

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Pós graduação em Biologia Celular e Molecular

LUCIANA FURLANETO

Transformação genética de *Trypanosoma cruzi*
mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Tese apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Biologia Celular e Molecular
da Universidade Federal do Paraná
para obtenção do grau de Doutor.

Curitiba

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Pós graduação em Biologia Celular e Molecular

LUCIANA FURLANETO

Transformação genética de *Trypanosoma cruzi*
mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Tese apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Biologia Celular e Molecular
da Universidade Federal do Paraná para
obtenção do grau de Doutor, sob orientação
do prof. Dr Marco Aurélio Krieger.

AGRADECIMENTOS

“O mestre que caminha à sombra do templo entre os discípulos, não reparte apenas sua sabedoria.....” (Ao Dr Marco Aurélio Krieger, meu muito obrigada)

“...e todo o trabalho é vazio menos onde há amor...” (Á grande pesquisadora e minha referência Dr^a Márcia Cristina Furlaneto)

“...porque no orvalho das pequenas coisas o coração encontra a sua manhã e a sua frescura...”(Ao querido irmão de “estrada” prof. Otavio Góes de Andrade)

“...pois o trabalho é o vosso campo, semeado com amor e ceifado com reconhecimento...” (Dr Stênio Perdigão Fragoso e Dr Samuel Goldenberg)

“...e se não puderdes trabalhar com amor, mais vale abandonares o trabalho...” (Aos coordenadores da Universidade Norte do Paraná)

“...trabalhar com amor é tecer o pano com fios tirados do vosso coração...” (Aos Doutores componentes da banca examinadora e aos pesquisadores do Instituto de Biologia Molecular do Paraná)

“...o vosso amigo..... é a resposta às vossas necessidades...” (Aos professores do Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, em particular á Dr^a Sueli Fumei Yamada Ogatta)

“...e na doçura da vossa amizade haja também riso e os prazeres partilhados...” (Ao amigo Fernando César Bizerra)

“... pois um barco sem leme pode navegar sem rumo entre perigosos recifes sem, contudo ir a pique...” (Aos Dr Celso Vataru Nakamura, Dr Phileno Pinge, amigos e alunos do Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas-UEL)

“...porque na amizade, todos os pensamentos, desejos, e expectativas, nascem sem palavras e partilham-se numa alegria calada...” (Ás secretárias Marlene – UFPR e Nalva UEL)

“... e o vento não fala mais docemente ao carvalho gigante do que à humilde folhinha de erva...” (Aos professores do programa de pós graduação em Biologia Celular e Molecular – UFPR), e

“...quando vos separardes do vosso amigo não vos aflijais, porque aquilo que mais nele amais pode ficar claro na sua ausência”.

“O Profeta” de Khalil Gibran

Aos meus queridos pais **Rosa e Olintho**

E ao meu grande amor **Dimas**

Quero agradecê-los, e o faço elevando uma prece enternecida, pois vocês revigoraram minha fé, reacenderam minha esperança e me fez vencer todos os obstáculos, mantendo-me inquebrantável a energia e renovada a coragem, nos momentos de desalento e cansaço que me banharam durante a realização deste trabalho. Desculpe-me pelas ausências, mas esta obra é nossa.

INDICE

LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> e aspectos gerais da doença de Chagas.....	11
2.2 Características fenotípicas e genotípicas de <i>T. cruzi</i>	14
2.2.1 – DNA mitocondrial.....	19
2.2.2 – Metaciclogênese.....	20
2.3 Técnicas de transformação genética em tripanosomatídeos.....	21
2.4 Transformação genética mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (ATMT)	23
2.4.2 Expressão e função dos genes <i>vir</i>	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 Células e manutenção celular	34
4.1.1 Linhagens de <i>Escherichia coli</i>	34
4.1.2 Linhagem AGL-1 de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	34
4.1.3 <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa CL.....	34
4.2 Teste de sensibilidade de <i>T. cruzi</i> a neomicina	35
4.3 Eletroforese de DNA em gel de agarose	35
4.4 Construção do vetor para transformação de <i>T. cruzi</i>	36
4.4.1 Vetor Binário	36
4.4.2 Construção do plasmídeo pPk2gfpTetrep.....	37
4.5. Transformação de <i>E. coli</i> TOP 10F'	39
4.5.1. Preparo de células competentes.....	39
4.5.2 Transformação	39
4.6 Seleção dos clones recombinantes de <i>E. coli</i>	40
4.7 Extração de DNA plasmidial recombinante.....	40
4.8 Transformação de <i>A. tumefaciens</i> AGL-1 com o vetor pPK2gfpTetrep	41
4.9 Co-cultivo de <i>T. cruzi</i> e <i>A. tumefaciens</i> recombinante	42
4.10 Extração de DNA total de <i>T. cruzi</i>	43
4.11 Análises de <i>T. cruzi</i> transformantes.....	43
4.11.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	43
4.11.2 Análises do tipo “Dot-blot”	44
4.11.3 Análises do tipo “Northern blot”	44
4.12 Ensaio de hibridação	45
4.12.1 Marcação da sonda.....	45
4.12.2 Pré-hibridação e hibridação	45
4.13. Expressão e purificação de proteínas recombinantes em sistema bacteriano.....	46
4.13.1 Clonagem do gene <i>gfp</i> no vetor de expressão pQE 30	46
4.13.2 Indução da proteína recombinante	46
4.13.3 Purificação da proteína recombinante	47
4.14 Produção de anticorpos policlonais contra a proteína recombinante	48
4.15 - Análise da expressão da proteína GFP em <i>T. cruzi</i> transformado, por ensaios do tipo “Western blot”	49
4.15.1 - Preparo do gel SDS-PAGE e eletrotransferência.....	49
4.15.2 – Detecção de proteína em “Western blot” usando o sistema de revelação por fosfatase alcalina.....	49
4.14 Microscopia eletrônica	50

4.14.1 Microscopia eletrônica de transmissão.....	50
4.14.2 Microscopia eletrônica de varredura	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 Construção do vetor binário	54
5.2. Determinação da concentração inibitória de neomicina.....	57
5.3 Análise do co-cultivo <i>T. cruzi</i> - <i>A. tumefaciens</i>	58
5.4 Análise dos transformantes de <i>T. cruzi</i>	64
5.5 Expressão de GFP em <i>T. cruzi</i>	67
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ciclo evolutivo do <i>T. cruzi</i> no inseto vetor e no hospedeiro vertebrado.....	12
Figura 2 -	Entidades morfológicas estáveis de <i>T. cruzi</i>	15
Figura 3 -	Processamento do RNAm de tripanosomatídeos.....	18
Figura 4 -	Seqüências gênicas das bordas direita (RB) e esquerda (LB) flanqueadoras do T-DNA	26
Figura 5 -	Representação esquemática do sistema de transferência do T-DNA de <i>Agrobacterium</i> para a célula hospedeira.	27
Figura 6 -	Representação esquemática do plasmídeo pPK2.....	36
Figura 7 -	Representação esquemática do plasmídeo pTetrep.....	38
Figura 8 -	Representação esquemática do vetor binário pPK2gfpTetrep.	54
Figura 9 -	Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR utilizando células de <i>A. tumefaciens</i> transformada	57
Figura 10 -	Atividade do antibiótico neomicina sobre o crescimento de <i>T. cruzi</i>	58
Figura 11 -	Microscopia eletrônica de varredura	61
Figura 12 -	Microscopia eletrônica de transmissão	61
Figura 13 -	Eletroforese em gel de agarose dos clones recombinantes de <i>T. cruzi</i>	65
Figura 14 -	Autoradiograma da análise do DNA genômico de <i>T. cruzi</i> por “Dot blot”.	66
Figura 15 -	Análise tipo “Northern blot” dos RNAs totais isolados de <i>T. cruzi</i> ...	66

Figura 16 - Expressão da proteína verde fluorescente (GFP) em *T. cruzi* 68

Figura 17 - Análise tipo “Western blot” do extrato protéico total de células de *T. cruzi*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resumo dos processos celulares e proteínas envolvidas na interação entre as células de <i>Agrobacterium</i> -planta.....	32
Tabela 2 -	Composição dos tampões empregados para purificação da proteína recombinante.....	48

1. INTRODUÇÃO

Trypanosoma cruzi é o agente etiológico da doença de Chagas, e constitui alvo de inúmeros estudos que visam desde a elucidação dos mecanismos biológicos, apresentados por este parasita, até o desenvolvimento de quimioterápicos e vacinas. Este protozoário apresenta um ciclo heteroxênico, caracterizado pela expressão diferencial de genes, sendo que alguns deles já foram clonados e estudados. Contudo o sistema de transferência gênica em *T. cruzi* tem sido um obstáculo, pois envolvem a introdução de plasmídeos pela técnica de eletroporação, e o emprego desta metodologia leva a uma perda celular significativa devido as elevadas voltagens aplicadas. A transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT), uma bactéria Gram-negativa, representa um método de mutagênese insercional, uma vez que ocorre a transferência e integração, no cromossomo da célula hospedeira, de uma região denominada de T-DNA presente no plasmídeo bacteriano. Portanto, este trabalho visou o desenvolvimento de uma metodologia de transformação de células de *T. cruzi* mediado por *Agrobacterium*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Trypanosoma cruzi* e aspectos gerais da doença de Chagas

Trypanosoma cruzi, agente etiológico da doença de Chagas (CHAGAS, 1909), é um protozoário flagelado heteroxênico eucarionte, pertencente à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae. As características desta ordem incluem a presença de flagelo e cinetoplasto, organela autoreplicável que contém o DNA extranuclear. *T. cruzi* é transmitido por insetos triatomíneos hematófagos infectados pertencentes à família Reduviidae, sendo que as principais espécies transmissoras são *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus*. Os hospedeiros vertebrados somam uma grande variedade de espécies, incluindo o homem.

O ciclo biológico do parasita se inicia quando os triatomíneos se contaminam durante a ingestão de sangue de mamíferos infectados. Os parasitas ingeridos se multiplicam na luz intestinal do inseto como formas flageladas epimastigotas, e quando se encontram no intestino posterior, diferenciam-se em formas tripomastigotas metacíclicas, infectivas, que são eliminadas nas fezes e urina (Figura 1). A infecção do hospedeiro vertebrado pelo *T. cruzi* tem início quando os parasitas eliminados pelo inseto encontram uma descontinuidade na pele ou mucosa (BRENER, 1992). Ao penetrar no hospedeiro, o parasita tem a capacidade de atingir os tecidos subcutâneos podendo invadir diferentes tipos celulares principalmente macrófagos. As formas tripomastigotas que invadem as células interagem com moléculas da membrana modificando o trânsito de lisossomas dependentes de microtúbulos. Isso contribui para a formação de membranas de vacúolos parasitóforos, de onde conseguem escapar, atingem o citoplasma e multiplicam-se, por divisão binária, como formas amastigotas. Posteriormente, ocorre uma nova diferenciação para a forma tripomastigota (sangüíneo) que é liberada para a circulação pela ruptura da membrana plasmática. Estes tripomastigotas podem invadir então novas células ou atingir órgãos distantes (BRENER, 1992).

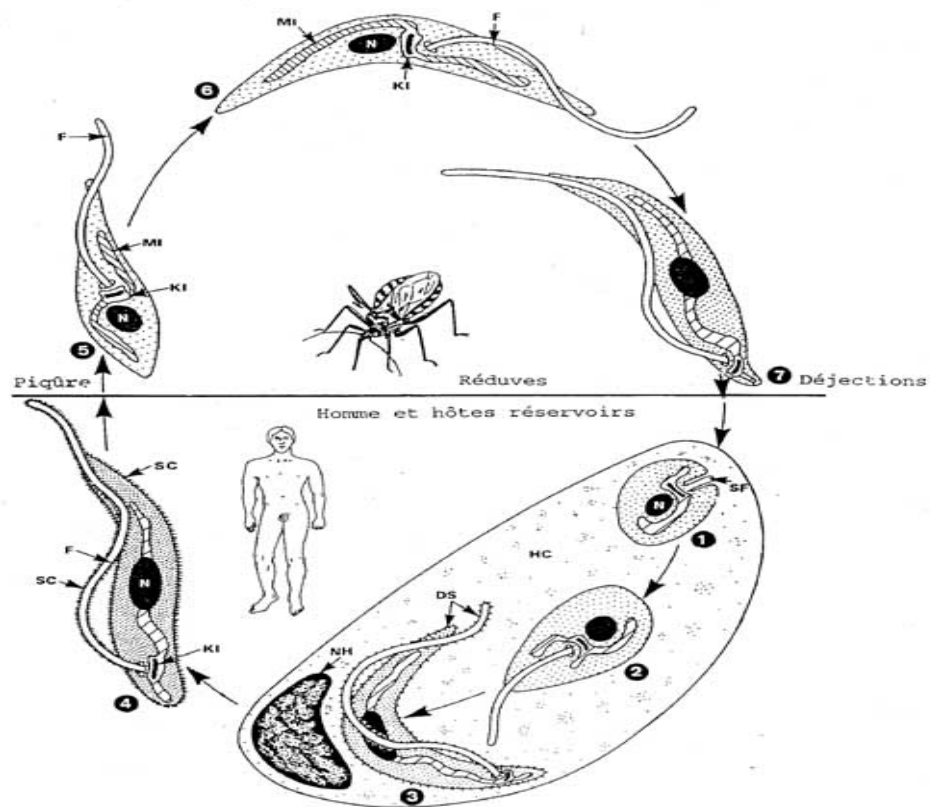


Figura 1. Ciclo evolutivo do *T. cruzi* no inseto vetor e no hospedeiro vertebrado. Tripomastigotas presentes no sangue do hospedeiro são ingeridos pelo inseto e diferenciam-se em formas epimastigotas (passos 5 e 6). Estas formas proliferam-se por divisão binária no intestino médio do triatomíneo. Posteriormente, os epimastigotas migram em direção à porção terminal do intestino e diferenciam-se em formas tripomastigotas metacíclicas (7). Esta forma infectante é liberada nas fezes, durante e logo após a alimentação do inseto, e entram na corrente sanguínea do hospedeiro. Os tripomastigotas metacíclicos invadem a célula hospedeira e diferenciam-se em formas amastigotas (passos 1 a 3), que proliferam e se transformam em tripomastigotas (4), concluindo o ciclo. Fonte: <http://www.mnhn.fr/mnhn/bpph>

Aproximadamente 18 milhões de pessoas, principalmente nas Américas do Sul e Central, estão infectadas pelo *T. cruzi*. Além disso, cerca de 25% dessa população encontra-se em risco de contrair a doença (GURLER *et al.*, 2003), constituindo um sério risco de saúde pública.

Como já mencionado, a transmissão do parasita ocorre naturalmente através de insetos vetores, que podem ser encontrados em toda a América, desde o sul dos EUA até o

sudoeste da Argentina. Contudo a incidência da doença de Chagas transmitida por essa via em muitas áreas endêmicas tem diminuído consideravelmente nas últimas décadas. Isso é resultado de um trabalho governamental sistemático de alguns países interessados em eliminar essa doença através da erradicação dos vetores das áreas domésticas, principalmente *T. infestans* e *R. prolixus*, bem como redução no número de outras espécies (MONCAYO, 2003). Dessa forma, a transmissão da doença pelo invertebrado estaria controlada em países como Argentina, Brasil, Chile e Uruguai, ainda que surtos possam ocorrer esporadicamente e isoladamente (SCHMUNIS *et al.*, 1996).

A doença de Chagas apresenta sintomatologia variável, dependendo da cepa do patógeno e da fase em que se encontra a doença. Isso está relacionado com o fato do *T. cruzi* ser heterogêneo em nível de composição antigênica e conteúdo de DNA (ZINGALES *et al.*, 1984; WAGNER & SO, 1990).

A fase aguda da doença de Chagas é caracterizada por um conjunto de sinais/sintomas com intensidade variável, após um período de incubação mínimo de 4 dias. Um dos primeiros sinais clínicos que surge é um processo inflamatório inespecífico no local do sítio de entrada do parasita, que pode ser o sinal de Romanã (no olho) ou o chagoma (na pele). A análise histológica revela um parasitismo disseminado entre vários tipos celulares e edema intersticial com hiperplasia dos gânglios satélites, principalmente pré-auriculares (BRENER, 1992). Outros sintomas da fase aguda são febre, mal-estar, astenia, cefaléia e hipóxia. Com o passar do tempo, alterações como hepatomegalia, esplenomegalia e miocardite aguda podem ocorrer. A parasitemia elevada observada na fase aguda tende a decrescer como resultado da resposta imune do hospedeiro, tornando-se baixa na fase crônica da infecção (BARRET *et al.*, 2003).

T. cruzi invade uma grande variedade de células em vertebrados. A invasão ocorre por recrutamento de lisossomos das células hospedeiras, onde os parasitas estão aderidos, com posterior fusão. A fusão dos lisossomos é um requisito para a entrada do parasita, sugerindo que estes possam servir como fonte de membrana para a formação do

vacúolo intracelular. A entrada dos tripanosomas é significativamente aumentada por uma rápida exposição das células hospedeiras a citocalasina D, que remove a barreira cortical do citoesqueleto, facilitando o acesso e fusão dos lisossomos à membrana plasmática (HALL *et al.*, 1992; SCHENKMAN *et al.*, 1993). O papel do cálcio no processo de invasão celular tem sido de importância fundamental, uma vez que ocorre o aumento da concentração citosólica deste mineral nas células hospedeiras concomitantemente a entrada dos parasitas (TARDIEUX *et al.*, 1994).

2.2 Características fenotípicas e genotípicas de *T. cruzi*

Como já mencionado, *T. cruzi* apresenta as formas epimastigota, tripomastigota e amastigota (Figura 2). A forma epimastigota caracteriza-se por ser alongada, com cinetoplasto justanuclear e anterior ao núcleo e flagelo livre na porção anterior; essa é a forma de replicação no hospedeiro invertebrado.

A forma tripomastigota é alongada, com cinetoplasto posterior ao núcleo, flagelo que se estende por toda célula e torna-se livre na porção anterior. Nessa forma, observa-se um nítido polimorfismo, podendo ser descritos dois tipos morfológicos polares, formas finas e formas largas, que resultam em diferença na evolução parasitológica, na patologia e na resposta do parasitismo a diferentes substâncias. A forma tripomastigota é encontrada na circulação sangüínea do hospedeiro vertebrado, podendo estar presente também nos espaços intersticiais, líquido cefaloraquidiano, leite e esperma.

A forma amastigota é arredondada ou ovalada, com um flagelo curto que não se exterioriza. Esta é a forma replicativa no hospedeiro vertebrado, e está presente no interior de vários tipos celulares, mas predominantemente nas fibras musculares estriadas e lisas, no sistema fagocítico mononuclear (LANA & TAFURI 2000; REY, 2001).

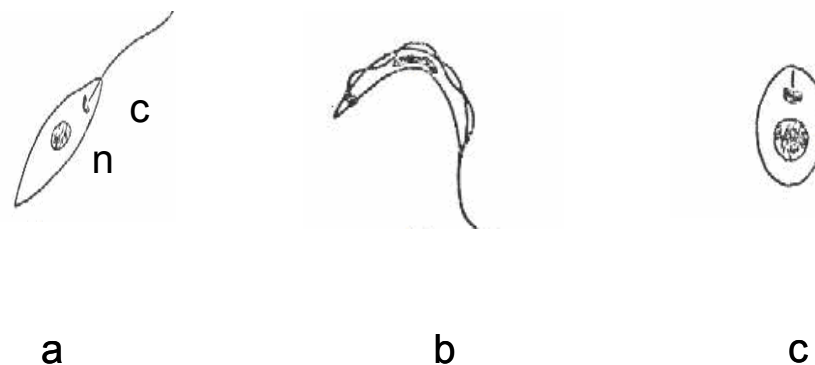


Figura 2. Representação esquemática de algumas entidades morfológicas estáveis de *T. cruzi*. **a:** epimastigota, **b:** tripomastigota, **c:** amastigota. **n:** núcleo, **c:** cinetoplasto, **f:** flagelo. Fonte: adaptado de Kaneshima (1995).

T. cruzi apresenta características típicas das células eucarióticas, apresentando membrana nuclear, membrana citoplasmática, aparato de Golgi e retículo endoplasmático. E ainda apresentam vesículas compartimentalizadas denominadas glicossomos relacionada com o processo de glicólise celular. Entretanto, apresenta uma única mitocôndria cujo DNA (kDNA) está contido em uma organela denominada cinetoplasto. Este é composto por centenas de moléculas de DNA circulares, denominadas maxi e mini círculos (SILVEIRA, 2000).

O tamanho do genoma de *T. cruzi* ($100\text{-}200 \times 10^6$ pb) é relativamente superior ao tamanho dos genomas de outros protozoários parasitas, como por exemplo, *Leishmania* ($33,6 \times 10^6$ pb) ou *Trypanosoma brucei* (35×10^6 pb) (EL-SAYED *et al.*, 2005 , IVENS *et al.*, 2005).

A organização da cromatina dos tripanosomas difere em vários aspectos daquela encontrada nos eucariotos complexos e mesmo em outros protistas. Os cromossomos dos tripanosomas não se condensam durante a divisão celular e a segregação dos mesmos para as células-filhas, durante a divisão celular, ocorre intranuclearmente, sem a dissolução

da carioteca ou membrana nuclear (endomitose). A divisão celular nos tripanosomas ocorre através do mecanismo mitótico (SOLARI, 1995).

O cariótipo de *T. cruzi* parece ser estável nas diferentes formas evolutivas do parasita. Há o consenso de que o cariótipo das formas epimastigotas seja representativo das demais formas evolutivas do parasita. Contudo, existem relatos de alterações na localização dos genes que codificam o RNA da seqüência líder durante o cultivo prolongado do parasita (WAGNER & SO, 1990). Além disso, tem sido relatada a existência de intenso polimorfismo cromossômico entre cepas e clones de *T. cruzi* (HENRIKSSON *et al.*, 1996).

O genoma nuclear de *T. cruzi*, tal como ocorre em outros eucariotos, é composto por seqüências de DNA que podem ser agrupadas em 3 classes majoritárias: a) seqüências que codificam proteínas, b) seqüências que codificam RNAs e c) seqüências repetitivas (DNA repetitivo), as quais, de maneira geral, não são transcritas. Existem também seqüências espaçadoras entre genes codificadores de proteínas e RNA que podem conter elementos reguladores da transcrição (regiões promotoras, ativadoras, etc) (SILVEIRA, 2000).

As seqüências repetitivas representam cerca de 44% do genoma nuclear e podem aparecer agrupadas ou dispersas no genoma. Embora a maioria das seqüências repetitivas não sejam codificadoras, alguns genes que codificam proteínas ou RNAs contribuem para a formação da fração repetitiva do genoma como, por exemplo, o RNA da seqüência líder que possui mais de 200 cópias dispersas no genoma (SILVEIRA, 2000).

Muitas seqüências repetitivas estão organizadas em tandem (micro e mini-satélites, genes que codificam rRNAs, RNA da seqüência líder, tubulina, etc). Esses agrupamentos podem estar distribuídos em diferentes cromossomos, e o número de cópias da repetição pode variar de um agrupamento para outro. Os microssatélites são seqüências pequenas de DNA (aproximadamente 6 nt), e apresentam elevado grau de polimorfismo, principalmente no que diz respeito ao número de repetições em um dado *locus*. Por esse

motivo, os microssatélites são extremamente úteis em estudos filogenéticos, taxonômicos e genéticos (REQUENA, 1996).

Em tripanosomatídeos, os genes codificadores de proteína podem ser encontrados como cópia única ou duplicados, contudo, a maioria está presente como duas ou mais cópias, as quais podem estar localizadas em uma única região do cromossoma ou em diferentes cromossomas. É importante notar que as cópias duplicadas de um determinado gene podem apresentar diversidades entre si, consequência do processo evolutivo (SILVEIRA, 2000).

A maioria dos genes que codificam para proteínas não contém íntron e são freqüentemente transcritos como RNA policistrônicos – pré-mRNA - (JOHNSON *et al.*, 1987) que, após processamento, originam RNAm maduros monocistrônicos. Essas unidades transcricionais podem conter várias cópias em tandem do mesmo gene, ou genes cujas funções são relacionadas ou não, e separados por regiões intergênicas. Além disso, diferenças no padrão de expressão desses genes também podem ser detectadas (CULLY *et al.*, 1985; PAYS & NOLAN, 1998).

O processamento dos pré-mRNAs nucleares ocorre por um mecanismo não usual denominado *trans-splicing*. Nesse processo, as regiões de dois transcritos são unidas de forma que todo RNA mensageiro maduro apresenta a mesma seqüência líder (*spliced leader* ou mini-exon –ME) na extremidade 5' (STURM & CAMPBELL, 1999; STURM & YU, 1999; LIANG *et al.*, 2003). Dessa forma, o RNA da SL é clivado e a porção 5' resultante de 39 nt é transferida para a região 5' do mRNA nascente. A região 5' do pré-mRNA também é clivada em um sítio específico e substituída pela SL. A reação de *trans-splicing* é catalisada por um complexo multienzimático constituído por enzimas específicas (endonucleases, ligases, etc) e ribonucleoproteínas (U2, U4, U5 e U6 snRNP) (LIANG *et al.*, 2003) (Figura 3).

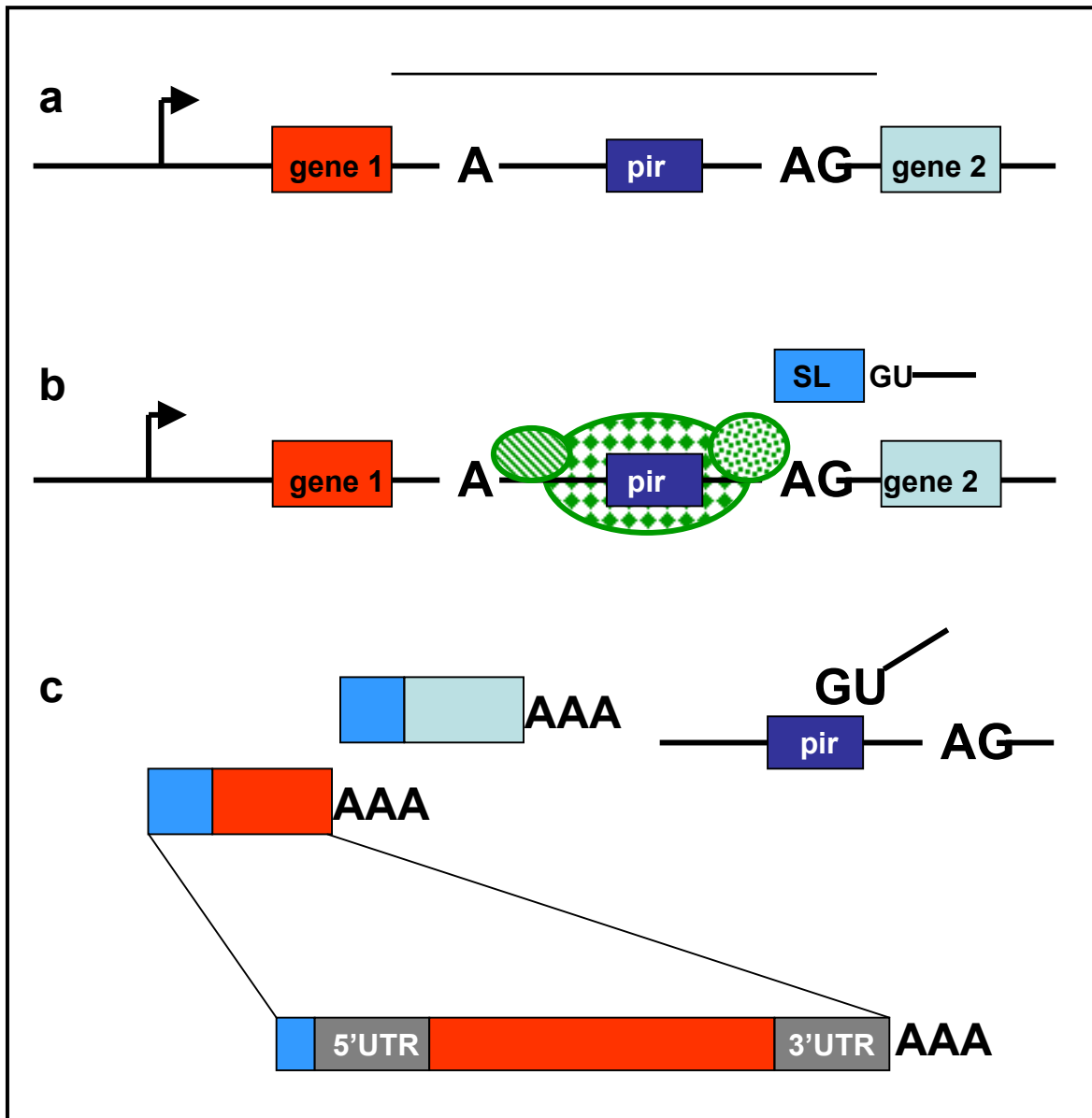


Figura 3: Processamento do RNAm de tripanosomatídeos. (a) Representação esquemática de um transcrito policistrônico contendo os sítios de reconhecimento para *trans-splicing* (AG), poliadenilação (A) e o trato de polipirimidina (pir). (b) Reação de *trans-splicing* e poliadenilação. A seqüência do *spliced leader* (SL) está presente no transcrito SL-RNA (em azul) O diagrama em verde representa a maquinaria envolvida nos processos. (c) Produtos da reação de processamento. O SL e a cauda poli-A (A-A-A) estão representados nas extremidades 5' e 3' do RNAm, respectivamente. A região em vermelho representa a seqüência codificante do RNAm e está flanqueada por seqüências não traduzidas (5' UTR e 3' UTR).

Tal como ocorre nos eucariotos, os mRNAs dos tripanosomas apresentam na sua extremidade 3' uma cauda composta por cerca de 30 resíduos de adenina (cauda poli-A).

Porém, ao contrário dos eucariotos superiores, os mRNAs dos tripanosomatídeos não apresentam uma seqüência consenso para adição de resíduos de adenina. Os genes em tandem estão separados por regiões intergênicas espaçadoras, relativamente curtas (100-300 pb), que contêm regiões ricas em resíduos de pirimidina (citosina e timina) envolvidos no controle da transcrição. A distância entre a região rica em pirimidinas e o sítio consenso (AG) para *trans-splicing* tem influência sobre a adição da cauda poli-A (SILVEIRA, 2000).

2.2.1 – DNA mitocondrial

Nos tripanosomas, o kDNA corresponde de 10 a 30% do conteúdo total do DNA celular. A estrutura do cinetoplasto representa um bom alvo para ação de drogas. O processo de replicação do cinetoplasto depende de uma enzima topoisomerase, e inibidores desta, tem atividade tripanocida (BARRET *et al.*, 2003).

Os minicírculos possuem cerca de 1.400 pb e estão presentes em 10.000 a 20.000 cópias por célula. O número e tipos de classes de minicírculos podem variar entre as diferentes cepas ou isolados do parasita. As seqüências presentes no minicírculo não são traduzidas em peptídeos, mas são transcritas gerando pequenos RNAs denominados gRNAs (RNA guia), que estão envolvidos no processo de edição dos mRNAs mitocondriais (MACINA *et al.*, 1985; JUNQUEIRA *et al.*, 2005).

Os maxicírculos possuem cerca de 40.000 pb de tamanho e o número de cópias por célula varia de 20 a 50, contendo os genes que codificam proteínas e rRNAs mitocondriais (SILVEIRA, 2000; JUNQUEIRA *et al.*, 2005).

A edição do RNA é um mecanismo de processamento pós-transcricional dos pré-mRNA originados a partir dos maxicírculos (BENNE *et al.*, 1986). Em tripanosomatídeos esse mecanismo envolve a inserção e, com menor freqüência, a deleção de uridinas em uma determinada posição nos transcritos primários (STUART *et al.*, 1997). A edição do

RNA promove a formação de códons de iniciação e terminação da tradução, a correção da fase de leitura, ou mesmo a criação de uma fase de leitura completa, garantindo a produção de uma proteína funcional (SHAW *et al.*, 1988).

2.2.2 – Metaciclógênese

Durante a metaciclógênese, processo de diferenciação das formas epimastigotas para tripomastigotas metacíclicas, ocorre uma reprogramação de expressão gênica, conduzindo à expressão preferencial de grupos de genes envolvidos no processo de diferenciação (GOLDENBERG, 1990). Até o momento, poucos fatores foram identificados como responsáveis pelo disparo da metaciclógênese *in vivo* e *in vitro*. A utilização de L-prolina como fonte energética, cuja captação ocorre nas seis primeiras horas de indução, pode estimular a metaciclógênese do *T. cruzi* (CONTRERAS *et al.*, 1985). Além disso, esse aminoácido é predominante na hemolinfa e urina do inseto vetor (KOLLIEN & SCHAUB, 2000) e a adição de L-isoleucina e L-leucina, que inibem o catabolismo de L-prolina, diminuem a diferenciação celular do parasita em meio definido (HOMSY *et al.*, 1989).

A adição de AMPc exógeno e análogos estruturais, assim como ativadores de adenilato ciclase, estimulam a metaciclógênese (GONZALES-PERDOMO *et al.*, 1988). Além disso, Kollien & Schaub (2000) detectaram esta molécula na urina e secreções das glândulas de Malpighi do inseto, sugerindo assim, seu papel na metaciclógênese. Alguns autores sugerem a participação da enzima ADP-ribosil transferase no processo de diferenciação celular de epimastigotas a tripomastigotas (ISOLA *et al.*, 1987). Ainda, outros fatores como temperatura (KOLLIEN & SCHAUB, 2000), pH (UCROS *et al.*, 1983), cultura em fase estacionária e adesão do parasita podem influenciar o processo de diferenciação de *T. cruzi* (COOPER *et al.*, 1991).

2.3 Técnicas de transformação genética em tripanosomatídeos

O emprego de metodologias de transfecção tornou possível a análise da função gênica *in vivo* (LI & GOTTESDIENER, 1996). O avanço na tecnologia de introdução de DNA exógeno em tripanosomatídeos teve início com a expressão transiente de genes-repórter após a eletroporação dos parasitas com vetores circulares (BELLOFATTO & CROSS, 1989; LU & BUCK, 1991; CLAYTON, 1999).

Várias ferramentas foram introduzidas visando a manipulação gênica de tripanosomatídeos. Em geral, esses métodos têm como objetivo investigar a função de genes pelo ganho (superexpressão) e/ou perda de funções, bem como estudar a localização de seus produtos, utilizando a fusão de genes homólogos com genes repórter. As técnicas de RNAi e transposon também têm sido utilizadas para a investigação de silenciamento gênico (BEVERLEY, 2003).

As principais estratégias de introdução de DNA exógeno em células hospedeiras podem ser agrupadas em métodos químicos, físicos ou mediado por vírus (transdução).

Os métodos químicos compreendem a aplicação de íons cálcio (PARI & XU, 2004), DEAE-dextran (MACK *et al.*, 1998) e lipofecção (FELGNER *et al.*, 1987). Nessas metodologias, o agente químico utilizado (fosfato de cálcio, DEAE-dextran ou lipídios catiônicos) forma um complexo com o DNA facilitando sua incorporação pela célula hospedeira. O princípio da técnica de fosfato de cálcio é a formação de complexos DNA-fosfato de cálcio insolúveis em solução saturada. Essa mistura é então adicionada às células em meio de cultura, onde o co-precipitado é endocitado pela célula alvo (PARI & XU, 2004). Na lipofecção um componente lipídico neutro liga-se a molécula de DNA e o complexo interage com resíduos do ácido siálico presentes na membrana da célula hospedeira, propiciando assim a entrada por endocitose (FELGNER *et al.*, 1987). No entanto, as substâncias empregadas nessas metodologias apresentam certa toxicidade à célula, limitando sua utilização.

Os métodos físicos mais utilizados são a eletroporação (CLAYTON, 1999) e a biobalística (HARA *et al.*, 2002). A eletroporação baseia-se na ação da corrente elétrica de alta voltagem, que quando aplicado à célula, leva à polarização dos componentes da membrana citoplasmática, gerando uma diferença de potencial. Quando este potencial ultrapassa um limiar de voltagem, ocorrem microrupturas na membrana celular, tornando-a permeável a compostos exógenos como o DNA transformante, desde que excedam repulsões eletrostáticas presentes no momento do pulso. A remoção do campo elétrico resulta no selamento espontâneo dos poros formados (WATTS & STACEY, 1990).

Há décadas, os procedimentos usuais para obtenção de transfecção estável de DNA em tripanosomatídeos baseiam-se na eletroporação. Entretanto, apesar de ser uma importante ferramenta para introdução de DNA em uma grande variedade de tipos celulares, apresenta limitações quando aplicada a tripanosomatídeos. Uma das desvantagens da técnica é a necessidade de uma grande quantidade de DNA plasmidial (40 a 100 µg por descarga elétrica) e a alta taxa de mortalidade celular (VAINSTEIN *et al.*, 1994).

A eficiência dos sistemas de transformação foi aumentada quando Sanford *et al.* (1987) propuseram uma nova metodologia, posteriormente denominada biobalística ou “*gene gun*”. Seu fundamento baseia-se na aceleração de partículas de alta densidade (ouro ou tungstênio), envoltas por DNA exógeno, contra as células hospedeiras. Como o microprojétil ultrapassa a membrana citoplasmática e nuclear, este método dispensa a utilização de corrente elétrica. Além disso, o projétil é capaz de atingir diretamente o núcleo e, portanto, não estaria sujeito à ação de nucleases citoplasmáticas (BARRETO *et al.*, 1997). Entre os fatores físicos envolvidos na eficiência da biobalística, pode-se citar a constituição da micropartícula, tamanho, concentração e o procedimento utilizado para ligar o DNA a mesma. Os parâmetros biológicos que afetam a eficiência incluem o genótipo da célula alvo, a fase de crescimento, densidade celular e a composição osmótica do meio

durante o bombardeamento (ARMALEO *et al.*, 1990). A aplicação dessa metodologia em *Trypanosoma brucei* mostrou vantagens em relação à eletroporação em se tratando de aumento significativo de eficiência de transferência de genes em formas sangüíneas do parasita. O método não requer especificidade de tipo celular e a quantidade de DNA requerida é menor do que na eletroporação (HARA *et al.*, 2002).

2.4 Transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT)

A metodologia de transformação a qual faz uso da bactéria *A. tumefaciens* vem sendo empregada há muitos anos para transformar plantas superiores. Mais recentemente foi mostrada a capacidade dessa bactéria em transferir DNA para leveduras (BUNDOCK *et al.*, 1995), fungos filamentosos (DE GROOT *et al.*, 1998), *Streptomyces lividans* (KELLY & KADO, 2002) e células humanas (Hela) (KUNIK *et al.*, 2001).

A. tumefaciens é um bacilo Gram-negativo aeróbico, flagelado e encontrado no solo. Pertence a classe das α -proteobactérias e família Rhizobiaceae que inclui, entre outros, gêneros de bactérias fixadoras de nitrogênio como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Phyllobacterium* (LIPP-NISSINEN, 1993). No gênero *Agrobacterium*, as espécies *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes* destacam-se por serem patógenos de diversas espécies de vegetais por apresentarem os plasmídeos Ti e Ri, respectivamente. Estes conferem, às bactérias, capacidade para alterar o metabolismo e desenvolvimento das células vegetais, que resulta na doença conhecida como “galha da coroa” no caso de *A. tumefaciens*, e a síndrome da “raiz em cabeleira” por *A. rhizogenes*. O processo de colonização da planta requer a transferência de genes dos plasmídeos para o genoma da planta, resultando no desenvolvimento de um tumor na planta. Esse processo representa um mecanismo de engenharia genética natural, de transferência de genes entre reinos diferentes (GELVIN, 2003).

Em condições naturais, a bactéria transfere parte de seu plasmídeo Ti (“Tumor inducing”) para a célula vegetal infectada. Esta seqüência de DNA que é transferida (T-DNA) é capaz de se integrar eficientemente no genoma da planta hospedeira. O fragmento de T-DNA contém genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de opinas e de fitohormônios (NAM *et al.*, 1997; TINLAND, 1996), responsáveis pela formação do tumor e sobrevivência da bactéria.

Os hormônios vegetais sintetizados – ácido indol acético (auxina) e isopentenil-AMP (citocinina) – induzem um desequilíbrio hormonal, que tem como consequência uma multiplicação descontrolada das células vegetais, resultando na formação do tumor (GELVIN, 2003).

As opinas produzidas no processo de infecção são utilizadas como fonte de carbono e nitrogênio para o *Agrobacterium*, e estão especificamente relacionadas com a linhagem bacteriana inoculada. Dessa forma, a bactéria cria para si um nicho favorável pela modificação genética das células da planta, sendo este processo denominado “colonização genética” (HOOYKAAS & BEIJERSBERGEN, 1994). As linhagens de *Agrobacterium* são classificadas de acordo com o tipo de opina produzida. As opinas estão agrupadas em quatro famílias: octopina, nopalina, manopina e agrocinopina. Já foram identificados mais de 20 tipos diferentes de opinas, sendo a octopina [N^2 -(1,3-dicarboxietil)-L-arginina] e nopalina [N^2 -(1,3-dicarboxipropil)-L-arginina] os tipos mais comuns (WEISING & KAHL, 1996).

O mecanismo natural de transferência de genes entre *Agrobacterium* e plantas ainda não é totalmente compreendido, mas grande parte da base molecular envolvida nesse processo já foi caracterizada. A maioria das monocotiledôneas, incluindo muitos cereais, apresenta resistência à infecção pelo *A. tumefaciens*, o que dificulta a transformação por esta via (De GROOT *et al.*, 1998).

As linhagens de *A. tumefaciens* são divididas em três grupos principais, que variam entre si quanto às espécies de plantas hospedeiras, características metabólicas e estrutura genômica, sendo que o grupo da linhagem C58 é o mais estudado. Seu genoma é formado basicamente por um cromossomo circular (2,84 Mb), um cromossomo linear (2,07 Mb), e dois megaplasmídeos: pAtC58 (542,8 kb) e pTiC58 (214,2 kb). Os genes envolvidos na transformação e na gênese do tumor estão localizados nos quatro elementos genéticos (WOOD *et al.*, 2001).

O plasmídeo Ti (pTiC58) pode ser dividido em duas regiões principais: a região de virulência (*vir*) e a região de T-DNA (“Transferred DNA”). Além destas duas regiões, o plasmídeo Ti possui genes de replicação e incompatibilidade (*ori* e *inc*), catabolismo de opina (*opc*) e função de conjugação (*tra*), sendo nenhuma destas seqüências necessárias à virulência (HOOYKAS & BEIJERSBERGEN, 1994).

A região de virulência é composta por um *cluster* gênico (denominados genes *vir*) e é responsável pela regulação da transferência do T-DNA. Esse conjunto de operons possui aproximadamente 40 kb e está localizado adjacente à borda esquerda do T-DNA (HOOYKAS & BEIJERSBERGEN, 1994). As unidades transcricionais dos genes *vir* são denominadas *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF*, *virG* e *virH*. Somente quatro *locus vir* são essenciais para a formação do tumor (*virA*, *virB*, *virD* e *virG*), enquanto os outros afetam somente a eficiência da transferência (WEISING & KAHL, 1996).

A região de T-DNA é a única parte do plasmídeo transferida para a célula hospedeira, e abriga os oncogenes (*onc*) responsáveis pela produção de fitohormônios. O tamanho do T-DNA varia de 10 a 30 kb e é limitada por duas regiões ou bordas constituídas de 25 pb denominadas borda direita (RB – “Right Border”) e borda esquerda (LB – “Left Border”). Estas bordas são seqüências altamente homólogas e estão orientadas de forma repetida direta (GELVIN, 2003) (Figura 4).

RB 5' - T G A C A G G A T A T A T T G G C G G G T A A A C - 3'
LB 5' - T G G C A G G A T A T A T T G T G G T G T A A A C - 3'

Figura 4. Seqüências nucleotídicas das bordas direita (**RB**: *right border*) e esquerda (**LB**: *left border*) flanqueadoras do T-DNA; A – adenina; T – timina; C – citosina; G – guanina. Em azul: nucleotídeos iguais entre as bordas.

A presença dessas seqüências é que define o tamanho do T-DNA, e experimentos mostraram que a borda direita é essencial para a ocorrência da transferência (WANG *et al.*, 1984).

2.4.1 Mecanismo de transferência do T-DNA

O processo de infecção e transferência do T-DNA ocorre por uma série de etapas: quimiotaxia, adesão, indução da expressão dos genes *vir*, processamento do T-DNA, transferência do T-DNA, direcionamento do T-DNA até o núcleo e integração do T-DNA no genoma (SHENG & CITOVSKY, 1996; ZIEMIENOWICZ, 2001; GELVIN, 2003).

O primeiro evento do processo de transferência ocorre quando um tecido da planta sofre injúria, liberando diferentes moléculas para o ambiente. Algumas destas moléculas são capazes de atuar como sinalizadoras, promovendo quimiotaxia positiva para o *Agrobacterium*. Estes sinalizadores foram identificados principalmente como compostos fenólicos tais como acetoseringona, ácido *p*-hidroxibenzóico e vanilina, embora existam relatos de que alguns açúcares e aminoácidos também possam atuar como quimiotáticos (HAWES *et al.*, 1988). Independente da molécula sinalizadora, o processo de reconhecimento e quimiotaxia do *Agrobacterium* é dependente dos genes *virA* e *virG*, presentes no plasmídeo Ti (SHAW *et al.*, 1988). Acetoseringona é um dos compostos fenólicos que participam ativamente na indução dos genes de virulência (BOLTRON *et al.*, 1986) (Figura 5).

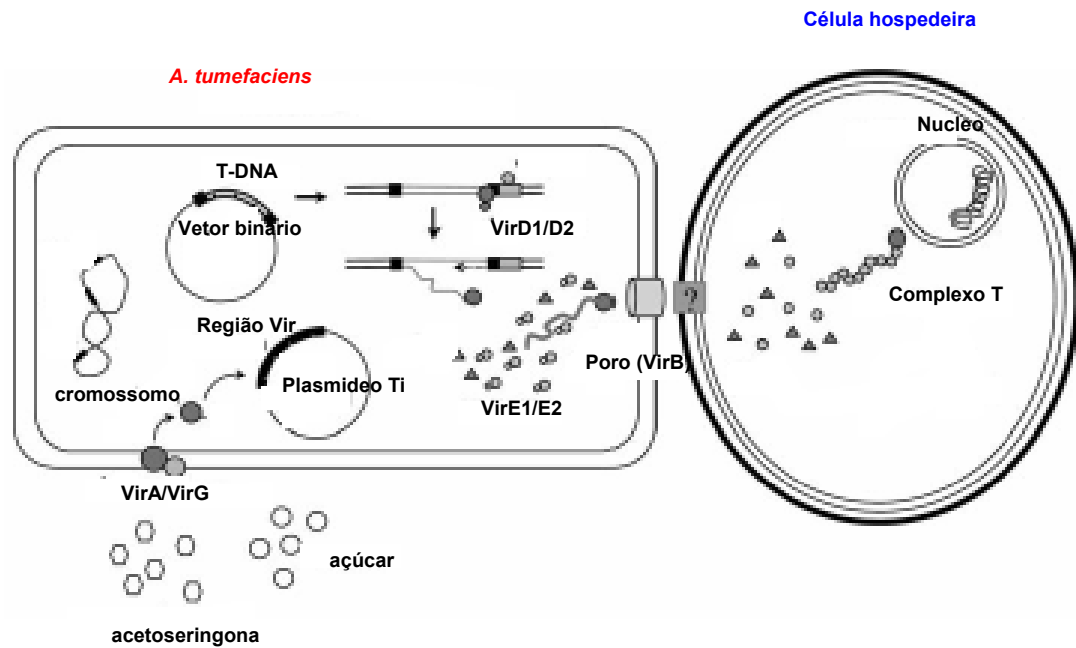


Figura 5. Representação esquemática do sistema de transferência do T-DNA de *Agrobacterium* para a célula hospedeira. Observar a presença do indutor no sistema. Fonte Michielse e Hooykaas (2005)

O processo de adesão envolve moléculas receptoras tanto na planta como na superfície do *Agrobacterium*. O receptor bacteriano é um polissacarídeo rico em α -glucanas ancorado no lipopolissacarídeo da parede celular, enquanto os receptores de superfície na planta foram caracterizados como pectinas, proteínas tipo-vitronectina e tipo-germina (MATTHYSSE & KINJE, 1998). É provável que as proteínas tipo-vitronectina das plantas estejam envolvidas na adesão celular de *Agrobacterium*-planta, uma vez que a adesão entre estas células foi inibida em presença de anticorpos anti-vitronectina (WAGNER & MATTHYSSE, 1992). A vitronectina é um componente da matriz extra-celular de células animais e é utilizada como receptor de superfície por várias linhagens de bactérias patogênicas (PAULSSON & WADSTROM, 1990).

Os genes envolvidos na adesão de *A. tumefaciens* à planta estão localizados no cromossomo circular bacteriano, e incluem *chvA*, *chvB*, *pscA*, *attA-Z* e *celABCDE*

(ZIEMIENOWICZ, 2001; MATTHYSSE *et al.*, 2000). Os produtos dos genes *chvA* e *chvB* promovem a síntese de α -1,2 glucanas e o gene *pscA* (*exoC*) codifica enzimas responsáveis pela síntese de exopolissacarídeos. A função exata do produto dos genes *attA-Z* ainda não é conhecida, mas a presença de um grande número de genes envolvidos no processo de adesão sugere que a habilidade de *A. tumefaciens* em ligar-se às células hospedeiras seja importante para a transferência do T-DNA (MATTHYSSE *et al.*, 2000).

Após a indução dos genes de virulência, a proteína VirD reconhece as bordas do T-DNA, promovendo a formação de fita simples e linear de DNA, que se associam às proteínas Vir E que conferem estabilidade ao processo, e a proteína Vir D2 que se une covalentemente à extremidade 5' do T-DNA. Esse complexo, proteínas-DNA, é transferido para o citoplasma da célula vegetal, onde regiões de sinalização de direcionamento nuclear das proteínas VirE2 e VirD2 orientam o complexo aos poros nucleares (GELVIN *et al.*, 2000). Uma vez que o complexo encontra-se no núcleo, a integração do T-DNA, no genoma, envolve proteínas que participam do processo de reparo, recombinação e síntese de DNA (OHBA *et al.*, 1995). O sistema de integração do T-DNA não é conhecido, entretanto a inserção parece ser ao acaso, havendo uma preferência por regiões transcricionalmente ativas (KONCZ *et al.*, 1992).

2.4.2 Expressão e função dos genes *vir*

As proteínas Vir são codificadas pela região *vir*, contendo 20 genes essenciais e expressos em operons: *vir* A, B, C, D, E e G. A regulação da expressão dos genes *vir* é induzida em resposta a presença de compostos fenólicos em combinação com monossacarídeos e acidez extracelular (pH 5,0 a 5,5). Esta acidez pode ser necessária para promover a protonação dos compostos fenólicos, aumentando sua permeabilidade através da membrana citoplasmática bacteriana. Este estímulo químico é detectado por dois componentes sensores transmembrana, proteínas Vir A e Vir G, resultando em auto-

regulação positiva de todos os promotores *vir* (JUN *et al.*, 2000). Essas proteínas estão presentes em níveis basais no interior celular.

O *locus virA* é constitutivamente expresso e o seu produto (VirA), localizado na membrana interna das células de *Agrobacterium*, funciona como um quimiorreceptor para as moléculas sinalizadoras da planta. Após a aproximação da bactéria até a região onde ocorreu a injúria no tecido vegetal, dá-se início a adesão entre as células. A proteína Vir A contém 4 domínios funcionais, designados de periplasmático, *linker*, quinase e domínio receptor, apresentando dímeros tanto na presença quanto na ausência de moléculas indutoras (GELVIN, 2003).

Ao se ligar à molécula indutora, a proteína VirA inicialmente se autofosforila e modifica a proteína VirG (que também é expressa constitutivamente, mas em menor escala) através da fosforilação da mesma. A proteína VirG fosforilada atua como ativador transcricional dos genes *vir*, através da ligação no *vir*-box, uma seqüência de 12 pb presente nos promotores desses genes (GELVIN, 2003). Recentemente foi investigada a função do plasmídeo pAtC58 sobre a virulência de *A. tumefaciens* C58. A participação deste plasmídeo na virulência de *A. tumefaciens* era supostamente nula, mas ficou comprovado que genes do pAtC58 estão envolvidos na regulação da expressão dos genes *vir* de pTiC58 (NAIR *et al.*, 2003).

Com a indução da expressão dos genes *vir*, dá-se início a montagem do “complexo-T” (a molécula final de T-DNA associada a diversas proteínas), a partir da síntese de uma cópia fita simples do T-DNA. Este processo é dependente das proteínas VirD1 e VirD2, duas proteínas do operon *virD*. Estas proteínas são capazes de reconhecer as bordas esquerda e direita do T-DNA. A proteína VirD2 hidrolisa a ligação fosfodiéster da fita inferior, entre o 3° e 4° nucleotídeo de cada borda, e conseqüentemente gera um segmento fita simples do T-DNA. Este fragmento de T-DNA fita simples é removido do plasmídeo Ti, que por sua vez é reparado através da incorporação de novos nucleotídeos. Em seguida, a proteína VirD2 permanece covalentemente ligada à extremidade 5’ do T-

DNA. A presença desta proteína está relacionada com a polarização do complexo-T. A função exata da proteína VirD1 ainda é desconhecida, mas é sugerido que tenha atividade semelhante a topoisomerase I (GHAI & DAS, 1989). A etapa final no processamento do T-DNA envolve as proteínas VirC1 e VirC2. VirC1 é capaz de ligar-se ao sítio “overdrive”, localizado adjacente à borda direita, aumentando a atividade enzimática de VirD1/VirD2 (GELVIN, 2003).

A montagem do complexo-T é finalizada com a associação de proteínas VirE2 ao conjunto T-DNA/VirD2. Várias cópias desta proteína ligam-se ao longo da molécula de T-DNA, sem especificidade de seqüências (ZUPAN & ZAMBRYSKI, 1995). Diversas funções foram associadas a esta proteína, incluindo proteção da fita de T-DNA contra nucleases do hospedeiro e formação do canal de transporte de T-DNA (GELVIN, 2003). Análises do complexo-T através de microscopia eletrônica revelaram que esta molécula exibe uma estrutura helicoidal semelhante a um solenóide (CITOVSKY *et al.*, 1997; ABU-ARISH *et al.*, 2004).

A transferência do complexo-T até a planta é mediada por um *pillus* do *Agrobacterium*, semelhante ao encontrado no sistema de conjugação bacteriana (FULLNER *et al.*, 1996). Esse *pillus* é formado por proteínas VirB, sendo VirB2 a subunidade maior. O *pillus* é ancorado à membrana externa da célula bacteriana através da proteína VirB7. O complexo-T é acoplado ao *pillus* através da proteína VirD4, localizada na membrana interna da bactéria, e é transferido até o citoplasma da célula hospedeira. No citoplasma do hospedeiro, o complexo-T é direcionado para o núcleo através de sinais de localização nuclear (SLN). Estes sinais, presentes nas proteínas VirD2 e VirE2, são reconhecidos por proteínas da membrana nuclear, como a importina e proteínas Ran. Uma vez reconhecido, o complexo-T é incorporado para o interior do núcleo da célula hospedeira (ZIEMIENOWICZ, 2001).

A internalização do complexo-T é um evento ainda não esclarecido. A proteína VirD2 supostamente confere polarização para o complexo-T interagir com as importinas. O

papel de VirE2 no transporte nuclear do T-DNA ainda é bastante controverso. No interior das células de *Agrobacterium*, VirE2 provavelmente interage com a chaperonina VirE1, tornando-se incapaz de se ligar à fita simples de T-DNA. Contudo, quando VirE2 está ligada ao T-DNA, este assume a forma estrutural de um solenóide-helicoidal. Suspeita-se que esta conformação possa ser necessária para a internalização do complexo-T no núcleo do hospedeiro. A molécula do complexo-T é um conjunto nucleoprotéico extremamente grande, uma vez que o T-DNA pode conter até 150 kb de extensão (HAMILTON, 1996). Além disso, aproximadamente 600 moléculas de VirE2 ligam-se ao longo do T-DNA, conferindo a este um comprimento de aproximadamente 3600 nm. A molécula final do complexo-T possui cerca de 5×10^7 Da de massa e 60 vezes a espessura da membrana nuclear. No contexto de toda a estrutura desta molécula, é possível que a proteína VirE2 seja fundamental para a internalização do complexo-T. Além de estabelecer a ultraestrutura helicoidal ao T-DNA, a presença de VirE2 ao longo de todo o seu comprimento permite que os poros da membrana nuclear estejam abertos em ambos os meios, núcleo e citoplasma (ZUPAN & ZAMBRYSKI, 1995).

No núcleo da célula vegetal, o T-DNA é integrado ao genoma por recombinação ilegítima (GHEYSEN *et al.*, 1991; ZIEMIENOWICZ, 2001) ou, menos freqüentemente, por recombinação homóloga (LEE *et al.*, 1990). De acordo com o modelo atual (TINLAND & HOHN, 1995), a integração tem início quando a região 3' do T-DNA encontra homologia e forma um pareamento em algum sítio do DNA vegetal. Os nucleotídeos pareados sofrem restrição por nuclease(s). Em seguida, a extremidade 5'-VirD2 também pareia com o DNA vegetal e é ligado na terminação 3'-OH deste. A fita superior do DNA vegetal é degradada e a maquinaria de reparo do DNA sintetiza a fita complementar do T-DNA, finalizando o processo de integração. As proteínas envolvidas na integração do T-DNA ainda não são conhecidas, mas há evidências de que VirD2 atue como integrase ou ligase (ZIEMIENOWICZ, 2001). Fatores da célula hospedeira também participam do evento de

integração, a exemplo da histona H2A (MYSORE *et al.*, 2000). As principais proteínas envolvidas no processo de interação *Agrobacterium*-planta estão mostradas na Tabela 1.

Tabela 1. Resumo dos processos celulares e proteínas envolvidas na interação entre as células de *Agrobacterium*-planta.

Processo celular	Evento da interação	Proteínas envolvidas
Reconhecimento célula-célula	Adesão da bactéria a receptores do hospedeiro	ChvA, ChvB, PscA, Att
Transdução de sinal	Reconhecimento de moléculas sinalizadoras da planta e ativação da via de transporte do DNA	ChvE, VirA, VirG
Ativação transcricional	Expressão dos genes <i>vir</i> após fosforilação do ativador transcricional	VirG
Transferência do T-DNA	Corte das bordas do T-DNA e mobilização da cópia de T-DNA fita simples	VirD1, VirD2, VirC1
Transporte celular *	Formação do complexo T-DNA e proteínas; transporte do complexo para o citoplasma da célula hospedeira	VirE1; VirE2; VirD2, VirD4, VirB4, VirB7, VirB9, VirB10, VirB11, VirB1

* Proteínas VirB estão envolvidas na formação de um canal transmembrana e possivelmente na transferência do complexo-T. Proteínas VirE e VirD estão envolvidas na formação do complexo-T e provavelmente participam no transporte do complexo-T através do canal de VirB. (adaptado de SHENG & CITOVSKY, 1996).

3. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo :

- descrever a metodologia de transformação genética de *T. cruzi* mediada por *A. tumefaciens*, e
- construir um vetor binário para estudos de transformação de *T. cruzi* , com a introdução de genes repórter.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Células e manutenção celular

4.1.1 Linhagens de *Escherichia coli*: linhagem comercial M15 (Qiagen Inc) sem genótipo disponível; linhagem TOP 10F': F' {*lac I^q*, *Tn 10* (Tet^R) *mer A* Δ (*mrr-hsd RMS-merBC*) θ 80 *lac Z* Δ *m15* Δ *lacX74 deoR recA1 ara D139* Δ (*ara-leu*) 7697 *galK rpsL* (str^R) *end A1 nupG*.

As células foram cultivadas em meio LB (Luria – Bertani) (Bacto-triptona 10,0 g/L, NaCl 5,0 g/L, Extrato de levedura 5,0 g/L) a 37 °C durante 18 h. Células em fase de crescimento exponencial foram estocadas em igual volume de glicerol a -20 °C.

4.1.2 Linhagem AGL-1 de *Agrobacterium tumefaciens* foi gentilmente cedida pelo Dr. Peter Romaine, da Universidade da Pennsylvania, EUA. A linhagem AGL-1 contém o plasmídeo desarmado pTiBo542 Δ T com os genes de virulência *vir*. As células foram cultivadas em meio LB suplementado com estreptomicina (100 μ g/mL) a 28 °C durante 18 h sob agitação constante. Células em fase de crescimento exponencial foram estocadas em igual volume de glicerol a -20 °C.

4.1.3 *Trypanosoma cruzi* cepa CL: as formas epimastigotas de *T. cruzi* CL foram cultivadas em meio LIT (NaCl 68 mM; KCl 5,3 mM; Na₂HPO₂ 58 mM; glicose 0,2%; triptose 5 mg/mL; infusão de fígado 5 mg/mL; soro fetal bovino 10%; hemina 10 μ g/mL) (CAMARGO, 1964) sendo mantidas à temperatura de 28°C, com passagens a cada cinco dias.

4.2 Teste de sensibilidade de *T. cruzi* a neomicina

O inóculo de *T. cruzi* foi obtido a partir de culturas em fase de crescimento exponencial incubadas a 28 °C em meio LIT. Um volume de 100 µL da cultura (aproximadamente $3,0 \times 10^5$ células) foram adicionados em 10 mL de meio LIT, acrescido de concentrações diferentes do antibiótico neomicina G418 (Sigma Chemical Co): 250, 500 e 700 µg/mL. Para controle, células de *T. cruzi* foram inoculadas em meio sem antibiótico. A atividade de neomicina sobre o crescimento do protozoário foi avaliada através da contagem de células em câmara hematimétrica (*Improved Neubauer Chamber*) a cada 24 horas, durante 10 dias.

4.3 Eletroforese de DNA em gel de agarose

A migração eletroforética do DNA em géis de agarose foi realizada em sistema de gel submerso em tampão TBE (Tris base 89 mM; Ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM; pH 8,3). O gel, em diferentes concentrações (0,8 a 1,0%) foi preparado em TBE. As amostras e um padrão de massa molecular (1 kb Plus DNA ladder - Invitrogen) foram aplicados em tampão de amostra para DNA (Ficoll 400 25%; Azul de bromofenol 0,25%). O sistema foi submetido a uma diferença de potencial (70 a 100V) com amperagem constante.

As moléculas de DNA foram visualizadas em comprimento de onda ultravioleta (260 nm) após coloração do gel com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por 30 minutos.

4.4 Construção do vetor para transformação de *T. cruzi*

4.4.1 Vetor Binário

O vetor binário pPK2 (10,77 kb) foi gentilmente cedido pela Dra Sarah F. Covert da Universidade da Geórgia, EUA. Este vetor contém o fragmento de T-DNA (5 kb) flanqueado pelas bordas direita (RB) e esquerda (LB), o gene que confere resistência a canamicina (*kan*) e a região do T-DNA contendo gene de resistência a higromicina (*hph*) sob o controle do promotor *Pgpd*, para fungos (COVERT *et al.*, 2001) (Figura 6).

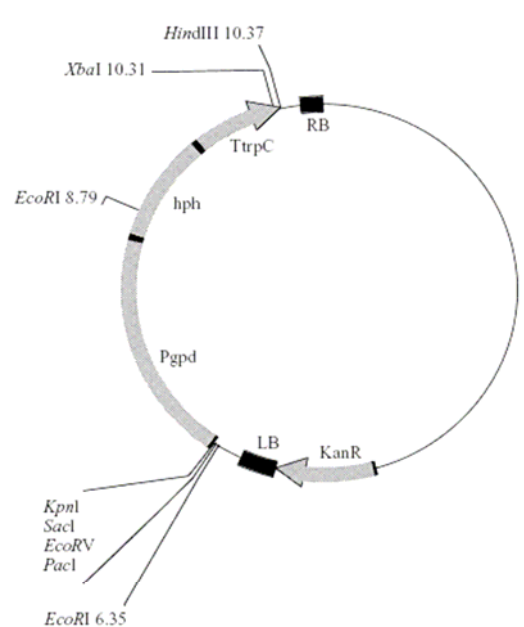


Figura 6. Representação esquemática do plasmídeo pPK2 utilizado para expressão de higromicina (*hph*) em fungos. As setas grossas indicam o gene que codifica resistência a canamicina e a região do T-DNA. Os retângulos correspondem às bordas direita (**RB**) e esquerda (**LB**). **Pgpd**: região promotora do gene que codifica para gliceraldeído-fosfato-desidrogenase de *Aspergillus nidulans*. **TtrpC**: região terminadora do gene *trpC* de *A. nidulans*. No mapa estão representados os sítios para as endonucleases de restrição: *EcoRI*, *PacI*, *EcoRV*, *SacI*, *KpnI*, *XbaI* e *HindIII*. Fonte: Covert *et al.*, (2001).

4.4.2 Construção do plasmídeo pPk2gfpTetrep

4.4.2.1 Preparo do plasmídeo

O plasmídeo pPK2 foi utilizado como referência para a construção do vetor binário pPk2gfpTetrep a ser empregado na transformação de *T. cruzi*. Inicialmente, 1 µg de DNA plasmidial (pPK2) foi submetido a digestão com a endonuclease de restrição *Hind* III (Invitrogen) a 37 °C durante 3 horas. As extremidades do plasmídeo foram reparadas utilizando-se a enzima *Klenow* (Invitrogen) a 37 °C, por 15 minutos, seguido de inativação a 75°C por 10 minutos. A seguir, o plasmídeo foi digerido com a endonuclease *Eco*RI (Invitrogen) a 37 °C. A separação eletroforética foi realizada em gel de agarose de baixo ponto de fusão (*ultra low melting point*) e o fragmento de DNA (aproximadamente 4,0 kb) contendo as bordas RB e LB e o gene que confere resistência a canamicina foi excisado do gel com o auxílio de um bisturi e colocado em tubos de microcentrifuga. Cerca de 200 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; EDTA 1 mM) foram acrescentados ao tubo e incubado a 65 °C até fusão completa da agarose. A mistura foi submetida a purificação com igual volume de fenol saturado e posteriormente com uma solução contendo fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1, v/v). O DNA contido na fase aquosa foi precipitado com três volumes de etanol gelado e 300 mM acetato de sódio pH 7,0 durante 2 horas a -20 °C. Após centrifugação a 10.000 x g por 15 minutos, o sedimento foi lavado com 1,0 mL de etanol 70% e ressuspenso em 30 µL de água deionizada estéril.

4.4.2.2. Preparo do inserto

O inserto denominado Tetrep foi obtido do plasmídeo pTetRep (gentilmente cedido pelo Dr Gregory Buck – Virginia Commonwealth University). A região do plasmídeo pTetREp (Figura 7) contém o gene da região promotora ribossomal, as regiões doadoras de

sítios aceptores de *splice-leader* (SA. 35.2 e 35.1), o gene que codifica a proteína repressora da tetraciclina (*tetrep*) e o gene de resistência a neomicina (*NeoR*).

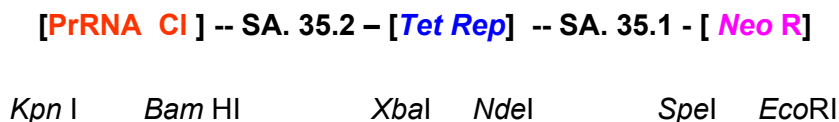


Figura 7. Representação esquemática da região do plasmídeo pTetrep, contendo o gene da região promotora ribossomal da cepa CI, regiões espaçadoras SA (35.2 e 35.1), gene que codifica a proteína repressora da tetraciclina (*Tetrep*) e gene de resistência a neomicina (*Neo R*). No esquema também estão representados os sítios de reconhecimento das seguintes enzimas de restrição: *Kpn*I, *Bam*HI, *Xba*I, *Nde*I, *Spe*I, *Eco*RI.

Para a obtenção do inserto, 1 µg de DNA plasmidial foi digerido com as endonuclease de restrição *Kpn*I, reparado e digerido com *Eco*RI, de acordo com as recomendações do fabricante e após a digestão, foi submetido a eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão. Após a separação eletroforética, um fragmento de aproximadamente 2,5 kb do DNA foi obtido.

O gene *gfp* (green fluorescent protein) de *Aequorea victoria* foi clonado na região que antecede ao gene *tetrep*. Para tanto, o amplicon *gfp* foi obtida por PCR, a partir do plasmídeo pNUS-GFPcH (gentilmente cedido pelo Dr. Emmanuel Tetaud, Departamento de Química Biológica e Microbiologia Molecular, Universidade de Dundee, Escócia). As bordas do amplicon foram submetidas ao reparo com a enzima *Klenow* (Invitrogen) a 37 °C, por 15 minutos, seguido de inativação a 75°C por 10 minutos. Posteriormente, foi clonado na região de reconhecimento da endonuclease de restrição *Xba*I.

4.4.2.3 Ligação do inserto ao vetor

A reação de ligação entre o inserto gfpTetrep e a fração do plasmídeo pPk2, na proporção de 3:1, foi realizado em tampão de ligação (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; MgCl₂ 10 mM; DTT 10 mM; espermidina 1 mM; BSA 50 µg/mL; ATP 1mM) e 200 U da enzima T₄ DNA ligase. A mistura foi mantida em banho de gelo (aproximadamente 10 °C) por 20 horas.

4.5. Transformação de *E. coli* TOP 10F'

4.5.1. Preparo de células competentes

Para o preparo de células competentes foi utilizado o método do cloreto de cálcio descrito em Sambrook & Russell (2001). Assim, uma colônia da bactéria *E. coli* TOP 10F' foi inoculada em 5,0 mL de meio LB. A cultura foi incubada a 37 °C por 18 horas sob agitação constante. Um volume de 1,0 mL (inóculo de 1:100) desta cultura foi transferido para 100 mL de meio LB. As células foram incubadas a 37 °C sob agitação constante até a fase de crescimento exponencial (Absorbância₆₀₀ de 0,6).

A cultura foi centrifugada (4.000 x g por 5 minutos a 4 °C), e as células foram ressuspensas em 50 mL (metade do volume da cultura original) de CaCl₂ 100 mM e mantidas no gelo durante 30 minutos. A suspensão foi submetida a uma centrifugação nas mesmas condições anteriores e as células ressuspensas em 2,0 mL (1/50 do volume da cultura original) de CaCl₂ 100 mM. As células foram mantidas no gelo por pelo menos 2 horas antes da transformação.

4.5.2 Transformação

Para seleção inicial dos plasmídeos recombinantes, a reação de ligação foi transformada em células de *E. coli* TOP10F' competente (item 3.5.1).

A um volume de 100 μL da suspensão bacteriana foi adicionada a reação de ligação e a mistura foi incubada no gelo por 30 minutos. Em seguida foi submetida à incubação em banho-maria a 42 °C por um período de 2 minutos e banho de gelo (choque térmico). Cerca de 1 mL de meio LB líquido foi adicionado à mistura, seguido de incubação durante 1 h a 37 °C sob agitação. Após esse período, a cultura foi centrifugada por 60 segundos e o sedimento foi ressuspensionado em 100 μL de LB líquido. A mistura foi plaqueada em meio seletivo (ágar LB suplementado com canamicina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e incubada a 37 °C por 24 horas. Após este período as colônias foram ordenadas em meio seletivo (placa mestre).

4.6 Seleção dos clones recombinantes de *E. coli*

As colônias transformadas selecionadas foram analisadas através de reação em cadeia pela polimerase utilizando-se os oligonucleotídeos tetF e tetR (PCR de colônia), para avaliar a presença do gene *tetrep*. Para tanto, as colônias da placa mestre foram transferidas para tubo de polipropileno (capacidade para 200 μL) contendo Tris-HCl 67 mM pH 8,8; MgCl_2 4 mM; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 16 mM; β -mercaptoetanol; BSA 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; dNTPs 175 μM ; 1 μM de cada oligonucleotídeo iniciador e 1 U da enzima *Taq* DNA polimerase. As reações de amplificação foram realizadas nas seguintes condições: uma etapa de desnaturação de 10 minutos a 94 °C (desnaturação), seguidos de 25 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 58 °C (hibridação) e 1 minuto a 72 °C (extensão). Os produtos da reação de amplificação foram analisados em gel de agarose e as colônias confirmadas foram submetidas a extração plasmidial.

4.7 Extração de DNA plasmidial recombinante

As colônias selecionadas, como descrito no item 3.6, foram inoculadas em meio LB líquido contendo canamicina (100 µg/mL) e incubadas a 37 °C por 16 h. Após centrifugação, o sedimento foi utilizado para extração dos plasmídeos através do método da lise alcalina segundo Birboin & Doly (1979), com modificações. As colônias selecionadas foram inoculadas em 1,5 mL de meio LB suplementado com canamicina 100 µg/mL e incubadas a 37 °C durante 18 h sob agitação constante. A seguir, as células foram centrifugadas a 6.000 x g durante 5 minutos e ressuspensas em 200 µL de Solução I (Glicose 50mM, EDTA 10mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0). Posteriormente foram adicionados 200 µL de Solução II (SDS 1%, NaOH 0,2 N) e a homogeneização foi feita por inversão. Finalmente, foram adicionados 200 µL de Solução III (5M de acetato de potássio, pH 4,8). A mistura foi centrifugada 5 minutos a 6.000 x g e o sobrenadante submetido a uma purificação com igual volume de fenol-clorofórmio. O DNA contido na fase aquosa foi precipitado com 1,0 mL de etanol gelado durante 2 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação, o sedimento foi submetido a uma lavagem com 1,0 mL de etanol 70% e, depois de seco, ressuspensado em 30 µL de água deionizada estéril.

4.8 Transformação de *A. tumefaciens* AGL-1 com o vetor pPK2gfpTetrep

A linhagem bacteriana de *A. tumefaciens* AGL-1 utilizada neste estudo, contém o plasmídeo Ti desarmado, ou seja, sem a região do T-DNA e as bordas que o flanqueiam. A transformação desta bactéria com o plasmídeo recombinante foi realizada por choque térmico. Inicialmente a bactéria foi cultivada em meio LB suplementado com 100 µg/mL de estreptomicina por 18 h a 28 °C sob agitação. Após esse período, um inóculo de 2 mL da cultura foi feito em 50 mL de meio LB líquido. A cultura foi incubada a 28 °C até atingir a densidade óptica (DO₆₀₀) entre 0,5 e 1,0. Posteriormente, a cultura foi mantida no gelo por 15 minutos e centrifugada a 12.000 x g por 5 minutos a 4 °C. O sedimento foi ressuspensado em 1 mL de cloreto de cálcio 20 mM e mantido no gelo.

A um volume de 100 μ L dessa suspensão celular foi adicionado cerca de 1 μ g de DNA plasmidial (vetor pPK2gfpTetrep). A mistura foi incubada no gelo por 30 minutos e em seguida colocada em nitrogênio líquido até solidificação completa. A seguir, foi submetida à incubação em banho-maria a 37 °C (choque térmico). Cerca de 1 mL de meio LB líquido foi adicionado à mistura, seguido de incubação durante 2 h a 28 °C sob agitação. Após centrifugação de 30 segundos, o sedimento foi ressuspensionado em 100 μ L de LB líquido e a mistura foi plaqueada em LB suplementado com canamicina (100 μ g/mL).

As colônias crescidas no meio de cultura seletivo foram submetidas a confirmação pela reação em cadeia pela polimerase (PCR de colônia) como descrito no item 3.6.

4.9 Co-cultivo de *T. cruzi* e *A. tumefaciens* recombinante

A linhagem AGL-1 de *A. tumefaciens*, contendo a construção pPK2GFPTetrep foi cultivada em 7 mL de meio LB acrescido de 50 μ g/mL de canamicina e 50 μ g/mL de estreptomicina, sob agitação a 28 °C durante 16-20 horas. As células foram diluídas até que a densidade óptica (DO_{660}) atingisse 0,15, em volume final de 20 mL de meio LIT contendo 200 μ M de acetoseringona (AS). A cultura foi incubada por aproximadamente 4 horas a 28 °C até DO_{660} final de 0,6-0,8.

Células de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT a 28 °C até atingir a concentração de 5×10^6 células/mL.

A. tumefaciens e *T. cruzi* (na razão celular de 1:10) foram misturados em meio LIT contendo AS, e os tubos permaneceram na posição horizontal a 28 °C. Nos tempos 1, 4 e 17 horas, foram acrescentados aos tubos o antibiótico mefoxina (150 μ g/mL), para inibir o crescimento da bactéria. Após 24 horas, as células de *T. cruzi* foram transferidas para meio de cultura LIT e foi acrescido 500 μ g/mL de neomicina, para selecionar as células transformadas. Um controle negativo foi realizado com células de *T. cruzi* não

transformadas. A cultura transformada foi mantida em repiques semanais com pressão seletiva.

4.10 Extração de DNA total de *T. cruzi*

A extração do DNA total das células de *T. cruzi* transformadas e não transformadas foram obtidas pela técnica de mini-preparação descrita por Medina-Acosta & Cross (1993), com modificações.

Cerca de 1,5 mL da cultura de *T. cruzi* (aproximadamente 5×10^6 epimastigotas/mL) foram coletados por centrifugação a 6.000 x g por 5 minutos. Os parasitas foram lavados em tampão PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 4,3 mM; KH₂PO₄ 1,4 mM) e acrescentou-se 150 µL de tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 62,5 mM EDTA pH 9,0; 2,5 M LiCl; 4% (v/v) Triton X-100), e os tubos foram homogeneizados por inversão invertidos e incubados por 5 minutos a temperatura ambiente. Após este período, foram acrescentados 150 µL de fenol/clorofórmio e a fase aquosa foi recuperada por centrifugação a 6.000 x g por 5 minutos. O DNA foi precipitado com três volumes de etanol gelado e 300 mM acetato de sódio pH 7,0 durante 2 horas a -20 °C. Após centrifugação a 10.000 x g por 15 minutos, o sedimento foi lavado com 1,0 mL de etanol 70% e ressuspenso em 30 µL de água ultra pura.

4.11 Análises de *T. cruzi* transformantes

4.11.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR foi realizada para a detecção dos genes *tetrep*, *gfp* e *neo*, nas células de *T. cruzi* transformadas. As reações de amplificação foram realizadas utilizando oligonucleotídeos iniciadores, específicos para cada gene, nas seguintes condições: 10

min a 94 °C, seguido de 25 ciclos de 45 s a 94 °C, 1 min a 55 °C e 1 min a 72 °C. O produto de amplificação foi submetido à migração eletroforética em agarose 1%, como descrito em 4.3.

4.11.2 Análises do tipo “Dot-blot”

Para a análise do “dot blot”, aproximadamente 300 ng μ L do amplicon do gene TetRep, proveniente da reação em cadeia da polimerase, foi depositado em membrana de nylon (Hybond N - GE Healthcare Life Sciences). O DNA foi fixado à membrana através da irradiação ultravioleta por um período de 2 minutos.

4.11.3 Análises do tipo “Northern blot”

O RNA total foi obtido das formas epimastigotas de *T. cruzi* (aproximadamente 5×10^6 parasitas/mL) utilizando o kit RNeasy mini (Qiagen). A separação eletroforética das moléculas de RNA foi realizada em gel de agarose em condições desnaturantes como descrito por Lehrach *et al.*, (1977). O gel foi preparado com a fusão da agarose em tampão MOPS (MOPS 20 mM; Acetato de sódio 5 mM; EDTA 2 mM; pH 7,5). Após o resfriamento (aproximadamente 60 °C), foi adicionado formaldeído em solução (37%) na concentração final de 2,2 M. As amostras de RNA e o padrão de massa molecular (RNA Ladder) foram aplicados em três volumes de tampão de amostra de RNA (Formamida 80%; Formaldeído 6%; Tampão MOPS 1X; 15% de corante preparado em MOPS, glicerol 25%, azul de bromofenol 0,25%).

A eletroforese foi realizada em sistema de gel submerso em tampão MOPS com diferença de potencial (100 a 130V) e amperagem constante. Após a corrida, o gel foi lavado várias vezes em água para retirada do formaldeído. As moléculas de RNA foram

visualizadas após coloração do gel com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por 5 minutos e observação em comprimento de onda ultravioleta (260 nm).

Após este tratamento, o RNA foi transferido para membrana de nylon conforme descrito em Sambrook & Russel (2001). O RNA foi fixado à membrana através da irradiação ultravioleta por um período de 2 minutos.

4.12 Ensaios de hibridação

4.12.1 Marcação da sonda

Os genes *tetrep*, utilizados para os experimentos de “dot blot” e *gfp*, utilizados para os experimentos de “Northern blot”, foram utilizados como sonda nos experimentos de hibridação, após amplificação por PCR. A marcação das seqüências de DNA foi efetuada pelo método de “random primer” utilizando-se o kit Digoxigenin (DIG) Hybridization System (Roche -Mannheim, Germany), conforme recomendações do fabricante.

4.12.2 Pré-hibridação e hibridação

As membranas foram pré-hibridadas por 30 minutos e após esse tempo, as sondas (aproximadamente 75 ng/µL) previamente desnaturadas (aquecimento a 100 °C, por 5 minutos e resfriada imediatamente em gelo) foram adicionadas. Os sistemas foram incubados a em temperaturas de acordo com o ácido nucléico utilizado durante 20 horas.

Após 20 horas, as membranas foram lavadas duas vezes em SSC 2X (NaCl 0,3 M; Citrato de sódio 0,03 M; pH 7,0) acrescido de SDS 0,1%, por 15 minutos cada, a temperatura ambiente, e duas vezes em SSC 0,5X (NaCl 0,075 M; Citrato de sódio 0,0075 M; pH 7,0) e SDS 0,1%, por 15 minutos a 65°C. Em seguida foram adicionados os reagentes do sistema de detecção, segundo procedimento do kit, e as membranas foram expostas a filmes de raios-X (Fuji®) por 3 horas a temperatura ambiente.

4.13. Expressão e purificação de proteínas recombinantes em sistema bacteriano

4.13.1 Clonagem do gene *gfp* no vetor de expressão pQE 30

O inserto para clonagem no vetor pQE 30 (C-terminal 6-His) foi obtido através da reação em cadeia pela polimerase, utilizando os oligonucleotídeos específicos (Tabela 2) e o plasmídeo pNUS-GFPcH como molde. A reação de amplificação foi realizada em volume final de 20 μ L contendo Tris-HCl 67 mM pH 8,8; $MgCl_2$ 4 mM; $(NH_4)_2SO_4$ 16 mM; β -mercaptoetanol 10 mM; BSA 100 μ g/mL; dNTPs 250 μ M; 1 μ M de cada iniciador e 5 U da enzima Vent DNA polimerase.

A mistura foi previamente incubada a 94 °C por 2 minutos e imediatamente após foi submetida a 30 ciclos de amplificação, cada um composto por incubações a 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto. Ao término da reação, o produto foi purificado e após a digestão com *Bam* HI foi ligado ao vetor pQE 30. As reações de ligação foram, então, transformadas em *E. coli* M15, e as bactérias transformadas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura seletivo (LB; ágar 1,5%; ampicilina 100 μ g/mL; canamicina 10 μ g/mL) com o auxílio da alça de Drigalsky. As placas foram incubadas a 37 °C durante 18 horas.

As colônias transformadas foram selecionadas e analisadas através de reação em cadeia pela polimerase, utilizando-se os mesmos oligonucleotídeos acima (PCR de colônia), para avaliar a presença do inserto.

4.13.2 Indução da proteína recombinante

As colônias selecionadas, como descrito no item anterior, foram inoculadas em 2 mL de meio LB contendo ampicilina 100 μ g/mL e canamicina 10 μ g/mL (LB amp/cana). As

culturas foram incubadas a 37 °C durante 18 horas sob constante agitação. Um volume de 200 µL (inóculo de 1:100) desta cultura foi transferido para 2 mL do mesmo meio. As células foram incubadas a 37 °C sob agitação constante por 2 horas. O indutor IPTG (isopropil-β-D-tio-galactopiranosídeo) foi adicionado à cultura em concentração final de 1 mM e a incubação prosseguiu por mais 3 horas nas mesmas condições.

As células com expressão induzida de GFP foram sedimentadas a 4.000 x g por 10 minutos a 4 °C e lavada em PBS. O sedimento foi ressuspensão em PBS, seguido da adição de tampão de amostra para proteínas 4X (Tris-HCl 125 mM pH 6,8; SDS 2%; β-mercaptoetanol 5%; Glicerol 12%; Azul de bromofenol 0,012%). Os extratos protéicos foram desnaturados por aquecimento a 100 °C por 3 minutos e, juntamente com um marcador de massa molecular (BenchMark, Invitrogen), submetidos a eletroforese em gel desnaturante de poli-acrilamida a 15% (SDS-PAGE) (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

4.13.3 Purificação da proteína recombinante

A expressão da proteína recombinante foi induzida como descrito anteriormente, utilizando-se 1L de meio LB amp/cana. As células foram centrifugadas (4.000 x g por 15 minutos), lavadas em PBS e o sedimento foi ressuspensão em 10 mL de tampão A. A mistura foi submetida a um ciclo de congelamento rápido em nitrogênio líquido e descongelamento a 37 °C para auxiliar a lise bacteriana. O lisado foi incubado a temperatura ambiente por 1 hora sob agitação constante. Após esse período, o lisado foi centrifugado (10.000 x g por 15 minutos a 4 °C) e o sobrenadante, incubado com 500 µL da resina Ni-NTA, previamente equilibrada no tampão A, a temperatura ambiente por 45 minutos.

A coluna contendo a proteína ligada foi submetida a sucessivas lavagens para retirada de proteínas ligadas inespecificamente. A primeira lavagem foi com tampão A (10

vezes o volume da resina); em seguida foram realizadas lavagem com tampão B (5 vezes o volume da resina) e lavagens com tampão C (2 vezes o volume da resina).

As proteínas recombinantes ligadas foram, então, eluídas com 1 mL de tampão de eluição, dialisadas em 1.000 volumes de PBS pH 7,5 contendo 0,1% de SDS a 4 °C durante 16 horas. As proteínas recombinantes purificadas foram analisadas em SDS-PAGE a 15%, quantificadas por análises espectrofotométricas e utilizadas como antígenos para obtenção de antisoros em camundongos.

Tabela 02: Composição dos tampões empregados para purificação da proteína recombinante.

Tampão	Composição
A	NaH ₂ PO ₄ 0,1 M; Tris-HCl 0,01 M pH 8,0
B	NaH ₂ PO ₄ 0,1 M; Tris-HCl 0,01 M pH 7,5
C	NaH ₂ PO ₄ 0,1 M; Tris-HCl 0,01 M pH 6,3
Eluição	NaH ₂ PO ₄ 0,1 M; Tris-HCl 0,01 M pH 4,5

4.14 Produção de anticorpos policlonais contra a proteína recombinante

As doses de antígenos administradas foram preparadas da seguinte maneira: 10 µg de proteína recombinante purificada foram emulsificadas com adjuvante de Freund (v/v).

Quatro camundongos Balb/C machos de 8 a 10 semanas de idade foram mantidos no Biotério de Experimentação do Centro de Ciências Biológicas (UEL), monitorado em ambiente com temperatura controlada, e com água e ração em livre demanda, durante todo o período de experimentação. Os animais receberam quatro inoculações subcutâneas do antígeno (10 µg) no dorso, com intervalos de uma semana cada. O soro foi coletado uma

semana após a última imunização, através da sangria por punção cardíaca, em condições estéreis. O soro foi cuidadosamente extraído por centrifugação a 6000 x g para eliminar eritrócitos, e posteriormente aliquotados e armazenados a -20 °C.

Este trabalho foi avaliado e aprovado pelo comitê de ética em Pesquisa Animal da Universidade Estadual de Londrina.

4.15 - Análise da expressão da proteína GFP em *T. cruzi* transformado, por ensaios do tipo “Western blot”

4.15.1 - Preparo do gel SDS-PAGE e eletrotransferência

Para análise do perfil de expressão de proteínas utilizamos o sistema de gel de SDS-poliacrilamida unidirecional. Assim, cerca de $1,0 \times 10^8$ parasitas transformados e não transformados foram centrifugados a 4.000 x g por 10 minutos a 4 °C, e lavados com PBS. Ao sedimento foi acrescentado 200 µL de PBS/tampão de amostra e submetido à fervura por 10 minutos. A corrida eletroforética foi realizada com diferença de potencial variável (50 a 80 V) durante 4 horas.

Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond C – GE Healthcare Life Sciences), conforme descrito por Sambrook e Russel (2001). A eletrotransferência foi realizada em Tris-HCl 25 mM pH 8,3; Glicina 192 mM e Metanol 20% (v/v) durante 16 horas a 4 °C, utilizando-se diferença de potencial de 20 V e amperagem constante.

4.15.2 – Detecção de proteína em “Western blot” usando o sistema de revelação por fosfatase alcalina

Para análises do tipo “Western blot”, a membrana foi incubada com PBS-Tween (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 4,3 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, Tween 20 0,05%)

contendo 5% de leite desnatado em pó (tampão de bloqueio), a temperatura ambiente por 2 horas. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes em 50 mL do tampão escolhido. Na última lavagem, anticorpo policlonal (1: 500) contra a proteína recombinante foi adicionado a um saco de hibridação e a incubação prosseguiu por 1 hora, nas mesmas condições. Após esse tempo, as membranas foram lavadas (5x) com PBS-Tween contendo 5% de leite e a seguir incubadas com anticorpo anti-mouse IgG (Promega) conjugado com fosfatase alcalina (1:7000) por aproximadamente 1 hora.

A revelação das proteínas ligadas ao anticorpo foi realizada após incubação com NBT (*nitroblue tetrazolium* 50 mg/mL) e BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyolphosphate 50 mg/mL) em tampão contendo Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM.

4.14 Microscopia eletrônica

4.14.1 Microscopia eletrônica de transmissão

Para as análises ultraestruturais o sistema de co-cultivo foi fixado com glutaraldeído 0,3%, formaldeído 4% e ácido pícrico 1% em tampão cacodilato 0,1 M pH 7,2 durante 2 h a temperatura ambiente (Berryman & Rodewald, 1990). Após a fixação, as células foram lavadas 3 vezes com tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2), pós-fixadas com uma mistura de tetróxido de ósmio (OsO₄) 1% contendo 0,8% de ferrocianeto de potássio. Foram mantidos no escuro por 30-60 min e lavados posteriormente por 3 vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Subseqüentemente, as células foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (50, 70, 80, 90, 95 e 100%) e incluídas em resina de Epon. O material foi acomodado em formas e colocado para polimerizar em estufa a 60 °C por 72 h. Cortes ultrafinos foram obtidos em um ultramicrotomo RMC e os cortes coletados em grades de cobre com 400 mesh, contrastado com acetato de uranila e citrato de chumbo e observado no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 900.

4.14.2 Microscopia eletrônica de varredura

Para a microscopia eletrônica de varredura, as células do co-cultivo foram coletadas por centrifugação a 3.000 x g por 60 segundos e fixadas em solução de glutaraldeído a 2%. Em seguida as amostras foram lavadas em tampão cacodilato 0,1 M e aderidas em chips com poli-L-lisina, desidratadas em concentrações crescentes de etanol (15, 30, 50, 70, 80, 90, 95, 100% e ultra-seco) durante 15 min cada uma. As amostras foram submetidas ao ponto crítico (BAL-TEC CPD 030), metalizadas com ouro e observadas em microscópio eletrônico de varredura SHIMADZU SS-550.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Até o momento, a reprodução sexual é um evento desconhecido em *T. cruzi*, assim, estudos empregando metodologias de genética clássica ficam limitados. Portanto o uso de genética reversa tem sido uma alternativa para a análise da função gênica e dos mecanismos de regulação da expressão de genes nesse parasita. Sistemas de transfecção têm sido utilizados para gerar mutantes nocauteados, introdução de genes repórter, sondas e mutantes dominantes recessivos (RAMIREZ *et al.*, 2000).

Como mencionado anteriormente, a eletroporação consiste na metodologia de transformação mais empregada em tripanosomatídeos (BELLOFATTO & CROSS, 1989; RUDENKO *et al.*, 1991; ZOMERDIJK *et al.*, 1991; WIRTZ *et al.*, 1994; KELLY, 1995; TYLER-CROSS *et al.*, 1995; WIRTZ & CLAYTON, 1995; BIEBINGER & CLAYTON, 1996; WIRTZ *et al.*, 1998; CLAYTON, 1999; WIRTZ *et al.*, 1999; SHI *et al.*, 2000; DA ROCHA *et al.*, 2004; ALIBU *et al.*, 2005). A eficiência dessa metodologia é influenciada por diversos fatores, como amplitude e potência do pulso elétrico, temperatura, conformação e concentração de DNA, e composição iônica do meio de cultura (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). Em alguns estudos que utilizaram a eletroporação do parasita, não se observou maior eficiência quando a concentração de DNA foi aumentada (RAMIREZ, *et al.*, 2000). Além disso, várias condições têm sido utilizadas, e estas diferem para cada espécie e entre laboratórios que trabalham com a mesma espécie de tripanosomatídeo (SWINDLE & TAIT, 1996; LI & GOTTESDIENER, 1996).

A transformação genética mediada por *A. tumefaciens* vem sendo utilizada para transferência de DNA, com sucesso, em diferentes organismos (MICHELSE *et al.*, 2005). O principal avanço que permitiu a utilização de *Agrobacterium* como mediador de transformação genética foi a descoberta de que a substituição dos oncogenes do T-DNA por genes de interesse não inibe o mecanismo natural de transferência. Dessa forma, a

primeira demonstração real de que a interação *Agrobacterium*-planta poderia resultar em sistemas eficientes de transformação foi a introdução do gene que confere resistência ao antibiótico canamicina em plantas de fumo (HERRERA-ESTRELLA *et al.*, 1983).

Os plasmídeos utilizados para sistemas de transformação via *Agrobacterium* são chamados de vetores desarmados, isto é, não possuem os oncogenes do T-DNA, mas conservam os genes de virulência (região *vir*). Os vetores podem ser divididos em dois sistemas: sistema cointegrado (sistema *in cis*) no qual os genes *vir* e o T-DNA modificado estão no mesmo *replicon* (ZAMBRYSKI *et al.*, 1983) e sistema binário (sistema *in trans*), onde o T-DNA modificado é mantido em um plasmídeo distinto do Ti (HOEKEMA *et al.*, 1983).

O sistema de vetores binários tem sido a estratégia mais utilizada na transformação via *Agrobacterium*. Esses vetores apresentam tamanho muito reduzido quando comparado ao plasmídeo Ti desarmado, facilitando sua manipulação *in vitro*. Além disso, possuem seqüências *ori*, marcadores de resistência a antibióticos e sítios únicos para endonucleases de restrição dentro da seqüência de T-DNA. Estas características permitem a manipulação do vetor binário em *E. coli* contendo praticamente qualquer seqüência clonada entre as bordas esquerda e direita. Atualmente existem várias construções de vetores binários, os quais variam em tamanho, sítios de restrição, marcador de seleção, origem de replicação e outras propriedades (KLEE, 2000).

Nesse trabalho, idealizamos a construção de um vetor binário para estudos de transformação de *T. cruzi* mediada por *A. tumefaciens*. O gene que codifica a proteína GFP (*green fluorescent protein*) de uma água viva, *Aequorea victoria*, foi inserido, visando sua utilização como repórter para a análise da expressão de genes *in vivo* (no parasita). A expressão dessa proteína (de aproximadamente 27 kDa) pode ser facilmente detectada por sua fluorescência emitida pelas células (RAMIREZ, 2000).

5.1 Construção do vetor binário

Para a construção do vetor foi utilizado o plasmídeo pPK2 (Figura 6). A digestão com as endonucleases de restrição *Eco* RI e *Hind* III permitiu a retirada de um fragmento de aproximadamente 4 kb, que contém o gene que codifica resistência a higromicina flanqueado pelas regiões de processamento 5' e 3' de genes constitutivos do fungo *Aspergillus nidulans*. O fragmento de aproximadamente 6,34 kb, contendo as bordas, direita e esquerda, foi utilizado para a construção do vetor binário de *T. cruzi*. Assim, a partir da borda direita foram introduzidos a região promotora para genes que codificam RNA ribossomais, os genes que codificam para GFP e o repressor da tetraciclina (TETREP) e flanqueados por regiões espaçadoras dos genes 35.2 e 35.1 que contém os sinais de processamento do RNAm. Além disso, contém o gene *neoR* que codifica resistência a neomicina, para selecionar as células transformadas (Figura 8).

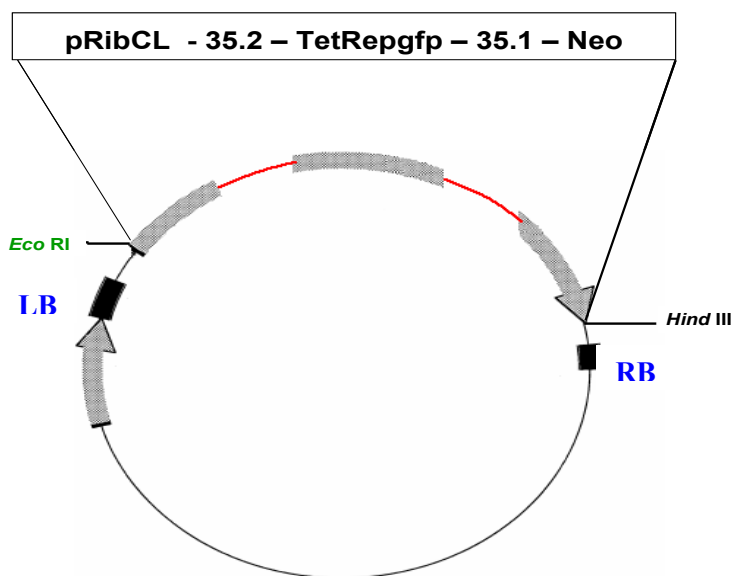


Figura 8. Representação esquemática do vetor binário pPK2gfpTetrep. A seta representa a direção da transcrição. A região de T-DNA, flanqueada pelas bordas direita (RB: *right border*) e esquerda (LB: *left border*), contém o gene repórter (*gfp*), o gene repressor da tetraciclina (*tetrep*) e o gene que codifica resistência a neomicina (*neo*) em tandem. **pRibCL**: região promotora do gene que codifica RNA ribossomal de *T. cruzi* cepa CL. Para a reação de processamento do RNAm foram adicionadas as regiões **35.2** à montante e **35.1** a jusante dos genes *gfp* e *tetrep*.

Até o momento, poucos promotores foram identificados em tripanosomatídeos. A transcrição de genes de SL-RNA de *Leptomonas seymouri* (GILINGER & BELLOFATTO, 2001) e *T. cruzi* são dependentes de uma RNA polimerase II. (DOSSIM & SCHENKMAN, 2005). Entretanto outros resultados mostram que a RNA polimerase I e promotores ribossomais podem ser usados para transcrever genes que codificam proteínas em tripanosomatídeos (RUDENKO *et al.*, 1991; ZOMERDIJK *et al.*, 1991; OTSU *et al.*, 1993; TYLER-CROSS *et al.*, 1995; BIEBINGER & CLAYTON, 1996; MARTINEZ-CALVILLO *et al.*, 1997; DOWNEY & DONELSON, 1999). Ensaio de transformação desses parasitas com vetores que não apresentavam seqüência promotora resultaram em baixos níveis de expressão de genes repórter (KELLY *et al.*, 1992). Estudos posteriores mostraram que a introdução de seqüências derivadas do promotor de RNAr nesses vetores, resultou em aumento (2 vezes) da expressão de genes exógenos em formas epimastigotas transformadas (TEIXEIRA *et al.*, 1995; TYLER-CROSS *et al.*, 1995; MARTINEZ-CALVILLO *et al.*, 1997).

Vários relatos mostram que a presença de sinais para as reações de processamento das extremidades 5' (*trans-splicing*) e 3' (poliadenilação) são suficientes para a expressão gênica em tripanosomatídeos (LEBOWITZ *et al.*, 1990; BELLOFATTO *et al.*, 1991; KELLY *et al.*, 1992; RAY & HINES, 1995; TETAUD *et al.*, 2001; AVLIYAKULOV *et al.*, 2003). Assim, no nosso trabalho, os genes *gfp* e *neoR* foram flanqueados com as regiões intergênicas 35.1 e 35.2 para permitir o processamento pós-transcricional e reconhecimento pela maquinaria de tradução do parasita.

Outros vetores para transformação em tripanosomatídeos utilizam um sistema de expressão indutível baseado no mecanismo de regulação do operon da lactose de bactérias. Nesse sistema, uma proteína repressora regula a atividade do promotor através de sua ligação a uma região operadora situada próxima ao promotor. A presença de um indutor, que interage com a proteína repressora, libera o sítio operador, tornando acessível

o promotor para a RNA polimerase, restaurando a expressão gênica (GRIFFITHS *et al.*, 1999).

Para a expressão regulada em tripanosomatídeos, a maioria dos vetores recruta a RNA polimerase do bacteriófago T7 e o repressor da tetraciclina (TETREP). Em bactérias Gram negativas, a resistência a tetraciclina é mediada pela proteína antiporter dependente de próton, embebido na membrana citoplasmática, aumentando o efluxo celular para a droga, em analogia ao operon da lactose em *E. coli*.

O gene *tetA* são regulados pela presença de tetraciclina na célula, que apresenta elevada afinidade pelo repressor (TETREP), removendo-o da região operadora permitindo assim a expressão da proteína (BERENS & HILLEN, 2003). Esse tipo de regulação já foi obtido com sucesso em tripanosomatídeos (WIRTZ *et al.*, 1994; WIRTZ & CLAYTON, 1995; WIRTZ *et al.*, 1998; WIRTZ *et al.*, 1999; SHI *et al.*, 2000; DA ROCHA *et al.*, 2004; ALIBU *et al.*, 2005).

Os plasmídeos recombinantes foram identificados através de PCR das colônias transformadas de *E. coli* (dados não apresentados) e *A. tumefaciens*, (Figura 9) utilizando oligonucleotídeos iniciadores para os genes *gfp* e *tetrep*.

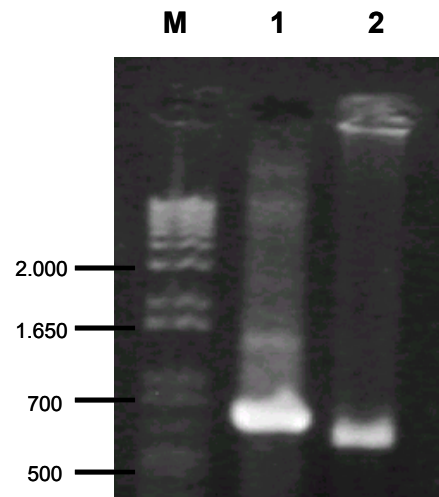


Figura 9- Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR utilizando células de *A. tumefaciens* transformada, corado com brometo de etídeo 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. M: marcador de peso molecular está indicado em kb. Linhas 1 e 2, amplificação do gene *gfp* e *tetrep*, respectivamente.

5.2. Determinação da concentração inibitória de neomicina

Uma vez que o marcador seletivo ao gene que confere resistência a neomicina (*neoR*), inicialmente foi avaliada a concentração dessa substância capaz de inibir o crescimento de formas epimastigotas de *T. cruzi* em meio de cultura LIT. A Figura 10 mostra o efeito de três concentrações de neomicina sobre o crescimento do parasita. A inibição do crescimento foi dependente da concentração do antibiótico utilizado, sendo observada nas concentrações de 500 e 700 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Uma vez que não foram observadas diferenças significativas de inibição entre estas concentrações foi, então, utilizado 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para selecionar as células transformadas de *T. cruzi*. Na menor concentração de neomicina (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) não houve inibição de crescimento nos diferentes tempos analisados.

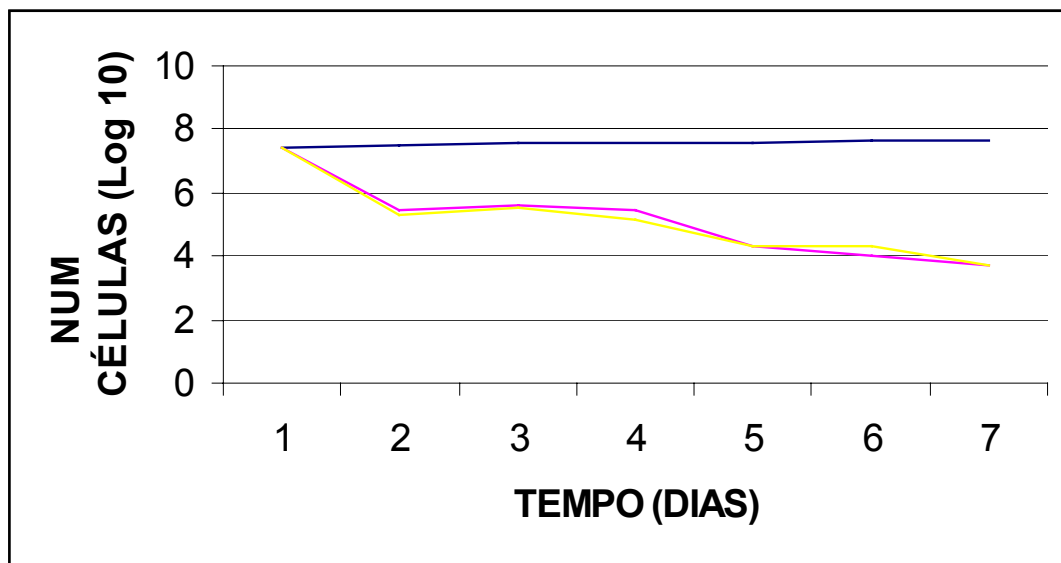


Figura 10 - Atividade do antibiótico neomicina sobre o crescimento de *T. cruzi*. Células em fase de crescimento exponencial foram inoculadas em meio LIT contendo diferentes concentrações de neomicina: 250 µg/mL (azul), 500 µg/mL (rosa) e 700 µg/mL (amarela). A contagem das células foi efetuada a cada 24 h e os valores expressos em Log 10 do número de células/mL.

Ramirez *et al.* (2000) mostraram que a concentração de neomicina capaz de inibir 50% do crescimento (atividade tripanocida) estava entre 400 e 800 µg/mL após 72-96 horas de incubação.

5.3 Análise do co-cultivo *T. cruzi* - *A. tumefaciens*

A variedade de tipos celulares que *A. tumefaciens* pode transformar é tido como uma das principais vantagens sobre outras metodologias de transformação. Células como leveduras, protoplastos, conídios, conídios germinados, basidiósporos, micélio e fragmentos do corpo de frutificação já foram transformados com esta metodologia (DE GROOT *et al.*, 1998; ZWIERS & WAARD, 2001; ABUODEH *et al.*, 2000). Entretanto, segundo estes autores, o número de transformantes obtidos via *Agrobacterium* pode variar quando são empregados diferentes tipos de células alvo.

A escolha do vetor binário adequado, assim como da linhagem bacteriana, pode ser decisiva para uma transformação genética eficiente. A eficiência das linhagens de *Agrobacterium* está diretamente associada ao *background* cromossômico e ao plasmídeo Ti desarmado (revisado por MICHIELSE *et al.*, 2005).

A gama de hospedeiros que o *Agrobacterium* pode infectar varia de acordo com a linhagem bacteriana. A base molecular que envolve a especificidade de hospedeiros ainda não foi completamente estabelecida, entretanto existem trabalhos indicando que genes do plasmídeo Ti desempenham um papel relevante no reconhecimento de hospedeiros (LOPER & KADO, 1979; THOMASHOW *et al.*, 1980). Segundo Gelvin (2003) os genes *virC*, *virF* e *virH* foram fundamentais na determinação das espécies vegetais susceptíveis à infecção e formação do tumor. Outros genes *vir*, incluindo *virG*, contribuem para a hipervirulência de algumas linhagens bacterianas. Entretanto, o processo de especificidade de hospedeiros é controlado por fatores genéticos múltiplos, tanto da bactéria quanto da célula hospedeira.

O reconhecimento e interação de *A. tumefaciens* com a célula hospedeira é uma etapa assencial no processo de transferência de T-DNA (MATTHYSSE *et al.*, 2000). Esta etapa marca o início da transferência de genes para sua hospedeira natural (célula vegetal) através de uma série de reações sinalizadoras relativas a expressão dos genes de virulência bacteriana. A importância da adesão entre células do par é reforçada pela observação de que interação entre mutantes de *A. tumefaciens* com fenótipo de aderência alterado e células vegetais não resultou na formação do tumor (GELVIN, 2000).

Desta forma, foi examinada a habilidade da linhagem AGL-1 de *A. tumefaciens* em interagir com células de *T. cruzi* durante o co-cultivo. Tal análise foi realizada empregando-se a microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. Como observado nas Figuras (11 e 12) houve formação de agregados de células de *Agrobacterium* ao redor de células de *T. cruzi*. A presença de tais agregados tem sido observada quando do estudo da

interação de *Agrobacterium* com células vegetais (hospedeira natural) (MATTHYSSE et al., 1981).

Na condição de co-cultivo testada, a interação celular entre *T. cruzi* e células de *A. tumefaciens* parece ter ocorrido pelo contato direto entre as células, pois não foi observada a presença de estruturas semelhantes a fímbrias (“fibril-like”). Já na interação com células vegetais, após a etapa de adesão, a bactéria sintetiza microfibrilas de celulose (genes *celABCDE*) que formam uma rede para ancorar o *Agrobacterium* à região de injúria no tecido vegetal. Esta rede de microfibrilas promove a agregação de muitas células bacterianas na superfície do hospedeiro (MATTHYSSE, 1983). Tais estruturas (“fibril-like”) foram também observadas na interação da linhagem AGL-1 de *Agrobacterium* com conídios e tubo germinativo do fungo filamentosso *Metarhizium anisopliae* (FURLANETO et al., 2005).

Exceto os dados relativos à adesão de *Agrobacterium* a células vegetais, são poucos os relatos de observação da interação do par durante o co-cultivo. Até o momento, esta análise foi descrita somente para *Streptomyces lividans* (KELLY & KADO, 2002) e células Hela (KUNIK et al., 2001; PELCZAR, et al., 2004)). Segundo Kunik et al. (2001) a interação de *Agrobacterium* – célula Hela é dependente dos mesmos fatores bacterianos (genes *vir*) relacionados à interação *Agrobacterium* - células vegetais.

Na quase totalidade dos trabalhos relativa à transformação de microrganismos por *Agrobacterium*, o co-cultivo foi conduzido sobre uma superfície sólida, tal como membrana de nitrocelulose. Esta condição foi testada em nosso trabalho, porém não foi observada transformação. Desta forma padronizou-se a transformação de *T. cruzi* empregando o co-cultivo em meio líquido.



Figura 11 - Microscopia eletrônica de varredura observado em JEOL-JSM-6340F Field Emission Scanning Eletron Microscope. As setas indicam a interação entre os microrganismos. Amplificação de 8.000 (1) e 30.000x (2). **(A)** *A. tumefaciens*, **(B)** *T. cruzi*.

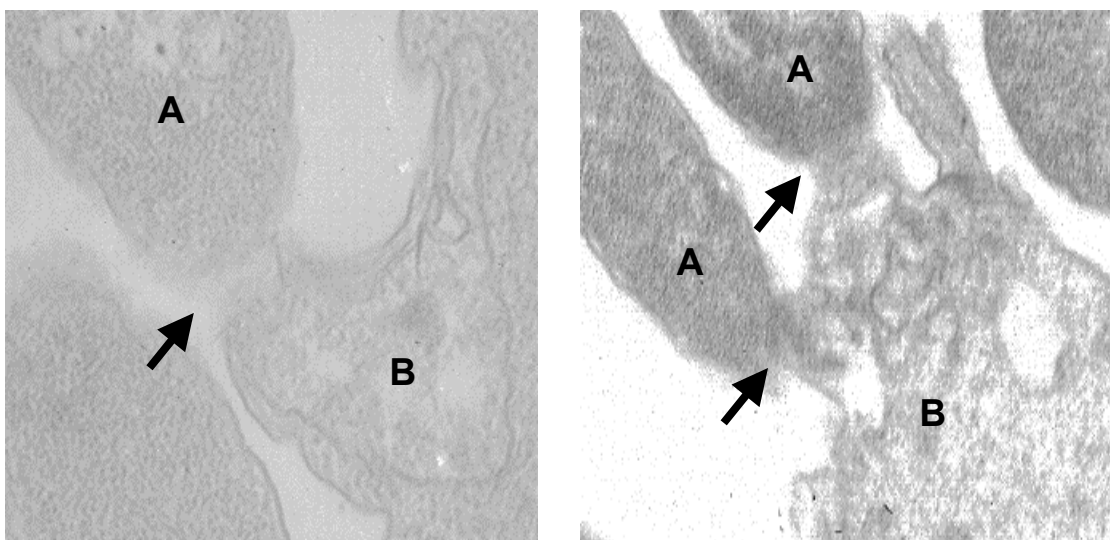


Figura 12 - Microscopia eletrônica de transmissão analisado em microscópio Zeiss 900. **(A)** *A. tumefaciens*, **(B)** *T. cruzi*. As setas indicam a interação entre os microrganismos. Amplificação de 12.000x.

Nos experimentos de transformação propriamente ditos, algumas variáveis durante o co-cultivo foram testadas, incluindo o tempo de incubação antes da adição de neomicina e a razão das células de *Agrobacterium* e *T. cruzi*. Tais variáveis têm sido relatadas como fundamentais para o estabelecimento de transformação via *Agrobacterium* (MICHIELSE *et al.*, 2005).

Quanto a primeira variável, diversos períodos foram analisados, compreendendo períodos curtos (1, 4 e 17 h) e períodos longos (40 e 50 h). Os melhores resultados foram obtidos nos tempos de 1-17 horas de co-cultivo, uma vez que em períodos mais longos, o crescimento bacteriano foi elevado em relação ao do parasita (observação microscópica).

Para a maioria das espécies fúngicas transformadas via *A. tumefaciens* o co-cultivo por 48 horas tem resultado em uma melhor eficiência de transformação (MULLINS *et al.*, 2001; RHO *et al.*, 2001; LEAL *et al.*, 2004). Entretanto, a extensão do tempo de co-cultivo pode resultar em um maior número de transformantes, como observado para a espécie *Hebeloma cylindrosporum* (COMBIER *et al.*, 2003). Em células vegetais o período de incubação do co-cultivo prévio à pressão seletiva pode variar de 6 a 24 horas, dependendo da espécie receptora (GELVIN, 2000), contudo, tem-se observado que muitos dias de co-cultivo diminuem a frequência de transformação.

Quanto a razão entre as células (*Agrobacterium* : *T. cruzi*) foram testadas três condições: 1:10, 1:1 e 10:1. O co-cultivo foi avaliado por observação microscópica, sendo que na razão celular 1:10, nos diferentes tempos de co-cultivo testados (1, 4 e 17 h), foi observado uma melhor condição de desenvolvimento do protozoário. As demais condições testadas não foram favoráveis ao crescimento do *T. cruzi*, o que pode ser resultado da competição microbiana pelo substrato.

A razão bactéria - célula receptora no co-cultivo é um fator determinante na eficiência de transformação. Normalmente, aumentando o número de células obtém-se um maior número de transformantes, como observado para as células fúngicas (ZWIERS &

WAARD, 2001; ROLLAND *et al.*, 2003; REIS *et al.*, 2004; ROGERS *et al.*, 2004; ZEILINGER *et al.*, 2004). Em contrapartida, determinadas concentrações de *A. tumefaciens* não aumentaram o número de transformantes, revelando uma saturação do sistema (COMBIER *et al.*, 2003; FANG *et al.*, 2004; GODIO *et al.*, 2004).

O efeito da temperatura também afeta a eficiência de transformação no co-cultivo para algumas espécies, sendo que a temperatura ótima de transformação varia entre 22 e 23 °C (ROLLAND *et al.*, 2003; COMBIER *et al.*, 2003; GARDINER *et al.*, 2004).

Outros fatores que podem interferir na eficiência da transferência são a presença ou não do agente indutor (AS) e a linhagem celular (LECLERQUE, *et al.*, 2004). A indução dos genes *vir*, pela presença de acetoseringona durante o co-cultivo, é um fator importante para a transformação (DE GROOT *et al.*, 1998). O pré-tratamento das células de *A. tumefaciens* com indutor antes do co-cultivo é uma estratégia utilizada para garantir a expressão dos genes *vir* antes da transformação. Embora acetoseringona seja importante durante o co-cultivo, o pré-tratamento das células com este composto não é um requisito para a transferência gênica. Embora, foram observadas diferenças na eficiência de transformação, no número de integrações do T-DNA (DEGEFU & HANIF, 2003; LECLERQUE *et al.*, 2003) e maior proporção de transformantes com múltiplas integrações (MULLINS *et al.*, 2001; RHO *et al.*, 2001) quando as células de *A. tumefaciens* sofreram o pré-tratamento. Um resultado controverso foi observado na transformação de *Hebeloma cylindrosporum*, onde o pré-tratamento com acetoseringona gerou menor número de transformantes e com integrações únicas do T-DNA (COMBIER *et al.*, 2003).

Covert *et al.* (2001) e Mikosch *et al.* (2001) relataram a ocorrência de algumas colônias fúngicas transformadas em meio sem acetoseringona. Porém, estas colônias não foram capazes de se desenvolver após várias passagens por meio seletivo, e, a maioria dos trabalhos relata a não ocorrência de transformantes na ausência de acetoseringona.

Nesse trabalho, foi testado o crescimento do parasita na presença e ausência de acetoseringona para verificar a ocorrência de possíveis efeitos desta substância sobre células de *T. cruzi*, tais como alterações morfológicas ou de crescimento. Após cultivo por um período de 1 a 50 horas não foi observada alteração no número e morfologia celular do protozoário. Dessa forma, o co-cultivo foi realizado somente na presença desse indutor. Foi também testado o crescimento e viabilidade da linhagem AGL-1 de *Agrobacterium* no meio LIT.

5.4 Análise dos transformantes de *T. cruzi*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* transformadas foram analisadas através de várias metodologias. A Figura 13 mostra os amplicons gerados a partir da PCR utilizando DNA genômico dos parasitas transformados e oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene *gfp* nos tempos 1, 4 e 17 horas de co-cultivo, após a quinta passagem em presença de pressão seletiva.

Com o objetivo de analisar se o amplicon do gene *gfp* não era proveniente de restos celulares de *A. tumefaciens*, presentes no co-cultivo, foi realizado a amplificação do gene para resistência a canamicina (*kan*). Vale ressaltar que esse gene não está presente na região do T-DNA. Não houve amplificação dessa seqüência a partir de células transformadas de *T. cruzi* (dados não mostrados) Dessa forma os produtos da PCR foram gerados a partir do gene inserido em *T. cruzi*.

Ramirez *et al.* (2000), utilizando uma construção com promotor ribossomal, mostraram que a expressão do gene luciferase em células epimastigotas de *T. cruzi* ocorria após 12 horas de eletroporação. Esses pesquisadores adicionaram 10% de sangue humano na cultura para manter o desenvolvimento dos parasitas transfectados.

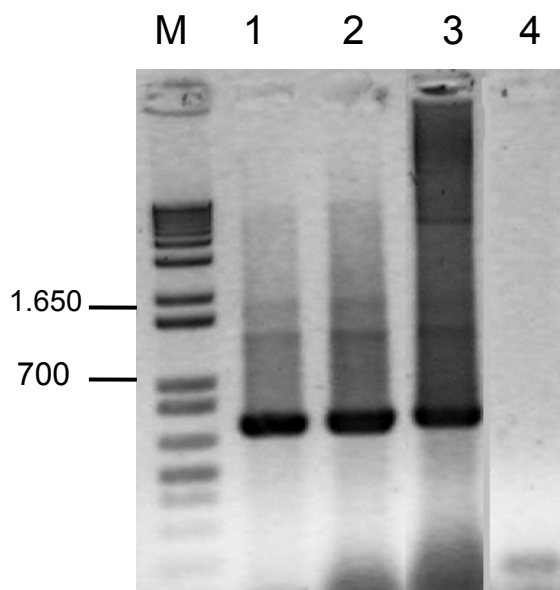


Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose dos clones recombinantes de *T. cruzi*. **M** : marcador de peso molecular está indicado em kb. Linhas 1, 2 e 3: produto da amplificação utilizando oligonucleotídeos iniciadores para o gene *gfp*, após a quinta passagem em pressão seletiva, nos tempos 1, 4 e 17 horas de co-cultivo, respectivamente. Linha 4: *T. cruzi* não transformado (controle negativo).

Como a transformação de *T. cruzi* foi realizada em meio líquido, a caracterização de um único clone para avaliar o padrão de integração ficou limitada. Assim, realizamos o ensaio de dot blot para confirmar a presença do gene nas células transformadas, como mostra a Figura 14. A sonda, nesse ensaio, corresponde ao gene *tetrep* e o DNA foi extraído dos cultivos celulares (5^o passagem), que correspondem ao co-cultivo de 1, 4 e 17 horas. Esses dados corroboram àqueles obtidos por PCR das células transformadas.

A análise do RNA total desses parasitas transformados através de ensaios do tipo Northern blot detectou um transcrito de aproximadamente 1,35 kb (Figura 15). O tamanho é compatível com a fusão dos genes *gfp* e *tetrep*, presentes na construção do plasmídeo.

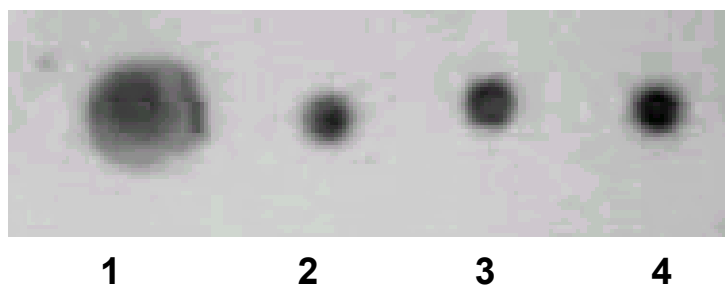


Figura 14 – Análise do tipo “Dot blot” de DNA genômico de *T. cruzi*. O DNA foi extraído de *T. cruzi* transformado após co-cultivo de 17 horas. (1) mini preparação do plasmídeo pPk2gfpTetRep (controle positivo); (2, 3 e 4) extração de DNA de diversos repiques celulares.

A transformação mediada por *A. tumefaciens* tem mostrado vantagens nos diferentes modelos biológicos analisados. Vários relatos mostram uma maior eficiência dessa metodologia para a obtenção de transformantes (De GROOT *et al.*, 1998; COVERT *et al.*, 2000). E ainda, é possível determinar o gene mutado aplicando a técnica de PCR inversa (*tail*-PCR), ao contrário do que ocorre com a mutagenese obtida por produtos químicos e radiações (MULLINS, *et al.*, 2001).

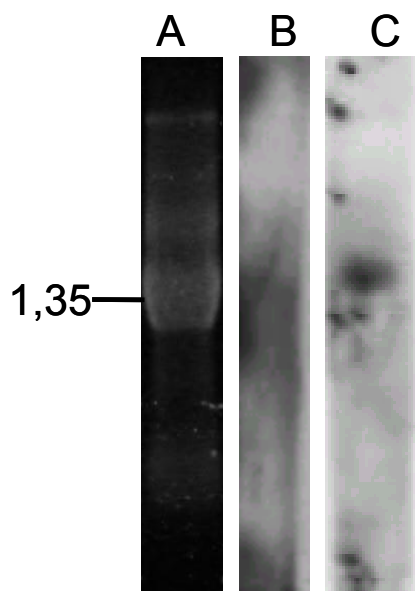


Figura 15 - Análise tipo “Northern blot” dos RNAs totais isolados de *T. cruzi* não transformado (painel B) e transformado (painel C). A hibridação foi realizada utilizando a sequência do gene *gfp*. Painel A: gel corado com brometo de etídio. O peso molecular está indicado em kb.

5.5 Expressão de GFP em *T. cruzi*

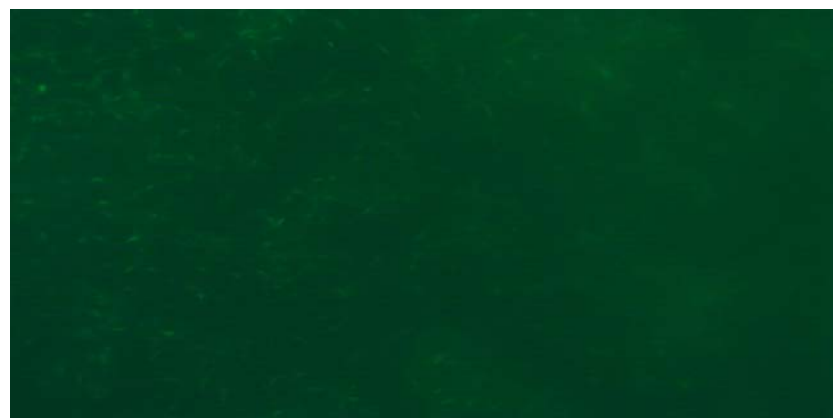
Uma das vantagens da utilização do gene *gfp* como repórter de sistemas de expressão reside na facilidade de observação do seu produto. Como mencionado anteriormente, a proteína GFP emite fluorescência após excitação em luz ultravioleta. Dessa forma, os parasitas transformados foram analisados em microscópio de fluorescência, como mostra a Figura 16.

Células transformadas após co-cultivo de 17 horas mostraram-se fluorescentes (Painel B e C) quando comparados com o controle não transformado (Painel A).

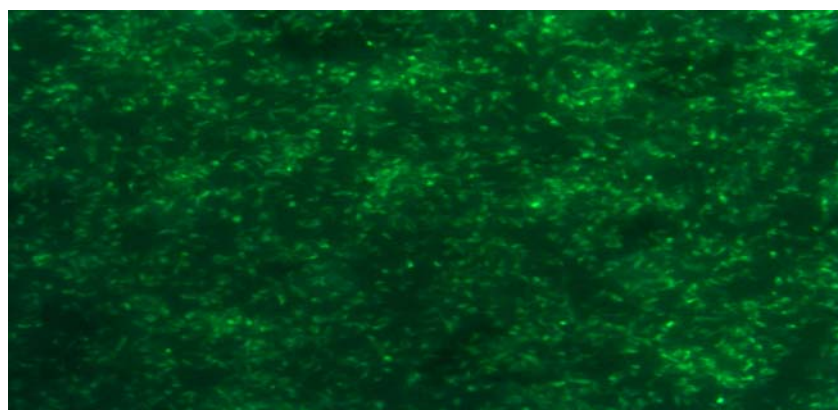
Ramirez *et al.* (2000), utilizaram um vetor para expressão de *gfp* em *T. cruzi*, sob controle do promotor para RNA ribossomal. Foi detectada a proteína GFP 24 horas após o procedimento de transformação.

Finalmente analisamos a expressão da proteína GFP em epimastigotas transformadas, através de ensaios do tipo Western blot utilizando anticorpo policlonal anti-GFP. Esse antisoro foi obtido através da imunização de camundongos com a proteína GFP purificada de *E. coli*. Assim, utilizamos o vetor pQE30 para expressão da proteína nessa bactéria.

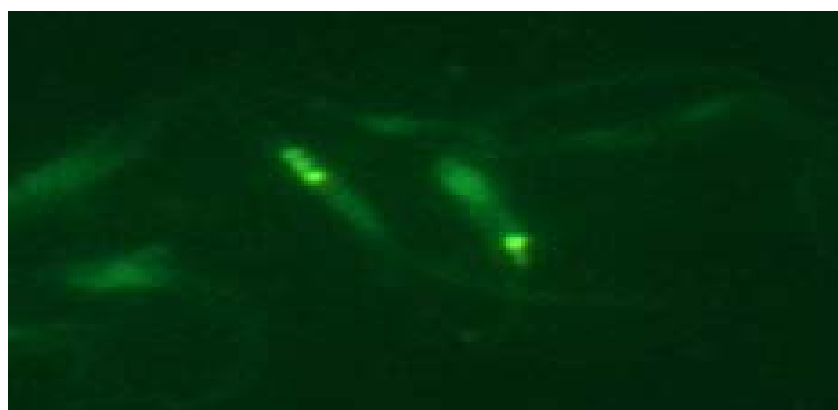
Os vetores da série pQE fornecem um alto nível de expressão, em bactérias, de proteínas contendo um motivo de seis resíduos consecutivos do aminoácido histidina (6xHis tag) na sua extremidade amino ou carboxiterminal. A proteína recombinante expressa nesse sistema, pode, então, ser purificada facilmente. A afinidade do motivo de histidinas pela resina permite a remoção de proteínas ligadas inespecificamente através de condições relativamente estridentes (CROWE *et al.*, 1995).



A



B



C

Figura 16 - Expressão da proteína GFP em *T. cruzi* usando o vetor binário pPK2gfpTetrep, observado em microscopia de fluorescência. (A) célula não transformada e (B e C) células transformadas após 17 horas de co-cultivo. Amplificação de 40x em A e B, e 100x em C.

O antisoro reconheceu um polipeptídeo de aproximadamente 27 kDa no extrato proveniente de formas epimastigotas transformadas que não está presente nas formas não transformadas (Figura 17). Como na construção não tivemos o cuidado de retirar o códon terminador da tradução de GFP, a seqüência de aminoácidos correspondentes ao gene *tetrep* não está presente no polipeptídeo detectado, justificando assim o tamanho do mesmo.



Figura 17 - Análise tipo “Western blot”, pela reação com antisoro derivado da proteína do gene *gfp*, do extrato protéico total de células de *T. cruzi*. Células não transformadas (1) e transformadas com o plasmídeo pPK2GfpTetrep (2). Os pesos moleculares do marcador estão indicados em kDa.

Um dos aspectos interessantes da metodologia de transformação mediada por *A. tumefaciens* é a ocorrência de integração aleatória somente da região de T-DNA em sítios únicos no genoma da célula hospedeira (BUNDOCK *et al.*, 1995; De GROOT *et al.*, 1998; COVERT *et al.*, 2000). Além disso, alguns autores utilizaram vetores binários contendo seqüências homólogas ao genoma da célula hospedeira para integração sítio-dirigida (GOUKA *et al.*, 1999; ZWIERS & De WAARD, 2001). Dessa forma, essa ferramenta pode

ser utilizada em ensaios de função gênica através de mutagênese insercional nos diferentes modelos biológicos (GARRICK *et al.*, 1998).

Em transformação do tipo epissomal, os plasmídeos não se integram no DNA genômico, podendo formar concatâmeros, o que sugere algum tipo de processamento para se manterem na célula hospedeira, com conseqüente aumento de gasto energético (RAMIREZ, 2000). E ainda envolvem a utilização de grande quantidade de plasmídeo, sendo que apenas 2%, ou menos, das células expressam os produtos de interesse. Somado a isto, há também a dificuldade na obtenção de produto de RNA para quantificação ou análise estrutural (CLAYTON, 1999). E a necessidade de manter o crescimento das células transformadas em presença de pressão seletiva.

6. CONCLUSÃO

Os nossos resultados mostraram que:

- a região do T-DNA de *A. tumefaciens* pode ser transferida para *T. cruzi*, sugerindo uma metodologia alternativa para estudos genéticos desse parasita e de outros membros da família Trypanosomatidae, e

- o vetor pPK2GFPTETREP, contruído para os estudos de transformação, mostrou-se eficiente na transferência de genes repórter.

Contudo, outros estudos são necessários para elucidação dos mecanismos envolvidos na transformação de *T. cruzi* mediada por *A. tumefaciens*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU-ARISH, A. et al. Three-dimensional reconstruction of *Agrobacterium* VirE2 protein with single-stranded DNA. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 25359-25363, 2004.
- ABUODEH, R. O. et al. Genetic transformation of *Coccidioides immitis* facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, p. 2106-2110, 2000.
- ALIBU, V.P. et al. A doubly inducible system for RNA interference and rapid RNAi plasmid construction in *Trypanosoma brucei*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 139, p. 75-82, 2005.
- ARMALEO, D. et al. A. Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. **Current Genetics**, v. 17, p. 97-103, 1990.
- AVLIYAKULOV, N.K.; HINES, J.C.; RAY, D.S. Sequence elements in both the intergenic space and the 3' untranslated region of the *Crithidia fasciculata* KAP3 gene are required for cell cycle regulation of KAP3 mRNA. **Eukaryot Cell**, v 2, p. 671-7, 2003.
- BARRET, M. P. et al. **The trypanosomiases**. *The Lancet*. v. 362, p. 1469-1480, 2003.
- BELLOFATTO, V.; CROSS, G.A. Expression of a bacterial gene in a trypanosomatid protozoan. **Science**, v 244, p. 1167-9, 1989.
- BELLOFATTO, V.; TORRES-MUÑOZ, J.E.; CROSS, G.A.M. Stable transformation of *Leptomonas seymouri* by circular extrachromosomal elements. **Proc Natl Acad Sci USA**, v 88, p. 6711-6715, 1991.
- BENNE, R.; et al. Major transcript of the frameshifted coxII gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. **Cell**, v 46, p. 819-826, 1986.

- BERENS, C.; HILLEN, W. Gene regulation by tetracyclines. Constrains of resistance regulation in bacteria shape tetR for application in eukaryotes. **Eur. J. Biochem.** V. 15, p. 3109-3121, 2003.
- BEVERLEY, S.M. Protozoomics: trypanosomatid parasite genetics comes of age. **Nature Reviews**, v. 4, p. 11-19, 2003.
- BIEBINGER, S.; CLAYTON, C. A plasmid shuttle vector bearing an rRNA promoter is extrachromosomally maintained in *Crithidia fasciculata*. **Exp Parasitol**, v 83, p. 252-8, 1996.
- BIEBINGER, S.; et al. The PARP promoter of *Trypanosoma brucei* is developmentally regulated in a chromosomal context. **Nucleic Acids Res.**, v 24, p. 1202-1211, 1996.
- BRENER, Z. ***Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas**. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan. 1992.
- BOLTRON, G.W.; NESTER, E.W.; GORDON, M.P. Plant phenolic compounds induce expression of the *Agrobacterium tumefaciens* loci needed for virulence. **Science**, v 232, p. 983-5, 1986.
- BUNDOCK, P. et al. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO Journal**, v. 14, p. 3206-3214, 1995.
- CAMARGO, E.P. Growth and diferenciation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic tryposomes in liquid media. **Revista do Instituto de Medicina. Tropical de São Paulo**, v. 6, p. 93-100, 1964.
- CHAGAS, C. Nova tripanosomíase humana. Estudo sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* gen.n.sp., agente etiolojico de nova entidade morbida no homem. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v 1, p. 159-218, 1909.
- CLAYTON, C.E. Genetic manipulation of Kinetoplastida. **Parasitol Today**, v 15, p. 372-378 , 1999.

- CITOVSKY, V.; et al. The molecular structure of *Agrobacterium* VirE2-single-stranded DNA complexes involved in nuclear import. **Journal of Molecular Biology** v. 271, p. 718-727, 1997.
- COMBIER, J. P. et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporium*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 220, p. 141–148, 2003.
- CONTRERAS, V.T.; et al. *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v 16, p. 315-327, 1985.
- COOPER, R.; INVERSO, J.A.; ESPINOSA, M.; NOGUEIRA, N. & CROSS, G.A.M. Characterization of a candidate gene for GP72, an insect stage-specific antigen of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v 49, p. 45-60, 1991.
- COVERT, S. F.; et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Fusarium circinatum*. **Mycological Research**, v. 105, p. 259-264, 2001.
- CULLY, D.F.; IP, H.S.; CROSS, G.A. Coordinate transcription of variant surface glycoprotein genes and an expression site associated gene family in *Trypanosoma brucei*. **Cell**, v 1, p. 173-182, 1985.
- Da ROCHA, W.D.; et al. Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, v 133, p. 175-86 , 2004.
- DE GROOT, M. J. et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. **Nature Biotechnology**, v. 16, p. 839–842, 1998.
- DEGEFU, Y.; HANIF, M. *Agrobacterium*- tumefaciens-mediated transformation of *Helminthosporium turcicum*, the maize leaf-blight fungus. **Archives of Microbiology**, v. 189, p. 279-284, 2003.

- DOSSIM, F. M.; SCHENKMAN, S. Actively transcribing RNA polymerase II concentrates on spliced leader genes in the nucleus of *T. cruzi*. **Eukaryot Cell**. V. 5, p. 960-970, 2005.
- DOWNEY, N.; DONELSON, J.E. Expression of foreign proteins in *Trypanosoma congolense*. **Mol Biochem Parasitol**, v 104, p 38-53, 1999.
- EL-SAYED, N.M. et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**. v 15, p. 409-15, 2005.
- FALASCA, C.A. et al. Chronic myocardial damage in experimental *Trypanosoma cruzi* infection of a new world primate Cebus sp. Monkey. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 32, p. 151-161, 1990.
- FANG, W. et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Beauveria bassiana* using an herbicide resistance gene as a selection marker. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 85, p. 18-24, 2004.
- FELGNER, P.L.; et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. **Proc Natl Acad Sci USA**, v 84, p. 7413-7417, 1987.
- FULLNER, K. J.; LARA, C. J.; NESTER, E. W. Pilus assembly by *Agrobacterium* T-DNA transfer genes. **Science**, v. 273, p. 1107-1109, 1996.
- FURLANETO, M.C. et al. Transformation of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* using T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens*. **Fungal Genetics Newsletter**, v 52, p. 208-208, 2005.
- GARDINER, D. M.; HOWLET, B. J. Negative selection using thymidine kinase increases the efficiency of recovery of transformants with targeted genes in the filamentous fungus *Leptosphaeria maculans*. **Current Genetics**, v. 45, p. 249-255, 2004.
- GARRICK D, et al. Repeat-induced gene silencing in mammals. **Nature Genetics**, v. 18, p. 56–59, 1998.

- GELVIN, S.B. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. **Annu. Rev. Plant. Physiol.** V 51, p. 223-256, 2000.
- GELVIN, S. B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: The biology behind the “Gene-Jockeying” tool. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 16-37, 2003.
- GILINGER, G.; BELLOFATTO, V. *Trypanosome* spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. *Nucleic Acids Res.* V. 29, p. 1556-1564, 2001.
- GHAI, J.; DAS, A. The *virD* operon of *Agrobacterium* Ti plasmid encodes a DNA relaxing enzyme. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, p. 3109-3113, 1989.
- GHEYSEN, G.; VILLARROEL, R.; VAN MONTAGU, M. Illegitimate recombination in plants: a model for T-DNA integration. **Genes & Development**, v. 5, p. 287-297, 1991.
- GODIO, R. P.; et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the antitumor clavarinic acid-producing basidiomycete *Hypholoma sublateritium*. **Current Genetics**, v. 46, p. 287-294, 2004.
- GOLDENBERG, S. *Trypanosoma cruzi* as a model system for studying cell differentiation. **Parasites: Molecular Biology, Drug and Vaccine Design**, p. 1-6, 1990.
- GONZALES-PERDOMO, M.; ROMER, P.; GOLDENBERG, S. Cyclic AMP and adenylate cyclase activators stimulate *Trypanosoma cruzi*. **Exp. Parasitol.**, v 66, p. 205-212, 1988.
- GOUKA, R.J. et al. Transformation of *Aspergillus awamori* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated homologous recombination. **Nat. Biotechnol.** v. 17, p. 598-601, 1999.
- GURTLER RE; SEGURA EL; COHEN JE. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, p.29-32, 2003.

- HALL, B.F., et al. Desialylation of lysosomal membrane glycoproteins by *Trypanosoma cruzi*: a role of the surface neuroaminidase in facilitating parasite entry into the host cell cytoplasm. **J. Exp. Med.** V. 6, p. 176, 312, 1992.
- HAMILTON, C. M.; et al. Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 9975–9979, 1996.
- HARA, T.; YASUDA, K.; FUKUMA, T. Effective gene transfer into *Trypanosoma burcei* bloodstream forms by particle bombardment. **Mol Biochem Parasitol**, v 119, p. 117-119, 2002.
- HAWES, M. C.; SMITH, L. Y.; HOWARTH, A. J. *Agrobacterium tumefaciens* mutants deficient in chemotaxis to root exudates. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 1, p. 182-186, 1988.
- HENRIKSSON J, et al. Karyotype variability in *Trypanosoma rangeli*. **Parasitology**. V. 112, p. 385-91, 1996.
- HENRIKSSON, J.; ASLUND, L.; PETTERSON, U. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Today**, v. 12, p. 108-114, 1996.
- HERRERA-ESTRELLA, L.; DEPICKER, A.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. Expression of chimeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid derived vector. **Nature**, v. 303, p. 209-213, 1983.
- HOEKEMA, A.; HIRSCH, P. R.; HOOYKAAS, P. J. J.; SCHILPEROOT, R. A. A binary vector strategy based on separation of *vir* and T region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. **Nature**, v. 303, p. 179-180, 1983.
- HOMSY, J.J.; GRANGER, B.; KRASSNER, S.M. Some factors inducing formation of metacyclic stages of *Trypanosoma cruzi*. **J. Protozool.**, v 36, p. 150-153. 1989.

HOOYKAAS, P. J. J.; BEIJERSBERGEN, A. G. M. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 32, p. 157-179, 1994.

<http://www.mnhn.fr/mnhn/bpph>. Acessado em 12 de Dezembro de 2005.

ISOLA, E.L.D.; LAMMEL, E.M.; GONZÁLEZ CAPPA, S.M. *Trypanosoma cruzi*: differentiation to metacyclic trypomastigotes in the presence of ADP-ribosyltransferase inhibitors. **Exp. Parasitol.** v 64, p. 424-429, 1987.

IVENS AC, et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**. v. 15, p. 436-42, 2005.

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

JUNQUEIRA, A. C.V.; DEGRAVE, W.; BRANDÃO, A. Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. **Trends in Parasitology**, v. 21, p. 2710-272, 2005.

JUN, Z. et al. The bases os crown gall tumorigenesis. **Journal of Bacteriology**. v 15, p. 3885-3895, 2000.

KELLY, J.M. *et al.* Phenotype of recombinant *Leishmania donovani* and *Trypanosoma cruzi* which over-express trypanothione reductase: sensitivity towards agents that are thought to induce oxidative stress. **Eur. J. Biochem.** V. 218, 29–37, 1993.

KELLY, J.M. Trypanosomatid shuttle vectors: new tools for the functional dissection of parasite genomes. **Parasitol Today**,11(12):447-51, 1995.

KLEE, H. A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. **Trends in Plant Science**, v. 5, p. 446-451, 2000.

KOLLIEN, A.H.; SCHAUB, G.A. The development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. **Parasitol. Today**, v 16, p. 381-387, 2000.

- KONCZ, C. et al. T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*. **Plan. Mol. Biol.** v 20, p. 963-976, 1992.
- KUNIK, T.; TZFIRA, T.; KAPULNIK, Y.; GAFNI, Y.; DINGWALL, C.; CITOVSKY, V. Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. **Proc Natl Acad Sci USA.** v 98, p. 1871-1976, 2001.
- LANA, M.; TAFURI, W.L. Em NEVES, D.P. *Parasitologia Humana*. 10^a ed. São Paulo: Ed Atheneu, p. 73-96, 2000.
- LEAL C. V.; MONTES B. A.; MESA A. C.; RUA A. L.; CORREDOR M.; RESTREPO A., MCEWEN J. G. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medical Mycology**, v. 42, p. 391-395, 2004.
- LEBOWITZ, J.H.; SMITH, H.Q.; RUSCHE, L.; BEVERLEY, S.M. Coupling of poly(A) site selection and *trans*-splicing in *Leishmania*. **Gene Develop**, v 7, p. 996-1007, 1990.
- LECLERQUE, A.; WAN, H.; ABSCHÜTZ, A.; CHEN, S.; MITINA, G. V.; ZIMMERMANN, G.; SCHAIRER, H. U. *Agrobacterium*-mediated insertional mutagenesis (AIM) of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Current Genetics**, v. 45, p. 111-119, 2004.
- LEE, K. Y.; LUND, P.; LOWE, K.; DUNSMUIR, P. Homologous recombination in plant cells after *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Cell**, v. 2, p. 415-425, 1990.
- LEHRACH, H. DIAMOND, D.; WOZNEY, J.M.; BOEDTKER, H. RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions: a critical reexamination. **Biochemistry**, v 16, p. 4743-4751, 1977.
- LI, F.; GOTTESDIENER, K.M. Na efficient method for stable transfection of bloodstream-form *Trypanosoma brucei*. **Nucleic Acids Research**, v. 24, p. 534-535, 1996.
- LIANG, X.; HARITAN, A.; ULIEL, S.; MICHAELI, S. Trans and cis Splicing in Trypanosomatids : mechanisms, factors and regulation. **Eukaryotic Cell**, v. 2, p. 830-840, 2003.

- LIPP-NISSINEN, K. H. Molecular and cellular mechanisms of *Agrobacterium*-mediated plant transformation. **Ciência e Cultura**, v. 45, p. 104-111, 1993.
- LOPER, J. E.; KADO, C. I. Host range conferred by the virulence specifying plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Bacteriology**, v. 139, p. 591–596, 1979.
- MACINA, R.A.; SANCHEZ, D.O.; AFFRANCHINO, J.C.; ENGEL, J.; FRASCH, A.C.C. Polymorphism within minicircle sequence classes in the kDNA of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 16, p. 61-74, 1985.
- MACK, K. D.; WEI, R.; ELBAGARRI, A.; ABBEY, N.; McGRATH, M. S. A novel method for DEAE-dextran mediated transfection of adherent primary cultured human macrophages. **J Immunol Methods**, v 211, p. 79-86, 1998.
- MARTINEZ-CALVILLO, S.; LOPEZ, I.; HERNANDEZ, R. pRIBOTEX expression vector: a pTEX derivative for a rapid selection of *Trypanosoma cruzi* transfectants. **Gene**, v 199, p. 71-76, 1997.
- MATTHYSSE, A. G. Role of bacterial cellulose fibrils in *Agrobacterium tumefaciens* infection. **Journal of Bacteriology**, v. 154, p. 906-915, 1983.
- MATTHYSSE, A. G.; KINJE, J. W. Attachment of *Rhizobiaceae* to plant cells. In: SPAINK, H. P., KONDOROSI, A. & HOOYKAAS, P. J. J. **The Rhizobiaceae**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 235-249, 1998.
- MATTHYSSE, A. G.; et al. A region of the *Agrobacterium tumefaciens* chromosome containing genes required for virulence and attachment to host cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1490, p. 208-212, 2000.
- MICHIELSE, C.B. et al. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. **Curr. Genet.** V 48, p. 1-17, 2005.

- MULLINS, E. D.; CHEN, X.; ROMAINE, P.; RAINA, R.; GEISER, D. M.; KANG, S. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. **Phytopathology**, v. 91, p. 173-180, 2001.
- MULLINS, E. D.; KANG, S. Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, p. 2043-5052, 2001.
- MULLINS, E.D. et al., *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum* : an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. **Phytopathology**, v. 91, p. 173-180, 2001.
- MYSORE, K. S.; NAM, J.; GELVIN, S. B. An *Arabidopsis* histone H2A mutant is deficient in *Agrobacterium* T-DNA integration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 948-953, 2000.
- NAIR, G. R.; LIU, Z.; BINNS, A. N. Reexamining the role of the accessory plasmid pAtC58 in the virulence of *Agrobacterium tumefaciens* strain C58. **Plant Physiology**, v. 133, p. 989-999, 2003.
- NAM, J.; MATTHYSSE, A. G.; GELVIN, S. B. Differences in susceptibility of *Arabidopsis* ecotypes to crown gall disease may result from a deficiency in T-DNA integration. **The Plant Cell**, v. 9, p. 317-333, 1997.
- OHBA, T. et al. DNA rearrangement associated with the integration of T-DNA in tobacco: an example for multiple duplications of DNA around the integration target. **Plant Journal**. v. 7, p. 157-164, 1995.
- OTSU, K.; DONELSON, J.E.; KIRCHHOFF, L.V. Interruption of a *Trypanosoma cruzi* gene encoding a protein containing 14-amino acid repeats by targeted insertion of the neomycin phosphotransferase gene. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v 57, p. 317-330, 1993.

- PARI, G. S.; XU, Y. Gene transfer into mammalian cells using calcium phosphate and DEAE-dextran. **Methods Mol Biol**, v 245, p. 25-32, 2004.
- PAULSSON, M.; WADSTROM, T. Vitronectin and type-I collagen binding by *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. **FEMS Microbiology and Immunology**, v. 2, p. 55-62, 1990.
- PAYS, E.; NOLAN, D.P. Expression and function of surface proteins in *Trypanosoma brucei*. **Mol Biochem. Parasitol**, v 91, p. 3-36, 1998.
- PELCZAR, P. et al. T-DNA mediated transgenes in Hela cells. **EMBO Journal**, v. 5, p. 633-637, 2004.
- POTRYKUS, T. et al. Molecular and general genetics of a hybrid foreign gene introduced into tobacco direct gene transfer. **Mol. Gen. Genetic**. v 199, p. 169-177, 1985.
- RAMIREZ, M.I. et al. The use of the green fluorescent protein to monitor and improve transfection in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 111, p. 235-240, 2000.
- RAY, D.S.; HINES, J.C. Disruption of the *Crithidia fasciculata* RNH1 gene results in the loss of two active form of ribonuclease H. **Nucleic Acids Res**. V. 23, p. 2526-2530, 1995.
- REIS, M. C.; et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, p. 197–202, 2004.
- REQUENA, J.M.; LOPEZ, M.C.; ALONSO, C. Genomic repetitive DNA elements of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Today**, v. 12, p. 279-282, 1996.
- REY, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitarias do homem nas Américas e na ASfrica. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

- RHO, H. S.; KANG, S.; LEE, H. Y. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecules and Cells**, v. 12, p. 407-411, 2001.
- ROGERS, C. W.; et al. Use of REMI and *Agrobacterium*-mediated transformation to identify pathogenicity mutants of the biocontrol fungus, *Coniothyrium minitans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 241, p. 207-214, 2004.
- ROLLAND, S.; et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Botrytis cinerea*, simple purification of monokaryotic transformants and rapid conidia-based identification of the transfer-DNA host genomic DNA flanking sequences. **Current Genetics**, v. 44, p. 164-171, 2003.
- RUDENKO, G.; CHUNG, H.M.M.; PHAM, V.P.; VAN DER PLOEG, L.H.T. RNA polymerase I can mediate expression of CAT and *neo* protein-coding genes in *Trypanosoma brucei*. **EMBO J.**, v 10, p. 3387-3397, 1991.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W., Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 3rd ed. 2001.
- SANFORD, J. C.; et al. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. **Particulate Science and Technology**, v. 5, p. 27-37, 1987.
- SCHENKMAN, S.; EICHINGER, D. *T. cruzi* trans-sialidase and cell invasion. **Parasitology Today**, v. 9, p. 218-221, 1993.
- SCHMUNIS GA.; MONCAYO, A. Interruption of Chagas' disease transmission through vector elimination. **Lancet**. v. 26, 1171-1178, 1996.
- SHAW, C. H.; et al. *virA* and *virG* are Ti-plasmid functions required for chemotaxis of *Agrobacterium tumefaciens* towards acetosyringone. **Molecular Microbiology**, v. 2, p. 413-417, 1988.

- SHENG, J.; CITOVSKY, V. *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. **The Plant Cell**, v. 8, p. 1699-1710, 1996.
- SHI, H.; DJIKENG, A.; MARK, T.; WIRTZ, E.; TSCHUDI, C.; ULLU, E. Genetic interference in *Trypanosoma brucei* by heritable and inducible double-stranded RNA. **RNA**, v 7, p. 1069-76, 2000.
- SILVEIRA, A.C. Current situation with Chagas disease vector control in the Americas. **Cad. Saúde Pública**, v 2, p. 35-42, 2000.
- SOLARI, A. J. Mitosis and genome partition in trypanosomes. **Biocell**. v. 19, p. 65-84. 1995.
- STUART, K.; ALLEN, T.E.; HEIDMANN, S.; SEIWERT, S.D. RNA editing in kinetoplastid Protozoa. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v 61, p. 105-120, 1997.
- STURN, N.R.; CAMPBELL, D. K. The role of intron structures in trans-splicing and cap4 formation for the *Leishmania* spliced leader RNA. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 19371-19367, 1999.
- STURN, N.R.; YU, M.C. Transcription termination and 3' end processing of the spliced leader RNA in kinetoplastids. **Molecular Cell. Biol.**, v. 19, p. 1595-1604, 1999.
- SWINDLE, J.; TAIT, A., 1996. Trypanosomatid genetics. *In: Molecular Biology of Parasitic Protozoa* by Deborah F. Smith & Marilyn Parsons, IRL Press, Oxford University Press.
- TARDIEUX, I., NATHANSON, M.H.; ANDREWS, N. Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*- induced cytosolic free-Ca transients. **Journal of Experimental Medicine**, v.179, 1017-1022, 1994.
- TEIXEIRA, S.M.R.; KIRCHHOFF, L.V.; DONELSON, J.E. Post-transcriptional elements regulating expression of mRNAs from amastin/tuzin gene cluster of *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.**, v 270, p. 22586-22594, 1995.

- TETAUD, E.; LECUIX, I.; SHELDRAKE, T.; BALTZ, T.; FAIRLAMB, A.H. A new expression vector for *Crithidia fasciculata* and *Leishmania*. **Mol Biochem Parasitol**, v 120, p. 195-204, 2001.
- THOMASHOW, M. F.; et al. Host range of *Agrobacterium tumefaciens* is determined by the Ti plasmid. **Nature**, v. 283, p. 794–796, 1980.
- TINLAND, B. The integration of T-DNA into plant genomes. **Trends in Plant Science**, v. 1, p. 178-184, 1996.
- TINLAND, B.; HOHN, B. Recombination between prokaryotic and eukaryotic DNA: Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA into the plant genome. **Genetic Engineering**, v. 17, p. 209-229, 1995.
- TYLER-CROSS, R.E.; SHORT, S.L.; FLOETER-WINTER, L.M.; BUCK, G.A. Transient expression mediated by the *Trypanosoma cruzi* rRNA promoter. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v 72, p. 23-31, 1995.
- UCROS, H.; GRANGER, B; KRASSNER, S.M. *Trypanosoma cruzi*: effect of pH on *in vitro* formation of metacyclic trypomastigotes. **Acta Tropica**, v 40, p. 105-112, 1983.
- VAINSTEIN, M.H.; ALVES, S.A.; De LIMA, B.D.; ARAGAO, J.L.; RECH, E.L. Stable DNA transfection in a flagellate trypanosomatid by microparticle bombardment. **Nucleic Acids Res**, v 22, p. 3263-3264, 1994.
- WAGNER, V. T.; MATTHYSSE, A. G. Involvement of a vitronectin-like protein in attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to carrot suspension culture cells. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 5999-6003, 1992.
- WAGNER, W.; SO, M. Genomic variation of *Trypanosoma cruzi*: involvement of multicopy genes. **Infection and Immunity**, v. 58, p. 3217-3224, 1990.

- WANG, K.; et al. Right 25 bp terminus of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. **Cell**, v. 38, p. 455-462, 1984.
- WATTS, J. W.; STACEY, N. J. Novel methods of DNA transfer. In: PEBERDY, J. F.; CATEN, C. E.; OGDEN, J. E.; BENNETT, J. W. **Applied Molecular Genetics of Fungi**. Cambridge University Press, Cambridge, New York, USA, 1990.
- WEISING, K.; KAHL, G. Natural genetic engineering of plant cells: the molecular biology of crown gall and hairy root disease. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 12, p. 327-351, 1996.
- WIRTZ, E.; HARTMANN, C.; CLAYTON, C. Gene expression mediated by bacteriophage T3 and T7 RNA polymerases in transgenic trypanosomes. **Nucleic Acids Res**, v 22, p. 3887-94, 1994.
- WIRTZ, E.; CLAYTON, C. Inducible gene expression in trypanosomes mediated by a prokaryotic repressor. **Science**, v 268, p. 1179-83, 1995.
- WIRTZ, E.; HOEK, M.; CROSS, G.A. Regulated processive transcription of chromatin by T7 RNA polymerase in *Trypanosoma brucei*. **Nucleic Acids Res**, v 26, p. 4626-34, 1998.
- WOOD, D. W.; et al. The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. **Science**, v. 294, p. 2317-2323, 2001.
- ZAMBRYSKI, P. C.; et al. Ti plasmid vector for introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. **EMBO Journal**, v. 2, p. 2143-2150, 1983.
- ZEILINGER, S. Gene disruption in *Trichoderma atrovirive* via *Agrobacterium*-mediated transformation. **Current Genetics**, v. 45, p. 54-60, 2004.
- ZIEMIENOWICZ, A. Odissey of *Agrobacterium* T-DNA. **Acta Biochimica Polonica**, v. 48, p. 623-635, 2001.

- ZINGALES, B., et al. Superface antigens of stocks and clones of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans. **Acta Trop.** v. 41, 5-16, 1984.
- ZOMERDIJK, J.C.B.M.; KIEFT, R. & BORST, P. Efficient production of functional mRNA mediated by RNA polymerase I in *Trypanosoma brucei*. **Nature**, v 353, p. 772-775, 1991.
- ZUPAN, J. R.; ZAMBRYSKI, P. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. **Plant Physiology**, v. 107, p. 1041-1047, 1995.
- ZWIERS, L. H.; WAARD, M. A. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene disruption in the phytopathogen *Mycosphaerella graminicola*. **Current Genetics**, v. 39, p. 388-39, 2001.