

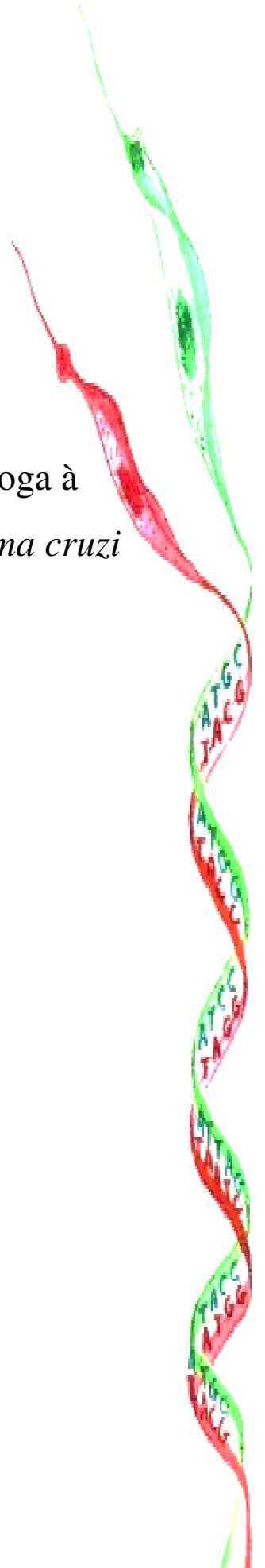


**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR**

Análise da expressão gênica da proteína homóloga à
Scc1/Rad21 do complexo Coesina em *Trypanosoma cruzi*

Fabiana Brandão Alves Silva

Brasília
2012





**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR**

Análise da expressão gênica da proteína homóloga à
Scc1/Rad21 do complexo Coesina em *Trypanosoma cruzi*

Fabiana Brandão Alves Silva

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Dolabela de Lima

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

Brasília
2012

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Biologia do Gene do Departamento de Biologia do Gene da Universidade de Brasília, com apoio financeiro do CNPq.

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Dolabela de Lima

Quando tudo diz que não... Tua voz me encoraja a prosseguir... Quando tudo diz que não, ou parece que o mar não vai se abrir... Sei que não estou só e o que dizes sobre mim não pode se frustrar, cumpra em mim TEU querer.

DEUS do impossível não desistiu de mim, Sua destra me sustenta e me faz prevalecer.

Dedico este trabalho:

A *Ele*, aquele que me fez chegar até aqui e ir além, que me sustenta em minhas fragilidades, que me ama e me ensina a ser forte e buscar o que realmente vale a pena. A *Ele* que me faz capaz de todas as coisas, que não me deixa desisti de nada que sonhamos juntos. A *Ele* meu amado *JESUS...*

“Vou perseguir tudo aquilo que o *Senhor* já escolheu para mim, nada e ninguém me farão desistir, tudo posso em *Ti* que me fortalece”.

Deus sempre em primeiro lugar.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Gladys por ter me ensinado a sempre estender a mão a quem precisa e isto me fez ter esta vontade de usar o que aprendo em favor do próximo.

À minha avó Gercila, que é para mim um exemplo de humildade, fé e força.

Ao meu pai Fabio, que nos mostrou como olhar a vida sem medo, a amar a Deus de todo coração.

À minha tia Dete, que por amor e confiança me amparou e tornou possível eu ver e buscar mais além.

Aos meus irmãos Mariana, Anna e Raul por eu saber o quanto vocês se orgulham de mim e o quanto eu me orgulho de cada um de vocês. May com seu enorme coração, Anna com sua vasta sabedoria e Raul com sua enorme coragem e força.

Aos pedacinhos do amor de Deus derramado em nossas vidas, meus sobrinhos Victor, Alan, Maria Cecília, Joseph e Giovana, toda vez que olho para vocês agradeço a Deus pelo presente que vocês são em minha vida.

À Samyra, pelo amor, sabedoria e força a mim dedicados, te amo.

À minha Tia Viviane, por sempre ter sido uma irmã para mim, alguém sempre pronta a ajudar e servir. Obrigada, Vi.

Aos meus cunhados Jefferson e Thiago, à minha cunhada linda Larissa, aos amigos Rose e Marcílio Caxito, muito obrigada pela força e incentivo de vocês.

À minha orientadora e professora Dra. Beatriz Dolabela de Lima, por seus conhecimentos e sua vasta experiência compartilhados, sem você este trabalho não seria possível, obrigada.

À duas pessoas muito especiais, as grandes responsáveis pela realização desse sonho. Dois grandes mestres que tive ao longo da jornada. Com eles eu aprendi muito, muito além da biologia molecular... Renata Cristina Grangeiro Ferreira, minha irmã, sábia, humilde, justa, paciente fiel, muito obrigada... Ricardo Camargo, meu irmão, com a sua inteligência rara, sagaz e criativa, muito obrigada. Sem você não seria possível.

À amiga irmã Lilian Queiroz, pelos estímulos, pelo apoio e grande amizade que tantas vezes me deu forças para prosseguir. Você é uma pessoa cheia de luz, meiga e humilde. Obrigada pelo carinho.

À Amanda, Klênia e Jessika, pelos muitos momentos de força, paciência e risadas gostosas. Foram muitos bons momentos, realmente fomos o melhor apartamento da colina.

À Dra. Líliam de Oliveira Faria Maçaneiro, pelo carinho e conselhos que muito me ajudaram. Líliam, você é muito especial, obrigada, você me ajudou muito.

Aos meus amigos Helaine, Jorge e Henrique, que souberam escolher as palavras e momento certo para falar e me encorajar.

À Dra. Alessandra R. E. O. Xavier, minha amiga, que sempre me incentivou e acreditou que eu podia ir mais adiante.

A todos os amigos do Laboratório de Biologia do Gene, Samuel, Stenia, Marinez, Agenor, obrigada pelo carinho e paciência.

A todos os amigos dos Laboratórios de Interação Parasita-Hospedeiro e de Imunologia Aplicada, Ana Camila, Flávia, Márcio, Luiza, Rafael e Pedro.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular, Profa. Dra. Ildinete Pereira, Lorena, Robson, Marciano, Caliandra, obrigada a todos vocês.

Aos amigos da Farmacologia Molecular, Carol, Maíra, Martha.

Ao amigo Chiquinho da Biofísica, pela boa vontade e pelas boas risadas.

Ao amigo Dr. Luis Sakamoto, pela ajuda com actinomicina D e pelas conversas prazerosas de biomol.

À Dra. Santuza Teixeira, pelas discussões e ajuda.

Aos coordenadores da Pós-Graduação em Biologia Molecular Prof. Dr. Renato Rezende e Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brigido, à secretária Ana Hilda Tiberti, ao Decanato de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade de Brasília, pelo apoio.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
SIGLAS E ABREVIATURAS	v
INTRODUÇÃO	1
1. <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
2. A doença de Chagas e seus aspectos epidemiológicos	4
3. Aspectos genéticos do <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
4. Transcrição em Tripanossomatídeos	9
5. Regulação gênica em Eucariotos	10
6. Regulação gênica em Tripanossomatídeos	11
6.1. <i>Processamento de RNA</i>	13
6.2. <i>Regiões não traduzidas</i>	15
6.3. <i>Cis-elementos</i>	17
6.4. <i>Transativadores</i>	18
6.5. <i>Degradação de mRNA em tripanossomas</i>	19
7. Ciclo celular	19
8. O complexo Coesina em Eucariotos	21
8.1. <i>As subunidades Smc1 e Smc3</i>	23
8.2. <i>As subunidades Scc1 e Scc3</i>	24
9. Divisão celular em <i>T. cruzi</i>	25
9.1. <i>O complexo Coesina em tripanossomatídeos</i>	26
OBJETIVOS	29
MATERIAL E MÉTODOS	30
RESULTADOS	52
1. Análise comparativa da expressão do gene TcSCC1 nas diferentes formas do <i>T. cruzi</i>	52
2. Análises em bancos de dados genômicos das regiões 5' e 3' UTR do gene <i>TcSCC1</i>	53
3. Amplificação e clonagem das regiões 5' UTR e 3' UTR do mRNA da TcSCC1	54

3.1. Análise da região 5' UTR do mRNA da <i>TcSCC1</i>	55
3.2. Análise da região 3' UTR do mRNA da <i>TcSCC1</i>	57
4. Análise comparativa dos níveis de mRNA entre as formas epimastigotas e amastigotas de <i>T. cruzi</i>	59
4.1. Análise da estabilidade do mRNA da <i>TcSCC1</i> por RT-PCR semi-quantitativo.....	61
4.2. Análise comparativa dos níveis de mRNA por PCR em tempo Real.....	65
DISCUSSÃO	71
CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formas diferenciadas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
Figura 2. Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
Figura 3. Mapa da distribuição de casos da doença de Chagas e do vetor transmissor em todo mundo.....	5
Figura 4. Transcrição de genes organizados em <i>clusters</i> em tripanossomatídeos	8
Figura 5. Representação esquemática do processo de <i>trans-splicing</i> e poliadenilação do pré-mRNA em <i>T. cruzi</i>	14
Figura 6. Transcrição e processamento de mRNAs em tripanossomatídeos.....	15
Figura 7. Modelo da interação entre TcUBP-1, TcUBP-2 e PABP1 no RNA durante o desenvolvimento do parasita.....	19
Figura 8. Regulação da anáfase e saída da mitose pela APC/CCdc20.....	21
Figura 9. Modelos de atuação do complexo Coesina para a manutenção das cromátides irmãs juntas.....	22
Figura 10. Estrutura do dímero Smc e complexo Coesina.....	24
Figura 11. Ciclo da Coesina.....	25
Figura 12. Modelo da dinâmica dos cromossomos durante o ciclo celular do <i>T. cruzi</i>	26
Figura 13. Esquema utilizado para obtenção do RNA das formas amastigotas intracelulares de <i>T. cruzi</i> para o tratamento com actinomicina D.....	40
Figura 14. Esquema utilizado para obtenção do RNA das formas amastigotas intracelulares de <i>T. cruzi</i> em ensaios com Actinomicina D e Cicloheximida.....	41
Figura 15. Esquema utilizado para obtenção do RNA das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> para o tratamento com actinomicina D.....	42
Figura 16. Esquema utilizado para obtenção do RNA das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> em ensaios com Actinomicina D e Cicloheximida.....	43
Figura 17. Vetor recombinante com a região 5'UTR do <i>TcSccl</i>	47
Figura 18. Quantificação relativa dos níveis do mRNA do gene <i>TcSCC1</i> nas diferentes formas do <i>T. cruzi</i>	52
Figura 19. Sequência genômica e organização do <i>cluster</i> onde está presente o gene <i>TcSCC1</i> de <i>T. cruzi</i>	54

Figura 20. Estratégia utilizada na amplificação das regiões UTR do mRNA da <i>TcSCC1</i> do complexo Coesina.....	55
Figura 21. Mapeamento da região 5' UTR do gene <i>TcSCC1</i>	56
Figura 22. <i>Nested</i> PCR da região 5' UTR do gene <i>TcSCC1</i>	56
Figura 23. Análise do plasmídeo recombinante pETcSCC1/5'UTR.....	57
Figura 24. Mapeamento da região 3'UTR do gene <i>TcSCC1</i>	58
Figura 25. Sequência intergênica 3' do gene <i>TcSCC1</i> e 5' do gene hipotético a jusante em <i>T. cruzi</i>	59
Figura 26. Avaliação da integridade do RNAs totais de <i>T. cruzi</i> após tratamento com Actinomicina D.....	60
Figura 27. Análise comparativa dos níveis de mRNA dos genes TcSCC1 e TcAmastina nas formas epimastigotas e amastigotas de <i>T. cruzi</i> após tratamento com actinomicina D.....	62
Figura 28. Análise comparativa dos níveis de mRNA dos genes TcSCC1 e TcAmastina nas formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após tratamento com actinomicina D e com actinomicina D e cicloheximida.....	64
Figura 29. Análise comparativa dos níveis de mRNA dos genes TcSCC1 e TcAmastina nas formas amastigotas de <i>T. cruzi</i> após tratamento com actinomicina D e com actinomicina D e cicloheximida.....	65
Figura 30. Quantificação relativa por RT-PCR em tempo real dos níveis do mRNA da TcSCC1 e da TcAmastina nas formas epimastigotas e amastigotas após tratamento com actinomicina D.....	67
Figura 31. Quantificação relativa por RT-PCR em tempo real dos níveis do mRNA da TcSCC1 nas formas epimastigotas, após tratamento com actinomicina D e com actinomicina D e cicloheximida.....	69
Figura 32. Quantificação relativa por RT-PCR em tempo real dos níveis do mRNA da TcSCC1 nas formas amastigotas, após tratamento com actinomicina D e com actinomicina D e cicloheximida.....	70

RESUMO

O complexo Coesina tem a função essencial de assegurar a correta segregação das cromátides irmãs após replicação do DNA. A Coesina atua tanto na mitose como na meiose e é mais bem descrita em leveduras e mamíferos. O complexo se forma pela interação das subunidades proteicas conhecidas como SMC (proteínas de manutenção estrutural dos cromossomos), SMC1 e SMC3, e duas proteínas SCC (proteínas de coesão das cromátides irmãs), a SCC1 (também conhecida como Mcd1 ou Rad21) e SCC3 (SA1 e SA2 em células de mamíferos). Existem poucos estudos sobre a Coesina e sua função em tripanossomatídeos, sendo que foi verificada a presença dos genes para todas as subunidades da Coesina em *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* e a *Leishmania major*. Em trabalhos recentes do nosso grupo, foi observado que a subunidade SCC1 do complexo Coesina em *T. cruzi* está presente nas formas amastigotas com localização nuclear, em menor quantidade em epimastigotas distribuída por toda a célula e ausente em tripomastigotas. Desse modo, essa diferença da presença da proteína TcSCC1 nas diferentes formas do parasita nos levou a estudar nesse trabalho a expressão gênica dessa proteína de *T. cruzi* e sua regulação. Inicialmente, foi realizada uma quantificação relativa do mRNA da proteína SCC1 nas diferentes formas do *T. cruzi* por RT-PCR em tempo real. As formas amastigotas e tripomastigotas apresentaram uma quantidade relativa semelhante entre si e equivalente à metade da quantidade das formas epimastigotas, o que diverge do observado para a presença da proteína. Assim, é possível que haja um mecanismo regulatório provavelmente pós-transcricional, já que é descrito que esse tipo de regulação é peça chave na modulação da expressão gênica em *T. cruzi*. Nos experimentos onde foi inibido a transcrição e a transcrição juntamente com a tradução nas formas epimastigotas e amastigotas, observamos uma estabilidade do mRNA da TcSCC1 mais longa em amastigotas e pouco afetada com a inibição da tradução. Essa observação pode explicar a causa da maior abundância da proteína nas formas amastigotas. Embora em epimastigotas o mRNA também seja relativamente estável, a quantidade relativa decresce mais acentuadamente, sugerindo uma meia vida mais curta em epimastigotas. É provável que a regulação pós-transcricional desse mRNA possa estar modulando a expressão do gene *TcSCC1* entre as formas do *T. cruzi* e essa não é dependente da tradução.

ABSTRACT

The cohesin complex has the essential function of ensuring the correct segregation of sister chromatids after DNA replication. The cohesin acts both in mitosis as in meiosis and is best described in yeast and mammals. The complex is formed by the interaction of protein subunits known as SMC (structural maintenance of chromosomes), SMC1 and SMC3, and two proteins SCC (cohesion of sister chromatids), the SCC1 (also known as Mcd1 or Rad21) and SCC3 (SA1 and SA2 in mammalian cells). There are few studies of the cohesin and its function in trypanosomatids, and it was detected the presence of genes for all subunits of cohesin in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* and *Leishmania major*. In recent work from our group, we observed that the SCC1 subunit of cohesin complex in *T. cruzi* amastigotes is present with nuclear localization, in epimastigotes with a lesser amount distributed throughout the cell and absent in trypomastigotes. Thus, this difference of the presence of TcSCC1 protein in the different forms of the parasite led us to study in this work the gene expression of this *T. cruzi* protein and its regulation. Initially, we performed a relative quantification of TcSCC1 mRNA in the different forms of *T. cruzi* by real time RT-PCR. The amastigotes and trypomastigotes forms presented a relative similar amount among themselves and as equivalent to half the amount of the epimastigote forms, which differs of that observed for presence of the protein. Thus, there may be a possible post-transcriptional regulatory mechanism, since it is reported that this type of regulation is a key part in the modulation of *T. cruzi* gene expression. In experiments where transcription was inhibited and transcription along with translation in epimastigotes and amastigotes, we observed longer stability of TcSCC1 mRNA in amastigotes and is not affected by the inhibition of the translation. This observation may explain why the protein is more abundant in amastigotes. Although in epimastigotes the mRNA is also relatively stable, the relative amount decreases more markedly, suggesting shorter half life in epimastigotes. It is likely that post-transcriptional regulation of this mRNA may be modulating the TcSCC1 gene expression between the forms of *T. cruzi* and that is not dependent on translation.

SIGLAS E ABREVIATURAS

AMD – Actinomicina D

ARS – região rica em AU

CHX – Cicloheximida

DEPC - Dietipirocarbonato

DMEM – Meio Eagle modificado por Dulbecco's (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DMSO – Dimetil sulfóxido (*Dimethyl sulfoxide*)

EDTA – Ácido etileno-diamino-tetra-acético (*Ethylenediaminetetraacetic acid*)

HEPES – Ácido N-2-hidoxietil-piperazina-N'-2-etano-sulfônico (*4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*)

HSP - proteína do choque térmico

IPTG – Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (*Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*)

LIT – meio de cultura com infuso de fígado e triptose para crescimento de *T. cruzi* (*Liver Infusion Tryptose*)

MOPS – 3-(N-morpholino) ácido propanesulfônico (*3-(N-morpholino)propanesulfonic acid*).

mRNA – RNA mensageiro (*Messenger RNA*)

PBS – Tampão salina fosfato (*Phosphate Buffer Saline*)

RNA pol – Enzima que transcreve RNA (RNA polimerase)

rRNA– RNA ribossomal (*ribosome RNA*)

SCC - Proteínas de Coesão das Cromátides-irmãs (Sister Chromatid Cohesion Proteins)

SDS – Dodecilsulfato de sódio (*Sodium Dodecyl Sulfate*)

SL - sequência líder (*Spliced leader*)

SMC - Proteína de Manutenção Estrutural dos Cromossomos (*Structural Maintenance of Chromosomes*)

TBP – proteína de ligação ao TATA box

Tris – Tri (hidroximetil) aminometano (*Tris (hydroxymethyl)aminomethan*)

INTRODUÇÃO

1. *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário parasita digenético pertencente ao reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, sub-filo Mastigophora, classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastida, sub-ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae, gênero *Trypanosoma*, espécie *Trypanosoma cruzi* (LEVINE *et al*, 1980).

Organismos da ordem Kinetoplastida apresentam uma organela especializada denominada cinetoplasto, correspondente à sua mitocôndria, e composto por uma grande quantidade de DNA em forma de bastão, o qual é denominado kDNA. Um dos critérios para se definir as formas evolutivas presentes na família Trypanosomatidae é a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo (HOARE; WALLACE, 1966; MASLOV; SIMPSON, 1995).

O gênero *Trypanosoma* pode ser dividido em dois grupos: Stercoraria e Salivaria. O grupo Stercoraria apresenta como características o desenvolvimento no tubo digestivo do inseto vetor e as formas infectivas são liberadas nas fezes, tendo como exemplos deste grupo o *T. cruzi* e o *T. lewisi*. O grupo Salivaria apresenta suas formas infectivas nas glândulas salivares do inseto que são inoculadas mecanicamente no hospedeiro, tendo como exemplo desse grupo o *T. brucei*, *T. congolense* e *T. rangeli* (BRENER, 1979).

O *Trypanosoma cruzi* apresenta três formas básicas: tripomastigotas, epimastigotas e amastigotas, classificadas em função de sua morfologia, da maneira como o flagelo emerge do corpo celular e como já citado a posição do núcleo em relação ao cinetoplasto. Esses diferentes estágios celulares são determinados pela passagem do parasito pelos hospedeiros invertebrado e vertebrado (BRENER, 1979).

Nas formas epimastigotas, o parasita apresenta aspecto alongado, com cinetoplasto justanuclear e anterior ao núcleo e o flagelo encontra-se livre na porção anterior. Essa é a forma de replicação no hospedeiro invertebrado que ocorre por divisão binária longitudinal (Figura 1B) (REY, 2001).

As formas tripomastigotas são mais alongadas em comparação às formas epimastigotas, o cinetoplasto é posterior ao núcleo e o flagelo se estende por toda célula

e torna-se livre na porção anterior (Figura 1A) (LANA; TAFURI, 2000; REY, 2001). As formas tripomastigotas são encontradas na circulação sanguínea do hospedeiro vertebrado, podendo estar presente também nos espaços intersticiais, líquido cefalorraquidiano, leite e esperma (REY, 2001).

As formas amastigotas são arredondadas ou ovaladas, com um flagelo curto que não se exterioriza (Figura 1C). O cinetoplasto se apresenta em forma de bastão anterior ao núcleo. Essa é a forma replicativa no hospedeiro vertebrado e está presente no interior das células infectadas (NEVES *et al*, 2005).

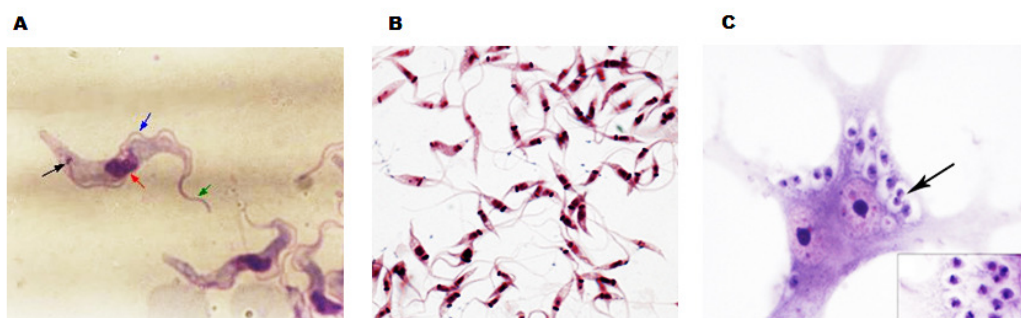


Figura 1: Formas diferenciadas do *Trypanosoma cruzi*. (A) Formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Seta preta - cinetoplasto; vermelha - núcleo; azul - membrana ondulante; verde – flagelo (UFRGS, 2011). (B) Formas epimastigotas de *T. cruzi*. (C) Formas amastigotas de *T. cruzi*. A seta aponta para núcleo da amastigota. (FIOCRUZ, 2011).

A infecção por *T. cruzi* ocorre durante o repasto sanguíneo, onde o vetor triatomíneo (barbeiro) elimina as formas tripomastigotas metacíclicas nas fezes e na urina (Figura 2). O indivíduo, ao coçar o local, favorece a penetração e a interação do *T. cruzi* com células do sistema mononuclear fagocitário (SMF) e células musculares. As formas epimastigotas também podem penetrar por esse mesmo processo, entretanto elas são destruídas por células fagocitárias e não participam no restante do processo. Já os tripomastigotas metacíclicos iniciam a invasão das células do hospedeiro com a sua adesão à superfície celular, sendo posteriormente fagocitados. Dentro da célula, os tripomastigotas são envoltos por uma membrana formando o vacúolo parasitóforo que sofrerá fusão com lisossomos da célula hospedeira. O vacúolo torna-se então ácido e ocorre o início do processo de diferenciação das formas tripomastigotas para as formas amastigotas e da dissolução da membrana por ação de enzimas secretadas pelas formas tripomastigotas (BURLEIGH; WOOLSEY, 2002). Em seguida, as formas amastigotas se dividem por fissão binária a cada 12 horas. Após uma série de divisões ocorre a diferenciação das formas amastigotas em tripomastigotas sanguíneos e a ruptura da

célula. O processo desde a infecção até ruptura da célula dura de três a seis dias (VERONESI, 2005).

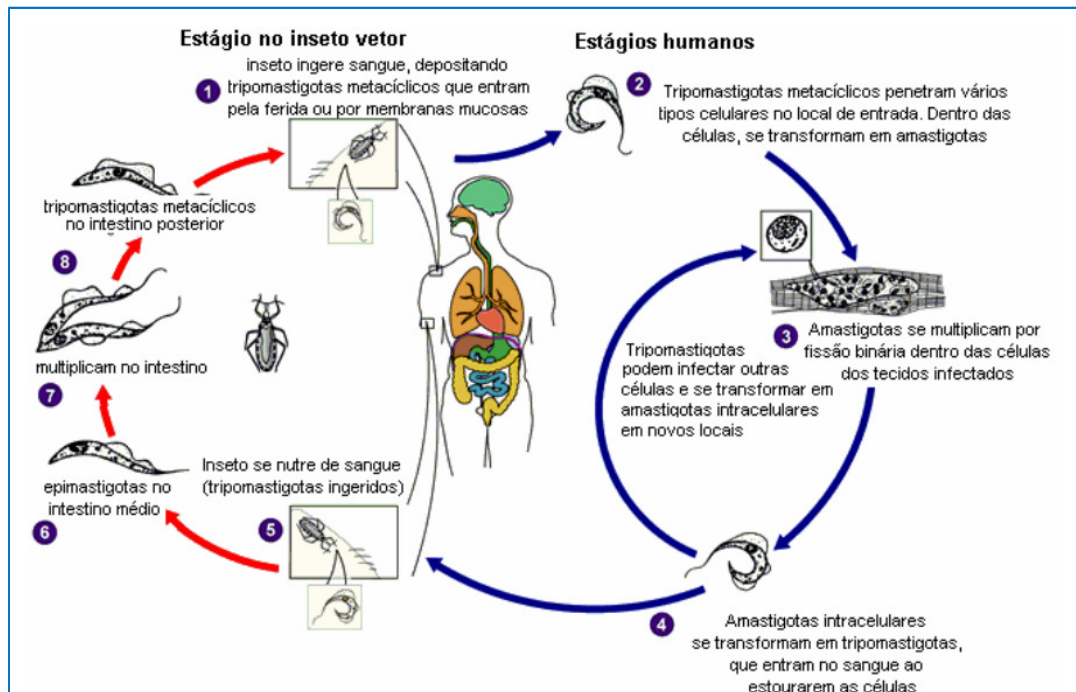


Figura 2. Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*. O esquema mostra as formas presentes no inseto vetor (barbeiro) e as encontradas no hospedeiro mamífero. (1) O inseto triatomíneo se alimenta de sangue (formas tripomastigotas metacíclicas presentes nas fezes do triatomíneo entram nas membranas mucosas, bem como nas conjuntivas através do local da picada), (2) Tripomastigotas metacíclicas penetram em várias células e no interior das mesmas se transformam em amastigotas, (3) Amastigotas multiplicam-se nas células infectadas por divisão binária, (4) Amastigotas intracelulares transformam-se em tripomastigotas. Rompem as células e entram na corrente sanguínea (tripomastigotas sanguíneas), (5) O inseto triatomíneo alimenta-se de sangue (tripomastigotas sanguíneas são ingeridos), (6) Estágio epimastigota na porção média do intestino do triatomíneo, (7) Multiplicação de epimastigotas na porção média do intestino do triatomíneo, (8) Transformação epimastigota-tripomastigota metacíclico na porção posterior do intestino do triatomíneo (DPDx, 2011).

No hospedeiro invertebrado, o triatomíneo adquire o patógeno ao se alimentar do sangue de um hospedeiro vertebrado infectado e no estômago do inseto o *T. cruzi* se diferencia numa forma arredondada com flagelo circundando o corpo. Essa forma inicial no vetor é denominada esferomastigota, a qual se transforma em epimastigotas, que são dotadas de grande motilidade. Daí vão para o intestino médio do artrópode, onde iniciam a multiplicação binária. Em seguida os epimastigotas migram para o intestino posterior do vetor onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos que são a forma infectante para os hospedeiros vertebrados, os quais são eliminados nas fezes e urina do vetor (VERONESI, 2005).

Em resumo, o ciclo acontece da seguinte forma: tripomastigotas são liberados das células hospedeiras e caem na circulação, podendo assim seguir dois caminhos: (i) os tripomastigotas invadem novas células do hospedeiro (SMF, células musculares: lisas, esqueléticas, cardíacas, nervosas, etc.), reiniciando o ciclo neste hospedeiro, ou (ii) o sangue contaminado é sugado por um vetor triatomíneo (barbeiro), infectando-o com formas tripomastigotas sanguíneas, que se converterão em epimastigotas, e posteriormente tripomastigotas metacíclicas. (DE SOUZA, 2002; TYLER; ENGMAN, 2001) (Figura 2).

2. A doença de Chagas e seus aspectos epidemiológicos

A tripanossomíase americana ou Doença de Chagas como é mais conhecida é uma zoonose muito frequente na América Latina e apresenta como agente etiológico o parasita flagelado *Trypanosoma cruzi*. É um dos maiores problemas de saúde pública no continente americano decorrente de sua alta prevalência, morbidade e mortalidade (VERONESI, 2005).

O brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano Chagas (1909) identificou inicialmente o *T. cruzi* em insetos da espécie *Panstrongylus megistus*, coletados no município de Lassance no estado de Minas Gerais, Brasil. Outras espécies também atuam como vetores da transmissão da doença de Chagas como o *Triatoma infectans* e o *Triatoma sordida* (DE SOUZA, 2002; KROPF, 2009).

Dados da Organização Mundial de Saúde apontam que 10 milhões de pessoas estão infectadas em todo mundo e outras 25 milhões encontram-se em áreas de risco (Figura 3). No ano de 2008 aproximadamente 10 mil pessoas morreram com a doença (WHO - *World Health Organization*). Na América a dispersão do *T. cruzi* encontra-se bastante ampla no que se refere à enzootia. A distribuição da doença pode ocorrer em todas as áreas onde haja triatomíneos antropofílicos adaptados ao domicílio. No Brasil há 44 espécies de triatomíneos já identificados sendo na sua maioria silvestres. Dentre essas espécies, vale ressaltar as de hábitos domésticos, como *Triatoma infestans*, que abrange desde o Rio Grande do Sul até Pernambuco, Paraíba e Piauí; o *Panstrongylus megistus* que se encontra disperso por Santa Catarina, Rio de Janeiro, onde é silvestre, e Minas Gerais e Bahia, onde é domiciliado ou silvestre; o *T. brasiliensis* e o *T.*

pseudomaculata, que podem ser silvestre bem como domésticos e predominam no Nordeste; e o *T. sordida*, de ampla distribuição do Rio Grande do Sul ao Piauí, ocupando muitas vezes nichos de onde o *T. infestans* foi eliminado (COURA, 2003). No Brasil, atualmente predominam os casos crônicos de doença de Chagas decorrentes de infecções adquiridas no passado com aproximadamente três milhões de indivíduos infectados. No entanto, nos últimos anos, a ocorrência da doença de Chagas aguda tem sido observada nos estados da Amazônia, com ocorrência de casos isolados em outros estados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

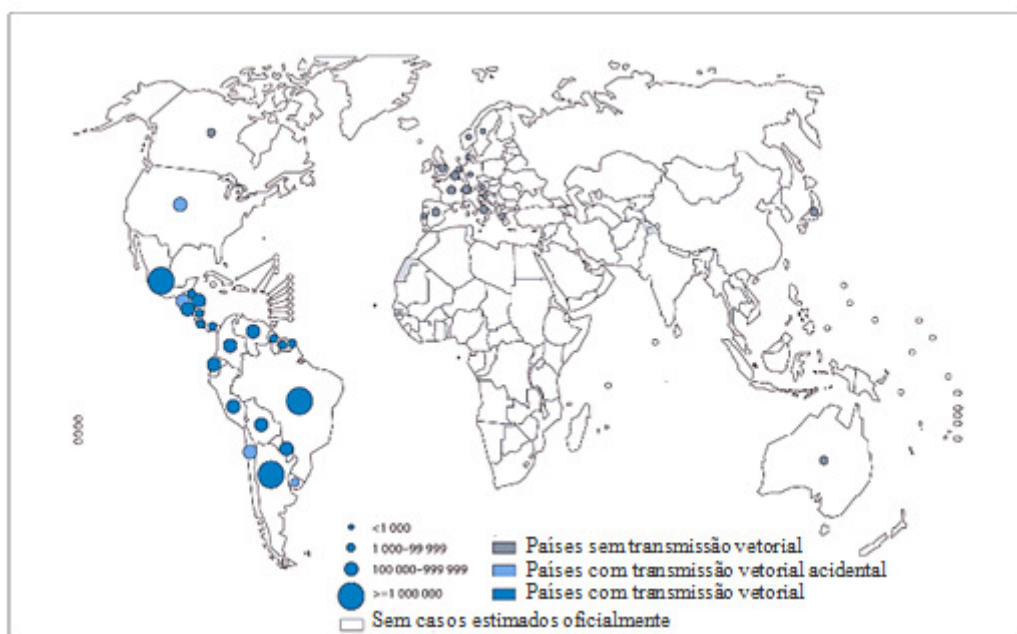


Figura 3: Mapa da distribuição de casos da doença de Chagas e do vetor transmissor em todo mundo (WHO).

A Doença de Chagas apresenta sintomatologia variável, o que parece estar relacionado com o fato do *T. cruzi* ser heterogêneo em nível de composição antigênica e conteúdo de DNA (ZINGALES et al., 1984; WAGNER; SO, 1990). Os processos patológicos fundamentais induzidos aos tecidos pelo *Trypanosoma cruzi* são o processo inflamatório, lesões celulares e a fibrose (VERONESI, 2005).

A infecção por *T. cruzi* leva à mobilização de múltiplos mecanismos humorais e celulares da resposta imune adaptativa, assim como mecanismos inespecíficos da imunidade inata, os quais levam à eliminação dos parasitas da circulação e a diminuição de sua replicação intracelular. Entretanto tais mecanismos não eliminam totalmente o

parasita e a persistência da resposta imune pode levar ao surgimento de lesões teciduais que podem causar alterações morfológicas (BRENER et al., 2000). Há uma grande complexidade da resposta imunológica em relação às formas do parasita. Uma delas é a ação da via alternativa do complemento, onde as formas não infectivas epimastigotas são lisadas, enquanto as formas infectivas tripomastigotas são resistentes. Este fato está relacionado de forma direta aos mecanismos de expressão gênica do *T. cruzi* que leva à expressão diferencial de proteínas de membrana, tais como a gp160 e a T-DAF (NOGUEIRA et al., 1975; NORRIS et al., 1991).

3. Aspectos genéticos do *Trypanosoma cruzi*

Os tripanossomatídeos possuem um genoma nuclear e outro mitocondrial. O DNA mitocondrial ou kDNA, como é comumente conhecido, é constituído por uma enorme rede de pequenas moléculas circulares de DNA interligados que se assemelham a um colar de contas. O kDNA chega a representar aproximadamente 30% do total de DNA celular e organiza-se em dois tipos: os maxicírculos e minicírculos (SIMPSON, 1987). Os maxicírculos apresentam genes que codificam proteínas mitocondriais responsáveis pela cadeia transportadora de elétrons, enquanto que os minicírculos apresentam até então uma única função identificada, que é produzir pequenos RNAs guias (50-100 nucleotídeos) responsáveis pela editoração de outros transcritos. A editoração é um modo não usual usado pelos tripanossomatídeos, onde mRNAs sofrem inserção ou remoção de resíduos de uridina. Os maxicírculos também produzem esses pequenos RNAs guias (SHAPIRO; ENGLUND, 1995; STUART et al., 1997; GUILBRIDE; ENGLUND, 1998).

Quanto ao genoma nuclear os tripanossomatídeos possuem alguns aspectos distintos dos demais eucariotos. Seus cromossomas não condensam durante a divisão celular (VICKERMAN; PRESTO, 1970) e a compactação da cromatina no núcleo é menos evidente quando comparada com a cromatina nuclear de coração de ratos (HECKER; GANDER, 1985). Uma das suposições é de que a cromatina não se dobre assumindo a estrutura da fita de 30 nm comumente encontrada nos eucariotos (HECKER; GANDER, 1985; BURRI et al., 1993). Suas histonas diferem significativamente quando comparadas aos outros eucariotos em relação à composição e

à sequência de aminoácidos, além de que todos os mRNAs das histonas são poliadenilados (PUERTA et al., 1994).

A análise citogenética dos cromossomas de tripanossomatídeos é dificultada pelo fato dos mesmos não condensarem durante a divisão celular. Com o desenvolvimento da técnica de eletroforese em campo pulsante (PFGE) foi possível a separação e a visualização de aproximadamente 20 a 40 bandas cromossômicas, variando de 0,45 Mb e 3,5 Mb numeradas de 1 a 20 em baixa resolução e de 1 a 42 em média resolução (GIBSON; MILES, 1987; WAGNER; SO, 1990; DEGRAVE et al., 1997; SANTOS et al., 1997). O sequenciamento do genoma desse protozoário revelou que o *T. cruzi* é um organismo diploide, cujo genoma está organizado em 41 cromossomos com o tamanho estimado entre 106,4 Mb e 110,7 Mb. Foram anotados cerca de 22.570 genes que codificam proteínas, 12.570 desses genes são pares de alelos. Aproximadamente 50% do genoma desse parasito consistem em sequências repetidas, tais como retrotransposons e genes que codificam uma grande família de moléculas de superfícies, incluindo *trans-sialidases*, mucinas, GP63 e uma nova família (>1.300 cópias) de genes que codificam uma proteína de superfície associada à mucina (MASP) (EL-SAYED et al., 2005). Alguns genes que possuem mais de duas cópias no genoma diploide foram observados em um único cromossomo ou em diferentes cromossomos. Diversos genes apresentaram entre 4 a 200 repetições, organizados normalmente em *tandem*. Esta organização é vista em diversos genes codificadores de proteínas e RNAs, como por exemplo: proteínas de superfície, ubiquitina, proteínas de choque térmico (HSPs), histonas, calmodulina, tubulinas e amastina (GONZÁLEZ et al., 1985; DRAGON et al., 1987; REQUENA et al., 1988; SWINDLE et al., 1988; ASLUND et al., 1994; CHUNG et al., 1994; TEIXEIRA et al., 1994; VASQUEZ et al., 1994).

A organização cromossômica entre as diferentes cepas de *T. cruzi* é conservada, incluindo o número cromossômico e a estrutura dos cromossomos individuais. O tamanho de cada cromossomo não é conservado entre as diferentes linhagens, algumas vezes variando até mesmo entre cromossomos homólogos da mesma estirpe, o que pode ser explicado pelo fato de que a quantidade de DNA repetitivo parece ser maior em algumas cepas de *T. cruzi* (HENRIKSSON, 1996). Embora seja estabelecida a diploidia, alguns dados sugerem também a ocorrência de poliploidia e aneuploidia, como

observado em isolados do *T. cruzi* derivados de um mesmo clone que apresentaram polimorfismo no conteúdo de DNA (HENRIKSSON, 1996).

A conclusão da análise do genoma indica que os genes codificadores de proteínas estão organizados em grandes unidades bidirecionais policistrônicas, de forma que centenas de genes estão dispostos sequencialmente na mesma fita de DNA (SANTOS, 1997, MARTÍNEZ-CALVILLO et al., 2010; HAILE; PAPADOPOULOU, 2007). Esses grupos de genes assim organizados são denominados *clusters* e apresentam a seguinte organização em *T. cruzi*: *cabeça – cabeça* e *cauda – cauda*, ambos separadas por regiões intergênicas conhecidas como *switch region* (Figura 4). É postulado que a transcrição se inicie nestas regiões na ausência de promotores definidos para RNA polimerase II e fatores de transcrição (HAILE; PAPADOPOULOU, 2007; RESPUELA et al., 2008).

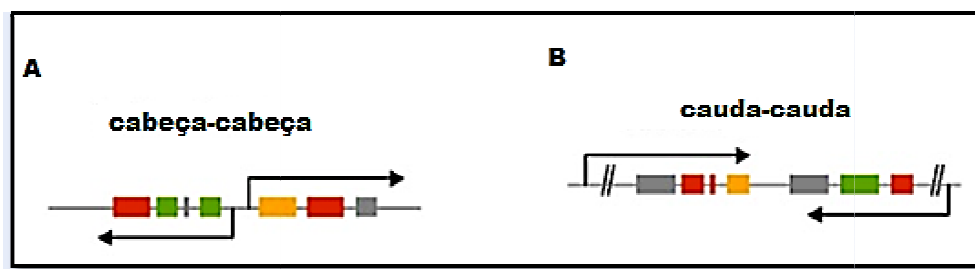


Figura 4. Transcrição de genes organizados em clusters em tripanossomatídeos. O sentido da transcrição é de acordo com as setas. (A) A transcrição bidirecional inicia entre os grupos de genes que estão separados por uma região intergênica conhecida como *switch region* (sentido cabeça-cabeça). (B) Transcrição bidirecional com sentido cauda-cauda, separados por *switch region* (RESPUELA et al., 2008).

Outros tripanossomatídeos como *T. brucei* e *Leishmania major* também tiveram seus genomas sequenciados (BERRIMAN et al., 2005; IVENS et al., 2005) e tais resultados possibilitaram uma análise comparativa. É interessante notar que os três parasitas compartilham muitas estruturas celulares. A análise genômica revelou um conjunto de 6.158 grupos de genes ortólogos, sendo que 1.014 são compartilhados por somente dois dos três tripanossomatídeos analisados (EL-SAYED et al., 2005). Embora tenham divergido há mais de 200 milhões de anos (OVERATH et al., 2001; STEVENS et al., 1999), os genomas desses tripanossomatídeos apresentam um grau elevado de conservação. Quando foi comparado o genoma dos três tripanossomatídeos, aproximadamente 94% dos genes ortólogos que formam o genoma central está em regiões de sintonia conservada.

4. Transcrição em Tripanossomatídeos

As três RNA polimerases, I, II e III, descritas em outros eucariotos, foram encontradas em *T. brucei* (KOCK et al., 1998; JESS et al., 1989; EVERS et al., 1989), no entanto elas apresentam algumas diferenças estruturais comparadas às RNA polimerases de outros eucariotos. A RNA polimerase II apresentou um comportamento diferencial na presença de inibidores específicos como a α -amanitina (CLAYTON et al., 1990). As polimerases dos tripanossomatídeos também apresentaram diferenças na dependência de Mn^{++} , na utilização de fita simples e no reconhecimento de promotores específicos. Em *T. cruzi*, apenas promotores associados a genes ribossomais e ao miniéxon foram caracterizados (DIETRICH et al., 1993; PULIDO et al., 1996; NUNES et al., 1997). A atividade desses promotores de *T. cruzi* parece ser controlada por fatores de transcrição que são linhagem - específica (TYLER-CROSS et al., 1995; NUNES et al., 1997). Nos sítios onde se iniciam a transcrição no promotor do gene para o miniéxon ou Sequência Líder (SL), a proteína de ligação ao TATA box (TBP) bem como outros fatores foram encontrados. Ensaios de SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) mostraram que a TBP do *T. cruzi* tem afinidade por regiões ricas em G, que também estão presentes em *Switch Regions* (CRIBB; SERRA, 2009). O recrutamento da TBP ao promotor do gene SL também foi demonstrado em *Leishmania tarentolae* (THOMAS et al., 2006).

De um modo geral, a RNA polimerase I transcreve os genes ribossomais e a RNA polimerase III transcreve moléculas de RNA nucleolar e de transferência, enquanto a RNA polimerase II transcreve o miniéxon e mRNAs. O interessante é que a transcrição de genes de superfície como de glicoproteínas de superfícies variantes (VSG) e da proteína repetitiva ácida procíclica (PARP) em *T. brucei* são transcritos por RNA polimerase cujo comportamento é semelhante a RNA polimerase I (VANHAMME; PAYS, 1995), mas ainda é necessário compreender quais polimerases e quais promotores estão associados à transcrição dos demais genes que codificam proteínas (GILINGER; BELLOFATTO, 2001; LANDFEAR, 2003).

A organização dos genes de tripanossomatídeos em unidades de transcrição policistrônica sugere que o número de promotores nesses organismos seja reduzido

(VANHAMME; PAYS, 1995). Pouco se sabe sobre promotores em *T. cruzi*, exceto algumas regiões consensuais de regulação que foram identificadas para RNA polimerase III em rRNA 5S e genes tRNA (CORDINGLEY, 1985; CAMPBELL; SUYAMA; SIMPSON, 1989), e também um elemento externo conservado para RNA polimerase II que transcreve pequenos snRNA (RNA nucleares) a montante do gene SL (CORDINGLEY, 1985; GÜNZL et al., 2003). O promotor do gene SL identificado apresenta características semelhantes ao promotor de snRNA de vertebrados, o que dá suporte à hipótese de que a sequência líder seja equivalente ao U1, um complexo ribonucleoproteico que interage com o pré-RNA e outros complexos ribonucleoproteicos Us para formar o spliceossomo, envolvido no processo de splicing dos demais eucariotos (GILINGER; BELLOFATTO, 2001). O promotor rRNA de tripanossomatídeos foi capaz de direcionar a expressão de genes repórteres em ensaios de transfecção, desde que os sinais de *trans-splicing* estejam presentes (RUDENKO et al., 1991; TYLER-CROSS et al., 1995). Além disso, especula-se que sequências regulatórias e promotores presentes em elementos repetitivos podem estar envolvidos na regulação gênica do *T. cruzi*, porém ainda há muito a ser estudado e compreendido em relação aos promotores (REQUENA et al., 1996).

5. Regulação gênica em Eucariotos

O controle da expressão gênica é um mecanismo pelo qual as células regulam as suas atividades e limitam seus produtos no espaço-tempo. Os RNAs são transcritos pelas RNA polimerases e cada polimerase é responsável pela síntese de determinado tipo de RNA. Durante a transcrição existem vários fatores proteicos que atuam no processo, seja ativando, desativando ou intensificando a transcrição. Na maioria das células eucarióticas as regiões genômicas que codificam proteínas são conhecidas como éxons, e as não codificantes são denominadas introns. A transcrição começa com o reconhecimento por fatores que se ligam a regiões específicas e iniciam o recrutamento da maquinaria de transcrição, como a RNA polimerase II. Um resíduo de metil guanosina trifosfatado (Gppp) conhecido como *Cap* é adicionado a extremidade 5' do RNA primário, enquanto que na região 3' não traduzida UTR (3' UTR) uma cauda poli-A é inserida através de um processo conhecido como poliadenilação. Os introns são

retirados e os éxons unidos no pré-RNA através de processo conhecido como *cis-splicing* (LODISH et al., 2000). O mRNA processado é então transportado através do núcleo para citoplasma onde ocorre a tradução. As proteínas produzidas estão prontas para exercer suas funções até a sua degradação por diversas formas, como por exemplo pela via do proteassoma. Em cada etapa desses processos eucarióticos de transcrição, pós-transcrição, tradução e pós-tradução, existe algum tipo de controle o que torna esse controle bastante complexo e em diferentes níveis (DARNELL, 1982).

6. Regulação gênica em Tripanossomatídeos

Todos os parasitas helmintos e protistas de importância médica devem se ajustar a uma ampla variedade de mudanças ambientais (condições químicas e estresse) durante o seu ciclo evolutivo. Para sobreviver em tais condições ambientais, esses organismos são protegidos usando capa proteica e glicoproteínas. Como parte do processo adaptativo ocorre a mudança do seu metabolismo e padrões de expressão de moléculas essenciais para a sobrevivência.

A estrutura genômica e padrões de transcrição dos parasitas da ordem Kinetoplastida são únicos na evolução. Em tripanossomatídeos, muitos genes contidos nos extensos *clusters* policistrônicos são transcritos em taxas equivalentes, de modo que o controle da expressão de genes diferencialmente expressos deve acontecer em sua maior parte por mecanismos pós-transcricionais (VANHAMME; PAYS, 1995; TEIXEIRA, 1998; HORN, 2008). Estudos usando técnicas de microarranjo e PCR em tempo real mostraram que no mínimo 50% dos genes em *T. cruzi* são regulados durante seu ciclo de vida. Em estágios com atividades biológicas similares, como por exemplo, os estágios de divisão (amastigota e epimastigota) há uma sobreposição de 20% dos genes regulados positivamente, como os genes ligados ao reparo do DNA (MINNING et al., 2009).

Outra característica do genoma desses organismos é a distribuição e a orientação de genes, que não apresentam um padrão comum. O cromossomo I de *Leishmania major*, por exemplo, tem ~ 0,3 Mb. Nesse cromossomo, foi observada uma região de 1,6 kb que não contém nenhuma fase aberta de leitura. A montante dessa região existem 29 fases abertas de leitura, todas orientadas para o telômero, a jusante, existem 50 fases

abertas de leituras orientadas para o oposto dos telômeros. De acordo com experimentos de transcrição e sensibilidade para α -amanitina, foi observado que nessa região de 1,6 kb existe um possível promotor para a RNA polimerase II (RNAP-II) (MCDONAGH et al., 2000; MYLER et al., 1999). Em *T. cruzi* observou-se que as taxas de transcrição da RNA polimerase I e II diminuem drasticamente na passagem das formas replicativas epimastigotas e amastigotas para as formas não-replicativas e infectivas tripomastigotas. Essas mudanças transcricionais parecem estar acopladas à mudanças na estrutura nuclear e a remodelação da cromatina (ELIAS et al., 2001).

Estudos de regulação gênica em tripanossomatídeos revelaram alguns achados importantes como a repressão da tradução (ÁVILA et al., 2001), recrutamento de mRNAs nos polissomos (CASSOLA et al., 2007) e adaptação de códon nos tRNAs. Alguns estudos com genes como metacicloquina, *cblp-1* e *Tcmp-4* mostraram que a regulação da expressão pode ocorrer durante a mobilização desses mRNAs ao polissoma (DALLAGIOVANNA et al., 2001; FRAGOSO et al., 2003). O mRNA em *T. cruzi* pode sofrer mais de um processo de trans-splicing e poliadenilação para gerar um mRNA traduzível. Este processo é denominado *exon-skipping* e ocorre da seguinte forma: regiões não traduzidas presentes nas extremidades do mRNA (5'UTR e 3'UTR) podem conter elementos que sirvam de sinal para “camuflar” o mRNA evitando assim o processo de *trans-splicing* e/ou poliadenilação nuclear, gerando RNAs intermediários, como dicistrons com longos 3' UTRs, que poderiam ser processados por métodos convencionais de *trans-splicing* e poliadenilação no citoplasma, dando assim origem a mRNAs monocistrônicos (JAGER et al., 2007).

Mudanças pós-traducionais foram descritas nas histonas de *T. cruzi*, sendo semelhantes às já citadas para os demais eucariotos, como acetilação e metilação de alguns resíduos de lisinas (DA CUNHA et al., 2005). Contribuições epigenéticas na transcrição devido a mudanças na cromatina foram observadas em diferentes estágios do desenvolvimento do *T. cruzi*. Essas alterações ocorrem principalmente nas regiões intergênicas entre os *cluster* de genes (*switch region*) das unidades policistrônicas e essas regiões parecem conter possíveis promotores bidirecionais (RESPUELA et al., 2008).

6.1. *Processamento de RNA*

Até o presente momento, apenas um gene apresentou processamento por *cis-splicing* em tripanossomatídeos, o gene da enzima poli-A polimerase de *T. cruzi* e *T. brucei* (MAIR et al., 2000). A maquinaria de processamento de introns foi comprovada pela identificação de um gene que codifica o snRNA U1 em *T. brucei* e um complexo ribonucleoproteico contendo duas outras proteínas pouco similares a seus prováveis homólogos em outros eucariotos, denominadas U1-70K e U1C associado a esse RNA também foi confirmado (DJIKENG et al., 2001; PALFI et al., 2002, 2005). Outro processo muito semelhante ao *cis-splicing* denominado *trans-splicing* foi descrito primeiramente para os genes VSG e mostrou ser essencial para a maturação dos mRNAs (BOOTHROYD; CROSS, 1982; SUTTON; BOOTHROYD, 1986). No *trans-splicing* ocorre a transferência de uma sequência de 39 nt conhecida como Sequência Líder (SL) ou mini-éxon, de um RNA doador ao 5' do mRNA final (Figura 5). A SL é adicionada a 30-100 nucleotídeos a montante do códon iniciador da tradução (AUG). Esses 39 nucleotídeos são oriundos de um RNA de 110 nucleotídeos (SL-RNA) que é transcrito a partir de um grande número de genes repetidos *in tandem* no genoma e recebe um *cap* 5' diferencial, onde os quatro primeiros nucleotídeos após a 7-metilguanossina são metilados (McCARTHY-BURKE et al., 1989; DE LANGE et al., 1984; ULLU; TSCHUDI, 1991; ZWIERZYNSKI; BUCK, 1991; GUNZL et al., 1997). O processamento é semelhante ao *cis-splicing* dos eucariotos superiores (LAIRD, 1989) e apresenta sequências consenso GU-AG de junções exon-intron e intron-exon presentes no SL RNA e no pré-mRNA de tripanossomatídeos. Entretanto no *trans-splicing*, o SL é adicionado à molécula de mRNA mediante um sinal de dinucleotídeo AG e uma região a montante rica em pirimidinas (HARTMANN et al., 1998; LÓPEZ-ESTRAÑO et al., 1998; BENZ et al., 2005). Um intermediário de RNA em forma de Y, contendo uma ligação fosfodiéster 2'-5' análoga ao intermediário de RNA em forma de laço do *cis-splicing* é removido. Outra semelhança é que o SL RNA é capaz de substituir funcionalmente o snRNA U1 no *cis-splicing* de mamíferos (Figura 5) (MATTHEWS et al., 1994; MARTÍNEZ-CALVILLO et al., 2010).

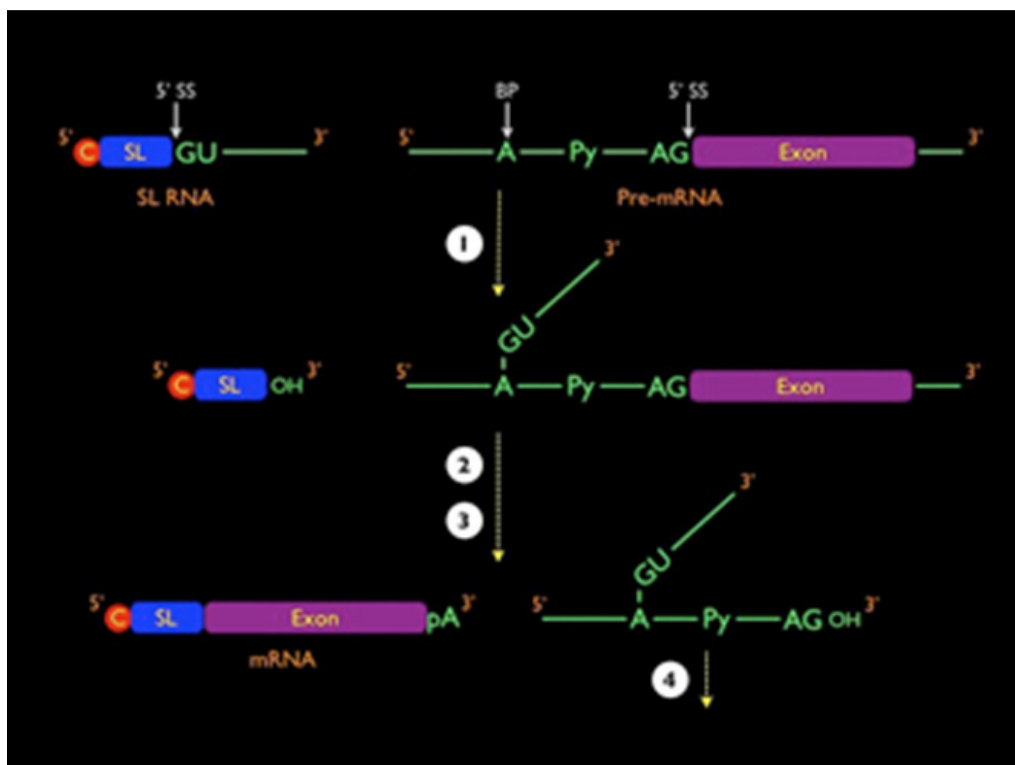


Figura 5. Representação esquemática do processo de *trans-splicing* e poliadenilação do pré-mRNA em *T. cruzi*: O sítio acceptor de *splicing* 5' (5' SS), o sítio acceptor 3' (3' SS) e o ponto de ramificação (BP) estão indicados. C, cap 5'; SL, *spliced leader*; Py, região de polipirimidina; pA, cauda poli(A). 1) primeira reação de transesterificação; 2) segunda reação de transesterificação; 3) clivagem e poliadenilação; 4) desramificação e degradação do intermediário em Y (URMENYI, 2011)

O processo de *trans-splicing* e *poliadenilação* de genes adjacentes (Figura 6) estão aparentemente ligados de tal forma que a escolha do sítio de *trans-splicing* influencia o sítio de poliadenilação (CAMPBELL et al., 2003; THOMAS, 2005). Os mRNAs de tripanossomatídeos não possuem o sinal de poliadenilação (AAUAAA), presente a uma distância de 10-30 bases a montante do sítio de poliadenilação presente nos mRNAs de outros eucariotos. Em *T. cruzi*, os sítios de *trans-splicing* e poliadenilação foram identificados em vários genes, porém ainda não foram estudados em detalhe. Sítios alternativos são utilizados nos transcritos dos genes da proteína ribossômica P2 beta (VAZQUEZ et al., 1994), histona H2A (MARAÑÓN et al., 2000), TcRho1 e LYT1 (DE MELO et al., 2006), e sítios alternativos de poliadenilação foram descritos para os genes da histona H2A e HSP10 (FERNANDES et al., 2005).

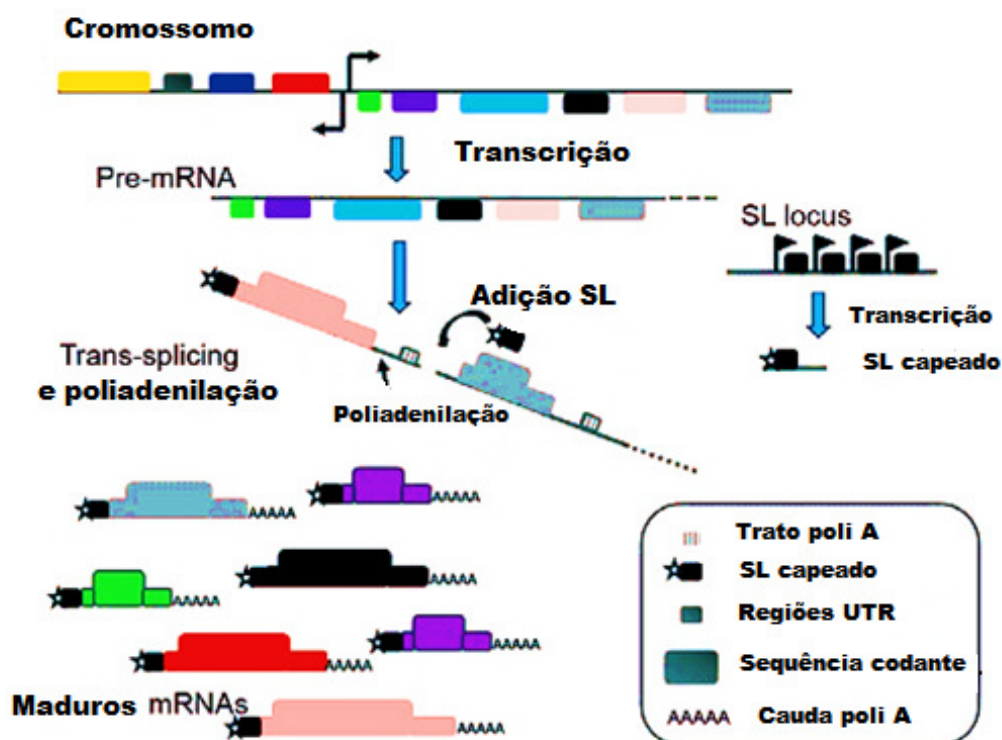


Figura 6. Transcrição e processamento de mRNAs em tripanossomatídeos. Clusters de genes presentes no genoma são transcritos como pré-mRNAs policistrônicos e são processados por *trans-splicing* e poliadenilação. Nas regiões intergênicas estão presentes sequências de polipirimidina que guiam a inserção da sequência líder (SL) capeada na porção 5' e da cauda poli-A no 3' de transcritos, gerando mRNAs maduros monocistrônicos (ARAÚJO; TEIXEIRA, 2011).

6.2. Regiões não traduzidas

Os genes dos eucariontes apresentam segmentos em suas extremidades 5' e 3' que são transcritos em RNA, porém não são traduzidos, sendo portanto chamados de regiões não traduzidas ou simplesmente 5' UTR e 3' UTR. O mecanismo de controle da expressão gênica pós-transcricional pode afetar a estabilidade do mRNA através de interações de proteínas-RNA. Essas proteínas podem reconhecer elementos presentes nas regiões 5' UTR e 3' UTR do mRNA e se ligarem, promovendo estabilização ou decaimento conforme o momento ou fase na qual o parasita se encontra (FURGER et al., 1997).

Na regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos, todos os processos atuam para modular a abundância de mRNA e determinar os níveis de expressão das proteínas. Há, no entanto, evidências de que os níveis de transcritos desses parasitas são

controlados pelo decaimento do mRNA, envolvendo cis-elementos presentes nas regiões 5' e 3'-UTRs (CLAYTON, 2002).

Em *T. brucei*, após mapeamento das regiões UTRs dos genes VSGs, foi identificado um elemento regulador positivo, que aumenta a estabilidade do mRNA de genes repórteres nas formas sanguíneas em relação às formas procíclicas do parasita (BERBEROF et al., 1995a, 1995b). A região 5' UTR do gene α -tubulina em *T. brucei* contém elementos que podem servir como moduladores do *trans-splicing* (LÓPEZ-ESTRAÑO et al., 1998). Estudos na região 5' UTR do gene *Tuzina* mostraram a presença de cis-elementos reguladores (TEIXEIRA; KIRCHHOFF; DONELSON, 1999). Outros trabalhos mostraram que as estabilidades dos transcritos de certos genes em tripanossomatídeos variam ao longo do ciclo celular (HEHL et al., 1994; BLATTNER; CLAYTON, 1995; NOZAKI; CROSS, 1995; TEIXEIRA et al., 1995).

Ensaio com genes repórteres mostraram diferenças na estabilidade nos transcritos nos diferentes estágios do *T. cruzi* (COUGHLIN et al., 2000; BOUCHER et al., 2002). Estudos com os genes *Amastinas* mostraram que a sua expressão é dependente de sequências contidas em sua região 3' UTR. Tais sequências seriam responsáveis pela associação dessa molécula de RNA mensageiro aos polissomos e pelo aumento de sua taxa de tradução, sem que a estabilidade desse transcrito fosse alterada (TEIXEIRA et al., 1994; TEIXEIRA; KIRCHHOFF; DONELSON, 1995). Ambas as regiões não traduzidas mostraram ter influência na expressão gênica, apresentando elementos cis-atuantes em *T. cruzi*, que podem modular a tradução desses RNAs. Experimentos de transfecção com um gene repórter seguido de regiões 3' UTR de genes estágio-específico, como gp85 em tripomastigotas sanguíneos e amastigotas, gp72 em epimastigotas, gp82 em tripomastigotas metacíclicos, β -tubulina, a mucina, transsialidase e de expressão constitutiva como o gene *GAPDH* e *HSP60*, mostraram que essas regiões atuam de modo direto na regulação desses genes, uma vez que o gene repórter mostrou um padrão de expressão idêntico aos de seus genes de origem (NOZAKI; CROSS, 1995; ABUIN et al., 1999, BARTHOLOMEU et al., 2002; BRANDÃO, 2006).

6.3. *Cis-elementos*

Vários fatores podem regular o destino do mRNA promovendo (elementos desestabilizadores) ou inibindo (elementos estabilizantes) a sua degradação. Um dos elementos regulatórios mais bem caracterizado é o ARE (elemento rico em AU), localizado na região 3'-UTR de mRNAs de citocinas e fatores de crescimento, entre outros (BAKHEET et al., 2001, CHEN; SHYU, 1995). Há várias classes de AREs que apresentam variações em sua sequência e que por sua vez são caracterizados pela sua capacidade em promover a rápida deadenilação seguida da degradação do mRNA (CHEN; SHYU, 1995). Outros cis-elementos como regiões ricas em G ou trechos de polipirimidina presentes em UTRs também parecem influenciar a meia-vida dos mRNA (DI NOIA et al., 2000; D'ORSO; FRASH, 2001).

Esses cis-elementos presentes nas regiões UTRs atuam de maneiras diferentes na estabilidade do mRNA entre as formas do *T. cruzi*. Como foi observado em tripomastigota metacíclico a presença de regiões ricas no dinucleotídeo AU (denominado ARE) desestabiliza seletivamente transcritos da mucina (SMUG). As mucinas são proteínas O-glicosiladas que apresentam um papel importante na proteção e na interação entre células, em especial as células do sistema imune dos vertebrados (BING et al., 1998). Em *T. cruzi* as mucinas foram classificadas em duas famílias que diferem entre os estágios do parasita. Na forma epimastigota, uma família de mucinas denominada TcSMUG expressa proteínas menores que em tripomastigota, tendo entre 35 a 50 kDa. Em tripomastigota, além das mucinas serem maiores, elas são codificadas por aproximadamente 500 genes, enquanto que em epimastigota as mucinas são codificadas por aproximadamente 70 genes diferentes (DI NOIA et al., 1998). Regiões ricas em G denominada GRE presentes em mRNA de epimastigotas funcionam como estabilizadores do mRNA da SMUG apenas nessa fase do parasita. Esses elementos GRE e ARE exercem funções opostas em diferentes estágios do *T. cruzi* e são reconhecidos por fatores transativadores (D'ORSO; FRASH, 2001). Uma família de proteínas contendo RRM (motivo de reconhecimento ao RNA), incluindo TcUBP-1 e TcUBP-2 (*T. cruzi* *Uridine-binding protein*) em modelo experimental desestabilizaram o mRNA da SMUG, ligando a regiões ricas em AU no 3'UTR (D'ORSO; FRASCH, 2002).

Outra proteína bem estudada que se liga a mRNA em sequências ricas em adeninas bem estudada é a proteína de ligação ao poli (A) ou PABP que já foi identificada em tripanossomatídeos (BATISTA et al., 1994). Sugere-se que a PABP possa estar envolvida na estabilidade do mRNA e na tradução em tripanossomatídeos, como já foi mostrado em outros eucariotos, através da interação com a extremidade 3' da cauda poli-A presente em todos os mRNAs. Uma proteína homóloga descrita na regulação da estabilidade do mRNA foi encontrada em *T. brucei* (TbPUF1) (HOEK et al., 2002).

6.4. Transativadores

Os fatores transativadores TcUBP-1 e TcUBP-2 são ribonucleoproteínas que ligam ao RNA (RBP), as quais contém um único motivo de reconhecimento ao RNA (RRM), e estão envolvidas na desestabilização fase-específica do mRNAs em *T. cruzi* (D'ORSO; FRASCH, 2002). TcUBP-1 e TcUBP-2 são membros da família de proteína TcRBP, que incluem outros possíveis reguladores de mRNA (TcRB3, 4, 5 e 6b) (DE GAUDENZI et al., 2005). TcUBP-1 é um fator de desestabilização e interage diretamente com TcUBP-2 no citoplasma dos epimastigotas. A TcPABP-1 também interage com TcUBP-1 em ambos os estágios em epimastigota e tripomastigota, porém em epimastigota a TcUBP-2 causa a estabilização do mRNA, enquanto que em tripomastigotas a ausência desta leva à heterodimerização da TcUBP-1 e PABP-1 que causa a desestabilização do mRNA e sua degradação por vias ainda não elucidadas (D'ORSO; FRASCH, 2002). Em tripomastigotas a TcUBP-2 não é expressa, assim a TcUBP-1 interage diretamente com TcPABP-1 na ausência de RNA e esta interação reduz a afinidade da TcPABP-1 a cauda poli(A), levando ao decaimento do mRNA (Figura 7). Isto poderia ocorrer devido ao exossoma e/ou recrutamento da atividade poli(A) ribonuclease.

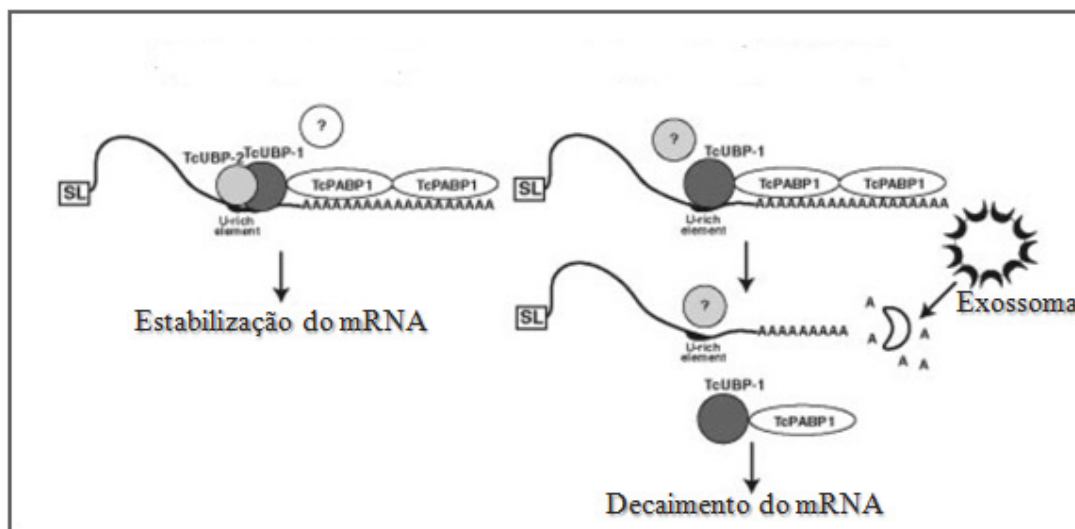


Figura 7. Modelo da interação entre TcUBP-1, TcUBP-2 e PABP1 no RNA durante desenvolvimento do parasita. Na forma epimastigota, TcUBP-1, TcUBP-2 formam um complexo com TcPABP1 no mRNA da SMUG no *cis-elemento* presente na região 3'UTR. A presença desta proteína juntamente com fatores ainda não identificados poderia estar estabilizando o complexo ribonucleoproteico (D'ORSO; FRASCH, 2002).

6.5 Degradação de mRNA em tripanossomos

Em *T. brucei* foi observada a presença da maquinaria do exossoma no núcleo e citoplasma, entretanto os complexos são menores do que os relatados em levedura, uma vez que são compostos de 8 subunidades (ESTÉVEZ et al., 2001). Experimentos relacionados com o estudo dos mecanismos de degradação dos mRNAs em tripanossomatídeos têm sido principalmente restritos à observações em relação ao uso de inibidores de transcrição e tradução. Estes ensaios permitiram determinar se a abundância de transcritos aumenta ou diminui decorrente de um desses tratamentos (TEIXEIRA et al., 1995, RODRIGUES et al., 2010).

7. Ciclo celular

O processo o qual leva uma célula a se dividir dando origem a duas outras células é denominado ciclo celular. É um mecanismo essencial pelo qual todos os seres vivos se reproduzem. É um processo complexo onde uma rede de sinais coordenados atua limitada no espaço-tempo. A passagem através do ciclo celular é marcada por eventos ordenados em sequência, incluindo a replicação do DNA, a mitose o aparecimento de certas proteínas específicas do ciclo celular e uma série de atividades enzimáticas (MITCHISON, 1971; FORSBURG, NURSE, 1991; TYSON, 1991). O ciclo celular em geral é composto de quatro fases principais, a fase gap1 (G1) que

ocorre antes da replicação do DNA, a fase S onde acontece a replicação do DNA, a lacuna após a replicação conhecida como fase gap 2 (G2) que separa a conclusão da síntese de DNA da prófase, onde inicia-se a fase M terminando com a divisão. Diversas moléculas são montadas, ativadas ou movidas entre essas fases, ou até mesmo durante todo o processo (HARTWELL; WEINERT, 1989; FORSBURG, NURSE, 1991).

Proteínas como as quinases dependentes de ciclina (cdks) e as ciclinas são peças-chave no processo de divisão celular. As quinases ou cdks como são mais referidas são ativadas por ciclinas, como o próprio nome já sugere uma cdk só que esta está ativa quando ligada a uma ciclina. Esta ativação ocorre em determinados pontos do ciclo principalmente por fosforilação dos seus resíduos de serina/treonina levando a mudanças em sua conformação, expondo seus sítios ativos que ativarão e modificarão outros fatores durante o ciclo celular (DRAPKIN et al., 1996). As ciclinas, assim denominadas devido à sua síntese e degradação a cada ciclo, são divididas em três classes principais, que estão presentes em todas as células eucarióticas, definidas conforme a fase do ciclo em que atuam: G1/S-ciclinas que ativam cdks no final da fase G1, cujos níveis caem na fase S; S-ciclinas que auxiliam na duplicação do DNA, cujos níveis permanecem até a mitose; e M-ciclinas que estimulam a entrada na mitose no ponto de verificação G2/M (HARTWELL; WEINERT, 1989).

Com exceção das quinases CDK4 e CDK6 em células de mamíferos, a subunidade CDK está presente como um *pool* inativo na célula, geralmente em excesso comparado ao nível total de ciclinas (SCHAFER, 1998). O papel do complexo ciclina-cdks é fosforilar outras proteínas-substrato que irão atuar no ciclo. Em leveduras existem ao menos quatro cdks, sendo a *cdk1p*, essencial para direcionar o controle do ciclo celular, uma vez que esta atua direcionando os alvos que irão coordená-lo. Um fator muito importante no ciclo é o MPF (fator promotor da mitose), este fator é um heterodímero composto pela ciclina B (em humanos) e uma quinase denominada *cdc2* (em levedura) ou apenas p34 (referente ao seu peso molecular) (TYSON, 1991; KRYLOV et al., 2003). As subunidades ciclina recém-sintetizadas combinam com subunidades pré-existentes da *cdc2* para formar um complexo MPF inativos. O complexo é ativado de forma autocatalítica, por uma série de fosforilações e desfosforilações de resíduo de tirosina específicos da subunidade *cdc2*, este processo é mediado em parte por outros fatores envolvidos no ciclo como *wee1* (inibidor) e *cdc25*

(ativador). Na transição entre a metáfase e anáfase, o complexo do MPF dissocia-se da subunidade ciclina que é rapidamente degradada no proteossoma após ubiquitinação pelo fator promotor da anáfase (APC) e então o ciclo se repete (SADHU et al., 1990; TYSON, 1991; ATHERTON-FESSLER et al., 1993; MORGAN, 1997).

O APC é uma ubiquina ligase (E3), necessária na mitose e na meiose, que atua na degradação de alguns fatores do ciclo como a securina. É regulada por fosforilação, bem como diversos ativadores e inibidores que alteram sua especificidade de substrato em diferentes fases do ciclo celular, assegurando um controle ríspido de degradação devidamente cronometrado dos reguladores chave do ciclo celular. A degradação da Securina permite à Separase desfazer o complexo Coesina que liga cromátides irmãs (Figura 8) (WANG; DAI, 2005; ACQUAVIVA; PINES, 2006; PETER, 2006).

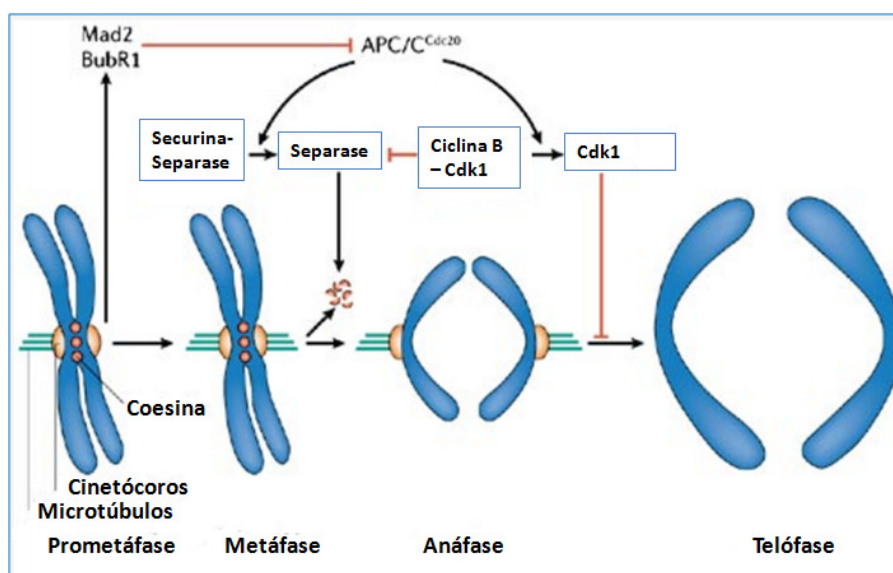


Figura 8. Regulação da anáfase e saída da mitose pela APC/CCdc20. Durante a prometáfase proteínas *checkpoint* da montagem do fuso, como Mad2 e BubR1 são ativados no cinetócoros que não estão (ou não totalmente) unidos com os microtúbulos (indicado em verde). Ativação da Mad2 e BubR1 inibem a capacidade Cdc20 complexo (APC/CCdc20) ubiquitinar a securina e ciclina B e, assim, evitar anáfase e saída da mitose. Na metáfase, quando todos os cinetócoros estão ligados aos microtúbulos, APC/CCdc20 ubiquitina a securina e ciclina B e, assim, ativa a protease separase e inativa a ciclina cinase dependente-1 (Cdk1). Separase então cliva o complexo Coesina (mostrados como círculos vermelhos) que estão mantendo cromátides irmãs juntas e, assim, inicia a separação das cromátides. A inativação da Cdk1 leva à defosforilação dos substratos Cdk1, deste modo, permite sair da mitose. Nos vertebrados, inativação de CDK1 também contribui para ativação da Separase (Modificado de Peters, 2006).

8. O complexo Coesina em Eucariotos

Em eucariotos, as cromátides irmãs devem permanecer juntas após a replicação do DNA até mitose para que ocorra a segregação do material genético. Um grande complexo de proteínas em forma de anel chamado Coesina serve para ligar as duas cromátides irmãs. A coesão tem a função de orientar a correta adesão dos microtúbulos ao fuso mitótico garantindo assim a exata segregação (NASMYTH; HAERING, 2005). O complexo é composto de quatro subunidades principais: Smc1 (Psm1 em *Schizosaccharomyces pombe*), Smc3 (PSM3 em *S. pombe*), Scc1 (Rad21 em *S. pombe* e vertebrados, substituído por Rec8 na meiose), e Scc3 (Psc3 em *S. Pombe*) que é parcialmente substituído por Rec11 na meiose; SA1, SA2, SA3 ou como um ortólogo em *Saccharomyces* (HIRANO, 2000, 2002; XIONG; GERTON, 2010). 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.

O complexo Coesina montado assume uma estrutura em forma de anel em volta do DNA. Esta conexão é topológica e bem forte e não é eluída mesmo em altas concentrações salinas (CIOSK et al., 2000; SUMARA et al., 2000). O diâmetro do anel formado pelo complexo é estimado em 45 nm, que parece impedir a compactação da cromatina na fibra de 30 nm embora a fibra de 10 nm pode ser acomodada. Em um segundo modelo aceito, dois anéis da Coesina circundam uma fibra de cromatina única (Figura 9) (GRUBER et al., 2003; CHANG et al., 2005).

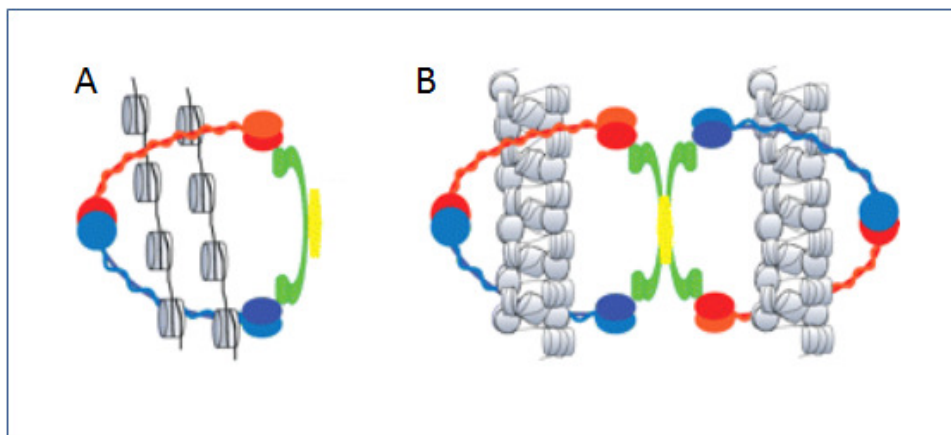


Figura 9. Modelos de atuação do complexo Coesina para a manutenção das cromátides irmãs juntas. (A) O modelo de anel (à esquerda) propõe a passagem das duas cromátides irmãs (cilindros cinza) através da estrutura de anel e da interação topológica entre DNA-Coesina. (B) Um modelo alternativo

propõe que um domínio “cabeça” da Smc1 se liga a uma cromátide enquanto o outro domínio “cabeça” da Smc3 se liga a outra cromátide irmã, possivelmente em conjunto com Scc1. A interação Coesina DNA é apenas física (BOSE; GERTON, 2010).

Durante a primeira fase da mitose (prófase) a Coesina presente nos braços do cromossomo é removida via um processo que requer as quinases: *Pólo-like* conhecida em humanos como Plk1 (Serine/treonina proteína Kinase) e aurora B, esta última atua na ligação do fuso mitótico ao centrômero (GLOVER et al., 1998; BISCHOFF et al., 1998). Na primeira fase não há necessidade da clivagem proteolítica da subunidade Scc1 pela Separase, entretanto, na segunda fase (prometáfase) a Scc1 é clivada em resíduos de cisteína por uma protease conhecida como Separase ou Esp1p ou Cut1p em levedura de fissão (NASMYTH; HAERING, 2005). Concomitantemente outro complexo conhecido como Condensina se liga às cromátides e organiza o DNA de forma mais compacta. A Condensina é formada por duas subunidades SMC (Smc2 e Smc4) que formam um heterodímero. Outras proteínas também participam do complexo condensina: Cap-D2, Cap-G e Cap-H (KIMURA et al., 2001).

8.1 As subunidades Smc1 e Smc3

As SMC são ATPases pertencentes à família de manutenção estrutural dos cromossomos são conservadas desde bactérias a humanos (HIRANO, 2000). Análises da arquitetura molecular do complexo mostram em sua estrutura que as subunidades Smc possuem um motivo conhecido como motivo Walker A, dois motivos centrais conhecidos como *coiled-coil* que assume a forma de uma estrutura em dobradiça, e uma região conservada carboxi-terminal, motivo Walker B. A região *coiled-coil* ou de dobradiça como é mais conhecida se organiza em forma antiparalela de forma que a SMC se dobre sobre ela mesma e a sua região N-terminal se junta ao C-terminal formando uma “cabeça” com atividade ATPase semelhante à observada na família ABC, que são proteínas de membrana que transportam ativamente moléculas (HIGGINS, 1992) (Figura 10). Embora Smc1 e Smc3 possam ligar ATP e hidrolisá-lo, ainda não se sabe ao certo como isso acontece, mas supõe-se que a hidrólise do ATP esteja relacionada ao transporte de DNA para dentro do anel formado pelo complexo (HAERING et al., 2002; WEITZER et al., 2003). O domínio globular da Smc3 associa-

se à região N-terminal da Scc1 enquanto o domínio globular da Smc1 associa-se ao C-terminal da subunidade Scc1, formando assim uma estrutura em anel (Figura 10)..

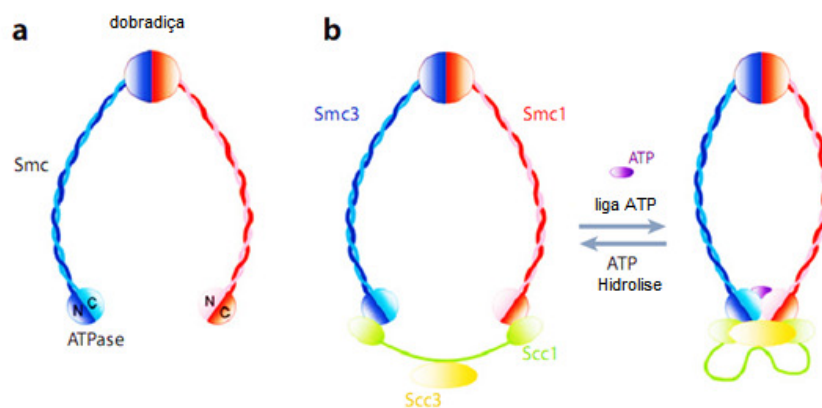


Figura 10: Estrutura do dímero Smc e complexo Coesina. (a) um monômero Smc possui um domínio em dobradiça em uma extremidade e em outra extremidade um domínio ATPase, ligados por um motivo conhecido como *coiled-coil*. Os domínios de dobradiça dos monômeros Smc podem interagir uns com os outros para formar um par Smc. Os domínios ATPase, formados por terminações N e C, desempenham papéis importantes na abertura e fechamento da estrutura do anel. (b) O complexo Coesina é composto por um heterodímero Smc1-Smc3 e duas subunidades não Smc: Scc1/Mcd1/Rad21 e Scc3. A região N-terminal da Scc1 liga ao domínio cabeça da Smc3 e o C-terminal desta liga ao domínio cabeça da Smc1. Scc1 também recruta Scc3 para o complexo. A ligação e hidrólise do ATP regulam o engate e desengate dos domínios cabeça Smc1-Smc3 (XIONG; GERTON, 2010).

8.2 As subunidades Scc1 e Scc3

A subunidade Scc1/Mcd1/Rad21 é conhecida como uma subunidade kleisin, que são membros de uma superfamília de proteínas evolutivamente conservada de procariontes aos seres humanos (SCHLEIFFER et al., 2003). O termo kleisin é derivado da palavra grega para o fechamento. Essa subunidade também pode regular a atividade de ATPase do heterodímero SMC1-SMC3 (ARUMUGAM et al., 2006).

A subunidade Scc1 tem papel importante na montagem com complexo Coesina, ela se liga diretamente em ambas as cabeças das SMC, sendo que sua região C-terminal liga região N-terminal da Smc1 e sua região N-terminal liga a C-terminal da Smc3. A Rec8 é uma homóloga da Scc1 na meiose, ambas compartilham homologia apenas nas regiões N e C-terminal (SCHLEIFFER et al., 2003). A Scc1 é clivada pela Separase/Esp1/Cut1 no início da anáfase ocorrendo então a abertura do anel levando a Coesina a se dissociar dos cromossomos (Figura 11) (UHLMANN et al., 2001).

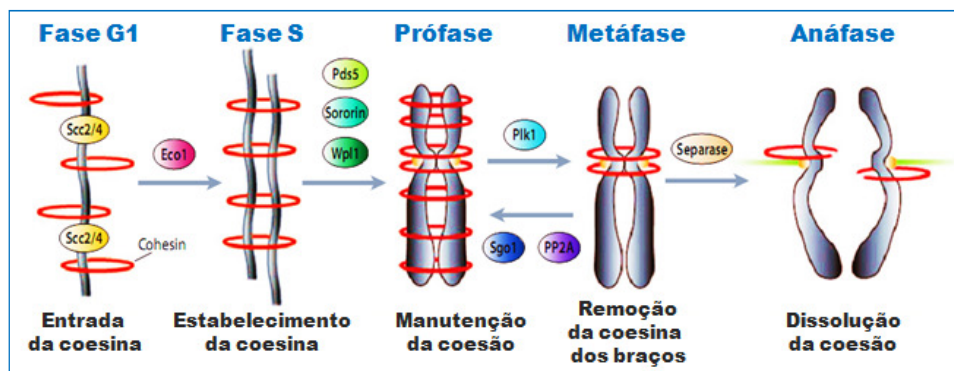


Figura 11. Ciclo da Coesina. O complexo Coesina se associa inicialmente na cromatina na fase G1 do ciclo celular, dependente da atividade do complexo Scc2 e Scc4. Concomitantemente com a replicação do DNA, a Coesina é estabilizada entre as cromátides irmãs na presença da acetiltransferase Eco1. Após a entrada na fase G2/M, a coesão é mantida pela proteína Pds5, sororin e Wp11. Em mamíferos, a coesão ao longo dos braços do cromossomo é removida durante a prófase via fosforilação da Rad21 pela Polo-like quinase 1. Na metáfase, a coesão é protegida pela shugoshin e PP2A. No início da anáfase, a protease Separase cliva Scc1/Mcd1/Rad21, levando à abertura do anel da Coesina e a separação das cromátides irmãs (XIONG; GERTON, 2010).

A subunidade Scc3 se associa a região C-terminal da Scc1 e parece exercer função de ativação da transcrição em células humanas (LARA-PEZZI et al., 2004). Outro fator o Swi6 mostrou ser capaz de interagir com Scc3 e recrutar o complexo Coesina para outras regiões do DNA (NONAKA et al., 2002). A Scc3 mostrou-se instável na ausência da Scc1, porém isso não ocorre com a Scc1 (VASS et al., 2003).

9. Divisão celular em *T. cruzi*

Em *T. cruzi*, nas formas replicativas (epimastigota e amastigota) o núcleo é esférico e apresenta um nucléolo bem evidente e pouca quantidade de heterocromatina. Na forma não-replicativa (tripomastigotas) o núcleo é alongado, o nucléolo desaparece e a heterocromatina está dispersa em todo nucleoplasma (ELIAS et al., 2001). A maioria dos cromossomos do *T. cruzi* se distribui principalmente no interior do núcleo na forma tripomastigota e apresenta este mesmo perfil na fase G1 do ciclo celular nas formas epimastigota e amastigota. No início da fase S os cromossomos são encontrados na periferia nuclear, que contém a maioria dos sítios de replicação. Portanto, essas mudanças de posicionamento indicam que os cromossomos do *T. cruzi* se movem durante o ciclo celular e estes achados também mostram que a replicação acontece na periferia nuclear, conforme ilustrado na Figura 12. Uma vez finalizada a replicação os cromossomos são observados novamente no interior do núcleo (ELIAS et al., 2002).

Devido à aparente falta de controle transcricional em *Trypanosoma cruzi* é sugerido que a localização cromossômica é ditada pelo ciclo celular bem como controle da replicação (ELIAS et al., 2002).

Existem diferenças tanto estruturais entre a cromatina de *T. cruzi* e de eucariotos superiores, quanto diferenças entre as fases do ciclo de vida desse organismo. No estágio epimastigota, existem diferenças nas formas de fase exponencial e estacionária. A cromatina das formas epimastigotas em fase exponencial é mais compactada, fato este relatado ao se fazer digestão com DNase I (SPADILIERO et al., 2002b), enquanto que na fase estacionária a cromatina é mais solta estendendo em direção ao centro do núcleo (Figura 12) Essas observações sugerem que, em comparação as células eucarióticas, em *T. cruzi* a dinâmica da cromatina desempenha um papel importante e incomum na interface do ciclo celular e mitose (SPADILIERO et al., 2002a).

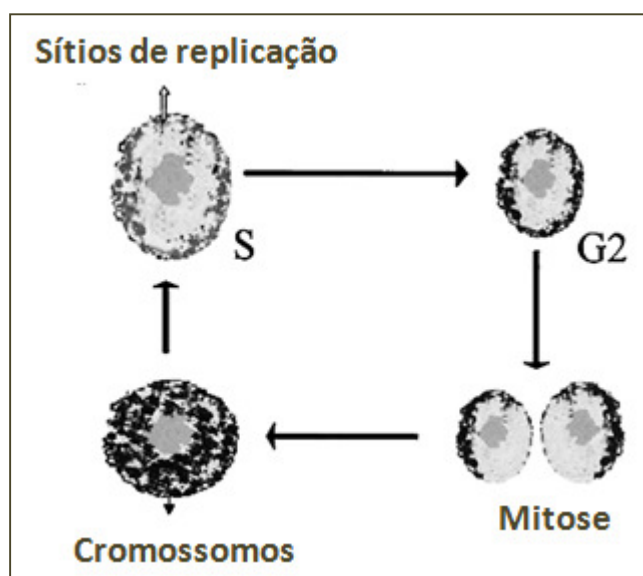


Figura 12. Modelo da dinâmica dos cromossomos durante o ciclo celular do *T. cruzi*. Na fase G1 os cromossomos são encontrados dispersos no núcleo. Durante a replicação, os cromossomos são organizados na periferia nuclear. Na mitose os cromossomos ficam em polos opostos e dispersão ao final da mitose. O material nucleolar é observado no centro das estruturas (ELIAS et al., 2002).

9.1. O complexo Coesina em *Tripanossomatídeos*

No presente momento pouco se sabe a respeito do complexo Coesina em tripanossomatídeos. Estudos em *T. brucei* realizados por Gluenz et al. (2008) mostraram

que estão presentes no seu genoma de genes homólogos às subunidades do complexo Coesina. Foi observado que a proteína Scc1 é expressa a partir do início da fase S até a anáfase. Ensaios com RNAi possibilitaram um *knockdown* do gene Scc1, o que impediu a divisão celular de *T. brucei*. A redução da atividade da Scc1 selvagem ou expressão da Scc1 resistente à atividade da separase resultaram em uma completa falha de divisão celular em células de *T. brucei* nas formas sanguíneas, mas não na forma procíclica do protozoário. A segregação dos mini-cromossomos em *T. brucei* também foi afetada pelo *knockdown* da Scc1, exibindo padrões incomuns durante a mitose. A depleção da subunidade Smc3 não apresentou efeitos visíveis na segregação tanto dos mini-cromossomos como dos cromossomos maiores. Entretanto quando houve a depleção de outra proteína atuante no complexo Coesina, a Separase, ocorreu um erro na segregação dos cromossomos de *T. brucei*. A proteína Smc3 persiste como uma proteína solúvel durante o ciclo celular e só se associa à cromatina entre a fase G1 e a metáfase (BESSAT; ERSFELD, 2009). A Separase está presente na célula durante todo o ciclo celular, mas é excluída do núcleo na transição entre a metáfase e a anáfase, promovendo assim um mecanismo de controle para impedir a clivagem do complexo Coesina antes do momento correto (SUN et al., 2009).

Nosso grupo no Laboratório de Biologia do Gene iniciou o estudo do complexo Coesina em tripanossomatídeos com o trabalho de Lucena (2004). Todos os genes da Coesina foram analisados em bancos de dados e estão presentes no genoma de *T. cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania major*. Ainda de acordo com Lucena (2004), as sequências das proteínas preditas Smc1 e Smc3 têm um alto nível de conservação entre os tripanossomatídeos, especialmente nas extremidades N-terminal e C-terminal, que formam os domínios globulares das SMC e na região de dobradiça dessas proteínas. A sequência predita das proteínas Scc1 e Scc3 apresentam uma alta identidade principalmente na região N-terminal em tripanossomatídeos. Ao que parece as proteínas SMC de tripanossomatídeos possuem sequência e estrutura similares às SMC de outros eucariotos. Essa semelhança é evidenciada pela comparação e homologia de regiões que supostamente formam um heterodímero e pela região de dobradiça, que é mais curta que a de bactérias e, diferente das dobradiças procarióticas, apresenta estrutura primária conservada. Embora existam semelhanças na estrutura primária, as proteínas SMC de tripanossomatídeos possuem domínios de ligação à membrana semelhantes aos de

bactérias na região de alfa-hélices dessas proteínas de *T. cruzi*, onde existe uma região com similaridade ao domínio COG4942, típico de proteínas de membranas procarióticas envolvidas na divisão celular e na segregação do nucleóide. Essa peculiaridade nas proteínas SMC de tripanossomatídeos pode explicar a permanência da cromatina desses organismos na periferia nuclear desde a fase S até a finalização da mitose.

Recentemente Ferreira (2011) clonou e expressou o gene *TcSCC1* em células de *Escherichia coli*. A proteína heteróloga produzida foi utilizada para a produção de anticorpos em coelhos para experimentos de análise de expressão e localização dessa subunidade em células de *T. cruzi*. A proteína foi encontrada nas formas amastigotas com localização nuclear, pouco aparente e difusa em epimastigotas e ausente em tripomastigotas. Entretanto o mRNA da subunidade *TcSCC1* está presente nas três formas do *T. cruzi*, o que nos levou a pensar em possíveis mecanismos de regulação pós-transcricional que poderia estar modulando a expressão desta proteína durante o ciclo de vida.

OBJETIVOS

Com base nos resultados anteriores do nosso grupo que mostram que a proteína SCC1 de *T. cruzi* apresenta variação nos seus níveis durante o ciclo de vida do parasita, podemos supor que há um mecanismo atuante na regulação da expressão do gene TcSCC1. Deste modo, esse trabalho teve como objetivo analisar a expressão do gene SCC1 nas diferentes formas do *T. cruzi*, no intuito de apontar um possível mecanismo regulatório pós-transcricional.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Organismos e linhagens celulares

1.1. *Trypanosoma cruzi*

Em todos os experimentos realizados durante esta etapa da pesquisa foram utilizadas as formas epimastigotas, amastigotas e tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* (SILVA; NUSSENZWEIG, 1953).

1.2. *Escherichia coli* DH5 α

DH5 α (Invitrogen): F⁻ Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1* *hsdR17* (rK⁻, mK⁺) *phoA supE44* λ - *thi-1 gyrA96 relA1*.

1.3. Células L6

As células L6 utilizadas são do tipo mioblasto e foram originalmente isolados por YAFFE (1968), de culturas primárias de músculo de rato (*Rattus norvegicus*).

2. Vetor de clonagem

O vetor pGEM[®] -T Easy (Promega) utilizado permite a clonagem de produtos de PCR amplificados pela *Taq* DNA polimerase que gera terminações com uma base A nas extremidades 3'. Além da resistência à ampicilina para a seleção dos transformantes bacterianos, esse vetor permite a seleção direta de recombinantes pelo sistema da atividade da β -galactosidase e IPTG/X-gal.

3. Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos foram desenhados com ajuda do programa Primer3 (v. 0.4.0) e Beacon Designer[™] (Premier Biosoft, Demo version). As sequências selecionadas em base nos bancos dados genômicos. A especificidade foi testada utilizando a ferramenta eletrônica BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool* – NCBI). As análises no BLAST mostraram 100 % de especificidade para o gene alvo e são espécie-específica para *Trypanosoma cruzi*. Todos os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Características dos oligonucleotídeos.

Olígos	Gene	Função	Sequência (5'-3')	Tamanho (mer)	TM.*
PR 110	TcSCC1 3'	Mapeamento 5'UTR	ATGTTCTTCTCTACGTA	17	56
PR369 PR375	TcSCC1 3' TcSL 5'	Mapeamento 5'UTR	CGTCTGTGGCGTCCTTCAAC GATACAGTTTCTGTACTATATTG	20 23	64 60
PR370	TcSCC1 5'	Mapeamento 3'UTR	ATGCGTCGTCGTGAGGCGG	19	64
PR404 PR405	TcSCC1 5' TcSCC1 3'	qPCR	TCTGTGGGCTTTTGTGGATGC CAGAGGCCTCAGCTTGTTCA	21 20	64 62
PR 445 PR 446	TcAmastina 5' TcAmastina 3'	qPCR	TGGCGGCACACTTCTACCT GGTTCTCCAAAGACGTTGTC	19 20	60 60
PR 436 PR 437	Tc24αS 5' Tc24αS 3'	qPCR	AGCCCTTCCGATGTAGATG TTTGCTACGCCAACCAAG	19 18	60 60

*Temperatura utilizada na etapa de anelamento da PCR.

4. Meios de cultura

4.1. Meio de Cultura para *Trypanosoma cruzi*

Meio LIT (CAMARGO, 1964)

NaCl	0,4 %
KCL	0,4 %
Na ₂ HPO 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 foi previamente dissolvido em água destilada fervido em placa aquecedora sob agitação durante 1 h e filtrado em papel Whatman nº 1. A hemina foi adicionada ao meio a partir de uma solução estoque de 2mg/mL. O pH do meio foi ajustado para 7,2 com HCl concentrado e este foi esterilizado por filtração através do filtro Millipore 0,45 µm. Após a esterilização do meio foram adicionados o soro fetal bovino já inativado (Gibco – BRL) e os antibióticos ampicilina (100 µg/mL) e estreptomicina (30 µg/mL), esterilizados por filtração através de filtro Millipore 0,22 µm.

4.2. Meio de cultura para células L6

Meio DMEM (Gibco BRL #12100-046) 13,4 g; Piruvato de sódio 0,11 g; Bicarbonato de Sódio 3,7 g; Água destilada q.s.p. 900 mL.

O pH do meio foi ajustado para 7,2 com HCl concentrado e o meio foi esterilizado por filtração através de filtro Millipore 0,45 µm. Após a esterilização do meio, soro fetal bovino (Gibco BRL) e solução de antibióticos (item 4.2.1) foram adicionados. Em seguida, o meio foi distribuído assepticamente em garrafas previamente esterilizadas e armazenado a 4°C.

4.3. Meios de cultura para a bactéria *Escherichia coli*

4.3.1. Meio LB (Luria-Bertani)

Peptona de caseína	1,0 % (p/v)
Extrato de Levedura	0,5 % (p/v)
NaCl	1,0 % (p/v)

O pH do meio foi ajustado para 7,2 com NaOH concentrado a 5M, esterilizado em autoclave a 121°C por 20 min e armazenado à temperatura ambiente.

4.3.2. Ágar LB

Para o meio LB sólido, foi adicionado 1,5 % (p/v) de ágar ao meio. A esterilização foi feita em autoclave por 15-20 min a 121°C.

4.3.3. Meio 2YT

Peptona de caseína	1,6 % (p/v)
Extrato de Levedura	1,0 % (p/v)
NaCl	0,5 % (p/v)

O pH do meio foi ajustado para 7,2 com NaOH a 5 M, esterilizado em autoclave a 121°C por 20 min e armazenado à temperatura ambiente.

4.3.4. Meio SOB

Peptona de caseína	2,0 % (p/v)
Extrato de Levedura	0,5 % (p/v)
NaCl	0,5 % (p/v)
KCl	2,5 mM

Ajustou-se o pH para 7,2 com NaOH concentrado a 5M e foi esterilizado em autoclave a 120°C por 20 min e armazenado à temperatura ambiente. Antes do uso, adicionou ao meio 10 mM de MgCl₂ (10 mL/L de uma solução estoque de 1 M previamente esterilizado por filtração).

4.3.5. Meio SOC

Para o preparo do meio SOC adicionou-se ao meio SOB 20 mM de glicose previamente esterilizada por filtração através de filtro Millipore 0,22 μm .

5. Soluções e Tampões

Os reagentes utilizados no preparo das soluções foram os de maior grau de pureza disponível no laboratório e a água usada era bidestilada ou milli-Q.

5.1. Verseno (EDTA)

Verseno – EDTA (pH 7,0) 2mM; PBS 1 X . A esterilização foi realizada em autoclave por 20 min a 120°C.

5.2. Tripsina

Tripsina 5%; PBS 1 X.

O pH foi ajustado para 7,8 a 8,0. A solução foi armazenada a 4°C durante a noite para decantação. No dia seguinte, o pH foi checado novamente e ajustado se necessário. A solução foi esterilizada por filtração através de filtro Millipore 0,22 μm e armazenada a -20°C.

5.3. Antibióticos

- Ampicilina (1.000 X): 100 mg/mL em H₂O Milli Q.
- Estreptomicina (1.000 X): 30 mg/mL em H₂O Milli Q.

As soluções foram esterilizadas por filtração através de filtro Millipore 0,22 μm , alíquotas e armazenadas a -20 °C.

5.4. Actinomicina D

0,5 mg de COSMEGEN® foram diluídos em água estéril na concentração final de 15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

5.5. DEPC

A água utilizada nos experimentos com RNA foram previamente tratadas com DEPC 0,01% v/v, estocada em estufa a 60°C por 24 h e então autoclavada por 15 minutos. A limpeza de bancadas foi realizada utilizando SDS 10% e em seguida etanol 70%. O material plástico foi tratado solução de DEPC 0,1% v/v em água milli Q por no mínimo 1h.

5.6. PBS (5 X)

NaCl	685,0 mM
Na ₂ HPO ₄	35,0 mM
KCl	13,5 mM
KH ₂ PO ₄	7,5 mM

5.7. Tampão TB para células competentes

Pipes	10 mM
MnCl ₂	55 mM
CaCl ₂	15 mM
KCl	250 mM

Todos os sais foram dissolvidos exceto o MnCl₂; o pH ajustado para 6,7 com KOH. Em seguida, o MnCl₂ foi adicionado e o tampão foi esterilizado por filtração através de filtro Millipore 0,22 µm e estocado a 4 °C.

5.8. X-Gal

Solução estoque de 20 mg de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- beta-D-galactopyranoside (X-GAL) em 1 mL de dimetilformamida. A solução foi armazenada a -20°C ao abrigo da luz.

5.9. Enzimas de restrição e ligação

As enzimas utilizadas foram adquiridas das empresas Promega e New England Biolabs. O procedimento usado foi indicado pelo fabricante.

6. Soluções para extração de DNA plasmidial

6.1. Solução I

Tris-HCl (pH 8,0)	25 mM
EDTA (pH 8,0)	10 mM

A solução foi esterilizada em autoclave por 20 min a 120°C.

6.2. Solução II

NaOH	0,2 M
SDS	1 %

6.3. Solução III

Acetato de Potássio	5 M
Ácido Acético glacial	2 M

A solução de acetato de potássio 5M foi previamente esterilizada em autoclave por 20 min a 120°C.

7. Soluções para eletroforese em gel de agarose

7.1. Tampão TBE (10X)

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

7.2. Tampão de amostra (5X)

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

7.3. Tampão MOPS/EDTA (10X)

MOPS	0,2 M
Acetato de Sódio	50 mM
EDTA (pH 8,0)	1 0mM

O pH do tampão foi ajustado para 7,0 com NaOH (livre de RNase) e foram armazenado em frasco âmbar a 4° C.

7.4. Tampão de Amostra para eletroforese desnaturante

Formamida	0,75 mL
MOPS/EDTA 10X	0,15 mL
Formaldeído	0,24 mL
Glicerol 100%	0,10 mL
Azul de bromofenol 10%	0,08 mL
Água Milli-Q	0,10 mL

7.5. Brometo de Etídeo

Solução estoque: 10 mg/mL em água destilada.
Concentração final de uso: 0,5 µg/mL.

8. Manutenção das culturas

8.1. Obtenção das formas epimastigotas linhagem Y:

Tripomastigotas sanguíneos da linhagem Y de *T. cruzi* foram incubados em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) por aproximadamente 20 dias. O meio foi suplementado inicialmente com 5 % de soro fetal bovino e incubado a 28°C. Foi realizado um repique após aproximadamente 10 dias de incubação, onde já se podia perceber o surgimento dos primeiros epimastigotas diferenciados a partir de tripomastigotas. Após 20 dias, repiques semanais eram realizados com meio LIT suplementado com 20 % de soro. Os epimastigotas eram repicados em outras garrafas de 25 cm² na proporção de 25% do volume.

8.2. Cultura de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Epimastigotas da linhagem Y foram crescidas em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) a uma temperatura de 28°C, de modo que o volume ocupado pelas culturas fosse de aproximadamente 25% da capacidade total do frasco. Os inóculos foram iniciados com aproximadamente 2,0 x 10⁶ células/mL e cultivados durante 48 a 72 h. Repiques eram feitos semanalmente, utilizando 25% do inóculo, quando a densidade de células chegava a 3 x 10⁷ células/mL contados em câmara de Neubauer, eram então centrifugadas a 5.000 rpm durante 10 minutos. O sedimento contendo as formas

epimastigotas foi utilizado para realização dos experimentos necessários ou congelados em meio LIT suplementado a 30% com soro fetal bovino e 10 % de DMSO. Os congelados eram foram deixados por 24 h a -80°C e em seguida transferidos para estocagem em nitrogênio líquido

8.3. Cultura de tripomastigotas e amastigotas de *Trypanosoma cruzi*

As formas tripomastigotas sanguíneos e amastigotas intracelulares de *T. cruzi* foram mantidas em cultura de células L6. Tripomastigotas da linhagem Y eram utilizados para infectar garrafas contendo células L6 na densidade de $8,0 \times 10^4$ células/cm². A proporção de parasitas era 10:1. As células L6 foram incubadas durante 48 h em meio DMEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino a 37°C , sendo que ao término deste período as garrafas eram lavadas com PBS 1X esterilizado para retirada dos tripomastigotas do sobrenadante, seguindo de nova incubação por 48 a 72h até surgimento das formas amastigotas intracelulares. Os tripomastigotas derivados das infecções eram congelados em meio DMEM suplementado a 30 % com soro fetal bovino e 10 % de DMSO. As amostras congeladas ficavam por 24 h a -80°C e em seguidas transferidas para nitrogênio líquido.

8.4. Cultivo de células L6

As células foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino e antibióticos a 37°C com 5% de CO₂. A manutenção foi realizada com repiques semanais, como descritos a seguir: o meio DMEM suplementado utilizado para a multiplicação era retirado e descartado, 2,0 mL de solução de verseno contendo 2 % de tripsina eram adicionados às garrafas e as células foram mantidas nessa solução à temperatura ambiente por aproximadamente 30 s. Após este período, a solução de verseno era retirada e descartada e as células incubadas a 37°C por 10 min para que descolassem das garrafas. Em seguida, 2,0 mL de meio DMEM suplementado eram adicionados em cada cultura para homogeneização das células e 500 μL de suspensão de células eram inoculadas em garrafas de 80 cm² (marca TPP) contendo 10 mL de meio DMEM suplementado. As células eram incubadas a 37°C evitando-se que as mesmas entrassem em confluência, realizando-se repiques periódicos. O meio das

células L6 era trocado a cada dois dias para evitar que houvesse a diferenciação dessas células.

8.5. Cultivo de células L6 para infecção com *T. cruzi*

As monocamadas de células L6 foram obtidas por meio do plaqueamento de $4,0 \times 10^4$ células/ cm^2 em garrafas de 150 cm^2 contendo 20 mL de meio DMEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino. Após 48 h de incubação em estufa a 37°C foi obtido aproximadamente $8,0 \times 10^4$ células/ cm^2 , densidade esperada para infecção.

9. Extração de RNA total

O RNA das formas epimastigotas e amastigotas intracelulares foram obtidos pelo método de extração de RNA por *TRIZOL* (Invitrogen) segundo instruções do fabricante (Invitrogen) com algumas variações: As células foram centrifugadas a 6.000 rpm / 10 min. O sedimento de células foi ressuspensionado em 0,5 mL de Trizol e deixadas à temperatura ambiente por 5 min. Em seguida foram adicionados 0,1 mL de clorofórmio (Sigma) e incubado 3 min à temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada a 12.000 g, na temperatura de 4°C por 15 min. Foram adicionados 0,250 mL de isopropanol (Sigma), homogeneizou-se e incubou-se a -20°C por 1 h a 2 h. Por fim, seguiu-se com nova centrifugação a 12.000 g / 4°C / 15 min, seguido de lavagem com etanol 70 % preparado com água tratada com DEPC (0,01%). Após secagem o sedimento de RNA foi incubado 5 min/ 65°C . As culturas foram tratadas com dois diferentes quimioterápicos: *Cosmegen* (Actinomicina D) na concentração de $15 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ e *Cicloheximida* (Sigma-Aldrich) na concentração $20 \mu\text{g}/\text{mL}$. Os RNAs foram extraídos nos seguintes tempos: 0 h, 1 h, 2 h, 3 h e 4 h. O tempo 0 h não foi tratado e foi utilizado com controle das amostras. Amostras de RNA sem tratamento foram utilizadas nas reações de PCR para amplificação das regiões UTR. Os sedimentos derivados das extrações foram incubados por 5 min a 65°C e em seguida estocados a -80°C . Alíquotas de $1,0 \mu\text{L}$ de todos os RNA foram retiradas para análise da integridade dos mesmos em gel de agarose a 1,5 %. As amostras de RNA total obtidas foram quantificadas por espectrofotometria (Nanodrop – Thermo Scientific e NanoVue Plus – GE healthcare).

9.1. Eletroforese em gel desnaturante de agarose

Para a análise das amostras de mRNA, géis desnaturante de agarose com a concentração de 1% foram feitos em tampão MOPS 1 X e formaldeído 2 % sob condições livre de RNase. A concentração de RNA por amostra no gel foi de 1µg, adicionados a um volume final de 25µL de tampão de amostra. Após incubação a 65 °C por 15 min, 1,0 µL da solução de brometo de etídeo a 1,0 mg/mL foi adicionado às amostras e essas aplicadas no gel. A corrida eletroforética aconteceu em tampão MOPS 1 X. O gel foi retirado ao alcançar 2/3 da corrida, os ácidos nucleicos foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (UV) e fotografados no fotodocumentador (BIO-RAD).

9.2. Tratamento do RNA total com DNase I

As amostras foram tratadas com DNase I livre de RNase (Promega), com o objetivo de se eliminar qualquer resíduo de DNA genômico. O tratamento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante, onde foram utilizados: tampão DNase 1 X; 2 U da enzima DNase I. O tratamento foi realizado a 37 °C por 60 min.

10. Ensaio de inibição da transcrição (actinomicina D) e tradução (cicloheximida)

10.1. Estratégia para obtenção dos RNAs das formas amastigotas intracelulares.

Para obtenção das amostras de RNA das formas amastigotas intracelulares, células L6 foram crescidas (item 8.4) em garrafas de 80 cm² e mantidas em cultivo em estufa a 37 °C. As células eram contadas em câmara de Neubauer e repiques de 4,0 x 10⁴ células/cm² em novas garrafas de 80 cm² em dias alternados. Quando as garrafas atingiam uma confluência de 40 %, tripomastigotas sanguíneos eram adicionados às culturas e incubados por 48 h. Os tripomastigotas eram então retirados e congelados em nitrogênio líquido (item 8.3) e as garrafas eram lavadas três vezes com PBS 1 X esterilizado e incubadas novamente em 20 mL de meio DMEM até surgirem as formas amastigotas intracelulares, o que ocorria em aproximadamente 72 h. Às garrafas contendo cultura de células L6 infectadas, foi adicionado uma solução de verseno +

tripsina a 2 % (itens 5.1 e 5.2) para as células aderidas se soltarem. As células foram centrifugadas a 3.000 rpm /5 min e o sedimento ressuspensionado em 2,5 mL de meio DMEM. Uma alíquota de 0,5 mL foi retirada para controle (amostra não tratada – tempo 0), em seguida Cicloheximida (20 µg/mL) era adicionado aos 2,0 mL restantes. Após 30 min a Actinomicina D (15 µg/mL) também era adicionada. Alíquotas de 0,5 mL foram distribuídas em cada tubo Eppendorf de 1,5 mL referente a um determinado tempo. Inicialmente os ensaios foram realizados no intervalo de tempo de 0 a 150 min e a extração de RNA total era realizada a cada 30' (Figura 13).

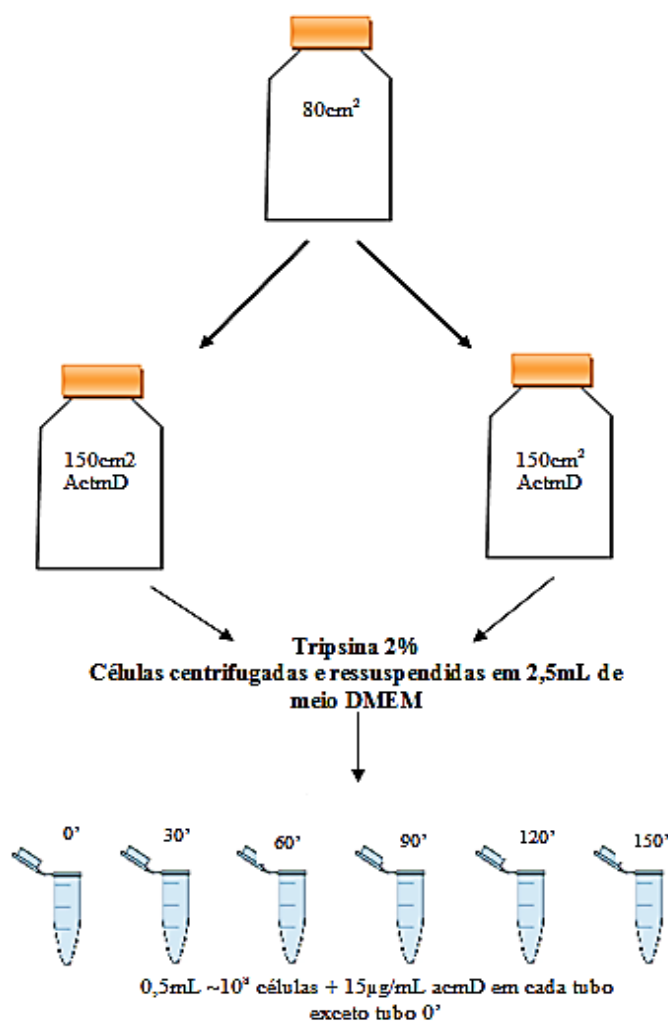


Figura 13. Esquema utilizado para obtenção do RNA das formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi* para o tratamento com actinomicina D. Duas garrafas de 150 cm² contendo células L6 infectadas com formas amastigotas foram adicionadas Tripsina a 2%. As células descoladas da garrafa foram centrifugadas, lavadas com PBS 1 X esterilizado e ressuspensionadas em 2,5 mL de meio DMEM. Alíquotas de 0,5 mL foram adicionadas em cada tubo Eppendorf de 1,5 mL. 15µg/mL de Actinomicina D foram adicionados a partir do tubo 30' e a cada 30 minutos seguia-se extração de RNA total. O tubo 0' (tempo zero) não foi tratado com a droga e foi utilizado como controle.

Nos ensaios seguintes os intervalos de tempo variaram de 0 h a 4 h, sendo o RNA extraído a cada hora. O tubo 0 (tempo zero) que não foi tratado com nenhum fármaco foi utilizado como controle nas mesmas condições que a cultura tratada. Ensaios em triplicata foram realizados para células tratadas apenas com AMD (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e triplicatas foram realizadas para ensaios com Actinomicina D (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e cicloheximida (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

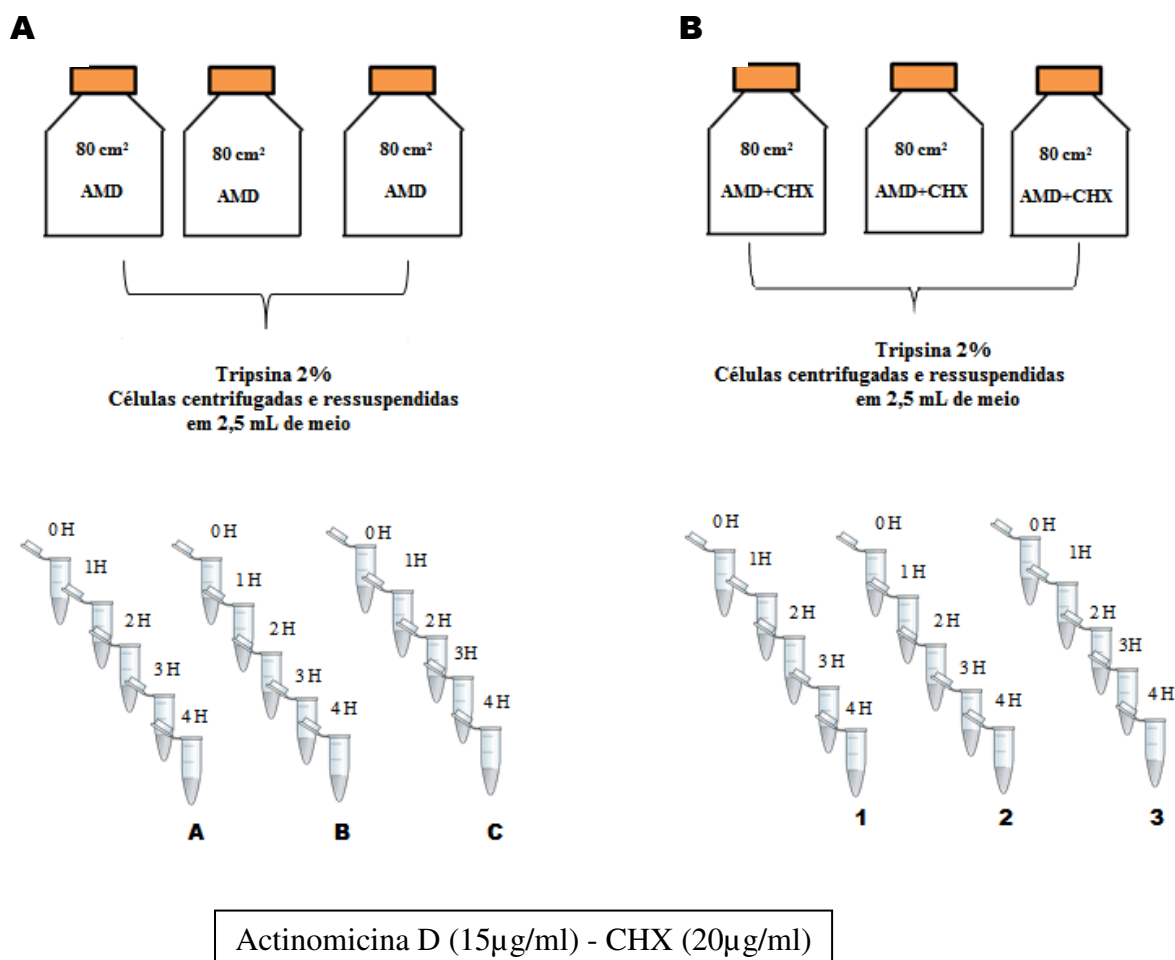


Figura 14. Esquema utilizado para obtenção do RNA das formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi* em ensaios com actinomicina D e cicloheximida. Ensaios realizados em triplicatas. Três garrafas de 80 cm² contendo células L6 infectadas com formas amastigotas intracelulares foram utilizadas para cada experimento. Tripsina a 2% foi adicionada e as células descoladas das garrafas foram centrifugadas, lavadas com PBS 1 X esterilizado e ressuspendidas em 2,5 mL de meio DMEM. Alíquotas de 0,5 mL foram adicionadas em cada tubo Eppendorf de 1,5 mL. 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Actinomicina D foram adicionados a partir do tubo 1 h nas amostras A, B e C. mais 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cicloheximida foram adicionados nas amostras 1, 2 e 3. A cada hora seguia-se com extração de RNA total. O tubo 0 h (tempo zero) não foi tratado com nenhum dos fármacos e foi utilizado como controle.

10.2. Estratégia para obtenção dos RNA das formas epimastigotas

Para obtenção das amostras de RNA das formas epimastigotas, parasitas foram cultivados em meio LIT. As células foram contadas em câmara de Neubauer e quando a cultura atingia a concentração de 10^8 parasitas, os epimastigotas foram centrifugados a 3.000 rpm/5 min e o sedimento foi lavado em PBS 1X e ressuspendido em 2,5 mL de meio DMEM. Alíquotas de 0,5mL foram distribuídas em cada tubo Eppendorf de 1,5 mL referente a um determinado tempo. Em seguida, 15 μ g/mL de actinomicina D foram adicionados a partir do tubo 30' e a cada 30 min era realizada a extração de RNA total. O tubo 0' (tempo 0) não foi tratado com a droga e foi utilizado como controle.

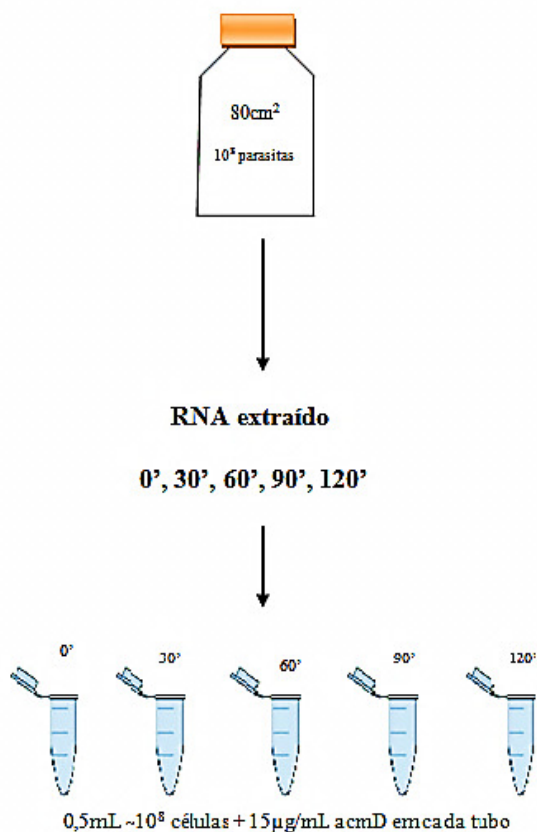


Figura 15. Esquema utilizado para obtenção do RNA das formas epimastigotas de *T. cruzi* para o tratamento com actinomicina D. Uma garrafa de 80 cm² contendo as formas epimastigotas foram contados em câmara de Neubauer, seguido de centrifugação, lavagem com PBS 1 X estéril e ressuspendidas em 2,5 mL de meio LIT. Alíquotas de 0,5mL foram adicionados em cada eppendorf de 1,5mL. 15µg/mL de Actinomicina D foram adicionados a partir do tubo 30' e a cada 30 minutos seguia-se extração de RNA total. O tubo 0' (tempo zero) não foi tratado com a droga e foi utilizado como controle. AMD = actinomicina D.

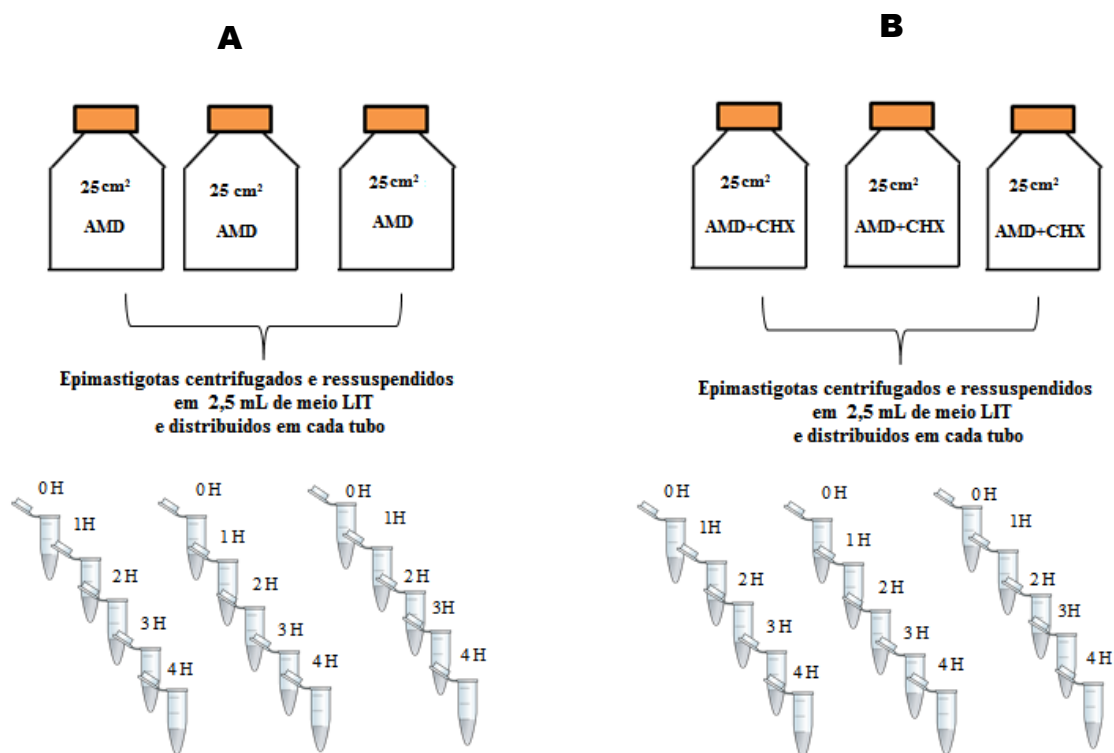


Figura 16. Esquema utilizado para obtenção do RNA das formas epimastigotas de *T. cruzi* em ensaios com actinomicina D e cicloheximida. . Ensaios realizados em triplicatas. Três garrafas de 25 cm² contendo as formas epimastigotas foram utilizadas para cada experimento. As células eram centrifugadas e lavadas com PBS 1 X estéril. Em seguida, eram ressuspensas em 2,5 mL de meio LIT. Aliquotas de 0,5 mL foram adicionadas em cada eppendorf de 1,5 mL. 15 µg/mL de Actinomicina D foram adicionados a partir do tubo 1 h nas amostras A, B e C. 15 µg/mL de Actinomicina D mais 20 µg/mL de cicloheximida foram adicionadas nas amostras 1, 2 e 3. A cada hora seguia-se com extração de RNA total. O tubo 0 h (tempo zero) não foi tratado com nenhum dos fármacos e foi utilizado como controle.

11. Transcrição Reversa (RT)

A reação de síntese da primeira fita de cDNA foi realizada a partir de 1,0 µg de RNA total das formas amastigotas intracelulares e epimastigotas de *T. cruzi* cultivadas de acordo com as condições especificadas (itens 8.2, 8.3 e 8.4). A essa quantidade de RNA total foi adicionado 0,5 µg de Random Primer (Promega) para análises de qPCR ou 0,5 µg de oligo (dT) quando para amplificação da região 3' UTR. A mistura era incubada a 70°C/5 min, e imediatamente colocada no gelo. Em seguida, para um volume final de 25 µL, os seguintes reagentes foram adicionados (para as concentrações finais indicadas): M-MLV Reaction Buffer 1 X; dNTPs 2,5 mM, Recombinant RNasin[®] Ribonuclease Inhibitor 25 U e 200 U da enzima transcriptase reversa do vírus Moloney Murine Leukemia (M-MLV – Promega). Em seguida os tubos foram incubados a 37 °C por 60 min. Para todos os sistemas controles da RT foram realizados omitindo-se a enzima transcriptase reversa, no intuito de verificar possível contaminação com DNA genômico.

12. PCR semiquantitativa

Uma alíquota correspondente a 1,0 µL da reação de síntese de cDNA foi submetida a reação de amplificação utilizando um volume final de 25,0 µL contendo: tampão *Taq* DNA polimerase 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,1 mM dNTPs, 0,3 µM (gene SCC1 e AMASTINA) e 0,1 µM (gene rRNA 24alfaS) de cada oligonucleotídeo (Tabela 1), 1,5 U da enzima Platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen).

Os parâmetros de amplificação adotados para a PCR semiquantitativa a partir do cDNA foram:

-*Pré-ciclo*: Desnaturação inicial: 94°C/ 1 min

- 28 ciclos:
 - 1) Desnaturação: 94°C/30 seg;
 - 2) Anelamento: temperatura 60°C/ 30 seg;
 - 3) Extensão: 72°C/ 30 seg
- Ciclo de extensão final: 72°C /2 min.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2,5 %, corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizados em sistema de fotodocumentação BioRad Universal Hood II (BioRad).

13. Amplificação das regiões UTR

13.1. Amplificação da região 5'UTR

Para amplificação da região 5'UTR da subunidade SCC1 do complexo Coesina foi usado um oligonucleotídeo (PR 375) complementar a sequência líder (SL- 5') que é conservado em todos os mRNAs de *Trypanosoma cruzi* até então descritos, e outro oligonucleotídeo complementar ao início da ORF (*Open Reading Frame*) específico a este gene. Todos os oligonucleotídeos foram desenhados de acordo com as sequências disponível no GenBank e TryTripDB, correspondentes ao gene *TcSCC1*.

Uma alíquota correspondente a 2,0 µL da reação de síntese de cDNA foi submetida à reação de amplificação em um volume final de 25,0 µL contendo: tampão *Taq* DNA polimerase 1X, 1,0 mM de MgCl₂, 10,0 pmol dNTPs, 1,6 pmol de cada oligonucleotídeo (sendo um par de oligonucleotídeo específico para gene SCC1 e um par para *gapdh* usado como controle da reação de PCR), 1,5 U da enzima *Platinum Taq* DNA polimerase (Invitrogen).

-*Pré-ciclo*: Desnaturação inicial: 94°C/ 1 min

- 30 ciclos:

- 1) Desnaturação: 94°C/30 seg

- 2) Anelamento: 58°C/ 30 seg.

- 3) Extensão: 72°C/ 1 min.

- Ciclo final: Extensão final: 72°C 2 min.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5 %, corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL).

13.2. Região 3'UTR

Para amplificação da região 3'UTR da subunidade SCC1 da Coesina em *Trypanosoma cruzi* foi utilizado o oligonucleotídeo PR370 que é específico e complementar ao final da ORF SCC1 e oligo (dt) 15 pb (Promega).

Uma reação inicial de PCR foi realizada utilizando apenas o oligonucleotídeo PR370 (tabela 1) interno ao final da ORF. Uma re-amplificação do produto inicial da PCR foi realizada utilizando oligo (dt) juntamente com PR370. Essa estratégia foi criada devido a dificuldade em amplificação da região 3'UTR.

1ª reação de PCR:

Uma alíquota correspondente a 3,0 µL da reação de síntese de cDNA foi submetida à reação de amplificação em um volume final de 25,0 µL contendo: tampão *Taq* DNA polimerase 1X, 2,0 mM de MgCl₂, 0,1 µM dNTPs, 40 picomoles do oligonucleotídeo PR370 que se anela ao final da ORF, um par de oligonucleotídeos específicos ao gene *GAPDH* foram usados com controle da PCR, 1,5 U da enzima *Platinum Taq* DNA polimerase (Invitrogen).

- *Pré-ciclo*: Desnaturação inicial: 94°C/ 1 min

- 40 ciclos:

- 4) Desnaturação: 94°C/30 seg;

- 5) Anelamento: temperatura 64°C/ 30 seg;

- 6) Extensão: 72°C/ 2 min.

- Ciclo de extensão final: 72°C /2 min.

2ª reação de PCR:

Uma re-amplificação foi necessária para se obter os fragmentos desejados. Para tanto, utilizou-se tampão *Taq* DNA polimerase 1X, 1,0 mM de MgCl₂, 0,1 µM dNTPs, 20 picomoles de cada oligonucleotídeo complementares ao final da ORF, um par de

oligonucleotídeos específicos ao gene *gapdh* foram usados com controle da PC), 0,008 µM de oligo (dt), 1,5 U da enzima *Platinum Taq* DNA polimerase (Invitrogen).

-*Pré-ciclo*: Desnaturação inicial: 94°C/ 1 min

- 40 ciclos:
 - 7) Desnaturação: 94°C/30 seg;
 - 8) Anelamento: temperatura 50°C/ 30s;
 - 9) Extensão: 72°C/ 2 min.
- Ciclo de extensão final: 72°C /2 min.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2,0 %, corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL).

13.3. Eletroforese em gel de agarose

O gel de agarose na concentração desejada foi feito em tampão TBE 0,5 X, sendo empregado o corante brometo de etídeo na concentração final de 0,5 µg/ml. As amostras a serem analisadas foram preparadas adicionando-se tampão de amostra para a concentração final de 1 X. Após a aplicação das amostras, o gel foi submetido à eletroforese em tampão de corrida TBE 0,5 X utilizando-se uma voltagem constante de aproximadamente 5 V/cm. A visualização dos ácidos nucléicos foi realizada em transluminador de luz ultravioleta (UV) e fotografada no fotodocumentador (BIO-RAD).

14. Clonagem dos fragmentos de PCR no vetor

Foi retirado 5,0 µL do produto de PCR e adicionado a um sistema de ligação utilizando o vetor pGEM-T (pGEM-T *Vector System* - Promega) na proporção de 1 de vetor para 2 de inserção em 15 µL de reação de ligação. Foi utilizada 1 unidade de T4 DNA Ligase (Gibco) para cada 15 µL de volume total da reação. A ligação foi mantida a 16°C, por 18 h. A metade da reação foi usada para a transformação de células competentes DH5α. A proporção vetor/ inserto foi calculada de acordo com a fórmula descrita em *Promega Protocols & Applications Guide* (1991).

$$\frac{\text{ng de vetor} \times \text{kb do inserto} \times \text{relação molar inserto/vetor}}{\text{kb do Inserto}} = \text{ng de inserto}$$

A relação vetor/inserto foi sempre 1:2.

Os plasmídeos ligados foram usados para transformar *E. coli* DH-5 α por choque térmico.

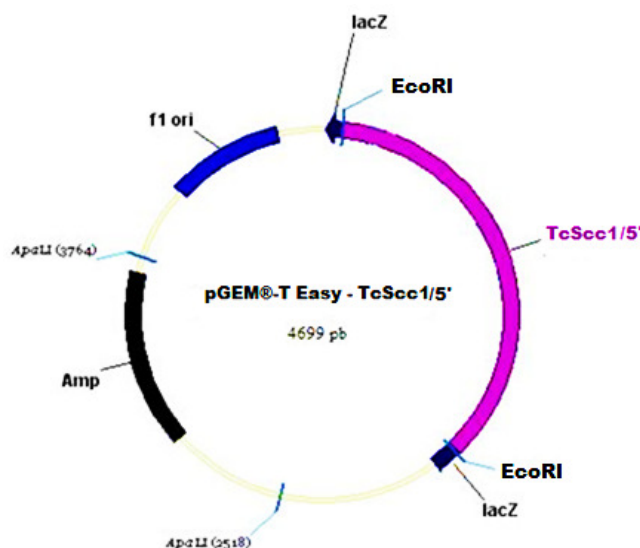


Figura 17. Vetor recombinante com a região 5'UTR do *TcScc1*. O produto da amplificação da região 5'UTR do mRNA *TcSCC1*, foi clonado dentro do gene *lacZ* do plasmídeo pGEM T – easy.

15. Transformação de *Escherichia coli* por choque térmico.

15.1. Preparo de Células Competentes (INOUE et al., 1990).

Todas as soluções e centrifugações utilizadas para a obtenção de células competentes foram mantidas ou procedidas a 4° C. Recolheram-se células de *E. coli* DH5 α estocadas, fez-se estria em placa de LB ágar e incubou por aproximadamente 18 h a 37°C. Após crescimento das colônias na placa pegou-se uma colônia isolada e foi feito um pré-inoculo em 3 mL de meio 2YT (item 2.2.3) e incubou a 37°C sob agitação de 220 rpm por 16 horas (overnight). Foi retirado 1 mL deste pré-inoculo e adicionado em 100 mL de meio SOB, incubou sob agitação (220 rpm) a 18°C até se atingir uma OD₆₀₀/mL de 0,4 - 0,5. Em seguida a cultura foi resfriada em banho de gelo por 10 min. e centrifugada por 10 min. a 2.500 g a 4 °C. O sedimento de células foi gentilmente ressuspendido em 32 mL de TB gelado e incubado no gelo por 10 min. Foi realizada uma nova centrifugação a 2500 g, por 10 min. a 4 °C e o sedimento obtido foi gentilmente ressuspendido em 8 mL de tampão TB. Finalmente, adicionou lentamente DMSO homogeneizando para uma concentração final de 7%, incubou no gelo por 10

min, distribuiu-se 200 µL da suspensão de células em tubos de 1,5 mL, estes foram resfriados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados a - 80°C.

15.2. Transformação

Tubos contendo 200,0 µl de células competentes foram descongelados em banho de gelo e a eles adicionados 50-100 ng do plasmídeo desejado. As células foram incubadas em gelo por uma hora, depois, submetidas ao choque térmico por 30s à 42°C e rapidamente transferidas para o banho de gelo por 10 minutos. Em cada tubo adicionou-se 0,8 mL de SOC, os deixando à 37°C por 1 hora. Após este período, as células foram semeadas em placas de LB ágar contendo o antibiótico de seleção adequada (ampicilina) e cultivada à 37°C por 14-18 horas.

15.3. Extração de DNA plasmidial de E. coli

Para a extração e purificação de DNA plasmidial foi realizado o método de lise alcalina (BIRNBOIM; DOLY, 1979). Clones selecionados foram inoculados em 3 mL de meio 2YT contendo a droga de seleção e incubados sob agitação (220 rpm) a 37° C por 18 horas. Uma alíquota de 1,5 mL de uma cultura de *E. coli* em fase estacionária de crescimento foi retirada e centrifugada em micro tubo a 10 000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de células ressuspensionado em 100 µl de solução I com auxílio de homogeneizador do tipo vortex. Adicionou-se 200 µl de solução II e, por inversão do tubo misturou-se o seu conteúdo por 10 vezes deixando-o por 5 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se 200 µl de solução III e por inversão do tubo misturou-se a solução até o aparecimento do precipitado de DNA cromossomal. Incubou-se no gelo por mais 5 minutos e centrifugou-se a 12 000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e transferido para um novo tubo no qual foi adicionado um volume de isopropanol. A solução foi homogeneizada, incubada por 5 minutos e centrifugada a 12 000 rpm por mais 30 minutos. O sedimento obtido foi lavado com etanol 70% (-20°C), sem ressuspensão, e centrifugado por mais 5 minutos. Depois de seco ao ar livre em temperatura ambiente, o sedimento foi ressuspensionado em 40 µl de água milli Q e guardado à -20°C.

16. Análise da quantificação relativa de mRNA por RT – PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR).

Os ensaios de qPCR em tempo real foram realizados no aparelho *Applied Biosystems StepOnePlus™* de acordo especificações do fabricante. Inicialmente foi realizada uma análise da eficiência de cada par de oligonucleotídeo em uma curva feita com diluição seriada (1:10, 1:50, 1:250 e 1:1250). O par de oligonucleotídeos utilizados para cada gene é apresentado na Tabela 1. Todos os oligonucleotídeos apresentaram uma eficiência entre 90 a 110 %. Após validação dos oligonucleotídeos, as amostras de RNA extraídas e submetidas à transcrição reversa (item 11) seguiram para reações de amplificação realizadas em triplicatas para cada amostra de tempo. Em cada sistema havia um volume final de 10,0 µL contendo: 0,4µL do par de oligonucleotídeos (Tabela 1) (10 µM cada), 5,0 µL de solução completa para PCR contendo SYBR Green (2X) (*Applied Biosystems*) e 1,0 µL da reação de síntese de cDNA como molde (cDNA de cada amostra foi diluído 1:50) e completando o volume final com 3,2 µL de água. Após a desnaturação inicial a 95°C por 10 min, as amplificações foram realizadas por 40 ciclos a 95°C por 15 s, 60°C por 15 s e 72°C por 20 s. Para confirmar a especificidade da amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à análise da curva de desnaturação. O gene ribossomal 24aS de *Trypanosoma cruzi* foi utilizado com gene referência para as reações de PCR em tempo real.

Os ensaios de PCR em tempo real permitem monitorar o progresso da reação. As reações são caracterizadas pelo momento durante o ciclo quando a amplificação do alvo é primeiramente detectada, contrapondo-se à quantidade acumulada de alvo ao final da reação de PCR comum. A quantificação relativa determina a variação na expressão de uma sequência de um ácido nucleico (alvo) em uma amostra teste quando comparada com a mesma sequência em uma amostra de referência. Esta última pode ser uma amostra do tempo zero de um estudo cinético (LIVAK et al., 2001). Essa quantificação fornece uma ótima comparação entre o nível inicial da molécula alvo em cada amostra, mesmo sem se saber o número exato de cópias desta molécula.

O método utilizado para quantificar relativamente as amostras foi baseado no cálculo do $2^{-\Delta\Delta CT}$. Nesse método de comparação do ciclo limiar (CT) do tempo zero (amostra não tratada) foi utilizado como calibrador para quantificação relativa dos dados e empregado para a avaliação da variação de expressão (*fold-change*) de cada

gene de interesse. O CT é o número de ciclos onde o alvo é amplificado, atingindo o limiar de fluorescência definido pelo pesquisador. O limiar está na faixa onde a quantidade de fluorescência gerada pela amplificação das amostras é significativamente maior que a fluorescência da linha base.

Para avaliarmos a expressão de mRNA, cada amostra de tempo tratada com Actinomicina D (0 h – 4 h) ou com Actinomicina D + Cicloheximida (0 h – 4 h), foram comparadas a expressão do mRNA *TcSCCI* não tratado (tempo zero). Usamos a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK et al., 2001) para calcularmos a meia-vida de cada amostra de mRNA. O $\Delta\Delta CT$ é obtido pela seguinte fórmula: ΔCT gene de interesse – ΔCT gene referencia ou calibrador. Inicialmente calculamos o valor ΔCT ($\Delta CT = CT$ gene interesse – CT referência). Outro modo de analisarmos o tempo de meia-vida dos mRNA foi usando uma análise percentual, onde o tempo zero não tratado foi considerado como 100% e os demais tempos tratados determinados em relação a este. As reações foram feitas em triplicata, para todos os genes analisados.

17. Quantificação dos níveis de expressão gênica obtidos na PCR

A análise dos resultados obtidos visando à quantificação dos níveis de expressão dos genes de interesse foi realizada por densitometria, utilizando-se o programa *ImageJ* 1.45s. Os níveis de expressão do gene ribossomal *Tc24alfaS* permitiram a normalização dos resultados. A partir dos valores obtidos por densitometria, referentes a cada fragmento de DNA amplificado, foi determinada a razão entre os níveis de expressão dos genes *TcSCCI* e *TcAMASTINA* em relação a expressão do gene *Tc24alfaS* (controle) para cada uma das condições empregadas. Comparam-se os valores das razões obtidas (gene de interesse / *Tc24alfaS*) a partir da condição experimental (tratado com AMD ou AMD+CHX) com aquelas obtidas para a condição controle de cultivo (tempo 0 – não tratado).

18. Análise estatística dos resultados obtidos na RT-PCR semiquantitativa e qRT-PCR em tempo-real.

Os resultados da PCR semiquantitativa foram analisados aplicando-se o teste *one-way* ANOVA e as médias foram comparadas usando o teste *Tukey-Kramer*. As

análises de PCR em tempo real foram feitas com auxílio do programa *Q-base*. Os gráficos foram construídos no programa GraphPad Prism 5.0 (Graph Pad Inc.). Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

1. Análise comparativa da expressão do gene *TcSCC1* nas diferentes formas do *T. cruzi*

Em 2011, Ferreira observou que a proteína *TcSCC1* está presente mais abundantemente nas formas amastigotas com uma localização nuclear, menos abundante nas formas epimastigotas com distribuição ao longo das células e ausente nas formas tripomastigotas. Baseado nesses resultados, a primeira etapa desse trabalho foi a quantificação e a comparação dos níveis do mRNA do gene *TcSCC1* entre as diferentes formas do *T. cruzi*. Os resultados obtidos pela quantificação relativa por RT-PCR em tempo real dos níveis de mRNA entre as formas amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas da linhagem Y de *T. cruzi* estão mostrados na Figura 18. Entre as formas amastigotas e tripomastigotas a quantificação é similar e não houve diferença significativa em nossas análises. Entretanto nas formas epimastigotas a quantidade de mRNA da *TcSCC1* é aproximadamente duas vezes maior que em amastigotas e tripomastigotas.

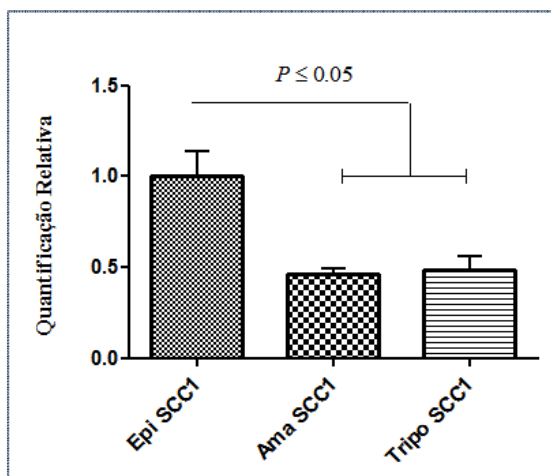


Figura 18. Quantificação relativa dos níveis do mRNA do gene *TcSCC1* nas diferentes formas do *T. cruzi*. O gene *GAPDH* foi empregado como endógeno para normalização. O gráfico mostra a quantificação relativa dos níveis dos mRNA nas três formas do *T. cruzi*. Um experimento representativo de três é mostrado, as barras representam o erro padrão da média da triplicata. As análises estatísticas mostraram um valor de $p < 0.05$.

Esse resultado mostra então uma divergência entre a quantidade da proteína *TcSCC1* observada por Ferreira (2011) e os níveis de mRNA nas diferentes formas do parasita, o que sugere um possível controle pós transcricional na sua expressão gênica.

Assim, iniciamos a análise da região genômica da *TcSCC1* e suas possíveis regiões regulatórias.

2. Análises em bancos de dados genômicos das regiões 5' e 3' UTR do gene *TcSCC1*

Para a identificação de possíveis elementos cis regulatórios presentes nas regiões 5' e 3' UTR do mRNA da *TcSCC1* que possam atuar de forma direta na estabilidade ou desestabilidade do mRNA, como já descrito para vários genes em *T. cruzi*, prosseguimos com as análises das regiões genômicas do gene *TcSCC1*. Buscamos em bancos de dados genômicos (GenBank e TriTrypDB) a sequência do gene *TcSCC1* e sua organização no *cluster* o qual esse faz parte. O gene *TcSCC1* possui dois alelos no genoma de *T. cruzi* e é homólogo ao *Rad-21* de mamíferos, sendo que a sua localização, tamanho e número de acesso no GeneBank estão apresentados na Tabela 2. O gene *TcSCC1* se encontra entre dois genes hipotéticos e sua fase aberta de leitura bem como as regiões intergênicas 5' e 3' estão apresentadas na Figura 19A. Essa sequência disponibilizada no GenBank nos permitiu identificar possíveis *cis-elementos* regulatórios presentes nas regiões intergênicas que podem estar também presentes nas regiões UTRs do RNA mensageiro atuando então como sinais de controle gênico pós-transcricional como os elementos ARE. Foi também possível identificarmos os sinais de *trans-splicing* e adição da cauda poli A, com base no que já foi descrito para tais processos (Figura 19B).

Tabela 2: Localização cromossômica do gene *TcSCC1*.

Subunidade	Número de acesso	Cromossomo	Localização no cluster	5'Intergênica	3'Intergênica
<i>TcSCC1</i>	AAHK01000306.1	28	198.988 a 200.745	1155 pb	1510 pb

sequenciamento e confirmação da presença das possíveis sequências *cis* regulatórias, além de experimentos posteriores de transfecção com genes repórteres.

Devido ao processo de *trans-splicing* sofrido pelos tripanossomatídeos, os mRNA apresentam em sua extremidade 5' uma sequência líder (SL) conservada. Na estratégia elaborada (Figura 20) para a amplificação da região 5'UTR, foi utilizada essa sequência 5' SL conservada para o anelamento do oligo PR375 nessa região 5' e o oligo PR369 que anela internamente à ORF para amplificação da região 5' UTR. Para a amplificação da região 3'UTR, um oligo dT foi utilizado para o anelamento na cauda poli(A) com o oligo PR370 que anela internamente no final da ORF. Os fragmentos amplificados esperados com a utilização dessa estratégia corresponderão cada qual ao tamanho de suas regiões 5' UTR e 3' UTR, adicionados das pequenas regiões da ORF.



Figura 20. Estratégia utilizada na amplificação das regiões UTR do mRNA da *TcSCC1* do complexo Coesina. Caixa azul SL (*Sequência líder de T. cruzi*), caixa vermelha ORF (*Open reading frame – fase aberta de leitura*). Cauda poli A (aaaaaaa), oligonucleotídeo oligo(dT) (ttttttt). As setas indicam sentido e local de anelamento dos oligonucleotídeos desenhados para cada gene do complexo.

3.1. Análise da região 5' UTR do mRNA da *TcSCC1*

Utilizando a estratégia mostrada na Figura 20, fragmentos amplificados por RT-PCR, a partir de RNA total das formas amastigotas e epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, foram analisados em gel de agarose (Figura 21A). Dois fragmentos resultaram da amplificação com os oligonucleotídeos PR369 e PR375 (SL). Dois possíveis sítios para *trans-splicing* foram identificados na região intergênica 5' do gene *TcSCC1* (Figura 21B), assim nas amplificações por PCR dois produtos correspondentes a essas regiões foram amplificados. Uma banda de aproximadamente 506 pb foi amplificada a partir de cDNA de epimastigotas. Um *nested* PCR foi realizado para confirmar se o produto amplificado era realmente a região 5' UTR do mRNA da *TcSCC1* (Figura 22A). Utilizamos o par de oligonucleotídeos PR110 e PR369, que amplificam uma região

interna ao produto amplificado inicialmente com os oligonucleotídeos PR369 e PR375 (Figura 22B). Os fragmentos amplificados correspondem ao tamanho esperado, confirmando que a primeira amplificação foi específica e correspondia à região 5' UTR do mRNA do gene *TcSCC1*.

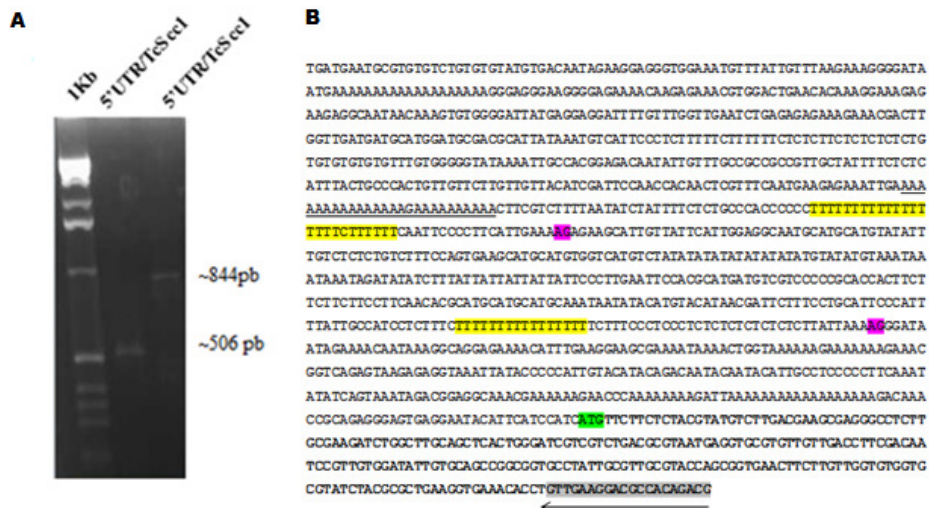


Figura 21. Mapeamento da região 5'UTR do gene *TcSCC1*. (A) Análise em gel de agarose a 1,5 % da amplificação da região 5'UTR mostrando produto da amplificação com os oligos PR369 + PR375 (SL). (B) Região intergênica 5' do gene *TcSCC1* e 3' do gene a montante no *cluster*, um gene hipotético (Tc00.1047053508387.160). A seta mostra a cobertura do oligonucleotídeo PR369 dentro da ORF e o sentido da amplificação. Em verde códon ATG de início da ORF do gene *TcSCC1*. Em amarelo regiões ricas em pirimidinas, sinal para adição da SL seguido do primeiro dinucleotídeo AG destacado em rosa (acesso no. AAHK01000306.1).

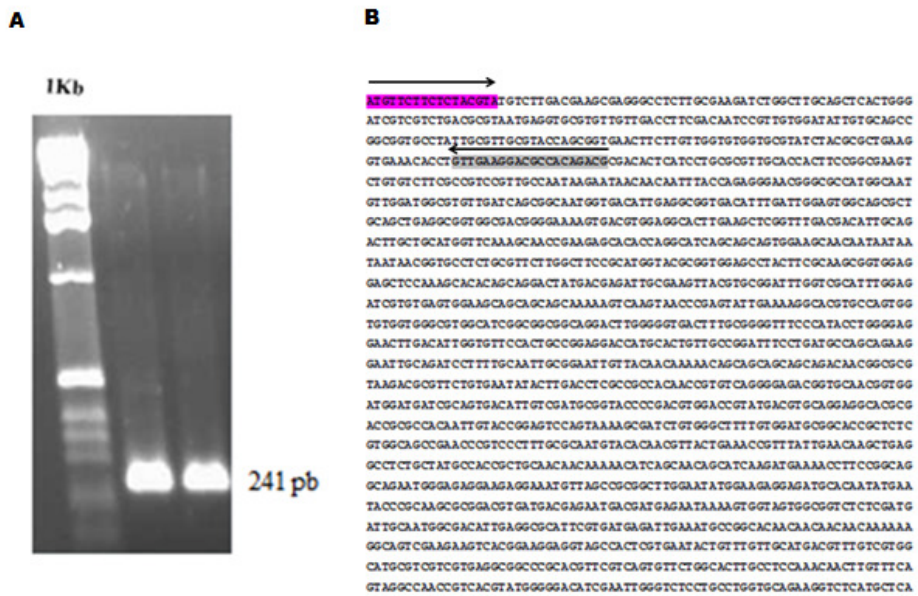


Figura 22. Nested PCR da região 5'UTR do gene *TcSCC1*. (A) Gel de agarose mostrando dois fragmentos amplificados, produtos da reamplificação dos fragmentos mostrados na Figura 21A, utilizando o oligo PR110 que anela no início da ORF do gene *TcSCC1* e o oligo PR369. (B) ORF do gene

TcSCC1 de *T. cruzi* (no. acesso AAHK01000306.1). Em rosa oligo PR110, em cinza oligo PR369. As setas indicam o sentido da amplificação.

Após confirmação de que o fragmento era de fato correspondente à região 5' UTR do mRNA da *TcSCC1*, realizamos a clonagem dos fragmentos amplificados no vetor de clonagem pGEM-T Easy (Invitrogen). A Figura 23 mostra o plasmídeo recombinante selecionado denominado de pETcSCC1/5'UTR. A Figura 23A mostra a confirmação da clonagem do fragmento pela análise em gel de agarose da digestão com a enzima *EcoRI*, que libera o fragmento clonado com massa molecular de ~550 bp.

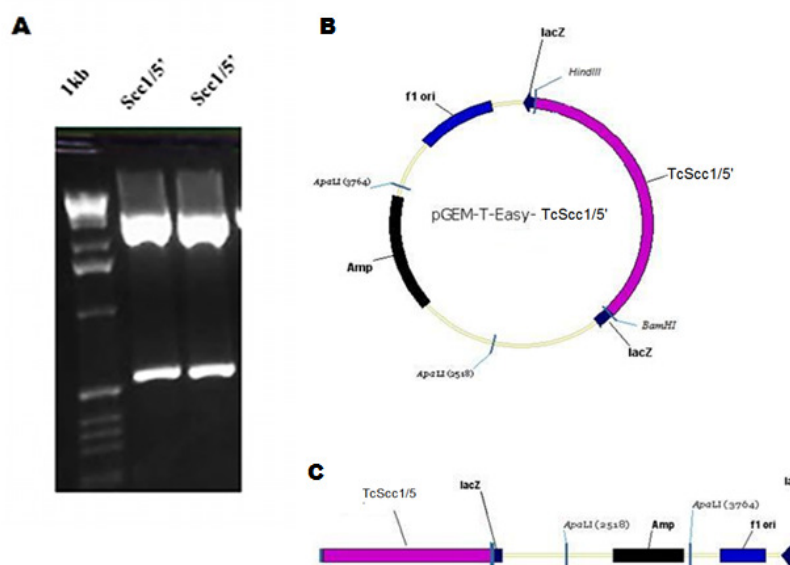


Figura 23. Análise do plasmídeo recombinante pETcSCC1/5'UTR. A) Análise em gel de agarose a 1,5 % da digestão com enzima *EcoRI* do plasmídeo recombinantes pETcSCC1/5' (plasmídeo pGEM-T Easy + região 5' UTR da *TcSCC1*). (B) Mapa do vetor de clonagem construído com a inserção da região 5'UTR do gene *TcSCC1*. Em rosa fragmento correspondente a região 5'UTR amplificada inserido no vetor. (C) Vetor linearizado contendo o fragmento *TcSCC1/5'UTR*.

3.2. Análise da região 3' UTR do mRNA da *TcSCC1*

A amplificação da região 3' UTR do mRNA da *TcSCC1* foi realizada utilizando RNA total das formas epimastigotas e amastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Os fragmentos após serem amplificados seguindo a estratégia da Figura 20 foram visualizados em gel de agarose evidenciando a presença de duas bandas, uma de ~700 pb e outra de 900 pb, ambas correspondem ao tamanho teórico estimado pela análise dessas regiões na sequência intergênica (Figura 24B). Dois possíveis sítios para adição da cauda poli(A)



Figura 26. Avaliação da integridade dos RNAs totais de *T. cruzi* após tratamento com Actinomicina D. RNA total em gel de agarose 1,5% das formas epimastigotas e células L6 infectadas com as formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Em cada poço foi colocado 1,0 μ L de cada extração de RNA. São visualizadas as três bandas de rRNA de *T. cruzi* (poço 1 – 6) e as duas bandas do rRNA de L6 (8 – 12).

Os ensaios com actinomicina D (AMD) e com actinomicina e cicloheximida foram realizados no intuito de avaliar a estabilidade dos mRNAs através da inibição da transcrição apenas e da inibição da transcrição e tradução, respectivamente, o que possibilita mensurar a vida média dos mRNAs de interesse.

A droga actinomicina D faz parte da classe de antibióticos composto de polipeptídios isolados de *Streptomyces*. É muito utilizada nos estudos de transcrição por ter a capacidade de se ligar ao DNA, interrompendo assim a elongação pela RNA polimerase (SOBELL, 1985). Por se ligar ao DNA dupla fita, pode também parar a duplicação do DNA. A empresa Merck lançou em 1964 a actinomicina D com o nome comercial *Cosmegen* que é um fármaco muito usado no tratamento de câncer. A cicloheximida é um antibiótico isolado de *Streptomyces griseus*, conhecido por impedir a atividade peptidil transferase da subunidade 60s do ribossomo, impedindo assim a tradução.

De acordo com os resultados obtidos anteriormente mostrados no item 1, onde fizemos uma análise comparativa da quantidade de mRNA da TcSCC1 presente nas formas epimastigotas e amastigotas intracelulares de *T. cruzi*, existe uma divergência entre os níveis de mRNA e a quantidade da proteína TcSCC1 presente nessas formas

mostrada por Ferreira (2011). Essa diferença sugere uma regulação pós-transcricional na expressão do gene *TcSCC1* nas diferentes formas de *T. cruzi*. Assim, para testarmos se essa regulação está relacionada à estabilidade do mRNA da *TcSCC1*, analisamos a sua meia vida nos experimentos com a inibição da transcrição e com a inibição da transcrição e tradução em experimentos semiquantitativos por RT-PCR e quantitativos por RT-PCR em tempo real.

4.1. Análise da estabilidade do mRNA da TcSCC1 por RT-PCR semiquantitativo

No experimento semiquantitativo com a inibição da transcrição, após o tratamento das células com actinomicina D, o RNA extraído foi submetido a ensaios de RT-PCR e quantificados após eletroforese em gel de agarose. O gene ribossomal *Tc24a5* foi usado como controle interno normalizador. O gene *TcAMASTINA* foi usado como controle do experimento, cujos níveis de mRNA são mais abundantes em amastigotas (COUGHLIN et al., 2000). Os resultados foram quantificados com auxílio do programa *ImageJ 1.45s*. A Figura 27 mostra os resultados das análises semiquantitativas. Nas formas epimastigotas (Figura 27A, B e C) os resultados da PCR semiquantitativa mostram que, no intervalo de tempo de 0 a 150 min após tratamento com AMD, apenas a amostra no tempo de 150 min apresentou um valor significativamente menor ($p \leq 0,05$) em relação ao tempo 0 (controle). As demais amostras não apresentaram variação em relação ao controle. O gene controle amastina apresentou variação a partir dos 30 min de tratamento com AMD (Figura 27C). Assim, nessa primeira análise, observamos nas formas epimastigotas uma estabilidade aparentemente maior nos níveis do mRNA da *TcSCC1* durante tratamento com actinomicina D (Figura 27B). Nas formas amastigotas intracelulares (Figura 27D, E e F), os resultados mostraram que a quantificação dos níveis de mRNA da *TcSCC1*, a partir de 60 min de tratamento das células com AMD, apresentaram variação estatisticamente relevante em relação ao tempo 0 (Figura 27E). O gene Amastina variou a partir de 30 min tanto em epimastigotas quanto em amastigotas (Figura 27C e 27F).

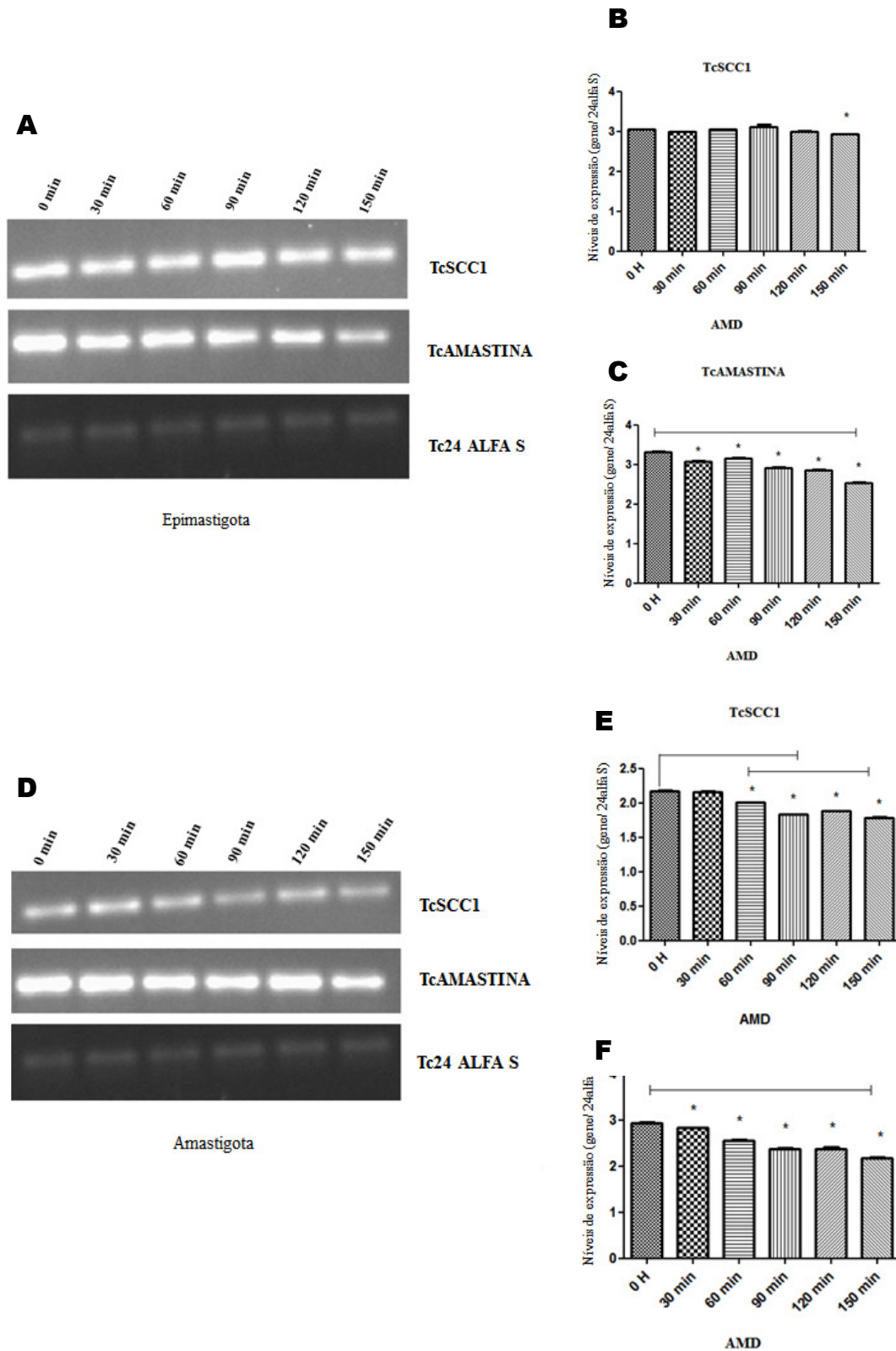


Figura 27. Análise comparativa dos níveis de mRNA dos genes *TcSCC1* e *TcAMASTINA* nas formas epimastigotas e amastigotas de *Trypanosoma cruzi* após tratamento com actinomicina D. O rRNA *Tc24a S* foi empregado como controle interno da reação. (A) e (D) Géis de agarose 2,5 % corado com brometo de etídeo mostrando amplificação dos cDNAs. Na primeira linha amplificação do cDNA do gene *TcSCC1*. Na segunda linha amplificação do gene *Amastina*. Na terceira linha amplificação do gene *Tc24a S*, controle para normalização do experimento. Os resultados referentes aos níveis dos referidos

mRNA foram quantificados por densitometria feita com auxílio do programa *ImageJ 1.45s*. Os gráficos (B), (C), (E) e (F) mostram respectivamente a média das razões entre o nível de expressão dos genes da *TcSCC1* e da *TcAmastina* e o controle interno *24aS* em epimastigotas e amastigotas. Um experimento representativo de três é mostrado, as barras representam o erro padrão da média da triplicata, os asteriscos representam análise estatística com $p < 0.05$, os asteriscos (*) representam análise estatística com $p < 0.05$. AMD: Actinomicina D.

Novas análises foram realizadas aumentando o intervalo de tempo até 4 horas de tratamento, no intuito de confirmarmos as observações anteriores. Além disso, foi realizado em paralelo o tratamento com a inibição da transcrição e da tradução para checar o envolvimento da tradução na estabilidade do mRNA da *TcSCC1*. O intervalo de tempo de tratamento com AMD ou AMD+CHX variou então entre 0 h a 4 h, sendo que as análises foram realizadas de hora em hora. Usamos as mesmas condições anteriores de cultivo para as formas epimastigotas e cultivo e infecção no caso das formas amastigotas intracelulares. A concentração de AMD (15 μ g/mL) se manteve como anteriormente.

Nas formas epimastigotas tratadas com AMD houve variação nos níveis do mRNA da *TcSCC1* em relação à amostra controle (tempo 0) a partir de 2 h de tratamento (Figura 28B). A análise feita a partir da inibição da transcrição (AMD) combinada com inibição da tradução por cicloheximida (CHX) mostrada na Figura 28C mostra uma variação significativa a partir de 1 h de tratamento. Essa variação oscilou entre a amostra 3 h que apresentou aumento na quantificação, entretanto, a quantificação volta a diminuir na amostra 4 h (Figura 28C). O aumento não foi maior que a quantificação da amostra controle e continuou significativamente menor. O mRNA do gene *Amastina* nas formas epimastigotas apresentou uma diminuição significativa a partir de 1h de tratamento com AMD, chegando a decair aproximadamente 50% a partir do tempo de 2 h. Na combinação do tratamento com AMD e CHX, a *Amastina* diminui na quantificação relativa a partir da amostra 1 h (Figura 28C).

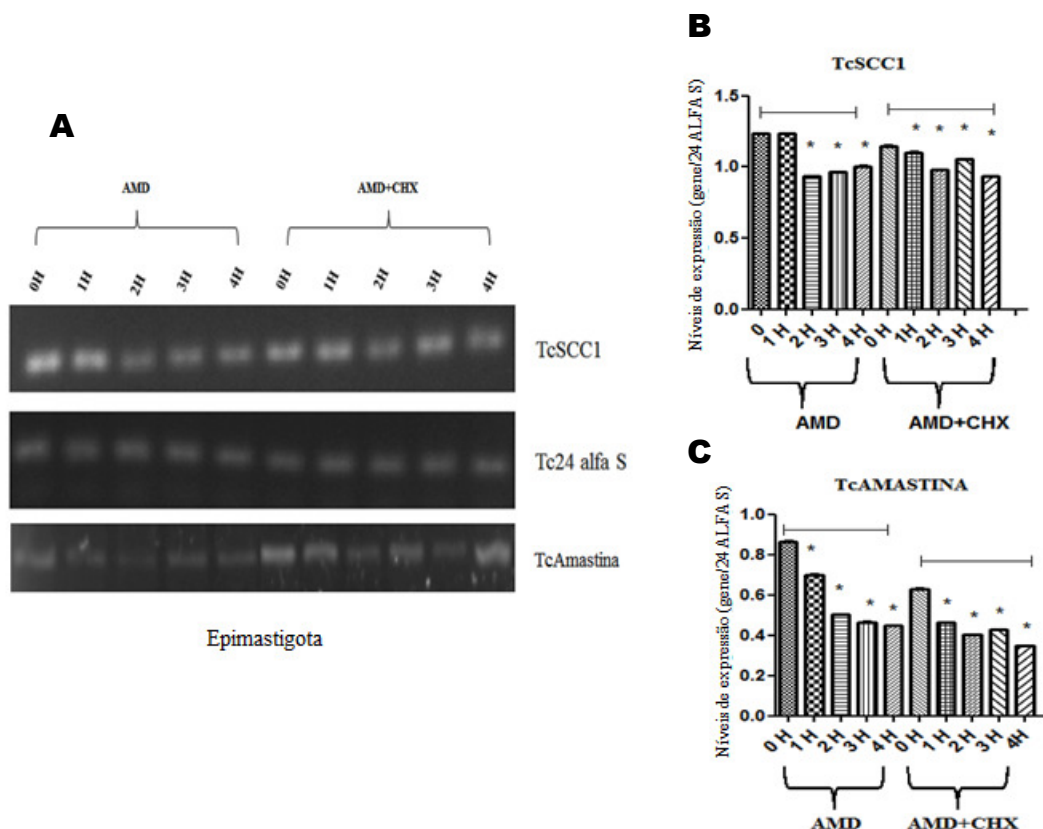


Figura 28. Análise comparativa dos níveis de mRNA dos genes *TcSCC1* e *TcAMASTINA* nas formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* após tratamento com actinomicina D e com actinomicina D e cicloheximida. O rRNA *24aS* foi empregado como controle interno da reação. (A) Gel de agarose 2,5 % corado com brometo de etídeo mostrando amplificação dos cDNAs. Na primeira linha amplificação do cDNA do gene *TcSCC1*. Na segunda linha amplificação do gene *Tc24aS*, endógeno usado para normalização do experimento. Na terceira linha amplificação do gene *Amastina*. Os resultados referentes aos níveis dos referidos mRNA foram quantificados por densitometria feita com auxílio do programa *ImageJ 1.45s*. Os gráficos (B) e (C) mostram respectivamente a média das razões entre o nível de expressão dos genes *TcSCC1* e *TcAmastina* e o controle interno *24alfaS*. Um experimento representativo de três é mostrado, as barras representam o erro padrão da média da triplicata, os asteriscos (*) representam $p < 0.05$. AMD: Actinomicina D, CHX: Cicloheximida.

Nas formas amastigotas intracelulares, os níveis de mRNA da *TcSCC1* das células tratadas apenas com AMD apresentaram uma diminuição significativa nas amostras nos tempos 2 h e 3 h. No entanto, a amostra 4 h volta se normalizar em relação à amostra controle (tempo 0). Quando combinado o uso de AMD e CHX nas células, as quantificações das amostras apresentaram aumento significativo nos tempos: 1 h, 2 h, 3 h e 4 h. O cDNA da *Amastina* quando analisado no tratamento com AMD mostrou uma leve diminuição na amostra 1h, embora significativa. As amostras 2h, 3h e 4h aumentaram em relação à amostra controle (Figura 29). Quando comparada a quantificação após tratamento com AMD e CHX, observamos um aumento dos níveis

do mRNA da amastina como o observado quando apenas AMD foi adicionado às culturas.

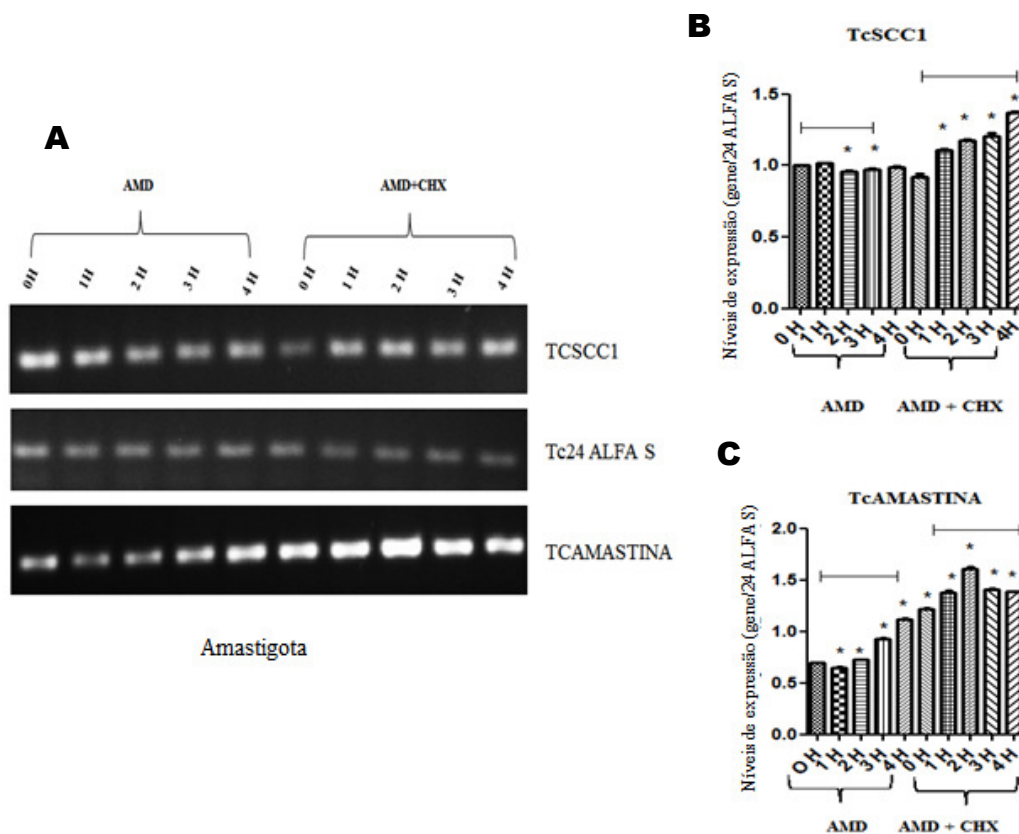


Figura 29: Análise comparativa dos níveis de mRNA dos genes *TcSCC1* e *TcAMASTINA* nas formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* após tratamento com actinomicina D e com actinomicina D e cicloheximida. O rRNA *24alfa S* foi empregado como controle interno da reação. (A) Gel de agarose 2,5% corado com brometo de etídeo mostrando amplificação dos cDNAs. Na primeira linha amplificação do cDNA do gene *TcSCC1*. Na segunda linha amplificação do gene *Tc24aS*, endógeno usado para normalização do experimento. Na terceira linha amplificação do gene *TcAmastina*. Os resultados referentes aos níveis de expressão dos referidos genes foram quantificados por densitometria feita com auxílio do programa *ImageJ 1.45s*. Os gráficos (B) e (C) mostram respectivamente a média das razões entre o nível dos mRNA da *TcSCC1* e da *TcAmastina* e o controle interno *24aS rRNA*. Um experimento representativo de três é mostrado. As barras representam o erro padrão da média da triplicata, os asteriscos (*) representam análise estatística com $p < 0.05$. AMD: Actinomicina D, CHX: Cicloheximida.

4.2. Análise da estabilidade do mRNA da *TcSCC1* por RT-PCR em tempo Real

Para uma análise mais sensível e apurada da variação dos níveis de mRNA da *TcSCC1*, nós realizamos um RT-PCR em tempo real (qRT-PCR) usando oligonucleotídeos específicos. Como controle do experimento nós usamos oligonucleotídeos para o gene Amastina que em amastigotas é mais abundante

(COUGHLIN et al., 2000). Os gráficos abaixo com a quantificação relativa mostram os resultados estimados com base na fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK et al., 2001). As amostras não tratadas (tempo 0 h) foram utilizadas como calibrador em todas as análises. As amostras tratadas com os fármacos eram comparadas ao seu controle não tratado e análises estatísticas eram empregadas em cada amostra. Valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os testes estatísticos aplicados foram *one-way* ANOVA e *Tukey-Kramer* e o teste T. Ao iniciarmos as análises por PCR em tempo real, realizamos uma curva de eficiência dos oligonucleotídeos, onde todos obtiveram uma eficiência entre 90 % e 110 %, o que é exigido para que se use a fórmula de LIVAK (2001) (dados não mostrados). Em um primeiro momento, nós analisamos os níveis de mRNA da TcSCC1 nos intervalos de tempo: 30 min, 60 min, 90 min, 120 min e 150 min, onde as formas epimastigotas e amastigotas intracelulares foram tratadas com AMD. O tempo 0 não era exposto ao tratamento e foi utilizado como controle. Os ensaios seguiram conforme detalhado em material e métodos e os resultados dessas análises estão apresentados na Figura 30.

Nas formas epimastigotas a quantidade relativa do mRNA da TcSCC1 após tratamento com AMD se mantém estável até o tempo de 60 min. Após 90 min, 120 min e 150 min a quantidade relativa diminui de forma significativa em relação ao controle (Figura 30). O gene Amastina como esperado decai a quantidade relativa nos primeiros 30 min (Figura 30B).

Nas formas amastigotas intracelulares a quantidade relativa do mRNA da TcSCC1 diminui nos primeiros 30 min de tratamento com AMD e essa diferença é significativa em relação ao controle (Figura 30C). A quantidade relativa se mantém menor que o tempo 0 ao longo dos 150 min. Já a Amastina se mantém estável ao longo do tratamento com uma tendência a um aumento (Figura 30D). Com base nessas primeiras análises, realizamos novas análises com o aumento do tempo de tratamento das células com AMD e incluindo o tratamento com AMD e CHX, no intuito de assim podermos avaliar com mais precisão a estabilidade dos mRNA da TcSCC1 e da TcAMASTINA.

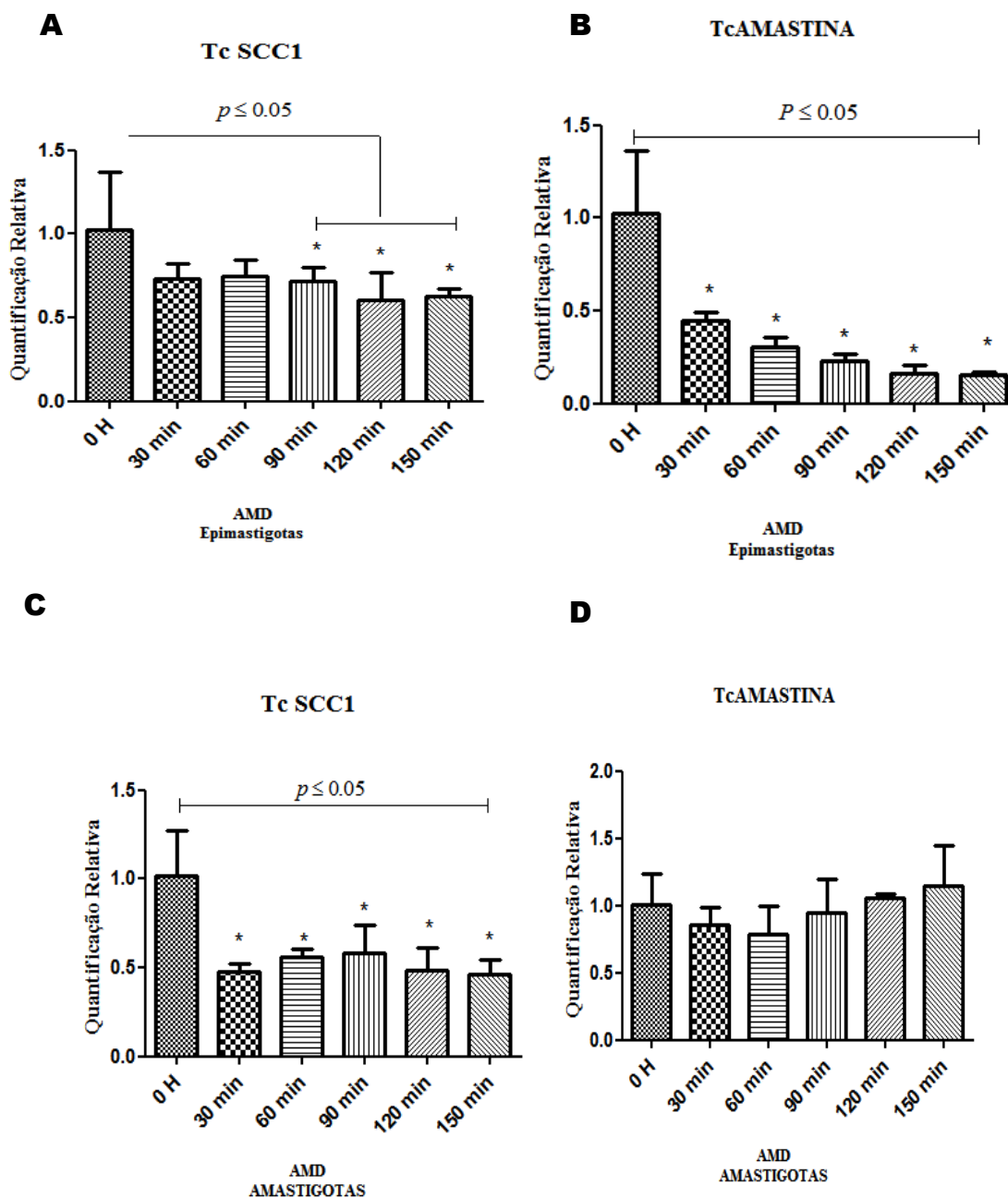


Figura 30. Quantificação relativa por RT-PCR em tempo real dos níveis do mRNA da TcSCC1 e da TcAMASTINA nas formas epimastigotas e amastigotas após tratamento com actinomicina D. O tratamento foi analisado em diferentes tempos (30 min, 60 min, 90 min, 120 min e 150 min) em comparação com 0 h e normalizados com o mRNA do rRNA *Tc24alfa S*. Uma alíquota de 1,0 μ L da reação de síntese de cDNA de cada amostra foi diluído na proporção de 1:50 e 1,0 μ L da diluição foi empregada como molde para amplificação. O gene *24alfa S* foi empregado como endógeno para normalização. Os gráficos A, B, C e D mostram a quantidade relativa dos níveis dos mRNA da TcSCC1 e da TcAMASTINA ao longo do tratamento com AMD. Um experimento representativo de três é mostrado, as barras representam o erro padrão da média da triplicata, os asteriscos (*) representam análise estatística com $p < 0.05$. AMD: Actinomicina D.

Deste modo, as análises realizadas em seguida mostram a variação da quantidade relativa dos mRNAs da TcSCC1 e da TcAMASTINA ao longo de 4 h de tratamento com AMD e com AMD e CHX.

Nas formas epimastigotas a quantidade relativa do mRNA da TcSCC1 diminui significativamente a partir de 1 hora de tratamento com AMD e continua a diminuir ao longo das 4 horas de tratamento (Figura 31A). Quando inibimos a tradução em conjunto com a transcrição, observamos que a quantidade relativa do mRNA da TcSCC1 se mantém estável até 3 horas de tratamento com os dois fármacos (Figura 31C). Apenas na amostra de 4 h é que observamos uma diminuição significativa na quantidade relativa desse mRNA (Figura 31C). Os níveis do mRNA da Amastina diminuem drasticamente já na primeira hora de tratamento com AMD (Figura 31B), o que é esperado (COUGHLIN et al., 2000). O mesmo é observado quando a tradução também é inibida (Figura 31D).

Em amastigotas intracelulares, observamos que há uma diminuição na quantidade relativa do mRNA da TcSCC1 a partir de 1 h de tratamento com AMD e que se mantém abaixo do tempo 0 até o tempo de 4 h (Figura 32A). Já a Amastina não apresentou variação significativa nas análises estatísticas (Figura 32B). Esses resultados concordam com nossas análises iniciais nos experimentos semiquantitativos. Já, quando inibimos a tradução em conjunto com transcrição, a quantidade relativa do mRNA da TcSCC1 aumenta significativamente em relação ao controle (amostras 1 h, 2 h e 3 h), e diminui na amostra de 4 h (Figura 32C). A quantidade relativa de Amastina apresenta uma diminuição a partir da terceira hora de tratamento quando há a inibição da transcrição e tradução (Figura 32D).

Baseado nos resultados acima, podemos concluir que a vida média dos mRNAs tanto da TcSCC1 quanto da TcAMASTINA é mais curta em epimastigotas do que em amastigotas e que a inibição da tradução aparentemente não afeta drasticamente esse comportamento.

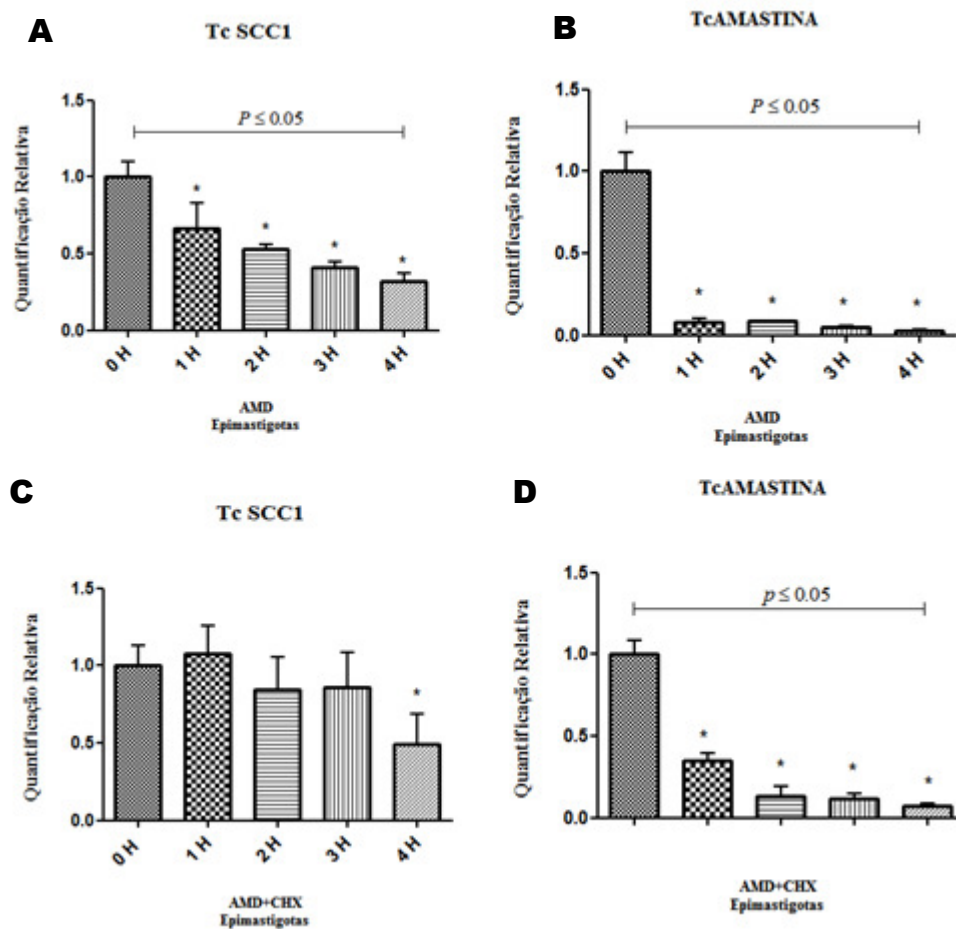


Figura 31. Quantificação relativa por RT-PCR em tempo real dos níveis do mRNA da TcSCC1 nas formas epimastigotas, após tratamento com actinomicina D e com actinomicina D e cicloheximida. O rRNA *24aS* foi empregado como endógeno para normalização. Os gráficos A e B mostram respectivamente, os níveis dos mRNA da TcSCC1 e da TcAMASTINA ao longo do tratamento com AMD. Os gráficos C e D mostram os níveis dos mRNA da TcSCC1 e TcAMASTINA tratados com AMD e CHX. Um experimento representativo de três é mostrado, as barras representam o erro padrão da média da triplicata, os asteriscos (*) representam análise estatística com $p < 0.05$. AMD: Actinomicina D, CHX: Cicloheximida.

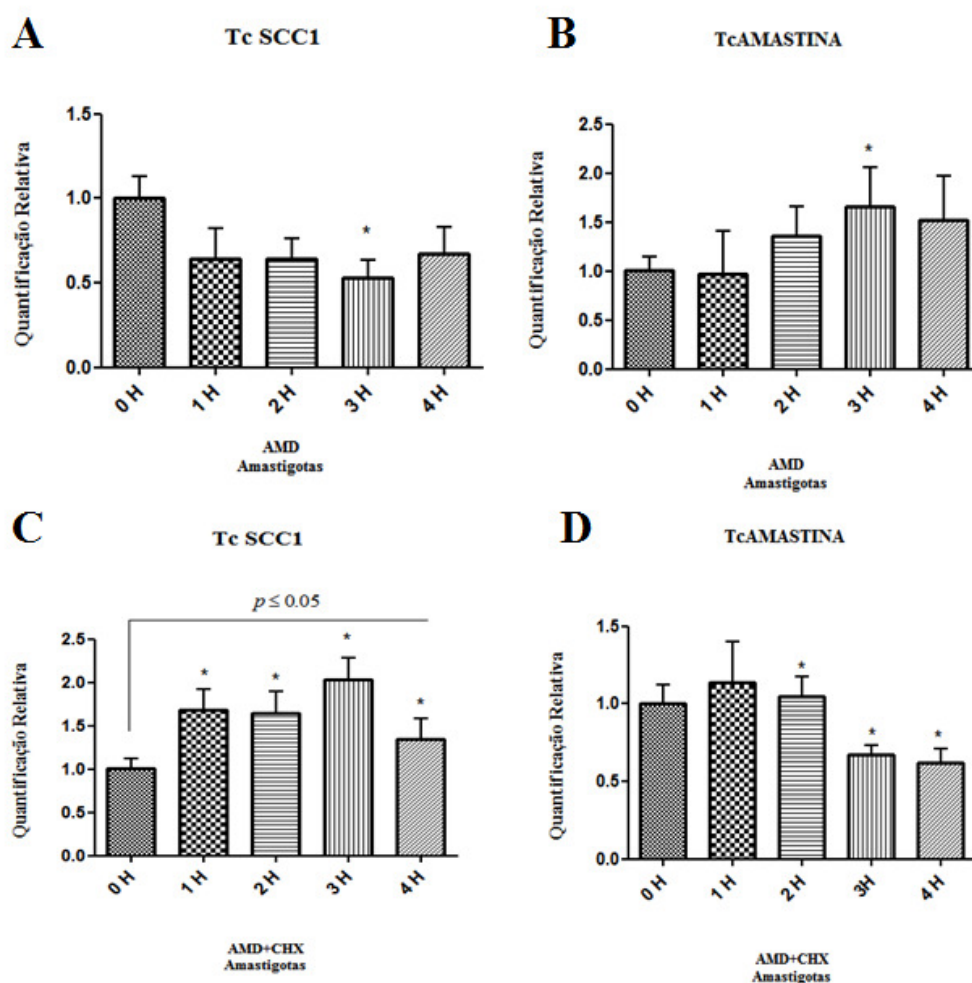


Figura 32. Quantificação relativa por RT-PCR em tempo real dos níveis do mRNA da TcSCC1 nas formas amastigotas, após tratamento com actinomicina D e com actinomicina D e cicloheximida. O rRNA *24aS* foi empregado como endógeno para normalização. Os gráficos A e B mostram respectivamente, os níveis dos mRNA da TcSCC1 e da TcAMASTINA ao longo do tratamento com AMD. Os gráficos C e D mostram os níveis dos mRNA da TcSCC1 e TcAMASTINA tratados com AMD e CHX. Um experimento representativo de três é mostrado, as barras representam o erro padrão da média da triplicata, os asteriscos (*) representam análise estatística com $p < 0.05$. AMD: Actinomicina D, CHX: Cicloheximida.

DISCUSSÃO

Processos envolvendo o metabolismo de mRNA em *T. cruzi* tem sido foco de muitos grupos de pesquisa avaliando regulação de vários genes, como *Amastina* (TEIXEIRA et al., 1995) e HSP70 (RODRIGUES et al., 2010). Muitos autores descrevem o quanto o controle pós-transcricional é peça chave na regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos, entre eles o *T. cruzi* que é objeto de nosso trabalho (CLAYTON; SHAPIRA, 2007; JAGER et al., 2007; ÁVILA; GOLDENBERG, 2010; ARAÚJO; TEIXEIRA, 2011).

É sugerido que tripanossomatídeos por não apresentarem promotores definidos para RNA polimerase II controlam sua expressão gênica principalmente por meio de mecanismos pós-transcricionais, que são capazes de modular a estabilização, desestabilização ou localização ou montagem do ribossomo no mRNA. Grande parte deste controle é exercido por cis-elementos presentes em regiões UTR dos mRNA (RAMAMOORTHY et al., 1995; VANHAMME; PAYS, 1995).

A proteína TcSCC1, objeto de estudo desse trabalho, assim como o complexo Coesina, podem estar envolvidos na divisão celular das formas replicativas do *T. cruzi*. Pouco se sabe a respeito do complexo Coesina em tripanossomatídeos e sua importância no ciclo celular desses organismos e de suas diferentes formas. Anteriormente, Ferreira (2011) verificou a presença da proteína TcSCC1 do complexo Coesina em *Trypanosoma cruzi*, com maior evidência nas formas amastigotas desse parasito, com uma localização nuclear, em ensaios de imunocitocalização com anticorpo anti-TcSCC1. Para as formas replicativas epimastigotas, a proteína TcSCC1 se apresentou com uma localização difusa em toda a célula com uma intensidade menor que em amastigotas.

Em nosso trabalho, nós observamos uma variação na quantidade relativa do mRNA da TcSCC1 entre as formas epimastigotas, amastigotas e tripomastigotas da linhagem Y de *T. cruzi*. Entre as formas amastigotas e tripomastigotas a quantificação é similar e não houve diferença significativa em nossas análises. Entretanto nas formas epimastigotas a quantidade relativa de mRNA da TcSCC1 é aproximadamente duas vezes maior do que em amastigotas e tripomastigotas. Essa discrepância da quantidade relativa do mRNA e dos níveis proteicos da TcSCC1 entre as formas do *T. cruzi* nos

levam a crer que haja um mecanismo regulatório atuante, que modula os níveis da proteína entre as formas do parasita, através de um mecanismo relacionado aos níveis de seu mRNA.

Inicialmente não esperávamos observar níveis menores nas formas amastigotas em relação à epimastigotas, pois a proteína se mostrou mais abundante em amastigotas intracelulares. Também não esperávamos que mesmo sendo menores os níveis em amastigotas, fossem similares aos encontrados em tripomastigotas, já que esta última forma não apresentou sinal para proteína. Uma hipótese para tal comportamento é que o mRNA nas formas amastigotas é traduzido e processado mais rapidamente que em epimastigotas, por isso seus níveis seriam menores e não necessariamente o mRNA seria menos estável. Esse fato já foi mostrado por Jager et al. (2007) onde o mRNA do gene da trans-sialidase de *T. cruzi* era mais rapidamente processado na fase do parasita onde a proteína é traduzida.

Em tripomastigotas nossos dados mostraram uma quantificação nos níveis de mRNA da TcSCC1 similares aos encontrados em amastigotas, muito embora a proteína TcSCC1 não foi detectada em trabalhos anteriores do grupo (FERREIRA, 2011). Uma hipótese seria que esse mRNA possa estar complexado a corpos-P presentes no citoplasma do parasita e que sejam recrutados para a sua tradução quando necessário, possivelmente na transição para amastigotas ou epimastigotas. Isso também pode explicar a abundância do mRNA em epimastigotas ser maior, embora a proteína é aparentemente menos expressa. Além disso, em epimastigotas, a proteína TcSCC1 pode exercer outras funções, que não somente o possível papel na replicação, o que explicaria o fato de seu mRNA ser mais abundante do que em amastigotas e o porquê da proteína estar distribuída de forma difusa por toda a célula. Deste modo, como tem sido sugerido por GOLDENBERG *et al.* (1985), corpos-P, ou corpos de processamento de RNA, são compostos por mRNPs não traduzidas e são locais onde um mRNA pode ser decapeado e, conseqüentemente, degradado ou armazenado para o seu retorno posterior aos polissomos (SHETH, *et al.*, 2003; BRENGUES, *et al.*, 2005).

Análise das regiões 5' e 3' UTR do mRNA da TcSCC1 mostrou alguns cis-elementos potenciais para estarem envolvidos na regulação pós-transcricional da expressão desse gene, como elementos ARE e ricos em G. Cis-elementos ARE e ricos em G localizados no 3' UTR de mucinas SMUG de *T. cruzi* controlam a estabilidade e

eficiência da tradução do mRNA (D'ORSO; FRASCH, 2001). D'Orso e Frascch (2002) mostraram que algumas proteínas identificadas, como TcUBP-1 e TcUBP-2, ligam em *cis-elementos* ARE e ricos em G presentes nas regiões 3'UTR do mRNA e modulam a estabilidade e tradução do mRNA entre as formas do *T. cruzi*.

Nos experimentos realizados para a quantificação dos níveis e estabilidade do mRNA da TcSCC1 com tratamento com AMD e com AMD e CHX, verificamos que a vida média dos mRNAs tanto da TcSCC1 quanto da TcAMASTINA é mais curta em epimastigotas do que em amastigotas e que a inibição da tradução aparentemente não afeta drasticamente esse comportamento. Entretanto, quando comparamos a estabilidade da TcSCC1 em epimastigotas comparado com o gene TcAMASTINA, verificamos que o mRNA da TcSCC1 apresenta uma meia vida mais longa que o gene da amastina quando apenas a transcrição é inibida tanto nos experimentos semiquantitativos e quantitativos por qRT-PCR. Com a inibição também da tradução, ocorre apenas uma ligeira mudança de comportamento para uma meia vida mais longa, porém não podemos afirmar que esse fenômeno realmente ocorra, sem experimentos adicionais.

PERSPECTIVAS

Como perspectivas desse trabalho, novos experimentos devem ser realizados para a elucidação desse processo regulatório envolvido na expressão do gene *TcSCC1* nas diferentes formas do parasita. Ensaio com gene repórter sob comando das regiões 5' e 3'UTR devem ser realizados para a confirmação da participação dos cis-elementos observados no processo regulatório. Além disso, mutações que modifiquem esses elementos devem ser realizadas para a confirmação da sua participação. Ensaio de interação proteína/RNA podem apontar se algum transativador está envolvido no processo e em que elemento ele se liga. Além disso, será interessante realizar imunoprecipitação dos *corpos-p* seguindo com análises de RT-PCR em tempo real para averiguarmos a hipótese desse mRNA estarem complexados a esses e armazenados no citoplasma. Análises da estabilidade do mRNA nas formas tripomastigotas também devem ser feitas e comparadas, assim como análise da expressão da proteína TcSCC1 nos ensaios de inibição da transcrição e tradução nas três formas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUIN, G.; FREITAS-JUNIOR, L.H.; COLLI, W.; ALVES, M.J.; SCHENKMAN, S. Expression of trans-sialidase and 85-kDa glycoprotein genes in *Trypanosoma cruzi* is differentially regulated at the pos-transcriptional level by labile protein factors. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n.19, p. 3041-3047, mai. 1999.

ACQUAVIVA, C.; PINES, J. The anaphase-promoting complex/cyclosome: APC/C. **J. Cell Sci.**, v. 119, p. 2401-2404, jun. 2006.

ARAÚJO, P.R.; TEIXEIRA, S.M. Regulatory elements involved in the post-transcriptional control of stage-specific gene expression in *Trypanosoma cruzi* - A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 3, p. 257-266, mai. 2011.

ARUMUGAM, P.; NISHINO, T.; HAERING, C.H.; GRUBER, S.; NASMYTH, K. Cohesin's ATPase activity is stimulated by the C-terminalWinged-Helix domain of its kleisin subunit. **Curr. Biol.**, v. 16, p. 1998-2008, 2006.

ASLUND, L.; CARLSSON, L.; HENRIKSSON, J.; RYDAKER, M.; TORO, G.C.; GALANTI, N.; PETTERSSON, U. A gene family encoding heterogeneous histone H1 proteins in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 65, n. 2, p. 317-30, jun. 1994.

ATHERTON-FESSLER, S.; PARKER, L.L.; GEAHLEN, R.L.; PIWNICA-WORMS, H. Mechanisms of p3cdc2 Regulation. **Mol. Cell. Biol.**, v. 3, n. 3, p. 1675-1685, mar. 1993.

ÁVILA, A.R.; GOLDENBERG, S. Functional genomics and insights into *Trypanosoma cruzi* gene expression regulation. **Parasitology**, v. 4, p. 148-155, 2010.

ÁVILA, A.R.; YAMADA-OGATTA, S.F.; MONTEIRO, V.D.S.; KRIEGER M.A.O.; NAKAMURA, C.V.; DE SOUZA, W.; GOLDENBERG, S. Cloning and characterization of the metacyclogenin gene, which is specifically expressed during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 117, n. 2, p. 169-177, out. 2001.

BAKHEET, T.; FREVEL, M.; WILLIAMS, B.R.; GREER, W.; KHABAR, K.S. ARED: human AU-rich element-containing mRNA database reveals an unexpectedly diverse functional repertoire of encoded proteins. **Nucleic Acids Res.**, v.29, n.1, p. 246-254, 2001.

BARTHOLOMEU, D.C.; SILVA, R.A.; GALVÃO, L.M.; EL-SAYED N.M.; DONELSON, J.E.; TEIXEIRA, S.M. *Trypanosoma cruzi*: RNA structure and post-transcriptional control of tubulin gene expression. **Exp. Parasitol.**, v.102, n. 3-4, p. 123-133, nov. 2002.

- BATISTA, J.A.N.; TEIXEIRA, S.M.R.; DONELSON, J.E.; KIRCHHOFF, L.V.; MARTINS DE SÁ, C. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* poly(A)-binding protein and its genes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 67, n. 2, p. 301-312, out. 1994.
- BENZ, C.; NILSSON, D.; ANDERSSON, B.; CLAYTON, C.; GUILBRIDE, D.L. Messenger RNA processing sites in *Trypanosoma brucei*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 143, n. 2, p. 125-134, out. 2005.
- BERBEROF, M.; VANHAMME, L.; PAYS, E. *Trypanosoma brucei*: A preferential splicing at the inverted polyadenylation site of the VSG mRNA provides further evidence for coupling between trans-splicing and polyadenylation. **Exp. Parasitol.**, v. 80, n. 3, p. 563-567, mai. 1995a.
- BERBEROF, M.; VANHAMME, L.; TEBABI, P.; PAYS, A.; JEFFERIES, D.; WELBURN, S.; PAYS, E. The 3'-terminal region of the mRNAs for VSG and procyclin can confer stage specificity to gene expression in *Trypanosoma brucei*. **EMBO J.**, v. 14, p. 2925-2934, jun. 1995.
- BERRIMAN, M. et al. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 416-22, jul. 2005.
- BESSAT, M.; ERSFELD, K. Functional characterization of cohesin SMC3 and separase and their roles in the segregation of large and minichromosomes in *Trypanosoma brucei*. **Mol. Microbiol.**, v. 71, n. 6, p. 1371-1385, 2009.
- BING, L.; OFFNER, G.D.; NUNES, D.P.; OPPENHEIM, F.; G.; TROXLER, R.F. MUC4 is a major component of salivary mucin MG1 secreted by the human submandibular gland. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 250, n. 3, p. 757-761, set. 1998.
- BISCHOFF, J.R.; ANDERSON, L.; ZHU, Y.; MOSSIE, K.; NG, L.; SOUZA, B.; SCHRYVER B.; FLANAGAN, P.; CLAIRVOYANT, F.; GINTHER, C.; CHAN, C.S.; NOVOTNY, M.; SLAMON, D.J.; PLOWMAN, G.D. A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. **EMBO J.**, v. 17, n. 11, p. 3052-3065, jun. 1998.
- BLATTNER, J.; CLAYTON, C.E. The 3'-untranslated regions from the *Trypanosoma brucei* phosphoglycerate kinase-encoding genes mediate developmental regulation. **Gene**, v. 162, n. 1, p. 153-156, ago. 1995.
- BOOTHROYD, J.C.; CROSS, G.A.M. Transcripts coding for variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* have a short, identical exon at their 5' end. **Gene**, v. 20, n. 2, p. 281-289, dez. 1982.
- BOSE, T.; GERTON, J.L. Cohesinopathies, gene expression, and chromatin organization. **J. Cell Biol.**, vol. 189, p. 201-210, 2010.
- BOUCHER, N.; WU, Y.; DUMAS, C.; DUBE, M.; SERENO, D.; BRETON, M.; PAPADOPOULOU, B. A common mechanism of stage-regulated gene expression in

Leishmania mediated by a conserved 3'-untranslated region element. **J. Biol Chem.**, v. 277, n. 22, p. 19511-19520, mai. 2002.

BRANDÃO, A. The untranslated regions of genes from *Trypanosoma cruzi*: perspectives for functional characterization of strains and isolates. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 7, p. 775-777, nov. 2006.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z. (Eds). ***Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas***. Guanabara Koogan, p. 1-41, 1979.

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

BRENGUES, M.; TEIXEIRA, D.; PARKER, R. Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. **Science**, v. 310, p. 486-488, out. 2005.

BURLEIGH, B.A.; WOOLSEY, A.M. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. **Cell Microbiol.**, v. 4, n. 11, p. 701-11, nov. 2002.

BURRI, M.; SCHLIMME, W.; BETSCHART, B.; KÄMPFER, U.; SCHALLER, J.; HECKER, H. Biochemical and functional characterization of histone H1-like proteins in procyclic *Trypanosoma brucei brucei*. **Parasitol. Res.**, v. 79, n. 8, p. 649-659, 1993.

CAMARGO, E.P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosoma in liquid media. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 6, p. 93-100, 1964.

CAMPBELL, D.A.; SUYAMA, Y.; SIMPSON, L. Genomic organisation of nuclear tRNAGly and tRNA^{Leu} genes in *Trypanosoma brucei*. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 37, n. 2, p. 257-262, dez. 1989.

CAMPBELL, D.A.; THOMAS, S.; STURM, N.R. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? **Microbes Infect.**, v. 5, n. 13, p. 1231-1240, nov. 2003.

CASSOLA, A.; DE GAUDENZI, J.G.; FRASCH, A.C. Recruitment of mRNAs to cytoplasmic ribonucleoprotein granules in trypanosomes. **Mol. Microbiol.**, v. 65, n. 3, p. 655-670, ago. 2007.

CHANG, C.R.; WU, C.S.; HOM, Y.; GARTENBERG, M.R. Targeting of cohesin by transcriptionally silent chromatin. **Genes Dev.**, v. 9, p. 3031-3042, out. 2005.

CHEN, C.Y.; SHYU, A.B. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. **Trends Biochem. Sci.**, v. 20, n. 11, p. 465-470, nov. 1995.

CHUNG, S.H.; GILLESPIE, R.D.; SWINDLE, J. Analyzing expression of the calmodulin and ubiquitin-fusion genes of *Trypanosoma cruzi* using simultaneous, independent dual gene replacements. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 63, n. 1, p. 95-107, jan. 1994.

- CIOSK, R.; SHIRAYAMA, M.; SHEVCHENKO, A.; TANAKA, T.; TOTH, A.; SHEVCHENKO, NASMYTH, K. Cohesin's Binding to Chromosomes Depends on a Separate Complex Consisting of Scc2 and Scc4 Proteins. **Mol. Cell**, v. 5, p. 243–254, fev. 2000.
- CLAYTON, C.; SHAPIRA, M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 156, n. 2, p. 93-101, dez. 2007.
- CLAYTON, C.E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. **EMBO J.**, v. 21, p. 1.881-1.888, abr. 2002.
- CLAYTON, C.E.; FUERI, J.P.; ITZHAKI, J.E.; BELLOFATTO, V.; SHERMAN, D.R.; WISDOM, G.S.; VIJAYASARATHY, S.; MOWATT, M.R. Transcription of the procyclic acidic repetitive protein genes of *Trypanosoma brucei*. **Mol. Cell Biol.**, v. 10, n. 6, p. 3036-3047, jun. 1990.
- CORDINGLEY, J.S. Nucleotide sequence of the 5S ribosomal RNA gene repeat of *Trypanosoma brucei*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 17, n. 3, p. 321–330, dez. 1985.
- 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. **J. Biol. Chem.**, v. 251, n. 16, p. 12.051-12.060, abr. 2000.
- COURA, J.R. Tripanosomose, doença de Chagas. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 55, n. 1, jan./mar. 2003.
- CRIBB, P.; SERRA, E. One- and two-hybrid analysis of the interactions between components of the *Trypanosoma cruzi* spliced leader RNA gene promoter binding complex. **Int. J. Parasitol.**, v. 39, n. 5, p. 525-32, abr. 2009.
- D'ORSO, I.; FRASCH, A.C. Functionally different AU- and G-rich cis-elements confer developmentally regulated mRNA stability in *Trypanosoma cruzi* by interaction with specific RNA-binding proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 19, p. 15783–15793, mai. 2001.
- D'ORSO, I.; FRASCH, A.C. TcUBP-1, an mRNA destabilizing factor from trypanosomes, homodimerizes and interacts with novel au-rich element-and poly(a)-binding proteins forming a ribonucleoprotein complex. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 52, p. 50520–50528, dez. 2002.
- DA CUNHA, J.P.; NAKAYASU, E.S.; DE ALMEIDA, I.C.; SCHENKMAN, S. *Trypanosoma cruzi* histone H1 is phosphorylated in a typical cyclin dependent kinase site accordingly to the cell cycle. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 140, n. 1, p. 75-86, mar. 2005.

DA CUNHA, J.P.C.; NAKAYASU, E.S.; De ALMEIDA, I. C.; SCHENKMAN S. Post-translational modifications of *Trypanosoma cruzi* histone H4. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 150, n. 2, p. 268–277, 2006.

DALLAGIOVANNA, B.; PLAZANET-MENUT, C.; OGATTA, S.F.; ÁVILA A.R.; KRIEGER, M.A.; GOLDENBERG, S. *Trypanosoma cruzi*: A gene family encoding chitin-binding-like proteins is posttranscriptionally regulated during metacyclogenesis. **Exp. Parasitol.**, v. 99, n. 1, p. 7–16, set. 2001.

DARNELL, J.E. Variety in the level of gene control in eukaryotic cells. **Nature**, v. 297, p. 365-371, jun. 1982.

DE GAUDENZI, J.; FRASCH, A.C.; CLAYTON, C. RNA-binding domain proteins in kinetoplastids: a comparative analysis. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 12, p. 2106-2114, dez. 2005.

DE LANGE, T.; BERKVEN, T.M.; VEERMAN, H.J.; FRASCH, A.C.; BARRY, J.D.; BORST, P. Comparison of the genes coding for the common 5' terminal sequence of messenger RNAs in three trypanosome species. **Nucleic Acids. Res.**, v. 12, n. 11, 1984.

DE MELO, L.D.; EISELE, N.; NEPOMUCENO-SILVA J.L.; LOPES, U.G. TcRho1, the *Trypanosoma cruzi* Rho homologue, regulates cell-adhesion properties: evidence for a conserved function. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 345, n. 2, p. 617-22, Jun. 2006.

DE SOUZA W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Curr. Pharm. Des.**, v. 8, n. 4, p. 269-85, 2002.

DEGRAVE, WIM et al. Parasite Genome Projects and the *Trypanosoma cruzi* Genome Initiative. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 6, nov. 1997.

DI NOIA, J. M.; D'ORSO, I.; ASLUNDI, L.; SÁNCHEZ, D. O.; FRASCH, A.C.C. The *Trypanosoma cruzi* mucin family is transcribed from hundreds of genes having hypervariable regions. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 18, p. 10843–10850, mai. 1998.

DI NOIA, J.M.; D'ORSO, I.; SÁNCHEZ, D.O.; FRASCH, A.C. AU-rich elements in the 3'-untranslated region of a new mucin-type gene family of *Trypanosoma cruzi* confers mRNA instability and modulates translation efficiency. **J. Biol. Chem.**, v. 75, n. 14, p. 10218-27, abr. 2000.

DIETRICH, P.; SOARES, M.B., AFFONSO, M.H.T.; FLOETER-WINTE, L.M. The *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA-encoding gene: analysis of promoter and upstream intergenic spacer sequences. **Gene**, v. 125, n. 1, p. 103-7, mar. 1993.

DJIKENG, A.; FERREIRA, L.; D'ANGELO, M.; DOLEZAL, P.; LAMB, T.; MURTA, S.; TRIGGS, V.; ULBERT, S.; VILLARINO, A.; RENZI, S.; ULLU, E; TSCHUDI, C. Characterization of a candidate *Trypanosoma brucei* U1 small nuclear RNA gene. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 133, n. 1, p. 109-115, 2001.

DPDx. American Tripanosomiasis. Disponível em: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/trypanosomiasisamerican.htm>. Acesso em: 05 dez 2011.

DRAGON, E.; SIAS, S.R.; KATO, E.A.; GABE, J.D. The genome of *Trypanosoma cruzi* contains a constitutively expressed, tandemly arranged multicopy gene homologous to a major heat shock protein. **Mol. Cell. Biol.**, v. 7, p. 1271-1275, 1987.

DRAPKIN, R.; LE ROY, G.; CHO, H.; AKOULITCHEV, S.; REINBERG, D. Human cyclin-dependent kinase-activating kinase exists in three distinct complexes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 6488-6493, Jun. 1996.

ELIAS, M.C.Q. B.; FARIA, M.; MORTARA, R. A.; MOTTA, M. C. M.; DE SOUZA, W.; THIRY, M.; SCHENKMAN, S. Chromosome Localization Changes in the *Trypanosoma cruzi* Nucleus. **Eukaryotic Cell**, v. 1, n. 6, p. 944-953, dez. 2002.

ELIAS, M.C.Q.B.; MARQUES-PORTO, R.; FREYMULLER, E.; SCHENKMAN, S. Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 112, n.1, p. 79-90, jan. 2001.

EL-SAYED, N. M., et al. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. **Science**, v. 309, n. 15, p. 404-409, jul. 2005.

ESTÉVEZ, A.M.; KEMPF, T.; CLAYTON, C. The exosome of *Trypanosoma brucei*. **EMBO J.**, v. 20, p. 3831-3839, 2001.

EVERS, R.; HAMMER, A.; KOCK, J.; JESS, W.; BORST, P.; MEMET, S.; CORNELISSEN, A.W. *Trypanosoma brucei* contains two RNA polymerase II largest subunit genes with an altered C-terminal domain. **Cell**, v. 56, n. 4, p. 585-597, fev. 1989.

FERNANDES, M.; SILVA, R.; RÖSSLE, S.C.; BISCH, P.M.; RONDINELLI E.; URMÉNYI, T.P. Gene characterization and predicted protein structure of the mitochondrial chaperonin HSP10 of *Trypanosoma cruzi*. **Gene**, v. 349, p. 135-42, abr. 2005.

FERREIRA, R.C.G. **Caracterização do Complexo Coesina de *Trypanosoma cruzi***. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Distrito Federal, 109 f. 2011.

FIOCRUZ. 2011. Disponível em:

<<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=13>> Acesso em: novembro, 2011.

FORSBURG, S.L.; NURSE, P. Cell cycle regulation in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. **Annu. Rev. Cell. Biol.**, v. 7, p. 227-256, 1991.

FRAGOSO, S.P.; PLAZANET-MENUT, C.; CARREIRA, M.A.; MOTTA, M.C.; DALLAGIOVANA, B.; KRIEGER, M.A.; GOLDENBERG, S. Cloning and characterization of a gene encoding a putative protein associated with U3 small nucleolar ribonucleoprotein in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 126, n. 1, p. 113- 117, jan. 2003.

FURGER, A.; SCHÜRCH, N.; KURATH, U.; RODITIE, I. Elements in the 3' untranslated region of procyclin mrna regulate expression in insect forms of *Trypanosoma brucei* by modulating RNA stability and translation. **Mol. Cell. Biol.**, v. 17, n. 8, p. 4372–4380, ago. 1997.

GIBSON, W.C.; MILES, M.A. The karyotype and ploidy of *Trypanosoma cruzi*. **EMBO J.** v. 5 n. 6, p. 1299 - 1305, jun. 1986.

GILINGER, G.; BELLOFATTO, V. Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. **Nucl. Acids Res.**, v. 29, n. 7, p. 1556-1564, nov. 2001.

GLOVER, D.M.; HAGAN, I.M.; TAVARES, Á.A.M. Polo-like kinases: a team that plays throughout mitosis. **Genes & Dev.**, v. 12, p. 3777-3787, 1998.

GLUENZ, E.; SHARMA, R.; CARRINGTON, M.; GULL, K. Functional characterization of cohesin subunit SCC1 in *Trypanosoma brucei* and dissection of mutant phenotypes in two life cycle stages. **Mol. Microbiol.**, v. 69, n. 3, p. 666–680, ago. 2008.

GOLDENBERG, S.; SALLES, J.M.; CONTRERAS, V.T.; LIMA-FRANCO, M.P.A.; KATZIN, A.M.; COLLI, W.; MOREL, C. Characterization of messenger RNA from epimastigotes and metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **FEBS Lett.** v. 180, n. 2, p. 265–270, jan. 1985.

GONZÁLEZ, A.; LERNER, T. J.; HUECAS, M.; SOSA-PINEDA, B.; NOGUEIRA, N.; LIZARDI, P.M. Apparent generation of a segmented mRNA from two separate tandem gene families in *Trypanosoma cruzi*. **Nucl. Acids Res.** v.13, n.16, Jul.1985.

GRUBER, S.; HAERING, C.H.; NASMYTH, K. Chromosomal Cohesin Forms a Ring. **Cell**, v. 112, n. 6, p. 765-777, mar. 2003.

GUILBRIDE, D.L.; ENGLUND, P.T. The replication mechanism of kinetoplast DNA networks in several trypanosomatid species. **J. Cell Sci.**, v. 111, n. 6, p. 675-679, 1998.

GÜNZZL, A., ULLU, E.; DÖRNER, M.; FRAGOSO, S.P.; HOFFMANN, K.F.; MILNER, J. D.; MORITA, Y.; NGUU, E. K.; VANACOVA, S.; WÜNSCH, S.; DARE, A.O.; KWON, H.; TSCHUDI, C. Transcription of the *Trypanosoma brucei* spliced

leader RNA gene is dependent only on the presence of upstream regulatory elements. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 85, p. 67-76, 1997.

GÜNZL, A.; BRUDERER, T.; LAUFER, G.; SCHIMANSKI, B.; TU, L.C.; CHUNG, H.M.; LEE, P.T.; LEE, M.G. RNA polymerase I transcribes procyclin genes and variant surface glycoprotein gene expression sites in *Trypanosoma brucei*. **Eukaryotic Cell**, v. 2, n. 3, p. 542-551, jun. 2003.

HAERING, C.H.; LOWE, J.; HOCHWAGEN, A.; NASMYTH, K. Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. **Mol. Cell**, v. 9, n. 4, p. 773-788, abr. 2002.

HAILE, S.; PAPADOPOULOU, B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. **Curr. Opinion in Microbiol.**, v. 10, n. 6, p. 569-577, dez. 2007.

HARTMANN, C.; HOTZ, H.R.; MCANDREW, M.; CLAYTON, C. Effect of multiple downstream splice sites on polyadenylation in *Trypanosoma brucei*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 193, n. 1, p. 149-152, mai 1998.

HARTWELL, L.H.; WEINERT, T.A. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. **Science**, v. 246, n. 4930, p. 629-634, nov. 1989.

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

HEHL, A.; VASSELLA, E.; BRAUN, R.; RODITI, I. A conserved stem-loop structure in the 3' untranslated region of procyclin mRNAs regulates expression in *Trypanosoma brucei*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, n. 1, p. 370-374, jan. 1994.

HENRIKSSON, J.; ASLUND L.; PETTERSSON, U. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Today**, v. 12, n. 3, p. 108-114, mar. 1996.

HIGGINS, C.F. ABC transporters: from microorganisms to man. **Annu. Rev. Cell Biol.**, v. 8, p. 67-113, 1992.

HIRANO, T. Chromosome cohesion, condensation, and separation. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 69, p. 115-44, 2000.

HIRANO, T. The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair. **Genes & Dev.** v. 16, p. 399-414, 2002.

HOARE, C.A.; WALLACE, F.G.; Developmental stages of trypanosomatid flagellate: a new terminology. **Nature**, v. 244, p. 69-70, 1966.

HOEK, M.; ZANDERS, T.; CROSS, G.A.M. *Trypanosoma brucei* expression-site-associated-gene-8 protein interacts with a Pumilio family protein. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 120, n. 2, p. 269-283, Apr. 2002.

- HORN, D. Codon usage suggests that translational selection has a major impact on protein expression in trypanosomatids. **BMC Genomics**, v. 9, n. 2, p. 1-11, jan. 2008.
- INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, v. 96, n. 1. p. 23-28, nov. 1990.
- IVENS, A.C. The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania major*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 436-442, jul. 2005.
- JAGER, A.V.; DE GAUDENZI, J.G.; CASSOLA, A.; D'ORSO, I.; FRASCH, A.C. mRNA maturation by two-step trans-splicing/polyadenylation processing in trypanosomes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 104, n. 7, p. 2035–2042, fev. 2007.
- JESS, W.; HAMMER, A.; CORNELISSEN, A.W. Complete sequence of the gene encoding the largest subunit of RNA polymerase I of *Trypanosoma brucei*. **FEBS Letters**, v. 249, n. 1, p. 123-128, mai, 1989.
- KIMURA, K.; CUVIER, O.; HIRANO, T. Chromosome Condensation by a Human Condensin Complex in *Xenopus* Egg Extracts. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 8, p. 5417-5420, fev. 2001.
- KOCK, J.; EVERS, R.; CORNELISSEN, A.W. Structure and sequence of the gene for the largest subunit of trypanosomal RNA polymerase III. **Nucl. Acids Res.**, v. 16, n. 18, p. 8753-8772, ago. 1988.
- KROPF, S.P. Carlos Chagas e os debates e controvérsias sobre a doença do Brasil (1909-1923). **Hist. Cienc. Saúde – Manguinhos**, Rio de Janeiro, v. 16, supl. 1, p. 205-227, jul. 2009.
- KRYLOV, D.M.; NASMYTH, K.; KOONIN, E.V. Evolution of eukaryotic cell cycle regulation: stepwise addition of regulatory kinases and late advent of the CDKs. **Curr. Biol.**, v. 13, n. 2 p. 173–177, jan. 2003.
- KULKARNI, M.; OZGUR, S.; STOECKLIN, G. On track with P-bodies. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 38, n. 1, p. 242-51, fev. 2010.
- LAIRD, P.W. Trans *splicing* in trypanosomes-archaism or adaptation? **Trends in Genet.** v. 5, n. 7, p. 204-208, jul. 1989.
- LANA, M.; TAFURI, W.L. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. In: NEVES, D.P., org **Parasitologia Humana**. 10^a ed. São Paulo: Ed. Atheneu, p. 73-96, 2000.
- LANDFEAR, S.M. Trypanosomatid transcription factors: waiting for Godot. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 100, n. 1, p. 7-9, jan. 2003.
- LARA-PEZZI, E.; PEZZI, N.; PRIETO, I.; BARTHELEMY, I.; CARREIRO C.; MARTÍNEZ, A.; MALDONADO-RODRÍGUEZ, A.; LÓPEZ-CABRERA M, BARBERO, J.L. Evidence of a transcriptional co-activator function of cohesin STAG/SA/Sc3. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 8, p. 6553-9, fev. 2004.

LEVINE, N.D.; CORLISS, J.O.; COX, F.E.; DEROUX, G.; GRAIN, J. HONIGBERG, B.M.; LEEDALE, G.F.; LOEBLICH, A.R.; 3RD, LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E.G.; PAGE, F.C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F.G. A newly revised classification of the protozoa. **J. Protozool.**, v. 27, n. 1, p. 37-58, fev. 1980.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. **Methods**, v. 25. n. 4, p. 402-408, dez. 2001.

LODISH, H.; BERK A.; ZIPURSKY, L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. **Molecular Cell Biology**. 4a ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2000.

LÓPEZ-ESTRAÑO, C.; TSCHUDI, C.; ULLU, E. Exonic Sequences in the 5' Untranslated Region of α -Tubulin mRNA Modulate *trans* splicing in *Trypanosoma brucei*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 18, n. 8, p. 4620-4628, ago. 1998.

LUCENA, D.K.C. **Complexo Coesina de Tripanossomatídeos**. 2004. 102 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2004.

MAIR, G.; SHI, H.; LI, H.; DJIKENG, A.; AVILES, H.O.; BISHOP, J.R.; FALCONE, F.H.; GAVRILESCU, C.; MONTGOMERY, J.L.; SANTORI, M.I.; STERN, L.S.; WANG, Z.; ULLU, E.; TSCHUDI, C. A new twist in trypanosome RNA metabolism: *cis-splicing* of pre-mRNA. **RNA**, v. 6, n. 2, 163-169, 2000.

MARAÑÓN, C.; THOMAS, M.C.; PUERTA, C.; ALONSO, C.; LOPEZ, M.C. The stability and maturation of the H2A histone mRNAs from *Trypanosoma cruzi* are implicated in their post-transcriptional regulation. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1490, n. 1-2, p. 1-10, jan. 2000.

MÁRTINEZ-CALVILLO, S.; VIZUET-DE-RUEDA, J.C.; FLORENCIO-MÁRTINEZ, L.E.; MANNING-CELA, R.G.; FIGUEROA-ÂNGULO, E. . Gene expression in trypanosomatid parasites. **J. Biomed. Biotechnol.**, v. 2010, p. 525241, fev. 2010.

MASLOV, D. A.; SIMPSON, L. Evolution of parasitism in kinetoplastid protozoa **Parasitology Today**, v. 11, n. 1, p. 30-32, jan. 1995.

MATTHEWS, K.R.; TSCHUDI, C.; ULLU, E. A common pyrimidine-rich motif governs *trans-splicing* and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. **Genes Dev.**, v. 8, n. 4, p. 491-501, 1994.

MCCARTHY-BURKE, C.; TAYLOR, Z.A.; BUCK, G.A. Characterization of the spliced leader genes and transcripts in *Trypanosoma cruzi*. **Gene**, v. 82, n. 1, p. 177-189, out. 1989.

MCDONAGH, P.D.; MYLER, P.J.; STUART K. The unusual gene organization of *Leishmania major* chromosome 1 may reflect novel transcription processes. **Nucl. Acids Res.**, v. 28, n. 14, p. 2800- 2803, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doença de Chagas. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1530> Acesso em dez. 2011.

MINNING, T. A.; WEATHERLY, D. B.; ATWOOD, J.; ORLANDO, R.; TARLETON, R.L. The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. **BMC Genomics.**, v. 10, p. 370, ago. 2009.

MITCHISON, J.M. **The Biology of the Cell Cycle**. Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.K, 1971.

MORGAN, D.O. CYCLIN-DEPENDENT KINASES: Engines, Clocks, and Microprocessors. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, v. 13, p. 261–291, 1997.

MYLER, P.J. , AUDLEMAN, L.; DEVOS, T.; HIXSON, G.; KISER, P.; LEMLEY, C.; MAGNESS, C.; RICKEL, E.; SISK, E.; SUNKIN, S.; SWARTZELL, S.; WESTLAKE, T.; BASTIEN, P.; FU, G.; IVENS, A.; STUART, K. Leishmania major Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, n. 6, p. 2902-2906, mar. 1999.

NASMYTH, K.; HAERING, C.H. The structure and function of SMC and kleisin complexes. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 74, p. 595-648, jul. 2005.

NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. **Parasitologia Humana**. 11a. ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2005.

NOGUEIRA, N.; BIANCO, C.; COHN, Z. Studies on the selective lysis and purification of *Trypanosoma cruzi*. **J. Experimental Med.**, v. 142, n. 1, p.224-229, jul. 1975.

NONAKA, N.; KITAJIMA, T.; YOKOBAYASHI, S.; XIAO, G.; YAMAMOTO, M.; GREWAL, S. I.; WATANABE, Y. Recruitment of cohesin to heterochromatic regions by Swi6/HP1 in fission yeast. **Nat. Cell Biol.**, v. 4, n. 1, p. 89–93, jan. 2002.

NORRIS, K.A.; BRADT, B.; COOPER, N.R.; SO, M. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor. **J. Immunol.**, v. 147, n .7, p. 2240-7, out. 1991.

NOZAKI, T.; CROSS, G.A. Effects of 3' untranslated and intergenic regions on gene expression in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 75, n. 1, p. 55-67, dez. 1995.

- NUNES, L.R.; CARVALHO, M.R.; SHAKARIAN, A.M.; BUCK, G.A. The transcription promoter of the spliced leader gene from *Trypanosoma cruzi*. **Gene**, v. 188, n. 2, p. 157-168, abr. 1997.
- OVERATH, P.; HAAG, J.; LISCHKE, A.; O'HUIGIN, C. The surface structure of trypanosomes in relation to their molecular phylogeny. **Int. J. Parasitol.**, v. 31, n. 5-6, p. 468-71, mai. 2001.
- PALFI, Z.; LANE, W.S.; BINDEREIF, A. Biochemical and functional characterization of the cis-spliceosomal U1 small nuclear RNP from *Trypanosoma brucei*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 121, n. 2, p. 233-243, mai. 2002.
- PALFI, Z.; SCHIMANSKI, B.; GUNZL, A.; LUCKE, S.; BINDEREIF, A. U1 small nuclear RNP from *Trypanosoma brucei*: a minimal U1 snRNA with unusual protein components. **Nucleic Acids Res.**, v. 33, n. 8, p. 2493-2503, 2005.
- PETERS, J.-M. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. **Nature**, v. 7, p. 644-656, set. 2006.
- PUERTA, C.; MARTÍN, J.; ALONSO, C.; LÓPEZ, M.C. Isolation and characterization of the gene encoding histone H2A from *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 64, n. 1, p. 1-10, mar. 1994.
- PULIDO, M.; MARTÍNEZ-CALVILLO, S.; HERNÁNDEZ, R. *Trypanosoma cruzi* rRNA genes: a repeated element from the non-transcribed spacer is locus specific. **Acta Tropica**, v. 62, n. 3, p. 163-170, dez. 1996.
- RAMAMOORTHY, R.; SWIHART, K.G.; MCCOY, J.J.; WILSON, M.E.; DONELSON, J.E. Intergenic regions between tandem gp63 genes influence the differential expression of gp63 RNAs in *Leishmania chagasi* promastigotes. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 20, p. 12133-9, mai. 1995.
- REQUENA, J.M.; LÓPEZ, M.C.; ALONSO, C. Genomic repetitive DNA elements of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Today**, v. 12, n. 7, p. 279-283, jul. 1996.
- RESPUELA, P.; FERELLA, M.; RADA-IGLESIAS, A.; ASLUND, L. Histone acetylation and methylation at sites initiating divergent polycistronic transcription in *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 23, p. 15884-15892, jun. 2008.
- REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- RODRIGUES, D.C.; SILVA, R.; RONDINELLI, E.; URMÉNYI, T.P. *Trypanosoma cruzi*: modulation of HSP70 mRNA stability by untranslated regions during heat shock. **Exp. Parasitol.**, v. 126, n. 2, p. 245-53, out. 2010.
- RUDENKO, G.; CHUNG, H. M.; PHAM, V. P.; VAN DER PLOEG, L. H. RNA polymerase I can mediate expression of CAT and neo protein-coding genes in *Trypanosoma brucei*. **EMBO J.**, v. 10, n. 11, p. 3387-3397, nov.1991.

- SADHU, K.; REED, S.I.; RICHARDSON, H.; RUSSELL, P. Human homolog of fission yeast *cdc25* mitotic inducer is predominantly expressed in G2. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 87, n. 13, p. 5139-43, jul. 1990.
- SANTOS, M.R.M., et al. The *Trypanosoma cruzi* Genome Project: Nuclear Karyotype and Gene Mapping of Clone CL Brener. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 6, p. 821-828, nov./dez. 1997.
- SCHAFFER, K.A. The cell cycle: a review. **Vet. Pathol.**, v. 35, n. 6. p. 461-478, nov. 1998.
- SCHLEIFFER A, KAITNA S, MAURER-STROH S, GLOTZER M, NASMYTH K, EISENHABER F. Kleisins: A Superfamily of Bacterial and Eukaryotic SMC Protein Partners. **Mol. Cell**, v. 11, p. 571-75, mar. 2003.
- SHAPIRO, T.A.; ENGLUND, P. T. The Structure and Replication of kinetoplast DNA. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 49, p. 117-43, 1995.
- SHETH, U.; PARKER, R. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. **Science**, v. 300, p. 805-808, mai. 2003.
- SILVA, L.H.O.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para camundongo branco. **Folia Clin. Biol.**, v. 20, p. 191-207, 1992.
- SIMPSON, L. The mitochondrial genome of Kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication and evolution. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 41, p. 363-382, out. 1987.
- SOBELL, H. Actinomycin and DNA transcription. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, n. 16, p. 5328-31, 1985.
- SPADILIERO, B.; NICOLINI, C.; MASCETTI, G.; HENRIQUEZ, D. VERGANI, L. Chromatin of *Trypanosoma cruzi*: In situ analysis revealed its unusual structure and nuclear organization. **J Cell Biochem**, v. 85, p. 798-808, 2002a.
- SPADILIERO, B.; SANCHEZ, F.; SLEZYNGER, T.C. AND HENRIQUEZ, D.A. Differences in the nuclear chromatin among various stages of the life cycle of *Trypanosoma cruzi*. **J. Cell Biochem.**, v. 84, p. 832-839, 2002b.
- STEVENS, J.R.; GIBSON, W. The molecular evolution of trypanosomes. **Parasitology Today**, v. 15, n. 11, p. 432-437, nov. 1999.
- STUART, K., ALLEN, T.E., HEIDMANN, S., SEIWERT, S.D. RNA editing in kinetoplastid protozoa. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 61, n. 1, p. 105-120, mar. 1997.
- SUMARA, I. ; VORLAUFER, E.; GIEFFERS, C. ; PETERS, B.H.; PETERS, J.M. Characterization of vertebrate cohesin complexes and their regulation in prophase. **J Cell Biol.**, v. 151, n. 4, p. 749-62, nov. 2000.

SUN, Y.; KUCEJ, M.; FAN, H.Y.; YU, H.; SUN, Q.Y.; ZOU, H. Separase is recruited to mitotic chromosomes to dissolve sister chromatid cohesion in a DNA-dependent manner. **Cell**, v. 137, p. 123–32, 2009.

SUTTON, R.E.; BOOTHROYD, J.C. Evidence for trans *splicing* in trypanosomes. **Cell**, v. 47, n. 4, p. 527-535, nov. 1986.

SWIERZYNSKI, T.A.; BUCK, G.A. RNA-protein complexes mediate *in vitro* capping of the spliced-leader primary transcript and U-RNAs in *Trypanosoma cruzi*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 5626-5630, jul. 1991.

SWINDLE, J.; AJIOKA, J.; EISEN, H.; SANWAL, B.; JACQUEMOT, C.; BROWDER, Z.; BUCK, G. The genomic organization and transcription of the ubiquitin genes of *Trypanosoma cruzi*. **EMBO J.**, v. 7, n. 4, p. 1121-7, abr. 1988.

TEIXEIRA, S.M.R. Control of gene expression in Trypanosomatidae. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, n. 12, dez. 1998.

TEIXEIRA, S.M.R.; KIRCHHOFF, L.V.; DONELSON, J.E. Post-transcriptional elements regulating expression of mRNAs from the amastin/tuzin gene cluster of *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 32, p. 22.586-22.594, set. 1995.

TEIXEIRA, S.M.R.; KIRCHHOFF, L.V.; DONELSON, J.E. *Trypanosoma cruzi*: suppression of tuzin gene expression by its 5'-UTR and spliced leader addition site. **Exp. Parasitol.**, v. 93, n. 3, p. 143-151, nov. 1999.

TEIXEIRA, S.M.R.; RUSSEL, D.G.; KIRCHHOFF, L.V.; DONELSON, J.E. A differentially expressed gene family encoding "amastin," a surface protein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 32, p. 20.509-22.516, ago. 1994.

THOMAS, S, YU M.C.; STURM, N.R.; CAMPBELL, D.A. A non-universal transcription factor? The *Leishmania tarentolae* TATA box-binding protein LtTBP associates with a subset of promoters. **Int. J. Parasitol.**, v.36, n. 10-11, p. 1217-1226, set. 2006.

THOMAS, S.; WESTENBERGER, S.J.; CAMPBELL, D.A.; STURM, N.R. Intragenomic spliced leader RNA array analysis of kinetoplasts reveals unexpected transcribed region diversity in *Trypanosoma cruzi*. **Gene**, v. 6, n. 352, p. 100-108, jun. 2005.

TYLER, K.M; ENGMAN, D.M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revised. **Int. J. Parasitol.**, v. 31, p. 472-81, 2001.

TYLER-CROSS, R.E.; SHORT, S.L.; FLOETER-WINTER, L.M.; BUCK, G.A. Transient expression mediated by the *Trypanosoma cruzi* rRNA promoter. **Mol Biochem. Parasitol.**, v. 72, n. 1-2, p. 23-31, jun. 1995.

TYSON, J.J. Modeling the cell division cycle: cdc2 and cyclin interactions (maturation promoting factor/metaphase arrest/weel/cdc25). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA Cell Biology** v. 88, p. 7328-7332, ago. 1991.

UFRGS. 2011. Disponível em:

<<http://www.ufrgs.br/parasite/siteantigo/Imagensatlas/Protozoa/Trypanosomacruzi.htm>> Acesso em novembro, 2011.

UHLMANN, F. Chromosome cohesion and segregation in mitosis and meiosis. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v.13, n.6, p.754-761, dez. 2001.

ULLU, E.; TSCHUDI, C. Trans *splicing* in trypanosomes requires methylation of the 5' end of the spliced leader RNA. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 88, n. 22, p. 10.074-10.078, nov. 1991.

URMENYI, T.P. **Processamento de RNA**. Disponível em:

<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=76> Acesso em: nov. 2011.

VANHAMME, L.; PAYS, E. Control of Gene Expression in Trypanosomes. **Microbiol. Rev.**, v. 59, n. 2, p. 223-240, jun. 1995.

VASS, S.; COTTERILL, S.; VALDEOLMILLOS, A.M.; BARBERO, J.L.; LIN, E.; WARREN, W.D.; HECK, M.M.S. Depletion of Drad21/Sccl in *Drosophila* cells leads to instability of the cohesin complex and disruption of mitotic progression. **Curr. Biol.**, v. 13, n. 3, p. 208-218, fev. 2003.

VAZQUEZ, M.P.; SCHIJMAN, A.G.; LEVIN, M.J. A short interspersed repetitive element provides a new 3' acceptor site for trans-*splicing* in certain ribosomal P2 β protein genes of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 64, n. 2, p. 327-336, abr. 1994.

VERONESI, R. **Tratado de Infectologia**. 3^a ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

VICKERMAN, K.; PRESTON, T.M. Spindle microtubules in the dividing nuclei of trypanosomes. **J. Cell Sci.**, v. 6. n. 2, p. 365-383, mar. 1970.

WAGNER, W.; SO, M. Genomic Variation of *Trypanosoma cruzi*: Involvement of Multicopy Genes. **Infec. Immun.**, v. 58, n. 10, p. 3217-3224, out. 1990.

WANG, X.; DAI, W. Shugoshin, a guardian for sister chromatid segregation. **Exp. Cell Res.** v. 310, n. 1, p. 1-9, out. 2005.

WEITZER, S.; LEHANE, C.; UHLMANN, F. A model for ATP hydrolysis-dependent binding of cohesin to DNA. **Curr. Biol.**, v.13, n.22, p. 1930-4190, nov. 2003.

WHO. Disponível em:

http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_chagas_2009.png Acesso em: nov 2011.

XIONG, B.; GERTON, J.L. Regulators of the Cohesin Network. **Annu. Rev. Biochem.** v. 79, p. 131–53, mar. 2010.

YAFFE, D. Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 61, p. 447-483, 1968.

ZINGALES, B.; ABUIN, G.; ROMANHA, A.J.; CHIARI, E.; COLLI, W. Surface antigens of stocks and clones of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans. **Acta Trop.**, v. 41, n. 1, p. 5-16, mar. 1984.

ZWIERZYNSKI, T.A.; BUCK, G.A. RNA-protein complexes mediate *in vitro* capping of the spliced-leader primary transcript and U-RNAs in *Trypanosoma cruzi*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, n. 13, p. 5626-5630, jul. 1991.