

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

**Caracterização do Complexo Coesina de
*Trypanosoma cruzi***

Renata Cristina Grangeiro Ferreira

Brasília

2011

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

**Caracterização do Complexo Coesina de
*Trypanosoma cruzi***

Renata Cristina Grangeiro Ferreira

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

2011

Banca examinadora:

Profa. Dra. Beatriz Dolabela de Lima (UnB – Orientadora)

Prof. Dr. Jaime Martins Santana (UnB – Membro Titular)

Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart (UnB – Membro Titular)

Prof. Dr. Alex Leite Pereira (UnB – Membro Suplente)

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

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Dolabela de Lima

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.” Cora Coralina

“Um caminho de mil milhas começa com um passo.” Benjamin Franklin

“Uma vez que você prove o vôo, nunca mais caminhará sobre a terra sem olhar para os céus, pois você já esteve lá, e para lá sua alma deseja voltar.” Leonardo da Vinci

Dedico este trabalho:

À minha avó, Raimunda Grangeiro (*in memorian*), a pessoa mais sábia que já conheci, mesmo não sabendo ler ou escrever. Uma pessoa exemplo de alegria e de força. Saudades eternas!

Ao professor Cezar Martins de Sá (*in memorian*), que levou consigo uma característica que todo pesquisador deveria ter: o verdadeiro fascínio pela ciência.

AGRADECIMENTOS

Acredito que poucos têm a sorte que eu tenho na vida. Nasci primeira filha de duas pessoas incríveis e, depois de quase 5 anos, uma pessoa mais incrível ainda entrou para a família. Nunca me faltou nada. Estudei em bons colégios. Aprendi com minha avó que o conhecimento é a única coisa que nunca podem nos tirar. Aprendi com meus pais que devemos sempre levar conosco bondade, respeito e educação. Sempre fui cercada de carinho, alegria e apoio por toda a família e, com o passar do tempo, pelos amigos maravilhosos que fui coletando pelo caminho e que, de certa forma, nunca saíram de perto de mim, mesmo que seja em lembranças. Por tudo isso, e muito mais, eu agradeço...

À Deus por sempre guiar o meu caminho, por sempre me dar força e sabedoria nos momentos de dificuldades e por sempre me cercar de pessoas tão especiais.

Aos meus pais, Maria Grangeiro e Pedro Ferreira, por todo o apoio, por sempre confiarem nas minhas escolhas e decisões, por acreditarem nos meus sonhos e por me ensinarem a sempre querer ser uma pessoa melhor. Eu não poderia ter pais mais fantásticos que vocês, meus pais, meus heróis!

À minha irmã, Juliana Ferreira, pela amizade, pelas risadas, por passar os finais de semana no laboratório comigo e por me divertir tanto! Você é uma pessoa única!

À toda a minha família de Goiânia e Brasília, especialmente Tia Lalá, por se preocupar tanto comigo, à Tia Vilma, Cláudia, Marcinha, Jéssica e Pedro por cuidarem tão bem de mim nos anos em que moramos juntos. Espero um dia conseguir retribuir tanto carinho! À Dim Michele e à Maria Clara pelos ótimos momentos.

À minha orientadora Profa. Dra. Beatriz Dolabela de Lima que, com toda paciência do mundo, me ensinou a pipetar pela primeira vez e, de lá pra cá, me guiou durante todos esses anos. Obrigada pela oportunidade, pela confiança, pela amizade, pela paciência, pelas idéias e por me ensinar muito, muito mesmo, do que eu sei.

Ao Prof. Dr. Cezar Martins de Sá pelas idéias e conselhos, pela inteligência admirável e por levar tanto bom humor aos encontros do laboratório.

À Gabriela, Luciana e à toda família Matsunaga por me adotarem para a família, pela preocupação e amor comigo, pelos estudos de quinta-feira, por todos os ótimos momentos que sempre passamos juntas. Sem vocês teria tudo sido muito mais difícil!

À Patrícia Basílio pelas fugas do laboratório, pela paciência todas as vezes que eu roubei sua bancada e por todas as vezes que a fiz centrifugar as placas comigo, pelos empréstimos de reagentes, pelas dicas, pelos lanches e por ser tão linda assim.

À Liana Blume pelas manhãs, tardes e noites internadas na biblioteca estudando para a prova do mestrado, pelos risotos e risadas, pelo carinho e preocupação sempre.

Às minhas queridas amigas de infância: Bruna Meirelles, Carol Khayat, Juliana Romano, Camila Rodovalho, Elissa Barreto, Fernanda Lauar, Ana Paula Antunes e Sarah Issy por acreditarem e admirarem tanto o meu trabalho e por sempre me darem força pra seguir em frente! Amo vocês!

À Natália Torres pelas mil histórias que teremos para contar sobre as nossas aventuras brasilienses (só até os nossos 37 anos)! Ainda bem que te encontrei pelo caminho, Abigail!

À todos os meus amigos da Bio, especialmente Liana Ramalho, Raquel Pedroso, Fernanda de Lima, Priscila Torres, Muriele Lottermann, Valter Hirakuri, Railsson Oliveira, Thiago Nepomuceno, David Cho, Flávio Brandão, Miguel Sartori, Jadson Carvalho, Marcus Soares, Elisa Catão, Juliana Braz e Raquel Negreiros. Com todos vocês me diverti muito nessa UnB!

Ao mestre supremo da sabedoria Ricardo Camargo, pela amizade e genialidade, por toda a ajuda com tudo, principalmente com as imagens da Microscopia Confocal!

Ao Samuel Mandacaru por todas as gargalhadas de tirar o fôlego, pelos almoços e bombons.

À Fabiana Brandão por toda dedicação, preocupação, carinho e cuidado, por ser essa pessoa tão especial, por me ensinar tanto sobre a vida, por ter me mostrado o verdadeiro significado da palavra irmandade!

À toda a galera do Labiogene: Stenia, Gabi Teixeira, Larissa, Débora, Maria, Rafa, Martha, Juma e Magna pelos ótimos momentos sempre. Muito obrigada à Marinez pelo cuidado com os materiais e pelo carinho comigo, à Liliam Maçaneiro pelas conversas e conselhos, pelas inúmeras ajudas com os protocolos e por ser uma verdadeira mãezona e à Lilian por ser sempre tão querida!

Aos alunos e professores do Laboratório de Microbiologia e do Laboratório de Interação Parasito-Hospedeiro por tornarem o convívio durante todos esses anos tão agradável.

Ao Marcus Teixeira pela enorme ajuda com o sequenciamento e com a PCR em tempo real.

À Lorena Derengowski por ajudar com as análises da PCR em tempo real.

Ao Prof. Dr. Alex Leite Pereira pela enorme paciência com as análises estatísticas, por passar manhãs e tardes comigo fazendo contas. Obrigada mesmo!

Ao Prof. Dr. Osmino R. Pires Júnior pela ajuda com os coelhos.

À Ana Cristina Gomes e Rosana Falcão da EMBRAPA/CENARGEM pelo auxílio com as imagens feitas por microscopia de fluorescência.

À Ana Hilda Tiberti pela solicitude em todos os momentos que precisei.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular pela oportunidade e apoio.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	1
SIGLAS E ABREVIATURAS.....	3
RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	5
INTRODUÇÃO	6
1. <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
1.1. Doença de Chagas.....	6
1.2. Ciclo de Vida.....	7
1.3. Organização Nuclear.....	11
2. Ciclo Celular em eucariotos superiores.....	12
2.1. Mitose.....	15
3. O Complexo Coesina em leveduras.....	18
3.1. Proteínas SMC.....	20
3.2. Proteína SCC1.....	23
3.3. Proteína SCC3.....	24
3.4. Modelos de Coesão.....	24
3.5. A coesina e o ciclo celular.....	26
3.6. Outras Funções do Complexo Coesina.....	30
3.7. O Complexo Coesina em Tripanossomatídeos.....	32
OBJETIVOS	34
MATERIAL E MÉTODOS	35
1. Material.....	35
2. Métodos.....	43
RESULTADOS	61
1. Clonagem do gene para a subunidade SCC3 de <i>T. cruzi</i>	61
2. Sequenciamento do gene <i>TcSCC3</i>	65
3. Expressão heteróloga da região 5´ do gene <i>TcSCC3</i> em <i>E. coli</i>	66
4. Expressão heteróloga da região 5´ do gene <i>TcSMC1</i> em <i>E. coli</i>	67
5. Produção de anticorpos policlonais anti-TcSCC3 e anti-TcSMC1.....	68

6. Análise da presença da subunidade TcSCC1 do Complexo Coesina nas formas amastigotas, tripomastigotas e epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	70
7. Análise da presença da subunidade TcSCC1 no extrato total das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	72
8. Análise da subunidade TcSCC1 durante o ciclo celular das formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	73
a. Sincronização de células de <i>Trypanosoma cruzi</i>	73
b. Imunocitocalização da proteína TcSCC1 em células sincronizadas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	76
9. Imunocitocalização da TcSCC1 nas formas amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	78
a. Formas amastigotas de <i>T. cruzi</i>	79
b. Formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	80
c. Formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	82
d. Comparação entre os níveis da subunidade TcSCC1 do complexo coesina nas três formas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	83
10. Análise da localização da TcSCC1 durante a dinâmica nuclear na divisão celular de <i>T. cruzi</i>	83
a. Células não sincronizadas – formas amastigotas intracelulares de <i>T. cruzi</i>	83
b. Células sincronizadas – formas amastigotas intracelulares de <i>T. cruzi</i>	85
11. Análise comparativa dos níveis de mRNAs das subunidades da Coesina por RT – PCR semi-quantitativa.....	88
12. Análise da expressão gênica por RT-PCR quantitativa (qRT-PCR)..	89
DISCUSSÃO	91
CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. As formas de <i>T. cruzi</i> durante o seu ciclo de vida	8
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
Figura 3. Características morfológicas das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> durante seu ciclo celular.....	10
Figura 4. O ciclo celular.....	14
Figura 5. O processo de mitose	18
Figura 6. Estrutura do complexo Coesina	20
Figura 7. Arquitetura das proteínas SMC	21
Figura 8. A coesão das cromátides irmãs por meio do modelo do anel	25
Figura 9. Estratégia para clonagem do gene <i>TcSCC3</i>	61
Figura 10. Análise em gel de agarose da amplificação dos genes <i>TcSCC3/5'</i> e <i>TcSCC3/3'</i> utilizando DNA genômico de <i>T. cruzi</i> e iniciadores específicos.....	62
Figura 11. Análise de restrição enzimática de pGEM-T-Easy- <i>TcSCC3/5'</i> e pGEM-T-Easy- <i>TcSCC3/3'</i>	63
Figura 12. Montagem do gene completo da subunidade <i>TcSCC3</i>	64
Figura 13. Análise do gene completo <i>TcSCC3</i>	65
Figura 14. Subclonagem do gene <i>TcSCC3/5'</i> no vetor pET21a(+)	66
Figura 15. Análise da expressão da proteína <i>TcSCC3/N-terminal</i> em gel desnaturante de poliacrilamida em diferentes períodos de indução da proteína.....	67
Figura 16. Análise da expressão da proteína <i>TcSMC1/N-terminal</i> em gel desnaturante de poliacrilamida.....	68
Figura 17. <i>Western blot</i> do extrato total de <i>E. coli</i> não induzida e induzida. 69	
Figura 18. Análise da presença da proteína <i>TcSCC1</i> nas diferentes formas do <i>T. cruzi</i> em experimento de western blot utilizando o anticorpo anti- <i>TcSCC1</i>	71
Figura 19. <i>Western Blot</i> das frações do extrato total de <i>Trypanosoma cruzi</i> , utilizando o anticorpo anti- <i>SCC1</i>	72
Figura 20. Curva de crescimento de células epimastigotas de <i>T. cruzi</i> não	

tratadas e tratadas com hidroxiuréia.....	74
Figura 21. . Curva de crescimento das células epimastigotas <i>T. cruzi</i> após a remoção da hidroxiuréia.....	75
Figura 22. Imunofluorescência das formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	77
Figura 23. Imunofluorescência de células L6 infectadas com <i>Trypanosoma cruzi</i> nas formas amastigotas.....	79
Figura 24. Imunofluorescência de células de <i>Trypanosoma cruzi</i> nas formas epimastigotas.....	81
Figura 25. Imunofluorescência de células de <i>Trypanosoma cruzi</i> nas formas tripomastigotas.....	82
Figura 26. Comparação dos níveis de fluorescência para a proteína TcSCC1 nas três formas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	83
Figura 27. Padrões da proteína TcSCC1 no núcleo de células amastigotas	85
Figura 28. Padrões da proteína TcSCC1 no núcleo de células amastigotas sincronizadas	87
Figura 29. Análise comparativa dos níveis dos mRNAs dos genes <i>TcSCC1</i> , <i>TcSCC3</i> , <i>TcSMC1</i> e <i>TcSMC3</i> de <i>Trypanosoma cruzi</i>	89
Figura 30. Análise comparativa da expressão dos genes <i>TcSCC1</i> , <i>TcSCC3</i> , <i>TcSMC1</i> e <i>TcSMC3</i> de <i>Trypanosoma cruzi</i> por RT-PCR em tempo real.....	90
Figura 31. Cluster do gene <i>TcSMC3</i> e do gene <i>MASP</i> de <i>T. cruzi</i>	94
Figura 32. Modelo da dinâmica dos cromossomos durante o ciclo celular de <i>T. cruzi</i>	96

SIGLAS E ABREVIATURAS

APS – Persulfato de amônio (*Ammonium persulfate*)

DBS – Rompimento da dupla fita (*Double-strand break*)

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*)

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*)

NP-40 – Nonidet P-40

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

PMSF – Fluoreto de fenilmetanosulfonil (*Phenylmethanesulphonyl fluoride*)

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

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

SDS-PAGE – Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

SMC - Proteínas de Manutenção Estrutural dos Cromossomos (Structural Maintenance of Chromosomes Proteins),

TEMED – N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina (*N, N, N', N' – Tetramethylethylenediamine*)

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

RESUMO

A segregação das cromátides irmãs para os pólos opostos da célula durante a divisão celular é um evento complexo durante o ciclo de vida de uma célula eucariótica. Tanto na mitose quanto na meiose a coesão entre as cromátides irmãs é essencial para que ocorra a correta segregação cromossomal, evento sob a responsabilidade do complexo protéico chamado Coesina. Este complexo é melhor conhecido em leveduras e mamíferos, sendo formado por duas proteínas 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). A coesina mantém as cromátides irmãs unidas a partir da fase S do ciclo celular e essa coesão é mantida até a transição entre a metáfase e a anáfase, quando as cromátides irmãs se separam para os pólos opostos da célula. Existem poucos estudos sobre a coesina em tripanossomatídeos e o projeto genoma mostrou a presença dos genes para todas as subunidades da Coesina em *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* e a *Leishmania major*. Neste trabalho nós propusemos a análise da expressão e a imunocitocalização das subunidades do complexo Coesina em *T. cruzi*. Anticorpo contra a subunidade TcSCC1 produzido em coelho foi utilizado em ensaios de *western blot* e imunofluorescência em microscopia confocal, para as formas amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*. Tais análises indicam uma maior detecção da proteína TcSCC1 na forma amastigotas de *T. cruzi*, apresentando variações no padrão da localização nuclear. Nas formas epimastigotas um sinal fraco foi detectado e nas formas tripomastigotas não houve sinalização. Estes resultados sugerem a presença da proteína TcSCC1 do complexo coesina principalmente no núcleo das formas amastigotas de *T. cruzi*. Os níveis de expressão dos genes para as quatro subunidades da coesina foram analisados por RT-PCR em tempo real nas três formas do *T. cruzi* e verificamos poucas diferenças entre estes níveis, o que sugere um controle pós-transcricional na expressão da SCC1 em *T. cruzi*.

ABSTRACT

The segregation of sister chromatids to opposite poles of the cell during division is the most complex and, at the same time, the most important event during the life cycle of a eukaryotic cell. Both in mitosis and meiosis cohesion between sister chromatids is essential for the occurrence of the correct chromosomal segregation. The protein complex responsible for cohesion between chromatids is called Cohesin. The Cohesin complex is well known in yeast and mammals, consisting of two SMC (structural maintenance of chromosomes) proteins, SMC1 and SMC3, and two proteins SCC (sister chromatid cohesion) proteins, the SCC1 and SCC3 (SA1 and SA2 in mammalian cells). The Cohesin keeps sister chromatids together from S phase until the transition between metaphase and anaphase in cell cycle, when sister chromatids separate to the opposite poles of the cell. In trypanosomatids, there are few studies about this complex and the genome project revealed the presence of all Cohesin complex genes in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* and *Leishmania major*. In this work we proposed the analysis of the expression of the Cohesin subunits and its immunocytolocalization in *T. cruzi* cells. An antibody anti-TcSCC1 produced in rabbit, was used in western blots and immunofluorescence confocal microscopy analyses of amastigote, epimastigote and trypomastigote forms of *T. cruzi*. These analyses indicate that the TcSCC1 protein is detected mainly in the amastigote forms with distinct pattern of nucleus localization. Epimastigote form presented a weak signal for the anti-SCC1 antibody and trypomastigote form presented no signal. These results suggest that the SCC1 subunit of the Cohesin complex is present in *T. cruzi* and it is mainly evident in the nucleus of amastigote form of this parasite. The expression levels of each subunit of the Cohesin complex were analyzed by real time RT-PCR assays in the three forms of *T. cruzi* and it was found few differences between these levels, suggesting a post-transcriptional control in the SCC1 expression in *T. cruzi*.

INTRODUÇÃO

1. *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário hemoflagelado digenético pertencente à família Trypanosomatidae e ordem Kinetoplastida. Este parasito foi descrito no início do século XX pelo cientista Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (CHAGAS, 1909). A contaminação de humanos por este protozoário pode resultar na doença de Chagas, que acomete aproximadamente 13 milhões de pessoas nas Américas (WHO, 2005). Sua transmissão ocorre por meio das fezes de insetos vetores hematófagos contaminados, da ordem Hemiptera, família *Reduviidae*, conhecidos popularmente como barbeiros.

O gênero *Trypanosoma* pode ser dividido em dois grupos, conforme o seu desenvolvimento no inseto hospedeiro: o grupo Salivaria e o grupo Stercoraria. Na primeira situam-se os tripanossomas africanos, cujo desenvolvimento ocorre no tubo digestivo do hospedeiro vetor e migram para as glândulas salivares, sendo então transmitidos por meio da inoculação, como por exemplo, o *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma rangeli*. O *Trypanosoma cruzi*, por sua vez, pertencente à seção Stercoraria, se desenvolve no tubo digestivo do hospedeiro vetor, é liberado pela excreção intestinal e transmitido ao hospedeiro vertebrado pela ferida da picada, abrasões da pele ou através de membranas mucosas (CLAYTON, 1988).

1.1. Doença de Chagas

A distribuição geográfica da doença de Chagas ocorre em todas as áreas aonde existem insetos triatomíneos, do México ao sul da Argentina (COURA, 2003), onde ocorrem aproximadamente 21.000 mortes por ano em consequência dessa enfermidade (URBINA; DOCAMPO, 2003). Entre as mais de 112 espécies de insetos vetores da doença presentes no continente americano, 12 espécies têm recebido uma maior atenção devido à sua capacidade de invadirem e procriarem dentro das casas, possibilitando a infecção humana. Dentre elas, o *Triatoma infestans* ao sul e o *Rhodnius prolixus* em parte da América Central têm se mostrado os principais vetores da doença (SILVEIRA, 2000)

Além do contato com as fezes de triatomíneos infectados pelo *T. cruzi*, a doença de Chagas pode também ser transmitida ao homem por meio de mecanismos alternativos, como a transmissão transfusional, a congênita, a acidental (contaminação em laboratório), por transplante de órgãos e por via oral, através da ingestão de alimentos contaminados (DIAS, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; STEINDEL et al., 2005; HERWALDT, 2001).

A partir de 1991, os países mais afetados com a disseminação da doença de Chagas (Brasil, Argentina, Bolívia, Chile, Paraguai e Uruguai) intensificaram suas medidas para controlar a transmissão da doença realizando o combate ao vetor e a ampla triagem nos bancos de sangue. Apesar da redução da transmissão, o Brasil ainda é considerado endêmico para a doença de Chagas, existindo cerca de 3 milhões de chagásicos (DIAS et al., 2002).

A doença de Chagas vem sendo alvo de grandes estudos nos principais centros de pesquisas latino-americanos, visando o aperfeiçoamento de tecnologias e medicamentos no combate à doença. Atualmente apenas dois medicamentos estão disponíveis para o seu tratamento: benzonidazol e nifurtimox. Contudo, nenhum dos compostos se mostra ideal devido a diversos fatores, entre eles a falta de atividade durante a fase crônica da doença, por apresentarem vários efeitos colaterais, por requererem a administração por longos períodos de tempo sob supervisão médica e por apresentarem uma grande variação na susceptibilidade de isolados do parasito a ação destas drogas e estarem disponíveis somente sob um alto custo (STEINDEL et al., 2005).

1.2. Ciclo de Vida

O *Trypanosoma cruzi* possui diferentes formas durante o seu ciclo de vida (Figura 1). As formas amastigotas (presentes no hospedeiro mamífero) e epimastigotas (presente no hospedeiro Hemíptero) apresentam uma alta atividade transcricional e replicam-se, contudo as formas epimastigotas não são capazes de infectar células. As formas tripomastigotas (em mamíferos) ou tripomastigotas metacíclicos (em Hemípteros) possuem uma menor atividade transcricional, não são proliferativas e são altamente infectivas (DE SOUZA, 1984; ELIAS et al., 2001)

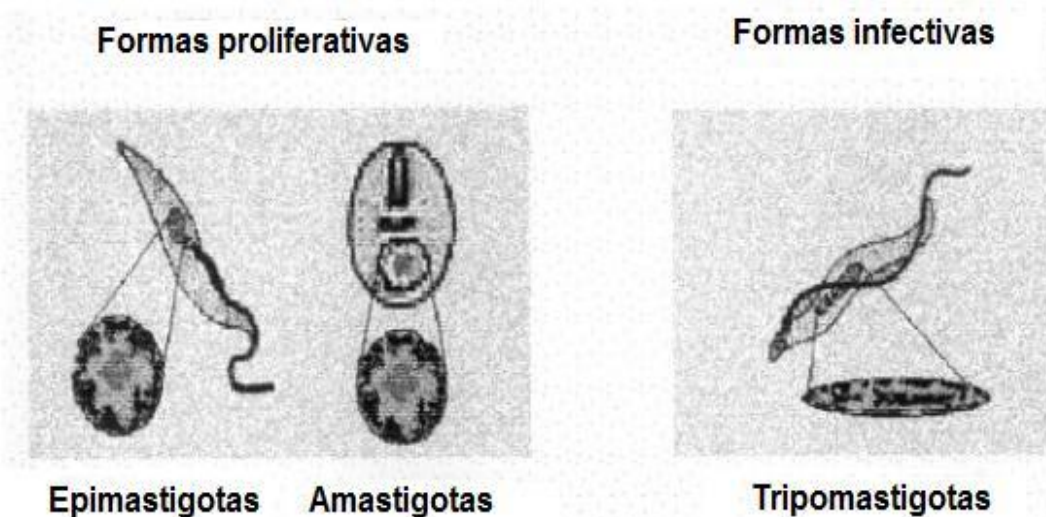


Figura 1. As formas de *T. cruzi* durante o seu ciclo de vida. Amastigotas são células proliferativas, epimastigotas são proliferativas e não infectivas e tripomastigotas que são infectivas e não proliferativas (adaptado de ELIAS et al., 2001). Em destaque os núcleos das três formas de vida do parasito.

O ciclo de vida do parasito ocorre da seguinte forma: o vetor infectado defeca liberando as formas tripomastigotas metacíclicos (Figura 2A), que possuem forma fina e alongada com núcleo alongado e cinetoplasto posterior a ele (Figura 1). Estes parasitos podem infectar o hospedeiro mamífero por diferentes mecanismos, como a presença de lesões na pele (Figura 2B), lesões na mucosa ocular ou por via oral através da ingestão de alimentos contaminados. As formas tripomastigotas metacíclicas são capazes de infectar diversos tipos celulares. Uma das maneiras de infecção ocorre quando o parasito interage com a membrana celular, sendo fagocitado e passando a se situar no interior do vacúolo-parasitófago. O parasito pode escapar deste vacúolo e se dirigir ao citoplasma da célula onde irá se diferenciar em amastigotas (Figura 2C), que possui uma forma arredondada e com núcleo arredondado (Figura 1). Por meio de fissões binárias as formas amastigotas se multiplicam dentro da célula, no seu interior se diferenciam em tripomastigotas. Após inúmeras multiplicações ocorre a ruptura da célula (Figura 2D), os tripomastigotas são liberados e podem infectar outras células, repetindo o ciclo (Figura 2E), podem também atingir a circulação sanguínea (Figura 2F) ou ainda infectar células do músculo e do tecido nervoso, formando “ninhos” de amastigotas (Figura 2G). Os tripomastigotas presentes na corrente sanguínea podem ser ingeridos pelo vetor durante sua alimentação e, em seguida, se transformam em epimastigotas (Figura 2I). As células epimastigotas são alongada, com núcleo

arredondado e cinetoplasto anterior ao núcleo (Figura 1). Estes se multiplicam no intestino do vetor invertebrado e, após migrarem para o intestino posterior, aderem ao epitélio se diferenciando em tripomastigotas metacíclicos que são liberados nas fezes, fechando o ciclo de vida do parasito (TYLER; ENGMAN, 2001; DE SOUZA, 2002).

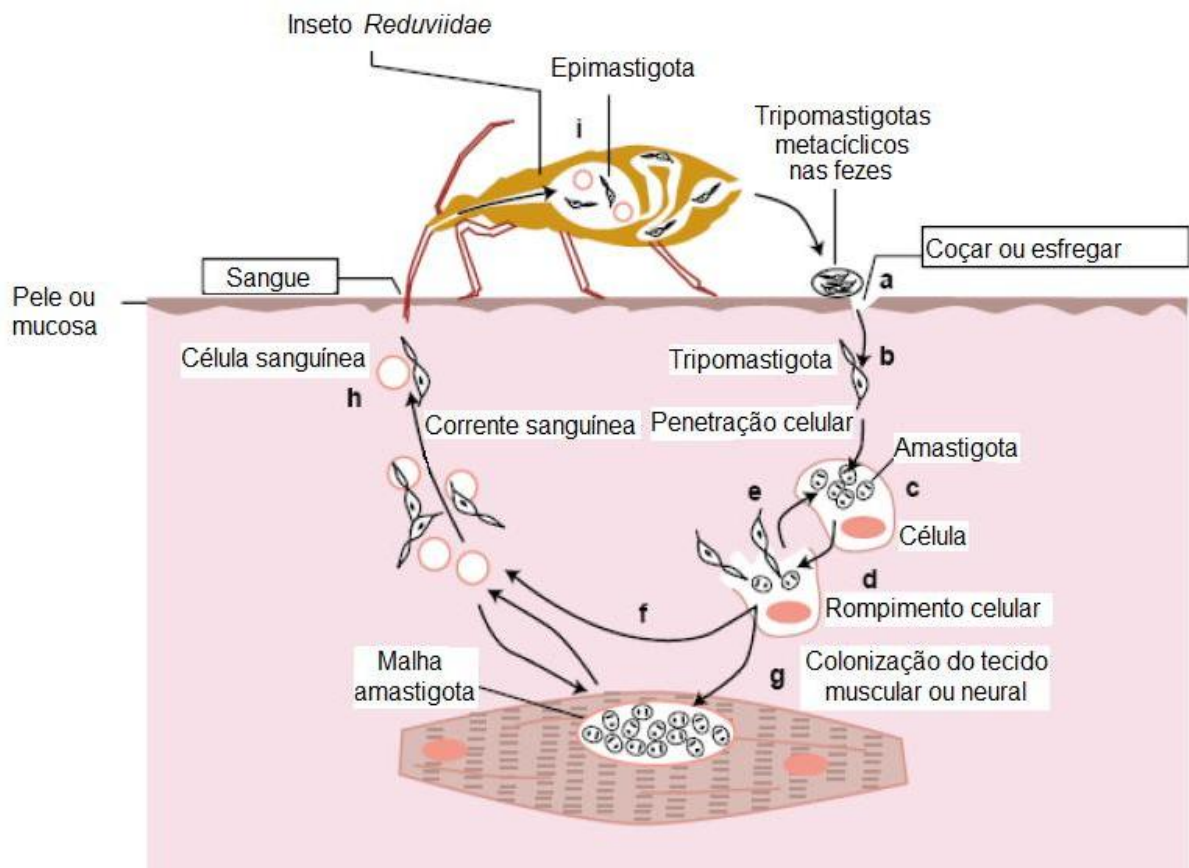


Figura 2. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Em (a) tripomastigotas metacíclicos são depositados na pele ou mucosa; (b) metacíclicos infectam o hospedeiro vertebrado; (c) invasão celular e multiplicação de amastigotas; (d) ruptura da célula e liberação de tripomastigotas para (e) invadir outras células, (f) atingir corrente sanguínea ou (g) formar ninhos de amastigotas. Em (h) o vetor ingere tripomastigotas que (i) se diferenciam em epimastigotas e se multiplicam, diferenciando-se em tripomastigotas metacíclicos novamente que são liberados nas fezes do inseto (adaptado de MACEDO et al., 2002.)

A replicação das formas epimastigotas de *T. cruzi* tem sido caracterizada em estudos recentes. Elias *et al.* (2007) identificou as modificações morfológicas que ocorrem nesta forma, de maneira que é possível identificar diferentes fases do ciclo celular em uma cultura exponencial por meio do número de cinetoplastos, núcleos e

flagelos. Células que estão nas fases G1 e S do ciclo celular possuem um núcleo, um cinetoplasto e um flagelo, ao final da síntese do DNA a célula entra na fase G2 e nesta fase um novo flagelo surge. Durante a mitose ocorre a segregação dos cinetoplastos, de forma que nesta fase se tem um núcleo, dois cinetoplastos e dois flagelos. Na citocinese o núcleo se divide e, deste modo, a célula apresenta dois núcleos, dois cinetoplastos e dois flagelos durante essa fase do ciclo (Figura 3) (ELIAS et al., 2007).

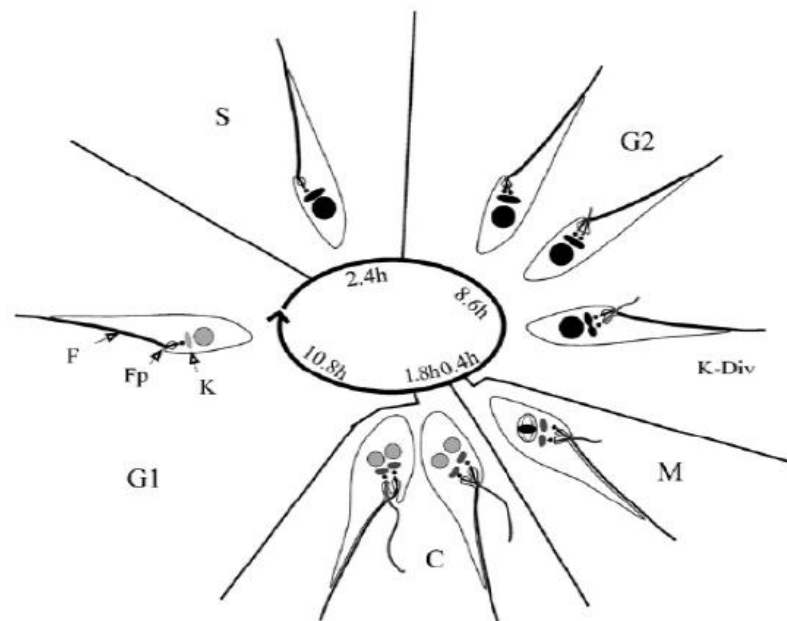


Figura 3. Características morfológicas das formas epimastigotas de *T. cruzi* durante seu ciclo celular. O número de núcleos, cinetoplastos (**K**) e flagelos (**F**) indicam a fase do ciclo celular de epimastigotas. O ciclo de 24 horas está separado de acordo com o tempo de cada fase no centro do esquema. As células que estão na fase G1 e na fase de Síntese (**S**) do ciclo celular possuem um núcleo, um cinetoplasto e um flagelo. Na fase G2 um novo flagelo surge. Durante a mitose (**M**) ocorre a segregação dos cinetoplastos, de forma que nesta fase se tem um núcleo, dois cinetoplastos e dois flagelos. Na citocinese (**C**) há a presença de dois núcleos, dois cinetoplastos e dois flagelos. **Fp**: Bolsa Flagelar. Os núcleos em preto possuem o dobro de DNA quando comparados aos núcleos em cinza (Elias et al, 2007).

As formas amastigotas sofrem um aumento gradual de tamanho antes da divisão. O cinetoplasto e o núcleo se dividem, um novo flagelo é formado e fendas aparecem nas regiões anterior e posterior da célula, aonde a célula irá se dividir. O tempo para dobrar a população de *T. cruzi* é de aproximadamente 14 horas, mas pode haver variações de acordo com a temperatura de crescimento celular e com a linhagem do parasito. O processo de citocinese ocorre em cerca de 25 minutos (DE SOUZA, 2002).

Durante a mitose em *T. cruzi*, a carioteca permanece intacta durante todo o ciclo celular não se rompendo durante a mitose como ocorre na maioria dos eucariotos (DE SOUZA; OSMANI, 2007). Outros fatores incomuns às outras células eucarióticas ocorrem durante a mitose: as fibras de cromatina não formam cromossomos visíveis e a presença de fusos mitóticos não é observada. Além disso, os tripanossomatídeos têm demonstrado complexidade no controle do ciclo celular e é provável que mecanismos moleculares especiais estejam envolvidos nestes parasitos (DE SOUZA, 2002).

1.3. Organização Nuclear

Os tripanossomatídeos apresentam algumas características peculiares em certos processos nucleares como a transcrição e a compactação do DNA, resultando em uma organização nuclear diferente da maioria dos eucariotos.

A transcrição dos mRNAs em *T. cruzi* é policistrônica. A RNA polimerase II parece não possuir sítios promotores. Dessa forma os diferentes genes são transcritos em um único RNA. Para que mRNA maduros e independentes sejam formados, o RNA policistrônico deve sofrer *trans-splicing*, onde uma sequência líder é adicionada à sua extremidade 5' e uma poliadenilação na extremidade 3'. Ao final deste processo mRNAs maduros individuais se formam (PALENCHAR; BELLOFATTO, 2006). Enquanto na maioria dos eucariotos o interior nuclear é dotado de diversos sítios de transcrição (COOK, 1999), em *T. cruzi* a transcrição ocorre na região central do núcleo (DOSSIN; SCHENKMAN, 2005).

A replicação de *T. cruzi* ocorre apenas na periferia nuclear, onde seus cromossomos estão localizados. Os cromossomos que durante a fase G1 se encontram dispersos pelo núcleo migram para a periferia nuclear durante a fase S para que possam ser duplicados, permanecendo nesta região até o final da mitose (ELIAS et al., 2002).

A compactação do DNA formando a cromatina de *T. cruzi* ocorre em um processo semelhante aos demais eucariotos, onde há a presença do octâmero formado por duas de cada histona H2A, H2B, H3 e H4. Contudo, a histona H1 não possui o domínio globular N-terminal (ALSFORD; HORN, 2004). A falta desta região

contribui para a limitação da compactação da cromatina, que não forma fibras de 30nm (HECKER et al., 1995).

Pouco se sabe sobre a distribuição dos cromossomos no espaço nuclear e sobre a formação dos territórios cromossômicos em *T. cruzi*, mesmo porque é difícil determinar o número de cromossomos deste organismo, tendo em vista que durante a mitose não ocorre a condensação máxima destes (SOLARI, 1980). Portanto, o número de cromossomos em *T. cruzi* foi avaliado por eletroforese em campo pulsante e outras técnicas complementares como, por exemplo, hidridação com sondas teloméricas. O cariótipo molecular *T. cruzi* sugere a presença de cerca de 20 bandas cromossômicas com tamanho entre 3,5 e 0,45 Mb e um tamanho do genoma de 87 Mb (CANO et al., 1995). Sabe-se que os cromossomos de *T. cruzi* estão dispersos no núcleo durante a fase G1 e concentrados na periferia nuclear durante as fases S, G2 e durante a mitose (ELIAS et al., 2002). Sabe-se também que a disposição da heterocromatina durante o ciclo de vida de *T. cruzi* varia, assim as formas replicativas (epimastigotas e amastigotas) que possuem alta atividade transcricional apresentam a heterocromatina na periferia nuclear, enquanto a forma não replicativa (tripomastigotas) possui menor atividade transcricional e muita heterocromatina distribuída por todo o núcleo (ELIAS et al., 2001).

2. Ciclo Celular em eucariotos superiores

O ciclo celular é um processo complexo e ubíquo que está envolvido no crescimento e na proliferação celular, no desenvolvimento dos organismos, na regulação dos reparos aos danos no DNA, na hiperplasia tecidual como resposta a lesões e no desenvolvimento de algumas doenças, como o câncer (SCHAFER, 1998).

Todo o ciclo envolve um alto número de proteínas reguladoras que direcionam a célula através de uma sequência de eventos específicos que, ao final, culminam na mitose e na produção de duas células filhas (SCHAFER, 1998).

Alguns fatores são centrais para que este processo aconteça como, por exemplo, as quinases dependentes de ciclina (Cdks) e as demais proteínas ciclinas, que regulam a progressão da célula através dos estágios do ciclo celular, conhecidos com G1, S, G2 e M (SCHAFER, 1998).

As ciclinas controlam finamente todo o ciclo celular. A formação, ativação e separação dos complexos de ciclina-Cdk são os eventos fundamentais que coordenam o ciclo (BLAIN et al., 1997). As proteínas Cdk induzem os processos do ciclo celular por meio da fosforilação de proteínas específicas nos resíduos de serina e treonina. As ciclinas se ligam a moléculas de Cdk e controlam sua habilidade de fosforilar proteínas alvo. A montagem, ativação e desmontagem dos complexos ciclina-Cdk são os principais eventos que coordenam o ciclo celular. As ciclinas seguem no ciclo de síntese e degradação a cada ciclo. As principais ciclinas envolvidas em todo o processo são as ciclinas mitóticas, que se ligam às moléculas de Cdk durante G2 e são necessárias para que a célula entre na fase de mitose, e as ciclinas G1, que se ligam às moléculas de Cdk durante a fase G1 e são necessárias para que a célula entre na fase de síntese (MURRAY, 2001).

A ciclina B e a cdc2, uma quinase que leva a célula da fase G2 à fase M, formam um complexo chamado MPF (fator promotor de mitose) (DUNPHY et al. 1988, GAUTIER et al., 1988, LABBE et al., 1988; DRAETTA et al., 1989; LABBÉ et al., 1989). Tal complexo encontra-se inicialmente inativo, mas é ativado por enzimas específicas após atingir altas concentrações, fazendo com que a célula entre em mitose. O MPF é rapidamente inativado por um complexo promotor da anáfase (APC), responsável pela destruição de ciclinas mitóticas e demais proteínas reguladoras da mitose no final desta fase (INGER et al., 1995; KING et al., 1995). O complexo APC é formado por multissubunidades de ubiquitinas ligases, que marcam a ciclina mitótica para degradação proteolítica. O complexo promotor da anáfase é, por sua vez, regulado pela quinase Aurora B, que inibe a ativação do APC até que todos os cromossomos estejam alinhados na metáfase. A família de quinases Aurora têm se mostrado fundamental para que ocorra a correta segregação cromossômica. A Aurora A é um regulador importante na formação do fuso mitótico. Mutações nessa proteína interferem no recrutamento dos anéis de gama tubulina e outras proteínas durante a maturação cromossômica e na formação do fuso bipolar (GOEPFERT; BRINKLEY, 2000; BLAGDEN ; GLOVER, 2003). A quinase Aurora B também é necessária para que haja interações entre microtúbulos e centrômeros. A expressão de uma forma não-funcional de Aurora B resulta na formação de fusos defeituosos (MURATA-HORI; WANG, 2002). A degradação proteolítica da ciclina mitótica permite que a célula finalize a mitose e dê início a um novo ciclo celular (NURSE, 1990).

A replicação do DNA nuclear ocorre somente na fase S (período de síntese). O intervalo entre o término da mitose e o começo da síntese de DNA é chamado de fase G1, e o intervalo entre o final da síntese de DNA e o início da mitose é a fase G2. G1 e G2 propiciam um tempo adicional para o crescimento celular (Figura 4) (SHERR, 2002).

Durante a fase G1 a célula monitora os meios intra e extracelular, além de coordenar seu próprio tamanho. A fase G2 constitui um intervalo de segurança, permitindo que a célula certifique-se que a replicação do DNA foi realizada por completo antes do início da mitose. Células em G1, onde a replicação do DNA ainda não foi realizada, podem parar o progresso no ciclo celular e entrar em um estado de repouso especializado chamado G0. Células em G0 podem permanecer nesse estágio por dias, meses ou até mesmo anos antes de entrarem novamente no ciclo celular (JOHNSTON, 1990). Durante o período G1 ocorre uma intensa síntese de RNA e proteínas, de forma que o citoplasma da célula-filha recém formada apresente o citoplasma aumentado. Na maioria dos eucariotos a cromatina, também durante este período, está enovelada e não distinta em cromossomos individualizados (Figura 4) (HARTWELL; WEINERT, 1989).

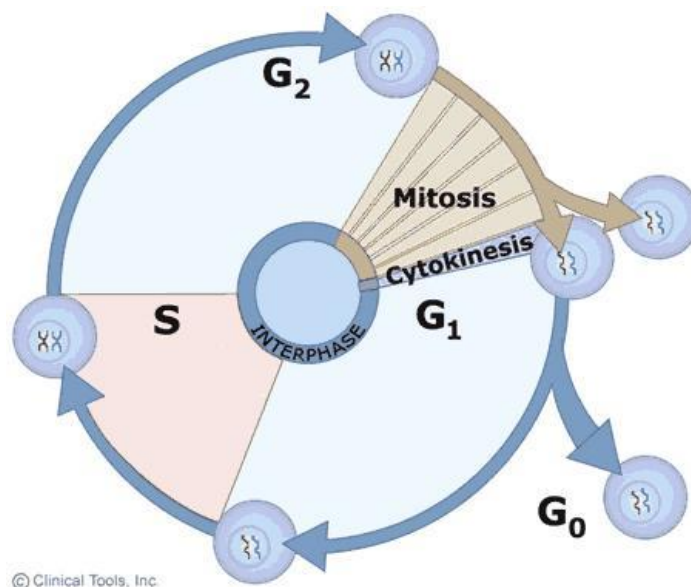


Figura 4. O ciclo celular. Em G1, as células crescem e o conteúdo celular, excluindo os cromossomos, são duplicados. Durante a fase S cada um dos cromossomos é duplicado, e as cromátides irmãs são formadas. Em G2 a célula verifica se há algum erro nos cromossomos e se prepara para dividir. Durante a fase M a célula separa os cromossomos copiados em diferentes pólos e se divide em duas novas células (citocinese). As células que não estão em divisão permanecem no estado G0. O período entre as divisões celulares é chamado de interfase. Adaptado de UNIVERSITY OF LEICESTER (www.le.ac.uk).

O controle do ciclo celular ocorre de maneira muito refinada, funcionando como um dispositivo bioquímico que opera de forma cíclica, construído a partir de um conjunto de proteínas que induzem e coordenam os processos essenciais de duplicação e divisão celular. O controle do ciclo celular é regulado por períodos de pausa que podem interromper o ciclo em pontos de checagem específicos. Esses sistemas de checagem retardam o progresso do ciclo celular, prevenindo o início de uma fase antes que a fase anterior tenha terminado. Os pontos de checagem consideram principalmente se o crescimento celular foi suficiente e se as condições do meio são favoráveis para o progresso do ciclo celular. No ponto de checagem de G2 a maquinaria de replicação do DNA também analisa se todo o DNA foi replicado e devidamente reparado, e o ponto de checagem na metáfase verifica se todos os cromossomos estão alinhados ao fuso mitótico (HARTWELL; WEINERT, 1989).

Durante a mitose as cromátides irmãs, geradas por meio da duplicação do cromossomo durante a fase S, segregam-se para pólos opostos da célula que então se divide em um processo chamado citocinese. A motilidade das cromátides é mediada por microtúbulos que surgem dos pólos opostos do fuso mitótico e se anexam a cada cromátide por meio de uma estrutura chamada cinetócoro (RIEDER et al., 1998). Para que ocorra a correta segregação das cromátides irmãs durante a anáfase é necessário que haja um processo coesivo entre elas. A coesão é estabelecida durante a fase S e permanece até a anáfase. Durante o início da mitose essa coesão neutraliza a força de tração exercida pelos microtúbulos e cria, assim, uma tensão que permite a permanência dos cromossomos no fuso equatorial. A dissolução da coesão controla a separação das cromátides irmãs no momento de transição entre a metáfase e a anáfase (MIYAZAKI; ORR-WEAVE, 1994).

Para que a correta segregação das cromátides irmãs ocorra é necessário que aconteça um segundo rearranjo na arquitetura dos cromossomos: a condensação cromossomal. Durante a interfase os cromossomos estão dispersos por todo o núcleo e seu DNA se encontra mais longo que o fuso mitótico. Durante o início da mitose, o processo de condensação compacta o DNA de cada cromossomo em uma estrutura pequena que mantém seu cinetócoro no fuso polar (ZACHARIAE, 1999).

2.1. Mitose

Todas as células somáticas animais ou vegetais passam pelo processo de divisão celular conhecido como mitose. Fusos, centríolos, ásteres e cromossomos constituem o aparelho mitótico, permitindo o desenvolvimento de todas as fases da mitose. Os cromossomos são compostos por duas estruturas simétricas chamadas cromátides, onde cada uma delas contém uma única molécula de DNA. As cromátides são ligadas por sua vez através do centrômero, região do cromossomo que se liga ao fuso mitótico. O áster é um grupo de microtúbulos irradiados que convergem em direção ao centríolo (RAFF; GLOVER, 1989)

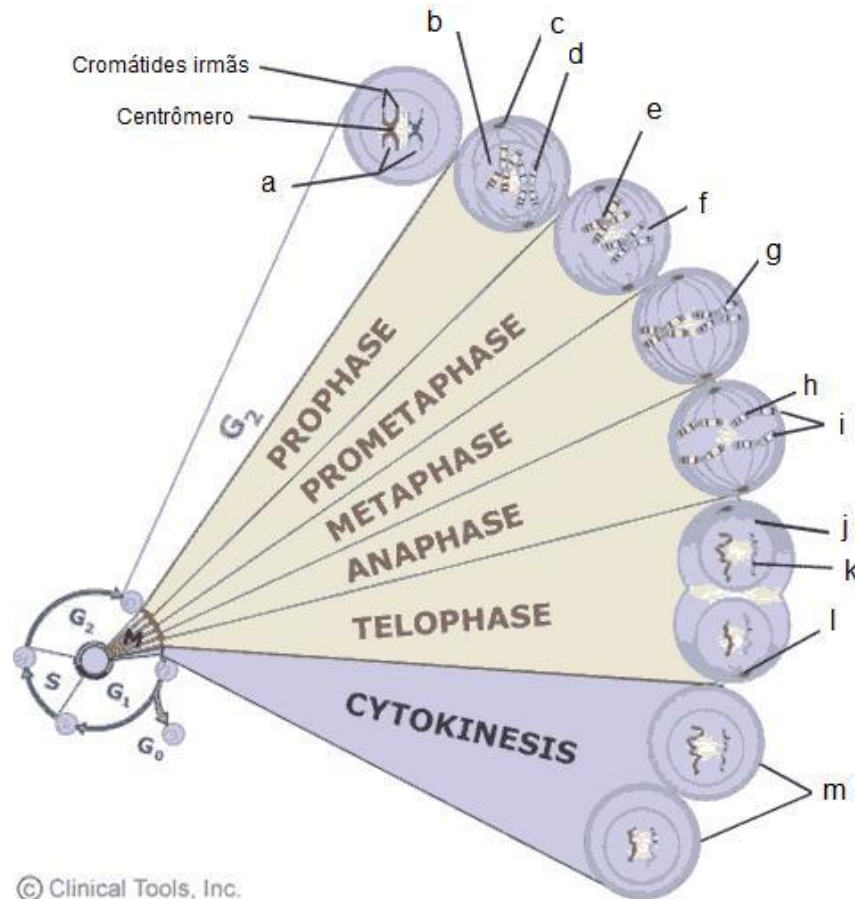
Na maioria dos eucariotos, durante a mitose acontece a perda de envelope nuclear, o material genético é condensado em cromossomos compactos e os microtúbulos se reorganizam para formar o fuso mitótico (SCHOLEY et al., 2003). A mitose é um processo contínuo dividido em quatro fases: prófase, metáfase, anáfase e telófase.

Em vários organismos este processo é bem conhecido. Em leveduras, por exemplo, ocorre a contração dos cromossomos durante a prófase, que se tornam gradativamente mais curtos e compactos devido ao processo de condensação. Os nucléolos se organizam e os centríolos, que foram duplicados durante a interfase, migram para pólos da célula. O citoesqueleto se desorganiza e seus elementos vão constituir-se no principal componente do fuso mitótico, que é uma estrutura bipolar composta por microtúbulos e proteínas associadas (MCINTOSH; MCDONALD, 1989). O final da prófase, que também é denominado prometáfase, caracteriza-se pelo desmembramento do envoltório nuclear em pequenas vesículas que se espalham pelo citoplasma. Na metáfase, as cromátides ocupam o plano equatorial do aparelho mitótico e os cromossomos adotam uma orientação radial na porção central da célula, formando a placa mitótica. Os centrômeros das duas cromátides estão voltados para os pólos opostos e ocorre um equilíbrio de forças. A anáfase inicia-se quando os centrômeros tornam-se funcionalmente duplos. Com a separação dos centrômeros, as cromátides separam-se, puxadas pelas fibras do fuso, e iniciam sua migração em direção aos pólos da célula. A anáfase caracteriza-se pela migração polar dos cromossomos, que se movem na velocidade de cerca de um micrômetro por minuto. A telófase inicia-se quando as cromátides filhas alcançam os pólos. Esses cromossomos agrupam-se em massas de cromatina que são circundadas por cisternas de retículo endoplasmático que se fundem para formar um novo envoltório nuclear. A citocinese é o processo de clivagem e separação do

citoplasma. A separação do conteúdo celular tem início na anáfase e termina após a telófase com a formação das células filhas. Em células animais forma-se uma constrição na zona equatorial da célula mãe, que progride gradualmente e divide o citoplasma. Esta constrição é formada pela interação molecular de actina, miosina e microtúbulos. (GELFAND; SCHOLEY, 1992; MCINTOSH; KOONCE, 1989).

Durante a mitose a atividade bioquímica é baixa, de modo que a maior parte das atividades metabólicas encontra-se reprimida, em especial a síntese de macromoléculas. Assim, a síntese de DNA não é observada no período mitótico e a intensidade da síntese de RNA e proteínas se reduz de maneira marcante na prófase, mantendo-se em níveis mínimos durante a metáfase e a anáfase. A queda de síntese de RNA característica da mitose deve-se ao fato que a condensação da cromatina inibe o acesso da maquinaria de transcrição ao DNA. Após a telófase os cromossomos tornam-se menos condensados, permitindo novamente a síntese de RNA. No final desta etapa, com o início de G1, a síntese de proteínas é restaurada (MCINTOSH; KOONCE, 1989).

O período entre uma divisão mitótica e outra é conhecido como interfase. A interfase é uma fase de atividade biossintética intensa, durante a qual a célula duplica seu DNA (SCHOLEY et al., 2003).



© Clinical Tools, Inc.

Figura 5. O processo de mitose. (a) Em G₂ os cromossomos replicados se encontram pouco enovelados. Durante a prófase (b) ocorre a degradação da membrana nuclear, (c) as fibras do fuso aparecem e (d) os cromossomos se condensam. Durante a prometáfase (e) as fibras do fuso se anexam aos cromossomos e (f) os cromossomos continuam a se condensar. Na metáfase (g) os cromossomos se alinham. Durante a anáfase (h) os cromossomos se dividem e (i) as cromátides irmãs se movem para pólos opostos da célula. Na telófase (j) a membrana nuclear é formada, (k) os cromossomos se descondensam e (l) as fibras do fuso desaparecem. A citocinese (m) é caracterizada pela divisão do citoplasma, em seguida as células parentais se tornam duas células filhas geneticamente idênticas. Adaptado de UNIVERSITY OF LEICESTER (www.le.ac.uk)

3. O Complexo Coesina em leveduras

A segregação das cromátides irmãs para os pólos opostos da célula durante o desenvolvimento da mitose é o evento mais complexo durante o ciclo de vida de uma célula. Tanto na mitose quanto meiose, a coesão entre as cromátides irmãs é essencial para que ocorra uma correta segregação cromossomal (LEE; ORR-WEAVER 2001).

A elucidação dos mecanismos pelos quais as células organizam o DNA em cromátides e como as cromátides idênticas são orientadas a se moverem para pólos opostos da célula se baseia basicamente na conexão física entre as cromátides

irmãs, que é tênue ao longo dos braços dos cromossomos, porém muito justa nos centrômeros. Um complexo proteico formado por quatro subunidades chamado de Coesina é responsável por essa coesão entre as cromátides irmãs.

A coesão entre as cromátides irmãs é essencial não somente para manter os cinetócoros em sua correta orientação, como também para criar a tensão necessária para estabilizar a conexão entre as mesmas. Tal princípio é válido tanto para a meiose quanto para a mitose (NASMYTH; HAERING, 2009).

No momento em que a correta bi-orientação é alcançada, a destruição da coesão entre as cromátides irmãs deve ocorrer, de modo que a separação das cromátides aconteça na transição da metáfase para a anáfase. O fim da coesão acontece de maneira muito regulada e pode ser inibida por cromossomos retardatários, que ainda não se encontram corretamente bi-orientados, em um dos pontos de checagem que ocorre durante todo o processo, conhecido como SAC (*spindle assembly checkpoint*) (NASMYTH et al., 2004). O fim da coesão entre as cromátides irmãs durante a transição da metáfase para a anáfase é regulada por complexo protéico tipo ubiquitina ligase conhecido como complexo promotor da anáfase (APC) (IRNINGER et al., 1995, KING, 1995 SUDAKIN, 1995).

O complexo coesina é formado por duas proteínas 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) (Figura 6). Todos os componentes do complexo coesina são essenciais para a manutenção da coesão entre as cromátides irmãs em células em estado pós-replicativo. Outras proteínas também são essenciais para o processo coesivo durante o ciclo celular, entre elas destacam-se a proteína Pds5 que se liga fracamente a coesina, o complexo SCC2/4, essencial para a associação da coesina ao cromossomo, uma acetil transferase chamada Eco1, que assim como o complexo Scc2/4, é necessária para o estabelecimento da coesão durante a fase S do ciclo celular, mas não essencial para a manutenção desta coesão (NASMYTH; HAERING, 2009).

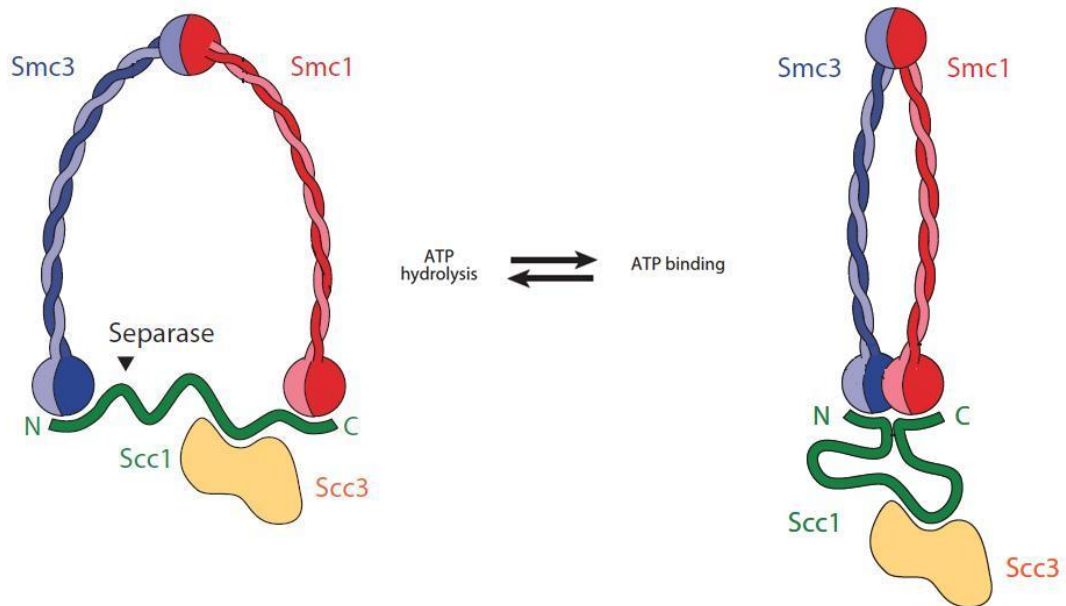


Figura 6. Estrutura do complexo Coesina. As subunidade Smc1 (vermelho) e Smc3 (azul) formam super-hélices paralelas, que se ligam através dos domínios de dobradiça. A extremidade C-terminal da Scc1 (verde) se liga ao domínio globular da Smc1 e a extremidade N-terminal se liga ao domínio globular da Smc3, formando o anel. A subunidade Scc3 (amarelo) se liga à extremidade C-terminal da Scc1 e não mantém um contato direto com o heterodímero de Smc. Os sítios de clivagem pela separase estão indicados. O ATP liga os domínios globulares das proteínas SMC, aproximando-os. A ligação ou a hidrólise do ATP pode ter um papel na abertura ou no fechamento do anel da coesina, por alterar a associação da Scc1 com os domínios globulares (adaptado de NASMYTH; HAERING, 2009)

A dissolução da coesão ocorre em duas fases. A primeira se inicia durante a prófase, onde as coesinas dos braços dos cromossomos são clivadas e as encontradas nos centrômeros permanecem intactas. Durante a segunda fase, a enzima separase cliva a subunidade SCC1 e remove todo o complexo coesina dos cromossomos, permitindo a disjunção das cromátides (PAULI et al.,2008; UHLMANN et al, 1999; UHLMANN et al.,2000; WAIZENEGGER et al., 2000).

3.1 Proteínas SMC

As proteínas SMC1 e SMC3 formam um heterodímero no complexo coesina eucariótico. Cada uma dessas subunidades é composta por dois braços de uma estrutura super-hélice com cerca de 50nm de comprimento, com domínios globulares (também chamadas de cabeça) nas porções N e C- terminal, conectados

por uma estrutura alfa helicoidal. No centro existe uma dobradiça globular que, ao se dobrar, posiciona os domínios globulares em uma das extremidades e a região de dobradiça na outra (Figura 7). As regiões globulares são formadas por domínios tipo ATP *nucleotide-binding* (NBD), característicos da família de proteínas transportadoras do ATP *Binding Cassete* (ABC) e que compreendem uma vasta família de ATPases que transportam ativamente pequenas moléculas através da membrana celular (HAERING et al., 2002; HIRANO, 2002; et al, 1998). A propriedade ATPásica das proteínas SMC modula a abertura e fechamento dos braços super enovelados (Figura 6) (HIRANO et al. 2001).

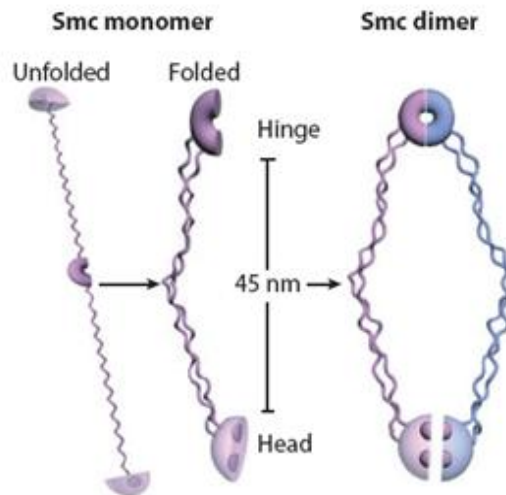


Figura 7. Arquitetura das proteínas Smc. O monômero das Smcs, quando dobrado, apresenta um domínio de dobradiça e um domínio globular, ou cabeça, conectados por uma longa super-hélice. Os dímeros das Smcs são formados por meio da associação das dobradiças e por meio da interação dos domínios globulares de maneira dependente de ATP (adaptado de ONN et al., 2008).

O sítio de ligação a ATP está localizado na superfície dos domínios globulares e, após a ligação do ATP, os dois domínios do heterodímero se combinam, acomodando o ATP entre eles. O heterodímero formado pelas subunidades SMC1 e SMC3 auxilia na hidrólise do ATP quando a subunidade SCC1 se liga a SMC1 (ARUMUGAM et al., 2008). Complexos coesinas contendo mutações nos sítios onde o ATP é aparentemente ligado apresentam falhas na associação da coesina à cromatina, o que sugere que a ligação do ATP une as subunidades SMC1 e SMC3 e que sua hidrólise possa permitir a dissociação destas subunidades (ARUMUGAM et al., 2003).

A origem antiga das proteínas SMC reflete sua ação fundamental na dinâmica dos cromossomos. Enquanto múltiplos membros dessa família são encontrados em uma mesma espécie eucariótica, cada um dos genomas de bactérias e Archaea completamente sequenciados até hoje contém uma ou nenhuma cópia de um gene *smc*. Diferente das SMC eucarióticas, que formam heterodímeros, as SMC procarióticas são homodímeros e há apenas uma sequência SMC por genoma. As proteínas SMC já foram identificadas em quase todas as Archaea e bactérias Gram positivas, e em cerca de 40% das bactérias Gram negativas sequenciadas atualmente. A grande maioria das bactérias Gram negativas não possuem um gene *smc*, mas apresentam uma proteína MukB, que possui uma estrutura de cinco domínios semelhantes às SMCs e é considerada uma SMC divergente (SOPPA et al., 2000).

Cópias iguais das proteínas SMC formam homodímeros em bactérias. Os homodímeros de SMC possuem um arranjo antiparalelo, assim como ocorre em eucariotos (HIRANO, 1999). Além disso, as proteínas SMC de bactérias possuem um domínio de ligação à membrana plasmática, diferente das SMCs de eucariotos, que não possuem esse domínio (MELBY et al, 1998).

Os complexos SMC regulam a compactação e a segregação de nucleoides bacterianos. Ao invés de ocorrer um processo envolvendo a separação passiva e gradual dos cromossomos, uma maquinaria ativa existe em bactérias para realizar a divisão celular. Logo após o início da replicação, as novas cópias recém replicadas da região *oriC*, comportando-se como centrômeros eucarióticos, movem-se rapidamente para lados opostos da célula. Eles determinam as posições que serão tomadas pelos nucleoides irmãos quando a replicação do DNA for finalizada. Assim, a expansão gradual do nucleoide difuso camufla um mecanismo ativo, que há muito tempo era desconhecido. No ciclo celular primitivo das bactérias, os processos de condensação e segregação são regulados por uma mesma proteína SMC, que funciona como um dispositivo topológico responsável pela dinâmica cromossomal (HIRANO; HIRANO, 1998).

As proteínas SMC são essenciais para a condensação e a segregação dos cromossomos, assim como para o progresso do ciclo celular em bactérias (NIKI et al., 1991). As origens recém replicadas permanecem ligadas entre si por cerca de dois terços do período de replicação, indicando o envolvimento de uma função de coesão. Acredita-se que a SMC bacteriana age após a separação inicial das origens

de replicação do cromossomo no momento da divisão, separando as cromátides irmãs ao condensar as fitas de DNA recém-replicado das duas metades da célula (HIRANO, 1999).

3.2 Proteína SCC1

Uma característica importante do complexo coesina é a de que os domínios globulares das subunidades SMC3 e SMC1 são fortemente ligados pelos domínios N e C-terminal da proteína SCC1, respectivamente, criando assim, uma estrutura em forma de anel (Figura 6). Os dois domínios N e C-terminal da proteína SCC1 são membros da família kleisina de proteínas. Essa família inclui a α -kleisina, ortóloga da SCC1 e sua variante meiótica Rec8, uma β -kleisina equivalente a subunidade da condensina II, MukF, que se liga a proteína MukB, uma proteína bacteriana semelhante a SMC, entre outras proteínas (ARUMUGAM, 2006). As proteínas SCC1 são bem conservadas nas regiões N e C terminal. Os dois sítios de clivagem pela separase em leveduras e em mamíferos estão localizados no centro da proteína no centro dos dois domínios. A clivagem em qualquer um dos sítios é suficiente para destruir a coesão entre as cromátides (UHLMAN et al., 1999)

A clivagem da proteína SCC1 pela enzima separase no início da anáfase provoca a abertura do anel que envolve as cromátides irmãs, causando a dissociação da coesina dos cromossomos e a posterior desintegração do complexo (ULMANN et al., 1999). A clivagem da SCC1 é necessária e suficiente para destruir a coesão (UHLMANN et al., 2000). Após a dissociação da coesina nos cromossomos, a SCC1 se torna um alvo para fosforilação por Cdk1, essa dissociação reduz a capacidade dessa proteína se ligar novamente a cromatina. A dissociação da subunidade SCC1 é essencial para que o complexo coesina seja liberado, para que ocorra a separação das cromátides irmãs e para que a célula termine a mitose (TOMONAGA et al., 2000).

Pela comparação entre cromátides irmãs de células de eucariotos unicelulares e multicelulares, observou-se que em *S. cerevisiae*, a SCC1 associa-se à cromatina logo após a replicação do DNA e pode ser detectada especialmente no centro e em alguns locais dos braços dos cromossomos até a transição entre a metáfase e a anáfase, quando a SCC1 é clivada pela separase (TANAKA et al., 1999). Entretanto, em células de *Drosophila*, *Xenopus* e humanos, a maior parte da

SCC1 se dissocia dos braços dos cromossomos durante a prófase, após a fosforilação pela Polo Like Kinase - PLK (WAIZENEGGER et al., 2000).

3.3 Proteína SCC3

Pouco é conhecido sobre a proteína SCC3. A associação desta subunidade ao anel é dependente da subunidade SCC1 (HAERING, 2002; MCINTYRE, 2007). A Scc3 se liga diretamente aos resíduos de aminoácido da região C-terminal da SCC1 (Figura 6). A SCC3 também se liga a proteína Rad61 (Wapl em leveduras) *in vitro* (ROWLAND, 2009).

As proteínas SCC3 são também conhecidas como estromalinas por terem sido identificadas no estroma da medula óssea de camundongos. Essa família de proteínas apresenta um papel de co-ativador da transcrição em células humanas (LARA-PEZZI et al., 2004).

Em humanos as proteínas SA-1 e SA-2 (SCC3 em leveduras) apresentam um alto grau de identidade (72%) (CARROMOLINO et al., 1997). Além destas SAs, foi descoberta uma nova classe, a SA-3 (JONES; SGOUROS, 2001) presente em humanos e em outros organismos. Tal proteína parece fazer parte da coesina meiótica, enquanto as outras SAs estão envolvidas na mitose se unindo ao complexo (LOSADA et al., 2000; PEZZI et al., 2000).

A região N-terminal da SCC3 é bastante conservada entre os organismos estudados e o Domínio Conservado da Estromalina (SCD) está localizado nessa região. A estrutura predita para o SCD é composta por duas regiões alfa-hélice separadas por uma folha beta (PEZZI et al., 2000).

A subunidade SCC3 é instável na ausência de SCC1, mas o inverso não ocorre. Isso sugere que a SCC3 deve interagir com a SCC1 para se tornar estável no complexo.

3.4 Modelos de Coesão

A descoberta de que as subunidades SMC1, SMC3 e SCC1 formam um anel levou à proposição de um modelo onde a coesina se associaria ao cromossomo abraçando as fibras de DNA/cromatina conjuntamente, englobando-as dentro de um único anel (HAERING, 2002). O modelo do anel, ou modelo do “abraço” como

também é chamado, possui duas principais vertentes. A primeira e mais aceita versão do modelo defende que as cromátides irmãs são abraçadas dentro de um único anel monomérico de coesina (Figura 8a), enquanto as outras versões defendem que as cromátides irmãs são mantidas unidas através da interação entre dois anéis diferentes, um deles engloba uma cromátide e o outro engloba a cromátide irmã (Figura 8b, 8c).

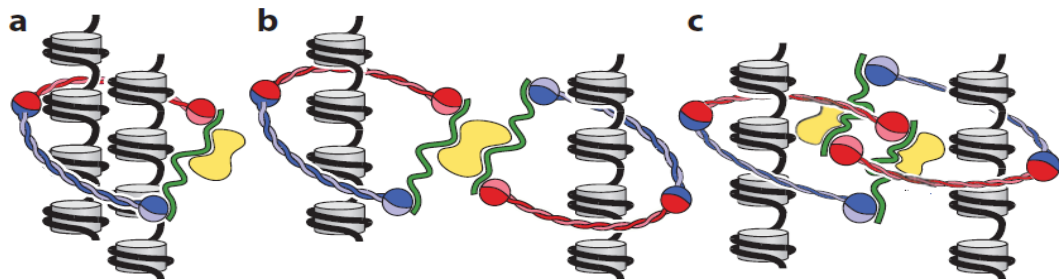


Figura 8. A coesão das cromátides irmãs por meio do modelo do anel. (a) A primeira versão prevê que as cromátides irmãs (exibidas como fibras de 10 nm, com o DNA em torno dos nucleossomos) são englobadas por um único anel de coesina. (b) O modelo “algema” prevê a associação (por meio da ligação de uma única subunidade Scc3) de dois anéis Smc1/Smc3/Scc1. (c) Outra versão que defende a interação entre os complexos coesinas propõe que existe uma interconexão topológica entre dois anéis de coesina, cada um contendo uma única cromátide irmã em seu interior (adaptado de NASMYTH; HAERING, 2009).

Os três modelos defendem que o complexo coesina apreende a cromatina utilizando o princípio topológico e não o princípio físico da ligação entre a coesina e o DNA ou os nucleossomos. Assim, os dois modelos predizem que a clivagem do anel em qualquer ponto leva à dissociação da coesina da cromatina e conseqüentemente, a perda da coesão entre as cromátides irmãs. Ambos também predizem que uma vez que o DNA se encontra preso dentro dos anéis da coesina, é impossível que os componentes desse anel sejam substituídos (NASMYTH; HAERING, 2009).

Se a associação entre a coesina e a cromatina é topológica, o anel de coesina, então, se encontra livre para deslizar ao longo das fibras de cromatina quando estas não se encontram estavelmente condensadas. O anel da coesina possui o diâmetro de 30 a 50 nm, que é consideravelmente maior que o diâmetro de uma fibra nucleossomal de cromatina, com cerca de 10 nm (NASMYTH; HAERING, 2009).

Tais modelos propõem que associação entre a coesina e a cromatina possivelmente ocorre por meio de uma abertura transiente do anel, sob um processo altamente regulado (NASMYTH; HAERING, 2009).

Outro modelo também conhecido é chamado de “modelo bracelete”, prediz que as cromátides irmãs se unem por meio da formação de um complexo de coesinas que se oligomerizaram (HUANG, 2005). Esse modelo propõe que a interação entre as subunidades da coesina podem ser utilizadas para formar não somente anéis, mas também filamentos oligoméricos, ou “braceletes”, que de alguma forma envolvem as cromátides irmãs (HUANG, 2005; NASMYTH; SCHLEIFFER, 2004).

É importante notar, no entanto, que vários modelos descrevendo a associação entre a coesina e a cromatina vêm sendo propostos pelos principais pesquisadores do assunto, entre eles estão os modelos dos dímeros de coesina, oligômeros, estruturas filamentosas e complexos coesinas associados lateralmente (SKIBBENS, 2009).

3.5 A coesina e o ciclo celular

A coesina é um complexo macromolecular que mantém as cromátides irmãs unidas a partir da fase S do ciclo celular. A interação entre as coesinas e os cromossomos é bem descrita para leveduras, onde a ligação entre as cromátides é formada durante a replicação e é em grande parte destruída na transição entre a metáfase e a anáfase, quando as cromátides irmãs se separam para os pólos opostos da célula. Embora a coesina possa ser encontrada nos cromossomos durante todo o ciclo celular, ela só é capaz de gerar coesão se estiver presente durante a replicação do DNA (UHLMANN; NAMYTH, 1998). Caso a subunidade SCC1 não seja expressa anteriormente a replicação do DNA, a coesão é impossibilitada de ser formada (HAERING, 2004).

A associação da coesina ao cromossomo necessita de um grande número de fatores. Um dos fatores mais importante é o complexo SCC2/4. A associação da coesina com a cromatina em todos os sítios do genoma necessita desse complexo tanto em células de leveduras quanto em células de mamíferos (SEITAN et al., 2006; CIOSK et al., 2000). Mutações tanto na proteína SCC2 quanto na SCC4 (CIOK et al, 2000) provocam danos à coesão cromossomal (MICHAELIS et al.,

1997), contudo ambas não são necessárias para manter a coesão em células em estado pós-replicativo (BERNARD et al, 2006, CIOSK et al., 2000). No modelo de anel, a função do complexo SCC2/4 se baseia em apreender as fibras de cromatina através da coesina. Isso possivelmente ocorre de modo direto, por meio do auxílio do complexo SCC2/4 em abrir o anel e/ou levar a coesina a uma maior proximidade das fibras da cromatina, ou de modo indireto, modificando as fibras de cromatina de um modo que possibilite que a coesina a envolva (NASMYTH; HAERING, 2009).

O complexo coesina se associa a cromatina de modo sítio-específico (ECKERT et al, 2007). Isso foi demonstrado em *S. cerevisiae* após a descoberta de que a associação da coesina em torno do centrômero depende de diversos fatores, entre eles de uma seqüência CEN de 150 pares de bases, de proteínas específicas que se associam a essa seqüência, como a histona H3 (uma histona específica do centrômero), e de proteínas presentes no cinetócoro. Acredita-se que o complexo coesina se associa primeiramente a estas regiões próximas ao centrossomos e depois se difundem, ou são ativamente movidas para os braços do cromossomo. Pouco se sabe sobre como tais proteínas estão envolvidas na associação da coesina a regiões pericêntricas (ECKERT, 2007).

Diversos estudos mostram que o complexo coesina apresenta um baixo (ou até mesmo nenhum) nível de associações promíscuas com a cromatina. Tais ligações inespecíficas são evitadas para prevenir qualquer ligação que possa causar danos a algum sítio do cromossomo ou que possa comprometer a coesão eficiente entre a coesina e a cromatina (NASMYTH; HAERING, 2009).

A associação da coesina ao cromossomo ocorre anteriormente à replicação do DNA. Quando as subunidades do complexo são expressas na fase G2 ou M do ciclo celular, elas conseguem se associar ao cromossomo, contudo falham em estabelecer a devida coesão mesmo na presença de uma coesão pré-existente entre as cromátides irmãs (HAERING et al., 2004; LENGRONNE et al., 2006; STROM et al., 2007, STROM et al., 2005). Não se sabe ao certo o que permite com que a coesina presente durante a fase S estabeleça a coesão e a coesina presente durante as fases G2 e M não, mas acredita-se que a resposta para tal questionamento esteja no fato de que alguns fatores são requeridos somente para estabelecer a coesão e não para manter a coesão ao longo do processo.

Outro fator também apresenta uma grande importância no estabelecimento da coesão, a acetil transferase Eco1. Essa transferase acetila um par de lisinas (K112 e

K113) contidas na subunidade SMC3. A acetilação aumenta durante a fase S de maneira considerável, podendo estar associada ao momento em que a coesina se liga a cromatina, e permanece alta durante as fases G2 e M do ciclo celular, decaindo somente na anáfase (BEM-SHAHAR, 2008). Tais fatos sugerem que a desacetilação possa estar associada ao momento em que a coesina se desassocia da cromatina. A subunidade SMC3 é o substrato para essa atividade de acetiltransferase, permitindo o estabelecimento da coesão. Um mapeamento do ciclo celular feito em leveduras e em células de mamíferos mostrou que a SMC3 não está acetilada em G1, mas sua acetilação sofre um grande aumento durante a fase S, período onde há também um aumento da atividade de Eco1. A acetilação da subunidade SMC3 permanece até o início da anáfase (SKIBBENS, 2009).

Outro fator envolvido na regulação do estabelecimento da coesão é a proteína Pds5. Células contendo Pds5 mutantes apresentam defeitos na coesão. A Pds5 auxilia a manter a coesão durante a fase G2/M. Contudo, a Pds5 não se liga em grande quantidade ao complexo coesina e só é recrutada após a deposição da coesina na cromatina (SKIBBENS, 2009)

Embora o mecanismo para a remoção da coesina dos cromossomos seja significativamente mais simples do que o estabelecimento da coesão, esse processo deve ser minuciosamente regulado. Na maioria das células eucarióticas, a dissociação da coesina ocorre em duas fases. A primeira dissociação, conhecida como a “via prófase”, ocorre durante a prófase e a prómetáfase, quando a maioria das coesinas se dissocia dos braços do cromossomo, mas não do centrômero. Durante essa fase a coesina é fosforilada por uma quinase específica da mitose chamada PLK (Polo-Like Kinase), o que diminui a afinidade da coesina pelo DNA (SUMARA et al., 2002). A questão principal é se a persistência da coesina nos centrômeros se deve ao fato de que essa porção não é fosforilada pela PLK ou porque outros fatores específicos da heterocromatina centromérica impedem a dissociação da coesina mesmo após a fosforilação por PLK. A última hipótese vem se mostrando mais pertinente, uma vez que a clivagem da Scc1 em leveduras depende também da sua fosforilação por PLK (ALEXANDRU et al., 2001)

A segunda dissociação ocorre pouco antes do início da anáfase, onde todas as coesinas restantes (predominantemente nos centrômeros, mas também nos braços) se dissociam devido à clivagem da subunidade SCC1 pela separase (HAUF

et al., 2001; KUMADA et al., 2006, NAKAJIMA et al., 2007, UHLMANN et al., 1999; UHLMANN et al., 2000, WIRTH et al., 2006).

Esses dois processos possuem mecanismos diferentes além de distinta regulação temporal. A via prófase, por exemplo, não envolve a clivagem pela separase (SUMARA, 2000), e parece não ser um aspecto essencial para a segregação dos cromossomos durante a mitose, tendo um papel pouco significativo na mitose de leveduras. Além disso, poucas ou nenhuma coesina se dissociam dos braços do cromossomo na prómetáfase durante a meiose I, quando a coesão entre as cromátides irmãs ao longo dos braços do cromossomo é essencial para manter os cromossomos bivalentes unidos (BUONOMO et al., 2000).

Caso todas as coesinas fossem removidas dos cromossomos durante a prófase a bi-orientação destes cromossomos ao longo do fuso mitótico seria comprometida. Com isso, durante esse período as coesinas centroméricas são impedidas de se dissociarem por meio da atuação da proteína Sgo1, uma proteína específica do centrômero (KITAJIMA et al., 2005; MCGUINNESS et al., 2005; SALIC et al., 2004). Sgo1 é membro de uma classe de proteínas conhecidas como shugoshinas, também encontradas em *Drosophila melanogaster* (KERREBROCK, 1995). As proteínas shugoshinas possuem um domínio super hélice que se liga a uma holoenzima ABC, PP2A, que também se localiza no centrômero de células mitóticas e neutraliza a fosforilação da coesina e do complexo SCC2/4 (RIVERA; LOSADA, 2009).

A transição da metáfase para a anáfase é um passo sem retorno. Uma vez que a coesão entre as cromátides irmãs foi destruída não há como reconstituí-las (UHLMANN; NASMYTH, 1998). Em leveduras, tudo indica que essa separação das cromátides seja mediada pela clivagem da subunidade SCC1 pela separase (TOMONAGA, 2000). A separase também participa do mesmo processo em *Caenorhabditis elegans* (SIOMOS, 2001), em *Drosophila melanogaster* (JAGER, 2001), em células de mamíferos (KUDO et al., 2006; KUMADA et al., 2006), e em *Arabidopsis* (LIU, 2006). A atividade da separase é altamente regulada e inibida por grande parte do ciclo celular por meio de sua associação com uma chaperona inibitória chamada securina (UHLMANN et al., 2000). A separase só é totalmente ativada quando os cromossomos já estão em sua correta biorientação, quando é liberada uma proteína que ativa a Cdc20, através do seqüestro do inibidor Mad2 (MUSACCHIO, 2007; NASMYTH, 2005). Isso permite com que o Cdc20 recrute a

securina e a ciclina B ao APC/C. Após a liberação da securina e da ciclina, a separase ativada cliva a subunidade SCC1 (HAUF et al., 2001; UHLMANN et al., 1999) que se encontra associada ao cromossomo (SUN et al., 2009; WAIZENEGGER et al., 2000), o que induz a dissociação da coesina e inicia a disjunção das cromátides irmãs.

3.6 Outras Funções do Complexo Coesina

A coesina desempenha um papel fundamental no reparo do DNA, especialmente no reparo de rompimentos da dupla fita (DBS- *Double-strand break*) do DNA, em células mitóticas (CORTES-LEDESMA; AGUILERA, 2006; SJOEGREN; NASMYTH, 2001) e em células meióticas (ELLERMEIER; SMITH, 2005; KLEIN et al., 1999). Em células mitóticas, duas populações diferentes de coesinas contribuem para esse processo: coesinas que englobam as cromátides irmãs unindo-as no momento do rompimento e coesinas que são subsequentemente recrutadas à cromatina, circundando o mesmo rompimento (UNAL et al., 2004). Em leveduras, os maiores reguladores de danos ao DNA, Mec1 (ATM) e Tel1 (ATR), fosforilam a isoforma histona H2AX em um grande domínio em torno do DSB, tornando-o permissivo para a atuação da coesina (ONN et al., 2008). Em G2/M, os reguladores Mec1 e MRX atuam em processos distintos para promover a geração da coesão ao redor dos sítios rompidos por meio da ativação da proteína Eco1 em G2 (ONN et al., 2008).

A regulação do pareamento das cromátides irmãs durante a fase S e durante a fase G2/M (onde ocorre o reparo aos danos no DNA) ocorre de maneira diferente. Enquanto a SMC3 precisa ser acetilada para que haja o estabelecimento da coesão durante a fase S, na resposta ao dano ao DNA, a proteína Eco1 atua sobre a subunidade SCC1, tornando a acetilação a SMC3 completamente dispensável nesse momento. Caminhos críticos no ciclo celular muitas vezes geram múltiplos níveis de regulação. Isso é confirmado pelo fato de que a subunidade SCC1 não é somente acetilada com também fosforilada. A fosforilação da SCC1 é resultante da ativação da Chk1, uma quinase que participa da ativação dos pontos de checagem aos danos ao DNA (SKIBBENS, 2009)

Se a coesina é ativamente recrutada aos sítios de DSB durante a meiose da mesma maneira como ocorre na mitose ainda não se sabe. Devido ao seu papel

fundamental durante a recombinação, a perda de sua função geralmente leva a um ponto de checagem induzido em células na fase paquíteno (BANNISTER et al, 2004), o que dificulta a análise de sua função e regulação durante a segregação cromossomal subsequente durante a meiose (BRAR et al, 2006).

A primeira indicação de que as proteínas envolvidas na coesão entre as cromátides irmãs poderiam ter funções adicionais foi a descrição da síndrome de Roberts (ROBERTS, 1919) e SC phocomelia (HERRMANN et al., 1977) em humanos. Tais síndromes são autossomias recessivas raras associadas a deficiências nos membros e deficiência de crescimento, anomalias crânio-faciais e deficiência mental média a grave. Os cromossomos mitóticos desses pacientes são caracterizados por repulsão da heterocromatina, em partículas nos centrômeros, indicando uma perda prematura da coesão entre as cromátides irmãs (FREEMAN et al., 1974; JUDGE, 1973; TOMKINS et al., 1979). Devido à coesão defectiva das cromátides, as células com síndrome de Roberts crescidas em cultura apresentam defeitos mitóticos (TOMKINS; SISKEN, 1984). A presença de indivíduos de uma mesma família afetados severa ou moderadamente indica que as duas doenças são alélicas, e ambas são causadas por mutações em *ESCO2*, e tais mutações suprimem a sua função (SCHULE et al., 2005). Ainda não é claro se os defeitos de desenvolvimento são causados por variações entre os indivíduos na forma como as suas células embrionárias reagem à perda parcial da coesão entre as cromátides irmãs.

Um forte indício de que a coesina pode ter funções não mitóticas decorre da descoberta de que a maioria dos pacientes com a síndrome de Cornelia de Lange (CdLS) (DE LANGE, 1933) possuem mutação somente em um alelo do gene que codifica a proteína SCC2 humana, a Nipbl. CdLS é um transtorno no desenvolvimento, dominante e herdado, caracterizado por retardo no crescimento, anormalidades no lábio superior, disfunção cardíaca, anomalias genitais e oftálmicas, entre outros. Tais defeitos são causados por somente 30% de redução no nível da proteína SCC2 e que não parecem ser acompanhados por grandes defeitos na coesão de cromátides irmãs. Esses fatos levam a possibilidade de que os defeitos presentes na síndrome de CdLS sejam causados pela redução nos níveis de leitura da coesina pelo cromossomo. Outro estudo que reforça essa afirmação é a recente descoberta de que as formas brandas de CdLS são causadas por mutações nas proteínas SMC1 e SMC3 (DEARDORFF et al., 2007).

3.7 O Complexo Coesina em Tripanossomatídeos

Até o presente, poucos estudos já foram realizados para o entendimento da estrutura e função da coesina em tripanossomatídeos.

Gluezn et al. (2008) caracterizaram a subunidade SCC1 do complexo coesina de *Trypanosoma brucei*, mostrando que: (i) o genoma de *T. brucei* contém homólogos à células eucarióticas para todos os componentes presentes nos complexos coesina e condensina, (ii) a SCC1 é expressa a partir do começo da fase S até a anáfase, (iii) o *knockdown* para a expressão de SCC1, utilizando-se o RNAi, impossibilita a divisão nuclear de *T. brucei*, (iv) a redução da atividade da SCC1 selvagem ou expressão da SCC1 resistente a atividade da separase resultam em uma completa falha de divisão celular em células de *T. brucei* nas formas sanguíneas, mas não na forma procíclica do protozoário.

Bessat e Ersfeld (2009) estudaram os minicromossomos no genoma nuclear de *Trypanosoma brucei*, que exibem padrões incomuns de segregação mitótica. Para verificar se as diferenças no modo de segregação destes minicromossomos em relação aos cromossomos grandes estão refletidas em níveis moleculares, foram caracterizadas duas proteínas diferentes que possuem funções bem conservadas na segregação de cromossomos eucarióticos: a proteínas SMC3, um componente da coesina, e a protease Separase que cliva o complexo coesina no início da anáfase e possui, em outros organismos, funções adicionais durante a mitose. Neste trabalho foi mostrado que a depleção da proteína SMC3 através de RNA de interferência não possui efeitos visíveis na segregação dos minicromossomos. Em contraste, a depleção da Separase causa erro na segregação tanto de minicromossomos quanto de cromossomos grandes. Foi mostrado ainda que 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. 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 prevenir a clivagem do complexo coesina antes do momento correto.

No Laboratório de Biologia do Gene da Universidade de Brasília, o estudo do complexo Coesina em *Trypanosoma cruzi* iniciou-se em 2004 por Lucena no seu trabalho de dissertação, confirmando a presença de todos os genes da coesina em

Trypanosoma cruzi, *Trypanosoma brucei* e a *Leishmania major* por meio da análise desses genes em bancos de dados. De acordo com este trabalho, 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. O mesmo trabalho ainda mostra que as proteínas SMC de tripanossomatídeos possuem sequência e estrutura similares às SMC de outros eucariotos. Essa semelhança é evidenciada pela formação de um heterodímero e pela região de dobradiça, que é mais curta que a de bactérias e, diferente das dobradiças procarióticas, apresenta conservação na estrutura primária. Entretanto, os tripanossomatídeos possuem, nas proteínas SMC, domínios de ligação à membrana semelhantes aos de bactérias. Além disso, na região de alfa-hélices das proteínas SMC de *T. cruzi* 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.

Após o trabalho de Lucena (2004), o gene para a subunidade TcSCC1 foi amplificado por reação de polimerização em cadeia a partir de DNA total de *T. cruzi*, clonado e expresso em células de *Escherichia coli*. Esta proteína heteróloga produzida foi utilizada para a produção de anticorpos em coelhos para futuros experimentos de análise de expressão e localização desta subunidade em células de *T. cruzi*.

OBJETIVOS

O protozoário *Trypanosoma cruzi*, assim como os demais tripanossomatídeos, apresenta algumas peculiaridades em sua estrutura celular e, principalmente, em seu processo de divisão celular quando comparado aos demais eucariotos. O entendimento do funcionamento da divisão celular desse organismo é um passo importante para inibir sua proliferação em tecidos humanos.

Esse trabalho tem então como objetivo geral iniciar a caracterização proteica do complexo coesina em *Trypanosoma cruzi* e entender o seu envolvimento na divisão celular de *T. cruzi*.

Objetivos específicos:

- Analisar a expressão dos genes das subunidades do complexo coesina nas três formas do parasito e durante o ciclo celular;
- Verificar a presença das subunidades do complexo coesina nas formas amastigotas, tripomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi*;
- Identificar os padrões de localização das subunidades do complexo coesina no núcleo das formas amastigotas, tripomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi*.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

1. Organismos e linhagens celulares utilizadas

1.1. Linhagens Bacterianas

As linhagens bacterianas de *Escherichia coli* utilizadas nos procedimentos de clonagem e expressão de proteínas recombinantes estão destacadas a seguir, juntamente com o seu genótipo:

- 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*.
- BL21 (DE3) pLysE (Invitrogen): F⁻ *ompT hsdSB*(rB⁻, mB⁻) *gal dcm* (DE3) pLysE (CamR).

1.2. *Trypanosoma cruzi*

Em todo trabalho experimental foram utilizadas as formas epimastigotas da cepa CL Brener (ZINGALES et al., 1997; CANO et al., 1995) e tripomastigotas e amastigotas da cepa Y (SILVA; NUSSENZWEIG, 1953).

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. Plasmídeos

2.1. Vetor de clonagem dos produtos de PCR

O vetor pGEM® -T Easy (Promega) utilizado neste trabalho 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.

2.2. Vetores de expressão

Os vetores pET-21a(+) e pET-28a(+) utilizados neste trabalho fazem parte do sistema pET (Novagen®) e foram desenvolvidos para expressão de proteínas recombinantes a níveis elevados e em fusão com uma cauda de seis histidinas (His₆-Tag) nas extremidades C- ou N-terminal, que possibilitam a posterior purificação da proteína por cromatografia de afinidade. Os vetores da série pET possuem promotores T7 reguláveis que, quando induzidos, permitem uma grande produção de RNA mensageiro (RNAm) a partir do gene clonado.

3. Meios de cultura

3.1. Meios de cultura para células bacterianas

Meio LB (Luria-Broth)

Peptona de caseína 1,0% (p/v);

Extrato de levedura 0,5% (p/v);

NaCl 1,0% (p/v).

Ajustar o pH para 7,2 com NaOH e esterilizar em autoclave por 20 min a 121°C.

Ágar LB

Adicionar ágar bacteriológico ao meio LB a uma concentração final de 1,5% (p/v). A esterilização foi feita em autoclave por 20 min. a 120°C.

Meio 2YT

Peptona de caseína 1,6% (p/v);

Extrato de levedura 1,0% (p/v);

NaCl 0,5% (p/v).

Ajustar o pH para 7,2 com NaOH e esterilizar em autoclave por 20 min a 121°C.

SOB

Peptona de caseína 2,0% (p/v);

Extrato de levedura 0,5% (p/v);

NaCl 0,05%;

KCl 2,5 mM.

Ajustar o pH para 7,2 com NaOH e esterilizar em autoclave por 20 min a 121°C. Deixar esfriar, e em seguida adicionar MgCl₂ 10 mM (já em solução esterilizada por filtração) ao meio.

SOC

Meio SOB adicionado de glicose (já em solução esterilizada por filtração) a uma concentração final de 20 mM.

3.2. Meios de cultura para *T. cruzi*

Meio LIT

NaCl	0,4%
KCl	0,04%
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 aquecido a 60°C 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 0,22 μ m. Após a esterilização do meio foram adicionados o soro fetal bovino já inativado (Gibco – BRL) e os antibióticos ampicilina (100 μ g/mL) e estreptomicina (30 μ g/mL), esterilizados por filtração através de filtro Millipore 0,22 μ m.

3.3. Meios de cultura para células L6

3.3.1. Solução de Antibióticos

A solução utilizada continha uma mistura dos antibióticos ampicilina e estreptomicina. Os antibióticos foram usados em uma concentração final de: ampicilina 100 μ g/mL; estreptomicina 30 μ g/mL.

A solução foi esterilizada por filtração através de filtro Millipore 0,22 μ m, distribuída assepticamente em alíquotas de 0,5 mL e armazenada a – 20°C.

3.3.2. Meio DMEM

Meio DMEM (Gibco BRL #12100-046) 13,4 g; Piruvato de sódio 0,11 g; Bicarbonato de Sódio 3,7 g; Água destilada qsp. 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, 22 μ m. Após a esterilização do meio, o soro fetal bovino (Gibco BRL) e a solução de antibiótico (3.3.1) foram adicionados. Em seguida, o meio foi distribuído assepticamente em garrafas previamente esterilizadas e armazenado a 4°C.

3.3.3. Verseno (EDTA)

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

3.3.4. Tripsina

Trypsina 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.

4. Antibióticos

Ampicilina (1000X): 100 mg/mL em H₂O Milli Q.

Canamicina (1000X): 30 mg/mL em H₂O Milli Q.

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

5. Soluções e Tampões

PBS (5 X)

NaCl 685,0 mM;

Na₂HPO₄ 35,0 mM;

KCl 13,5 mM;

KH₂PO₄ 7,5 mM

Tampão TB para células competentes

Pipes 10 mM;

MnCl₂ 55 mM;

CaCl₂ 15 mM;

KCl 250 mM.

Dissolver todos os sais exceto o MnCl₂; ajustar o pH para 6,7 com KOH. Em seguida, adicionar o MnCl₂ e esterilizar por filtração através de filtro Millipore 0,22 µm; estocar a 4°C.

IPTG

Solução estoque 1 M: 238,21 mg/mL em H₂O Milli Q.

A solução foi esterilizada por filtração através de filtro Millipore 0,22 µm, aliqüotada e armazenada a -20 °C.

Tampão de Lise (1X)

Tris HCl (pH 6,8) 80 mM; Sacarose 12%; SDS 4%; β-Mercaptoetanol 10%; Azul de Bromofenol 0,01%.

O tampão foi aliqüotado em microtubos de 1,5 mL e armazenados a -20 °C.

6. Soluções para extração de DNA plasmidial

Solução I

Tris HCl 25 mM pH 8,0; EDTA 10 mM.

Esterilizar em autoclave por 20 min a 121°C.

Solução II

NaOH 0,2 M; SDS 1%.

Solução III

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

7. Soluções para géis SDS-PAGE

Gel separador 13%

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

Gel separador 8%

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

Gel concentrador 4%

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

Tampão de Corrida Tris-Glicina (5X)

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

Tampão de Amostra (2X)

Tris HCl (pH 6,8) 0,16 M; Sacarose 24%; SDS 4%; β -Mercaptoetanol 4%; Azul de Bromofenol 0,05%.

O tampão foi aliquotado em tubos de 1,5 mL e armazenados a -20 °C.

Solução Corante – Coomassie blue

Coomassie Blue R250 0,25%; Metanol 50%; Ácido acético glacial 10%.

Solução Descorante/Fixadora

Metanol 50%; Ácido acético glacial 10%

8. Soluções para eletroforese em géis de agarose

Tampão TBE (10X)

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

Tampão de amostra (10X)

TBE 10X; Glicerol 50%; Azul de Bromofenol 0,01%; Xileno Cianol 0,01%

Tampão MOPS/EDTA (10X)

MOPS 0,2M; Acetato de Sódio 50mM; EDTA (pH 8,0) 10mM

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

Tampão de Amostra para eletroforese desnaturante

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

Brometo de Etídeo

Solução estoque: 10 mg/mL em H₂O Milli Q

9. Tampões utilizados na preparação de extrato enriquecido nuclearNKM (1X)

HEPES-KOH pH7,0	10mM
NaCl	0,14M
KCl	5mM
MgCl ₂	1,5mM

TENM2 (1X)

Tris-HCl pH 7,4	10mM
NaCl	10mM
MgCl ₂	1mM
MnCl ₂	1mM
β-Mercaptoetanol	5mM

XBE2

HEPES-KOH pH 7,7	10 mM
KCl	0,1 M
MgCl ₂	2 mM
CaCl ₂	0,1 mM
EGTA	5 mM

MÉTODOS

10. Manutenção das culturas

10.1. *Trypanosoma cruzi*

As células epimastigotas foram mantidas em cultura de 8 mL de meio LIT (Liver Infusion Tryptose) a uma temperatura de 28°C. A manutenção da cultura foi feita com repiques em intervalos de uma semana, utilizando 20% do inóculo. As culturas de tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi* foram mantidas em cultura de células L6, e foram recolhidos diariamente, centrifugados e congelados em soro fetal bovino contendo 10% de DMSO a -80°C em nitrogênio líquido.

10.2. 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 descrito a seguir: o meio DMEM suplementado utilizado para a multiplicação foi retirado e descartado, 2 mL de solução de verseno contendo 1 % de tripsina foram adicionados às garrafas e as células foram mantidas nesta solução à temperatura ambiente por aproximadamente 30 s. Após este período, a solução de verseno foi retirada e descartada e as células incubadas a 37°C por 10 min para que descolassem da garrafas. Em seguida, 2 mL de meio DMEM suplementado foram adicionados em cada cultura para homogeneização das células e 500 µL de suspensão de células foram inoculadas em garrafas de 25 cm² (Corning) contendo 5 mL de meio DMEM suplementado. As células foram incubadas a 37°C evitando-se que as mesmas entrassem em confluência, realizando-se repiques periódicos. O meio das células L6 foi trocado a cada dois dias para evitar que houvesse a diferenciação destas células.

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

As monocamadas de células L6 foram obtidas por meio do plaqueamento de 4×10^4 células/ cm^2 em garrafas de 80 cm^2 contendo 10 mL de meio DMEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino. Após 48 h de incubação em estufa a 37°C foi obtido aproximadamente 8×10^4 células/ cm^2 .

11. Contagem dos parasitos e curva de crescimento

A densidade de parasitos em suspensão foi determinada pela contagem de células em câmara de Neubauer. Para determinação da curva de crescimento da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi*, parasitos na fase de crescimento exponencial foram inoculados em meio de cultivo LIT de forma a se obter uma concentração de 10^6 células/mL. As contagens foram realizadas até que as células atingissem a fase estacionária de crescimento.

12. Extração de DNA total de *Trypanosoma cruzi*

Para a extração de DNA total de *T. cruzi* foi utilizada uma cultura com um volume de 100 mL e concentração final de $2,0 \times 10^7$ células/mL. A cultura foi submetida a centrifugação de $1500 \times g$ por 15 min. O sedimento obtido foi ressuspenso em PBS 1 X e centrifugado a $1500 \times g$ por 15 min. Esse procedimento foi repetido por duas vezes.

A lise dos parasitos foi realizada pela adição de 1 mL de uma solução de TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA) e incubação a 42°C por 2 h com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteinase K e dodecilsulfato de sódio (SDS) a 0,5% de concentração final.

Em seguida, foi adicionado 1 volume de fenol equilibrado (pH = 8,0). A amostra foi agitada manualmente por cinco min. Após centrifugação a $3400 \times g$ por cinco min, a fase aquosa (superior) foi transferida para um novo tubo Eppendorf® e foi realizada a extração com igual volume de fenol-clorofil e uma extração com igual volume de clorofil. Com uma nova centrifugação a $3400 \times g$ por três min, recuperou-se a fase aquosa que recebeu a adição de 10% do volume de acetato de sódio 3M pH 5,2 e duas vezes o volume de etanol absoluto. A solução foi deixada em temperatura ambiente por 15 min e após nova centrifugação a $3400 \times g$ por 20 min,

o sobrenadante foi descartado e o DNA foi lavado pela adição de 500 µl de etanol a 70% gelado. Após nova centrifugação a 15000 x g por cinco min o sobrenadante foi desprezado e o DNA foi seco e ressuspenso em 50 µl de TE.

13. Reação de polimerização em cadeia (PCR)

Baseado na seqüência do gene de 3456 pb disponibilizada pelo projeto Genoma do *Trypanosoma cruzi* (GenBank – número de acesso AAHK00000000), oligonucleotídeos específicos para o gene da subunidade TcSCC3 foram desenhados e sintetizados para a amplificação de dois fragmentos correspondendo às regiões 5' e 3' do gene. Com a utilização desses oligonucleotídeos, foram realizados experimentos de PCR com o DNA genômico de *Trypanosoma cruzi* para a amplificação dos fragmentos gênicos.

No fragmento TcSCC3/5' o oligo senso foi sintetizado com o tamanho de 30 nucleotídeos e com a temperatura de anelamento no DNA genômico de *T. cruzi* de 64 °C, adicionando o sítio para a enzima de restrição *Bam*HI, enquanto o oligo anti-senso foi sintetizado com o tamanho de 28 nucleotídeos e com a temperatura de anelamento no DNA genômico de 64 °C e adicionando o sítio para a enzima de restrição *Hind*III (Tabela 1).

Por sua vez, no fragmento TcSCC3/3' o oligo senso foi sintetizado com o tamanho de 29 nucleotídeos e com a temperatura de anelamento de 64 °C no DNA genômico, adicionando o sítio para a enzima de restrição *Hind*III, enquanto o oligo anti-senso foi sintetizado com o tamanho de 31 nucleotídeos e com a temperatura de anelamento de 66 °C no DNA genômico, adicionando o sítio para a enzima de restrição *Sa*II (Tabela 1).

Tabela 1. Oligonucleotídeos sintetizados para a amplificação do gene TcSCC3.

Primer	Características	Sequência (5' – 3')	Tamanho (mer)	Tm*
PR172	TcSCC3 primer 3' + sítio <i>SaI</i>	ACGCGTCTGACTAATCGTACTCCTGCGTGG	29	64
PR273	TcSCC3 primer 5'+ sítio <i>Bam</i> HI	CGCGGATCCATGGCTGGAAAACGCAAGACG	30	64
PR274	TcSCC3 primer 5'l + <i>Hind</i> III	TTACAAGCTTGGAGCAGGTGGCACGGAT	28	64
PR275	TcSCC3 primer 3'l + <i>Hind</i> III	CTCCAAGCTTGTAACGCCTTGA ACTCCATC	31	66

*Tm calculado no anelamento com o DNA genômico do *T. cruzi*

Para a amplificação do fragmento correspondente à região 5' do gene *TcScC3* o sistema da PCR foi realizado com o volume final de 50 µL constituído por 50 ng de DNA genômico da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi*, 1,5mM de MgCl₂, 0,1 µM de dNTP's, 20 picomoles de cada primer e 2,5 U da enzima *Taq* polimerase (Invitrogen).

Para a amplificação do fragmento correspondente à região 3' o sistema PCR foi realizado em volume final de 30 µL constituído por 50 ng de DNA genômico da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi*, 2mM de MgCl₂, 0,1 µM de dNTP's, 20 picomoles de cada primer e 2,5 U da enzima *Taq* polimerase (Invitrogen).

As amostras foram amplificadas em um termociclador (BioRad). A temperatura de anelamento foi calculada 2°C abaixo da menor Tm dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação.

Os parâmetros de amplificação adotados foram:

1. Desnaturação inicial: 94°C/ 1 min.
2. Desnaturação: 94°C/ 30 s.
3. Anelamento: temperatura de cada par de oligonucleotídeos (tabela 1)/ 30 s.
4. Extensão: 72°C/ 40 s.
5. Repetição das etapas 2 a 4 por 30 vezes.
6. Extensão final: 72°C/ 1 min.

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,0% e visualizados após o tratamento com brometo de etídio 0,22 µg/mL, em sistema de fotodocumentação BioRad Universal Hood II (BioRad).

14. Clonagem do DNA amplificado

Os produtos de PCR foram purificados a partir de géis de agarose, depois da separação eletroforética, usando o kit GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) e clonados diretamente no vetor de pGEM-T-Easy (Promega) conforme o protocolo fornecido pelo fabricante. Os produtos de PCR foram ligados ao vetor de clonagem pGEM-T-Easy separadamente. A ligação, feita na presença da T4 DNA ligase, foi realizada conforme descrito o item 18. Em seguida, as ligações pGEM-T-Easy-*TcSCC3/5'* e pGEM-T-Easy-*TcSCC3/3'* foram transformadas em células de *E. coli* DH5α conforme descrito no item 19. As análises de digestão com enzimas de restrição dos plasmídeos purificados a partir de clones brancos selecionados confirmaram as ligações.

Os fragmentos 5' e 3' do gene *TcScc3* foram clonados separadamente, e, em seguida, a região 3' foi subclonada no plasmídeo contendo a região 5' visando a montagem do gene *TcSCC3* completo para ser submetidos ao seqüenciamento. Os demais experimentos prosseguiram apenas com o fragmento 5'.

15. Digestão de DNA com enzimas de restrição

Para a digestão dos plasmídeos ou produtos de amplificação com enzimas de restrição foram feitas misturas de reação com volumes totais de 15 µL (no caso de análise de restrição) ou 70 µL (no caso de preparação dos vetores e insertos para os experimentos de subclonagem, digerindo-se 3,0 µL ou 10 µL de DNA respectivamente, por períodos de 2 a 4 h a 37°C. Para a digestão do fragmento 5' do gene *TcSCC3* foram utilizadas as enzimas de restrição *Bam*HI (Biolabs) e *Hind*III (Biolabs). Para a digestão do fragmento 3' do gene *TcSCC3* foram utilizadas as enzimas de restrição *Hind*III e *Sal*I (Boehringer). As enzimas foram utilizadas com seus respectivos tampões de reação, com adição ou não de BSA de acordo com as recomendações do fabricante.

16. Purificação de fragmentos de DNA de géis de agarose

Em todas as clonagens, tanto o fragmento do vetor como o inserto, foram fracionados em géis de agarose preparativos (0,8%). As bandas de interesse foram cortadas e colocadas em tubos de 2,0 mL e o DNA purificado utilizando-se o kit GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), seguindo o protocolo do fabricante.

17. Ligação de fragmentos de DNA

As ligações foram feitas com volumes totais de 15 µL, 30 µL ou 50 µL, de acordo com o ensaio a ser realizado. Foi empregada 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.

18. Preparação e transformação de células competentes das cepas DH5α e BL21 de *Escherichia coli*.

Para as transformações com os produtos de ligação ou para a expressão dos genes utilizaram-se células competentes de *E. coli* DH5α e BL21 preparadas segundo o método de Inoue et al. (1990) com uma eficiência de transformação de 10⁷ a 10⁸ colônias por µg de DNA. Uma alíquota de 7,5 µL da reação de ligação foi adicionada a 200 µL de células competentes e incubadas em gelo por 1 h. Aplicou-se um choque térmico a 42°C por dois min e adicionou-se 800 µL de meio SOC. Cultivou-se as bactérias por 1 h a 37°C e 200 µL foram plaqueados em meio LB Ágar contendo o antibiótico ampicilina (100 µg/mL) ou canamicina (30 µg/mL), de acordo com o vetor utilizado. As placas foram mantidas de 14-18 h a 37°C.

19. Extração de DNA plasmidial dos clones recombinantes

Para extração de DNA plasmidial, clones selecionados foram inoculados em 3 mL de meio LB ou meio 2YT contendo o antibiótico de seleção e incubados sob agitação a 220 rpm a 37° C por 18 h. Para a extração de DNA plasmidial (Miniprep) foram utilizados 2 mL da cultura por meio do método de lise alcalina (BIMBOIN; DOLY, 1979; SAMBROOK et al., 1989).

Para a obtenção de DNA plasmidial em maior escala utilizou-se o kit PureLink™ *HiPure Plasmid DNA Purification Midiprep* Kit (Invitrogen) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

20. Sequenciamento de DNA

O sequenciamento do gene *TcSCC3* clonado no vetor pGEM-T-Easy foi realizado por meio do método enzimático (Sanger) no Laboratório de Biologia Molecular – UnB, utilizando o sequenciador MegaBace.

21. Expressão em *E. coli* BL21

Para realizar a indução da produção de proteínas a partir de culturas contendo os plasmídeos de interesse, a cepa *E. coli* BL21 competente foi transformada com plasmídeos pET-28a(+) ou pET-21a(+) da série pET (Novagen). Com colônias isoladas foi feito um pré-inóculo 3-5 mL de meio 2YT + antibiótico de seleção, que foram incubados sob agitação a 37°C por 18 h. Foram adicionados 1:250 do pré-inóculo em um frasco contendo o meio de cultura 2YT + antibiótico de seleção, em uma proporção de no máximo 1/5 do volume do frasco (foram utilizados 100 mL de meio de cultura). A cultura foi incubada a 37°C sob agitação até atingir $O.D._{600} = 0,6-0,8$. Uma alíquota de 2 mL da cultura foi retirada a fim de processar uma amostra não induzida. A indução foi realizada adicionando-se 1mM de IPTG na cultura e incubando-a sob agitação a 37°C durante o período de 2 a 3 h. A cultura foi então centrifugada a 6000 rpm (2400 x g) por 10 min, lavada duas vezes com PBS 1 X e o sedimento ressuspensão em tampão de lise 1x. As amostras foram analisadas em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10%.

22. Gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O gel desnaturante de poliacrilamida segue o protocolo original de Laemmli (1970). As placas utilizadas possuem as dimensões 16,0 x 16,5 x 0,3 cm. O gel foi polimerizado pela adição de 100 µL de persulfato de amônio 10% e 10 µL de TEMED a cada 10 mL de solução do gel separador (8 ou 13%). A solução separadora foi aplicada às placas e coberta com 500 µL de butanol com a finalidade de impedir o contato do gel com o ar. Após a polimerização o butanol foi retirado, as placas foram lavadas com água destilada e foram adicionados 5 mL da solução do gel concentrador (4%) com 50 µL de persulfato de amônio 10% e 5 µL de TEMED, adicionando-se em seguida o pente para a formação dos poços. Anteriormente à aplicação ao gel as amostras foram ressuspensas em tampão de lise 1x ou em tampão de amostra 2x, fervidas por três min e aplicadas no gel. As eletroforeses foram realizadas a uma voltagem constante de 200V à temperatura ambiente. Após a eletroforese, a coloração do gel foi realizada com solução de Coomassie Blue R-250, incubando-o sob agitação a temperatura ambiente por 2 h, em seguida o gel foi descorado com solução descorante para visualização das bandas.

23. Produção de anticorpos policlonais anti-TcSCC3 e anti-TcSMC1 em coelhos.

Para a produção de anticorpos policlonais em coelhos, as proteínas de *T. cruzi* TcSCC3 e TcSMC1 não purificadas, expressas em *E. coli* BL21, foram isoladas a partir do gel SDS-PAGE. Para isso, o gel SDS-PAGE foi feito em concentrações de 8% (gel separador) e 4% (gel concentrador). Pentes com poços de 4,5 cm de comprimento e 1,3 cm de altura foram confeccionados e em cada poço foram inseridos 50µL do lisado do extrato total de *E. coli* BL21 contendo as proteínas de interesse induzidas. Após a corrida o gel foi corado e descorado e a banda equivalente às proteínas em estudo (TcSCC3 ou TcSMC1) foi cortada do gel e macerada em PBS 1 X. Cada proteína foi então injetada em um coelho de cerca de 1,5 kg. Anteriormente à primeira imunização, uma alíquota de 5 mL sangue foi retirada de orelha de cada coelho, centrifugada a 4000 x g por 20 min e soro (sobrenadante) pré-imune foi recolhido e mantido a -70°C para ser utilizado como controle. As imunizações foram realizadas por quatro vezes em um intervalo de

aproximadamente 15 dias. As injeções foram realizadas abaixo da pele do animal na região interescapular e o material foi injetado utilizando uma pressão e uma velocidade moderadas.

Quarenta e cinco dias após a primeira injeção foi feita uma punção cardíaca onde foram retirados aproximadamente 50 mL de sangue de cada coelho visando a obtenção dos anticorpos produzidos no organismo dos animais. A punção cardíaca foi realizada utilizando-se uma solução de ketamina/xilazina como anestésico. A área acima da região do processo xifóide foi limpa com etanol 70%, a seringa de 60 mL com agulha de 18-25G, 1.5-in, contendo 1 mL de heparina (1 mg), foi inserida à esquerda do processo xifóide na base do osso esterno formando um ângulo de 30° a 45° e o sangue foi coletado delicadamente. O sangue coletado foi centrifugado a 4000 x g por 20 min. O sobrenadante foi aliqotado em tubo de 1,5 mL e mantido a -70°C até o momento da purificação dos anticorpos.

24. Western blot

24.1. Transferência de proteínas para a membrana de nitrocelulose

A transferência de proteínas presentes no gel SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose foi realizada por meio da utilização do aparelho iBlot Gel *Transfer Device System* (Invitrogen). A transferência foi realizada de acordo com as instruções do fabricante, por um período de sete min.

24.2. Incubação com anticorpos

Após realizada a transferência, a membrana foi fixada em Metanol 10% e Ácido Acético 7% durante 15 min. Em seguida, foi adicionado leite desnatado (Molico) 5% (p/v) dissolvido em PBS 1 X, que permaneceu saturando a membrana por um período de 2 h. Após a lavagem com PBS por cinco min, a membrana foi incubada com o anticorpo primário (anti-SCC1, anti-SCC3 ou anti-SMC1 de *Trypanosoma cruzi*) na diluição de 1:250 (anti-SCC1) ou na diluição de 1:500 (anti-SCC3 e anti-SMC1) em PBS 1 X com 1% de leite desnatado (p/v) por, no mínimo, 4 h sob agitação. Em seguida foram realizadas três lavagens da membrana com PBS 1 X, tendo cada lavagem uma duração de 15 min. Após a lavagem, a membrana foi

incubada com o anticorpo secundário (cabra anti-coelho acoplada à fosfatase alcalina), na diluição de 1:1000 em PBS 1 X contendo 1% de leite desnatado, por 2 h sob agitação. Em seguida a membrana foi novamente lavada por três vezes com PBS 1 X.

24.3. Revelação

A revelação foi feita adicionando-se o tampão APB por um período de um min, incubando a membrana com a solução de revelação BCIP/NBT Kit (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. A membrana permaneceu sob agitação com a solução de revelação até o aparecimento das bandas.

25. Preparação de Extrato Enriquecido Nuclear de *T.cruzi*

As células de uma cultura em fase log ($0,8 - 1,0 \times 10^7$ células por mL) foram coletadas e centrifugadas a $5.000 \times g$ por 15 min. O sedimento de células foi lavado com NKM 1x em um volume de 1/3 do volume da cultura inicial e centrifugado a $5.000 \times g$ por 15 min. Em seguida, as células foram ressuspensas no tampão TENM2 adicionado de inibidores de proteases (Roche) em um volume de 8 vezes o volume das células ($3-5 \times 10^9$ células em 10 mL do tampão) e incubadas no gelo por cinco min. O inchaço das células foi checado em microscopia ótica.

Em seguida foi adicionado NP40 para uma concentração final de 0,5% e as células foram homogeneizadas em Dounce de vidro com 10-15 movimentos. A lise das células foi confirmada por microscopia ótica. Foram adicionados 1/7 do volume de sacarose 2M em TENM2 para restaurar a osmolaridade. O “colchão” de sacarose a 20% foi adicionado em TENM2 no fundo do tubo e centrifugado a $2.000 \times g$ por 10 min a 4°C para sedimentar os núcleos.

Após a centrifugação o sobrenadante (extrato citoplasmático) foi retirado cuidadosamente e transferido para outro tubo. O sedimento (extrato enriquecido nuclear) foi ressuspenso em tampão XBE2 adicionado de inibidores de proteases. Os núcleos foram lisados passando o sistema por uma agulha G21 de 10-20 vezes. Foi adicionado 1mM de CaCl_2 e nuclease microcócica (15.000U/mL) e incubado a 37°C por 1 h. Em seguida foram adicionados 20mM de EGTA e a amostra foi centrifugada a $12000 \times g$ por 10 min. O sobrenadante (extrato enriquecido nuclear

solúvel) foi retirado e colocado em um novo tubo. O sedimento (extrato enriquecido nuclear insolúvel) foi armazenado e ressuspensão em 0,5% de SDS mais Tampão de Amostra 2x no momento da análise em gel SDS-PAGE. Os extratos nucleares e o extrato citoplasmático foram quantificados pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) e após a quantificação utilizou-se 100 µg de extrato citoplasmático, 100 µg de extrato enriquecido nuclear insolúvel e 100 µg de extrato enriquecido nuclear solúvel para a análise em gel SDS-PAGE e futuro experimento de *western blot*

26. Sincronização de células de *Trypanosoma cruzi* epimastigotas com hidroxauréia

Foram inoculados 100 mL de meio LIT com uma cultura de *T. cruzi* e o crescimento foi acompanhado até a cultura atingir densidade de $7,0 \times 10^6$ a $9,0 \times 10^6$ células por mL. A cultura foi checada para garantir que a mesma se encontre em fase log (células em divisão). Foram adicionados 20mM de hidroxauréia e a cultura foi incubada a 28°C por 24 h, tendo uma alíquota de 2 mL retirada a cada 6 h para efetuar-se a contagem de células e garantir que a cultura se encontrava estacionada. Em paralelo foi feita uma cultura controle idêntica, onde não foi adicionada a hidroxauréia.

Após 24 h a hidroxauréia foi retirada com três lavagens em PBS 1 X, centrifugando a cultura a $2.740 \times g$ por 15 min. As células foram então ressuspensas em meio LIT e incubadas a 28°C por um período de 24 h. No tempo zero e a cada 2 h subsequentes, uma alíquota de 2 mL foi retirada para análise das amostras pela técnica de Imunofluorescência.

27. Imunofluorescência

As células de *T. cruzi* utilizadas nos ensaios de imunofluorescência foram sedimentadas por meio de centrifugação em um período de 3 min a $3.400 \times g$ e o sobrenadante descartado. O sedimento foi então lavado com PBS 1 X e centrifugado por 3 min a $3.400 \times g$. A lavagem foi repetida por mais 2 vezes. Em seguida, o sedimento foi ressuspensão em 70 µL de PBS 1 X mais 1% de BSA, e dividido em duas lâminas (uma positiva e outra negativa). Após secas as lâminas foram fixadas com paraformaldeído 4% em PBS 1 X.

Foi adicionado Triton 0,2% diluído em PBS 1 X, visando o aumento da permeabilidade das células. As lâminas foram então incubadas à temperatura ambiente por 15 min, até serem lavadas com PBS 1 X para retirar o excesso de Triton. Foram adicionados 500µL de leite desnatado 5% diluído em PBS 1 X, que permaneceu saturando as amostras por um período de 2 h a 4°C. O excesso de leite foi lavado com PBS 1 X e, em seguida, o anticorpo primário (1:200 para anti-SCC1), diluído em leite desnatado 1%, foi adicionado na lâmina positiva. As lâminas foram incubadas a 4°C durante a noite. O excesso de anticorpo primário foi lavado com PBS 1 X por três vezes, cada lavagem com duração de 5 min. Em seguida, o anticorpo secundário (Alexa Fluor 488, *goat anti-rabbit IgG*, Invitrogen), diluído em leite desnatado 1% em uma proporção de 1:400, foi adicionado às amostras positivas e negativas. As lâminas permaneceram incubadas por 1 h a temperatura ambiente. As lâminas foram então lavadas três vezes com água destilada, cada lavagem com duração de 5 min.

Após as lâminas secarem, foram adicionados 5µL de Prolong (Invitrogen) (que estabiliza e prolonga a fluorescência do anticorpo secundário) contendo DAPI. Uma lamínula foi inserida sob a lâmina que foi, logo em seguida, incubada no escuro por um período de 36 h à temperatura ambiente.

As lâminas foram então analisadas em Microscopia Confocal de Imunofluorescência (*Leica Microsystems*)

27.1. Quantificação dos sinais do anticorpo anti-TcSCC1 obtidos nos ensaios de imunofluorescência

O anticorpo anti-TcSCC1 foi produzido através da clonagem do gene *TcSCC1* no vetor de expressão pET-28a(+) seguida pela expressão da proteína de 62 kDa por indução com IPTG. A proteína expressa em *E. coli* BL 21 (pLysE) foi purificada em géis SDS-PAGE e utilizada para a imunização de um coelho. O soro anti-TcSCC1 foi coletado e o anticorpo foi purificado através de ensaios de *western blot* utilizando tiras de membrana de nitrocelulose contendo a proteína TcSCC1 recombinante (LIMA, B.D.; MARTINS DE SÁ, C; comunicação pessoal) A quantificação dos sinais obtidos pelo anticorpo primário anti- TcSCC1 e pelo anticorpo secundário Alexa Fluor 488, *goat anti-rabbit IgG* (Invitrogen), nos testes revelados por imunofluorescência foi feita por densitometria utilizando-se o programa *ImageJ* (Disponível em <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Embora as imagens analisadas

tenham sido obtidas de ensaios diferentes, durante as aquisições, estas foram ajustadas igualmente com o mesmo tempo de exposição, resolução e níveis de brilho e contraste. Os dados adquiridos se referem à densidade relativa, que são medidas da intensidade de pixels na escala de verde dividida pelo número de pixels totais de uma área fixa. Esses valores foram plotados num gráfico de barras usando o programa de computador Excel 2007 (Microsoft).

28. Infecção com *T. cruzi*

28.1. Infecção com *T. cruzi* em monocamadas de células L6 para obtenção das formas amastigotas

As células L6 foram cultivadas em garrafas de 80 cm². Após o período de incubação de 48 h, as células foram expostas aos parasitos nas formas tripomastigotas, na proporção de 10 parasitos para cada célula L6 (8×10^4 células/cm²). As células foram então incubadas a 37°C e a 4% de CO₂ por 24 h. Como controle, foram utilizadas garrafas com uma monocamada de mesma densidade celular e mesmo meio, não expostas à suspensão de parasitos.

28.2. Infecção com *T. cruzi* das monocamadas de células L6 para ensaios de Imunofluorescência

28.2.1. Em lamínulas

As células foram crescidas em placas de 24 orifícios contendo lamínulas de aproximadamente 2 cm². Após o período de incubação de 72 h, as células foram expostas à suspensão de parasitos (células tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*) na proporção de aproximadamente 10 parasitos para cada célula hospedeira. As infecções foram mantidas na placa por períodos de 24 h, 48 h e 72 h.

28.2.1.1. Parasitos extracelulares no sobrenadante das placas

Em seguida, o meio contendo os parasitos extracelulares foi retirado dos poços, centrifugado a 2500 x g por cinco min e incubados à temperatura ambiente por 20 min, visando a separação dos parasitos extracelulares tripomastigotas e restos celulares. O sobrenadante (fração contendo os tripomastigotas) foi coletado e centrifugado a 2500 x g por cinco min, e após a centrifugação o sobrenadante

desprezado. Os parasitos foram, em seguida, fixados em lâminas e processadas de acordo com o item 28, visando a realização do ensaio de Imunofluorescência.

28.2.1.2. Parasitos intracelulares aderidos nas lamínulas

As lamínulas foram lavadas 5 vezes com uma solução de PBS 1 X, a fim de eliminar os parasitos extracelulares e, em seguida, diferentes amostras foram utilizadas em dois experimentos:

- a)** Um grupo de células foi fixado por 20 min com 4% de paraformaldeído diluído em PBS 1X após diferentes períodos de infecção (24, 48 e 72 h). Em seguida, impermeabilizado com 0,25% de Triton X-100 por 20 min e processado conforme o item 27, visando a realização do ensaio de imunofluorescência.
- b)** Outro grupo foi tratado com 20 mM de hidroxauréia para a sincronização das células amastigotas no estágio S da divisão celular. A cultura foi então incubada por 24 h a 37°C e a 4% de CO₂. Após a incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS 1 X para a retirada da hidroxauréia, e fixadas com 4% de paraformaldeído após diferentes períodos de tempo pós-lavagem (0, 1 e 4 h). As amostras foram impermeabilizadas com 0,25% de Triton X-100 por 20 min e processadas de acordo com o item 27 para a realização do ensaio de imunofluorescência.

29. Extração de RNA Total

As células foram crescidas como descrito anteriormente (itens 10 e 28). As culturas utilizadas apresentavam-se em fase exponencial de crescimento, com densidade de aproximadamente 10⁷ células/mL de cultura. As células foram coletadas por centrifugação, lavadas três vezes com PBS 1 X gelado (livre de RNase) e ressuspensas em TRIzol® (Invitrogen). Em seguida, a extração do RNA total foi realizada conforme especificações do fabricante: às amostras adicionou-se clorofórmio misturando-se vigorosamente. A mistura foi centrifugada (10.000 x g/15 min/ 4°C) e a fase aquosa resultante foi transferida para um tubo novo. Adicionou-se isopropanol e, após 10 min de incubação à temperatura ambiente, a amostra foi novamente centrifugada (10.000 x g/ 15 min/ 4°C). O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com etanol 70% (7.000 x g/ 5 min/ 4°C). Em seguida deixou-se o sedimento secando à temperatura ambiente e, posteriormente, o mesmo foi ressuspensado em 40 µL de água Milli Q. As amostras de RNA total obtidas foram

quantificadas por espectrofotometria (GeneQuant – Pharmacia) e analisadas por eletroforese em gel de agarose desnaturante.

30. Eletroforese Desnaturante de agarose

Os géis de agarose para análise das amostras de RNA foram realizados na concentração de 1% em tampão MOPS (item 8) diluído para 1X e formaldeído 2%. O volume das amostras foi ajustado para 5 µL e de tampão de amostra 25 µL (item 8) foram adicionados. Após incubação a 65°C por 15 min, 1µL de uma solução de brometo de etídeo 1 mg/mL foi adicionado às amostras e estas aplicadas no gel. Após a corrida, 40 V constantes, o gel foi analisado em transluminador de UV.

31. Tratamento do RNA total com DNase I

Após a quantificação das amostras por espectrofotometria (GeneQuant – Pharmacia Biotech) e a verificação da integridade do RNA total por eletroforese em gel desnaturante de agarose 1% livre de RNase, 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 1X; 2U da enzima DNase I. O tratamento foi realizado a 37 °C por 30 min.

32. RT-PCR semi-quantitativa

A reação de síntese da primeira fita de cDNA foi realizada a partir de 2 µg de RNA total das formas amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* cultivadas de acordo com as condições especificadas nos itens 10 e 28. A essa quantidade de RNA total foi adicionado 0,5 µg de Random Primer (Promega), sendo a mistura 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 25U e 200U da enzima transcriptase reversa do vírus Moloney Murine Leukemia (M-MLV – Promega). Em seguida os tubos foram incubados a 37°C por 60 min.

Uma alíquota correspondente a 2 µL da reação de síntese de cDNA foi submetida a reação de amplificação utilizando um volume final de 30 µL contendo:

tampão *Taq* DNA polimerase 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,1 mM dNTPs, 0,3 µM de cada oligonucleotídeo (Tabela 2), 1,5 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% e corados com 0,22 µg/mL de brometo de etídeo e visualizados em sistema de fotodocumentação BioRad Universal Hood II (BioRad).

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

1. Desnaturação inicial: 94°C/ 1 min.
2. Desnaturação: 94°C/ 30 s.
3. Anelamento: temperatura de cada par de oligonucleotídeos (Tabela 2)/ 30 s.
4. Extensão: 72°C/ 40 s.
5. Repetição das etapas 2 a 4 por 30 vezes.
6. Extensão final: 72°C/ 1 min.

Tabela 2. Oligonucleotídeos sintetizados para a amplificação dos genes do complexo Coesina em ensaios de RT-PCR semi-quantitavas.

Primer	Características	Sequência (5' – 3')	Tamanho (mer)	Tm
PR400	TcSMC1 primer 5'	GCGGAGCAGCTGTCAGAGTA	20	62
PR401	TcSMC1 primer 3'	TGACCCTCGACCAATGAATG	20	60
PR402	TcSMC3 primer 5'	CACGAACTTGCCGATGAAAAAC	22	64
PR403	TcSMC3 primer 3'	CATTACCCGCAGTCACCTCA	20	62
PR404	TcSCC1 primer 5'	TCTGTGGGCTTTTGTGGATGC	21	64
PR405	TcSCC1 primer 3'	CAGAGGCCTCAGCTTGTTCA	20	62
PR406	TcSCC3 primer 5'	TTGGAGCAGGTGGCACGGAT	20	64
PR324	TcSCC3 primer 3'	CTCAACAACAAAGCCAAGCCAT	22	64
PR196	GAPDH primer 5'	GACGACGATCCACTCGTACAC	21	62
PR407	GAPDH primer 3'	CAGTCGTGCTCGGAATGATG	20	62

33. Quantificação dos níveis de expressão gênica obtidos na PCR.

A análise dos resultados obtidos visando a quantificação dos níveis de expressão dos genes em estudo foi realizada por densitometria, utilizando o programa *Image J*. Os níveis de expressão do gene constitutivo *gapdh* permitiram a normalização dos resultados. A partir dos valores referentes a cada fragmento de

DNA amplificado obtidos por densitometria, foi determinada a razão entre o nível de expressão dos genes da coesina em relação à expressão do gene controle (*gapdh*), para cada uma das condições empregadas. Comparam-se os valores das razões obtidas (gene de interesse / *gapdh*) para cada um dos genes da coesina.

34. Análise da expressão gênica por RT – PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR).

As reações de amplificação foram realizadas com o aparelho 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) em uma reação de 25 µL contendo: 10 µM de cada primer (Tabela 3), 12,5 µL de Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix – UDG (Invitrogen), 0,5 µL de ROX Reference Dye e 2,5 µL do sistema de cDNA. Após a desnaturação inicial a 95°C por dois min as amplificações foram realizadas com 40 ciclos de 95°C por 3 s, seguidos por 60°C por 30 s. Para confirmar a especificidade da amplificação, os produtos da PCR foram submetidos à análise da curva de anelamento. O gene constitutivo de *Trypanosoma cruzi* GAPDH foi utilizado com controle endógeno para as reações de PCR em tempo real. Os experimentos de PCR em tempo real foram realizados em triplicata para todos os genes analisados

Tabela 3. Oligonucleotídeos sintetizados para a amplificação dos genes do complexo Coesina em ensaios de RT-PCR quantitativos em tempo real.

Primer	Características	Sequência (5' – 3')	Tamanho (mer)	Tm
PR400	TcSMC1 primer 5'	GCGGAGCAGCTGTCAGAGTA	20	62
PR401	TcSMC1 primer 3'	TGACCCTCGACCAATGAATG	20	60
PR402	TcSMC3 primer 5'	CACGAACTTGCCGATGAAAAAC	22	64
PR403	TcSMC3 primer 3'	CATTACCCGCAGTCACCTCA	20	62
PR404	TcSCC1 primer 5'	TCTGTGGGCTTTTGTGGATGC	21	64
PR405	TcSCC1 primer 3'	CAGAGGCCTCAGCTTGTTCA	20	62
PR406	TcSCC3 primer 5'	TTGGAGCAGGTGGCACGGAT	20	64
PR324	TcSCC3 primer 3'	CTCAACAACAAAGCCAAGCCAT	22	64
PR196	GAPDH primer 5'	GACGACGATCCACTCGTACAC	21	62
PR407	GAPDH primer 3'	CAGTCGTGCTCGGAATGATG	20	62

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 nucléico (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) o gene *gapdh* foi utilizado como gene endógeno constitutivo para a normalização 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 de base.

Para comparar a expressão de cada gene de interesse com a expressão da *gapdh* a equação $2^{-\Delta CT}$ onde $\Delta CT = (CT \text{ gene de interesse} - CT \text{ controle endógeno})$. As reações foram feitas em triplicata, para todos os genes analisados.

35. Análise estatística dos resultados obtidas na RT-PCR e qRT-PCR

As análises foram realizadas com o auxílio pro programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 13.0. Os dados estão apresentados como médias +/- desvio padrão da média. Para comparações entre dois grupos foi utilizado o teste de t de Student, considerando a variância da amostra (Teste de Levene's). Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes.

RESULTADOS

1. Clonagem do gene para a subunidade SCC3 de *T. cruzi*

Visando a clonagem do gene *TcSCC3*, codificador da subunidade TcSCC3 do complexo Coesina de *Trypanosoma cruzi*, iniciadores específicos foram desenhados e sintetizados a partir de sua sequência disponibilizada por meio do projeto Genoma deste parasito (GenBank - número de acesso AAHK00000000). Como o gene possui tamanho de 3,453 kb, para facilitar a clonagem o gene foi amplificado em dois fragmentos, a região 5' e a região 3', como mostrado na figura 9.

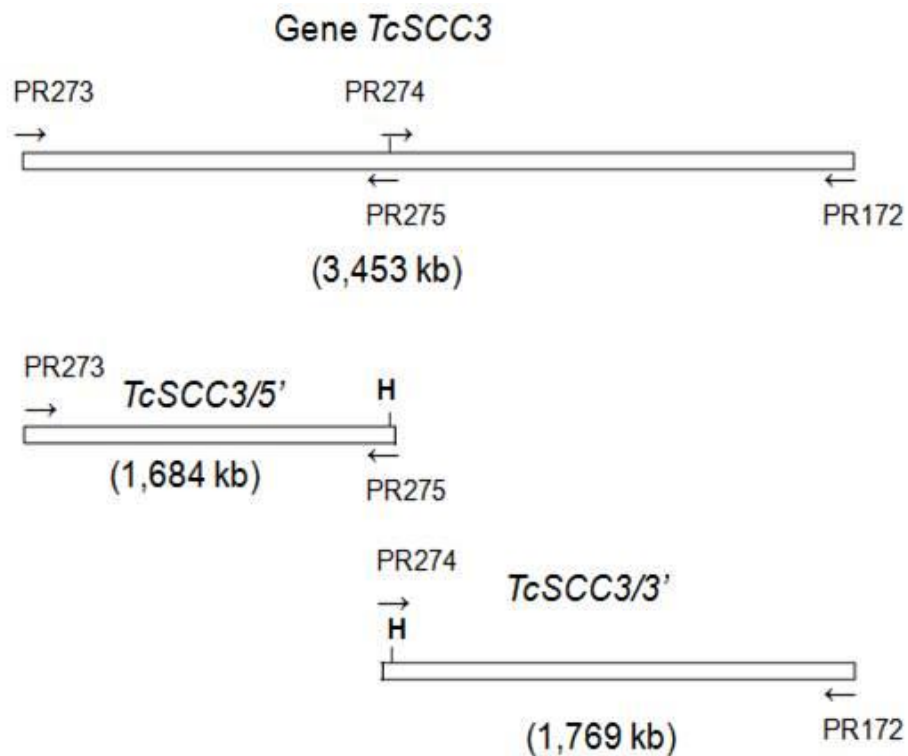


Figura 9. Estratégia para clonagem do gene *TcSCC3*. Os oligos foram sintetizados visando a clonagem de dois fragmentos do gene, *TcSCC3/5'* e *TcSCC3/3'*. H – *HindIII*

Os fragmentos *TcSCC3/5'* e *TcSCC3/3'* após serem amplificados a partir do DNA genômico da cepa Y de *T. cruzi*, por meio da reação de polimerização em cadeia, foram visualizados em gel de agarose evidenciando a presença das bandas no tamanho esperado (Figura 10). Os fragmentos *TcSCC3/5'* e *TcSCC3/3'*

apresentaram o tamanho aproximado de 1,6 kb (Figura 10A) e 1,7 kb (Figura 10B), respectivamente.

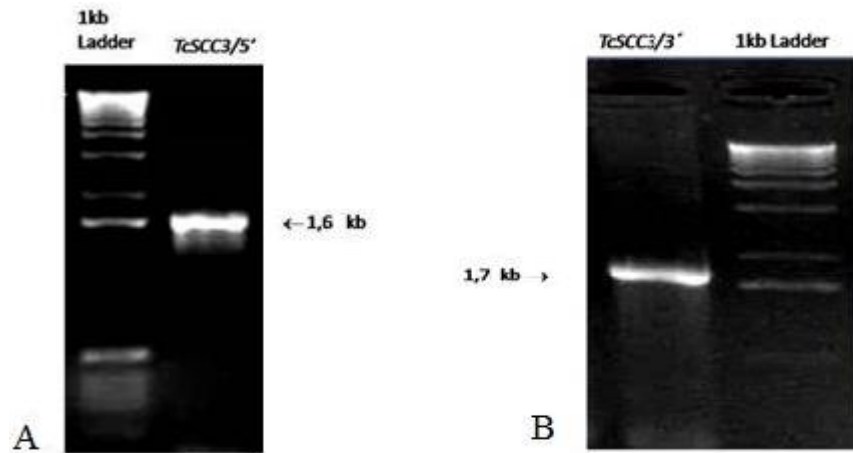


Figura 10. Análise em gel de agarose da amplificação dos genes *TcSCC3/5'* e *TcSCC3/3'* utilizando DNA genômico de *T. cruzi* e iniciadores específicos. A PCR foi realizada utilizando os iniciadores senso e anti-senso de cada fragmento específico. Foram aplicados 10 μ L da reação para visualização no gel. **A** – Amplificação da região *TcSCC3/5'*. **B** – Amplificação da região *TcSCC3/3'*. Análise em gel de Agarose 1,0%

Após a confirmação da amplificação dos genes *TcSCC3/5'* e *TcSCC3/3'*, os produtos de PCR foram clonados separadamente no vetor de clonagem pGEM-T-Easy. Após a digestão com enzimas de restrição dos plasmídeos recombinantes purificados foram liberados fragmentos nos tamanhos esperados: 3,0 kb do vetor e 1,6 kb do inserto para a amostra pGEM-T-Easy-*TcSCC3/5'* (Figura 11A) e 3,0 kb do vetor e 1,7 kb do inserto para a amostra pGEM-T-Easy-*TcSCC3/3'* (Figura 11B).

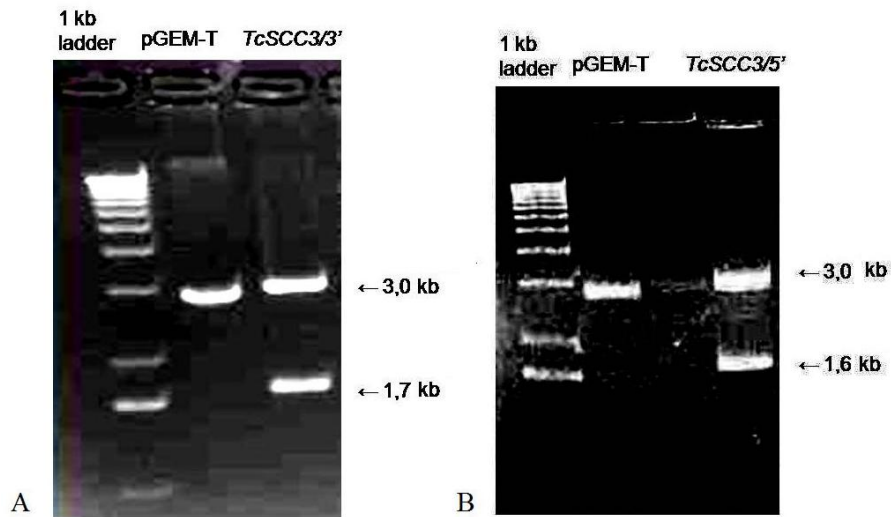


Figura 11. Análise de restrição enzimática de pGEM-T-Easy-*TcSCC3/5'* e pGEM-T-Easy-*TcSCC3/3'*. As clonagens dos genes *TcSCC3/5'* e *TcSCC3/3'* no vetor pGEM-T-Easy foram confirmadas por meio da digestão com *HindIII* e *Sall* (A) e *BamHI* e *HindIII* (B), e analisadas em gel de agarose 1,0%. O vetor pGEM-T-Easy foi linearizado por meio da digestão com *EcoRI*.

Depois de confirmada a clonagem das amostras, o gene *TcSCC3* completo foi montado. Para isso, o fragmento *TcSCC3/3'* foi liberado com as enzimas de restrição *HindIII* e *Sall*, purificado do gel de agarose e, em seguida, ligado ao plasmídeo linear pGEM-T-Easy-*TcSCC3/5'*, digerido com as mesmas enzimas (Figura 12). As análises dos plasmídeos recombinantes purificados confirmaram a ligação, liberando os fragmentos esperados de 3,0 kb do vetor e 3,4 kb do gene *TcSCC3* completo após a digestão com as enzimas de restrição *BamHI* e *Sall* (Figura 13).

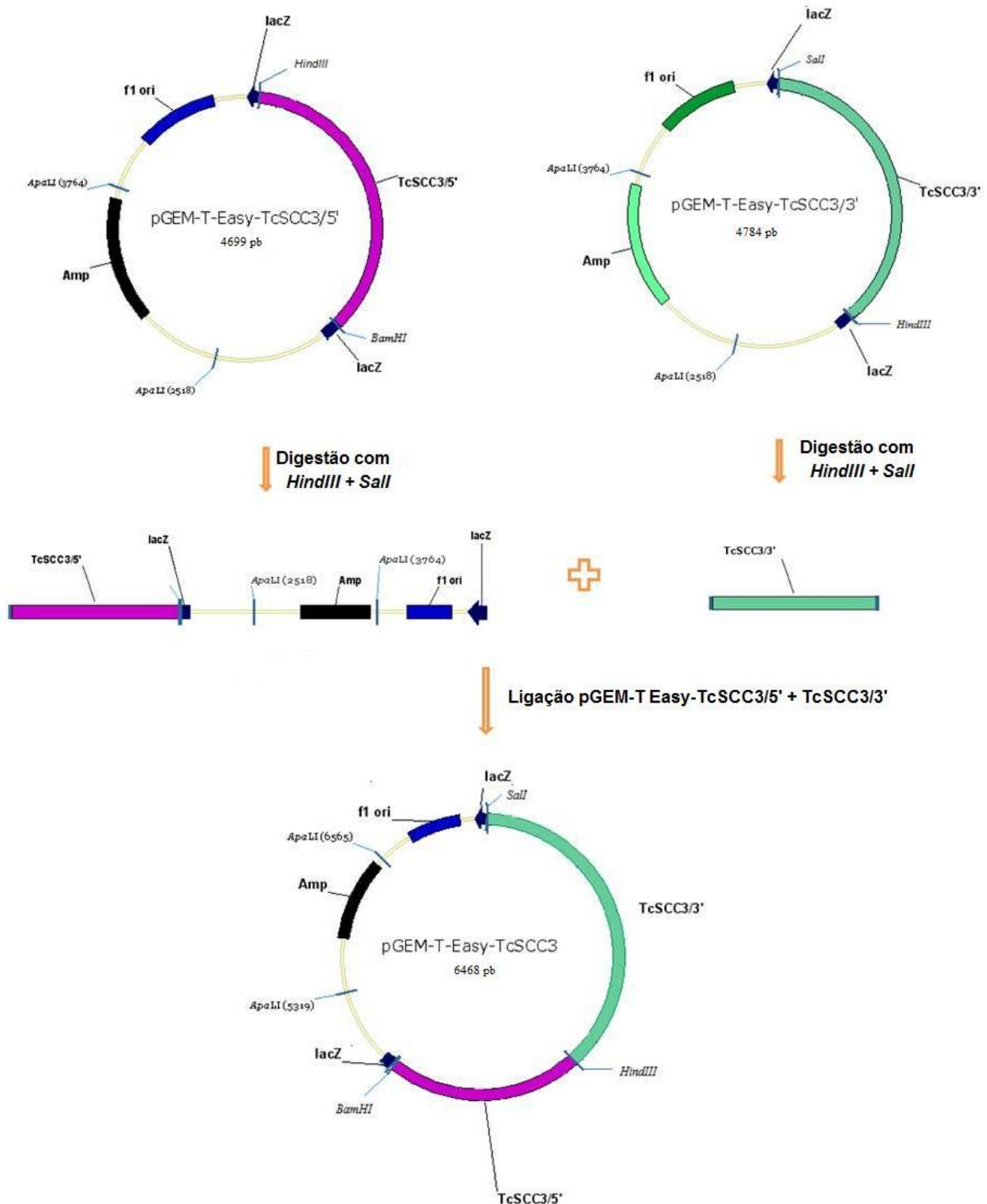


Figura 12. Montagem do gene completo da subunidade TcSCC3. Os fragmentos TcSCC3/3' e TcSCC3/5', após amplificados, foram ligados separadamente ao vetor de clonagem pGEM-T Easy. Em seguida os dois fragmentos foram ligados entre si por meio da seguinte estratégia: o fragmento TcSCC3/3' foi digerido utilizando-se as enzimas de restrição *HindIII* e *Sall*, e purificado do gel de agarose. Em seguida, a amostra TcSCC3/3' foi ligada ao plasmídeo linear pGEM-T-Easy-TcSCC3/5', digerido com as mesmas enzimas de restrição.

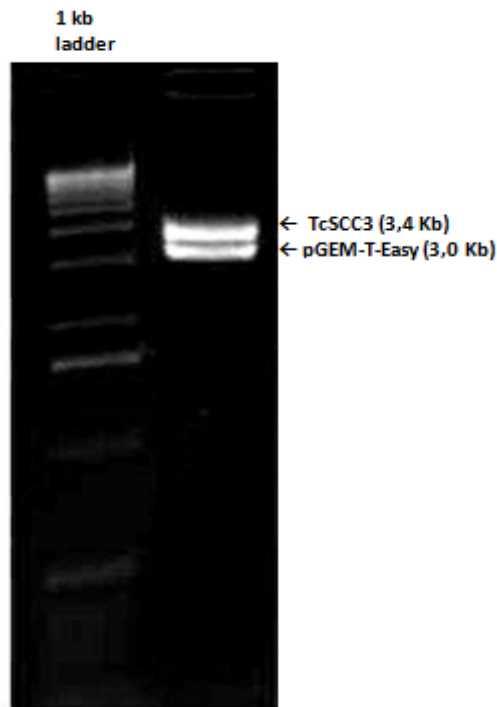


Figura 13. Análise do gene completo *TcSCC3*. A sub-clonagem do fragmento *TcSCC3/3'* e a montagem do gene *TcSCC3* foi confirmada por digestão com *Bam*HI e *Sall*, seguida por eletroforese em gel de agarose 1,0%.

2. Sequenciamento do gene *TcSCC3*

A correta amplificação e clonagem do gene *TcSCC3*, de tamanho equivalente a 3,4 kb, foi confirmada por sequenciamento, onde 1282 pb foram sequenciados nas regiões 5', 3' e interna do gene, cerca de 37,13% do gene completo. A amostra sequenciada apresentou 99% de equivalência com a sequência disponibilizada no banco genômico da subunidade SCC3 do complexo coesina da cepa CL Brener de *T. cruzi*. Os demais 1% equivalem a 16 variações ocorridas em bases de diferentes códons, indicando a existência de variações de bases entre o gene *TcSCC3* da cepa Y de *T. cruzi* e o mesmo gene da cepa CL Brener de *T. cruzi*. Em duas dessas variações houve mudança de aminoácidos: aminoácido 543 (Ala – Val, 1.628 pb do gene) e aminoácido 636 (Arg – Gly, 1905 pb do gene) e uma adição de aminoácido Ala na posição 1117 (3.349 pb do gene)

3. Expressão heteróloga da região 5' do gene *TcSCC3* em *E. coli*.

Para a expressão da proteína TcSCC3/N-terminal e posterior produção de anticorpos, o fragmento *TcSCC3/5'* foi subclonado no vetor de expressão pET21a(+) nos sítios para as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III (Figura 14A).

Por meio de análises com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III, a subclonagem foi confirmada, liberando fragmentos de 5,4 Kb do vetor pET21a(+) e 1,6 Kb do inserto (Figura 14B).

O vetor pET21a(+) possui um promotor T7 que dirige a expressão do gene a ser expresso. A linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) pLysE foi utilizada para a expressão por apresentar uma cópia cromossomal da T7 RNA polimerase sob controle do sistema pLac/lacI, sendo, então, capaz de expressar o gene sob controle do promotor T7 por meio da indução indireta com IPTG. A expressão basal do gene sob o controle do promotor T7 pode ser adicionalmente controlada pela presença de lisozima do bacteriófago T7, um inibidor natural da T7 RNA polimerase (STUDIER; MOFFAT, 1986).

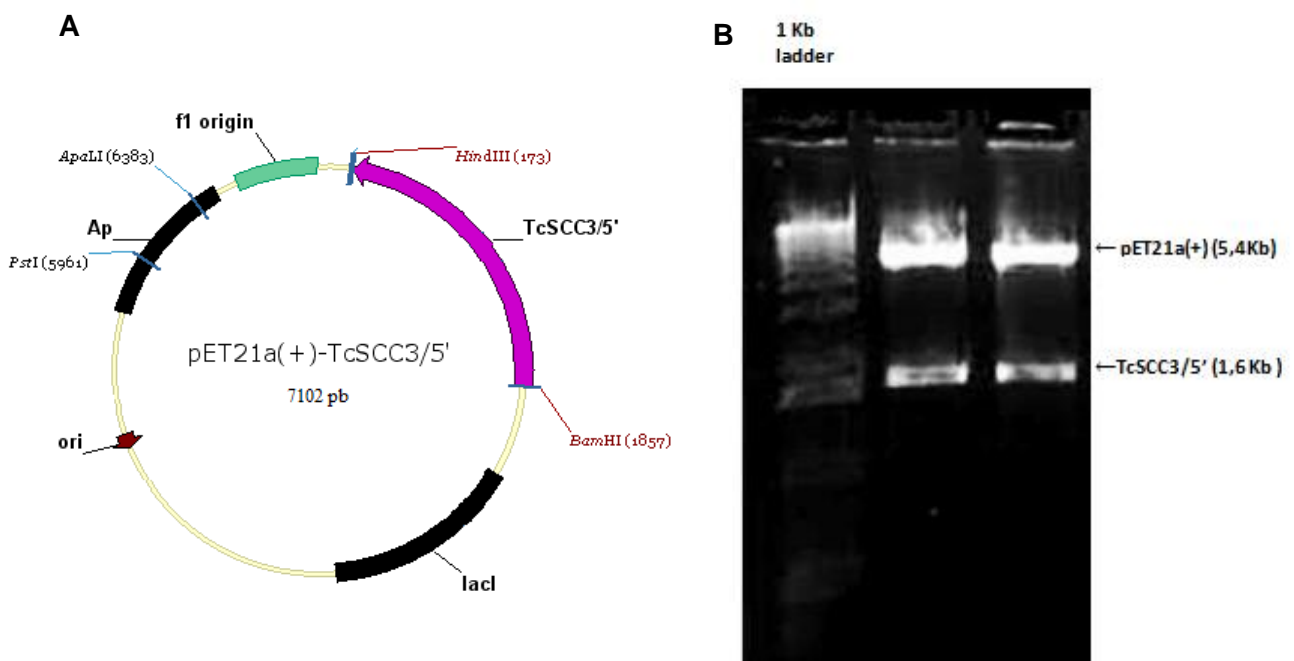


Figura 14. Subclonagem do gene *TcSCC3/5'* no vetor pET21a(+). (A) O inserto *TcSCC3/5'* e o vetor pET21a(+) foram ambos digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III, purificados do gel de Agarose e ligados utilizando a enzima T4 DNA Ligase. (B) A subclonagem do gene *TcSCC3/5'* no vetor de expressão pET21a(+) foi confirmada por meio da digestão com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III. Análise em gel de agarose 1,0%.

A expressão da região N-terminal da subunidade TcSCC3 foi então realizada por meio da indução de produção de proteínas a partir de culturas tratadas com IPTG, conforme descrito no Material e Métodos. O extrato total das células bacterianas induzidas foi então analisado em gel desnaturante de poliacrilamida, evidenciando na amostra induzida uma banda de cerca de 60kDa correspondente ao tamanho esperado da proteína TcSCC3/N-terminal (Figura 15).

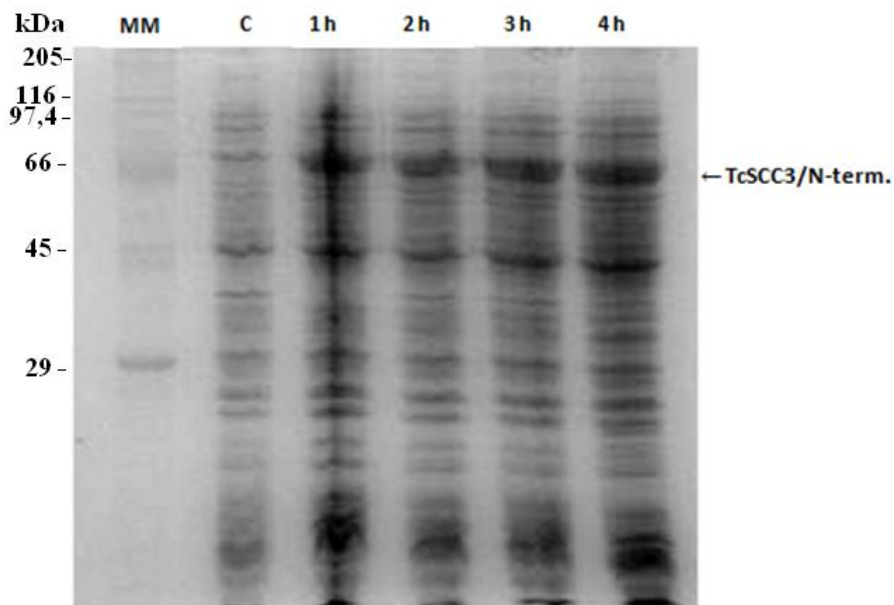


Figura 15. Análise da expressão da proteína TcSCC3/N-terminal em gel desnaturante de poliacrilamida em diferentes períodos de indução da proteína. 1 h a 4 h - tempo de indução de cada amostra. MM – marcador de peso molecular indicando as massas moleculares em kDa). C – controle não induzido.

4. Expressão heteróloga da região 5' do gene *TcSMC1* em *E. Coli*.

A região 5' do gene da subunidade *TcSMC1* da coesina foi previamente clonada no vetor pET28a(+) e este foi utilizado para a expressão da proteína TcSMC1/N-terminal, visando a produção dos anticorpos em coelho.

A correta clonagem do gene *TcSMC1/5'*, de tamanho equivalente a 1,6 Kb, foi confirmada por sequenciamento, onde 890 pb foram sequenciados nas regiões 5' e interna do gene, cerca de 57,16% do fragmento.

Após o sequenciamento, o plasmídeo foi utilizado nos ensaios de indução por um período de 2 h para a produção desta proteína, fazendo-se o uso de IPTG como

agente indutor. O resultado da indução foi analisado em gel SDS-PAGE, evidenciando na amostra induzida uma banda de tamanho equivalente a aproximadamente 59 kDa, tamanho esperado para a proteína em estudo (Figura 16).

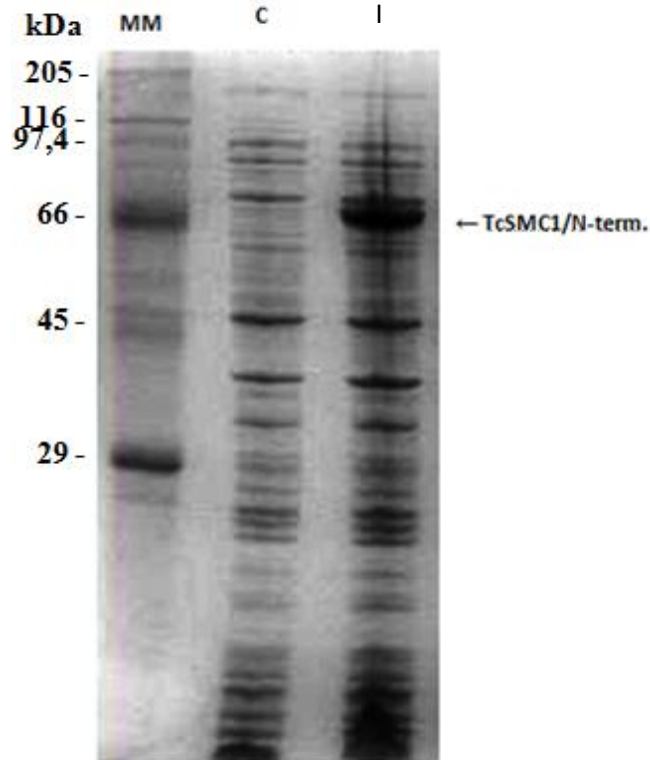


Figura 16. Análise da expressão da proteína TcSMC1/N-terminal em gel desnaturante de poliacrilamida. MM – marcador de peso molecular indicando as massas moleculares em kDa (Sigma *Standart Mixture for SDS-PAGE*). C – controle contendo o extrato total bacteriano não induzido. I – Extrato total bacteriano contendo a proteína SMC1/N-terminal induzida.

5. Produção de anticorpos policlonais anti-TcSCC3 e anti-TcSMC1.

Os anticorpos policlonais anti-TcSCC3 e anti-TcSMC1 foram produzidos em coelhos. Para isso a imunização foi realizada com as bandas proteicas extraídas diretamente do gel SDS-PAGE.

Após decorrido o tempo de imunização necessário, os soros dos coelhos imunizados foram coletados e testados em ensaios de *western blot*. Os ensaios foram feitos tanto para o anticorpo anti-TcSCC3 quanto para o anticorpo anti-TcSMC1. Os soros pré-imune e imune de ambos os anticorpos foram testados

contra o extrato total de *E. coli*, induzida e não induzida (controle), e contra o extrato total de *T. cruzi* nas formas epimastigotas.

Os ensaios utilizando os soros pré-ímmunes contra o extrato total de *E. coli* induzida resultou em nenhuma marcação, como esperado. Os ensaios dos anticorpos anti-TcSCC3 e anti-SMC1 contra o extrato total de *E. coli* revelaram que os anticorpos localizam proteínas tanto no extrato total induzido quanto no extrato total não induzido, embora no último caso a marcação se encontre de maneira menos intensa (Figura 17A e 17B). Além disso, foram observadas marcações adjacentes à banda de interesse, tanto no ensaio para anticorpos anti-TcSCC3 quanto no ensaio para anticorpos anti-TcSMC1.

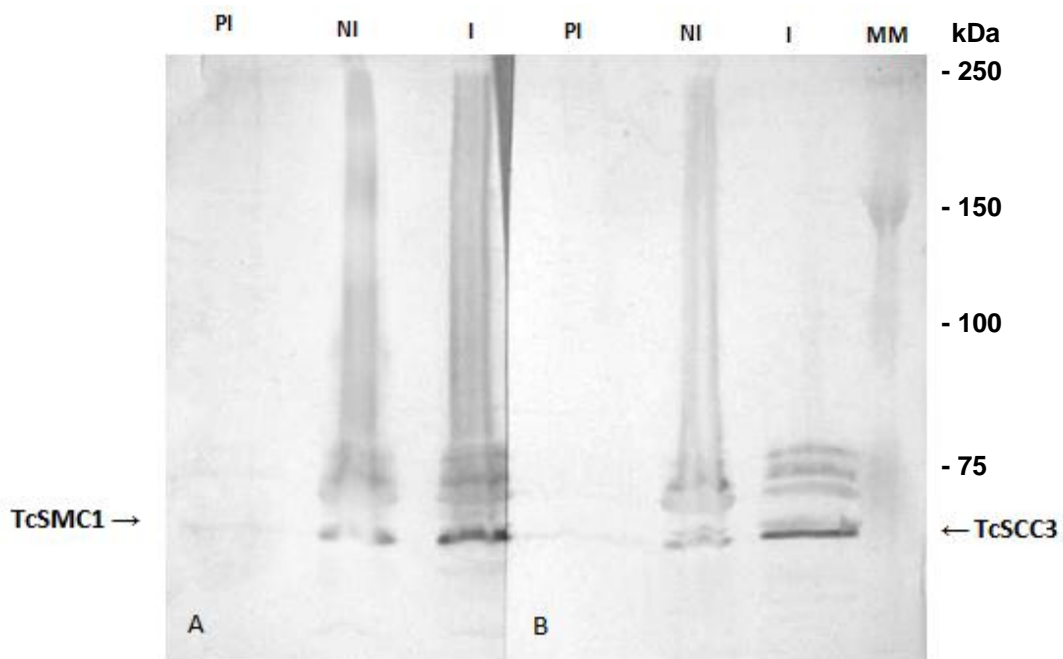


Figura 17 . Western blot do extrato total de *E. coli* não induzida e induzida. A – Ensaio para a proteína TcSMC1: **PI**- Soro Pré-Ímmune testado na proteína induzida; **NI** – anticorpo anti-TcSMC1 testado na proteína não induzida; **I** – anticorpo anti-TcSMC1 testado na proteína induzida. **B** – Ensaio para a proteína TcSCC3: **PI**- Soro Pré-Ímmune testado na proteína induzida; **NI** – anticorpo anti-TcSCC3 testado na proteína não induzida; **I** – anticorpo anti-TcSCC3 testado na proteína induzida. **MM** – marcador de peso molecular.

Tais resultados sugerem que, além das proteínas recombinantes TcSCC3 e TcSMC1, os coelhos foram também imunizados com vestígios de proteínas bacterianas de tamanho semelhante às proteínas em estudo.

Para purificar estes anticorpos e, assim, utilizá-los nos experimentos de *Western blot* e Imunofluorescência, iniciou-se a purificação das proteínas recombinantes TcSCC3 e TcSMC1. Para isso as mesmas foram reclonadas no vetor

pET-28a(+) de forma que as duas proteínas expressas contenham uma cauda de histidina para futura purificação por cromatografia de afinidade (dados não mostrados). Contudo, devido à formação de corpos de inclusão, não tivemos sucesso na purificação destas proteínas. Assim, para ensaios futuros será necessário que a purificação das proteínas seja otimizada para a realização das etapas posteriores de purificação dos anticorpos anti-TcSCC3 e anti-TcSMC1 e sua utilização nos ensaios de análise de lisados de *T. cruzi* em experimentos de *western blot* e imunocitocalização das proteínas em células do parasita.

6. Análise da presença da subunidade TcSCC1 do Complexo Coesina nas formas amastigotas, tripomastigotas e epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Para verificar a presença da subunidade TcSCC1 em *T. cruzi*, ensaio de *western blot* foi realizado com os lisados das formas tripomastigotas, epimastigotas e amastigotas deste parasito, tendo em vista que, neste último caso, foram coletadas amostras de células amastigotas dentro das células L6 e de células amastigotas presentes no sobrenadante da cultura, ou seja, fora das células L6 (Figura 18). Para cada lisado foram usadas 10^7 células/mL e como anticorpo primário foi utilizado um anticorpo anti-TcSCC1 produzido em estudos anteriores no laboratório. Lisado de células L6 não infectadas foi utilizado como controle negativo do ensaio.

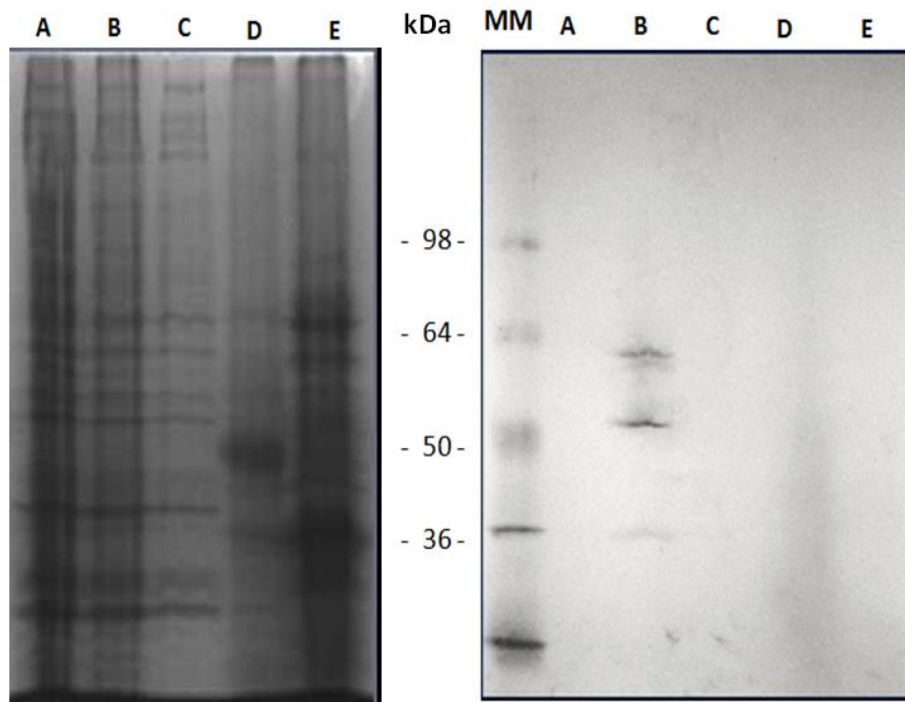


Figura 18. Análise da presença da proteína TcSCC1 nas diferentes formas do *T. cruzi* em experimento de western blot utilizando o anticorpo anti-TcSCC1. À esquerda gel SDS-PAGE, à direita membrana de nitrocelulose. **A** – Lisado de células amastigotas extracelulares. **B** – Lisado de células amastigotas intracelulares. **C** – Lisado de células L6 (controle). **D** – Lisado de células epimastigotas. **E** – Lisado de células tripomastigotas. Tamanho total da proteína TcSCC1 : 62 kDa. As massas moleculares em kDa referentes ao padrão **MM** (SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standart - Invitrogen) estão indicadas.

Os resultados mostraram que o anticorpo localiza a proteína TcSCC1 (com o tamanho aproximado de 62 kDa) nas formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi*. A localização de bandas protéicas com tamanhos menores do que o esperado pode indicar a presença da forma clivada da proteína TcSCC1 provavelmente pela ação da enzima separase. A amostra contendo células amastigotas extracelulares não apresentou sinal, o que pode indicar que essa proteína já tenha sido degradada nesse estágio, tendo em vista que nessa fase as células amastigotas já não se encontram em divisão. A amostra contendo células tripomastigotas também não apresentaram marcação para o anticorpo anti-TcSCC1, resultado esperado pois as formas tripomastigotas não são replicativas. Para as células epimastigotas, nenhum sinal para a proteína TcSCC1 foi detectado neste ensaio e experimentos posteriores com esta forma foram realizados como apresentado a seguir.

7. Análise da presença da subunidade TcSCC1 no extrato total das formas epimastigotas de *T. cruzi*

Para verificar a presença da subunidade TcSCC1 em diferentes frações do extrato total das formas epimastigotas de *T. cruzi*, ensaio de fracionamento celular foi realizado de forma que o extrato do parasito fosse separado em três diferentes frações: extrato citoplasmático, extrato enriquecido nuclear solúvel e extrato enriquecido nuclear insolúvel. Após o ensaio, cada fração foi quantificada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), analisada em gel SDS-PAGE e submetida ao experimento de *western blot*, utilizando como anticorpo primário o anticorpo policlonal anti-TcSCC1. Este ensaio revelou que o anticorpo localiza a proteína TcSCC1, com uma massa molecular de cerca de 62 kDa, em ambos os extratos nucleares de *T. cruzi*, com uma intensidade um pouco maior no extrato nuclear insolúvel (Figura 19). O ensaio também revelou a localização de bandas proteicas com tamanhos menores do que o esperado, indicando a presença da proteína TcSCC1 clivada, especialmente na amostra contendo o extrato enriquecido nuclear insolúvel de *T. cruzi*.

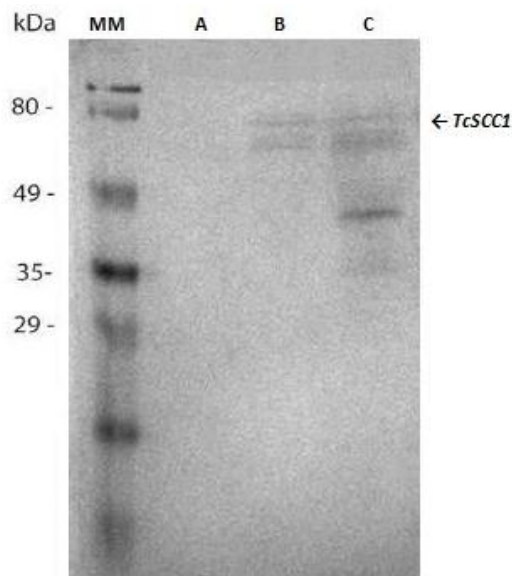


Figura 19. Western Blot das frações do extrato total de *Trypanosoma cruzi* epimastigotas, utilizando o anticorpo anti-SCC1. A – Extrato citoplasmático. B - Extrato enriquecido nuclear solúvel. C- Extrato enriquecido nuclear insolúvel. À esquerda estão indicadas as massas moleculares em kDa referentes ao padrão MM (BIO-RAD *Prestained Standards*).

8. Análise da subunidade TcSCC1 durante o ciclo celular das formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Para verificar a presença da TcSCC1 durante o ciclo celular do *T. cruzi*, foram realizados experimentos de sincronização de células e imunocitocalização por microscopia de fluorescência. .

a. Sincronização de células de *Trypanosoma cruzi*

A hidroxiuréia, utilizada em experimentos de sincronização celular, atua na fase S do ciclo com ação específica na ribonucleotídeo redutase, interferindo assim na conversão de ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos e impedindo a divisão celular (HANFT et al., 2000; SCOOT et al., 1996; GALLI et al., 1996; LIMA et al., 2003; RANG, 2000; SAKANO et al., 2001). Após remoção da HU, o ciclo prossegue normalmente, com um número elevado de células em sincronia (PAN et al., 1993).

A cultura contendo células de *T. cruzi* nas formas epimastigotas foi submetida a tratamento com hidroxiuréia por um período de 24 h, sendo monitorada por meio da retirada de alíquotas de seis em seis horas e contagem em câmara de Neubauer. Não foi detectado crescimento significativo da cultura tratada durante esse período (Figura 20A), indicando que o tratamento com hidroxiuréia interrompeu a divisão celular. Em paralelo uma cultura sem adição de hidroxiuréia foi utilizada como controle nas mesmas condições que a cultura tratada e verificou-se um crescimento normal dessa cultura não tratada (Figura 20B), resultado esperado para células sem tratamento com hidroxiuréia.

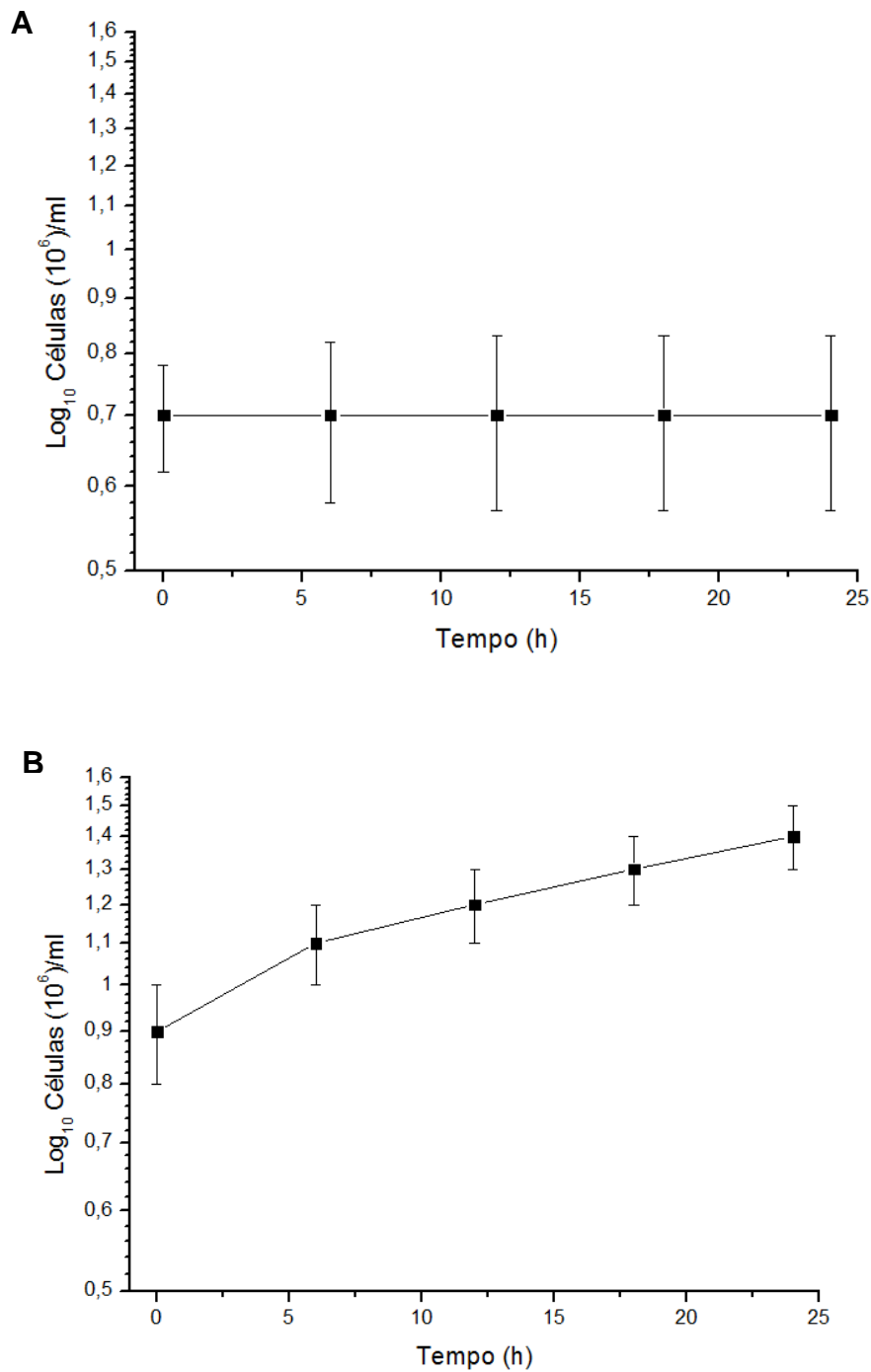


Figura 20. Curva de crescimento de células epimastigotas de *T. cruzi* não tratadas e tratadas com hidroxiuréia. O crescimento da cultura celular não tratada (controle) e da cultura celular tratada com hidroxiuréia foi monitorado por um período de 24 h. A cultura tratada (**A**) não apresentou crescimento significativo ($7,95 \times 10^6$ células/mL), enquanto a cultura controle (**B**) apresentou um crescimento normal ($9,45 \times 10^6$ células/mL a $1,37 \times 10^7$ células/mL). Os gráficos apresentam médias entre cinco amostras em cada ponto e seus respectivos desvios-padrão.

Uma cultura paralela, também submetida ao tratamento com hidroxiuréia foi realizada onde, após as 24 h, a hidroxiuréia foi retirada, as células lavadas e ressuspensas em novo meio. A cultura permaneceu incubada a 28°C por um período

de 24 h, sendo uma alíquota retirada a cada duas horas para a contagem em câmara de Neubauer e experimentos de imunofluorescência.

Foi verificado um crescimento normal nessa cultura durante o período analisada, de modo que no tempo inicial (T=0) as células se encontravam em densidade equivalente a $8,95 \times 10^6$ células/mL e no tempo final (T=24) as células se encontravam em densidade equivalente a $3,64 \times 10^7$ células/mL (Figura 21). Assim, o tratamento com hidroxauréia se mostrou eficiente, interrompendo a divisão celular de *T. cruzi* e sincronizando-os, voltando a crescer normalmente após a retirada da hidroxauréia e a lavagem dos parasitos.

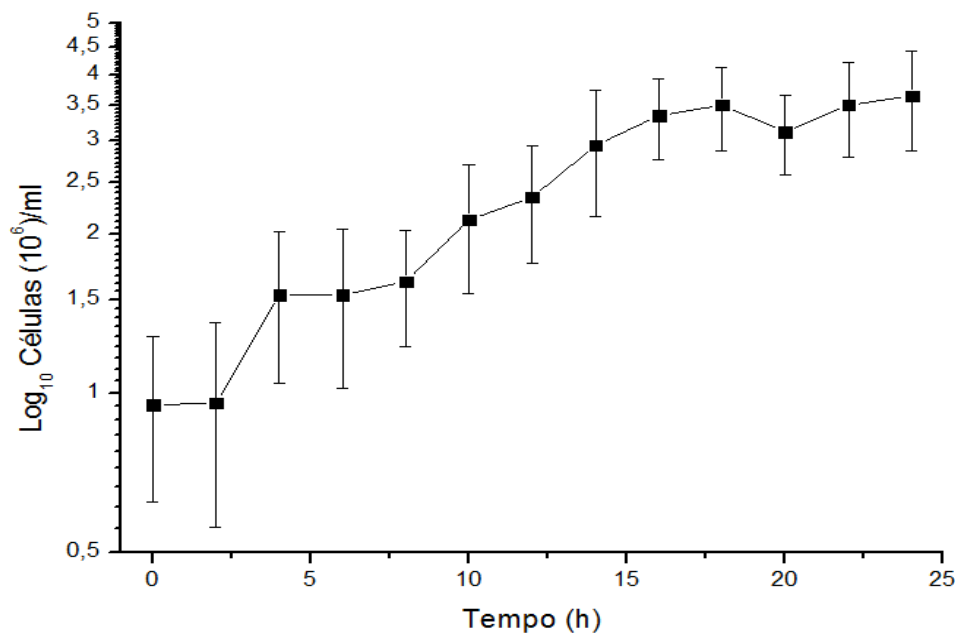
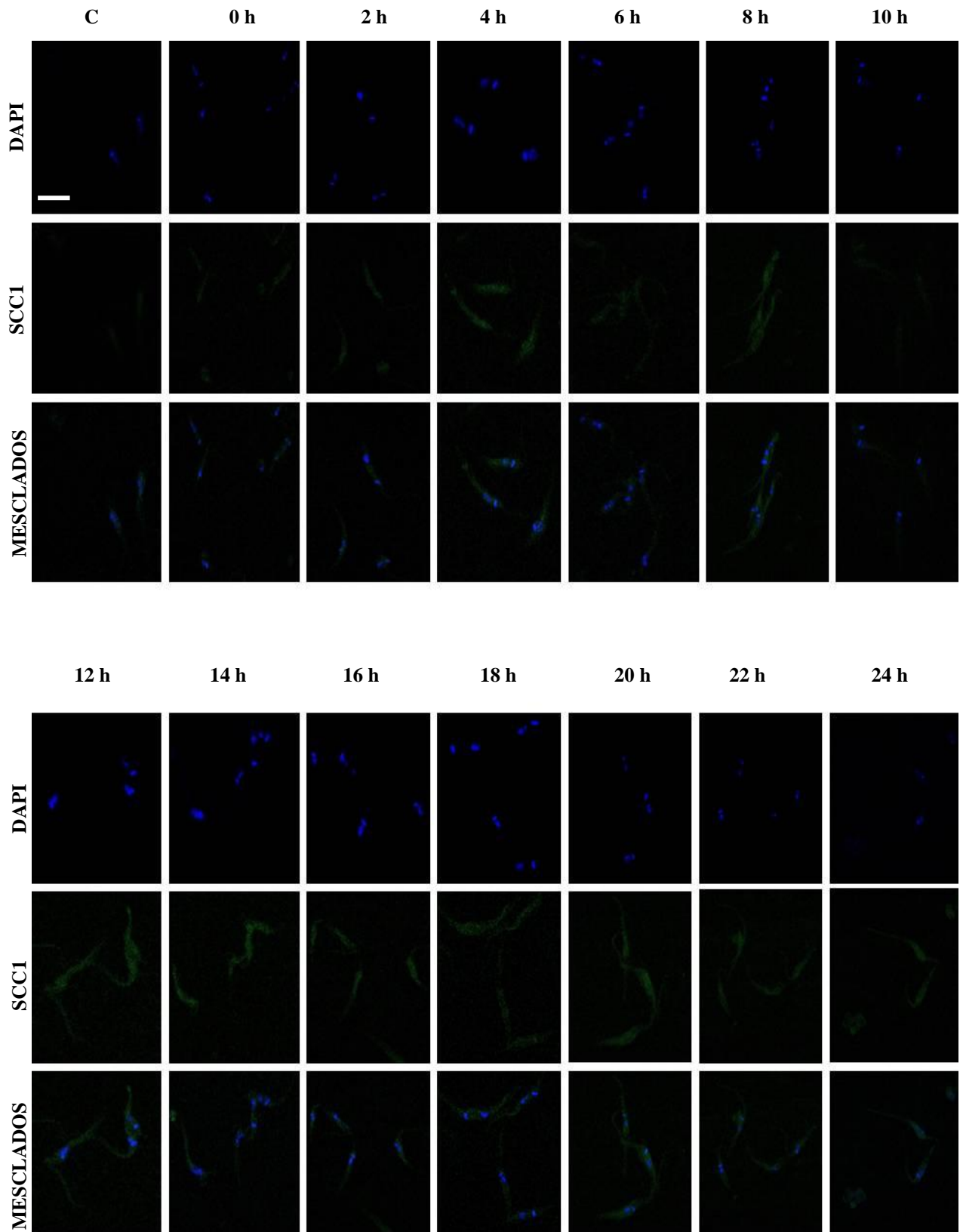


Figura 21. Curva de crescimento das células epimastigotas *T. cruzi* após a remoção da hidroxauréia. O crescimento da cultura de *T. cruzi* após a sincronização foi monitorado por um período de 24 h, por meio de contagem em câmara de Neubauer. Os gráficos apresentam médias entre cinco amostras em cada ponto e seus respectivos desvios-padrão.

As amostras retiradas a cada duas horas de experimento durante um período de 24 h foram também processadas para o ensaio de imunofluorescência com a finalidade de serem analisadas por microscopia de fluorescência. Essa análise permite observar o padrão de citolocalização da subunidade SCC1 do complexo coesina no decorrer do ciclo celular das formas epimastigotas de *T. cruzi*.

b. Imunocitocalização da proteína TcSCC1 em células sincronizadas de *Trypanosoma cruzi*

Os experimentos de Imunocitocalização não apresentaram um padrão de citocalização para o anticorpo anti-TcSCC1 de células de *T. cruzi* epimastigotas em diferentes fases do ciclo celular, tanto quando comparados entre si, quanto quando comparados ao controle (sem a presença do anticorpo primário) (Figura 22).

A

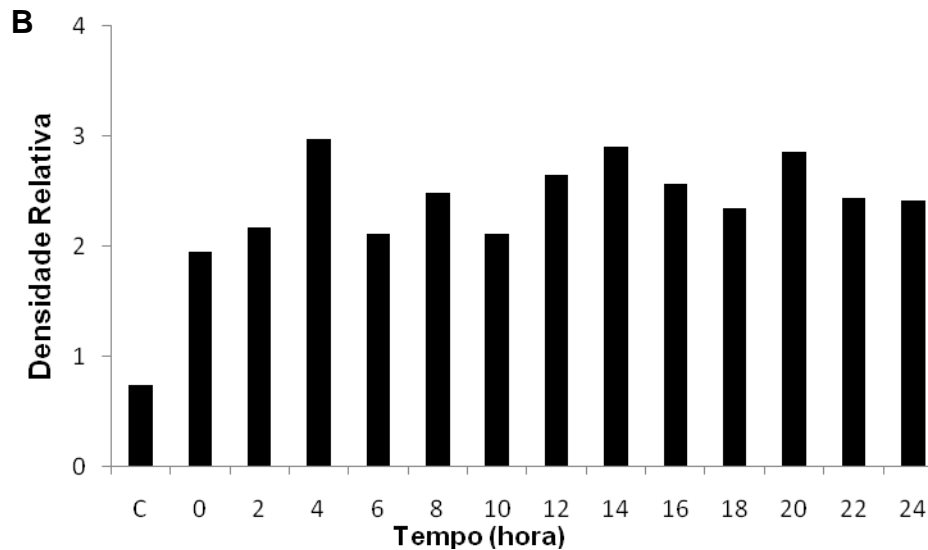


Figura 22. Imunofluorescência das formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. (A) As amostras foram processadas em intervalos de 2 h durante um período de 24 h. Como anticorpo primário utilizou-se o anticorpo anti-TcSCC1 em uma diluição de 1:200. Como anticorpo secundário utilizou-se o anticorpo Alexa Fluor 488, *goat anti-rabbit* IgG em uma diluição de 1:400 (verde). O DNA foi corado com DAPI (azul). **C-** controle. (B) O gráfico evidencia, semi-quantitativamente, a diferença de intensidade do sinal das amostras positivas, marcadas com o anticorpo primário anti- TcSCC1, quando comparadas ao sinal do controle sem o anticorpo primário – **C**, mas não indica uma variação significativa entre o padrão de marcação de células epimastigotas de *T. cruzi* no decorrer das horas. Os valores obtidos se referem à densidade relativa, que são medidas da intensidade de pixels na escala de verde dividida pelo número de pixels totais de uma área fixa. Barra = 10 μ m.

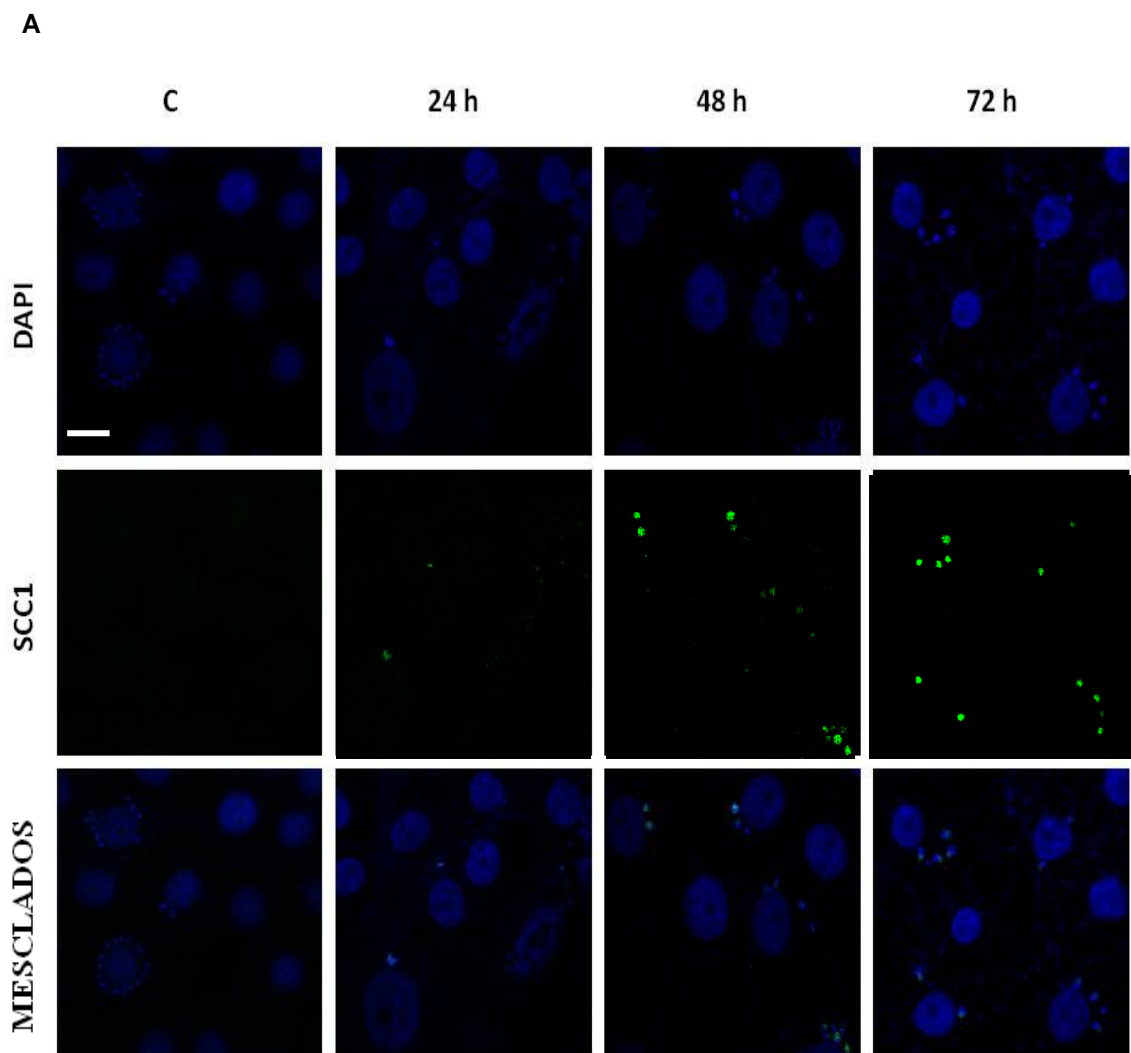
Os resultados desse experimento de imunocitocalização e os experimentos anteriores de western *blot* sugerem que a subunidade TcSCC1 nas formas epimastigotas de *T. cruzi* está presente em menor quantidade quando comparada ao sinal obtido nas formas amastigotas.

9. Imunocitocalização da TcSCC1 nas formas amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*

Com o objetivo de verificar a presença proteína TcSCC1 nas formas replicativas e infectiva de *Trypanosoma cruzi*, experimentos de imunofluorescência foram realizados com as formas amastigotas (em lamínulas), epimastigotas e tripomastigotas (em lâminas).

a. Formas amastigotas de *T. cruzi*

As formas amastigotas foram analisadas em células L6 infectadas com *T. cruzi*. A realização da microscopia de fluorescência das lamínulas submetidas ao ensaio de imunofluorescência, utilizando anticorpos anti-TcSCC1 purificados, apresentou um sinal significativo nas formas amastigotas de *T. cruzi* (Figura 23), mais especificamente nas amostras analisadas após 48 e 72 h de infecção, o que sugere a presença da subunidade TcSCC1 nessa forma intracelular do protozoário.



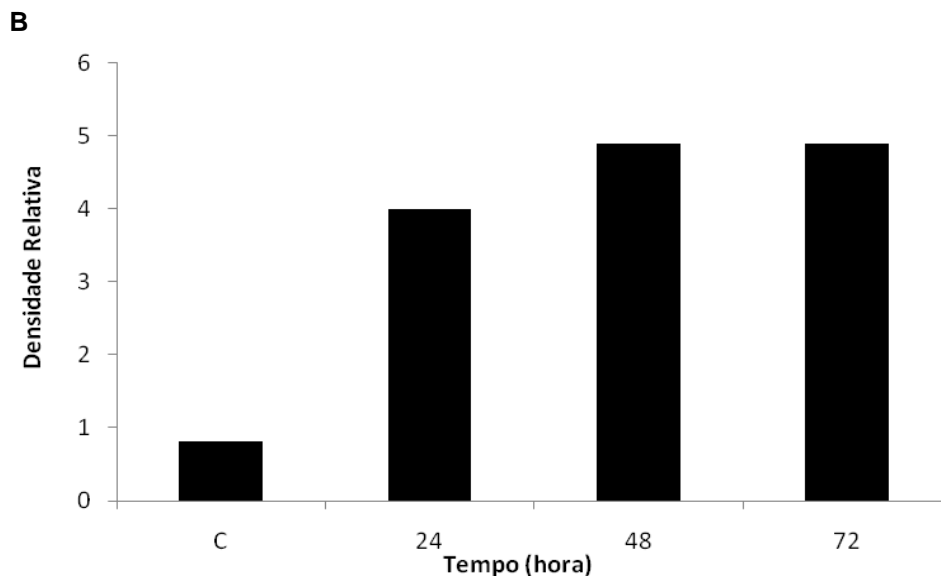


Figura 23. Imunofluorescência de células L6 infectadas com *Trypanosoma cruzi* nas formas amastigotas. (A) As amostras foram processadas em intervalos de 24 h de infecção, 48 h de infecção e 72 h de infecção. Como anticorpo primário utilizou-se o anticorpo anti-TcSCC1 em uma diluição de 1:200. Como anticorpo secundário utilizou-se o anticorpo Alexa Fluor 488, *goat anti-rabbit* IgG, em uma diluição de 1:400 (verde). O DNA foi corado com DAPI (azul), evidenciando o DNA presente nas células L6 e nas células de *T. cruzi*. **C** – controle sem anticorpo primário. (B) O gráfico evidencia, semi-quantitativamente, a diferença de intensidade do sinal das amostras positivas, utilizando o anticorpo primário anti- TcSCC1, quando comparado ao controle sem o anticorpo primário – **C**, e a diferença de intensidade entre as amostras positivas em diferentes períodos de infecção. Os valores obtidos se referem à densidade relativa, que são medidas da intensidade de pixels na escala de verde dividida pelo número de pixels totais de uma área fixa. Barra = 10 μ m.

b. Formas epimastigotas de *T. cruzi*

Nas formas epimastigotas de *T. cruzi* a análise por microscopia de fluorescência das lâminas submetidas ao ensaio de imunofluorescência apresentaram um sinal difuso e fraco para o anticorpo anti-SCC1 em toda a extensão das células deste protozoário (Figura 24), resultado semelhante ao observado no experimento de sincronização desta forma do parasito. Isso sugere que a proteína TcSCC1 está presente em menor quantidade nessa forma do parasita quando comparado com as formas amastigotas de *T. cruzi*.

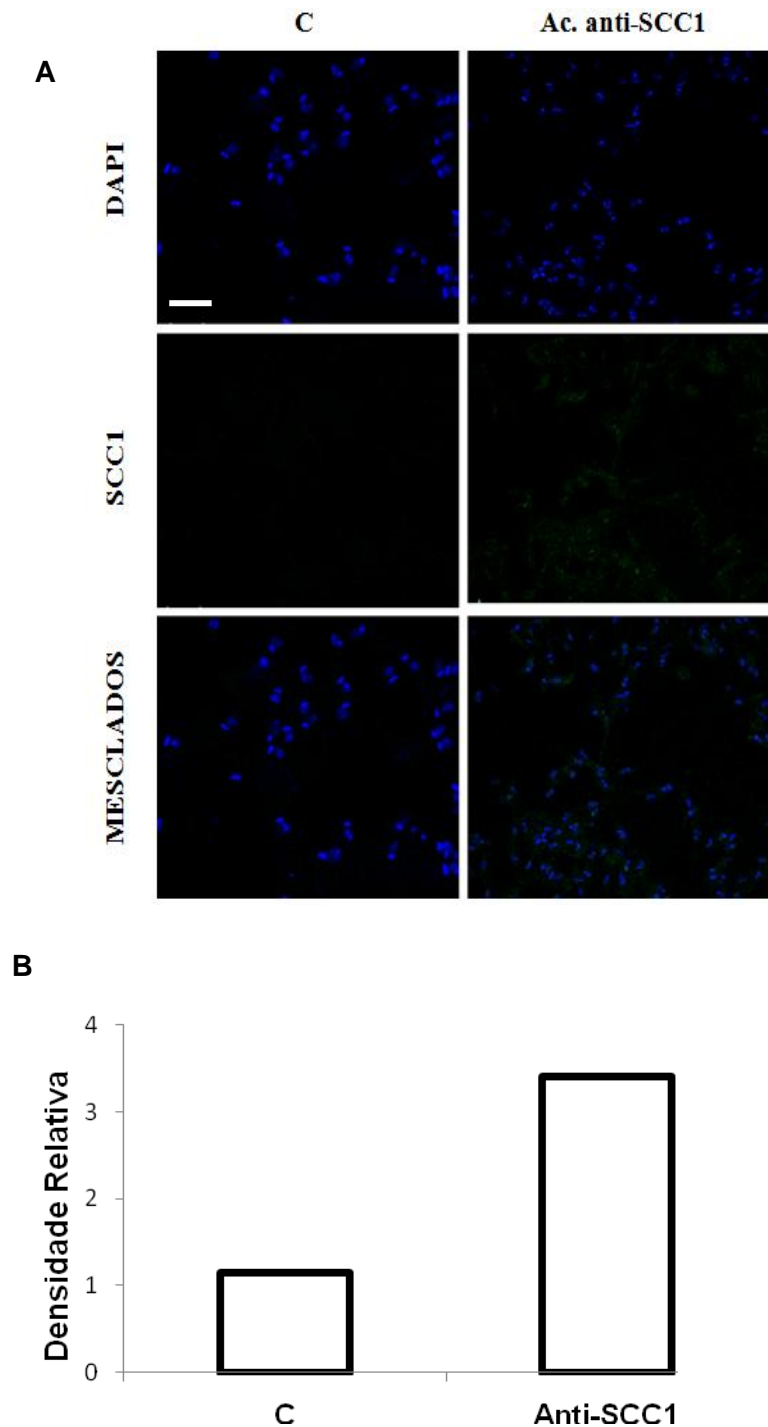


Figura 24. Imunofluorescência de células de *Trypanosoma cruzi* nas formas epimastigotas. (A) As células epimastigotas apresentam sinal para o anticorpo primário anti-TcSCC1, utilizado em uma diluição de 1:200, quando comparadas ao controle sem o anticorpo primário – **C**. Como anticorpo secundário utilizou-se o anticorpo Alexa Fluor 488, *goat anti-rabbit IgG* em uma diluição de 1:400 (verde). O DNA foi corado com DAPI (azul). **(B)** O gráfico traduz, de modo semi-quantitativo, a diferença de intensidade do sinal da amostra positiva, utilizando o anticorpo primário anti- TcSCC1, quando comparado ao controle sem o anticorpo primário - **C**. Os valores obtidos se referem à densidade relativa, que são medidas da intensidade de pixels na escala de verde dividida pelo número de pixels totais de uma área fixa. Barra = 10 μ m.

c. Formas tripomastigotas de *T. cruzi*

A análise das lâminas submetidas à microscopia de fluorescência, após a realização do ensaio de imunofluorescência, mostrou que nas formas tripomastigotas o sinal para o anticorpo anti-SCC1 é muito fraco e pouco significativo quando comparado com ao controle não tratado com o anticorpo primário anti-SCC1 (Figura 25).

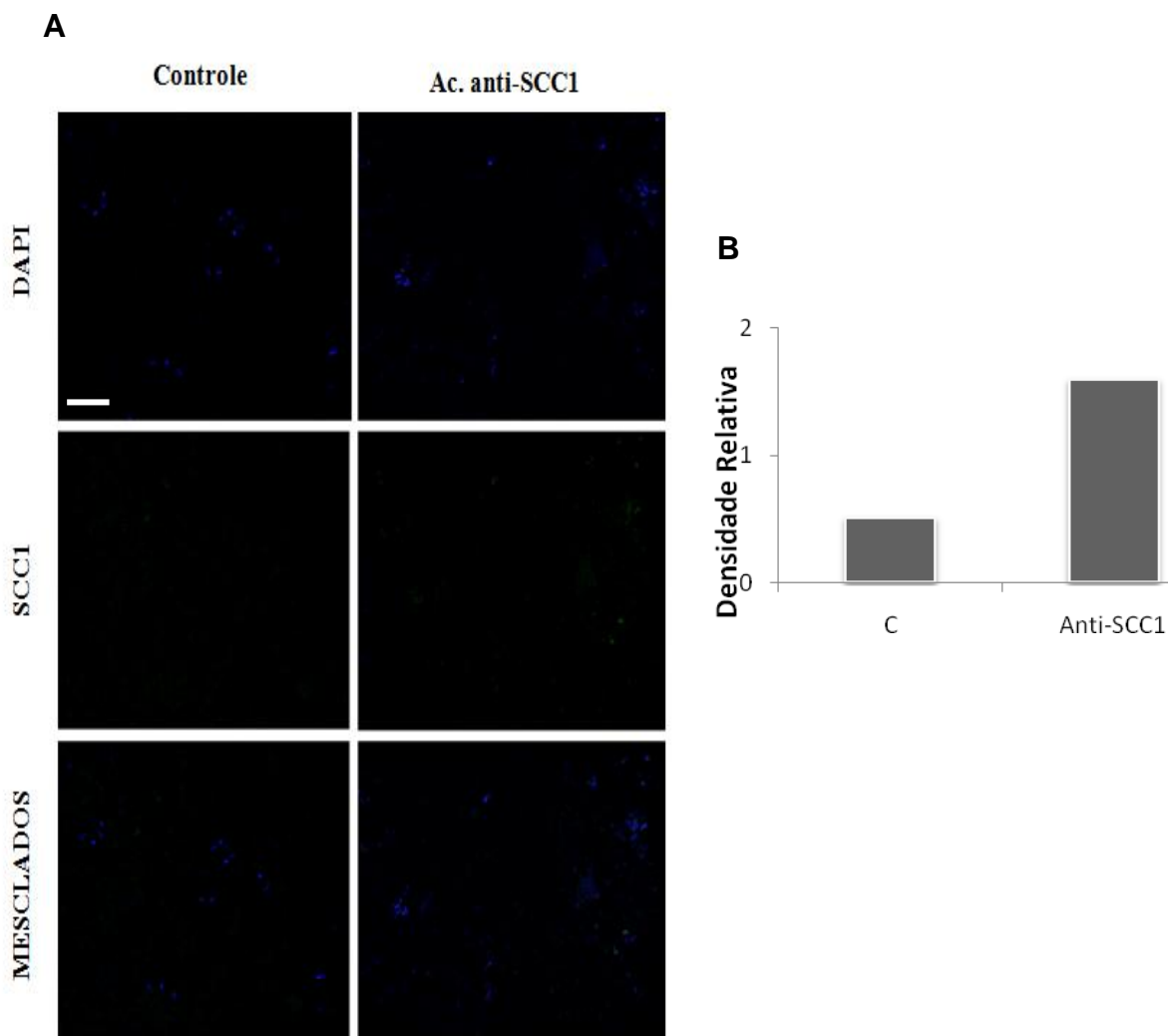


Figura 25. Imunofluorescência de células de *Trypanosoma cruzi* nas formas tripomastigotas. (A) As células tripomastigotas não apresentaram um sinal significativo para o anticorpo primário anti-TcSCC1, utilizado em uma diluição de 1:200. Como anticorpo secundário utilizou-se o anticorpo Alexa Fluor 488, *goat anti-rabbit* IgG em uma diluição de 1:400 (verde). O DNA foi corado com DAPI (azul). (B) O gráfico traduz, de modo semi-quantitativo, a diferença de intensidade do sinal da amostra positiva, utilizando o anticorpo primário anti-TcSCC1, quando comparado ao controle sem o anticorpo primário - C. Os valores obtidos se referem à densidade relativa, que são medidas da intensidade de pixels na escala de verde dividida pelo número de pixels totais de uma área fixa. Barra = 10 μ m

d. Comparação entre os níveis da subunidade TcSCC1 do complexo coesina nas três formas de *Trypanosoma cruzi*.

A presença da proteína TcSCC1 foi analisada através de ensaios de imunocitocalização nas formas amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*. As células amastigotas apresentaram níveis de fluorescência expressivamente maiores para esta subunidade quando comparada às demais formas de vida do parasito (Figura 26). As células epimastigotas apresentaram uma fraca intensidade de fluorescência para a subunidade TcSCC1, enquanto as células tripomastigotas apresentaram um sinal pouco diferente de seu controle (Figura 26).

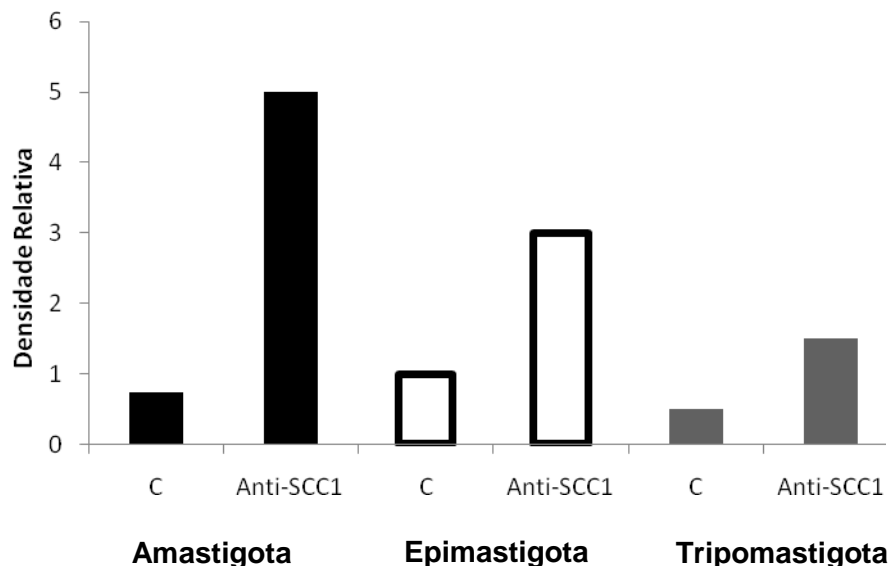


Figura 26. Comparação dos níveis de fluorescência para a proteína TcSCC1 nas três formas de *Trypanosoma cruzi*. O gráfico evidencia, semi-quantitativamente, a diferença de intensidade do sinal das amostras submetidas ao ensaio de imunofluorescência das formas amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas, utilizando o anticorpo primário anti- TcSCC1. Os valores obtidos se referem à densidade relativa, que são medidas da intensidade de pixels na escala de verde dividida pelo número de pixels totais de uma área fixa. C- Controle.

10. Análise da localização da TcSCC1 durante a dinâmica nuclear na divisão celular das formas amastigotas de *T. cruzi*.

a. Células não sincronizadas – formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi*

A citolocalização da proteína TcSCC1 durante a dinâmica nuclear das formas amastigotas foi analisado através de microscopia confocal de fluorescência utilizando o anticorpo anti-TcSCC1.

Dois padrões de citolocalização foram evidenciados nas células amastigotas não sincronizadas. Na primeira a marcação se encontra de forma difusa pelo núcleo da célula e na segunda a marcação se encontra concentrada na periferia nuclear das células amastigotas (Figura 27). Essa diferença no padrão de localização da subunidade TcSCC1 do complexo coesina sugere a sua presença em diferentes fases do ciclo celular das formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*, além de caracterizar o comportamento da cromatina dessa forma durante o ciclo.

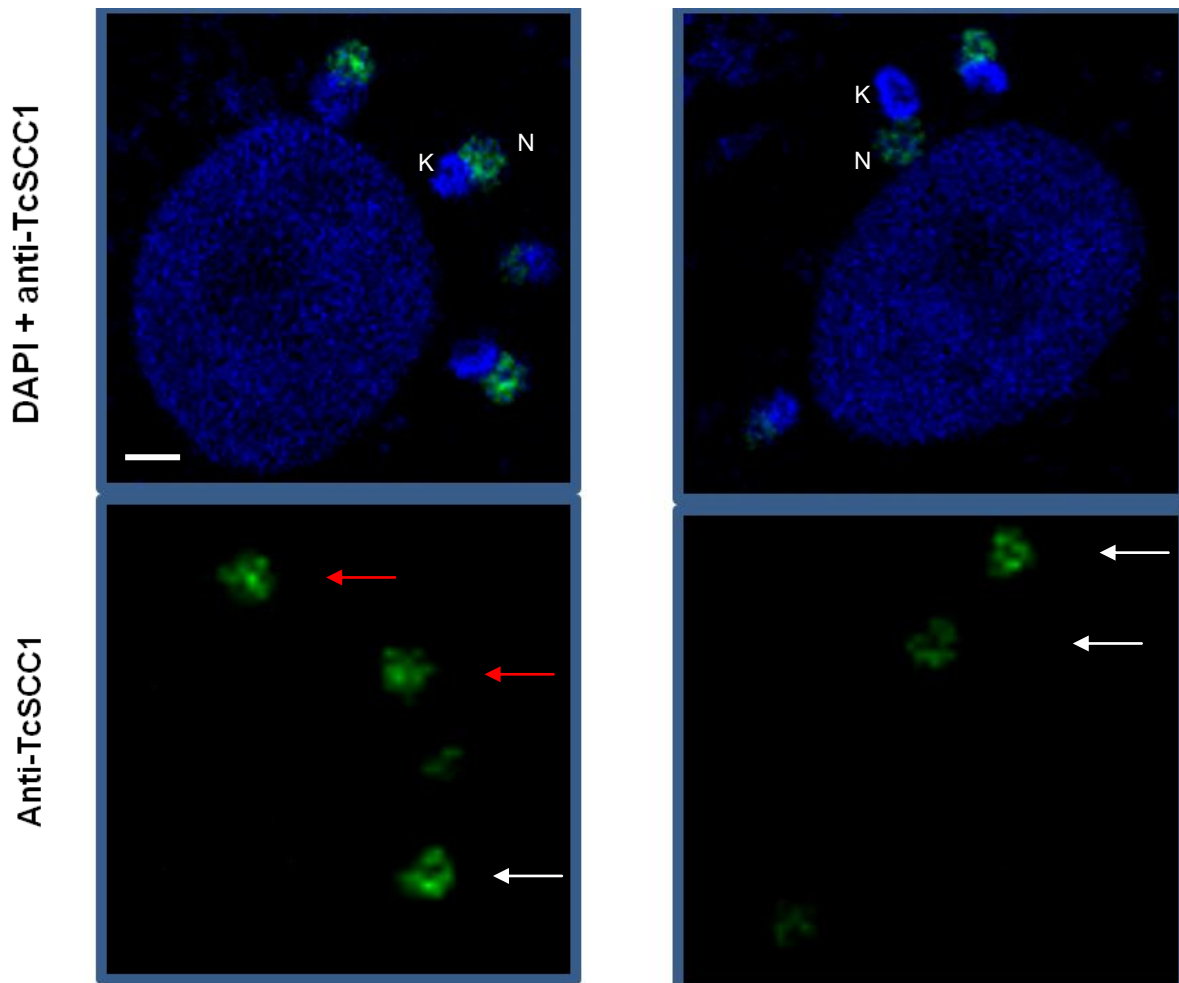


Figura 27. Padrões da proteína TcSCC1 no núcleo de células amastigotas. As setas em vermelho indicam uma marcação difusa pelo núcleo da célula e as setas brancas indicam uma marcação na periferia nuclear. O núcleo das células amastigotas estão indicado em **N** e o cinetoplasto em **K**. As amostras foram submetidas ao ensaio imunofluorescência, utilizando o anticorpo anti-SCC1 como anticorpo primário, e analisadas em Microscopia de Fluorescência em Microscópio Confocal. Barra = 2 μ m.

b. Células sincronizadas – formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi*

Para a análise da localização da proteína TcSCC1 na dinâmica nuclear das formas amastigotas de *T. cruzi*, células L6 infectadas com o parasito foram sincronizadas com hidroxiuréia (HU) e observadas por microscopia confocal de fluorescência em diferentes períodos após o tratamento com HU.

As células amastigotas analisadas imediatamente após a retirada da hidroxiuréia, que se encontram na fase S do ciclo, apresentaram uma marcação difusa no seu interior nuclear, enquanto as células analisadas 1h após a retirada da hidroxiuréia apresentaram uma expressiva marcação na periferia nuclear dessa

forma de vida do parasito, indicando a migração da cromatina para a periferia nuclear em determinada fase do ciclo celular (Figura 28). Após quatro horas decorridas da lavagem da hidroxiuréia as células amastigotas apresentaram uma marcação mais intensa no seu interior nuclear (Figura 28).

Tais resultados sugerem que a proteína TcSCC1 está envolvida no ciclo celular das formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* e que o comportamento da proteína durante o ciclo se assemelha ao comportamento da cromatina, marcada com DAPI, anteriormente descrito na literatura para formas epimastigotas.

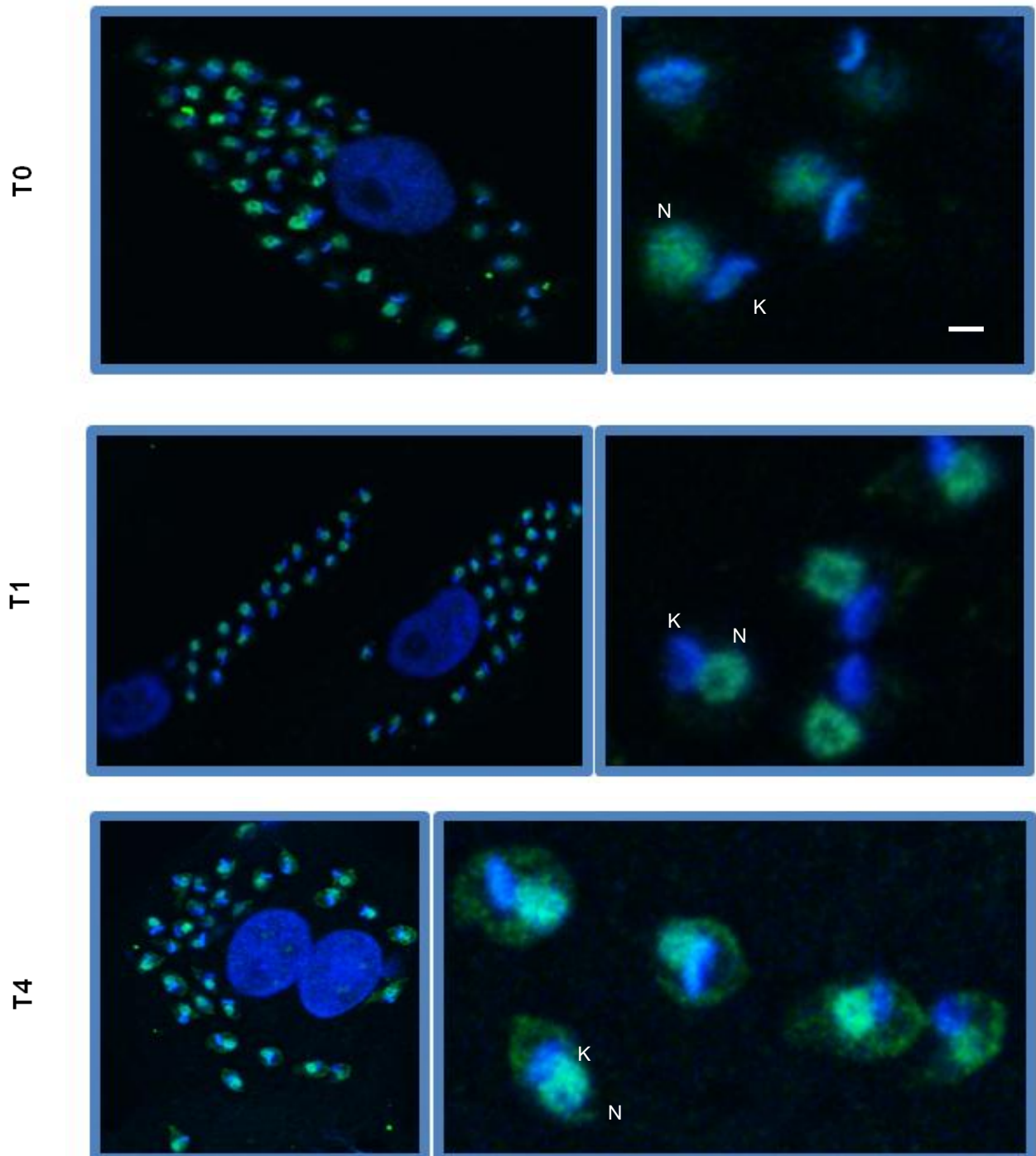


Figura 28. Padrões da proteína TcSCC1 no núcleo de células amastigotas sincronizadas. Células L6 infectadas com *Trypanosoma cruzi* foram sincronizadas com hidróxiuréia. Após a retirada da hidróxiuréia as células foram analisadas no tempo 0, 1 e 4 (h), respectivamente. Os aumentos à direita evidenciam a marcação para a proteína TcSCC1 na células amastigotas. Durante o tempo 0 a proteína se encontra difusa no núcleo da célula, no tempo 1 a marcação está presente na periferia nuclear e no tempo 4 a marcação se encontra mais intensa no núcleo. **N**= Núcleo, **K**= cinetoplasto. Barra = 2 μ m.

11. Análise comparativa dos níveis de mRNAs das subunidades da Coesina por RT – PCR semi-quantitativa

Como a marcação para a proteína TcSCC1 foi detectada em intensidades diferentes nas três formas de *T.cruzi*, analisamos, em seguida, se essa diferença está também presente nos níveis dos mRNA que codificam não só a proteína TcSCC1, mas todas as prováveis subunidades que formam o complexo.

Assim, para investigar se os níveis de mRNA de cada um dos genes do complexo Coesina são diferentes entre as formas de *Trypanosoma cruzi*, células amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas foram utilizadas em experimentos de RT-PCR, transcrição reversa seguida de reação de polimerização em cadeia. Os resultados mostrados na figura 29 ilustram a presença dos mRNAs das subunidades TcSCC1, TcSCC3, TcSMC1 e TcSMC3 do complexo Coesina de *T. cruzi*. Por meio do cálculo do teste de t de Student não foi verificada variação significativa nos níveis de mRNA de um mesmo gene nas três formas de *T. cruzi*, evidenciando que os níveis de mRNA são semelhantes, apesar dos níveis da proteína TcSCC1 serem tão diferentes.

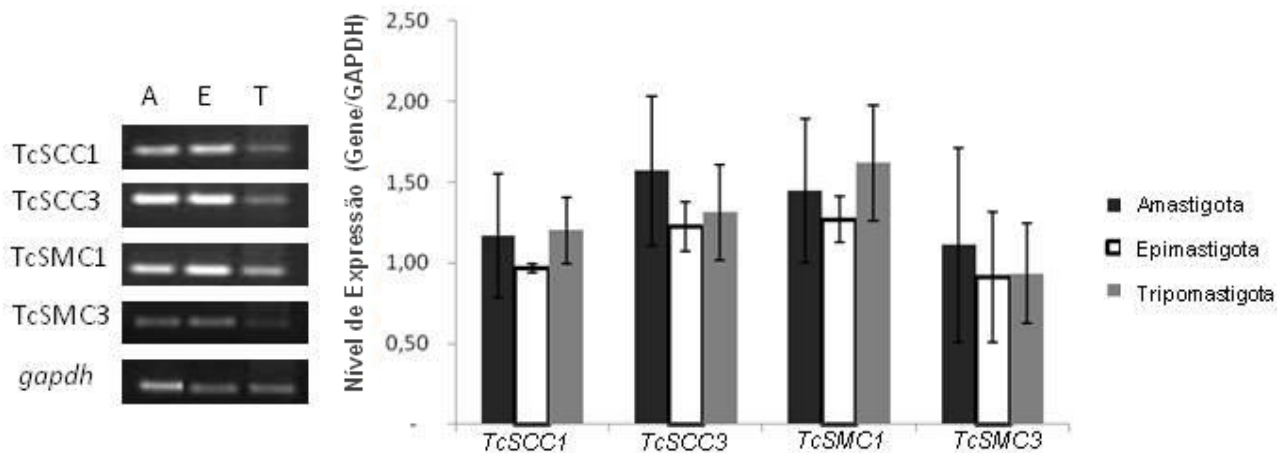


Figura 29. Análise comparativa dos níveis dos mRNAs dos genes *TcSCC1*, *TcSCC3*, *TcSMC1* e *TcSMC3* de *Trypanosoma cruzi*. O RNA total foi extraído das formas amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas. Uma alíquota de 2 μ L da reação de síntese de cDNA foi empregada como molde para amplificação dos fragmentos, em reações separadas, dos genes de interesse e do gene constitutivo *gapdh* empregado como controle interno da reação. Um terço da reação de PCR foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Os produtos amplificados das subunidades SCC1, SCC3, SMC1 e SMC3 do Complexo Coesina de *Trypanosoma cruzi* e o produto específico de amplificação do gene *gapdh* de *T. cruzi* usado como controle interno da reação são mostrados no painel A, onde os níveis de expressão de cada gene foram analisados para as formas amastigotas (A), epimastigotas (B) e tripomastigotas (C) de *T. cruzi*. Os resultados referentes aos níveis de expressão dos referidos genes foram quantificados por densitometria e ferramentas do programas *Image J*. O gráfico B mostra a média das razões entre o nível de expressão dos genes de interesse do complexo Coesina e o controle interno *gapdh*. Os valores indicam a média de três experimentos e as barras representam o desvio padrão da média ($P > 0,05$)

12. Análise dos níveis de mRNAs por RT-PCR quantitativa (qRT-PCR)

Para uma análise mais apurada nos níveis de mRNA das subunidades do complexo Coesina para cada uma das formas de *T. cruzi*, foram realizados ensaios de RT-PCR em tempo real.

Os resultados mostrados na figura 30 ilustram a presença dos mRNAs das subunidades TcSCC1, TcSCC3, TcSMC1 e TcSMC3 do complexo Coesina de *T. cruzi*. Por meio do cálculo do teste de t de Student foi verificada uma variação significativa apenas nos níveis de mRNA do gene TcSMC3 nas formas tripomastigotas quando comparado aos níveis deste mesmo gene nas formas amastigotas de *T. cruzi*.

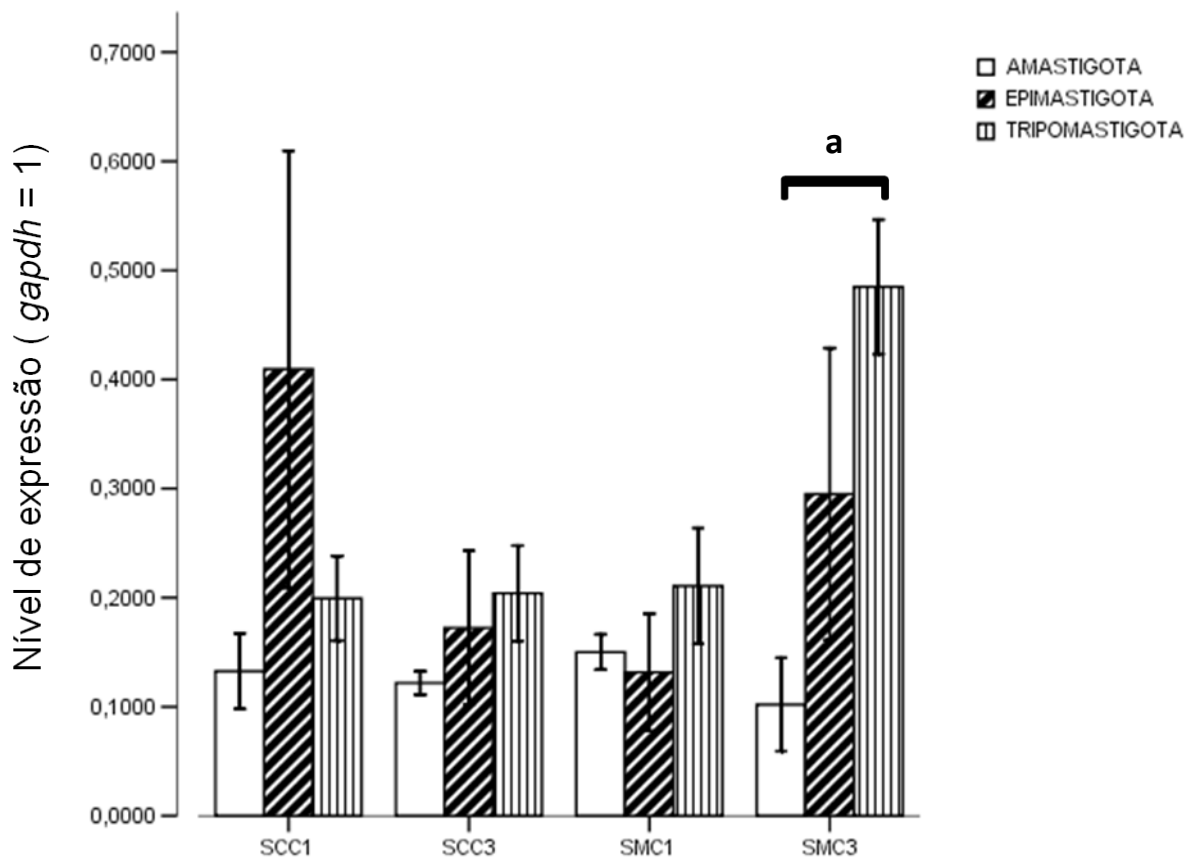


Figura 30. Análise comparativa da expressão dos genes *TcSCC1*, *TcSCC3*, *TcSMC1* e *TcSMC3* de *Trypanosoma cruzi* por RT-PCR em tempo real. O RNA total foi extraído das formas amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas. Uma alíquota de 5 μ L da reação de síntese de cDNA foi empregada como molde para amplificação dos fragmentos em tempo real, em reações separadas, dos genes de interesse e do gene constitutivo *gapdh* empregado como controle interno da reação. O método de comparação do ciclo limiar (CT) foi utilizado para calcular a relação entre cada um dos genes e a *gapdh* para cada forma, onde o nível de expressão da *gapdh* é igual a 1. “a” indica $P = 0,025$ para a comparação de dois grupos (teste de t de Student para amostras independentes): TcSMC3 amastigotas e TcSMC3 tripomastigotas.

DISCUSSÃO

A Coesina é um complexo proteico bem elucidado em células de leveduras e mamíferos e está envolvida na divisão celular destes organismos. Contudo, poucos estudos relatam a presença e a função da Coesina em tripanossomatídeos. No presente trabalho verificamos a presença da subunidade TcSCC1 do complexo Coesina em *Trypanosoma cruzi*, com maior evidência no núcleo das formas amastigotas desse parasito e fizemos o levantamento dos níveis de RNA mensageiro para todas as subunidades do complexo Coesina (TcSCC1, TcSCC3, TcSMC1 e TcSMC3) nas três formas de vida do *Trypanosoma cruzi* (amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas).

No presente trabalho a marcação para a proteína TcSCC1, feita em ensaios utilizando-se o anticorpo anti-TcSCC1, foi detectada de maneira significativamente maior nas formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Esta forma é encontrada no hospedeiro vertebrado no interior das células do tecido infectado. É uma forma replicativa que se multiplica cerca de nove gerações, fazendo com que as células fiquem repletas de parasitos. A proteína TcSCC1, assim como o complexo Coesina, podem estar envolvidos na divisão celular desta forma replicativa. Nas formas infectivas, tripomastigotas, a detecção da proteína TcSCC1 foi pouco expressiva quando comparada às demais formas do parasito, resultado esperado tendo em vista que esta não é uma forma replicativa e, portanto, não passa pelo processo de divisão celular. As formas replicativas presente no *Hemíptero*, epimastigotas, apresentou uma menor detecção do anticorpo anti-TcSCC1. Tal resultado leva a crer que nesta forma o processo de divisão celular requiera níveis muito baixos desta proteína para ser efetivado. Contudo, mais estudos precisam ser feitos para concluir efetivamente qual a função deste complexo proteico na divisão celular das formas de vida do *Trypanosoma cruzi*.

Como a Coesina ainda é pouco conhecida em tripanossomatídeos, não se sabe ao certo qual a sua importância no ciclo celular destes organismos e de suas formas evolutivas. No estudo de GLUENZ et al. (2001) verificou-se que, em *Trypanosoma brucei*, a depleção da subunidade SCC1 por RNAi ou a expressão de uma SCC1 não clivável leva a uma falha na citocinese: sem a segregação cromossômica os tripanosomas procíclicos produzem uma célula nucleada e outra anucleada, enquanto em formas sanguíneas a citocinese é interrompida

permanecendo incompleta; deste modo há uma falha completa na divisão da forma sanguínea mas não da forma procíclica.

Estudos realizados com outras proteínas reguladoras do ciclo celular de *Trypanosoma cruzi* mostraram que existem diferenças na imunolocalização destas proteínas quando se comparam as formas amastigotas e tripomastigotas do parasito. CUNHA et al., (2005) utilizou anticorpos contra a quinase TzCRK1, uma proteína envolvida na regulação do ciclo celular através da fosforilação de histonas, e não detectou nenhum sinal para a mesma nas formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, enquanto nas formas amastigotas este sinal é detectado.

A realização destes estudos em tripanossomatídeos é particularmente importante devido ao fato de que estes organismos não utilizam o início da transcrição como etapa da regulação para controlar a expressão gênica. Aparentemente, todos os genes que codificam proteínas em tripanossomatídeos são organizados em grandes unidades policistrônicas as quais geram RNAs precursores e que são processados para originar RNA mensageiros monocistrônicos, por mecanismos de trans-splicing. A regulação gênica ocorre por controlar a estabilidade ou a tradução de mRNA específicos (VANHAMME AND PAYS, 1995)

Devido a diferença de detecção do sinal da proteína TcSCC1 do complexo Coesina em ensaios de imunofluorescência para as formas amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, os níveis de mRNA para essa subunidade também foram analisados. Os ensaios não apresentaram diferenças significativas nos níveis de mRNA das três formas de *Trypanosoma cruzi* para a subunidade TcSCC1.

Essas diferenças nas análises comparativas entre os níveis de detecção para a proteína e os níveis de mRNA reforçam a idéia de que a regulação da expressão deste gene *TcSCC1* ocorre de maneira pós-transcricional, pois os níveis de mRNA que será traduzido em proteína são muito semelhantes nas três formas do parasito,mas o mesmo não parece ser observado ao analisar os níveis da proteína.

Em tripanossomatídeos unidades policistrônicas são transcritas (VAHNHAME & PAYS, 1995; TEIXEIRA, 1998; TEIXEIRA & DA ROCHA, 2003) que são representadas por uma única molécula de RNA geralmente contendo diversos genes que não são relacionado a determinada via metabólica, como ocorre nos operons de procariotos. Além disso, genes de uma mesma unidade de transcrição policistrônica

podem apresentar diferenças nos níveis de expressão, demonstrando o controle da expressão gênica por mecanismos pós-transcricionais (VENHAMME & PAYS, 1995). Essa molécula de RNA será processada por trans-splicing (SUTTON & BOOTHROYD, 1986), gerando unidades monocistrônicas traduzíveis.

O fato de que os genes presentes na mesma unidade policistrônica apresentam níveis de mRNA processados de maneira distintas reforçam a idéia de que a regulação da expressão ocorra a nível pós-transcricional. O fato de não ter sido encontrado nenhum promotor característico para a enzima RNA polimerase II e de o início da transcrição da maioria dos genes codificadores de proteínas serem promíscuos (VANHAMME and PAYS, 1995; CLAYTON, 2002) reforçam a idéia de que os mecanismos de regulação da expressão gênica devem ocorrer, em grande parte, após o término da transcrição.

A regulação pós-transcricional em *T. cruzi* possui alguns pontos potenciais de ocorrência como, por exemplo, o trans-splicing (processamento do mRNA policistrônico em unidade de mRNA monocistrônico), a degradação citoplasmática dos mRNAs, a associação à maquinaria de tradução (fatores que controlam o acesso do mRNA à maquinaria de tradução de forma seletiva), estabilidade protéica e modificações pós traducionais.

Além da subunidade TcSCC1, as demais subunidades do complexo Coesina de *T. cruzi* tiveram os seus níveis de mRNA analisados tanto semi-quantitativamente, quanto quantitativamente. Em análises semi-quantitativas os níveis de todos os genes da coesina foram semelhantes entre as formas de *T. cruzi*, enquanto em análises quantitativas, por RT-PCR em tempo real, que é uma técnica mais apurada, houve uma diferença significativa entre o nível de mRNA da subunidade TcSMC3 entre as formas tripomastigotas e amastigotas, onde o nível de mRNA na primeira forma foi consideravelmente superior quando comparado a segunda. Tal diferença pode ter sido ocasionada pelo fato de que o *cluster* onde se encontra o gene *TcSMC3* também contém, um pouco a montante, uma proteína MASP (*Mucin-Associated Surface Protein*) (Figura 31). As proteínas MASP fazem parte de uma grande família de proteínas multigênicas identificadas recentemente em *T. cruzi* que compõem cerca de 6% do genoma do parasito. Os transcritos de *Masp* são expressos preferencialmente nas formas tripomastigotas. Ensaios de *western blot* e de parasitos tratados com fosfolipase C fosfatidilinositol-específica sugerem que a proteína MASP pode contribuir para o alto número de polipeptídeos

dos parasitos que são expostos ao sistema imune do hospedeiro (BARTHOLOMEU et al.,2009)

Para os demais genes os níveis encontrados para cada uma das subunidades foi semelhante entre as formas amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, sugerindo que estes genes são expressos constitutivamente nestas formas evolutivas do parasito.

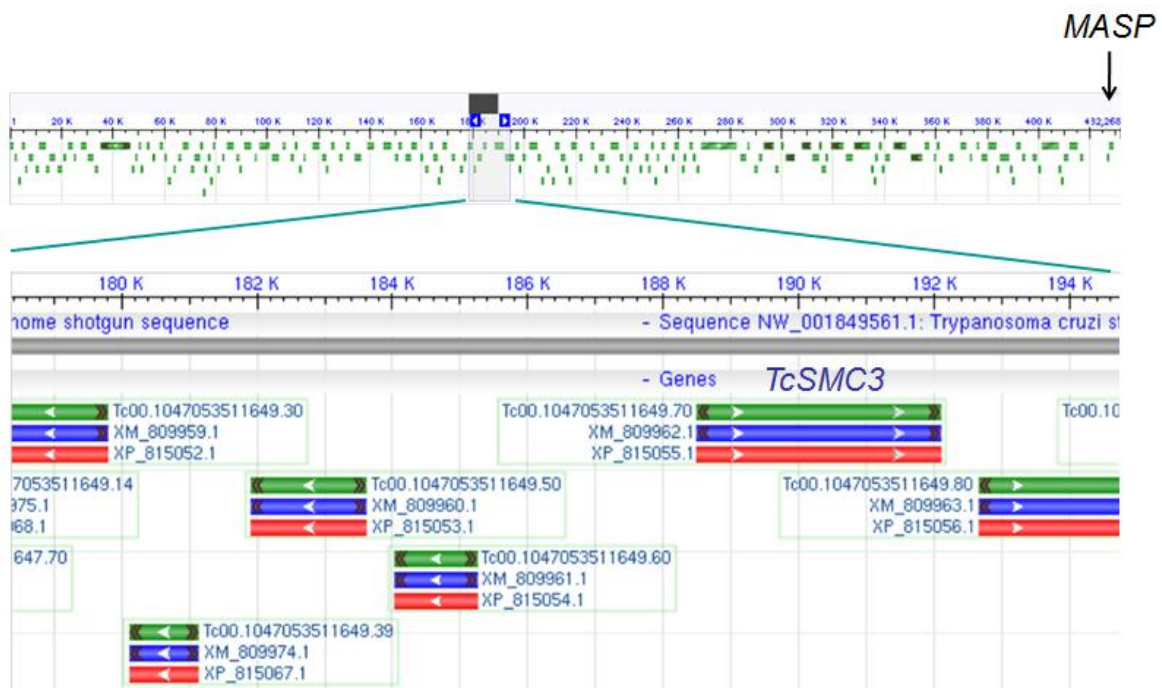


Figura 31. Cluster do gene *TcSMC3* e do gene *MASP* de *T. cruzi*. O gene *TcSMC3* se encontra no mesmo cluster do gene *MASP* em *T. cruzi*, separados por aproximadamente 240 K. Adaptado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, sequência: NW_001849561.1

A localização dos cromossomos no núcleo de uma célula eucariótica é dependente dos processos de replicação e transcrição dos genes. Pouco se sabe sobre a localização cromossômica de protozoários como tripanosomatídeos, que possuem um mecanismo exclusivo de controle da expressão gênica, em que a maioria dos genes são regulados de maneira pós-transcricional.

Os ensaios de imunofluorescência realizados neste trabalho evidenciaram mais de um padrão de citolocalização da proteína *TcSCC1* do complexo Coesina no núcleo das formas amastigotas de *T. cruzi*. No primeiro padrão a marcação se apresenta de forma difusa pelo núcleo celular e no segundo padrão a marcação se apresenta na periferia nuclear. Em culturas amastigotas sincronizadas com

hidroxiuréia, células em fase G₁ apresentam o primeiro padrão. Possivelmente as células que apresentaram o segundo padrão se encontram nas fases S a G₂.

Elias et al (2002) elucidou os sítios de replicação em *Trypanosoma cruzi* por meio da incorporação de 5-bromodeoxiuridina, localizando-os na periferia nuclear das formas epimastigotas a partir do início da fase S do ciclo celular (Figura 32). Quando a fase S termina e as células progridem pelo ciclo a marcação com a 5-bromodeoxiuridina foi observada no interior nuclear, o que sugere que os cromossomos se movem. No mesmo trabalho a localização dos cromossomos foram monitoradas em diferentes estágios do ciclo celular utilizando uma sequência de DNA satélite como sonda em ensaios de fluorescência com hibridização in situ. Nestes ensaios dois padrões de marcação distintos foram encontrados. O primeiro foi visto em células na fase G₁, tanto em formas epimastigotas quanto em tripomastigotas sincronizadas com hidróxiuréia. O outro padrão foi encontrado em células que estavam nas fases S a G₂. Nestas células o DNA satélite foi localizado preferencialmente na periferia nuclear. A marcação da periferia nuclear desaparece somente após a mitose. Com tais resultados sugere-se que os cromossomos de *T. cruzi* se movem e, após entrarem na fase S, se encontram concentrados na periferia nuclear, onde a replicação ocorre.

Com os resultados obtidos na citolocalização do presente trabalho com a proteína TcSCC1 do complexo Coesina (responsável em outros eucariotos por manter as cromátides unidas durante a divisão celular – da fase S ao estágio de anáfase da Mitose) sugere-se que o padrão da dinâmica nuclear das células amastigotas seja semelhante ao encontrado em células epimastigotas, onde, da fase S à fase G₂ do ciclo celular, os cromossomos se encontram na periferia nuclear para replicar-se.

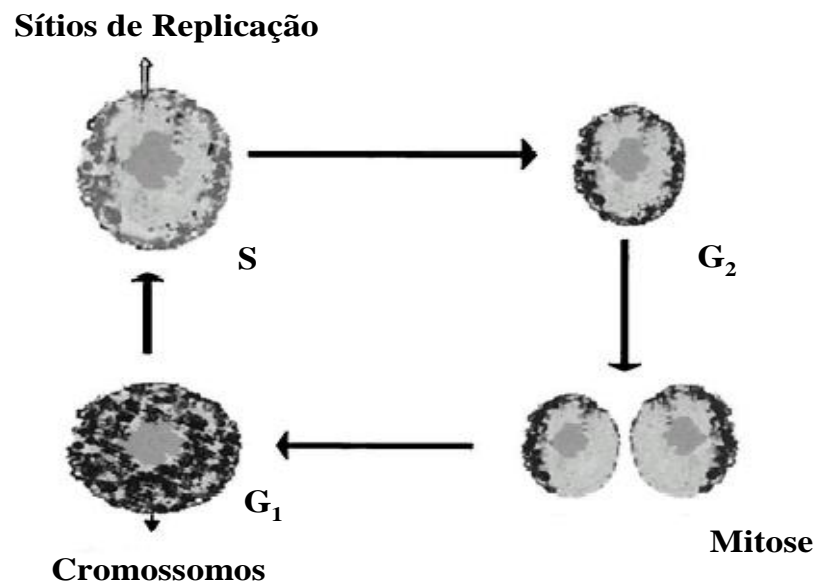


Figura 32. Modelo da dinâmica dos cromossomos durante o ciclo celular de *T. cruzi*. Em G1 os cromossomos estão dispersos por todo núcleo. Durante o estágio replicativo do ciclo celular os cromossomos se encontram retidos na periferia nuclear, mantendo-se nos pólos opostos da célula durante a mitose e se dispersando quanto a mitose está completa. O nucléolo está localizado no centro da estrutura (Adaptado de Elias et al., 2002).

De acordo com CALDERANO (2008) uma das hipóteses da replicação dos cromossomos de *T. cruzi* acontecer em região separada da transcrição consiste no fato de que essa separação espacial poderia ser uma forma simples de organizar os processos dentro do núcleo da célula, evitando que uma etapa sobreponha a outra. Por isso a transcrição ocorreria no interior nuclear (DOSSIN E SCHENKMAN, 2005), enquanto a replicação do DNA na periferia (ELIAS et al., 2002). Isso se baseia na origem dos tripanossomatídeos, antiga na evolução dos eucariotos. A transcrição de *Trypanosoma cruzi*, por exemplo, ocorre de maneira policistrônica, sem sítios promotores para RNA polimerase II, o que restringe o controle da expressão gênica a poucas etapas, evidenciando a simplicidade deste organismo.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

No estudo sobre o envolvimento da Coesina como mecanismo de controle da divisão celular de *Trypanosoma cruzi*, este trabalho propõe que a subunidade TcSCC1 do Complexo Coesina está presente no protozoário *T. cruzi*, de forma mais evidente no núcleo das formas amastigotas deste parasito. Propõe, também, que esta proteína migra para a periferia nuclear em conjunto com os cromossomos no momento da replicação dos mesmos, de acordo com trabalhos anteriores realizados nas formas epimastigotas e tripomastigotas. Foi observado ainda que os níveis de mRNA das prováveis quatro subunidades que formam o anel da coesina apresentam poucas variações entre as formas amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, e os níveis de marcação para a proteína TcSCC1 em ensaios de imunocitocalização foram consideravelmente diferentes entre essas três formas evolutivas do parasito. Tal resultado sugere a existência de uma regulação pós-transcricional atuando sobre as subunidades do complexo coesina.

Assim, como perspectivas deste trabalho, os mesmos ensaios de imunocitocalização devem ser repetidos para as subunidades TcSCC3, TcSMC3 e TcSMC1, visando esclarecer se o mesmo padrão é encontrado para estas proteínas no interior nuclear das formas amastigotas de *T. cruzi*. Além disto, é preciso esclarecer se a interação entre as quatro possíveis subunidades da coesina, já descrita para leveduras, está conservada neste parasita, ou se a estrutura molecular do complexo é diferente. Deste modo, muito ainda se tem para elucidar a estrutura da coesina de *T. cruzi*, sua regulação e sua importância para a correta segregação das cromátides-irmãs neste parasita, aumentando assim o conhecimento do processo de divisão celular de *T. cruzi*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDRU, G.; UHLMANN, F.; MECHTLER, K.; POUPART, M.A.; NASMYTH, K. Phosphorylation of the cohesin subunit Scc1 by Polo/Cdc5 kinase regulates sister chromatid separation in yeast. **Cell**, 105: 459-72, 2001.
- ALSFORD, S.; HORN, D. Trypanosomatid histones. **Mol. Microbiol.** 53(2): 365-72, 2004.
- ARUMUGAM, P.; GRUBER, S.; TANAKA, K.; HAERING, C.H.; MECHTLER, K.; NASMYTH, K. ATP hydrolysis is required for cohesin's association with chromosomes. **Curr. Biol.**, 13: 1941–53, 2003.
- ARUMUGAM, P.; NISHINO, T.; HAERING, C.H.; GRUBER, S.; NASMYTH, K. Cohesin's ATPase activity is stimulated by the C-terminal winged-helix domain of its kleisin subunit. **Curr. Biol.**, 16: 1998–2008, 2006.
- BANNISTER, L.A.; REINHOLDT, L.G.; MUNROE, R.J.; Schimenti J.C. Positional cloning and characterization of mouse *mei8*, a disrupted allele of the meiotic cohesin *Rec8*. **Genesis**, 40:184–94, 2004.
- BARTHOLOMEU, D.C.; CERQUEIRA, G.C.; LEÃO, A.C.A.; DAROCHA, W.D.; PAIS, F.S.; MACEDO, C.; DJIKENG, A.; TEIXEIRA, S.M.R.; EL-SAYED, N.M. Genomic organization and expression profile of mucin-associated surface protein (*maps*) family of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. **Nuclei Acids Research**. 37(10):3407-3417, 2009.
- BESSAT, M.; ERSFELD, K. Functional characterization of cohesin SMC3 and separase and their roles in the segregation of large and minichromosomes in *Trypanosoma brucei*. **Molec. Microbio.**, 71(6): 1371-1385, 2009.
- BEN-SHAHAR, T.R.; HEEGER, S.; LEHANE, C.; EAST, P.; FLYNN, H. Eco1-dependent cohesin acetylation during establishment of sister chromatid cohesion. **Science**, 321:563–66, 2008.
- BERNARD, P.; DROGAT, J.; MAURE, J.F.; DHEUR, S.; VAUR, S. A screen for cohesion mutants uncovers Ssl3, the fission yeast counterpart of the cohesin loading factor Scc4. **Curr. Biol.** 16:875–81, 2006.
- BIMBOIN, H. C.; J. DOLY. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res.** 7:1513-1523, 1979.
- BLAGDEN, S.P.; GLOVER, D.M. Polar expeditions--provisioning the centrosome for mitosis. **Nat. Cell. Biol.** 5: 505–511, 2003.
- BLAIN, S. W.; MONTALVO, E.; MASSAUGUE, J. Differential Interaction of the cyclin-dependent kinase (cdk) inhibitor p27 with cyclinA-CDK2 and cyclinD2-CDK4. **J. Biol. Chem.** 25: 863-872, 1997.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, 72: 248-255, 1976.

BRAR, G.A.; KIBURZ, B.M.; ZHANG, Y.; KIM, J.E.; WHITE, F.; AMON, A. Rec8 phosphorylation and recombination promote the step-wise loss of cohesins in meiosis. **Nature**, 441: 532–36, 2006.

BUONOMO, S.B.; CLYNE, R.K.; FUCHS, J.; LOIDL, J.; UHLMANN, F.; NASMYTH, K. Disjunction of homologous chromosomes in meiosis I depends on proteolytic cleavage of the meiotic cohesin Rec8 by separin. **Cell** 103:387–98, 2000.

CALDERANO, S.G. **Dinâmica Molecular no Núcleo de *Trypanosoma cruzi***. 2008. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) – Departamento de Parasitologia. Instituto de Ciência Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

CANO, M.I.; GRUBER, A.; VAZQUEZ, M.; CORTÉS, A.; LEVIN, M.J.; GONZALEZ, A.; DEGRAVE, W.; RONDINELLI, E.; RAMIREZ, J.L.; ALONSO, C.; REQUENA, J.M.; FRANCO DA SILVEIRA, J. Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project. **Mol. Biochem. Parasitol.** 71:273-278, 1995.

CARROMOLINO, L.; LEE, B. C.; ZABALLOS, A.; PELED, A.; BRTHELEMY, I.; TAL, S.; PIETRO, I.; CARMÍ, P.; GOTHELF, Y.; GONZÁLES DE BUITRAGO G.; ARACIL, M.; MÁRQUEZ, G.; BARBERO, J. L.; ZIPORI, D. SA-1, a nuclear protein encoded by one member of a novel gene family: molecular cloning and detection in homopoeitic organs. **Gene**, 195:151-159, 1997

CHANDLEY, A.C. Meiosis in man. **Trends Genet.**, 4(3): 79-84, 1988.

CIOSK, R.; SHIRAYAMA, M.; SHEVCHENKO, A.; TANAKA, T.; TOTH, A. Cohesin's binding to chromosomes depends on a separate complex consisting of Scc2 and Scc4 proteins. **Mol. Cell**, 5:243–54, 2000.

CLAYTON, C.E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. **EMBO Journal**. 21(8):1881-88, 2002.

CLAYTON, C.E. The molecular biology of the kinetoplastidae. **Genet. Engineer.** 7, 1988.

COOK, P.R. Organization of replication ant transcription. **Science**. 284: 1790-5, 1999.

CORTES-LEDESMA, F.; AGUILERA, A. Double-strand breaks arising by replication through a nick are repaired by cohesin-dependent sister-chromatid exchange. **EMBO Rep.** 7: 919–26, 2006.

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

CUNHA, J.P.C.; NAKAYASU, E.S.; ELIAS, M.C.; PIMENTA, D.C., TÉLLEZ-IÑÓN, M.T.; ROJAS, F.; MUÑOZ, M.J.; 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.** 140: 75–86.

DAVIS, L.; SMITH, G.R. Meiotic recombination and chromosome segregation in *Schizosaccharomyces pombe*. **PNAS.** 15: 8395-8402, 2001

DE LANGE, C. Sur un type nouveau de degeneration (typus Amstelodamensis). **Arch. Méd. Enfants.** 36: 713–19, 1933

DE SOUZA, W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Int. Ver. Cytol.**, 86: 197-283, 1984.

DE SOUZA, W. Special organelles of some pathogenic protozoa. **Parasitol Res.**, 12: 1013-25, 2002.

DE SOUZA, C.P.C.; OSMANI, A.S. Mitosis, not just open or closed. **Eukar. Cell.**, 6: 1521-7, 2007.

DEARDORFF, M.A.; KAUR, M.; YAEGER, D.; RAMPURIA, A.; KOROLEV, S. Mutations in cohesin complex members SMC3 and SMC1A cause a mild variant of Cornelia de Lange syndrome with predominant mental retardation. **Am. J. Hum. Genet.** 80:485–94, 2007.

DEGRASSE, J.A.; CHAIT, B.T.; FIELD, M.C.; ROUT, M.P. High-yield isolation and subcellular proteomic characterization of nuclear and subnuclear structures from trypanosomes. **Methods Mol. Biol.**, 463: 77-92, 2008

DIAS, J.C.P.; SILVEIRA, A.C.; SCHOFIELD, C.J. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 97: 603-644, 2002.

DIAS, J.C.P.; SILVEIRA, A.C.; SCHOFIELD, C.J. Doença de Chagas e transfusão de sangue no Brasil: vigilância e desafios. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, 28(2):81-87, 2006.

DOSSIN, F.M; SCHENKMAN, S. Actively transcribing RNA polymerase II concentrates on spliced leader genes in the nucleus of *Trypanosoma cruzi*. **Eukaryot. Cell.** 5: 960-70, 2005.

DRAETTA, G.; LUCA, F.; WESTENDORF, J.; BRIZUELA, L.; RUDERMAN, J.; BEACH, D. Cdc2 protein kinase is complexed with both cyclin A and B: Evidence for proteolytic inactivation of MPF. **Cell.** 56: 829–838, 1989.

DUNPHY, W.G., BRIZUELA, L.; BEACH, D.; NEWPORT, J. The *Xenopus* cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. **Cell.** 54: 423–431, 1988.

ECKERT, C.A.; GRAVDAHL, D.J.; MEGEE, P.C. The enhancement of pericentromeric cohesin association by conserved kinetochore components promotes high-fidelity chromosome segregation and is sensitive to microtubule-based tension. **Genes Dev.** 21: 278–91, 2007.

ELIAS, M. C.; CUNHA, J.P.C.; FARIA F.P.; MORTARA R. A.; FREYMULLER, E.; SCHENKMAN, S. Morphological events during the *Trypanosoma cruzi* cell cycle. **Protist.**, 158: 147-57, 2007.

ELIAS, M.C.; FARIA, M.; MORTARA, R.A.; MOTTA, M.C.; DE SOUZA, W.; THIRY, M.; SCHENKMAN, S. Chromosome localization changes in the *Trypanosoma cruzi* nucleus. **Eukaryot. Cell.** 6: 944-53, 2002.

ELIAS, M.C.; MARQUES-PORTO, R.; FREYMULER, E.; SCHENKMAN, S. Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organization. **Mol. Biochem. Paras.**, 112: 29-90, 2001.

ELLERMEIER, C.; SMITH, G.R. Cohesins are required for meiotic DNA breakage and recombination in *Schizosaccharomyces pombe*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 102:10952–57, 2005.

FREEMAN, M.V.; WILLIAMS, D.W.; SCHIMKE, R.N.; TEMTAMY, S.A.; VACHIER, E.; GERMAN J. The Roberts syndrome. **Clin. Genet.**, 5:1–16, 1974

GALLI, A.; SCHIESTL, R.H. Hydroxyurea induces recombination in diiding but not in G1 or G2 cell cycle arrested yeast cells. **Mutat. Res.**, 354(1): 69-75, 1996.

GAUTIER, J.; NORBURY, C.; LOHKA, M.; NURSE, P.; MALLER, J. Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*. **Cell.** 54: 433–439, 1988.

GELFAND, V.I.; SCHOLEY, J.M. Cell biology. Every motion has its motor. **Nature.** 359: 480-2, 1992.

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. **Molec. Microbio.**, 69(3): 666–680, 2008.

GOEPFERT, T.M.; BRINKLEY, B.R. The centrosome-associated Aurora/Ipl-like kinase family. **Curr. Top. Dev. Biol.** 49: 331–342, 2000.

HAERING, C.H.; LOWE, J.; HOCHWAGEN, A.; NASMYTH, K. Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. **Mol. Cell**, 9:773–88, 2002.

HAERING, C.H.; SCHOFFNEGGER, D.; NISHINO, T.; HELMHART, W.; NASMYTH, K.; LOWE, J. Structure and stability of cohesin's Smc1-kleisin interaction. **Mol. Cell** 15:951–64, 2004.

HANFT, V.N., et al. Acquired DNA mutations associated with in vivo hydroxyurea exposure. **Blood**, 95(11): 3.589-3.593, 2000.

HARTWELL, L.H.; WEINERT, T.A. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. **Science**, 246: 629-34, 1989.

- HAUF, S.; WAIZENEGGER, I.; PETERS, J.M. Cohesin cleavage by separase required for anaphase and cytokinesis in human cells. **Science** 293:1320–23, 2001.
- HECKER, H.; BETSCHART, B.; BENDER, K.; BURRI, M.; SCHLIMME, W. The chromatin of trypanosomes. **Int. J. Parasitol.** 24(6):809-19, 1994.
- HECKER, H.; BETSCHART, B.; BURRI, M.; SCHLIMME, W. Functional morphology of trypanosome chromatin. **Parasitol. Today**, 11: 79–83, 1995.
- HERRMANN, J.; OPITZ, J.M. The SC phocomelia and the Roberts syndrome: nosologic aspects. **Eur. J. Pediatr.**, 125:117–34, 1977.
- HERWALDT, B.L. Laboratory-Acquired Parasitic Infections from Accidental Exposures. **Clinic. Microbiol. Rev.**, 14(4): 659-688, 2001.
- HIRANO, T. SMC-mediated chromosome mechanics: a conserved scheme from bacteria to vertebrates? **Genes Dev.**, 13(1):11-9, 1999.
- HIRANO, M.; HIRANO T. ATP-dependent aggregation of single-stranded DNA by a bacterial SMC homodimer. **EMBO J.**, 17(23): 7139-48, 1998.
- HIRANO, M.; HIRANO, T. Hinge-mediated dimerization of SMC protein is essential for its dynamic interaction with DNA. **EMBO J.** 21: 5733–44, 2002.
- HORI, M.M.; TATSUKA, M.; WANG, Y.L. Probing the Dynamics and Functions of Aurora B Kinase in Living Cells during Mitosis and Cytokinesis. **Molec. Biol. of the Cell.**, 13 (4): 1099-1108, 2002.
- HUANG, C.E.; MILUTINOVICH, M.; KOSHLAND, D. Rings, bracelet or snaps: fashionable alternatives for SMC complexes. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.** 360: 537–42, 2005.
- IRNIGER, S.; PIATTI, S.; MICHAELIS, C.; NASMYTH, K. Genes involved in sister chromatid separation are needed for B-type cyclin proteolysis in budding yeast. **Cell.** 81: 269–278, 1995.
- JAGER, H.; HERZIG, A.; LEHNER, C.F.; HEIDMANN, S. *Drosophila* separase is required for sister chromatid separation and binds to PIM and THR. **Genes Dev.** 15: 2572–84, 2001.
- JOHNSTON, L.H. Periodic events in the cell cycle. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, 2: 274-9, 1990.
- JONES, S.; SGOUROS, J. The cohesion complex: sequence homologies, interaction networks and shared motifs. **Gen. Biol.**, 2: 0009.1-12, 2001.
- JUDGE, C. A sibship with the pseudothalidomide syndrome and an association with Rh incompatibility. **Med. J. Aust.** 2:280–81, 1973

KERREBROCK, A.W.; MOORE, D.P.; WU, J.S., ORR-WEAVER, T.L. Mei-S332, a *Drosophila* protein required for sister-chromatid cohesion, can localize to meiotic centromere regions. **Cell**, 83:247–56, 1995

KING, R.W.; PETERS, J.; TUGENDREICH, S.; ROLFE, M.; HIETER, P.; KIRSCHNER, M.W. A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. **Cell** 81: 279–88, 1995.

KITAJIMA, T.S.; HAUF, S.; OHSUGI, M.; YAMAMOTO, T.; WATANABE, Y. Human Bub1 defines the persistent cohesion site along the mitotic chromosome by affecting Shugoshin localization. **Curr. Biol.** 15:353–59, 2005.

KLEIN, F.; MAHR, P.; GALOVA, M.; BUONOMO, S.B.; MICHAELIS, C. A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis. **Cell** 98:91–103, 1999

KUDO, N.R.; WASSMANN, K.; ANGER, M.; SCHUH, M.; WIRTH, K.G. Resolution of chiasmata in oocytes requires separase-mediated proteolysis. **Cell**, 126: 135–46, 2006.

KUMADA, K.; YAO, R.; KAWAGUCHI, T.; KARASAWA, M; HOSHIKAWA, Y. The selective continued linkage of centromeres from mitosis to interphase in the absence of mammalian separase. **J. Cell Biol.** 172:835–46, 2006.

LABBÉ, J.C.; CAPONY, J.P.; CAPUT, D.; CAVADORE, J.C.; DERANCOURT, J.; KAGHDAD, M.; LELIAS, J.M.; PICARD, A.; DORÉE, M. MPF from starfish oocytes at first meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of cdc2 and one molecule of cyclin B. **EMBO J.** 8: 3053–3058, 1989.

LABBÉ, J.C.; LEE, M.G.; NURSE, P.; PICARD, A.; DOREE, M. Activation at M-phase of a protein kinase encoded by a starfish homologue of the cell cycle control gene *cdc2+*. **Nature.** 335: 251–254, 1988.

LARA-PEZZI, E.; PEZZI, N.; PRIETO, I.; BARTHELEMY, I.; CARREIRO, C.; MARTINES, A.; MALDONADO-RODRIGUEZ, J. A.; LOPEZ-CABRERA, M.; BARBERO, J.L. Evidence of a transcriptional co-activator function of cohesin STAG/AS/Scs3. **J. Biol Chem.**, 279(8): 6553-9, 2004.

LEE, J. Y.; ORR-WEAVER, T.L. The molecular basis of sisterchromatid cohesion. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** 17: 753–777, 2001.

LENGRONNE, A.; MCINTYRE, J.; KATOU, Y.; KANO, Y.; HOPFNER, K.P. Establishment of sister chromatid cohesion at the *S. cerevisiae* replication fork. **Mol. Cell**, 23: 787–99, 2006.

LIMA, P.D.L., et al. Evaluation of the mutagenic activity of hydroxyurea on the G1-S-G2 phases of the cell cycle: an in vitro study. **Genet. and Mol. Res.**, 2(3): 328-333, 2003.

- LIU, Z.; MAKAROFF, C.A. *Arabidopsis* separase AESP is essential for embryo development and the release of cohesin during meiosis. **Plant Cell**, 18: 1213–25, 2006.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. **Methods**. 25: 402-408, 2001.
- LOSADA, A.; YOKOCHI, T.; KOBAYASHI, R.; HIRANO, T. Identification and characterization of SA/Scs3p subunits in the *Xenopus* and human cohesin complexes. **J. Cell. Biol.** 150: 405-16, 2000.
- 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.
- MACEDO, A.M.; OLIVEIRA, R.P.; PENA, S.D.J. Chagas disease: role of parasite variation in pathogenesis. **Exp. Rev. Molec. Med.**, 4 : 1-16, 2002.
- MCGUINNESS, B.E.; HIROTA, T.; KUDO, N.R.; PETERS, J.M.; NASMYTH, K. Shugoshin prevents dissociation of cohesin from centromeres during mitosis in vertebrate cells. **PLoS Biol.**, 3:433–49, 2005.
- MCINTOSH, J.R.; MCDONALD, K.L. The mitotic spindle. **Sci. Am.**, 261(4): 48-56, 1989
- MCINTOSH, J.R.; KONCE, M.P. Mitosis. **Science**, 246: 622-8, 1989.
- MCINTYRE, J.; MULLER, E.G.; WEITZER, S.; SNYDSMAN, B.E.; DAVIS, T.N.; UHLMANN, F. In vivo analysis of cohesin architecture using FRET in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO J.** 26: 3783–93, 2007.
- MELBY, T.E.; CIAMPAGLIO, C.N.; BRISCOE, G.; ERICKSON, H.P. The symmetrical structure of structural maintenance of chromosomes (SMC) and MukB proteins: long, antiparallel coiled coils, folded at a flexible hinge. **J. Cell Biol.**, 142: 1595–604, 1998.
- MICHAELIS, C.; CIOSK, R.; NASMYTH, K. Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. **Cell**, 91:35–45, 1997.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 38 (Supl. III): 1-29, 2005.
- MIYAZAKI, W.Y.; ORR-WEAVER, T.L.: Sister-chromatid cohesion in mitosis and meiosis. **Annu. Rev. Genet.**, 28: 167-187, 1994.
- MURRAY, A.W. Cell cycle. Centrioles at the checkpoint. **Science**, 291: 1499-502, 2001.
- MUSACCHIO, A.; SALMON, E.D. The spindle-assembly checkpoint in space and time. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 8:379–93, 2007.

NAKAJIMA, M.; KUMADA, K.; HATAKEYAMA, K.; NODA, T.; PETERS, J.M.; HIROTA, T. The complete removal of cohesin from chromosome arms depends on separase. **J. Cell Sci.** 120:4188–96, 2007.

NASMYTH, K. How do so few control so many? **Cell**, 120: 739–46, 2005.

NASMYTH, K.; HAERING, C.H. Cohesin: Its Roles and Mechanisms. **Annu. Rev. Genet.** 43: 525–58, 2009.

NASMYTH, K.; SCHLEIFFER, A. From a single double helix to paired double helices and back. **Philos.Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.** 359:99–108, 2004

NIKI, H.; JAFFE, A.; IMAMURA, R.; OGURA, T.; HIRAGA, S. The new gene mukB codes for a 177kd protein with coiled-coil domains involved in chromosome partitioning of *E. coli*. **EMBO J.** 10(1): 183-93, 1991.

NURSE, P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. **Nature**, 344(6266): 503–8, 1990.

ONN, I.; HEIDINGER-PAULI, J.M.; GUACCI, V.; UNAL, E.; KOSHLAND, D.E. Sister chromatid cohesion: a simple concept with a complex reality. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** 24: 105-29, 2008.

PALENCHAR J.B.; BELLOFATTO, V. Gene transcription in trypanosomes. **Mol. Biochem. Parasitol.** 146: 135-41, 2006

PAN, W. H.; HOUBEN, A.; SCHLEGEL, R. Highly effective cell synchronization in plant roots by hydroxyurea and amiprofos-methyl or colchicine. **Genome**, 36: 387-390, 1993.

PAULI, A.; ALTHOFF, F.; OLIVEIRA, R.A.; HEIDMANN, S.; SCHULDINER, O. Cell-type-specific TEV protease cleavage reveals cohesin functions in *Drosophila* neurons. **Dev. Cell**, 14:239–51, 2008.

PEREIRA, M.C.S.; COSTA, M., CHAGAS FILHO, C.; MEIRELLES, M.N.L. Myofibrillar breakdown and cytoskeletal alterations in heart muscle cells during invasion by *Trypanosoma cruzi*: immunological and ultrastructural study. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, 25(4) : 559-569, 1993.

PEZZI, N.; PRIETO, I.; KREMER, L.; PÉREZ JURADO, L.A.; VALERO, C.; DEL MAZO, J.; MARTÍNEZ-A.C.; BARBERO, J. L. STAG3, a novel gene encoding a protein involved in meiotic chromosome pairing and location of STAG-3-related genes flanking the Williams-Beuren syndrome deletion. **FASEB J.**, 14:581-92, 2000.

PROUDFOOT, N.; FURGER, A.; DYE, M. Integrating mRNA processing with transcription. **Cell.** 108(4):501-12, 2002.

RAFF, J.W.; GLOVER, D.M. Centrosomes, and not nuclei, initiate pole cell formation in *Drosophila* embryos. **Cell**, 57: 611-9, 1989.

RANG, H.P., et al. **Farmacologia**. 4 ed. São Paulo: Ganabara Koogan, 2000. 571 p.

RIEDER, C.L.; SALMON, E. The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis. **Trends Cell Biol**, 8: 310-318, 1998.

RIVERA, T.; LOSADA, A. Shugoshin regulates cohesion by driving relocalization of PP2A in *Xenopus* extracts. **Chromosoma**, 118: 223–33, 2009.

ROBERTS, J. A child with double cleft of lip and palate, protrusion of the intermaxillary portion of the upper jaw and imperfect development of the bones of the four extremities. **Ann. Surg.** 70: 252–53, 1919.

ROWLAND, B.D.; ROIG, M.B.; NISHINO, T.; KURZE, A.; ULUOCAK, P. Building sister chromatid cohesion: Smc3 acetylation counteracts an antiestablishment activity. **Mol. Cell** 33:763–74, 2009.

SAKANO, K., et al. Hydroxyurea induces site-specific DNA damage via formation of hydrogen peroxide and nitric oxide. **Jpn. J. Cancer Res.**, 92(11): 1.166-1.174, 2001.

SALIC, A.; WATERS, J.C.; MITCHISON, T.J. Vertebrate shugoshin links sister centromere cohesion and kinetochore microtubule stability in mitosis. **Cell**, 118:567–78, 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning. A laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 417p.

SCHAFER, K.A. The cell cycle: a review. **Veter. Pathol.** 35: 461-478, 1998.

SCOOT, J.P., et al. Hydroxyurea therapy in children severely affected with sickle cell disease. **J. of Pediatrics**, 128(6): 820-828, 1996.

SEITAN, V.C.; BANKS, P.; LAVAL, S.; MAJID, N.A.; DORSETT, D. Metazoan Scc4 homologs link sister chromatid cohesion to cell and axon migration guidance. **PLoS Biol.**, 4: 242, 2006

SHERR, C.J.; MCCORMICK, F. The Rb and p53 pathway in cancer. **Cancer cell.** 2: 103-111, 2002.

SIOMOS, M.F.; BADRINATH, A.; PASIERBEK, P.; LIVINGSTONE, D.; WHITE, J. Separase is required for chromosome segregation during meiosis I in *Caenorhabditis elegans*. **Curr. Biol.** 11: 1825–35, 2001.

SILVA, L.H.O.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para camundongo branco. **Folia Clin. Biol.**, 20: 191-207, 1992.

SILVEIRA, A.C. Situação do controle da transmissão vetorial da doença de Chagas nas Américas. **Cad. Saúde Pública**, 16 (2): 35-42, 2000.

SKIBBENS, R.V. Establishment of Sister Chromatid Cohesion Minireview. **Curr. Biol.**, 19 (24): 1126-1132, 2009.

SOLARI, A.J. The 3-dimensional fine structure of the mitotic spindle in *Trypanosoma cruzi*. **Chromosoma.**, 78: 239-55, 1980.

SOPPA, J.; KOBAYASHI, K.; NOIROT-GROS, M.F.; OESTERHELT, D.; MORIYA, S. Discovery of two novel families of proteins that are proposed to interact with prokaryotic SMC, and characterization of the *Bacillus subtilis* family members ScpA and ScpB. **Mol. Microbiol.**, 45(1): 59-71, 2002.

SCHOLEY, J.M.; BRUST-MASCHER, I.; MOGILNER, A. Cell division. **Nature**, 422: 746-52, 2003.

SCHULE, B.; OVIEDO, A.; JOHNSTON, K.; PAI, S.; FRANCKE, U. Inactivating mutations in ESCO2 cause SC phocomelia and Roberts syndrome: no phenotype-genotype correlation. **Am. J. Hum. Genet.** 77:1117–28, 2005.

SJOEGREN, C.; NASMYTH, K. Sister chromatid cohesion is required for post-replicative double strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Biol.** 11:991–95, 2001.

STEINDEL, M.; DIAS, J.C.P.; ROMANHA, A.J. Doença de Chagas: Mal que ainda preocupa. **Ciênc. Hoje**, 37 (217): 32-38, 2005.

STROM, L.; KARLSSON, C.; LINDROOS, H.B.; WEDAHL, S.; KATOU, Y. Postreplicative formation of cohesion is required for repair and induced by a single DNA break. **Science** 317:242–45, 2007.

STROM, L.; SJOGREN, C. DNA damage–induced cohesion. **Cell Cycle**, 4: 536–39, 2005.

STEINDEL, M.; DIAS, J.C.P.; ROMANHA, A.J. Doença de Chagas: Mal que ainda preocupa. **Ciência Hoje**, 37(217): 32-38, 2005.

STUDIER, F.W.; MOFFATT, B.A. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. **J. Mol. Biol.**, 219: 37-44, 1986.

SUDAKIN, V.; GANOTH, D.; DAHAN, A.; HELLER, H.; HERSHKO, J. The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. **Mol. Biol. Cell**, 6:185–98, 1995.

SUMARA, I.; VORLAUFER, E.; GIEFFERS, C.; PETERS, B.H.; PETERS, J-M. Characterization of vertebrate cohesion complexes and their regulation in prophase. **J. Cell Biol.** 151:749–62, 2000

SUMARA, I.; VORLAUFER, E.; STUKEMBERG, P.T.; KELM, O.; REDEMANN, N.; NIGG, E.A.; PETERS, J.M. The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. **Mol. Cell**, 9: 515-525, 2002.

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**, 137:123–32, 2009.

SUTTON, R.E.; BOOTHROYD, J.C. Evidence for trans-splicing in trypanosomes. **Cell**. 47(4):527-35, 1986.

TANAKA, T.; COSMA, M.P.; WIRTH, K.; NASMYTH, K. Identification of cohesion association sites at centromeres and along chromosome arms. **Cell**, 98: 847-58, 1999.

TEIXEIRA, S.M.; DAROCHA, W. Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. **Genetic Mol. Res.** 31;2(1):148-58, 2003.

TEIXEIRA, S.M. Control of gene expression in Trypanosomatidae. **Braz. J. Biol. Res.** 31(12):1503-16, 1998.

TOMKINS, D.; HUNTER, A.; ROBERTS, M. Cytogenetic findings in Roberts-SC phocomelia syndrome(s). **Am. J. Med. Genet.** 4:17–26, 1979.

TOMKINS, D.J.; SISKEN, J.E. Abnormalities in the cell-division cycle in Roberts syndrome fibroblasts: a cellular basis for the phenotypic characteristics? **Am. J. Hum. Genet.** 36:1332–40, 1984.

TOMONAGA, T.; NAGAO, K.; KAWASAKI, Y.; FURUYA, K.; MURAKAMI, A.; MORISHITA, J.; YUASA, T.; SUTANI, T.; KEARSEY, S. E; UHLMANN, F. Characterization of fission yeast cohesin: essential anaphase proteolysis of Rad21 phosphorylated in the S phase. **Genes Dev.**, 14:2757-70, 2000.

TOTH, A.; CIOSK, R.; UHLMANN, F.; GALOVA, M.; SCHLEIFER, A.; NASMYTH, K. Yeast cohesin complex requires a conserved protein, Eco1p (Ctf7), to establish cohesion between sister chromatids during DNA replication. **Genes Dev.** 13: 320–33, 1999.

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

UNAL, E.; ARBEL-EDEN, A.; SATTLER, U.; SHROFF, R.; LICHTEN, M. DNA damage response pathway uses histone modification to assemble a double-strand break-specific cohesin domain. **Mol. Cell.** 16: 991–1002, 2004.

UNIVERSITY OF LEICESTER. Genetics Education Networking for Innovation and Excellence. Virtual **Genetics Education Centre**. The cell cycle, mitosis and meiosis. Disponível em: <<http://www.le.ac.uk/ge/genie/vgec/sc/cellcycle.html>> Acesso em 20 fevereiro 2010

URBINA. J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends Parasitol.**, 19: 495-500, 2003.

UHLMANN, F. Chromosome cohesion and segregation in mitosis and meiosis. **Curr. Opin. Cell. Biol.** 13: 754–761, 2001.

UHLMANN, F.; LOTTSPREICH, F.; NASMYTH, K. Sister chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1p. **Nature**, 400:37–42, 1999.

UHLMANN, F.; NASMYTH, K. Cohesion between sister chromatids must be established during DNA replication. **Curr. Biol.** 8: 1095–101, 1998.

UHLMANN, F.; WERNIC, D.; POUPART, M.A.; KOONIN, E.; NASMYTH, K. Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. **Cell**, 103: 375–86, 2000.

VANHAMME, L.; PAYS, E. Control of gene expression in trypanosomes. **Microbiology Reviews.** 59:223-40, 1995.

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

WAZENEGGER, I.; HAUF, S.; MEINKE, A.; PETERS, J.M. Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. **Cell**, 103: 399–410, 2000.

WHO – World Health Organization. TDR – Tropical Disease Research: progress 2003 – 2004. Seventeenth programme report of the UNICEF/UNDO/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. 1-98, Geneva, 2005.

WIRTH, K.; WUTZ, G.; KUDO, N.R.; DESDOUETS, C.; ZETTERBERG, A. Separase: a universal trigger for sister chromatid disjunction but not chromosome cycle progression. **J. Cell. Biol.**, 172:847–6, 2006.

ZACHARIAE, W. Progression into and out of mitosis. **Curr. Opin. Cell Biol.**, 11: 708–716, 1999.

ZINGALES, B.; PEREIRA, E.S.; OLIVEIRA, R.P. Trypanosoma cruzi Genome Project: Biological characteristics and molecular typing of Clone CL Brener. **Acta Tropica.**, 68: 159-173, 1997.