

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FELIPE JANSEN RABELLO

CARACTERIZAÇÃO E NOCAUTE DO GENE TcNUP-1 EM *Trypanosoma cruzi*

CURITIBA

2013

FELIPE JANSEN RABELLO

CARACTERIZAÇÃO E NOCAUTE DO GENE TcNUP-1 EM *Trypanosoma cruzi*

Monografia apresentada à disciplina Estágio Supervisionado em Biologia como requisito parcial à conclusão do Curso de Ciências Biológicas - Bacharelado, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Dr.^a Gisele Fernanda Assine Picchi
Co-orientadora: Dr.^a Márcia Helena Mendonça

CURITIBA

2013

RESUMO

Estima-se, que somente no Brasil, 5 milhões de pessoas padeçam da Doença de Chagas. O agente etiológico dessa doença é o *Trypanosoma cruzi*, um organismo unicelular que possui um complexo ciclo de vida passando por dois organismos hospedeiros, um vertebrado e outro invertebrado, além de possuir quatro formas celulares de desenvolvimento principais: amastigotas, epimastigotas, tripomastigotas sanguíneos e tripomastigotas metacíclicos. O *Trypanosoma cruzi* pode ser classificado como um organismo eucarionte, da ordem Cinetoplastida, da família Tripanossomatidaeae. O genoma principal do *T. cruzi* se encontra no núcleo, que apresenta uma organização estrutural similar à encontrada em outras células eucarióticas. Entretanto é possível observar alterações na forma nuclear e nos níveis de compactação da cromatina durante os diferentes estágios celulares do ciclo do parasita. As associações observadas entre o envoltório nuclear e a cromatina periférica sugerem que as proteínas da lâmina nuclear são importantes para essa interação, fornecendo sítios de ancoragem para a cromatina na periferia nuclear e dessa forma atuam regulando a expressão de genes situados nesses *loci*. Tripanossomatídeos não possuem lamínas, mas apresentam proteínas distintas que poderiam exercer as mesmas funções. Estudos preliminares realizados no Laboratório de Biologia Molecular de Tripanossomatídeos, do Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ, levaram a caracterização da proteína TcNUP-1 como uma das proteínas de lâmina nuclear em *T. cruzi*. Nesse contexto com intuito de conhecer melhor qual a função da proteína TcNUP-1, foram realizadas tentativas de nocautear ambos alelos do gene, bem como foi efetuado o sequenciamento do *locus* no qual o gene alvo desse estudo está inserido. Ao sequenciar o *locus* encontrou-se uma cópia adicional do gene TcNUP-1 todavia, em uma forma “truncada” que não contém todos os domínios do gene completo, tal fato ainda não havia sido relatado na literatura. Apesar de ser uma cópia incompleta, foi possível identificar um mRNA correspondente à mesma sendo transcrito nas formas epimastigotas da cepa Dm28c e alvo de *trans-splicing*. Não obstante, mais estudos devem ser realizados a fim de caracteriza-la. Ademais se conclui que no *locus* do gene TcNUP-1, diferente do observado no banco de dados, existe outra cópia do gene PEPCK a jusante da cópia truncada de TcNUP-1. Foi possível confirmar a deleção de somente um dos alelos. Por este motivo a transfecção para nocaute do segundo alelo deve ser repetida para que haja deleção completa da proteína e assim possa ser observado o fenótipo resultante. Não foi possível confirmar a caracterização do gene como sendo de cópia única com duas formas alélicas, embora existam fortes evidências corroborando essa hipótese.

Palavras chave: Doença de Chagas. *Trypanosoma cruzi*. Arquitetura nuclear. Proteínas ortólogas à lamínas. TcNUP-1. Nocaute duplo.

ABSTRACT

It is estimated that in Brazil 5 million people suffer from Chagas disease. The etiologic agent of this disease is the unicellular parasite *Trypanosoma cruzi* which has a complex life cycle passing through two hosts, one vertebrate and another invertebrate, besides the fact it possess four major cellular forms: amastigotes, epimastigotes, blood trypomastigotes and metacyclic trypomastigotes. The *Trypanosoma cruzi* can be classified as a eukaryotic organism belonging to the kinetoplastid order and to the Tripanosomatidae family. The main genome of *T. cruzi* is located at the nucleus, which has a structural organization similar to that found in other eukaryotes. However it is possible to observe changes in nuclear shape and chromatin compaction levels during different stages of the cell cycle from the parasite. The associations observed between the peripheral chromatin and the nuclear envelope proteins suggests that the nuclear lamina is important for this interaction, providing anchoring sites for the chromatin at the nuclear periphery and thus act regulating the expression of genes located in these *loci*. Trypanosomatids lack lamin proteins, instead they possess different proteins that could perform the same functions. Preliminary studies carried out in the Laboratory of Molecular Biology of Trypanosomatids, from the Carlos Chagas Institute - FIOCRUZ, led to characterization of the protein TcNUP-1 as a nuclear lamina protein in *T. cruzi*. Within this context, pursuing a better understanding on the role of the protein TcNUP-1, attempts to knock out both alleles of the gene were performed as well the sequencing of the locus in which the target gene is inserted. By sequencing the locus it was found an additional copy of TcNUP - 1 gene, however, in a "truncated" form which does not contain all domains from the entire gene copy, this fact had not been reported in the literature. Despite being an incomplete copy it was possible to identify a corresponding mRNA being transcribed and target to trans-splicing, in the epimastigote form of the strain of *T. cruzi* Dm28c, nevertheless further studies should be conducted to featuring it. Besides this exists downstream of the "truncated" copy of TcNUP-1 another copy of PEPCK gene. It was possible to confirm the deletion of only one allele. For this reason transfection to knockout the second allele has to be repeated, so that there will be complete deletion of the protein and thus the resulting phenotype can be observed. Finally it was not possible to confirm the characterization of the TcNUP-1 gene as a single copy with two allelic forms, although there is strong evidence supporting this hypothesis.

Keywords: Chagas Disease. *Trypanosoma cruzi*. Nuclear Architecture. Orthologous lamins proteins. TcNUP-1. Double Knockout

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 5 |
| 2 OBJETIVOS | 7 |
| 2.1 GERAL | 7 |
| 2.2 ESPECÍFICOS | 7 |
| 3 REVISÃO DA LITERATURA | 8 |
| 3.1 DOENÇA DE CHAGAS | 8 |
| 3.2 <i>Trypanosoma cruzi</i> | 9 |
| 3.2.1 Classificação e Ciclo Evolutivo | 9 |
| 3.2.2 Expressão Gênica | 10 |
| 3.2.3 Núcleo | 12 |
| 3.2.3 Cromatina | 13 |
| 3.2.4 TcNUP-1 | 15 |
| 3.3 JUSTIFICATIVA | 17 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 17 |
| 4.1 MEIOS, SOLUÇÕES E TAMPÕES UTILIZADOS | 17 |
| 4.2 CLONAGEM DOS SEGMENTOS CORRESPONDENTES AO <i>LOCUS</i> DO GENE <i>TCNUP-1</i> | 18 |
| 4.2.1 Amplificação das regiões intergênicas através de PCR | 18 |
| 4.2.2 Amplificação do gene TcNUP-1 por PCR | 20 |
| 4.2.3 Clonagem dos fragmentos e transformação de <i>Escherichia coli</i> | 21 |
| 4.3 SEQUENCIAMENTO DOS CLONES OBTIDOS ATRAVÉS DO MÉTODO CONVENCIONAL DE SÄNGER | 22 |
| 4.4 CONSTRUÇÃO DOS CASSETES PARA NOCAUTE DE AMBOS ALELOS DO GENE <i>TCNUP-1</i> | 22 |
| 4.4.1 Amplificação e clonagem dos genes npt e hph | 22 |
| 4.4.2 Amplificação e clonagem das regiões intergênicas IntergENO e IntergGAPDH | 23 |
| 4.4.3 Amplificação e clonagem das regiões de recombinação | 24 |
| 4.4.4 Amplificação dos Cassetes por PCR e purificação | 25 |
| 4.5 TRANSFEÇÃO DE <i>T. cruzi</i> | 26 |
| 4.5.1 Confirmação da inserção do cassete UPS//HIG//DOWN | 27 |
| 4.6 RT-PCR | 27 |
| 4.7 EXTRATO PROTÉICO DE <i>T. cruzi</i> | 28 |
| 4.8 WESTERN BLOT | 28 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 29 |
| 5.1 LOCALIZAÇÃO GENÔMICA DO GENE <i>TCNUP-1</i> | 29 |
| 5.1.1 <i>Locus</i> do gene TcNUP-1 | 29 |
| 5.2 CÓPIA TRUNCADA DO GENE TcNUP-1 | 32 |
| 5.2.1 Análise da transcrição do “gene” Δ NUP | 35 |
| 5.3 NOCAUTE | 36 |
| 5.3.1 Obtenção dos cassetes e confirmação do nocaute simples | 36 |
| 6 CONCLUSÕES | 40 |
| 7. PERSPECTIVAS | 41 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 42 |

1 INTRODUÇÃO

Carlos Ribeiro Justiniano Chagas é considerado um dos mais brilhantes cientistas brasileiros. Essa atribuição foi alcançada devido aos méritos científicos do pesquisador que descreveu em seus trabalhos, publicados desde 1909, não só o agente causador, o inseto transmissor e os animais reservatórios como também o quadro clínico de uma doença, que hoje leva seu nome como homenagem, a Doença de Chagas (CHAGAS, 1909). A descrição de tantos aspectos relacionados a uma mesma patologia, por um único cientista, parece ter sido feita somente uma vez na história da ciência e da medicina (KATZ, 2009). A doença ainda provoca espanto nos especialistas que a estudam devido à sua complexidade, tanto em aspectos da biologia do agente causador como em aspectos clínicos.

Pode-se dividir a manifestação da doença em duas fases clínicas, uma aguda e outra crônica. Durante a fase aguda é possível observar os chagomas de inoculação, já durante a fase crônica o quadro clínico inclui sintomas mais graves como megaesôfago, megacólon e cardiopatias (WHO, 2013).

Estima-se que, somente no Brasil, 5 milhões de pessoas padeçam da Doença de Chagas (COURA, 2010). Nesse contexto é de grande relevância o fato de que a fase crônica pode levar o paciente à morte ou torná-lo inapto ao trabalho, acarretando uma série de aposentadorias precoces e aumentando os gastos da previdência social. Tal viés poderia ser evitado caso houvessem tratamentos mais eficazes no combate à doença, principalmente contra a forma crônica. Os medicamentos disponíveis atualmente são eficazes somente nas horas seguintes à contaminação e não existe vacina ou medicamento que atue na forma crônica da doença (ARAÚJO *et al.*, 2000; BASTOS *et al.*, 2013; BEAUMIER *et al.*, 2013).

O agente etiológico da doença de Chagas é o *Trypanosoma cruzi*, um organismo unicelular que possui um complexo ciclo de vida passando por dois organismos hospedeiros, um vertebrado e outro invertebrado, além de possuir quatro formas celulares de desenvolvimento principais: amastigotas, epimastigotas, tripomastigotas sanguíneos e tripomastigotas metacíclicos (DE SOUZA, 2002).

A biologia do *T. cruzi* é bastante peculiar, principalmente no que se refere a aspectos moleculares. Contrastando com outros eucariotos, no genoma do parasita ainda não foram observadas sequências promotoras clássicas da transcrição, nem

tampouco a presença de íntrons nas sequências codificantes da maioria dos genes (CLAYTON; SHAPIRA, 2007; MARTÍNEZ-CALVILLO, *et al.*, 2010). O genoma principal do *T. cruzi* se encontra no núcleo, que apresenta uma organização estrutural similar à encontrada em outras células eucarióticas, o que inclui: unidade de membrana dupla, formando o envoltório nuclear, presença de complexos de poro, nucléolo único e regiões eletrondensas de cromatina próximas à periferia nuclear (BELLI, 2000; ELIAS, *et al.*, 2001; ROUT; FIELD, 2001). É possível observar alterações na forma nuclear e nos níveis de compactação da cromatina, durante os diferentes estágios celulares do ciclo do parasita (DE SOUZA 2002; ELIAS *et al.*, 2001; SPADILIERO, *et al.*, 2002).

As associações observadas entre o envoltório nuclear e a cromatina periférica sugerem que as proteínas da lâmina nuclear são importantes para essa interação (MANS, *et al.*, 2004), fornecendo sítios de ancoragem para a cromatina na periferia nuclear e dessa forma atuam regulando a expressão de genes situados nesses *loci* (GRUENBAUM, *et al.*, 2000; HUTCHISON, 2002; MARALDI; LATTANZI, 2005). Tripanossomatídeos não possuem laminas, mas apresentam proteínas distintas que poderiam exercer as mesmas funções (DUBOIS, *et al.*, 2012; ROUT; FIELD, 2001).

Estudos preliminares realizados no Laboratório de Biologia Molecular de Tripanossomatídeos, do Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ, no qual foi desenvolvido o presente trabalho, levaram a caracterização da proteína TcNUP-1 (PICCHI, *et al.*, 2011) como uma das proteínas de lâmina nuclear em *T. cruzi*. Os dados obtidos suportam a hipótese de que a proteína TcNUP-1 tenha um papel na organização da cromatina ancorando os cromossomos do parasita ao envelope nuclear.

O estudo da estrutura nuclear vem se tornando uma nova disciplina contribuindo para o entendimento de diversos eventos celulares e moleculares em eucariotos. Colaborando para uma visão mais precisa do funcionamento das células eucarióticas. A extensão deste tipo de conhecimento para um parasito unicelular como o *T. cruzi*, que se adapta a diferentes ambientes celulares para causar a doença, é crucial para o entendimento de mecanismos básicos da interação parasita / hospedeiro. Ademais, a partir dessa visão ampliada, poderão ser propostas novas estratégias para o desenvolvimento de terapias e diagnósticos para a doença de Chagas (SCHENKMAN, 2011).

Em comparação com outros tripanossomas e até mesmo com outros eucariotos, o conhecimento sobre o núcleo do *T. cruzi* ainda é limitado, principalmente devido à sua complexidade e ao fato de ser uma área pouco explorada (SCHENKMAN, 2011).

Visando contribuir com esses estudos, no presente trabalho investigou-se o locus do gene TcNUP-1 e obteve-se um mutante de *T. cruzi* com a deleção de um dos alelos do gene.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Investigar o *locus* do gene TcNUP-1 em *Trypanosoma cruzi* e construir cassetes para o nocaute de ambos alelos do gene, com intuito de verificar sua função através da observação do fenótipo resultante.

2.2 ESPECÍFICOS

- Amplificar por PCR (Polymerase Chain Reaction), as regiões intergênicas do *locus* gênico de TcNUP-1;
- Clonar os fragmentos obtidos por PCR no plasmídeo pGEM T-easy®;
- Sequenciar, pelo método convencional de Sanger, os clones obtidos;
- Construir, através de técnicas de clonagem clássica, cassetes para o nocaute de ambos alelos do gene TcNUP-1;
- Transfectar os cassetes em *T. cruzi*;
- Confirmar a correta inserção dos cassetes no *locus* do gene TcNUP-1, por PCR e
- Caracterização do gene TcNUP-1.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas manifesta-se em duas fases, uma aguda e outra crônica. A fase aguda dura cerca de dois meses após o contato inicial com o parasita, sendo em geral assintomática, mas pode evoluir para um quadro clínico de febre, cefaléia, edema, linfadenopatia, miocardite, hepatoesplenomegalia, meningoencefalite e cardiopatia aguda com parasitemia (WHO, 2013).

A manifestação dos sintomas durante a fase aguda varia de pessoa para pessoa e também de acordo com a cepa do parasita. Já na fase crônica, os parasitas que alcançaram a circulação sanguínea durante a fase aguda se depositam, principalmente, no coração ou na musculatura lisa do intestino. A forma cardíaca da doença gera complicações como arritmia, cardiomiopatia, insuficiência cardíaca e tromboembolismo secundário. Já na forma intestinal o quadro clínico é caracterizado por aumento exarcebado do esôfago e do cólon (megaesôfago e megacólon), (WHO, 2013).

Uma vez que a enfermidade acomete, em especial, a população rural de 21 países majoritariamente da América Latina, é igualmente conhecida por tripanossomíase americana. Não obstante, casos da doença têm sido relatados na América do Norte e Ásia, sendo tais ocorrências atribuídas a migrações de pessoas infectadas para essas regiões (COURA; DIAS, 2009).

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde, existem aproximadamente de 7 a 8 milhões de pessoas infectadas com *T. cruzi* no mundo, vivendo a maioria em 18 países do continente Americano, desde o México até a Argentina e Chile (WHO, 2013). Nesse continente, 90 milhões de pessoas estão expostas à infecção pelo *T. cruzi* (COURA; DIAS, 2009). Do total de casos crônicos da doença, uma fração superior a 30% evolui para a forma cardíaca e uma parcela maior do que 10% desenvolve a forma digestiva. Estima-se que, somente no Brasil, 5 milhões de pessoas estejam infectadas (COURA, 2010).

Os principais vetores da doença são insetos da família Reduviidae, subfamília Triatominae, sendo que os gêneros de maior interesse médico são

Panstrongylus, *Rhodnius* e *Triatoma*. A forma mais frequente de transmissão do *Trypanosoma cruzi* é o contato com as fezes contaminadas dos insetos vetores, que concomitantemente ao repasto sanguíneo acabam por defecar. Desta forma, os parasitas presentes nas fezes do triatomíneo infectado atingem a corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado através do local da picada ou de feridas na pele.

Outras formas comuns de contaminação humana são: a transfusão sanguínea, a transmissão oral e a transmissão via placentária ou durante o parto. Formas de contágio menos usuais incluem: acidentes laboratoriais durante a manipulação do parasita *in vitro*, manejo de animais infectados, transplante de órgãos, transmissão sexual e contato com esperma ou fluido menstrual contaminado com o *T. cruzi* (SCHMUNIS; DIAS; COURA, 1997; COURA 2007).

Os medicamentos disponíveis para o tratamento da tripanossomíase americana são eficientes somente nas horas subseqüentes ao contágio com o parasita, diminuindo sua eficácia com o aumento do tempo da infecção aguda (ARAÚJO, *et al.*, 2000). Até a presente data não existe vacina disponível nem mesmo tratamentos capazes de impedir a progressão da forma crônica (BASTOS, *et al.*, 2013; BEAUMIER, *et al.*, 2013).

3.2 *Trypanosoma cruzi*

3.2.1 Classificação e Ciclo Evolutivo

O *Trypanosoma cruzi* pode ser classificado como um organismo eucarionte, da ordem Kinetoplastida, da família Trypanosomatidae. Análises de filogenia mais aceitas atualmente, quanto às relações gerais da árvore da vida, incluem a ordem Kinetoplastida no clado Discicristata, ou Excavatas mitocôndriados (SIMPSON; ROGER, 2002; BALDAUF, 2003; BALDAUF, 2008; ADL. *et al.*, 2005 e MASSANA *et al.*, 2006;).

O ciclo evolutivo do *T. cruzi* é heteroxênico. Nesse ciclo formas tripomastigotas metacíclicas presentes nas excretas contaminadas dos triatomíneos

(insetos popularmente conhecidos como barbeiros), são liberadas durante o repasto sanguíneo e penetram no hospedeiro vertebrado através da lesão causada pela picada do inseto ou feridas na pele. Ao invadir as células do hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas metacíclicos se transformam em amastigotas, que se multiplicam rapidamente e, por sua vez transformam-se em tripomastigotas sanguíneos. Esses rompem a célula e são liberados na corrente sanguínea, meio pelo qual se disseminam pelo organismo e atacam músculos e outros tecidos.

Os insetos triatomíneos são infectados ao sugar as formas presentes no sangue do hospedeiro parasitado, as quais se transformam em epimastigotas no intestino do inseto, multiplicam - se e sofrem modificações para tripomastigostas metacíclicos (metaciclogênese) na ampola retal, de onde podem ser excretados e infectar um novo hospedeiro vertebrado (DE SOUZA, 2002; TYLER; ENGMAN, 2001).

O *T. cruzi*, à semelhança da maioria dos eucariotos, possui dois genomas em compartimentos celulares diferentes, no núcleo e na mitocôndria. A mitocôndria dos tripanossomas é única e ocupa grande espaço no citoplasma, além de possuir seu genoma concentrado em uma porção próxima ao corpúsculo basal, que leva o nome de cinetoplasto. A organização do material genético no cinetoplasto é composta por uma rede de aproximadamente 20 a 30 mil moléculas chamadas de minicírculos, que estão concatenados entre si e com moléculas lineares (DE SOUZA, 2002).

O fato dos diferentes estágios de replicação do parasita, no citosol da célula do mamífero e no estômago do inseto vetor, requererem respostas celulares específicas do parasita é bastante relevante e, neste contexto, o núcleo parece desempenhar papel importante nessas respostas (SCHENKMAN, 2011).

3.2.2 Expressão Gênica

A maioria dos organismos ajusta o nível de expressão de seus genes em função das alterações ambientais, sendo que o ponto principal de regulação é o início da transcrição (CLAYTON; SHAPIRA, 2007). Aparentemente, alguns grupos como os tripanossomatídeos utilizam em baixos níveis, a capacidade de regulação

pré transcricional. Esta afirmação baseia-se no fato de ainda não terem sido encontradas sequências de ligação da RNA Pol II para a maioria dos genes no genoma desses organismos, que estejam regulando a transcrição de genes ou de clusters gênicos (PALENCHAR; BELLOFATTO, 2006). Contudo o conhecimento sobre a biologia molecular desse organismo particular ainda encontra-se em construção.

Embora seja um organismo eucarioto, o *T. cruzi* realiza a transcrição de seus genes de forma policistrônica, processo pelo qual vários genes são transcritos em um mesmo pré-mRNA sendo importante reportar que, à diferença dos organismos procariotos, os genes de um mesmo cístron não são necessariamente relacionados a uma mesma via metabólica (GÜNZL, 2010; MARTÍNEZ-CALVILLO, *et al.*, 2010).

O pré-mRNA posteriormente é alvo de *trans-splicing*, mecanismo comum em tripanossomatídeos, onde ocorre a adição de um “*miniexon*”, ou “sequência líder” na extremidade 5’ dos mRNAs que serão traduzidos (GÜNZL, 2010; MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 2010). Os genes dos pré RNAs mensageiros e do *miniexon* estão dispostos em diferentes *loci* do genoma, razão pela qual esse sistema foi batizado de *trans-splicing*. Esse processo difere da forma convencional *cis-splicing*, onde as partes do mRNA unidos derivam de um mesmo co-transcrito, forma mais comum em outros eucariotos (Di SEGNI, *et al.*, 2008; LIANG *et al.*, 2003). O *miniexon* apresenta tamanho e sequência variáveis de acordo com a espécie de tripanossoma. No *Trypanossoma cruzi* essa sequência é composta por 39 bases (CLAYTON; SHAPIRA, 2007). Também ocorre, como em outros eucariotos, a adição de cauda poli adenina na extremidade 3’ dos mRNAs. Esses dois mecanismos tem a função de estabilizar o mRNA maduro, evitando sua degradação por RNAases intracelulares.

Outra característica molecular intrigante no parasita é a existência de uma base modificada na sequência de DNA, a base J (β -d-glucosil-hidroximetiluracil). Essa base pode ser descrita como o esqueleto de uma timina com um resíduo de glicose adicional, que parece estar relacionada com mecanismos epigenéticos de regulação da expressão gênica, podendo ser observada nas principais espécies da família Tripanossomatidaeae (BORST; SABATINI, 2008).

A razão de tantas particularidades relacionadas à biologia molecular e expressão gênica na linhagem dos Tripanossomatidaeae é corriqueiramente atribuída

ao fato de serem considerados como um grupo que derivou das primeiras linhagens eucarióticas. Por essa razão esta família pode servir como sistema modelo para inferir sobre uma possível “caixa de ferramentas” (*toolbox*) contendo as principais “ferramentas” moleculares necessárias à biologia eucariótica, comum ao eucarioto ancestral, mas também para o estudo de aspectos da biologia eucariótica que se desenvolveram independentemente nesses parasitas (DACKS, *et al.*, 2008; ERSFELD, 2011).

Portanto, os Tripanossomatidae são organismos modelo de grande importância para a ciência devido à sua origem biológica, aos processos moleculares que neles atuam e aos impactos epidemiológicos / patológicos causados pelos membros dessa família no homem e em toda a biota (ALSFORD, *et al.*, 2012; CATARINO, *et al.*, 2001; LLOYD-SMITH, *et al.*, 2009; STURM, *et al.*, 2007).

3.2.3 Núcleo

Por fazer parte de uma linhagem eucariótica que divergiu logo após o surgimento do núcleo, o *T. cruzi* apresenta mecanismos distintos e ainda pouco conhecidos de regulação da expressão gênica, replicação e reparo do DNA. Conseqüentemente a estrutura nuclear e a organização da cromatina também apresentam características peculiares (SCHENKMAN, 2011).

A forma do núcleo de *T. cruzi* varia entre as fases do ciclo celular. Nas formas replicativas, epimastigotas e amastigotas, o núcleo é ligeiramente esférico e contém um grande nucléolo, enquanto nas formas não replicativas, tripomastigotas, o nucléolo não é evidenciado e o núcleo, mais alongado, localiza-se na porção central da célula (DE SOUZA 2002; ELIAS, *et al.*, 2001). O nível de condensação da cromatina também é variável (ELIAS, *et al.*, 2001; SPADILIERO, *et al.*, 2002).

Este remodelamento pode estar envolvido tanto no controle da expressão de alguns genes, ou seja, silenciamento / transcrição (SPADILIERO, *et al.*, 2002), como na replicação dos cromossomos (ELIAS, *et al.*, 2002). De fato existem evidências de que a localização da cromatina na periferia do núcleo é uma maneira de suprimir completamente a expressão de genes situados nestes *loci* (CHAVES, *et al.*, 1998; NAVARRO; GULL, 2001; PEREZ – MORGA, *et al.*, 2001).

Quando os núcleos das formas amastigotas e epimastigotas são comparados, percebe-se uma diferença clara quanto ao tamanho dessa organela. A razão para essa diferença ainda não é compreendida, mas pode estar relacionada à mudança na ploidia entre esses dois estágios, ou ainda, a diferentes níveis de atividade celular (SCHENKMAN, 2011).

Na forma tripomastigota o tamanho celular é reduzido dramaticamente. Ocorre uma alteração drástica no formato e organização nuclear, o nucléolo não é evidenciado e o núcleo, mais alongado, localiza-se na porção central da célula (DE SOUZA 2002; ELIAS, *et al.*, 2001). Tripomastigotas possuem baixa atividade de transcrição (ELIAS, *et al.*, 2001), não replicam (ELIAS, *et al.*, 2002), mas expressam alguns componentes das vias de reparo de DNA (MACHADO, *et al.*, 2006).

Diferente da maioria dos eucariotos o *T. cruzi* realiza a mitose fechada (SOLARI, 1995), ou seja, não ocorre a desorganização da membrana nuclear e todo processo ocorre dentro do núcleo. Centríolos ou corpo polar do fuso ainda não foram identificados em *T. brucei* tampouco em *T. cruzi* (OGBADOYI, *et al.*, 2000). Essas peculiaridades demonstram a importância de se compreender melhor a dinâmica do núcleo de *T. cruzi* (SCHENKMAN, 2011).

3.2.3 Cromatina

A cromatina é provavelmente um dos conjuntos moleculares mais complexos que existem na célula, sendo formada pelo DNA genômico, em conjunto com várias proteínas e moléculas de RNA associadas direta ou indiretamente. Essa grande variedade de moléculas inclui histonas, fatores de ligação ao DNA, a maquinaria basal de transcrição com seus transcritos nascentes, as maquinarias de replicação e reparo que copiam e preservam o DNA e muitas outras moléculas que interagem com alguns desses componentes. Todos esses processos acontecem harmonicamente e, dessa forma, a estrutura da cromatina não pode ser totalmente compreendida a menos que seja estudada no contexto completo (VAN STEENSEL, 2011).

A estrutura da cromatina em *T. cruzi*, assim como em outros organismos eucariotos, é mantida por histonas (ERSFELD, 2011; ALSFORD; HORN, 2004).

Todas as histonas canônicas foram encontradas no *T. cruzi*, entretanto a sequência dessas proteínas mostrou diferenças substanciais em relação à seus homólogos em outros eucariotos opistocontes (*e.g.* animais e fungos), principalmente nos domínios encontrados na cauda N-terminal (ALSFORD; HORN, 2004).

A cromatina em *T. cruzi* é organizada em filamentos de nucleossomos arranjados irregularmente, não formando a estrutura típica encontrada em outros organismos com fibras de 30 nm, o que pode fazer com que essa cromatina seja mais sensível à ação de nucleases do que a cromatina de outros eucariotos (HECKER; GANDER, 1985; SCHENKMAN, 2011). Durante a mitose a cromatina não se condensa em cromossomos visivelmente distinguíveis (VICKERMAN; PRESTON, 1970; ALSFORD; HORN, 2004). Ademais é possível observar diferentes níveis de compactação da cromatina entre as principais formas evolutivas do ciclo do parasita. Nas formas replicativas existe pouca quantidade de heterocromatina, localizada na região periférica, em contraste com a forma tripomastigota que possui maiores quantidades de heterocromatina e esta se encontra dispersa pelo núcleo (DE SOUZA 2002; ELIAS *et al.*, 2001; SPADILIERO, *et al.*, 2002).

Atualmente se sabe que a regulação dos processos relacionados à cromatina pode ser influenciada também por sua própria organização tridimensional no espaço nuclear (HAKIM, *et al.*, 2010). Por essa razão, proteínas que atuam promovendo sítios de ancoragem para a cromatina desempenham um papel protagonista nesse processo.

Regulação transcricional, recombinação, replicação e condensação de DNA têm como pré-requisito inicial mudanças na estrutura da cromatina (FIGUEIREDO, *et al.*, 2009). Essas modificações, conhecidas como alterações epigenéticas, atuam em um nível acima do genoma e têm sido estudadas extensivamente nos últimos anos, trazendo conhecimento sobre fatores que agem como moduladores dessa informação (HAKIM, *et al.*, 2010), aumentando o conhecimento sobre a estrutura da cromatina e seu papel.

É digno de nota o fato de a dinâmica cromossômica no *T. cruzi* ser mantida funcional mesmo em um genoma contendo várias regiões repetitivas. A estabilidade genômica aparentemente está relacionada à estabilidade da organização da cromatina e a um mecanismo eficiente de reparo de DNA. Esses processos devem estar conectados ao controle da expressão gênica, principalmente durante a diferenciação celular (SCHENKMAN, 2011).

Mecanismos epigenéticos exploram a organização geral do núcleo e do próprio DNA, e estão relacionados à organização da cromatina no tempo e espaço, sugerindo que esse sistema tenha co-evoluído com o aparecimento do núcleo.

3.2.4 TcNUP-1

A membrana nuclear (MN) é uma estrutura altamente organizada, composta de unidade de membrana dupla, presença de complexos de poro nuclear (CPN), e lâmina nuclear (BELLI, 2000; ELIAS, *et al.*, 2001; NAVARRO, *et al.*, 2007; ROUT; FIELD, 2001), que tem como função básica delimitar o espaço nuclear do citoplasma e controlar o tráfego de moléculas entre esses compartimentos.

A lâmina nuclear é uma rede de fibras protéicas (filamentos intermediários), situada na face interna da membrana nuclear, composta por proteínas chamadas laminas. Essa estrutura pode ser encontrada em organismos eucariotos vertebrados e invertebrados (FAWCETT, 1966; WATSON, 1955). A lâmina não somente mantém a arquitetura do núcleo, mas também está envolvida em processos como: controle do ciclo celular, desenvolvimento de células germinativas, manutenção da distância correta entre os CPN e fornecimento de sítios para ancoragem da cromatina à periferia nuclear e regulação transcricional (GRUENBAUM, *et al.*, 2000; HUTCHISON, 2002; MANS, *et al.*, 2004; WORMAN; COURVALIN, 2005; MARALDI; LATTANZI, 2005; DECHAT, *et al.*, 2010; MEKHAIL; MOAZED, 2010). A fosforilação reversível de laminas é pré-requisito para a quebra e reorganização do envoltório nuclear durante o ciclo celular (COHEN, *et al.*, 2001).

Apesar de serem essenciais em metazoários, organismos eucariotos como plantas e outros unicelulares de vida livre e parasitas não possuem genes para laminas nem para proteínas associadas a laminas (MANS, *et al.*, 2004; COHEN *et al.*, 2001). Como essas proteínas são fundamentais em vários processos celulares primordiais é provável que, naqueles organismos não dotados de laminas, outras proteínas tenham se desenvolvido independentemente durante a seleção natural para exercer funções homólogas às laminas (GINDULLIS, *et al.*, 2002).

Tripanossomatídeos não possuem laminas, mas apresentam proteínas distintas que poderiam exercer as mesmas funções (DUBOIS, *et al.*, 2012; ROUT; FIELD, 2001; PICCHI, *et al.*, 2011).

Em 2011, Picchi *et al.*, descreveram o gene TcNup-1 como um gene de cópia única com duas formas alélicas, o alelo TcNUP-1.1 (GenBank Accession No. AY528743) com 7.7 kb de comprimento contendo 9 repetições de 450 bp, e o alelo TcNUP-1.2 (GenBank Accession No. GQ401997) com 9.5 kb de extensão total contendo 13 regiões repetitivas de 450 bp.

A proteína TcNUP-1, apresenta um comportamento similar às laminas e parece interagir com regiões específicas do genoma do *T. cruzi*, provavelmente ancorando cromossomos à membrana nuclear. Em ensaios de imunofluorescência a proteína se localiza na periferia do núcleo, além de possuir domínios “*coiled-coil*” (PICCHI *et al.*, 2011), estrutura também presente em outras proteínas recrutadas durante a adaptação dos eucariotos para exercerem funções nucleoesqueléticas (MANS *et al.*, 2004).

A proteína TcNUP-1 é considerada uma proteína ortóloga a TbNUP-1 de *Trypanosoma brucei* (PICCHI *et al.*, 2011). A proteína TbNUP-1 tem ~ 450 kDa com domínios *coiled-coil*, e está associada à rede de fibras localizadas na face interna da membrana nuclear (DUBOIS *et al.*, 2012). A redução da expressão dessa proteína, pela técnica de RNA de interferência, em *T. brucei*, está associada à falhas na divisão celular, anormalidades estruturais do núcleo e no posicionamento dos Complexos de Poro Nuclear (NPC). As variações observadas são correlacionadas àquelas encontradas com a redução da expressão dos genes para laminas em metazoários. Além disso, essa proteína parece atuar na organização da cromatina e na regulação da expressão de genes localizados nas regiões próximas aos telômeros, como os genes para Proteínas Variáveis de Superfície (VSGs) (DUBOIS, *et al.*, 2012). Trata-se de fenômeno de extrema importância biológica, visto que as VSGs são responsáveis pela evasão da resposta imune do hospedeiro pelo parasita.

Considerando-se a provável origem do controle epigenético, juntamente ao aparecimento do próprio núcleo, se faz importante o entendimento de como e em que extensão os tripanossomatídeos lançam mão de mecanismos epigenéticos (ALSFORD *et al.*, 2012). Nesse viés, um melhor entendimento sobre o gene alvo deste estudo é de importância crucial para a melhor compreensão desses mecanismos e suas origens.

3.3 JUSTIFICATIVA

Com base nos dados da caracterização do gene TcNUP-1 (PICCHI *et al.*, 2011), FERREIRA (2011) realizou a deleção do gene pela técnica de nocaute. Porém, seus resultados questionam a organização genômica e localização do gene TcNUP-1, pois mesmo tendo obtido uma população clonal que apresentava os dois marcadores de seleção, ainda era possível observar, através de ensaios de *western blot*, que a proteína estava sendo expressa (FERREIRA, 2011). Em acréscimo, a confirmação da inserção do cassete no *locus* não resultou satisfatória. Os *primers* usados nos resultados positivos anelavam somente nas partes internas do cassete indicando a inserção dos mesmos, mas não necessariamente na posição correta.

Dentro desse contexto propomos sequenciar a região genômica onde o gene TcNUP-1 está inserido e nocautear os alelos do gene para observação da função da proteína com base no fenótipo mutante.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MEIOS, SOLUÇÕES E TAMPÕES UTILIZADOS

Brometo de etídio: 0,5 µg/ml diluído em água 18.2 Ω, armazenado na ausência de luz.

Fenol - clorofórmio - álcool isoamílico: Fenol saturado 25 partes, clorofórmio 24 partes, álcool isoamílico 1 parte, Tris-HCl 100 mM pH 8,0 10 partes.

Meio LB (Luria Bertani): 1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 0,5% de NaCl. Autoclavado e mantido a 4°C.

Meio LIT (*liver infusion tryptose*): 0,5 % infuso de fígado, NaCl 75,3 mM, KCl 5,4 mM, glicose 10 mM, 0,5 % bacto-triptose, Na₂HPO₄ 56,4 mM, 0,0025% hemina, 10 % soro fetal bovino. Autoclavado e mantido a 4°C.

Mix de dNTP: dATP, dCTP, dGTP e dTTP (Amersham Biosciences) foram misturados e diluídos em Tris-HCl pH 7,5 10 mM para obter uma solução estoque com concentração final de 2,5 mM de cada nucleotídeo. Mantido em congelador – 20 °C.

PBS: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 4,3 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM. Filtrado em membrana de 0,45 µm e armazenado a 4°C.

PBST: solução contendo PBS e Tween 20, 0.1%.

Solução de bloqueio para western blot: solução contendo PBST e de leite em pó desnatado 5 %.

Tampão de amostra para gel de agarose: 25% de Ficoll (tipo 400-Sigma), 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol. Ficoll dissolvido em TBE antes de adicionar os corantes.

Tampão de eletroporação para *T. cruzi*: NaCl 150 mM, Hepes ácido 25 mM, Na₂HPO₄ 0,74 mM, pH 7,5.

Tampão de sonicação: Tris HCl pH 8 20 mM, NaCl 500mM.

Tampão isotônico: Hepes pH 7,4 20 mM, KCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM.

Tampão de amostra para proteína: solução contendo Tris-HCl pH 6,8 40 mM, SDS 1 %, -mercaptoethanol 2,5 %, glicerol 6 % e azul de bromofenol 0,005 %. Mantida em congelador - 20 °C.

Tampão para transferência (*WESTERN BLOT*) 1X: TRIS-BASE 25 MM; GLICINA 192 MM; METANOL 20 %.

Tampão de eletroforese para SDS-PAGE 1X: Tris-base 25 mM; Glicina 192 mM; SDS 0,1%

Tampão da fosfatase alcalina: Tris-HCl pH 9,5 100 mM; NaCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM.

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

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

4.2 CLONAGEM DOS SEGMENTOS CORRESPONDENTES AO *LOCUS* DO GENE *TCNUP-1*

4.2.1 Amplificação das regiões intergênicas através de PCR

Com base na sequência do genoma do *T. cruzi* (cepa CL-Brenner), disponibilizada no banco de dados *TriTryp* DB, foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que permitem a amplificação das regiões intergênicas que flanqueiam o gene para a TcNUP-1 por PCR, dessa maneira observando o padrão de ampliações gerado seria possível confirmar a sequência dos genes no *locus*. A posição de anelamento dos *primers* está ilustrada na Figura 1.

Os genes que antecedem e sucedem o gene para TcNUP-1 são respectivamente um gene que codifica para uma *GTP-Binding Protein* (ID: Tc00.1047053509099.10), e um gene para uma proteína *Glycosomal Phosphoenolpyruvate Carboxykinase* (ID: Tc00.1047053507547.90), que neste trabalho, para facilitar o entendimento, serão chamados respectivamente GTPbp e PEPCK.

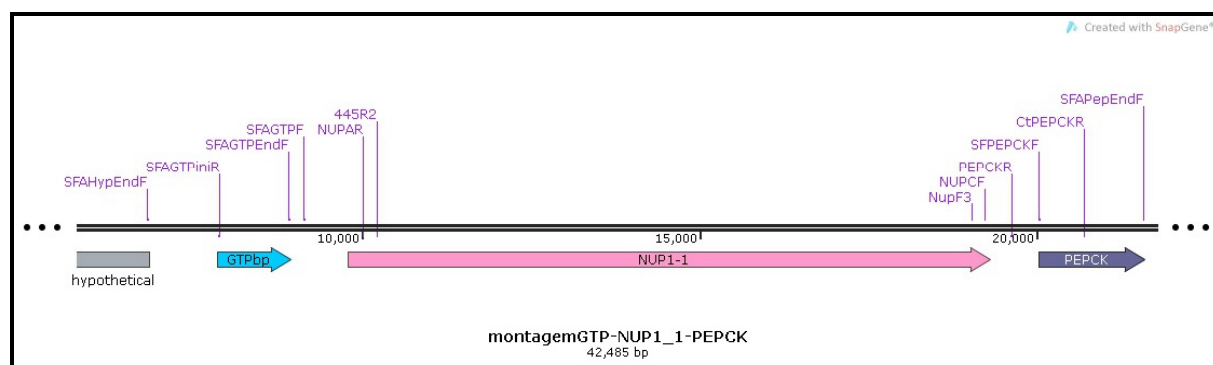


Figura 1: Montagem da organização genômica para o *locus* da TcNUP-1 (dados disponíveis no *TriTryp* DB), com a posição de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores usados nas reações de PCR para confirmar o posicionamento, listados na Tabela 1.

A reação de amplificação foi realizada em triplicata, utilizando-se 3 temperaturas de anelamento para buscar a melhor condição, ou seja, aquela mais eficiente em produzir a maior quantidade de produto específico. As três temperaturas de anelamento usadas foram 53 °C, 56.4 °C e 59 °C.

Nas reações de PCR foram usados 100 ng de DNA genômico de *T. cruzi* selvagem cepa Dm28c, 10 pmol dos *primers*, 0.2 mM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, tampão comercial para Taq DNA polimerase e 2.5 Unidades da enzima Taq DNA polimerase (volume final, 50 µL). As reações foram processadas em termociclador modelo MJ96G+ (Biocycler), que tem a capacidade de manter cada coluna do termobloco em uma temperatura específica nas fases escolhidas do ciclo da PCR, gerando assim um gradiente de temperatura.

A ciclagem das PCRs foi a seguinte: desnaturação por 5' a 94 °C, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30'', usamos uma das 3 temperaturas de

anelamento 53°C, 56.4°C e 59°C por 30'' e extensão a 72°C com o tempo dessa etapa variando conforme o esperado, tendo como base a processividade de 1kb por minuto.

As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores podem ser observadas na Tabela 1.

| Primer | Seqüência |
|------------|----------------------------------|
| SFAHypEndF | 5' AGCCGGACGACCTCATCCTTGCG 3' |
| SFAGTPiniR | 5' AGAGGAGCAGGCACGCATGGAG 3' |
| SFAGTPEndF | 5' AGGATGGCGATGTCATGATTGTTG 3' |
| SFAGTPF | 5' GACATTGCGAGGAAGCACGCATGGA 3' |
| NUPAR | 5' ACGCCTGTGAGAGTCCAAGA 3' |
| 445R2 | 5' GTTCTGCATTTGGGCCACATCA 3' |
| NUPF3 | 5' ACACGGCACGAAGGAGCAC 3' |
| NUPCF | 5' GCATCCACCCCAACACAG 3' |
| PEPCKR | 5' GTGACGATGCGCATGAACCCCAAG 3' |
| SFPEPCKF | 5' ATGCCGCCGACCATTACAGGAATCTG 3' |
| CtPEPCKR | 5' GTCCCGCTCAGTCCAAAGAA 3' |
| SFAPEpEndF | 5' TCCCGCGCTACGTGGAATTTG 3' |

Tabela 1: Sequências dos *primers* utilizados para amplificação das regiões intergênicas.

4.2.2 Amplificação do gene TcNUP-1 por PCR

Nas soluções foram usados 100 ng de DNA genômico de *T. cruzi* selvagem cepa Dm28c, 10 pmol dos *primers*, 0.3 mM de dNTPs, 2.5 µL do tampão "A" e 2.5 µL do tampão "B" (*kit Expand Long Template PCR System*, Roche), 3.5 Unidades de enzima (*kit Expand Long Template PCR System*, Roche), volume final de 50 µL. As reações foram processadas em termociclador modelo MJ96G+, marca Biocycler, com desnaturação por 5' a 94°C, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30'', anelamento a 56°C por 30'' e extensão a 68°C por 15'.

| Primer | Sequência |
|-----------|---------------------------------------|
| GTPF | 5' GACATTGCGAGGAAGCACGCATGGA 3' |
| PEPCKR | 5' GTGACGATGCGCATGAACCCCAAG 3' |
| NUPR2 | 5' TCACGATGATGCGTCTATGGC 3' |
| TcNUPC1R | 5' GCACGTGGTTCGCTTTGTG 3' |
| SFANUP5CR | 5' CACCTCAAATGTTTTAACGAGACTCGATGTC 3' |
| TcNUPA1F | 5' CGTCGTTACCCGGGCTTCT 3' |
| SFNNhF | 5' GAGGAACTGACACGGGCACAGCATGTGATAC 3' |

Tabela 2: Sequência dos *primers* usados na PCR long-range.

4.2.3 Clonagem dos fragmentos e transformação de *Escherichia coli*

Os fragmentos obtidos foram clonados no sistema pGEM T-easy® (Promega), de acordo com o protocolo especificado pelo fabricante, propagados em células quimiocompetentes da linhagem de *Escherichia coli*, Top 10.

As bactérias armazenadas a -70°C foram descongeladas em gelo e logo após foram aplicados 3 µL de plasmídeo em 50 µL da solução de células. Após 30 minutos em banho de gelo, as bactérias foram incubadas a 42°C por 2 minutos e incubadas novamente em gelo por 2 minutos. Adicionou-se 1000 µL de meio LB sobre as células, que foram então incubadas a 37°C com agitação de 200 RPM por 1 hora. Após esse período 100 µL da suspensão de células foi plaqueado em meio seletivo contendo: LB, antibiótico ampicilina (100 µg/mL), IPTG (Isopropilβ-D-1-thiogalactopiranosídeo) e X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside).

Em linhas gerais, as células transformadas com o plasmídeo recombinante geram colônias brancas (positivas), já células que tenham sido transformadas somente com o plasmídeo não recombinante (sem o inserto), produzem colônias azuis (negativas). Somente as colônias com fenótipo branco foram repicadas em uma placa mãe, sendo mais uma vez triadas através da técnica de Palitagem ou “Toothpick” (SAMBROOK, 1989).

As colônias positivas foram inoculadas em meio LB + Ampicilina (100µg/mL) e incubadas a 37°C, com agitação de 200 rpm, por um período de 16 a 18 horas. Em seguida as células foram precipitadas por centrifugação (SAMBROOK, 1989). Os plasmídios contendo o inserto foram extraídos usando kit para mini-preparação de plasmídios QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN), segundo protocolo recomendado pelo fabricante. Para confirmar a eficiência da extração dos plasmídios o material

purificado foi dosado com espectrofotômetro, aplicado em gel de agarose e submetido à eletroforese.

4.3 SEQUENCIAMENTO DOS CLONES OBTIDOS ATRAVÉS DO MÉTODO CONVENCIONAL DE SÄNGER

Os plasmídios, contendo o inserto a ser sequenciado, foram enviados para uma empresa terceirizada (Macrogen Korea), para sequenciamento em sequenciador automático de DNA, modelo ABI 3100, Applied Biosystems.

Os dados do sequenciamento foram analisados usando o programa do pacote DNASTar, SeqMan, disponível no Instituto Carlos Chagas.

4.4 CONSTRUÇÃO DOS CASSETES PARA NOCAUTE DE AMBOS ALELOS DO GENE *TCNUP-1*

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

O gene *npt* (Neo) codifica a enzima neomicina fosfotransferase que confere resistência ao antibiótico neomicina (G418), enquanto o gene *hph* (Higro), codifica a enzima higromicina fosfotransferase que confere resistência ao antibiótico higromicina B.

Para amplificar os genes Neo e Higro utilizou-se como moldes os plasmídios pSV2-neo e pPGK-Hyg disponíveis no laboratório, e que foram gentilmente cedidos pelo Dr. Gregory Buck, Virginia Commonwealth University, EUA. Foram usados nas PCRs 30 ng de DNA plasmidial, 10 pmol dos *primers*, 0.2 mM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, tampão comercial para Taq DNA polimerase e 2.5 Unidades da enzima Taq DNA polimerase (volume final, 50 µL). As reações foram processadas em termociclador modelo MJ96G+ (Biocycler). A ciclagem das PCRs foi a seguinte: desnaturação por 5' a 94 °C, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30",

anelamento a 55 °C por 30” e extensão a 72 °C, com o tempo dessa etapa variando conforme o esperado (tendo como base a processividade de 1kb por minuto).

Os *primers* NeoHindF/HigHindF e NeoEcoR/HigEcoR (Tabela 3) contém, respectivamente, os sítios *Hind* III e *Eco*RI. Tanto os *primers* quanto o vetor pBluescript II KS (Stratagene), foram digeridos com as enzimas escolhidas, purificados com fenol / clorofórmio (SAMBROOK, 1989), e ligados com a enzima T4 DNA ligase (PROMEGA), empregando-se o protocolo especificado pelo fabricante.

Os plasmídios recombinantes foram denominados pKS/NEO e pKS/HIG. Tais plasmídios foram usados para transformar células quimiocompetentes de *E. coli*, linhagem Top 10, segundo o protocolo descrito no subitem 4.3.2.

| Primer | Sequência |
|----------|--|
| NeoHindF | 5` GGGGA AAGCTT ATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAG 3` |
| NeoEcoR | 5` GGGG GAATTC AGAAGAAGCTCGTCAAGAAGGCGATAGAA 3` |
| HigHindF | 5` GGGGGA AAGCTT ATGAAAAGCCTGAACTCACCGCGAC 3` |
| HigEcoR | 5` GGGT GAATTC TATTCCTTTGCCCTCGGACGAGTGCTG 3` |

Tabela 3: Sequência dos *primers* usados para amplificação das porções do cassete. Os sítios para as enzimas de restrição adicionadas estão marcados em negrito.

4.4.2 Amplificação e clonagem das regiões intergênicas IntergENO e IntergGAPDH

A montante do gene de resistência foi clonada uma parte da região intergênica (350pb), entre os genes Enolase e Kap-3 (IntergENO) de *T. cruzi* e a jusante, um fragmento correspondente à região intergênica (500pb) entre as duas cópias de GAPDH (IntergGAPDH), de *T. cruzi* (Figura 2).

Nas reações de PCR foram usados 100 ng de DNA genômico da cepa Dm28c de *T. cruzi* selvagem, 10 pmol dos *primers*, 0.2 mM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, tampão comercial para Taq DNA polimerase e 2.5 Unidades da enzima Taq DNA polimerase. As reações foram processadas em termociclador modelo MJ96G+ (Biocycler). A ciclagem das PCRs foi a seguinte: desnaturação por 5’ a 94 °C, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30”, anelamento a 55 °C por 30” e extensão a 72 °C, com o tempo dessa etapa variando conforme o esperado (tendo como base a processividade de 1kb por minuto).

| Primer | Sequência |
|--------------|--|
| IntENOSaIF | 5` TGATAG T CGACCGTCCATTTCTCTTTCCGCACTC 3` |
| IntENOHindR | 5` TCGTT AAGCT TTTTTTTATTGCTGTTGGCTCTTCACTCCCCG 3` |
| IntGAPDHEcoF | 5` TGTAC G AATTCTGGCCTCGAAGGATCGTTTCGGCAAAGTT 3` |
| IntGAPDHBamR | 5` GATAG G ATCCTTGATGGGCATGTTAAATTCTGTTCAATGTAATTGTT 3` |

Tabela 4: Sequência dos *primers* usados para amplificação das porções do cassete. Os sítios para as enzimas de restrição adicionadas estão marcados em negrito.

Os *primers* IntergENOSaIF e IntergENOHindR contém, respectivamente, os sítios *Sal I* e *Hind III*. Os *primers* IntergGAPDHEcoF e IntergGAPDHBamR contém os sítios *EcoRI* e *BamHI* respectivamente (Tabela 4). Tanto os *primers* quanto os vetores pKS/NEO e pKS/HIG, foram digeridos com as enzimas escolhidas, purificados com fenol / clorofórmio (SAMBROOK, 1989), e ligados com a enzima T4 DNA ligase (PROMEGA), usando-se o protocolo especificado pelo fabricante.

Os plasmídios recombinantes foram denominados pNEO-2 e pHIG-2 (Figura 2), tais plasmídios foram usados para transformar células quimiocompetentes de *E. coli*, linhagem Top 10, segundo o protocolo descrito no subitem 4.3.2.

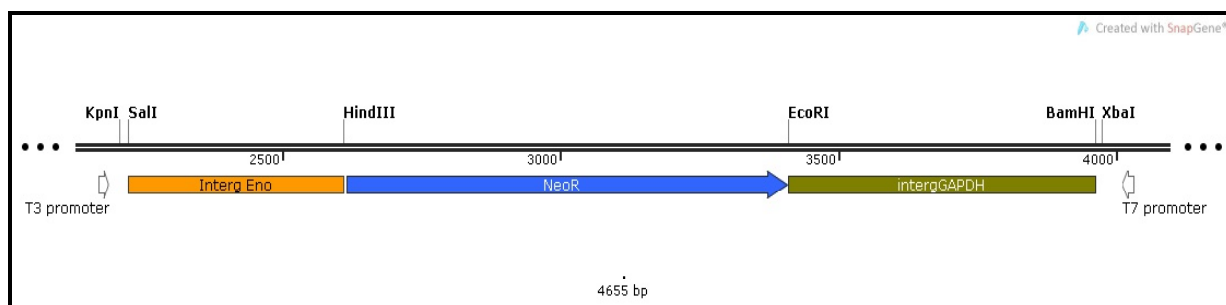


Figura 2 : Representação do cassete contendo o gene Neo, indicando os sítios de restrição usados para a ligação das regiões intergênicas ao gene de resistência e os sítios para ligação das regiões de recombinação.

4.4.3 Amplificação e clonagem das regiões de recombinação

Foram selecionadas regiões de 599 pb (Ups) da região intergênica a montante do gene TcNUP-1 e uma região de 638 pb (Down) que codifica parte da porção carboxi-terminal do gene TcNUP-1 (Figura 3). Cada região foi amplificada por PCR, usando 100 ng de DNA genômico da cepa Dm28c de *T. cruzi* selvagem, 10 pmol dos *primers*, 0.2 mM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, tampão comercial para Taq DNA polimerase e 2.5 Unidades da enzima Taq DNA polimerase. As reações foram processadas em termociclador modelo MJ96G+ (Biocycler). A ciclagem das PCRs

foi a seguinte: desnaturação por 5' a 94 °C, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30'', anelamento a 55 °C por 30'' e extensão a 72 °C por 2'.

Os *primers* IgGTPKoKpnF e IgGTPKoSalR contém, respectivamente, os sítios KpnI e SalI. Os *primers* NupNocBamF e NupNocXbaR contém os sítios BamHI e XbaI respectivamente (Tabela 5). Tanto os *primers* quanto os vetores pNEO-2 e pHIG-2, foram digeridos com as enzimas escolhidas, purificados com fenol / clorofórmio (SAMBROOK, 1989) e ligados com a enzima T4 DNA ligase (PROMEGA), usando-se o protocolo especificado pelo fabricante.

| Primer | Sequência |
|-------------|---|
| IgGTPKOKpnF | 5` AGCGGTACCTCACATTGACATCAAATTTTTCAAACGAAGAA 3` |
| IgGTPKOSaIR | 5` CCCGTCGACAACTTCGCCTTTGCTTGTTCCTCTCT 3` |
| NUPNocCBamF | 5` TTCGGATCCGGAAAACAATGATGGAGAGGAGCATG 3` |
| NUPNocCXbaR | 5` GCCTCTAGATGTGCTCCAGAAACGTGATGC 3` |

Tabela 5: Sequência dos *primers* usados para amplificação das porções do cassete. Os sítios para as enzimas de restrição adicionadas estão marcados em negrito.

Os plasmídios recombinantes foram denominados pUPS//NEO//DOWN e pUPS//HIG//DOWN. Tais plasmídios foram usados para transformar células quimiocompetentes de *E. coli*, linhagem Top 10, segundo o protocolo descrito no subitem 4.3.2.

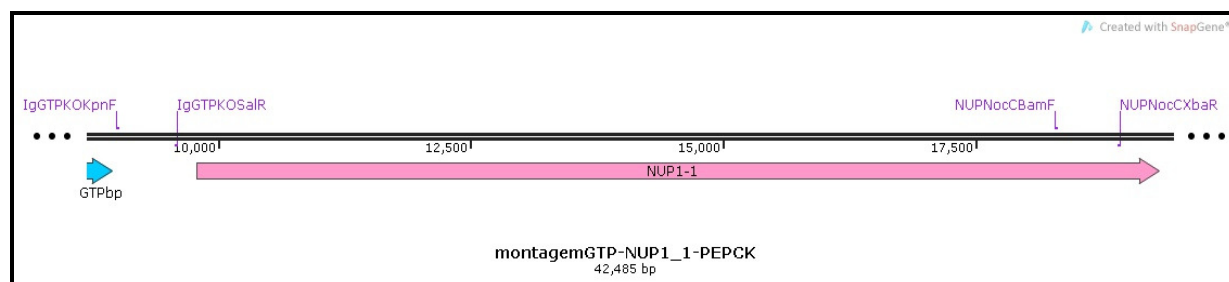


Figura 3 : Representação do gene TcNUP-1, com o local de anelamento dos *primers* usados para amplificar as regiões Ups (599 pb, IgGTPKOKpnF + IgGTPKOSaIR) e Down (638 pb, NupNocCBamF + NupNocCXbaR).

4.4.4 Amplificação dos Cassetes por PCR e purificação

Os plasmídios recombinantes pUPS//NEO//DOWN e pUPS//HIG//DOWN, foram purificados pelo método da lise alcalina, usando o kit para mini-preparação de plasmídios QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN) segundo protocolo recomendado pelo fabricante.

Para amplificar os cassetes foram usados 30 ng de DNA plasmidial, 10 pmol dos *primers* e 1x do Master Mix (IBMP), para um volume final de 1 mL de reação (fracionado em 20 tubos de 0.2 mL). A seguinte ciclagem foi empregada: desnaturação por 5' a 94 °C, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30'', anelamento 55 °C 30'' e extensão a 72 °C 5'.

Os cassetes resultantes da amplificação foram denominados UPS//NEO//DOWN e UPS//HIG//DOWN, respectivamente. Uma vez confirmada a amplificação dos cassetes, o produto de PCR foi aplicado em gel de agarose 1%, submetido à eletroforese (25 volts, 16 horas) e corado em brometo de etídio. A banda correspondente ao cassete foi visualizada com aparelho de trans-iluminação UV e retirada do gel com auxílio de um bisturi. O gel contendo o DNA do cassete foi inserido em membrana de diálise (SnakeSkin Dialysis Tubing, Pierce) e novamente submetido à eletroforese por uma hora a 100 volts em TBE. O DNA que estava confinado no gel passou ao tampão, devido à eletroforese, o tampão foi recuperado e o DNA purificado com fenol / clorofórmio (SAMBROOK, 1989).

4.5 TRANSFEÇÃO DE *T. cruzi*

A transfecção do parasita foi obtida usando formas epimastigotas de *T. cruzi* 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 estéril e ressuspenso em 1 mL de solução de eletroporação (NaCl 140 mM, HEPES ácido 25 mM, Na₂HPO₄ 0,74 mM).

A suspensão de células (0,4 mL) foi transferida para cubetas de eletroporação estéreis, pré-resfriadas em gelo, contendo 0,2 cm de GAP (BioAgency). Em uma das cubetas foram adicionados 7 µg do cassete, enquanto outra cubeta, contendo apenas a suspensão de parasitas, foi usada como controle. Após 10' em gelo, as amostras contidas nas cubetas foram expostas a 2 pulsos de 450 volts, 500 µF, com auxílio do eletroporador GenePulser® II Apparatus (Bio-Rad).

As amostras foram incubadas novamente por 5' a 10' em gelo e transferidas para garrafas de cultura de 25 cm², contendo 10 mL de meio LIT (suplementado com 10.000U de penicilina e estreptomicina a 10 µg/mL).

As culturas foram incubadas a 28 °C. Após 24 horas de incubação adicionou-se o antibiótico higromicina em concentração final de 500 µg/mL. As culturas foram mantidas por sucessivas passagens (diluição de 1:10), em meio LIT suplementado com antibiótico a cada 8-10 dias, até a ausência de proliferação celular na cultura controle.

4.5.1 Confirmação da inserção do cassete UPS//HIG//DOWN

A extração e purificação do DNA da população simples nocaute foi realizada conforme descrito por Medina-Acosta & Cross (1993). O DNA genômico da população de parasitas foi utilizado para confirmação da inserção do cassete UPS//HIG//DOWN, através de PCR. Nas reações foram usados 100 ng do DNA genômico (simples nocaute), 10 pmol dos *primers*, 0.2 mM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, tampão comercial para Taq DNA polimerase e 2.5 Unidades da enzima Taq DNA polimerase. O ciclo seguiu as seguintes condições: desnaturação por 5' a 94 °C, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30", anelamento a 55 °C por 30" e extensão a 72 °C por 4'.

| Primer | Sequência |
|--------------|--|
| GTPIIF | 5` GTCAGGATCCGAGCGGCAGTGGCTGCAGCAGTATCA 3` |
| HigEcoR | 5` GGGT GAATTC TATTCCTTTGCCCTCGGACGAGTGCTG 3` |
| NeoEcoR | 5` GGGG GAATTC AGAAGAAGGCGATAGAA 3` |
| IntENOHindR | 5` TCGTT AAGCTT TTTTTATTGCTGTTGGCTCTTCACTCCCCG 3` |
| IgGTPKOSal R | 5` CCCGTCGACA ACTTCGCCTTTGCTTGTTCCTCTCT 3` |

Tabela 5: Sequência dos *primers* usados para confirmação da inserção do cassete UPS//HIG//DOWN.

4.6 RT-PCR

O RNA total foi extraído de formas epimastigotas selvagens do *T. cruzi* de acordo com o protocolo de KARLINSEY *et al.*, (1989). A reação da transcriptase reversa foi feita usando o kit ImProm-II (Promega).

A solução, contendo 10 µg do RNA total, 0.5 µg de "random primer" (RNase Free) e água 18.2 Ω (sem nucleases), foi aquecida a 70 °C por 5' e rapidamente

resfriada em gelo por 5'. Logo em seguida foram adicionados ao tubo 11.4 μ L de uma solução previamente preparada contendo: 4 μ L do tampão 5X, 4 mM de MgCl₂, 0.5 mM de dNTPs, 2 μ L de DTT Rnase Free, 1 μ L de RNase out e 1 μ L da enzima *ImProm-II™ Reverse Transcriptase*. As soluções foram incubadas na sequência a 25 °C por 5', 42 °C por 2 horas e 75 °C por 15'.

| Primer | Sequência |
|--------------|---|
| TcMini_ExonF | 5' AACGCTATTATTGATACAGTTTCTGTACTATATTG 3' |
| NupR2R | 5' TCACGATGATGCGTCTATGGC 3' |

Tabela 6 : Sequência dos *primers* usados na RT-PCR.

Um volume de 5 μ L da reação anterior, contendo cDNA, foi usado para as reações de PCR. Além de 10 pmol dos *primers*, 0.2 mM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, tampão comercial para Taq DNA polimerase e 2.5 Unidades da enzima Taq DNA polimerase. O ciclo seguiu as seguintes condições: desnaturação por 5' a 94 °C, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30'', anelamento a 55 °C por 30'' e extensão a 72 °C por 5'.

4.7 EXTRATO PROTÉICO DE *T. cruzi*

As formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT até a densidade de 1×10^7 células/mL e coletadas por centrifugação (4.000 $\times g$, 15 min a 10 °C), lavados duas vezes em PBS pH 7.5. 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/L. Os extratos foram fervidos a 100 °C por 5' e armazenados a -70 °C.

4.8 WESTERN BLOT

O extrato protéico total do parasita selvagem, mutante simples nocaute e mutante duplo nocaute, foram aplicados em gel SDS-PAGE (6%), submetidos à eletroforese com corrente constante a 30mA. Em seguida as proteínas foram transferidas à uma membrana de nitrocelulose (Hybond C, Amersham Bioscience),

com uso do tampão de transferência segundo protocolo descrito por Towbin *et al.*, 1979.

Para evitar interações inespecíficas dos anticorpos com a membrana, após a transferência, bloqueou-se a membrana em uma solução de PBST e leite 5%, por 40' em agitação constante. Logo após o bloqueio a membrana foi incubada com o anticorpo monoclonal, produzido em camundongos, contra a proteína TcNUP-1 em uma diluição de 1:500 na solução de bloqueio por 60' e agitação constante. Decorrido este tempo a membrana foi lavada por 4x de 5', para eliminar interações inespecíficas do anticorpo.

O anticorpo secundário α -IgG de camundongos conjugado à enzima fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich), foi utilizado na diluição de 1:10.000 na solução de bloqueio e incubado por 40' em agitação constante. Decorrido este tempo a membrana foi lavada por 4x de 5', para eliminar interações inespecíficas do anticorpo.

Anteriormente a revelação a membrana foi lavada com o tampão da fosfatase alcalina por 5' em agitação constante. A revelação foi obtida adicionando-se sobre a membrana uma solução contendo BCIP (5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) e NBT (*Nitro Blue Tetrazolium*), para uma concentração final de 0.165 mg/mL e 0.33 mg/mL, respectivamente, em um volume de 10 mL do tampão da fosfatase alcalina. A reação ocorreu na ausência de luz.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 LOCALIZAÇÃO GENÔMICA DO GENE TCNUP-1

5.1.1 *Locus* do gene TcNUP-1

O padrão de amplificação gerado pelos *primers* desenhados possibilitou a identificação do posicionamento dos genes que flanqueiam o gene TcNUP-1 na cepa de *T. cruzi* Dm28c. Os pares de *primers* usados nas reações de PCR estão

listados na Tabela 7. Nessa mesma tabela, para facilitar o entendimento, estão listadas as canaletas correspondentes aos produtos de PCR na Figura 4, onde também é possível observar o local de anelamento dos *primers*.

Os resultados obtidos com o padrão de amplificação demonstram que o gene TcNUP-1 esteja a jusante do gene para GTP (ID: Tc00.1047053509099.10) e a montante de uma cópia do gene PEPCK (ID: Tc00.1047053507547.90) (Figura 4: canaletas 2, 3, 4 e 5), corroborando os dados obtidos no banco de dados TriTryp.

| Canaleta (Fig. 4) | Primer F | Primer R | Esperado (pb) | Observado ~ (pb) |
|-------------------|------------|------------|---------------|------------------|
| 1 | SFAHypEndF | NUPAR | 3195 | 3000 |
| 2 | SFAGTPF | NUPAR | 863 | 850 |
| 3 | SFAGTPEndF | 445R2 | 1308 | 1300 |
| 4 | NUPF3 | CtPEPCKR | 1676 | 1500 |
| 5 | NUPCF | CtPEPCKR | 1485 | 1500 |
| 6 | SFAPepEndF | NUPAR | > 255 | 1400 |
| 7 | SFAPepEndF | 445R2 | > 465 | 1600 |
| 8 | PEPCKF | 445R2 | > 1430 | 2600 |
| 10 | NUPF3 | NUPAR | > 513 | Não Amplificou |
| 11 | NUPCF | NUPAR | > 327 | Não Amplificou |
| 12 | NUPCF | SFAGTPiniR | > 100 | Inespecífico |
| 13 | NUPF3 | SFAGTPiniR | > 290 | Inespecífico |
| 14 | SFAPepEndF | PEPCKR | ? | Não Amplificou |
| 15 | SFAPepEndF | CtPEPCKR | > 670 | Não Amplificou |

Tabela 7: Combinações de *primers* usados para amplificar as regiões intergênicas e suas canaletas correspondentes na Figura 4.

Foi possível amplificar por PCR fragmentos de ~ 1300 pb, ~ 1500 pb e ~ 2600 pb, (Figura 4: canaletas 6, 7 e 8), o que pela posição de anelamento dos *primers*, indica haver outra cópia do gene TcNUP-1 após PEPCK, diferente do observado no banco de dados.

O *T. cruzi* não representa uma população homogênea, mas um grupo heterogêneo e complexo de populações que diferem entre si segundo critérios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e clínicos (DA SILVEIRA, 2000), o que é refletido na organização do genoma de cada uma das populações ou cepas do parasita.

Além disso, é importante considerar que a cepa usada para realizar o sequenciamento do genoma de *T. cruzi* (EL-SAYED, *et al.*, 2005) foi a cepa CL Brener considerada uma cepa híbrida (BRISSE, *et al.*, 1998; MACHADO; AYALA, 2001; GAUNT, *et al.*, 2003; BRISSE, *et al.*, 2003). Ademais, a cepa CL Brener não

está na mesma DTU (Discrete Typing Unit) da cepa Dm28c, usada para caracterizar e nocautear o gene TcNUP-1 (PICCHI *et al.*, 2011; FERREIRA, 2011).

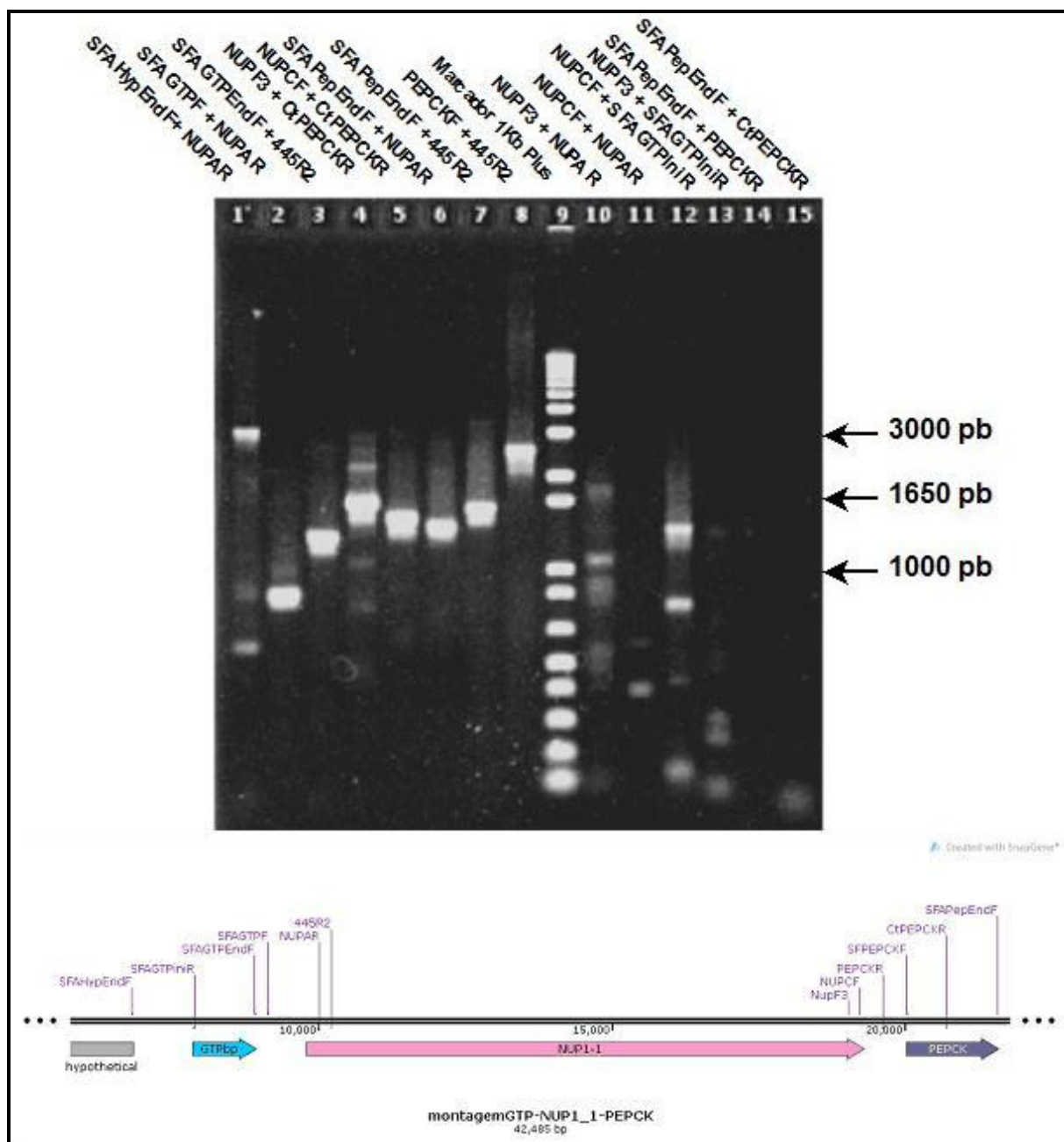


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos de PCR obtidos para a localização genômica. Abaixo, montagem da organização genômica para o locus da TcNUP-1 (dados disponíveis no TriTryp DB), com a posição de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores usados nas reações de PCR (Tabela 7). Nas canaletas de 1 a 8 podem ser observados resultados específicos, enquanto nas canaletas de 10 a 15 observa-se os resultados inespecíficos ou onde não houve amplificação. Marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen), canaleta 9.

A grande variabilidade intra-específica em *T. cruzi* é relatada com freqüência na literatura (HENRICKSSON; ASLUND; PETERSSON, 1996; AYMERICH; GOLDENBERG, 1989; VARGAS; PEDROSO; ZINGALES, 2004). O fato dos

cromossomos de tripanossomatídeos não se condensarem durante a mitose aumenta a complexidade dificultando uma análise precisa de seu cariótipo (VICKERMAN; TETLEY, 1970). Estima-se que o número de cromossomos em *Trypanosoma cruzi* possa variar de 64 a 80 cromossomos, sendo relatada inclusive variação cromossômica entre diferentes cepas e clones (CANO, *et al.*, 1995; PORCILE, *et al.*, 2003; BRANCHE, *et al.*, 2006).

Outrossim, a montagem do gene TcNUP-1 não está correta no banco de dados. Não é possível observar o número correto de repetições dentro da sequência e nem mesmo a anotação da *Open Reading Frame* (ORF) para todo o gene está correta. Isso se deve ao fato de que o gene em questão é bastante complexo, TcNUP-1 possui uma sequência longa (7.7 Kb e 9.5 Kb) e dentro do gene existem sequências repetitivas, que dificultam o processo de montagem após o sequenciamento.

O panorama é complexo, existe uma grande variação entre as cepas do *Trypanosoma cruzi* e a anotação do sequenciamento da região onde o gene se encontra é dificultada pelas particularidades do próprio gene, sendo que, esses fatores se somam contribuindo para as diferenças encontradas nesse trabalho.

5.2 CÓPIA TRUNCADA DO GENE TcNUP-1

Objetivando amplificar o gene TcNUP-1 em sua totalidade foram realizadas PCRs *long range*, utilizado o kit *Expand Long Template PCR System* (Roche), que pode amplificar até 30kb segundo informações do fabricante. O uso do kit fez-se necessário, pois o gene em questão tem um alelo com 9.5kb e outro com 7.5kb (PICCHI, 2011).

Em todas as reações realizadas (usando combinações distintas de *primers*), foi possível observar a amplificação de um produto específico, porém com tamanho muito abaixo do esperado. Os *primers* usados nas reações podem ser observados na Tabela 8 e os resultados se encontram na Figura 5.

O padrão de amplificação encontrado demonstra existir uma sequência genômica parcialmente similar ao gene TcNUP-1.

| Primer F | Primer R | Esperado para cada alelo (pb) | Observado (pb) |
|----------|-----------|-------------------------------|-----------------------|
| TcNUPA1F | NUPR2 | 9513 e 7713 | ~ 1500 |
| TcNUPA1F | TcNUPC1R | 9494 e 7694 | ~ 1500 |
| TcNUPA1F | SFANUP5CR | 8220 e 6420 | Não amplificou |
| SFNNhF | PEPCKR | 8967 e 7167 | ~ 2900 |

Tabela 8 : *Primers* usados para amplificar o gene TcNUP-1. Os resultados e a posição de anelamento dos *primers* podem ser observados na Figura 5.

Ao usarmos os *primers* TcNUPA1F e NUPR2 na PCR espera-se a amplificação total do gene TcNUP-1 gerando um produto de 7713 pb e 9513 pb (alelo de 7.7 Kb e alelo de 9.5 Kb, respectivamente), entretanto observou-se a amplificação de um fragmento com apenas ~1500 pb. Utilizando os *primers* TcNUPA1F e TcNUPC1R o produto esperado teria 7694 e 9494 pb (alelo de 7.7 Kb e alelo de 9.5 Kb, respectivamente), todavia o encontrou-se uma banda correspondente a ~1500 pb. Na amplificação usando os *primers* TcNUPA1F e SFANUP5CR o esperado é de 6420 e 8220 (alelo de 7.7 Kb e alelo de 9.5 Kb, respectivamente), mas nesse caso não foi observada amplificação indicando a inexistência da sequência para anelamento do *primer reverse*, visto que foi possível amplificar fragmentos usando o mesmo *primer forward* como descrito anteriormente (Figura 5).

Ou seja, usando o *primer* TcNUPA1F em conjunto com diferentes *primers reverse* que anelam em porções distintas da região próxima ao códon de parada do gene TcNUP-1 foi possível inferir, usando PCR, o tamanho da sequência similar a TcNUP-1. Isso porque ao menos um dos *primers* usados hibridiza dentro da sequência do gene e em nenhuma reação foi possível observar o tamanho esperado para amplificação completa do gene. Sendo assim com base no padrão observado pode-se concluir que o tamanho da sequência “truncada” é de ~1500 (Figura 5).

Usando o *primer* SFNNhF em conjunto com o *primer* PEPCKR, que anela na sequência intergênica a jusante de TcNUP-1, o esperado seria de 7167 pb e 8967 pb (alelo de 7.7 Kb e alelo de 9.5 Kb, respectivamente) no entanto observou-se uma amplificação correspondente a ~2900 pb. O que mostra, pela diferença no tamanho, que a sequência intergênica a jusante da cópia truncada é a mesma para a cópia completa. Esses resultados juntamente com o que foi descrito anteriormente, indicando haver outra cópia do gene TcNUP-1 após PEPCK (subitem 5.1.2), admite

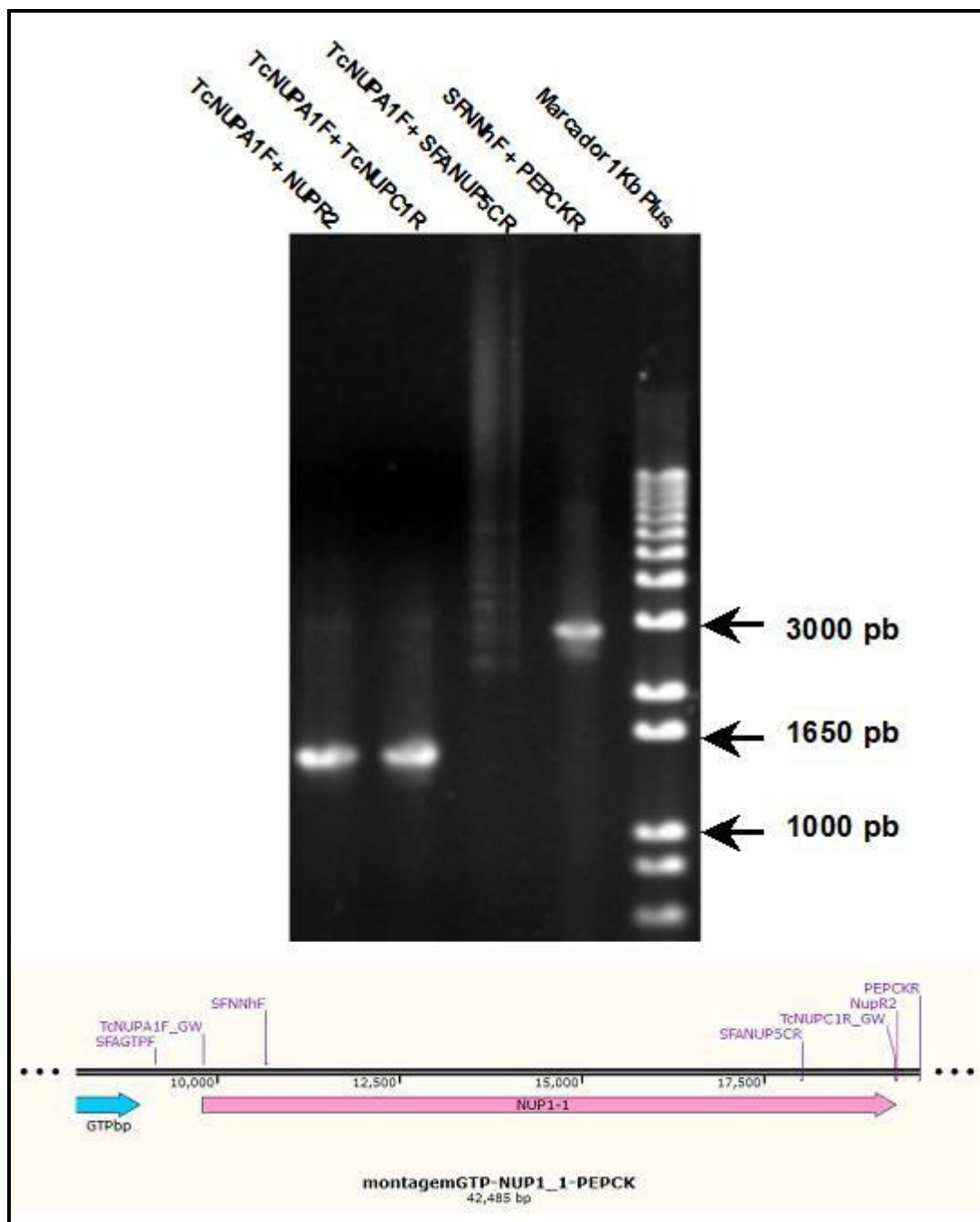


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 0.5%. Resultado das PCRs para amplificação do gene TcNUP-1. Os *primers* correspondentes a cada canaleta estão listados na Tabela 8. Marcador de peso molecular 1Kb plus da Invitrogen. Representação do gene completo TcNUP-1 juntamente com a posição de hibridização dos oligonucleotídios iniciadores usados nas reações de PCR *Long Range*.

Para confirmar tal hipótese, os fragmentos foram clonados no plasmídeo pGEM T-easy® vector (Promega) e enviados para sequenciamento (Macrogen Korea), em sequenciador automático de DNA modelo ABI 3100 (Applied Biosystems).

Os resultados obtidos atestam a existência de uma cópia truncada do gene TcNUP-1 após o gene PEPCK, que para melhor compreensão será chamada de Δ NUP. Além disso, a jusante do gene Δ NUP foi encontrada outra cópia do gene PEPCK, como indicado na Figura 6.

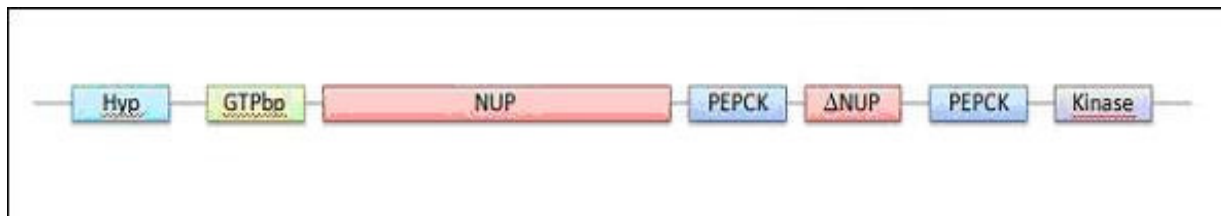


Figura 6: Posicionamento dos genes no *locus* segundo sequenciamento.

O gene Δ NUP não é completo tendo apenas 1508 bp, diferente da cópia íntegra do gene TcNUP-1 (9.5kb e 7.5kb). A cópia truncada possui uma porção homóloga à região inicial do gene TcNUP-1, contando a partir do ATG cerca de 1416pb. A Δ NUP não possui os domínios repetitivos em sua seqüência e tem somente 35bp homólogos à região terminal da cópia completa. O alinhamento das seqüências está representado na Figura 7.

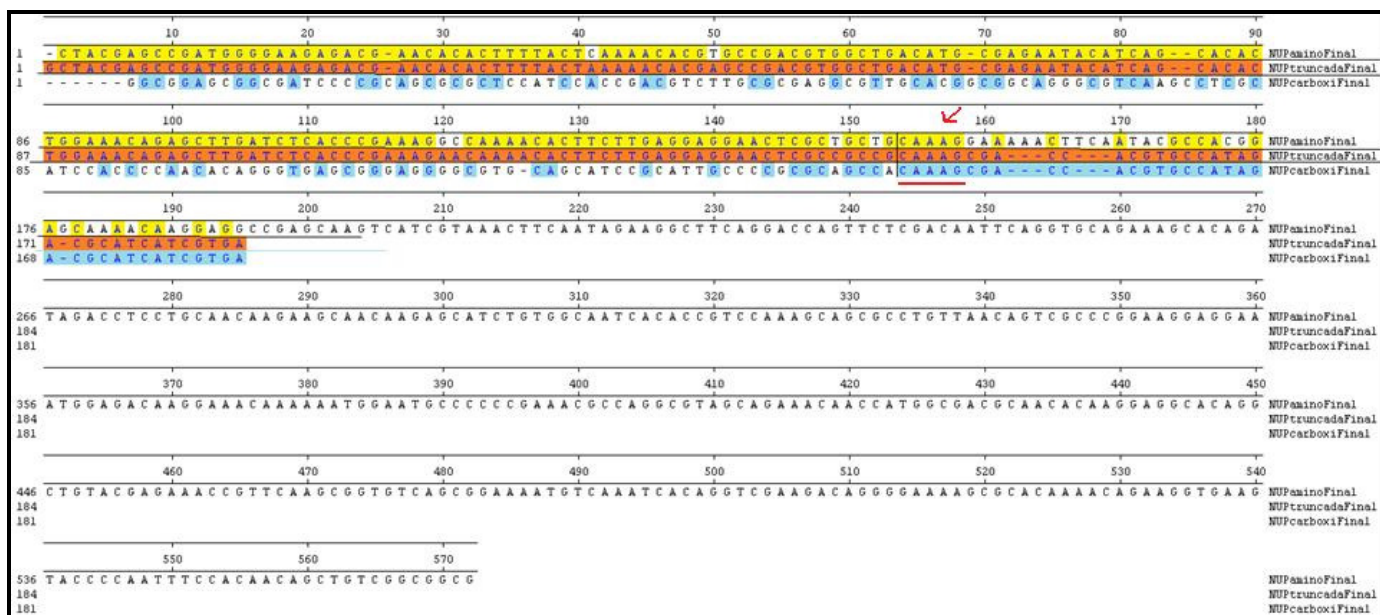


Figura 7: Alinhamento das seguinte regiões: Terminal da Δ NUP (NUPTruncadaFinal); porção final da seqüência codificadora da extremidade N-terminal da proteína TcNUP-1 (NUPAminoFinal) e seqüência codificadora da porção C-terminal da proteína TcNUP-1 (NUPCarboxiFinal). É possível observar uma região consenso entre as três seqüências (seta vermelha). O algoritmo de alinhamento foi o Clustal W.

5.2.1 Análise da transcrição do “gene” Δ NUP

O *primer Forward* usado anela no *miniexon* e o *primer Reverse*, anela no final dos genes TcNUP-1 e Δ NUP, sendo que o produto esperado para TcNUP-1 é de ~9.5 kb e ~7.7 kb e para Δ NUP é de ~1500 pb. Como o fragmento observado tem apenas ~ 1700 pb (Figura 8), concluí-se que este representa o mRNA do gene Δ NUP. Mesmo existindo o cDNA para as duas cópias a amplificação pode ocorrer em favor daquele segmento de menor tamanho, nesse caso a Δ NUP.

A adição do Miniexon e da cauda poli A aos mRNAs processados estabiliza o mRNA evitando sua degradação, favorece o transporte deste para o citoplasma e facilita o início da tradução (LEWIS; IZAURFLDE, 1997; ISKEN; MAQUAT, 2007). Isto posto, o fato do gene Δ NUP ter seu mRNA alvo de *trans-splicing* é um indício de que o mesmo seja funcional. Entretanto mais estudos devem ser realizados a fim de caracterizar o gene.

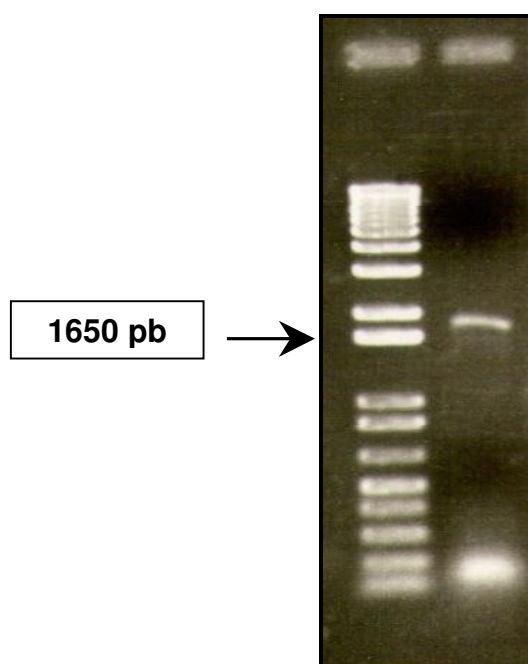


Figura 8: Eletroforese, em gel de agarose (1%) do produto de PCR da reação com cDNA de *T. cruzi*. A banda representa o cDNA correspondente ao mRNA do gene Δ NUP. Marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen).

5.3 NOCAUTE

5.3.1 Obtenção dos cassetes e confirmação do nocaute simples

O primeiro alelo foi deletado com o cassete UPS//HIG//DOWN (3278 pb, Figura 9) que contém como marcador de seleção o gene de resistência ao antibiótico higromicina B. Os parasitas transfectados foram selecionados ao adicionar ao meio o antibiótico mencionado, de forma que apenas os parasitas portando o cassete sobreviveram.

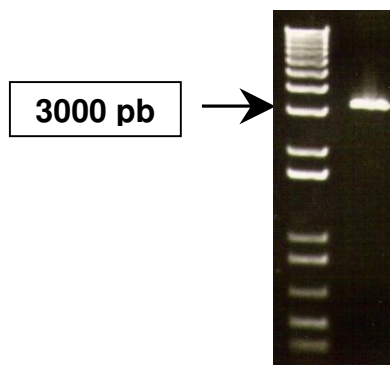


Figura 9: Gel de agarose 1%. Cassete UPS//HIG//DOWN após amplificação e purificação. Marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen).

O tamanho dos fragmentos gerados nas reações de PCR, para confirmar a inserção do cassete UPS//HIG//DOWN no *locus* estudado, foi de acordo com o esperado (Figura 10), confirmando o nocaute de uma das cópias do gene. Nessas reações o *primer forward* usado hibridiza no gene GTP a montante do local de recombinação da construção e os *primers reverse* anelam respectivamente, no gene Higo, na IntergENO e na Região de recombinação Ups.

Para deleção do segundo alelo a população de parasitas selecionados com o antibiótico higromicina B, foi transfectada com o cassete UPS//NEO//DOWN (2982 pb, Figura 11). Tal cassete contém como marcador de seleção o gene de resistência ao antibiótico G418, após a segunda transfecção a população de parasitas foi selecionada com os antibióticos higromicina B e G418, de forma que apenas os parasitas portando os cassetes sobreviveram.

Entretanto não foi possível confirmar a correta inserção do cassete por PCR. Nas reações foram usados o DNA genômico da população duplo nocaute juntamente com o *primer forward* que hibridiza no gene GTP a montante do local de recombinação e os *primers reverse* que anelam respectivamente, no gene Neo, na IntergENO e na Região de recombinação Ups.

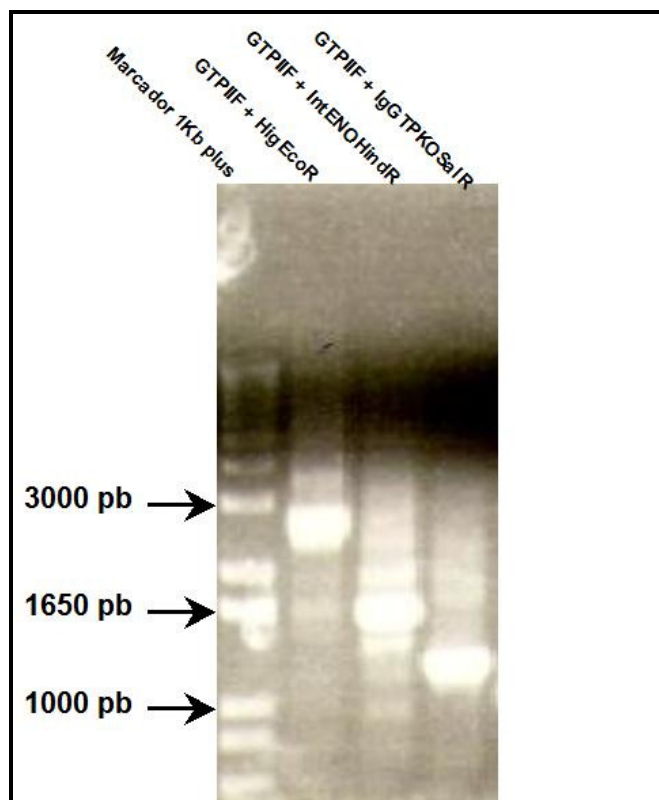


Figura 10 : Gel de agarose 1%. Resultado das PCRs para confirmação da inserção do cassete UPS//HIG//DOWN. Marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen).

Todavia os parasitas foram selecionados com os antibióticos específicos, o que demonstra que os genes de resistência que estavam nos cassetes foram integrados no genoma conferindo resistência à higromicina B e G418, entretanto no caso do gene Neo a inserção não ocorreu no *locus* esperado.

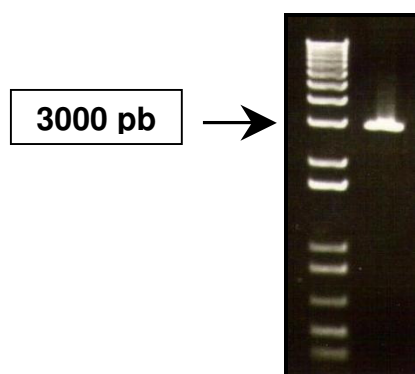


Figura 11: Gel de agarose 1%. Cassete UPS//NEO//DOWN após amplificação e purificação. Marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen).

Os alelos possuem tamanhos diferentes com 9.5kb e 7.5kb, da mesma forma as proteínas expressas, que tem 350 kDa e 285 kDa respectivamente (PICCHI *et al.*, 2011). Sendo assim, caso existam somente duas formas alélicas, ao nocautear um dos alelos em uma população clonal espera-se que uma das formas da proteína não esteja mais presente em ensaios de *Western Blot*.

Para confirmar a redução da expressão protéica no nocaute o extrato protéico das diferentes populações (selvagem, nocaute simples e nocaute duplo), foi usado em um ensaio de *Western blot*, a fim de comparar o padrão das bandas geradas com o uso de anticorpo monoclonal específico contra a proteína TcNUP-1, conforme indica Figura 12. É possível perceber que realmente houve a deleção de um dos alelos do gene, evidenciado pela ausência da banda de 285 KDa, corroborando os dados obtidos com as reações de PCR. Já no duplo nocaute a banda correspondente ao segundo alelo ainda permanece presente, confirmando o resultado das reações de PCR.

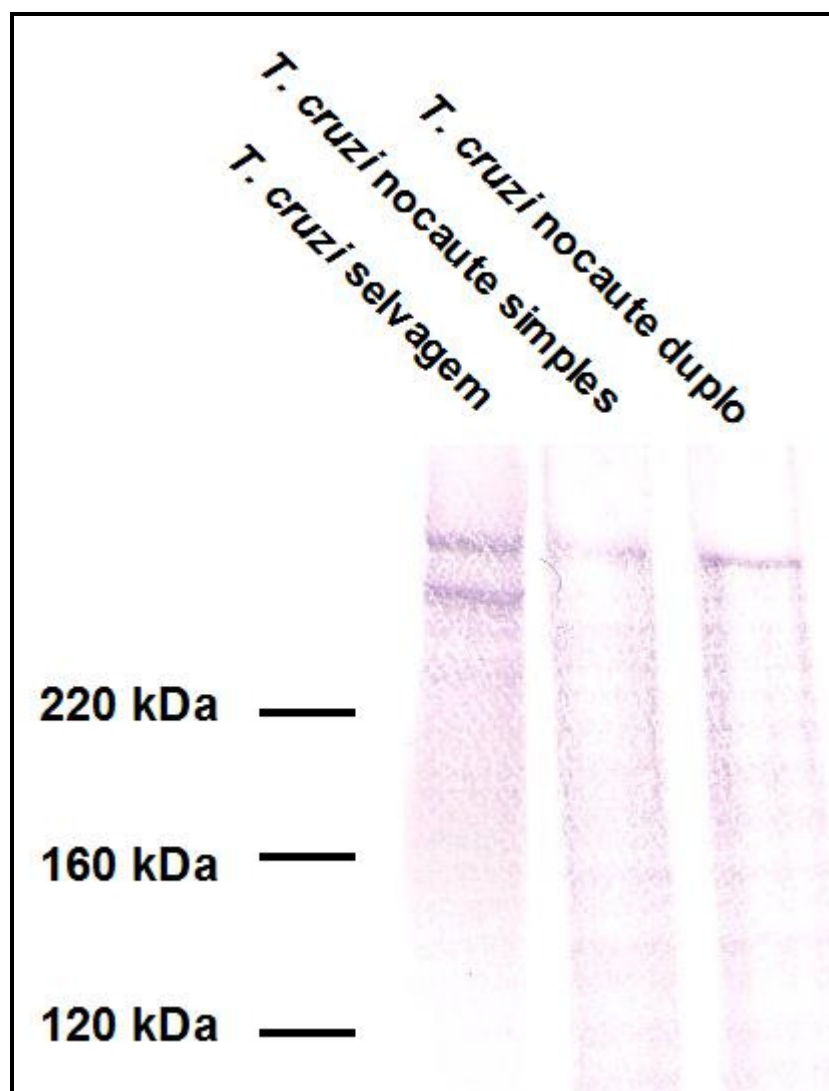


Figura 12 : Western Blot da transferência do gel SDS-PAGE 6%, contendo o extrato protéico total de *T. cruzi* tipo selvagem, *T. cruzi* nocaute simples e *T. cruzi* nocaute duplo. Anticorpo primário: anti-TcNUP-1 monoclonal, diluição 1:500. Anticorpo secundário: α -IgG de camundongos conjugado à enzima fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich), diluição 1:10.000. Marcador de peso molecular BenchMark™ Protein Ladder (Life).

Esse padrão observado gera um forte argumento em favor da caracterização do gene como sendo de cópia única com duas formas alélicas de diferentes tamanhos. Visto que ao obtermos o mutante simples nocaute foi observado a ausência de uma das bandas indicando que um dos alelos correspondente foi eliminado. Entretanto não foi possível deletar o outro alelo, o que indica que existe outra cópia do gene ou que a recombinação não ocorreu no local correto.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados alcançados foram obtidas as seguintes conclusões:

- Foi possível amplificar por PCR as regiões intergênicas do locus gênico de TcNUP-1;
- Os fragmentos gerados foram clonados com sucesso no plasmídeo pGEM T-easy®;
- O sequenciamento desses fragmentos indica que o *locus* do gene TcNUP-1, na cepa Dm28C de *T. cruzi*, contém os seguintes genes: GTPpb; TcNUP-1; PEPCK; Δ NUP e PEPCK;
- Existe um mRNA sendo transcrito, na forma epimastigota de *T. cruzi* (cepa Dm28C), para o “gene” Δ NUP, todavia são necessários estudos adicionais para caracteriza-lo;
- Ambos os cassetes foram construídos e purificados conforme o esperado;
- A transfecção dos parasitas com os cassetes foi eficiente, visto que foram selecionadas populações resistentes aos marcadores de seleção inseridos nos cassetes;
- Foi possível confirmar a deleção de um dos alelos do gene TcNUP-1 usando PCR, porém o segundo alelo não pode ser confirmado usando esse tipo de ensaio, indicando que a recombinação não ocorreu conforme o esperado;
- Não foi possível confirmar a caracterização do gene TcNUP-1, entretanto existem fortes evidências em favor da hipótese de que se trata de um gene de cópia única com duas formas alélicas.

7. PERSPECTIVAS

Como perspectivas para o nocaute, a transfecção de *T. cruzi* com o cassete para o segundo alelo deve ser repetida, até que se possa confirmar a correta inserção do mesmo e a ausência das bandas correspondentes às duas formas da proteína.

Quanto ao possível gene Δ NUP devem ser feitas construções a fim de fusionar o produto protéico do gene a um peptídeo marcador (*Flag*), para o qual existem anticorpos monoclonais específicos. Dessa forma será possível a realização de imunoenaios objetivando investigar a possível função desse “gene”.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADL, SINA M. *et al.* The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 399-451, 2005.

ARAÚJO, M. S. S.; MARTINS-FILHO, O. A.; PEREIRA, M. E. S.; & BRENER, Z. A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, n. 6, p. 819-824, 2000.

AL-HAKIM, A.; ESCRIBANO-DIAZ, C.; LANDRY, M. C.; O'DONNELL, L.; PANIER, S.; SZILARD, R. K.; DUROCHER, D. The ubiquitous role of ubiquitin in the DNA damage response. **DNA repair**, v. 9, n. 12, p. 1229-1240, 2010.

ALSFORD, S.; ECKERT, S.; BAKER, N.; GLOVER, L.; SANCHEZ-FLORES, A.; LEUNG, K. F.; HORN, D; *et al.* High-throughput decoding of antitrypanosomal drug efficacy and resistance. **Nature**, v. 482, n. 7384, p. 232-236, 2012.

ALSFORD, S; HORN, D. Trypanosomatid histones. **Molecular microbiology**, v. 53, n. 2, p. 365-372, 2004.

AYMERICH, STEPHANE; GOLDENBERG, SAMUEL. The karyotype of *Trypanosoma cruzi* Dm 28c: Comparison with other *T. cruzi* strains and trypanosomatids. **Experimental parasitology**, v. 69, n. 1, p. 107-115, 1989.

BASTOS, I. M.; MOTTA, F. N.; GRELLIER, P.; SANTANA, J. M. Parasite Prolyl Oligopeptidases and the Challenge of Designing Chemotherapeutics for Chagas disease, Leishmaniasis and African Trypanosomiasis. **Current medicinal chemistry**, 2013.

BALDAUF, S. L. The deep roots of eukaryotes. **Science**, v. 300, n. 5626, p. 1703-1706, 2003.

BALDAUF, S. L. An overview of the phylogeny and diversity of eukaryotes. **J Syst Evol**, v. 46, p. 263-273, 2008.

BEAUMIER, C. M.; GILLESPIE, P. M.; HOTEZ, P. J.; BOTTAZZI, M. E. New vaccines for neglected parasitic diseases and dengue. **Translational Research**, 2013.

BELLI, S. I. Chromatin remodelling during the life cycle of trypanosomatids. **International journal for parasitology**, v. 30, n. 6, p. 679-687, 2000.

BORST, P.; SABATINI, R. Base J: discovery, biosynthesis, and possible functions. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 62, p. 235-251, 2008.

BRANCHE, C.; KOHL, L.; TOUTIRAIS, G.; BUISSON, J.; COSSON, J.; BASTIN, P. Conserved and specific functions of axoneme components in trypanosome motility. **Journal of cell science**, v. 119, n. 16, p. 3443-3455, 2006.

CANO, M. I.; GRUBER, A.; VAZQUEZ, M.; CORTÉS, A.; LEVIN, M. J.; GONZÁLEZ, A.; SILVEIRA, J. D.; *et al.* Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* Genome Project. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 71, n. 2, p. 273-278, 1995.

CATARINO, L. M.; SERRANO, M. G.; CAVAZZANA, M.; ALMEIDA, M. L.; KANESHINA, E. K.; CAMPANER, M.; ITOW-JANKEVICIUS, S; *et al.* Classification of trypanosomatids from fruits and seeds using morphological, biochemical and molecular markers revealed several genera among fruit isolates. **FEMS microbiology letters**, v. 201, n. 1, p. 65-72, 2001.

CHAGAS, CARLOS. Nova tripanozomíase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.1, n.2, p.159-218, ago. 1909.

CHAVES, I.; ZOMERDIJK, J.; DIRKS-MULDER, A.; DIRKS, R. W.; RAAP, A. K.; BORST, P. Subnuclear localization of the active variant surface glycoprotein gene expression site in *Trypanosoma brucei*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 21, p. 12328-12333, 1998.

CLAYTON, CHRISTINE; SHAPIRA, MICHAL. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 156, n. 2, p. 93-101, 2007.

COHEN, M.; GRUENBAUM, Y.; LEE, K. K.; WILSON, K. L. Transcriptional repression, apoptosis, human disease and the functional evolution of the nuclear lamina. **Trends in biochemical sciences**, v. 26, n. 1, p. 41-47, 2001.

COURA, José Rodrigues. Chagas disease: what is known and what is needed-A background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 113-122, 2007.

COURA, JOSÉ RODRIGUES; DIAS, JOÃO CARLOS PINTO. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 31-40, 2009.

COURA, JOSÉ RODRIGUES; VIÑAS, PEDRO ALBAJAR. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, n. n7301_suppl, p. S6-S7, 2010.

DACKS, JOEL B.; WALKER, GISELLE; FIELD, MARK C. Implications of the new eukaryotic systematics for parasitologists. **Parasitology international**, v. 57, n. 2, p. 97-104, 2008.

DECHAT, T.; ADAM, S. A.; TAIMEN, P.; SHIMI, T.; GOLDMAN, R. D. Nuclear lamins. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 11, 2010.

DE SOUZA, WANDERLEY. Special organelles of some pathogenic protozoa. **Parasitology research**, v. 88, n. 12, p. 1013-1025, 2002.

DI SEGNI, GIANFRANCO; GASTALDI, SERENA; TOCCHINI-VALENTINI, GLAUCO P. Cis-and trans-splicing of mRNAs mediated by tRNA sequences in eukaryotic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 19, p. 6864-6869, 2008.

DUBOIS, K. N.; ALSFORD, S.; HOLDEN, J. M.; BUISSON, J.; SWIDERSKI, M.; BART, J. M.; FIELD, M. C.; *et al.* NUP-1 is a large coiled-coil nucleoskeletal protein in trypanosomes with lamin-like functions. **PLoS biology**, v. 10, n. 3, p. e1001287, 2012.

ELIAS, M. C. Q.; MARQUES-PORTO, R.; FREYMÜLLER, E.; SCHENKMAN, S. Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 112, n. 1, p. 79-90, 2001.

EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BARTHOLOMEU, D. C.; NILSSON, D.; AGGARWAL, G.; TRAN, A. N.; MCKENNA, A; *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 409-415, 2005.

ERSFELD, KLAUS. Nuclear architecture, genome and chromatin organisation in *Trypanosoma brucei*. **Research in microbiology**, v. 162, n. 6, p. 626-636, 2011.

ELIAS, M. C. Q.; FARIA, M.; MORTARA, R. A.; MOTTA, M. C. M.; DE SOUZA, W.; THIRY, M.; SCHENKMAN, S. Chromosome localization changes in the *Trypanosoma cruzi* nucleus. **Eukaryotic cell**, v. 1, n. 6, p. 944-953, 2002.

ELIAS, M. C. Q.; MARQUES-PORTO, R.; FREYMÜLLER, E.; SCHENKMAN, S. Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 112, n. 1, p. 79-90, 2001.

FAWCETT, DON WAYNE. **Atlas of fine structure**. 1966.

FERREIRA, Alda Maria Teixeira. **Interação de TcNUP-1 com cromatina de Trypanosoma Cruzi**. 113 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba 2011.

FIGUEIREDO, LUISA M.; CROSS, GEORGE AM; JANZEN, CHRISTIAN J. Epigenetic regulation in African trypanosomes: a new kid on the block. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 7, p. 504-513, 2009.

GINDULLIS, F.; ROSE, A.; PATEL, S.; MEIER, I. Four signature motifs define the first class of structurally related large coiled-coil proteins in plants. **BMC genomics**, v. 3, n. 1, p. 9, 2002.

GRUENBAUM, Y.; WILSON, K. L.; HAREL, A.; GOLDBERG, M.; COHEN, M. Review: nuclear lamins—structural proteins with fundamental functions. **Journal of structural biology**, v. 129, n. 2, p. 313-323, 2000.

GÜNZL, ARTHUR. The pre-mRNA splicing machinery of trypanosomes: complex or simplified?. **Eukaryotic cell**, v. 9, n. 8, p. 1159-1170, 2010.

HECKER, H.; GANDER, E. S. The compaction pattern of the chromatin of trypanosomes. **Biology of the Cell**, v. 53, n. 3, p. 199-208, 1985.

HENRIKSSON, JAN; ÅSLUND, L.; PETTERSSON, ULF. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Today**, v. 12, n. 3, p. 108-114, 1996.

HUTCHISON, Christopher J. Lamins: building blocks or regulators of gene expression?. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 11, p. 848-858, 2002.

ISKEN, OLAF; MAQUAT, LYNNE E. Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. **Genes & development**, v. 21, n. 15, p. 1833-3856, 2007.

KARLINSEY, JOYCE; STAMATOYANNOPOULOS, GEORGE; ENVER, TARIQ. Simultaneous purification of DNA and RNA from small numbers of eukaryotic cells. **Analytical biochemistry**, v. 180, n. 2, p. 303-306, 1989.

KATZ, N. CARLOS CHAGAS NÃO RECEBEU O PRÊMIO NOBEL. Academia Mineira de Medicina; Instituto Mineiro de História da Medicina; **Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ**, Belo Horizonte/MG, Brasil. 2009

LEWIS, JOE D.; IZAURFLDE, ELISA. The role of the cap structure in RNA processing and nuclear export. **European Journal of Biochemistry**, v. 247, n. 2, p. 461-469, 1997.

LIANG, X. H.; HARITAN, A.; ULIEL, S.; MICHAELI, S. Trans and cis splicing in trypanosomatids: Mechanism, factors, and regulation. **Eukaryotic cell**, v. 2, n. 5, p. 830-840, 2003.

LLOYD-SMITH, J. O.; GEORGE, D.; PEPIN, K. M.; PITZER, V. E.; PULLIAM, J. R.; DOBSON, A. P.; GRENFELL, B. T.; *et al.* Epidemic dynamics at the human-animal interface. **Science**, v. 326, n. 5958, p. 1362-1367, 2009.

MACHADO, C. R.; AUGUSTO-PINTO, L.; MCCULLOCH, R.; TEIXEIRA, S. M. DNA metabolism and genetic diversity in Trypanosomes. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 612, n. 1, p. 40-57, 2006.

MANS, B.; ANANTHARAMAN, V.; ARAVIND, L.; KOONIN, E. V. Comparative genomics, evolution and origins of the nuclear envelope and nuclear pore complex. **Cell cycle**, v. 3, n. 12, p. 1625-1650, 2004.

MASSANA, R.; TERRADO, R.; FORN, I.; LOVEJOY, C.; PEDRÓS-ALIÓ, C. Distribution and abundance of uncultured heterotrophic flagellates in the world oceans. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 1515-1522, 2006.

MARALDI, Nadir M.; LATTANZI, Giovanna. Linkage of lamins to fidelity of gene transcription. **Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression**, v. 15, n. 4, 2005.

MARTÍNEZ-CALVILLO, S.; VIZUET-DE-RUEDA, J. C.; FLORENCIO-MARTÍNEZ, L. E.; MANNING-CELA, R. G.; FIGUEROA-ANGULO, E. E. Gene expression in trypanosomatid parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010.

MEDINA-ACOSTA, ENRIQUE; CROSS, GEORGE AM. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 59, n. 2, p. 327-329, 1993.

MEKHAIL, KARIM; MOAZED, DANESH. The nuclear envelope in genome organization, expression and stability. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 5, p. 317-328, 2010.

NAVARRO, MIGUEL; GULL, KEITH. A pol I transcriptional body associated with VSG mono-allelic expression in *Trypanosoma brucei*. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 759-763, 2001.

OGBADOYI, E.; ERSFELD, K.; ROBINSON, D.; SHERWIN, T.; GULL, K. Architecture of the *Trypanosoma brucei* nucleus during interphase and mitosis. **Chromosoma**, v. 108, n. 8, p. 501-513, 2000.

PALENCHAR, J. B.; BELLOFATTO, V. Gene transcription in trypanosomes. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 146, n. 2, p. 135-141, 2006.

PÉREZ-MORGA, D. A. V. I. D.; AMIGUET-VERCHER, A. M. E. L. I. A.; VERMIJLEN, D.; PAYS, E. Organization of telomeres during the cell and life cycles of *Trypanosoma brucei*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 221-226, 2001.

PICCHI, G. F.; FERREIRA, A. M.; SOUZA, F. S.; LOURENÇO, É. E.; ARAUCO, P. R.; LORUSSO, A.; FRAGOSO, S. P; *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Identification of DNA targets of the nuclear periphery coiled-coil protein TcNUP-1. **Experimental parasitology**, v. 127, n. 1, p. 147-152, 2011.

PORCILE, P. E.; SANTOS, M. R.; SOUZA, R. T.; VERBISCK, N. V.; BRANDÃO, A.; URMENYI, T.; FRANCO DA SILVEIRA, J.; *et al.* A refined molecular karyotype for the reference strain of the *Trypanosoma cruzi* genome project (clone CL Brener) by assignment of chromosome markers. **Gene**, v. 308, p. 53-65, 2003.

ROUT, MICHAEL P.; FIELD, MARK C. Isolation and characterization of subnuclear compartments from *Trypanosoma brucei* Identification of a major repetitive nuclear lamina component. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 41, p. 38261-38271, 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold spring harbor laboratory press, 1989.

SCHENKMAN, S. Nuclear Structure of *Trypanosoma cruzi*. In: WEISS, Louis M.; TANOWITZ, Herbert B.; KIRCHHOFF, Louis V. (Ed.). **Chagas Disease**. Academic Press, 2011.

SCHMUNIS, G. A.; DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. Tripanossomíase americana: seu impacto nas Américas e perspectivas de eliminação. **Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas. Um Manual Prático para o Clínico Geral**, p. 11-24, 1997.

SOLARI, ALBERTO J. Mitosis and genome partition in trypanosomes. **Biocell**, v. 19, n. 2, p. 65-84, 1995.

SIMPSON, ALASTAIR GB; INAGAKI, YUJI; ROGER, ANDREW J. Comprehensive multigene phylogenies of excavate protists reveal the evolutionary positions of "primitive" eukaryotes. **Molecular biology and evolution**, v. 23, n. 3, p. 615-625, 2006.

SPADILIERO, B.; NICOLINI, C.; MASCETTI, G.; HENRÍQUEZ, D.; VERGANI, L. Chromatin of *Trypanosoma cruzi*: In situ analysis revealed its unusual structure and nuclear organization. **Journal of cellular biochemistry**, v. 85, n. 4, p. 798-808, 2002.

STURM, N. R.; DOLLET, M.; LUKEŠ, J.; CAMPBELL, D. A; *et al.* Rational subdivision of plant trypanosomes (*Phytomonas spp.*) based on minicircle conserved region analysis. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 7, n. 5, p. 570-576, 2007.

TOWBIN, HARRY; STAEBELIN, THEOPHIL; GORDON, JULIAN. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International journal for parasitology**, v. 31, n. 5, p. 472-481, 2001.

VAN STEENSEL, B. Chromatin: constructing the big picture. **The EMBO journal**, v. 30, n. 10, p. 1885-1895, 2011.

VARGAS, NANCY; PEDROSO, AURÉLIO; ZINGALES, BIANCA. Chromosomal polymorphism, gene synteny and genome size in *T. cruzi* I and *T. cruzi* II groups. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 138, n. 1, p. 131-141, 2004.

VICKERMAN, K.; PRESTON, T. M. Spindle microtubules in the dividing nuclei of trypanosomes. **Journal of cell science**, v. 6, n. 2, p. 365-383, 1970.

WATSON, MICHAEL L. The nuclear envelope: Its structure and relation to cytoplasmic membranes. **The Journal of biophysical and biochemical cytology**, v. 1, n. 3, p. 257, 1955.

WORMAN, HOWARD J.; COURVALIN, JEAN-CLAUDE. Nuclear envelope, nuclear lamina, and inherited disease. **International review of cytology**, v. 246, p. 231-279, 2005.

WHO – World Health Organization. Control of Chagas Disease – Second Report of the WHO Expert Committee. **Who Technical Report Series**. n. 905. Geneva, 2002. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_905.pdf>. Acesso em: 23/11/2013.

WHO - World Health Organization. Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. **Who Technical Report Series**. n. 975. 2012. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77472/1/WHO_TRS_975_eng.pdf>. Acesso em: 12/11/2013.