



Universidade de Brasília  
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

Dissertação de Mestrado

Divisão celular do *Trypanosoma cruzi*: o papel da subunidade TcSCC1 do complexo coesina e das proteínas centrininas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito à obtenção do grau de mestre em Patologia Molecular.

Agnelo Rodrigues de Souza

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Dolabela de Lima

Brasília, agosto de 2016

RAG271 Rodrigues de Souza, Agnelo  
d Divisão celular do Trypanosoma cruzi: o papel da subunidade TcSCC1 do complexo coesina e das proteínas centrinas / Agnelo Rodrigues de Souza; orientador Beatriz Dolabela de Lima. -- Brasília, 2016.  
77 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Patologia Molecular) -- Universidade de Brasília, 2016.

1. Trypanosoma cruzi. 2. expressão gênica. 3. centrina. 4. coesina. 5. transfecção transiente. I. Dolabela de Lima, Beatriz, orient. II. Título.

Dedico:

À minha mãe, Zenilda.

Às minhas filhas Kamilly e Paola.

À Sidineia.

## AGRADECIMENTOS

Quero deixar aqui registrado meus agradecimentos a pessoas queridas que fizeram parte dessa minha caminhada.

Aos meus queridos Profa. Dra. Beatriz Dolabela de Lima e Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart, gostaria de agradecer-los pela paciência que tiveram comigo, pelas experiências compartilhadas, pelas oportunidades proporcionadas durante todos esses anos de trabalho como aluno de iniciação científica e de mestrado.

À minha mãe por ter cuidado sempre dos seus filhos como uma guerreira e enfrentado todas as adversidades com muito entusiasmo e coragem. Pela educação e por sempre ter me apoiado em todas as minhas decisões acadêmicas e profissionais.

A Neinha, por conviver com todo meu *stress*, por todo esse período. Te Amo Muitão. Sem ela seria muito mais difícil.

Aos especiais do Laboratório de Biologia do Gene: Agenor de Castro por ter me ensinado e ajudado nos experimentos, Luanna, IC do Lab (nossa chefe), e Bianca por transmitir paz e harmonia.

A Laura Fernandes por sempre ajudar com positividade.

Ao Ricardo Camargo por ter ajudado no início da minha vinda para o LaBioGene.

A todos os professores que de alguma forma contribuíram muito na minha formação acadêmica.

A Helena Castanheira, primeira orientadora de IC a sofrer comigo.

Ao Prof. Magno Junqueira, segundo orientador de IC. Profa. Livia Goto, co-orientadora.

Às professoras de MEC e MEB, Zara Guimarães e Maria Rita Avanzi.

Aos antigos e novos amigos de laboratório de Bioquímica com quem tive a oportunidade de trabalhar e aprender juntos com todos: Rayner Queiroz, Humberto Jorge, Jaques Souza, Samuel Mandacaru, Arthur H. Pontes, Nicholas Mojana, Luis Janssen, Micaella Fonseca e Carol Toledo.

Às meninas da Izabela: Clênia Azevedo, Camila Lesse, Graziella Figueiredo, por dois anos de ótima convivência.

Aos meninos da Kelly Grace: Rafael e Raquel pela amizade firmada desde os tempos de graduação.

Ao meu grande amigo Raffael Araujo de Castro por me ajudar a mexer nos programas de referências automáticas e por sempre demonstrar preocupação comigo.

Aos professores da banca Tatiana Amabile de Campos, Wagner Fontes e Luis Henrique do Vale.

Ao Programa de Pós Graduação em Patologia Molecular e à CAPES pelo auxílio financeiro.

## ABREVIATURAS

APS – Persulfato de amônio

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

dNTP – Deoxinucleotídeos trifosfatos

EDTA – Ácido etileno-diamino-tetra-acético

kDNA –DNA mitocondrial dos cinetoplastídeos

kDa – kilodaltons

pb – Pares de Bases

PBS – Tampão Salina Fosfato

PCR – Reação de Polimerização em Cadeia

qPCR – PCR quantitativa

RT-PCR – Transcrição reversa acoplada à PCR

pH – Potencial Hidrogeniônico

RNA – Ácido Ribonucleico

SCC – Proteínas de Coesão das Cromátides-irmãs

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SDS-PAGE – Eletroforese Desnaturante em Gel de Poliacrilamida

SMC – Proteínas de Manutenção Estrutural dos Cromossomos

TEMED – N, N, N',N'-Tetrametiletilenodiamina

WHO – Organização Mundial da Saúde

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa da distribuição da doença de Chagas.....	1
Figura 2. Estimativa global dos casos de doença de Chagas.....	2
Figura 3. <i>Triatoma infestans</i> conhecido como barbeiro é uma espécie de inseto da família Reduviidae.....	3
Figura 4. Ciclo biológico do <i>T. cruzi</i> .....	4
Figura 5. A progressão do ciclo celular e arquitetura nuclear de organismos que apresentam divisão nuclear fechada.....	5
Figura 6. Modelo de dinâmica de cromossomos.....	6
Figura 7. Representação esquemática da dinâmica dos cromossomos, TcOrc/Cdc6 e TcPCNA no núcleo de <i>T. cruzi</i> .....	7
Figura 8. Modelo mostrando estrutura do complexo Coesina.....	8
Figura 9. Arquitetura das proteínas SMCs.....	10
Figura 10. Mapa físico e tamanho esperado dos genes de <i>T. cruzi</i> .....	20
Figura 11. Estratégia experimental geral utilizada neste trabalho.....	27
Figura 12. Estratégia experimental para a análise de citolocalização.....	28
Figura 13. Estratégia experimental para a análise de expressão no nível de mRNA dos genes para as proteínas TcSCC1 e TcCen1 a 5.....	29
Figura 14. PCR usando DNA genômico de <i>T. cruzi</i> .....	31
Figura 15. Vetor pGEM-T Easy e cultura de <i>E. coli</i> transformada por choque térmico.....	32
Figura 16. Análise do sítio de restrição interno.....	33
Figura 17. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio para conferir o perfil de restrição dos fragmentos amplificados e clonado no pGEM-T Easy.....	34
Figura 18. Eluição genes inseridos no pGEM-T Easy.....	35
Figura 19. Mapa físico do vetor pRTEGFP.....	36
Figura 20. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio para conferir o perfil de restrição dos fragmentos amplificados.....	37
Figura 21. Análise da Max prep obtida pelo Protocolo SS-LIS.....	38
Figura 22. Sequência obtida do plasmídeo pRTEGFPTcSCC1.....	40

Figura 23. Sequência obtida do plasmídeo pRTEGFPTcSCC1.....	41
Figura 24. Sequência obtida do plasmídeo pRTEGFPTcCEN2.....	42
Figura 25. Sequência obtida do plasmídeo pRTEGFPTcCen4.....	42
Figura 26. Sequência obtida do plasmídeo pRTEGFPTcCen5.....	43
Figura 27. Western blotting.....	44
Figura 28. <i>T. cruzi</i> na forma epimastigotas transfectado com o vetor pREGFP...	45
Figura 29. Imagens de microscópio confocal de fluorescência.....	46
Figura 30. Imagens de microscopia de fluorescência do <i>T. cruzi</i> .....	47
Figura 31. Imagens de microscopia de fluorescência do <i>T. cruzi</i> .....	47
Figura 32. Imagens de microscopia de fluorescência do <i>T. cruzi</i> .....	48
Figura 33. Análise dos níveis de mRNA nas três formas de <i>T. cruzi</i> .....	51



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proteínas centrinas e suas principais funções em eucariotos. ....	11
Tabela 2. Oligonucleotídeos com sítio de restrição para clonagem, utilizados para a amplificação de genes específicos de <i>T. cruzi</i> . ....	19
Tabela 3. Parâmetros de amplificação adotados para o gene <i>TcSCC1</i> . ....	19
Tabela 4. Os parâmetros de amplificação adotados para o gene <i>TcCENs</i> . ....	19
Tabela 5. Primers utilizados para PCR em tempo Real. ....	26
Tabela 6. Valor de Identidade e cobertura ( <i>query cover</i> ) do sequenciamento de cada gene em relação ao primeiro hit da cepa CL Brener a partir do nBLAST ....	39

## SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO .....	1
1.1 A doença de Chagas.....	1
1.2 Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> .....	4
1.3 Organização nuclear em <i>T. cruzi</i> .....	5
1.4 Organização nuclear em eucariotos superiores .....	7
1.5 O complexo coesina em leveduras e mamíferos .....	8
1.6 Proteína SCC1 em tripanossomatídeos.....	9
1.7 Proteínas SMCs .....	9
1.8 Proteínas centrinas .....	10
1.9 Justificativa .....	12
2. OBJETIVOS .....	14
2.1. Objetivo Geral .....	14
2.2. Objetivos Específicos .....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Material .....	15
Organismos e linhagens celulares utilizadas .....	15
Linhagens Bacterianas.....	15
Células HeLa.....	15
Trypanosoma cruzi.....	15
Meios de cultura:.....	15
Cultivos de bactérias.....	15
Meio LB (Luria-Broth).....	15
Meio 2YT.....	15
Meio SOB.....	15
Meio SOC.....	16
Cultivos de <i>T. cruzi</i> .....	16
Meio de cultura LIT .....	16
Meio de cultura para células HeLa.....	16
Meio DMEM (Gibco BRL #12100-046).....	16
Solução e tampões .....	16
Verseno (EDTA).....	16
PBS (1 X).....	17

Tampão PSG (1 X).....	17
Tampão TB para células competentes.....	17
Tampão de Lise (1X).....	17
Soluções para extração de DNA plasmidial .....	17
Solução I .....	17
Solução II .....	17
Solução III .....	17
Soluções para géis SDS-PAGE .....	17
Gel Separador 13%.....	17
Gel Concentrador 4%.....	17
Tampão de Corrida Tris-Glicina (5X) .....	17
Tampão de Amostra (2X) .....	18
Solução Corante Coomassie Blue .....	18
Tampão de transferência para Western Blot.....	18
Soluções para eletroforese em géis de agarose .....	18
Tampão TBE (10X) .....	18
Tampão de amostra (5X) .....	18
Brometo de Etídeo .....	18
3.2 MÉTODOS.....	18
Reação em cadeia da polimerase.....	18
Ligação dos genes no vetor pREGFP .....	20
Preparo de células competentes de <i>Escherichia coli</i> (Inoue et al., 1990) .....	20
Transformação de bactérias por choque térmico .....	21
Extração de DNA plasmidial de <i>E. coli</i> (Birnboim Doly, 1979) .....	21
Confirmação do perfil de restrição com as enzimas adequadas.....	21
Purificação dos fragmentos de DNA de gel de agarose.....	21
Clonagem dos genes TcSCC1 e TcCENs 2, 4, 5 no vetor para <i>T. cruzi</i> .....	22
Preparo de plasmídeos para transfecção em <i>T. cruzi</i> pelo método SS-LIS..	22
Sequenciamento de DNA plasmidial.....	23
Transfecção de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	23
Western Blotting.....	23
Microscopia Confocal.....	24
Preparo da resina.....	24

Purificação das culturas de tripomastigotas metacíclicos em coluna de troca iônica para extração de mRNA total das formas tripomastigota.....	24
Extrações de RNA total de <i>T. cruzi</i> e RT-qPCR.....	25
4. Estratégia Experimental .....	27
5. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	30
5.1 Amplificação por PCR dos genes ( <i>TcSCC1</i> , <i>TcCen1</i> , <i>TcCen2</i> , <i>TcCen3</i> , <i>TcCen4</i> e <i>TcCen5</i> ) do DNA genômico de <i>T. cruzi</i> .....	30
5.2 Análise de Restrição .....	32
5.3 Subclonagem dos genes <i>TcCEN2</i> , <i>TcCEN4</i> , <i>TcCEN5</i> e <i>TcSCC1</i> no vetor pRTEGFP .....	34
5.4 Perfil de restrição dos genes inseridos no vetor pRTEGFP .....	36
5.5 Sequenciamento dos genes inseridos (pRTEGFPTcSCC1, pRTEGFPTcCEN2, pRTEGFPTcCEN4 e pRTEGFPTcCEN5) e análises de bioinformática.....	38
5.6 Western blot.....	43
5.7 Microscopia de fluorescência.....	45
5.8 Análise dos níveis mRNA dos genes <i>TcSCC1</i> e <i>TcCEN1</i> a 5 por RT-PCR em tempo Real.....	49
CONCLUSÃO .....	52
PRÓXIMAS ETAPAS .....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

## RESUMO

Durante o processo de divisão celular os tripanossomatídeos e alguns microrganismos do reino *Fungi* mantém o núcleo intacto em um processo denominado de mitose fechada. Além disso, os tripanossomatídeos não apresentam condensação da cromatina e ocorre um alongamento do núcleo para acomodar os cromossomos já replicados. Em leveduras e metazoários, a manutenção das cromátides irmãs juntas durante a divisão celular até a sua separação na transição metáfase e anáfase é realizada pelo complexo coesina. Análise dos genomas de tripanossomatídeos mostrou que genes do complexo coesina e de proteínas centrinas estão presentes e são conservados. Para investigar a função da subunidade TcSCC1 do complexo coesina e das cinco proteínas centrinas preditas em *T. cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas, foram feitas clonagens dos genes *TcSCC1* e *TcCEN1* a 5. Para a análise de citolocalização dessas proteínas no parasita, os genes *TcSCC1*, *TcCEN2*, 4 e 5 foram subclonados no vetor de expressão transiente pRTEGFP que contém o promotor ribossomal, a região 5'UTR do gene para a amastina, o gene para a proteína fluorescente verde (EGFP) e a região 3'UTR do gene TCR27. A subclonagem foi realizada de modo que as proteínas de estudo foram expressas como fusão no N-terminal da EGFP. Esses plasmídeos foram utilizados em transfecção transiente e a expressão da EGFP com e sem as fusões proteicas foram visualizadas por microscopia de fluorescência. As centrinas 2, 4 e 5 e a subunidade TcSCC1 da coesina fusionadas com EGFP apresentaram uma localização predominantemente nuclear, embora não exclusivo, quando comparado com a EGFP sem fusão. Para verificar se as proteínas estudadas são expressas em *T. cruzi* foram realizadas análises de PCR quantitativa nas suas três formas de vida: amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas. Verificamos que todos os genes são expressos na forma de mRNA. As centrinas 2 e 5 apresentaram a maior expressão relativa nas três formas enquanto que as centrinas 1 e 3 apresentaram expressão equivalente à GAPDH em amastigotas e epimastigotas, mas em tripomastigotas uma expressão maior. A centrina 4 apresentou uma expressão relativa muito menor que a GAPDH e às outras centrinas nas três formas do parasita. Deste modo, concluímos que as cinco centrinas e a subunidade SCC1 são expressas em *T. cruzi* com uma possível localização nuclear.

Palavras-Chaves: *Trypanosoma cruzi*, expressão gênica, divisão celular, citolocalização.

## ABSTRACT

During cell division the trypanosomatids and some fungi microorganisms keeps the nucleus intact in a so-called closed mitosis. Furthermore, the trypanosomes do not show chromatin condensation and it occurs nucleus elongation to accommodate the replicated chromosomes. In yeast and metazoan, maintenance of sister chromatids together during cell division until their separation in metaphase and anaphase transition is performed by cohesin complex. Analysis of trypanosomatid genomes showed that genes for the cohesin complex and for centrin proteins are present and conserved. To investigate the function of TcSCC1 subunit of cohesin complex and the five predicted centrin proteins in *T. cruzi*, the causative agent of Chagas disease, cloning of the *TcSCC1* gene and all five *TcCEN* genes was performed. For cytolocalization analysis of these proteins in the parasite, TcSCC1 and TcCEN2, 4 and 5 genes were subcloned into the transient expression vector pRTEGFP that contains the ribosomal promoter, the 5'UTR region of the amastin gene, the gene for green fluorescent protein (EGFP) and the 3'UTR region of the TCR27 gene. Subcloning was performed so that the proteins were expressed as fusion proteins at the N-terminus of EGFP. These plasmids were used in transient transfection and expression of EGFP with and without the protein fusions were visualized by fluorescence microscopy. The centrin 2, 4 and 5 and TcSCC1 cohesin subunit fused to EGFP showed a predominantly nuclear localization, although not unique, when compared to EGFP without fusion. To verify that the studied proteins are expressed in *T. cruzi* quantitative PCR analysis was performed in its three forms of life: amastigotes, epimastigotes and trypomastigotes. We found that all genes are expressed as mRNA. The centrin 2 and 5 had the highest relative expression in three forms while centrin 1 and 3 had equivalent expression to GAPDH in amastigotes and epimastigotes, but higher expression in trypomastigotes. The centrin 4 showed a much smaller relative expression to GAPDH and the other centrin in the three forms of the parasite. Thus, we conclude that the five centrin and the SCC1 subunit are expressed in *T. cruzi* with a possible nuclear localization.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, gene expression, cell division, cytolocalization.

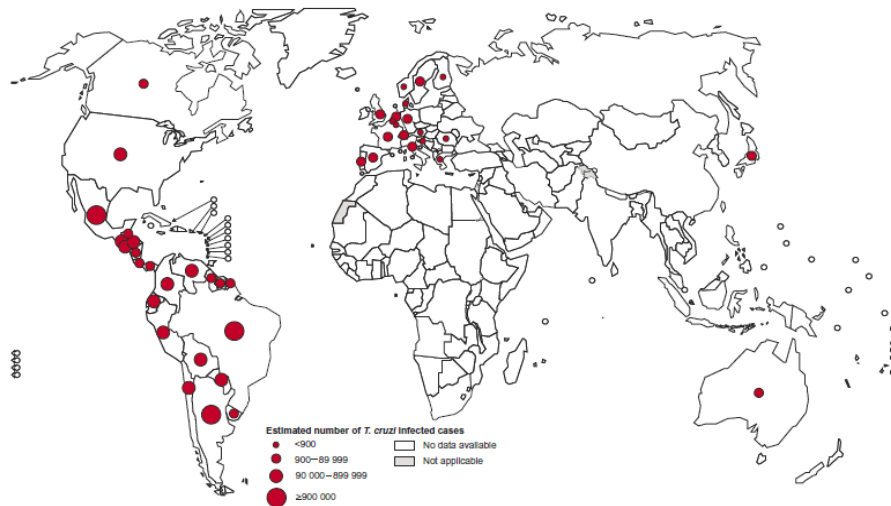
# 1.INTRODUÇÃO

## 1.1 A doença de Chagas

A doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana possui como agente etiológico o *Trypanosoma cruzi*, um protozoário flagelado pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Essa doença foi descrita pelo médico sanitário Carlos Chagas em 1909 (CHAGAS, 1909). É uma doença parasitária, sistêmica e crônica. O fator de risco da doença está fortemente ligado a situações socioeconômicas, considerada uma doença tropical negligenciada. É endêmica em 21 países nas Américas (Figura 1), embora as migrações de pessoas infectadas possam transportar a doença para países não endêmicos da América e do mundo (Figura 2).



Figura 1. Mapa da distribuição da doença de chagas, segundo a organização mundial da saúde (OMS) mostrando os principais países onde a enfermidade é endêmica.



**Figura 2. Estimativa global dos casos de doença de Chagas, com base em estimativas oficiais da Organização Mundial da Saúde (2005–2013).**

O parasita *T. cruzi* é transmitido para o homem principalmente pelas fezes infectadas do triatomíneo hematófago, conhecido como "barbeiro". *T. cruzi* pode infectar várias espécies de triatomíneos, a maioria das quais são encontrados nas Américas. Uma pessoa fica exposta ao parasito quando o inseto infectado deposita suas fezes na pele do hospedeiro humano durante a noite. O indivíduo, ao coçar a pele, provoca escoriações que facilitam a entrada do parasito.

Outras formas de transmissão são transfusão de sangue, congênita e transplante de órgãos. Com uma incidência anual de 28.000 casos na região das Américas, a doença de Chagas afeta cerca de 6 a 8 milhões de pessoas no mundo e provoca, em média, cerca de 12.000 mortes por ano. Embora a mortalidade tenha diminuído significativamente, a doença pode causar consequências irreversíveis em órgãos como o coração, sistema digestivo e sistema nervoso. Estima-se que 65 milhões de pessoas nas Américas vivam em áreas de exposição e estão em risco de contrair essa doença (OMS, 2016).

Nattha-Larrie (1921) comprovou a possibilidade da transmissão oral, infectando pequenos animais com sangue contendo tripomastigotas. Storino e Jorg (1994) mostraram experimentalmente a infecção de pequenos mamíferos por ingestão de moscas e baratas que estiveram em contato com fezes de triatomíneos contaminados.

Existem 112 espécies de insetos vetores para a doença de Chagas. Esses insetos estão presentes no continente americano, sendo que 12 dessas espécies recebem uma atenção especial devido a sua capacidade de invadirem e



procriarem dentro das moradias humanas. O *Triatoma infestans* é uma espécie de inseto da família Reduviidae, ocorrendo na Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai, Peru e Uruguai, espécie situada mais ao sul do continente, *Rhodnius prolixus* situado na América central (SILVEIRA, 2000)



**Figura 3** *Triatoma infestans* conhecido como barbeiro é uma espécie de inseto da família Reduviidae. Endêmico em regiões como Brasil, Bolívia, Peru, Chile, Argentina, Paraguai e Uruguai. *T. infestans* um dos vetores mais importante, pois tem uma ampla distribuição e é quase que exclusivamente intradomiciliar. No ambiente silvestre (somente na Bolívia) é encontrado em montes de pedras associado a ninhos de roedores. Após a implantação do Programa de Controle da Doença de Chagas no Brasil, foi praticamente eliminado do país. [http://www.cpqrr.fiocruz.br/laboratorios/lab\\_triato/TriatoInfestans.html](http://www.cpqrr.fiocruz.br/laboratorios/lab_triato/TriatoInfestans.html)

A doença de Chagas apresenta-se em duas fases. A fase inicial aguda tem a duração de cerca de dois meses após a infecção. Durante a fase aguda, um grande número de parasitas circula no sangue, mas na maioria dos casos, os sintomas estão ausentes ou leves. Em menos de 50% das pessoas picadas por um inseto triatomíneo, os primeiros sinais visíveis característicos podem ser uma lesão de pele ou um inchaço arroxeadado das pálpebras. Além disso, eles podem apresentar febre, dor de cabeça, gânglios linfáticos aumentados, palidez, dor muscular, dificuldade em respirar, inchaço e dor abdominal ou torácica. Na fase crônica, os parasitas estão escondidos principalmente no coração e músculos. Até 30% dos pacientes sofrem de distúrbios cardíacos e até 10% sofrem de distúrbios digestivos (tipicamente alargamento do esôfago ou do cólon), ou alterações mistas. Nos anos posteriores, a infecção pode levar à morte súbita ou insuficiência cardíaca causada por destruição progressiva do músculo cardíaco e seu sistema nervoso (OMS, 2016).

## 1.2 Ciclo de vida do *T. cruzi*

*T. cruzi* tem um ciclo de vida complexo com características que dependem do ambiente em que o parasito se encontra. O ciclo biológico do *T. cruzi* é heteroxênico, ou seja, ele possui hospedeiro definitivo e intermediário possibilitando que o parasito passe por uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado e extracelular no vetor.

Na forma vetorial da transmissão, tripomastigotas metacíclicos do protozoário são liberadas junto às excretas dos triatomíneos através da pele lesada ou das mucosas do ser humano, durante ou logo após o repasto sanguíneo. Esse meio de transmissão ocorre exclusivamente no continente americano, e em outros continentes o modo de transmissão é por transfusão sanguínea e horizontal (OMS, 2016).

Os tripomastigotas circulantes alcançam a corrente sanguínea e podem parasitar outras células de qualquer tecido ou órgão para cumprir novo ciclo celular. Dentro dos vetores, a forma tripomastigota migra e, em seu intestino, converte-se em epimastigota. Esta multiplica-se por divisão binária e origina a tripomastigotas metacíclica na porção final do intestino do inseto (OMS, 2016).

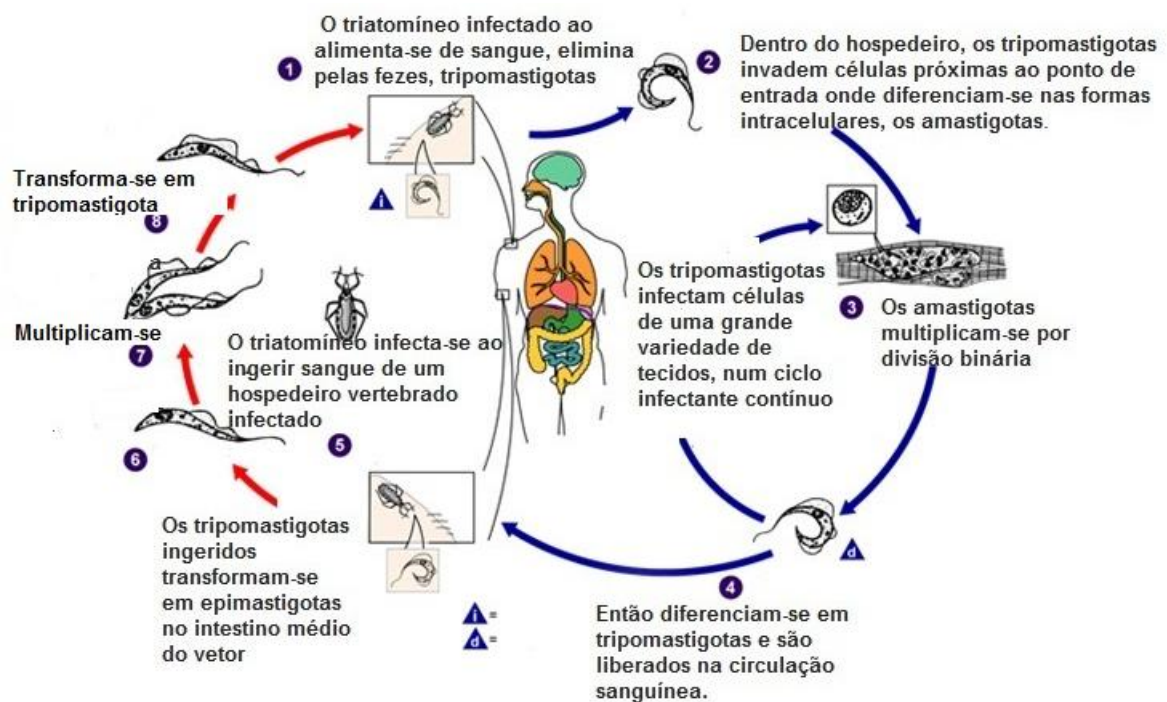
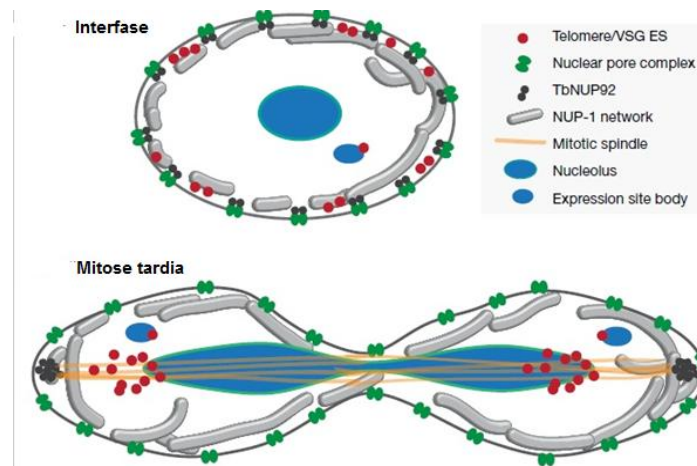


Figura 4 Ciclo biológico do *T. cruzi* no interior do inseto vetor e do mamífero (adaptado OMS, 2016).

### 1.3 Organização nuclear em *T. cruzi*

A presença do núcleo em organismos caracteriza o domínio Eukarya. O núcleo compartimentaliza o material genético envolvido por uma membrana dupla chamada envelope nuclear. Em *T. cruzi*, a membrana nuclear permanece intacta durante todo o processo de divisão caracterizando uma mitose fechada (ALSFORD et al., 2012; SOLARI, 1995).

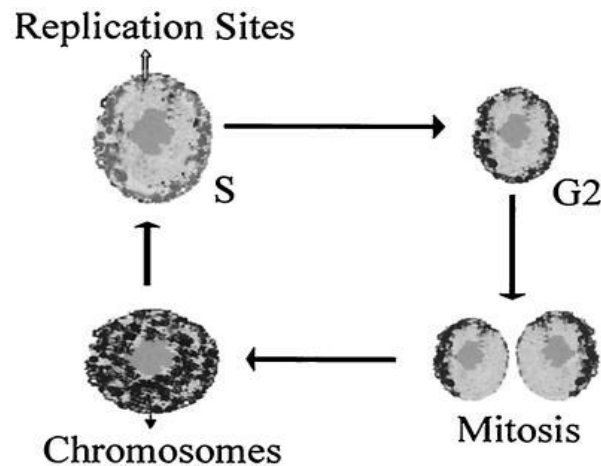
O significado e função dessa organização aumentou com a compreensão da transcrição, replicação, reparo de DNA e processos de recombinação. O *T. cruzi* é um eucarioto que divergiu precocemente na árvore filogenética, apresenta eventos únicos e/ou reduzidos de replicação do DNA, transcrição e reparação, bem como processamento de RNA e transporte para o citoplasma (ELIAS; NARDELLI; SCHENKMAN, 2009).



**Figura 5 A progressão do ciclo celular e arquitetura nuclear de organismos que apresentam divisão nuclear fechada.** Painel superior mostra o *T. brucei* em estágio em que se encontra na corrente sanguínea esquema mostrando o núcleo, com foco no complexo do poro nuclear (NPC) representado em verde. Tubos cinza representa proteína lâmina putativa NUP-1. E o posicionamento dos telômeros em vermelho em pequenos aglomerados na periferia nuclear. Um único nucléolo e um corpo local de expressão (ESB) são mostrados, ambos contendo subunidades RNA Pol I em azul, e no caso de o ESB, um VSG ativo e região telomérica associado. Observe a presença de NUP92 em *T. brucei*, um provável componente da cesta nuclear no NPC (cinza escuro). Painel inferior mostra o núcleo em uma mitose tardia, onde os telômeros está com a migração quase concluída a partir do meio do corpo nuclear para os polos opostos dos núcleos filhos (ALSFORD et al., 2012).

A localização e alterações dos cromossomos no núcleo de *T. cruzi* estão de acordo com o ciclo celular. Os cromossomos estão distribuídos principalmente no interior do núcleo dos parasitas em formas não replicativas e em células em fase G1 do ciclo celular. Os sítios de replicação, que são sequências de DNA reconhecidas por complexos proteicos que estão envolvidos na replicação dos

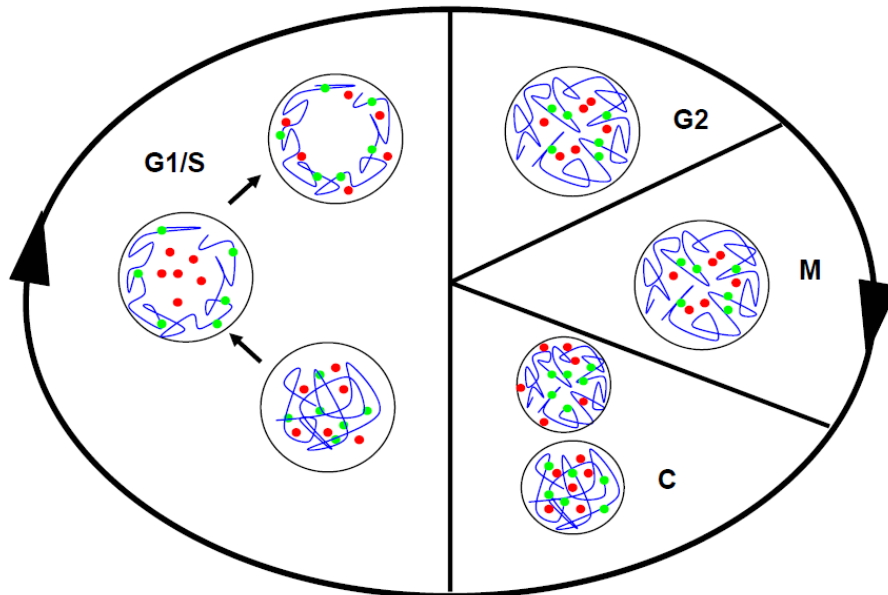
cromossomos, aparecem no início da fase S na periferia nuclear. Portanto, estas alterações de posição indicam que os cromossomos de *T. cruzi* se movem durante o ciclo celular e replicam-se na periferia nuclear, tal como ilustrado na Figura 6. Vários resultados experimentais mostraram que os cromossomos de *T. cruzi* são distribuídos de forma diferente nas fases sequenciais do ciclo celular (ELIAS et al., 2002).



**Figura 6. Modelo de dinâmica de cromossomos durante o ciclo celular de *T. cruzi*.** Na fase G1, cromossomas são encontrados dispersos no núcleo. Durante a fase de replicação do ciclo celular, os cromossomos ficam retidos na periferia nuclear (ELIAS et al., 2002).

Por microscopia confocal de fluorescência, como ilustrado na figura 5, foi observado que a replicação do DNA em *T. cruzi* inclui o recrutamento sequencial de complexo proteico envolvido na pré-replicação e replicação. Esses complexos situam próximo da periferia nuclear ou distante dependendo do momento da divisão celular. No momento da replicação do DNA a dinâmica dos complexos proteicos envolvidos na pré-replicação TcOrc1/Cdc6 e replicação TcPCNA foram determinadas em dois padrões: periférico e disperso. Após a divisão, as células entram na fase G1 e TcOrc1/Cdc6 e TcPCNA estão dispersos por todo o espaço nuclear, excluindo a região do nucléolo (CALDERANO et al., 2011). As estruturas nucleares, apesar de não serem delimitadas por membranas, são compartimentalizadas, identificando-as como território cromossomal e intercromatina em células de mamíferos (CREMER et al., 2000). Os cromossomos são organizados nesses locais de forma que não se tornem emaranhados uns

com os outros e esta organização é conseguida, pelo menos em parte, pela ligação de domínios cromossomais a sítios específicos no envelope nuclear ou lâmina nuclear (ALBERTS et al., 2004; SPADILERO et al., 2002; PICCHI, 2006).



**Figura 7. Representação esquemática da dinâmica dos cromossomos, TcOrc/Cdc6 e TcPCNA no núcleo de *T. cruzi* durante o ciclo celular.** Em azul cromossomos, em verde TcOrc/Cdc6 e em vermelho TcPCNA. TcOrc/Cdc6 permanece ligada ao DNA durante todo ciclo celular. No início de G1/S cromossomos, TcOrc/Cdc6 e TcPCNA encontram-se dispersos pelo núcleo. Cromossomos e TcOrc/Cdc6 migram para periferia nuclear enquanto TcPCNA permanece disperso. Ao entrar em S TcPCNA vai para periferia onde o DNA será duplicado. Nas demais fases G2, M (mitose) e C (citocinese) cromossomos, TcOrc/Cdc6 e TcPCNA estão dispersos pelo núcleo. (CALDERANO et al., 2011).

#### 1.4 Organização nuclear em eucariotos superiores

O núcleo eucariótico é altamente organizado, apresentando a membrana nuclear que separa o meio nuclear do meio citoplasmático, como um compartimento termodinamicamente aberto. No meio nuclear ocorre o metabolismo dos ácidos nucleicos, e são compartimentos funcionais onde a maquinaria necessária para que estes processos ocorram se encontra. Desta forma estes processos podem ser realizados em regiões nucleares específicas durante determinada fase do ciclo celular (LAMOND; SPECTOR, 2003; MISTELI, 2005). Da mesma maneira que os processos nucleares estão organizados, o DNA também se organiza neste espaço nuclear, primeiramente por meio da sua compactação exercida pelas histonas e outros complexos proteicos de

manutenção como a coesina e a condensina formando a cromatina e segundo pela distribuição não aleatória dos cromossomos, havendo territórios estabelecidos de localização dentro do núcleo (CREMER et al., 1982).

### 1.5 O complexo coesina em leveduras e mamíferos

Em eucariotos, antes do início da divisão celular ou mitose, cada cromossomo é replicado e consiste em duas cromátides idênticas. Essas cromátides-irmãs são mantidas unidas ao longo de seu comprimento por proteínas coesivas. Durante a mitose essas proteínas são clivadas e as cromátides-irmãs se separam e tornam-se cromossomos-filhos independentes, os quais são puxados para os polos opostos da célula pelo fuso mitótico. Um grande complexo de proteínas em forma de anel chamado coesina serve para manter juntas as duas cromátides irmãs (Figura ). O complexo coesina tem a função de orientar a correta adesão dos microtúbulos ao fuso mitótico, garantindo assim a exata segregação (NASMYTH; HAERING, 2005). Em *Saccharomyces cerevisiae*, o complexo é composto de quatro subunidades principais: Smc1, Smc3, Scc1 e Scc3 (HIRANO, 2002). A coesina é montada antes da replicação do DNA e está presente no centrômero e nos braços dos cromossomos onde depende de outras proteínas como as Scc2 e Scc4 que parecem auxiliar na montagem do complexo. Em *T. cruzi*, experimentos de detecção imunológica demonstraram a presença da subunidade Scc1 do complexo coesina em amastigotas (Ferreira, 2011).

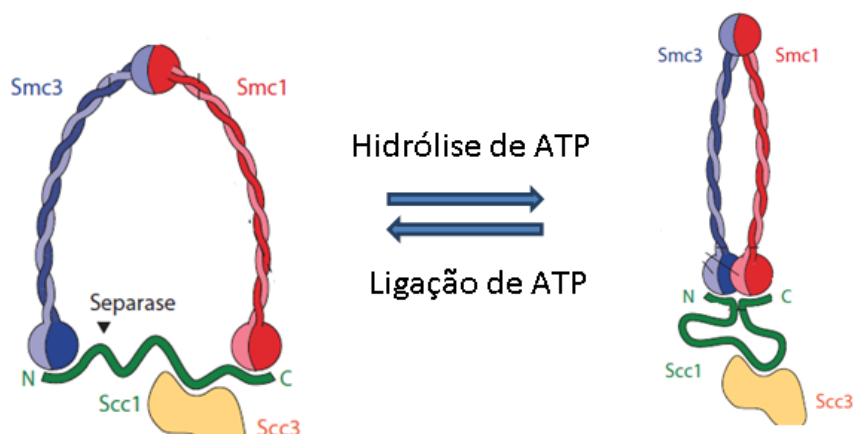


Figura 8. Modelo mostrando estrutura do complexo Coesina. As subunidades Smc1 (vermelho) e Smc3 (azul) formam super-hélices paralelas, que se ligam através dos domínios de dobradiça. A extremidade C-terminal da Scc1 (verde) se liga ao domínio globular da Smc1 e a extremidade N-terminal se liga ao domínio globular da Smc3,

formando o anel. A subunidade Scc3 (amarelo) se liga à extremidade C-terminal da Scc1. Os sítios de clivagem pela separase estão indicados (adaptado de NASMYTH; HAERING, 2009).

## 1.6 Proteína SCC1 em tripanossomatídeos

Em *Trypanosoma brucei* a subunidade do complexo coesina TbSCC1 é expressa antes da síntese de DNA em G1, permanecendo no núcleo ao longo da fase S e G2 do ciclo celular e desaparecendo em anáfase. Silenciamento da TbSCC1 por RNAi ou expressão de uma proteína TbSCC1 não clivável resultou na ausência de segregação dos cromossomos. As células de *T. brucei* que progrediram para a citocinese ficaram defeituosa, prevalecendo células com mais de dois núcleos e células sem núcleo. Duplicação e segregação do cinetoplasto também foi afetada (GLUENZ et al., 2008).

## 1.7 Proteínas SMCs

Para identificar proteínas com uma função de organização cromossomal em tripanossomatídeos, os genomas de *T. brucei* (BERRIMAN et al., 2005) e *Leishmania major* (IVENS et al., 2005) foram consultados em bancos de dados e foram encontrados componentes do complexo SMC.

SMCs são proteínas de manutenção estrutural dos cromossomos. As células eucarióticas têm pelo menos seis proteínas SMCs. Essas proteínas formam três heterodímeros diferentes (Figura) com funções especializadas. Um par de SMC1 e SMC3 constitui as subunidades principais dos complexos coesina envolvidos na coesão de cromátides irmãs e permitindo a correta segregação (MICHAELIS et al., 1997. GUACCI et al., 1998. LOSADA et al., 1998). Do mesmo modo, um par de SMC2 e SMC4 atua como núcleo dos complexos condensina implicados na condensação física dos cromossomos (HIRANO et al., 1997; ONO et al., 2003). Outro dímero composto por SMC5 e SMC6 forma um complexo com parte de sua função ainda desconhecida, tendo como uma de suas funções o reparo de DNA em vertebrados (FOUSTERI et al., 2000). Cada complexo contém um conjunto distinto de subunidades reguladoras não SMC. Alguns organismos têm variantes de proteínas SMC. Por exemplo, os mamíferos têm uma variante de SMC1 específica da meiose, conhecido como SMC1 $\beta$ . As leveduras

*Schizosaccharomyces pombe* têm uma SMC4 variante que tem uma função especializada junto com a Rad18, que é uma proteína essencial envolvido na reparação de danos ao DNA produzido por radiação ionizante (FOUSTERI et al., 2000).

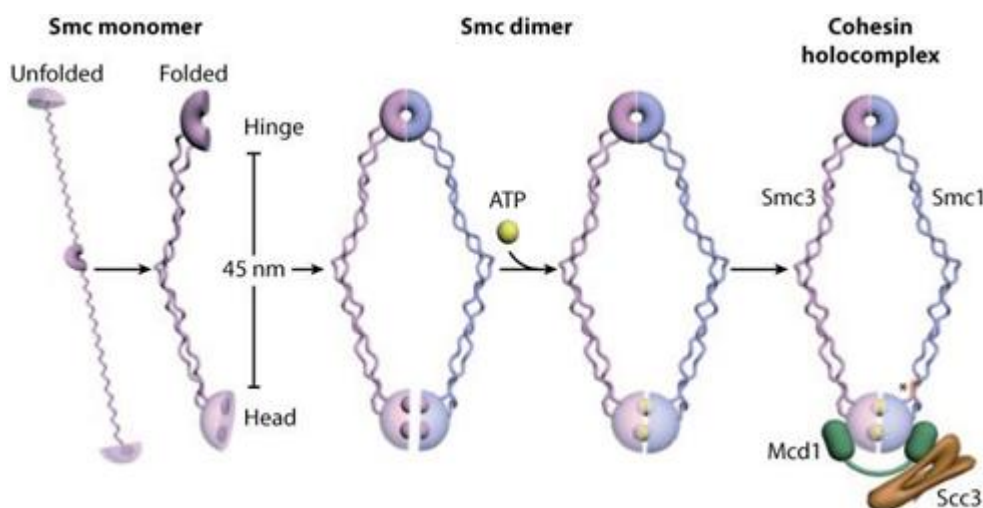


Figura 9. Arquitetura das proteínas SMCs. O monômero das Smcs, quando dobrado, apresenta um domínio de dobradiça e um domínio globular, ou cabeça, conectados por uma longa super-hélice. Os dímeros das Smcs são formados por meio da associação das dobradiças e por meio da interação dos domínios globulares de maneira dependente de ATP (adaptado de ONN et al., 2008).

## 1.8 Proteínas centrinas

Análises comparativas de sequências de várias centrinas mostraram que estas fazem parte da superfamília das proteínas “EF-Hand”. São proteínas com domínios de ligação ao cálcio e foram descobertas primeiramente nas raízes flagelares de *Tetraselmis striata*, um eucarioto autotrófico componente dos plânctons (SALISBURY et al., 1992).

*T. cruzi*, *Leishmania sp* e *Trypanosoma brucei* são conhecidos como tritryps e tiveram seus genomas sequenciados (El-SAYED et al., 2005). Foram identificados no genoma desses três organismos cinco genes que codificam para cinco proteínas centrinas diferentes e com funções intracelulares variadas (Tabela 1). As centrinas TbCentrin1 e TbCentrin2 foram reconhecidas por 20H5, um anticorpo monoclonal originalmente criado para reconhecer centrinas de *Chlamydomonas reinhardtii* (SALISBURY et al., 1988). Essas duas centrinas



estão presentes em organismos que possuem flagelos junto aos corpos basais, organelas necessárias para a locomoção celular que estão envolvidas na duplicação dessas organelas. A TbCentrin2, no entanto, está presente em uma estrutura bilobulada que é intimamente associada com o complexo Golgi. A duplicação da estrutura bilobulada e a duplicação do complexo de Golgi são altamente coordenadas durante o ciclo celular e a depleção do gene da TbCentrin2 por RNA interferência (iRNA) leva à inibição da duplicação do complexo de Golgi, sugerindo um papel importante dessa proteína nesses processos celulares. A depleção da TbCentrin2 também inibe a segregação do cinetoplasto (organela onde encontra-se DNA mitocondrial no qual os corpos basais estão ligados) e divisão celular. No entanto, não inibe a divisão nuclear, de modo que há grande acúmulo de células multinucleadas (HE et al., 2005).

**Tabela 1. Proteínas centrinas e suas principais funções em eucariotos.**

Organismos	Nome da Proteína	Função	Referência
Mouse, <i>T. brucei</i>	Centrina 1	Localização subcelular em células da retina, interagindo com proteínas G. A deleção do gene da centrina1 interfere na fase acrossomal do espermatozoide, causando infertilidade em mamíferos. Envolvidas em segregação de organelas e citocinas em <i>T. brucei</i> .	GISSL, et al., 2004. GISSL, et al., 2005. AVASTHI et al., 2013. SELVAPANDIYAN et al., 2007.
<i>Homo sapiens</i> , <i>Xenopus</i> sp, <i>T. brucei</i>	Centrina 2	Localizada nos poros da membrana nuclear desempenhando um papel na exportação mRNA, e associada com proteínas do centrosomo em células de mamíferos. Corpos basais em organismos flagelados.	RESENDES et al., 2008. ROUT et al., 2000. FISCHER et al., 2004. SALISBURY et al, 1995. SALISBURY et al., 2002.
Mouse, <i>Homo sapiens</i> , <i>T. brucei</i>	Centrina 3	Envolvida na fase acrossomal de espermatozoides interagindo junto com a centrina 1. Centrina 3 em tripanossomas mantém a estabilidade de uma dineína situada nos flagelos dando motilidade celular em <i>T. brucei</i> .	AVASTHI et al, 2013. YING et al., 2014
<i>T. brucei</i>	Centrina 4	Processos celulares como divisão celular e nuclear. Interação com a Centrina 2 em estruturas bilobulada em <i>T. brucei</i> regula a duplicação do complexo de Golgi.	JIE et al., 2008. SHI et al.,2008.
<i>T. cruzi</i>	Centrina 5	Níveis de mRNA tem expressão maior que o endógeno GAPDH em todas as formas de <i>T. cruzi</i> .	Neste trabalho.

A centrina-4 foi caracterizada em *T. brucei* como coordenadora de processos celulares como a divisão celular e nuclear (JIE et al., 2008) e TbCEN3 está envolvida com o processo de segregação de organelas e citocinese durante o ciclo celular (SELVAPANDIYAN et al., 2012).

Além disso, centrinas são proteínas conservadas encontradas nos centrossomos, que é o principal centro organizador de microtúbulos das células animais, e no corpo basal, que é a terceira porção do flagelo que liga o flagelo à membrana plasmática. O corpo basal é composto de uma pequena haste central inserida em uma série de anéis (SALISBURY, 1996; CHAPMAN et al., 2000). As centrinas exercem o papel de chaves regulatórias para a correta duplicação e função dessas estruturas (BAUM et al., 1986; MIDDENDORP et al., 2000; SALISBURY, 2002; PAOLETTI et al., 2003) e são também necessárias para uma variedade de outros processos celulares, incluindo a reparação de DNA, exportação de mRNA e transdução de sinal (ARAKI et al., 2001; WOLFRUM et al., 2002; FISCHER et al., 2004). Um único gene da proteína centrina tem uma variedade de funções. Em organismos tais como *Saccharomyces cerevisiae*, múltiplos genes que codificam para a proteína centrina têm sido encontrados em muitos outros organismos, incluindo mamíferos. Análises bioquímicas estruturais sugerem diferentes propriedades para as isoformas das proteínas centrinas (HU e CHAZIN, 2003; SHEEHAN et al., 2006) e tem sido relatado que a localização intracelular e função destas proteínas são diversos (GIESSL et al., 2004; TROJAN et al., 2008; RUIZ et al., 2005; GOGENDEAU et al., 2008).

Recentemente, análises proteômicas de frações nucleares de formas epimastigotas de *T. cruzi* mostraram a presença de proteínas centrinas (SANTOS et al., 2013).

## **1.9 Justificativa**

O protozoário *T. cruzi*, assim como os demais tripanossomatídeos, apresenta algumas peculiaridades em sua estrutura celular e, principalmente, em seu processo de divisão quando comparado aos demais eucariotos. Estudar a divisão celular do *T. cruzi*, com ênfase no papel do complexo coesina e da proteína centrina, é um passo crucial para o entendimento da divisão celular

desse organismo que pode levar à descoberta de futuros alvos moleculares para o tratamento da doença de Chagas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Este trabalho tem como objetivo geral estudar o papel do complexo coesina e da proteína centrina no processo de divisão celular do *T. cruzi*.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Citolocalizar a subunidade TcSCC1 do complexo coesina e das proteínas centrinadas fusionadas com a proteína fluorescente verde (EGFP) por transfecção e microscopia na forma replicativa epimastigota.
- Quantificar os níveis de mRNA que codificam as proteínas centrinadas e a subunidade TcSCC1 da coesina por PCR em tempo real nas formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material

##### Organismos e linhagens celulares utilizadas

##### Linhagens Bacterianas

A linhagem bacteriana *E. coli* utilizada para procedimentos de clonagem é descrita: DH5 $\alpha$  (Invitrogen): F- $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+) phoA supE44  $\lambda$ - thi-1 gyrA96 relA1.

##### Células HeLa

As células de mamífero utilizadas como hospedeiras foram da linhagem HeLa, que são células humanas epiteliais, não imunes e aneuploides isoladas de adenocarcinoma de útero. Para as infecções foi utilizada a forma tripomastigota da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* (SILVA; NUSSENZWEIG, 1953).

##### Trypanosoma cruzi

Em todo o desenvolvimento do trabalho, a cepa de *T. cruzi* CL Brener foi utilizada para as formas epimastigotas e a cepa Y pra as formas tripomastigota e amastigotas (SILVA; NUSSENZWEIG,1953).

##### Meios de cultura:

##### Cultivos de bactérias

##### Meio LB (Luria-Broth)

Peptona de caseína 1% (p/v); Extrato de levedura 0,5% (p/v); NaCl 1% (p/v). pH ajustado para 7,2 com NaOH. Adição de ágar bacteriológico ao LB a uma concentração final de 1,5% (p/v). Meio esterilizado em autoclave por 20 min a 121°C.

##### Meio 2YT

Triptona 1,6% (p/v); Extrato de levedura 1% (p/v); NaCl 0,5% (p/v). O pH era ajustado para 7,2 com NaOH. Meio esterilizado em autoclave por 20 min a 121°C.

##### Meio SOB

Peptona de caseína 2% (p/v); Extrato de levedura 0,5% (p/v); NaCl 0,05%; KCl 2,5 mM; MgCl<sub>2</sub> 10 mM. Todos os ingredientes menos o MgCl<sub>2</sub> era dissolvido em água destilada e o pH era ajustado para 7,2 com NaOH. O meio era esterilizado

em autoclave por 20 min a 121°C. Após resfriamento, era adicionado ao meio o  $MgCl_2$  (já em solução esterilizada por filtração).

### **Meio SOC**

Adição de glicose (já em solução esterilizada por filtração) ao meio SOB a uma concentração final de 20 mM.

### **Cultivos de *T. cruzi***

#### **Meio de cultura LIT**

NaCl 0,4%; KCL 0,4%;  $Na_2HPO_4$  0,8%; Glicose 0,2%; Triptose 0,5 %; Infuso de fígado 0,5%; Hemina 0,0025 %; Soro Fetal Bovino 10%. O extrato de fígado era previamente dissolvido em água destilada, aquecido a 60°C em placa aquecedora sob agitação durante 1 h e filtrado em papel Whatman número 1. O pH foi ajustado para 7,2 com HCl concentrado e o meio filtrado utilizando filtro Millipore 0,22µm. esterilização, o meio foi suplementado para uso com soro fetal bovino 10% (Gibco – BRL) e hemina a uma concentração final de 2 mg/mL e adicionado de ampicilina (100 µg/mL)/estreptomicina (30 µg/mL) esterilizados por filtração em filtro Millipore 0,22µm.

#### **Meio de cultura para células HeLa**

##### **Meio DMEM (Gibco BRL #12100-046)**

13,4g; Piruvato de sódio 0,11 g; Bicarbonato de Sódio 3,7 g; Água destilada q.s.p. 900 mL; pH 7,2. O meio foi esterilizado por filtração e distribuído assepticamente em garrafas previamente esterilizadas. Para uso o meio DMEM foi suplementado com soro fetal bovino 10% e adicionado de solução ampicilina (100 µg/mL)/estreptomicina (30 µg/mL).

### **Solução e tampões**

#### **Verseno (EDTA)**

EDTA (pH 7,0) 2 mM; PBS 1X. A esterilização foi realizada em autoclave por 20 min a 121°C. Tripsina 5%; PBS 1X. O pH foi ajustado para 7,8. A solução foi armazenada a 4°C durante a noite para decantação. No dia seguinte, o pH foi checado novamente. A solução foi esterilizada por filtração através de filtro Millipore 0,22 µm e armazenado a -20°C.

### **PBS (1 X)**

NaCl 137 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7 mM; KCl 2,7 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM. A esterilização foi realizada em autoclave por 20 min a 120°C.

### **Tampão PSG (1 X)**

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 95 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 5 mM; NaCl 72 mM; Glicose 55,5 mM. A esterilização foi feita por filtração através de filtro Millipore 0,22 µm e o tampão foi armazenado a 4°C.

### **Tampão TB para células competentes**

Pipes 10 mM; MnCl<sub>2</sub> 55 mM; CaCl<sub>2</sub> 15 mM; KCl 250 mM. Dissolução de todos os sais, exceto o MnCl<sub>2</sub>; pH ajustado para 6,7 com KOH. E seguida, adição do MnCl<sub>2</sub> e esterilização por filtração através de filtro Millipore 0,22 µm; armazenamento a 4°C.

### **Tampão de Lise (1X)**

Tris HCl (pH 6,8) 80mM; Sacarose 12%; SDS 2%; β-Mercaptoetanol 2%; azul de bromofenol 0,01%. O tampão foi aliquoteado em microtubos de 1,5 mL e armazenado a - 20°C.

### **Soluções para extração de DNA plasmidial**

#### **Solução I**

Tris HCl 25 mM pH 8,0; EDTA 10 mM. Esterilização em autoclave por 20 min a 121°C.

#### **Solução II**

NaOH 0,2 M; SDS 1%.

#### **Solução III**

Acetato de Sódio 3 M; Ácido acético 2 M; pH 4,8-5,0

### **Soluções para géis SDS-PAGE**

#### **Gel Separador 13%**

Tris HCl (pH 8,8) 0,375 M; SDS 0,1%; acrilamida/bisacrilamida (39:1 p/p) 13%; APS 1,0%; TEMED 0,1%.

#### **Gel Concentrador 4%**

Tris HCl (pH 6,8) 0,125M; SDS 0,1%; acrilamida/bisacrilamida (39:1 p/p) 4%; APS 1,0%; TEMED 0,1%.

### **Tampão de Corrida Tris-Glicina (5X)**

Tris Base 0,125 M; Glicina 1,25 M; SDS 0,5%.

### **Tampão de Amostra (2X)**

Tris HCl (pH 6,8) 0,16 M; Sacarose 24%; SDS 4%;  $\beta$ -Mercaptoetanol 4%; azul de bromofenol 0,05%.

### **Solução Corante Coomassie Blue**

Coomassie Blue R-250 0,25%; Metanol 50%; Ácido acético glacial 10%.

### **Solução Descorante/Fixadora**

Metanol 50%; Ácido acético glacial 10%

### **Tampão de transferência para Western Blot**

Trizma® base 48 mM; Glicina 39 mM; SDS 0,0375%; Metanol 20%

## **Soluções para eletroforese em géis de agarose**

### **Tampão TBE (10X)**

Tris Base 0,89 M; Ácido Bórico 0,89 M; EDTA 0,02 M

### **Tampão de amostra (5X)**

TBE 5X; Glicerol 25%; Azul de Bromofenol; 0,01 % Xileno Cianol; 0,01 %

### **Brometo de Etídeo**

Solução estoque: 10 mg/mL em água destilada. Concentração final de uso: 0,5  $\mu$ g/mL.

## **3.2 MÉTODOS**

### **Reação em cadeia da polimerase**

Para clonagem e análise por PCR em tempo Real, oligonucleotídeos específicos foram desenhados e sintetizados para a amplificação do gene da subunidade do complexo coesina (gene *TcSCC1*) e genes das proteínas centrinhas. Com a utilização desses oligonucleotídeos foram realizados experimentos de PCR com DNA genômico de *T. cruzi*. O tamanho e o número de cada oligonucleotídeo se encontra na Tabela 2.



**Tabela 2.** Oligonucleotídeos com sítio de restrição para clonagem, utilizados para a amplificação de genes específicos de *T. cruzi*.

Gene	Primers	Sequência do oligonucleotídeo (5'-3')	Tam =	Tm=
TcSCC1	PR526	CGGCTCGAGATGTTCTTCTCTACGTATGTCTTG	33	62
	PR472	CGGGGATCCAGATGTGAGCATGAGACCTTC	30	60
TcCEN1	PR533	CGGCTCGAGATGTCGACAACACGCGCTG	28	60
	PR534	CACGGTACCGTAATCCTCATCCTCTAG	27	60
TcCEN2	PR553	CGGCTCGAGATGAGTCACACCGCGAAGC	28	60
	PR554	CGGGGATCCGTAYAGCGATGTCTTTTTTCATCA	32	60
TcCEN3	PR557	CACGGTACCATGGGCAACAACGACTTTTTTG	30	60
	PR558	CGGGGATCCTTTTTCTTTGTGTGGCAGCAG	30	60
TcCEN4	PR537	CGGCTCGAGATGGCGGCTTTACTGACG	28	60
	PR538	CGGGGATCCTTTCKCGCATCTGCA	26	60
TcCEN5	PR561	CGGCTCGAGATGGAGTCAATTAAGGCCAAG	30	60
	PR562	CGGGGATCCATATACATGAGCTCGGCCCAT	30	60

Obs: sítios de restrição CTCGAG – XhoI; GGATCC – BamHI; GGTACC – KpnI; GGATTC – EcoRI.

Para a amplificação o sistema de PCR foi realizado com o volume final de 30 µl constituído por 10 ng de DNA, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1 µM de dNTPs, 10 pmol de cada primer e 2 U da enzima Platinum Taq polimerase (Invitrogen). As amostras foram amplificadas em um termociclador (BioRad). A temperatura de anelamento foi calculada de acordo com as temperaturas correspondente dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação como descrito na Tabela 2.

Os parâmetros de amplificação adotados para o gene *TcSCC1* e *TcCENs* estão descritos abaixo na Tabela 3 e 4.

**Tabela 3. Parâmetros de amplificação adotados para o gene *TcSCC1*.**

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	94°C	1 min	1x
Desnaturação	94°C	30 s	35x
Anelamento	62°C	30 s	
Extensão	72°C	60 s	
Extensão final	72°C	1 min	1x

**Tabela 4. Os parâmetros de amplificação adotados para o gene *TcCENs*.**

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	94°C	1 min	1x
Desnaturação	94°C	30 s	35x
Anelamento	58°C	30 s	
Extensão	72°C	30 s	
Extensão final	72°C	1 min	1x

Os produtos amplificados do gene *TcSCC1* e *TcCENs* foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% e 2%, respectivamente, contendo

brometo de etídeo (0,22 µg/mL), e visualizados em sistema de fotodocumentador BioRad Universal Hood II (BioRad). Os tamanhos esperados são: para o gene *TcSCC1* - 1.700 pb, *TcCEN1* – 546 pb, *TcCEN2* – 570 pb, *TcCEN3* - 501 pb, *TcCEN4* – 450 pb e *TcCEN5* - 561pb como mostrado na Figura 10.

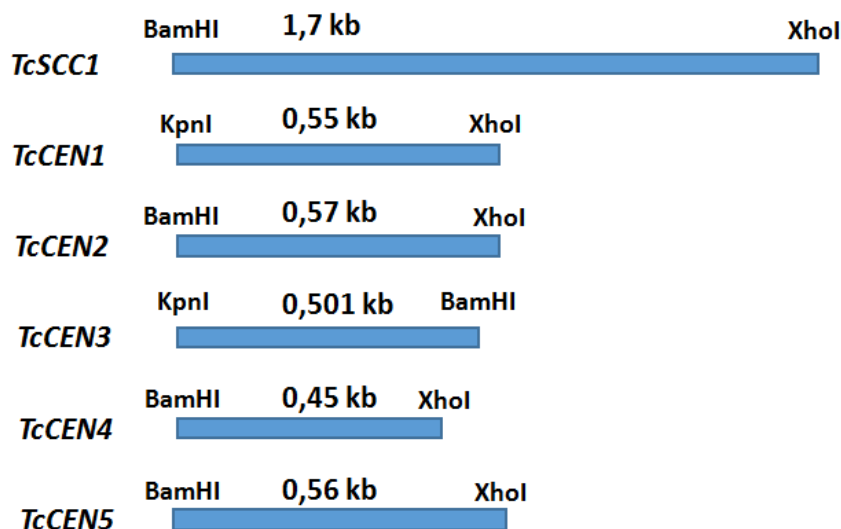


Figura 10. Mapa físico e tamanho esperado dos genes de *T. cruzi*.

### Ligação dos genes no vetor pREGFP

Todas as reações de ligação foram feitas em um volume final de 10 µl com adição de 1 U da enzima T4 DNA Ligase (Promega) e incubadas a 16°C por 18 h. A metade desse sistema foi utilizada para a transformação de células competentes de *E. coli* DH5α. A proporção vetor/inserto foi calculada de acordo com a fórmula descrita em Promega Protocols & Applications Guide (1991), tendo como base a adição de 50 ng do vetor ao sistema de reação. A relação vetor/inserto foi sempre de 1:3.

### Preparo de células competentes de *Escherichia coli* (Inoue et al., 1990)

Células DH5α estocadas a -80°C foram descongeladas, estriadas em meio de cultura LB ágar e incubadas por 18 h a 37°C. Após crescimento, foram coletadas 6 colônias de 2-3 mm de diâmetro e inoculadas em 100 mL de meio SOB sob agitação de 220 rpm, a 30°C, até atingir 0,6 de OD a 600 nm. Em seguida, a cultura foi resfriada em banho de gelo por 10 min e centrifugada a 2.500 g a 4°C durante 10 min. O sedimento de células foi ressuscitado em 32 ml de TB gelado e incubado no gelo por 10 min. Foi realizada uma nova

centrifugação a 2.500 g, por 10 min a 4°C e o sedimento obtido foi ressuspensionado em 8 mL de tampão TB. Finalmente, adicionou-se lentamente DMSO, homogeneizando e diluindo para uma concentração final de 7%, incubou-se no gelo por 10 min, distribuiu-se 200 µL da suspensão de células em tubos de 1,5 mL, os quais foram resfriados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados a – 80°C.

### **Transformação de bactérias por choque térmico**

Tubos contendo 200 µL de células competentes foram descongelados em banho e a eles foram adicionados 50-100 ng do plasmídeo desejado. As células foram incubadas em gelo por 1 h, depois submetidas ao choque térmico por 30 s a 42°C e rapidamente transferidas para o banho de gelo por 1 a 2 min. Em cada tubo foi adicionado 0,8 mL de meio SOC e incubado a 37°C por 1 h. Após este período, as células foram semeadas em placas de LB ágar contendo o antibiótico de seleção adequado (no caso a ampicilina) e incubadas a 37°C por 14-18 h.

### **Extração de DNA plasmidial de *E. coli* (Birnboim; Doly, 1979)**

Para extração de DNA plasmidial, clones foram selecionados e inoculados em 3 mL de meio 2YT contendo o antibiótico de seleção e incubados sob agitação a 220 rpm a 37°C por 18 h. Para a extração de DNA plasmidial (minipreparação) foram utilizados 2 mL da cultura por meio do método de lise alcalina (BIRNBOIM; DOLY, 1979; SAMBROOK et. al. 1989) e ao final foram os plasmídeos purificados foram ressuspensionados em 40 µL de água milliQ esterilizada.

### **Confirmação do perfil de restrição com as enzimas adequadas.**

Para a digestão foram usados 2 µL da minipreparação e enzimas de restrição adequadas para cada clonagem. As enzimas utilizadas foram adquiridas das empresas Promega e New England Biolabs. O procedimento adotado foi indicado pelo fabricante.

### **Purificação dos fragmentos de DNA de gel de agarose**

Para a clonagem, tanto os fragmentos quanto os vetores foram digeridos e posteriormente fracionados em gel de agarose preparados com tampão TEB 0,5x. As bandas de interesse foram excisadas do gel, colocadas em tubos de 1,5 mL e o DNA purificado utilizando-se o kit GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), seguindo protocolo do fabricante.

### **Clonagem dos genes TcSCC1 e TcCENs 2, 4, 5 no vetor para *T. cruzi***

Para a ligação foram feitas as quantificações do vetor e dos genes eluídos: vetor pRTEGFP 12 ng/μl, TcSCC1 5 ng/μl, TcCEN2 10 ng/μl, TcCEN4 6,5 ng/ul, TcCEN5 10,8 ng/μl. A proporção vetor/inserto foi calculada de acordo com a fórmula descrita em Promega Protocols & Applications Guide (1991), tendo como base a adição de 50 ng do vetor ao sistema de reação, TcSCC1 48 ng, TcCEN2 16 ng, TcCEN4 13 ng e TcCEN5 16 ng. As proporções usadas foram 3 para 1.

### **Preparo de plasmídeos para transfecção em *T. cruzi* pelo método SS-LIS**

Para extração de DNA plasmidial, clones foram selecionados e inoculados em 200 mL de meio 2YT contendo o antibiótico de seleção ampicilina e incubados sob agitação de 220 rpm a 37°C por 18 h. Para a extração de DNA plasmidial (MaxPrep), clones em fase estacionária foram centrifugados a 5.000 g por 10 min. O sedimento foi ressuspensionado em PBS 1x e transferido para tubos de centrifugação de 30 mL. A suspensão foi centrifugada a 5.000 g por 10 min. O sedimento foi ressuspensionado em 5 mL de solução I sob agitação vigorosa em vórtex. Foram adicionados 10 mL de solução II, com agitação suave por inversão do tubo incubou à temperatura ambiente por 10 min. Adicionou-se 7,5 mL de solução III e misturou suavemente por inversão do tubo, incubou-se no gelo por 10 min. Centrifugou-se a 12.000 g por 10 min à temperatura ambiente. Transferiu-se o sobrenadante para um tubo de centrifugação. Adicionou ao sobrenadante igual volume de isopropanol deixando-o a temperatura ambiente por 10 min. Centrifugou-se a 12.000 g por 10 min a 4°C. Secou-se o sedimento e ressuspendeu-se em 3 mL de TE e adicionando RNase incubando por 30 min a 37°C. Adicionou-se 0,1 M de NaCl e 1,5 % de SDS e agitou-se vigorosamente por alguns segundos no vórtex. Extraiu-se uma vez com fenol equilibrado, uma vez com fenol-clorofórmio e uma vez com clorofil. Adicionou-se 0,3 M de NaCl e adicionou 2,5 V de etanol 100 % e deixou-se precipitar por 30 min no gelo. Houve a coleta do sedimento através de centrifugação a 12.000 g por 15 min a 4°C. O sedimento foi lavado uma vez com 10 mL de etanol 70% a -20°C, centrifugando a 12.000 g por 5 min, seco à temperatura ambiente e ressuspensionado em 150 μL de água ultra pura.

### **Sequenciamento de DNA plasmidial**

Foi utilizado o sequenciador ABI 3130xl da Applied Biosystems no serviço de sequenciamento da Universidade Católica de Brasília. As amostras de DNA produto de minipreparação de plasmídeos com qualidade e quantidade suficientes para garantir boas sequências ressuspensos em água Milli-Q. As amostras foram purificadas (kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System*, Promega) e quantificadas (*Nanodrop Lite Spectrophotometer* Thermo Scientific) antes da reação de sequenciamento. Primers específicos foram enviados já misturados às amostras em uma quantidade final de 3,2 pmol por reação, observando o volume máximo de primer + DNA igual a 7,0 µL. A reação de sequenciamento foi feita usando somente um dos primers (F ou R) por vez. A temperatura de anelamento usada para a reação de sequenciamento foi 60°C.

### **Transfecção de formas epimastigotas de *T. cruzi***

Epimastigotas na fase exponencial de crescimento foram lavadas 2 vezes com tampão PBS 1X e em seguida ressuspendidas para uma concentração final de 10<sup>8</sup> células/mL em tampão de eletroporação (TpET) (120 mM KCl, 0,15 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM Hepes, 2mM EDTA pH 7,6 e 5 mM MgCl<sub>2</sub>) a 4°C. Alíquotas de 0,4 mL desta suspensão de células foram misturadas a 50 µg de cada plasmídeo e colocados em cubetas de eletroporação por 10 min em gelo. Os plasmídeos a serem utilizados foram os vetores de expressão pRTEGFPTcSCC1 e pRTGFPTcCENs, que apresentam os genes da TcSCC1 e das centrinas fusionados com a proteína verde fluorescente (EGFP), respectivamente. Os parasitos foram eletroporados utilizando 0,3 kV e capacitância de 500 µF, aplicando 2 pulsos, com intervalos de 30 segundos entre eles. Após a eletroporação, o meio contido nas cuvetas foi transferido para garrafas de cultura estéreis contendo 5 mL de meio LIT suplementado com 10% SFB (soro fetal bovino) e incubado a 28 °C.

### **Western Blotting**

Extrato total de *T. cruzi* das formas epimastigotas foi obtido após a lavagem da células três vezes com PBS 1X e ressuspensão final direta em tampão de amostra de SDS-PAGE. As proteínas foram submetidas a elefroforese SDS-PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose (GE Healthcare Life

Sciences). A membrana foi bloqueada por 1 h em PBST (PBS + 0,05% Tween 20) contendo 5% de leite desnatado. A membrana foi então incubada por 1h com o anticorpo policlonal anti-GFP produzido em coelho (Life Technologies). Em seguida a membrana foi incubada com o segundo anticorpo, IgG de coelho conjugados com peroxidase (Invitrogen). O western blot foi revelado com a reação de detecção ECL da Western (GE Healthcare).

### **Microscopia Confocal**

Lâminas com parasitos expressando TcSCC1 fusionada a EGFP ou Centrininas 2, 4 e 5 fusionadas a EGFP foram utilizadas para captação de imagens em microscópio confocal (*Leica TCS SP5 Confocal Laser Scanning Microscope*) e microscópio de fluorescência (*Eclipse-Ti-E Microscope*). Para isto as amostras foram lavadas 5 vezes em PBS e fixadas com paraformaldeído 4%. Em seguida, as células foram lavadas três vezes e adicionado em uma lâminas de vidro 10  $\mu$ L de células a uma concentração de  $10^7$  células/mL.

### **Preparo da resina**

A resina de troca iônica DE-52 celulose (Whatman) foi hidratada em água destilada até a sua uniformização e esterilizada em autoclave por 20 min a 120°C. Após a esterilização, a resina foi adicionada a uma seringa e empacotada em uma seringa de plástico de 10 mL e em seguida equilibrada com tampão PSG 1X (item 4.5.4). Para a purificação das formas tripomastigotas metacíclicas foi utilizada uma proporção de 7,5 mL de resina para 50 mL de cultura de *T. cruzi* com aproximadamente  $6 \times 10^7$  células/mL.

### **Purificação das culturas de tripomastigotas metacíclicos em coluna de troca iônica para extração de mRNA total das formas tripomastigota**

As culturas da cepa Y de *T. cruzi* contendo aproximadamente 30 a 60% de tripomastigotas foram centrifugadas a 6.000 g (Rotor R14A 29, Hitachi) por 10 min e ressuspendidas em tampão PSG 1X (item 1.5.1) (LANHAM, 1968; LANHAM; GODFREY, 1970; SOUZA, 1983). A suspensão de células foi aplicada em uma coluna de DE-52 celulose de troca iônica (Whatman), preparada como descrito no item 4.5.4 e previamente equilibrada no mesmo tampão. As células foram

concentradas por centrifugação em microcentrífuga a 3000 rpm por 2 min w em seguida foram ressuspendidas e lavadas 2 vezes em PBS 1x.

### **Extrações de RNA total de *T. cruzi* e RT-qPCR**

O RNA total das células foi extraído com TRIzol® (Invitrogen) segundo as especificações do fabricante. Para cada mL de TRIzol® (volume para extração de RNA de  $1,0 \times 10^7$  células) adiciona-se 200 µL de clorofórmio à amostra homogeneizando-a vigorosamente. Após 3 min de incubação à temperatura ambiente, a amostra foi centrifugada (12.000 g/15 min/4°C) e a fase aquosa resultante foi transferida para um tubo novo. Adiciona-se 500 µL de isopropanol e após 10 min de incubação à temperatura ambiente a amostra foi novamente centrifugada (12.000 g/10 min/ 4°C). O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado em etanol 75% gelado (7.500 g/5 min/4°C). Em seguida, o sedimento foi deixado secando por 15 min a temperatura ambiente e o mesmo então foi ressuspendido em 100 µL de água ultrapura livre de nucleases. A concentração e a qualidade dos RNAs isolados foram determinadas por espectrofotometria (NanoDrop – Thermo Scientific) a uma absorbância a 280 nm e por eletroforese em gel de agarose a 1,2%. Os RNAs foram armazenados a -80°C até o uso.

A síntese dos cDNAs utilizados nas análises por RT-qPCR foi feita a partir de 2 µg de RNA total previamente tratados com a enzima RQ1 DNase (Promega), segundo as recomendações do fabricante. Após o tratamento com DNase, os RNAs (2 µg) foram retrotranscritos usando o kit *High Capacity Reverse Transcription (Life Technologies)* em um volume final de 20 µL de acordo com o protocolo do fabricante.

Os sistemas de RT-qPCR (volume final de 10 µL) foram compostos por 1X Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), 0,25 µM de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores e 4 µL de cDNA previamente diluído 1:10 em água ultrapura (Ambion). As reações de PCR foram realizadas no termociclador *StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*, os dados analisados no programa SDS 2.3 (Applied Biosystems) e os gráficos plotados no programa Excel 2010 (Microsoft). Para todos os pares de primers foram feitas curvas de eficiência por meio de diluições seriadas do cDNA e todos atingiram valores entre

95-105% de eficiência. Além disso, foi avaliada a especificidade do amplicon gerado nas reações de PCR por curvas de desnaturação. As amostras foram aplicadas em triplicata técnica e três experimentos foram conduzidos independentemente. Como normalizador experimental foram utilizadas as médias geométricas referentes às expressões do gene GAPDH e do gene ribossomal  $\alpha$  24S. Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação de genes específicos de *T. cruzi* e para a avaliação da expressão de mRNA por PCR em tempo real (Tabela 5).

**Tabela 5. Primers utilizados para PCR em tempo Real.**

Gene	Primers	Sequência do oligonucleotídeo(5'-3')	pb=	Tm=
TcSCC1	PR404	TCTGTGGGCTTTTGTGGATGC	21	64
	PR405	CAGAGGCCTCAGCTTGTTC	20	62
TcCEN1	PR535	AATTCGTGAGGCGTTTGAGCT	21	60
	PR536	CTGCATCATCCGTAGCACCT	20	60
TcCEN2	PR555	GAGATGCTGAGGGCGTTTC	19	60
	PR556	GCGTCTGTCATGTTCTCGC	19	60
TcCEN3	PR559	ATTACCCTTGAAGACCTGAAG	21	60
	PR560	CATGGTCGAGAACGTCAGC	19	60
TcCEN4	PR539	GGAGCGTATGATCCGCACAA	20	60
	PR540	AGTATCTCCTCCGGTGAGTG	20	60
TcCEN5	PR563	CTTGCGAAGATGATGCAGCG	20	60
	PR564	CAATAGGACGAAGATCATCTAC	22	60



## 4. Estratégia Experimental

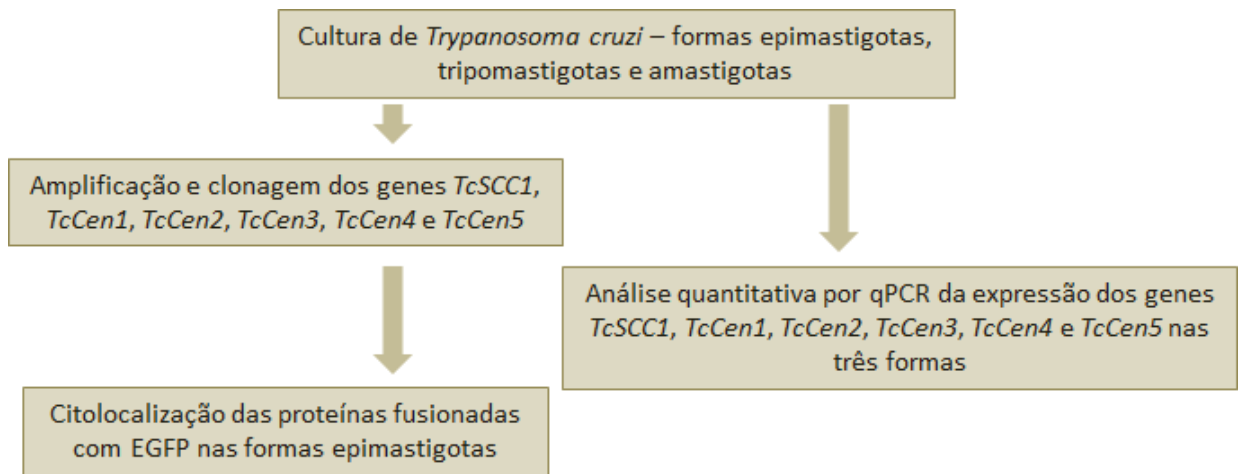


Figura 11. Estratégia experimental geral utilizada neste trabalho.

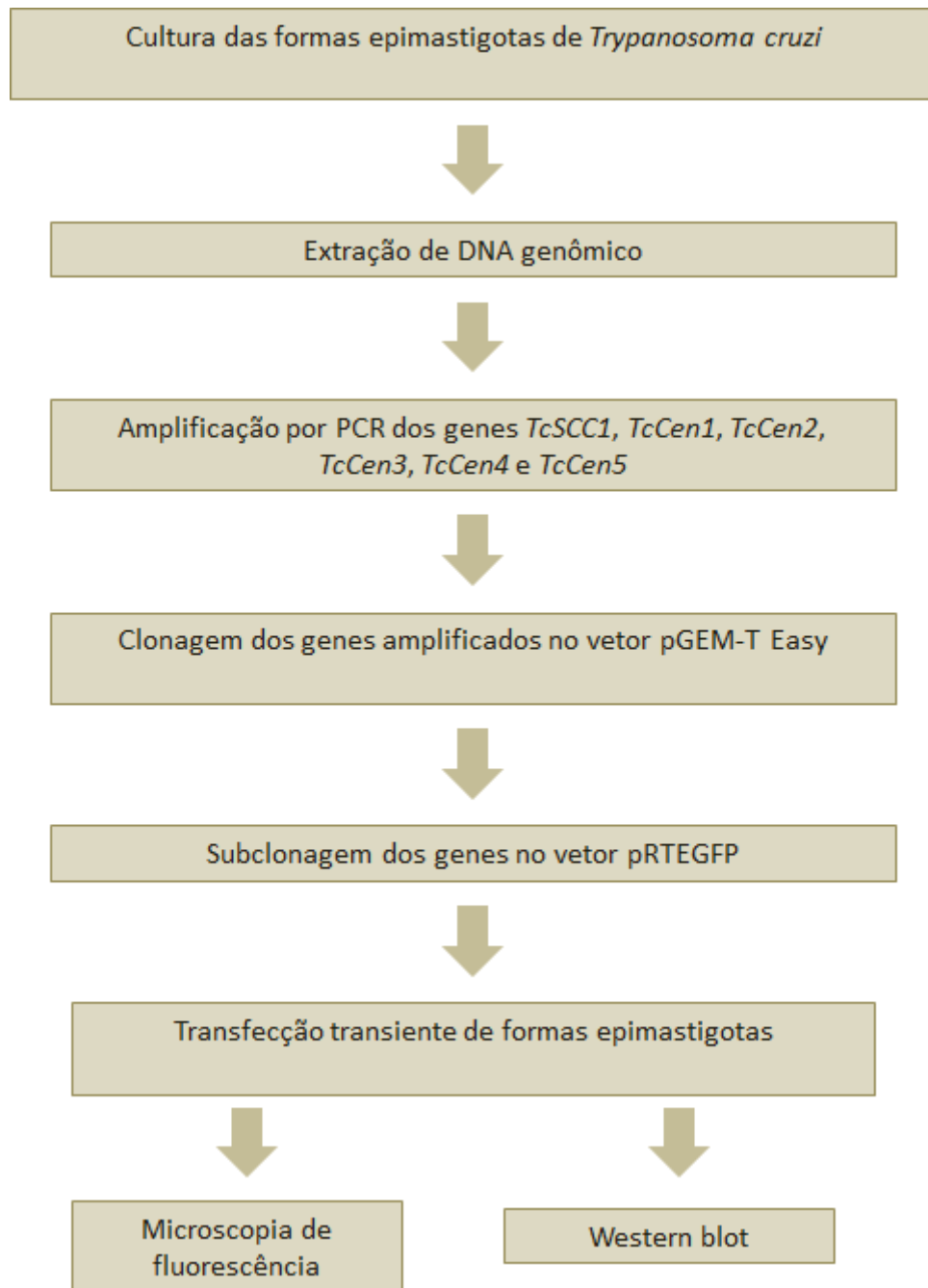
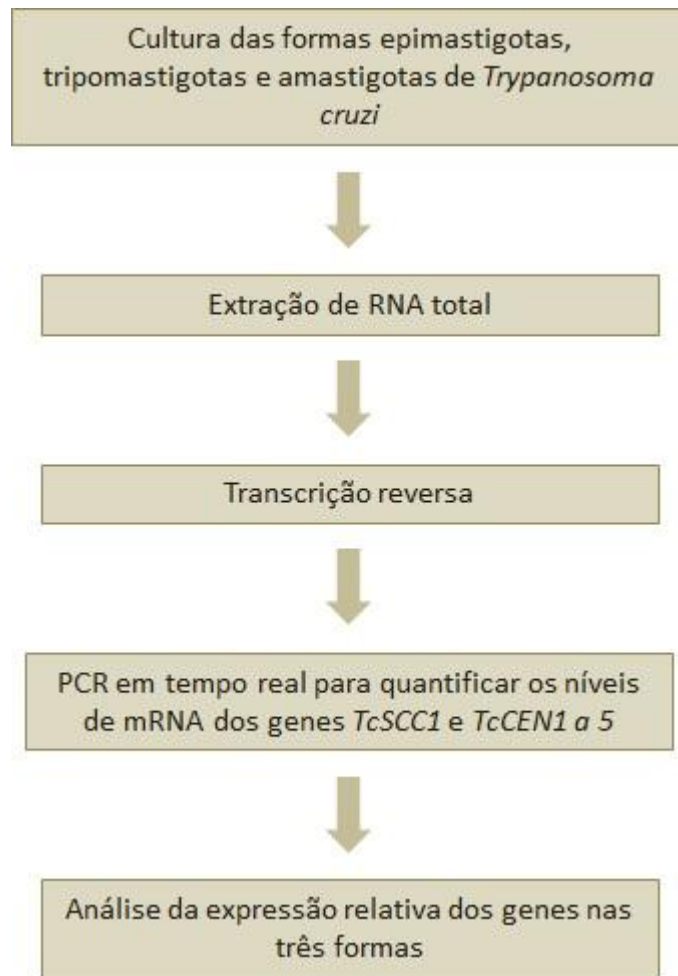


Figura 12. Estratégia experimental para a análise de citolocalização das proteínas TcSCC1, TcCen2, TcCen4 e TcCen5 fusionadas com EGFP nas formas epimastigotas.

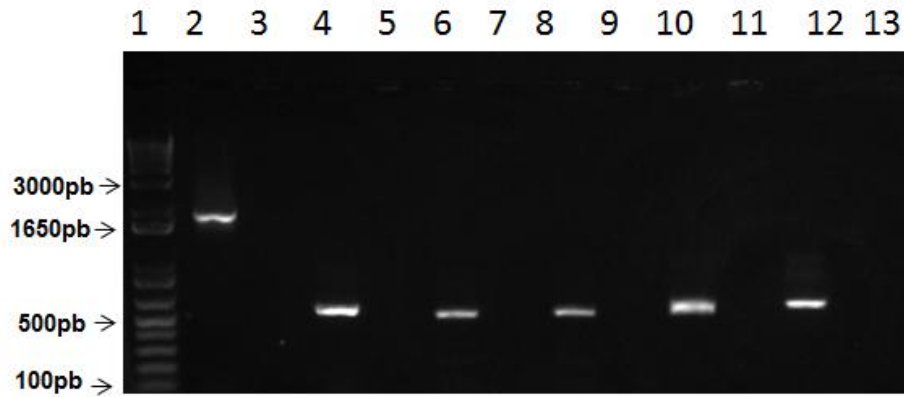


**Figura 13.** Estratégia experimental para a análise de expressão no nível de mRNA dos genes para as proteínas TcSCC1 e TcCen1 a 5.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

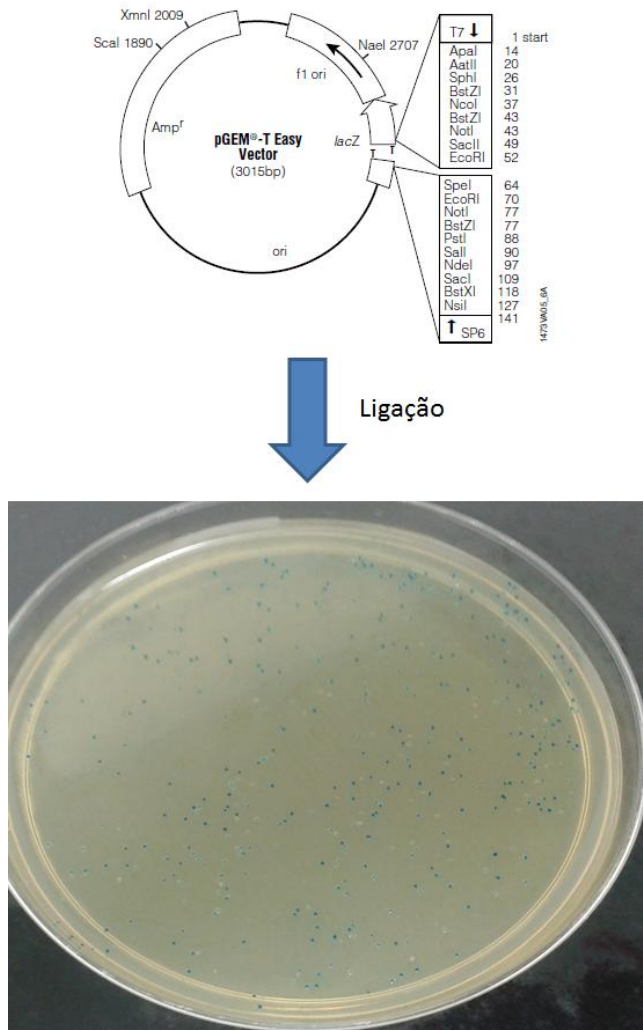
### 5.1 Amplificação por PCR dos genes (*TcSCC1*, *TcCen1*, *TcCen2*, *TcCen3*, *TcCen4* e *TcCen5*) do DNA genômico de *T. cruzi*

Para a análise de citolocalização dos genes (*TcSCC1*, *TcCen1*, *TcCen2*, *TcCen3*, *TcCen4* e *TcCen5*) foram desenhados oligonucleotídeos utilizados na amplificação desses genes, com base na sequência da ORFs (*open reading frame*) e tiveram sítios de restrição para as enzimas BamHI/XhoI para os genes (*TcSCC1*, *TcCen2*, *TcCen4* e *TcCen5*), XhoI/KpnI (*TcCen1*) e BamHI/KpnI (*TcCen3*) incorporados preservando seus códons originais de iniciação e terminação. Estes sítios de restrição nos primers foram inseridos de forma a permitir a subclonagem dos genes no vetor pRTEGFP construído para *T. cruzi*. A temperatura de anelamento que depende do tamanho e composição de bases de cada par de primers (5' e 3') mostrados na Tabela 4, foi calculada teoricamente para garantirmos que estes apresentassem temperaturas de anelamento próximas. Se a temperatura de anelamento for muito baixa, os primers podem anelar em alvos similares e amplificar produtos não específicos. Se temperatura anelamento for alto demais, a probabilidade do anelamento diminui e a quantidade de produto também. O desenho dos primers foi feito evitando a complementaridade de bases, pois isso pode formar dímeros de primers, e estruturas secundárias como grampos. A amplificação de genes específicos do DNA genômico da cepa CL Brener de *T. cruzi* das formas epimastigotas foi devidamente analisada e quantificada em gel de agarose. A Figura ilustra o resultado desta amplificação a qual gerou os produtos com pares de bases correspondentes ao tamanho teórico dos genes em estudo e resultou em quantidades suficientes para procedermos à clonagem posterior.



**Figura 14. Análise do PCR a partir do DNA genômico de *T. cruzi*.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Poço 1: marcador molecular *1 kb plus ladder*, poço 2: *TcSCC1* com amplicon de 1.700 pb, poço 3: controle negativo, poço 4 com *TcCen1* com amplicon de 546 pb, poço 5: controle negativo, poço 6: *TcCen2* com amplicon de 570 pb, poço 7: controle negativo, poço 8: *TcCen3*: com amplicon de 501 pb, poço 9: controle negativo, poço 10: *TcCen4* com amplicon de 450 pb, poço 11: controle negativo, poço 12: *TcCen5* com amplicon de 561 pb e poço 12: controle negativo.

A concentração obtida para estes produtos variou de 0,5 a 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . O vetor usado para a ligação dos produtos de PCR foi o pGEM-T Easy (Figura 15). Este vetor é muito conveniente para ligar os produtos de PCR, pois a Taq DNA polimerase deixa nos produtos uma base A que faz anelamento com a base T no vetor pGEM-T Easy. Esse vetor tem outras vantagens, como a de facilitar a seleção dos clones positivos, tendo 3.018 pb e contendo duas marcas de seleção ao longo de sua sequência: um gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina e outro gene que codifica para a proteína  $\beta$ -galactosidase localizado após a região de sítios múltiplos de clonagem. O X-gal é um análogo de lactose e, portanto, pode ser hidrolisado pela enzima  $\beta$ -galactosidase, que cliva a ligação glicosídica em  $\beta$ -D-lactose. O X-gal, quando clivado pela  $\beta$ -galactosidase, produz um produto intensamente azul. Portanto, esse é um teste eficiente para saber se há a presença de  $\beta$ -galactosidase ativa.

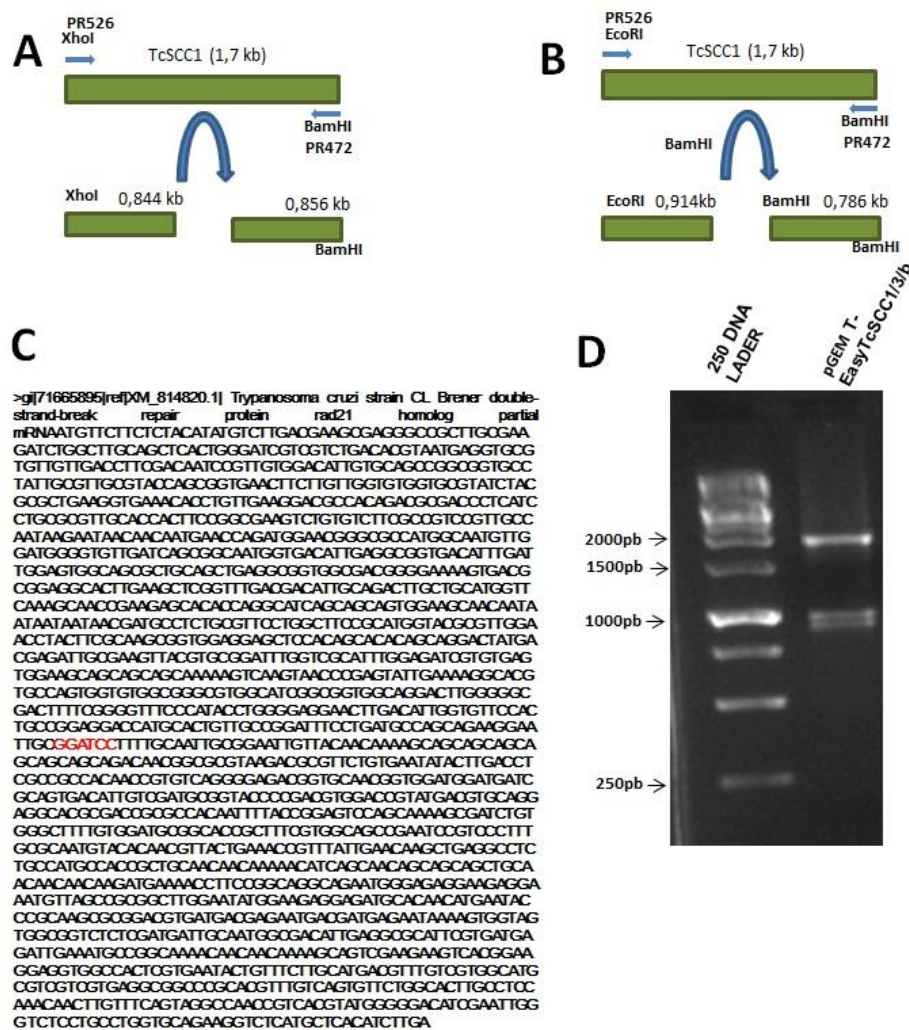


**Figura 15. Vetor pGEM-T Easy e cultura de *E. coli* transformada.** Clones azuis mostra que houve apenas o fechamento do vetor. Clones brancos mostra que houve a inserção do gene no vetor.

## 5.2 Análise de Restrição

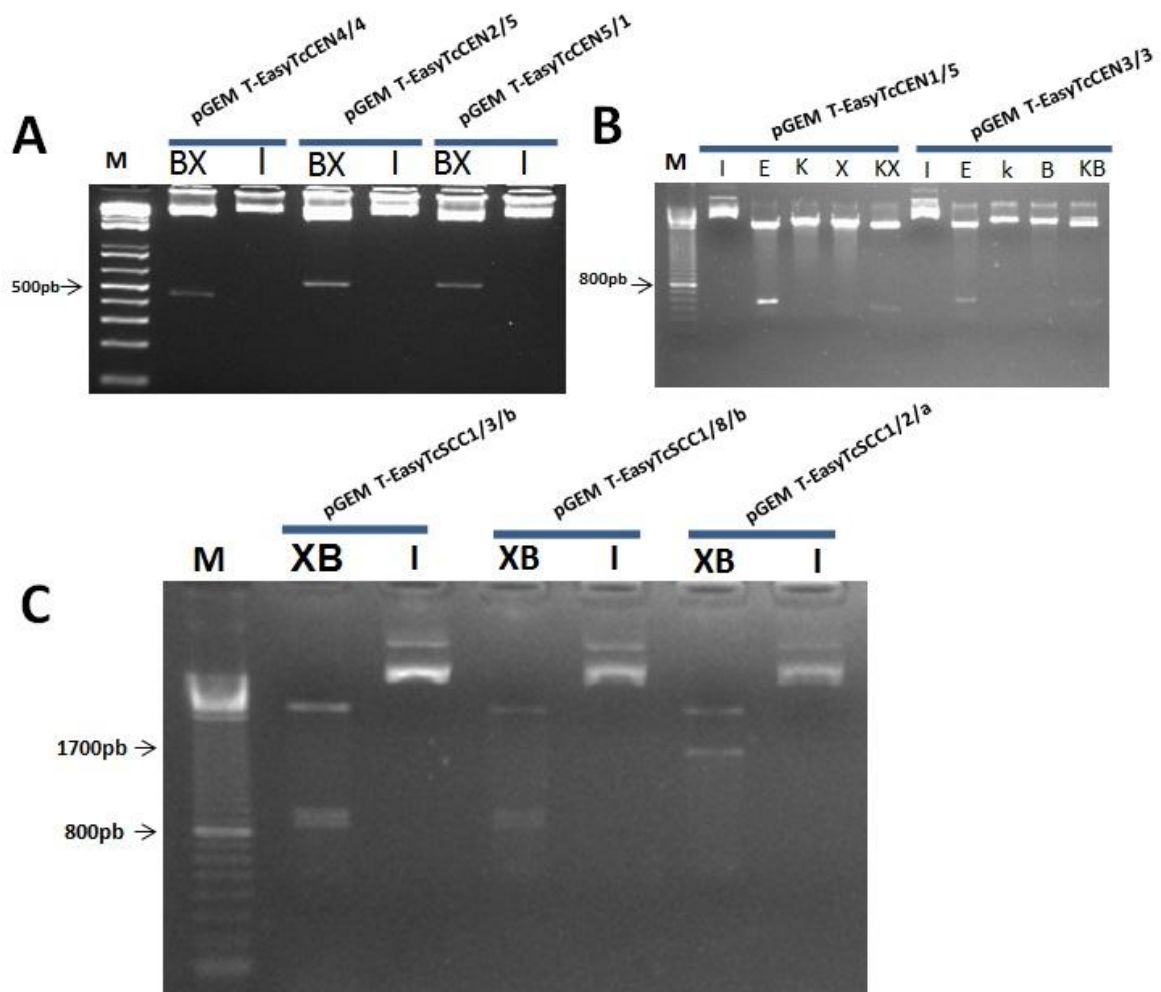
O pGEM-T Easy possui dois sítios de restrição para a enzima EcoRI flanqueando o sítio de ligação da inserção. Os DNAs plasmidiais dos clones positivos, extraídos através dos métodos de lise alcalina (BIMBOIN; DOLY,1979; SAMBROOK et. al. 1989), foram considerados utilizados para as análises de restrição. Durante os experimentos de análise de restrição foi observado que a construção pGEM-T EasyTcSCC1 estava liberando dois fragmentos, um com 844 pb e outro com 846 pb (Figura 16). A fim de descobrir qual enzima tem sítio interno no gene *TcSCC1*, foi feita primeiramente uma análise *in silico* mostrado

em vermelho na sequência gênica da Figura 16 e dupla digestão com EcoRI e BamHI confirmando o sítio BamHI mostrado no gel da Figura 16C.



**Figura 16. Análise do sítio de restrição EcoRI interno no gene *TcSCC1*.** A- Esquema mostrando que o gene contém um sítio de restrição interno. B- Esquema confirmando que o sítio interno no gene é para enzima de restrição BamHI. C- Análise da sequência do gene para confirmar o sítio de restrição BamHI, em vermelho. D- perfil da digestão dupla do produto de PCR com as enzimas EcoRI/BamHI é mostrado no gel de agarose a 0,8% liberando fragmento do tamanho mostrado em A e B.

A análise de restrição empregando as enzimas BamHI/XhoI (Figura 17A e 17C) realizada a fim de confirmar a presença do inserto nos clones selecionados e dos sítios de restrição adicionados nos oligonucleotídeos. Para mostrar o perfil de restrição para os genes *TcCEN1* e *TcCEN3*, foram feitas digestões simples com a enzima EcoRI, BamHI, KpnI, XhoI e digestões duplas com as enzimas de clonagem BamHI/KpnI e XhoI/KpnI (Figura 17B).



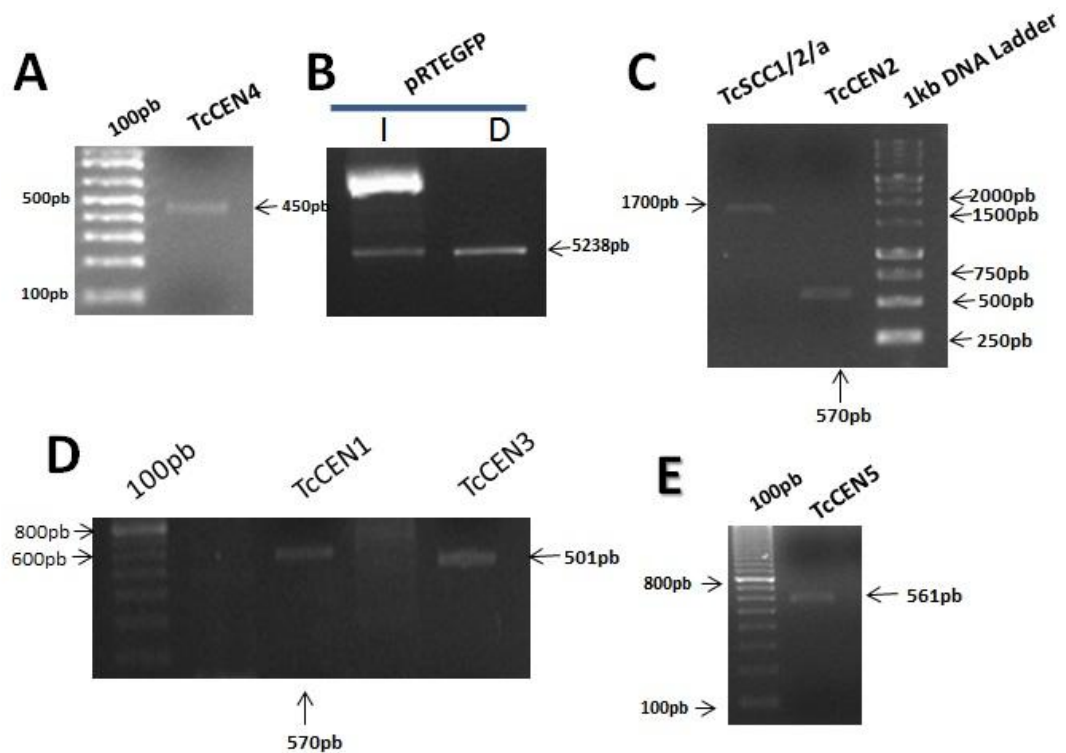
**Figura 17. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio para conferir o perfil de restrição dos fragmentos amplificados e clonados no pGEM-T Easy.** A-Digestão dos clones TcCEN4, TcCEN2 e TcCEN5 com BX= BamHI/XhoI, I= intacto B- M=100pb marcador molecular, I = vetor intacto, E=EcoRI, K=KpnI, X=XhoI. K=KpnI e BamHI. C- digestão com as enzimas de clonagem, M= marcador molecular 100 bp, X/B=XhoI/BamHI liberando fragmento de acordo com o esperado teórico.

### 5.3 Subclonagem dos genes *TcCEN2*, *TcCEN4*, *TcCEN5* e *TcSCC1* no vetor pRTEGFP

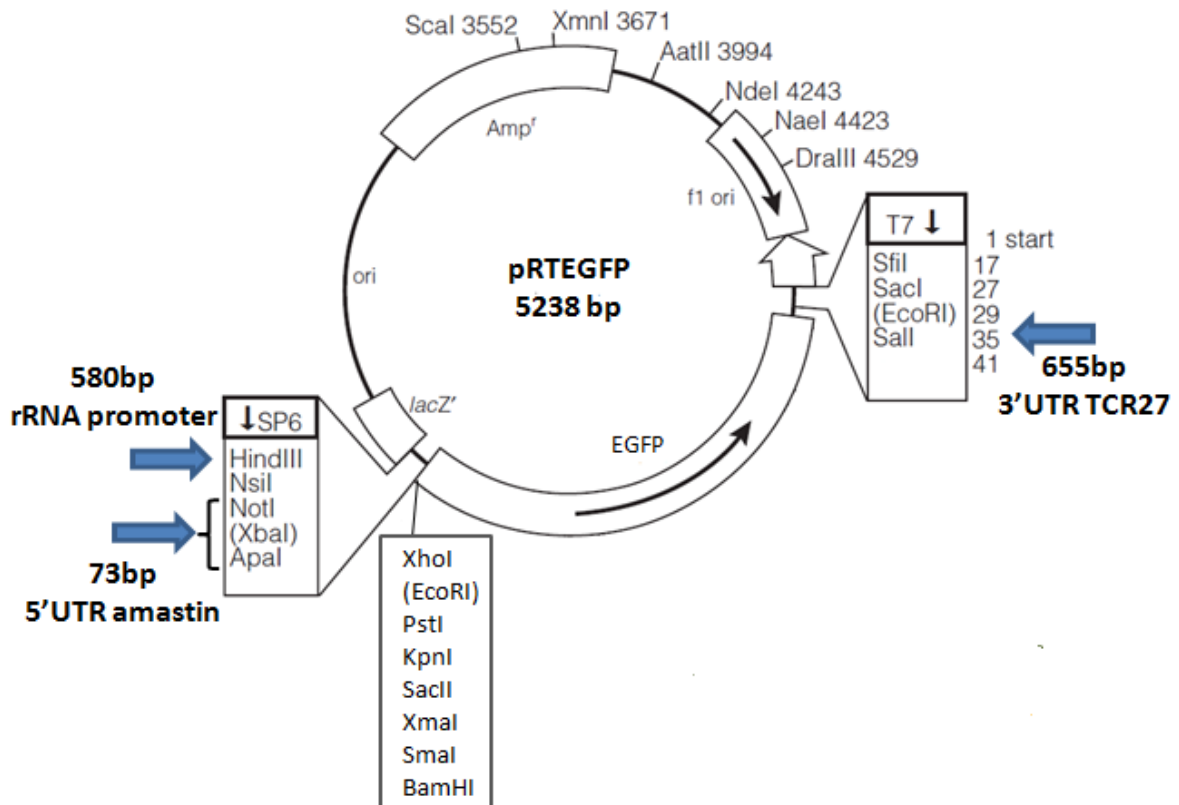
A fim de clonar os genes no vetor de expressão em *T. cruzi* e sublocalizar as proteínas, foram feitas digestões com as enzimas de restrição específicas para cada gene. Em seguida, os fragmentos contendo os genes de interesse foram eluídos a partir de um gel de agarose e como mostrado na Figura 18 corresponderam ao tamanho esperado com uma concentração suficiente para prosseguir com subclonagem no vetor pRTEGFP. A Figura 18A mostra o tamanho



esperado para o gene *TcCEN4* de 450 pb. O vetor pRTEGFP (Figura 19) intacto e digerido com BamHI/XhoI está mostrado na Figura 18B com o tamanho esperado de 5.238 bp. Os genes *TcSCC1* e *TcCEN2* mostrado na Figura 18C apresentaram o padrão de tamanho esperado 1.700 pb e 570 pb, respectivamente. Os genes *TcCEN1* e *TcCEN3* mostrados na Figura 18D também apresentaram o tamanho esperado de 570 pb e 501 pb, respectivamente, assim como o gene *TcCEN5* na Figura 18E com tamanho de 561 pb.



**Figura 18. Análise dos fragmentos eluídos contendo os genes *TcCENS* e *TcSCC1* e o vetor pRTEGFP.** A- gel de agarose em uma concentração de 2 % para analisar 12 ng do gene *TcCEN4* B- gel de agarose a uma concentração de 0,8% para conferir 24 ng de pRTEGFP intacto e digerido. C- gel de agarose a uma concentração de 0,8% para analisar 10 ng do gene *TcSCC1/2/a*, 24 ng do gene *TcCEN2*. D- gel de agarose a uma concentração de 2% para analisar 20 ng do gene *TcCEN1* e 30 ng do gene *TcCEN3*. E- gel de agarose a uma concentração de 2% para analisar 24 ng do gene *TcCEN5*.

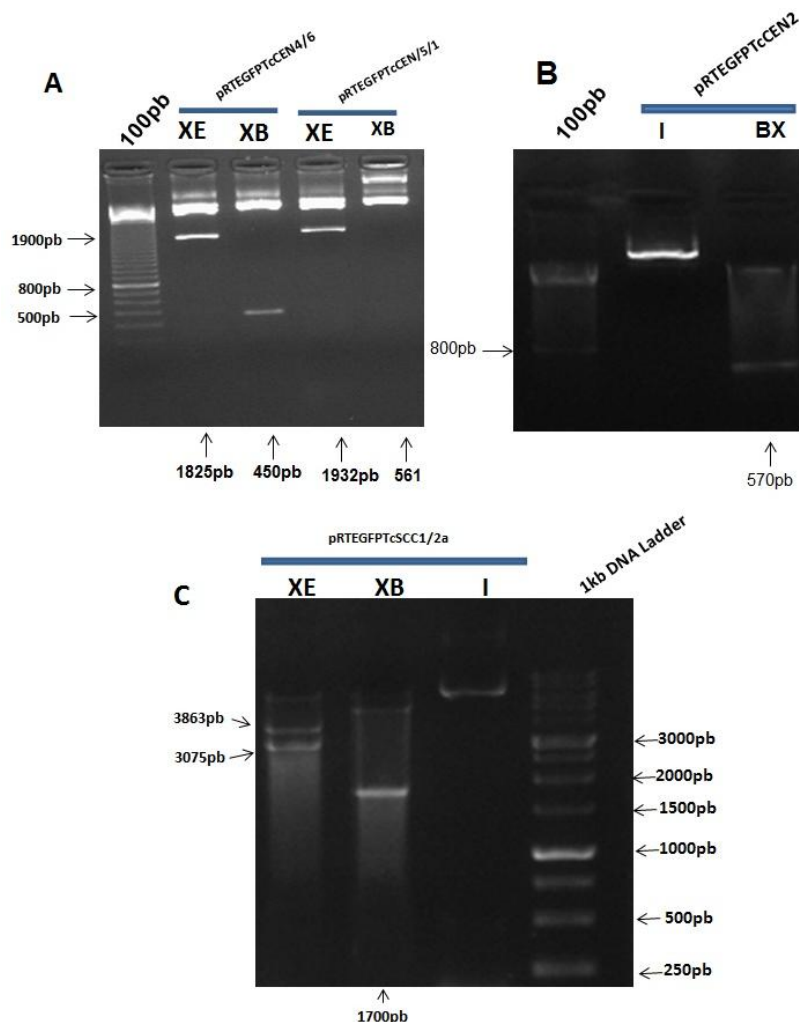


**Figura 19. Mapa físico do vetor pRTEGFP.** As setas indicam a direção de expressão dos genes, os sítios múltiplos de clonagem no N-terminal da EGFP, e mostra a localização do gene que confere resistência ampilicina. E a região da rRNA promoter.

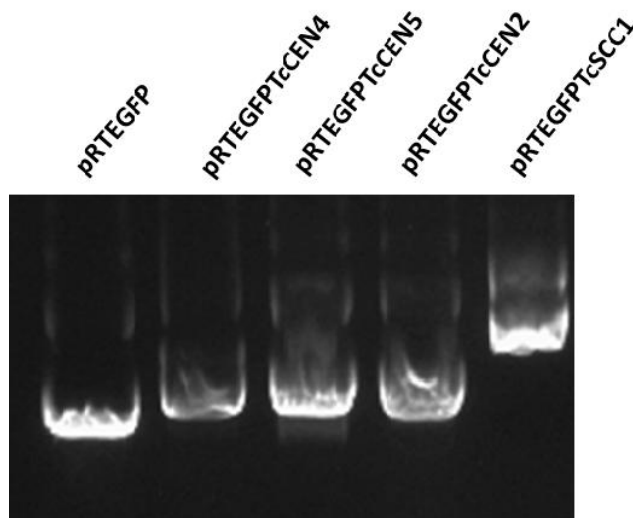
#### 5.4 Perfil de restrição dos genes inseridos no vetor pRTEGFP

Os fragmentos de DNA que codificam para as proteínas TcSCC1, TcCEN2, TcCEN4 e TcCEN5 foram subclonados no vetor pRTEGFP (Figura 18). Estas novas construções denominadas pRTEGFPTcSCC1, pRTEGFPTcCEN2, pRTEGFPTcCEN4 e pRTEGFPTcCEN5 foram obtidas para expressar as proteínas de interesse fusionadas com a EGFP em *T. cruzi*. Os plasmídeos recombinantes recém-construídos foram selecionados por análise de PCR (dados não mostrados) e perfil de digestão plasmidial com enzimas de restrição, já que o vetor pRTEGFP não apresenta genes que as tornem com coloração diferenciada. A Figura 20 ilustra perfil de restrição dos plasmídeos. Observa-se pela análise de restrição do gene *TcCEN4* mostrada na Figura 20A, que o mesmo foi liberado pela digestão dupla com as enzimas BamHI e XhoI. O vetor pRTEGFP possui em sua sequência sítio para EcoRI na região 3' UTR após o gene de EGFP. Somando

os fragmentos da construção pRTEGFPTcCEN4 (450 pb do gene *TcCen4* + 720 pb do gene *EGFP* + 655 pb da região 3'UTR = 1.825 pb), a dupla digestão EcoRI e XhoI libera um fragmento de 1.825 pb (Figura 20A). Somando os fragmentos da construção pRTEGFPTcCEN5 (561 pb do gene *TcCEN5* + 720 pb do gene *EGFP* + 655 pb 3'UTR = 1.932 pb) a dupla digestão EcoRI e XhoI libera um fragmento de 1.932 pb (Figura 20A). Entretanto, para o gene *TcCEN5* houve a perda dos sítios de restrição para BamHI (Figura 20A, último poço). A Figura 21 mostra o perfil de plasmídeo dos clones selecionados após a obtenção dos mesmos por uma preparação em larga escala de cultura celular (maxipreparação de plasmídeos). Esses plasmídeos foram analisados em gel de agarose e depois quantificados para os experimentos de transfecção.



**Figura 20. Perfil de restrição dos fragmentos gênicos clonados no vetor pRTEGFPT.** A- Marcador molecular 100 base pair ladder, Pharmacia, digestão dos clones TcCEN4 e TcCEN5 com BX= BamHI/XhoI e XE= XhoI/EcoRI. B- Marcador molecular 100 base pair ladder, Pharmacia, I = vetor intacto, vetor digerido com BX= BamHI/XhoI. C- Digestão da construção pRTEGFPTcSCC1 com XB=XhoI/BamHI e XE = XhoI/EcoRI marcador molecular 1kb DNA Ladder.



**Figura 21. Análise da maxipreparação de plasmídeos obtida pelo Protocolo SS-LIS.** Gel de agarose a uma concentração de 0,8% dos perfis dos plasmídeos recombinantes. pRTEGFP vazio com 5.238 pb. pRTEGFPTcCEN4 com 5.688 pb, pRTEGFPTcCEN5 com 5.799 pb e pRTEGFPTcCEN2 com 5.808 bp e pRTEGFPTcSCC1 com 6.938 pb.

### **5.5 Sequenciamento dos genes inseridos (pRTEGFPTcSCC1, pRTEGFPTcCEN2, pRTEGFPTcCEN4 e pRTEGFPTcCEN5) e análises de bioinformática**

Desde a década de 70, o método descrito por Sanger é o mais utilizado para análise de seqüências de DNA sendo conhecido também como método da terminação da cadeia. Atualmente, com o desenvolvimento das técnicas de sequenciamento automático, um aparelho de sequenciamento é capaz de sequenciar meio milhão de pares de bases por dia (LEWIN, 1997; STRYER, 1988). O sequenciamento de DNA é um método de análise dos clones positivos que se faz necessário para se obter a seqüência completa, ou pelo menos, uma porção do gene alvo. Sua estratégia envolve a PCR consistindo na capacidade da DNA polimerase em adicionar um nucleotídeo na extremidade de alongamento de um oligonucleotídeo copiando uma fita de DNA molde. Os DNAs plasmidiais dos 4 prováveis clones positivos (pRTEGFPTcSCC1, pRTEGFPTcCEN2, pRTEGFPTcCEN4 e pRTEGFPTcCEN5), extraídos através dos métodos de lise alcalina e pelo kit Wizard Miniprep® (Promega), foram inicialmente considerados de boa qualidade e adequados para as análises de sequenciamento.

As seqüências nucleotídicas resultantes do sequenciamento foram submetidas a um processo de busca por similaridade no banco de dados, através de servidores de busca disponíveis na rede. O principal programa utilizado foi o

software público nBLAST onde os resultados mostraram similaridade de sequência com genes depositados no banco de dados. A Tabela 6 mostra o valor de identidade e cobertura (*query cover*) do sequenciamento de cada gene em relação ao primeiro hit da cepa CL Brener. Esse sequenciamento acaba confirmando a presença da região alvo desejada. De modo geral os clones sequenciados apresentaram pequenas variações entre si, que podem ser atribuídos a erros de leitura ou mesmo a erros gerados durante a marcação para o sequenciamento. No entanto, os plasmídeos pRTEGFPTcSCC1, pRTEGFPTcCEN2, pRTEGFPTcCEN4 e pRTEGFPTcCEN5 sequenciados apresentaram os genes de interesse inseridos na orientação e com fase de leitura corretas dentro do vetor pRTEGFP garantindo assim a integridade destes clones e a leitura eficiente de todas as bases dos fragmentos na etapa de expressão proteica. O sequenciador usado é limitado a sequenciar entre 600 a 800 pb. Para o sequenciamento do gene TcSCC1 que é formado por 1.700 pb, foram usados os primers 5' e 3' (Figura 22 e 23), para testar o grau de identidade.

**Tabela 6. Valor de Identidade e cobertura (*query cover*) do sequenciamento de cada gene em relação ao primeiro hit da cepa CL Brener a partir do nBLAST.**

Construções	Identi(%)	Cobertura(%)	Cepa	Genes
pRTEGFPTcSCC1	97	98	CL Brener	TcSCC1
	98	99	CL Brener	TcSCC1
pRTEGFPTcCEN2	99	72	CL Brener	TcCEN2
pRTEGFPTcCEN4	99	55	CL Brener	TcCEN4
pRTEGFPTcCEN5	99	74	CL Brener	TcCEN5

```

Query 10  AGGGGCGGGCTTGGGAGA-CTGGCTTGCAGCTCACTGGGATCGTCGGTCTGACACGCTCATG 68
      |||||  |||||  |||  |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  |||
Sbjct 33  AGGGGC-TCTTGGGAGATCTGGCTTGCAGCTCACTGGGATCGTCGGTCTGACACGCTCATG 91

Query 69  AGGTGGGTGTGTGTGACTTCGACAAATCCGTGTGGCAATGTGCGAGCCGGGGTGCCTA 128
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  |||||||||||||||
Sbjct 92  AGGTGGGTGTGTGTGACTTCGACAAATCCGTGTGGCAATGTGCGAGCCGGGGTGCCTA 151

Query 129  TTGGGTTGGGTACCAGCGGTGAACCTTCTTGTGGTGTGGTGGTATCTACGGCTGAGG 188
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  |||||||||||||||
Sbjct 152  TTGGGTTGGGTACCAGCGGTGAACCTTCTTGTGGTGTGGTGGTATCTACGGCTGAGG 211

Query 189  TGAACACCTGTGTAAGGACGCCACAGCGCGACCCCTCATCTGGCGGTTGCACCACTTC 248
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  |||||||||||||||
Sbjct 212  TGAACACCTGTGTAAGGACGCCACAGCGCGACCCCTCATCTGGCGGTTGCACCACTTC 271

Query 249  CGGCGAAGTCTGTCTTCGGCGTCCGTTGCCAATAGAAATACACAAATGACCCAGATG 308
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  |||||||||||||||
Sbjct 272  CGGCGAAGTCTGTCTTCGGCGTCCGTTGCCAATAGAAATACACAAATTTACCCAGAG 331

Query 309  GAGCGGGCCCATGGCAATGTGGATGGCGTGTGATCAGCGCAATGGTGACATTGAGG 368
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  |||||||||||||||
Sbjct 332  GAGCGGGCCCATGGCAATGTGGATGGCGTGTGATCAGCGCAATGGTGACATTGAGG 391

Query 369  CGGTGACATTTGATTTGAGTGGCAGCCCTGCAGCTGAGGGCGTGGCGACGGGAAAAGTG 428
      |||||  |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  |||||||||||
Sbjct 392  CGGTGACATTTGATTTGAGTGGCAGCCCTGCAGCTGAGGGCGTGGCGACGGGAAAAGTG 451

Query 429  ACGTGGAGGCACCTGAGGCTCGGTTTACGACATTCGAGACTTGGTGCATGZTTCAAAGC 488
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  |||||||||||||||
Sbjct 452  ACGTGGAGGCACCTGAGGCTCGGTTTACGACATTCGAGACTTGGTGCATGZTTCAAAGC 511

Query 489  AACCGAAGGACACACCAGGCATCAGCAGCAGTGGGAGCAACAAATANTAAATAACGGTG 548
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  |||||||||||||||
Sbjct 512  AACCGAAGGACACACCAGGCATCAGCAGCAGTGGGAGCAACAAATANTAAATAACGGTG 571

Query 549  CCTCTGGCTTCTGGCTTCGGCATGGTACGGCGTGGAGCCCTACTTTGGCAGCGGTGGAG 608
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  |||||||||||||||
Sbjct 572  CCTCTGGCTTCTGGCTTCGGCATGGTACGGCGTGGAGCCCTAC-TTGGCAGCGGTGGAG 630

Query 609  GAGCTCCAAAGCACACAGCAGGACTATGACGGGATTCGGAAGTTACSTGGGZATTTGGTC 668
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  |||||||||||||||
Sbjct 631  GAGCTCCAAAGCACACAGCAGGACTATGACGGGATTCGGAAGTTACSTGGGZATTTGGTC 690

Query 669  GCNTTTGGGAGTCTGTGTGAGTGGGAGCAGCAGCGCAAAAAGTCAAGTAAACCCGAGTA 728
      |||||  |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  |||||||||||
Sbjct 691  GCNTTT-GGAGTCTGTGTGAGTGGGAGCAGCAGCGCAAAAAGTCAAGTAA-CCCGAGTA 748

Query 729  TTGAAAAGGCACGTGCCCGTGGGTGTTGGTGGCGTTGGCATTCCGGGGGGCGGCGGA 787
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  |||||||||||||||
Sbjct 749  TTGAAAAGGCACGTGCC-AGTGG-TGT-GGTGGCGT-GGCAT-CGGCGG-CGGCAGGA 801

```

**Figura 22.** Sequência obtida do plasmídeo pRTEGFPTcSCC1 com o primer 5' PR526. As bases *Query* correspondem a ORF que codifica para proteína TcSCC1 clonada no vetor. As bases *subject* são correspondentes às sequências dos genes presentes nos bancos de dados.

```

Query 5 ACCAGGCGAGAAACCAATTCGGTGTCCCCATACGTGACGGTTGGGCTACTGRAACRA 64
      ||| ||||| ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1746 ACC-AGGCAGGAGACCCCAATTCGGTGTCCCCATACGTGACGGTTGGGCTACTGRAACRA 1688

Query 65 GTTGTTCGGGAGGCAAGTGCACGAACTGACAAACGTCGGGGCGGCTCACGGACGC 124
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1687 GTTGT-TGGAGGCAAGTGCACGAACTGACAAACGTCGGGGCGGCTCACGGACGC 1629

Query 125 ATGCCACGACAAACGTCATGCAAGAAACGATTCACGGTGGGACCTCTCTCGGTGAC 184
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1628 ATGCCACGACAAACGTCATGCAAGAAACGATTCACGGTGGGACCTCTCTCGGTGAC 1569

Query 185 TTCTTCGACTGCTTTTGTGTGTGTTTGGGGCAATTCATCTCATCAGAAATGGGCTC 244
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1568 TTCTTCGACTGCTTTTGTGTGTGTTTGGGGCAATTCATCTCATCAGAAATGGGCTC 1509

Query 245 AATGTCGCCATTCGAATCATCGAGAGACGGCCACTACCCATTTTATTCTCATCGTCATTC 304
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1508 AATGTCGCCATTCGAATCATCGAGAGACGGCCACTACCCATTTTATTCTCATCGTCATTC 1449

Query 305 TCGTCATCAGTCCGGCTTGGGGTATTTCATGTTGTCATCTCTCTTCATATTCCAA 364
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1448 TCGTCATCAGTCCGGCTTGGGGTATTTCATGTTGTCATCTCTCTTCATATTCCAA 1389

Query 365 GCGGGGCTAACATTTCCCTCTTCCCTCCCATTTCTGCCGCGGAGGTTTTTCATCttgt 424
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1388 GCGGGGCTAACATTTCCCTCTTCCCTCCCATTTCTGCCGCGGAGGTTTTTCATCttgt 1329

Query 425 tgttgttgcagctgctgctgttgtgatgttttgttgttgcAGGGTGGCATGGCAGAG 484
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1328 TGTGTGTGCAGCTGCTGCTGTTCCTGATGTTTTTGTGTGTGCAGGGTGGCATGGCAGAG 1269

Query 485 GCCTCAGCTTGTTCATAAACGGTTTCAGTAACGTTGTGTACATTGCCAAAGGGACGG 544
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1268 GCCTCAGCTTGTTCATAAACGGTTTCAGTAACGTTGTGTACATTGCCAAAGGGACGG 1209

Query 545 TTGGGTGCCACGAAAGCGTGGCCATCCACAAAGGCCACAGATCGCTTTTGTGGAC 604
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1208 TTGGGTGCCACGAAAGCGTGGCCATCCACAAAGGCCACAGATCGCTTTTGTGGAC 1149

Query 605 TCCGGTAAAAATGTTGGGGGGTGGCGTCCCTCTGCAAGTTCATACGGTCCACGTCGGG 664
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1148 TCCGGTAAAAATGTTGGGGGGTGGCGTCCCTCTGCAAGTTCATACGGTCCACGTCGGG 1090

Query 665 TACCGCATCGCAATGTCAGTGGATCATCCATCCACCGTTCGACCGTCTCCCTTGACA 724
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1089 TACCGCATCGCAATGTCAGTGGATCATCCATCC-ACCGTTCGACCGTCTCCCTTGACA 1031

Query 725 CGGTGTGGGGGGGCTCAGTATATTCACGAAACGGTCCITAAAGCCCGTTTGT 784
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1030 CGGTGTGGGGGGGCTCAGT-ATATTCACGAA-CCGCTC-TTACGGGCC-GTT-GT 976

Query 785 CTGCTTCT 793
      ||||| |||
Sbjct 975 CTGCT-GCT 968

```

**Figura 23. Sequência obtida do plasmídeo pRTEGFPTcSCC1 com o primer 3' PR472.** As bases *Query* correspondem a ORF que codifica para a proteína TcSCC1 clonada no vetor. As bases *subject* são correspondentes às sequências dos genes presentes nos bancos de dados.

Para o sequenciamento dos genes *TcCEN2*, *TcCEN4* e *TcCEN5* formados por 570 pb, 450 pb e 561 pb, respectivamente, foi usado o primer que anela dentro da sequência do gene *EGFP*, primer PR357. As Figuras 24, 25 e 26 mostram o nBLAST das construções contra genoma de *Trypanosoma cruzi* cepa CL Brener (taxid:353153). Na Tabela 6 mostra os valores de identidade e cobertura (*query cover*) do sequenciamento de cada gene em relação ao primeiro hit da cepa CL Brener a partir do nBLAST.





```

Query 23  TGAGTC-CACDGGGARGCAGRCACGCCACDGGGGACGGGCTCCCAACCGAGGGGGCCAG 81
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 2   TGAGTCACACDGGGARGCAGRCACGCCACDGGGGACGGGCTCCCAACCGAGGGGGCCAG 61

Query 82  GCRAAGAACAAAGCCCTGTCCGAGCTTACGGGAGATCAGGACAGGAGATCAAAGAGGCCCT 141
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 62  GCRAAGAACAAAGCCCTGTCCGAGCTTACGGGAGATCAGGACAGGAGATCAAAGAGGCCCT 121

Query 142 TCGATCTTTTGGACACGGACGGTAGCGGCCAGATCGACCGGAAAGAGTTGAAAGTCCGCA 201
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 122 TCGATCTTTTGGACACGGACGGTAGCGGCCAGATCGACCGGAAAGAGTTGAAAGTCCGCA 181

Query 202 TGGGAGCACTCGGCTTTGAGCCCCGCAAGGRCGANGTGGCTCGACTGTGTGTGTCATCG 261
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 182 TGGGAGCACTCGGCTTTGAGCCCCGCAAGGRCGANGTGGCTCGACTGTGTGTGTCATCG 241

Query 262 CTGAGGAAAGACCGCTGCCCGGGGTGGAAGCCGCTGGTCCCGGTGCGGACCGCTGGCGA 321
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 242 CTGAGGAAAGACCGCTGCCCGGGGTGGAAGCCGCTGGTCCCGGTGCGGACCGCTGGCGA 301

Query 322 TTGGCTTTGGGAGTTTACGGAGCTCATGGCCCGTAAAGTACCGGAGCGGGACTCACGTT 381
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 302 TTGGCTTTGGGAGTTTACGGAGCTCATGGCCCGTAAAGTACCGGAGCGGGACTCACGTT 361

Query 382 AGGAGATGCTGAGGGCGTTTCATCCCTTCGACGACACAGACCGGGAGATCTCTTTTA 441
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 362 AGGAGATGCTGAGGGCGTTTCATCTCTTCGACGACACAGACCGGGAGATCTCTTTTA 421

Query 442 AGRACCTCAAAACGACTGGCCGAGGAGCTCGGCGAGACACTGACACAGCCGGAGTCCAGG 501
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 422 AGRACCTCAAAACGACTGGCCGAGGAGCTCGGCGAGACACTGACACAGCCGGAGTCCAGG 481

Query 502 AGATGRTAGACGAGGCCGATCGGACGGGTGACGGTGGAGTGGAGGAGGATGAATTTCTCC 561
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 482 AGATGRTAGACGAGGCCGATCGGACGGGTGACGGTGGAGTGGAGGAGGATGAATTTCTCC 541

Query 562 GCCTGRTGAAAAGCATCGCTGTAC 587
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 542 GCCTGRTGAAAAGCATCGCTGTAC 567

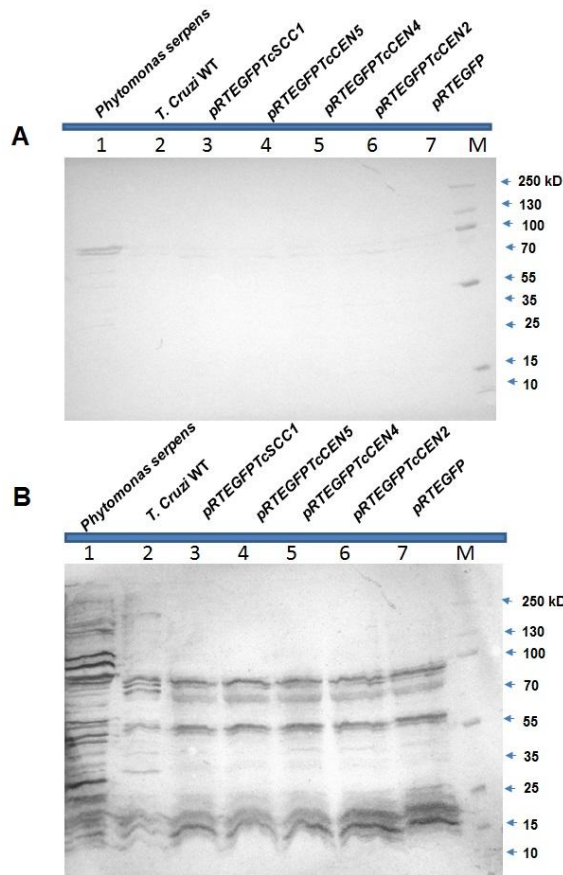
```

**Figura 26. Sequência obtida do plasmídeo pRTEGFPTcCen5 com o primers 3' PR357.** As bases *Query* correspondem a ORF que codifica para a proteína TcCEN5 clonada no vetor. As bases *subject* são correspondentes às sequências dos genes presentes nos bancos de dados.

## 5.6 Western blot

Western blot é uma técnica para analisar a expressão e verificar os níveis de proteínas e no entanto muitas vezes não é bem otimizada e depende muito do anticorpo usado e de sua validação. Deste modo, para verificar a expressão da EGFP com e sem fusão foi usado um anticorpo anti-EGFP fornecido pela empresa Invitrogen. Na figura 27 podemos verificar que houve um reconhecimento deste anticorpo por proteínas de tripanossomatídeos. Na Figura 27A com uma diluição do anticorpo 1/2.000 nota-se o reconhecimento inespecífico do anticorpo anti-GFP por proteínas do extrato total de *Phytomonas serpens* (poço1 e no poço 2) e não apresentou outras bandas detectadas nas

outras amostras. Na Figura 27B, a mesma membrana foi submetida a outras lavagens e incubada com uma nova diluição do anticorpo primário 1/1000 como determina o fabricante. Foi notado um grande reconhecimento de bandas inespecíficas tanto para o tripanossomatídeo *P. serpens* e *T. cruzi* não transformado, sendo assim não foi possível saber se a proteína EGFP está sendo traduzida

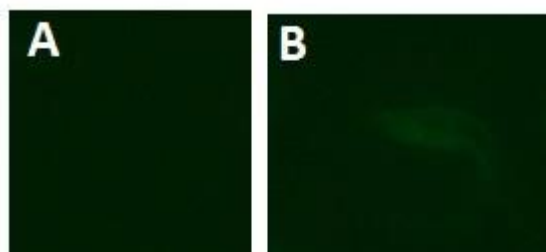


**Figura 27. Western blotting para analisar a expressão de proteínas de *T. cruzi* fusionada com EGFP nos experimentos de transfecção transiente.** A- Diluição 1/2000, nessa diluição o anti-GFP reconhece com maior afinidade duas bandas de *Phytomonas serpens* um protozoário da família tripanossomatídeos que infecta tomate. B- Em uma diluição 1/1000. O anticorpo primário reconheceu inespecificamente bandas nos extratos de *T. cruzi*.

## 5.7 Microscopia de fluorescência

Para a análise de expressão das proteínas fusionadas a EGFP, parasitos no estágio epimastigotas foram transfectados com os plasmídeos pRTEGFPTcSCC1, pRTEGFPTcCEN2, pRTEGFPTcCEN4 e pRTEGFPTcCEN5. A GFP e seus derivados têm definido o uso da microscopia de fluorescência em pesquisas nas áreas biológicas (YUSTE, 2005). A maior vantagem da GFP é que ela pode ser transmitida de uma geração para outra, dependendo da forma como ela é introduzida na célula, transiente ou estável, permitindo o estudo continuado de sua expressão. A visualização da GFP não é invasiva, requerendo apenas iluminação com luz azul. A EGFP sozinha (Figura 28) não causa interferência nos processos biológicos, mas quando fusionada com proteínas de interesse, um estudo cuidadoso do efeito que essa fusão pode gerar é necessário para que não haja perda da função principal da proteína de interesse (CHALFIE, 2009).

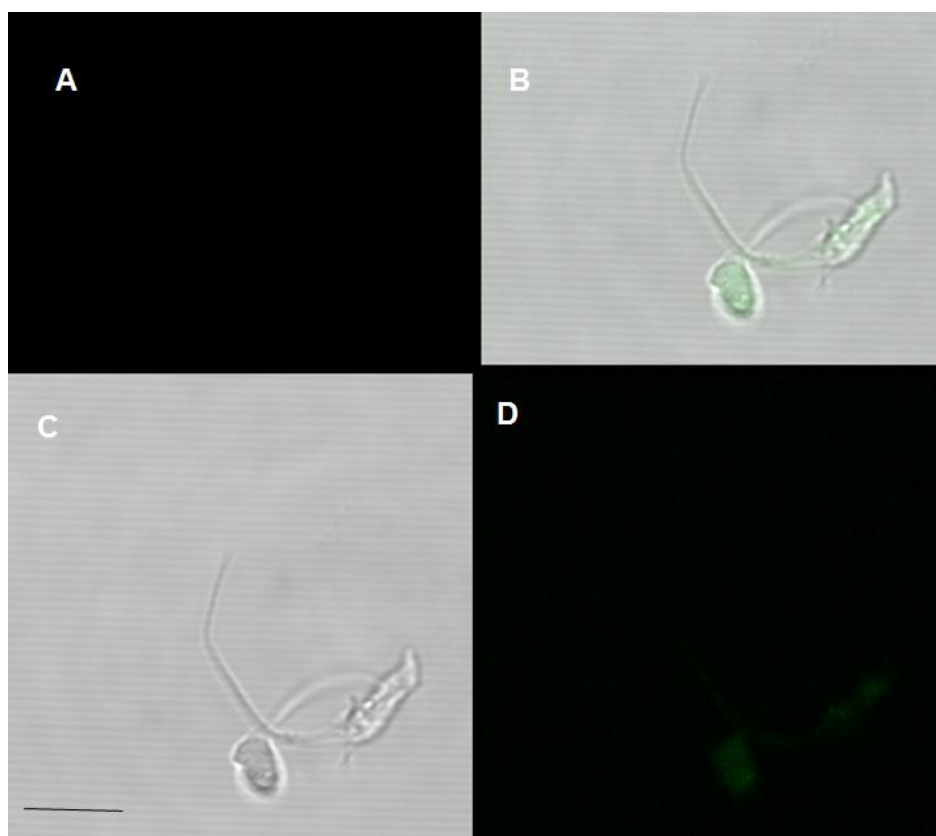
O vetor pRTEGFP é baseado na biologia dos tripanossomatídeos por isso foi utilizado neste trabalho, o vetor em questão possui uma região promotora (rRNA) de *T. cruzi* na qual a RNA polimerase de *T. cruzi* realiza o acoplamento e a síntese o mRNA e outra região para a ligação do SL (*Spliced Leader*). As pequenas moléculas de RNA denominadas SL estão presentes no processamento de mRNA de tripanossomatídeos é um mecanismo pós transcricional adicionados as moléculas de mRNA para evitar a degradação (LEE et al., 2007). Esse vetor é constituído por 5.238 pb, tem sido amplamente empregado na clonagem de genes cujas proteínas correspondentes estarão fusionadas a EGFP e tem demonstrado sucesso nessa função (TEIXEIRA et al., 1995).



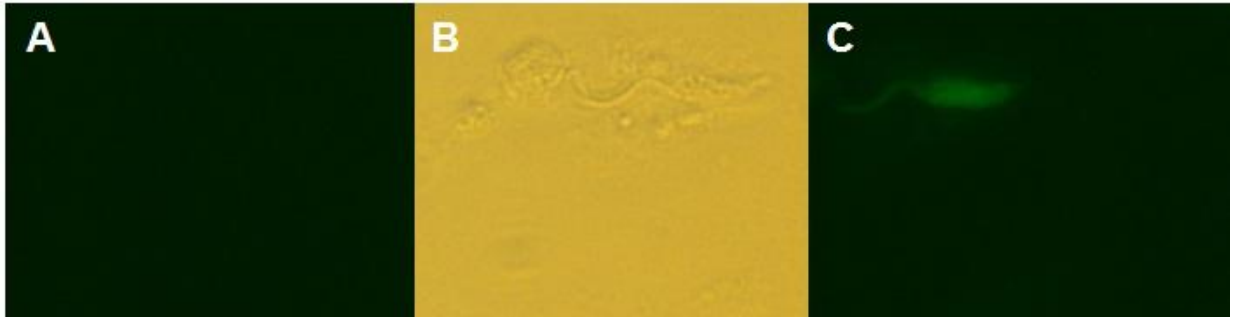
**Figura 28.** *T. cruzi* na forma epimastigotas transfectado com o vetor pREGFP. A- controle negativo da transfecção. B- *T. cruzi* na forma epimastigotas transfectado com o vetor, se dividindo e expressando a EGFP.

Neste trabalho então foi realizado a expressão transiente e sublocalização em *T. cruzi* da subunidade do complexo TcSCC1 e das centrinas 2, 4 e 5 a fusionados a EGFP (Figuras 29 a 32).

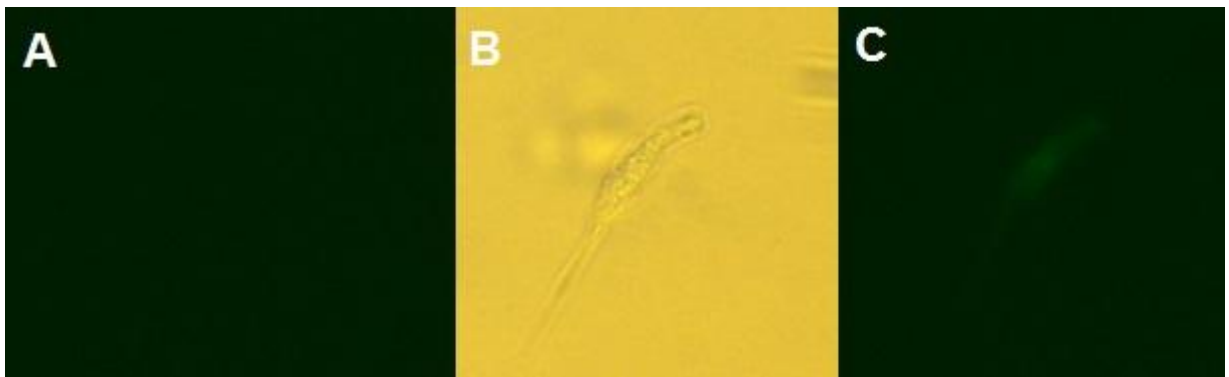
Nas análises de microscopia, para todas as fusões estudadas obtivemos uma intensidade de fluorescência predominantemente nuclear mas não especificamente. Deste modo, sugerimos que citolocalização específica vai ser otimizada com experimentos de sincronização celular. Algumas células das cepas pRTEGFPTcCEN2 e pRTEGFPTcCEN4 apresentam emissão de fluorescência visualmente maior que outras (Figuras 30C e 32C). Essa diferença na intensidade pode ser explicada pela localização das células em diferentes planos do campo de observação, ou pela diferença nos níveis de expressão das construções. A expressão da construção pRTEGFPTcSCC1 foi confirmada pela visualização de fluorescência na Figura 29D. A Figura 29B mostra a sobreposição das duas imagens de contraste de fase e emissão da EGFP.



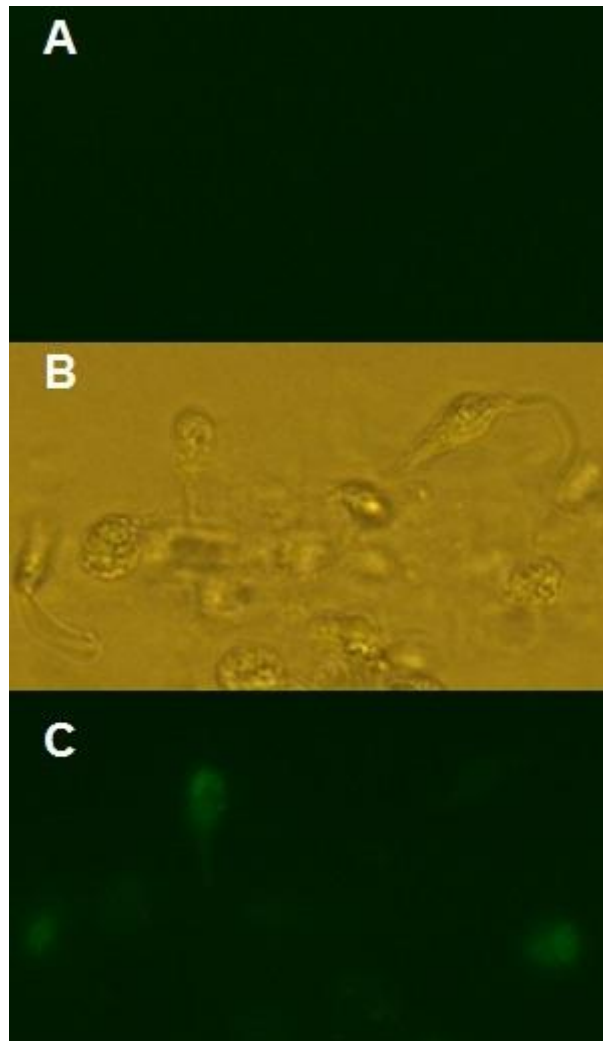
**Figura 29. Imagens de microscópio confocal de fluorescência do *T. cruzi* para a análise de citolocalização da proteína TcSCC1 fusionada a EGFP. A- célula eletroporada com PBS 1x controle negativo. B- Sobreposição da EGFP com o contraste de fase. C- Contraste de fase D- EGFP com excitação com comprimento de onda de 488nm e emissão de 509nm Barra 10µm.**



**Figura 30. Imagens de microscopia de fluorescência do *T. cruzi* para a análise de citolocalização da proteína TcCEN2 fusionada a EGFP. A- células eletroporadas com PBS 1x controle negativo. B- imagens de contraste de fase C- EGFP sendo excitada na faixa da ultravioleta.**



**Figura 31. Imagens de microscopia de fluorescência do *T. cruzi* para a análise de citolocalização da proteína TcCEN5 fusionada a EGFP. A- células eletroporadas com PBS 1x controle negativo. B- imagens de contraste de fase. C- EGFP sendo excitada na faixa da ultravioleta.**



**Figura 32. Imagens de microscopia de fluorescência do *T. cruzi* para a análise de citolocalização da proteína TcCEN4 fusionada a EGFP. A- células eletroporadas com PBS 1x controle negativo B- imagens de contraste de fase. C- EGFP sendo excitada na faixa da ultravioleta.**

Nos resultados obtidos neste trabalho, foi possível observar que o vetor pREGFP está expressando a proteína EGFP (Figura 28B) e também quando fusionadas com outros genes (Figuras 29D, 30C, 31C e 32C). Por microscopia confocal de fluorescência (HE et al.,2005), visualizou a TbCEN2 em *Trypanosoma brucei* fazendo parte da bolsa flagelar e segregação do complexo de Golgi durante o processo de divisão celular. Em *Trypanosoma brucei*, outro estudo baseado em transfecção de genes fusionados a EGFP demonstrou que a subunidade do complexo coesina, a proteína TbSCC1 possui maior taxa de fluorescência com maior intensidade nas fases S, G2 e início da mitose (GLUENZ et al.,2008).

## 5.8 Análise dos níveis de mRNA dos genes *TcSCC1* e *TcCEN1* a 5 por RT-PCR em tempo real

Para analisar os níveis de expressão dos mRNA dos genes *TcSCC1* e *TcCen1* a 5 das formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas, nós realizamos um RT-PCR em tempo real (qRT-PCR) usando oligonucleotídeos específico mostrados na Tabela 5. Os níveis de expressão de um gene dentro de uma célula podem ser alterados por diversas condições, como a fase do ciclo celular ou a exposição a diferentes ambientes (estímulos). A análise da expressão de genes requer medidas precisas e reprodutíveis de sequências específicas de mRNA. O método mais comum de quantificação de mRNA é a amplificação de moléculas individuais de RNA, pela combinação de transcrição reversa e pela reação da cadeia de polimerase em tempo real (SCHMITTGEN et al., 2000). Mesmo assim, é necessário haver seleção de uma estratégia apropriada de normalização para excluir possíveis erros experimentais, fornecendo, desse modo, dados mais confiáveis. A maioria dos experimentos de expressão gênica requer isolamento e processamento do ácido ribonucleico (RNA), e a quantidade final de RNA pode variar entre as amostras. Eficiência de síntese do ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) e diferenças na atividade geral de transcrição das células analisados (ANDERSEN et al., 2004).

A abordagem usada mais frequentemente para normalização em estudos de expressão gênica é o emprego de um controle interno ou gene de referência endógeno. Os genes endógenos codificam proteínas que oferecem funções básicas, essenciais, das quais todas as células necessitam para sobreviver. Eles devem ter níveis de expressão estáveis em diferentes tipos de células, por todos os estágios de desenvolvimento, e mesmo em várias condições. Entretanto, vários estudos mostraram que os níveis de transcrição de genes endógenos usados podem variar de forma considerável dependendo das condições que as células foram submetidas (COOK et al., 2010).

Nossos resultados de PCR quantitativo (Figura 33) mostrou que todos os genes são expressos na forma de mRNA presentes nas três formas do parasita: epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas. As centrinas 2 e 5 apresentaram a maior expressão relativa nas três formas enquanto que as centrinas 1 e 3 apresentaram expressão equivalente à GAPDH em amastigotas e epimastigotas, mas em tripomastigotas uma expressão maior. A centrina 4 apresentou uma

expressão relativa muito menor que a GAPDH e às outras centrinas nas três formas do parasita.

Os níveis de mRNA para o gene *TcCEN2* foram maiores em relação ao endógeno GAPDH para todas as formas de vida do *T. cruzi*. Esse fato pode ser explicado pelo fato dessas proteínas exercerem muitas funções intracelulares, reparo de DNA, exportação de mRNA, associada com proteínas do poro nuclear, e associada a bolsa flagelar como descrito por diversos autores (ARAKI et al, 2001;. WOLFRUM et al, 2002;. FISCHER et al., 2004).

Em *T. brucei* a centrina 3 foi descrita envolvida na segregação de organelas e citocinese agindo como parceiras da centrina 1. Além disso, mantém a estabilidade de uma dineína situada nos flagelos dando motilidade celular (SELVAPANDIYAN et al., 2007. YING et al.,2014)..



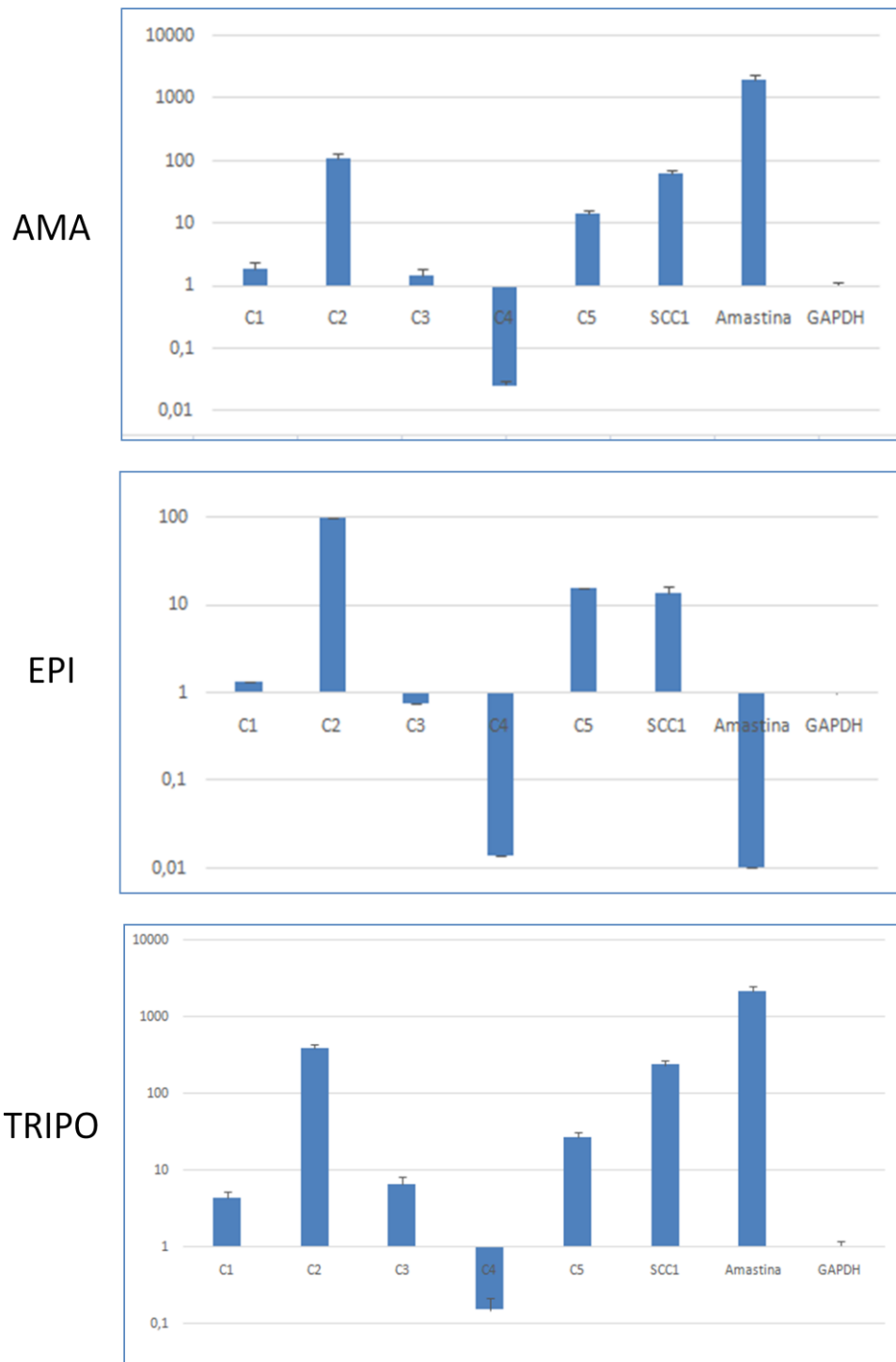


Figura 33. Análise dos níveis de mRNA em três formas de *T. cruzi* de possíveis genes envolvidos na divisão celular de *T. cruzi*. C1, C2, C3, C4 e C5 são respectivamente, TcCEN1, TcCEN2, TcCEN3, TcCEN4 e TcCEN5 e GAPDH (gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase).

## CONCLUSÕES

Os genes para a subunidade TcSCC1 e das proteínas centrinas foram clonados e confirmados por sequenciamento. Verificamos que todos os genes são expressos na forma de mRNA presentes nas três formas do parasita: epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas. As centrinas 2 e 5 apresentaram a maior expressão relativa nas três formas enquanto que as centrinas 1 e 3 apresentaram expressão equivalente à GAPDH em amastigotas e epimastigotas, mas em tripomastigotas uma expressão maior. A centrina 4 apresentou uma expressão relativa muito menor que a GAPDH e às outras centrinas nas três formas do parasita. As centrinas 2, 4 e 5, assim como a subunidade TcSCC1 da coesina fusionadas com EGFP apresentaram uma tendência a localização nuclear, mas não especificamente.

## PRÓXIMAS ETAPAS

Para prosseguir com o estudo sobre a divisão celular de *T. cruzi* a partir dos resultados obtidos neste trabalho, propomos as seguintes etapas:

- Análise da citolocalização das proteínas fusionadas com EGFP em transfecção transiente em um microscópio de fluorescência com maior resolução.
- Transfecção estável com as construções fusionadas e análise da citolocalização em cultura sincronizada com hidroxureia para avaliação durante o ciclo celular.
- Comparação da expressão e citolocalização nas diferentes formas de *T. cruzi*: amastigotas, tripomastigotas e epimastigotas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALARCON CM, SON HJ, HALL T, DONELSON JE. A monocistronic transcript for a trypanosome variant surface glycoprotein. *Molecular and Cellular Biology*, 14: 5579-5591. 1994
- ALSFORD, S. et al Epigenetic mechanisms, nuclear architecture and the control of gene expression in trypanosomes; *molecular medicine* Vol. 14; e 13; May 2012.
- ALSFORD, S.; HORN, D. Trypanosomatid histones. *Mol Microbiol* v. 53, n. 2, p. 365-372, 2004.
- ANDERSEN CL, et al. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.*;64(15):5245-50. 2004.
- ARAKI, Marito *et al.* Centrosome Protein Centrin 2/Caltractin 1 Is Part of the Xeroderma Pigmentosum Group C Complex That Initiates Global Genome Nucleotide Excision Repair. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 22, p. 18665–18672, 2001.
- AVASTHI .P, SCHEEL JF, YING G, FREDERICK JM, BAEHR W, WOLFRUM U. GERMLINE Deletion of *Cetn1* causes infertility in male mice. *Journal of Cell Science*. 126(14):3204-3213. doi:10.1242/jcs.128587. 2013.
- BAUM, P., FURLONG, C. AND BYERS, B. Yeast gene required for spindle pole body duplication: homology of its product with Ca<sup>2+</sup>-binding proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 83, 5512-5516. 1986.
- BERRIMAN et al. The Genome of the African Trypanosome *Trypanosoma brucei* *Science* Vol. 309, Issue 5733, pp. 416-422. 2005
- BIRNBOIM HC, DOLY J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research.*:1513-1523. 1979.
- BLOUQUIT, Y., CRAESCU, C.T. Calcium-dependent self-assembly of human centrin2. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 46, p. 47672-80, Nov 12 2004.
- BRITTON RA, LIN DC, GROSSMAN AD "Characterization of a prokaryotic SMC protein involved in chromosome partitioning.". *Genes Dev.* 12 (9): 1254–1259. doi:10.1101/gad.12.9.1254. PMID 9573042. 1998.
- CHALFIE. M. "GFP: Lighting up life". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (25): 10073–10080. 2009
- CHANG, DC; CHASSY, BM; SAUNDERS, JA; SOWERS, AE. Guide to electroporation and electrofusion. San Diego, California: Academic Press, Inc.; . p.1-10 1992.
- CHAPMAN, M. J., DOLAN, M. F. AND MARGULIS, L.. Centrioles and kinetosomes: form, function, and evolution. *Q. Rev. Biol.* 75, 409-429, 2000.

COLING, D. E.; SALISBURY, J. L. Characterization of the calcium-binding contractile protein centrin from *Tetraselmis striata* (Pleuroastrophyceae). *Journal of Protozoology*, v. 39, n. 3, p. 385-91, May-Jun 1992.

COOK NL, et al. Reference genes for normalising gene expression data in collagenase-induced rat intracerebral haemorrhage. *BMC Molecular Biology*.;11:7. 2010

COUGHLIN, B.C.; TEIXEIRA, S.M.; KIRCHHOFF LV, DONELSON, J.E. Amastin mRNA abundance in *Trypanosoma cruzi* is controlled by a 3'-untranslated region position-dependent cis-element and an untranslated region-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 12051-12060. 2000.

COURA, J.R. Tripanosomose, Doença de Chagas. *Ciênc. Cult.*, 55(1): 1-7, 2003.

COURA. JR, Mecanismo de transmissão da infecção chagásica ao homem por via oral. *Ver Soc Bras Med Trop*. 30 (supl 1) 45-7 .1997.

DIAS, J.C.P.; SILVEIRA, A.C.; SCHOFIELD, C.J. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 97: 603-612, 2002.

ELIAS, M. CAROLINA Q. B. "Chromosome Localization Changes in the *Trypanosoma Cruzi* Nucleus." *Eukaryotic Cell* 944–953, 2002.

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

ENGEL, J.C., DOYLE, P.S., DVORAK, J.A. *Trypanosoma cruzi*: biological characterization of clones derived from chronic chagasic patients. II. Quantitative analysis of the intracellular cycle. *J Protozool*. v.32, p.80-83, New York, 1985.

FISCHER, T., S. RODRIGUES-NAVARRO, G. PEREIRA, A. RACZ, E. SCHIEBEL, and E. Hurt. Yeast centrin Cdc31 is linked to the nuclear mRNA export machinery. *Nat. Cell Biol*. 6:840–848, 2004.

FISCHER, Tamás *et al.* Yeast centrin Cdc31 is linked to the nuclear mRNA export machinery. *Nature cell biology*, v. 6, n. 9, p. 840–8, 2004.

FOUSTERI MI, LEHMANN AR. "A novel SMC protein complex in *Schizosaccharomyces pombe* contains the Rad18 DNA repair protein". *EMBO J*. 19 (7): 1691–1702. doi:10.1093/emboj/19.7.1691. PMID 10747036, 2004.

GARCIA, E. S., DE AZAMBUJA, P. Fisiologia de triatomíneos: Desenvolvimento, reprodução e interação com o *Trypanosoma cruzi*. In Brener Z., Andrade Z. A., Barral-neto M. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2.ed, Guanabara Koogan, p.41-46, Rio de Janeiro, 2000.

GISSL, A., PULVERMULLER, A., TROJAN, P., PARK, J. H., CHOE, H. W., ERNST, O. P., HOFMANN, K. P. and WOLFRUM, U. Differential expression and interaction with the visual G-protein transducin of centrin isoforms in mammalian photoreceptor cells. *J. Biol. Chem*. 279, 51472-51481, 2004.

GISSL, A., TROJAN, P., RAUSCH, S., PULVERMULLER, A. and WOLFRUM, U. Centrins, gatekeepers for the light-dependent translocation of transducin through the photoreceptor cell connecting cilium. *Vision Res*. 46, 4502-4509, 2006.

- GISSLER, ANDREAS et al. Centrioles, gatekeepers for the light-dependent translocation of transducin through the photoreceptor cell connecting cilium. *Vision Research*, v. 46, n. 27, p. 4502–4509, 2006.
- GILINGER G, BELLOFATTO V. Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. *Nucleic Acids Research*. 2001;29(7):1556-1564. 2001.
- GLUENZ et al Functional characterization of cohesin subunit SCC1 in *Trypanosoma brucei* and dissection of mutant phenotypes in two life cycle stages *Molecular Microbiology* 69(3), 666–680 (2008)
- GLUENZ, et al., Functional characterization of cohesin subunit SCC1 in *Trypanosoma brucei* and dissection of mutant phenotypes in two life cycle stages *Molecular Microbiology* 69(3), 666–68 2008
- GOGENDEAU, Delphine *et al.* Functional diversification of centrioles and cell morphological complexity. 2008.
- GUACCI V, KOSHLAND D, STRUNNIKOV A . "A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through the analysis of MCD1 in *S. cerevisiae*". *Cell* 91 (1): 47–57. doi:10.1016/S0092-8674(01)80008-8. PMC 2670185. PMID 9335334, 1998
- He, C. Y., PYPART, M. and WARREN, G. Golgi duplication in *Trypanosoma brucei* requires Centrin2. *Science* 310, 1196-1198, 2005.
- HERNANDES-OZORIO, L. A., et al., Improved method for in vitro secondary amastigogenesis of *Trypanosoma cruzi*: morphometrical and molecular analysis of intermediate developmental forms. *J Biomedical Biotechnol.* 283-842, 2010.
- HIRANO T, KOBAYASHI R, HIRANO M. "Condensins, chromosome condensation complex containing XCAP-C, XCAP-E and a *Xenopus* homolog of the *Drosophila* Barren protein". *Cell* 89 (4): 511–21. doi:10.1016/S0092-8674(00)80233-0. PMID 9160743. 1997
- HIRANO, T. The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair. *Genes & Dev.* 16, 399-414, 2002
- HU, Haitao; CHAZIN, Walter J. Unique features in the C-terminal domain provide caltractin with target specificity. *Journal of Molecular Biology*, v. 330, n. 3, p. 473–484, 2003.
- IVENS. A. C et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major* *Science* vol:309:436 -42. 2005
- JULIE CLAYTON From Chagas disease 101 *Nature* 465, S4–S5 doi:10.1038/nature 09220 24 June 2010
- LANDEIRA, D. et al. Cohesin regulates VSG monoallelic expression in trypanosomes. *Journal of Cell Biology* 186, 243-254. 2009.
- LEE, JU HUCK. "Spliced Leader RNA Gene Transcription in *Trypanosoma Brucei* Requires Transcription Factor TFIIF ." *Eukaryotic Cell* 6.4: 641–649. 2007.
- LEWIN, B. *Genes VI*. New York. Oxford University Press and Cell Press, 1260p 1997.

- LOSADA A, HIRANO M, HIRANO T. "Identification of Xenopus SMC protein complexes required for sister chromatid cohesion". *Genes Dev.* 12 (13): 1986–1997. doi:10.1101/gad.12.13.1986. PMID 9649503, 1998.
- MANDACARU, S.C. Análise de proteínas nucleares reguladas na amastigogênese e de complexos proteicos de *Trypanosoma cruzi*. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) Universidade de Brasília, 2013
- MICHAELIS C, CIOSK R, NASMYTH K. "Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids". *Cell* 91 (1): 35–45. doi:10.1016/S0092-8674(01)80007-6. PMID 9335333, 1997.
- MIDDENDORP, et al. A role for centrin 3 in centrosome reproduction. *Journal of Cell Biology*, v. 148, n. 3, p. 405–415
- NASMYTH, K.; HAERING, C.H. The structure and function of SMC and kleisin complexes. *Annu. Rev. Biochem.* v. 74, 595-648, 2005.
- NATTAN-LARRIER L. Infections a trypanosomes et voies de penetrations des virus. *Bull Soc path exotique*; 14:537-42, 1921.
- ONN, I.; HEIDINGER-PAULI, J.M.; GUACCI, V.; UNAL, E.; KOSHLAND, D.E. Sister chromatid cohesion: a simple concept with a complex reality. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 24: 105-29, 2008.
- ONO T, LOSADA A, HIRANO M, MYERS MP, NEUWALD AF, HIRANO T. "Differential contributions of condensin I and condensin II to mitotic chromosome architecture in vertebrate cells". *Cell* 115 (1): 109–21. doi:10.1016/S0092-8674(03)00724-4. PMID 14532007, 2003.
- PAOLETTI, A., MOUDJOU, M., PAINTRAND, M., SALISBURY, JL., BORNENS, M. Most of centrin in animal cells is not centrosome-associated and centrosomal centrin is confined to the distal lumen of centrioles. *Journal of Cell Science*, v. 109 ( Pt 13), p. 3089- 102, Dec 1996.
- PETRES, E. B. Marcadores moleculares e morfológicos da citocinese em *Trypanosoma rangeli*, Universidade Estadual de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.
- RESENDES, KAREN K., BETH A. RASALA, and DOUGLASS J. FORBES. "Centrin 2 Localizes to the Vertebrate Nuclear Pore and Plays a Role in mRNA and Protein Export." *Molecular and Cellular Biology* 28.: 1755–1769. 5 2008.
- ROUT, M. P., J. D. AITCHISON, A. SUPRAPTO, K. HJERTAAS, Y. ZHAO, and B. T. CHAIT.. The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J. Cell Biol.* 148:635–651, 2000.
- RUIZ, Françoise et al. Centrin deficiency in *Paramecium* affects the geometry of basal-body duplication. *Current Biology*, v. 15, n. 23, p. 2097–2106, 2005.
- SALISBURY, et al. Centrin-2 is required for centriole duplication in mammalian cells. *Current Biology*, v. 14, n. 13, p. Vol. 12, 1287–1292, 2002.
- SALISBURY, J. L., K. M. SUINO, R. BUSBY, and M. SPRINGETT. Centrin-2 is required for centriole duplication in mammalian cells. *Curr. Biol.* 12: 1287–1292, 2002.
- SALISBURY, J. L.. Centrin, centrosomes, and mitotic spindle poles. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:39–45, 1995.

- SANTOS JUNIOR, Agenor de Castro Moreira. Análise proteômica da fração nuclear de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. 2014. 118 f., il. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular)—Universidade de Brasília, Brasília, 2014.
- SCHMITTGEN TD, et al. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem.*;285(2):194-204. 2000
- SELVAPANDIYAN A, KUMAR P, SALISBURY JL, WANG CC, NAKHASI HL Role of Centrioles 2 and 3 in Organelle Segregation and Cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. *PLoS ONE* 7(9): e45288. doi:10.1371/journal.pone.0045288. 2012
- SELVAPANDIYAN, et al. Role of Centrioles 2 and 3 in Organelle Segregation and Cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. *PLoS ONE*, v. 7, n. 9, p. 1–12, 2012.
- SELVAPANDIYAN, ANGAMUTHU et al. “Centrin1 Is Required for Organelle Segregation and Cytokinesis in *Trypanosoma Brucei*.” Ed. Orna Cohen-Fix. *Molecular Biology of the Cell* 18.9: 3290–3301. 2007
- SHEEHAN, Jonathan H. et al. Structure of the N-terminal calcium sensor domain of centrin reveals the biochemical basis for domain-specific function. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 5, p. 2876–2881, 2006.
- SHI J, FRANKLIN JB, YELINEK JT, EBERSBERGER I, WARREN G, HE CY. Centrin4 coordinates cell and nuclear division in *T. brucei*. *J Cell Sci.* 15;121(Pt 18): 2008.
- SOLARI, A. J., Mitosis and genome partition in trypanosomes. *Biocell* v.19, n. 2, p. 65-84, 1995.
- SOLARI, A. J., Mitosis and genome partition in trypanosomes. *Biocell* v.19, n. 2, p. 65-84, 1995.
- STORINO R, JORG ME, Vias de infección y aspectos clínicos, in: Storino R, Milei J, orgs. *Enfermedad de Chagas*. Buenos Aires Doyma; Ppp 132-4, 1994.
- STRYER. L. *Biochemistry*. New York. W.H. Freeman and Company, 881p
- TEIXEIRA SMR, KIRCHHOFF LV & DONELSON JE. Post-transcriptional elements regulating expression of mRNAs from the amastin/tuzin gene cluster of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 22586-22594. 1995
- TOMLINSON S, VANDEKERCKHOVE F, FREVERT U, NUSSENZWEIG V. The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. *Parasitology*. Jun;110 ( Pt 5):547-54, 1995.
- TROJAN, Philipp et al. Centrioles in retinal photoreceptor cells: Regulators in the connecting cilium. *Progress in Retinal and Eye Research*, v. 27, n. 3, p. 237–259, 2008.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. TDR - Tropical Disease Research: progress 2009-2012. Programme report of the UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Facts Sheets Link: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>, accessed on 14/06/2016.
- WOLFRUM et al. Calcium-dependent assembly of centrin-G-protein complex in photoreceptor cells. *Molecular and cellular biology*, v. 22, n. 7, p. 2194–203, 2002.



YING WEI, HUIQING HU ZHAO-RONG LUN. Centrin3 in trypanosomes maintains the stability of a flagellar inner-arm dynein for cell motility. Nature Article number: 4060. 2014.

YUSTE. R. "Fluorescence microscopy today". Nature Methods 2 (12): 902–4. doi:10.1038/nmeth1205-902. 2005