classe é dividida em duas subclasses (Prokinetoplastina e Metakinetoplastina), as quais compreendem uma série de protozoários comensais de vida livre ou parasitas, coletivamente nomeados bodonidas. Uma das ordens destas subclasses (Trypanosomatida), é formada por protozoários parasitos obrigatórios, alguns deles responsáveis por graves doenças em humanos, como *Trypanosoma cruzi* (doença de Chagas), *Trypanosoma brucei* (doença do sono) e *Leishmania* sp. (leishmanioses) (SIMPSON; STENENS; LUKES, 2006; MOREIRA; LÓPEZ-GARCÍA; VICKERMAN, 2004).

Onze gêneros identificados até agora compõem a subclasse dos tripanossomatídeos, sendo 7 delas de protozoários de ciclo biológico monoxênico, ou seja, desenvolvem-se em apenas um hospedeiro (*Angomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Strigomonas*, *Herpetomonas*, *Wallaceina*, *Leptomonas*), e 4 de ciclo biológico heteroxênico (*Trypanosoma*, *Leishmania*, *Endotrypanum* e *Phytomonas*). Sua classificação ocorre principalmente por aspectos morfológicos de sua interação com os hospedeiros: suas dimensões, forma e posição do complexo cinetoplasto-bolsa flagelar em relação ao núcleo (SVOBODOVÁ *et al.*, 2007, TEIXEIRA *et al.*, 2012).

Os tripanossomatídeos possuem características bioquímicas e celulares singulares, ou que foram primeiramente observadas nestes microrganismos e posteriormente atribuídas a outros eucariotos (LOPES *et al.*, 2010). Dentre elas, estão a variação antigênica programada de glicoproteínas de superfície que ocorre com *T. brucei*; a transcrição policistrônica; a edição de RNA mitocondrial; a baixíssima frequência de íntrons; *trans-splicing* dos precursores de RNA e a existência de organelas únicas como o glicossomo e o cinetoplasto. Os tripanossomatídeos são organismos ancestrais, com linhagens que antecedem aquelas de animais, plantas e inclusive fungos (DONELSON; GARDNER; EL-SAYED, 1999). Estas características justificam o interesse no extenso estudo destes

protozoários, buscando um entendimento maior da evolução de microrganismos unicelulares a seres multicelulares de alta complexidade.

Dentre as características próprias da biologia celular dos tripanossomatídeos, estão a estrutura peculiar do flagelo; a presença de uma invaginação na membrana responsável pela endocitose (bolsa flagelar); uma organela que comporta parte da via glicolítica (o glicossomo); uma única mitocôndria ramificada por toda célula com uma estrutura proeminente denominada cinetoplasto (LOPES *et al.*, 2010; LANDFEAR; IGNATUSHCHENKO, 2001). Os mecanismos de expressão gênica são particulares e serão descritos em seção própria.

### 2.1.1. *Angomonas deanei*

*Angomonas deanei* (anteriormente chamada de *Crithidia deanei*) é um tripanossomatídeo que parasita somente insetos, isolado do hemíptero *Zelus leucogrammus* (CARVALHO; DEANE, 1974; MUNDIM *et al.*, 1974). Sua forma morfológica é de coanomastigota (em forma de sino), sendo esta sua única forma evolutiva durante seu ciclo monoxênico, que ocorre exclusivamente no hospedeiro invertebrado (MOTTA *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2011). Sua disseminação é através da alimentação por parte de *Z. leucogrammus* de insetos saprófagos que contêm este protozoário (CARVALHO; DEANE, 1974). Estruturalmente, contém todas as características que são ditas usuais aos tripanossomatídeos: flagelo conectado a bolsa flagelar, citoesqueleto com microtúbulos subpeliculares, cinetoplasto, uma única mitocôndria, glicossomos e bastão paraflagelar. Este é parte de um complexo proteico flagelar responsável pela motilidade do parasito. Em *A. deanei*, ele é bastante reduzido, sendo considerado por muito tempo inexistente neste microrganismo (GADELHA *et al.*, 2005).

Todo ciclo biológico de *A. deanei* ocorre no inseto, uma vez que esse organismo não necessita de hospedeiros vertebrados para seu desenvolvimento (ciclo monoxênico). Os detalhes deste processo ainda não são bem esclarecidos em tripanossomatídeos de ciclo monoxênico, mas acredita-se o ponto principal de colonização por estes protozoários é o intestino médio dos insetos, embora já tenham sido isolados protozoários de outras regiões do hospedeiro invertebrado, como da hemolinfa, hemocélula e dos túbulos de Malpighi (MOTTA *et al.*, 2010). *A.*

*deanei* foi primeiramente isolada do intestino do inseto *Z. leucogramus*, sugerindo este ser um provável local da colonização (CARVALHO; DEANE, 1974).

Ao contrário da maioria dos tripanossomatídeos, *A. deanei* não é um protozoário nutricionalmente exigente, apenas alguns aminoácidos e vitaminas suplementados no meio de infusão de fígado e triptose (LIT) permitem crescimento do protozoário *in vitro*. Nenhuma fonte de hemina, um análogo do grupo heme, ou de purinas é necessário para o crescimento, ao contrário dos demais tripanossomatídeos que são incapazes de sintetizar heme ou purinas (MUNDIM *et al.*, 1974; MOTTA, 2010). Essa característica permitiu deduzir a existência de um organismo endossimbionte, uma vez que *Crithidia oncopelti* era igualmente cultivada em meio de cultura mínimo e possuía em seu citoplasma corpos bipolares próximos ao núcleo do protozoário (NEWTON; HORNE, 1957). Posteriormente, descobriu-se que estes corpos bipolares possuíam material genético e acompanhavam a divisão celular do hospedeiro. Estas estruturas foram mais tarde identificadas como sendo uma bactéria endossimbionte (MARMUR *et al.*, 1963).

A endossimbiose é um evento comum na natureza, principalmente em plantas e protozoários. Sua relação de dependência com o hospedeiro, e dele com o endossimbionte, tem levantado a questão de que talvez esses organismos evoluíram a organelas como a mitocôndria e o cloroplasto (DU; McLAUGHLING; CHANG, 1994). Por essa razão, protozoários que abrigam endossimbiontes têm sido usados como modelo de estudo para a evolução de organelas (DU; McLAUGHLING; CHANG, 1994; MOTTA, 2010). Alguns tripanossomatídeos apresentam endossimbiose, como *Angomonas deanei*, *Strigomonas oncopelti* (anterior *Crithidia oncopelti*), *Angomonas desouzai* (anterior *Crithidia desouzai*), *Strigomonas culicis* (anterior *Blastocrithidia culicis*) e *Herpetomonas roitmani*. O endossimbionte de *A. deanei* pertence à classe das  $\beta$ -proteobactérias, sendo nomeado *Kinetoplastibacterium crithidii* e agrupado no gênero *Bordetella*. A presença do endossimbionte resultou em recente reclassificação taxonômica de diversos protozoários, devido à alteração morfológica causada pela endossimbiose (MOTTA, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2011).

O endossimbionte é responsável por algumas alterações morfológicas em *A. deanei*. Os glicossomos e o núcleo celular encontram-se em íntima associação com o endossimbionte (MOTTA *et al.*, 1997). A mitocôndria tem sua distribuição espacial alterada, na qual regiões dessa organela, que se assemelham a ramos, entram em

contato com a parte interna da membrana celular. Os microtúbulos subpeliculares estão ausentes nas regiões em que os ramos mitocondriais estão justapostos à membrana plasmática. O cinetoplasto também apresenta alteração morfológica: a rede que forma o DNA desta organela (kDNA) é mais frouxa em relação aos tripanossomatídeos livres de endossimbionte (MOTTA, 2010). Acreditava-se que o endossimbionte pudesse impedir a expressão dos genes que constituem o bastão paraflagelar (PFR), justificando a ausência dessa estrutura no flagelo (MOTTA, 2010). Contudo, Gadelha *et al.* (2005) mostraram a existência do PFR em *A. deanei* por microscopia eletrônica e de um único gene codificador (PFR1) através de PCR com iniciadores degenerados e técnicas de hibridização. O produto do gene PFR1 mostrou ser funcional por recuperar mesmo que parcialmente a motilidade de mutantes de *Leishmania mexicana* (GADELHA *et al.*, 2005).

O tripanossomatídeo hospedeiro compartilha diversas vias metabólicas com o endossimbionte. Hemina, hematina e hemoglobina são fatores de crescimento essenciais e, aparentemente, os tripanossomatídeos não possuem uma via para síntese do heme (ROITMAN; ROITMAN; DE AZEVEDO, 1972; CHANG; CHANG; SASSA, 1975). O endossimbionte fornece enzimas dessa via e porfirina precursoras para a síntese do heme, justificando a razão pela qual *A. deanei* e outros tripanossomatídeos portadores de endossimbionte não necessitam de hemina para seu crescimento (SALZMAN *et al.*, 1985). De forma semelhante, enzimas para a síntese de alguns aminoácidos também são fornecidas pelo endossimbionte, como a ornitina descarboxilase, a qual participa da síntese de ornitina, citrulina e arginina (MOTTA, 2010). Já a absorção de L-prolina a partir do meio de cultura é maior em *A. deanei* que possui endossimbiose, em relação a cepas desse organismo sem endossimbionte (ROJAS *et al.*, 2008).

Para uma verdadeira simbiose, deve haver uma relação mutualística entre a célula hospedeira e o endossimbionte. Já foi discutido o benefício dessa relação para o desenvolvimento do protozoário, o qual na perda desse microrganismo através do tratamento com antibióticos torna-se um protozoário nutricionalmente exigente. Naturalmente, deve haver algum benefício para o endossimbionte abrigado no tripanossomatídeo para que exista a simbiose. Endossimbiontes isolados dos seus hospedeiros não são capazes de sobreviver por si só (DU; McLAUGHLING; CHANG, 1994). Já foi demonstrado que o endossimbionte de *A. deanei* utiliza fosfatidilcolina, um lipídio de membrana, sintetizado pelo hospedeiro (AZEVEDO-

MARTINS *et al.*, 2007). Algumas análises sugerem que a cadeia de transporte de elétrons do endossimbionte de *A. deanei* não é ativa, pela inexistência ou inatividade da succinato desidrogenase e da citocromo oxidase  $aa_3$ . Por essa razão, é possível que o endossimbionte utilize o ATP produzido pela célula hospedeira para criar um gradiente de prótons em sua membrana, fazendo-o transportar para si compostos de que precisa, como íons, adenosina e outros. Essa hipótese é reforçada pela íntima associação do endossimbionte com organelas produtoras de energia do protozoário: a mitocôndria e os glicossomos (MOTTA *et al.*, 1997).

### 2.1.2. Expressão gênica em tripanossomatídeos

Os tripanossomatídeos são microrganismos eucarióticos ancestrais que, além da importância médica, apresentam características peculiares na expressão de seus genes, as quais despertam o interesse no estudo do seu mecanismo. A transcrição ocorre em unidades policistrônicas (PTU); o mRNA é processado principalmente por *trans-splicing* e alguns genes codificadores de proteínas são transcritos pela RNA polimerase I (DONELSON; GARDNER; EL-SAYED, 1999). O único promotor de RNA polimerase II caracterizado até o momento é o que codifica para o *spliced leader (SL)*, apesar de outras PTUs apresentarem transcrição por esta polimerase, como mostram ensaios de sensibilidade a  $\alpha$ -amanitina. Finalmente, a existência de modificações de histonas e de proteínas modificadoras da cromatina sugerem um importante mecanismo de regulação epigenética por esses microrganismos (Figura 1) (ELIAS; FARIA, 2009; MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 2010; EKANAYAKE *et al.*, 2011; TEIXEIRA *et al.*, 2012).

O genoma é organizado em extensas unidades de transcrição policistrônica, como primeiramente mostrado para o cromossomo 1 de *L. major* (MYLER *et al.*, 1999) (Figura 1). Todos os genes de uma PTU são transcritos ao mesmo tempo, de forma divergente ou convergente, sendo que cada cromossomo possui no mínimo duas PTUs. Ao contrário do que se observa em *operons* de procariontos e de nematódeos, os genes de uma PTU não estão correlacionados entre si (CAMPBELL; THOMAS; STURM, 2003). Entre as PTUs encontram-se genes codificados pela RNA polimerase III, incluindo os de tRNAs, os quais parecem ser distribuídos de forma específica e em determinados cromossomos (IVENS *et al.*, 2005; PADILLA-MEJÍA *et al.*, 2009). Diferentemente dos outros eucariotos, a



presença de íntrons no genoma é rara, sendo descrita até o momento para dois genes apenas: poli(A) polimerase e para o tRNA de tirosina (MAIR *et al.*, 2000; TAN *et al.*, 2002; PADILLA-MEJÍA *et al.*, 2009).

A transcrição de uma unidade policistrônica gera mRNAs igualmente policistrônicos, ou seja, um único RNA contém todos os transcritos dessa PTU (Figura 1). Esses mRNAs são posteriormente processados aos respectivos mRNAs monocistrônicos, através de reações de *trans-splicing* e de poliadenilação (ULLU; MATTHEW; TSCHUDI, 1993). O *trans-splicing* adiciona uma pequena sequência de RNA (cerca de 40 nt), chamada de *spliced leader* (SL) ou miniexon, à extremidade 5'UTR do RNA policistrônico. Sua inserção é determinada pelos nucleotídeos AG, o sítio aceptor do SL. A poliadenilação adiciona uma sequência de adeninas à extremidade 3' UTR, em uma região rica em pirimidinas. Essa região encontra-se cerca de 18 a 24 pares de base anteriores ao sítio aceptor do SL do gene seguinte, variando entre as espécies (CAMPOS *et al.*, 2008). A poliadenilação é precedida pelo *trans-splicing* e determinada pela posição do sítio aceptor do SL do gene adjacente. Ambas as reações são relacionadas e ocorrem paralelamente à transcrição (LeBOWITZ *et al.*, 1993; ULLU; MATTHEW; TSCHUDI, 1993).

Embora vários mRNAs sejam produzidos a partir de um mRNA policistrônico, as taxas de expressão não serão necessariamente uniformes, estes mRNAs poderão sofrer controle da expressão em níveis pós-transcricionais. Elementos regulatórios presentes na região 3' UTR atuam como sítio de ligação de proteínas, as quais promovem estabilização ou desestabilização do transcrito, dependendo do estágio de vida do parasito (DE GAUDENZI; D'ORSO; FRASCH, 2003; ARAÚJO; TEIXEIRA, 2011). Por exemplo, o mRNA de amastina, uma glicoproteína de superfície do *T. cruzi*, é 50 vezes mais abundante nas formas amastigotas do que em epimastigotas (TEIXEIRA *et al.*, 1994). Especula-se que um complexo de proteínas em maior quantidade nas formas amastigotas liga-se a uma sequência regulatória de cerca de 200 pares de base neste mRNA. Esse complexo é responsável pela estabilização do mRNA de amastina nas formas amastigotas (COUGHLIN *et al.*, 2000). Os níveis de RNA mensageiro de mucina, uma glicoproteína de superfície, são regulados em *T. cruzi* de maneira estágio específica através de um elemento regulatório rico em AU, presente na região 3' não traduzida de seu gene. O RNA mensageiro de mucina é por essa razão mais abundante na forma epimastigota deste protozoário (DI NOIA *et al.*, 2000). De maneira análoga, o

mRNA da fosfoglicerato quinase B (PGKB) de *T. brucei* também possui um elemento regulatório rico em AU que promove a estabilização deste mRNA na forma procíclica, mas não na forma sanguínea do protozoário (QUIJADA *et al.*, 2002). Por esses fenômenos, e pela ausência de promotores caracterizados de RNA Polimerase II e de seus fatores de regulação, diz-se que a regulação da transcrição nos tripanossomatídeos é principalmente a nível pós transcricional. Por conseguinte, esses microrganismos são capazes de alterar a expressão gênica de forma rápida, em decorrência das mudanças ambientais entre o hospedeiro inseto e o mamífero (SANTUZA; DaROCHA, 2003).

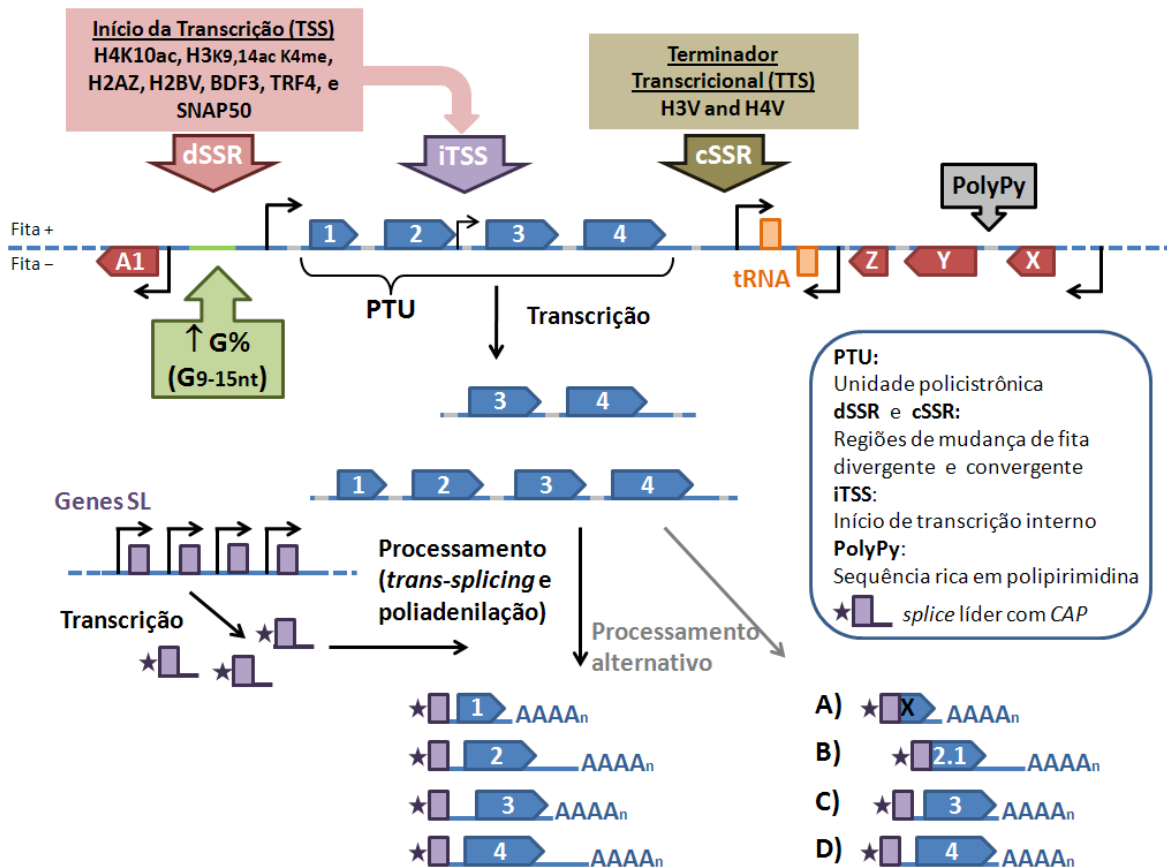


FIGURA 1 – EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS.

FONTES: Adaptado de Teixeira *et al.* (2012).

NOTA: Longos conjuntos de genes não relacionados são organizados por unidades policistrônicas (PTU), as quais são separadas por regiões de alteração de fita convergente e divergente. Sítios de início de transcrição (TSS<sup>1</sup>) de RNA Pol II são geralmente encontrados a montante do primeiro gene da PTU ou como uma TSS interna (iTSS). Diversos tipos de histonas e alguns fatores de transcrição estão associados às TSS e com menor frequência nas iTSS. Os RNAs policistrônicos são individualizados em mRNAs monocistrônicos após a adição do *Spliced leader* com *CAP*, através de uma reação de *trans-splicing* acoplada à poliadenilação. Estas reações são guiadas por regiões de polipirimidina que estão presentes em cada região intercodificadora. mRNAs maduros são transportados para o citoplasma, onde a estabilidade e eficiência de tradução são amplamente

dependentes de elementos *cis-acting*, presentes nas regiões não traduzidas (UTR). RNAs policistrônicos podem sofrer processamento alternativo que pode resultar em mudanças do códon AUG inicial, alterando então a tradução da proteína (A), ou a marcação/função (B). O processamento alternativo e a poliadenilação também podem resultar em inclusão ou exclusão de elementos regulatórios presentes nas 5' UTRs (C) ou 3' UTRs (D).

## 2.2. SISTEMAS DE EXPRESSÃO EM TRIPANOSSOMATÍDEOS

A descoberta dos elementos necessários para a transcrição gênica nos tripanossomatídeos surgiu de experimentos de transfecção com vetores contendo fragmentos que continham esses elementos em potencial (LABAN; WIRTH, 1989; BELLOFATTO; CROSS, 1989; ARAÚJO; TEIXEIRA, 2011). No decorrer dos anos, as técnicas foram aprimoradas, fornecendo uma visão profunda da biologia molecular desses protozoários, através da expressão de proteínas para ensaios de localização celular e testes bioquímicos, da construção de protozoários nocautes para o estudo da função gênica e também através da introdução de marcas genéticas para o estudo da regulação da expressão gênica. Nesse contexto, as técnicas de transfecções nestes protozoários são amplamente utilizadas para alcançar tais objetivos (TEIXEIRA, 1998; TEIXEIRA; DaROCHA, 2003).

As transfecções podem ocorrer de duas maneiras: transiente ou estável. Na primeira, o vetor permanece na forma episomal sua expressão é avaliada em algumas horas após a transfecção, no entanto a taxa de expressão cai após curto período de tempo, como alguns dias. Nas transfecções estáveis, o vetor pode recombinar-se com o genoma do parasito ou permanecer episomal, podendo ser mantido estável pela manutenção de pressões seletivas. Neste caso, a expressão do gene exógeno leva mais tempo para ser evidenciada, mas permanece por período mais longo de tempo, até alguns meses após a transfecção (TEIXEIRA, 1998).

As primeiras transfecções em tripanossomatídeos se iniciaram na década de 1980, utilizando-se sequências de *Trypanosoma cruzi*, *Leptomonas*, *Leishmania* e genes repórteres bacterianos (cloranfenicol acetil transferase, ou CAT) (LABAN; WIRTH, 1989; BELLOFATTO; CROSS, 1989; LU; BUCK, 1991). Nesses ensaios, regiões intercodificadoras dos genes de  $\alpha$ -tubulina e do miniexon flanqueavam o gene repórter de CAT. Esses fragmentos continham as sequências necessárias para a adição do SL e da cauda poli(A), garantindo desta maneira a expressão do gene

exógeno. Deleções de parte desses fragmentos e inversão da orientação nos vetores forneceram o conhecimento da orientação e das sequências necessárias para o processamento dos mRNAs (LABAN; WIRTH, 1989; BELLOFATTO; CROSS, 1989). Nesses experimentos, os parasitos transfectados com estes vetores apresentaram certa estabilidade, com a expressão transiente de CAT variando de 20h a 100h após a transfecção.

Kelly *et al.* (1992) construíram o vetor de expressão estável pTEX para *T. cruzi* e *Leishmania*. Ele contém as sequências intercodificadoras de gGAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase glicossomal) flanqueando o gene repórter (CAT) e o marcador de resistência a neomicina, garantindo dessa maneira a *trans-splicing* e a poliadenilação correta desses genes. Esse vetor foi posteriormente modificado com a introdução do promotor do *locus* de rRNA no lugar da 3' UTR de gGAPDH do gene repórter, resultando no pRIBOTEX (MARTÍNEZ-CALVILLO; LÓPEZ; HERNÁNDEZ, 1997). Este vetor apresentou atividade de CAT maior e tempo de seleção menor em comparação com o vetor parental, além de permitir a integração no genoma do *T. cruzi*, ao contrário do pTEX. O pRIBOTEX foi em seguida aperfeiçoado através da inserção da região HX1 a jusante do promotor ribossomal, resultando no vetor de expressão estável pTRESX-n (VAZQUEZ; LEVIN, 1999). A região HX1 é parte do gene *TcP2β*, uma proteína ribossomal de *T. cruzi*, e funciona como potente região para *trans-splicing*. Com essa modificação, o pTRESX apresentou atividade de CAT ainda maior que a do pRIBOTEX. Finalmente, DaROCHA e outros (2004a) inseriram parte do gene de β-tubulina anterior ao promotor ribossomal do pTRESX-n, criando o vetor pROCKNeo. O gene de β-tubulina contém sítio único da endonuclease *NotI*, que após digestão com essa enzima permite a integração do vetor no *locus* de β-tubulina, facilitando a recombinação homóloga deste vetor no genoma de *T. cruzi*.

Existem ainda vetores para expressão em demais tripanossomatídeos. O vetor pNUS é usado tanto para *C. fasciculata* como para *Leishmania* e é mantido estável na forma epissomal (TETAUD *et al.*, 2002). Os vetores pLEW são utilizados para *T. brucei* para expressão regulada (WIRTZ *et al.*, 1999). O pLEXY é usado em *Leishmania tarantolae* (BREITLING *et al.*, 2002) como um sistema para produção de proteínas eucarióticas. Todos esses vetores, assim como os de *T. cruzi*, contêm regiões intercodificadoras flanqueando os genes repórteres e os marcadores de

seleção, as quais possuem as sequências necessárias para o *trans-splicing* e a poliadenilação adequados dos mRNAs transcritos. Regiões intercodificadoras de genes constitutivamente expressos são as mais utilizadas, como as de  $\alpha$ -/ $\beta$ -tubulina, GAPDH ou actina. A escolha desses genes reside no fato de que, como são de expressão constitutiva, os níveis de mRNA permanecerão altos e constantes ao longo do ciclo de vida dos protozoários (DaROCHA *et al.*, 2004a). A inserção de uma região promotora (como a do rRNA, a mais utilizada), possibilita o aumento da expressão do gene de interesse, no entanto, ela não é totalmente necessária, como observado nos vetores pNUS e pTEX, o qual garante níveis satisfatórios de transcrição apenas com as regiões intercodificadoras de PGKA e PGKB (TETAUD *et al.*, 2002).

Uma nova geração de vetores tem surgido, garantindo sistemas de expressão regulada de genes que apresentam alta toxicidade quando superexpressos. Uma linhagem celular é construída coexpressando a T7 RNA polimerase e o repressor bacteriano de tetraciclina. O promotor de T7 RNA polimerase está sujeito ao controle do operador de tetraciclina, o qual está bloqueado pelo repressor na ausência de tetraciclina. Dessa forma, ocorre a superexpressão do gene de interesse pela T7 RNA polimerase e sua regulação pelo repressor de tetraciclina, de acordo com os níveis desse antibiótico adicionado ao meio de cultura. Utilizando esta metodologia Wirtz *et al.* (1999) desenvolveram uma linhagem de *T. brucei* (29:13) expressando o repressor de tetraciclina e a T7 RNA polimerase. Segundo os autores, os transformantes foram rapidamente selecionados e o sistema é adequado para a expressão de genes tóxicos. Contudo, apesar das modificações efetuadas, uma baixa expressão do gene de interesse ocorre na presença do repressor (vazamento). Tentativas de superexpressar o repressor de tetraciclina para reduzir este vazamento, mostraram-se tóxicas às células de *T. brucei*. Esse sistema também foi desenvolvido para *T. cruzi* (DaROCHA *et al.*, 2004b) a fim de testar a maquinaria de RNAi deste organismo, através da expressão regulada de dsRNA para diversos genes. O sistema de expressão é funcional, porém o dsRNA produzido não é processado por esse protozoário, provavelmente pela inexistência de um ou mais componentes da via de RNAi (seção 2.3.4). De forma semelhante, Kushnir *et al.* (2005) desenvolveram linhagens de *Leishmania tarentolae* expressando T7 RNA polimerase e o repressor de tetraciclina. Nesse

sistema, é possível a coexpressão de múltiplos genes através da integração em diferentes regiões do genoma do microrganismo.

A plataforma Gateway<sup>®</sup>, patenteada pela empresa Invitrogen (Carlsbad, Estado Unidos), compreende um sistema de clonagem bastante rápido e eficiente. Essa plataforma se baseia na capacidade de recombinação do bacteriófago lambda. A ligação dos fragmentos ocorre em uma reação *in vitro*, mediada por sequências de recombinação sítio específicas (HARTLEY; TEMPLE; BRASCH, 2000). Com base na plataforma Gateway<sup>®</sup>, Batista *et al.* (2010) desenvolveram um vetor para *T. cruzi* flexível o suficiente para a clonagem em grande escala de diversos elementos, como promotores marcadores de seleção ou regiões intercodificadoras. O vetor contém os sítios de recombinação usado por essa plataforma, que garantem a mudança de elementos de maneira rápida e eficiente, além de possuir variantes que adicionam diferentes *tags* na região N-terminal, tais como proteínas fluorescentes e caudas de polihistidina. O vetor resultante é útil para ensaios de localização, colocalização e expressão proteica, além de permitir a modificação de seus elementos de forma bastante fácil.

Para se analisar a efetividade de um vetor, é necessária a inserção de um gene repórter que permita de maneira simples sua análise. Além da CAT, utilizada nos primeiros ensaios de transfecção, outros genes amplamente usados são os das proteínas fluorescentes, tais quais as proteínas verde (GFP) e vermelha (RFP) fluorescentes, as enzimas superóxido dismutase,  $\beta$ -galactosidase e luciferase (BELLOFATTO; CROSS, 1989; BUCKNER; WILSON; VAN VOORHIS, 1999; DaROCHA *et al.*, 2004a; TAYLOR; KELLY, 2006; ARAÚJO *et al.*, 2011). As proteínas GFP e RFP são originárias, respectivamente da água-viva *Aequorea victoria* e da anêmona do mar *Discomona species* (CHALFIE *et al.*, 1994; MIZUNO *et al.*, 2001). Ambas apresentam a vantagem de não necessitarem de substratos exógenos para a emissão de luz verde (GFP) e vermelha (RFP), necessitando apenas de luz ultravioleta para excitá-las e um microscópio de fluorescência para observá-las. Dessa forma, essas proteínas são utilizadas como marcadoras *in vivo*, através de sua fusão a outros genes para determinar a localização e acompanhar a dinâmica da proteína na célula viva. Outra aplicação é no monitoramento da expressão gênica de forma não invasiva. Através da expressão de GFP controlada por promotores ou sequências regulatórias em estudo, é possível determinar

diretamente o nível de expressão por parte dessas sequências (Revisado por MISTELI; SPECTOR, 1997).

A enzima luciferase é um potente gene repórter e ideal para ser usada em eucariotos, pois precisa de apenas uma proteína para produção de luz se todos os substratos estiverem disponíveis na reação (OW *et al.*, 1986). Essa enzima é obtida de organismos marinhos (*Renilla*) e terrestres (vaga lume [*Photinus pyralis*] e besouro [*Pyrophorus noctilucus*]). A luciferase de vaga lume (FLUC) catalisa a reação de oxidação de luciferina em oxiluciferina e luz, utilizando oxigênio dissolvido e ATP (WET *et al.*, 1985; LORENZ *et al.*, 1991). A luciferase de *Renilla* (RLUC) catalisa a reação de descarboxilação oxidativa de coelenterazina na apenas presença de oxigênio dissolvido, produzindo oxiluciferina, gás carbônico e luz. O comprimento de onda máximo difere para a luz emitida por estas enzimas (562 nm para FLUC e 489 nm para RLUC). A intensidade de luz decai rapidamente após a reação. Para FLUC, ela é reduzida à metade após 12 a 15 min, enquanto que para RLUC o tempo é ainda menor: 3 min para redução de 50% da luminescência (DE ALMEIDA; RAPPARD; WU, 2011).

Apesar do rastreamento de proteínas *in vivo* ser mais limitado em comparação com GFP/RFP, uma vez que depende da difusão dos substratos nas células, a luciferase é um gene repórter mais sensível, pois as células eucarióticas não emitem luz própria. A luciferase permite a quantificação da expressão gênica relativa de maneira mais simples que GFP/RFP (MISTELI; SPECTOR, 1997; DE ALMEIDA; RAPPARD; WU, 2011).

### 2.3. RNA DE INTERFERÊNCIA (RNAi)

O fenômeno de RNAi é definido como o mecanismo específico de silenciamento gênico desencadeado por um RNA dupla fita (dsRNA), sendo este RNA produzido por fontes endógenas ou exógenas (PECOT *et al.*, 2011). Neste mecanismo, um pequeno RNA simples fita, derivado do respectivo dsRNA, se parece a um mRNA de sequência homóloga, marcando o mRNA para degradação ou induzindo o bloqueio da tradução. Desde sua caracterização molecular no nematódeo *Caenorhabditis elegans* (FIRE *et al.*, 1998), a manipulação desta via tem sido usada no estudo da função de vários genes e também como potencial

abordagem terapêutica em algumas doenças (revisado por TEIXEIRA; DaROCHA, 2003; LIU; PAROO; 2010; EEKELS; BERKHOUT, 2011; PECOT *et al.*, 2011).

De maneira genérica, a função celular do RNAi é de proteção contra o material genético exógeno (como o de vírus, transposons e transgenes). O RNAi também possui função regulatória da expressão de genes endógenos, entre outras mais diversas, como a montagem e manutenção da cromatina (HANNON, 2002; ULLU; TSCHUDI; CHAKRABORTY, 2004). Duas vias principais já foram caracterizadas em diversos organismos eucarióticos, desde mamíferos a nematódeos: a dos siRNA (pequenos RNAi), e a dos miRNA (micro RNAi). Ambas possuem dois conjuntos de proteínas comuns para seu funcionamento: a Dicer, uma RNase do tipo III, e RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*), um complexo de nucleases que reconhecem e destroem o mRNA. Sua principal nuclease é a Ago, da família das argonautas (AGO) (HANNON, 2002). Essas proteínas possuem isoformas distintas (Dicer 1 e Dicer 2, Ago1 a 4) e requerem determinados cofatores para seu funcionamento, dependendo da via em questão ou do organismo (GOLDEN; GERBASI; SONTHEIMER, 2008; LIU; PAROO, 2010).

Tanto os siRNAs quanto os miRNAs reconhecem o mRNA alvo através da interação entre pares de base. A diferença básica entre ambas as vias é que o miRNA não necessita do pareamento perfeito com o mRNA alvo, além de ser mais provável que o silenciamento ocorra pelo bloqueio da tradução do que pela clivagem do mRNA. Ademais, a biogênese dos miRNAs é endógena, a partir de íntrons no genoma que são tipicamente produzidos pela RNA polimerase II e outras enzimas nucleares (BARTEL, 2004; KIM, 2005). Como a presença de íntrons no genoma dos tripanossomatídeos é muito pequena (PADILLA-MEJÍA, *et al.*, 2009) e conseqüentemente a existência dessa via é improvável nestes organismos, ela não será discutida nesta revisão.

Outra via independente de Dicer foi descrita, a do piRNA (RNA de interação com PIWI), cujo principal efetor é uma proteína tipo PIWI, uma subclasse específica de proteínas AGO. Essa via é característica de mamíferos e ativa principalmente em células germinativas (KETTING, 2011).



### 2.3.1. A ribonuclease Dicer

A enzima Dicer é a responsável por excisar os dsRNA menores de seus precursores (dsRNA viral, de transposons, grampos de pareamento incompleto, entre outros). É formada por um monômero de dois domínios RNase III, os quais reconhecem dsRNA e os cliva em dsRNA menores (21 a 25 nt). Outra característica marcante destas ribonucleases é a formação de 2 a 3 nt protudentes em cada ponta do dsRNA resultante, devido à disposição espacial das RNases (Figura 2). A Dicer também contém um domínio PAZ, que reconhece a porção terminal do dsRNA, uma região de ligação ao dsRNA (dsRBD) e uma helicase. A distância física entre PAZ e o sítio catalítico das RNases é responsável pelo comprimento singular dos dsRNAs menores. Alterações estruturais da Dicer justificam a variação de tamanho dos dsRNA produzidos por diferentes organismos (HANNON, 2002; LIU, PAROO, 2010). O dsRNA de comprimento menor produzido pela ação catalítica desta enzima (siRNA ou miRNA) serve de molde para a degradação sequência específica pelo complexo enzimático RISC.

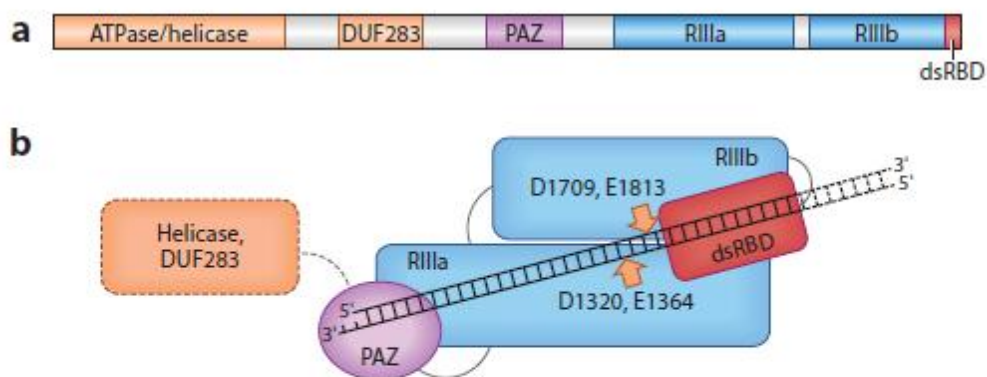


FIGURA 2 – MECANISMO DE AÇÃO DA DICER.

FONTE: Adaptado de Liu e Paroo (2010)

NOTA: (a) Estrutura do domínio da Dicer de humanos, indicando os domínios ATPase/helicase, domínio (DUF)283 de função ainda desconhecida, PAZ, RNaseIII (RIII) e os domínios de ligação ao dsRNA (dsRBD). (b). Modelo molecular para catálise da Dicer: o domínio PAZ se liga a uma das porções terminais do dsRNA. Os domínios RNase aproximam-se para formar o centro catalítico que cliva o dsRNA de forma despareada, formando os 2-3 nucleotídeos protudentes, característicos do produto desta enzima.

### 2.3.2. Proteínas AGO e o complexo RISC

O complexo RISC é a nuclease efetora do silenciamento gênico. A principal proteína deste complexo é a ribonuclease Ago, da família das argonautas. Essa família é formada por proteínas básicas muito conservadas, e possuem dois domínios característicos: (i) o domínio PAZ (PIWI/Argonaute/Zwille), também presente na Dicer, e (ii) o característico domínio PIWI. O primeiro possui cerca de 150 aminoácidos de comprimento e é responsável por ligar-se ao mRNA. O segundo localiza-se na porção N-terminal, é relativamente conservado e possui cerca de 330 aminoácidos. O domínio PIWI assemelha-se à RNase H em estrutura, sendo responsável pela clivagem do mRNA, além de auxiliar na seleção da fita guia a partir do dúplice de RNA fornecido pela Dicer (Figura 3). Dois resíduos de aspartato e um de histidina (DDH) são os aminoácidos críticos para atividade catalítica da Ago no domínio PIWI (Figura 3a) (ULLU; TSCHUDI; CHAKRABORTY, 2004; PARKER; ROE; BARFORD, 2005; CZECH; HANNON, 2011). Esses aminoácidos formam um motivo único à atividade da Ago, o chamado DDH (Aspartato-Aspartato-Histidina), uma vez que outras RNases possuem motivo DDE (Aspartato-Aspartato-Glutamato). O motivo DDH faz coordenação com um íon metálico e três moléculas de água, envolvidos na clivagem do mRNA (RIVAS *et al.*, 2005; FAEHNLE; JOSHUA-TOR, 2007).

Ainda não existe consenso de como ocorre a ativação da RISC. Em uma das abordagens, supõem-se a atividade de algumas helicases de RNA, uma delas a própria Dicer. No modelo helicase, essas enzimas podem auxiliar no desenovelamento da fita guia de RNA, no processamento de dsRNA na via de siRNA, no reconhecimento da fita de mRNA e na liberação de produtos de clivagem. No segundo modelo, de *slicer*, uma das fitas do dúplice de RNA é clivada pela Ago e excluída (fita passageira), enquanto que somente a outra é utilizada por ela como fita guia (revisado por LIU, PAROO, 2010). A escolha da fita guia é possivelmente determinada pela distorção em uma das fitas do dúplice de RNA: a fita cuja porção 5' é menos estável torna-se a fita guia (PARKER; ROE; BARFORD, 2005).

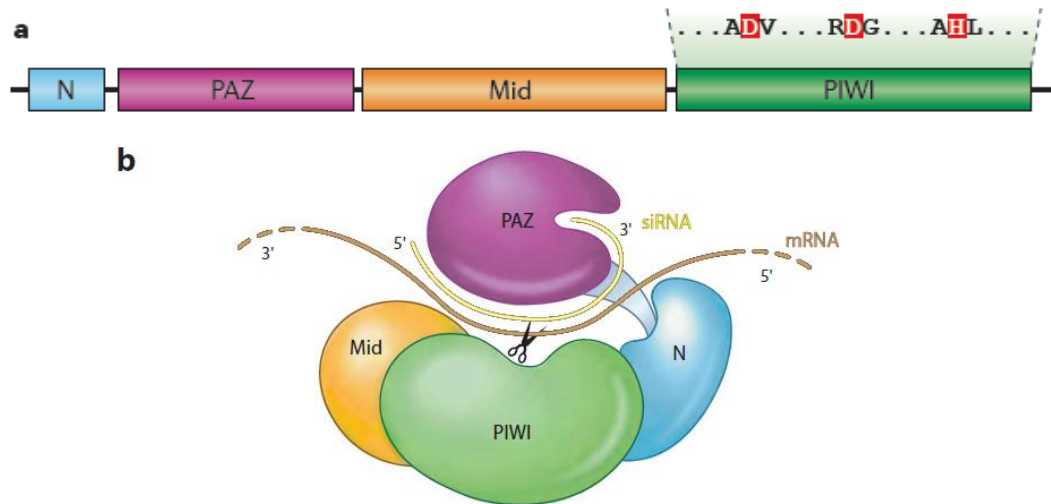


FIGURA 3 – ESTRUTURA E MECANISMO DE AÇÃO DO MODELO *SLICER* DA AGO.

FONTE: Adaptado de Liu e Paroo (2010) e Czech e Hannon (2011).

NOTA: (a) Domínios da proteína Ago de *Pyrococcus furiosus*, mostrando o motivo DDH (Aspartato-Aspartato-Histidina) no domínio PIWI. (b) Representação esquemática da catálise da RISC pelo modelo *slicer*. A porção 3' do duplec de RNA é posicionado em uma fenda do domínio PAZ. O mRNA se situa entre o domínio PAZ e a base formada pelos domínios N-terminal, Mid e PIWI. O sítio catalítico (representado como um par de tesouras) cliva o mRNA na posição correspondente ao nono e ao décimo nucleotídeo do duplec de RNA (neste exemplo, o siRNA).

### 2.3.3. siRNA

Os pequenos RNAs de interferência (siRNA) são definidos como longos dsRNAs (maiores que 400 nucleotídeos de comprimento) perfeitamente pareados. Sua origem clássica é pela introdução de dsRNA exógeno no citoplasma celular, como os de vírus de RNA, transposons ou transgenes (MELLO; CONTE, 2004). No entanto, o siRNA pode ser formado a partir de sequências endógenas, tais quais centrômeros, transposons, transcritos de mRNA que se pareiam, duplec de transcritos antissenso de pseudogenes que se anelam a um mRNA senso ou a partir de grampos de RNA (hpRNA) (LIPPMAN; MARTIESSEN, 2004). Dessa forma, os siRNAs produtos de fonte exógena são denominados exo-siRNAs, enquanto que aqueles produzidos por fonte endógena são nomeados endo-siRNAs, estes diferindo dos exo-siRNA por conter uma ou mais etapas de processamento nuclear (GOLDEN; GERBASI; SONTHEIMER, 2008).

Os dsRNAs processados pela via do siRNA em *Drosophila* e humanos usam preferencialmente a Dicer-2 e ATP (MATRANGA, *et al.*, 2005). Os precursores ligam-se à Dicer-2 e a outros cofatores ainda desconhecidos, para então se unirem

ao complexo de iniciação da RISC (RLC), com o siRNA ainda como dúplice (TOMARI; ZAMORI, 2005; KIM; LEE; CARTHEW, 2007). O RLC é constituído pela Dicer e pela Ago este complexo é capaz de ligar-se ao dsRNA, clivá-lo a siRNA usando a Dicer, carregar o siRNA na Ago-2 para que esta clive a fita passageira e a descarte (GREGORY *et al.*, 2005). Na via clássica do siRNA, ocorre o pareamento completo da fita guia com a alvo, promovendo a clivagem precisa pela Ago. Os produtos da clivagem são em seguida degradados por exonucleases ou utilizados para oligouridilação. A RISC, possivelmente utilizando outros cofatores ou a hidrólise de ATP, dissocia-se do mRNA alvo após sua clivagem, estando pronta para degradar outros mRNAs homólogos (TOMARI; ZAMORI, 2005). De forma menos comum, pode ocorrer o pareamento parcial das fitas, o que resulta na repressão da tradução, ao invés da degradação do RNA alvo. A amplificação da via também é possível pela ação de uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRP), presente em nematódeos e plantas. Alternativamente, o siRNA pode induzir a formação de heterocromatina em leveduras e em plantas (LIPPMAN; MARTIENSSEN, 2004). Todos esses mecanismos são mostrados na Figura 4.

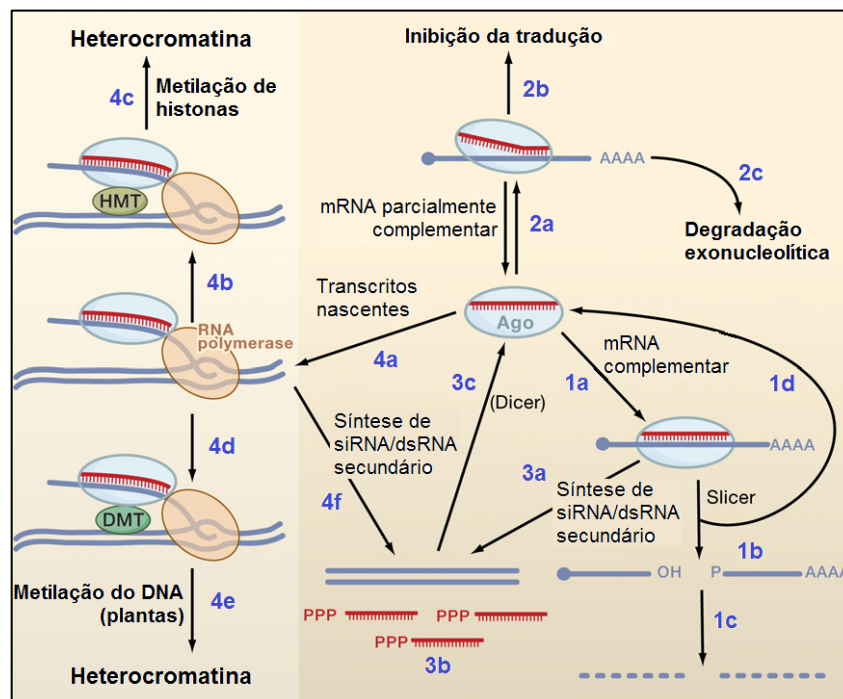


FIGURA 4 – MECANISMO DO SILENCIAMENTO POR siRNA.

FONTE: Adaptado de Carthew e Sontheimer (2009)

NOTA: (1a) Pela via clássica, Ago reconhece um mRNA alvo complementar ao seu siRNA guia, levando à catálise do mRNA em um único sítio (1b). Os produtos de degradação são posteriormente clivados por exonucleases (1c) e a RISC é regenerada para uma nova catálise (1d). siRNA também

podem parear-se com mRNA parcialmente complementares (2a), inibindo a tradução em um mecanismo semelhante ao miRNA (2b) ou exonucleases podem degradar o mRNA (2c). Em plantas e nematódeos, uma RdRP pode sintetizar siRNAs secundários (3a) simples (nematódeos) ou dupla fita plantas (3b) que são incorporados à RISC ou à Dicer, respectivamente (3c). Por fim, siRNA pode induzir a formação da heterocromatina por associar-se a transcritos nascentes (4a), por provocar, entre outros, a metilação de histonas (4b e 4c) e a metilação do DNA (4d e 4e). Algumas polimerases podem sintetizar siRNAs secundários que amplificam a cascata (4f).

#### 2.3.4. RNAi em tripanossomatídeos

O primeiro relato da existência de RNAi em tripanossomatídeos foi em *Trypanosoma brucei*. Os autores observaram a alteração morfológica de células promastigotas após a transfecção com dsRNA de  $\alpha$ -tubulina. As células mudaram sua morfologia tipicamente alongada para arredondada e multinucleada, chamada *FAT cell*, ou fenótipo FAT. Embora os efeitos fossem transientes e com durabilidade de um ciclo celular, a maquinaria mostrou-se muito potente no *knockdown* de  $\alpha$ -tubulina, reduzindo em 97% a quantidade de seu transcrito (NGÔ *et al.*, 1998). Desde então, sistemas que prolongassem a atividade dessa maquinaria em *T. brucei* foram desenvolvidos (WIRTZ *et al.* 1999; LaCOUNT *et al.* 2000; WANG *et al.* 2000), e este é um dos métodos de escolha para o estudo da função gênica neste organismo (KOLEV; TSCHUDI; ULLU, 2011).

A possibilidade de uma nova metodologia de estudos da função gênica dos tripanossomatídeos motivou em parte a identificação desta maquinaria em outras espécies deste grupo. Curiosamente, descobriu-se que a suposição da existência do RNAi em outros parasitos não poderia ser feita apenas por extrapolação filogenética. Por exemplo, em *T. cruzi*, filogeneticamente próximo de *T. brucei*, essa maquinaria é inexistente, sendo incapaz de processar dsRNA de  $\alpha$ -tubulina como ocorre em *T. brucei* (DaROCHA *et al.*, 2004b). Hoje se sabe que *T. cruzi* não possui genes codificadores para Ago (também chamada de Ago-tryp) e para Dicer (RNase III). Em compensação, *T. congolense* possui a maquinaria de RNAi ativa (INOUE *et al.*, 2002). De forma semelhante, *Leishmania braziliensis* possui uma potente maquinaria de RNAi, enquanto que *L. major* não, assim como *T. cruzi*. Análises do genoma sugerem que em espécies de *Leishmania* as cópias gênicas de Dicer foram deletadas ao longo da evolução e que a Ago exista como pseudogenes (LYE *et al.*, 2010). Portanto, experimentos que quantifiquem o transcrito ou produto de um gene marcado pela maquinaria de RNAi são definitivos para demonstrar sua atividade.

O RNAi em tripanossomatídeos foi melhor caracterizado em *T. brucei*. A via utilizada por este microrganismo é a de siRNA e o pequeno RNA produzido pela Dicer tem 24 nucleotídeos. Embora não tenham sido encontrados moléculas similares aos miRNAs, a predição por ferramentas de bioinformática suportam sua existência (MALLICK; GHOSH; CHAKRABARTI, 2008). Existem três proteínas que participam da via em *T. brucei*, a Ago1 (Ago-tryp) (GARCIA-SILVA *et al.*, 2010), Dicer 1 (DCL1) e a Dicer 2 (DCL2). A DCL1 encontra-se no citoplasma e é responsável por processar o dsRNA exógeno. A DCL2, em contrapartida, está presente no núcleo e processa dsRNA endógenos, originários de retroposons ou transcritos repetidos. A Ago1 utiliza os siRNA gerados tanto no citoplasma quanto no núcleo como fita guia (SHI *et al.*, 2004; PATRICK *et al.*, 2009).

Uma característica da TbAgo1/Ago-tryp de *T. brucei* é a presença na região aminoterminal de sequências repetidas ricas em resíduos RGG, os quais pressupõem-se ligar-se aos polirribossomos e, dessa maneira, aumentar a capacidade de reconhecimento da RISC ao mRNA ou marcá-lo para posterior degradação. Em uma via alternativa, RISC pode associar-se diretamente a mRNA livres dos ribossomos e a clivagem do RNA alvo pode ocorrer sem a interação direta entre as maquinarias de tradução e de RNAi (SHI *et al.*, 2009).

Outra família de proteínas Ago foi encontrada nos tripanossomatídeos, nomeadas de PIWI-tryp. Diferentemente da Ago-tryp, a PIWI-tryp não possui o característico domínio PAZ, mas somente o domínio PIWI. Em contrapartida, existe uma provável região de ligação a oligonucleotídeos nessa proteína, com estrutura semelhante ao do domínio PAZ, sugerindo complementação funcional por parte desta região (GARCIA-SILVA *et al.*, 2010). Essa família está presente em todo ciclo de vida do *T. cruzi* e é possível que exerça regulação semelhante à via de RNAi de piRNA, observada em animais. Nesse contexto, o RNAi seria ativado por RNA de fita simples (ssRNA), possivelmente provenientes de pequenos RNA não codificadores (ncRNA) derivados de tRNAs (COUVILLION; SACHIDANANDAM; COLLINS, 2010; GARCIA-SILVA *et al.*, 2010). No entanto, não foram identificados muitos ncRNAs em *T. cruzi* que fundamentassem essa hipótese, permanecendo então a função da PIWI-tryp indeterminada.

Como mencionado anteriormente, o silenciamento de genes por RNAi é um dos métodos de escolha na manipulação da expressão gênica em tripanossomatídeos. Duas abordagens são utilizadas para a manipulação gênica em

*T. brucei* de maneira estável através do RNAi. A primeira é a utilização de vetores que contenham dois promotores de T7 RNA polimerase opostos, regulados por tetraciclina (WIRTZ *et al.* 1999; LaCOUNT *et al.* 2000; WANG *et al.* 2000). Apesar de ser um ótimo sistema que permite o controle da expressão de genes tóxicos, existe certa taxa de expressão basal na ausência do indutor (tetraciclina). A segunda metodologia é a construção de vetores que formem grampos de RNA, clonando-se segmentos do gene alvo um oposto ao outro, separados por um espaçador (LYE *et al.*, 2010). Essa estratégia, assim como a anterior, possui a desvantagem de necessitar de algumas etapas extras de clonagens. Apesar de suas desvantagens, esses vetores são adequados para a análise da função de diversos genes (ULLU *et al.*, 2002).

### 3. JUSTIFICATIVA

Os tripanossomatídeos são protozoários flagelados que podem parasitar diversos organismos, incluindo plantas e animais. Alguns deles causam importantes patologias humanas, como a leishmaniose, a doença de Chagas e doença do sono, as quais acometem milhares de indivíduos. Estes parasitos expressam em sua superfície importantes moléculas envolvidas em sobrevivência e escape do sistema de defesa do hospedeiro. Grande parte dessas moléculas são glicoproteínas, cujo estudo torna-se limitado em parte, quanto à necessidade de expressar e purificar essas proteínas em sistemas procarióticos. Aqui temos o interesse em desenvolver ferramentas para manipulação da expressão gênica em *Angomonas deanei*.

Algumas características tornam esse organismo de excelente aplicação para este propósito. Por ser um tripanossomatídeo, apresentará semelhanças nos sistemas de modificação pós-traducionais de suas proteínas em relação à *Leishmania* sp., *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*. *A. deanei* é um protozoário não patogênico, pois apresenta um único hospedeiro invertebrado durante seu ciclo de vida (monoxênico). Este organismo possui alta taxa de produção de biomassa em curto espaço de tempo em relação aos demais tripanossomatídeos. Seu tempo de geração é de 6 horas (MOTTA *et al.*, 2010), enquanto *T. brucei* e *T. cruzi* apresentam 7 e 24 h, respectivamente. *A. deanei* apresenta baixo requerimento nutricional do meio de cultivo, se comparado com os demais tripanossomatídeos. Finalmente, seu genoma está sendo determinado por um grupo de pesquisadores brasileiros que envolvem componentes de nosso grupo de pesquisa.

Cabe ressaltar que, pela proximidade genética, *A. deanei* também poderá ser utilizada como modelo experimental para o estudo de genes compartilhados com os demais tripanossomatídeos. Além disso, *A. deanei* é hospedeira para uma bactéria intracelular obrigatória. Assim, tem sido proposto que esses protozoários constituam excelente modelo para estudos de origem e evolução das organelas celulares. Desta forma, ferramentas de manipulação genéticas desenvolvidas aqui permitirão grandes avanços em várias áreas do conhecimento.

Como mencionado anteriormente, o fenômeno de RNA de interferência (RNAi) tem sido um dos métodos de escolha na manipulação gênica em diversos organismos, uma vez que é de simples condução, é gene específico, pode ser



aplicado a famílias multigênicas e é de rápida detecção. Logo, resolvemos testar a presença de tal fenômeno uma vez que pretendemos utilizar *A. deanei* como organismo modelo para demais tripanossomatídeos. Recentemente, a maquinaria de RNAi já foi detectada em *Crithidia fasciculata* e *Leishmania braziliensis*, espécies filogeneticamente relacionadas à *A. deanei*. Os dados de genoma parcial também reforçam a presença desse sistema em *A. deanei* (dados não publicados).

Juntamente com o sistema de expressão que será desenvolvido, a detecção da maquinaria de RNAi poderá auxiliar nos estudos de função gênica, principalmente de genes multicópias de tripanossomatídeos que não possuem a maquinaria de RNAi ativa, como é o caso de *T. cruzi*. Nestas situações, torna-se por vezes inviável o estudo da função genética através do nocaute de cada cópia gênica. Por essa razão, tanto o silenciamento de genes de interesse em *A. deanei* quanto a superexpressão, podem auxiliar no maior entendimento da biologia molecular dos tripanossomatídeos.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar *Angomonas deanei* como modelo de expressão heteróloga.

### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir vetores de expressão com sequências regulatórias próprias de *A. deanei*;
- Criar linhagens de *A. deanei* expressando GFP e luciferase de forma estável e transiente
- Avaliar por fluorescência de GFP e por atividade de luciferase a expressão do sistema construído;
- Identificar a existência da maquinaria de RNAi em *A. deanei* através de análises *in silico*.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. ANÁLISE *IN SILICO* PARA AVERIGUAR A EXISTÊNCIA DA MAQUINARIA DE RNAi EM *Angomonas deanei*

As sequências das proteínas Ago e PIWI de *A. deanei* foram gentilmente cedidas pela Dra. Adriana Ludwig do Instituto Carlos Chagas (ICC) de Curitiba (dados não publicados). Estes dados são parte do esforço de sequenciamento do DNA genômico de *A. deanei*, ainda em andamento, realizado em colaboração com vários pesquisadores brasileiros. Está centralizado no laboratório de bioinformática (Labinfo) do Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC) em Petrópolis, Rio de Janeiro, sob coordenação da pesquisadora Dra. Ana Tereza Vasconcelos. As sequências usadas nas análises estão agrupadas no Quadro 1.

Os alinhamentos múltiplos entre as sequências de aminoácidos foram feitas pelo programa PRANKSTER (<<http://www.ebi.ac.uk/goldman-srv/webPRANK/>>) (LOYTYNOJA; GOLDMAN, 2008). A identificação dos domínios foi realizada pelo programa SMART (<<http://smart.embl-heidelberg.de/>>) (LETUNIC; DOERKS; BORK, 2012). O programa HHpred (<<http://hhpred.tuebingen.mpg.de/hhpred>>) foi usado na identificação de proteínas com maior homologia para serem usadas na modelagem molecular. A proteína com o melhor resultado foi a da Ago de *Pyrococcus furiosus* (SONG *et al.*, 2004) (Quadro 1). A sequência de aminoácidos desta foi usada como guia para a modelagem molecular das proteínas Ago e PIWI. O molde para estas proteínas de *A. deanei* foi obtido pelo programa SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>). A modelagem molecular foi feita usando a proteína completa de *P. furiosus* e as regiões dos domínios PIWI das proteínas Ago e PIWI de *A. deanei*. A visualização e alinhamento das estruturas foi realizada pelo programa PyMOL v. 1.3 (<http://www.pymol.org/>).

A árvore filogenética foi montada com as sequências de aminoácidos das proteínas identificadas no Quadro 1, usando o programa ClustalW. (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

QUADRO 1 – IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS USADAS NAS ANÁLISES *IN SILICO* PARA VERIFICAR A EXISTÊNCIA DA MAQUINARIA DE RNAi EM *A. deanei*.

ORGANISMO	PROTEÍNA	IDENTIFICAÇÃO	BANCO DE DADOS
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ago	ref NP_849784.1	GenBank
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Ago-2	ref NP_871992.1	GenBank
	PIWI-1	ref NP_492121.1	GenBank
<i>Drosophila melanogaster</i>	PIWI	gb AAF53043.1	GenBank
<i>Homo sapiens</i>	Ago-2	ref NP_036286.2	GenBank
	PIWI-1	ref NP_004755.2	GenBank
<i>Leishmania braziliensis</i>	PIWI-like	ref XP_001564757.1	GenBank
	Ago-like	LbrM.11.0360	TriTryps DB
<i>Mus musculus</i>	PIWI-1	ref NP_067286.1	GenBank
<i>Pyrococcus furiosus</i>	Ago-like	pdb 1U04	Protein Data Bank
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Ago	emb CAA19275.1	GenBank
<i>Trypanosoma brucei</i>	Ago-like	gb AAR10810.1	GenBank
	PIWI-like	Tb927.10.2220	TriTryps DB
<i>Trypanosoma cruzi</i>	PIWI-like	Tc00.1047053511367.240	TriTryps DB

## 5.2. MICRORGANISMOS E PLASMÍDEOS

Os microrganismos e plasmídeos utilizados estão nomeados no Quadro 2 e 3. A cepa de *A. deanei* usada foi gentilmente cedida pela Dra. Maria Cristina Machado Motta do Laboratório de Ultra-estrutura Hertha Meyer, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da UFRJ. O vetor pBlueScriptNeo1 foi fornecido gentilmente pelo Dr. Stenio Perdigão Fragoso, do ICC, Fiocruz, Paraná.

QUADRO 2 – MICRORGANISMOS USADOS E SUAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS (continua).

MICRORGANISMO	FENÓTIPO	RESISTÊNCIA	REFERÊNCIA
<i>Angomonas deanei</i> TCC036E, forma coanomastigota	Cepa selvagem	Não documentada	TEIXEIRA <i>et al.</i> , 2011
<i>Escherichia coli</i> DH10B	F- ; endA1; recA1; aIE15; galK16; nupG; rpsL; ΔlacX74; Φ80lacZΔM15; araD139;Δ(ara,leu)7697; mcrA ;Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ-	Estreptomicina	Invitrogen
<i>E. coli</i> TOP 10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ-	Estreptomicina	Invitrogen

<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>endA1</i> ; <i>gyrA96</i> (nal <sup>R</sup> ); <i>thi-1</i> ; <i>recA1</i> ; <i>relA1</i> ; <i>lac</i> ; <i>glnV44 F'</i> ::Tn10; <i>proAB</i> <sup>+</sup> ; <i>lacI</i> <sup>q</sup> Δ( <i>lacZ</i> )M15]; <i>hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> )	Ácido nalidíxico e tetraciclina	Stratagene
<i>Trypanosoma cruzi</i> pROCK RR4, forma epimastigota	Cepa CL Brener contendo o vetor pROCK RR4	Higromicina	CAMBRI, 2011
<i>Trypanosoma cruzi</i> cepa G, forma epimastigota	Cepa selvagem	—	YOSHIDA, 2006
<i>Trypanosoma cruzi</i> GFP	<i>T. cruzi</i> cepa G contendo o vetor pTRES, o qual expressa GFP	Neomicina	Normanda Souza Melo (comunicação pessoal)

QUADRO 2 – MICRORGANISMOS USADOS E SUAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS (conclusão).

QUADRO 3 – PLASMÍDEOS USADOS E SUAS CARACTERÍSTICAS (continua).

PLASMÍDEO	CARACTERÍSTICAS	RESISTÊNCIA	REFERÊNCIA/FONTE
pBlueScriptNeo1	Cassete de neomicina clonado <i>EcoRI/HindIII</i> no vetor pBlueScript II KS + (Stratagene)	Ampicilina e neomicina	DE SOUZA <i>et al.</i> , 2010
pCDXRibo	Vetor contendo sequências regulatórias de <i>A. deanei</i> , construído a partir do vetor pBlueScriptNeo1. Integração no <i>locus</i> do promotor de RNA ribossomal.	Ampicilina e neomicina	A autora (2012)
pCDXRibo GFP	Vetor com gene repórter para GFP clonado <i>XbaI/XhoI</i> no vetor pCDXRibo	Ampicilina e neomicina	A autora (2012)
pCDXTub	Vetor contendo sequências regulatórias de <i>A. deanei</i> , construído a partir do vetor pBlueScriptNeo1. Integração no <i>locus</i> de α-tubulina.	Ampicilina e neomicina	A autora (2012)
pCDXTub GFP	Vetor com gene repórter para GFP clonado <i>XbaI/XhoI</i> no vetor pCDXTub	Ampicilina e neomicina	A autora (2012)
pCDXTub HRLUC	Contém região HX1 de <i>T. cruzi</i> , a montante do gene de RLUC, fusionado a <i>riboswitch</i> inativo. Clonada <i>BamHI/SalI</i> no vetor pCDXTub	Ampicilina e neomicina	A autora (2012)
pCDXTub RLUC	Gene de RLUC fusionada a <i>riboswitch</i> inativo. Clonada <i>XbaI/XhoI</i> no vetor pCDXTub.	Ampicilina e neomicina	A autora (2012)

pCDXRibo HRLUC	Contém região HX1 de <i>T. cruzi</i> , a montante do gene de RLUC, fusionado a <i>riboswitch</i> inativo. Clonada <i>Bam</i> HI/ <i>Sa</i> II no vetor pCDXRibo	Ampicilina e neomicina	A autora (2012)
pCDXRibo RLUC	Gene de RLUC fusionado a <i>riboswitch</i> inativo. Clonada <i>Xba</i> II/ <i>Xho</i> I no vetor pCDXTub.	Ampicilina e neomicina	A autora (2012)
pGAT9	Parte do gene de $\alpha$ -tubulina de <i>A. deanei</i> clonado a montante do promotor T7 do vetor pGEM – T Easy	Ampicilina	A autora (2012)
pGEM –T Easy	Vetor comercial linearizado, com timinas livres para aumentar a capacidade de clonagem de produtos de PCR	Ampicilina	Promega
pROCK Higo	Vetor com sequências regulatórias de <i>T. cruzi</i> , integrativo ou episomal. Integração em <i>locus</i> de $\beta$ -tubulina	Ampicilina e higromicina	DaROCHA <i>et al.</i> , 2004a
pROCK RR4	Gene de RLUC fusionada a <i>riboswitch</i> inativo. Clonada <i>Xba</i> II/ <i>Xho</i> I no vetor pROCK Higo.	Ampicilina e higromicina	CAMBRI, 2011
pTZ57R	Vetor comercial linearizado, com timinas livres para aumentar a capacidade de clonagem de produtos de PCR	Ampicilina	Fermentas

QUADRO 3 – PLASMÍDEOS USADOS E SUAS CARACTERÍSTICAS (conclusão).

### 5.3. ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos foram preparados seguindo instruções de Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989) ou recomendações dos fabricantes. Suas concentrações estoque e final estão descritas no Quadro 4.

QUADRO 4 – ANTIBIÓTICOS USADOS E SUAS CONCENTRAÇÕES FINAL E ESTOQUE.

Antibiótico	Concentração estoque (mg/mL)	Concentração final ( $\mu$ g/mL)	Microrganismo
Ampicilina	250	100	Todas as cepas de <i>E. coli</i>
Estreptomicina	80	63	<i>A. deanei</i> ; <i>T. cruzi</i>
		80	<i>E. coli</i> DH10B; <i>E. coli</i> TOP10
G418 (análogo à neomicina)	50	200; 300; 500	<i>A. deanei</i>
Higromicina	50	500	<i>A. deanei</i>
		100	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Tetraciclina	20	20	<i>E. coli</i> XL-1 Blue
Penicilina	63	63	<i>A. deanei</i> ; <i>T. cruzi</i>

#### 5.4. MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Para o cultivo de *E. coli* foram usados os meios LB (triptona 1 %; extrato de levedura 0,5 % e NaCl 1 %) e LA (meio LB suplementado com 15 g/L de ágar). O meio LB também foi usado para o preparo de células de *E. coli* competentes e na sua recuperação após a transformação. As bactérias foram cultivadas em estufa a 37 °C ( $\pm 1$  °C) por no mínimo 12 horas, ou por período menor de tempo, seguindo protocolo específico. Os meios usados para *E. coli* foram esterilizados por autoclavagem.

Para o cultivo de epimastigotas de *T. cruzi*, o meio usado foi o meio LIT completo (infuso de fígado 0,5 %; NaCl 75,3 mM; KCl 5,4 mM; glicose 10 mM; bacto-triptose 0,5 %; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 56,4 mM; hemina 0,0025 %; extrato de levedura 15 g/L e 10 % de SFB inativado) acrescido de penicilina/estreptomicina (Quadro 4). Antes da adição dos antibióticos, o meio foi esterilizado por filtração a vácuo (aparato Millipore) em membrana de 0,22 µm. Os parasitos foram cultivados em estufa a 28 °C ( $\pm 1$  °C) até atingirem 10<sup>7</sup> parasitos/mL e mantidos através de diluições de 100 vezes em novo meio de cultura.

As células de *A. deanei* foram cultivadas em meio LIT incompleto (sem SFB). Os protozoários foram cultivados em estufa a 28 °C ( $\pm 1$  °C) até atingirem 10<sup>8</sup> parasitos/mL (aproximadamente 48 h), quando foram diluídos 1000 vezes em novo meio de cultura. Para a curva de crescimento em higromicina, o meio usado foi o M199 (CultiLab) suplementado com 10 % do meio LIT completo e penicilina/estreptomicina (Quadro 4) As diluições dos parasitos seguiram o mesmo critério utilizado para aqueles cultivados em meio LIT.

#### 5.5. REAGENTES

A composição dos reagentes e tampões utilizados está no quadro a seguir:

QUADRO 5 - COMPOSIÇÃO DOS REAGENTES E TAMPÕES USADOS (*continua*)

REAGENTE	COMPOSIÇÃO
Azul de Comassie (coloração de proteína)	Azul de Comassie R-250 0,3 % (p/v); metanol 45%; ácido acético glacial 10%
Clorofórmio/álcool isoamílico (24:1)	24 partes de clorofórmio e 1 parte de álcool isoamílico

Fenol/clorofórmio	25 partes de fenol saturado; 24 partes de clorofórmio e 1 parte de álcool isoamílico
PBS 1X	NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 4,3 mM e KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,5 mM; pH = 7,4
Ponceau S	Ponceau S 0,1% (p/v); ácido acético 5%
Solução de bloqueio para <i>Western Blot</i>	PBS 1x; Tween 100 a 0,05% e leite em pó desnatado 5%.
Solução de Denhardt 50x	Ficoll 40 1% (p/v); polivinilpirrolidona 1% (p/v); BSA 1% (p/v)
Solução de depurinação para <i>Southern blot</i>	HCl 125 mM
Solução de desnaturação para <i>Southern blot</i>	NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M
Solução de neutralização para <i>Southern blot</i>	Tris-HCl 0,5 M; NaCl 0,5 M
Solução de pré-hibridação	SSC 5x; solução de Denhardt 5X, SDS 1% (p/v); DNA de esperma de salmão desnaturado por calor 100 µg/mL
SSC 10x	NaCl 1,5 M e citrato de sódio 0,15 M pH 7,0
Tampão de amostra para DNA 10x	Ficoll 400 25%; azul de bromofenol 0,25% e xileno cianol FF 0,25%
Tampão de amostra para proteína 4x	Tris-HCl 40 mM pH 6,8; SDS 1%; β-mercaptoetanol 2,5%; glicerol 6% e azul de bromofenol 0,005%;
Tampão de eletroforese para SDS-PAGE	Tris-HCl 25 mM; glicina 192 mM e SDS 0,1%.
Tampão de eletroporação	120 mM KCl; 0,15 mM CaCl <sub>2</sub> ; 10 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 25 mM Hepes; 2 mM EDTA pH 8,0; e 5 mM MgCl <sub>2</sub>
Tampão de lise/digestão	NaCl 100 mM; Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 25 mM pH 8,0; SDS 0,5%; proteinase K 100 µg/mL; RNase 70 µg/mL
Tampão MOPS/EDTA 10x	MOPS 200 mM; acetato de sódio 20 mM e EDTA 10 mM; pH=7,0
Tampão para transferência ( <i>western blot</i> )	Tris-HCl 25 mM; glicina 192 mM e metanol 20%.
TBE 10x	Tris-HCl 89 mM; ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM
TE	Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM
TSS <sup>2</sup> solução estoque	Triptona 1%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 1%; PEG 8000 10% (p/v); DMSO 5%; 50 mM de MgSO <sub>4</sub> ; pH=6,5
Solução de lavagem para <i>Southern</i> e <i>Northern blot</i>	SSC 2x; SDS 0,1%

QUADRO 5 - COMPOSIÇÃO DOS REAGENTES E TAMPÕES USADOS (*conclusão*)

## 5.6. CURVA DE CRESCIMENTO PARA DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE A G418 E HIGROMICINA

A sensibilidade de *A. deanei* ao antibiótico G418 foi avaliada inoculando-se  $0,5 \times 10^5$  células/mL em meio LIT completo nas concentrações de 0 (controle), 100, 250 e 500 µg/mL de G418. Num período de 6 em 6h, as células foram diluídas em PBS 1x com formaldeído 4 % e contados em câmara de Neubauer em duplicata nos quadrantes menores. Quando o controle atingiu a densidade de  $10^8$  células/mL,



todas as culturas foram diluídas a  $0,5 \times 10^5$  células/mL. O experimento prosseguiu até que não fosse possível observar células nas culturas com antibióticos.

Para o antibiótico higromicina o procedimento foi o mesmo, no entanto utilizando as concentrações de 0 (controle), 100, 500 e 1000  $\mu\text{g/mL}$  em meio M199 contendo 10 % de LIT completo.

## 5.7. CLONAGEM DAS SEQUÊNCIAS DE DNA PARA CONSTRUÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO

### 5.7.1. Extração do DNA genômico de *A. deanei*

O DNA genômico de *A. deanei* foi extraído de  $5 \times 10^8$  células em fase exponencial de crescimento, utilizando tampão de lise/digestão, a noite toda a 37 °C. O lisado foi submetido a uma extração de igual volume com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), homogeneizando por 10 min, e outra de igual volume com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A fase aquosa foi separada por centrifugação a 14.000 rpm (*Eppendorf Centrifuge 5415C*) por 5 min, removida e tratada com 1 volume de isopropanol. O DNA foi sedimentado por centrifugação a 14.000 rpm (*Eppendorf Centrifuge 5415c*) por 20 min em TA. O sedimento foi lavado com 1 mL de etanol 70 % (v/v), secado e solubilizado em 100  $\mu\text{L}$  de TE. A integridade do DNA obtido foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1 % e o DNA quantificado por espectrofotometria em aparelho NanoDrop™ (Thermoscientific).

### 5.7.2. Amplificação do DNA por PCR

Os iniciadores para amplificação dos fragmentos usados para a construção do vetor de expressão em *A. deanei* foram desenhados usando os sítios *Primer BLAST* do NCBI (<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>>) e *IDT Oligo Design and Analysis Tools* (<<http://www.idtdna.com/SciTools/>>). Aproximadamente 100 ng de DNA genômico foi amplificado em reação contendo dNTP 0,2 mM;  $\text{MgCl}_2$  1,5 mM; tampão de *Taq* DNA polimerase 1x (Invitrogen); 0,5  $\mu\text{M}$  dos pares de iniciadores (Quadro 6) e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) em reação final de 100  $\mu\text{L}$ . As condições da reação foram: desnaturação a 92 °C por 2 min. (1

ciclo); desnaturação a 92 °C por 45 seg.; anelamento a 57 °C por 45 seg. e extensão a 72 °C por 1 min. (34 ciclos) e por fim 1 ciclo de 10 min. a 72 °C. Os produtos de PCR foram purificados com o kit *Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) e mantidos a - 20 °C.

QUADRO 6 - LISTA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES USADOS.

Nº	PRODUTO	SEQUÊNCIA (5'→3')	SÍTIOS PARA DIGESTÃO ENZIMÁTICA
1	α-Tubulina 3' Intergênica For	GTGTGAATTCCGCCGATGATGGTGAGGATG	<i>EcoRI</i>
2	α-Tubulina 3' Intergênica Rev	TGTGGAGCTCAGACTAGGGAGTGGCCATTTG	<i>SacI</i>
3	GAPDH Intergênica 3' For	TACTGGATCCGTGTAGTCGACCTCGTCCGC	<i>BamHI/SalI</i>
4	GAPDH Intergênica 3' Rev	TTACAAGCTTACTGTTTCAACCTTTACTACT	<i>HindIII</i>
5	Actina Intergênica 5' For	TATTCTCGAGTTACCGTCGGTGTCTGTCTGTCGTG	<i>XhoI</i>
6	Actina Intergênica 5' Rev	CGCAGGATCCGGTCTAGACCAAACCAGAGCCGTTATCG	<i>BamHI/XbaI</i>
7	rRNAPromotor For	TTTTGGTACCGGTTTTGGTCTCTGGGCTGG	<i>KpnI</i>
8	rRNAPromotor Rev	TTTTCTCGAGCCGTCTCGTTTTCACAC	<i>XhoI</i>
9	rRNAPromoter2Rev	ATTTGAGCTCGGTACCAGCAGTGACACAGACGC	<i>SacI/ KpnI</i>
10	α-Tubulina For	TACGATTTGACTCGACGCAG	x
11	α-Tubulina Rev	GAGTTGGCAATCATGCACAC	x
13	NeoFor	CGACCCTGCAGCCAATATGGGATCG	x
14	NeoRev	TCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCG	x
15	Promotor T7	AATACGACTCACTATAG	x
16	Promotor T3	ATTAACCCTCACTAAAG	x
17	M13For-pUC(-40)	GTTTTCCCAGTCACGAC	x

NOTA: O destaque na terceira coluna se refere aos sítios para digestão por endonucleases. O x na quarta coluna indica que não foram adicionados sítios extras nos iniciadores para se efetuar as clonagens

Os iniciadores foram desenhados a partir de sequências do genoma de *A. deanei*, que será publicado futuramente, cedidas pelo Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC).

### 5.7.3. Digestão dos amplicons e dos vetores

Os produtos de PCR purificados foram submetidos à digestão por endonucleases utilizando as enzimas mostradas no Quadro 6. A reação foi realizada com todo o produto de PCR purificado, 1 unidade de enzima, BSA 1x (NEB) e o tampão recomendado pelo fabricante da enzima (Invitrogen, Promega, NEB ou

Fermentas), a 37 °C por no mínimo 4 horas. As enzimas foram inativadas a 72 °C por 20 min. e o DNA foi purificado com o kit *Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare). As digestões foram feitas em sequência, purificando a reação de um sistema enzimático para só então realizar a próxima reação.

Vinte µg de cada vetor foram digeridos com as enzimas apropriadas (Quadro 4), de acordo com as especificações dos fabricantes. As digestões foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose 1% e o DNA foi purificado por excisão do gel de agarose 1%. A purificação foi feita com o kit *Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare). As moléculas de DNA plasmidial foram submetidas a etapas sequenciais de digestão e purificação (Figura 5). O vetor foi digerido com uma das enzimas por vez, e purificado por excisão do gel de agarose após cada digestão.

#### 5.7.4. Construção dos vetores pCDXTub e pCDXRibo

A quantidade de DNA usada para as ligações foi de 100 ng de vetor e 40 ng, de inserto, independente do tamanho dos fragmentos. Para cada reação de 15 µL, o DNA do vetor e do inserto foram homogeneizados com água ultrapura, aquecidos a 65 °C por 5 min para desanelamento parcial das duas fitas de DNA, e colocados em banho de gelo logo em seguida. Após breve centrifugação para baixar as gotículas de condensação, o tampão de reação da enzima ligase (Fermentas) foi adicionado na concentração final de 1 x, seguido de 1 unidade Weiss de T4 DNA ligase (Fermentas). A reação prosseguiu por no mínimo de 4h a 16 °C. Alíquotas de 1 a 5 µL desta reação foram usadas na transformação bacteriana para obtenção dos clones.

O fragmento de  $\alpha$ -Tubulina 3' inter-CDS digerido sequencialmente *EcoRI/SacI* foi clonado no vetor pBlueScriptNeo1 *EcoRI/SacI*, gerando o clone pBST (figura 10). Em paralelo, o fragmento de Actina 5' inter-CDS foi digerido com *BamHI*, a enzima foi inativada a 80 °C por 20 min e o DNA foi desfosforilado em sua porção 5' utilizando a enzima SAP (1h a 37°C), no mesmos componentes de reação com *BamHI*. Em seguida, este fragmento purificado e ligado (*BamHI-BamHI*) ao GAPDH 3' inter-CDS previamente digerido e purificado com *BamHI*. Um µL dessa ligação foi amplificada por PCR, e a identidade dos fragmentos foi confirmada por digestão em

sistemas distintos com *Sall* e *Xbal*. A fusão Act:GAPDH foi subclonada no vetor pGEM-T Easy. Este vetor foi digerido em separado com as enzimas *HindIII* e *XhoI* para liberar a fusão Act:GAPDH, a qual foi purificada e ligada ao pBST previamente digerido e purificado com *HindIII* e *XhoI*. Todas estas etapas de clonagem originaram o pBSTAG. A partir deste vetor criaram-se os dois vetores para integração em locais distintos: (i) pCDXRibo, de integração no *locus* de rRNA e (ii) o pCDXTub, para integração no *locus* de  $\alpha$ -tubulina. Para criação do vetor pCDXRibo, o provável promotor de RNA ribossomal (IGR rRNA 28S), produto dos iniciadores 7 e 8 (Quadro 6), foi amplificado e digerido com as enzimas *KpnI/XhoI*, purificado e ligado ao vetor pBSTAG previamente digerido com as mesmas enzimas. O clone resultante foi nomeado pBSR1. Em paralelo, o promotor de rRNA foi amplificado com iniciadores distintos a partir do DNA genômico de *A. deanei* (7 e 9 – Quadro 6), a fim de produzir um fragmento maior. O amplicon foi subclonado no vetor pTZ57R e o clone resultante foi digerido com *SacI* para liberar um fragmento de cerca de 300 pb, pertencente ao provável promotor rRNA. Esse fragmento, foi purificado e finalmente clonado no pBSR1 previamente digerido com a mesma enzima e desfosforilado com SAP, originando por fim o vetor pCDXRibo (Figura 5).

O vetor pCDXTub foi gerado a partir do pBSTAG (Figura 5). Este último foi digerido com a enzima *XhoI* e desfosforilado com SAP. Em paralelo, o produto de PCR de parte do gene de  $\alpha$ -tubulina (iniciadores 10 e 11, Quadro 6) foi subclonado no vetor pGEM-T Easy, resultando no vetor pGAT9. Este foi digerido com *Sall*. O fragmento resultante, que compreendia uma região do gene de  $\alpha$ -tubulina, foi então clonado no vetor pBSTAG digerido com *XhoI*. Os sítios de *Sall* e *XhoI* foram perdidos neste processo. Desta última clonagem, o vetor pCDXTub foi criado (Figura 5).

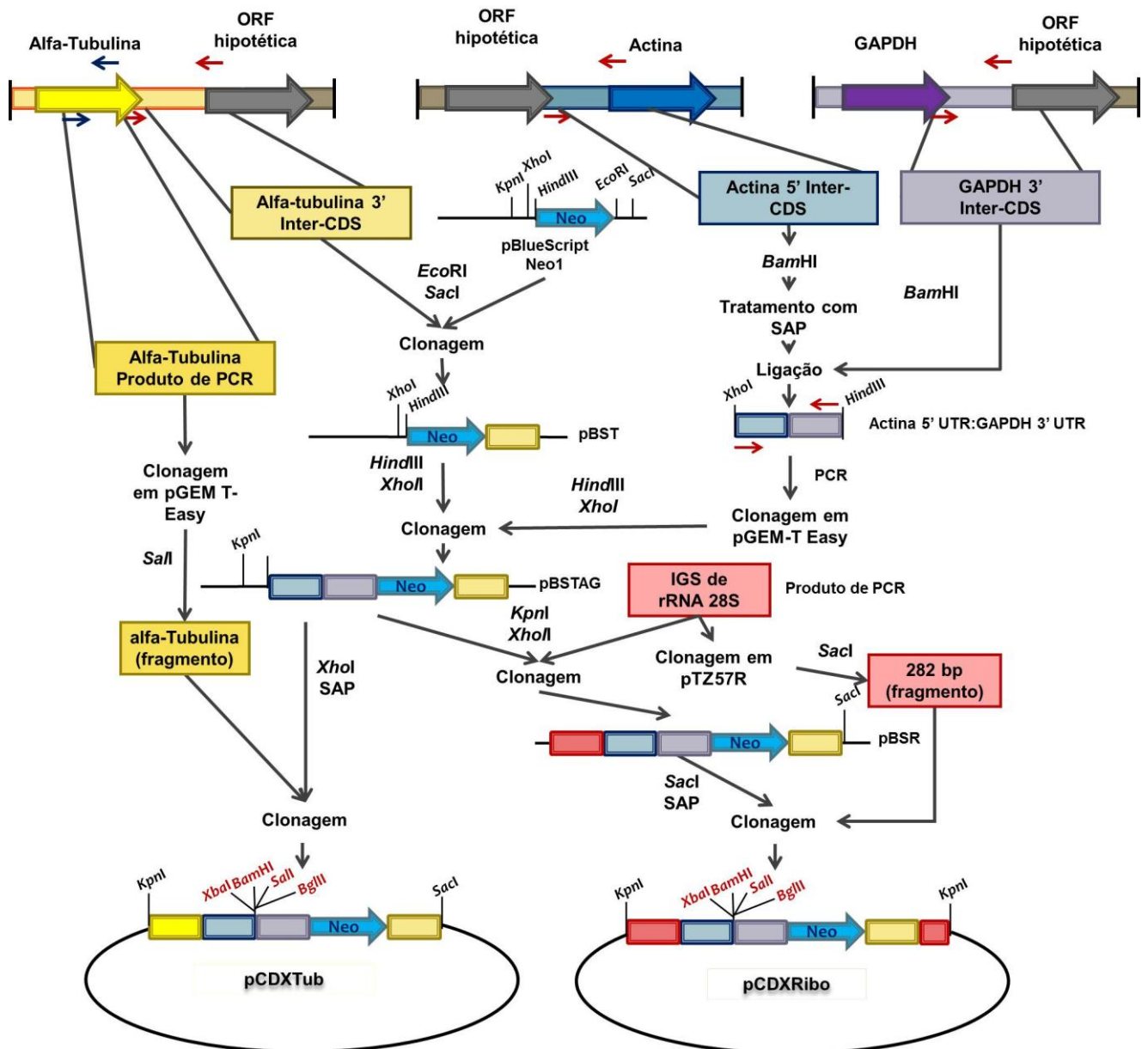


FIGURA 5 – DESENHO ESQUEMÁTICO MOSTRANDO AS ETAPAS DE CLONAGEM PARA A CONSTRUÇÃO DOS VETORES pCDX.

NOTA: Alguns sítios de digestão por endonucleases são mostrados. Os sítios em vermelho correspondem ao sítio de policlonagem dos vetores, em amarelo é representada a  $\alpha$ -tubulina 3' inter-CDS e parte do gene de  $\alpha$ -tubulina, em azul, a região de actina 5' inter-CDS, em lilás, a região de GAPDH 3' inter-CDS, a seta azul indica o gene de resistência a neomicina (neomicina fosfotransferase) e em vermelho, está um espaçador intergênico (IGS) a montante do rRNA 28S, podendo ser um provável promotor dessa região. Inter-CDS = intercodificadora; SAP = fosfatase alcalina de camarão.

#### 5.7.5. Clonagem dos genes repórter de GFP e RLUC

O gene repórter de GFP foi obtido a partir da digestão do vetor pROCK GFP Neo (DaROCHA *et al.*, 2004a) com as enzimas *Xba*I e *Xho*I. O gene de GFP liberado foi purificado e clonado em ambos os vetores pCDX nos sítios de *Xba*I e *Sal*I (figura 5). Neste processo, tanto os sítios de *Sal*I quanto de *Xho*I foram perdidos (Figura 12, em Resultados e Discussão). Quanto à clonagem de RLUC, este gene foi obtido de duas maneiras. A primeira foi através da digestão do vetor pROCK RR4 (CAMBRI, 2011) com as enzimas *Xba*I e *Xho*I, liberando o gene de RLUC. Este foi então clonado nos vetores pCDX nos sítios de *Xba*I e *Sal*I (Figura 5). A segunda maneira de clonagem, foi pela digestão do vetor pROCK RR4 com as enzimas *Bam*HI e *Xho*I. O fragmento liberado continha o gene RLUC e parte da região de HX1 de *T. cruzi*, a montante do gene repórter. Este fragmento foi clonado nos sítios *Bam*HI e *Sal*I de ambos os vetores pCDX. Neste processo, os sítios de *Xho*I e *Sal*I foram eliminados (Figura 19, em Resultados e Discussão).

#### 5.7.6. Preparação de células de *Escherichia coli* quimiocompetentes

O preparo das células foi adaptado de Chung, Niemela e Miller (1989). As células de *E. coli* foram cultivadas a partir do estoque em glicerol 50 % em meio LA com os antibióticos adequados (Quadro 4). Uma colônia foi selecionada e inoculada em meio LB com o antibiótico específico e cultivada a 37 °C por cerca de 16 h sob agitação constante (180 rpm). Este pré-inóculo foi diluído 100 vezes em meio LB sem antibiótico e cultivado nas mesmas condições do pré-inóculo, porém até a cultura atingir a DO<sub>600</sub> de 0,4 a 0,6. A cultura foi mantida em banho de gelo por 20 min. e centrifugada a 5.000 rpm por 5 min., a 4 °C (*Eppendorf Centrifuge 5804R*). O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi suspenso em TSS<sup>2</sup>, na quantidade de 10 % do volume inicial da cultura. As células foram separadas em alíquotas de 100 µL em tubos para microcentrífuga, previamente resfriados. As alíquotas foram mantidas em banho de gelo por 15 min e então estocadas a – 80 °C ou usadas em seguida.

#### 5.7.7. Transformação bacteriana e seleção dos clones

Alíquotas 100  $\mu\text{L}$  de bactérias *E. coli* preparadas como descrito na seção anterior foram misturadas com o produto de ligação ou plasmídeo. A mistura foi mantida em banho de gelo por 30 min. e transformada por choque térmico a 42 °C por 1 min. 30 seg., seguidas de banho de gelo por 3 min. A este material foram adicionados 1 mL de meio LB sendo incubado por 1 hora a 37 °C sem agitação. Em seguida, 200  $\mu\text{L}$  da cultura transformada foram plaqueados em meio LA suplementado com 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina. No caso do pGEM-T Easy, o meio foi suplementado ainda com 0,5  $\mu\text{M}$  de IPTG e 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de X-gal e as placas incubadas por 16 horas a 37 °C. Os clones foram selecionados para PCR de colônia, utilizando os iniciadores do inserto ou do vetor e uma colônia em cada reação. Os vetores que não continham os insertos foram usados como DNA molde na reação de controle positivo. O controle negativo continha todos os componentes da reação, exceto o DNA molde. Após as reações de PCR, o DNA das colônias que tiveram os insertos amplificados foi posteriormente extraído (seção 5.7.9). A ligação dos insertos foi confirmada adicionalmente através de digestão por endonucleases.

#### 5.7.8. Estoque em glicerol das células de *Escherichia coli*

Um mL da cultura crescida *overnight* de cada clone selecionado foi centrifugada a 14.000 rpm por 30 seg. (*Eppendorf Centrifuge 5415 C*). O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 1 mL de solução de glicerol 50 % gelada (aproximadamente 4 °C). As células foram mantidas a -20 °C.

#### 5.7.9. Extração do DNA plasmidial

As colônias foram inoculadas em LB suplementado com o antibiótico de seleção e crescidas sob agitação constante (180 rpm) por 16 horas. O DNA plasmidial foi extraído pelo método de lise alcalina (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989), precipitado com 2 volumes de etanol absoluto, lavado com etanol 70 %, o etanol foi evaporado completamente e o DNA foi solubilizado em 30  $\mu\text{L}$  de água ultrapura.

No caso do DNA para transfecção, este foi extraído por maxiprep, utilizando-se o kit *High Speed Plasmid Maxiprep Kit* (Quiagen) de acordo com o protocolo do fabricante. As células foram crescidas em 500 mL de meio LB. Em ambos os casos, a qualidade do DNA foi determinada por eletroforese de agarose 1 % e quantificado por espectrofotometria no aparelho NanoDrop™ (Thermoscientific).

#### 5.7.10. Eletroforese de DNA em gel de agarose

As amostras de DNA foram misturadas ao tampão de amostra de DNA e aplicadas em gel de agarose de 0,8 a 1,2% e TBE 1x (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989), utilizando como marcador molecular 1kb Gene Ruler (Fermentas). A corrida eletroforética procedeu a 80 V por aproximadamente 1 hora. O gel foi corado em solução de brometo de etídio a 0,05%, visualizado sob luz ultravioleta em transluminador (*UVP BioImaging Systems EPI Chemi Darkroom*), e fotodocumentado.

#### 5.7.11. Sequenciamento dos clones

Os clones obtidos das construções e os iniciadores foram enviados a empresa Macrogen, (Seul, Coreia do Sul). Os clones sequenciados foram pBSTAG, pCDXTub e pCDXRibo (Figura 5) com cada um dos iniciadores mostrados no Quadro 6, com as seguintes numerações: 1 a 3; 6; 7 a 11 e 15 ao 17. O método de sequenciamento usado foi o *Single Extention*. Os resultados foram alinhados pelo programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

### 5.8. TRANSFECÇÃO E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS VETORES

#### 5.8.1. Contagem das células em câmara de Neubauer

Os protozoários foram diluídos em diluições seriadas de 100 vezes em PBS 1x contendo formaldeído a 4 %. Dez µL da diluição foram usados para preencher ambos os compartimentos da câmara de Neubauer. Todos os protozoários do quadrante central foram contados. Cada contagem foi feita em duplicata, e o valor



final (células/mL) foi determinado efetuando-se a média das contagens, multiplicando-a pelo fator de diluição e pela ordem de grandeza da câmara ( $1,0 \times 10^4$ ).

#### 5.8.2. Transfecção em *A. deanei*

Em torno de  $1 \times 10^8$  protozoários na densidade de  $0,4 \times 10^8$  a  $0,8 \times 10^8$  células/mL foram coletados e centrifugados por 10 min a 3000 rpm (*Eppendorf Centrifuge 5804R*). O meio foi descartado e as células foram lavadas uma vez com PBS 1x gelado e uma vez com tampão de eletroporação gelado. Os protozoários foram ressuspensos em volume que garantisse  $0,5 \times 10^8$  células/mL. De 80 a 100 µg de DNA circular ou linearizado (para integração no genoma) foram utilizados em 400 µL de células (equivalente a  $0,2 \times 10^8$  células), transfectadas por eletroporação (*Bio-RAD Gene Pulser Xcell*) nas seguintes condições: 2 pulsos com intervalo de 10 segundos, a 450 V e 500 µF em cubetas de 0,2 cm de espessura. O controle negativo (*mock*) foi eletroporado nas mesmas condições, porém sem DNA. As células foram imediatamente inoculadas em 5 mL de LIT incompleto e recuperados a 28 °C por 4 horas.

#### 5.8.3. Seleção dos protozoários transfectados

Seis horas após a recuperação, os protozoários foram inoculados em meio M199 acrescido de 10 % de LIT completo, na densidade de  $0,2 \times 10^7$  e contendo antibiótico de seleção (G418 ou higromicina). As células foram acompanhadas pela visualização em microscópio de luz invertido. Quando as culturas atingiram cerca de  $10^7$  protozoários/mL, elas foram diluídas a  $10^4$  células/mL em novo meio de cultura. O período de seleção foi finalizado quando não foi mais possível observar células vivas no *mock*.

#### 5.8.4. Eletroporação de *A. deanei* com FITC-dextrana 150 kDa

Este experimento foi adaptado do estudo de Graziadei, Burfeind e Bar-Sagi (1991). O composto fluorescente FITC conjugado a dextrana 150 kDa (TdB Consultancy, Uppsala, Suécia), gentilmente cedido pelo Dr. Erik Svensjö (UFRJ), foi

preparado em água ultrapura na concentração estoque de 20 mg/mL. Em torno de  $0,2 \times 10^8$  células de *A. deanei* ou de *T. cruzi* cepa G foram usadas em cada eletroporação, como descrito no item 5.8.2. O modelo de cubetas usadas e os parâmetros de eletroporação foram os mesmos descritos no 5.8.2. Cada cultura de tripanossomatídeo foi submetida a três condições distintas: (i) + FITC/+ eletroporação = 400  $\mu$ L da suspensão de células misturadas a 840  $\mu$ g de FITC-dextrana 150 kDa e eletroporados em seguida; (ii) -FITC/+ eletroporação = 400  $\mu$ L da suspensão foram eletroporadas sem o composto fluorescente e (iii) + FITC/- eletroporação = 400  $\mu$ L da suspensão foram incubadas com 840  $\mu$ g de FITC-dextrana 150 kDa em gelo por 10 min., sem receber o pulso elétrico. Após estes tratamentos, as células foram lavadas uma vez com PBS 1x para remover o composto fluorescente não incorporado. Após centrifugação por 5 min. a 3.000 rpm (*Eppendorf Centrifuge 5415C*), a células foram ressuspensas em 1 mL de PBS 1x. A fluorescência celular foi avaliada por microscopia e por FACS.

#### 5.8.5. Análise por microscopia de fluorescência

Após a seleção das células de *A. deanei* contendo GFP ou aquelas submetidas ao experimento com FITC-dextrana 150 kDa, uma alíquota de 4  $\mu$ L de cada amostra ( $\approx 10^5$  protozoários) foi usada no preparo de lâmina microscópica. Após selar a lamínula com esmalte, cada amostra preparada a fresco foi visualizada em aumento de 400 a 1000 x sob filtro para FITC (excitação em 465 a 495 e emissão em 515 a 555 nm), em microscópio *Nikon Eclipse E400 Epi-Fluorescence*.

Alternativamente, as células contendo GFP foram fixadas e coradas com DAPI. Em torno de  $10^6$  células lavadas em PBS 1x foram fixadas em 500  $\mu$ L de metanol absoluto por 5 min., lavadas mais uma vez com PBS 1x e ressuspensas neste tampão. As células foram aderidas por 15 min em lâminas previamente cobertas com poli-lisina e então lavadas com PBS 1x para retirar as células não aderidas. Em seguida, 20  $\mu$ L de Triton X-100 0,05% foram adicionados sobre elas, reagindo por 1 min. 30 seg. As células foram lavadas mais uma vez com PBS 1x e coradas com 20  $\mu$ L DAPI por 5 min. Essa e as seguintes etapas foram realizadas ao abrigo da luz. Após este período, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x e secadas a 37 °C. Para reduzir a perda de fluorescência de DAPI, 2  $\mu$ L de N-propil-

galacto 2,5 % foram adicionados sobre as células. As lâminas tiveram as lamínulas seladas com esmalte e foram submetidas à microscopia de fluorescência sob os filtros de DAPI (excitação em 325 a 375 nm e emissão em 435 a 485 nm) e FITC.

#### 5.8.6. Análise de fluorescência por FACS

Em torno de  $2 \times 10^6$  protozoários foram lavados duas vezes com PBS 1x e ressuspensos em 1 mL deste mesmo tampão. As células foram analisadas pelo citômetro de fluxo *FACSCalibur* (*Becton Dickinson*). As células selvagens epimastigotas de *T. cruzi* e coanomastigotas de *A. deanei* foram usadas para estabelecer valores de corte para os parâmetros analisados. A fluorescência foi determinada em filtro FL1 (emissão de 515 a 545 nm), no total de 100.000 eventos. Os dados gerados pela citometria de fluxo foram analisados pelo programa Cyflogic versão 1.2.1 (<<http://www.cyflogic.com/index.php?link1=1&link2=4>>).

#### 5.8.7. Extração de proteínas e análise por eletroforese em gel SDS-PAGE

Cerca de  $1 \times 10^8$  protozoários na densidade de  $0,4 \times 10^8$  a  $0,8 \times 10^8$  células/mL foram coletados e centrifugados a 5.000 rpm por 5 min a 4°C (*Eppendorf Centrifuge 5804R*). O meio de cultivo foi descartado e o sedimento foi lavado duas vezes em PBS 1x gelado. As células foram ressuspensas em 200 µL de tampão de amostra para SDS-PAGE e fervidas por 10 min. Vinte microlitros das amostras (equivalente a  $0,1 \times 10^8$  protozoários) foram separados em géis de poliacrilamida 12 % (33 %/0,9 % acrilamida/bisacrilamida) preparados em Tris-HCl 400 mM pH 8,8; contendo 3,3 % de acrilamida; 0,09 % de bisacrilamida; 0,1 % de SDS; 0,075 % de APS e 0,07 % de TEMED. A corrida prosseguiu em tampão de eletroforese para SDS-PAGE a 200 V até o desaparecimento do corante azul de bromofenol. Dois géis foram preparados, um foi corado com azul de Coomassie por 10 min sob agitação e descorado *overnight* com água destilada. Este gel foi usado para determinar a qualidade do extrato proteico antes de realizar a transferência para membranas de nitrocelulose. O outro gel foi utilizado na detecção das proteínas pela técnica de *Western blot*.

#### 5.8.8. *Western blot*

Após a separação das proteínas por SDS-PAGE, elas foram transferidas para membranas de nitrocelulose *Hybond-ECL* (GE) a 100 V por 1 hora (no gelo) ou a 50 V por 16 horas (4 °C) em tampão de transferência utilizando o sistema de transferência da marca *Bio-Rad*.

Depois da transferência, as membranas foram coradas com Ponceau S até o surgimento das bandas proteicas. As membranas foram lavadas brevemente em água destiladas e incubadas na solução de bloqueio por 1 hora em TA. As membranas foram então incubadas com o anticorpo primário de  $\alpha$ -GFP (diluído 1:3.000 na solução de bloqueio) [Anti-GFP (F56-6A1), monoclonal produzido em camundongo anti-IgG2b – *Santa Cruz Biotechnology*], por 1 hora em TA ou *overnight* a 4°C sob agitação constante. Em seguida, elas foram lavadas 3 vezes de 5 min. com PBS Tween 20 a 0,05 % e incubadas por 1 hora em TA com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (diluído 1:5.000 na solução de bloqueio). As membranas foram lavadas 3 vezes de 5 min com PBS Tween 20 a 0,05 % e reveladas com o kit *ECL™ Western Blotting Systems* (GE Healthcare), por quimioluminescência em filme radiográfico *Amersham Hyperfilm ECL* (GE Healthcare). O extrato de *T. cruzi* expressando GFP foi usado como controle positivo (Normanda Souza Melo, comunicação pessoal).

#### 5.8.9. Tratamento dos materiais e soluções para eliminação de RNase

Os reagentes e materiais foram descontaminados segundo Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). A vidraria foi lavada com água destilada e etanol 70 % v/v, secadas e aquecidas a 150°C por 8 horas. Materiais de plástico, que não podiam ser aquecidos como os aparatos de eletroforese, foram lavados com água destilada e etanol 70 %, secados e submersos em solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 % por 10 min. Após este período, estes materiais foram lavados com água ultrapura e secos a TA.

As soluções foram tratadas com 0,1 % de DEPC por 1 hora a 37 °C. Para eliminar o DEPC, as soluções foram autoclavadas por 15 min. a 120 °C e 1 atm de pressão. No caso de soluções que não podiam ser autoclavadas, seus componentes passaram por este tratamento em separado para só então a solução final ser preparada.

#### 5.8.10. Extração de RNA de *Angomonas deanei*

O RNA total de *A. deanei* foi extraído de  $5 \times 10^8$  protozoários em fase exponencial de crescimento. As células foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 min. a 4 °C (*Eppendorf Centrifuge 5804R*) e lavadas duas vezes com PBS 1x gelado. O RNA foi extraído utilizando-se o kit *RNAspin Mini RNA Isolation Kit (Qiagen)*, seguindo recomendações do fabricante. No final da purificação, alíquotas de 3 µL foram separadas para quantificação em *Nanodrop<sup>TM</sup> (Thermoscientific)* e avaliação da qualidade do RNA por eletroforese em gel de agarose desnaturante. As amostras foram estocadas a – 80 °C até o momento do uso.

#### 5.8.11. Eletroforese em gel de agarose desnaturante

As amostras de RNA foram preparadas adicionando-se 3 µL formamida seguido de desnaturação a 65 °C por 10 min. Elas foram então separadas por eletroforese em gel de agarose 1,2 % contendo 2 % de formaldeído. A corrida procedeu em tampão MOPS/EDTA 1x por 1 hora a 80 V, para o gel da análise da qualidade da extração do RNA, ou por 1 h 40 min a 80 V, para o gel de transferência para *Northern blot*. Os géis foram revelados em solução de brometo de etídio 0,05 % preparada em água tratada com DEPC (item 5.8.9). Após 10 min., os géis foram lavados brevemente com água isenta de RNase e em seguida visualizados sob luz ultravioleta em transluminador (*UVP BioImaging Systems EPI Chemi Darkroom*), para serem então fotodocumentados.

#### 5.8.12. *Northern blot*

Os géis preparados como descrito no item anterior foram tratados com solução e NaOH 50 mM isenta de RNase por 4 min sob agitação constante. O gel foi preparado para transferência em membranas de nitrocelulose Hybond-N+ (*GE Health Care*) por capilaridade em solução de SSC 10x. A transferência ocorreu por 15 horas. Em seguida, as membranas foram expostas à luz ultravioleta em transluminador para efetuar o *crosslink* do RNA às membranas. Elas foram então submetidas à hibridação com sondas radiomarcadas (item 5.8.14) ou mantidas a - 20°C até o momento do uso.

### 5.8.13. Southern blot

Em torno de 10 µg de DNA genômico de *A. deanei* e 1 µg de DNA dos vetores pCDXTub GFP e pCDXRibo GFP foram digeridos em sistemas distintos com as enzimas *HindIII* e *XbaI overnight* seguindo protocolo do fabricante (Fermentas). Uma alíquota das amostras foi separada por eletroforese em gel de agarose 0,8 % (item 5.7.10) para avaliação da qualidade do DNA. As amostras de DNA genômico foram purificadas por precipitação com etanol absoluto (item 5.7.9) e então ressuspensas em 20 µL de água ultrapura. As quantias de 7 µg de DNA genômico e 15 ng de DNA dos vetores digeridos foram separadas por eletroforese de agarose 0,8% (item 5.7.10) por 13 h a 25 V. Após a corrida, os géis foram revelados como descrito no item 5.7.10. Estes foram então tratados em solução de depurinação por 7 min. sob agitação leve e constante. Os géis foram então brevemente lavados em água ultrapura e tratados com a solução de desnaturação por 30 min. também sob agitação. Após este período, os géis foram lavados rapidamente em água ultrapura e tratado com a solução de neutralização por 20 min., sob agitação leve e constante. Após esses procedimentos, o DNA dos géis foi transferido para membranas de nitrocelulose *Hybond-N+* (*GE Health Care*) como descrito no item 5.8.12. Após a transferência e *crosslink* do DNA às membranas, estas foram submetidas à hibridação com sondas radiomarcadas (item 5.8.14) ou estocadas a – 20 °C até o momento do uso.

### 5.8.14. Marcação de sondas radioativas

O fragmento de Neo foi obtido por reação de PCR com os iniciadores NeoFor e NeoRev (Quadro 6). O fragmento de GFP foi obtido pela digestão do vetor pROCK GFP Neo com as enzimas *XbaI* e *XhoI*. Em ambos os casos, os fragmentos foram purificados por excisão do gel de agarose (item 5.7.3) para eliminar a contaminação com DNA genômico ou plasmidial. Em reação de 50 µL, cerca de 80 ng desses fragmentos foram radioativamente marcados com 50µCi de [α-P<sup>32</sup>]dCTP, utilizando 5 µL da solução de hexanucleotídeos randômicos como iniciadores, 10 µL do tampão da reação contendo os demais dNTPs não marcados e 2 unidades da enzima Klenow (fragmento), disponível no *kit Megaprime DNA labelling System* (*GE*

*Healthcare*). Após 1 hora de marcação, as reações foram bloqueadas com 25 mM de EDTA pH 8,0.

Após a obtenção das sondas, as membranas foram submetidas à pré-hibridação em aproximadamente 20 mL de solução de pré-hibridação em frascos apropriados mantidos a 65 °C por 3 horas. Após prévia desnaturação por fervura a 5 min. com 200 mM de NaOH, as sondas marcadas foram adicionadas à solução de pré-hibridação. A reação prosseguiu a 65 °C em forno giratório por aproximadamente 18 horas (CHURCH; GILBERT, 1984). Após hibridação, as membranas foram lavadas duas vezes com solução de lavagem a 65 °C. Após a lavagem, as membranas foram seladas e expostas em cassete com chapa sensibilizadora (*GE Healthcare*) e reveladas pelo aparelho *STORM860 (Biounit)* e em filme de raios X *Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare)*, e reveladas com solução reveladora e fixadora em diferentes tempos de exposição.

Para nova marcação de uma mesma membrana, esta foi lavada com solução de SDS 0,1 % fervente 3 vezes por 10 min. A terceira lavagem procedeu até a solução atingir TA, após os 10 min. de fervura. A membrana foi então lavada brevemente em SSC 2x e exposta por 16 horas em cassete com chapa sensibilizadora para determinar se ainda havia algum sinal radioativo. A chapa foi revelada pelo aparelho *STORM860 (Biounit)*.

#### 5.8.15. Análise da atividade de luciferase

A determinação da atividade de luciferase foi realizada utilizando-se o kit *Dual Glo<sup>®</sup> Luciferase Assay System (Promega)*, efetuando-se algumas modificações. Em torno de  $1 \times 10^8$  células de *A. deanei* e de *T. cruzi* em fase de crescimento exponencial foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 min. (*Eppendorf Centrifuge 5804R*) e lavadas uma vez com PBS 1x. As células foram novamente centrifugadas para remover o PBS 1x e o sedimento foi ressuspensão em tampão de lise passivo 1x. As células foram lisadas com 3 ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido e água a 65 °C, respectivamente. Após breve centrifugação para sedimentar os restos celulares, 20 µL do sobrenadante foram transferidos para placa preta de 96 poços (*Corning*) e fundo chato. Sobre ele, foram adicionados 20 µL do reagente *Dual Glo<sup>®</sup> Luciferase*, seguido de 20 µL do reagente *Dual Glo<sup>®</sup> Stop Glo*, o qual contém coelenterazina, substrato para a reação de RLUC. Após a adição dos

reagentes, a reação foi incubada por 10 min. em TA. Imediatamente depois, a reação foi lida em aparelho *Tecan infinite 200*, através do *software i-control* em modo de luminescência por 15 seg. a 24 °C. O extrato de epimastigotas de *T. cruzi* expressando RLUC foi usado como controle positivo.



## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. ANÁLISE *IN SILICO* PARA VERIFICAR A EXISTÊNCIA DA MAQUINARIA DE RNAi EM *Angomonas deanei*

Para analisar a existência da maquinaria de RNAi em *A. deanei*, o que facilitará a manipulação da expressão de genes neste organismo, o primeiro passo é a identificação de genes codificadores das proteínas atuantes na via clássica: a Ago e a Dicer. Dados genômicos de *A. deanei* juntamente com os tripanossomatídeos *Trypanosoma cruzi* cepa DM28, *Trypanosoma cruzi* clone CL-14, *Trypanosoma rangeli*, e *Blastocrithidia culicis* foram gerados utilizando o sequenciamento de DNA de nova geração (454 GS FLX Genome Analyzer – Roche). Este esforço de sequenciamento envolve a colaboração de vários pesquisadores brasileiros e está centralizado no laboratório de bioinformática (Labinfo) do LNCC (Laboratório Nacional de Computação Científica) sob coordenação da pesquisadora Dra Ana Tereza Vasconcelos. No genoma de *A. deanei*, ainda em fase de anotação, foram encontradas uma provável proteína AGO, uma Dicer e também uma PIWI (Dra. Adriana Ludwig, comunicação pessoal). O gene que codifica uma provável Dicer de *A. deanei* foi identificado, mas está incompleto. Por essa razão, essa proteína foi excluída das nossas análises, uma vez que não seria possível concluir se domínios ausentes nesta proteína seriam verdadeiros ou não.

El-Sayed *et al.* (2005) identificaram, através de análises *in silico*, a presença de uma provável proteína PIWI no genoma de *T. cruzi*, o que foi corroborado posteriormente por Garcia-Silva *et al.* (2010). Essa proteína, nomeada TcPIWI-Tryp, possui um domínio PIWI, além de um subdomínio OB, semelhante ao encontrado no domínio PAZ das argonautas e responsável pela ligação de ácidos nucleicos de fita simples. Essas características foram determinadas por análises que utilizam algoritmos mais complexos que as usuais, devido à baixa conservação do domínio PAZ nestas proteínas AGO/PIWI de eucariotos inferiores (MAKAROVA *et al.*, 2009). Sendo assim, utilizamos a mesma metodologia para determinar se as prováveis proteínas AGO e PIWI de *A. deanei* preenchem os requisitos dessa família de proteínas.

Análises *in silico* com as prováveis proteínas AGO (aqui nomeada AdAGO) e PIWI (aqui nomeada de AdPIWI) de *A. deanei* mostram que essas proteínas

possuem cerca de 90 e 116 kDa, respectivamente, apresentando caráter básico ( $pI \approx 9$ ), o que também é observado em outras proteínas dessa classe (Revisado por CERUTTI, CASAS-MOLLANO, 2009; GARCIA-SILVA *et al.*; 2010), que interagem com ácidos nucleicos. A análise com o software SMART (Figura 6) mostrou a existência de um domínio PIWI, que se estende do aminoácido 727 ao 1.024 (AdPIWI) e do 526 ao 866 para a AdAGO. Entre outros domínios com baixa probabilidade, o domínio PAZ também é encontrado em ambas as proteínas (aminoácidos 286 ao 423 para AdAGO, e 409 a 604 para AdPIWI). Para a provável proteína PIWI de *A. deanei*, o valor esperado para o domínio PAZ foi consideravelmente alto (*e-value*  $3,72 \times 10^4$ ), fora dos parâmetros aceitáveis para a predição (o *e-value* deve ser muito menor que 1 para apresentar significância estatística). Como comparação, as proteínas AGO e PIWI de *T. brucei* apresentam para o domínio PAZ *e-value* da ordem de  $10^{-23}$  (dados do sítio SMART). É possível que, tal como descrito para a TcPIWI-Tryp (GARCIA-SILVA *et al.*; 2010), o domínio PAZ da AdPIWI tenha sido perdido ao longo da evolução, ou que esse organismo tenha uma forma divergente deste domínio, justificando a não detecção deste domínio em análises iniciais.

A análise pelo HHpred da AdAGO e da AdPIWI mostrou homologia com várias estruturas de argonautas de diferentes organismos, na região próxima ao C-terminal, onde se localiza o domínio PIWI (Figura 6). Um subdomínio *OB-fold* também foi encontrado para AdAGO, com menor probabilidade (*e-value*  $1,2 \times 10^{-5}$  para). O *OB-fold* (OB = ligante de oligonucleotídeo/oligossacarídeo), é um motivo compacto envolvido no reconhecimento de ácidos nucleicos (THEOBALD; MITTON-FRY; WUTTKE, 2003). Esse subdomínio já foi descrito como parte do domínio PAZ das argonautas (SONG *et al.*, 2004), corroborando a ideia de que a AdAGO e a AdPIWI possuam um domínio PAZ degenerado mas com possível capacidade de ligação a RNA de fita simples (ssRNA) ou DNA de fita simples (ssDNA). Outras regiões, como as repetições RGG no domínio N-terminal, responsáveis pela associação da proteína TbAGO a polirribossomos (SHI; ULLU; TSCHUDI, 2004; SHI *et al.*, 2009) não foram identificadas por estas análises em nenhuma das duas proteínas de *A. deanei* estudadas.

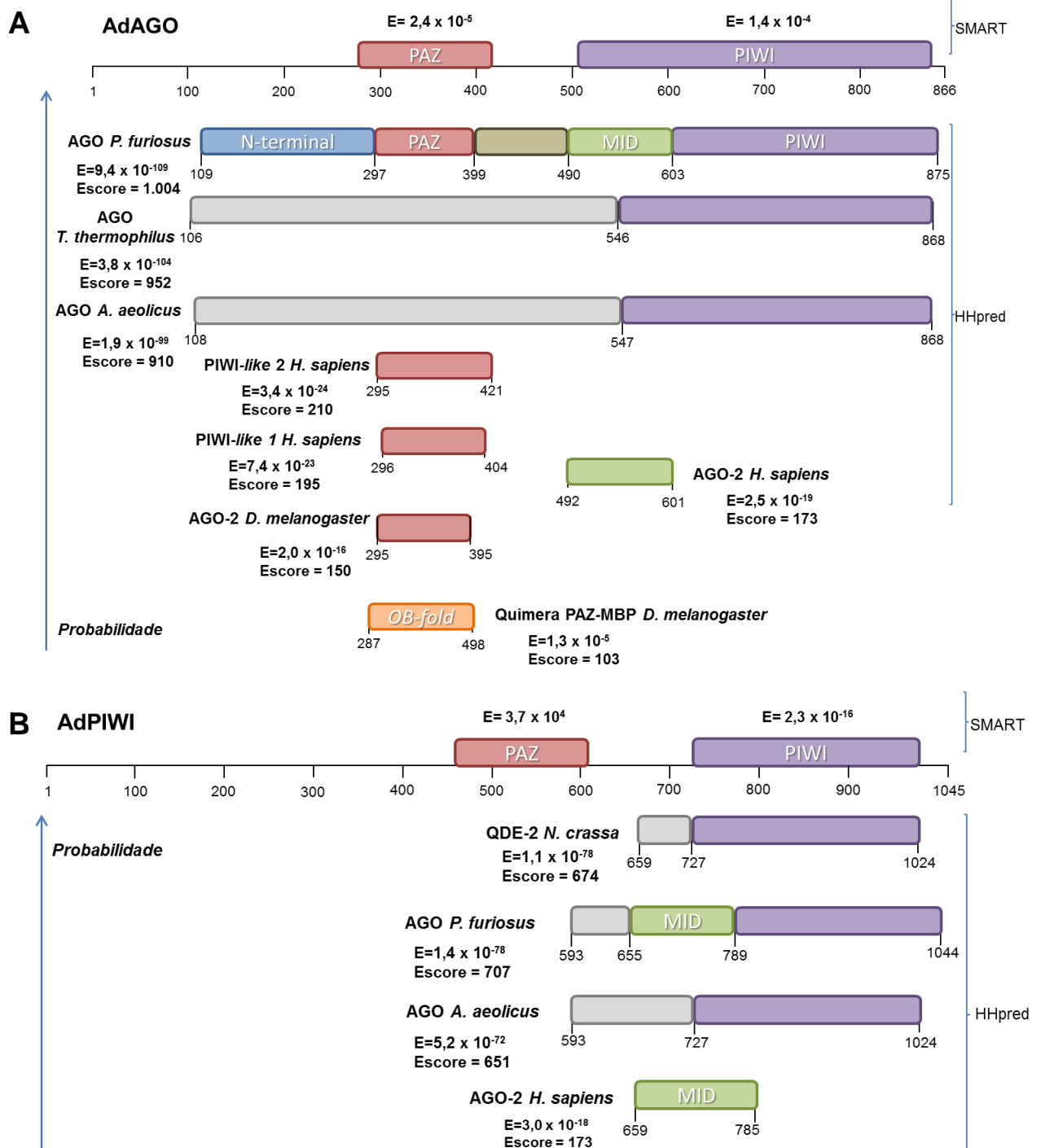


FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO DAS PROTEÍNAS COM MAIOR HOMOLOGIA ÀS PROTEÍNAS AGO E PIWI DE *A. deanei* (continua).

NOTA: Em A estão os resultados para AdAGO e em B, para a AdPIWI. Os colchetes à direita indicam os domínios e seus respectivos *E-values* encontrados pelo SMART e pelo HHpred, como indicado. *E-value*: fornece número médio de falsos positivos e representa a confiabilidade do resultado. Se próximo de zero, o resultado é confiável. *Score*: somatório dos escores especificados para cada par de letra alinhado, e letras com *gaps* são tidas como penalidades. Quanto maior seu valor, melhor é o alinhamento. *Probabilidade*: mostra em porcentagem a probabilidade do resultado ser um verdadeiro positivo, em relação à sequência em análise. Em azul está o domínio N-terminal; em vermelho, o domínio PAZ; em verde, o MID; em marrom, o domínio conector; em roxo o PIWI e em laranja, o subdomínio OB-fold. Os domínios foram identificados pelo sítio SMART, ou pela literatura. Em cinza estão os domínios das proteínas que não puderam ser identificados nestas análises. Os números sob os domínios indicam as posições em relação à AdAGO1 (A) e à AdPIWI (B). Desenhado em escala

aproximada. AGO, argonauta; MBP, proteína ligante de manose; ssDNABP, proteína ligante de ssDNA; NABP, proteína ligante de ácidos nucleicos. *P. furiosus* = *Pyrococcus furiosus*; *T. thermophilus* = *Thermus thermophilus*; *A. aeolicus* = *Aquifex aeolicus*; *H. sapiens* = *Homo sapiens*; *D. melanogaster* = *Drosophila melanogaster*; *N. crassa*, = *Neurospora crassa*.

O alinhamento entre as sequências primárias de outras proteínas AGO e PIWI de tripanossomatídeos mostrou conservação de aminoácidos próxima daqueles que supostamente fazem parte da tríade catalítica (Asp-Asp-His) para as proteínas PIWI de *A. deanei*, *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. braziliensis* (Figura 7). Essas proteínas parecem conter o motivo DDH, comum nas argonautas ativas de eucariotos. As proteínas Ago parecem não ter esse motivo usual, como também observado por Garcia-Silva *et al.* (2010).

AdAGO	619	LVIIGLDVSTSMETVGKGR	(16)	VEGKRWQPYCNH	(7)	RRVQG--	(27)	SEVANEQ		
LbAGO	613	LLIVGAVVGTAMNTMLEKY	(16)	ANGKSWKPYCMH	(7)	HQVKGEE	(27)	NEVLNNR		
TbAGO	626	ILIIAADVGRDQRSVATES	(16)	VKGTQWSTYCNH	(7)	YQVNGRK	(27)	SEVISKK		
AdPIWI	804	VLVIGVD-SCHTNVISTGA	(16)	IVGILIAPERNH	(7)	HDARGRE	(27)	TSNMAEH		
LbPIWI	948	VLILGVD-SCHTNTHSVGA	(16)	IVGILSTPAGNS	(7)	HDARGRE	(27)	AQHVAKH		
TbPIWI	860	VLLVGVD-SCHTPTVSTGS	(16)	VVGILCTAERNH	(7)	HERRGQE	(27)	VELVSEH		
TcPIWI	868	VLVVGVD-ACHTTTFSTGS	(16)	VVGILCAPERNH	(7)	HEMRGQE	(27)	ADRVTEH		
		*								
AdAGO	697	FDAFLRE	(14)	TALLYRA	(5)	CSGEGEVIS	(4)	AP-MIKAALP-T	(3)	WEYAVL
LbAGO	700	FPDFLKE	(14)	TMVLYRG	(5)	AMTDAEVGF	(4)	DL-VMEQVLP-N	(3)	WDTATV
TbAGO	710	MGEFVQE	(14)	AYLVLRG	(5)	CASEGELLD	(4)	DVDVLSEVLK-G	(3)	SSWAVV
AdPIWI	855	FGNLMIQ	(14)	AMALYGG	(5)	ILQDGDVFS	(4)	ELNAIKERIAAS	(3)	CGLTFM
LbPIWI	999	FRGILAN	(14)	AVALSGR	(5)	VFQDGDVFS	(4)	ELVGLKEVLTTQ	(3)	CGLTFM
TbPIWI	911	FEVLISR	(14)	AMELYDG	(5)	VFQDGDVYS	(4)	EMSAMQAHLPG	(3)	CGFTFA
TcPIWI	919	FRLVLQR	(14)	ACELYDG	(5)	VLQDGDVSS	(4)	EARQMOPHLPAG	(3)	CGFTFM
				*						
AdAGO	753	SAQVRTGTRLLW	(53)	NAPRGFASP	(4)	MG--IDAIHN	(4)	NSAHAFLLSGSFCEL		
LbAGO	757	VVHPRSHFRMAW	(53)	NVPRGFSTT	(4)	IL--ADSDPY	(4)	TPVDSFYLSAANCTL		
TbAGO	767	AGQR-----	(53)	-----	(4)	-----	(4)	-----		
AdPIWI	904	CLHKRTNIRFVH	(53)	NVVKGIVIP	(4)	AATPVGLDYE	(4)	VVAPSFYLQTHESNM		
LbPIWI	1048	CLHKRCNVRFMH	(53)	NIVKGVVIP	(4)	ALTTVPLDHO	(4)	PAANSFYLQTHESCM		
TbPIWI	957	CLHKRSQVRFVH	(53)	NVVKGTVVQ	(4)	ALTIQRASED	(4)	NAVNSFYLQNHDCET		
TcPIWI	965	CLHKRTNVRFVH	(53)	NVVKGAVVQ	(4)	ALTPISLQDD	(4)	SVVPSFYLQNHDCNM		
AdAGO	806	GNSANTCYVVLDLTAQVDKAELETFTYALCFLYPNKADALPLPLPMKCAS	(3)	EYAKKFL						
LbAGO	823	GHAANTYYLVQKRAASISLMDLQKLTYNMCMYPNKPDPALPLPLPIKCAY	(3)	EYARKYG						
TbAGO	-	-----	(3)	-----						
AdPIWI	966	STSRTVLYTVHHVSPLEIGDIQLLVNAMCSILS--PQATKLPMSTRCAH	(3)	DIAERL-						
LbPIWI	1132	STTRIVQYTVHHVSPSLDVADVQHIANIMANVLA--PQATKLPMAARCAH	(3)	DQAERL-						
TbPIWI	1023	STARTVQYTYLCTSPITLDVSDVQQLSHVLAHAMA--TRATKLPMPTRCAH	(3)	SIVERL-						
TcPIWI	1025	STARTVQYTVHSTSPITLEVSDVQQLSHVLSHVLS--TQATKLPMATRCAH	(3)	SVAERL-						

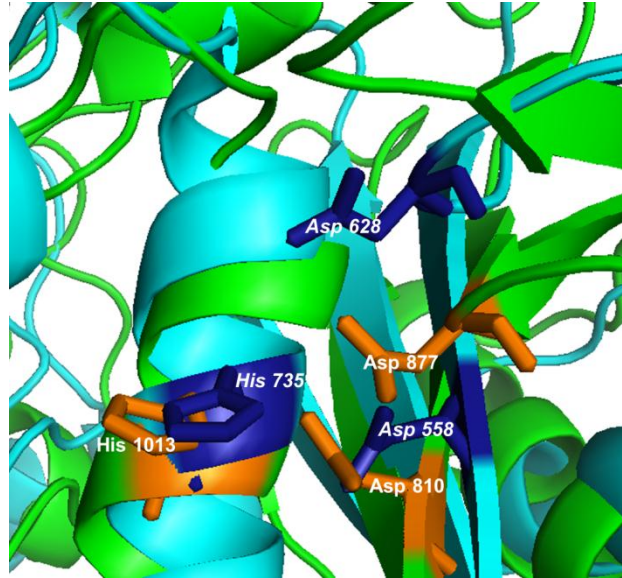
FIGURA 7 – ALINHAMENTO MÚLTIPLO ENTRE PARTE DO DOMÍNIO PIWI DAS PROVÁVEIS PROTEÍNAS AGO E PIWI DE ALGUNS TRIPANOSSOMATÍDEOS.

NOTA: Alinhamento realizado pelo programa *Prankster Graphical Aligner*. No destaque (cinza) são mostrados os prováveis resíduos que constituem a tríade catalítica. Os números entre parênteses indicam resíduos omitidos para fins didáticos. Ad, *Angomonas deanei*; Lb, *Leishmania braziliensis*; Tb, *Trypanosoma brucei*; Tc, *Trypanosoma cruzi*.

A modelagem molecular fornece importantes indícios da estrutura tridimensional da proteína em análise. A comparação de sequências pelo HHpred mostrou o menor *E-value* e maior escore com a AGO de *P. furiosus* (PfAGO) (Figura 5). Por isso, essa proteína foi escolhida como molde para a estrutura tridimensional das proteínas AdAGO e AdPIWI. Através do alinhamento das estruturas no programa PyMOL (Figura 8), foi possível observar a proximidade dos aminoácidos que constituem a provável tríade catalítica Asp<sup>810</sup>-Asp<sup>877</sup>-His<sup>1013</sup> para a AdPIWI. A distância dos carboxilatos do aspartato em relação ao anel imidazólico é cerca de 0,4 a 0,5 nm; o mesmo resultado encontrado para a TcPIWI-tryp em análise semelhante realizada por Garcia-Silva *et al.* (2010). Apesar do molde obtido para AdPIWI não ter a estrutura completa, o modelo de superfície é capaz de indicar que a provável tríade se encontra na região central do domínio PIWI, o que poderia constituir um bolsão catalítico. Esse modelo também se assemelha em estrutura ao da PfAGO. Apesar da baixa qualidade do modelo obtido, esse foi o melhor molde construído pelo programa SWISS MODEL e permitiu mostrar que os aminoácidos da tríade catalítica da PfAGO, Asp<sup>558</sup>-Asp<sup>628</sup>-His<sup>735</sup>, estão próximos àqueles da AdPIWI, encontrados pelo alinhamento da sequência primária das proteínas AGO e PIWI de alguns tripanossomatídeos. Essas informações são apenas especulações que necessitam de abordagens experimentais para serem comprovadas, tais como a cristalografia da proteína para determinar sua estrutura, bem como ensaios bioquímicos com versões mutantes para caracterizar sua atividade catalítica.

Para a AdAGO, assim como a estrutura primária, a modelagem molecular também não permitiu determinar a possível tríade catalítica dessa proteína (dados não mostrados). Apenas um resíduo de aspartato (625) se encontra próximo aos aspartatos críticos da PfAGO. Não foi encontrado outro resíduo característico (Asp, His, Glu) nesta região que possa atuar na tríade, baseado em sua vizinhança. Este dado, contudo, não exclui a identidade desta proteína como argonauta, bem como sua função na via de RNAi, se existente em *A. deanei*. Garcia-Silva *et al.* (2010), também não identificaram os supostos aminoácidos da tríade catalítica nas proteínas AGO analisadas em seu estudo, sendo estes possivelmente distintos para essa classe, uma vez que já foi descrita degeneração da sequência para outras proteínas (Revisado por TOLIA; JOSHUA-TOR, 2007). Outro aspecto a ser considerado, é a carência de evidências experimentais da existência de uma tríade catalítica para as proteínas AGO de *T. brucei* e *L. braziliensis*. A existência e

A



B

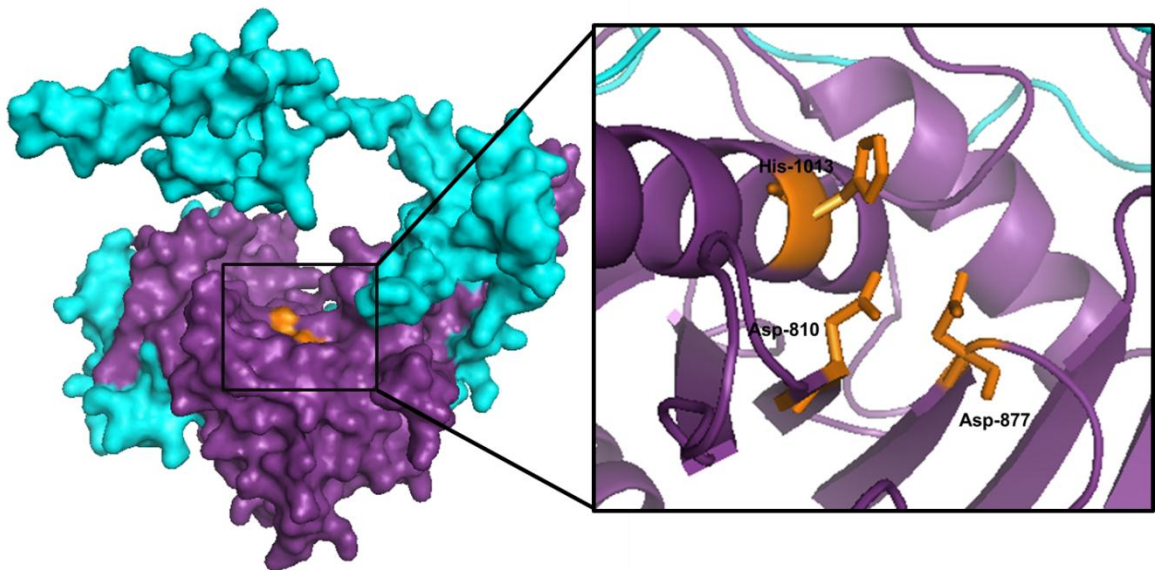


FIGURA 8 – MODELAGEM TRIDIMENSIONAL DO DOMÍNIO PIWI DE AdPIWI. O molde de AdPIWI foi gerado pelo sítio SWISS MODEL. As estruturas foram visualizadas pelo programa PyMOL. (A) Alinhamento entre os moldes de AdPIWI (verde) e PfAGO (azul claro). Em azul escuro estão os aminoácidos que constituem a tríade catalítica da PfAGO. Em laranja, estão os prováveis resíduos que constituem o sítio catalítico da AdPIWI. (B) Estrutura de superfície para parte de AdPIWI, mostrando provável bolsão catalítico. Em roxo está o domínio PIWI e em azul, o restante do molde. Em laranja está a localização do provável sítio catalítico. À direita é mostrada a imagem ampliada do suposto sítio catalítico, com os prováveis resíduos críticos para catálise de AdPIWI (Asp<sup>810</sup>-Asp<sup>877</sup>-His<sup>1013</sup>).

participação destas proteínas na via de RNAi já foi descrita (PATRICK *et al.*, 2009; LYE *et al.*, 2010), no entanto, estudos que mostrem a atividade de *slicer* das proteínas Argonautas é escasso. Um resíduo de arginina na posição 735 no domínio PIWI de TbAGO, parece ser crítico para a clivagem do mRNA alvo por esta proteína (SHI, ULLU, TSCHUDI, 2004). É possível que a tríade catalítica seja degenerada nestes organismos. É válido mencionar que proteínas com atividade nucleásica poderiam ser recrutadas pela AGO como uma alternativa para a clivagem do mRNA (MAKAROVA *et al.*, 2009).

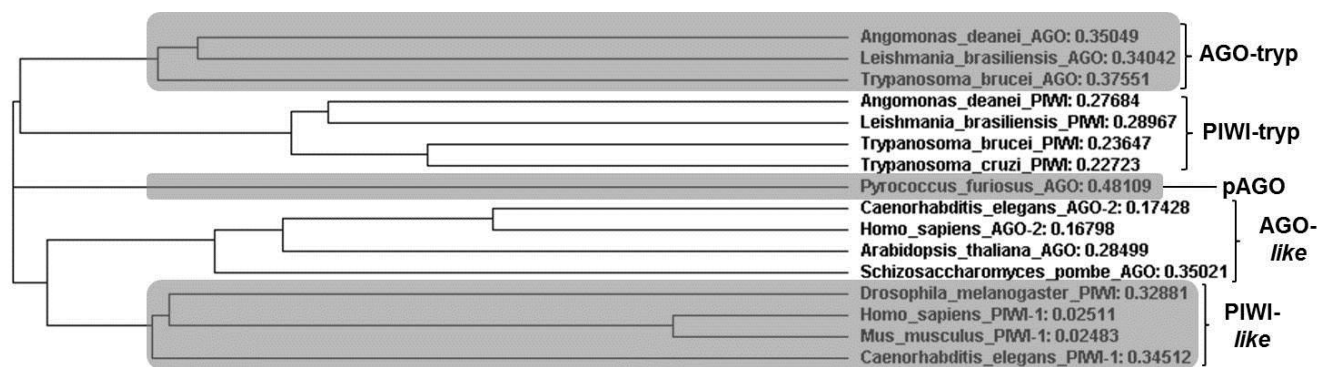


FIGURA 9 – ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS PROTEÍNAS AGO E PIWI DE ALGUNS TRIPANOSSOMATÍDEOS.

NOTA: As seqüências usadas são aquelas descritas em Material e Métodos. Os números à direita são as distâncias genéticas. Os colchetes separam as famílias dessas proteínas, como sugerido por GARCIA-SILVA *et al.*, 2010. pAGO: argonautas procarionóticas.

A análise filogenética dessas proteínas posiciona tanto as proteínas AGO quanto as PIWI em um ramo diferenciado das proteínas AGO/PIWI de outros eucariotos (Figura 9). Assim como descrito por Garcia-Silva *et al.* (2010), essas proteínas de *A. deanei* encontram-se no mesmo ramo que as AGO/PIWI de outros tripanossomatídeos, alocadas nas famílias AGO-tryp e PIWI-tryp, específicas destes protozoários. A AGO-tryp compreende as proteínas AGO com domínio PAZ-PIWI com atividade na maquinaria de RNAi. A PIWI-tryp engloba as proteínas PIWI com domínio PAZ bastante divergente e de função desconhecida. Especulamos que as PIWI-tryp não participem na via de RNAi que promove a degradação do mRNA alvo, uma vez que estão presentes em tripanossomatídeos sem RNAi funcional, como *T. cruzi* e *L. major*. É provável que estas proteínas tenham papel regulatório importante nestes protozoários, ainda a ser investigado. De acordo com a teoria evolutiva das proteínas Ago (Revisado por CERUTTI; CASAS-MOLLANO, 2006), as proteínas da família PIWI podem ter herdado um domínio PAZ pouco conservado, após um

evento de duplicação gênica das proteínas AGO/PIWI que antecedeu ao surgimento dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*.

Estas análises de *in silico* fortalecem a hipótese que é possível a existência da maquinaria de RNAi em *A. deanei*. Sua confirmação, no entanto, se dará pelo estudo experimental dessa via, pois somente a presença destes genes com estes atributos não comprova a funcionalidade deste mecanismo, uma vez que pode se tratar de pseudogenes (LYE *et al.*, 2010). O estudo experimental da maquinaria de RNAi envolve diversas abordagens, dentre elas: (i) transfecção de dsRNA e análise de fenótipo; (ii) transfecção com vetor expressando grampo com complementariedade de bases ao gene alvo e (iii) transfecção com vetor expressando dsRNA por dois promotores de T7 RNA pol. em orientações opostas (NGÔ *et al.*, 1998; DaROCHA *et al.*, 2004b; ROBINSON; BEVERLEY, 2003; LYE *et al.*, 2010). Em todas elas será produzido o dsRNA que ativará a maquinaria de RNAi, se existente. As evidências experimentais serão determinadas por técnicas específicas que detectem a redução do mRNA e da proteína codificada pelo gene alvo e a formação dos siRNAs de 20 a 24 nucleotídeos.

Uma vez que nosso grupo de pesquisa tem interesse em utilizar *A. deanei* para a superexpressão de genes heterólogos, e utilizar em estudos de genômica funcional, decidimos gerar vetores integrativos com sequências próprias de *A. deanei* para expressão estável. Estes vetores também poderão ser utilizados para avaliar experimentalmente a funcionalidade da via de RNAi em *A. deanei*, pois poderão ser utilizados para expressão de RNAs fita dupla (grampo) para disparar a via.

## 6.2. CONSTRUÇÃO DO SISTEMA DE EXPRESSÃO GÊNICA EM *A. deanei*

### 6.2.1. Teste de sensibilidade a G418 e higromicina

Pesquisas em bancos de dados apontam a inexistência de trabalhos modificando *A. deanei* geneticamente. Logo, resolvemos testar a capacidade de inibição do crescimento de culturas de coanomastigotas com os antibióticos G418 (um análogo da neomicina) e higromicina, que são amplamente utilizados em outros tripanossomatídeos.



Em ensaios preliminares, mesmo em concentrações de higromicina superiores a 500 µg/mL, não promoveram alterações de crescimento nas culturas de *A. deanei* selvagens em meio de cultivo LIT completo (*Liver Infusion Tryptose* + 10 % de soro fetal bovino) (dados não mostrados). Estas concentrações utilizadas em coanomastigotas são por volta de 10 vezes maiores do que as utilizadas para outros tripanossomatídeos (BIEBINGER; CLAYTON, 1996; WIRTZ *et al.*, 1999; DaROCHA *et al.*, 2004a). Na tentativa de reduzir a concentração de higromicina utilizada, uma vez que este antibiótico é de alto custo, um novo ensaio foi realizado, mas em meio M199 suplementado com 10 % de LIT completo. Em observações anteriores, a sensibilidade de células epimastigotas de *T. cruzi* a antibióticos aumenta nesse meio de cultivo, possivelmente pela baixa concentração de nutrientes se comparado ao LIT completo (DaROCHA *et al.*, 2004a). Com esta abordagem, o tratamento das culturas com higromicina 500 a 1000 µg/mL mostrou maior efeito nas taxas de crescimento de *A. deanei*. A análise destes dados sugere que durante o processo seletivo as doses de higromicina poderão ser utilizadas até 500 µg/mL (Figura 10). Embora não tenhamos construído um vetor que conferisse a *A. deanei* resistência a higromicina, este organismo é sensível a este antibiótico, possibilitando seu uso em estudos futuros em *A. deanei*.

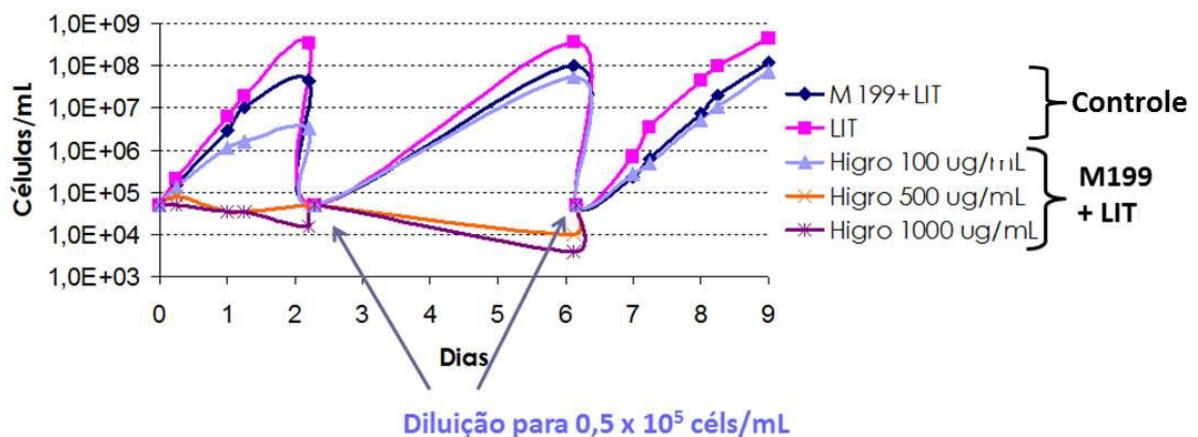


FIGURA 10 – PERFIL DE SENSIBILIDADE DE *A. deanei* A HIGROMICINA EM MEIO M199

NOTA: O ensaio foi realizado como descrito em Material e Métodos. Células coanomastigotas de *A. deanei* foram cultivadas em meio LIT sem higromicina para comparar o efeito do meio M199 no crescimento deste protozoário. Quando o controle (sem antibiótico) atingiu a fase estacionária ( $\approx 10^8$  par./mL), todos os parasitos foram diluídos a  $0,5 \times 10^5$  células/mL, a fim de mantê-los sempre na fase logarítmica de crescimento. As concentrações testadas foram de 100, 500 e 1000 µg/mL. Esta figura representa os dados de um único experimento.

Para o antibiótico G418, a menor concentração efetiva na morte de *A. deanei* foi de 250 µg/mL em meio LIT completo, ou seja, de 5 a 15 vezes mais G418 que o solicitado para *C. fasciculata* (50 µg/mL) e *T. brucei* (15 µg/mL), mas semelhante à usada para *T. cruzi* (200 µg/mL) (Figura 11). Esta faixa de concentração é aceitável, não comprometendo a utilização deste marcador de seleção. Dessa maneira, a concentração mínima de G418 a ser usada na seleção de células de *A. deanei* transfectadas seria por volta de 250 µg/mL de G418. No entanto, por motivos ainda não compreendidos, a concentração de G418 que permitiu a seleção foi de 500 µg/mL.

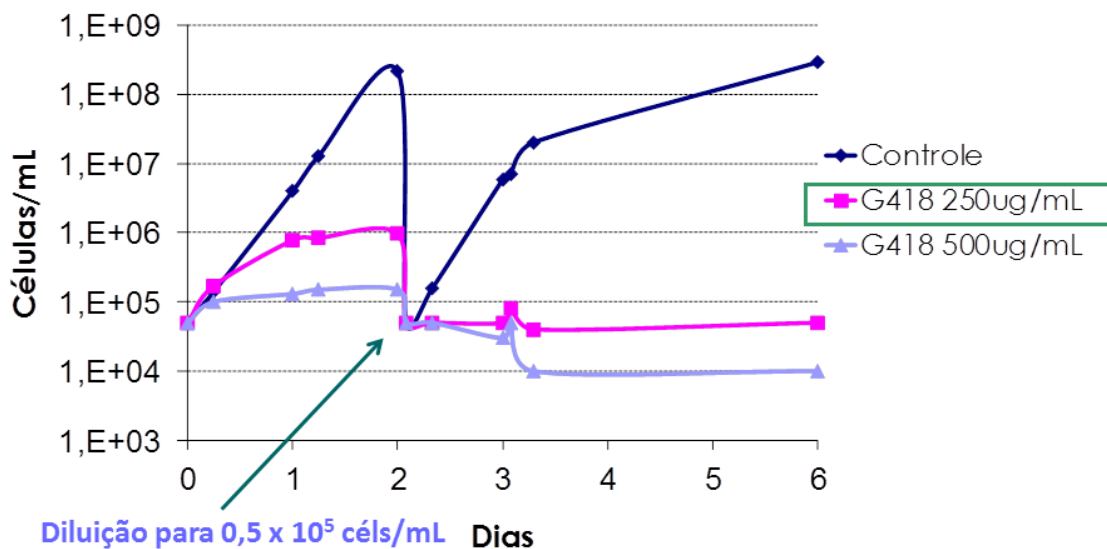


FIGURA 11 – PERFIL DE SENSIBILIDADE DE *A. deanei* A G418 EM MEIO LIT COMPLETO.

NOTA: O experimento foi realizado como descrito em Material e Métodos. Quando o controle (sem antibiótico) atingiu a fase estacionária ( $\approx 10^8$  par./mL), todos os parasitos foram diluídos a  $0,5 \times 10^5$  células/mL, a fim de mantê-los sempre na fase logarítmica de crescimento. As concentrações testadas foram de 250 e 500 µg/mL. Esta figura representa os dados de um único experimento.

### 6.2.2. Construção dos vetores de expressão pCDXTub e pCDXRibo

Como mencionado anteriormente, desejamos a obtenção de um sistema de expressão eficiente em *A. deanei*, logo vetores contendo regiões regulatórias de genes do próprio organismo são ideais para esta abordagem. Entretanto, não obtivemos sucesso em algumas tentativas preliminares de transfecção em *A. deanei* com vetores integrativos no *locus* de  $\beta$ -tubulina, como pLEW13, desenvolvido para transfecção em *T. brucei* (WIRTZ *et al.*, 1999), e pROCK GFP, criado para transfecção em *T. cruzi* (DaROCHA *et al.*, 2004a). Este resultado poderia ser

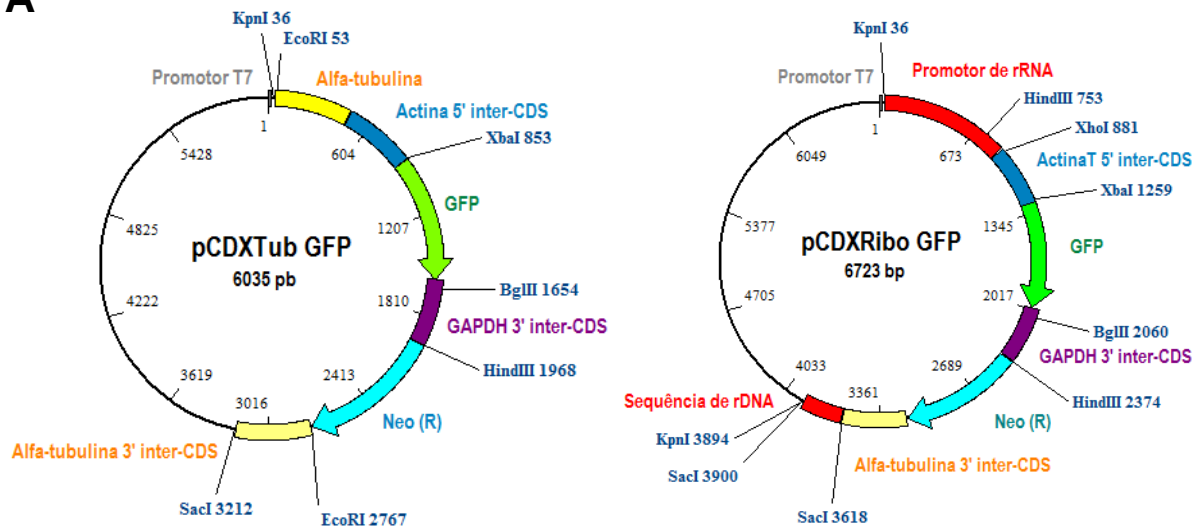
explicado por serem vetores heterólogos contendo sequências regulatórias do respectivo organismo controlando a expressão dos genes de resistência. Contudo, cabe ressaltar que a utilização do vetor episomal pTEX desenvolvidos com sequências regulatórias de gGAPDH de *T. cruzi* já foram eficientemente transferidos para *Leishmania* (KELLY *et al.*, 1992), assim como para o vetor pTREX-n (VAZQUEZ; LEVIN, 1999), também desenhado com sequências regulatórias de *T. cruzi* mas que é capaz de ser expresso em *T. rangeli* (GUEVARA *et al.*, 2005). O vetor pLEW13 desenvolvido com sequências regulatórias de *T. brucei* também já foi eficientemente transfectado em *T. cruzi* e *T. rangeli* permitindo seleção (INOUE *et al.*, 2002; DaROCHA *et al.* 2004a).

Devido a este resultado e ao fato de não haver evidências de que vetores episomais para transfecção estável seriam expressos eficientemente, devido a provável presença da maquinaria de RNAi (LYE *et al.*, 2010) resolvemos criar dois vetores integrativos contendo sequências regulatórias da própria *A. deanei*: um permitindo integração no *locus* de  $\alpha$ -tubulina e o outro para integração no *locus* de rRNA 28S. Para isto, obtivemos por PCR utilizando iniciadores específicos (Quadro 6, em Material e Métodos) as regiões do genoma de *A. deanei* correspondentes às regiões intergênicas de  $\alpha$ -tubulina, actina e GAPDH e a região a montante do rRNA da subunidade 28S (Figura 12 A). A escolha destas regiões se fundamentou na utilização destas em diversos trabalhos em tripanossomatídeos (LABAN; WIRTH, 1989; KELLY *et al.*, 1992; MARTÍNEZ-CALVILLO; LÓPEZ; HERNÁNDEZ, 1997; WIRTZ *et al.*, 1999; VAZQUEZ; LEVIN, 1999; DaROCHA *et al.*, 2004a; YAO *et al.*, 2007).

A construção dos vetores, nomeado pCDXTube pCDXRibo, foi realizada com sucesso. A Figura 12 A o mapa de ambos os vetores contendo o gene repórter da proteína verde fluorescente (GFP), a qual foi adicionada para testar a eficiência de expressão dos vetores obtidos neste trabalho.

Para a confirmação dos clones, os vetores pCDXTub e pCDXRibo obtidos das bactérias transformadas e selecionadas, foram submetidas à digestão por endonucleases de restrição (Figura 12 B) e reação de sequenciamento (Apêndice 1). Esta última cobriu desde o gene de tubulina à região 3' inter-CDS (pCDXTub), bem como do provável promotor de rRNA até a sequência de rDNA (pCDXRibo) (Figura 12 A). A qualidade das sequências produzidas foi satisfatória, com baixa frequência de *gaps* e de mutações, quando comparadas à sequência teórica (Apêndice 1).

A



B

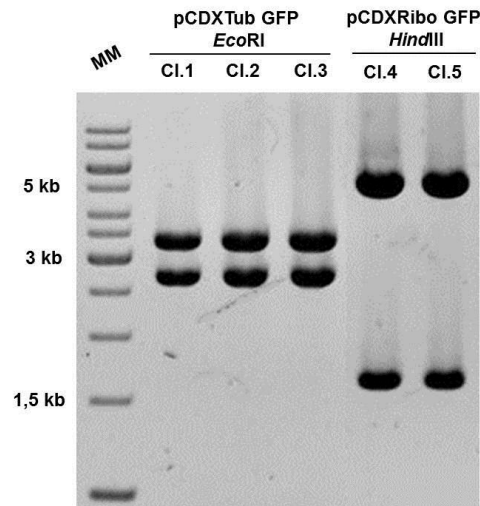


FIGURA 12 – MAPA DOS VETORES pCDXTub E pCDXRibo MOSTRANDO A LOCALIZAÇÃO DOS GENES CLONADOS E OS SÍTIOS DE RESTRIÇÃO.

NOTA: A clonagem foi realizada como descrito em material e métodos. (A) Alguns dos sítios de endonucleases são mostrados. (B) Perfil de digestão com *EcoRI* (pCDXTub GFP) e *HindIII* (pCDXRibo GFP). Gel de agarose 1%. Após a digestão de pCDXTub com *EcoRI*, os fragmentos preditos por análises *in silico* foram liberados para pCDXTub GFP (2714 pb e 3321 pb). O mesmo ocorreu para pCDXRibo GFP com *HindIII* (1621 pb e 5102pb). MM= marcador molecular 1kb DNA Ladder (Fermentas); Cl = clone; kb = kilobases.

### 6.2.3. Transfecção de *Angomonas deanei* com os vetores pCDX

O protocolo de eletroporação para *T. cruzi* (adaptado de DaROCHA *et al.*, 2004a) foi usado para testar a eficácia da permeabilidade celular em *A. deanei*. Realizamos, portanto, ensaios de transfecção substituindo o DNA pelo composto fluorescente FITC-dextrana 150 (GRAZIADEI; BURFEIND; BAR-SAGI, 1990). As

células tanto de *A. deanei* quanto do controle positivo, *T. cruzi*, foram analisadas por citometria de fluxo imediatamente após a transfecção. Como pode ser visto na Figura 13, o protocolo de eletroporação permitiu a permeabilização de ambas as células para a mesma quantidade de FITC-dextrana 150, como mostrado pelo deslocamento de fluorescência (linha verde). A quantidade de células fluorescentes foi notavelmente diferente, sendo que em *T. cruzi* a eficiência de permeabilização foi em torno de 75 %, enquanto que para *A. deanei* foi próximo a 60 %. Para excluir a possibilidade de captação de FITC-Dextrana 150 por parte dos protozoários por outra via que não a de permeabilização pela eletroporação, as células foram incubadas com o composto, sem sofrer o choque elétrico (linha azul, Figura 13 A e B). A porcentagem de fluorescência foi muito inferior à produzida pela eletroporação. Logo, o aumento da fluorescência foi em decorrência da perturbação celular causada pela eletroporação, e não pela captação do composto pelas células.

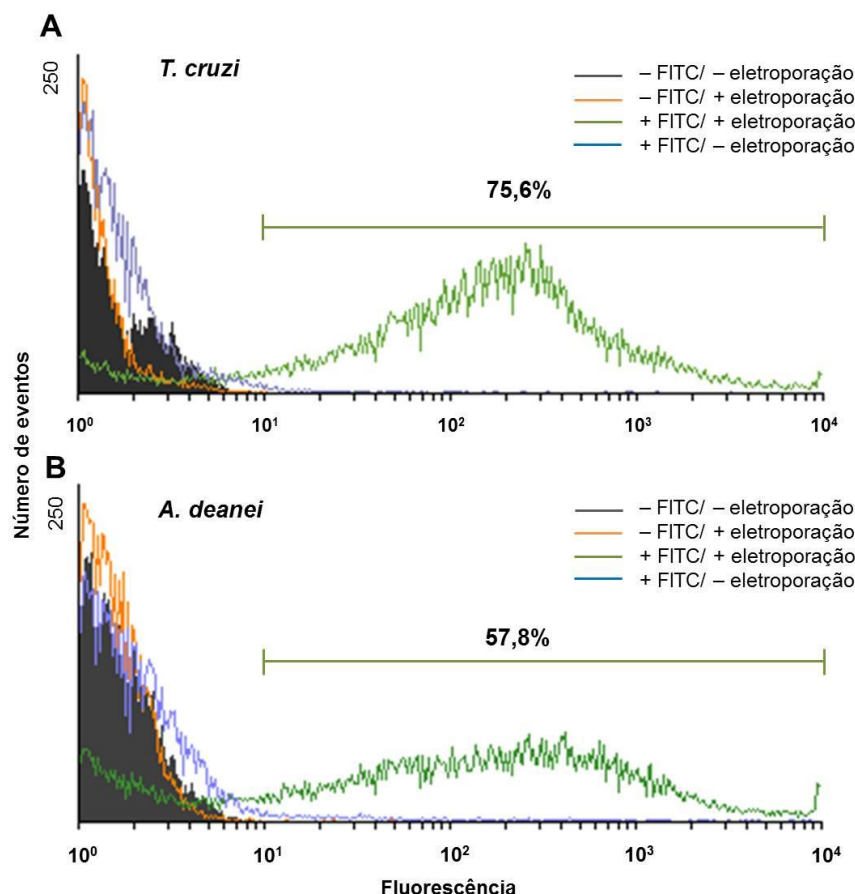


FIGURA 13 – EFICIÊNCIA DO PROTOCOLO DE ELETROPORAÇÃO USADO EM *A. deanei*.

NOTA: Cerca de  $2 \times 10^7$  protozoários em fase log foram eletroporados sem e com 0,84 mg de FITC-dextrana, ou somente incubados com o composto. *T. cruzi* (A) foi usado para comparação da eficiência de eletroporação. – FITC/ – eletroporação: célula selvagem sem tratamento; – FITC/+eletroporação: células eletroporadas sem FITC-dextrana 150; +FITC/+eletroporação: células eletroporadas com FITC-dextrana 150; +FITC/–eletroporação: células incubadas com FITC-dextrana 150 em gelo, sem eletroporação.

Cabe ressaltar que os dados da eletroporação usando FITC-dextrana foram superestimados, uma vez que o composto usado possui massa molecular (150 kDa) muito inferior a dos vetores testados (entre 4.000 e 5.000 kDa, estimando o valor de 350 Da para cada nucleotídeo). Por essa razão, a eficiência de eletroporação com as moléculas de DNA é consideravelmente menor do que a observada para o FITC-dextrana 150 (RAMIREZ *et al.*, 2000; DaROCHA, *et al.*, 2004). Além da massa molecular, outras características físico-químicas podem reduzir sua inserção na célula, tais como a conformação do DNA e a carga negativa dos grupos fosforil.

Apesar de ter sido possível a introdução de moléculas de FITC-dextrana 150 em cerca de 50 % das coanomastigotas de *A. deanei*, esse protocolo de transfecção pode não ser o ideal para este organismo. Outras condições de eletroporação deverão ser testadas para aumentar a eficiência de transfecção, tais como os protocolos utilizados em outros tripanossomatídeos como *T. brucei* ou *Leishmania* (ROBINSON; BEVERLEY, 2003; RINGPIS; LATHROP; APHASIZHEV, 2011).

Tendo os vetores próprios para *A. deanei*, as concentrações de antibióticos estabelecidas, e a demonstração de permeabilização das células, as transfecções com estes vetores foram realizadas. Estas construções foram transfectadas tanto na forma circular, quanto linearizado com as enzimas *SacI/KpnI* (pCDXTub) ou somente *KpnI* (pCDXRibo). Após as etapas de transfecção e seleção obtivemos populações resistentes a G418 (500 µg/mL) transfectadas apenas com o vetor pCDXRibo GFP D (digerido) e com o vetor pCDXTub ND (circular). Nos ensaios de transfecção, a seleção ocorreu a partir da terceira semana.

#### 6.2.4. Análise das populações de *A. deanei* resistentes a G418

Para confirmar a transfecção dos vetores em *A. deanei*, foram realizadas PCR (Resultados não mostrados) e *Southern blot*, utilizando como sondas a região codificadora das proteínas GFP e de resistência à neomicina radiomarcadas, como descrita no item 5.8.14 em Material e Métodos. Nesta análise, o DNA total dos parasitos selvagens ou resistentes a G418 eletroporados com DNA de pCDXTub GFP não digerido e DNA de pCDXRibo GFP digerido foram extraídos. Os DNAs genômicos foram digeridos (*HindIII* ou *XbaI*) submetidos a separação em gel de agarose transferidos para membranas de *nylon*. O resultado da hibridação destas membranas pode ser visualizado na Figura 14 A e B. Como esperado, apenas os

parasitos transfectados apresentaram sinal de hibridação. Parasitos transfectados com pCDXTub GFP apresentaram o mesmo perfil de hibridação para ambas as sondas. Este dado seria compatível com manutenção do plasmídeo na forma circular (epissomal), contudo os sinais de hibridação para ambas as sondas do DNA digerido com *Hind*III são superiores ao tamanho do vetor linearizado (~6035 pb), usado como controle (dado não mostrado), o que sugere a integração do vetor no genoma. Portanto, os fragmentos maiores são provenientes da digestão pelas enzimas *Xba*I e *Hind*III em um sítio do vetor e em outro sítio em alguma região do genoma do protozoário.

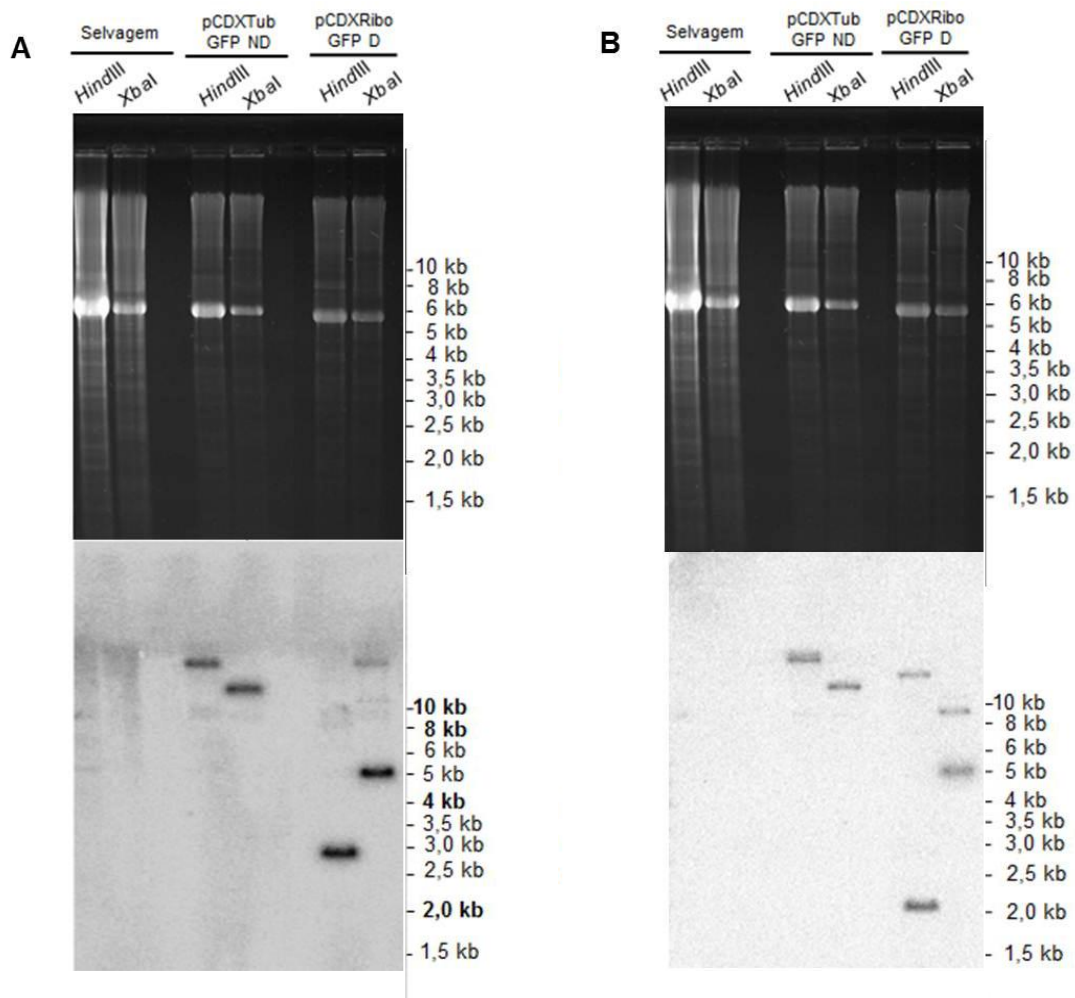


FIGURA 14 – CONFIRMAÇÃO DA INTEGRAÇÃO DOS VETORES pCDX NO GENOMA DE *A. deanei* POR SOUTHERN BLOT.

NOTA: Em (A), o resultado da hibridação utilizando sonda para o gene de resistência a neomicina radiomarcada com C[P<sup>32</sup>], como descrito em Material e Métodos. O painel superior representa o gel de agarose 0,8% usado para a transferência. O painel inferior mostra o padrão de bandas da hibridação, em imagem gerada pelo escâner STORM860 (Biounit). Após a exposição, a membrana foi lavada e exposta à nova hibridação, desta vez com sonda para o gene de GFP radiomarcada com C[P<sup>32</sup>] (B). MM = marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder (Fermentas); D = digerido; ND = não digerido.

A interpretação dos dados de *Southern blot* para as culturas de *A. deanei* transfectadas com o vetor pCDXRibo GFP é um pouco mais complexa. Como representado na Figura 15, espera-se que após transfecção com pCDXRibo GFP digerido com *KpnI*/*SacI* ocorra recombinação homóloga de ambas as extremidades. Na digestão com *XbaI* do DNA genômico total obtido das culturas de *A. deanei* transfectadas com o vetor pCDXRibo GFP, esperava-se a identificação de uma banda de ~4,0 Kb para a hibridação com ambas as sondas (Figura 15). Estas bandas foram satisfatoriamente identificadas, como mostrado na Figura 14 A e B. Já para a digestão com a enzima *HindIII* (dois sítios no vetor, mostrado na Figura 15), esperava-se o sinal de hibridação para duas bandas de tamanhos distintos dos genes de resistência a Neo (> 2.300) e de GFP (> 1.600 pb) (Figuras 14 e 15). Esses resultados de *Southern blot* sugerem a integração da construção no genoma. Outras bandas com massa molecular elevada (> 10 kb) foram detectadas (de menor intensidade), que não foram previstas pela análise *in silico*. Uma hipótese levantada seria a integração em mais de um *locus* ribossomal ou o polimorfismo para esse gene. Outra explicação seria de que a amostra analisada era formada por uma população heterogênea, portanto seria provável a existência de perfis distintos de hibridação.

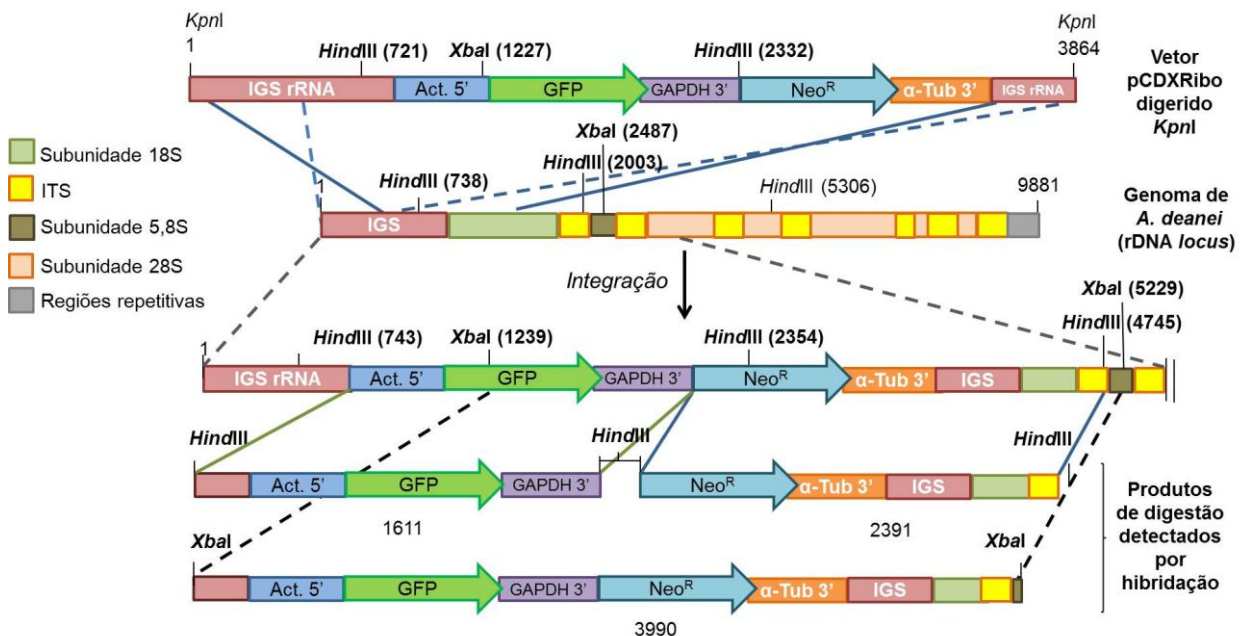


FIGURA 15 – POSSIBILIDADE DE INTEGRAÇÃO DO VETOR pCDXRibo GFP DIGERIDO *KpnI* NA REGIÃO DO DNA RIBOSSOMAL 18S DE *A. deanei*.

NOTA: Os números entre parênteses representam as posições no DNA, em pares de base, onde se encontram os sítios das enzimas *HindIII* e *XbaI*. Os números abaixo dos produtos de digestão representam seu comprimento em pares de base. Na região após a integração, a porção a jusante da subunidade 5,8S foi omitida para fins didáticos.



Esses resultados indicam que ambos os vetores são mantidos de forma estável em *A. deanei*, embora não haja a certeza do local da integração no genoma do protozoário. A integração do vetor pCDXTub GFP pode ocorrer mesmo na forma circular como descrito para os vetores pTEX, pRIBOTEX e pTRES (KELLY *et al.*, 1992; MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 1997; VÁZQUEZ; LEVIN, 1999), uma vez que há regiões de recombinação homóloga flanqueando os genes repórter e o do marcador de seleção, bem como suas regiões intercodificadoras.

#### 6.2.5. Análise da expressão do gene repórter GFP nas populações resistentes a G418

Após a seleção dos protozoários transfectados com os vetores pCDX, as culturas foram preparadas para a análise por microscopia de fluorescência e por FACS. A análise microscópica não revelou protozoários fluorescentes para nenhuma das populações obtidas (pCDXTub GFP e pCDXRibo GFP). É possível que a taxa de expressão de GFP fosse menor do que a sensibilidade da técnica de microscopia. A análise por FACS (Figura 16 B) mostrou um leve deslocamento de fluorescência da população contendo o vetor pCDXRibo GFP (2,7 % de células fluorescentes), em relação à população selvagem. Para o vetor pCDXTub GFP (Figura 16 A), a média da fluorescência foi ainda menor (0,7 % de células fluorescentes). As análises foram repetidas mais duas vezes e em todas elas não houve alteração do padrão de fluorescência.

Os dados de FACS sugerem baixíssima ou inexistência de expressão do gene repórter. Apesar da duvidosa expressão de GFP, as populações analisadas foram selecionadas e a presença das construções foi confirmada por *Southern blot* (Figura 14). Isto indica que as construções são adequadas para ao menos permitir a expressão do gene de resistência à neomicina em quantidade suficiente para a seleção.

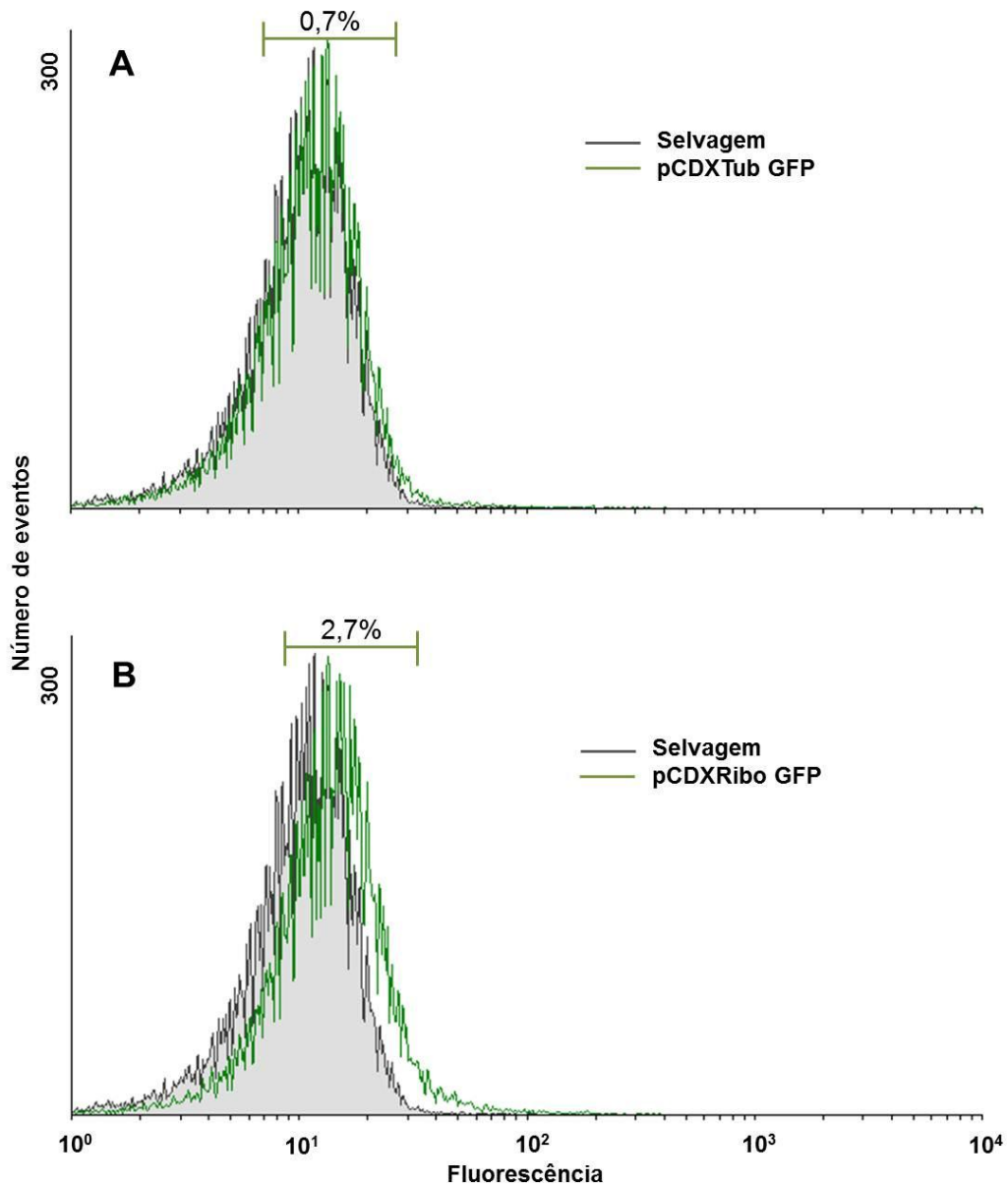


FIGURA 16 – AVALIAÇÃO DA EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DE GFP DAS POPULAÇÕES SELECIONADAS CONTENDO OS VETORES pCDXTub GFP e pCDXRibo GFP.

NOTA: Resultados da análise por FACS para (A) pCDXTub GFP e (B) pCDXRibo GFP. Em cinza é representado o pico de fluorescência para a população selvagem e, em verde, para as populações contendo os vetores. Em torno de  $10^6$  células foram usadas na análise, representadas em 100.000 eventos.

Para determinar a razão da baixa expressão dos vetores construídos, fizemos a identificação dos transcritos de GFP e de resistência a neomicina, e também da expressão da proteína GFP. Pela técnica de *Western blot* (resultados não mostrados) não foi possível identificar a presença da proteína GFP nos extratos contendo pCDXTub GFP e pCDXRibo GFP. Em vista do observado pela análise por FACS, a quantidade de proteína podia ser tão pequena a ponto de não ser detectada por esta técnica.

Outra análise realizada foi a da identificação dos transcritos para os genes repórter e de resistência por *Northern blot* (Figura 16). O transcrito de GFP e de neomicina só foram detectados na população carregando o vetor pCDXTub GFP. Considerando o comprimento dos genes (800 pb para neomicina e 700 pb para GFP), do *SL* (cerca de 40 nt), da calda poli(A) (até 200 nt) e parte das regiões intercodificadoras (cerca de 230 nt) (BENZ *et al.*, 2005; CAMPOS *et al.*, 2008), os transcritos deveriam ter em teoria cerca de 1,2 kb. As bandas detectadas pela hibridação encontram-se abaixo de 1,5 kb; sendo então possível que tenham o comprimento correto. Mas por questões técnicas, não foi possível determinar com exatidão o comprimento do transcrito. Logo, apenas com os dados de *Northern blot* não é possível concluir se o transcrito de GFP possui todas as sequências necessárias para sua tradução. Para tal, outras técnicas, RT-PCR seguido de sequenciamento, PCR em tempo real, devem ser aplicadas.

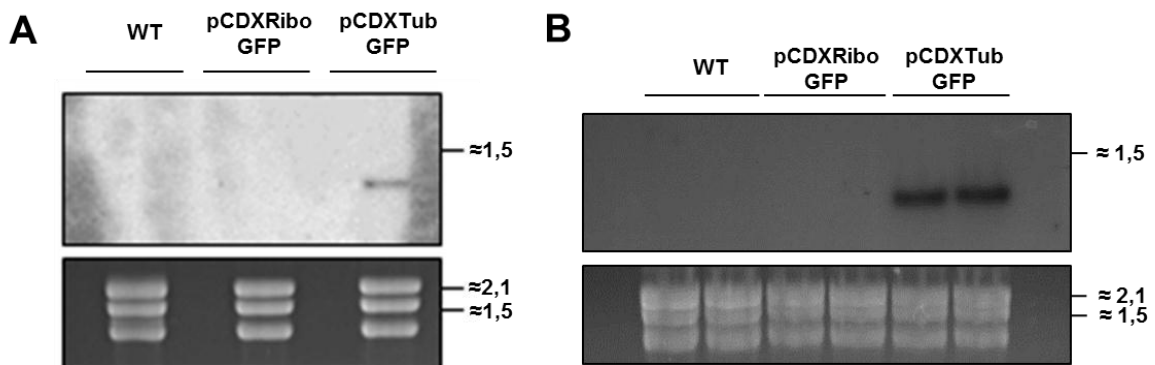


FIGURA 17 – DETECÇÃO DOS TRANSCRITOS DE NEOMICINA E GFP PARA *A. deanei* CONTENDO OS VETORES pCDXRibo GFP E pCDXTub GFP.

NOTA: *Northern blot* usando sonda para neomicina (A) ou GFP (B) radiomarcada com  $[P^{32}]$ . O painel superior mostra o resultado da hibridação, enquanto que o inferior mostra o RNA ribossômico em gel desnaturante de agarose 1,2%. O RNA total foi extraído de  $5 \times 10^8$  células em fase log. Os resultados de (A) e (B) foram obtidos da mesma amostra, porém de géis e membranas distintos. Os números indicam os tamanhos em kb.

Nos tripanossomatídeos, os genes de RNA ribossomal da subunidade 28S são organizados em unidades fragmentadas e que são multicópia. Apresenta alta taxa de expressão e é regulado pela taxa de crescimento (ULIANA *et al.*, 1996). Cabe ressaltar que a sequência de *A. deanei* usada no vetor pCDXRibo foi obtida por homologia com a sequência do DNA ribossomal 28S de *C. fasciculata*. A região clonada corresponde a um segmento a montante da subunidade 18S do *cluster*

(Figura 15). Ela foi escolhida pela sua localização, no entanto, sua efetividade como promotor ainda não foi testada.

DaROCHA *et al.* (2004a) desenvolveram para *T. cruzi* um vetor integrativo (pROCK GFP Neo) no *locus* de  $\beta$ -tubulina, um gene multicópia, como uma alternativa para transfecção estável neste parasito. A transfecção com este vetor permitiu a seleção de parasitos expressando altos níveis de GFP de forma estável por longos períodos. Com base nisso, criamos além do vetor de integração no *locus* de rDNA (pCDXRibo) outro vetor para integração em  $\alpha$ -tubulina (pCDXTub). Pelos resultados das hibridações, pCDXTub mostrou-se mais promissor do que o pCDXRibo, uma vez que permitiu a transcrição de ambos os genes de resistência e repórter. Conclui-se então que o vetor pCDXTub seja mais adequado para a integração e expressão do que o vetor pCDXRibo em *A. deanei*.

De forma surpreendente, os dados de *Northern blot* contradizem os do FACS (Figura 16 A e 17). A população contendo o vetor pCDXTub GFP apresentou fluorescência próxima à da selvagem. No entanto, a hibridação com sonda específica para GFP identificou seu transcrito, diferentemente do observado para a população que carrega o vetor pCDXRibo GFP. As análises de hibridação não foram realizadas com a mesma amostra que foi submetida à análise de FACS aqui mostrada. Em situação semelhante para *T. cruzi*, Pires *et al.* (2008) descreveram que as populações selecionadas expressando GFP ou RFP nunca atingiram 100% de parasitos fluorescentes, mesmo após repetidas diluições para seleção de população monoclonal. Neste estudo, os autores consideraram a possibilidade da ocorrência de nova recombinação após a seleção com G418. Como consequência, diferentes regiões do genoma podem exercer regulação diferenciada, justificando a redução da expressão de GFP. Um evento semelhante pode ter ocorrido em *A. deanei*, recombinação das construções em uma região de baixa expressão.

Para descartar a possibilidade de alguma inconsistência na sequência dos vetores construídos, analisamos as regiões intercodificadoras de actina 5'; GAPDH 3' e  $\alpha$ -tubulina 3' após tê-las sequenciado (Figura 18 e Apêndice 1). Toda região com potencial para ser uma intercodificadora foi clonada, carregando ainda parte das sequências codificadoras (marcadas em cinza). Utilizando como base os dados de Campos *et al.* (2008), identificamos as prováveis sequências usadas para a adição do *SL* e da cauda poli(A) para *A. deanei*. A distância entre os nucleotídeos AG e a sequência de poli(Y) é de 18 a 24 nt (em *T. cruzi* e em *T. brucei*,

respectivamente). A sequência de poli(Y) possui extensão de 14 - 15 nt e é constituída em sua maioria por timinas (59 %) e citosinas (33 a 38 %). As regiões destacadas na Figura 18 foram selecionadas com base nesses dados, sendo que para a região rica em poli(Y) foi admitido sequências 12 a 24 pirimidinas contendo no máximo uma purina. As três regiões intercodificadoras nos vetores pCDX possuem pelo menos duas poli(Y) com múltiplos sítios aceptores de *splice leader* (dinucleotídeo AG) para processamento adequado dos transcritos. Cabe ressaltar que as distâncias destas regiões são variáveis entre as espécies (CAMPOS *et al.*, 2008) e em *A. deanei* elas não foram estudadas até o momento. Mesmo assim, consideramos ser pouco provável que a baixa expressão de GFP seja em decorrência da integridade das regiões intercodificadoras.

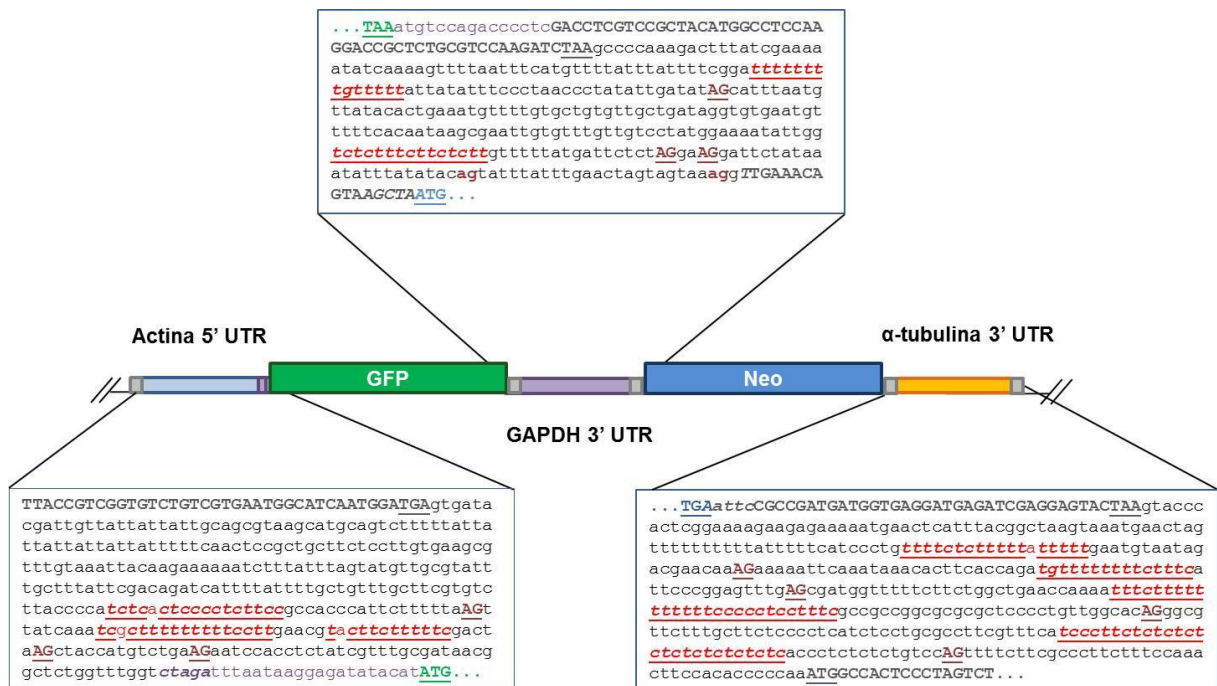


FIGURA 18 – SEQUÊNCIAS DAS REGIÕES INTERCODIFICADORAS PRESENTES NO VETOR pCDX.

NOTA: Os quadros mostram a sequência completa para actina 5' inter-CDS, GAPDH 3' inter-CDS e α-tubulina 3' inter-CDS. Em vermelho estão regiões ricas em pirimidina que podem ser usadas como sítio de poliadenilação. Em letras maiúsculas estão potenciais AG aceptores de *SL*. Outros prováveis AG também são destacados em negrito. Em roxo estão sequências residuais do vetor parental de GFP (pROCK GFP Neo). Sequências codificadoras residuais estão destacadas em cinza.

Outra justificativa para a baixa expressão de GFP seria uma mutação no gene de GFP, resultando em uma proteína não funcional que poderia ser degradada (revisado por HARTL; BRACHER; HAYER-HARTL, 2011). Para comprovar esta

hipótese, o vetor pCDXTub GFP teve a região do gene repórter sequenciada usando oligonucleotídeos iniciadores de actina inter-CDS (inter-codificadoras) 5' *forward* e GAPDH inter-CDS 3' *reverse*. Em torno de 350 nt na região central da proteína (em torno de 50 % da codificadora) não tiveram discrepâncias com a sequência molde que comprometesse a região codificadora (Apêndice 2). As sequências das extremidades do gene apresentaram baixa qualidade no sequenciamento, mas mesmo assim foi possível identificar as bases através das sequências em separado. Esta análise indica que o gene de GFP estaria íntegro.

Apesar do amplo uso de GFP como gene repórter, essa proteína também é capaz de exercer certa toxicidade em células de mamíferos, dificultando a obtenção de linhagens com expressão estável dessa proteína. Liu *et al.* (1999) observaram que diversas variantes de GFP expressas por células de mamíferos causaram alterações morfológicas que resultaram em morte por apoptose, por mecanismo desconhecido. A fluorescência destas células pôde ser observada por no máximo cinco dias após a transfecção. Baseado neste relato, seria possível que a proteína GFP exercesse algum efeito tóxico às células de *A. deanei* e, por mecanismos protetores, tenha sido rapidamente degradada.

Perante as dificuldades encontradas para analisar as construções contendo GFP, optamos por testar outro gene repórter. O gene escolhido foi a luciferase de *Renilla reniformis*. A clonagem e análise da expressão serão discutidas na seção seguinte.

#### 6.2.6. Avaliação da expressão heteróloga de RLUC em *Angomonas deanei*

A não detecção de fluorescência atribuída a expressão de GFP nos motivou a trocar esse gene repórter por outro com maior sensibilidade. Escolhemos então a enzima luciferase de *Renilla reniformis* (RLUC). A quantificação da atividade desta enzima apresenta maior acurácia, uma vez que as células eucarióticas possuem luminescência própria desprezível (DE ALMEIDA; RAPPARD; WU, 2011).

O gene de RLUC foi clonado nos vetores pCDXTub e pCDXRibo. Quatro novos vetores foram gerados: pCDXTub RLUC; pCDXRibo RLUC; pCDXTub HRLUC e pCDXRibo HRLUC (Figura 19 A). Estes dois últimos, além da RLUC, contêm a região aceptora de *Spliced leader* HX1 do gene *TcP2β* de *T. cruzi*. A inserção desta região foi uma tentativa de adicionar sítios extras para *trans-splicing*,

uma vez que sua presença no vetor pTREX aumentou consideravelmente a expressão do gene repórter em relação ao vetor parental (VÁZQUEZ; LEVIN, 1999). A identidade das construções foi realizada por perfil de digestão com endonucleases de restrição (Figura 19 B).

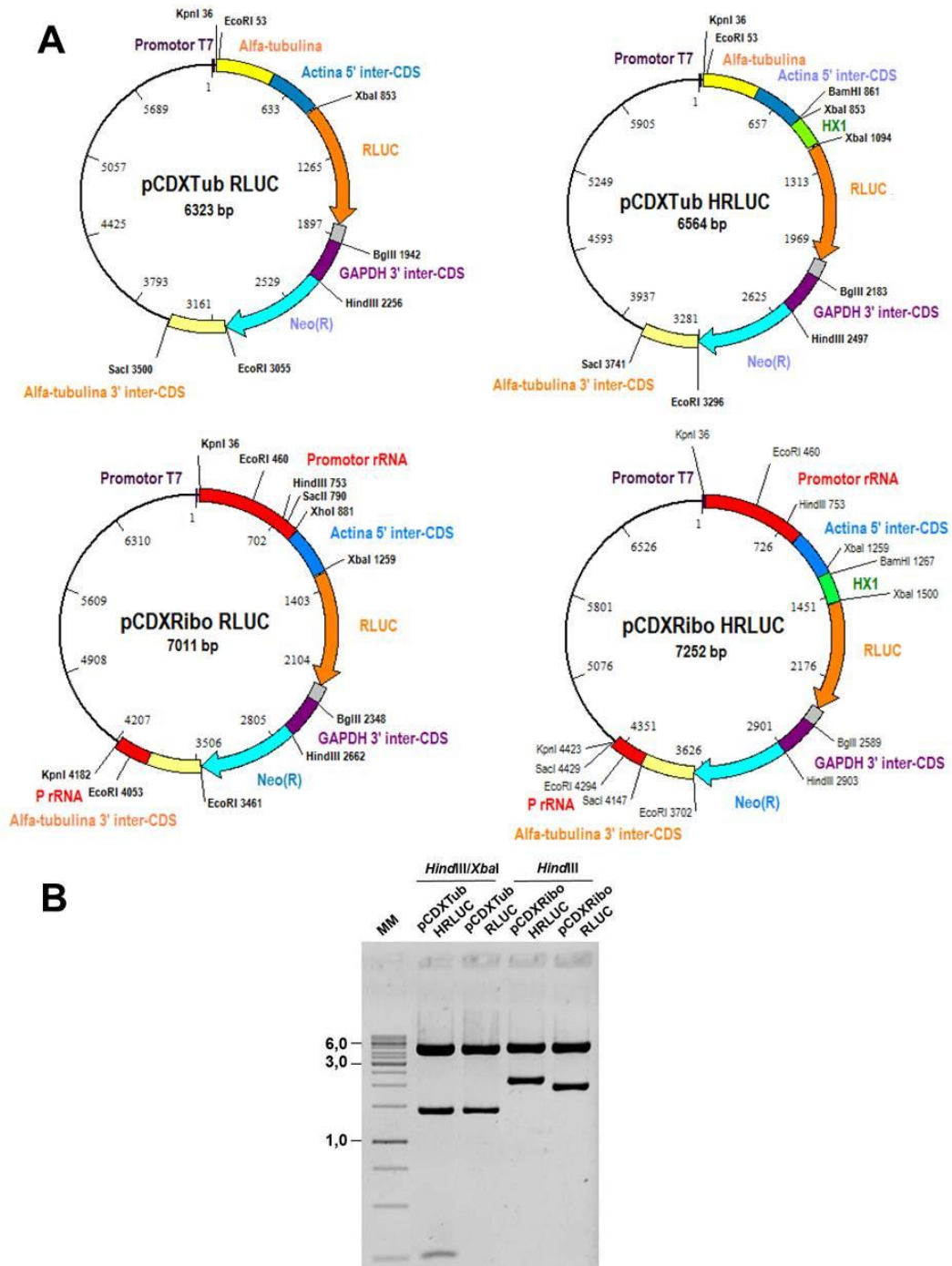


FIGURA 19 – VETORES pCDX COM GENE REPÓRTER RLuc.

NOTA: (A) Mapa dos vetores pCDX contendo RLuc. Os genes RLuc e RLuc contendo HX1 foram obtidos do vetor pROCK RR4 como descrito em Material e Métodos. A sequência em cinza a jusante do gene de RLuc corresponde a um *riboswitch* inativo. (B) Perfil de digestão dos vetores com as enzimas *HindIII/XbaI* (pCDXTub), *HindIII* (pCDXRibo) e revelado por eletroforese em gel de agarose 1%. MM = Marcador molecular 1kb DNA Ladder (Fermentas).

Os vetores de integração em  $\alpha$ -tubulina foram usados em transfecção estável, enquanto que os de integração no *locus* ribossomal, em transfecção transiente. Após uma única tentativa de transfecção, somente a população contendo pCDXTub HRLUC foi selecionada. A análise de luminescência da cultura de *A. deanei* carregando de forma estável não apresentou atividade de luciferase superior a população selvagem, gerando valores absolutos próximos de zero (Figura 20), contrariamente ao observado em culturas de *T. cruzi* expressando RLUC de forma estável. Em virtude do tempo, a presença da construção na transfecção estável não foi determinada nesse ensaio. Também é possível que a região regulatória de *T. cruzi* tenha afetado negativamente o processamento pela maquinaria de *A. deanei*. No caso da transfecção transiente com os vetores contendo a provável sequência do promotor ribossomal foram analisados 24 horas após a transfecção. A atividade de luciferase também foi próxima de zero (dados não mostrados).

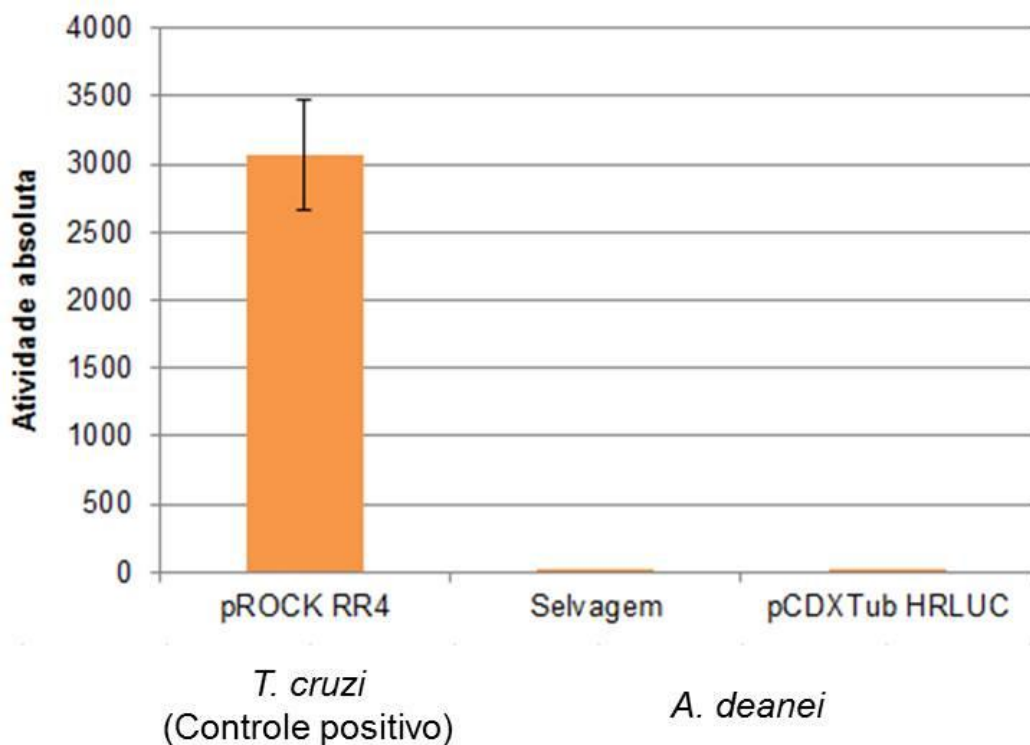


FIGURA 20 – ANÁLISE DA ATIVIDADE DE LUCIFERASE EM *A. deanei* CARREGANDO O VETOR pCDXTub HRLUC.

NOTA: A atividade é referente ao extrato total de  $2 \times 10^7$  células em fase exponencial de crescimento. Epimastigotas de *T. cruzi* contendo o vetor pROCK RR4 foram usadas como controle positivo. *A. deanei* selvagem foi usada como controle negativo. Os valores do eixo y estão em unidades de luminescência. Os dados representam os resultados de três experimentos independentes.



Mesmo substituindo o gene repórter, a expressão pelos vetores pCDX em *A. deanei* continuou baixa. Isso torna remota a possibilidade de toxicidade por GFP anteriormente levantada. Em dado momento, cogitamos que a baixa expressão fosse resultado da preferência por determinados códons durante a tradução, como já descrito para outros tripanossomatídeos (HORN, 2008). Pouca informação a respeito da preferência por códons em *A. deanei* está disponível. Aproximadamente 600 códons foram tabulados a partir de sequências do NCBI, segundo o sítio *Codon Usage Database* (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>) Pela baixa representatividade deste valor, não levamos a comprovação desta hipótese adiante. Mesmo assim, seria pouco provável que a preferência de códons seja a responsável pela expressão indetectável de dois genes repórteres de organismos diferentes.

Em vista do observado pela atividade de luciferase, voltamos a nos questionar sobre a eficácia das regiões intercodificadoras usadas nos vetores. Apesar de proveniente de genes *housekeeping* e da fidelidade de sua sequência ter sido confirmada, é provável que algum destes genes apresente baixa expressão devido a algum mecanismo regulatório. Situação semelhante foi descrita para  $\alpha$ - e  $\beta$ -tubulina de *T. cruzi*, na qual os transcritos destes genes são de 3 a 6 vezes menores em tripomastigotas e amastigotas, do que o observado em epimastigotas. O nível elevado de subunidades não polimerizadas  $\alpha$ - e  $\beta$ -tubulina seriam responsáveis pela autorregulação negativa dos transcritos de tubulina em tripomastigotas e amastigotas (BARTHOLOMEU *et al.*, 2002; DA SILVA; BARTHOLOMEU; TEIXEIRA, 2006). No caso da *A. deanei*, abordagens experimentais adicionais serão necessárias para confirmar alguma correlação. Uma alternativa seria trocar as regiões intercodificadoras por outras, como as dos genes PGKA e PGKB, usadas no vetor pNUS de *Leishmania* e *C. fasciculata* (TETAUD *et al.*, 2002).

Embora os vetores pCDX construídos neste estudo não realizem expressão proteica em níveis detectáveis, é possível que o vetor pCDXTub possa ser usado para estudar experimentalmente a via de RNAi em *A. deanei*. Como discutido na seção 6.1, é provável a existência de genes que participem desta via. O vetor de integração em tubulina permitiu a síntese do transcrito de Neo e GFP (Figura 17), por isso especula-se que esse vetor seja capaz de sintetizar dsRNA em níveis que possam ativar a maquinaria de RNAi, se existente.

## 7. CONCLUSÃO

As análises de bioinformática sugerem em *A. deanei* a existência do gene para a proteína Ago, a nuclease efetora da via de RNAi. Uma provável proteína PIWI também foi identificada. Esta proteína está presente em tripanossomatídeos com e sem RNAi funcional, sugerindo papel regulatório importante nesses organismos. Com base nos dados mostrados, propõem-se o estudo experimental da via de RNAi para a determinação de sua existência e níveis de atividade, além do estudo funcional da provável proteína PIWI.

O ensaio de eletroporação com FITC-dextrana 150 demonstram a permeabilização da membrana de *A. deanei* pelo protocolo testado, o de *T. cruzi*. No entanto, em comparação com este último, a quantidade de células fluorescentes foi 20 % menor. Este protocolo permitiu a transfecção e seleção dos vetores criados para *A. deanei*, mas otimizações ainda são necessárias para este organismo.

Os vetores construídos com sequências próprias de *A. deanei* são integrados no genoma deste protozoário, no entanto não são capazes de expressar os genes repórter testados em quantidades detectáveis pelas técnicas usadas. Modificações nas regiões intercodificadoras podem ser realizadas na tentativa de promover a expressão. Devido à capacidade de integração e transcrição, o vetor pCDXTub pode ser usado na identificação experimental da via de RNAi em *A. deanei* através da síntese de dsRNA endógeno.

## 8. PERSPECTIVAS

Os resultados deste estudo revelaram alguns aspectos moleculares sobre *Angomonas deanei*. Contudo, alguns ensaios precisam ser realizados para a solução de algumas questões: São eles:

- Teste experimental da maquinaria de RNAi através da transfecção com dsRNA exógeno e endógeno;
- Ensaios de *Northern blot* e *Western blot* para os genes de Dicer, Ago e PIWI de *A. deanei*;
- Otimização do protocolo de transfecção;
- Alteração das regiões inter-CDS dos vetores de expressão;
- Transfecção e análise da expressão destes vetores.

## 9. REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, P. R. *et al.* Development of a dual reporter system to identify regulatory *cis*-acting elements in untranslated regions of *Trypanosoma cruzi* mRNAs. **Parasitology International**, v. 60, n. 2, p. 161-69, Jun. 2011.
- ARAÚJO, P. R., TEIXEIRA, S. M. Regulatory elements involved in the post-transcriptional control of stage-specific gene expression in *Trypanosoma cruzi*: a review. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.106, n.3, p.257-66, May 2011.
- AZEVEDO-MARTINS, A. C. *et al.* Phosphatidylcholine synthesis in *Crithidia deanei*: the influence of the endosymbiont. **FEMS Microbiology Letters**, v. 275, p. 229-36, Oct. 2007.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v.116, p. 281–97, 2004.
- BARTHOLOMEU, D. C. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: RNA structure and post-transcriptional control of tubulin gene expression. **Experimental Parasitology**, v. 102, n. 3-4, p. 123-33, Nov./Dec. 2002.
- BATISTA, M. *et al.* A high-throughput cloning system for reverse genetics in *Trypanosoma cruzi*. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 259, p. 1-12, Oct. 2010.
- BELLOFATTO, V., CROSS, G. A. M. Expression of a bacterial gene in a Trypanosomatid protozoan. **Science**, v. 244, p. 1167-79, Jun. 1989.
- BENZ, C. *et al.* Messenger RNA processing sites in *Trypanosoma brucei*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 143, p. 125–34, 2005.
- BIEBINGER, S.; CLAYTON, C. A plasmid shuttle vector bearing an rRNA promoter is extrachromosomally maintained in *Crithidia fasciculata*. **Experimental Parasitology**, v. 83, p 252-58, 1996.
- BREITLING, R. *et al.* Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production. **Protein Expression and Purification**, v. 25; n. 2, p. 209-18, Jul. 2002.
- BUCKNER, F.S.; WILSON, A. J.; VAN VOORHIS, W.C. Detection of live *Trypanosoma cruzi* in tissues of infected mice by using histochemical strain for  $\beta$ -galactosidase. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 403-09. Jan. 1999.
- CAMBRI, Geison Eduardo. **Avaliação de mecanismos pós-traducionais na regulação da expressão heteróloga em tripanosomas**. 2011.104 f. Dissertação (Bioquímica e Biologia Molecular) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
- CAMPBELL, D. A.; THOMAS, S.; STURM, N. R. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? **Microbes and Infection**, vol. 5, no. 13, p. 1231–40, Nov. 2003.

CAMPOS, P. C. *et al.* Sequences involved in mRNA processing in *Trypanosoma cruzi*. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 1383–89, Oct. 2008.

CARTHEW; R.W; SONTHEIMER, E. J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**, v. 136, p. 642–55, Feb. 2009

CARVALHO, A. L.; DEANE, M. P. Trypanosomatidae isolated from *Zelus leucogrammus* (Perty, 1834) (Hemiptera, Reduviidae) with a discussion on flagellates of insectivorous bugs. **The Journal of Protozoology**, v. 21, n.1, p. 5-8, Feb. 1974.

CERUTTI, H., CASAS-MOLLANO, J. A. On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. **Current Genetics**, v. 50, n. 2, p. 81-99, May 2006.

CHALFIE, M. *et al.* Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, v. 263, p. 802-05, Feb. 1994.

CHANG, K. P.; CHANG, C. S.; SASSA, S. Heme biosynthesis in bacterium-protist symbioses: Enzymic defects in host hemoflagellates and complementary role of their intracellular symbionts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 72, n. 8, p. 2979-83, Aug. 1975.

CHUNG, C. T, NIEMELA, S. L, MILLER, R. H. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, p. 2172-75, Apr. 1989.

CHURCH, G.M.; GILBERT, W. Genomic sequencing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 7, p. 1991-95, Apr 1984.

CLAYTON, C.E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. **EMBO Journal**, v. 21, n.8, p.1881-88, Apr. 2002. .

COUGHLIN, B. C. *et al.* Amastin mRNA abundance in *Trypanosoma cruzi* is controlled by a 3'-untranslated region position-dependent *cis*-element and an untranslated region-binding protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 16, p. 12.051-60, Apr. 2000.

COUVILLION, M. T.; SACHIDANANDAM, R.; COLLINS, K. A growth-essential *Tetrahymena Piwi* protein carries tRNA fragment cargo. **Genes & Development**, v. 24, p. 2742–47, Dec. 2010.

CZECH, B.; HANNON, G. J. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, p. 19-31, Jan. 2011.

DA SILVA, R. A.; BARTHOLOMEU, D. C., TEIXEIRA, S. M. Control mechanisms of tubulin gene expression in *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Parasitology**, v. 36, n. 1, p. 87-96, Jan. 2006.

DaROCHA, W.D. *et al*, 2004a. Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. **Parasitology Research**, v. 92, n. 2, p.113-20, Jan. 2004.

DaROCHA, W.D. *et al*, 2004b. Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 133, n. 2, p.175-86, Feb. 2004.

DE ALMEIDA, P. E.; RAPPARD, J. R. R.; WU, J. C. In vivo bioluminescence for tracking cell fate and function. **American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology**, n. 301, p.663–71, Jun. 2011.

DE GAUDENZI; J. G.; D'ORSO, I.; FRASCH, A. C. C. RNA recognition motif-type RNA-binding proteins in *Trypanosoma cruzi* form a family involved in the interaction with specific transcripts *in vivo*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 21, p. 18.884-94, May 2003.

DE SOUZA, S. F. *et al*. Knockout of the gene encoding the kinetoplast-associated protein 3 (KAP3) in *Trypanosoma cruzi*: effect on kinetoplast organization, cell proliferation and differentiation. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 172, p. 90-98, Apr. 2010.

DI NOIA, J. M. *et al*. AU-rich elements in the 3'-untranslated region of a new mucin-type gene family of *Trypanosoma cruzi* confers mRNA instability and modulates translation efficiency. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 14, p. 10218-27, Apr. 2000.

DONELSON, J. E.; GARDNER, M. J.; EL-SAYED, N. M. More surprises from Kinetoplastida. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 2579–81, Mar. 1999.

DU, Y.;McLAUGHLIN, G; CHANG, K. 16S Ribosomal DNA sequence identities of 1-proteobacterial endosymbionts in three *Crithidia* species. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 10, p. 3081-84, May 1994.

EEKELS, J. J. M.; BERKHOUT, B. Toward a durable treatment of HIV-1 infection using RNA interference. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 102, p. 141-63, Aug. 2011.

EKANAYAKE, D. K. *et al*. Epigenetic regulation of transcription and virulence in *Trypanosoma cruzi* by O-linked thymine glucosylation of DNA. **Molecular and Cellular Biology**, v. 31, n. 8, p. 1690 – 1700, Apr. 2011.

ELIAS, M. C.; FARIA, M. Are there epigenetic controls in *Trypanosoma cruzi*? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1178, p. 285 – 90, Oct. 2009.

EL-SAYED, N. M. *et al*. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v. 309, n 5733, p. 409–15, Jul. 2005.

FAEHNLE, C. R.; JOSHUA-TOR, L. Argonautes confront new small RNAs. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, n. 5, p.569–77, Oct. 2007.

FIRE, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, p. 806-11, Feb. 1998.

GADELHA, C. *et al.* Cryptic paraflagellar rod in endosymbiont-containing Kinetoplastid Protozoa. **Eukaryotic Cell**, v.4, n.3, p. 516–25, Mar. 2005.

GARCIA-SILVA, M. R. *et al.* Cloning, characterization and subcellular localization of a *Trypanosoma cruzi* argonaute protein defining a new subfamily distinctive of trypanosomatids. **Gene**, v. 466, p. 26-35, Oct. 2010.

GOLDEN; D.E.; GERBASI; V.R.; SONTHEIMER, E.J. An inside job for siRNAs. **Molecular Cell**, v. 31, p. 309–12, Aug. 2008.

GRAZIADEI, L.; BURFEIND, P.; BAR-SAGI, D. Introduction of unlabeled proteins into living cells by electroporation and isolation of viable protein-located cells using dextran-fluorescein isothiocyanate as a marker for protein uptake. **Analytical Biochemistry**, v. 194, p. 198-203, Apr. 1991.

GREGORY, R.I. *et al.* Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. **Cell**, v.123, p. 631–640, Nov. 2005.

GUEVARA. Expression of fluorescent genes in *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): Its application to a parasite-vector biology. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n.1, Jan. 2005.

HANNON, G. RNA interference. **Nature**, v. 418, p. 244-51, Jul. 2002.

HARTL, F. U.; BRACHER, A.; HAYER-HARTL, M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. **Nature**, v. 475, n. 7356, p 324-32, Jul. 2011.

HARTLEY. J.L., TEMPLE, G.F., BRASCH, M.A. DNA cloning using *in vitro* site-specific recombination. **Genome Research**, v. 10, n. 11, p. 1788-95, Nov. 2000.

HORN, D. Codon usage suggests that translational selection has a major impact on protein expression in trypanosomatids. **BMC Genomics**, v. 9, n. 2, p 1-11, Jan. 2008.

INOUE, N. *et al.* Tetracycline-regulated RNA interference in *Trypanosoma congolense*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.120, p. 309–313, 2002.

IVENS, A.C. *et al.* The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**, v. 309, p. 436 – 442, Jul. 2005.

KELLY, J. M., *et al.* A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. **Nucleic Acids Research**, v. 20, n. 15, p. 3963-9, Aug. 1992.

KETTING, R. F. The many faces of RNAi. **Developmental Cell**, v. 20, n. 2, p. 148-61, Feb. 2011.

KIM, V. N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 6, p. 376–85, 2005.

KIM, K.; LEE, Y. S.; CARTHEW, R.W. Conversion of pre-RISC to holo-RISC by Ago2 during assembly of RNAi complexes. **RNA**, v. 13, p. 22–29, Jan. 2007.

KOLEV, N. G.; TSCHUDI, C.; ULLU, E. RNA interference in protozoan parasites: achievements and challenges. **Eukariotic Cell**, v. 10, n. 9, p. 1156-63, Sep. 2011.

KUSHNIR, S. *et al.* Development of an inducible protein expression system based on the protozoan host *Leishmania tarentolae*. **Protein Expression & Purification**, v. 42, n. 1, p. 37-46, Jul. 2005.

LABAN, A.; WIRTH, D.F. Transfection of *Leishmania enriettii* and expression of chloramphenicol acetyltransferase gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 23, p. 9119-23, Dec. 1989.

LaCOUNT, D. J. *et al.* Double-stranded RNA interference in *Trypanosoma brucei* using head-to-head promoters. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 111, p. 67–76, Nov. 2000.

LANDFEAR, S. M.; IGNATUSHCHENKO, M. The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 115, p. 1–17, Jun. 2001.

LeBOWITZ, J. H. Coupling of poly(A) site selection and *trans*-splicing in *Leishmania*. **Genes & Development**, v. 7, n. 6, p. 996-1007, Jun. 1993.

LETUNIC, I.; DOERKS, D.; BORK, P. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. D302-D305, Jan. 2012.

LIPPMAN, Z.; MARTIENSSEN, R. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. **Nature**, n. 431, p.364–70, 2004.

LIU, H. S. *et al.* Is Green Fluorescent Protein toxic to the living cells? **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 260, p.712–17, 1999.

LIU, Q.; PAROO, Z. Biochemical principles of small RNA pathways. **Annual Review of Biochemistry**, v. 79, p. 295–319, 2010.

LOPES, A. H. *et al.* Trypanosomatids: Odd organisms, devastating diseases. **The Open Parasitology Journal**, v. 4, p. 30-59, 2010.

LORENZ, W. W. *et al.* Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p. 4438-42, May. 1991.



- LOYTYNOJA, A., GOLDMAN, N. Phylogeny-aware gap placement prevents errors in sequence alignment and evolutionary analysis. **Science**, v. 320, p. 1632–1635, Jun. 2008.
- LU, H. Y. , BUCK, G. A. Expression of an exogenous gene in *Trypanosoma cruzi* epimastigotas. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 44, n. 1, p. 109-114. Jan. 1991.
- LYE, L.F. *et al.* Retention and loss of RNA interference pathways in Trypanosomatid protozoans. **PLoS Pathogenes**, v. 6, n. 10, p. 1-13, Oct. 2010.
- MAIR, G. *et al.* A new twist in trypanosome RNA metabolism: *cis*-splicing of pre-mRNA. **RNA**, v. 6, p. 163-69, Feb. 2000.
- MAKAROVA, K. S. *et al.* Prokaryotic homologs of Argonaute proteins are predicted to function as key components of a novel system of defense against mobile genetic elements. **Biology Direct**, v. 4, n. 29, p. 1-15, Aug. 2009.
- MALLICK, B.; GHOSH, Z.; CHAKRABARTI, J. MicroRNA switches in *Trypanosoma brucei*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 372, p. 459–63, Aug. 2008.
- MARMUR, J. *et al.* Deoxyribonucleic acid type attributable to a bacteria endosymbiont in the protozoon *Crithidia (Strigomonas) oncopelti*. **Nature**, v. 197, p. 1228-29, Mar. 1963.
- MARTÍNEZ-CALVILLO, S. *et al.* Gene expression in Trypanosomatid parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Feb. 2010. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/jbb/2010/525241/>>. Acesso em: 08/08/2010.
- MARTÍNEZ-CALVILLO, S.; LÓPEZ, I.; HERNÁNDEZ, R. pRIBOTEX expression vector: a pTEX derivative for rapid selection of *Trypanosoma cruzi* transfectants. **Gene**, v. 199, n. 1-2, p. 71-76, Oct. 1997.
- MATRANGA, C. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. **Cell**, v. 123, p. 607–620, 2005.
- MELLO, C.C.; CONTE, D. Revealing the world of RNA interference. **Nature**, v. 431, p. 338–42, Sep. 2004.
- MISTELI, T.; SPECTOR. D. L. Applications of the green fluorescent protein in Cell Biology and Biotechnology. **Nature Biotechnology**, v. 15, p. 961-64, Oct. 1997.
- MIZUNO, H, *et al.* Red fluorescent protein from *Discosoma* as a fusion tag and a partner for fluorescence resonance energy transfer. **Biochemistry**, v. 40, n. 8, p.2502-10, Feb. 2001.
- MOREIRA, D, LÓPEZ-GARCÍA, P; VICKERMAN, K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new

classification of the class Kinetoplastea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p.1861-75, Sep. 2004.

MOTTA, M. C. M. Endosymbiosis in Trypanosomatids as a model to study cell evolution. **The Open Parasitology Journal**, v. 4, p. 139-47, 2010.

MOTTA, M. C. M., *et al.* The bacterium endosymbiont of *Crithidia deanei* undergoes coordinated division with the host cell nucleus. **PLoS One**, v. 5, n. 8, p. 1-9, Aug. 2010.

MOTTA, M. C. M., *et al.* Ultrastructural and biochemical analysis of the relationship of *Crithidia deanei* with its endosymbiont. **European Journal of Cell Biology**, v. 72, p. 370-7, Apr. 1997.

MUNDIM, M. H. *et al.* Simple nutrition of *Crithidia deanei*, a Reduviid Trypanosomatid with an endosymbiont. **The Journal of Protozoology**, v. 21, n. 4, p. 518-21, Oct. 1974.

MYLER, P. F. *et al.* *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96., n. 6, p. 2902-06. Mar. 1999.

NEWTON, B. A.; HORNE, R. W. Intracellular structures in *Strigomonas oncopelti*: 1 cytoplasmatic structures ribonucleoprotein. **Experimental Cell Research**, v.13, n. 5, p. 563-74, Dec. 1957.

NGÔ *et al.* Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.95; p. 14687-93, Dec. 1998.

OW, D. W. *et al.* Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. **Science**, v. 234, p. 856-59, Nov. 1986.

PADILLA-MEJÍA, L. E. *et al.* Gene organization and sequence analyses of transfer RNA genes in trypanosomatid parasites. **BMC Genomics**, v. 10, n. 232, p. 1-18, May 2009.

PARKER, J. S.; ROE, S. M.; BARFORD, D. Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain–siRNA guide complex. **Nature**, v. 434, p. 663-66, Mar. 2005.

PATRICK, K. L. *et al.*, Distinct and overlapping roles for two Dicer-like proteins in the RNA interference pathways of the ancient eukaryote *Trypanosoma brucei*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 42, p. 17933-38, Oct. 2009.

PECOT, C. V. *et al.* RNA interference in the clinic: challenges and future directions. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, p. 59-67, Jan. 2011.

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

QUIJADA, L. Expression of the human RNA-binding protein HuR in *Trypanosoma brucei* increases the abundance of mRNAs containing AU-rich regulatory elements. **Nucleic Acids Research**. v. 30, n. 20, p. 4.414-24. Oct. 2002.

RAMIREZ, I. M. *et al.* The use of the green fluorescent protein to monitor and improve transfection in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 11, n. 1, p. 235-40, Nov. 2000.

RINGPIS, G. E.; LATHROP, R. H.; APHASIZHEV, R. iCODA: RNAi-based inducible knock-in system in *Trypanosoma brucei*. **Methods in Molecular Biology**, v.718, p. 23-37, 2011.

RIVAS *et al.* Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 12, n. 4, p. 340-49, Apr. 2005.

ROBINSON, K. A.; BEVERLEY, S. M. Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 128, n. 2, p. 217-28, May 2003.

ROITMAN, C.; ROITMAN, I.; DE AZEVEDO, H. P. Growth of an insect Trypanosomatid at 37°C in a defined medium. **The Journal of Protozoology**, v.19, n. 2, p. 346-349, May 1972.

ROJAS *et al.*, 2008. L-Proline uptake in *Crithidia deanei* is influenced by its endosymbiont bacterium. **FEMS Microbiology Letters** , v. 283, p. 15–22, Jun. 2008.

SALZMAN, T. A. *et al.* Heme synthesis in *Crithidia deanei*: influence of the endosymbionte. **The International Journal of Biochemistry**, v. 17, n. 12, p. 1343-47, 1985.

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

SHI, H.; ULLU, E.; TSCHUDI, C. Function of the Trypanosome Argonaute 1 Protein in RNA interference requires the N-terminal RGG domain and Arginine 735 in the Piwi domain. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 48, p. 49.889–93, Nov. 2004.

SHI, H. *et al.* Argonaute Protein in the early divergent eukaryote *Trypanosoma brucei*: control of small interfering RNA accumulation and retroposon transcript abundance. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, p. 420–27, n. 1, Jan. 2004.

SHI, H. *et al.* RNA Interference in *Trypanosoma brucei*: Role of the N-terminal RGG-domain and the polyribosomo association of argonaute. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 52, p. 36.511–20, Dec. 2009.

SIMPSON, A. G. B.; STEVENS, J. S.; LUKES, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **TRENDS in Parasitology**, v.22, n.4, p. 168-74, Apr. 2006.

SONG, J. J. *et al.* Crystal structure of Argonaute and Its implications for RISC slicer activity. **Science**, v. 305, n. 5689, p. 1434-7, Sep. 2004.

SVOBODOVÁ, M. *et al.* *Sergeia podlipaevi* gen. nov., sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 423-32, Feb. 2007.

TAN, T. H. P. *et al.* tRNAs in *Trypanosoma brucei*: genomic organization, expression, and mitochondrial import. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 11, p. 3707–17, Jun. 2002.

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

TEIXEIRA, M. M. G. *et al.* Phylogenetic validation of the genera *Angomonas* and *Strigomonas* of Trypanosomatids harboring bacterial endosymbionts with the description of new species of Trypanosomatids and of Proteobacterial symbionts. **Protist**, v. 162, n. 3, p. 503-24, Mar. 2011.

TEIXEIRA, S. M. Control of gene expression in Trypanosomatidae. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 1503-16, Dec. 1998.

TEIXEIRA, S. M. *et al.* A differentially expressed gene family encoding “amastin”, a surface protein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 32, p. 20509-16, Aug. 1994.

TEIXEIRA, S. M. *et al.* Trypanosomatid comparative genomics: Contributions to the study of parasite biology and different parasitic diseases. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 1, p. 1-17, Jan. 2012.

TEIXEIRA, S. M.; DaROCHA, W.D. Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. **Genetics and Molecular Research**. v. 2, n. 1, p.148-58, Mar. 2003.

TETAUD, E. *et al.* A new expression vector for *Crithidia fasciculata* and *Leishmania*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 120, n. 2, p. 195-204, Apr. 2002.

THEOBALD, D. L.; MITTON-FRY, R. M.; WUTTKE, D. S. Nucleic acid recognition by OB-fold proteins. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 32, p. 115-33, Jun. 2003.

TOLIA, H. N.; JOSHUA-TOR, L. Slicer and the Argonautes. **Nature Chemical Biology**, v. 3, n. 1, p. 36-43, Jan. 2007.

TOMARI, Y.; ZAMORE, P.D. Perspective: machines for RNAi. **Genes & Development**, v. 19, p. 517–529, Mar. 2005.

ULIANA, S. R. B.; FISCHER, W.; STEMPLIUK, V. A.; FLOETER-WINTER, L. M. Structural and functional characterization of the *Leishmania amazonensis* rRNA promoter. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 76, p. 245-55, 1996.

ULLU, E. *et al.* RNA interference: advances and questions. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 357, p. 65–70, Jan. 2002.

ULLU, E.; MATTHEWS, K. R.; TSCHUDI, C. Temporal order of RNA-processing reactions in Trypanosomes: rapid *trans* splicing precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts. **Molecular and Cellular Biology**, v. 13, n. 1, p. 720-25., Jan. 1993.

ULLU, E.; TSCHUDI, C.; CHAKRABORTY, T. RNA interference in protozoan parasites. **Cellular Microbiology**, v. 6, n.6, p. 509–19, 2004.

VAZQUEZ, M.P.; LEVIN, M.J. Functional analysis of the regions of TcP2 $\beta$  gene *loci* allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. **Gene**, v. 239, p. 217-25, Nov. 1999.

WANG, Z. *et al.* Inhibition of *Trypanosoma brucei* gene expression by RNA. Interference using an integratable vector with opposing T7 promoters. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 40, p. 174–84, Dec. 2000.

WET, J. R. *et al.* Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, p. 7.870-73, Dec. 1985.

WIRTZ, E. *et al.* A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 99, p. 89–101, Mar. 1999.

YAO, C. *et al.* *Leishmania chagasi*: A tetracycline-inducible cell line driven by T7 RNA polymerase. **Experimental Parasitology**, v. 116, p. 205-213, Jul. 2007.

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n.1, p. 87-111, Mar. 2006.

**APÊNDICES**

APÊNDICE 1 – VETORES pCDX SEQUENCIADOS.....	102
APÊNDICE 2 – SEQUENCIAMENTO DE GFP.....	107

APÊNDICE 1 – VETORES pCDX SEQUENCIADOS (continua)

NOTA: PROMOTOR rRNA O clone sequenciado foi pCDXRibo. Os alinhamentos foram agrupados por região do vetor. A região em negro corresponde ao promotor de rRNA. Gaps são mostrados em cinza. As regiões não destacadas fazem parte de regiões a monte e a do promotor de rRNA.

Template GGTACCGTTTTGGTCTCTGGGCTGGTTGGGGCGGATTTGCGCCTCGGGGTGTGGGAGG 60
pCDXRibo-T7 --AGTGGTGCTCGGTCCTCTGGGCTGGTTGGGGCGGATTTGCGCCTCGGGGTGTGGGAGG 58
pCDXRibo-PRNA\_7 -----TCTGGG-----GGCGGATTG---CCCTCGGGGTGTGGGAGG 33
pCDXRibo-PRNA\_8inv GGTACCGTTTTGGTCTCTGGGCTGGTTGGGGCGGATTTGCGCCTCGGGGTGTGGGAGG 60

Template GGGGCGCGGCCGGTTTGACCGTGAAAAGTAATTTTTT--GATAAACAGATGTGGGGCAATT 118
pCDXRibo-T7 GGGGCGCGGCCGGTTTGACCGTGAAAAGTAATTTTTTTGATAAACAGATGTGGGGCAATT 118
pCDXRibo-PRNA\_7 GGGGCGCGGCCGGTTTGACCGTGAAAAGTAATTTTTTTGATAAACAGATGTGGGGCAATT 93
pCDXRibo-PRNA\_8inv GGGGCGCGGCCGGTTTGACCGTGAAAAGTAATTTTTTTGATAAACAGATGTGGGGCAATT 120

Template GGTAAAAACAGTGTTATACATACGTTACAGTAGCGTGTTTTTCATTTTGAGCATCAGAT 178
pCDXRibo-T7 GGTAAAAACAGTGTTATACATACGTTACAGTAGCGTGTTTTTCGTTTGTAGCATCAGAT 178
pCDXRibo-PRNA\_7 GGTAAAAACAGTGTTATACATACGTTACAGTAGCGTGTTTTTCCTTTTGAGCATCAGAT 153
pCDXRibo-PRNA\_8inv GGTAAAAACAGTGTTATACATACGTTACAGTAGCGTGTTTTTCGTTTGTAGCATCAGAT 180

Template GACCGTTTTTTAGGGGTTGACTTTTTTCTTGACATGGCCGTTTCCCTTTTTCCGGG 234
pCDXRibo-T7 GACCGTTTTTTAGGGGTTGACTTTTTTCTTGACATGGCCGTTTCCCTTTTTCCGGG 238
pCDXRibo-PRNA\_7 GACCGTTTTTTAGGGGTTGACTTTTTTCTTGACATGGCCGTTTCCCTTTTTCCGGG 213
pCDXRibo-PRNA\_8inv GACCGTTTTTTAGGGGTTGACTTTTTTCTTGACATGGCCGTTTCCCTTTTTCCGGG 240

Template GG--CCCATGGGGGGAGGGCCAAAAACCCCTCGCCGAGGGACAGAGCGATTCCAGTG 292
pCDXRibo-T7 GGGCCCATGGGGGGAGGGCCAAAAACCCCTCGCCGAGGGACAGAGCGATTCCAGTG 298
pCDXRibo-PRNA\_7 GGGCCCATGGGGGGAGGGCCAAAAACCCCTCGCCGAGGGACAGAGCGATTCCAGTG 273
pCDXRibo-PRNA\_8inv GGGCCCATGGGGGGAGGGCCAAAAACCCCTCGCCGAGGGACAGAGCGATTCCAGTG 300

Template TAATAATTGCTAGGGCGGGGGCTTCGAAGAAATCCTCTGCAGAGGGGTCAGGGGTGACGA 352
pCDXRibo-T7 TAATAATTGCTAGGGCGGGGGCTTCGAAGAAATCCTCTGCAGAGGGGTCAGGGGTGACGA 358
pCDXRibo-PRNA\_7 TAATAATTGCTAGGGCGGGGGCTTCGAAGAAATCCTCTGCAGAGGGGTCAGGGGTGACGA 333
pCDXRibo-PRNA\_8inv TAATAATTGCTAGGGCGGGGGCTTCGAAGAAATCCTCTGCAGAGGGGTCAGGGGTGACGA 360

Template AAAGCCTATTTCTTACCCGGGCTGCACAAAATATCTGGCGCAATCGTGTTTTGTGAGAAA 412
pCDXRibo-T7 AAAGCCTATTTCTTACCCGGGCTGCACAAAATATCTGGCGCAATCGTGTTTTGTGAGAAA 418
pCDXRibo-PRNA\_7 AAAGCCTATTTCTTACCCGGGCTGCACAAAATATCTGGCGCAATCGTGTTTTGTGAGAAA 393
pCDXRibo-PRNA\_8inv AAAGCCTATTTCTTACCCGGGCTGCACAAAATATCTGGCGCAATCGTGTTTTGTGAGAAA 420

Template AGGGGAAAACAGGAAGGAATTCTGCGACTACGCTTTTCCGCCACACTTCTTTGTTGTGG 472
pCDXRibo-T7 AGGGGAAAACAGGAAGGAATTCTGCGACTACGCTTTTCCGCCACACTTCTTTGTTGTGG 478
pCDXRibo-PRNA\_7 AGGGGAAAACAGGAAGGAATTCTGCGACTACGCTTTTCCGCCACACTTCTTTGTTGTGG 453
pCDXRibo-PRNA\_8inv AGGGGAAAACAGGAAGGAATTCTGCGACTACGCTTTTCCGCCACACTTCTTTGTTGTGG 480

Template CGCGTCTTTCACCGGATGCGTGCGAATTTTCAGAAGGGGAGTCGAAACGCCGTGCGGAT 532
pCDXRibo-T7 CGCGTCTTTCACCGGATGCGTGCGAATTTTCAGAAGGGGAGTCGAAACGCCGTGCGGAT 538
pCDXRibo-PRNA\_7 CGCGTCTTTCACCGGATGCGTGCGAATTTTCAGAAGGGGAGTCGAAACGCCGTGCGGAT 513
pCDXRibo-PRNA\_8inv CGCGTCTTTCACCGGATGCGTGCGAATTTTCAGAAGGGGAGTCGAAACGCCGTGCGGAT 540

Template GCCGAGTTTGTGCGAATCAAACCAAAGGCAACGAAGCACGGCGACAAGACGAAACCACC 592
pCDXRibo-T7 GCCGAGTTTGTGCGAATCAAACCAAAGGCAACGAAGCACGGCGACAAGACGAAACCACC 598
pCDXRibo-PRNA\_7 GCCGAGTTTGTGCGAATCAAACCAAAGGCAACGAAGCACGGCGACAAGACGAAACCACC 573
pCDXRibo-PRNA\_8inv GCCGAGTTTGTGCGAATCAAACCAAAGGCAACGAAGCACGGCGACAAGACGAAACCACC 600

Template CACATCACATGAGAGTGTGCGTCTTTACTGACGCCACCACTGACCAGTCTCTATTTCATT 652
pCDXRibo-T7 CACATCACATGAGAGTGTGCGTCTTTACTGACGCCACCACTGACCAGTCTCTATTTCATT 658
pCDXRibo-PRNA\_7 CACATCACATGAGAGTGTGCGTCTTTACTGACGCCACCACTGACCAGTCTCTATTTCATT 633
pCDXRibo-PRNA\_8inv CACATCACATGAGAGTGTGCGTCTTTACTGACGCCACCACTGACCAGTCTCTATTTCATT 660

APÊNDICE 1 – VETORES pCDX SEQUENCIADOS (conclusão)

NOTA: PROMOTOR rRNA. O clone sequenciado foi pCDXRibo. Os alinhamentos foram agrupados por região do vetor. A região em negro corresponde ao promotor de rRNA. Gaps são mostrados em cinza. As regiões não destacadas fazem parte de regiões a monte e a do promotor de rRNA.

```

Template      CCACCCAGCTATGCTGCTCCCAGCGTTGGACGGCGTGTGCGTTCCCTGCTCGCTTCACTG 712
pCDXRibo-T7  CCACCCAGCTATGCTGCTCCCAGCGTTGGACGGCGTGTGCGTTCCCTGCTCGCTTCACTG 718
pCDXRibo-PRNA_7  CCACCCAGCTATGCTGCTCCCAGCGTTGGACGGCGTGTGCGTTCCCTGCTCGCTTCACTG 693
pCDXRibo-PRNA_8inv  CCACCCAGCTATGCTGCTCCCAGCGTTGGACGGCGTGTGCGTTCCCTGCTCGCTTCACTG 720
*****

Template      CGTTCGGGGAAGCTTCTGCCCGTGTCTGCCTGCGTCCGCTTACCAGCGGCGCTTGTGTTGAC 772
pCDXRibo-T7  CGTTCGGGGAAGCTTCTGCCCGTGTCTGCCTGCGTCCGCTTACCAGCGGCGCGCCGCCGAC 778
pCDXRibo-PRNA_7  CGTTCGGGGAAGCTTCTGCCCGTGTCTGCCTGCGTCCGCTTACCAGCGGCGCGCCGCCGAC 753
pCDXRibo-PRNA_8inv  CGTTCGGGGAAGCTTCTGCCCGTGTCTGCCTGCGTCCGCTTACCAGCGGCGCGCCGCCGAC 780
*****

Template      GTCGGAA--CGATGCTACCACAAGCACCCCTCGATGCGAACGACGCGCTTGGCGGTGTGAAA 831
pCDXRibo-T7  GTCGGAAACGATGCTACCACAAGCACCCCTCAATGCGAACGACGCGCTTGGCGGTGTGAAA 838
pCDXRibo-PRNA_7  GTCGGAA--CGATGCTACCACAAGCACCCCTCAATGCGAACGACGCGCTTGGCGGTGTGAAA 812
pCDXRibo-PRNA_8inv  GTCGGAA--CGATGCTACCACAAGCACCCCTCAATGCGAACGACGCGCTTGGCGGTGTGAAA 829
*****

Template      CGACGAC--CTCGAG 844
pCDXRibo-T7  CGACGACGGCTCGAG 853
pCDXRibo-PRNA_7  CGACGACGGCTCGAG 827
pCDXRibo-PRNA_8inv  -----

```

APÊNDICE 1 – VETORES pCDX SEQUENCIADOS

NOTA: TUBULINA O clone sequenciados foi pCDXTub. O alinhamento foi agrupado por região do vetor. A região em negro corresponde ao gene de tubulina. Gaps são mostrados em cinza. As regiões não destacadas fazem parte de regiões a monte e a jusante do gene de tubulina.

```

Tub_Teo      ATTAACCCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGGTACCCCTCGACATCACTAGTGAATTCGCG 60
Tub_dsTUB    -----

Tub_Teo      GCCGCCTGCAGTACGATTTGACTCGACGAGCCTCGACATTGAGGCGCCCAACGTACACCA 120
Tub_dsTUB    -----GCGATG-----GACGCA-----CGTACACCA 21
*****

Tub_Teo      ACGTGAACCGTCTCTGCGCGCAGGTGGTGTCCGCGCTCACGGCGTCTCTCGCTTCGATG 180
Tub_dsTUB    ACGTGAACCGTCTCTGCGCGCAGGTGGTGTCCGCGCTCACGGCGTCTCTCGCTTCGATG 81
*****

Tub_Teo      GTGCCCTCAACGTTGATCTGACCGAGTTCAGACCAACCTCGTGCCTACCCCGTATCC 240
Tub_dsTUB    GTGCCCTCAACGTTGATCTGACCGAGTTCAGACCAACCTCGTGCCTACCCCGTATCC 141
*****

Tub_Teo      ACTTCGTGCTCACCTCCTACGCCCGTCACTCTCCGCGGAGAAGGCTACCACGAACAGC 300
Tub_dsTUB    ACTTCGTGCTCACCTCCTACGCCCGTCACTCTCCGCGGAGAAGGCTACCACGAACAGC 201
*****

Tub_Teo      TCTCGTCTCCGAGATCACCACCTCGTCTTCGAGCCCGTGGCATGCTCACCAGTGCG 360
Tub_dsTUB    TCTCGTCTCCGAGATCACCACCTCGTCTTCGAGCCCGTGGCATGCTCACCAGTGCG 261
*****

Tub_Teo      ACCTCGCCACGGTAAGTACATGTCTTGCTGCCTCATGTACCGCGGTGATGTCGTCGCCA 420
Tub_dsTUB    ACCTCGCCACGGTAAGTACATGTCTTGCTGCCTCATGTACCGCGGTGATGTCGTCGCCA 321
*****

Tub_Teo      AGGACGTCAACGCCGCCATCGCCACCATCAAGACGAAGCGCACCATCCAGTTCGTCCGAG 479
Tub_dsTUB    AGGACGTCAACGCCGCCATCGCCACCATCAAGACGAAGCGCACCATCCAGTTCGTCCGAG 381
*****

```



APÊNDICE 1 – VETORES pCDX SEQUENCIADOS (continua)

NOTA: ACTINA 5' inter-CDS Os clones sequenciados foram pCDXTub e pCDXRibo. Os alinhamentos foram agrupados por região do vetor. A região em negro corresponde à actina 5' inter-CDS. Gaps são mostrados em cinza. As regiões não destacadas fazem parte de regiões a monte e a jusante de actina 5' inter-CDS

ACT\_Teo CTCGAGTTACCGTCGGTGTCTGTCGTGAATGGCATCAATGGATGAGTGTACGATTGTTA 60
pCDXRiboGFP\_ActF -----TCG-----ACGATTGTTA 13
pCDXRibo-T7promoter CTCGAGTTACCGTCGGTGTCTGTCGTGAATGGCATCAATGGATGAGTGTACGATTGTTA 60
pCDXRibo-PRNA\_7 CTCGAGTTACCGTCGGTGTCTGTCGTGAATGGCATCAATGGATGAGTGTACGATTGTTA 60
\*\*\* \*\*\*\*\*

ACT\_Teo TTATTATTGCAGCGTAAGCATGCAGTCTTTTTATTATTATTATTATTATTTTCAACTCC 120
pCDXRiboGFP\_ActF TTATTATTGCAGCGTAAGCATGCAGTCTTTTTATTATTATTATTATTATTTTCAACTCC 73
pCDXRibo-T7promoter TTATTATTGCAGCGTAAGCATGCAGTCTTTTTATTATTATTATTATTATTTTCAACTCC 120
pCDXRibo-PRNA\_7 TTATTATTGCAGCGTAAGCATGCAGTCTTTTTATTATTATTATTATTATTTTCAACTCC 120
\*\*\*\*\*

ACT\_Teo GCTGCTTCTCCTTGTGAAGCGTTTGTAAATTACAAAGAAAAATCTTTATTTAGTATGTTG 180
pCDXRiboGFP\_ActF GCTGCTTCTCCTTGTGAAGCGTTTGTAAATTACAAAGAAAAATCTTTATTTAGTATGTTG 133
pCDXRibo-T7promoter GCTGCTTCTCCTTGTGAAGCGTTTGTAAATTACAAAGAAAAATCTTTATTTAGTATGTTG 180
pCDXRibo-PRNA\_7 GCTGCTTCTCCTTGTGAAGCGTTTGTAAATTACAAAGAAAAATCTTTATTTAGTATGTTG 179
\*\*\*\*\*

ACT\_Teo CGTATTGCTTTATTCGACAGATCATTTTATTTTGCTGTTTGCTTCGTGTCTTACCCCA 239
pCDXRiboGFP\_ActF CGTATTGCTTTATTCGACAGATCATTTTATTTTGCTGTTTGCTTCGTGTCTTACCCCA 192
pCDXRibo-T7promoter CGTATTGCTTTATTCGACAGATCATTTTATTTTGCTGTTTGCTTCGTGTCTTACCCCA 240
pCDXRibo-PRNA\_7 CGTATTGCTTTATTCGACAGATCATTTTATTTTGCTGTTTGCTTCGTGTCTTACCCCA 235
\*\*\*\*\*

ACT\_Teo TCTCACTCCCCTCTCCG-CCACCCA-TTCTTTTTAAGTTATCAAATCGCTTTTTTTTTTC 297
pCDXRiboGFP\_ActF TCTCACTCCCCTCTCCG-CCACCCA-TTCTTTTTAAGTTATCAAATCKYTTTTTTTTTC 250
pCDXRibo-T7promoter TCTCACTCCCCTCTCCGGCCACCCAA-TTCTTTTTAAGTTATCAA-TCGCTTTTTTTTTT 299
pCDXRibo-PRNA\_7 TCTCACTCCCCTCTCCG-CCACTCA-TTCTTTTTAAGTAATCAA-TCGCTTTTTTTTT-- 289
\*\*\*\*\*

ACT\_Teo CT-TGAACGTA C TACTTCTTTTC--GACTAAGCTA--CCATGT-CTGAA-GAATCC-ACC-- 347
pCDXRiboGFP\_ActF T-TGAACKTACTTCTTTTC--GACTAAGCTA--CCATGT-CTGAA-GAATCC-ACC-- 300
pCDXRibo-T7promoter CCATGAACGTA C TACTTCTTTTC--GACTAAGCTA--CCATGT-CTGAA-GAATCC-ACC-- 359
pCDXRibo-PRNA\_7 CCATGA-CGTA C TACTTCTTTTC--GACTA-GCTA--ATGATCTGAG-AAATCC---CCC 336
\* \*\* \*

ACT\_Teo TCTA--TCGTTTGC--GATAACGGCTCTGGTTTGG--TCTAGACCGGAT-CCGTGT-AGT 399
pCDXRiboGFP\_ActF TCTA--TCGTTTGC--GATAACGGCTCTGGTTTGG--TCTAGATTTAARAAGGAGATAT- 353
pCDXRibo-T7promoter TCTAATCCGTTTGC CGAATAACG-CTCTG--TTGGAT TCTAAACCGGATTCGGTGTATT 416
pCDXRibo-PRNA\_7 TCTA--TCGTTTGC--GCGCG--GG--TGCTAGACCGGAT--CGTGTAAAT 390
\*\*\*\*\*

APÊNDICE 1 – VETORES pCDX SEQUENCIADOS (*continua*)

NOTA: GAPDH 3' INTER-CDS. Os clones sequenciados foram pBSTAG e pCDXRibo. Os alinhamentos foram agrupados por região do vetor. A região em negro corresponde à GAPDH 3' inter-CDS. *Gaps* são mostrados em cinza. As regiões não destacadas fazem parte de regiões a monte e a jussante de GAPDH 3' inter-CDS

GAPDH_Teo	TCGACCTCGTCCGCTACATGGCCCTCCAAGGACCGCTCTGCGTCCAAGATCTAAGCCCCAA	60
pCDXRiboGFP_GAPDHRev	TCGACCTCGTCCGCTACATGGCCCTCCAAGGACCGCTCTGCGTCCAAGATCTAAGCCCCAA	60
pBSTAG_GAPDHFor	-----CCGTGTCTCTCATG-----ACCGCTCTGCGTCCAAGATCTAAGCCCCAA	44
	*** * **** *****	
GAPDH_Teo	AGACTTTATCGAAAAATATCAAAAGTTTTAATTTTCATGTTTTATTTATTTTCGGATTTTT	120
pCDXRiboGFP_GAPDHRev	AGACTTTATCGAAAAATATCAAAAGTTTTAATTTTCATGTTTTATTTATTTTCGGATTTTT	120
pBSTAG_GAPDHFor	AGACTTTATCGAAAAATATCAAAAGTTTTAATTTTCATGTTTTATTTATTTTCGGATTTTT	104
	*****	
GAPDH_Teo	TTTGTTTTTATTATATTTCCCTAACCTATATTGATATAGCATTTAATGTTATACACTGA	180
pCDXRiboGFP_GAPDHRev	TTTGTTTTTATTATATTTCCCTAACCTATATTGATATAGCATTTAATGTTATACACTGA	180
pBSTAG_GAPDHFor	TTTGTTTTTATTATATTTCCCTAACCTATATTGATATAGCATTTAATGTTATACACTGA	164
	*****	
GAPDH_Teo	AATGTTTTGTGCTGTGTTGCTGATAGGTGTGAATGTTTTTCACAATAAGCGAATTGTGTT	240
pCDXRiboGFP_GAPDHRev	AATGTTTTGTGCTGTGTTGCTGATAGGTGTGAATGTTTTTCACAATAAGCGAATTGTGTT	240
pBSTAG_GAPDHFor	AATGTTTTGTGCTGTGTTGCTGATAGGTGTGAATGTTTTTCACAATAAGCGAATTGTGTT	224
	*****	
GAPDH_Teo	TGTTGTCCTATGGAAAATATTTGGTCTCTTTCTTCTCTTGTTTTATGATTCTCTAGGAAG	300
pCDXRiboGFP_GAPDHRev	TGTTGTCCTATGGAAAATATTTGGTCTCTTTCTTCTCTTGTTTTATGATTCTCTAGGAAG	300
pBSTAG_GAPDHFor	TGTTGTCCTATGGAAAATATTTGGTCTCTTTCTTCTCTTGTTTTATGATTCTCTAGGAAG	284
	*****	
GAPDH_Teo	GATTCTATAAATATTTATATACAGTATTTATTTGAAGTAGTAGTAAGGTTGAAACAGTA	360
pCDXRiboGFP_GAPDHRev	GATTCTATAAATATTT-----	316
pBSTAG_GAPDHFor	GATTCTATAAATATTTATATACAGTATTTATTTGAAGTAGTAGTAAGGTTGAAACAGTA	344
	*****	
GAPDH_Teo	AGCTT-----	365
pCDXRiboGFP_GAPDHRev	-----	
pBSTAG_GAPDHFor	AGCTTATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGCCGCTTGGGTGGAGAGGC	404

APÊNDICE 1 – VETORES pCDX SEQUENCIADOS (conclusão)

NOTA: TUBULINA 3' INTER-CDS. Os clones sequenciados foram pCDXTub e pCDXRibo. Os alinhamentos foram agrupados por região do vetor. A região em negro corresponde à tubulina 3' inter-CDS. Gaps são mostrados em cinza. As regiões não destacadas fazem parte de regiões a monte e a jusante de tubulina 3' inter-CDS

Table with 4 columns: Sequence identifier (TUB\_Teo, Ribo\_T3, pBSTAGTubIgRev, Ribo\_pRNARev9), DNA sequence (with gaps in grey and tubulin 3' inter-CDS in black), and position (e.g., 27, 517, 840, 840).

### APÊNDICE 2 – SEQUENCIAMENTO DE GFP

NOTA: Em preto, está o gene de GFP. Gaps são mostrados em cinza. As regiões não destacadas fazem parte de regiões a monte e a jusante do gene de GFP

Teórico	ATAACGGCTCTGGTTTGGTCTAGATTTAAGAAGGAGATATACAT	<b>ATGAGTAAAGGAGAAG</b>	420
TubGFP GAPDH	---ATGGCT---GTTTA-----ATTGAAGAGGC-----	<b>TATGGATAAACGGAGAAA</b>	82
TubGFP ActF	ATAACGGCTCTGGTTTGGTCTAGATTTAARAAGGAGATATACAT	<b>ATGAGTAAAGGAGAAG</b>	373
	* * * * *	* * * * *	
Teórico	<b>AAC</b> TTTTCACT <b>GGAGT</b> TTGTCCCAATTCTGT <b>GAAT</b> AGAT <b>GGT</b> GATGTAATGGGCACA	480	
TubGFP GAPDH	---TTTTCAC--GAGT--GTCCCAATT--TTGT--GAAT--AGA--GTGATGTA <b>CTGG--CACA</b>	130	
TubGFP ActF	<b>AAC</b> TTTTCACT <b>GGAGT</b> TTGTCCCAATTCTGT <b>GAAT</b> AGAT <b>GGT</b> GATGTAATGGGCACA	433	
	*****	*****	
Teórico	<b>AAT</b> TTTCTGTC <b>AGT</b> GGAGAGGGTGAAGGTGATGCA <b>AC</b> CATACGGAAA <b>ACTTACCCT</b> TAAAT	540	
TubGFP GAPDH	A--TTTCTGTC--GTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCA--CATACGGAAA <b>ACTTACC</b> TTAAAT	185	
TubGFP ActF	<b>AAT</b> TTTCTGTC <b>AGT</b> GGAGAGGGTGAAGGTGATGCA <b>AC</b> CATACGGAAA <b>ACTTACCCT</b> TAAAT	493	
	* *****	*****	
Teórico	<b>TTAT</b> TTGCACTACT <b>GGAAA</b> ACTTACTGT <b>CCATGGCCAACA</b> CTTGTC <b>CTACTTTCCGGTT</b>	600	
TubGFP GAPDH	A--TTGCA--TAC--GGAAA <b>ACTTACTGT--CCATGGCCAACA--TTGTC--TACTTTCCGGTT</b>	236	
TubGFP ActF	<b>TTAT</b> TTGCACTACT <b>GGAAA</b> ACTTACTGT <b>CCATGGCCAACA</b> CTTGTC <b>CTACTTTCCGGTT</b>	553	
	* *****	*****	
Teórico	ATGGTGTCAATGCTTTTGGCAGATACCCAGATCATATGAAACAGCATGACTTTTT	<b>CAAGA</b>	660
TubGFP GAPDH	ATGGTGTCAATGCTTTTGGCAGATACCCAGATCATATGAAACAGCATGACTTTTT	<b>CAAGA</b>	295
TubGFP ActF	ATGGTGTCAATGCTTTTGGCAGATACCCAGATCATATGAAACAGCATGACTTTTT	<b>CAAGA</b>	613
	*****	*****	
Teórico	GTGCCATGCCCCAAGGTTATGTACAGGAAAGAACTATATTTTTCAAAGATGACGGGAACT	720	
TubGFP GAPDH	GTGCCATGCCCCAAGGTTATGTACAGGAAAGAACTATATTTTTCAAAGATGACGGGAACT	355	
TubGFP ActF	GTGCCATGCCCCAAGGTTATGTACAGGAAAGAACTATATTTTTCAAAGATGACGGGAACT	673	
	*****	*****	
Teórico	ACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCCTTGTTAATAGAATCGAGTTAA	780	
TubGFP GAPDH	ACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCCTTGTTAATAGAATCGAGTTAA	415	
TubGFP ActF	ACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCCTTGTTAATAGAATCGAGTTAA	733	
	*****	*****	
Teórico	AAGGTATTGATTTTAAAGAA <b>AG</b> ATGGAAACATTCTTGGACACAAATTGGAATCAAACTATA	840	
TubGFP GAPDH	AAGGTATTGATTTTAAAGAA <b>AG</b> ATGGAAACATTCTTGGACACAAATTGGAATCAAACTATA	475	
TubGFP ActF	AAGGTATTGATTTTAAAGAA <b>AS</b> ATGGAAACATTCTTGGACACAAATTGGAATCAAACTATA	793	
	*****	*****	
Teórico	ACTCACACAATGTATACATCATGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGTTAACTTCA	900	
TubGFP GAPDH	ACTCACACAATGTATACATCATGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGTTAACTTCA	535	
TubGFP ActF	ACTCACACAATGTATACATCATGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGTTAACTTCA	853	
	*****	*****	
Teórico	AAATTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAG <b>ACCAT</b> TAACAACAAA <b>ATA</b>	960	
TubGFP GAPDH	AAATTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAG <b>ACCAT</b> TAACAACAAA <b>ATA</b>	595	
TubGFP ActF	AAATTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAG <b>ACCAT</b> TAACAACAAA <b>T</b>	911	
	*****	*****	
Teórico	CTCCAATGGCGATGGCCCTGTCC <b>TTT</b> ACCAGACAACCA <b>TTACCTGT</b> CCACA <b>CAATCTG</b>	1020	
TubGFP GAPDH	CTCCAATGGCGATGGCCCTGTCC <b>TTT</b> ACCAGACAACCA <b>TTACCTGT</b> CCACA <b>CAATCTG</b>	655	
TubGFP ActF	CTCCAATGGCGATGGCC <b>CTGTCCWTT</b> ACCAGACAACCA <b>TTACCTGT</b> CCACA <b>CAATCTR</b>	967	
	* *****	*****	
Teórico	CCCTTTCGAA <b>AG</b> ATCCCAACGAAA <b>AG</b> AG <b>GAC</b> ACATGTTCC <b>TCT</b> TGAGTT <b>GT</b> TAAC <b>AG</b>	1080	
TubGFP GAPDH	CCCTTTCGAA <b>AG</b> ATCCCAACGAAA <b>AG</b> AG <b>GAC</b> ACATGTTCC <b>TCT</b> TGAGTT <b>GT</b> TAAC <b>AG</b>	715	
TubGFP ActF	CCCTTTCGAA <b>AG</b> ATCCCAACGAAA <b>AGR</b> AK <b>AC</b> ACATGTTCC <b>TCT</b> TGAS <b>TT</b> WTAC <b>G</b>	1024	
	*****	*****	
Teórico	CTGCTGGGATTACAC <b>AT</b> GGCATGGAT <b>G</b> ACTATACAA <b>ATA</b> AAATGCCAGACCCTCGACC	1140	
TubGFP GAPDH	CTGCTGGGATTACAC <b>AT</b> GGCATGGAT <b>G</b> ACTATACAA <b>ATA</b> AAATGCCAGACCCTCGACC	775	
TubGFP ActF	CTGCTGGGATTAC <b>MM</b> FGGCATGGAT <b>S</b> ACTATACAA <b>T</b> AA <b>ACKT</b> CCR <b>-</b> ACCCTC <b>-</b> ASC	1078	
	*****	*****	