

ALDA MARIA TEIXEIRA FERREIRA

Interação de TcNUP-1 com cromatina de *Trypanosoma cruzi*.

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Dr Stenio Perdigão Fragoso

**CURITIBA
MARÇO - 2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
E
INSTITUTO CARLOS CHAGAS**

Interação de TcNUP-1 com cromatina de *Trypanosoma cruzi*.

ALDA MARIA TEIXEIRA FERREIRA

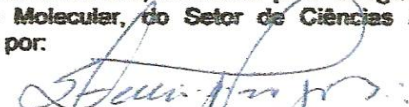
**CURITIBA
2011**


PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER

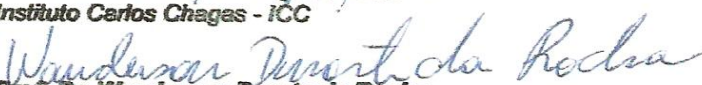
A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:


Prof. Dr. Stênio Perdigão Fragoso
Orientador e presidente da banca
Instituto Carlos Chagas - ICC


Profa. Dra. Olga Meiri Chaim
Universidade Federal do Paraná - UFPR


Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogata
Universidade Estadual de Londrina - UEL


Profa. Dra. Andrea Rodrigues Avila
Instituto Carlos Chagas - ICC


Prof. Dr. Wanderson Duarte da Rocha
Universidade Federal do Paraná

E tendo como suplentes,

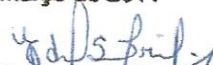
Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Após arguir a doutoranda **Alida Maria Teixeira Ferreira**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Interação do TcNUP-1 com cromatina de *Trypanosoma cruzi*" são de parecer favorável à aprovação da acadêmica, habilitando-a ao título de DOUTOR em Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.



Curitiba, 16 de março de 2011


Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Matr. 185795

Ao meu amor, porque este trabalho teve como combustível um sonho, e tu não só compreendeste como me ajudaste a realizá-lo. Te amo!

AGRADECIMENTOS

Ao Stenio, muito obrigada por todos os ensinamentos, pelas lições de generosidade, competência, rigor científico, pela confiança. Eu cheguei aqui buscando aprender sobre Biologia Molecular, mas saio levando tantas lições que não conseguirei carregá-las, terei que voltar para reabastecer. Você é especial!

Ao Dr Samuel Goldenberg, Marco Krieger e demais pesquisadores por terem criado e estarem construindo este oásis científico. É muito bom trabalhar aqui.

Aos pesquisadores que de alguma forma, muitas vezes bem especial, abriram mão de seu precioso tempo para atenderem as minhas necessidades.

A todos os colegas do ICC, aos que me auxiliaram, aos que fizeram por mim, aos que simplesmente me deram um sorriso e com isso mudaram o meu dia, até mesmo aqueles que me negaram um cumprimento. Obrigada!

Aos meus queridos companheiros de jornada do eterno “Lab 2”, Didi, Fiori, Flavinha, Ro, Gi, Odi, Lari, Mônica, Letícia, Marcinha, Cintia, Bárbara, Mariane, Elke, Lééo, Lauro, Fernandinho, André, Luiz. Muito obrigada por tudo, vocês vão ficar para sempre no meu coração!

Às minhas amadas companheiras, de choros e risos, jogos-da-verdade e trapalhadas. E ao nosso mascote, o Tiaguinho. Valeu!

Ao Nilson, Vanessa, Tânia, Sílvio, Diego, criaturas adoráveis, muito obrigada!

Às meninas de saideira, inclusive a Mari-mãe, pelos momentos divertidos.

Ao pessoal do “LabReg”, pelas dicas, troca de experiências, pelo auxílio. Aquele lugar ferve de idéias....um perigo!!!

Aos companheiros de “cruzi”, muitas vezes uma verdadeira cruzada de informações, valeu!

Ao Maurílio pelo prato da avó, pelo jeitinho mineiro e alegre de explicar as coisas do mundo celular. A todos que compõe o “Lab do Mau”, em especial à Ligia pela ajuda com as pranchas.

À Edilaine, Cristina, Marcele, Vivielin, Luiz, Laura e demais funcionários, pelo carinho.

A todos do LABCET, pelo carinho e a você Alessandra, por toda a atenção que sempre dispensou a mim.

Ao pessoal do “LAB 3”, em especial ao Juliano e Giovanni, pelas orientações com os monoclonais.

Aos garotos informáticos, aos colegas proteômicos, genômicos e todo pessoal “lá de baixo”.

À Ines, por confiar em mim e juntamente com Cacilda tornarem mais tranquilas minhas viagens, permitindo assim que eu me dedicasse um pouco mais ao doutorado. Agradeço imensamente!

Às minhas queridas amigas Ale, Regilene e Cássia, por me amarem à distância e quase nunca reclamarem. À Dona Eva pelas orações e aos meus amigos Tinho e Ricardo.

Aos meus pais e meu irmão, porque quando tudo parecia perdido, era em vocês que eu pensava !!

“Hoje me sinto mais forte,
Mais feliz, quem sabe
Eu só levo a certeza
De que muito pouco sei,
Ou nada sei”

Renato & Almir

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O MICRO-ORGANISMO.....	1
1.2. O CICLO DE VIDA de <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
1.3. DOENÇA DE CHAGAS.....	3
1.4. CARACTERÍSTICAS CELULARES.....	5
1.5. O NÚCLEO EUCARIÓTICO.....	8
1.5.1. Envelope nuclear.....	9
1.5.2. Complexo do poro nuclear.....	10
1.5.3. Lâmina nuclear e lamínas.....	10
1.6. O NÚCLEO DE <i>T. cruzi</i>	13
2. OBJETIVOS	18
2.1. OBJETIVO GERAL	18
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. REAGENTES E SOLUÇÕES UTILIZADOS.....	19
3.1.1. Reagentes e consumíveis	19
3.1.2. Tampões, Soluções e Meios de Cultivo	21
3.2. PRODUÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL	25
3.2.1. Animais.....	25
3.2.2. Fusão Celular.....	25
3.2.3. Tipificação de Isótipo.....	27
3.2.4. Purificação do Anticorpo Monoclonal.....	27
3.3. ELISA.....	27
3.4. CULTIVO DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	28
3.5. METACICLOGÊNESE <i>IN VITRO</i>	29
3.6. OBTENÇÃO DE DNA DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	29
3.7. EXTRATO PROTÉICO DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	29
3.8. IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI).....	30
3.9. ENSAIO DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DA CROMATINA (ChIP).....	31
3.9.1. epi-ChIP.....	31
3.9.2. meta-ChIP.....	32

3.10. CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE SEQUÊNCIAS TcNUP-1 ESPECÍFICAS.....	32
3.11. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS IMUNOPRECIPITADAS POR PCR QUANTITATIVO (qPCR)	33
3.12. HIBRIDAÇÃO <i>IN SITU</i> USANDO FLUORESCÊNCIA (FISH).....	35
3.12.1. Marcação de sonda com digoxigenina para FISH.....	35
3.13. DELEÇÃO DO GENE <i>TcNUP-1</i> POR NOCAUTE GÊNICO	37
3.13.1. Amplificação e clonagem dos genes <i>npt</i> e <i>hph</i>	37
3.13.2. Amplificação e clonagem das regiões do gene <i>TcNUP-1</i>	38
3.13.3. Amplificação dos cassetes <i>NupN-neo-NupC</i> e <i>NupN-higro-NupC</i> para transfecção de <i>T. cruzi</i>	40
3.13.4. Transfecção de <i>T. cruzi</i> com o cassete <i>NupN-neo-NupC</i>	41
3.13.5. Extração de DNA dos transfectantes.....	42
3.13.6. Análise por PCR do DNA dos parasitas transfectados com o cassete <i>NupN-neo-NupC</i>	42
3.13.7. Transfecção de <i>T. cruzi</i> com o cassete <i>NupN-higro-NupC</i>	42
3.13.8. Análise por PCR do DNA dos parasitas transfectados com o cassete <i>NupN-higro-NupC</i>	43
3.14. ELETROFORESE EM CAMPO DE PULSOS ALTERNADOS (PFGE)	44
4. RESULTADOS	47
4.1. PRODUÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL.....	47
4.2. ENSAIO DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DA CROMATINA (ChIP).....	49
4.3. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS IMUNOPRECIPITADAS POR PCR QUANTITATIVO (qPCR)	53
4.4. HIBRIDAÇÃO <i>IN SITU</i> USANDO FLUORESCÊNCIA (FISH).....	54
4.5. DELEÇÃO DO GENE <i>TcNUP-1</i> POR NOCAUTE GÊNICO.....	63
4.5.1. Análise por PCR do DNA dos parasitas transfectados com os cassetes <i>NupN-neo-NupC</i> e <i>NupN-higro-NupC</i>	63
4.5.2. Verificação do nocaute do gene <i>TcNUP-1</i> através de PFGE e <i>southern blot</i>	66
5. DISCUSSÃO	69
6. CONCLUSÕES	75
ANEXO 1. SEQUÊNCIAS ASSOCIADAS À TcNUP-1 EM FORMAS EPIMASTIGOTAS DE <i>T. cruzi</i> (epi-ChIP).....	76
ANEXO 2. SEQUÊNCIAS ASSOCIADAS À TcNUP-1 EM FORMAS TRIPOMASTIGOTAS METACICLICAS DE <i>T. cruzi</i> (meta-ChIP)	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. CICLO DE VIDA DE <i>T. cruzi</i>	3
FIGURA 2. DISTRIBUIÇÃO DA DOENÇA DE CHAGAS NO MUNDO.....	4
FIGURA 3. ESQUEMA GERAL DA ESTRUTURA CELULAR DE <i>T. cruzi</i>	6
FIGURA 4. FORMAS EVOLUTIVAS DE <i>T. cruzi</i>	8
FIGURA 5. ENVELOPE NUCLEAR.....	9
FIGURA 6. ESTRUTURA DOS FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS (IF) E DAS LAMINAS	12
FIGURA 7. MODELO DA DINÂMICA DOS CROMOSSOMOS DURANTE O CICLO CELULAR DE <i>T.cruzi</i> (epimastigota)	15
FIGURA 8. ESQUEMA DAS REGIÕES DO GENE <i>TcNUP-1</i>	39
FIGURA 9. VETORES UTILIZADOS PARA O NOCAUTE DO GENE <i>TcNUP-1</i>	40
FIGURA 10. ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA AMINOACÍDICA DE REPETIÇÃO DE <i>TbNUP-1</i> (<i>T.brucei</i>) E <i>TcNUP-1</i> (<i>T.cruzi</i>).....	47
FIGURA 11. REATIVIDADE DO ANTICORPO MONOCLONAL TESTADA ATRAVÉS DE ENSAIO DE <i>WESTERN BLOT</i>	48
FIGURA 12. IMUNOLocalização DE <i>TcNUP-1</i> EM EPIMASTIGOTAS DE <i>T.cruzi</i>	49
FIGURA 13. MAPA DE REGIÕES ASSOCIADAS À <i>TcNUP-1</i> EM EPIMASTIGOTAS DE <i>T. cruzi</i>	51
FIGURA 14. MAPA DE REGIÕES ASSOCIADAS À <i>TcNUP-1</i> EM TRIPOMASTIGOTAS METACÍCLICAS DE <i>T. cruzi</i>	52
FIGURA 15. QUANTIFICAÇÃO RELATIVA (qPCR) DAS SEQUÊNCIAS DE DNA OBTIDAS NA EPI-CHIP(IP), ENRIQUECIDAS EM RELAÇÃO AO <i>INPUT</i>	53
FIGURA 16. LOCALIZAÇÃO DAS SONDAS PARA GENES IMUNOPRECIPITADOS COM ANTICORPO ANTI- <i>TcNUP-1</i> NO ENSAIO DE EPI-CHIP ATRAVÉS DA TÉCNICA DE FISH E ANALISADO POR MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER.....	56
FIGURA 17. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS GENES <i>TcNUP-1</i> , <i>PEPCK</i> , <i>GTPase</i> E DISPOSIÇÃO DOS CASSETES <i>NupN-neo-NupC</i> , <i>NupN-higro-NupC</i> NO CONTEXTO GENÔMICO DE <i>T.CRUZI</i>	65
FIGURA 18. ENSAIOS DE PCR UTILIZANDO DNA DE <i>T.cruzi</i> (WT) e <i>T.cruzi</i> (NO)...	66
FIGURA 19. ANÁLISE DA ORGANIZAÇÃO DOS GENES <i>TcNUP-1</i> , <i>neo</i> E <i>higro</i> POR ENSAIO DO TIPO <i>SOUTHERN BLOT</i>	68

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NO PCR QUANTITATIVO	34
TABELA 2. SONDAS UTILIZADAS NO ENSAIO DE FISH.....	36
TABELA 3. RELAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DOS GENES <i>neo</i> E <i>hgro</i>	38
TABELA 4. RELAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES DO GENE <i>TcNUP-1</i>	39
TABELA 5. RELAÇÃO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NAS AMPLIFICAÇÕES PARA A ANÁLISE DOS PARASITAS TRANSFECTADOS....	44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato

CaCl₂: cloreto de cálcio

DNA : ácido desoxirribonucléico

dATP: desoxiadenosina trifosfato

dCTP: desoxicitosina trifosfato

DEAE: dietilaminoetil cellulose

dGTP: desoxiguanosina trifosfato

DIC: contraste interferencial diferencial

Dm: *Didelphis marsupialis*

DMSO: dimetilsulfóxido

dNTP: desoxiribonucleotídeos trifosfato

dTTP: desoxiribotimina trifosfato

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

FISH: *hibridação fluorescente in situ*

g: aceleração da gravidade

HCl: ácido clorídrico

IFI: imunofluorescência indireta

IFs: filamentos intermediaries

IPTG: *isopropyl β -D-1 thiogalactopyranoside*

kb: quilobase

kDa: quiloDalton

KCl: cloreto de potássio

kDNA: DNA do cinetoplasto

KH₂PO₄: fosfato de potássio dihidrogênio

LB: meio de cultura Luria-Bertani

LIT: meio de infusão de fígado e triptose (*liver infusion triptose*)

M: molar

mg: miligrama

MgCl₂: cloreto de magnésio

mL: mililitro

mM: milimolar

NBT: nitro blue tetrazolium chloride

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NaCl: cloreto de sódio

Na₂HPO₄.7H₂O: fosfato dibásico de sódio heptahidratado

NH₄Cl: cloreto de amônio

ng: nanograma

nm: nanômetro

NPCs: complexo de poro nuclear

ρ : posição *para*

pb: pares de base

PCR: reação em cadeia pela polimerase

pH: potencial hidrogeniônico

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonil

RNA: ácido ribonucléico

RNAm: RNA mensageiro

rpm: rotações por minuto

RPMI: *Meio Roswell Park Memorial Institute*

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante

SSC: tampão citrato-salino

TAU: do inglês: *triatomineae artificial urine*

TIGR: *The Institute for Genomic Research*

Tris: hidroximetil aminoetano

Tween-20: monolaurato de polioxietileno 20 sorbitana

V: Volts

µg: micrograma

µL: microlitro

µm: micrômetro

µM: micromolar

%: porcentagem

°C: graus Célsius

RESUMO

A lâmina nuclear é uma estrutura fibrilar protéica que está abaixo da membrana nuclear interna. Nos metazoários, as laminas são os componentes estruturais principais dessa estrutura e estão envolvidas em diversos processos nucleares. Os eucariotos que não possuem laminas apresentam proteínas distintas com funções homólogas. Recentemente foi identificada uma proteína com domínio *coiled-coil* em *Trypanosoma brucei*, NUP-1, como o componente filamentoso principal da lâmina nuclear, ainda sem papel definido. Nós caracterizamos uma proteína ortóloga à NUP-1 em *T. cruzi* e identificamos *in vivo* regiões do DNA associadas à proteína através de ensaio de imunoprecipitação da cromatina. Este foi o primeiro relato com relação à associação de TcNUP-1 com regiões cromossômicas contendo genes que codificam para proteínas de superfície e através do ensaio de FISH pudemos verificar sua co-localização com TcNUP-1. TcNUP-1 é uma proteína estrutural com papel essencial na organização nuclear por ancorar regiões cromossômicas ao envelope nuclear.

ABSTRACT

The nuclear lamina is a structure that lines the inner nuclear membrane. In metazoans, lamins are the primary structural components of the nuclear lamina and are involved in several processes. Eukaryotes that lack lamins have distinct proteins with homologous functions. Some years ago, a coiled-coil protein in *Trypanosoma brucei*, NUP-1, was identified as the major filamentous component of its nuclear lamina. However, its precise role has not been determined. We characterized a homologous protein in *Trypanosoma cruzi*, TcNUP-1, and identified its *in vivo* DNA binding sites using a chromatin immunoprecipitation assay and by testing of FISH we could verify the co-location of these regions with TcNUP-1. We demonstrate for the first time that TcNUP-1 associates with chromosomal regions containing large non-tandem arrays of genes encoding surface proteins. We therefore suggest that TcNUP-1 is a structural protein that plays an essential role in nuclear organization by anchoring *T. cruzi* chromosomes to the nuclear envelope.

1. INTRODUÇÃO

1.1 . O MICRO-ORGANISMO

Trypanosoma cruzi (CHAGAS, 1909) é um protozoário flagelado pertencente ao reino Protozoa, filum Euglenozoa e ordem Kinetoplastea. Esta ordem abrange protozoários flagelados que possuem uma estrutura singular, o cinetoplasto, onde reside o DNA mitocondrial (SHAPIRO & ENGLUND, 1995; MOREIRA *et al.*, 2004). A família Trypanosomatidae inclui vários gêneros importantes: *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Endotrypanum*, *Herpetomonas*, *Leishmania*, *Leptomonas*, *Phytomonas* e *Trypanosoma*. O gênero *Trypanosoma* é um dos mais importantes dentro da família Trypanosomatidae por incluir uma série de espécies causadoras de doenças como *Trypanosoma cruzi*, agente da doença de Chagas em humanos nas Américas, *Trypanosoma rhodesiense* e *Trypanosoma gambiense*, agentes da doença do sono em humanos na África Oriental e Ocidental, respectivamente e *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma equiperdum* e *Trypanosoma equinum*, agentes de tripanossomiasas em bovinos e equinos (DUMAS, 2000).

1.2. O CICLO DE VIDA DE *Trypanosoma cruzi*

O ciclo biológico de *T. cruzi* foi descrito por Carlos Chagas no início do século XX (CHAGAS, 1909), durante a investigação de uma doença endêmica com alterações patológicas graves, no quadro que foi denominado Doença de Chagas. Os estudos de Carlos Chagas não se restringiram somente a descoberta da etiopatogenia da doença, mas também a estudos sobre os vetores e reservatórios, sobre o diagnóstico parasitológico e sorológico e a transmissão congênita.

T. cruzi é um parasita heteroxênico possuindo como hospedeiros invertebrados insetos da família Triatominae, principalmente *Rhodnius prolixus* e *Triatoma infestans*

(conhecido popularmente como barbeiro) e hospedeiros vertebrados mamíferos, entre eles o homem (BRIONES *et al.*, 1999).

O ciclo de vida de *T. cruzi* está esquematizado na figura 1. O ciclo no hospedeiro vertebrado se inicia quando formas infectantes do parasita (tripomastigotas metacíclicos) presentes nos dejetos (fezes e urina) do vetor são eliminadas durante ou logo após o repasto sanguíneo. Ao alcançarem um local de descontinuidade cutânea infectam células da pele ou mucosas do mamífero. Essa etapa da interação envolve uma série de moléculas, entre elas glicoproteína de superfície com atividade de trans-sialidase e neuraminidase que está fortemente associada à capacidade invasiva das formas tripomastigotas do parasita (SCHENKMAN *et al.*, 1994; PEREIRA *et al.*, 1996). Ao aderir à célula hospedeira, uma série de modificações ocorre em ambas as células, do hospedeiro e do parasita, dando continuidade ao ciclo, podendo ocorrer o recrutamento de lisossomos no sítio de entrada do protozoário, a fusão dos mesmos, envolvendo o parasita e formando o vacúolo parasitóforo. No interior das células, os parasitas diferenciam-se em amastigotas, (CARVALHO & DE SOUZA, 1986; ANDREWS *et al.*, 1990) uma forma arredondada e com flagelo extremamente curto. Após intensa divisão binária, ocorre a diferenciação em tripomastigotas sanguíneos, formas infectivas e não-replicativas que com o movimento intenso dos flagelos rompem as células hospedeiras, podendo infectar novas células ou serem liberadas na corrente sanguínea.

Durante seu ciclo de vida, o protozoário sofre mudanças estruturais, morfológicas e bioquímicas adaptadas aos diferentes ambientes durante a passagem em seus hospedeiros. Podem-se distinguir quatro principais formas evolutivas do protozoário: formas epimastigotas e amastigotas (replicativas) e as formas tripomastigota sanguínea e tripomastigota metacíclica (não replicativas) (BRENER, 1973; ZELEDON, 1999; DE SOUZA, 2002).

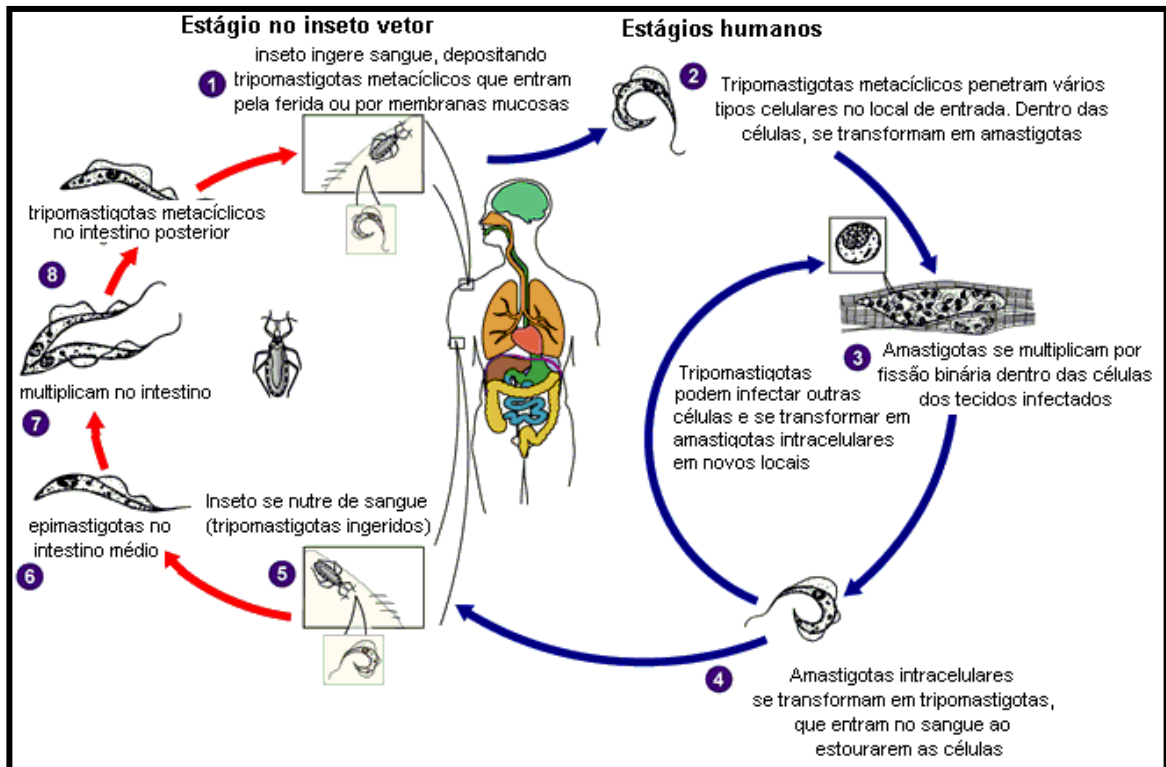


Figura 1: Ciclo de vida de *T. cruzi*.

Fonte: Modificado de www.dpd.cdc.gov/dpdx

1.3. DOENÇA DE CHAGAS

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, 100 anos após a descoberta da doença existem aproximadamente 18 milhões de pessoas infectadas com *T. cruzi* vivendo principalmente em 18 países do continente Americano, desde o México aos países da América do Sul (<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas>).

No Brasil, atualmente predominam os casos crônicos da doença decorrentes de infecção por via vetorial, com aproximadamente tres milhões de indivíduos infectados. No entanto, nos últimos anos, a ocorrência de doença de Chagas aguda (DCA) tem sido observada em diferentes Estados, em especial na região da Amazonia Legal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; COURA & VIÑAS, 2010).

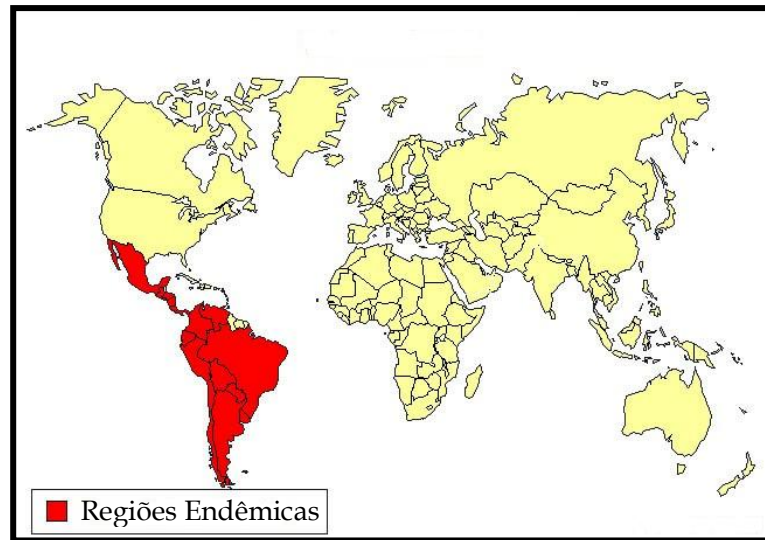


Figura 2: Distribuição da Doença de Chagas no mundo
Fonte: Modificado de <http://www.who.int/>

Após a infecção por transmissão vetorial, há um período de incubação de 8 a 10 dias, que pode variar com a cepa de *T. cruzi*, virulência e densidade do inóculo, assim como com a idade, sexo e grupo étnico do hospedeiro.

Podem ser reconhecidas, duas fases da doença, a aguda e a crônica (COURA & CASTRO, 2002). A fase aguda é usualmente assintomática, podendo evoluir para um quadro clínico caracterizado por febre, cefaléia, edema, linfadenopatia, miocardite, hepatoesplenomegalia, meningoencefalite e cardiopatia aguda com parasitemia importante. O conjunto e a intensidade dos sintomas são variáveis e a duração do quadro pode oscilar de 4 a 12 semanas (revisto por DIAS, 2000). A maioria dos casos agudos evolui para a fase crônica indeterminada da doença de Chagas que se inicia com a diminuição da parasitemia e mudança nos níveis do tipo de imunoglobulinas (redução nos níveis de IgM e aumento de IgG). A evolução desta fase é lenta e pode durar toda a vida do paciente manifestando-se pela presença da infecção associada à ausência de sintomatologia e resultados normais ao exame clínico, eletrocardiográfico e radiológico. Apesar do bom prognóstico, entre 5% - 30% dos casos ocorre o desenvolvimento da forma crônica com dano cardíaco causado pela fibrose do

miocárdio ou dano digestivo com desenvolvimento de megaesôfago e megacólon (revisto por DIAS, 2000).

Apesar de menos comum, a transmissão por via oral é responsável por um número significativo de casos agudos da doença, principalmente na região norte do Brasil (COURA *et al.*, 2002) através da contaminação por alimentos contendo o inseto-vetor ou seus detritos. De menor impacto, há a contaminação através de transplantes de órgãos e acidentes de laboratório (revisto por SCHMUÑIS, 2000).

Embora existam alguns medicamentos para tratamento da doença, estes além de apresentarem efeitos tóxicos, são eficazes apenas na fase aguda da infecção (BRENER *et al.*, 2000). Não há vacina disponível e nenhum tratamento é capaz de impedir a progressão da forma crônica indeterminada para a forma determinada da doença. No entanto, através de uma ação conjunta, várias Instituições de pesquisa estão desenvolvendo um estudo clínico no que refere-se a ação do Benzonidazol (único medicamento comercializado no Brasil) no controle da progressão cardíaca da doença de Chagas (BENEFIT: <http://www.clinicaltrials.gov>).

1.4. CARACTERÍSTICAS CELULARES

A figura 3 mostra o aspecto geral da forma epimastigota de *T. cruzi*, indicando diversas estruturas e organelas importantes para biologia desse parasita.

Além das organelas típicas da maioria das células eucarióticas, como núcleo, retículo endoplasmático, complexo de Golgi e mitocôndria, os tripanossomatídeos apresentam algumas estruturas peculiares (figura 3), como os microtúbulos subpeliculares, a estrutura paraflagelar, o cinetoplasto, os glicossomos e os acidocalcissomos (revisto por DE SOUZA; SANT'ANNA & CUNHA-E-SILVA, 2009).

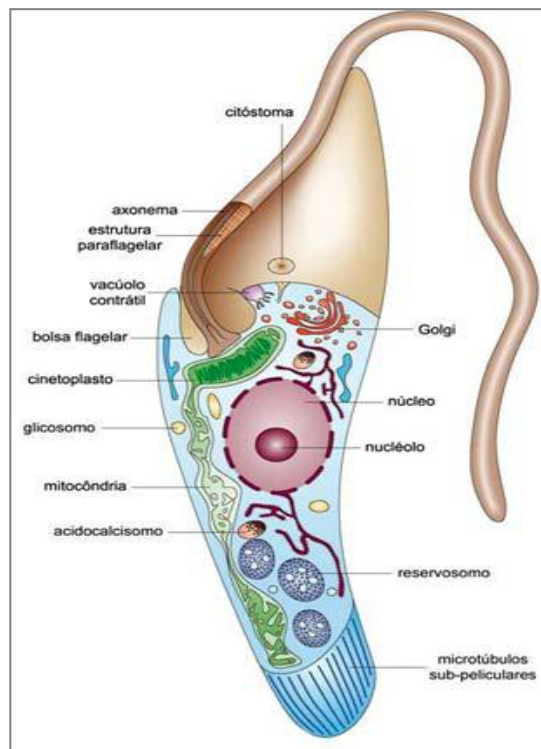


Figura 3: Esquema geral da estrutura celular de *T. cruzi*
Fonte: Do Campo *et al.*, 2005.

A superfície celular dos tripanossomatídeos é composta pela membrana plasmática, que apresenta um grande número de macromoléculas ligadas através de âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Imediatamente abaixo dela está presente uma camada de microtúbulos subpeliculares, os quais conferem estabilidade e resistência à célula. Estes se encontram distribuídos por todo o corpo do protozoário, exceto na região de ligação do flagelo ao corpo celular e na região da bolsa flagelar (DE SOUZA, 1984, 2000, 2002).

Todos os membros da família Trypanosomatidae apresentam um flagelo, que emerge de uma área de invaginação da membrana plasmática conhecida como bolsa flagelar. Devido à localização específica de vários receptores nesta área, acredita-se que a maior parte do tráfego vesicular e entrada de nutrientes ocorram nesta região. Outra invaginação menor, localizada próxima à bolsa flagelar em amastigotas e epimastigotas, o citóstomo, também está envolvida com a absorção de nutrientes (PORTO-CARREIRO *et al.*, 2000; DE SOUZA, 2009). O flagelo de *T. cruzi* apresenta

uma estrutura básica semelhante a outros flagelos, sendo envolvido por uma membrana flagelar e contendo um axonema típico, que apresenta um padrão de nove pares de microtúbulos periféricos e um par central. Associado ao flagelo encontra-se um complexo arranjo de filamentos protéicos, denominado de estrutura paraflagelar (revisto por GULL, 1999).

Na parte posterior da célula, existem organelas usualmente esféricas, ácidas denominadas reservossomos. Os reservossomos possuem em seu interior proteinases, principalmente a cruzipaina e proteínas ingeridas, oriundas da bolsa flagelar e do citóstomo. Acredita-se que os reservossomos sejam compartimentos pré-lisossomais e que durante a metaciclogênese participem como fonte de energia necessária para esse processo (SOARES *et al.*, 1992; 1999).

T. cruzi, assim como todos os membros da família Trypanosomatidae, apresenta uma mitocôndria única e ramificada que se estende por toda a extensão da célula. O material genético mitocondrial, também conhecido como kDNA ou DNA do cinetoplasto, encontra-se concentrado em uma determinada região da mitocôndria localizada logo abaixo do corpúsculo basal, dando origem a uma estrutura denominada de cinetoplasto (SHAPIRO & ENGLUND, 1995; DE SOUZA, 2002).

Distribuídos no citoplasma estão os glicossomos, um tipo especializado de peroxissomo, delimitados por membrana, onde se acumulam algumas enzimas da via glicolítica e da beta-oxidação de ácidos graxos (MICHELS & OPPERDOES, 1991; MICHELS; HANNAERT; BRINGAUD, 2000; HANNAERT *et al.*, 2003; MICHELS *et al.*, 2006) e os acidocalcissomos, provavelmente envolvidos em diversos processos biológicos, tais como o armazenamento de cálcio e polifosfatos, manutenção do pH intracelular e osmorregulação (DO CAMPO & MORENO, 1999; revisto por DOCAMPO *et al.*, 2005).

Em cada célula está presente um único aparelho de Golgi, localizado entre o núcleo e o cinetoplasto (DE SOUZA, 2002).

O núcleo de *T. cruzi* apresenta uma organização estrutural similar à de outras células eucarióticas. Possui um tamanho relativamente pequeno, medindo aproximadamente 2,5 μm , e sua forma difere entre as diferentes formas do parasita. Em

epimastigotas e amastigotas, é ligeiramente esférico, enquanto que em tripomastigotas é alongado e se localiza na região central da célula. A posição do flagelo em relação ao núcleo e ao cinetoplasto também é característica de cada forma evolutiva (figura 4) (DE SOUZA, 2002).

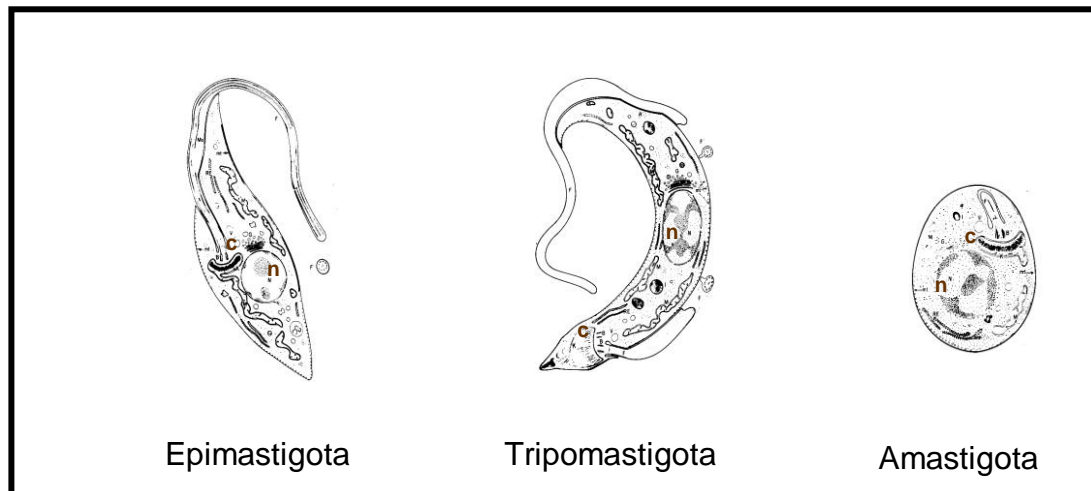


Figura 4: Formas evolutivas de *T. cruzi*. Legenda: c=cinetoplasto; n=núcleo
Fonte: Coura, 2005.

1.5. O NÚCLEO EUCARIÓTICO

Uma importante diferença entre as células eucarióticas e procarióticas é a presença, nas primeiras, de organelas que possibilitam a compartimentalização de funções (MISTELI, 2005), gerando uma maior capacidade de especialização e, portanto diferenciação. Entre essas organelas está o núcleo que, por conter grande parte do material genético, vem sendo estudado desde quando o biólogo Robert Brown observou-o pela primeira vez (HARRIS, 1999).

O núcleo foi a primeira estrutura intracelular descoberta, altamente organizado e dinâmico, onde se encontra a maior porção do genoma da célula. O DNA se organiza no espaço nuclear, primeiramente por meio da sua compactação, formando a cromatina e segundo pela dinâmica dos processos realizados no contexto celular (LAMOND & SPECTOR, 2003; MISTELI, 2005; 2008).

1.5.1. ENVELOPE NUCLEAR

O envelope nuclear é composto pelas membranas nucleares, pelos complexos de poros nucleares (NPCs) e pela lâmina nuclear (figura 5) (D'ANGELO & HETZER, 2006; HETZER, 2010).

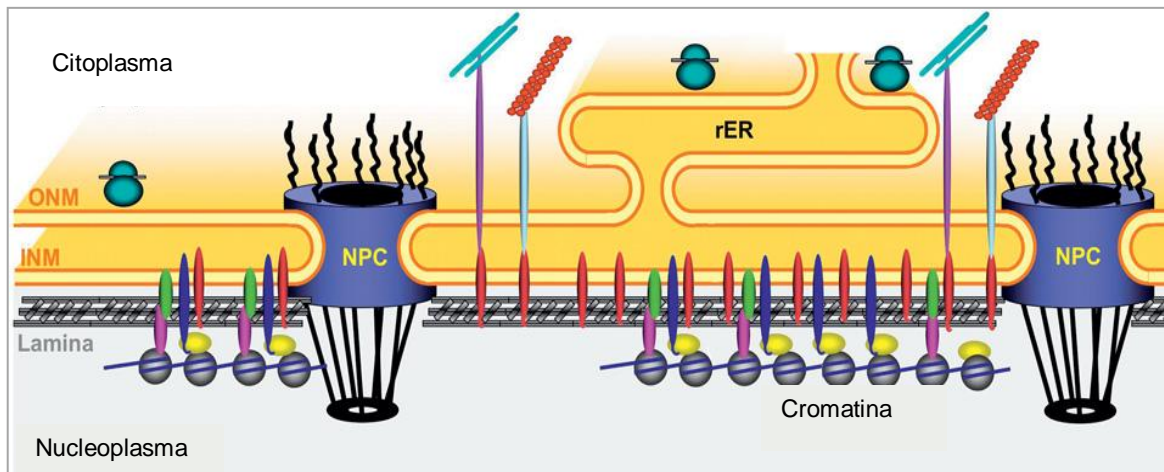


Figura 5: Envelope Nuclear. Legenda: NPC=complexo de poro nuclear, INM=membrana nuclear interna, ONM=membrana nuclear externa, rER=retículo endoplasmático rugoso.
Fonte: Adaptado de Kalverda *et al.*, 2010.

As duas membranas que compõem o envelope nuclear, a membrana externa e a membrana interna, são altamente especializadas e embora sejam contínuas apresentam composição protéica distinta (HETZER *et al.* 2005). Essas duas membranas concêntricas se unem na região do poro nuclear nos locais onde estão os NPCs. A membrana nuclear externa é contínua com o retículo endoplasmático rugoso, é coberta por ribossomos e fornece locais de fixação para elementos estruturais do citoplasma. A membrana nuclear interna contém um conjunto único de proteínas integrais e proteínas associadas que fornecem locais de fixação para a lâmina nuclear e para a cromatina (BURKE, 2001).

O envelope nuclear possui papel fundamental no controle da regulação gênica e na organização da cromatina, inclusive durante a divisão celular, uma vez que participa

na regulação do tráfego de macromoléculas nesse ambiente diferenciado (SPECTOR, 1993; D'ANGELO & HETZER, 2006).

1.5.2. COMPLEXO DO PORO NUCLEAR

O complexo do poro nuclear (NPC) representa um dos maiores complexos protéicos de células eucarióticas, variando em massa entre 60 MDa e 125 MDa em vertebrados (REICHEL *et al.*, 1990 revisto por HETZER; WALTHER & MATTAJ, 2005; ROUT & AITCHISON, 2001; CRONSHAW *et al.*, 2002) e entre 44 MDa e 66 MDa em *Saccharomyces cerevisiae* (ROUT & BLOBEL, 1993; YANG *et al.*, 1997 revisto por HETZER; WALTHER & MATTAJ, 2005; ROUT *et al.*, 2000). Cerca de 100 proteínas distintas, incluindo mais de 30 tipos de nucleoporinas, formam cada NPC (STOFFLER; FAHRENKOG; AEBI, 1999, revisto por HETZER, 2005). Apesar da grande diferença em massa, a arquitetura geral do NPC parece ser bem conservada entre as espécies (WEIS, 2003; MANS *et al.*, 2004).

A estrutura do NPC é representada por um cilindro octogonal simétrico, que atravessa o envelope nuclear e envolve um canal central (figura 5). Filamentos periféricos voltados tanto para o núcleo como para o citoplasma saem de cada raio do cilindro (ROUT & AITCHISON, 2001; WEIS, 2003).

Recentes estudos têm caracterizado, em *Drosophila*, a interação de nucleoporinas com a cromatina, especificamente no NPC ou no interior do nucleoplasma (CASOLARI *et al.*, 2004; MENON *et al.*, 2005; KALVERDA *et al.*, 2010).

1.5.3. LÂMINA NUCLEAR E LAMINAS

A lâmina nuclear é uma estrutura fibrilar protéica localizada logo abaixo da membrana nuclear interna, conferindo suporte estrutural e estabilidade ao envelope nuclear, ao qual está ancorada através de interações com proteínas integrais da membrana nuclear interna (FAWCETT, 1966).

A lâmina nuclear é uma estrutura conservada nos metazoários, porém, o número e a complexidade das proteínas associadas estão relacionados ao grau de

evolução dos organismos (MATTOUT-DRUBEZKI & GRUENBAUM, 2007). Além de manter o arcabouço nuclear (LIU *et al.*, 2000) a lâmina nuclear participa em diversos processos celulares (HERRMANN & FACKELMAYER, 2005) como o correto espaçamento dos NPCs (LENZ-BÖHME *et al.*, 1997) e o fornecimento de sítios de ancoragem para a cromatina na periferia nuclear (GERACE & BURKE, 1988; MOIR *et al.*, 1994; GRUENBAUM *et al.*, 2002; HUTCHISON, 2002; MARALDI *et al.*, 2006).

Em metazoários, a lâmina nuclear é composta pelas laminas (STUURMAN *et al.*, 1998), por proteínas associadas às laminas como emerina, polipeptídeos 1 e 2 (LAP1 e LAP2), nesprina, receptor de lamina-B (LBR), MAN1 e por proteínas integrais da membrana nuclear interna, incluindo UNC-84, UNC-83 que interagem com as laminas. Tendo em vista que as laminas são os principais componentes estruturais da lâmina nuclear atribui-se a esse grupo de proteínas a diversidade de papéis da lâmina (AARONSON & BLOBEL, 1975; FISHER *et al.*, 1986; SHUMAKER *et al.*, 2003).

As laminas pertencem ao grupo dos filamentos intermediários (IFs) do tipo V (STUURMAN *et al.*, 1998). Os filamentos intermediários estão organizados em um domínio amino-terminal pequeno, uma região central em α -hélice formando uma estrutura do tipo *coiled-coil* e um domínio carboxi-terminal (figura 6). O domínio central é composto por quatro domínios *coiled-coil* que são separados por regiões de ligação flexíveis. Os domínios *coiled-coil* são geralmente organizados em repetições sétuplas, mas as laminas apresentam 42 resíduos extras (seis sétuplos) no domínio 1B em relação aos IFs citoplasmáticos. Além disso, o domínio carboxi-terminal das laminas possui uma sequência sinal de localização nuclear (NLS) e, na maioria, um domínio CaaX Box (exceto na lamina C), que é alvo de modificações como isoprenilação e metilação (HUTCHISON, 2002).

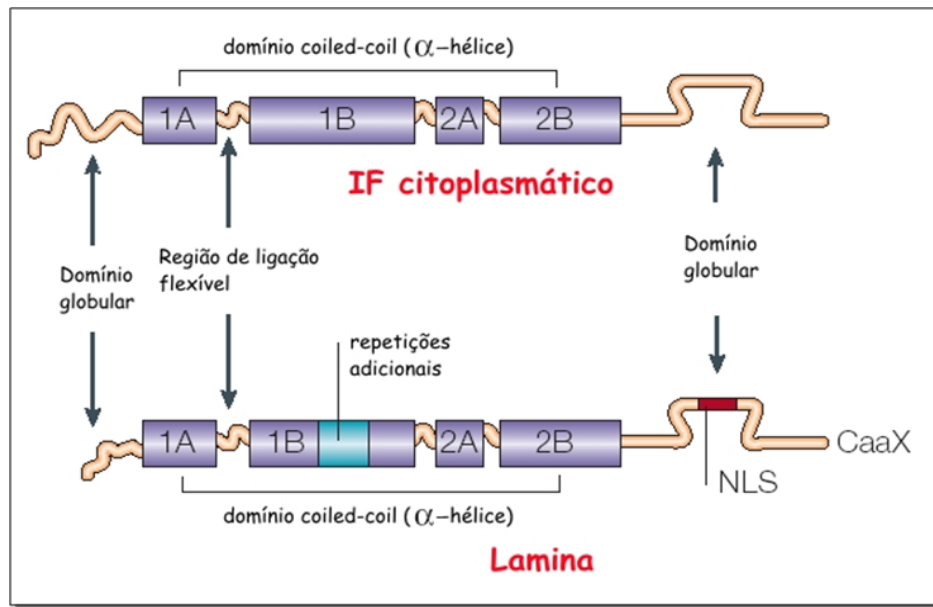


Figura 6: Estrutura dos Filamentos Intermediários (IF) e das Laminas.
Fonte: adaptada de HUTCHISON, 2002.

Muitas proteínas apresentam uma estrutura secundária do tipo alfa-hélice, onde as hélices estão entrelaçadas, gerando uma super-hélice que representa um dos motivos protéicos mais abundantes (LUPAS, 1995; BURKHARD *et al.*, 2001; LUPAS & GRUBER, 2005). Tal estrutura foi primeiramente descrita em 1952 para a proteína fibrosa, alfa-queratina (CRICK, 1952) e então denominada de *coiled-coil*.

Domínios *coiled-coil* estão presentes em proteínas envolvidas em uma grande variedade de processos celulares, como proteínas de citoesqueleto, proteínas motoras e diversos fatores de transcrição (LUPAS, 1996; BURKHARD *et al.*, 2001). Proteínas com domínios *coiled-coil* foram descritas na periferia do núcleo em células de cenoura (MASUDA *et al.*, 1997) e também associadas ao envelope nuclear em tomate e tabaco (MEIER *et al.*, 1996; GINDULLIS & MEIER, 1999; HARDER *et al.*, 2000).

Desde a publicação dos primeiros trabalhos mostrando a presença de lâmina nuclear em invertebrados e vertebrados (FAWCETT, 1966 *apud* AARONSON & BLOBEL, 1974; AEBI *et al.*, 1986) muitos foram os avanços a respeito de suas funções, não somente como um suporte mecânico, mas também exercendo um papel importante na organização estrutural do núcleo durante a replicação (BLUMENTHAL *et al.*, 2004; FOSTER & BRIDGER, 2005), transcrição, reparo do DNA (ELLIS *et al.*, 1997;

JAGATHEESAN *et al.*, 1999; MOIR *et al.*, 2000; SPANN *et al.*, 2002; MARALDI & LATTANZI, 2005), organização do fuso mitótico e segregação dos cromossomos (MOIR *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2000; TSAI *et al.*, 2006) e na organização da cromatina (DECHAT *et al.*, 2008).

Até o momento não há relatos da presença de lamínas em organismos unicelulares e plantas (MEWES *et al.*, 1998; COHEN *et al.*, 2001; BLUMENTHAL *et al.*, 2004; MANS *et al.*, 2004; MELCER *et al.*, 2007; DECHAT *et al.*, 2008).

1.6. O NÚCLEO DE *T. cruzi*

O núcleo de *T. cruzi*, assim como de outros tripanossomatídeos, apresenta uma organização estrutural similar à encontrada em outras células eucarióticas.

Nas formas replicativas o núcleo se apresenta ligeiramente esférico, com um nucléolo bem evidente, enquanto que nas formas infectivas o nucléolo não é evidenciado e o núcleo se apresenta alongado e localizado na porção central da célula (ELIAS *et al.*, 2001; DE SOUZA, 2002)

A membrana nuclear apresenta poros nucleares típicos e a continuidade entre a membrana nuclear externa e o retículo endoplasmático é evidente assim como em outras células eucarióticas (DE SOUZA, 2000; 2002).

A compactação da cromatina em *T. cruzi* é semelhante aos demais eucariotos, com a estruturação de filamentos nucleossomais típicos (ASTOLFI-FILHO *et al.*, 1980; RUBIO *et al.*, 1980), havendo a presença do octâmero formado por duas de cada histona H2A, H2B, H3 e H4. Porém a sequência aminoacídica das histonas de *T. cruzi* é distinta, especialmente da histona H1 que não possui a região globular, essa característica facilita a dissociação desta proteína dos nucleossomos, impedindo a formação de fibras de 30 nm (TORO & GALANTI, 1990; TORO *et al.*, 1992, 1993; HECKER *et al.*, 1994; revisto em ELIAS, NARDELLI & SCHENKMAN, 2009), conferindo à cromatina uma estrutura menos compacta (BELLI, 2000). Esse fato dificulta a avaliação estrutural dos cromossomos, por métodos citogenéticos convencionais, (VICKERMAN & PRESTON, 1970), portanto somente através de microscopia eletrônica

e confocal foi possível concluir que a divisão celular nos tripanossomas ocorre por mecanismo mitótico (DA SILVEIRA, 2000).

Durante o ciclo celular, há evidências de que a cromatina tem sua distribuição alterada. Na fase G1 das formas replicativas ela está concentrada no centro do núcleo. No início da fase S, se aglomera na periferia do núcleo, logo abaixo da membrana interna, onde ocorre a replicação (ELIAS *et al.*, 2002). A cromatina pode ser observada novamente no centro do núcleo, apenas depois da mitose. O nucléolo que é bem evidente na interfase se desestrutura durante a divisão celular e microtúbulos podem ser observados no interior do núcleo. Quando a divisão se completa, a cromatina e o nucléolo se reorganizam e assumem as posições vistas durante a interfase, enquanto os microtúbulos desaparecem (DE SOUZA, 2002; ELIAS *et al.*, 2002).

A dinâmica de alguns processos nucleares importantes como a transcrição, a replicação e a própria compactação do DNA vem sendo elucidada, revelando uma organização nuclear diferenciada em *T. cruzi*. A transcrição dos mRNAs é policistrônica, sendo assim, para que mRNAs maduros e independentes (monocistrônicos) sejam formados, o RNA policistrônico é processado pela adição, por *trans-splicing*, de uma sequência líder (mini-exon) na sua extremidade 5' e a poliadenilação na extremidade 3' (SCHURCH *et al.*, 1994; PALENCHAR & BELLOFATTO, 2006). Outra característica deste mesmo processo é que em *T. cruzi* a transcrição ocorre preferencialmente na região central do núcleo não sendo encontrados pontos individualizados de transcrição de mRNA, apenas a transcrição da sequência líder ocorre em um ponto definido próximo ao nucléolo (DOSSIN & SCHENKMAN, 2005 revisto em DANIELS; GULL & WICKTEAD, 2010), o que é justificado pela regulação pós-transcricional da expressão gênica nesse organismo.

Enquanto a transcrição dos mRNAs ocorre na região central do núcleo, a replicação ocorre apenas na periferia, no entanto os componentes da maquinaria encontram-se distribuídos no espaço nuclear, migrando para a periferia somente durante as fases G1/S do ciclo (figura 7). Isto sugere que os cromossomos se movam durante o ciclo celular em direção a determinados sítios onde, de forma organizada, os processos ocorrem (ELIAS *et al.*, 2002; GODOY *et al.*, 2009). Apesar de todas as

evidências da dinâmica da cromatina durante as fases do ciclo de vida de *T. cruzi* e da organização da mesma em determinadas regiões durante os processos celulares, pouco se conhece a respeito da formação de territórios cromossômicos.

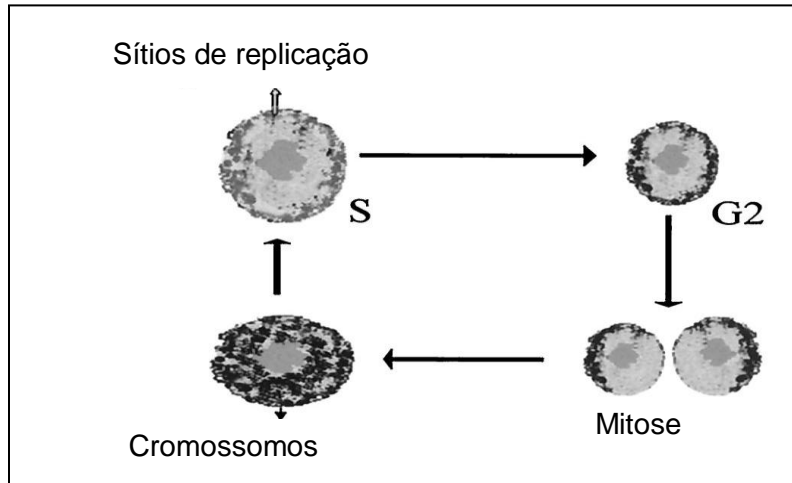


Figura 7: Modelo da dinâmica dos cromossomos durante o ciclo celular de *T. cruzi* (epimastigota).

Fonte: Adaptado de ELIAS *et al.*, 2002.

Com relação aos avanços na área da biologia molecular de tripanossomatídeos podemos citar alguns estudos que se concentraram na análise da condensação da cromatina; caracterização de histonas, suas variantes e padrões de expressão durante o ciclo de vida do parasita (TORO & GALANTI, 1990; TORO *et al.*, 1992, 1993; SABAJ *et al.*, 2001; MARQUES PORTO *et al.*, 2002; LOWELL *et al.*, 2005; JANZEN *et al.*, 2006; SIEGEL *et al.*, 2008, 2009; NARDELLI *et al.*, 2009); análise de enzimas-chave na manutenção da estrutura da cromatina, como as DNA topoisomerases do tipo II (FRAGOSO & GOLDENBERG, 1992; FRAGOSO *et al.*, 1998) e enzimas envolvidas nos mecanismos de reparo do DNA (PEREZ *et al.*, 1999, MACHADO *et al.*, 2006 revisto em ELIAS, NARDELLI & SCHENKMAN, 2009) além dos estudos já citados sobre os processos de replicação e transcrição (ELIAS *et al.*, 2001, 2002; DOSSIN & SCHENKMAN, 2005; GODOY *et al.*, 2009).

Porém até o momento, genes homólogos aqueles que codificam laminas não foram identificados em genomas de plantas e leveduras, nem em protozoários.

Contudo, a presença de estrutura semelhante à lâmina nuclear tem sido sugerida para proteínas contendo domínios *coiled-coil* localizadas na periferia nuclear de plantas e fungos (MASUDA *et al.*, 1997; DITTMER *et al.*, 2007; GOLDBERG *et al.*, 2008 revisto em DANIELS; GULL & WICKTEAD, 2010).

Genes para filamentos intermediários estão também ausentes no genoma de tripanossomatídeos e proteínas com características de laminas aparentemente não estão codificadas no genoma de *T. cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania major* (EL-SAYED *et al.*, 2005b).

Se a lâmina nuclear, em mamíferos, apresenta inúmeras e importantes funções na organização estrutural e funcional do compartimento nuclear, nos organismos onde os principais componentes dessa estrutura não estão representados existirá uma estrutura semelhante? E se existir, qual o seu componente principal?

Em 2001, ROUT & FIELD mostraram a presença de uma estrutura robusta na periferia do núcleo de *T. brucei* semelhante à lâmina nuclear composta principalmente por uma proteína filamentosa com domínios *coiled-coil* denominada NUP-1.

Ao analisar biblioteca normalizada de diferentes formas de *T. cruzi*, nosso grupo encontrou clones de EST (*expression sequence tag*) de proteínas com domínio repetitivo. A análise desses clones revelou que as sequências apresentavam homologia com a proteína recentemente caracterizada como sendo componente da lâmina nuclear em *T. brucei*, a NUP-1 (ROUT & FIELD, 2001).

Posteriormente Picchi (2006) identificou uma proteína de alta massa molecular (280 e 350 kDa, aproximadamente), localizada na periferia nuclear, como também descrito para NUP-1 de *T. brucei* (ROUT & FIELD, 2001). A análise estrutural da TcNUP-1 mostrou uma proteína com domínios *coiled-coil* sem hélices transmembrana, apresentando motivos de ligação ao DNA do tipo zíper de leucina (LAEERETLARGSAELEERVREL) em cada repetição.

Domínios *coiled coil* estão presentes em inúmeros grupos protéicos, conferindo alta plasticidade de funções e provavelmente proteínas contendo esse tipo de estrutura tenham sido recrutadas para funções nucleoesqueléticas em diversas ocasiões durante a evolução dos eucariotos (BURKHARD *et al.*, 2001; MANS *et al.*, 2004).

A caracterização de TcNUP-1 (PICCHI *et al.*, 2011) aliada a sua localização na periferia nuclear, tanto em formas replicativas quanto em formas infectivas de *T. cruzi* sugerem um papel similar ao das laminas, no que se refere a ancoragem da cromatina junto ao envelope nuclear.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Analisar a interação de TcNUP-1 com a cromatina de formas epimastigota e tripomastigota metacíclica de *Trypanosoma cruzi*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as sequências de DNA associadas à TcNUP-1 nas formas epimastigota e tripomastigota metacíclica de *T. cruzi*, através do ensaio de imunoprecipitação de cromatina (ChIP).
- Determinar a localização das sequências associadas à TcNUP-1, através de ensaios de hibridação *in situ* usando fluorescência (FISH).
- Avaliar o papel biológico TcNUP-1 através de nocaute gênico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. REAGENTES E SOLUÇÕES UTILIZADOS

3.1.1. Reagentes e consumíveis

- ✓ **Amersham Bioscience**: dNTPs; Hybond C; Hybond N; kit ECL de *western blotting*; anticorpo anti-Histidina; corante fluorescente para DNA Hoechst 33342; radioisótopo α -[P32]-dCTP (10 μ Ci/ μ l; 3.000 Ci/mmol); kit comercial para marcação por *Nick Translation*; colunas de Sephadex G-50 (ProbeQuant).
- ✓ **BioAgency**: Cubetas de eletroporação estéreis com *gap* de 0,2 cm.
- ✓ **Bio-Rad**: Acrilamida; agarose (UltraPure DNA grade); azul de Bromofenol; bis-acrilamida; persulfato de amônia; marcador de massa molecular na faixa de 1,05 a 3,13 Mpb (CHEF DNA - *H. wingei Chromosomes*).
- ✓ **Cultilab**: Soro Fetal Bovino; meio RPMI 1640.
- ✓ **Difco**: Bacto-ágar; bacto triptona; extrato de levedura; LIT; meio de congelamento para células animais.
- ✓ **Dupont**: Tela intensificadora para revelação em filmes de raios-x (Dupont Cronex Lightning Plus).
- ✓ **GE**: Colunas de proteína G sepharose para purificação de anticorpos.
- ✓ **Hyperfilm**: Filme para raios-X.
- ✓ **Invitrogen Inc.**: Kit TA cloning; pTrcHis-TOPO; EDTA; fenol; TRIS, Taq DNA polimerase; IPTG; agarose; X-Gal; marcador de massa molecular Bench Mark; λ DNA/*HindIII*; 1 kb Plus DNA Ladder; Platinum Taq DNA polimerase *high fidelity*.
- ✓ **KPL**: Solução reveladora para ELISA.

- ✓ **Merck:** Acetato de Sódio; ácido acético glacial; CaCl_2 ; etanol absoluto; formaldeído; formamida; glicina; glicose; HCl; isopropanol; KCl; metanol; Na_2HPO_4 ; NaH_2PO_4 ; NaCl; NaOH; TCA; tolueno.
- ✓ **New England Biolabs:** Endonucleases de restrição.
- ✓ **Nunc:** Placas de poliestireno para cultivo celular.
- ✓ **Pierce Biotechnology Inc.:** SDS; Micro-BCA Protein Assay Kit.
- ✓ **Promega:** Reagentes para revelação com fosfatase alcalina (NBT e BCIP); anti-IgG de camundongo e coelho conjugado com peroxidase; pGEM-T Easy vector.
- ✓ **Qiagen:** Oligonucleotídeos; kit MiniElute; QIAprep Spin Miniprep kit.
- ✓ **Roche:** kit para purificação de produto de PCR: *High Pure PCR Product Purification*; coquetel de inibidores de proteases sem EDTA; *DIG-High Prime* (Cat.11585606910).
- ✓ **Serva Electrophoresis:** Alu-Gel S.
- ✓ **Sigma:** Acetato de amônia; ampicilina; brometo de etídeo; BSA; glicerol; HEPES; MgCl_2 ; tetraciclina; β -mercaptoetanol; DEAE-celulose; Tween 20; anticorpos anti-IgG de coelho e mouse conjugado a Alexa 488 e 546; adjuvantes completo e incompleto de Freund; GTP; ATP; proteína-A e proteína-G *sepharose*; meio HAT; meio HT; PEG; anticorpo anti-DIG (D8156) produzido em camundongo; anticorpo anti-IgG, IgA, anti-IgM conjugado com peroxidase; *ethylene glycolbis[succinimidyl succinate]* (EGS); neomicina (G418); higromicina.
- ✓ **Southern Biotech:** *SBA Clonotyping™ HRP System*.
- ✓ **Stratagene:** Vetor comercial *pBluescript II KS*.

3.1.2. Tampões e Soluções e Meios de Cultivo

- 1) **Fenol-clorofórmio-álcool isoamílico**: Fenol saturado 25 partes, clorofórmio 24 partes, álcool isoamílico 1 parte, Tris-HCl 100 mM pH 8,0 10 partes.
- 2) **LB**: Luria Bertani. Meio de cultura contendo triptona 1 %, extrato de levedura 0,5 % e NaCl 1 %. Esterilizado em autoclave.
- 3) **LIT**: do inglês: *Liver Infusion-Tryptose*. Meio de cultura contendo infuso de fígado 0,5 % (Difco), NaCl 75,3 mM, KCl 5,4 mM, glicose 10 mM, bacto-triptose 0,5 % (Difco), Na₂HPO₄ 56,4 mM, hemina 0,0025 %, soro fetal bovino 10 % (CultLab) e extrato de levedura 15 g/L. Esterilizado por filtração e mantido a 4 °C.
- 4) **Meio HAT**: Meio Hipoxantina Aminopterina Timidina. RPMI suplementado com 10 mM hipoxantina; 1,6 mM timidina; 0,04 mM aminopterina
- 5) **Meio HT**: Meio Hipoxantina Timidina. RPMI suplementado com 10 mM hipoxantina; 1,6 mM timidina
- 6) **Meio RPMI**: Meio *Roswell Park Memorial Institute*. Contendo: 41,6 g de meio RPMI comercial em pó, 8,0 g de Bicarbonato de Sódio, 9,2 g de Hepes. Para a obtenção do meio completo deve-se adicionar 20% de Soro Fetal Bovino, 1% do volume final de Glutamina 100mM; 1% do volume final de Piruvato de Sódio.
- 7) **Mix de dNTP**: dATP, dCTP, dGTP e dTTP (Amersham Biosciences) foram misturados e diluídos em Tris-HCl 10 mM pH 7,5 para obter uma solução estoque com concentração final de 2,5 mM de cada nucleotídeo. Mantido em congelador – 20 °C.
- 8) **PEG**: Polietilenoglicol - 50% v/v em meio RPMI sem soro fetal bovino.
- 9) **PBS**: solução tampão contendo NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 4,3 mM e KH₂PO₄ 1,5 mM. Mantida a 4 °C.
- 10) **PBST**: solução contendo PBS e Triton X-100 0,075 %.

- 11) **Solução de bloqueio para imunofluorescência:** solução contendo PBS e BSA 1 % (do inglês: bovine serum albumin).
- 12) **Solução de bloqueio para FISH:** SSPE 2x; Formamida 50%; Dextran 10%; ssDNA salmon sperm 0,1mg/mL, BSA 0,02%
- 13) **Solução de bloqueio para *western blot*:** solução contendo PBST e leite em pó desnatado 5 %.
- 14) **Solução de Denhardt:** Ficoll 0,02 % (tipo 400, Pharmacia), polivinilpirrolidona 0,02 % (Sigma) e BSA 0,02 % (albumina sérica bovina). Mantida em congelador – 20 °C.
- 15) **Solução de hibridação de DNA:** solução contendo SSC 6 X, solução de Denhardt 5 X, SDS 0,1 % e DNA de esperma de salmão fita simples 100 µg/ml. Mantida em congelador – 20 °C.
- 16) **Tampão SSC 20X:** NaCl 3M e Citrato trisódico 2-hidrato 0,3M.
- 17) **Solução de hibridação de RNA:** solução contendo formamida 50 %, solução de Denhardt 1 X, SSC 5 X, SDS 0,5 % e DNA de esperma de salmão fita simples 50 µg/ml. Mantida em congelador – 20 °C.
- 18) **Solução de lise de hemácias** – cloreto de amônio na concentração de 168 mM.
- 19) **SSPE 1x:** NaCl 0,18M; NaH₂PO₄ 10 mM; EDTA 1 mM; pH 7,7 – 7,9
- 20) **Solução reveladora para ELISA:** Contendo o substrato enzimático e o cromógeno: *Sure Blue Reserve TMB Microwell Peroxidase substrate*.
- 21) **Solução de Brometo de Etídio:** 5,0 µg/mL de brometo de etídio em água destilada.
- 22) **Solução descorante de proteínas:** Metanol 30%, ácido acético 10%, água 60%.
- 23) **Solução de lise para eletroforese de pulsos alternados (PFGE):** EDTA 0,5 M pH 9,0; Sarcosyl 1%, Proteinase K 0,5 mg/mL.

- 24) **Solução PSA 2%:** Fosfato de sódio 75 mM pH 8,0; NaCl 65 mM; Agarose *Low Melting* 2%.
- 25) **Solução PSG:** Fosfato de sódio 75 mM pH 8,0; NaCl 65 mM, Glicose 1,5%.
- 26) **Tampão de amostra para proteína:** solução contendo Tris-HCl 40 mM pH 6,8, SDS 1 %, β -mercaptoethanol 2,5 %, glicerol 6 % e azul de bromofenol 0,005 %. Mantida em congelador - 20 °C.
- 27) **Tampão de eluição ChIP:** solução contendo Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 10 mM e SDS 1 %.
- 28) **Tampão de lavagem ChIP:** solução contendo Tris-HCl 10 mM pH 8,0, LiCl 250 mM, deoxicolato de sódio (DOC) 0,5 %, EDTA 1 mM e NP-40 0.5 %.
- 29) **Tampão de lise de bactérias:** solução contendo Tris-HCl 20 mM pH 8,0 e NaCl 0,5 M.
- 30) **Tampão de lise para ChIP:** solução contendo HEPES 50 mM pH 7,5, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, deoxicolato de sódio (DOC) 0,1 %, NP-40 1 %, PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride, Sigma) 1 mM e 1 pastilha de inibidor de proteases (COMPLETE Mini Protease inhibitor cocktail tablet, Roche).
- 31) **Tampão TBE:** solução contendo Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM. Mantida à temperatura ambiente.
- 32) **Tampão TELT:** Solução contendo Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 62,5 mM pH 9,0, LiCl 2,5 M e Triton X-100 4%.
- 33) **Tampão NKM:** Solução tampão contendo cloreto de sódio (N), cloreto de potássio (K) e cloreto de magnésio (M). Hepes 10 mM pH 7,4; KCl 5 mM; MgCl₂ 1,5 mM e NaCl 140 mM.
- 34) **Tampão para transferência (*western blot*) 1x:** Tris-base 25 mM; glicina 192 mM; metanol 20 %.

- 35) **Tampão de eletroforese para SDS-PAGE 1X:** Tris-base 25 mM; Glicina 192 mM; SDS 0,1%
- 36) **Tampão da fosfatase alcalina:** Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM.
- 37) **Tampão de amostra para DNA 10X:** Ficoll 400 25%, Azul de bromofenol 0,25%; Xileno cianol FF 0,25%.
- 38) **Tampão de eletroporação de *T. cruzi*:** NaCl 140 mM, HEPES ácido 25 mM, Na₂HPO₄ 0,74 mM.
- 39) **TAU:** do inglês: *triatomineae artificial urine*. Solução para indução de estresse, contendo: NaCl 190 mM, KCl 17 mM, MgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 2 mM e tampão fosfato pH 6,8 mM. Filtrado esterilmente e mantido a 4 °C.
- 40) **TAU 3AAG:** Solução TAU suplementado com L-prolina 10 mM, glutamato sódico 50 mM, aspartato sódico 2 mM e glicose 10 mM. Filtrado esterilmente e mantido a 4 °C.
- 41) **TBS:** solução contendo Tris-HCl 20 mM pH 8,0 e NaCl 150 mM. Mantida a 4 °C.
- 42) **TBST:** solução contendo TBS e Tween 20 0,05 %.
- 43) **TE:** solução contendo Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM. Mantida a 4 °C.

3.2. PRODUÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL

3.2.1. Animais

A região do gene *TcNUP-1* correspondente a três repetições da proteína foi expressa em bactéria e utilizada como antígeno para a inoculação de camundongos da linhagem BALB/c (*Bagg-Albino C*), com aproximadamente 6 semanas de idade, oriundos do biotério do ICC.

Antes do início do protocolo de imunizações foi colhido sangue dos animais a fim de se obter o soro pré-imune. Nesse momento testou-se a reatividade do mesmo através de ensaios de *western blot* e imunofluorescência indireta (IFI) contra extrato protéico de *T. cruzi* e contra polipeptídeo recombinante.

Cada animal foi inoculado 4 vezes, por via intraperitoneal, com intervalo de 12 dias entre as imunizações. Na primeira inoculação utilizou-se 50 µg de TcNUP-1 recombinante emulsionada em Adjuvante Completo de Freund. Nas demais inoculações utilizou-se 20 µg do antígeno em 77 µL de Alu-Gel. Após a quarta inoculação foi coletado o soro para a avaliação da resposta humoral através dos ensaios de: imunoadsorção enzimática do tipo ELISA (do inglês - *enzyme linked immunosorbent assay*), *western blot* e IFI. Os animais reagentes foram submetidos a uma dose suplementar de 10 µg de antígeno sem adjuvante por via endovenosa. No terceiro dia após a última inoculação os animais foram anestesiados, submetidos à punção cardíaca para obtenção do soro imune. Os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPR (Processo nº 23075034070/2007-78).

3.2.2. Fusão Celular

As células de mieloma murino da linhagem Ag8XP.653 foram mantidas em cultivo *in vitro* com meio RPMI 1640, adicionado de 20% de Soro Fetal Bovino (SFB), 1% de Piruvato de Sódio, 1 mM de Glutamina, Penicilina/ Estreptomicina (50 U/ µg /mL) em temperatura de 37 °C sob atmosfera de 5% de CO₂.

Para o procedimento da fusão celular, o baço de cada animal foi retirado em fluxo laminar através de incisão cirúrgica e macerado entre lâminas esterilizadas de extremidade fosca, em placa de Petri contendo o meio RPMI 1640 sem SFB. A suspensão de células resultante foi filtrada em ponteiras preenchidas com filtro de nylon, centrifugada a $1.500 \times g$ por 10 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o sobrenadante descartado. As células foram recuperadas em solução de lise de hemácias e mantidas no gelo durante 5 min. Após esse período, as células foram lavadas em RPMI 1640 sem SFB.

As células de mieloma foram transferidas para tubos cônicos, centrifugadas a $2.000 \times g$ por 5 min em temperatura ambiente e recuperadas em 10 mL de meio RPMI sem SFB.

A fusão entre os dois tipos celulares, na proporção de 1 célula de mieloma para 5 células esplênicas, foi realizada, utilizando-se polietilenoglicol 50% (PEG), segundo protocolo de Mazzarotto *et al.* (2009). As células submetidas a esse procedimento foram centrifugadas, recuperadas em meio RPMI com 20% de SFB e distribuídas em placas de 96 cavidades, com aproximadamente 1×10^5 células por cavidade. Após 24 h de cultivo, iniciou-se o processo de seleção bioquímica dos híbridos pela adição do meio HAT. O meio foi trocado a cada 48 h até aproximadamente o 15º dia após a fusão, quando foi sendo substituído gradativamente pelo meio HT. A partir do 19º dia após a fusão o meio utilizado foi RPMI acrescido de 20% de SFB. Durante todo o período de cultivo as placas foram mantidas em estufa a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob atmosfera de 5% de CO_2 .

Os hibridomas secretores de anticorpos anti-TcNUP-1 foram selecionados através de ensaio de ELISA e sua reatividade foi confirmada em ensaio de IFI.

Após clonagem por diluição limitante, os clones com reação positiva no ELISA e IFI foram submetidos a dois ciclos sucessivos de congelamento a fim de verificar sua estabilidade e mantidos em cultivo *in vitro* no meio RPMI acrescido de 20% de SFB até densidade adequada para expansão do cultivo e posterior ensaios de *western blot*.

3.2.3. Tipificação de Isotipo

A isotipagem dos anticorpos monoclonais foi realizada por ELISA de captura, utilizando o kit comercial *SBA Clonotyping™ HRP System*, conforme descrito pelo fabricante, utilizando-se como controles o soro do animal e o meio de cultivo, RPMI.

3.2.4. Purificação do Anticorpo Monoclonal

Para a purificação do anticorpo monoclonal o sobrenadante da cultura do clone selecionado durante a triagem foi concentrado em duas etapas de precipitação com acetato de amônio 30%, o sedimento foi ressuspendido em PBS e dialisado com 200 volumes de tampão fosfato 20 mM pH 7,0 contendo 1 mM de solução de inibidor de protease (PMSF). Posteriormente o material foi aplicado sobre uma coluna de Proteína G-Sepharose. O material foi então lavado com 10 volumes de coluna de tampão fosfato 20 mM pH 7,0 e posteriormente o anticorpo monoclonal foi eluído com glicina pH 2,7. O pH das frações foi imediatamente neutralizado com tampão Tris 1 mM pH 9,0.

A concentração protéica das frações obtidas foi determinada pelo método de Bradford e aquelas situadas nos picos protéicos foram agrupadas. A pureza das frações foi avaliada em SDS-PAGE e *western blot*. A reatividade e especificidade do anticorpo foram testadas pelos métodos de ELISA, IFI e *western blot* utilizando extratos protéicos de *T. cruzi*, *E. coli* e a polipeptídeo recombinante utilizada na imunização.

3.3. ELISA

Durante o processo de seleção de hibridomas e clones secretores de anticorpos foi necessário selecionarmos um teste que possibilitasse a triagem de um grande número de amostras em curto período, portanto elegemos o teste do tipo ELISA, por ser sensível e rápido. Para isso foi necessário a padronização *in house* deste ensaio, utilizando como antígeno a proteína (TcNUP-1) recombinante, expressa de forma solúvel em sistema bacteriano. Utilizamos como controle os soros pré-imune e imune,

ambos previamente testados em ensaios de *western blot* e imunofluorescência indireta (IFI).

Placas de poliestireno de 96 cavidades foram sensibilizadas com 50 ng de antígeno por cavidade, diluído em tampão carbonato-bicarbonato pH 8,0 e mantidas durante 18 h a 4 °C. Após esse período as placas foram lavadas 3x com TBS-T 0,05%, bloqueadas com solução de bloqueio contendo 5% leite desnatado em TBS-T 0,05% e mantidas durante 2 h a 4 °C. Posteriormente as placas foram lavadas com o mesmo tampão da etapa anterior e em cada orifício foi aplicado um volume de 100 µL de cada amostra e controles diluídos em solução de bloqueio e mantidos por 1 h a 37 °C. O sobrenadante da cultura de híbridos ou clones foi utilizado sem diluição, da mesma forma com o meio RPMI 1640 com 20% de SFB que foi incluído como controle. Após a incubação as placas foram novamente lavadas com TBS-T 0,05% e a cada orifício foram aplicados 100 µL de conjugado (anti-IgG, IgA, IgM de camundongo conjugado com Peroxidase) diluído em solução de bloqueio e incubado durante 1h a 37 °C. Após novo ciclo de lavagem foi aplicado um volume de 50 µL de solução reveladora, contendo o substrato enzimático e o cromógeno. Após 10 min a reação foi interrompida com a adição de 50 µL de H₂SO₄ 2 M. A leitura foi efetuada em espectrofotômetro (Stat Fax modelo 2600) no comprimento de onda de 492 nm. As amostras que apresentaram uma densidade óptica igual ou maior de 0,2 foram consideradas reagentes e submetidas aos ensaios de IFI e *western blot*.

3.4. CULTIVO DE *Trypanosoma cruzi*

As formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, clone Dm28c (GOLDENBERG *et al.*, 1984; CONTRERAS *et al.*, 1985) foram cultivadas em meio LIT a 28 °C (CAMARGO, 1964) com passagens a cada três dias com inóculo inicial de 1x10⁶ células/mL.

3.5. METACICLOGÊNESE *IN VITRO*

As formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* foram obtidas *in vitro*, sob condições quimicamente definidas de acordo com protocolo descrito por Contreras *et al.* (1985a,b) e Bonaldo *et al.* (1988). Os parasitas em fase estacionária na curva de crescimento foram coletados por centrifugação (8.000 x *g* por 10 min a 4 °C) e incubados em TAU (5x10⁸/mL) por 2 h a 28 °C. Decorrido esse período de estresse nutricional, os parasitas foram transferidos para garrafas de cultura contendo o mesmo meio, suplementado de glicose e os aminoácidos prolina, glutamato e aspartato de sódio (TAU3AAG). Após 96 h de incubação as formas tripomastigotas metacíclicas foram recolhidas do sobrenadante do meio de cultura e purificadas por cromatografia em DEAE-51 celulose (CONTRERAS *et al.*, 1985).

3.6. OBTENÇÃO DE DNA DE *Trypanosoma cruzi*

A extração e purificação do DNA foram realizadas conforme descrito por Medina-Acosta & Cross (1993). Aproximadamente 1x10⁷ epimastigotas mantidas em crescimento exponencial (item 3.4) foram coletadas por centrifugação a 8.000 x *g* por 10 min a 4 °C, lavadas em PBS e ressuspensas em 350 µL de tampão TELT. Após 5 min de incubação em temperatura ambiente foi adicionado o mesmo volume de fenol/clorofórmio e o material foi centrifugado a 13.000 x *g* por 10 min. A fase aquosa foi recolhida e o DNA foi precipitado com o dobro do volume (2V) de etanol absoluto e coletado por centrifugação a 13.000 x *g* por 10 min. O DNA presente no sedimento foi lavado com etanol 70%, seco e em seguida ressuspensado em tampão TE contendo 20 µg/mL de RNase.

3.7. EXTRATO PROTÉICO DE *Trypanosoma cruzi*

As formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT até a densidade de 1 x 10⁷ células/mL e coletadas por centrifugação (8.000x *g*, 10 min a 4 °C), lavados

duas vezes em PBS pH 7,2. Após as lavagens os parasitas foram ressuspensos em PBS (contendo solução de inibidores de proteases) e lisados em tampão de amostra para proteína para uma densidade de 1×10^6 células/ μ L. Os extratos foram fervidos por 5 min e armazenados a -70 °C.

3.8. IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI)

Para os ensaios de imunofluorescência, formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento, foram coletadas por centrifugação a $8.000 \times g$ por 10 min a 4 °C, lavados e ressuspensos em PBS pH 7,2.

Os parasitas foram aderidos à superfície de lâminas pré-tratadas com solução de poli-L-lisina 0,1% e mantidos durante 20 min a temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas com PBS pH 7,2 e os parasitas foram fixados com ρ -formaldeído 4%. Após lavagem com PBS, os parasitas foram então tratados com solução de Triton X-100 a 0,1% em PBS durante 2 min a temperatura ambiente. As lâminas foram novamente lavadas e incubadas com solução de bloqueio a 1% [BSA (do inglês: *bovine serum albumin*) em PBS] durante 12 h a 4 °C. Após esse período, os parasitas fixados foram incubados com os soros teste e controle, diluídos 1:400 e incubados por 1 hora a 37 °C, em câmara úmida. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas por 1h a 37 °C com o anticorpo anti-IgG conjugado a Alexa Fluor 488 (diluição de 1:600 em solução de bloqueio). Após a incubação com o anticorpo secundário, os parasitas foram incubados com o corante Hoechst 33342 e mantido por 6 min a temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas e montadas com n-propil-galato e lamínula. O material foi observado em microscópio óptico Nikon modelo E600, equipado para microscopia epi-fluorescente.

3.9. ENSAIO DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DA CROMATINA (ChIP)

3.9.1. epi-ChIP

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em 100 mL de LIT a 28 °C (item 3.4) até uma densidade de 1×10^7 células/mL. Em seguida, os parasitas foram coletados por centrifugação a $8.000 \times g$ por 10 min a 4 °C e o sedimento celular foi ressuspenso em 50 mL de PBS pH 7,2. Imediatamente após a etapa anterior, os parasitas foram fixados sucessivamente com EGS 1,5 mM (*ethylene glycolbis[succinimidyl succinate]*) durante 20 min e formaldeído para uma concentração final de 1% (Sigma) por 10 min à temperatura ambiente, sob agitação intermitente. A reação de fixação foi interrompida pela adição de glicina para uma concentração final de 125 mM por 5 min. Os parasitas foram coletados por centrifugação a $8.000 \times g$ por 10 min a 4 °C e lavados uma vez com PBS gelado contendo glicina 125 mM e duas vezes apenas com PBS. O sedimento foi ressuspenso em um volume de tampão de lise para ChIP necessário para se obter uma densidade de 1×10^9 parasitas/mL e sonificado (microtip, power setting 4, Ultrasonic Homogenizer 4710 series, Cole-Parmer) 10 vezes por 10 s em banho de gelo, com intervalo de 1 min entre os pulsos. As amostras foram centrifugadas a $30.000 \times g$ por 40 min a 4 °C. O sedimento foi descartado e o sobrenadante (sobrenadante pós-sonicação) foi utilizado para a etapa de imunoprecipitação.

O protocolo de imunoprecipitação foi desenvolvido com adição de 1 µg de anticorpo monoclonal anti-TcNUP-1 ao sobrenadante pós-sonicação durante 2 h a 4 °C sob agitação orbital constante. Após esse período o material foi centrifugado a $14.000 \times g$ por 15 min a 4 °C e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 40 µL de resina de proteína-G Sepharose pré-tratada com solução de BSA na concentração de 5 mg/mL e então incubado por 2 h a 4 °C sob agitação constante. Em seguida, as reações foram lavadas duas vezes com 1 mL de tampão de lise para ChIP, duas vezes com 1 mL tampão de lavagem ChIP e duas vezes com TE. Então, a cromatina imunoprecipitada foi eluída duas vezes a 65 °C por 20 min sob agitação (400 rpm) com

125 μ L de tampão de eluição. As amostras foram incubadas por 16 h a 65 °C para reverter a ligação proteína-DNA. O DNA foi então purificado com fenol clorofórmio e suas extremidades foram reparadas com Klenow de acordo com protocolo padrão (SAMBROOK *et al.*, 1989). Esse material foi então purificado com kit comercial *Mini Elute*.

O soro pré-imune dos camundongos foi utilizado como controle negativo nos experimentos de imunoprecipitação de cromatina, seguindo o mesmo protocolo acima descrito.

3.9.2. meta-ChIP

Formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* purificadas como descrito no item 3.5 foram coletadas por centrifugação a 8.000 x *g* por 15 min a 4 °C e o sedimento celular foi ressuspendido em 50mL de PBS pH 7,2. As etapas subsequentes foram desenvolvidas como descrito no item 3.9.1.

3.10. CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE SEQUENCIAS TcNUP-1 ESPECÍFICAS

A partir do DNA reparado, obtido no ensaio de ChIP, foi construída uma biblioteca em plasmídeo pGEM T-easy[®]. A reação de clonagem utilizando 3,8 μ L desse DNA purificado, Rapid ligation buffer 1 X, 10 ng de pGEM-T Easy vector e 3 U de T4 DNA ligase foi realizada à temperatura ambiente por 1 h e então, foi usada para transformar células *E. coli* XL1-blue eletrocompetentes de acordo com protocolo padrão (SAMBROOK *et al.*, 1989). Os plasmídeos recombinantes foram obtidos com o kit comercial *QIAprep Spin Miniprep* e sequenciados em um sequenciador automático de DNA (modelo ABI 3100, Applied Biosystems). As sequências obtidas foram analisadas utilizando o algoritmo BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997). Com a finalidade de localizar esses fragmentos, as sequências obtidas foram comparadas com as sequências publicadas do projeto genoma de *T. cruzi* (EL-SAYED *et al.*, 2005a) tanto nos bancos de dados do TIGR quanto do NCBI.

3.11. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS IMUNOPRECIPITADAS POR PCR QUANTITATIVO (qPCR)

Com o objetivo de confirmar as sequências de DNA especificamente associadas à TcNUP-1, 1ng de DNA purificado a partir dos ensaios de ChIP, utilizando (a) anticorpo monoclonal, (b) soro pré-imune e (c) do DNA obtido do sobrenadante pós-sonicação não submetido à imunoprecipitação (*input*) foram utilizados como molde para as reações de PCR quantitativo. Para isso foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores desenhados a partir de clones obtidos no ensaio de ChIP (tabela 1). Para minimizar a variabilidade inerente à técnica realizamos este ensaio em 3 réplicas biológicas e 3 réplicas técnicas. A curva padrão foi obtida a partir de diluições seriadas de 5 concentrações de DNA genômico de *T. cruzi*, com razão 4 entre cada ponto. As reações foram processadas em termociclador modelo Light Cycler® 480 Real-Time PCR Systems (Roche) submetidas a uma desnaturação inicial de 95 °C por 5 min, seguida de 45 ciclos de desnaturação a 95 °C por 10 segundos, hibridação a 60 °C por 40 segundos e extensão a 72 °C por 1 min e um ciclo de dissociação. A leitura da emissão fluorescente foi realizada a cada etapa de extensão.

Para a normalização foram selecionados iniciadores para amplificar parte dos genes que codificam para β -tubulina e metaciclina II (tabela 1). A concentração relativa de cada alvo foi obtida pela razão deste pelo valor obtido para os normalizadores.

TABELA 1. OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NO PCR QUANTITATIVO.

À esquerda, a identificação das sequências utilizadas como normalizadores e dos clones selecionados obtidos do ensaio de ChIP.

Identificação		Sequência dos Oligonucleotídeos (5'→3')
beta tubulina	Btub_F	GGCGCAGAGCTGATTGATT
	Btub_R	GTACCACCGCCAAGAGAGTG
metaciclina II	metacicl_F	AGGATGCGAGGATGAAAAAAG
	metacicl_R	GGGATGTGTTAATGAGATAAG
ChIP_clone 8	8_F	GTGCTTCGTGGGGTGAGG
	8_R	GAGGTGCGTGAGAGTGAGTG
ChIP_clone 14	14_F	CACACCACCTCCCCTCTTT
	14_R	GCTCTCTCTCCCTCACTCTCAC
ChIP_clone 15	15_F	CCGCAACTCCATGATGTCC
	15_R	TCCATTGTCTCTCCACGACT
ChIP_clone 23	23_F	GAGGTTTGTATCGTGTCCAGAG
	23_R	TGCGGGCAGTGTATTTGTT
ChIP_clone 26	26_F	CCAAGCAGCGGATAATTCAG
	26_R	ATGGCGGGAGTCAGAGACA
ChIP_clone 27	27_F	GAGGCCCTTCCCTAATTGT
	27_R	CACTGATCCTCCTCCGTGTG
ChIP_clone 29	29_F	GCTGGTGGTCAGGAGACACT
	29_R	GACCGTCCCATCGTACTT
ChIP_clone 31	31_F	CCATTTGGCTCTGGTTTTTGT
	31_R	GAACGAACGGGATGAGATGA
ChIP_clone 32	32_F	CCCCTGACGGTTGTTGTGT
	32_R	GCGGGTTTTGGTTCTTCTTC
ChIP_clone 33	33_F	AATAGTCCGTGCCGATGATG
	33_R	TCAAGAGACCGCTGCAGTAA
ChIP_clone 36	36_F	ATCTGATGGACTTTCGGAGG
	36_R	TTCAGGCACAACGACAGCA

3.12. HIBRIDAÇÃO *IN SITU* USANDO FLUORESCÊNCIA (FISH)

A técnica de FISH foi realizada de acordo com o protocolo de Ersfeld; Asbeck; Gull, 1999, com modificações.

3.12.1. Marcação de sonda com Digoxigenina para FISH

A partir da biblioteca de ChIP foram selecionados alguns clones, de acordo com a sua distribuição e redundância nos cromossomos para serem utilizados como sonda (tabela 2).

Os clones selecionados foram digeridos com a enzima de restrição *EcoRI* para que o fragmento fosse liberado do vetor pGEM-T Easy. O fragmento liberado foi purificado a partir do gel de agarose 1% utilizando o kit comercial *High Pure PCR Product Purification*, conforme especificações do fabricante. Aproximadamente 500 ng de DNA purificado foram utilizados para a marcação, pela técnica de *random primer* com nucleotídeo ligado a digoxigenina. As reações foram realizadas em um volume final de 20µL, contendo o DNA previamente desnaturado a 95 °C por 10 min e 4µL de *High Prime Roche* (1U/µL Klenow; mix 5x concentrado de oligonucleotídeos randômicos; 1mM de cada: dATP, dCTP, dGTP e 0,65 mM de dTTP; 0,35 mM de dUTP marcado com digoxigenina em tampão 5x concentrado), durante 14h a 37 °C. Após esse período as reações foram interrompidas com 20 mM de EDTA pH 8,0 e as sondas purificadas pela adição de de LiCl 500 mM e posterior precipitação e lavagem com etanol absoluto e etanol 70%, respectivamente. O material foi mantido a -20 °C até o momento de uso.

Um fragmento de 132pb contendo a sequência do mini-exon de *T. cruzi* (K02631.1), gentilmente cedido pelo Dr. Sérgio Schenkman, UNIFESP, foi utilizado como controle exclusivo das condições técnicas, uma vez que estávamos padronizando este ensaio em nosso laboratório.

TABELA 2. SONDAS UTILIZADAS NO ENSAIO DE FISH.

Clone	Identidade	pb
8	Proteína hipotética conservada	560
9	Proteína hipotética conservada (pseudogene)	1680
14	Protease de superfície gp63	1211
33	Proteína de superfície associada à mucina (MASP)	1.670
36	β -galactofuranosil glicosiltransferase	967

Para os ensaios de FISH, os parasitas, em fase exponencial de crescimento, foram coletados por centrifugação a 7.000 x g por 5 min, lavados e ressuspensos em PBS pH 7,2. Em seguida, uma suspensão contendo 5×10^5 parasitas foi depositada em uma lâmina e mantida durante 20 min a temperatura ambiente, para que ocorresse a adesão das células à superfície da lâmina. Após esse período as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS pH 7,2. As células foram fixadas com ρ -formaldeído 4% e mantidas a temperatura ambiente por 15 min. Em seguida as lâminas foram novamente lavadas e os parasitas foram permeabilizados com solução de Triton a 0,1% em PBS durante 5 min a temperatura ambiente. Após um ciclo de 5 lavagens com PBS pH 7,2 as células foram submetidas a uma sequência de banhos de desidratação, em etanol gelado: etanol 70% durante 5 min; etanol 90% durante 5 min e etanol 100% durante 5 min. Após rápida secagem foi adicionado a solução de bloqueio para FISH e o sistema foi incubado durante 30 min a 37 °C. Após esse período, foi adicionado um volume de 60 μ L de sonda, em solução de hibridação para FISH, pré-aquecida a 85 °C durante 7 min. Foram testadas quatro concentrações de sonda: 7,5 ng/ μ L, 15 ng/ μ L, 30ng/ μ L e 60 ng/ μ L. A etapa de desnaturação foi executada em temperatura de 95 °C durante 5 min e a hibridação durante 14h a 37 °C em câmara úmida.

Após esse período o sistema foi submetido a três lavagens de 10 min com solução de SSC 2X/Formamida 50% a 37 °C; três lavagens de 4 min com SSC 2X a 50 °C; três lavagens de 20 min com SSC 0,2X a 60 °C e uma lavagem de 10 min com SSC 4X a temperatura ambiente. As lâminas foram então incubadas com anticorpo anti-digoxigenina (anti-DIG) diluído 1:400 e anticorpo anti-TcNUP-1 diluído 1:1000 em

solução de BSA a 2%. As lâminas foram mantidas a 37 °C durante 45 min e então lavadas 3 vezes com PBS pH 7,2. Após esse período, os parasitas foram incubados com os anticorpos secundários (anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa Fluor 488 e anti-IgG de coelho conjugado a AlexaFluor 546) diluídos 1:800 em solução de BSA a 2% a 37 °C durante 45 min. Após lavagem foi adicionado o corante de DNA *Hoechst* 33342 seguida da incubação por 10 min a temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas e montadas com N-propil-galacto e lamínula. O material foi observado em microscópio confocal LEICA SP5.

3.13. DELEÇÃO DO GENE *TcNUP-1* POR NOCAUTE GÊNICO

3.13.1. Amplificação e clonagem dos genes *npt* e *hph*

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

Os genes *neo* e *higro* foram amplificados a partir dos plasmídeos pSV2-neo e pPGK-Hyg, gentilmente cedidos pelo Dr. Gregory Buck, Virginia Commonwealth University, EUA. Foram utilizados 100 ng do plasmídeo correspondente, 10 pmol dos oligonucleotídeos iniciadores (tabela 3), 200 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, tampão Taq DNA polimerase, 2,5 unidades de *Platinum Taq DNA polimerase high fidelity*. As reações foram processadas em termociclador modelo 9700 (Applied Biosystems, EUA) com a desnaturação por 4 min a 94 °C, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, hibridação a 55 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 1 min.

TABELA 3. RELAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DOS GENES *neo* E *higro*.

Identificação	Sítios de Restrição	Sequência dos oligonucleotídeos (5'→3')
NEOF	<i>Hind</i> III	GGG AAGCTT ATGATTGAACAAGATGGATTG
NEOR	<i>Eco</i> RI	GGG GAATTC AGAAGAAGCTCGTCAAG
HIGROF	<i>Hind</i> III	AGCT AAGCTT ATGAAAAAGCCTGAACTCACC
HIGROR	<i>Eco</i> RI	TCGGTCG GAATTC ACTCTATTCTTTGC

Os sítios de reconhecimento para as endonucleases de restrição, adicionados aos oligonucleotídeos iniciadores, estão indicados em negrito.

O material amplificado foi purificado usando o kit *High Pure PCR Product Purification* e digerido com as enzimas apropriadas para a clonagem dos fragmentos no vetor comercial pBluescript II KS, digerido com as mesmas enzimas. A montante dos genes *neo* e *higro*, em cada construção, foi clonado um fragmento correspondente à região intergênica (350 pb) entre *Enolase* e *Kap-3* de *T. cruzi* e a jusante um fragmento correspondente à região intergênica (500pb) entre as duas cópias de *GAPDH* de *T. cruzi*. Os plasmídeos recombinantes foram denominados de pNeo-2 e pHigro-2.

3.13.2. Amplificação e clonagem das regiões do gene *TcNUP-1*

Na (figura 8) estão indicadas as duas regiões escolhidas do gene *TcNUP-1* para serem utilizadas nas construções para os ensaios de deleção gênica. Uma delas de 548pb, que codifica para parte da região amino (denominado de NupN) e a outra de e 617pb, que codifica parte da região carboxi (denominado de NupC) de *TcNUP-1*. Cada região foi amplificada por PCR, usando 10 pmol dos oligonucleotídeos iniciadores descritos na tabela 4, 100ng de DNA genômico de *T. cruzi* Dm28c (Item 3.6), dNTPs

200 μ M, de $MgCl_2$ 1,5 mM, tampão Taq DNA polimerase e 2,5 unidades de Taq DNA polimerase, em um volume final de 50 μ L. As reações foram processadas em termociclador modelo 9700 (Applied Biosystems, EUA) com a desnaturação por 4 min a 94 °C, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, hibridação a 55 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 1 min. O DNA purificado foi digerido com enzimas de restrição apropriadas para a clonagem dos fragmentos nos vetores pNeo-2 ou pHgro-2.

Os plasmídeos resultantes desta clonagem foram denominados de pNupN-neo-NupC e pNupN-higro-NupC (figura 9).

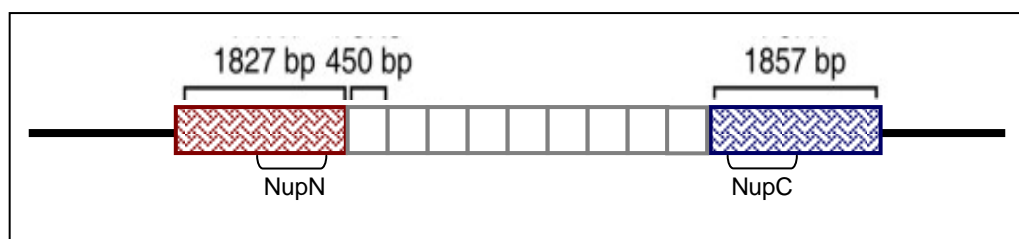


Figura 8. Esquema das regiões do gene *TcNUP-1*.

Legenda: Em vermelho e azul estão representadas as regiões que codificam para a porção amino e carboxi-terminal de *TcNUP-1*, respectivamente. Em cinza, estão representadas as repetições. NupN e NupC= regiões utilizadas nas construções para os ensaios de deleção gênica.

TABELA 4. RELAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES DO GENE *TcNUP-1*. Em negrito a sequência de reconhecimento para as enzimas de restrição correspondentes aos sítios de clonagem no vetor pBluescript II KS.

Identificação	Sítios de Restrição	Sequência dos oligonucleotídeos (5'→3')
NocN-F	<i>Kpn</i> I	AGG GGTACCT TACAACGGCTCAAGTATTTGCAG
NocN-R	<i>Sal</i> I	CCCG TGACT TTTGGCACCTTTCTATTCTCC
NocC-F	<i>Bam</i> HI	TTC GGATCC GGAAAACAATGATGGAGAGGAGCATG
NocC-R	<i>Xba</i> I	GCCT CTAGAT GTGCTCCAGAAACGTGATGC

Os sítios de reconhecimento para as endonucleases de restrição, adicionados aos oligonucleotídeos iniciadores, estão indicados em negrito.

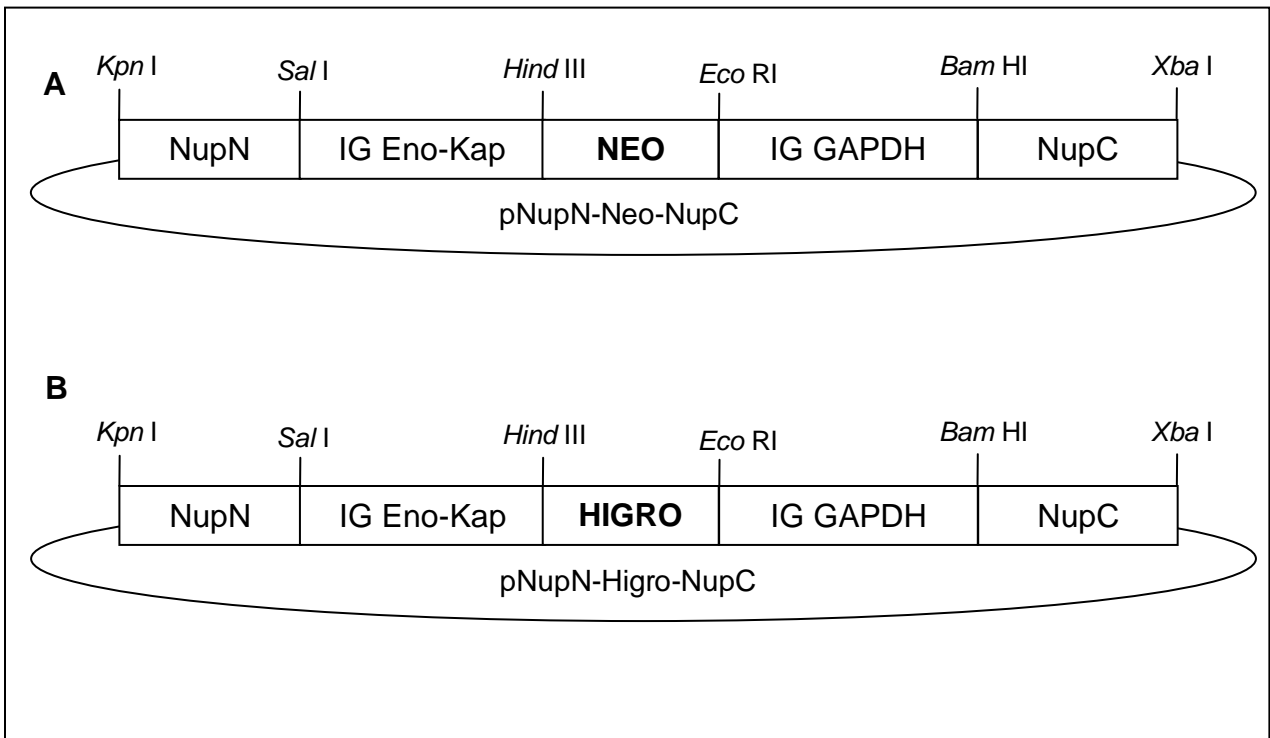


Figura 9. Vetores utilizados para o nocaute do gene *TcNUP-1*.

Legenda: Nesta figura é observada a inserção do gene *neo* (A) e *higro* (B) e das sequências intergênicas entre os genes *Enolase-Kap-3* e a intergênica entre as duas cópias de *GAPDH* de *T. cruzi*, com os respectivos sítios para cada enzima de restrição, no vetor de clonagem pBluescript II KS.

3.13.3. Amplificação dos cassetes *NupN-neo-NupC* e *NupN-higro-NupC* para transfecção de *T. cruzi*

Os dois plasmídeos recombinantes foram purificados pelo método da lise alcalina, usando o kit de minipreparação de plasmídeos. As minipreps foram utilizadas para a amplificação da região *NupN-neo-NupC* (cassete NEO) e da região *NupN-higro-NupC* (cassete HIGRO), usando 10 pmol dos oligonucleotídeos iniciadores NocN-F e NocC-R, 20 ng do plasmídeo pNupN-neo-NupC ou pNupN-higro-NupC, 200 µM de cada dNTP, 1,5 mM MgCl₂, tampão Taq DNA polimerase, 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen). As reações de PCR foram processadas no termociclador modelo 9700 (Applied Biosystems, EUA), com a desnaturação por 4 min a 94 °C, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, hibridação a 57 °C por 30 s, extensão a 72 °C por 3 min, seguido por uma extensão final a 72 °C por 7 min. O

material amplificado foi submetido à eletroforese em gel preparativo de agarose 1% e a banda correspondente a cada cassette foi eletroeluída em tampão TBE (100V por 1 hora a temperatura ambiente).

3.13.4. Transfecção de *T. cruzi* com o cassette *NupN-neo-NupC*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT até 2×10^7 células/mL. Os parasitas (1×10^8 células) foram coletados por centrifugação a $6.000 \times g$ por 10 min a 4 °C. O sedimento celular foi lavado com PBS esterilizado e ressuspenso em 1 mL de solução de eletroporação. Volumes correspondentes a 0,4 mL da suspensão de células foram transferidos para cubetas de eletroporação estéreis (0,2 cm de GAP) e pré-resfriadas. Em uma delas foram adicionados 40 µg do fragmento representando o cassette NEO. A outra cubeta contendo apenas a suspensão de parasitas foi usada como controle. Após 10 min no gelo, as amostras contidas nas cubetas foram submetidas a 2 pulsos de 450 volts, 500 µF, utilizando o eletroporador GenePulser® II Apparatus (Bio-Rad). As amostras foram incubadas novamente por 5 a 10 min no gelo, em seguida foram transferidas para garrafas de cultura de 25 cm², contendo 10 mL de meio LIT (suplementado com 50U/µg/mL de Penicilina/Estreptomicina). As culturas foram então incubadas a 28 °C. Após 24 horas de incubação adicionou-se o antibiótico G418 na concentração de 300 µg/ml. As culturas foram mantidas por sucessivas passagens (diluição de 1:10) em meio LIT suplementado com G418 a cada 8-10 dias, até a ausência de proliferação celular na cultura controle. Após 5 passagens, um volume da cultura (5×10^5 parasitas) resistente ao antibiótico G418 (transfectada com o cassette *NupN-neo-NupC*) foi então inoculado sobre meio LIT semi-solidificado, suplementado com 300 µg/mL de G418 para obtenção de clones de parasitas.

3.13.5. Extração de DNA dos transfectantes

Clones de *T. cruzi* transfectados com o cassete *NupN-neo-NupC* (*T. cruzi* ^{Δ nup1::neo}) foram cultivados como descrito no item 3.4, porém com a adição de 300 µg/mL de G418 até uma densidade de 3×10^7 células/mL.

Os parasitas foram então coletados por centrifugação por 5 min a 6.000 x *g* e lavados com PBS com posterior extração e purificação do DNA, conforme descrito no item 3.6.

3.13.6. Análise por PCR do DNA dos parasitas transfectados com o cassete *NupN-neo-NupC*

Os clones de parasitas resistentes à droga foram testados para a correta inserção do gene *neo* no locus genômico de *TcNUP-1* através de PCR, usando 10 pmol dos oligonucleotídeos iniciadores (listados na tabela 5), 100 ng do DNA total de *T. cruzi* Dm28c (tipo selvagem) ou do DNA de *T. cruzi* ^{Δ nup1::neo} (mutante simples nocaute), 200 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, tampão Taq DNA polimerase e 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen, EUA). As reações de PCR foram processadas no termociclador modelo 9700 (Applied Biosystems, EUA) com a desnaturação por 4 min a 94 °C, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, hibridação a 55 °C por 30 s, extensão a 72 °C por 30 s, seguido por uma extensão final a 72 °C por 7 min. O material amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8%.

3.13.7. Transfecção de *T. cruzi* com o cassete *NupN-higro-NupC*

Formas epimastigotas do clone de *T. cruzi* ^{Δ nup1::neo} foram cultivadas em meio LIT, suplementado com 300 µg/mL de G418 até a densidade de 2×10^7 células/mL. Os parasitas (1×10^8 células) foram coletados por centrifugação a 6.000 x *g* por 10 min a 4 °C. O sedimento celular foi lavado com PBS esterilizado e ressuspensionado em 1 mL de solução de eletroporação.

A transfecção com o cassete *NupN-higro-NupC* foi realizada nas mesmas condições relatadas no item 3.13.4. Da mesma forma, os procedimentos para obtenção dos clones de parasitas, salvo a suplementação com as drogas antimicrobianas, que neste caso adicionou-se 300 µg/mL de G418 e Higromicina. Mutantes, nos quais os dois alelos de *TcNUP-1* foram removidos e substituídos pelos genes *neo* e *higro*, foram denominados com genótipo *T. cruzi* ^{$\Delta nup1::neo/higro$} . A extração de DNA desta população foi realizada conforme mencionado no item 3.6 Posteriormente, o DNA obtido foi utilizado em reações de PCR para a confirmação da inserção do gene *higro* no locus genômico de *TcNUP-1*.

3.13.8. Análise por PCR do DNA dos parasitas transfectados com o cassete *NupN-higro-NupC*

Os clones de parasitas resistentes à G418 e Hygromicina foram testados para a correta inserção dos genes *neo* e *higro* no locus genômico de *TcNUP-1* através de PCR, usando 100 ng do DNA total de *T. cruzi* Dm28c (tipo selvagem) ou do DNA de *T. cruzi* ^{$\Delta nup1::neo/higro$} (mutante duplo nocaute). As reações foram desenvolvidas nas mesmas condições descritas no item 3.13.6.

Na tabela 5 estão relacionados os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações citadas acima.

TABELA 5. RELAÇÃO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NAS AMPLIFICAÇÕES PARA A ANÁLISE DOS PARASITAS TRANSFECTADOS.

Identificação	Sequência dos oligonucleotídeos (5'→3')
ENO-K F	TGATAGTCGACCGTCCATTTCTCTTTCCGCACTC
ENO-K R	TCGTTAAGCTTTTTTTTATTGCTGTTGGCTCTTCACTCCCCG
NEO F	GGGAAGCTTATGATTGAACAAGATGGATTG
NEO R	GGGGAATTCAGAAGAAGTCTCGTCAAG
HIGRO F	AGCTAAGCTTATGAAAAAGCCTGAACTCACC
HIGRO R	TCGGTCGGAATTCCTCTATTTCCTTTGC
GTP F	AGGATGGCGATGTCATGATTGTTG
GTP2 F	AACCTTGAAGCGGCGGAGATGCAG
NUPN R	ACGCCTGTGAGAGTCCAAGA
PEPCK R	CTAGCTCGGGGCTCAGCAGATTCC
NUPC F	GCATCCACCCCAACACAG

3.14. ELETROFORESE EM CAMPO DE PULSOS ALTERNADOS (PFGE)

Foram preparados blocos contendo 2×10^7 parasitas. Para estas preparações foram utilizadas culturas de *T. cruzi Dm28c* (tipo selvagem) como controle, bem como parasitas transfectados para o nocaute do gene *TcNUP-1*. As células foram centrifugadas por 15 minutos a $5.000 \times g$ por 10 min e lavadas 2 vezes com NKM pH 8,0. Após as lavagens, foram ressuspensas em 600 μ L de solução de PSG e foi adicionado igual volume de solução PSA 1% aquecido a 37 °C. Esta suspensão foi imediatamente aplicada no molde para produção dos blocos a serem utilizados na corrida eletroforética.

Os blocos foram tratados com solução de lise a 50 °C por 50 horas e mantidos nesta solução a 4 °C até o momento de uso. Cada bloco utilizado para a análise foi incubado 3 vezes com 50 mM de EDTA pH 8,0 por uma hora antes de ser aplicado no gel de eletroforese.

Para a corrida eletroforética foi utilizado gel de agarose 0,8% em TBE 0,5X. Foi utilizado o marcador de massa molecular na faixa de 1,05 a 3,13 Mpb (CHEF DNA - *H. wingei Chromosomes*). O tampão de corrida TBE 0,5X foi previamente resfriado a 4 °C e a eletroforese seguiu um programa com cinco fases de tempos crescentes de pulsos (N/S, E/W) por 135h a 83 V - *interpolation*. Fase 1 teve pulso de 90 s (30 h); fase 2, 200 s (30 h); fase 3, 350 s (25 h); fase 4, 500 s (25 h) e fase 5, 800 s (25 h).

Posteriormente, o gel foi tratado com soluções, de depuração por 15 minutos, de desnaturação por 30 minutos (2 vezes) e solução de neutralização por 30 minutos (2 vezes). O DNA foi transferido para uma membrana de *nylon* por capilaridade (SAMBROOK *et al.*, 1989), utilizando-se como veículo SSC 20X. Após a transferência o DNA foi fixado à membrana por exposição à luz ultravioleta com uma dose de 120 mJ/cm², usando o aparelho Spectrolinker (Spectronics corp., USA). A membrana contendo o DNA correspondente aos cromossomos de *T. cruzi* tipo selvagem e das culturas dos parasitas transfectados com o cassete contendo o gene *neo* (*T. cruzi* ^{Δ nup1::ne}) e com o cassete contendo o gene *higro* (*T. cruzi* ^{Δ nup1::neo/higro}) foi pré-hibridada em solução de hibridação de DNA por 1 hora a 65 °C, seguido da adição de sonda marcada radioativamente com α -[P32]-dCTP (10 μ Ci/ μ l; 3.000 Ci/mmol), preparada segundo método de *nick translation*, descrito por Rigby *et al.* (1977), utilizando-se o kit comercial *Nick Translation Kit*, conforme recomendações do fabricante.

As sondas utilizadas para este ensaio foram: *neo*, *higro* e a região correspondente a três repetições do gene *TcNUP-1*. Após a marcação as sondas foram purificadas em colunas de Sephadex G-50 e adicionadas ao tampão de hibridação na concentração de 5×10^6 cpm/mL. As membranas foram incubadas por 16 horas a 65 °C e, em seguida, lavadas nesta temperatura duas vezes por 30 minutos com soluções de

alta, média e baixa estirgência. As membranas foram expostas a filme de raio-X na presença de tela intensificadora durante 3 dias a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4. RESULTADOS

Considerando-se a localização celular da TcNUP-1 na periferia do núcleo e a predição de motivos de ligação ao DNA localizados na região central da proteína (PICCHI, 2006), nós decidimos investigar a possível associação desta proteína com a cromatina de *T. cruzi*, utilizando o ensaio de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) com um anticorpo monoclonal anti-TcNUP-1.

4.1. PRODUÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL

Embora já tivéssemos soros policlonais anti-TcNUP-1 desenvolvidos em camundongo e coelho, decidimos produzir um anticorpo monoclonal contra esta proteína, buscando minimizar interações inespecíficas, além de padronizar a concentração de anticorpo adicionado ao ensaio de ChIP, aumentando, desta maneira, a reprodutibilidade dos ensaios e a especificidade dos resultado.

A proteína TcNUP-1 contem em sua porção central, 9 a 13 domínios repetidos de 150 aminoácidos (16,5 kDa/domínio) com grande conservação entre eles, cujo consenso está mostrado na figura 10. Na teoria, um anticorpo monoclonal dirigido para um epítipo presente em um desses domínios poderia se ligar em vários domínios ao mesmo tempo, devido à conservação aminoacídica entre eles, facilitando e potencializando o processo de imunoprecipitação da TcNUP-1. Portanto, para a produção do anticorpo monoclonal utilizamos como antígeno uma polipeptídeo recombinante de 50 kDa, correspondente à três repetições centrais de TcNUP-1, expressa de forma solúvel em *E. coli*.

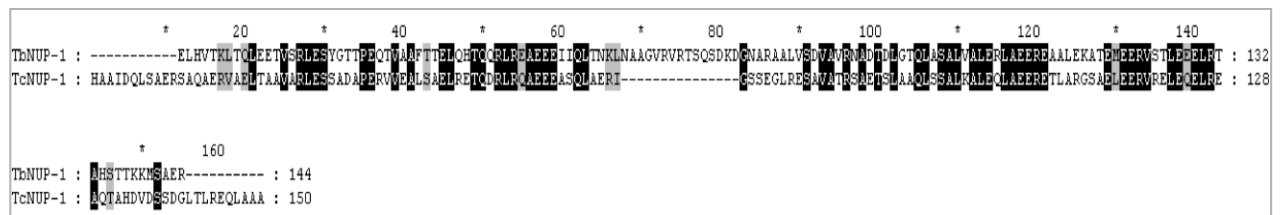


Figura 10. Alinhamento da sequência aminoacídica de repetição de TbNUP-1 (*T. brucei*) e de TcNUP-1 (*T. cruzi*). Resíduos idênticos estão marcados em preto, enquanto resíduos conservados estão marcados em cinza.

Aproximadamente 300 hibridomas foram testados por ELISA, das quais somente 20 apresentaram uma densidade óptica maior de 0,2. Estes então foram selecionados para os ensaios de IFI e *western blot*. Uma população clonal foi obtida por diluição limitante e o anticorpo secretado mostrou-se altamente específico no reconhecimento de epítomos presentes em TcNUP-1, no extrato protéico de *T. cruzi* (figura 11A) e no polipeptídeo recombinante (figura 11B), não apresentando reatividade quando testado frente a extrato protéico de *E. coli*. O anticorpo monoclonal anti-TcNUP-1 produzido pertence ao isotipo IgG2b, com cadeias leves do tipo kappa (κ).

O anticorpo monoclonal foi concentrado através de dois ciclos de precipitação com sulfato de amônio e posteriormente purificado por cromatografia de troca iônica em DEAE celulose. Com base na concentração protéica, determinada pelo método de Bradford, obtivemos uma fração de eluato com concentração de 1 mg/mL.

O processo de purificação foi eficiente e não afetou a reatividade do anticorpo, que apresentou um título de 800 (1:800) no ELISA e de 500 (1:500) no *western blot* e IFI (figura 12).

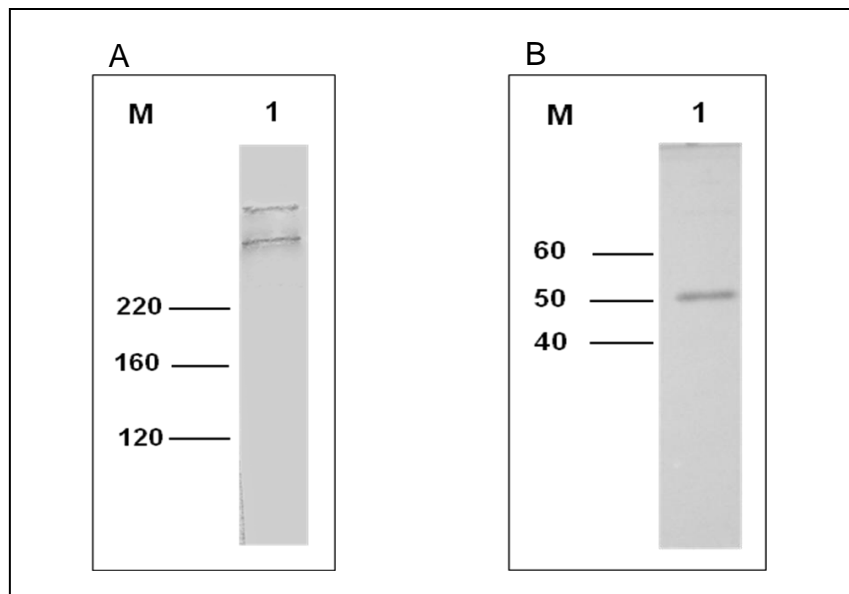


Figura 11. Reatividade do anticorpo monoclonal testada através de ensaio de *western blot*. 11A: Utilizando extrato protéico de formas epimastigotas de *T. cruzi*. 11B: Utilizando polipeptídeo recombinante. M) marcador de massa molecular em kDa.

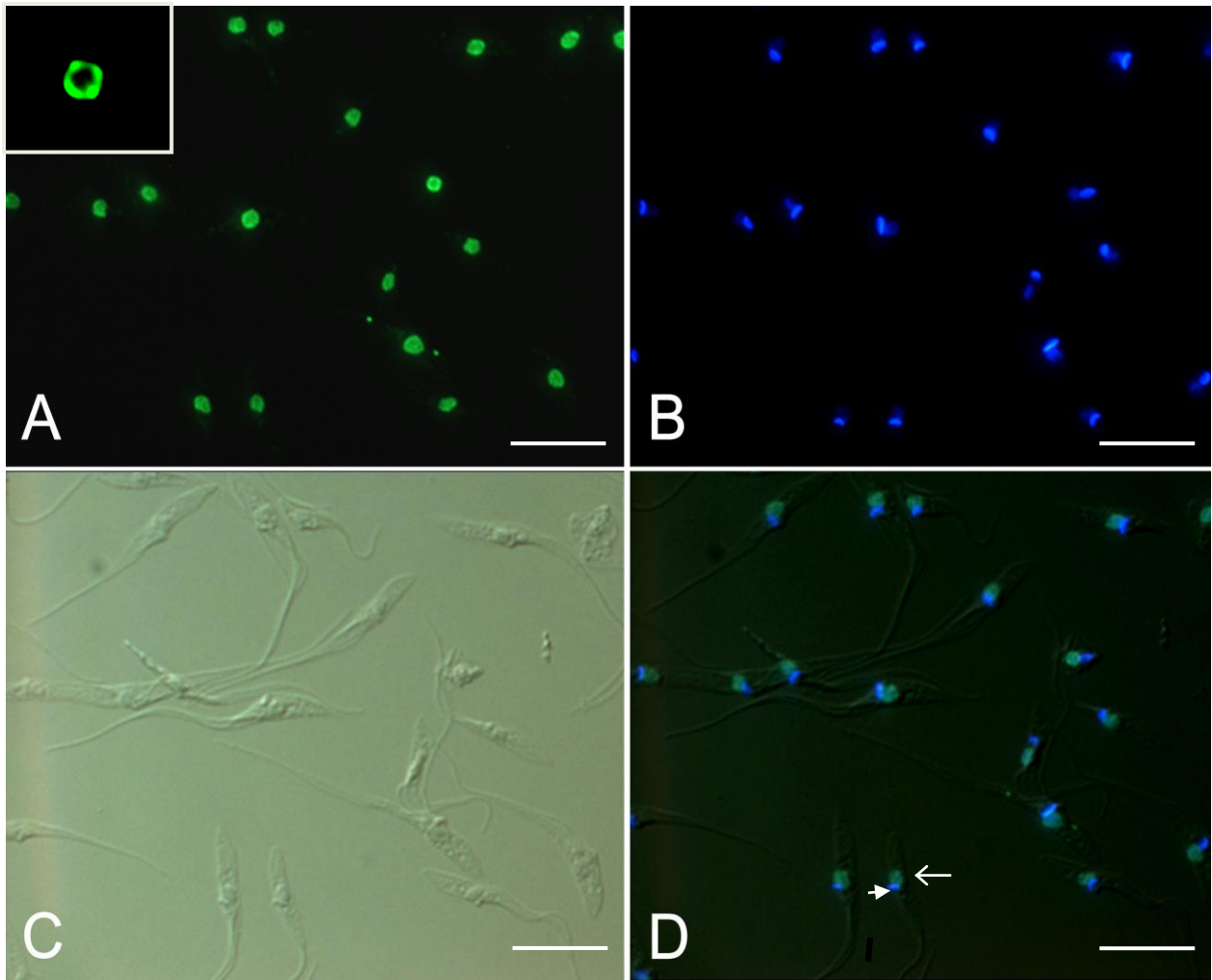


Figura 12- Imunolocalização de TcNUP-1 em epimastigotas de *T. cruzi*.

Legenda: A) Localização celular da proteína TcNUP-1 pela técnica de imunofluorescência indireta, usando o anticorpo monoclonal anti-TcNUP-1, seguido da incubação com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com AlexaFluor 488, B) marcação do núcleo e cinetoplasto, com Hoechst 33342; C) contraste interferencial diferencial (DIC); D) sobreposição das imagens A, B e C. A seta longa indica o núcleo e a seta curta indica o cinetoplasto. Aumento de 1000x. Barra= 5µm.

4.2. ENSAIO DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DA CROMATINA (ChIP)

Os ensaios de ChIP foram feitos tanto para as formas epimastigotas (epi-ChIP) quanto para as formas tripomastigotas metacíclicas (meta-ChIP), já que a cromatina destas duas formas apresenta níveis de compactação distintos (BELLI, 2000). Essas alterações no grau de compactação da cromatina poderiam, entre outros efeitos, alterar

a acessibilidade do DNA às proteínas nucleares, incluindo possíveis associações à TcNUP-1.

Os fragmentos de DNA obtidos a partir do ensaio de CHIP foram clonados em plasmídeos. Foram sequenciados 41 clones obtidos de epi-CHIP (anexo 1) e 27 clones obtidos da meta-CHIP (anexo 2). As identidades das sequências clonadas foram verificadas usando-se o algoritmo BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997), tendo como base as informações disponíveis no banco de dados sobre o genoma de *T. cruzi* (www.genedb.org). Além desta informação, procuramos analisar as regiões cromossômicas em que estas sequências estavam inseridas, na busca por padrões de localização, que permitissem inferir se há regiões cromossômicas associadas preferencialmente à proteína TcNUP-1.

As sequências obtidas nos ensaios de epi-CHIP e meta-CHIP são predominantemente fragmentos de genes e pseudogenes para proteínas hipotéticas e hipotéticas conservadas. Com base na montagem proposta por WEATHERLY *et al.* (2009) para os cromossomos de *T. cruzi* desenvolvemos um mapa da localização dessas sequências ao longo de cada cromossomo. Como pode ser observado nas figuras 13 e 14 essas sequências estão localizadas dentro ou próximo de regiões ricas em genes e pseudogenes que codificam proteínas de superfície, incluindo mucina e proteínas de superfície associadas a mucinas (MASPs); trans-sialidases, retroelementos do tipo SIRE (*short interspersed repetitive element*) e membros de famílias de retrotransposons.



Figura 13. Mapa de regiões associadas à TcNUP-1 em epimastigotas de *T. cruzi*. As barras em cinza indicam regiões de genes que codificam para proteínas de superfície. Os números, à esquerda, identificam os cromossomos, em ordem crescente de tamanho.

Legenda: 1, 2, 4, 16, 18, 19, 20, 23, 25: Proteína hipotética; 3, 5, 21, 40: Trans-sialidades (pseudogene); 6: Glicoproteína mucina-like; 7: *Retrotransposon hot spot protein* (RHS); 8, 11, 22, 27, 28, 35, 37, 39, 41: Proteína hipotética conservada; 9: Proteína hipotética conservada (pseudogene); 10: RNA polimerase II A- subunidade maior; 12, 13, 15, 17, 26, 30: Proteína hipotética (pseudogene); 14: Protease de superfície gpP63; 24, 31: kinesina; 29: Precursor de curzipaína; 32: Trans-sialidades; 33: Prot. superfície associada à Mucina (pseudogene); 34: UDP-Gal ou UDP-GlcNAc-dependente; 36: beta galactofuranosil glicosiltransferase; 38: *no hits*. Barra cinza (—) representa regiões de família de genes para proteínas de superfície.

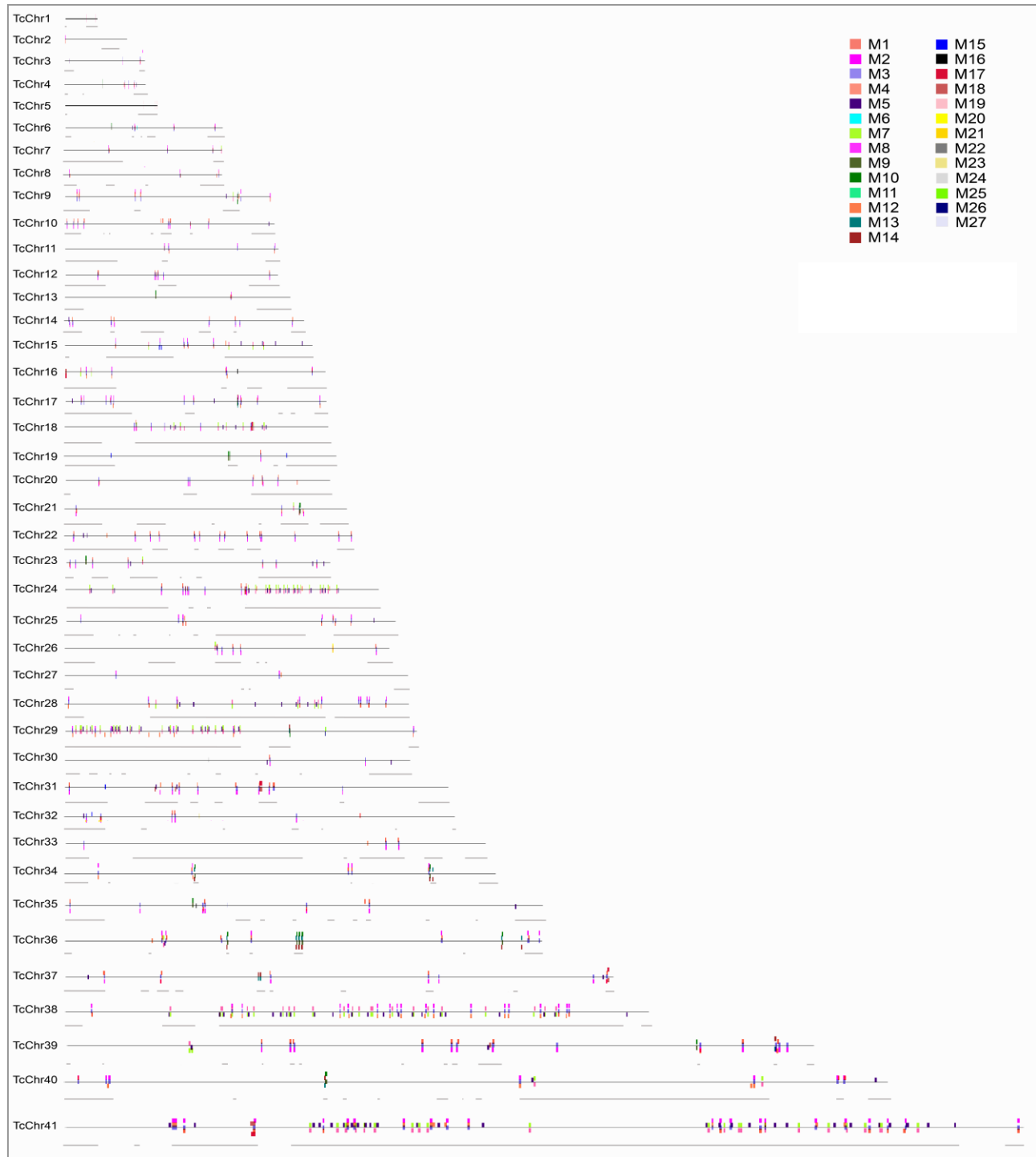


Figura 14. Mapa de regiões associadas à TcNUP-1 em tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*. As barras em cinza indicam regiões de genes que codificam para proteínas de superfície. Os números, à esquerda, identificam os cromossomos, em ordem crescente de tamanho.

Legenda: M1, M2, M6, M16, M20, M21, M22, M27: Proteína hipotética conservada; M3, M4, M5, M7, M9, M10, M11, M15: Proteína hipotética; M8, M14: Retrotransposon *hot spot protein* (RHS, pseudogene); M12, M23: *no hits*; M13, M17, M18: Proteína hipotética (pseudogene); M19: Domínio protéico SH3; M24: RNA helicase (pseudogene); M25, M26: Proteína quinase. Barra cinza (—) representa regiões de família de genes para proteínas de superfície.

4.3. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS IMUNOPRECIPITADAS POR PCR QUANTITATIVO (qPCR)

Através da análise das sequências obtidas no ensaio epi-ChIP foram desenhados oligonucleotídeos a serem utilizados nas reações de amplificação, através de PCR quantitativo. O objetivo foi determinar o enriquecimento dessas sequências no material imunoprecipitado com o anticorpo monoclonal.

Os resultados obtidos mostraram que as sequências de DNA identificadas no ensaio de epi-ChIP estão significativamente enriquecidas no material imunoprecipitado com anticorpo monoclonal anti-TcNUP-1 (figura 15), e não no material imunoprecipitado com o soro pré-imune, ambos comparados com o material não submetido à ChIP (*input*). O enriquecimento dessas sequências comprova a associação específica com TcNUP-1, tendo em vista que a amplificação dos genes *β-tubulina* e *metaciclina II* usados como controle, não mostraram o mesmo padrão.

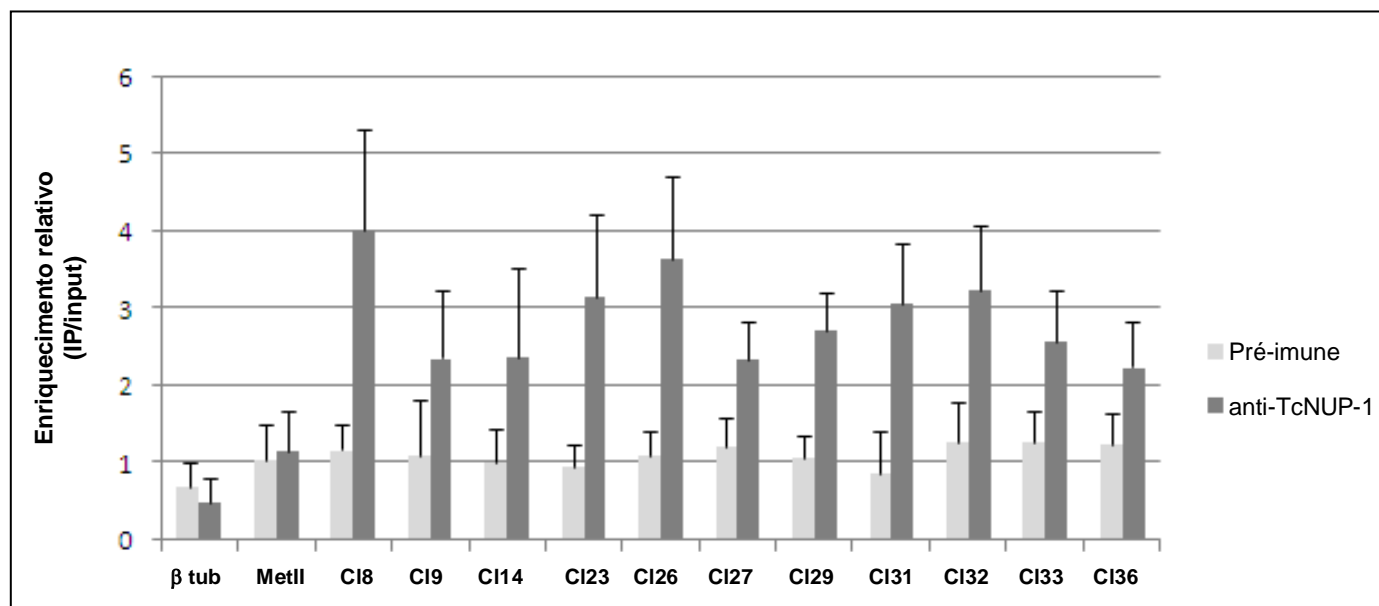


Figura 15: Quantificação relativa (qPCR) das sequências de DNA obtidas na epi-ChIP (IP), enriquecidas em relação ao *input*. Colunas em cinza claro indicam as amostras amplificadas a partir do material precipitado com soro pré-imune e colunas em cinza escuro indicam as amostras amplificadas a partir do material precipitado com anti-TcNUP-1. *βtub*= gene *β-tubulina*, *MetII*= gene *metaciclina II*, *CI8*= gene para proteína hipotética; *CI9*, *CI23*, *CI26*, *CI27*= pseudogene para proteína hipotética conservada; *CI14*= gene *gp63*; *CI29*=gene *cisteína peptidase*; *CI31*= gene *kinesina*; *CI32*= gene para trans-sialidase; *CI33*= gene para mucina-like; *CI36*= gene *β-gal glicosiltransferase*.

4.4. HIBRIDAÇÃO *IN SITU* USANDO FLUORESCÊNCIA (FISH)

Utilizando como critério a abundância das sequências analisadas por qPCR e sua distribuição nos cromossomos, selecionamos cinco clones (tabela 2) para utilizarmos como sondas no ensaio de FISH.

O objetivo deste ensaio foi verificar o posicionamento das sequências resultantes do ensaio de ChIP no núcleo das formas epimastigota de *T. cruzi* e avaliar sua colocalização com TcNUP-1.

Na figura 16 estão apresentados os padrões de hibridação das sondas de DNA marcadas com digoxigenina utilizadas no ensaio de FISH e a imunolocalização de TcNUP-1, através de ensaio de IFI, em formas epimastigotas de *T. cruzi*.

Os resultados confirmaram que as regiões imunoprecipitadas com anticorpo monoclonal anti-TcNUP-1 estão localizadas preferencialmente na periferia nuclear de formas epimastigota de *T. cruzi*, co-localizando, na maioria das vezes, com TcNUP-1.

Na figura 16A pode ser observado que a hibridação com a sonda 8 produziu um forte sinal na periferia do núcleo (mostrado em detalhe) apresentando um padrão, denominado por nós de granular, provavelmente representando a concentração dessas sequências em determinados locais na periferia nuclear. Em maior aumento (figura 16B) pode-se observar detalhes desse padrão. Resultados similares foram obtidos com as sondas, 33 e 36, como pode ser observado nas figuras 16C e 16F, respectivamente.

Por outro lado, na figura 16D observa-se que o padrão obtido com a sonda 9 foi mais homogêneo, representando, possivelmente uma distribuição mais uniforme dessas sequências ao longo do envelope nuclear (em maior aumento na figura 16E). Padrão similar foi obtido pela hibridação com a sonda 14, como pode ser observado na figura 16G. Independentemente do padrão apresentado pela hibridação com as respectivas sondas fica evidente, na maioria das vezes, a co-localização com TcNUP-1.

O sinal fluorescente, correspondente ao FISH esteve ausente em todas as preparações utilizadas como controle negativo deste ensaio, tanto nas preparações sem a adição de sonda como nas preparações sem adição de anticorpo secundário anti-IgG de camundongo.

Movidos pelos resultados satisfatórios obtidos com a padronização do ensaio de FISH com formas epimastigotas decidimos desenvolver, paralelamente, alguns ensaios preliminares, utilizando as mesmas sondas para hibridar preparações com formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*. Observamos que nas condições utilizadas, aparentemente, não ocorre co-localização das sondas 9 e 14 com TcNUP-1, sugerindo que estas sequências associadas à TcNUP-1 na forma epimastigota não estejam associadas à proteína TcNUP-1 na forma tripomastigota metacíclica (dados não mostrados). Porém, por se tratar de dados preliminares ainda faz-se necessária uma avaliação mais extensa.

Figura 16. Localização das sondas para genes imunoprecipitados com anticorpo anti-TcNUP-1 no ensaio de epi-ChIP através da técnica de FISH e analisado por microscopia confocal a laser.

A

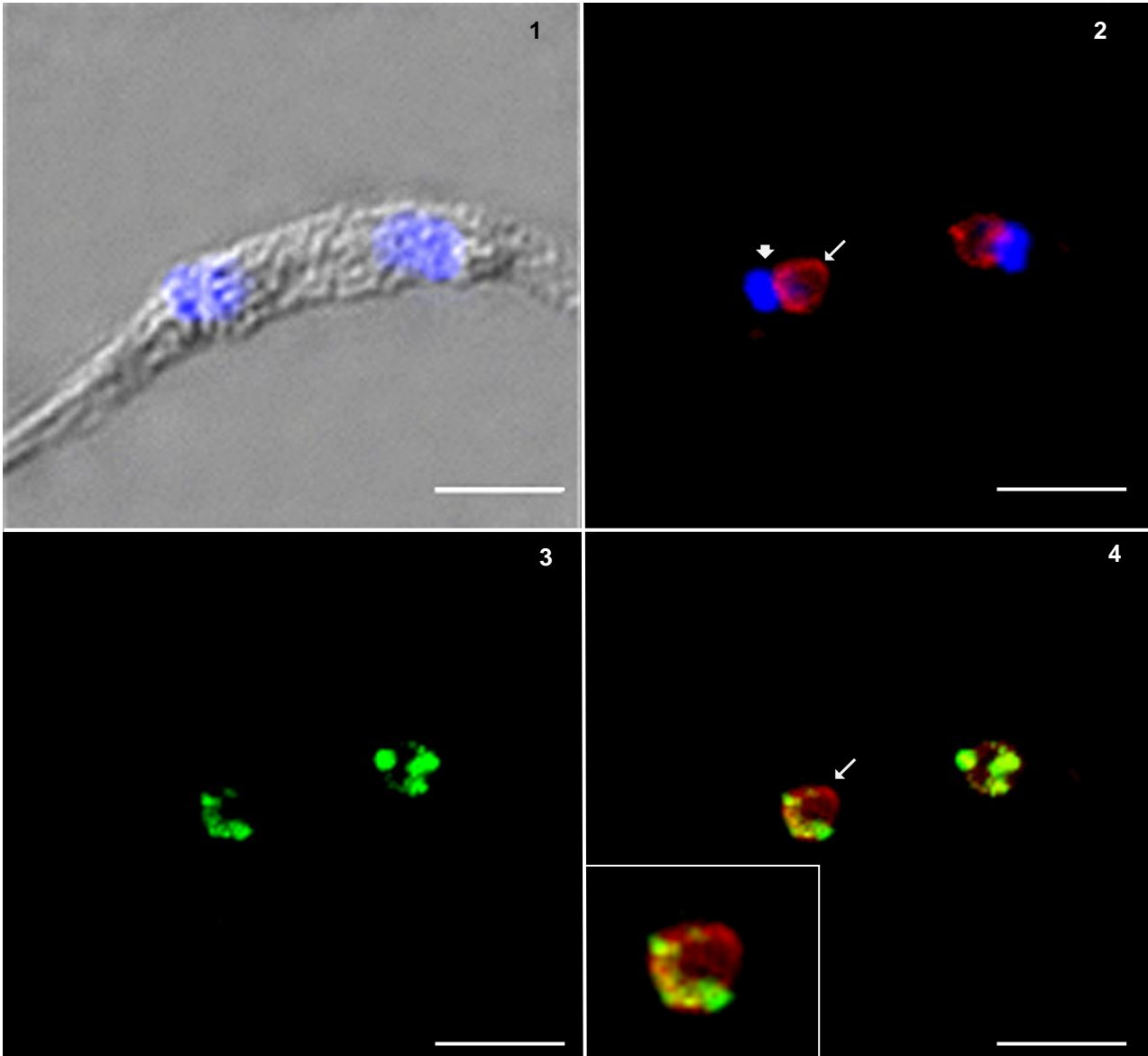


Figura 16 A. Localização da sonda 8 (gene para Proteína Hipotética).

Legenda: 1) Sobreposição da imagem de contraste interferencial diferencial (DIC) e marcação do núcleo e cinetoplasto com Hoechst 33342 (azul); 2) sobreposição das imagens da marcação do núcleo e cinetoplasto com Hoechst 33342 e localização de TcNUP-1 revelada usando o anticorpo anti-TcNUP-1 produzido em coelho e o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a Alexa Fluor 546 (vermelho); 3) localização da sonda 8 com utilização de anticorpo anti-digoxigenina desenvolvido em camundongo e o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa Fluor 488 (verde); 4) sobreposição da localização de TcNUP-1 e da sonda 8 (detalhe em maior aumento para evidenciar a marcação com a sonda 8). Setas longas indicam núcleo, setas curtas indicam cinetoplasto. Barra = 5 μ m.

B

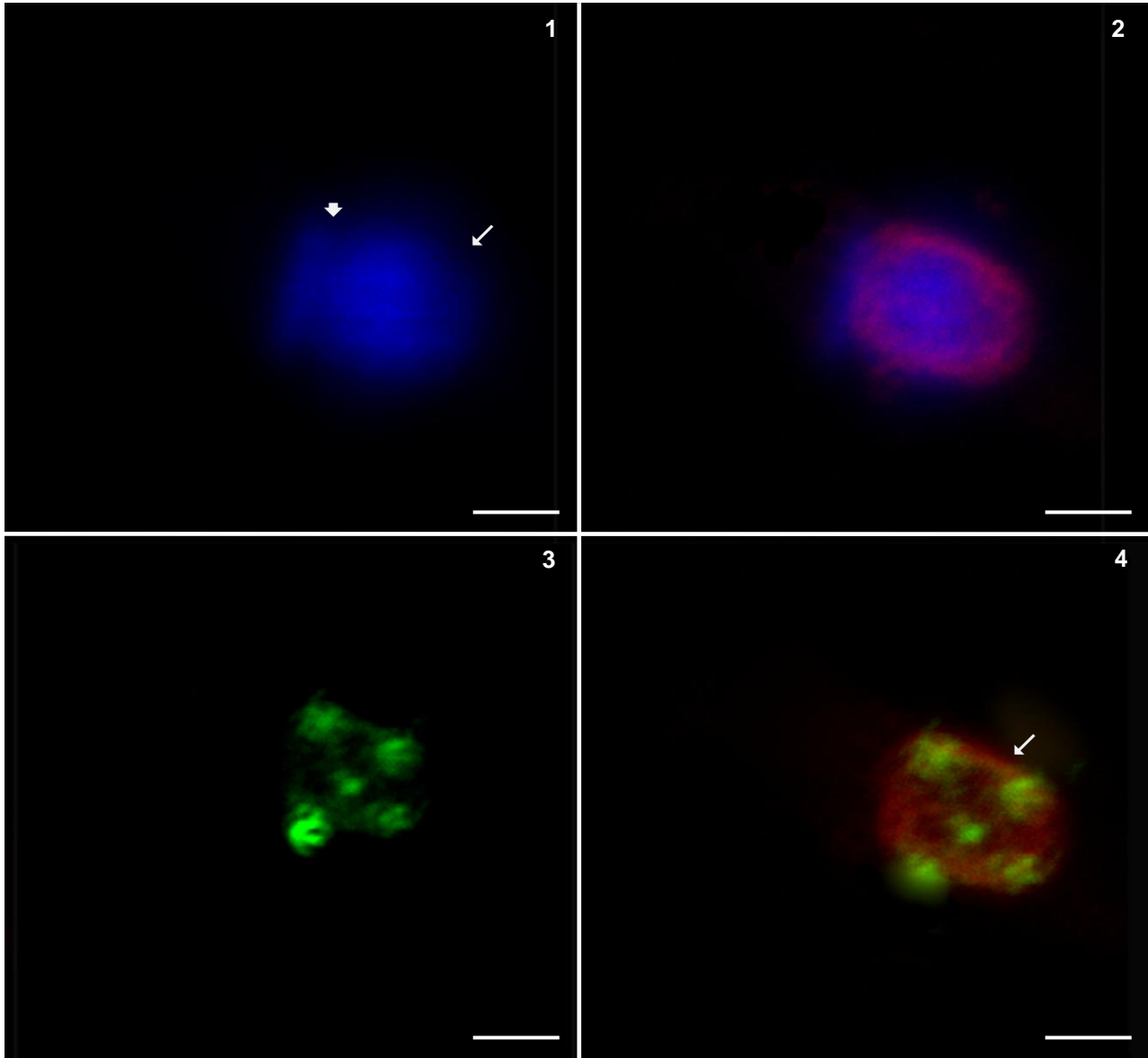


Figura 16 B. Localização da sonda 8 (gene para Proteína Hipotética).

Legenda: 1) Marcação do núcleo e cinetoplasto com Hoechst 33342 (azul); 2) sobreposição das imagens da marcação do núcleo e cinetoplasto com Hoechst 33342 e localização de TcNUP-1 revelada usando o anticorpo anti-TcNUP-1 produzido em coelho e o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a AlexaFluor 546 (vermelho); 3) localização da sonda 8 com utilização de anticorpo anti-digoxigenina desenvolvido em camundongo e o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa Fluor 488 (verde); 4) sobreposição da localização de TcNUP-1 e da sonda 8. Setas longas indicam núcleo, setas curtas indicam cinetoplasto. Barra = 1 μm .

C

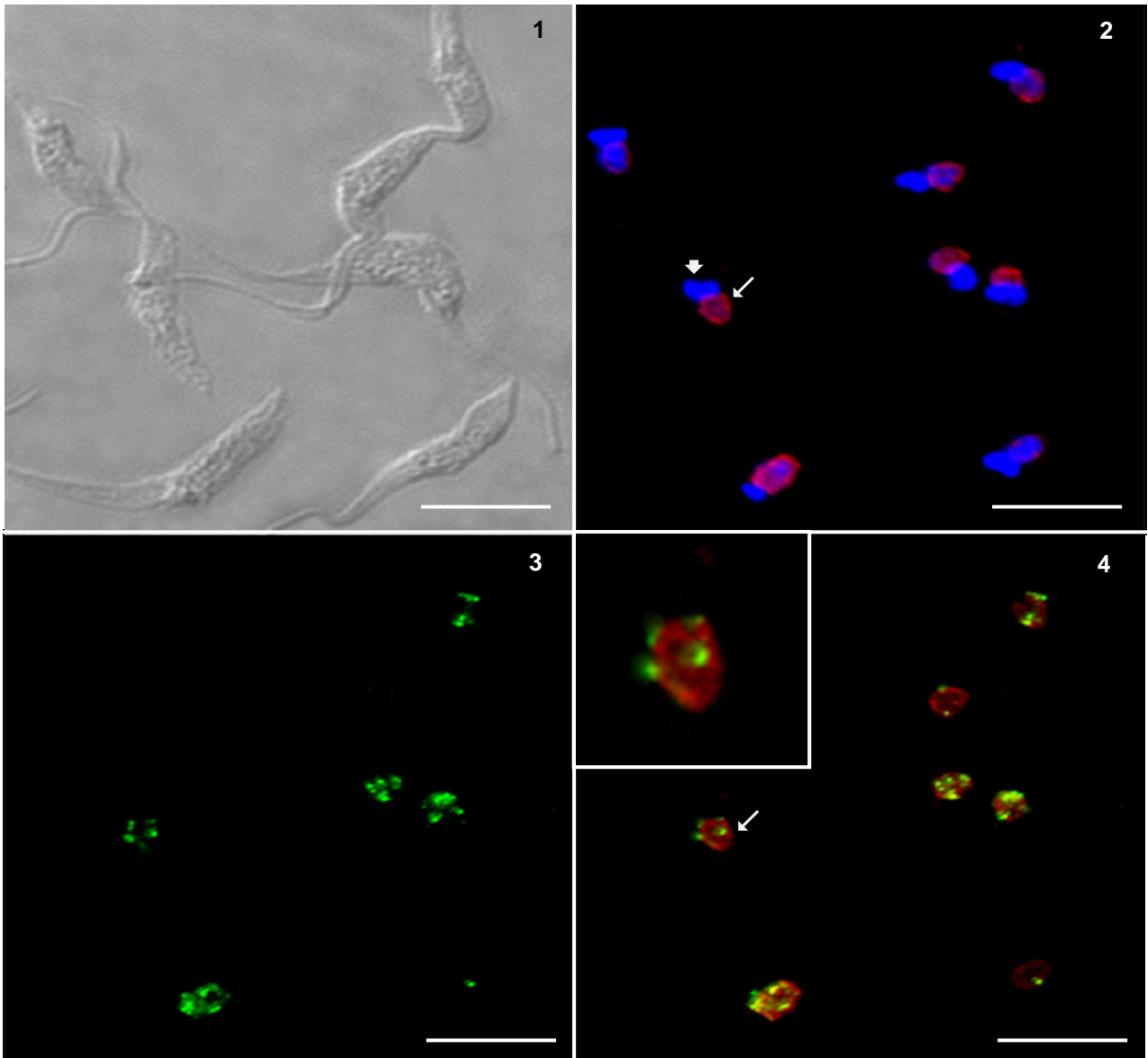


Figura 16 C. Localização da sonda 33 (gene para proteína de superfície associada à mucina - MASP).
Legenda:1) contraste interferencial diferencial (DIC); 2) sobreposição das imagens da marcação do núcleo e cinetoplasto com Hoechst 33342 e localização de TcNUP-1 revelada usando o anticorpo anti-TcNUP-1 produzido em coelho e o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a Alexa Fluor 546; 3) localização da sonda 33 com utilização de anticorpo anti-digoxigenina desenvolvido em camundongo e o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa Fluor 488; 4) sobreposição da localização de TcNUP-1 e da sonda 33 (detalhe em maior aumento para evidenciar a marcação com a sonda 33). Setas longas indicam núcleo, setas curtas indicam cinetoplasto. Barra = 5 μm .

D

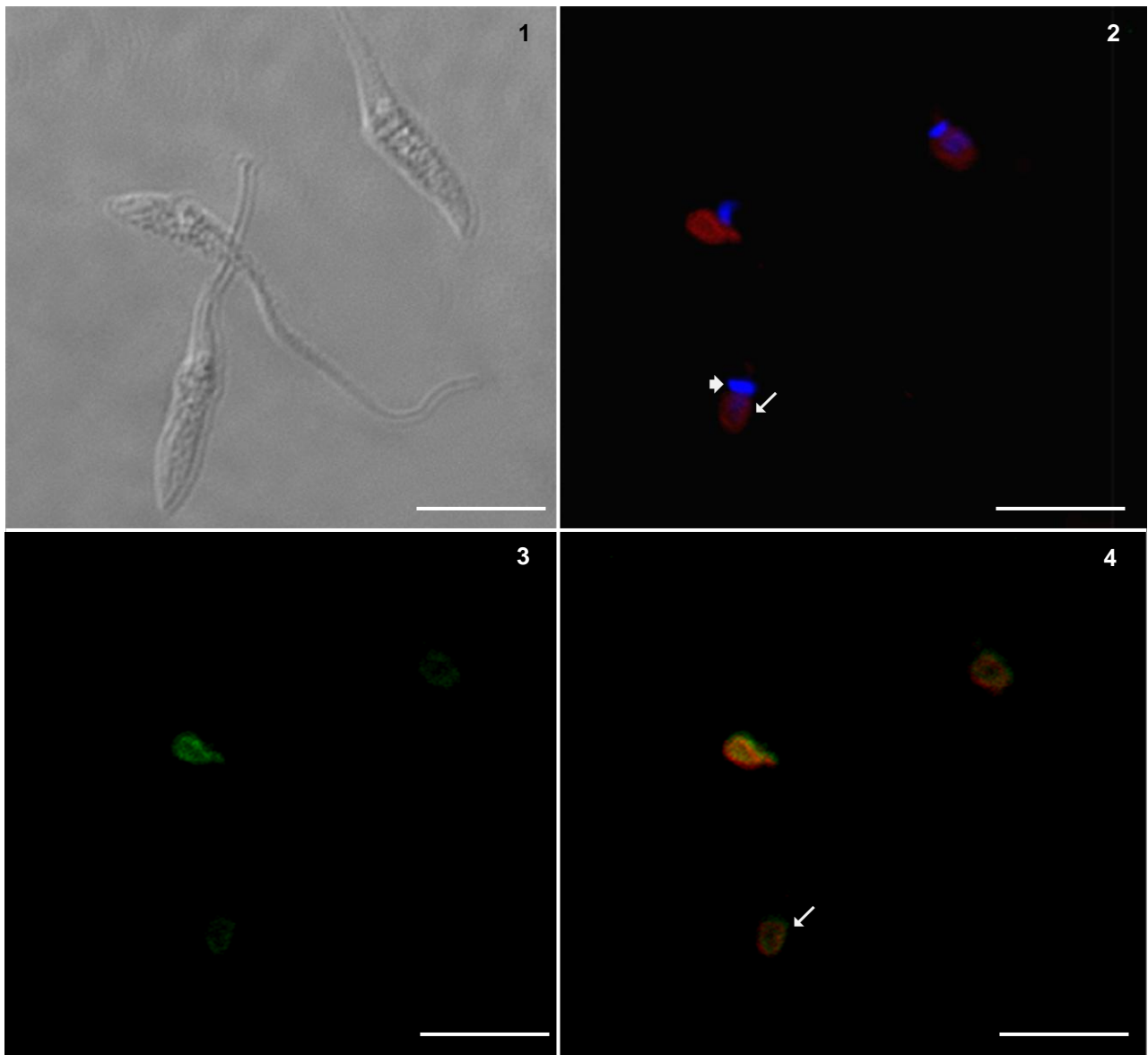


Figura 16 D. Localização da sonda 9 (gene para Proteína Hipotética).

Legenda:1) contraste interferencial diferencial (DIC); 2) sobreposição das imagens da marcação do núcleo e cinetoplasto com Hoechst 33342 e localização de TcNUP-1 revelada usando o anticorpo anti-TcNUP-1 produzido em coelho e o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a Alexa Fluor 546; 3) localização da sonda 9 com utilização de anticorpo anti-digoxigenina desenvolvido em camundongo e o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa Fluor 488; 4) sobreposição da localização de TcNUP-1 e da sonda 9. Setas longas indicam núcleo, setas curtas indicam cinetoplasto. Barra = 5 μm.

E

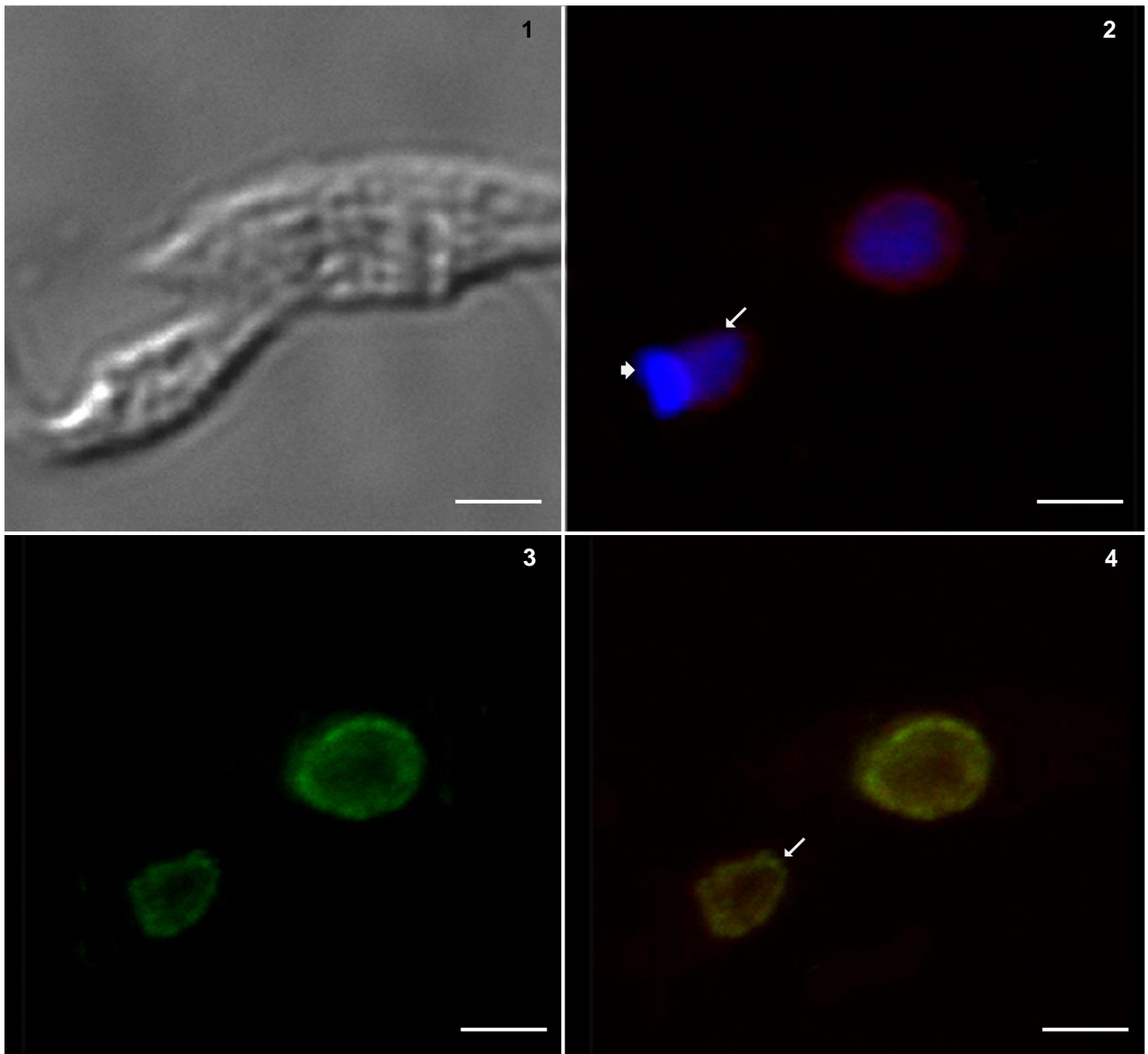


Figura 16 E. Localização da sonda 9 (gene para Proteína Hipotética)

Legenda: 1) contraste interferencial diferencial (DIC); 2) sobreposição das imagens da marcação do núcleo e cinetoplasto com Hoechst 33342 e localização de TcNUP-1 revelada usando o anticorpo anti-TcNUP-1 produzido em coelho e o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a Alexa Fluor 546; 3) localização da sonda 9 com utilização de anticorpo anti-digoxigenina desenvolvido em camundongo e o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa Fluor 488; 4) sobreposição da localização de TcNUP-1 e da sonda 9. Setas longas indicam núcleo, setas curtas indicam cinetoplasto. Barra = 1 μ m.

F

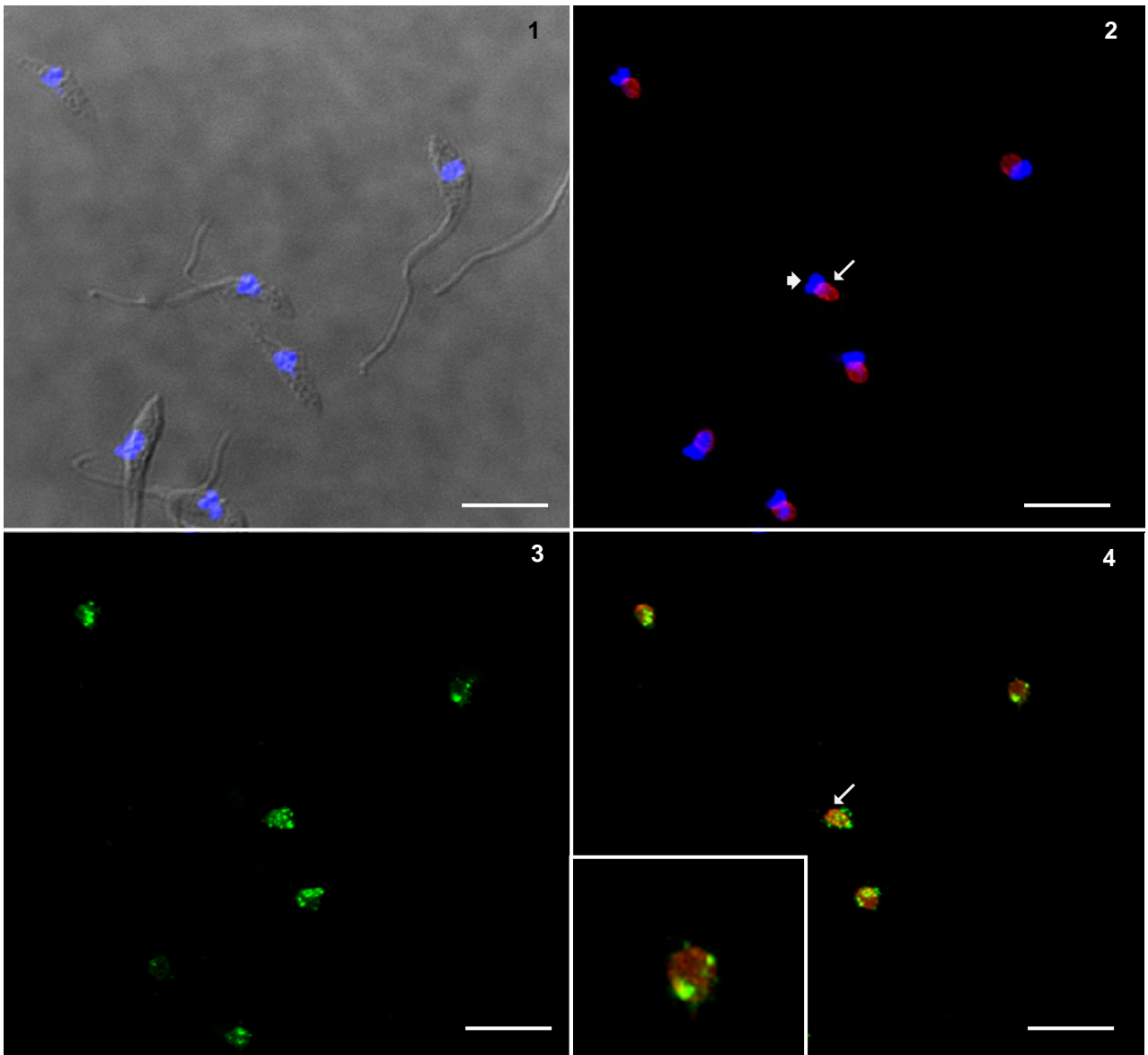


Figura 16 F. Localização da sonda 36 (gene para β -galactofuranosil).

Legenda: 1) Sobreposição da imagem de contraste interferencial diferencial (DIC) e marcação do núcleo e cinetoplasto com Hoechst 33342; 2) sobreposição das imagens da marcação do núcleo e cinetoplasto com Hoechst 33342 e localização de TcNUP-1 revelada usando o anticorpo anti-TcNUP-1 produzido em coelho e o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a Alexa Fluor 546; 3) localização da sonda 36 com utilização de anticorpo anti-digoxigenina desenvolvido em camundongo e o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488; 4) sobreposição da localização de TcNUP-1 e da sonda 36 (detalhe em maior aumento para evidenciar a marcação com a sonda 36). Setas longas indicam núcleo, setas curtas indicam cinetoplasto. Barra = 5 μ m.

G

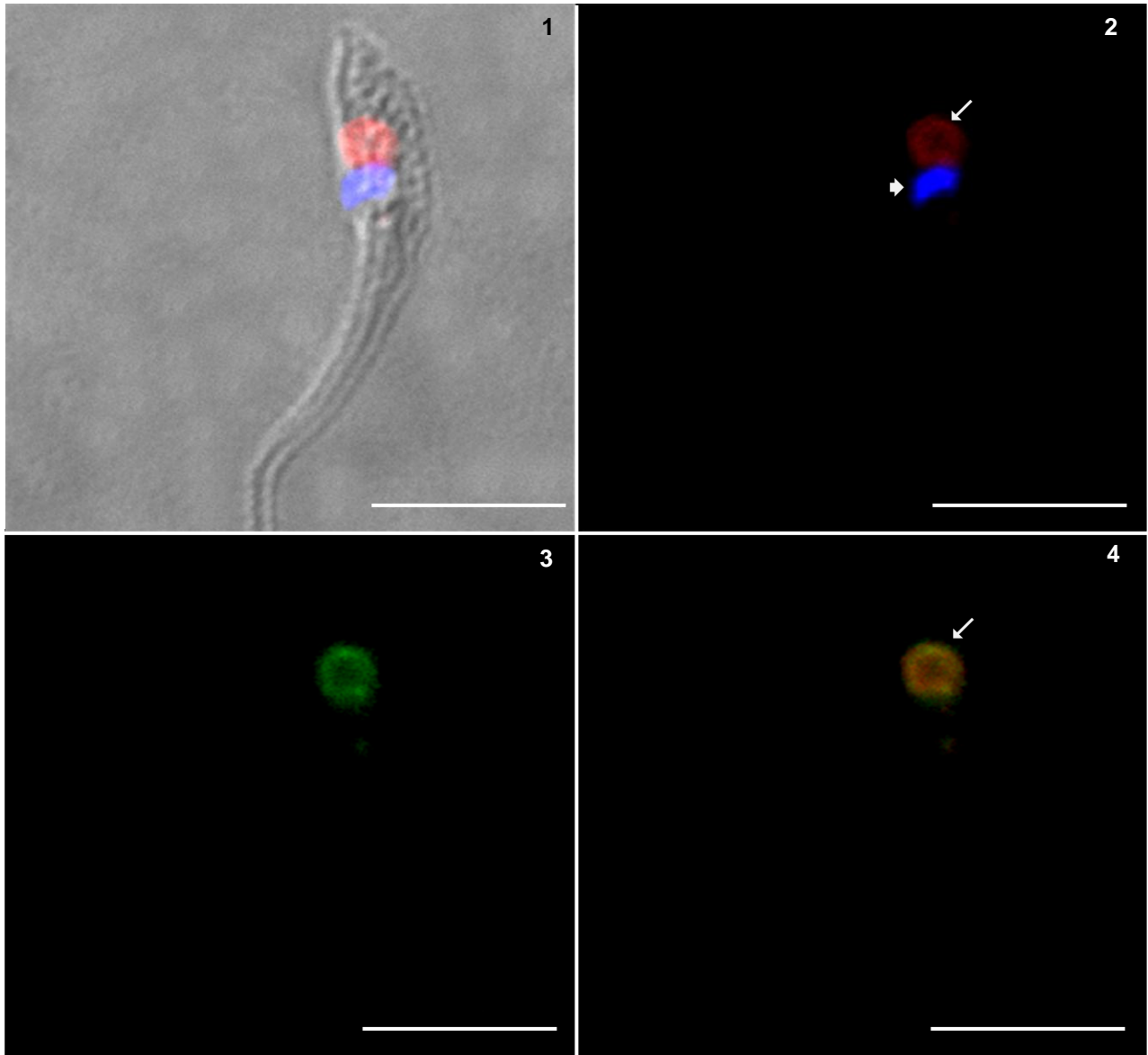


Figura 16 G. Localização da sonda 14 (gene para glicoproteína 63 - gp63).

Legenda: 1) Sobreposição da imagem de contraste interferencial diferencial (DIC), marcação do núcleo e cinetoplasto com Hoechst 33342 e localização de TcNUP-1 revelada usando o anticorpo anti-TcNUP-1 produzido em coelho e o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a Alexa Fluor 546; 3) localização da sonda 14 com utilização de anticorpo anti-digoxigenina desenvolvido em camundongo e o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa Fluor 488; 4) sobreposição da localização de TcNUP-1 e da sonda 14. Setas longas indicam núcleo, setas curtas indicam cinetoplasto. Barra = 5 μm.

4.5. DELEÇÃO DO GENE *TcNUP-1* POR NOCAUTE GÊNICO

Análises por *southern* e *northern blot* sugerem que o gene *TcNUP-1* é um gene de copia única com duas formas alélicas distintas (7,7kb e 11,3kb), apresentando de 9 a 13 repetições de aproximadamente 450pb na região central do gene (figura 8) (PICCHI, 2006; PICCHI *et al.*, 2011). A sequência completa do gene *TcNUP-1* está depositada no GenBank, sob o número de acesso AY528743.

A fim de se estudar o efeito que a ausência do gene *TcNUP-1* causa no parasita delineamos uma estratégia para induzir o nocaute gênico através de uma deleção parcial de *TcNUP-1*, com isso interrompendo a fase de leitura ao invés de excluir toda a extensão do gene. Para tanto, genes repórteres que codificam resistência aos antibióticos G418 (*neo*) e higromicina (*higro*) foram flanqueados por sequências de 548 pb e 617 pb (figura 8) do gene *TcNUP-1*. Tais regiões codificam parte das regiões amino e carboxi de *TcNUP-1*, respectivamente e foram denominadas de *NupN* e *NupC*. Os produtos de amplificação das referidas regiões foram clonados com o propósito de obter as construções necessárias (figura 9) para o interrompimento dos alelos de *TcNUP-1*, através de recombinação homóloga.

Após obtenção de uma população clonal de *T. cruzi* resistente a G418 e Higromicina, o DNA desta população foi extraído para análise por PCR e *southern blot*, a fim de confirmar se houve a recombinação.

4.5.1. ANÁLISE POR PCR DO DNA DOS PARASITAS TRANSFECTADOS COM OS CASSETES *NUPN-NEO-NUPC* E *NUPN-HIGRO-NUPC*

Com o propósito de confirmar a deleção do gene *TcNUP-1* do genoma de *T. cruzi* Dm28c e a substituição de parte de seus alelos pelos genes *neo* e *higro* foram realizadas várias reações de PCR utilizando DNA de *T. cruzi* tipo selvagem (WT), DNA de *T. cruzi* ^{$\Delta TcNUP-1::neo$} e *T. cruzi* ^{$\Delta TcNUP-1::neo/higro$} .

A figura 17 mostra um esquema da localização dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR.

Como pode ser observado nas figuras 18A e 18C os genes *higro* (1026 pb) e *neo* (795 pb) só foram amplificados nas reações que continham DNA da população de *T. cruzi* $\Delta TcNUP-1::neo$ e *T. cruzi* $\Delta TcNUP-1::neo/higro$ correspondente. Embora não mostrado, houve amplificação do gene *neo* na população *T. cruzi* $\Delta TcNUP-1::neo/higro$.

Oligonucleotídeos que hibridam nos genes *GTPase* e *PEPCK*, localizados respectivamente a montante (*upstream*) e a jusante (*downstream*) do gene *TcNUP-1*, em conjunto com oligonucleotídeos que hibridam na região codante do gene *TcNUP-1* foram utilizados com o objetivo de amplificar as respectivas regiões intergênicas. Observa-se nas figuras 18A e 18C que tanto nas amostras contendo DNA de *T. cruzi* selvagem, como nas amostras contendo o DNA dos transfectantes ocorreu a amplificação.

Para confirmarmos a inserção dos cassetes no locus de *TcNUP-1* também utilizamos oligonucleotídeos que hibridam nos genes *GTPase* (GTPF; GTP2F) e *PEPCK* (PEPCKR) em conjunto com oligonucleotídeos que hibridam em regiões internas à construção (ENO-KF; ENO-KR; HIGROF; NEOR). Como pode ser observado na figura 18B somente nas amostras de *T. cruzi* $\Delta TcNUP-1::neo$ e *T. cruzi* $\Delta TcNUP-1::neo/higro$ houve a amplificação.

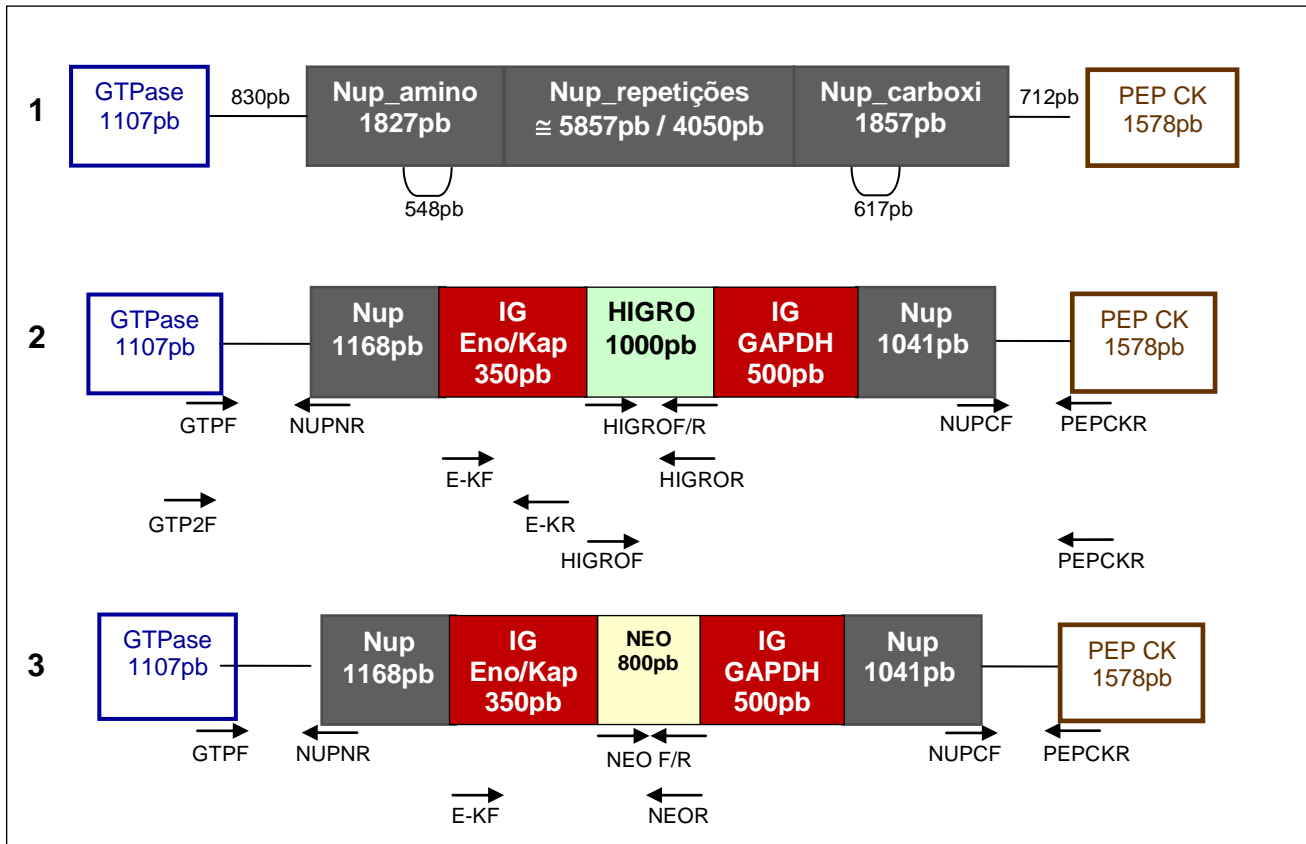


Figura 17. Representação esquemática dos genes *TcNUP-1*, *PEPCK*, *GTPase* e a disposição dos cassetes *NupN-neo-NupC* e *NupN-higro-NupC* no contexto genômico de *T. cruzi*.

Legenda: **1)** Representação esquemática da organização dos genes *GTPase* (azul) (Tc00.1047053509099.10), *TcNUP-1* (cinza) e *PEPCK* (marrom) (Tc00.1047053508441.20), a partir do sequenciamento do genoma de *T. cruzi* (www.genedb.org). **2)** Representação esquemática mostrando a substituição de parte do gene *TcNUP-1* pelo gene *higro* (verde) e regiões intergênicas (vermelho) utilizadas nas construções desta estratégia. **3)** Representação esquemática mostrando a substituição de parte do gene *TcNUP-1* pelo gene *neo* (amarelo) e regiões intergênicas (vermelho). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas PCRs descritas nos itens 3.13.6 e 3.13.8 estão indicados por setas.

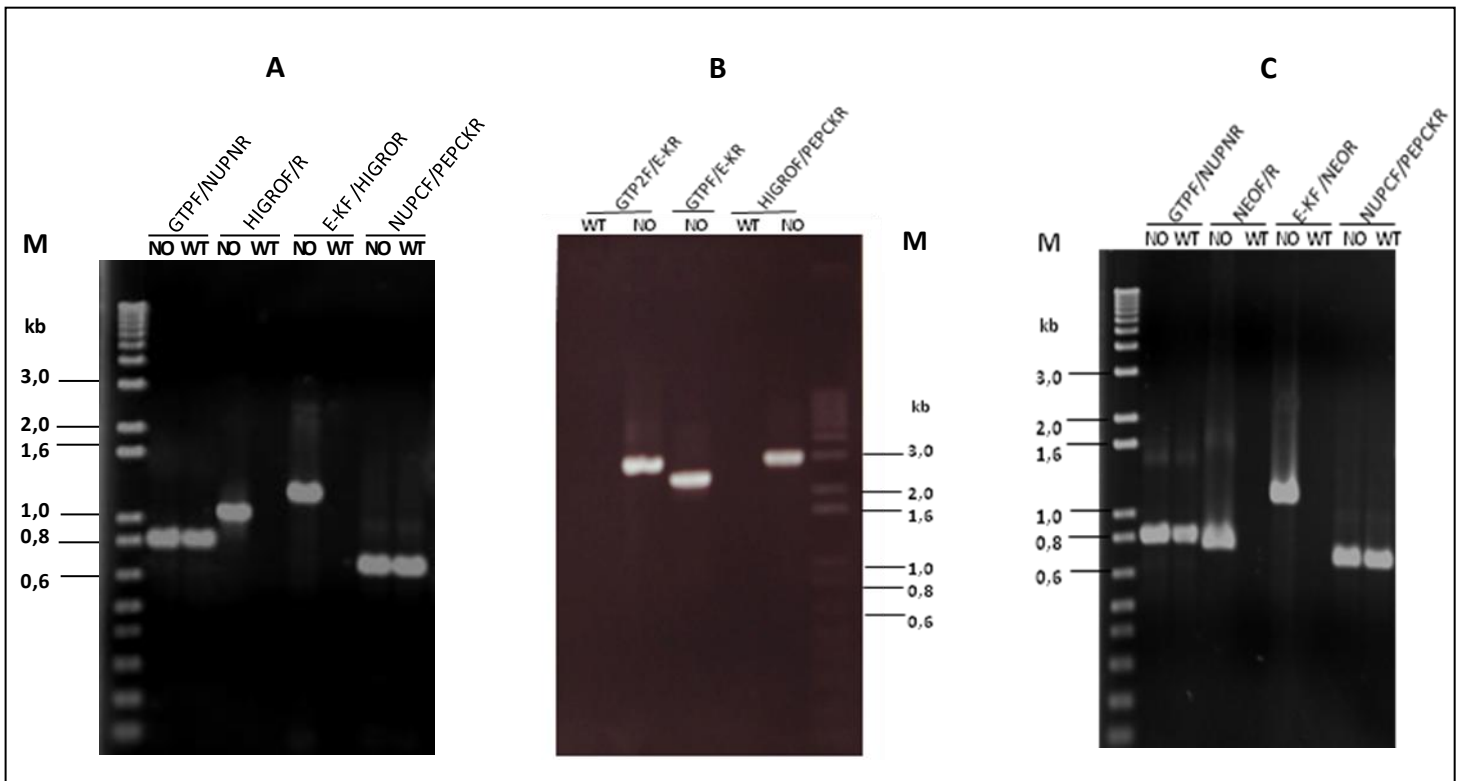


Figura 18. Ensaios de PCR utilizando DNA de *T. cruzi* (WT) e *T. cruzi* (NO).

Legenda: **A e B)** Utilizando DNA de *T. cruzi* (WT) e *T. cruzi* ^{Δ TcNUP-1::NEO/HIGRO} (NO). **C)** Utilizando DNA de *T. cruzi* (WT) e *T. cruzi* ^{Δ TcNUP-1::NEO} (NO). M: marcador de massa molecular 1 Kb plus.

4.5.2. VERIFICAÇÃO DO NOCAUTE DO GENE *TcNUP-1* ATRAVÉS DE PFGE E SOUTHERN BLOT

Embora os resultados das ampliações tenham indicado que ocorreu a inserção de ambas as construções no genoma de *T. cruzi*, os soros permaneciam reagentes nos ensaios de *western blot* e IFI, indicando que poderia haver outra cópia gênica, contrariando a atual informação disponibilizada no banco de dados para *T. cruzi* CL Brener. Na tentativa de elucidarmos essa questão realizamos uma eletroforese de pulsos alternados (PFGE) seguida de *southern blot*. Neste experimento foram utilizadas amostras dos parasitas do tipo selvagem e de clones dos transfectantes (*T. cruzi* ^{Δ TcNUP-1::neo} e *T. cruzi* ^{Δ TcNUP-1::neo/higro}). O DNA foi transferido para membrana de náilon e incubado com sondas radioativas correspondentes a três repetições da região central do gene *TcNUP-1* e aos genes *neo* e *higro*.

Quando utilizada a sonda *TcNUP-1*, o sinal de hibridação foi observado nas três populações, tanto na região correspondente a aproximadamente 1,5Mb, como na região das canaletas (figura 19 I).

Nas amostras hibridadas com a sonda correspondente ao gene *neo*, nenhuma marcação foi observada na população selvagem, ao contrário das populações transfectantes, onde ocorreu marcação tanto na região correspondente a aproximadamente 1,5Mb, como na região da canaleta (figura 19 II).

Com a sonda correspondente ao gene *higro* o sinal de hibridação foi observado somente na população transfectada com o cassete contendo o gene *higro*, tanto na região correspondente a aproximadamente 1,5 Mb, como na altura correspondente à região da canaleta (figura 19 III).

Com base nas informações disponibilizadas para o genoma de *T. cruzi* CLBrener o gene de *TcNUP-1* está localizado no cromossomo 23, com uma massa estimada de 714 Kb (WEATHERLY; BOEHLKE; TARLETON, 2009). Ao analisar os resultados de *southern blot* podemos verificar que o sinal de hibridação está presente em uma região não compatível com o tamanho esperado. Dessa forma, podemos imaginar que provavelmente o tamanho desse cromossomo em *T. cruzi* Dm28c seja maior ou que *TcNUP-1* esteja localizado em outro cromossomo do que descrito para *T. cruzi* CLBrener. Mesmo assim os resultados indicam que houve a inserção de ambos os cassetes no *locus* de *TcNUP-1*.

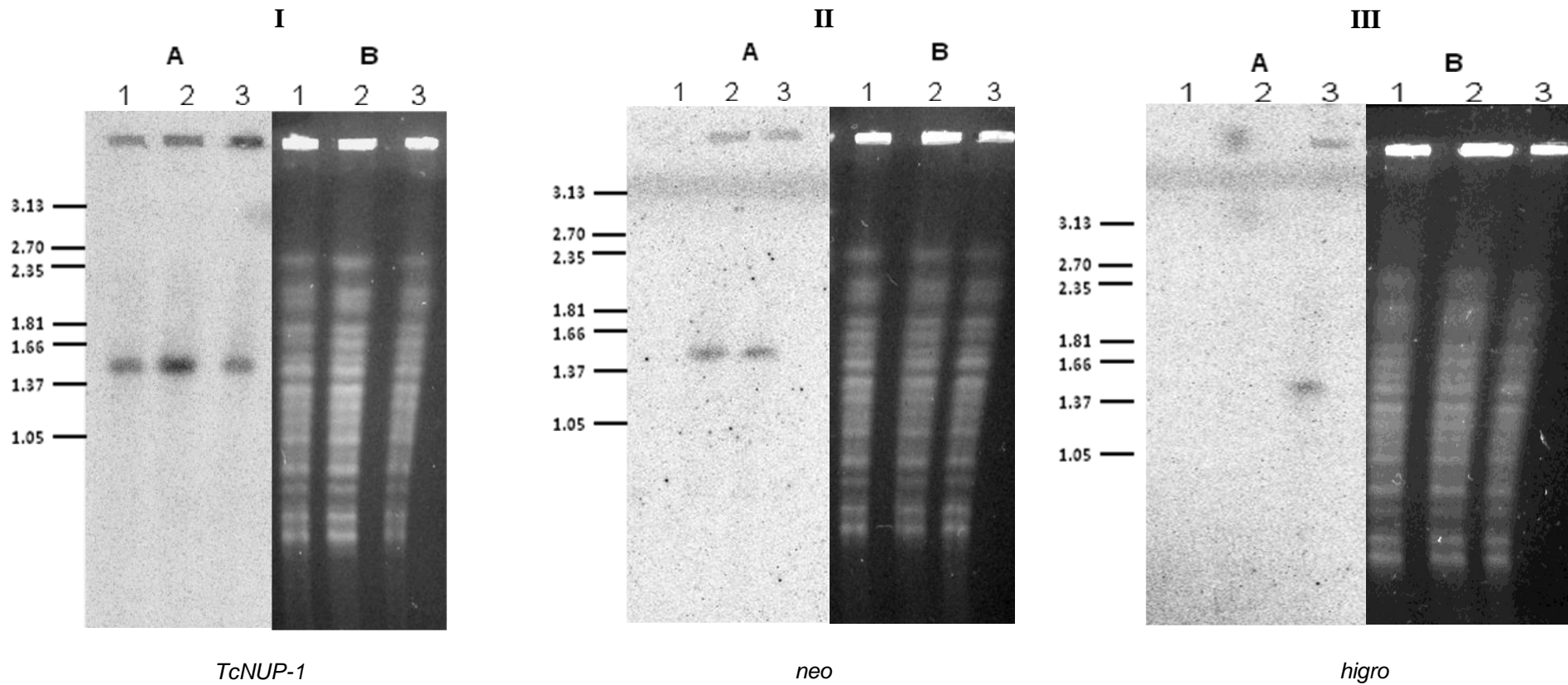


Figura 19. Análise da organização dos genes *TcNUP-1*, *neo* e *higo* por ensaio do tipo *southern blot*.

Legenda: Em I está representado os resultados da hibridação com a sonda *TcNUP-1*. Em II está representado os resultados da hibridação com a sonda *neo*. Em III está representado os resultados da hibridação com a sonda *higo*. **A** representa autoradiograma e **B** representa os perfis de migração dos cromossomos de *T. cruzi* tipo selvagem (WT), na linha 1; *T. cruzi* ^{$\Delta TcNUP-1::neo$} , na linha 2 e *T. cruzi* ^{$\Delta TcNUP-1::neo/higo$} , na linha 3. Marcador de massa molecular *CHEF DNA - H. wingei Chromosomes*.

5. DISCUSSÃO

Trypanosoma cruzi, o protozoário responsável pela doença de Chagas, pertence a um grupo que divergiu muito cedo na linhagem eucariótica, apresentando diversas características únicas tanto em relação à biologia celular quanto à molecular.

Apesar de existirem inúmeros trabalhos que estudam o núcleo de *T. cruzi* (BELLI, 2000; DE SOUZA, 2002; ELIAS *et al.*, 2001, 2002; DOSSIN & SCHENKMAN, 2005; GODOY *et al.*, 2009), o conhecimento ainda é limitado no que se refere à organização nuclear, quer seja em relação a localização dos cromossomos no interior do núcleo e seu processo de replicação e segregação, quer seja quanto a existência de territórios cromossômicos e regiões intercromossômicas, já bem estudados em outros organismos eucarióticos.

A compreensão sobre a organização nuclear nos remete evidentemente a questões sobre a influência dos fatores epigenéticos na expressão gênica das células em geral e, mais especificamente, em *T. cruzi*, cujos estudos sobre a regulação da expressão gênica tem sido baseados principalmente nos mecanismos pós-transcricionais (revisado por ÁVILA & GOLDENBERG, 2010).

Portanto, a descoberta da proteína TcNUP-1, em *T. cruzi*, com características de proteína estrutural e localizada na periferia do núcleo, prontamente nos levou a hipótese de que, na ausência de uma estrutura nos moldes da lâmina nuclear de células de mamíferos, esta proteína poderia desempenhar um papel tanto estrutural, de sustentação do arcabouço nuclear, quanto funcional, através da associação com a cromatina, participando na organização dos cromossomos. A partir dessa hipótese buscamos identificar quais regiões cromossômicas estariam envolvidas nessa interação, na tentativa de

compreender quais as possíveis implicações desta associação nos diversos processos nucleares em *T. cruzi*.

A diversidade de funções exercidas pela lâmina, como estabilidade mecânica do núcleo, estabelecimento de conexões entre o nucleosqueleto e o citoesqueleto (CRISP & BURKE, 2006; HOUBEN *et al.*, 2007; DAHL *et al.*, 2008; ROWAT *et al.*, 2008), bem como sua participação na organização da cromatina e participação na correta progressão espacial e temporal de alguns processos nucleares como a replicação do DNA, transcrição e reparo (BRIDGER *et al.*, 2007; DORNER *et al.*, 2007; DECHAT *et al.*, 2008) tem sido em grande parte atribuída às laminas, seu principal componente (SHUMAKER *et al.*, 2003).

Muitas proteínas nucleares com função estrutural atuam através da interação com regiões específicas do genoma, como os complexos protéicos condensina (WANG *et al.*, 2005) e coesina (GLYNN *et al.*, 2004; CHANG *et al.*, 2005), topoisomerase do tipo II (BORDE & DUGUET, 1998) e proteínas de arcabouço nuclear (von KRIES *et al.*, 1991; BOHM *et al.*, 2005).

As características moleculares de TcNUP-1, como a presença de domínios *coiled coil* com motivos de associação ao DNA do tipo zíper de leucina na sua estrutura indicam para uma provável associação com a cromatina de *T. cruzi*, representando dessa forma um componente importante da lâmina nuclear desse parasita, semelhantemente ao descrito para sua ortóloga NUP-1 de *T. brucei*.

A fim de determinarmos quais as regiões da cromatina estariam associadas à proteína, tanto na forma epimastigota como na forma tripomastigota metacíclica de *T. cruzi* utilizamos o ensaio de imunoprecipitação de cromatina (ChIP), técnica que se baseia na ligação *in vivo* dos complexos proteína-DNA (LÓDEN & van STEENSEL, 2005). As sequências obtidas nos ensaios de ChIP representam predominantemente fragmentos de genes e pseudogenes para proteínas hipotéticas e hipotéticas conservadas.

Através de análises *in silico* foi possível mapearmos a localização cromossômica dessas sequências e verificamos que a maioria está localizada dentro ou próximo de regiões ricas em genes e pseudogenes que codificam proteínas de superfície; incluindo mucina e proteínas de superfície associadas a

mucinas (MASPs); trans-sialidasas, retroelementos do tipo SIRE (*short interspersed repetitive element*) e membros de famílias de retrotransposons.

O enriquecimento significativo dessas sequências no material imunoprecipitado de formas epimastigotas de *T. cruzi* não só comprova a associação específica com TcNUP-1 como sugere fortemente que essa associação seja específica à determinadas sequências, tendo em vista que a amplificação de regiões utilizadas como controle (genes para β -tubulina e *metaciclina* II) não mostraram o mesmo padrão de enriquecimento e, aliado ao fato de termos utilizado um anticorpo monoclonal anti-TcNUP-1.

Inúmeros trabalhos evidenciam a ancoragem de regiões teloméricas e subteloméricas na periferia do núcleo (CRAIG, 2004). Análises com núcleos interfásicos de *Drosophila* mostraram que regiões de cromatina mais condensada como centrômeros e telômeros estão fortemente associadas à lâmina nuclear (MARSHALL & SEDAT, 1999). A associação entre o envelope nuclear e telômeros também já foi mostrado em levedura (GOTTA *et al.*, 1996; HEDIGER *et al.*, 2002a, b; TADDEI *et al.*, 2004; BYSTRICKY *et al.*, 2005) e *Plasmodium falciparum* (SCHERF; FIGUEIREDO & FREITAS-JUNIOR, 2001; FIGUEIREDO *et al.*, 2002; SCHERF; LOPEZ-RUBIO; RIVIERE, 2008)

A associação da cromatina com o envelope nuclear, em muitos casos, não condiciona determinado locus ao silenciamento, uma vez que a concentração de genes de virulência nas regiões subteloméricas em *P. falciparum* e *T. brucei* (FREITAS-JUNIOR *et al.*, 2000; SCHERF; FIGUEIREDO & FREITAS-JUNIOR, 2001; SCHERF; LOPEZ-RUBIO; RIVIERE, 2008) representam um eficiente mecanismo de variabilidade antigênica. Da mesma forma, a associação ao envelope nuclear pode estar relacionada à ativação gênica (LODÉN & van STEENSEL, 2005; MISTELI, 2008) como o papel recentemente sugerido para os complexos do poro nuclear (NPCs) em proteger a cromatina da repressão transcricional (CASOLARI *et al.*, 2004; MENON *et al.*, 2005; KALVERDA *et al.*, 2010).

Recentes estudos sobre a estrutura nuclear de *T. brucei*, organização da cromatina e dinâmica dos cromossomos durante a interfase e mitose tem auxiliado

na compreensão de como o remodelamento da cromatina pode influenciar na organização genômica e na regulação da variação antigênica nesse tripanossomatídeo (NAVARRO; PENATE; LANDEIRA, 2007; FIGUEIREDO & CROSS, 2010; ERSFELD, 2011).

Ao observar o mapa detalhado dos sítios associados especificamente à TcNUP-1 (figuras 13 e 14) é possível verificar a estreita relação com o número, a localização e a organização de *arrays* de genes e/ou pseudogenes para proteínas de superfície e retrotransposons, quando comparado com o mapeamento dos cromossomos de *T. cruzi* (WEATHERLY *et al.*, 2009). Nossos dados suportam a hipótese de que TcNUP-1 possui um papel na organização da cromatina de *T. cruzi* através da sua associação com os cromossomos deste parasita. Dessa forma, considerando ainda nossos resultados de FISH, regiões cromossômicas contendo grupos de gene e/ou pseudogenes para proteínas de superfície e retrotransposons encontram-se ancoradas na periferia nuclear através de sua interação com TcNUP-1. Esta associação pode representar importantes implicações para a expressão desses genes (TADDEI *et al.*, 2004), como a troca e expressão de variantes de gp85, o principal antígeno de superfície de formas tripomastigotas de *T. cruzi* (TAKLE AND CROSS, 1991).

Com o intuito de estudar o efeito que a ausência do gene *TcNUP-1* causaria no parasita delineamos um ensaio para a indução de nocaute gênico, empregando uma estratégia já utilizada com sucesso em nosso laboratório, através da interrupção da fase de leitura, ao invés de excluir toda a extensão do gene. Embora tenhamos obtido uma população clonal resistente a ambas as drogas utilizadas para seleção dos transfectantes (G418 e Higromicina) e as análises por PCR terem indicado a inserção, no genoma do parasita, dos cassetes utilizados para a transfecção, a proteína permanece sendo expressa.

A avaliação por *southern blot* revelou que o gene *TcNUP-1* permanece no genoma de *T. cruzi*, uma vez que a hibridação com a sonda *TcNUP-1* produziu um sinal na região de aproximadamente 1,5 Mb e na região correspondente à canaleta de cada uma das três populações testadas. Esse dado associado ao sinal de hibridação observado com as sondas *neo* e *higro*, nas mesmas regiões

citadas acima nas populações de *T. cruzi* $\Delta TcNUP-1::neo$ e *T. cruzi* $\Delta TcNUP-1::neo/higro$, exceto na amostra contendo *T. cruzi* selvagem, sugere que haja outra cópia do gene *TcNUP-1*.

De acordo com os dados do genoma de *T. cruzi*, o gene *TcNUP-1* está localizado no cromossomo 23, com tamanho de aproximadamente 714kb, (WEATHERLY; BOEHLKE; TARLETON, 2009), porém nossos resultados não estão de acordo com tal informação. Uma hipótese é a de que o tamanho do cromossomo onde o gene *TcNUP-1* está localizado em *T. cruzi* Dm28c seja maior do que o relatado para *T. cruzi* CL Brener. Tal evento não nos parece improvável, se considerarmos a variabilidade intra-espécie relatada frequentemente na literatura, revelando grande plasticidade no genoma de diversas cepas de *T. cruzi* (AYMERICH & GOLDENBERG, 1988; HENRICKSSON, ASLUND & PETERSSON, 1996; FREITAS-JUNIOR *et al.*, 1999; VARGAS, PEDROSO & ZINGALES, 2004).

Devemos ainda considerar que a avaliação do número de cromossomos de *T. cruzi* só foi possível através do emprego de eletroforese em campo de pulsos alternados (PFGE) e hibridação com sondas teloméricas, uma vez que a ausência de condensação dos cromossomos durante a mitose dificulta a identificação do cariótipo desse parasita (VICKERMAN & TETLEY, 1970). Com isso, a estimativa de que o genoma diplóide de *T. cruzi* encontra-se distribuído em 30 a 40 cromossomos, de 0,45 Mb a 4 Mb cada (CANO *et al.*, 1995; revisto por ELIAS *et al.*, 2009) pode não refletir um consenso entre as cepas *T. cruzi* Dm28c e *T. cruzi* CL Brener.

Neste estudo foi verificado que *TcNUP-1* se liga a cromossomos de *T. cruzi*, especificamente em regiões contendo grupos de genes e pseudogenes para proteínas de superfície e retrotransposons. Sendo assim, é provável que esta proteína seja responsável por ancorar regiões cromossômicas ao envelope nuclear, provavelmente influenciando na organização nuclear do parasita.

Portanto, as perspectivas abertas pelo presente estudo envolvem a avaliação comparativa das regiões imunoprecipitadas nas fases epimastigota e tripomastigota metacíclica de *T. cruzi*, bem como a determinação do número de

cópias do gene *TcNUP-1*, possibilitando assim a realização de ensaios que nos permitam determinar a importância da proteína TcNUP-1 na biologia do parasita.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, concluímos que:

1. TcNUP-1 se liga à sequências de DNA que representam predominantemente fragmentos de genes e pseudogenes para proteínas hipotéticas e hipotéticas conservadas.
2. As sequências associadas à TcNUP-1 estão localizadas em regiões cromossômicas contendo grupos de genes e pseudogenes para proteínas de superfície e retrotransposons.
3. Provavelmente a associação seja sequência-específica e ocorra tanto na forma epimastigota como na tripomastigota metacíclica de *T. cruzi*.
4. TcNUP-1 é responsável por ancorar regiões cromossômicas ao envelope nuclear, provavelmente com um papel essencial na organização nuclear de *T. cruzi*.
5. Não foi possível avaliarmos o papel biológico de TcNUP-1, pois o mutante obtido permaneceu expressando a proteína e análises de eletroforese de pulsos alternados (PFGE) e *southern blot* indicaram a possibilidade da existência de outra cópia gênica.

Anexo 1. Sequências associada à TcNUP-1 em formas epimastigotas de *T. cruzi* (epi-ChIP)

Sequência	Descrição	ID	<i>e-value</i>
1	Proteína hipotética	Tc00.1047053511323.20	0.0
	Proteína hipotética	Tc00.1047053507979.20	0.0
2	Proteína hipotética	Tc00.1047053508501.90	0.0
	Proteína hipotética	Tc00.1047053510791.11	0.0
	Proteína hipotética	Tc00.1047053508365.140	0.0
	Proteína hipotética	Tc00.1047053503889.5	0.0
	Proteína hipotética	Tc00.1047053510557.76	0.0
3	Trans-sialidades (pseudogene)	Tc00.1047053504241.80	9.00E-97
	Trans-sialidades (pseudogene)	Tc00.1047053508283.40	2.00E-94
	Trans-sialidades (pseudogene)	Tc00.1047053511477.10	1.00E-83
	Trans-sialidades (pseudogene)	Tc00.1047053510397.20	2.00E-82
	Trans-sialidades (pseudogene)	Tc00.1047053511479.10	3.00E-81
4	Proteína hipotética	Tc00.1047053510155.200	0.0
	Proteína hipotética	Tc00.1047053510155.200	0.0
5	Trans-sialidades (pseudogene)	Tc00.1047053509267.6	0.0
	Trans-sialidades (pseudogene)	Tc00.1047053507685.20	0.0
	Trans-sialidades (pseudogene)	Tc00.1047053511043.45	0.0
	Trans-sialidades (pseudogene)	Tc00.1047053511705.5	0.0
	Trans-sialidades (pseudogene)	Tc00.1047053506355.35	0.0
6	Glicoproteína mucina-like	Tc00.1047053508429.20	0.0
	Glicoproteína mucina-like	Tc00.1047053509115.50	9.00E-128
	Glicoproteína mucina-like	Tc00.1047053507059.10	5.00E-123
	Glicoproteína mucina-like	Tc00.1047053509115.60	5.00E-123
	Glicoproteína mucina-like	Tc00.1047053506801.20	3.00E-118

Sequência	Descrição	ID	e-value
7	Proteína hipotética	Tc00.1047053508479.490	9.00E-145
	Proteína hipotética	Tc00.1047053504099.15	7.00E-47
	Proteína hipotética	Tc00.1047053511587.33	2.00E-25
	Retrotransposon hot spot (RHS)	Tc00.1047053504109.200	7.00E-10
8	Proteína hipotética conservada	Tc00.1047053509287.220	4.00E-108
	Proteína hipotética conservada	Tc00.1047053506281.14	2.00E-100
	Proteína hipotética conservada	Tc00.1047053510275.255	7.00E-85
	Proteína hipotética conservada	Tc00.1047053508123.10	4.00E-80
	Protease de superfície gpP63	Tc00.1047053510139.20	6.00E-73
9	Proteína hipotética conservada (pseudogene)	Tc00.1047053506763.270	0.0
	Proteína hipotética conservada (pseudogene)	Tc00.1047053510015.5	0.0
	Proteína hipotética conservada (pseudogene)	Tc00.1047053510371.141	0.0
	Proteína hipotética conservada (pseudogene)	Tc00.1047053506501.177	0.0
	Proteína hipotética conservada (pseudogene)	Tc00.1047053511081.71	0.0
10	RNA polimerase II A subunidade maior	Tc00.1047053509011.20	0.0
11	Proteína hipotética conservada	Tc00.1047053509109.80	0.0
	Proteína hipotética conservada	Tc00.1047053510603.130	0.0
	Proteína hipotética conservada	Tc00.1047053506743.60	0.0
	Proteína hipotética conservada	Tc00.1047053509255.10	0.0
12	Proteína hipotética (pseudogene)	Tc00.1047053507609.150	0.0
	Proteína hipotética	Tc00.1047053509755.89	0.0
	Proteína hipotética	Tc00.1047053510217.10	0.0
	Proteína hipotética	Tc00.1047053509547.10	0.0
	Proteína hipotética	Tc00.1047053506973.140	0.0

Sequência	Descrição	ID	e-value
13	Proteína hipotética(pseudogene)	Tc00.1047053507609.150	2.00E-50
	Proteína hipotética	Tc00.1047053509755.89	1.00E-45
	Proteína hipotética	Tc00.1047053509547.10	2.00E-44
	Proteína hipotética	Tc00.1047053510217.10	2.00E-41
	Proteína hipotética	Tc00.1047053507185.13	2.00E-38
14	Protease de superfície gpP63	Tc00.1047053511117.50	0.0
	Protease de superfície gpP63	Tc00.1047053510139.20	0.0
	Protease de superfície gpP63	Tc00.1047053510307.10	0.0
	Protease de superfície gpP63 (pseudogene)	Tc00.1047053507471.10	0.0
	Protease de superfície gpP63	Tc00.1047053508071.50	0.0
15	Proteína hipotética(pseudogene)	Tc00.1047053508401.50	0.0
	Proteína hipotética(pseudogene)	Tc00.1047053503421.20	0.0
	Proteína hipotética(pseudogene)	Tc00.1047053507787.190	0.0
	Proteína hipotética(pseudogene)	Tc00.1047053506017.20	0.0
	Proteína hipotética(pseudogene)	Tc00.1047053508381.20	0.0
16	Proteína hipotética	Tc00.1047053509733.110	0.0
17	Proteína hipotética(pseudogene)	Tc00.1047053506763.270	0.0
	Proteína hipotética(pseudogene)	Tc00.1047053510371.141	0.0
	Proteína hipotética(pseudogene)	Tc00.1047053511081.71	0.0
	Proteína hipotética(pseudogene)	Tc00.1047053510015.5	0.0
	Proteína hipotética(pseudogene)	Tc00.1047053506759.150	0.0
18	Proteína hipotética	Tc00.1047053457101.10	0.0
	Proteína hipotética	Tc00.1047053504635.20	0.0
	Proteína hipotética	Tc00.1047053507223.20	0.0
	Proteína hipotética	Tc00.1047053507079.10	0.0
19	Proteína hipotética	Tc00.1047053510901.140	0.0
	Proteína hipotética	Tc00.1047053507035.70	6.00E-140

Sequência	Descrição	ID	e-value
20	Proteína hipotética	Tc00.1047053511771.171	7.00E-10
21	Trans-sialidades (pseudogene)	Tc00.1047053504241.80	9.00E-97
	Trans-sialidades (pseudogene)	Tc00.1047053508283.40	2.00E-94
	Trans-sialidades (pseudogene)	Tc00.1047053511477.10	1.00E-83
	Trans-sialidades (pseudogene)	Tc00.1047053510397.20	2.00E-82
	Trans-sialidades (pseudogene)	Tc00.1047053511479.10	3.00E-81
22	Proteína hipotética conservada	Tc00.1047053511887.40	0.0
	Proteína hipotética conservada	Tc00.1047053506537.110	0.0
	Proteína hipotética conservada	Tc00.1047053509259.126	1.00E-165
	Proteína hipotética conservada (pseudogene)	Tc00.1047053506917.27	8.00E-158
	Proteína hipotética conservada	Tc00.1047053507501.20	2.00E-152
23	Proteína hipotética	Tc00.1047053508293.120	0.0
	Proteína hipotética(pseudogene)	Tc00.1047053508247.100	0.0
	Proteína hipotética	Tc00.1047053510373.40	0.0
	Proteína hipotética	Tc00.1047053510465.90	0.0
	Proteína hipotética	Tc00.1047053510021.60	0.0
24	kinesina	Tc00.1047053509207.150	0.0
	kinesina	Tc00.1047053506857.80	0.0
	Proteína kinase	Tc00.1047053503627.20	5.00E-05
25	Proteína hipotética	Tc00.1047053504239.150	1.00E-119
	Proteína hipotética	Tc00.1047053506765.49	2.00E-105
	Proteína hipotética	Tc00.1047053503973.110	2.00E-102
	Proteína hipotética	Tc00.1047053508873.20	5.00E-100
	Proteína hipotética	Tc00.1047053508871.160	5.00E-100

Sequência	Descrição	ID	e-value
26	Proteína hipotética(pseudogene)	Tc00.1047053507609.150	2.00E-117
	Proteína hipotética	Tc00.1047053509755.89	1.00E-112
	Proteína hipotética	Tc00.1047053510217.10	1.00E-112
	Proteína hipotética	Tc00.1047053508191.10	3.00E-110
	Proteína hipotética	Tc00.1047053509547.10	3.00E-110
27	Proteína hipotética conservada	Tc00.1047053510029.80	1.00E-105
	Proteína hipotética conservada	Tc00.1047053507683.10	3.00E-103
	Proteína hipotética conservada	Tc00.1047053510029.90	3.00E-103
	Proteína hipotética conservada	Tc00.1047053511291.80	3.00E-103
28	Proteína hipotética conservada	Tc00.1047053506303.80	0.0
	Proteína R27-2	Tc00.1047053506811.160	2.00E-168
29	Precursor de curzipaína	Tc00.1047053507603.270	0.0
	Cisteína peptidase	Tc00.1047053507603.260	0.0
	Cisteína peptidase C-terminal (pseudogene)	Tc00.1047053510073.17	0.0
	Cisteína proteinase (pseudogene)	Tc00.1047053507537.10	0.0
	Cisteína peptidase	Tc00.1047053509401.30	0.0
30	Proteína hipotética(pseudogene)	Tc00.1047053507609.150	6.00E-152
	Proteína hipotética	Tc00.1047053509755.89	2.00E-149
	Proteína hipotética	Tc00.1047053510217.10	2.00E-142
	Proteína hipotética	Tc00.1047053508191.10	2.00E-139
	Proteína hipotética	Tc00.1047053509547.10	3.00E-135
31	kinesina	Tc00.1047053504047.40	3.00E-126
32	Trans-sialidades	Tc00.1047053506939.120	0.0
	Trans-sialidades	Tc00.1047053506813.190	0.0
	Trans-sialidades	Tc00.1047053507523.10	0.0
	Trans-sialidades	Tc00.1047053506703.90	0.0
	Trans-sialidades	Tc00.1047053511173.160	0.0

Sequência	Descrição	ID	e-value
33	Proteína de superfície associada à Mucina (MASP pseudogene)	Tc00.1047053510791.60	8.00E-47
	Proteína hipotética	Tc00.1047053507953.170	5.00E-45
	Proteína hipotética	Tc00.1047053507357.50	1.00E-42
	Proteína hipotética	Tc00.1047053507357.140	1.00E-42
	Proteína hipotética	Tc00.1047053506769.40	1.00E-42
	Proteína hipotética	Tc00.1047053506769.40 104	1.00E-42
34	UDP-Gal ou UDP-GlcNAc-dependente	Tc00.1047053507443.30	3.00E-87
	UDP-Gal ou UDP-GlcNAc-dependente	Tc00.1047053508367.20	3.00E-87
	UDP-Gal ou UDP-GlcNAc-dependente	Tc00.1047053506379.10	6.00E-85
	UDP-Gal ou UDP-GlcNAc-dependente	Tc00.1047053508065.10	6.00E-85
	UDP-Gal ou UDP-GlcNAc-dependente	Tc00.1047053509515.20	6.00E-85
35	Proteína hipotética conservada	Tc00.1047053511491.20	0.0
36	beta galactofuranosil glicosiltransferase,	Tc00.1047053504115.30	0.0
	beta galactofuranosil glicosiltransferase,	Tc00.1047053509033.20	0.0
	beta galactofuranosil glicosiltransferase (pseudogene)	Tc00.1047053508521.30	0.0
	beta galactofuranosil glicosiltransferase (pseudogene)	Tc00.1047053506217.20	0.0
	beta galactofuranosil glicosiltransferase,	Tc00.1047053509875.50	0.0
37	Proteína hipotética conservada	Tc00.1047053508669.10	0.0
	Proteína hipotética conservada	Tc00.1047053508809.40	3.00E-174
38	<i>no hits</i>		
39	Proteína hipotética conservada	Tc00.1047053508669.10	0.0
	Proteína hipotética conservada	Tc00.1047053508669.10	2.00E-129
	Proteína hipotética conservada	Tc00.1047053508809.40	3.00E-174
	Proteína hipotética conservada	Tc00.1047053508809.40	5.00E-120

Sequência	Descrição	ID	<i>e-value</i>
40	Trans-sialidades (pseudogene)	Tc00.1047053509437.109	8.00E-173
	Trans-sialidades (pseudogene)	Tc00.1047053509085.31	2.00E-167
	Trans-sialidades (pseudogene)	Tc00.1047053509429.41	1.00E-162
	Trans-sialidades (pseudogene)	Tc00.1047053508605.31	1.00E-162
	Trans-sialidades (pseudogene)	Tc00.1047053508297.14	3.00E-160
41	Proteína hipotética conservada	Tc00.1047053508637.120	0.0
	Proteína hipotética conservada	Tc00.1047053509245.10	0.0

Anexo 2. Sequências associadas à TcNUP-1 em formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* (meta-ChIP)

Sequência	Descrição	ID	e-value
1	Proteína hipotética conservada	Tc00.1047053509005.90	1.4e-59
	Proteína hipotética conservada	Tc00.1047053509005.90	1.7e-59
3	Proteína hipotética	Tc00.1047053510829.20	9.4e-68
	Proteína hipotética	Tc00.1047053511825.130	2.2e-66
	Proteína hipotética conservada	Tc00.1047053507951.215	4.9e-25
4	Proteína hipotética	Tc00.1047053510829.20	9.4e-68
	Proteína hipotética	Tc00.1047053511825.130	2.2e-66
	Proteína hipotética conservada	Tc00.1047053507951.215	4.9e-25
5	Proteína hipotética	Tc00.1047053506501.300	1.2e-76
	Proteína hipotética	Tc00.1047053511603.480	8.9e-76
	Proteína hipotética	Tc00.1047053507731.30	2.4e-61
	Proteína hipotética	Tc00.1047053511605.10	1.7e-57
	Proteína hipotética	Tc00.1047053509699.240	4.2e-57
6	Proteína hipotética conservada	Tc00.1047053510889.270	6.8e-46
	Proteína hipotética conservada	Tc00.1047053506529.590	8.7e-44
7	Proteína hipotética	Tc00.1047053508359.70	6.6e-104
	Proteína hipotética	Tc00.1047053509525.50	1.1e-93
	Proteína hipotética	Tc00.1047053508365.70	8.9e-93
	Proteína hipotética	Tc00.1047053509525.210	7.7e-88
	Proteína hipotética	Tc00.1047053507973.20	8.1e-88
8	Retrotransposon <i>hot spot</i> (RHS, pseudogene)	Tc00.1047053509521.84	1.6e-25
	Retrotransposon <i>hot spot</i> (RHS, pseudogene)	Tc00.1047053507621.10	2.8e-22
	Proteína hipotética (pseudogene)	Tc00.1047053509813.10	1.7e-20
9	Proteína hipotética	Tc00.1047053506321.230	1.5e-89
	Proteína hipotética (pseudogene)	Tc00.1047053507511.71	5.5e-71
	Proteína hipotética (pseudogene)	Tc00.1047053508187.20	1.0e-69

Sequência	Descrição	ID	e-value
	Proteína hipotética (pseudogene)	Tc00.1047053479517.40	7.3e-67
	Proteína hipotética	Tc00.1047053506529.370	1.2e-66
10	Proteína hipotética	Tc00.1047053506321.230	1.5e-89
	Proteína hipotética (pseudogene)	Tc00.1047053507511.71	5.5e-71
	Proteína hipotética (pseudogene)	Tc00.1047053508187.20	1.0e-69
	Proteína hipotética (pseudogene)	Tc00.1047053479517.40	7.3e-67
	Proteína hipotética	Tc00.1047053506529.370	1.2e-66
11	Proteína hipotética	Tc00.1047053508359.70	3.8e-89
	Proteína hipotética	Tc00.1047053509525.210	1.7e-73
	Proteína hipotética	Tc00.1047053508365.70	3.5e-73
	Proteína hipotética	Tc00.1047053507973.20	6.7e-68
	Proteína hipotética	Tc00.1047053509525.50	8.7e-66
12	<i>no hits</i>		
13	Proteína hipotética (pseudogene)	Tc00.1047053506451.13	3.9e-43
	Proteína hipotética (pseudogene)	Tc00.1047053508771.55	1.4e-28
	Proteína hipotética (pseudogene)	Tc00.1047053508595.30	3.4e-22
14	Retrotransposon <i>hot spot</i> (RHS, pseudogene)	Tc00.1047053509521.84	7.9e-26
	Retrotransposon <i>hot spot</i> (RHS, pseudogene)	Tc00.1047053507621.10	1.2e-23
	Proteína hipotética (pseudogene)	Tc00.1047053509813.10	7.4e-21
	Mucina TcMUC (pseudogene)	Tc00.1047053510701.50	1.8e-20
	Mucina TcMUC (pseudogene)	Tc00.1047053507833.21	1.9e-20
15	Proteína hipotética	Tc00.1047053506665.10	3.1e-45
	Proteína hipotética	Tc00.1047053507473.10	2.6e-32
	Proteína hipotética	Tc00.1047053511391.80	1.4e-20
16	Proteína hipotética conservada	Tc00.1047053506807.39	3.0e-67
	Proteína hipotética conservada	Tc00.1047053509823.4	5.2e-67
17	Proteína hipotética (pseudogene)	Tc00.1047053507609.150	9.3e-73

Sequência	Descrição	ID	e-value
	Proteína hipotética	Tc00.1047053509755.89	1.1e-69
	Proteína hipotética	Tc00.1047053509547.10	4.4e-68
	Proteína hipotética	Tc00.1047053510217.10	8.3e-68
	Proteína hipotética	Tc00.1047053508191.10	4.4e-65
18	Proteína hipotética (pseudogene)	Tc00.1047053507609.150	1.5e-32
	Proteína hipotética	Tc00.1047053510217.10	2.7e-32
	Proteína hipotética	Tc00.1047053508191.10	3.4e-32
	Proteína hipotética	Tc00.1047053509547.10	8.2e-32
	Proteína hipotética	Tc00.1047053509755.89	8.5e-32
19	Domínio protéico SH3	Tc00.1047053511517.153	8.3e-65
	Proteína hipotética conservada	Tc00.1047053511737.60	3.5e-63
22	Proteína hipotética conservada	Tc00.1047053511537.60	6.3e-94
	Proteína hipotética conservada	Tc00.1047053508707.320	4.1e-93
23	<i>no hits</i>		
24	DEAD/ RNA H helicase ATP-dependente (pseudogene)	Tc00.1047053506587.40	1.2e-140
	DEAD/ RNA H helicase ATP-dependente (pseudogene)	Tc00.1047053506929.60	2.6e-101
	DEAD/ RNA H helicase ATP-dependente	Tc00.1047053511199.9	2.9e-21
	DEAD/ RNA H helicase ATP-dependente (pseudogene)	Tc00.1047053510997.50	7.6e-12
	DEAD/ RNA H helicase ATP-dependente	Tc00.1047053506959.30	1.6e-11
25	Proteína kinase	Tc00.1047053508215.9	2.9e-189
	Proteína kinase	Tc00.1047053508879.4	2.1e-89
	Proteína kinase	Tc00.1047053503463.10	0,00
26	Proteína kinase	Tc00.1047053508215.9	4.7e-130
	Proteína kinase	Tc00.1047053508879.4	4.0e-126
27	Proteína hipotética conservada	Tc00.1047053508707.40	1.5e-80
	Proteína hipotética conservada	Tc00.1047053507037.80	4.4e-76

7. REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARONSON, R.P. & BLOBEL, G. On the attachment of the nuclear pore complex. **J. Cell. Biol.** 62: 746-754, 1974.

AEBI, U.; COHN, J.; BUHLE, L.; GERACE, L. The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. **Nature.** 323: 560-564, 1986.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** 25: 3389-3402, 1997.

ANDREWS, N. W.; ABRAMS, C. K.; SLATIN, S. L.; GRIFFITHS, G. A. *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. **Cell.** 61: 1277-87, 1990.

ASTOLFI FILHO, S.; MARTINS de SÁ, C.; GANDER, E. S. On the chromatin structure of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 1: 45-53, 1980.

ÁVILA, A. R. & GOLDENBERG, S. Functional genomics and insights into *Trypanosoma cruzi* gene expression regulation. **The Open Parasitology Journal.** 4, 148-155, 2010.

AYMERICH, S. & GOLDENBERG, S. The karyotype of *Trypanosoma cruzi* Dm 28c: Comparison with other *T. cruzi* strains and trypanosomatids. **Experimental Parasitology.** 69:1107-1115, 1989.

BARTHOLOMEU, D.C. ; CERQUEIRA, G.C. ; LEO, A.C. ; DAROCHA, W.D.; PAIS, F.S.; MACEDO, C. ; DJIKENG, A.; TEIXEIRA, S.M.; EL-SAYED, N.M. Genomic organization and expression profile of the mucin-associated surface protein (masp) family of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*, **Nucleic Acids Research.** 39, 3407–3417, 2009.

BELLI, S. I. Chromatin remodelling during the life cycle of trypanosomatids. **Int. J. Parasitol.** 30: 679-687, 2000.

BLUMENTHAL, S. S. D.; CLARK, G. B.; ROUX, S. J. Biochemical and immunological characterization of pea nuclear intermediate filament proteins. **Planta.** 218: 965-975, 2004.

BOHM, F.; KAPPES, F.; SCHOLTEN, I.; RICHTER, N.; MATSUO, H.; KNIPPERS, R.; WALDMANN, T. The SAF-box domain of chromatin protein DEK. **Nucleic Acids Res.** 33: 1101-1110, 2005.

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

BORDE, V. & DUGUET, M. The mapping of DNA topoisomerase sites in vivo: a tool to enlight the functions of topoisomerases. **Biochimie.** 80: 223-233, 1998.

BRANCHE, C.; OCHAYA, S.; ASLUND, L.; ANDERSSON, B. Comparative karyotyping as a tool for genome structure analysis of *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem. Parasitol.** 147:1 30-8, 2006.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Ann. Rev. of Microbiology.** 27:347-82, 1973.

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

BRIDGER, J.M.; FOEGER, N.; KILL, I.R.; HERRMANN, H. The nuclear lamina. Both a structural framework and a platform for genome organization. **FEBS J** 274:1354–6, 2007.

BRIONES, M. R. S.; SOUTO, R. P.; STOLF, B. S.; ZINGALES, B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. **Mol. Biochem. Parasitol.** 104, p. 219-232, 1999.

BRISSE, S.; BARNABE, C.; BANULS, A.L.; SIDIBE, I.; NOEL, S.; TIBAYRENC, M. A phylogenetic analysis of the *Trypanosoma cruzi* genome project CL Brener reference strain by multilocus enzyme electrophoresis and multiprimer random amplified polymorphic DNA fingerprinting. **Molecular and Biochemical Parasitology.** 92:2, 253-263, 1998.

BRISSE, S.; HENRIKSSON, J.; BARNABE, C.; DOUZERY, E.J.; BERKVEN, D.; SERRANO, M.; DE CARVALHO, M.R.; BUCK, G.A.; DUJARDIN, J.C.; TIBAYRENC, M. Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. **Infection, Genetics and Evolution.** 3:173-183, 2003.

BURKE, B. The nuclear envelope: filling in gaps. **Nat. Cell Biol.** 3: E273-274, 2001.

BURKHARD, P.; STETEFELD, J.; STRELKOV, S.V. Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. **Trends Cell Biol.** 11:82-88, 2001.

BURLEIGH, B.A.; ANDREWS, N.W. Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Current Opinion in Microbiology.** 1:4, 461-465, 1995.

BYSTRICKY, K.; LAROCHE, T.; van HOUWE, G.; BLASZCZYK, M.; GASSER, S.M. Chromosome looping in yeast: telomere pairing and coordinated movement reflect anchoring efficiency and territorial organization. **J. Cell Biol.** 168: 375-387, 2005.

CANO, M.I.; GRUBER, A.; VAZQUEZ, M.; CORTES, A.; LEVIN, M.J.; GONZALEZ, A.; DEGRAVE, W.; RONDINELLI, E.; ZINGALES, B.; RAMIREZ, J.L. *et al.* Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project. **Mol. Biochem. Parasitol.** 71, 273-8, 1995.

CARVALHO, T.M. & DE SOUZA, W. Early events related with the behavior of *Trypanosoma cruzi* within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. **Cell Struct. Funct.** 14: 383 – 392, 1989.

CASOLARI, J.M., BROWN, C.R., KOMILI, S., WEST, J., HIERONYMUS, H., AND SILVER, P.A. Genome-wide localization of the nuclear transport machinery couples transcriptional status and nuclear organization **Cell.** 14:117, 427–439, 2004.

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

CHANG, C.R.; WU, C.S.; HOM, Y.; GARTENBERG, M.R. Targeting of cohesin by transcriptionally silent chromatin. **Genes Dev.** 19: 3031-3042, 2005.

COHEN, M.; LEE, K.K.; WILSON, K.L.; GRUENBAUM, Y. Transcriptional repression, apoptosis, human disease and the functional evolution of the nuclear lamina. **Trends Biochem. Sci.** 26:41-47, 2001.

CONTRERAS, V.T., MOREL, C.M., GOLDENBERG, S. Stage specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Mol. Biochem. Parasitol.** 14: 83-96, 1985a.

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

COURA, J.R.; JUNQUEIRA, A.C.; BOIA, M.N.; FERNANDES, O.; BONFANTE, C.; CAMPOS, J.E.; SANTOS, L.; DEVERA, R. Chagas disease in the Brazilian Amazon: IV. A new cross-sectional study. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.** 44: 159-65, 2002.

COURA, J.R.; DE CASTRO, S.L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** 97:1, 3-24, 2002.

COURA, J. R. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2005, p.1137-2025.

- COURA, J.R. & VIÑAS, P.A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**. 2010.
- CRAIG, J.M. Heterochromatin – many flavours, common themes. **BioEssays**. 27: 17-28, 2004.
- CRICK, F.H.C. Is the alpha-keratin a coiled-coil? **Nature**. 170:882-883, 1952.
- CRISP, M.; LIU, Q.; ROUX, K.; RATTNER, J.B.; SHANAHAN, C.; BURKE, B.; STAHL, P.D.; HODZIC, D. Coupling of the nucleus and cytoplasm: Role of the LINC complex. **J. Cell Biol.** 172:41–53, 2006.
- CRONSHAW, J.M.; KRUTCHINSKY, A.N.; ZHANG, W.; CHAIT, B.T.; MATUNIS, M.J. Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. **J. Cell Biol.** 158: 915–927, 2002.
- D'ANGELO, M.A.; HETZER, M.W. The role of the nuclear envelope in cellular organization. **Cell. Mol. Life. Sci.** 63:316-332, 2006.
- DANIELS, JP; GULL, K; WICKSTEAD, B. Cell Biology of the Trypanosome Genome. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 74:4 552-569, 2010.
- DAHL, K.N.; RIBEIRO, A.J.S.; LAMMERDING, J. Nuclear Shape, Mechanics, and Mechanotransduction. **Circulation Research Circ. Res.** 102;1307-1318, 2008.
- DA SILVEIRA, J.F. Biologia molecular do *Trypanosoma cruzi*. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. 2^a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000 p.127-152.
- DE CARVALHO, T.U.; DE SOUZA, W. Infectivity of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Revista Instituto de Medicina Tropical São Paulo**. v. 28, n. 4, p. 205-12, 1986.
- DECHAT, T.; PFLEGHAAR, K.; SENGUPTA, K.; SHIMI, T.; SHUMAKER, D.K.; SOLIMANDO, L.; GOLDMAN RD. Nuclear lamins: Major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. **Genes Dev.** 22: 832–853, 2008.
- DE SOUZA, W. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Int. Ver. Citol.** 86: 197-283, 1984.
- DE SOUZA, W. O parasito e sua interação com os hospedeiros. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. 2^a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.88-126.
- DE SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Curr. Pharm. Des.** 8: 269-85, 2002.

DE SOUZA, W.; SANT'ANNA, C.; CUNHA-E-SILVA, N.L. Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**. 44:67-124, 2009.

DIAS, J.C.P. Epidemiologia. Em: *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas. Zigman Brener; Zilton Andrade; Manoel Barral-Neto 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 2000.

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

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

DITTMER, T.A.; STACEY, N.J.; SUGIMOTO-SHIRASU, K.; RICHARDS, E.J. Little nuclei genes affecting nuclear morphology in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell**. 9:2793–2803, 2007.

DI NOIA, J.M.; D'ORSO, I.; ASLUND, L.; SANCHEZ, D.O.; FRASCH, A.C. The *Trypanosoma cruzi* mucin family is transcribed from hundreds of genes having hypervariable regions. **Journal of Biological Chemistry**. 273:18, 10843-10850, 1998.

DORNER, D.; GOTZMANN, J.; FOISNER, R. Nucleoplasmic lamins and their interaction partners, LAP2alpha, Rb, and BAF, in transcriptional regulation. **FEBS J.** 274:1362–73, 2007.

DOSSIN, F. D. M., AND S. SCHENKMAN. Actively transcribing RNA polymerase II concentrates on spliced leader genes in the nucleus of *Trypanosoma cruzi*. **Eukaryot. Cell**. 4: 960–970, 2005.

DUMAS, M. Sleeping sickness, a reemerging sickness. **Bull. Acad. Natl. Med.** 184, 1867-1885, 2000.

ELIAS, M.C.; MARQUES-PORTO, R.; FREYMULLER, E.; SCHENKMAN, S. Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation. **Mol. Biochem. Parasitol.** 112: 79-90, 2001.

ELIAS, M.C.; FARIA, M.; MORTARA, R.A.; MOTTA, M.C.M.; de SOUZA, W.; THIRY, M.; SCHENKMAN, S. Chromosome location changes in the *Trypanosoma cruzi* nucleus. **Eukaryot. Cell**. 1: 944-953, 2002.

ELIAS, M.C.; NARDELLI, S.C.; SCHENKMAN, S. Chromatin and nuclear organization in *Trypanosoma cruzi*. **Future Microbiology**. 4(8), 1065-1074, 2009.

ELLIS, D.; JENKINS, H.; WHITFIELD, W.G.; HUTCHISON, C.J. GST-lamin fusion proteins act as dominant negative mutants in *Xenopus* egg extract and reveal the function of the lamina in DNA replication. **J. Cell Sci.** 110: 2507-2518, 1997.

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

EL-SAYED, N.M.; MYLER, P.J.; BLANDIN, G.; BERRIMAN, M.; CRABTREE, J.; AGGARWAL, G.; CALER, E.; RENAULD, H.; WORTHEY, E.A.; HERTZ-FOWLER, C.; GHEDIN, E.; PEACOCK, C.; BARTHOLOMEU, D.C.; HAAS, B.J.; TRAN, A.N.; WORTMAN, J.R.; ALSMARK, U.C.M.; ANGIUOLI, S.; ANUPAMA, A.; BADGER, J.; BRINGAUD, F.; CADAG, E.; CARLTON, J.M.; CERQUEIRA, G.C.; CREASY, T.; DELCHER, A.L.; DJIKENG, A.; EMBLEY, T.M.; HAUSER, C.; IVENS, A.C.; KUMMERFELD, S.K.; PEREIRA-LEAL, J.B.; NILSSON, D.; PETERSON, J.; SALZBERG, S.L.; SHALLOM, J.; SILVA, J.C.; SUNDARAM, J.; WESTENBERGER, S.; WHITE, O.; MELVILLE, S.E.; DONELSON, J.E.; ANDERSSON, B.; STUART, K.D.; HALL, N. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. **Science.** 309: 404-409, 2005b.

ERSFELD, K.; MELVILLE, S.E.; GULL, K. Nuclear and genome organization of *Trypanosoma brucei*. **Parasitology Today.** 15(2): 58-63, 1999.

ERSFELD, K. Nuclear architecture, genome and chromatin organisation in *Trypanosoma brucei*. **Research in Microbiology.** in press 1e11, 2011.

FAWCETT, D.W. On the occurrence of a fibrous lamina on the inner aspect of the nuclear envelope in certain cells of vertebrates. **Am. J. Anat.** 119: 129-145, 1966.

FERNANDEZ, M.A.; MUNOZ-FERNANDEZ, M.A.; FRESNO, M. Involvement of beta 1 integrins in the binding and entry of *Trypanosoma cruzi* into human macrophages. **Eur. J. Immunol.** 23: 552-557, 1993.

FIGUEIREDO, L.M.; FREITAS-JUNIOR, L.H.; BOTTIUS, E.; LIVO-MARIN, J.C.; SCHERF, A. A central role for *Plasmodium falciparum* subtelomeric regions in spatial positioning and telomere length regulation. **EMBO J.** 21: 815-824, 2002.

FIGUEIREDO, L. M. & CROSS, G. A. M. Nucleosomes are depleted at the VSG expression site transcribed by RNA polymerase I in African trypanosomes. **Eukaryot. Cell** 9, 148e154, 2010.

FISHER, D.Z.; CHAUDHARY, N.; BLOBEL, G. cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 83: 6450-6454, 1986.

FOSTER, H.A. & BRIDGER, J.M. The genome and the nucleus: a marriage made by evolution. Genome organisation and nuclear architecture. **Chromosoma.** 114: 212-229, 2005.

FRAGOSO, S.P.; GOLDENBERG, S. Cloning and characterization of the gene encoding *Trypanosoma cruzi* topoisomerase II. **Mol. Biochem. Parasitol.** 55: 127-134, 1992.

FRAGOSO, S.P.; MATTEI, D.; HINES, J.C.; RAY, D.; GOLDENBERG, S. Expression and cellular localization of *Trypanosome cruzi* type II DNA topoisomerase. **Mol. Biochem. Parasitol.** 94: 197-204, 1998.

FREITAS-JUNIOR, L.H.; PORTO, R.M.; PIRRIT, L.A.; SCHENKMAN, S.; SCHERF, A. Identification of the telomere in *Trypanosoma cruzi* reveals highly heterogeneous telomere lengths in different parasite strains. **Nucleic Ac. Res.** 27:12, 2451-2456, 1999.

FREITAS-JUNIOR, L.H.; BOTTIUS, E.; PIRRIT, L.A.; DEITSCH, K.W.; SCHEIDIG, C.; GUINET, F.; NEHRBASS, U.; WELLEMS, T.E.; SCHERF, A. Frequent ectopic recombination of virulence factor genes in telomeric chromosome cluster of *P. falciparum*. **Nature.** 407: 1018-1022, 2000.

GAUNT, M.W.; YEO, M.; FRAME, I.A.; TOTHARD, J.R.; CARRASCO, H.J.; TAYLOR, M.C.; MENA, S.S.; VEAZEY, P.; MILES, G.A.; ACOSTA, N.; ROJAS DE ARIAS, A.; MILES, M.A. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. **Nature.** 421, 936-939, 2003.

GERACE, L. & BURKE, B. Functional organization of the nuclear envelope. **Annu. Rev. Cell Biol.** 4: 335-374, 1988.

GINDULLIS, F. & MEIER, I. Matrix attachment region binding protein MFP1 is localized in discrete domains at the nuclear envelope. **Plant. Cell** 11: 1117-1128, 1999.

GLYNN, E.F.; MEGEE, P.C.; YU, H.G.; MISTROT, C.; UNAL, E.; KOSHLAND, D.E.; DeRISI, J.L.; GERTON, J.L. Genome-wide mapping of the cohesin complex in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS Biol.** 2: E259, 2004.

GODOY P.D.M.; NOGUEIRA-JUNIOR, L.A.; PAES, E.S.; CORNEJO, A.; MARTINS, R.M.; SILBER, A.M.; SCHENKMAN, S.; ELIAS, M.C. Trypanosome Prereplication Machinery Contains a Single Functional Orc1/Cdc6 Protein, Which Is Typical of *Archaea*. **Eukaryotic Cell.** 1592–1603, 2009.

GOLDBERG, M. W.; FISEROVA, J.; HUTTENLAUCH, I. AND STICK, R. A new model for nuclear lamina organization. **Biochem. Soc. Trans.** 36:1339–1343, 2008.

GOTTA, M.; LAROCHE, T.; FORMENTON, A.; MAILLET, L.; SCHERTHAN, H.; GASSER, S.M. The clustering of telomeres and colocalization with Rap1, Sir3, and Sir4 proteins in wild-type *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Cell Biol.** 134: 1349-1363, 1996.

GRUENBAUM, Y.; LEE, K.K.; LIU, J.; COHEN, M.; WILSON, K.L. The expression, lamin-dependent localization and RNAi depletion phenotype for emerin in *C. elegans*. **J. Cell Sci.** 115: 923–929, 2002.

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

HALL, B.F.; WEBSTER, P.; MA, A.K.; JOINER, K.A.; ANDREWS, N.W. Desialylation of lysosomal membrane glycoproteins by *Trypanosoma cruzi*: a role for the surface neuraminidase in facilitating parasite entry into the host cell cytoplasm. **Journal of Experimental Medicine.** 176: 2, 313-325, 1992.

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

HARDER, P.A.; SILVERSTEIN, R.A.; MEIER, I. Conservation of matrix attachment region-binding filament-like protein 1 among higher plants. **Plant Physiol.** 122: 225-234, 2000.

HARRIS, H. **The birth of the cell.** New Haven: Yale University Press, 1999.

HECKER, H.; BETSCHART, B.; BENDER, K.; BURRI, M.; SCHLIMME, W. The chromatin of trypanosomes. **Int. J. Parasitol.** 24: 809-819, 1994.

HEDIGER, F.; DUBRANA, K.; GASSER, S.M. Myosin-like proteins 1 and 2 are not required for silencing or telomere anchoring, but act in the Tel1 pathway of telomere length control. **J. Struct. Biol.** 140: 79-91, 2002a.

HEDIGER, F.; NEUMANN, F.R.; van HOUWE, G.; DUBRANA, K.; GASSER, S.M. Live imaging of telomeres: yKu and Sir proteins define redundant telomere-anchoring pathways in yeast. **Curr. Biol.** 12: 2076-2089, 2002b.

HENRIKSSON, J., ASLUND, L., AND PETTERSSON, U. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Today.** 12:108-114, 1996.

HERRMANN, F. and FACKELMAYER, F.O. Nuclear architecture – on higher ground. **Chromosome Res.** 13: 3-8, 2005.

HETZER, M. W.; WALTHER, T.C.; MATTAJ, I.W. Pushing the envelope: Structure, function, and dynamics of the nuclear periphery. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.** 21:367–380, 2005.

HETZER, M. W. The Nuclear Envelope. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.** p.1-16, 2010.

HOUBEN, F.; RAMAEKERS, F.C.; SNOECKX, L.H.; BROERS, J.L.; Role of nuclear lamina-cytoskeleton interactions in the maintenance of cellular strength. **Biochim. Biophys. Acta.** 1773(5):675-86, 2007.

HUTCHISON, C.J. Lamins: building blocks or regulators of gene expression? **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 3: 848-858, 2002.

JAGATHEESAN, G.; THANUMALAYAN, S.; MURALIKRISHNA, Bh.; RANGARAJ, N.; KARANDE, A.A.; PARNAIK, V.K. Colocalization of intranuclear lamin foci with RNA splicing factors. **J. Cell Sci.** 112: 4651-4661, 1999.

JANZEN, C.J.; HAKE, S.B.; LOWELL, J.E.; CROSS, G.A.M. Selective di- or trimethylation of histone H3 lysine 76 by two DOT1 homologs is important for cell cycle regulation in *Trypanosoma brucei*. **Mol. Cell.** 23:497–507, 2006.

KALVERDA, B.; PICKERSGILL, H.; SHLOMA, V. V.; FORNEROD, M. Nucleoporins Directly Stimulate Expression of Developmental and Cell-Cycle Genes Inside the Nucleoplasm. **Cell.** 40, 360-371, 2010.

LAMOND, A.I.; SPECTOR, D.L. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 4:8 605-12, 2003.

LENZ-BOHME, B.; WISMAR, J.; FUCHS, S.; REIFEGERSTE, R.; BUCHNER, E.; BETZ, H.; SCHMITT, B. Insertional mutation of the *Drosophila* nuclear lamin Dm0 gene results in defective nuclear envelopes, clustering of nuclear pore complexes, and accumulation of annulate lamellae. **J. Cell Biol.** 137:1001–1016, 1997.

LIU, J.; ROLEF-BEN SHAHAR, T.; RIEMER, D.; TREININ, M.; SPANN, P.; WEBER, K.; FIRE, A.; GRUENBAUM, Y. Essential roles for *Caenorhabditis elegans* lamin gene in nuclear organization, cell cycle progression and spatial organization of nuclear pore complexes. **Mol. Biol. Cell.** 11: 3937-3947, 2000.

LODE'N, M. & STEENSEL, B.V.. Whole-genome views of chromatin structure. **Chromosome Research.** 13: 289–298, 2005.

LOWELL, J.E.; KAISER, F.; JANZEN, C.J.; CROSS, G.A. Histone H2AZ dimerizes with a novel variant H2B and is enriched at repetitive DNA in *Trypanosoma brucei*. **J. Cell Sci.** 118: 5721-5730, 2005.

LUPAS, A. Coiled coils: new structures and new functions. **Trends Biochem. Sci.** 1996.

LUPAS, A.N.; GRUBER, M. The structure of alpha-helical coils. **Advances in Protein Chemistry.** 70, p37-38, 2005.

MACHADO, C.A.; AYALA, F.J. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Proceedings National Academy Sciences USA.** 98, 7396-401, 2001.

MACHADO, C.R.; AUGUSTO-PINTO, L.; MCCULLOCH, R.; TEIXEIRA, S.M. DNA metabolism and genetic diversity in Trypanosomes. **Mutat. Res.** 612(1):40-57, 2006.

MARSHALL, W.F. & SEDAT, J.W. Nuclear architecture. **Results Probl. Cell Differ.** 25: 283-301, 1999.

MANS, B.J., ANANTHARAMAN, V., ARAVIND, L. AND KOONIN, E.V. Comparative genomics, evolution and origins of the nuclear envelope and nuclear pore complex. **Cell Cycle.** 12, 1612–1637, 2004.

MARALDI, N.M. & LATTANZI, G. Linkage of lamins to fidelity of gene transcription. **Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.** 15: 277-294, 2005.

MARALDI, N.M.; LATTANZI, G.; CAPANNI, C.; COLUMBARO, M.; MERLINI, L.; MATTIOLI, E.; SABATELLI, P.; SQUARZONI, S.; MANZOLI, F.A. Nuclear envelope proteins and chromatin arrangement: a pathogenic mechanism for laminopathies. **Eur. J. Histochem.** 50: 1-8, 2006.

MARQUES PORTO, R.; AMINO, R.; ELIAS, M.C.; FARIA, M.; SCHENKMAN, S. Histone H1 is phosphorylated in non-replicating and infective forms of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 119: 265-271, 2002.

MASUDA, K.; XU, Z.J.; TAKAHASHI, S.; ITO, A.; ONO, M.; NOMURA, K.; INOUE, M. Peripheral framework of carrot cell nucleus contains a novel protein predicted to exhibit a long α -helical domain. **Exp. Cell Res.** 232: 173-181, 1997.

MATTOUT, A.; GOLDBERG, M.; TZUR, Y.; MARGALIT, A.; GRUENBAUM, Y. Specific and conserved sequences in *D melanogaster* and *C elegans* lamins and histone H2A mediate the attachment of lamins to chromosomes. **J. Cell Sci.** 120: 77–85, 2007.

MAZZAROTTO, G. A.; RABONI, S. M.; STELLA, V.; CARSTENSEN, S.; DE NORONHA, L.; LEVIS, S.; ZANLUCA, C.; ZANETTI, C. R.; BORDIGNON, J.; DUARTE DOS SANTOS, C.N. Production and characterization of monoclonal antibodies against the recombinant nucleoprotein of *Araucaria hantavirus*. **J. Virol. Methods.** 162(1-2):96-100, 2009.

MEDINA-ACOSTA, E. & CROSS, G.A.M. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple mini-prep procedure. **Mol. Biochem. Parasitol.** 59: 327-330, 1993.

MEIER, I.; PHELAN, T.; GRUISSSEN, W.; SPIKER, S.; SCHNEIDER, D. MPF1, a novel plant filament-like protein with affinity for matrix attachment region DNA. **Plant Cell.** 8: 2105-2115, 1996.

MELCER, S.; GRUENBAUM, Y.; KROHNE, G. Invertebrate lamins. **Exp. Cell. Res.** 313:2157–2166, 2007.

MENON, B.B.; SARMA, N.J.; PASULA, S.; DEMINOFF, S.J.; WILLIS, K.A.; BARBARA, K.E.; ANDREWS, B.; SANTANGELO, G.M. Reverse recruitment: the Nup84 nuclear pore subcomplex mediates Rap1/Gcr1/Gcr2 transcriptional activation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 102: 5749-5754, 2005.

MEWES, H.W.; HANI, J.; PFEIFFER, F.; FRISHMAN, D. MIPS: a database for protein sequences and complete genomes. **Nucleic Acids Res.** 26: 33-37, 1998.

MICHELS, P.A. & OPPERDOES, F.R. The evolutionary origin of glycosomes. **Parasitol. Today.** 7:150-109, 1991.

MICHELS, P.A.M.; HANNAERT, V.; BRINGAUD F. Metabolic Aspects of Glycosomes in Trypanosomatidae – New Data and Views. **Parasitology Today.** 16:11, 2000.

MICHELS, P. A.; BRINGAUD, F.; HERMAN, M.; HANNAERT, V. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. **Biochim. Biophys. Acta.** 1763(12): 1463-1477, 2006.

MING, M.; EWEN, M.E.; PEREIRA, M.E.A. Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF β signaling pathway. **Cell.** 82, 287-96, 1995.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Série A. Normas e Manuais Técnicos, 7. ed., Brasília, 2009.

- MISTELLI, T. Concepts in nuclear architecture. **Bioessays**. 27: 477-487, 2005.
- MISTELLI, T. Physiological importance of RNA and protein mobility in the cell nucleus. **Histochem. Cell Biol.** 129:5–11, 2008.
- MOIR, R.D.; MONTAG-LOWY, M.; GOLDMAN, R.D. Dynamic properties of nuclear lamins: lamin B is associated with sites of DNA replication. **J. Cell Biol.** 125: 1201–1212, 1994.
- MOIR, R.D.; SPANN, T.P.; HERRMANN, H.; GOLDMAN, R.D. Disruption of nuclear lamin organization blocks the elongation phase of DNA replication. **J. Cell Biol.** 149: 1179-1191, 2000.
- MOREIRA, D.; LOPEZ-GARCIA, P.; VICKERMAN, K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 54:1861-1875, 2004.
- MORENO, S.N.J.; SILVA, J.; VERCESI, A.E.; DOCAMPO, R. Cytosolic-free calcium elevation in *Trypanosoma cruzi* is required for cell invasion. **J. Exp. Med.** 180, 1535-40, 1994.
- NARDELLI, S.C.; DA CUNHA, J.P.C.; MOTTA, M.C.M.; SCHENKMAN, S. Distinct acetylation of *Trypanosoma cruzi* histone H4 during cell cycle, parasite differentiation, and after DNA damage. **Chromosoma**, 118:487–499, 2009.
- NAVARRO, M.; PENATE, X.; LANDEIRA, D. Nuclear architecture underlying gene expression in *Trypanosoma brucei*. **Trends Microbiol.** 15, 263-270, 2007.
- PALENCHAR, J.B. & BELLOFATTO, V. Gene transcription in trypanosomes. **Mol. Biochem. Parasitol.** 146, 135 – 141, 2006.
- PEREIRA, M.E.; ZHANG, K.; GONG, Y.; HERRERA, E.M.; MING, M. Invasive phenotype of *Trypanosoma cruzi* restricted to a population expressing trans-sialidase. **Infect. Immun.** 64: 3884-92, 1996.
- PICCHI, G.F.A. Identificação e caracterização de TcNUP-1, uma proteína de lâmina nuclear em *Trypanosoma cruzi*. 2006. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Paraná. *Orientador*: Stenio Perdigão Fragoso.
- PICCHI, G.F.A.; FERREIRA, A.M.T.; SOUZA, F.S.P.; LOURENÇO, E.E.; ARAUCO, P.R.C.; LORUSSO, A.; BORDIGNON, J.; KRIEGER, M.A.; GOLDENBERG, S.; FRAGOSO, S.P. *Trypanosoma cruzi*: Identification of DNA targets of the nuclea periphery coiled-coil protein TcNUP-1. **Exp. Parasitol.** 127:1, 147-152, 2010.

PORCILE, P.E.; SANTOS, M.R.; SOUZA, R.T.; VERBISCK, N.V.; BRANDÃO, A.; URMENYI, T.; SILVA, R.; RONDINELLI, E.; LORENZI, H.; LEVIN, M.J.; DEGRAVE, W.; FRANCO DA SILVEIRA, J. A refined molecular karyotype for the reference strain of the *Trypanosoma cruzi* genome project (clone CL Brener) by assignment of chromosome markers. **Gene**. 10;308:53-65, 2003.

PORTO-CARREIRO, I.; ATTIAS, M.; MIRANDA, K.; DE SOUZA, W.; CUNHA-E-SILVA, N. *Trypanosoma cruzi* epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes. **Eur. J. Cell Biol.** 9: 858-869, 2007.

REICHELT, R.; HOLZENBURG, A.; BUHLE, E.L. JR.; JARNIK, M.; ENGEL, A.; AEBI, U. Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components. **J. Cell Biol.** 110:883-94, 1990.

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

ROWAT, A.C.; LAMMERDING, J.; HERRMANN, H.; AEBI, U. Towards an integrated understanding of the structure and mechanics of the cell nucleus. **Bioessays**. 30:226–36, 2008.

ROUT, M.P. AND BLOBEL, G. Isolation of the yeast nuclear pore complex. **J. Cell Biol.** 123, 771–783, 1993.

ROUT, M.P.; AITCHISON, J.D.; SUPRAPTO, A.; HJERTAAS, K.; ZHAO, Y.; CHAIT, B.T. The yeast nuclear pore complex: Composition, architecture, and transport mechanism. **J. Cell Biol.** 148: 635–651, 2000.

ROUT, M.P. & AITCHISON, J.D. The nuclear pore complex as a transport machine. **J. Biol. Chem.** 276: 16593–16596, 2001.

ROUT, M.P. & FIELD, M.C. Isolation and characterization of subnuclear compartments from *Trypanosoma brucei*: identification of a major repetitive nuclear lamina component. **J. Biol. Chem.** 276: 38261-38271, 2001.

RUBIO, J.; ROSADO, Y.; CASTANEDA, M. Subunit structure of *Trypanosoma cruzi* chromatin. **Can. J. Biochem.** 58: 1247-1251, 1980.

SABAJ, V.; ASLUND, L.; PETTERSSON, U.; GALANTI, N. Histone genes expression during the cell cycle in *Trypanosoma cruzi*. **J. Cell. Biochem.** 80: 617-624, 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; and MANIATIS, T. Molecular Cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

SCHENKMAN, S.; JIANG, M.; HART, G.W.; NUSSENZWEIG, V. A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. **Cell**. 65: 1117-25, 1991.

SCHENKMAN, S.; PONTES DE CARVALHO, L.; NUSSENZWEIG, V. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and neuraminidase activities can be mediated by the same enzymes. **J. Exp. Med.** 175: 567-575, 1992.

SCHENKMAN, S.; EICHINGER, D. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and cell invasion. **Parasitol. Today**. 9, 218-22, 1993.

SCHENKMAN, S.; EICHINGER, D.; PEREIRA, M.E.; NUSSENZWEIG, V. Structural and functional properties of *Trypanosoma* trans-sialidase. **Annu. Ver. Microbiol.** 48: 499-523, 1994.

SCHERF, A.; FIGUEIREDO, L.M. AND FREITAS-JUNIOR, L.H. *Plasmodium* telomeres: a pathogen's perspective. **Curr. Opin. Microbiol.** 4:409-14, 2001.

SCHERF, A.; LOPEZ-RUBIO, J.J.; RIVIERE, L. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. **Annual Rev. Microbiol.** 62:445-70, 2008.

SCHMUNIS, G.A. A tripanossomíase americana e seu impacto na saúde pública das Américas. Em: *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas: Zigman Brener, Zilton, Andrade; Manoel Barral-Neto. 2 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2000.

SCHURCH, N.; HEHL, A.; VASSELLA, E.; BRAUN, R.; RODITI, I. Accurate polyadenylation of procyclin mRNAs in *Trypanosoma brucei* is determined by pyrimidine-rich elements in the intergenic regions. **Mol. Cell Biol.** 14: 3668-3675, 1994.

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

SHUMAKER, D. K.; KUCZMARSKI, E. R. & GOLDMAN, R. D. The nucleoskeleton: lamins and actin are major players in essential nuclear functions. **Curr. Opin. Cell Biol.** 15, 358–366, 2003.

SIEGEL, T. N.; KAWAHARA, J. A.; DEGRASSE, C. J.; JANZEN, D. HORN; CROSS, G. A. M. Acetylation of histone H4K4 is cell cycle regulated and mediated by HAT3 in *Trypanosoma brucei*. **Mol. Microbiol.** 67:762–771, 2008.

SOARES MJ, SOUTO-PADRÓN T, DE SOUZA W. Identification of a large pre-lysosomal compartment in the pathogenic protozoon *Trypanosoma cruzi*. **J. Cell Sci.** 102:157–167, 1992.

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

SPANN, T.P.; GOLDMAN, A.E.; WANG, C.; HUANG, S.; GOLDMAN, R.D. Alteration of nuclear lamin organization inhibits RNA polymerase II-dependent transcription. **J. Cell Biol.** 156: 603-608, 2002.

SPECTOR, D.L. Macromolecular domains within the cell nucleus. **Annu. Rev. Cell Biol.** 9: 265-315, 1993.

STOFFLER, D.; FAHRENKROG, B.; AEBI, U. The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. **Curr. Opin. Cell Biol.** 1:3, 391-401, 1999.

STUURMAN, N.; HEINS, S. & AEBI, U. Nuclear lamins: their structure, assembly and interactions. **J. Struct. Biol.** 122: 42-66, 1998.

TADDEI, A.; HEDIGER, F.; NEUMANN, F.R.; GASSER, S.M. The function of nuclear architecture: a genetic approach. **Annu. Rev. Genet.** 38: 305-345, 2004.

TAKLE, G.B. & CROSS, G.A. An 85-kilodalton surface antigen gene family of *Trypanosoma cruzi* encodes polypeptides homologous to bacterial neuraminidases. **Molecular and Biochemical Parasitology.** 185–198, 1991.

TORO, G.C.; GALANTI, N. *Trypanosoma cruzi* histones. Further characterization and comparison with higher eukaryotes. **Biochem. Int.** 21: 481-490, 1990.

TORO, G.C.; WERNSTEDT, C.; MEDINA, C.; JARAMILLO, N.; HELLMAN, U.; GALANTI, N. Extremely divergent histone H4 sequence from *Trypanosoma cruzi*: evolutionary implications. **J. Cell Biochem.** 49: 266-271, 1992.

TORO, G.C.; WERNSTEDT, C.; HELLMAN, U.; GALANTI, N. Presence of histone H2B in *Trypanosoma cruzi* chromatin. **Bio. Res.** 26: 41-6, 1993.

TSAI, MING-YING; WANG, S.; HEIDINGER, J. M.; SHUMAKER, D.K.; ADAM, S.A.; GOLDMAN, R.D.; ZHENG, Y. A Mitotic Lamin B Matrix Induced by RanGTP Required for Spindle Assembly. **Science.** 1887-1893, 2006.

VARGAS, N.; PEDROSO, A. AND ZINGALES, A. Chromosomal polymorphism, gene synteny and genome size in *T. cruzi* I and *T. cruzi* II groups, **Molecular and Biochemical Parasitology.** 138:131–141, 2004.

VICKERMAN, K.; PRESTON, T.M. Spindle microtubules in the dividing nuclei of trypanosomes. **J. Cell Sci.** 6: 365-383, 1970.

VON KRIES, J.P.; BUHRMESTER, H.; STRATLING, W.H. A matrix/scaffold attachment region binding protein: identification, purification, and mode of binding. **Cell.** 64: 123-135, 1991.

- WANG, B.D.; EYRE, D.; BASRAI, M.; LICHTEN, M.; STRUNNIKOV, A. Condensin binding at distinct and specific chromosomal sites in the *Saccharomyces cerevisiae* genome. **Mol. Cell. Biol.** 25: 7216-7225, 2005.
- WEATHERLY, D. B.; BOEHLKE, C.; TARLETON, R.L. Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi* genome. **BMC Genomics.** 1;10:255, 2009.
- WEIS, K. Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. **Cell.** 112: 441-451, 2003.
- WHO - BULLETIN OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas: one hundred years later. **Bull World Health Organ.** v. 87, p. 7, 2009.
- WILKOWSKY, S.E.; WAINSELBAUM, M.J.; ISOLA, E.L.D. *Trypanosoma cruzi*: participation of intracellular Ca²⁺ during metacyclic trypomastigote-macrophage interaction. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 222, 386-389, 1996.
- ZELEDON, R. Some morphological and molecular aspects of the life cycle of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 94: 217-218, 1999.
- ZINGALES, B.; PEREIRA, M.E.; OLIVEIRA, R.P.; ALMEIDA, K.A.; UMEZAWA, E.S.; SOUTO, R.P.; VARGAS, N.; CANO, M.I.; DA SILVEIRA, J.F.; NEHME, N.S.; MOREL, C.M.; BRENER, Z.; MACEDO, A. *Trypanosoma cruzi* genome project: biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener. **Acta Trop.** 68, 159-73, 1997.
- ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R. S.; CAMPBELL, D. A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; MILES, M .A.; ROMANHA, A. J.; STURM, N. R.; TIBAYRENC, M .; SCHIJMAN. A. G. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 104(7):1051-4, 2009.
- YANG, L.; GUAN, T.; GERACE, L. Integral membrane proteins of the nuclear envelope are dispersed throughout the endoplasmic reticulum during mitosis. **J. Cell Biol.** 137:1199–1210,1997.