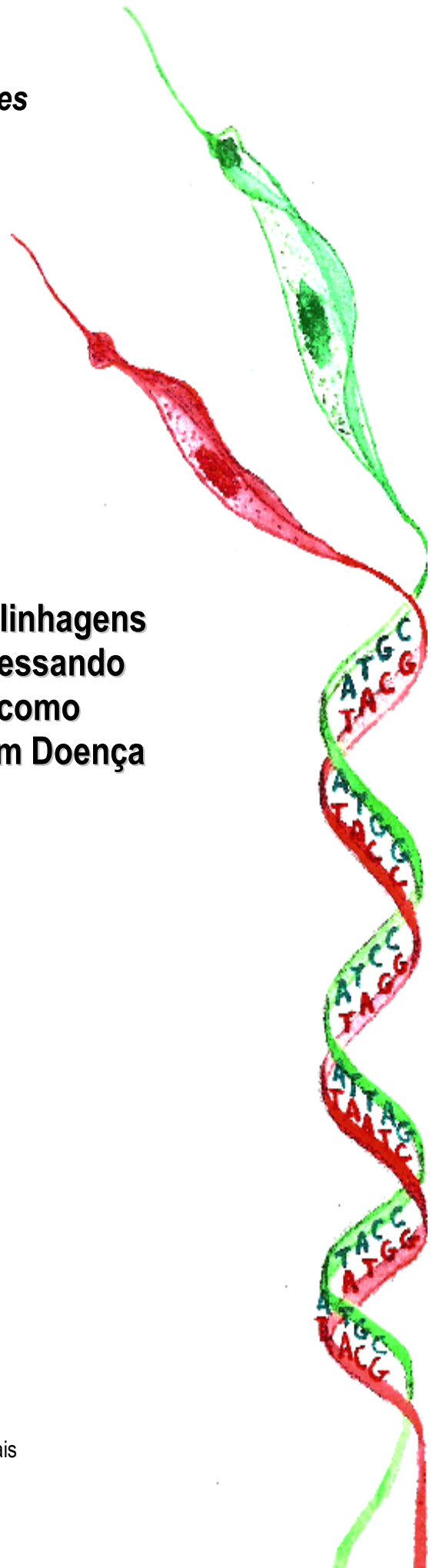


Tese de Doutorado
Simone da Fonseca Pires

**Geração e caracterização de linhagens
de *Trypanosoma cruzi* expressando
proteínas fluorescentes como
ferramentas para pesquisa em Doença
de Chagas**

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Outubro de 2007



Simone da Fonseca Pires

**Geração e caracterização de linhagens de
Trypanosoma cruzi expressando proteínas
fluorescentes como ferramentas para a pesquisa em
Doença de Chagas**

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Orientadoras:

Dra. Andréa Mara Macedo
Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Imunologia
Belo Horizonte – MG – Brasil
2007






ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE SIMONE DA FONSECA PRES. Aos dezoito dias do mês de outubro de 2007 às 13:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais a Comissão Examinadora da tese de doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Caracterização de Linhagens de *Trypanosoma cruzi* Expressando Proteínas Fluorescentes como Ferramentas para Pesquisas sobre a Doença de Chagas" requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão a Presidente da Comissão, Dra. Andrea Mara Macedo da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra a candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Renato Arruda Mortara da Universidade Federal de São Paulo, aprovada; Dr. Álvaro José Romanha do Centro de Pesquisas René Rachou- Fiocruz, aprovada; Dr. Evangelides Kalapothakis da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dra. Vânia Ferreira Prado da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira, co-orientadora, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dra. Andrea Mara Macedo, orientadora, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 18 de outubro de 2007.


 Dr. Renato Arruda Mortara – UNIFESP

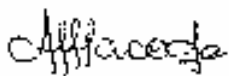

 Dr. Álvaro José Romanha – FIOCRUZ – MG


 Dr. Evangelides Kalapothakis – UFMG


 Dra. Vânia Ferreira Prado – UFMG


 Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira – co-orientadora – UFMG


 Dra. Andrea Mara Macedo - orientadora - UFMG


 Dra. Andrea Mara Macedo
 Presidente do Curso de Pós-Graduação em
 Bioquímica e Imunologia
 Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

*Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz e ser feliz.
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe!
Só levo a certeza de que muito pouco eu sei
Ou nada sei.*

Renato Teixeira e Almir Sater



AGRADECIMENTOS

Agradeço às minhas orientadoras, em ordem alfabética:

À Profa. Andréa Macedo, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, no qual pude amadurecer os meus conhecimentos científicos. Pela sua atenção e carinho no decorrer desses 7 longos anos. Pelas suas sensatas conversas durante as mais loucas tentativas de assassinato dos *T. cruzi*.

À Profa. Santuza Teixeira, por estar sempre presente, pela atenção, sugestões e pelo seu vasto conhecimento que muito contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Seu exemplo de profissional dedicada em fazer ciência de boa qualidade certamente contagia todos que convivem neste ambiente;

Tenho a grande honra de agradecer também ao Prof. Sérgio Pena, pela grande oportunidade de conviver com o brilhante exemplo de pesquisador, admirado por todos os alunos do LGB, pelas contribuições e experiência científica;

Aos Professores Égler Chiari e Lúcia Galvão, pela experiência e pela orientação nos experimentos com as culturas e clonagem de *T. cruzi*, por manter as portas dos seus laboratórios sempre abertas.

Ao Dr. Wanderson D. da Rocha, pela paciência, competência e por ter me ensinado a maior parte deste trabalho, desde a iniciação científica, como você agüentou esse tempo todo?.

À Profa. Glória Franco e ao Prof. Carlos Renato, pelos exemplos de profissionalismo, competência e dedicação científica/acadêmica dados a todos nós diariamente;

Ao Técnico Afonso Viana, nunca teve capacidade de me dizer um não. Não vou esquecer a sua imensa ajuda e colaboração durante todos esses anos; o eterno salvador daqueles que trabalham com o *T. cruzi* no ICB.

Ao Técnico Carlos Henrique, que sempre me ajudou prontamente nos experimentos com o criostato.

À Profa. Luciana Andrade, pela amizade, por sua ajuda nos momentos de extremo sufoco (sem ter nada a ver com o meu problema) e pelo seu exemplo de profissional.

À Profa. Conceição Machado, por abrir as portas do seu laboratório e permitir os experimentos com o criostato e microscópio de fluorescência;

Ao Dr. Oscar Romero e ao Laser pela ajuda nos experimentos com o microscópio confocal;



Agradeço imensamente aos amigos do LGB, pela convivência, por tornar essas fases difíceis das nossas vidas mais agradáveis:

Ao Claudiney, Pedro, Luciana Bastos, Fernanda, Lucas, Rogério (Qualira), Carlos Eduardo, Daiane e Rúbia, pela amizade apesar do pouco tempo de convívio;

Ao Bruno (também Exu), pela nova e agradável amizade, abalada pela minha ausência no consumo de chocolates!!!

À Alice, por nossa longa jornada nesses anos de mestrado, doutorado e bases, nunca esquecidas;

À Carol, nossa promotora de eventos e agora também responsáveis por nossas bijus tão lindas! Obrigada pela convivência agradável;

À Michele, pelo seu jeito do tipo Pacu! Seu humor instável já me fez rir muito! Pela amizade e solidariedade nos momentos difíceis.

À Dra. Alessandra Clarissa, pela amizade, pelo carinho com que cuidou de mim e do Gustavo e pelo seu exemplo de força e coragem.

Ao Antônio, pela amizade e sua serenidade, tenho certeza que você será um grande pesquisador.

Ao Helder, pelas imensas ajudas nas extrações de DNA e PCR de microssatélite. Por seu jeito inocente, sua alegria e nossas confidências.

Ao Carlos Gustavo, pelo carinho, amizade e bate-papo nos corredores.

À Dani, menina menor que eu e com certeza muito mais competente, pelas ajudas em tudo.

À Débora Naves, pela sua delicadeza e pelos longos anos de convivência.

Ao Francisco Lobo, pelo seu entusiasmo científico e pela amizade.

Ao Francisco Prosdocimi Tosco, pelo seu jeito irreverente e sua mente brilhante.

Ao João Pedro (Jamantinha), por fazer parte da população suburbana do LGB e por nunca perder o seu bom humor.

À Katita, pela amizade, carinho, por todas as delícias preparadas com carinho.

À Luciana Wernek, pelo seu jeito irreverente, suas visitas ao LGB sempre foram muito agradáveis.



À Marcela, também eleita promotora de eventos juntamente com a Carol, pela amizade e conversas na sala de computadores.

À Marina, pelas caronas, pela amizade, carinho e figos da fazenda.

Ao Matheus (Robertão) pelos elogios às imagens dos parasitos fluorescentes, mesmo quando eu achava que não estavam tão boas assim.

À Neuzinha, por manter o LGB funcionando sempre dentro das normas e legislações, mesmo que a maioria dos alunos não concorde. Obrigada por sempre acreditar no que faz.

À Simone Santos, minha chará, quantas confusões com os nossos nomes e pessoas. Obrigada pela convivência e amizade.

À Vanessinha, pelos sorrisos, pelo seu mundo rosa e liláz (eu até aderi a esse mundo das cores), pelos atrasos nos PTS e PAS, pelo seu entusiasmo na pesquisa com os botocudos, por não desanimar nunca.

Aos **AMIGOS DE OUTRORA**, espalhados pelo Brasil e pelo mundo:

Aos meus irmãos científicos:

Dr. Renato Santana, o menino hipoclorito, pelo tempo de academia no Sírio e boa convivência.

À Dra. Juliana Pimenta, por seu humor incondicional, por deixar transparecer seu nervosismo através de manchas vermelhas pelo rosto e por seu exemplo de profissional que nunca desistiu de usar o FACS!

À Alexia, pela sua alegria irradiante e entusiasmo no que se propôs a fazer, e sei que faz seu trabalho muito bem! Obrigada por me deixar aplicar suas amostras, mesmo sabendo que seria o meu primeiro gel.

Ao Prof. Dr. Eduardo Tarazona, antigo Edú, não tem experimentos para fazer? “Que cosa?”

Ao Querido Dr. Charles, pelo seu humor refinado e com isso diz o que quer sem magoar. Pelo seu talento em elaborar grandes apresentações. O por me chamar de choquito!

À Dra. Claudinha, um verdadeiro exemplo de cientista e de aluna bem aplicada sem esquecer os seus deveres de cidadã, buscando um mundo melhor.

Ao Dr. Carlos Eduardo (Kdu ou também Gnaldo), pela amizade durante os anos de LGB e por permitir que os meus experimentos funcionassem.

À Dra. Flávia Parra, pelo anos convivência.

À Miroca pelo carinho e cuidado com o nosso trabalho e com o LGB.

À Dra. Jacqueline, a rainha do mega, pela amizade e por sua canjica light.



À Dra. Patrícia (Pacu), pelas caronas, boa convivência e seu humor característico.

A todos ex-alunos do LGB Denise Rejane, Rinaldo Wellerson, Túlio Santos (Tutubarão), Heloísa, Renata Freitas, Luiz, Analina.

*Aos meus **GRANDES AMIGOS**, também em ordem alfabética para não gerar ciúme:*

Aline, também conhecida como Débora ou Exú (de todo jeito o nome dela vem primeiro, viu Jorge), por nossa amizade nunca abalada e realmente saudável. Só tem um defeito: mente o nome bairro onde mora.

Ao Jorge, também Jacaré ou Candango, pela ajuda com os PFGEs e dicas pertinentes. Também agradeço a você pelos nossos longos 10 anos diários de UFMG e caravanas para o Indú (sei que agora você mora dentro da Contorno e nem por isso esqueceu da amiga suburbana), afinal de contas você sempre terá o pé vermelho! Também pretendo manter sua amizade para sempre.

Obrigada a vocês pelos PAS, PTS e PTC. Por nossa convivência alegre dentro e fora do LGB (entende-se palhaçadas), e que apesar dos longos anos diários de convivência não se desgastou, pelo contrário continuamos confidentes.

*Aos meus **GRANDES AMORES**:*

Aos meus pais, pelo exemplo de dedicação à família, sacrifícios e abdições para permitirem a minha chegada até aqui, pelo apoio e incentivo. Por cuidar e educar o meu filho tão bem, cobrindo a minha ausência diária.

Ao Jonas, pela compreensão, por agüentar tanto choro e desequilíbrio e também por me incentivar nos momentos mais difíceis. Você é a metade mais equilibrada de nós dois!

Ao meu Gustavo, que sem dúvida alguma veio para dar mais sentido à minha vida.

Às **agencias financiadoras** deste projeto: **Capes, CNPq, FAPEMIG e WHO;**



I - LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	i
II - ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS	iv
III – RESUMO	vi
IV – ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 A doença de Chagas	2
1.2. O <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
1.2.1. O Genoma do Parasito	5
1.2.2. Variabilidade Genética	6
1.2.3. Infecção pelo <i>T. cruzi</i>	8
1.2.4. O Modelo Histotrópico Clonal da Doença de Chagas e a Detecção do parasito nos tecidos infectados.	10
1.3. Expressão Gênica em tripanosomatídeos	14
1.4. Manipulação genética de tripanosomatídeos	17
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Vetores	25
3.1.1. pTCRNeoGFP	25
3.1.2. pTREGFPNeo e pTREXRFPNeo	25
3.1.3. PROCKGFPNEO E PROCKRFPNEO	26
3.2. Transformação de células DH5 α	26
3.2.1. Obtenção e Restrição de DNA Plasmidiano	28
3.3. Parasitos	29
3.3.1. Transfecção de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	29
3.3.2. Seleção de parasitos transfectados	29
3.3.3. Análise de <i>T. cruzi</i> por Citometria de Fluxo	30
3.4. Obtenção de clones de parasitos transfectados	31
3.4.1. Clonagem por diluição limitante	31

3.4.2. Subclonagem em placas de ágar-sangue	31
3.5. Separação de Bandas Cromossômicas de <i>Trypanosoma cruzi</i> por PFGE	33
3.5.1. <i>Chromoblot</i>	33
3.5.2. <i>Northern blot</i>	34
3.5.3. Marcação de sondas radioativas	35
3.6. Infecção de Cultura de Células em Monocamadas com <i>T. cruzi</i>	35
3.7. Infecção de Camundongos com os Parasitos Expressando GFP e RFP	36
3.8. Microscopia Confocal	37
4. RESULTADOS	38
4.1. Transfecção de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> com os vetores pTCR27GFPNeo, pTREXGFPNeo e pTREXRFP	39
4.2. Construção dos Vetores de Expressão Permanente pROCKGFPneo e pROCKRFPNeo	41
4.3. Obtenção de linhagens de várias cepas e clones de <i>T. cruzi</i> transfectadas de maneira estável com os Vetores pROCKGFPNeo e pROCKRFPNeo	43
4.4. Clonagem dos Parasitos Geneticamente Modificados	46
4.5. Comparação da Estabilidade da expressão de GFP e RFP entre os clones e a população transfectada	48
4.6. Avaliação da Integração dos Vetores de Expressão Permanente no Genoma do Parasito.	48
4.7. Produção do mRNA dirigida pelos vetores de expressão permanente	52
4.8. Expressão das Proteínas Fluorescentes nas outras formas do ciclo de vida do Parasito	54
4.9. Avaliação da Infectividade dos Parasitos Transfectados em cultura de células.	54
4.10. Infecção de Camundongos com os Parasitos Expressando GFP e RFP	56
4.11. Investigação dos mecanismos envolvidos na ausência da expressão das proteínas fluorescentes	58
4.12. Co-infecção de Células Vero com dois Parasitos Expressando Proteínas Fluorescentes Diferentes	62
5. DISCUSSÃO	65

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	79
7. BIBLIOGRAFIA	81
8. ANEXOS	92
8.1. Expression of exogenous genes in <i>Trypanosoma cruzi</i> : improving vectors and electroporation protocols.	
8.2. Cell culture and animal infection with distinct <i>Trypanosoma cruzi</i> strains expressing red and green fluorescent proteins	

I - LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CAT: cloranfenicol acetil transfesase

COII: *Cytochrome oxidase subunit II gene*: gene da citocromo oxidase subunidade 2

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

dNTP: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

EDTA: *Ethylene Diamine Tetracetic acid*: ácido etilendiamino tetra-acético

FACS: *Flow Cytometer Cell Sorter*: seleção de células por citometria de fluxo

G418: Geneticina

GAPDH: *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GFP: *green fluorescent protein*: proteína verde fluorescente

GKO: *Interferon-gamma-knockout*

kDNA: DNA do cinetoplasto

LIT: *liver infusion tryptone*: infusão de fígado e triptona

LMP: *low melting point*: baixo ponto de fusão

LSSP/PCR: *Low Stringency Single Primer/PCR*: PCR de único iniciador sob baixa estringência

MFF: *Master Facs Fix*: solução de fixação de células para análise no aparelho FACS

MHC: *Major Histocompatibility complex*: Complexo de histocompatibilidade principal

MLEE: *Multiloci enzyme electrophoresis*: Eletroforese de enzimas multilocais

mRNA: *message ribonucleic acid*: ácido ribonucléico mensageiro

Neo: neomicina

O.C.T: *Optical Coherence Tomography*

PBS: *phosphate buffer saline*

PCR: *polymerase chain reaction*: reação em cadeia da polimerase

PFGE: *Pulsed Field Gel Electrophoresis*: gel de eletroforese em campo pulsátil

RAPD: *Randomly Amplified Polimorphic DNA*: DNA polimórfico aleatoriamente amplificado

RFLP: *Restriction Fragment length polymorphism*: polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição

RFP: *red fluorescent protein*: proteína vermelha fluorescente

RI: Região intergênica

RPM: rotações por minuto

rRNA: *ribosomic ribonucleic acid*: ácido ribonucléico ribossômico

SDS: *Sodium dodecyl sulfate*: dodecil sulfato de sódio

SFB: soro fetal bovino

SL: *spliced leader*: seqüência espaçadora

SMUGs: *Small mucin*: mucinas de pequeno tamanho

SSC: *sodium saline citrate*: solução salina sódio-citrato

TBE: tampão tris borato EDTA

UTR: *untranslated region*: Região não traduzida

UV: luz ultra violeta

Wt: *wild type*: tipo selvagem

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

VSGs: *variant surface glycoprotein*: glicoproteína variável de superfície

RFP: *red fluorescent protein*: proteína vermelha fluorescente

RI: Região intergênica

RPM: rotações por minuto

rRNA: *ribosomic ribonucleic acid*: ácido ribonucléico ribossômico

SDS: *Sodium dodecyl sulfate*: dodecil sulfato de sódio

SFB: soro fetal bovino

SL: *spliced leader*: seqüência espaçadora

SMUGs: *Small mucin*: mucinas de pequeno tamanho

SSC: *sodium saline citrate*: solução salina sódio-citrato

RFLP: *Restriction Fragment length polymorphism*: polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição

RFP: *red fluorescent protein*: proteína vermelha fluorescente

RI: Região intergênica

RPM: rotações por minuto

rRNA: *ribosomic ribonucleic acid*: ácido ribonucléico ribossômico

SDS: *Sodium dodecyl sulfate*: dodecil sulfato de sódio

SFB: soro fetal bovino

SL: *spliced leader*: sequência espaçadora

SMUGs: *Small mucin*: mucinas de pequeno tamanho

SSC: *sodium saline citrate*: solução salina sódio-citrato

TBE: tampão tris borato EDTA

UTR: *untranslated region*: Região não traduzida

UV: luz ultra violeta

Wt: *wild type*: tipo selvagem

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

VSGs: *variant surface glycoprotein*: glicoproteína variável de superfície

RFP: *red fluorescent protein*: proteína vermelha fluorescente

RI: Região intergênica

RPM: rotações por minuto

rRNA: *ribosomic ribonucleic acid*: ácido ribonucléico ribossômico

SDS: *Sodium dodecyl sulfate*: dodecil sulfato de sódio

SFB: soro fetal bovino

SL: *spliced leader*: sequência espaçadora

SMUGs: *Small mucin*: mucinas de pequeno tamanho

SSC: *sodium saline citrate*: solução salina sódio-citrato

II - ÍNDICE DE FIGURAS E TABELA

Figura 1: Países endêmicos para a doença de Chagas. (Fonte: WHO/CTD)	2
Figura 2: Ilustração do ciclo da doença de Chagas. (Fonte: www.uta.edu/Chagas)	3
Figura 3: Modelo Histotrópico-Clonal da doença de Chagas.	11
Figura 4: Representação esquemática do vetor de expressão em <i>T. cruzi</i> pTCRNeoGFP7.	27
Figura 5: Esquema representativo do vetor de expressão transiente pTREGFP/RFP.	27
Figura 6: Histogramas das células fluorescentes analisadas em aparelho FACS	32
Figura 7: Eficiência do processo de transfecção de <i>T. cruzi</i> com os vetores pTREGFP e pTRpTREGFP	40
Figura 8: Expressão de GFP no clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> dirigida pelo vetor pTREGFP	42
Figura 9: Representação esquemática do pROCKGFP/RFPNeo e expressão de GFP, RFP e Neo em <i>T. cruzi</i>	44
Figura 10: Expressão estável de GFP e RFP nas formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .	45
Figura 11: Eficiência do processo de transfecção da diferentes linhagens com os vetores pROCKGFP e pROCKRFP	47
Figura 12: Frequência de epimastigotas da cepa Tulahuén expressando GFP ou RFP	49
Figura 13: <i>Chromoblot</i> mostrando a integração dos vetores pROCKGFPNeo e pROCKRFPNeo	50
Figura 14: <i>Northern Blot</i> mostrando a presença de RNAm dos gene de GFP, RFP e Neomicina nos parasitos transfectados com os vetores pROCKGFPNeo e pROCKRFPNeo.	53
Figura 15: Avaliação da expressão de GFP e RFP na forma intracelular <i>T. cruzi</i>	55
Figura 16: Avaliação da infectividade entre parasitos selvagens e fluorescentes das linhagens Col1.7G2, JG e Tulahuén de <i>T. cruzi</i> .	57
Figura 17: Infecção de camundongos GKO (interferon- γ knockout) com tripomastigotas fluorescentes derivados de culturas de células Vero	60

Figura 18: Avaliação dos mecanismos envolvidos na ausência da expressão das proteínas fluorescentes	61
Figura 19: Avaliação da expressão de GFP e RFP em células Vero co-infectadas	64
Tabela 1: Proporção de parasitos fluorescentes das linhagens utilizadas nas infecções de camundongos BALB/c.	59

Sistemas de transformação estável vêm sendo descritos para várias espécies de tripanosomatídeos como *Leishmania spp*, *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma cruzi*. A transfecção pode ser mediada pela integração de genes exógenos no genoma da célula hospedeira, que ocorre por recombinação homóloga ou através da manutenção dos vetores transformados na forma episomal. Com o objetivo de gerar parasitos que expressassem proteínas fluorescentes de forma estável, formas epimstigotas do *T. cruzi* foram transfectadas com o vetor de expressão denominado pROCKGFP/RFPNeo, que leva a integração das proteínas verde (GFP) e vermelha (RFP) fluorescentes no loco de β -tubulin via recombinação homóloga com esse loco. Clones dos parasitos transfectados foram obtidos por diluição seriada em placas de 96 poços e/ou placas de ágar-sangue. Foi avaliada a estabilidade na expressão de GFP e RFP entre as populações (parasitos não clonados) e os clones. Os parasitos foram cultivados por 1 e 2 meses na presença de G418 (200 e 400 $\mu\text{g/mL}$) e na ausência da droga e em seguida analisados pela técnica de citometria de fluxo. Foi observado que os clones expressando GFP e RFP foram capazes de manter a porcentagem de parasitos fluorescentes na ausência do antibiótico, enquanto que nas populações, houve redução da porcentagem de células verdes e vermelhas fluorescentes. As análises de *chromoblot* mostraram a integração de GFP e RFP no loco de β -tubulina. Os parasitos transfectados mostraram infectividade semelhante ao não transfectado em culturas de células Vero e a expressão das proteínas fluorescentes pôde ser facilmente visualizada nas três formas do ciclo de vida do parasito por microscopia confocal. Parasitos expressando GFP foram capazes de infectar camundongos GKO (interferon-gama *knockout*) e apresentaram alta parasitemia 12 dias após a infecção. Foram observados parasitos fluorescentes no coração e diafragma dos animais. Cultura de células co-infectadas com parasitos da cepa Tulahuén expressando as duas diferentes fluorescências, mostraram que dois parasitos diferentes

podem infectar a mesma célula. Também foram observadas células co-infectadas com parasitos transfectados, derivados de cepas pertencentes às distintas linhagens de *T. cruzi*, Col1.7G2GFP (*T. cruzi* I) e TulahuénRFP (*T. cruzi* II). Os parasitos gerados expressando GFP e RFP constituem, portanto uma nova ferramenta para o estudo de vários aspectos da biologia do *T. cruzi*. Com eles podemos estudar mecanismos de invasão celular, troca genética, susceptibilidade às drogas e inúmeros aspectos da interação parasito-hospedeiro invertebrado e vertebrado, neste último, enfatizando o modelo histotrópico-clonal da doença de Chagas em modelos animais.

.

Stable transfection protocols have been described for a number of protozoan parasites such as *Leishmania spp*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. The transfection can be achieved by the integration of the foreign gene into the genome through homologous recombination, or by episomal maintenance of the transfected plasmid. In order to produce parasites expressing fluorescent proteins, epimastigotes forms of *T. cruzi* were transfected with the plasmid pROCKGFP/RFPNeo. This construction allowed the integration of green (GFP) and red (RFP) fluorescent protein genes by homologous recombination into β -tubulin locus of several strains of the parasite. Parasites transfected clones were isolated by serial dilution and/or agar-blood plates. To evaluate the stability of the GFP and RFP markers in the transfected populations and clones, parasites were cultivated for 1 and 2 months in the absence or presence of G418 (200 g mL and 400 g mL) and were analyzed by FACS. The selected clones were able to maintain high expression levels of the fluorescent protein markers even in absence of G418, whereas in transfected population, expression of GFP and RFP markers was significantly reduced when cultured in the absence of the drug. The integration of the GFP and RFP markers in the tubulin locus was confirmed by chromoblot analyses. GFP and RFP expressing parasites were inoculated into Vero cells culture to evaluate the infectivity of the transfected population. When compared with the wild type population, no significant differences in the infectivity of Vero cells were found. We detected the fluorescent proteins in the tree forms of parasite life cycle by confocal and fluorescence microscopy. Furthermore, GFP expressing parasites were able produce significant levels of parasitemia 12 days after being inoculated into interferon-gamma knockout (GKO) mice. We observed fluorescent parasites in heart and diaphragm of infected animals. Cell cultures infected simultaneously with two cloned cell lines, each one expressing a distinct fluorescent marker, showed that two different parasites were

able to infect the same cell. Double infected cells were also detected when GFP and RFP expressing parasites are derived from strains belonging to two distinct *T. cruzi* lineages Col1.7G2GFP (*T. cruzi* I) and TulahuénRFP (*T. cruzi* II). The parasites expressing GFP and RFP constitute a new tool for the study of various aspects of the *T. cruzi* biology. We can study the cellular invasion mechanism, genetic exchange, drug susceptibility and several aspects of interaction with invertebrate and vertebrate hosts, emphasizing the histotropic-clonal model of Chagas disease.



1. Introdução

1.1. A DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas é causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi*, um protozoário flagelado da ordem Kinetoplastidae. Segundo a Organização Mundial de Saúde (<http://www.who.int/tdr/diseases/Chagas>), essa enfermidade acomete cerca de 13 milhões de pessoas nas Américas, do sul da Argentina ao sul dos Estados Unidos da América, Figura 1).



Figura 1: Países endêmicos para a doença de Chagas. WHO/CTD, Maio, 1996.

O ciclo de vida do *T. cruzi* envolve vários estágios morfológicamente distintos e alterna entre hospedeiros vertebrados (mamíferos) e invertebrados (insetos vetores), com estágios de desenvolvimento específicos para cada hospedeiro. As formas flageladas tripomastigotas podem ser observadas no sangue periférico do hospedeiro vertebrado, sendo que, nas células deste hospedeiro, é a forma amastigota que se multiplica por divisões binárias. Estas formas diferenciam-se em tripomastigotas que, após o rompimento das células e liberação dos parasitos, reinfectam novas células ou retornam à corrente sanguínea. Durante o repasto sanguíneo, as formas tripomastigotas podem ser ingeridas pelo hospedeiro invertebrado (triatomíneo). No intestino do inseto vetor, os tripomatigotas evoluem para a forma epimastigota, a qual sofre intensa multiplicação ao longo do tubo digestivo e, ao atingir a ampola retal, se diferencia em tripomastigota metacíclico, a forma infectante para o hospedeiro vertebrado. Durante o repasto no hospedeiro vertebrado, as formas tripomastigotas infectantes são eliminadas através das fezes dos barbeiros, infectando o hospedeiro pelo contato com mucosas ou descontinuidade da pele, completando-se o ciclo (Figura 2).

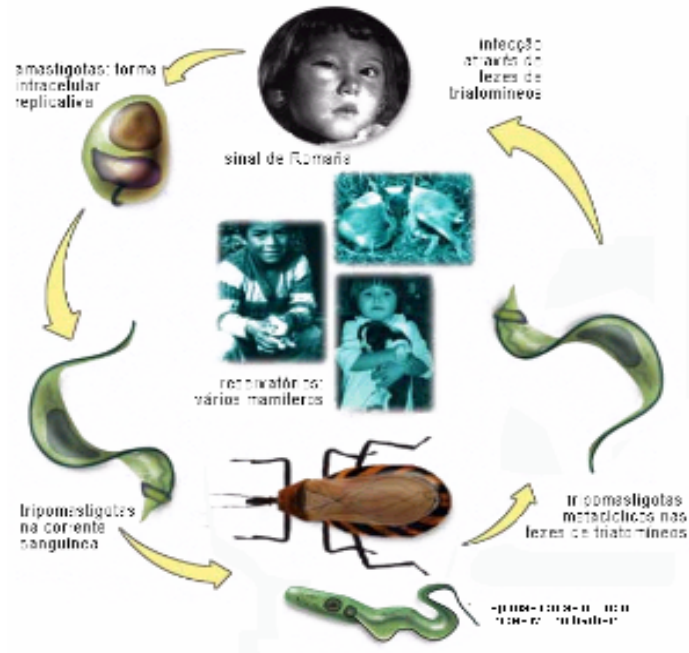


Figura 2: Ilustração do ciclo da Doença de Chagas. www.uta.edu/Chagas

Durante o ciclo de vida do *T. cruzi* diferentes hospedeiros vertebrados podem ser infectados, caracterizando os ciclos doméstico e silvestre da doença de Chagas. No ciclo silvestre do *T. cruzi* há a interação de vetores e hospedeiros silvestres em ambientes naturais. A maior importância é dada aos reservatórios capazes de aproximarem-se dos seres humanos, trazendo o parasito para próximo do homem e que também ajudam na dispersão dos triatomíneos (Dias, 2000). O ciclo doméstico leva à infecção de seres humanos e é resultante do contato entre o homem e o vetor, envolvendo a colonização de ecótopos artificiais pelos triatomíneos. Normalmente, essa colonização é resultante de modificações sociais e ecológicas no meio ambiente provocadas pelo homem (Dias, 1991). Entretanto, medidas de controle na eliminação dos insetos vetores e na triagem dos bancos de sangue foram bem sucedidas na eliminação da transmissão do *T. cruzi* em muitas áreas onde os vetores são domiciliados. A incidência anual de novos casos é estimada por ter caído de 700.000 – 800.000 nos anos 80 para aproximadamente 200.000 hoje (WHO, 2005).

Várias evidências de que a doença de Chagas e seus vetores já eram conhecidos por certas civilizações andinas pré-colombianas foram descritas. Aufderheide e cols., 2003 detectaram seqüências de DNA específicas de *T. cruzi* em tecidos provenientes de múmias chilenas datadas de 9.000 anos atrás.

Com relação à patologia, cerca de 30% dos pacientes infectados mostram algum sintoma da doença, que pode variar dependendo da cepa, do indivíduo infectado e do curso da infecção (aguda ou crônica). É estimado que entre 25-30% dos pacientes cronicamente infectados podem vir a sofrer de problemas no coração e no trato digestivo, resultando em aproximadamente 14000 mortes anuais e causando considerável morbidade (WHO, 2005).

A infecção do homem pelo *T. cruzi* apresenta um curso clínico variável, sendo que na fase aguda da doença de Chagas o parasito é encontrado principalmente no sangue dos pacientes. A parasitemia durante esta fase é relativamente alta e, em menos de 5% dos casos, podem ser observadas complicações fatais de ordem neurológicas e/ou cardíacas (Prata, 2001). Após a fase aguda, os pacientes entram na fase crônica da doença, que pode durar alguns anos ou persistir indefinidamente. Esta fase é caracterizada por baixa parasitemia e parasitismo tissular e por um variado curso clínico, que vai desde casos assintomáticos até casos severos, com envolvimento cardiovascular e/ou gastrointestinal (Prata, 2001).

A manifestação cardíaca pode ser considerada como a mais importante na doença de Chagas devido às suas características, frequência e conseqüências. Esta manifestação varia quanto à intensidade e gravidade dos sintomas. A patologia cardíaca é caracterizada pela miocardite crônica que frequentemente leva a cardiomegalia, falhas cardíacas e arritmias (Tanowitz e cols., 1992). As manifestações digestivas são caracterizadas por um aumento no calibre dos órgãos, sempre acompanhado de algum grau de destruição do sistema nervoso autônomo, o que pode levar às alterações nos padrões de secreção, motilidade e absorção de nutrientes principalmente no esôfago e cólon (Prata, 2001). Já os pacientes que apresentam a forma indeterminada não apresentam os sintomas característicos da doença de Chagas, mas a infecção pode ser demonstrada através da sorologia positiva ou pela detecção do parasito por PCR, hemocultura ou xenodiagnóstico. (Prata, 2001, Vago e cols. 2000).

As formas cardíaca e digestiva diferem quanto à prevalência e distribuição geográfica, variando entre países e regiões distintas de um mesmo país. Em países como a Venezuela e países da América Central, a prevalência da forma megaesofágica é muito baixa ou ausente (Dias, 1991). No Brasil, cerca de 50 a 60% dos pacientes chagásicos crônicos apresentam a forma indeterminada da doença, 20 a 30% apresentam a forma cardíaca e 8 a 10% apresentam a forma digestiva. Entretanto, a ocorrência da

forma digestiva dentro do próprio Brasil é bastante desigual sendo predominante na região Central (Dias, 1991). Esta heterogeneidade geográfica sugere que variações genéticas tanto do hospedeiro quanto do parasito sejam importantes no estabelecimento das formas clínicas da doença. Dentro deste cenário, devemos ainda considerar um possível papel para os aspectos ambientais, nutricionais e imunológicos do hospedeiro (revisado por Macedo e cols., 2004).

1.2. *O Trypanosoma cruzi*

1.2.1. O GENOMA DO PARASITO

O genoma diplóide do *T. cruzi*, com base no estudo realizado para o clone CL Brener, possui entre 106,4 e 110,7 Mb e codifica potencialmente 22.570 proteínas (El-Sayed e cols., 2005). O tamanho do genoma varia entre diferentes cepas, e também entre clones da mesma cepa. Devido ao fato dos cromossomos dos tripanosomas não se condensarem durante a mitose, a maneira de se estimar o número e tamanho dos cromossomos é através de eletroforese em campo pulsátil (PFGE). Através desta técnica, foram observadas, no clone CL Brener, clone de referência para o projeto genoma de *T. cruzi*, 20 bandas cromossômicas variando entre 0,45 Mb e 3,5 Mb. Diferenças de intensidades entre as bandas indicam que várias delas podem possuir diferentes cromossomos de tamanhos semelhantes, sugerindo que este clone possua cerca de 30 pares de cromossomos. Estima-se que o número de cromossomos em *T. cruzi* possa variar entre 64 a 80 cromossomos (Cano e cols., 1995; Porcile e cols., 2003; Branche e cols., 2006).

Entre 5 e 33% do DNA total dos tripanosomas é encontrado em uma região mitocondrial denominada de cinetoplasto, situada na base do flagelo. O genoma extranuclear do parasito é conhecido como kDNA (kinetoplast DNA). O kDNA do *T. cruzi* está organizado em uma rede complexa de moléculas circulares concatenadas, compostas por 10 a 20 mil cópias de minicírculos, com 1,4 Kb e entre 20 a 50 cópias de maxicírculos com tamanho de aproximadamente 40 kb (Silveira, 2000; Junqueira e cols., 2005).

Aproximadamente, 50% do genoma nuclear do *T. cruzi* é formado por seqüências repetitivas como retrotransposons, repetições subteloméricas e genes das famílias de moléculas de superfície (El-Sayed e cols., 2005). Embora a maioria das

seqüências repetitivas não seja codificadora, vários genes de proteínas ou RNAs contribuem para formação repetitiva do genoma. Muitas seqüências repetitivas estão organizadas em tandem. Esses agrupamentos podem estar distribuídos em diferentes cromossomos, e o número de cópias da repetição pode variar de um grupamento para outro. No genoma de *T. cruzi* estão arranjados em tandem os micro e mini-satélites, os genes de rRNAs, os genes da seqüência líder e dos mRNAs de tubulina, amastina, calmodulina, entre outros (Teixeira e cols., 1994; Beckman e Weber, 1992; Ajioka e Swindle, 1993).

Estudos utilizando diferentes locos de microsatélites isolados do genoma deste parasito reforçam a idéia de uma estrutura diplóide para o *T. cruzi*. Em nenhum dos clones de *T. cruzi* analisados foram encontrados mais do que dois alelos para os 8 locos de microsatélite estudados, evidenciando a organização diplóide do genoma (Oliveira e cols., 1998 e 1999, Valadares e cols., 2007).

1.2.2. VARIABILIDADE GENÉTICA

A espécie *T. cruzi* compreende uma grande população heterogênea de parasitos, que circula entre o homem, vetores, reservatórios silvestres e animais domésticos (Brenner 1977). Este parasito que foi descrito em 1909 por Carlos Chagas, desde então, já havia chamado a atenção pela sua grande variabilidade intraespecífica, incluindo desde aspectos morfológicos (já observado por Carlos Chagas no começo do século) até marcadores moleculares refinados (Oliveira e cols., 1998; Souto e cols., 1996; Fernandes e cols., 1998; De Freitas e cols., 2006).

Na prática, qualquer isolado obtido de uma infecção natural e mantido em laboratório é considerado uma cepa. Por sua vez uma cepa pode ser constituída por uma ou mais populações clonais com características diferentes (Macedo e cols., 1992, Oliveira e cols., 1998 e 1999). Grandes diferenças quanto ao comportamento biológico, desenvolvimento em cultura e infecções experimentais com diferentes cepas de *T. cruzi*, foram observadas por diversos autores. Por exemplo, De Araújo e Chiari (1970) descreveram a existência de subpopulações dentro de cepas de *T. cruzi*, através do estudo de cinética de crescimento em cultura.

Devido a essa grande diversidade, faz-se necessário agrupar as cepas de *T. cruzi* de forma a identificar padrões biológicos que permitam uma correlação com variantes

clínicas e epidemiológicas da doença. Marcadores biológicos e moleculares têm sido amplamente usados para classificar essas cepas em duas linhagens principais: *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (Momem, 1999). Elas podem ser facilmente agrupadas pela análise do padrão de amplificação pela PCR utilizando iniciadores para o gene do RNA ribossomal e da região espaçadora não transcrita do gene de mini-éxon (Fernandes e cols., 1998). Os isolados classificados como pertencentes ao grupo *T. cruzi* II são associados principalmente ao ciclo doméstico e são mais frequentemente associados a infecções humanas no Brasil e Argentina (Briones e cols., 1999; Zingales e cols., 1998), embora possam ser encontradas no ciclo silvestre (Yeo e cols., 2005). A linhagem *T. cruzi* I parece estar mais associada ao ciclo silvestre desse parasito, circulando entre barbeiros e pequenos mamíferos selvagens como tatus, gambás e roedores (Briones e cols., 1999; Zingales e cols., 1998). Todavia, mais recentemente foram encontrados casos de infecção humana por *T. cruzi* I na Bolívia, Venezuela e Colômbia (Teixeira e cols., 2006; Añes e cols., 2004; Coura e cols., 2002). O *T. cruzi* pode ainda ser dividido em seis sub-grupos: TC I e TC IIa - IIe segundo análise de RAPD (do inglês, Random Amplification of Polymorphic DNA) e MLEE (do inglês, Multi-locus Enzyme Electrophoresis) (Brisse e cols., 2000). Dados adicionais referentes à análise do gene MSH2 desse parasito, bem como análises de zimodemas e da seqüência de nucleotídeos dos genes da tripanotiona redutase e dihidrofolato redutase-timidilato sintase indicam, todavia, a presença de três grupos principais sendo que um deles é composto por cepas híbridas (Augusto-Pinto e cols., 2003; Miles e cols., 1978; Machado e Ayala, 2001; Machado e Ayala, 2002). De Freitas e colaboradores (2006) sugeriram uma nova classificação dessas cepas baseadas na caracterização de polimorfismos gerados no loco do gene mitocondrial da subunidade II da enzima COII, que permite a identificação de três clades: A, B e C. Nessa classificação, a linhagem *T. cruzi* I ou TC I corresponderia a clade A e a linhagem *T. cruzi* II corresponderia a clade C. Uma nova linhagem, *T. cruzi* III, seria criada agrupando cepas tipadas como TC IIc e as cepas híbridas TC II d e IIe seriam cepas originadas por eventos de hibridação entre cepas das linhagens *T. cruzi* II e III. E que, portanto, não pertenceriam especificamente, a nenhuma dessas linhagens.

As cepas com características híbridas têm sido alvos de constantes investigações. Estes estudos ganharam forte impulso após a demonstração da capacidade de recombinação de células de *T. cruzi* *in vitro* (Gaunt e cols., 2003). Neste trabalho, através da seleção artificial de parasitos recombinantes resistentes a drogas, foi

demonstrada a fusão dos genótipos nucleares parentais com perda de alelos e evidências processos de recombinação homóloga. Em todos os casos, observou-se a ausência de fusão do DNA mitocondrial, sugerindo um modelo de recombinação no qual um dos parentais é o “doador” do material nuclear e o outro “receptor”, que mantém o seu DNA do cinetoplasto (Gaunt e cols., 2003).

É importante ressaltar que, apesar de ser capaz de recombinação *in vitro*, o *T. cruzi* se reproduz predominantemente através de fissão binária. Apesar da fusão de células de *T. cruzi* não parecer ser um fenômeno comum, estudos baseados em análises de padrões de isoenzimas (Carrasco e cols., 1996; Bogliolo e cols., 1996), RFLP de genes constitutivamente expressos (Higo e cols., 2000), RAPD e análises de cariótipos (Brisse e cols., 2003), independentemente, sugerem a existência de cepas híbridas em populações naturais. Análises de seqüências nucleares e mitocondriais vêm confirmando a existências destes híbridos (Sturm e cols., 2003; Machado e Ayala, 2001) e com o projeto genoma do parasito isto ficou claramente demonstrado para o clone CL Brener (El-Sayed e cols., 2005).

1.2.3. A INFEÇÃO PELO *T. cruzi*

A forma tripomastigota do *T. cruzi* é altamente móvel e capaz de infectar diferentes tipos de células, dentre elas as não fagocitárias. A invasão da célula hospedeira, além de ser uma estratégia de escape do sistema imune, é essencial para a sobrevivência, replicação e estabelecimento da infecção pelo *T. cruzi*.

O estabelecimento da infecção depende de uma série de eventos, envolvendo interações entre diversas moléculas do parasito com as células hospedeiras, levando a mobilização de cálcio intracelular em ambas as células (revisado por Yoshida 2006; Kima 2000). Alguns estudos revelam duas vias de invasão: a primeira ocorre através do recrutamento e fusão de lisossomos até a membrana plasmática, e a segunda, através da invaginação da membrana plasmática seguida pela fusão intracelular com os lisossomos. Quando o processo de invasão dependente de lisossomos foi totalmente abolido por inibidores da IP3-quinase, como a wortmanina, observou-se a invasão de parasitos através da fusão com a membrana plasmática da célula hospedeira. Com o tempo, porém o número de parasitos internalizados diminuiu e isto foi devido a uma reversão do processo de invasão. Os parasitos que permaneceram no interior da célula

foram aqueles que tiveram seus vacúolos parasitóforos fundidos tardiamente com os lisossomos (Andrade e Andrews, 2004; Woolsey e cols., 2003).

A firme associação entre o tripomastigota e a membrana da célula hospedeira, formando o vacúolo parasitóforo, é observada durante a entrada do parasito, sugerindo a existência de uma grande interação molecular entre a membrana do parasito e a membrana do vacúolo. O *T. cruzi* fica dentro do vacúolo por um considerável período de tempo antes de escapar para o citoplasma. A destruição do vacúolo se dá pela ação de proteínas líticas dependentes de baixo pH (Andrews e cols., 1990).

A invasão de tripomastigotas é menos eficiente em células deficientes em ácido silílico. A íntima associação entre as transialidases da superfície do tripomastigota e os resíduos de ácido siálico da superfície luminal dos lisossomos parece estabilizar o contato entre o parasito e a membrana do vacúolo, como se fossem “dedos e luvas” (Lopez e cols., 2002). Kima e cols. (2000) mostraram que células super-expressando Lamp-1, uma glicoproteína lisossomal rica em resíduos de ácido siálico, tornaram-se mais susceptível à invasão pelo *T. cruzi* de um modo dependente de microtúbulos.

As análises de moléculas presentes na superfície dos parasitos permitiram identificar duas populações distintas quanto às suas capacidades invasivas. Os isolados que apresentam maior eficiência no processo de invasão celular, como a cepa CL, são aqueles que entram na célula hospedeira via gp82. Estes parasitos também possuem as proteínas quinases e as fosfolipases ativadas e então o Ca^{2+} é liberado dos estoques intracelulares sensíveis a IP3. Já os parasitos que penetram através da gp35/50 a via de sinalização parece envolver a adenilato ciclase, liberando AMPc que provoca a liberação de Ca^{2+} dos acidocalciosomas, esta via está associada a internalização de isolados pouco invasivos como a cepa G e Tulahuén. O aumento dos níveis de Ca^{2+} citoplasmático na célula hospedeira leva ao recrutamento de lisossomos para o sítio de penetração do *T. cruzi* (para uma revisão veja Yoshida, 2006)

Vários autores têm mostrado que as formas amastigotas provenientes da lise prematura de células infectadas ou da diferenciação de tripomastigotas extracelulares são capazes de invadir as células hospedeiras (Ley e cols., 1988; Mortara, 1991; Fernandes e cols., 2006; Fernandes e cols., 2007). O estudo invasão celular por amastigotas extracelulares (EA) da cepa G (*T. cruzi* I) e da cepa CL (*T. cruzi* II) foi realizado utilizando drogas que atuam sobre vias de sinalização específicas. Os autores puderam concluir que as EA de ambas as cepas acomplam vias de sinalização que

levam ao aumento de AMPc e mobilização de cálcio dos acidocalcisomas e que a ativação da PI3 quinase da célula hospedeira parece ser requerida da invasão da amastigotas extracelulares. Fernandes e cols., (2006) também descrevem que a atividade de tirosina quinase parece estar associada com a invasão de EA da cepa G, mas não com a cepa CL.

1.2.4. O MODELO HISTOTRÓPICO CLONAL DA DOENÇA DE CHAGAS E A DETECÇÃO DO PARASITO NOS TECIDOS INFECTADOS

Apesar do grande número de métodos disponíveis para análises de parasitos isolados de pacientes e do estabelecimento da diversidade genética exibida pelo *T. cruzi*, até o momento não foi possível estabelecer uma correlação segura entre a diversidade genética da espécie *T. cruzi* e a variabilidade clínica da doença de Chagas (Macedo e cols., 2004).

Partindo-se do fato de que parte das populações naturais do parasito são multiclonais, é razoável supor que subpopulações de *T. cruzi* possam apresentar tropismo por diferentes tecidos. Assim, durante o desenvolvimento da infecção no homem, pode ocorrer distribuição diferencial das distintas populações clonais, constituintes da cepa infectante, ocasionando as diferentes formas clínicas da doença. As formas sangüíneas, frequentemente isoladas de pacientes por meio de hemocultura, xenodiagnóstico ou ambos, podem não ser representativas de todas as populações presentes nos diversos tecidos daquele paciente e, possivelmente, mais associadas à formação das lesões. Além do fato de que o isolamento e manutenção dos parasitos em laboratório podem favorecer a seleção de um clone em detrimento de outros. Este cenário, esquematizado na figura 3, constitui a base do chamado modelo histotrópico-clonal para a doença de Chagas proposto por Macedo & Pena, 1998. Diante desta hipótese, viu-se a necessidade do desenvolvimento de metodologias de análise do parasito diretamente nos tecidos lesados.

A fase crônica da doença é caracterizada por uma escassez de parasitos na corrente sangüínea e nos tecidos lesados acompanhada de uma extensiva reação inflamatória tissular e padrões de autoimunidade. Estes fatos em conjunto levam à sugestão de que o padrão de resposta do hospedeiro ao parasito também esteja relacionado à etiologia da doença (Kalil e Cunha-Neto, 1996).

Uma hipótese postulando que a doença de Chagas crônica sintomática possui a etiologia autoimune, foi levantada devido à escassez de parasitos nos tecidos e principalmente com a descoberta de anticorpos que reconhecem cruzadamente antígenos próprios e antígenos dos parasitos (Kalil e Cunha-Neto, 1996). Porém, o desenvolvimento de técnicas mais sensíveis para a detecção do *T. cruzi* em tecidos mostrou que o parasito possui um papel preponderante no desencadeamento da resposta imune e, portanto, na patologia da doença (Macedo e cols., 2004).



Figura 3: Representação esquemática do modelo histotrópico clonal da doença de Chagas (modificado a partir de Macedo e Pena, 1998)

Em estudos de infecção comparada de quatro linhagens de camundongos (BALB/c, DBA-2, C57Black/6 e Swiss), com as mesmas populações clonais de *T. cruzi* citadas acima, ficou evidente também a importância da genética do hospedeiro no processo de tropismo tecidual. A distribuição das populações JG e Col.1.7G2 foi idêntica para BALB/c e DBA-2, mas muito diferente em C57Black/6 e Swiss. Tanto BALB/c quanto DBA-2 tem o mesmo haplótipo de H-2 (H-2d) e C57Black/6 tem o haplótipo H-2b. Foi sugerido que a variabilidade do MHC poderia estar envolvida, influenciando a distribuição tecidual das cepas de *T. cruzi* em camundongos (Andrade e cols., 2002). Estudos de associação entre os diversos alelos de MHC - também denominados HLA em humanos - e os diversos quadros clínicos da doença em pacientes Mexicanos demonstram que os haplótipos HLA-B39 e HLA-DR4 são mais frequentes em pacientes soropositivos para *T. cruzi* quando comparado ao grupo

controle não infectado. Dentre os indivíduos soropositivos, os indivíduos com a forma indeterminada da doença de Chagas apresentam maior frequência dos haplótipos HLA-A68 e HLA-B39 em comparação com cardiopatas, enquanto que os pacientes com cardiopatia grave têm frequência aumentada do haplótipo HLA-DR16 em comparação com os assintomáticos (Cruz-Robles e cols., 2004). Em pacientes Argentinos, o alelo HLA-DRB1*0409 é mais prevalente em pacientes soropositivos para *T. cruzi*, mas os alelos HLA-DRB*0701 e HLA-DRB*1503 estão em maior frequência em pacientes com cardiopatias (Garcia Borrás e cols., 2006).

Devido à escassez de parasitos na fase crônica da doença de Chagas, torna-se difícil a discriminação dos mesmos diretamente nos tecidos, sendo necessário o desenvolvimento de metodologias de análises sensíveis o bastante e ao mesmo tempo informativas. As técnicas que permitem a detecção dos parasitos nos tecidos infectados são a imunohistoquímica (Correa-de-Santana e cols., 2006; Añez e cols., 1999; Caliarí e cols., 2002; Guarner e cols. 2001) ou amplificação de seqüências do DNA do parasito por PCR (Andrade e cols., 1999, Vago e cols., 2000, De Freitas e cols., 2005).

Para tanto uma alternativa é procurar moléculas-alvo naturalmente amplificadas no genoma do parasito. A região hipervariável dos minicírculos, que está presente em milhares de cópias por célula, foi utilizada como alvo na reação de LSSP / PCR. Nas condições de baixa estringência, uso de altas concentrações de um único iniciador e baixas temperaturas de anelamento permitem a interação do primer com múltiplos sítios presentes na seqüência, além da ligação do iniciador à região de exata complementariedade. Os perfis compostos de múltiplas bandas gerados nesta reação são denominados de "assinatura gênica" (Vago e cols., 1996).

Em 2005, De Freitas e cols. descreveram uma estratégia para tipar geneticamente as diferentes linhagens de *T. cruzi* presentes em tecidos humanos. O protocolo é baseado na amplificação da região D7 do gene de rDNA 24S α por heminested PCR seguido da identificação dos produtos de amplificação usando curvas de desnaturação por PCR em tempo real. Esta metodologia permitiu identificar a presença de *T. cruzi* II em todas as amostras analisadas.

Estudos usando a técnica de LSSP-PCR demonstraram que a variabilidade genética do parasito parece ser um dos principais componentes determinantes no tropismo tecidual e na patogênese da doença. Em camundongos BALB/c artificialmente infectados com mistura composta por duas populações monoclonais de *T. cruzi*: cepa

JG e clone Col1.7G2, observou-se a ocorrência de distribuição tecidual diferencial das diferentes populações e com JG predominando no coração e Col1.7G2 sendo detectado no reto, diafragma, esôfago, cérebro e sangue dos mesmos animais (Andrade e cols.; 1999).

Em 2000, Vago e cols., também utilizando a técnica de LSSP-PCR, examinaram tecidos cardíacos de 13 pacientes com cardiopatia chagásica e tecido esofágico de 4 pacientes com megaesôfago. Os autores mostraram claramente diferentes assinaturas, para o kDNA em cada caso. Entretanto, similaridades nas assinaturas de kDNA foram observadas entre corações e/ou esôfagos de diferentes pacientes da mesma região geográfica. Sugerindo que populações de *T. cruzi* geneticamente relacionadas, possivelmente, existam nas mesmas áreas geográficas e possam estar envolvidas no desenvolvimento da mesma forma clínica da doença. Outra observação significativa foi a de que em dois pacientes as assinaturas de kDNA obtidas de coração e esôfago do mesmo indivíduo diferiu significativamente nos dois órgãos. Presumivelmente, cada um dos dois pacientes foi infectado com uma cepa multiclonal, e clones distintos predominaram no coração ou esôfago. Isto representa a primeira evidência direta do provável tropismo tecidual diferencial do *T. cruzi* em humanos.

No entanto Lages e cols. (2006) demonstraram falhas apresentadas pela técnica de LSSP-PCR. Neste trabalho, os autores observaram uma alta variabilidade de padrões genéticos geradas pelo polimorfismo do kDNA de cepas isoladas de pacientes com a mesma forma clínica da doença. Apesar da maioria dos isolados terem a mesma origem geográfica, os perfis genéticos foram únicos e específicos para cada paciente, não permitindo correlacionar o perfil da cepa encontrada com a forma clínica e estágios da doença apresentado pelo paciente. O intenso polimorfismo do kDNA pode ser resultado da presença de diferentes classes de minicirculos em cada parasito caracterizado, à altas taxas de mutação na região hipervariável ou baixa identidade de sequência entre eles.

A persistência do *T. cruzi* em tecidos cardíacos foi detectada no miocárdio de pacientes soropositivos através da técnica de imunohistoquímica indireta. Depósitos antigênicos entre as fibras cardíacas foram detectados nos tecidos de 89% dos pacientes chagásicos crônicos analisados. Estes achados são contrastantes com a hipótese de que a doença de Chagas crônica é resultado de uma resposta auto-imune (Añez e cols., 1999).

A doença de Chagas aguda e crônica foi reproduzida em modelos caninos, através da infecção dos animais com dois diferentes clones da cepa Berenice. A detecção do parasito nos cortes cardíacos foi realizada através de imunohistoquímica, utilizando soro policlonal anti-*T. cruzi* proveniente de coelhos imunizados com a cepa Y. A presença de ninhos de amastigotas em cortes do miocárdio de cães agudamente infectados pelo *T. cruzi* puderam ser identificados, porém o mesmo não foi observado nos tecidos de cães na fase crônica da doença. Em todos os casos foram observados infiltrados inflamatórios algumas vezes associados com as lesões do miocárdio (Caliari e cols., 2002).

Utilizando camundongos DBA/2 infectados com *T. cruzi* e soro anti-*T. cruzi* Guarnier e cols. (2001) puderam observar a presença de ninhos de amastigotas intracelulares na fase aguda da doença no coração, esôfago, estômago, músculo esquelético, fígado, nódulos linfáticos, baço dentre outros órgãos. Já durante a fase crônica, raras amastigotas intracelulares foram encontradas nos órgãos citados anteriormente.

Até o momento as técnicas utilizadas para identificar os parasitos diretamente em tecidos lesados mostram a presença de antígenos ou DNA dos parasitos, porém, não são capazes de demonstrar se parasitos viáveis estão presentes nos tecidos. Estes métodos apresentam problemas técnicos como especificidade e reação cruzada. Em reações de PCR não podemos descartar a possibilidade de competição dos iniciadores por diferentes seqüências alvo levando à amplificação desigual de subpopulações de parasitos, mascarando a presença de outras presentes na lesão. Além disso, não podemos descartar a possibilidade de amplificação de fragmentos de DNA, resultantes de restos celulares de parasitos, que não necessariamente estabeleceram uma infecção ativa no tecido em questão, gerando resultados de tropismo falso-positivos.

Com o objetivo de aprimorar os métodos de identificação e visualização dos parasitos diretamente em tecidos, vários grupos têm desenvolvido populações de tripanosomatídeos geneticamente modificadas, através de processos de transfecção, capazes de expressar diferentes marcas de fácil detecção.

1.3. EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSOMATÍDEOS

Estudos com *T. brucei*, *T. cruzi* e algumas espécies de *Leishmania* revelam que estes organismos apresentam ao mesmo tempo algumas características específicas de

organismos procariotos e de eucariotos no processo de expressão gênica, além de aspectos particulares só encontrados em tripanosomas. Muitos desses protozoários são parasitos digenéticos, cujo ciclo de vida apresenta múltiplas formas diferenciadas, alternando entre os hospedeiros vertebrados e invertebrados. A adaptação a estes ambientes diversificados exige grandes mudanças na morfologia, na composição das moléculas de superfície, permitindo escape do sistema imune e maior adaptação para invadir novas células, e na expressão gênica.

Os tripanosomatídeos têm despertado a atenção de pesquisadores não somente por sua relevância médica, mas também por apresentar curiosos mecanismos de controle da expressão genética. Nos tripanosomatídeos, ao contrário da maioria dos eucariotos, os genes são transcritos policistronicamente e os pré-mRNA individuais são processados a partir da adição de uma seqüência conservada de RNA na sua extremidade 5'. Esta seqüência é denominada de *spliced leader* (SL) ou minixon, contém 39 nucleotídeos que é transcrita através da ação da RNA polimerase II e, em seguida, adicionada ao pré-mRNA numa reação chamada de *trans-splicing*. A adição de SL, o qual contem o CAP, permite que o parasito sintetize mRNAs altamente estáveis. Um dinucleotídeo AG situado abaixo de uma curta seqüência consenso de polipirimidinas, presente na região intergênica, determina o sítio acceptor da SL (Matthews e cols., 1994). A seqüência de *spliced leader* é encontrada somente em tripanosomatídeos e em nematódeos e é idêntica em todos os mRNA de um mesmo organismo, porém difere para cada espécie (Donelson e Zeng, 1990).

Uma vez que todos os mRNAs precisam ser processados por *trans-splicing*, os parasitos dependem de um grande e contínuo suplemento de SL RNA, o que possibilita ao parasito sintetizar mRNA maduros altamente estáveis. Dois mRNAs em tandem são separados por uma região intergênica. A poliadenilação da região 3' do primeiro gene ocorre depois ou é concomitante à adição do cap, contendo a seqüência SL, na extremidade 5' do segundo gene. Este evento garante que em uma única rodada de reação da RNA polimerase II sejam produzidos inúmeros mRNA maduros, o que permite aos tripanosomas um rápido crescimento e evitando-se assim uma repetitiva reiniciação do processo de transcrição (para uma revisão veja Palencar e Bellofatto, 2006).

Os tripanosomatídeos, assim como os procariotos, não possuem íntrons na grande maioria dos seus genes e até recentemente, acreditava-se que não possuíam *cis-*

splicing no processamento do pré-mRNA. No entanto, foram identificados quatro genes contendo íntron nesses organismos: o gene da poli(A) polimerase, da DEAD/H RNA helicase ATP-dependente, uma proteína hipotética conservada e uma RNA-binding protein (Ivens e cols., 2005; Mair e cols.; 2000).

Os tripanosomatídeos apresentam cópias altamente conservadas das três RNA polimerases eucarióticas. Em *T. brucei*, a RNA polimerase I (RNAPI) transcreve os pré-rRNA 18S; 5,8S e 28S. Surpreendentemente, esta polimerase também transcreve dois mRNA estágio-específicos e também codifica glicoproteínas de superfície nas formas sanguíneas (VSGs) e das formas presentes no inseto, as prociclinas (EP e GEEPT) (Pays, 2006). A RNA polimerase II (RNAPII) transcreve todos os outros mRNAs bem como a seqüência SL RNA (Gilinger e cols., 2001). Finalmente a RNA polimerase III (RNAPIII) transcreve tRNAs, 5S RNA e snRNAs rico em U (Nakaar e cols., 1994).

Os tripanosomatídeos apresentam diferentes formas e hospedeiros durante os seus ciclos de vida, o que poderia levar ao entendimento de que a transcrição de conjuntos diferentes de genes seria ativada durante o processo de diferenciação celular, mas não é o que acontece. A transcrição policistrônica associada à ausência de promotor para RNA polimerase II indica que o início da transcrição não é um fator limitante na regulação transcricional desses parasitos. Estudos realizados por vários grupos mostraram que a expressão de genes em tripanosomatídeos é regulada exclusivamente ao nível pós-transcricional. Diferenças na eficiência de *trans-splicing* e a presença de elementos regulatórios nas regiões não traduzidas (UTRs) são fatores que podem explicar a expressão diferencial de genes estágio-específicos (Clayton, 2002; Teixeira e DaRocha 2003).

Vários genes cujos produtos são regulados de maneira diferencial durante o ciclo de vida dos tripanosomas vêm sendo utilizados como modelos para o estudo do controle pós-transcricional da expressão gênica nestes parasitos. Os genes de amastina, uma glicoproteína de superfície, e tuzina, uma proteína de 447 amino ácidos de localização e função desconhecidas, são transcritos em uma mesma unidade policistrônica nos três estágios do ciclo de vida do *T. cruzi*. Apesar de serem transcritos constitutivamente, os níveis de mRNA de amastina são 60 vezes mais elevados em amastigotas que em epimastigotas (Teixeira e col., 1995).

Outro exemplo bastante estudado refere-se a expressão dos diferentes tipos de mucina, glicoproteínas que cobrem a superfície do *T. cruzi*, que também é regulada pós-

transcricionalmente durante o ciclo de vida do parasito. Di Noia e cols., (2000) mostraram que os mRNAs de SMUGs (*Small mucin*) são mais estáveis na forma epimastigota. Experimentos de transfecção permitiram a identificação de um elemento rico em AU na região 3'UTR do gene das SMUGs. Este elemento seria responsável pela instabilidade dos mesmos transcritos na forma tripomastigota do parasito, mediada pela ligação de um fator protéico denominado TcUBP-1 (D'Orso e Frash, 2001)

Nozaki e Cross (1995) analisaram os efeitos da região 3'UTR e da região intergênica de vários genes estágio específicos e constitutivos de *T. cruzi*, sobre a expressão do gene repórter luciferase. Foram feitos estudos usando transfecção episomal ou transiente. A 3'UTR influencia a expressão da luciferase por mudar o nível de mRNA de luciferase ou a eficiência da sua tradução. As regiões 3'UTR dos genes da glicoproteína 72 (*gp72*), glicoproteína 85 (*gp85*) ou amastina (*ama*), que são estágio-específicos, diminuíram o nível do mRNA da luciferase de 6 a 14 vezes em epimastigotas, comparado à região 3'UTR da gliceraldeído 1-fosfato desidrogenase (*gapdh*), sendo este de expressão constitutiva. Em amastigotas, o efeito inibitório da 3'UTR de *ama* e de *gp85* observado em outros estágios do ciclo de vida foi abolido e a expressão da luciferase foi estimulada cerca de 16 vezes.

Entender os processos que envolvem a expressão e a sua regulação em um organismo é essencial para o desenvolvimento das ferramentas de manipulação gênica. Ao introduzir um gene exógeno no interior de uma célula é de se esperar que o mesmo apresente nível de expressão detectável. Porém, quando a célula alvo é um parasito como o *T. cruzi*, que apresenta três diferentes formas durante o seu ciclo de vida, isso implica na expressão diferencial de genes específicos de cada fase do ciclo. Os mecanismos escolhidos no controle da expressão dos genes exógenos devem ser muito bem explorados, permitindo que expressão seja maior em uma das fases ou em todas.

1.4. MANIPULAÇÃO GENÉTICA DE TRIPANOSOMATÍDEOS

Muito do que sabemos hoje sobre o processo de expressão gênica em tripanosomatídeos é resultado do desenvolvimento de técnicas de manipulação genética nesses organismos, seja pela criação de parasitos *knockout* ou pela introdução de marcas genéticas. Baseada na inserção de genes exógenos, objetivando a detecção dos produtos de expressão destes genes, a transfecção é uma técnica amplamente difundida na literatura, tendo sido utilizada em estudos de expressão e regulação gênica, de

localização protéica e enzimática, assim como em estudos de detecção e distribuição tissular de diferentes parasitos (Teixeira e cols., 1995, Buckner e cols., 1999, Teixeira e cols., 1999)

Existem dois tipos de transfecções: transfecções transientes ou transitórias nas quais são introduzidos genes exógenos que permanecem por curto período na célula na forma episomal. E as transfecções estáveis, na qual o gene é mantido de forma estável seja pela presença de origem de replicação no vetor, seja pela integração no genoma da célula por recombinação homóloga e, portanto a expressão se mantém por mais tempo (Teixeira, 1998).

O primeiro experimento de transfecção em tripanosomatídeos (*Leishmania*) foi realizado no final dos anos 80 por Laban e Wirth (1989). Nesta época nada se sabia sobre as seqüências necessárias para promover a expressão gênica nesses organismos. Pouco tempo depois, foram identificados muitos dos elementos envolvidos no processo de expressão, possibilitando a criação de vetores que levaram a níveis satisfatórios de expressão. Atualmente esses vetores contêm uma seqüência promotora da transcrição seguida de um sítio SL para adição da seqüência *spliced líder* (*trans splicing*) do mRNA. Em tripanosomatídeos, como não foram descritos promotores de RNA pol II, o único promotor utilizado em vetores de transfecção é o promotor de rRNA. Nas construções, o gene repórter é seguido por uma região não traduzida (3'UTR) e a estabilidade do transcrito é determinada por esta região (Da Silva e cols., 2006; Teixeira e cols., 1999; Vazquez e Levin, 1999; Coughlin e cols., 1999; Nozaki e Cross, 1995)

Em 1992, Kelly e cols., construíram o vetor pTEX, um vetor de expressão transiente em *T. cruzi*. Para o correto processamento dos RNA exógenos, esse vetor usa os sítios para *trans-splicing* e poliadenição do gene da enzima gliceraldeído fofasto desidrogenase (GAPDH). Martinez-Calvillo (1997) trocaram a região de GAPDH acima do sítio de clonagem do vetor pTEX pela região promotora de rRNA, gerando o vetor pRIBOTEX. O gene repórter utilizado foi o da enzima cloranfenicol acetiltransferase (CAT). As culturas de *T. cruzi* transfectadas com pRIBOTEX apresentaram atividade de CAT 16000 vezes maior que os parasitos transfectados com o pTEX. Os autores observaram que o novo vetor integrou-se no loco de rDNA *T. cruzi*, ao contrário do vetor parental. Em 1999, Vazquez e Levin inseriram a região HX1 abaixo do promotor de rRNA no vetor pRIBOTEX, gerando um novo vetor denominado pTRES. HX1 é um sinal altamente eficiente para processamento do mRNA por *trans-splicing* e é derivado

do gene TcP2 β . Este codifica um dos três polipeptídeos que compõem a proteína ácida ribossomal em *T. cruzi*, descrita como um antígeno importante na doença crônica cardíaca (Levitus e cols., 1991). Os autores também avaliaram a expressão de CAT que foi 2.760 vezes maior que a observada com o pRIBOTEX. Em 2003, Lorenzi e cols. mostraram que a integração do pTREX no genoma do parasito via recombinação com o loco de rRNA ocorre nas 5 primeiras horas após a transfecção e que as cópias não integradas são rapidamente degradadas.

Buckner e cols. (1999), desenvolveram um método para a detecção de *T. cruzi* intactos em tecidos, pelo desenvolvimento de parasitos que expressam a β -galactosidase de *E. coli*. Esse gene foi integrado no loco da calmodulina-ubiquitina. A expressão da enzima levou a detecção do *T. cruzi* em tecidos usando o ensaio histoquímico com X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo). Porém esta técnica requer laboriosos processos de fixação de tecidos e coloração com X-Gal. Além do mais, esta técnica não permite o estudo da dinâmica da infecção através da observação de parasitos vivos expressando a β -galactosidase.

Gaunt e cols. (2003) produziram duas diferentes populações geneticamente modificadas de *T. cruzi* que expressavam os genes de resistência a higromicina e G418, respectivamente. As duas populações modificadas foram utilizadas simultaneamente em infecções de células Vero, tendo sido selecionados parasitos recombinantes resistentes às duas drogas.

Novas construções permitem a expressão estável do gene de interesse de forma dependente de tetraciclina. Primeiramente, são obtidas células de *T. cruzi* que expressam constitutivamente a T7 RNA polimerase e o repressor de tetraciclina de *E. coli*. Em seguida, é utilizado um segundo vetor contendo o promotor da T7 e o operador de tetraciclina para aumentar e controlar a expressão do gene exógeno, respectivamente. Utilizando esta metodologia Da Rocha e cols., (2004b) geraram populações do clone CL Brener expressando RNA dupla fita de amastina. Este deveria atuar diminuindo a expressão do gene alvo, através da maquinaria de RNA interferência (RNAi). No entanto, o fenótipo esperado não foi observado, permitindo aos autores concluir que o *T. cruzi* falta um ou mais dos componentes endógenos requeridos para o funcionamento do RNAi. Recentemente, Taylor e Kelly (2006) também utilizaram a expressão dependente de tetraciclina em *T. cruzi*. Os autores utilizaram como genes repórteres luciferase e RFP e o gene da superóxido dismutase. Foi observado que a

indução era tempo e dose dependente de tetraciclina e o mRNA de luciferase e a atividade desta enzima puderam ser aumentados cerca de 100 e 60 vezes, respectivamente. Este sistema se mostrou uma valiosa ferramenta, pois permite a expressão de genes exógenos de maneira controlada, o que é particularmente útil quando se trata de genes que possam interferir no metabolismo do parasito.

Uma importante contribuição para os estudos de transfecção e análises dos processos celulares, foi a introdução dos genes das proteínas fluorescentes verde (GFP) e vermelha (RFP). GFP é responsável pela coloração esverdeada da medusa *Aequorea victoria* e RFP foi isolada de uma anêmona do mar chamada *Discomona species* (Misteli e Spector, 1997 e Mizuno e cols., 2001). Essas proteínas proporcionaram grandes avanços no entendimento dos processos celulares possibilitando a utilização de células vivas, uma vez que não requerem a presença de nenhum cofator ou substrato para geração das cores. Essas proteínas são ativadas de maneira cálcio-dependente gerando energia indiretamente para a emissão das luzes verde e vermelha. Essa energia pode ser mimetizada experimentalmente pela simples exposição de GFP e RFP à luz ultravioleta (UV). Com isto, um marcador versátil para marcação de proteínas alvo e expressão de gene em células vivas foi criado. Podem ser usadas como repórteres para monitorar também a atividade de promotores e como marcadores para visualizar tecidos específicos, células inteiras ou organelas sub-celulares (Misteli e Spector, 1997 e Mizuno e cols., 2001).

Vários autores vêm utilizando os genes das proteínas fluorescentes para monitorar e melhorar os vetores e os processos de transfecção, localizar proteínas e estudar os mecanismos de expressão gênica e troca genética em tripanosomatídeos (Santos e cols., 2000; Teixeira e cols., 1999; Da Rocha e cols., 2004a; Macêdo e cols., 2006; Gibson e cols., 2006). Recentemente, Gibson e cols., (2006) mostraram que o *T. brucei* é capaz de realizar troca genética ao detectar parasitos híbridos expressando GFP e RFP. Parasitos híbridos, de fluorescência amarela foram encontrados 13 dias após a infecção do inseto vetor na glândula salivar do mesmo. A natureza híbrida da prole foi confirmada por análises moleculares do cariótipo e microssatélites.

Nos estudos de expressão do gene de amastina, uma proteína altamente expressa nas formas amastigotas do *T. cruzi*, foram construídos dois vetores de expressão contendo o gene repórter de GFP. Nas duas construções foram clonados o promotor de rRNA e a 5'UTR de amastina, que contém o sítio para adição do *spliced líder*, acima de

GFP. A partir daí, um dos vetores recebeu a região 3'UTR selvagem e a região RI (Região Intergênica) de amastina. No segundo vetor, esse último cassete foi trocado por um fragmento quimérico, contendo a região central da 3'UTR de amastina fusionada com a 3'UTR do gene TCR27 (um gene cópia única e de expressão constitutiva que codifica uma proteína de superfície do parasito), seguida pela RI de amastina. Após a transfecção de *T. cruzi* com essas duas construções, os autores observaram que os níveis de RNA de GFP foram maiores nas formas epimastigotas que receberam o segundo vetor (quimérico) do que naqueles que receberam o primeiro vetor contendo a 3'UTR de amastina selvagem (Coughlin e cols., 1999).

A transfecção de epimastigotas de *T. cruzi* com o gene de GFP (green fluorescent protein) descrita por Teixeira e cols (1999) resultou na expressão da proteína verde fluorescente em todas as três formas do ciclo de vida do parasito. Nesta construção, o gene de GFP foi ligada a 3'UTR de amastina, o que aumentou a estabilidade do mRNA na forma amastigota. O gene exógeno foi inserido no genoma do parasito através de recombinação homóloga com o gene TCR27 (Teixeira e cols., 1999).

Desde a descoberta da doença de Chagas, grandes avanços quanto ao desenvolvimento de técnicas de diagnóstico, caracterização biológica, bioquímica e molecular do parasito, caracterização da resposta imunológica do paciente e do controle da transmissão vetorial tem sido alcançados. Todavia, a criação de novas ferramentas de estudo, como a obtenção de parasitos geneticamente modificados expressando proteínas fluorescentes de fácil detecção, podem ser valiosas no estudo sobre os fatores que determinam a patogênese da doença de Chagas, mecanismos de invasão celular e sobre aqueles geradores de variabilidade nesta espécie.



2. Objetivos

2.0. OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar linhagens geneticamente modificadas derivadas de várias cepas de *T. cruzi*, expressando GFP e RFP de forma estável, para que possam ser utilizadas como ferramentas no estudo da biologia do parasito e da doença de Chagas.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver diferentes cepas de *T. cruzi* transfectantes expressando GFP e RFP
- Avaliar a expressão das proteínas fluorescentes nos diferentes estágios de vida do parasito: epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas;
- Avaliar a infectividade dos parasitos transfectados em cultura de células;
- Avaliar a infecção em camundongos dos parasitos geneticamente modificados;
- Avaliar a co-infecção de cultura de células com diferentes parasitos expressando GFP e RFP.



3. Material e Métodos

3.1. VETORES

3.1.1. pTCRNeoGFP

O vetor pTCRNeoGFP desenvolvido por Teixeira e cols., (1999), permitiu aos autores a obtenção de *T. cruzi* resistentes ao G418 e expressando GFP nas diferentes formas de vida do parasito. Para a expressão da proteína verde fluorescente o plasmídeo pTCRNeoGFP contém os seguintes elementos: (a) o gene de *T. cruzi* de cópia única TCR27 que codifica uma proteína de citoesqueleto, com múltipla repetição interna de quatorze aminoácidos, que permite uma transfecção estável ou integrativa via recombinação homóloga em um dos alelos do gene TCR27, (b) um segmento carregando o promotor de rRNA de *T. cruzi*, que assegura um alto nível de transcrição do gene de GFP, (c) o gene para a forma mutada de GFP (GFPmut3), (d) um fragmento correspondente a região 3'UTR de amastina, uma proteína de superfície abundante na forma amastigota do parasita, seguida pela região intergênica (IR), incluindo os sítios de adição de poli A e acceptor de *spliced leader* requeridos para promover o processamento do mRNA. A 3'UTR mais a IR, inseridas abaixo do gene de GFP, pode resultar em um mais alto nível de expressão de GFP em amastigotas do que em epimastigotas e tripomastigotas e (e) a região codificadora para a neomicina fosfotransferase (NEO^r) que confere resistência a neomicina e ao seu análogo G418 (figura 4).

3.1.2. pTREXGFPNeo e pTREXRFPNeo

Os vetores pTREXGFPNeo e pTREXRFPNeo são vetores de expressão transiente derivados do vetor pTREX descrito por Vazques e Levin (1999). Eles contêm as seguintes seqüências: a) espaçador ribossomal que é parte integrante do promotor de rRNA; b) promotor de RNA ribossômico que assegura um alto nível de transcrição do gene repórter; c) HX1 que é um sinal altamente eficiente para processamento do mRNA por *trans-splicing*, derivado da região intergênica do gene *Tcp2β* (Vazques e Levin, 1999). Este gene codifica um dos três polipeptídeos que compõem a proteína ácida ribossomal em *T. cruzi*, descrita como um antígeno na doença crônica cardíaca (Levitus e cols., 1991); d) gene codificador da proteína verde fluorescente de *Aquorea victoria* (GFP) ou a proteína vermelha fluorescente (RFP) de *Discosoma* spp; e) região intergênica e 3'UTR do gene de gGAPDH, que são sinais para *trans-splicing* e poliadenilação do gene de Neo, respectivamente e f) região codificadora para a

neomicina fosfotransferase (NEO^r) que confere resistência a neomicina e ao seu análogo G418 (Figura 5).

3.1.3. PROCKGFPNEO E PROCKRFPNEO

Para gerar o vetor de expressão permanente, um fragmento de β -tubulina previamente clonado em pBluescript (Bartholomeu e cols., 2002) foi removido por digestão com *EcoR* I, seguido de tratamento com a enzima T4 DNA polimerase e então com *Pst* I. O Fragmento excisado de β -tubulina de aproximadamente 1,0 Kb foi clonado em pBluescript nos sítios de *Not* I/*Pst* I, gerando pTUB. O cassete contendo o promotor de rRNA, as regiões para processamento dos mRNA e o gene de resistência a Neomicina foi obtido por digestão com *Kpn* I a partir do vetor pTREX (Vazquez e cols., 1999), seguido de “*filling*” das extremidades. Este fragmento de 3,1 Kb foi inserido no pTUB que foi previamente digerido com *Hind* III/*Kpn* I e tratado com T4 DNA polimerase. O fragmento contendo β -tubulina mais o cassete de expressão foi obtido por digestão com *Sac* I/*Nhe* I do vetor pTUB e foi transferido para pBluescript modificado (sk1) depois de digerido com *Not* I/*Kpn* I e tratamento com T4 DNA polimerase. PSk1 não contém os promotores T3 e T7. Nesta construção final foi inserido nos sítios de *Xba* I/*Xho* I o gene de GFP (*green fluorescent protein*) ou RFP (*red fluorescent protein*), gerando o vetor pROCKGFPNeo ou pROCKRFPNeo (DaRocha e cols., 2004a).

O gene de GFP foi obtido do vetor pTCRGFPNeo (Teixeira e cols., 1999) e RFP foi obtido do vetor pDsRed (Clontech).

3.2. TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS DH5 α

Alíquotas de bactérias *E. coli* (cepa DH5 α), tratadas previamente com CaCl₂ (Sambrook e cols., 1989), foram misturadas com o produto de ligação ou plasmídeo, mantidas em banho de gelo por 10 minutos e transformadas por choque térmico a 42°C por 90 segundos. A este material foram adicionados 900uL de meio 2XYT líquido (1,6% de triptona, 1% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl, pH 7,0) sendo incubado por 45 minutos a 37 °C sob agitação constante (180 rpm). Em seguida, 200 μ L da cultura transformada foram plaqueados em meio 2XYT-ágar (1,5%) suplementado com 100 μ g/mL de ampicilina, 0,1 μ M de IPTG e 0,004% de X-gal e as placas incubadas por 16 horas a 37 °C.

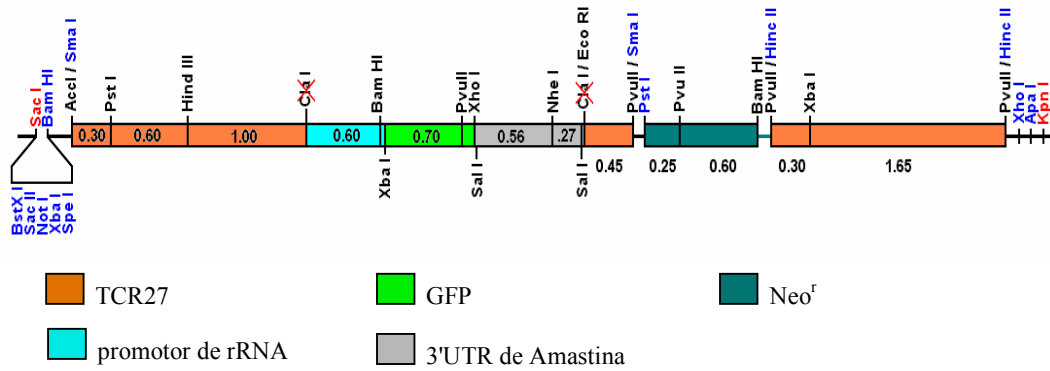


Figura 4: Representação esquemática do vetor de expressão em *T. cruzi* pTCRNeoGFP7.

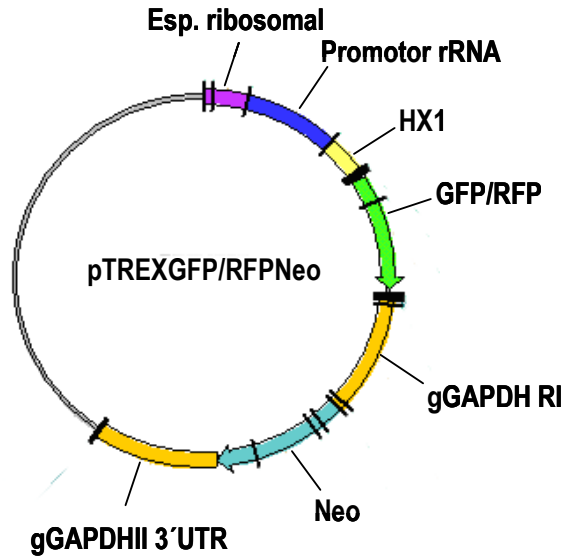


Figura 5: Esquema representativo do vetor de expressão transiente pTREXGFP/RFP.

Em todas as transformações, como controles positivos e negativos foram usados o plasmídeo pUC18 (*Amersham-Pharmacia Biotech*) e uma transformação sem plasmídeo, respectivamente.

3.2.1. OBTENÇÃO E RESTRIÇÃO DE DNA PLASMIDIANO

DNA plasmidiano dos clones considerados positivos foram preparados utilizando o “kit” *Wizard plus SV minipreps DNA purification system* (Promega), de acordo com instruções do fabricante. Esse sistema baseia-se na lise alcalina das bactérias seguida de cromatografia de troca iônica. Com o uso desse sistema de purificação foram obtidos cerca de 2 µg de DNA a partir de 3 mL de cultura crescidos em meio 2XYT. Preparações de DNA plasmidiano em maior escala e com alto grau de pureza (cerca de 400 µg de plasmídeo), para serem aplicados nos teste de transfecção dos parasitos, foram obtidas a partir de 200 mL de cultura em meio 2XYT, com o uso do *Plasmid Maxi Kit* (Qiagen), como descrito pelo fabricante, de princípio similar ao anterior. As amostras de DNA plasmidiano obtidas foram dosadas em espectrofotômetro a 260 nm, sendo o grau de pureza das amostras determinado pela relação da absorbância a 260/280nm.

As digestões dos DNAs plasmidiano foram realizadas nas proporções de 1 unidade de cada enzima de restrição para cada 1 µg de DNA, na presença do tampão especificado pelo fabricante a 37°C por quatro horas ou durante a noite. Em seguida o DNA foi precipitado na presença de 0,1 volume de acetato de sódio 3M pH 5,2; 2 volumes de etanol 100%, sendo a solução incubada a -20 °C durante a noite. Em seguida, a mesma foi centrifugada a 14000 rpm a 4 °C por 20 minutos e o DNA precipitado foi lavado com etanol 70% e novamente centrifugado por 5 minutos. Após secagem o precipitado de DNA foi solubilizado em água.

Os produtos das digestões do DNA plasmidiano foram corridos em geis de agarose 1% em tampão TAE 0,5X (0,02M de Tris base, 0,0571% de ácido acético glacial, 0,1% de EDTA 0,5M pH 8,0), nos quais as amostras foram aplicadas na presença do tampão da amostra 2X (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xilenocianol, 30% de glicerol). Após coloração por 0,5 µg/mL de brometo de etídeo os géis foram visualizados à luz ultravioleta e fotografados.

3.3. OS PARASITOS

Foram utilizadas, no presente estudo, as cepas JG e Tulahuén e os clones Col.1.7G2 e CL Brener gentilmente cedidos pelo Prof. Egler Chiari. A cepa JG foi isolada em 1995 por Lages-Silva, a partir da hemocultura de um paciente crônico grave, apresentando megaesôfago avançado e tendo sido submetido à cirurgia corretiva de esôfago e o clone Col.1.7G2 foi selecionado ao acaso da cepa Colombiana isolada por Federici em 1969 a partir da hemocultura de um paciente na fase crônica da doença, apresentando manifestações cardíacas. As formas epimastigotas dos parasitos foram mantidas em fase logarítmica de crescimento a 28°C em meio LIT (*liver infusion tryptone*), como descrito previamente por Teixeira e cols., 1994.

3.3.1. TRANSFEÇÃO DE FORMAS EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi*

Epimastigotas na fase exponencial de crescimento foram lavados em tampão de eletroporação (TE) (120 mM KCl, 0,15 mM CaCl₂, 10 mM K₂HPO₄, 25 mM HEPES, 2 mM EDTA pH 8,0, e 5mM MgCl₂) a 4 °C. Em seguida os parasitos foram ressuspensos para uma concentração final de 10⁸ células/mL no mesmo tampão. Aliquotas de 0,4 mL (4 x 10⁷ parasitos) desta suspensão de células foram misturados a 50 µg de cada plasmídeo (pROCKGFPNeo ou pROCKRFPNeo), previamente linearizado por digestão com a enzima *NotI* (Promega), em um volume máximo de 50 µL em cubetas de eletroporação 0,2 cm (Bio-Rad). Os parasitos foram eletroporados utilizando o aparelho *Gene Pulser System* (Bio-Rad) utilizando 0,3 KV e capacitância de 500 µF, tendo sido aplicados 3 pulsos, com intervalos de 30 segundos entre eles.

Após a eletroporação, as cubetas foram transferidas para um banho de gelo por 5 minutos, sendo os parasitos em seguida transferido para garrafas de cultura estéreis contendo 5 mL de meio LIT suplementado com 10% SFB (soro fetal bovino) e incubadas a 28 °C. Vinte e quatro horas após à eletroporação foram adicionados ao meio 200 µg de G418 (Geneticin - Gibco, USA).

3.3.2. SELEÇÃO DE PARASITOS TRANSFECTADOS

Para a seleção de parasitos transfectados foi utilizada a droga G418 (Geneticin - Gibco, USA). Este composto é um antibiótico aminoglicosídeo que atua no mecanismo de síntese protéica. O G418 liga-se aos polissomos e interfere na síntese de proteínas causando erros ou terminando precocemente a tradução do mRNA. As proteínas

aberrantes geradas são utilizadas pela célula, podendo inclusive ser incluídas na membrana celular, alterando a permeabilidade da mesma (Bar-Nun e cols., 1983).

3.3.3. ANÁLISE DE *T. cruzi* POR CITOMETRIA DE FLUXO

Cerca de 1,5 mL de cultura de epimastigotas de *T. cruzi* em meio LIT, contendo, aproximadamente, 1×10^7 células móveis foi centrifugada a 400 RPM, por 10 minutos, à temperatura ambiente, para separação das células intactas dos “debris” celulares. Em seguida, a cultura foi deixada em repouso por 10 minutos, para que os epimastigotas pudessem nadar para o sobrenadante. Utilizando uma pipeta plástica, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e as células foram lavadas 3 vezes em PBS gelado. Para as etapas de lavagem das formas epimastigotas seguiu-se centrifugação a 2200 RPM, por 10 minutos a 4 °C.

Após a última lavagem, o precipitado de células foi ressuscitado em 3 mL de *Master Facs Fix* (MFF) (0,05% de paraformaldeído, 0,05% cacodilato de sódio e 0,033% de NaCl). A solução de células fixadas foi deixada em geladeira (4 °C) durante a noite e em seguida submetida à análise por citometria de fluxo. A solução de células fixadas foi transferida para um tubo Falcon de poliestireno 352054 (Becton Dickinson, USA) para contagem no FACS. A solução foi diluída em PBS até que a contagem indicada pelo aparelho não ultrapassasse 2000 eventos/segundo.

Para a seleção das células a serem analisadas, inicialmente foi construído um gráfico SSC X FSC que traduz a granulosidade versus tamanho da célula, assim as células apresentando granulosidade e tamanhos médios foram selecionados para a leitura, através da delimitação da região correspondente no gráfico. Foram analisados 10^5 eventos dentro da região selecionada no gráfico SSC X FSC (Figura 6A).

A identificação dos parasitos fluorescentes foi feita através do histograma FL1 (fluorescência verde) x FL2 (fluorescência vermelha) (Figura 6B-C) e a determinação da porcentagem de parasitos verdes e vermelhos foi realizada através de histograma FL1 ou FL2 X número de eventos, sempre em comparação com o perfil gerado para as células selvagens (Figura 5d).

3.4. OBTENÇÃO DE CLONES DE PARASITOS TRANSFECTADOS

3.4.1. CLONAGEM POR DILUIÇÃO LIMITANTE

Para a obtenção de clones dos parasitos geneticamente modificados, culturas em fase exponencial de crescimento foram submetidas a um passo de diluição limitante até a concentração final de 0,1 ou 0,2 parasitos/0,2mL em meio LIT suplementado com 200µg/mL de G418 e 10% de sangue (Ramirez e cols., 2000) . Em seguida, a cultura foi distribuída em placa de 96 poços. As placas foram incubadas a 28 °C em câmara úmida por aproximadamente 25 a 30 dias, quando se observou crescimento em alguns poços da placa. Os parasitos de cada poço foram analisados em microscópio de fluorescência para verificação da existência de células fluorescentes. Aqueles clones que se apresentaram fluorescentes foram transferidos para garrafas de cultura contendo 1 mL de meio LIT 200 µg/mL de G418.

3.4.2. SUBCLONAGEM EM PLACAS DE ÁGAR-SANGUE

Alternativamente, as populações transfectadas e aqueles supostos clones obtidos através de diluição limitante foram submetidos a passos adicionais de cublonagem em placas de agar-sangue. Estas foram preparadas usando 0,75% (p/v) de agarose *low melting point* (LMP) e 2% de sangue humano fresco desfibrinado adicionados à mistura de 1:1 dos meios LIT e BHI contendo 200 µg/mL de G418. Em seguida 20 mL desse meio foram distribuídos em placas de petri estéreis. Logo após, as placas contendo o meio foram levadas à solidificar no gelo, embaladas uma a uma em papel autoclavado, inverditas e incudadas a 37 °C por 48 horas para secarem (Gomes e cols., 1991). Cerca 100 µL de meio contendo 10^2 , 10^3 e 10^4 parasitos foram plaqueados na superfície do ágar com o auxílio de alças de vidro estéreis, em seguida as placas foram incubadas a 28 °C. Depois de 25-30 dias, colônias isoladas puderam ser observadas e colônias individuais foram coletadas e transferidas para 1 mL de meio LIT suplementado com G418 em placas de 24 poços.

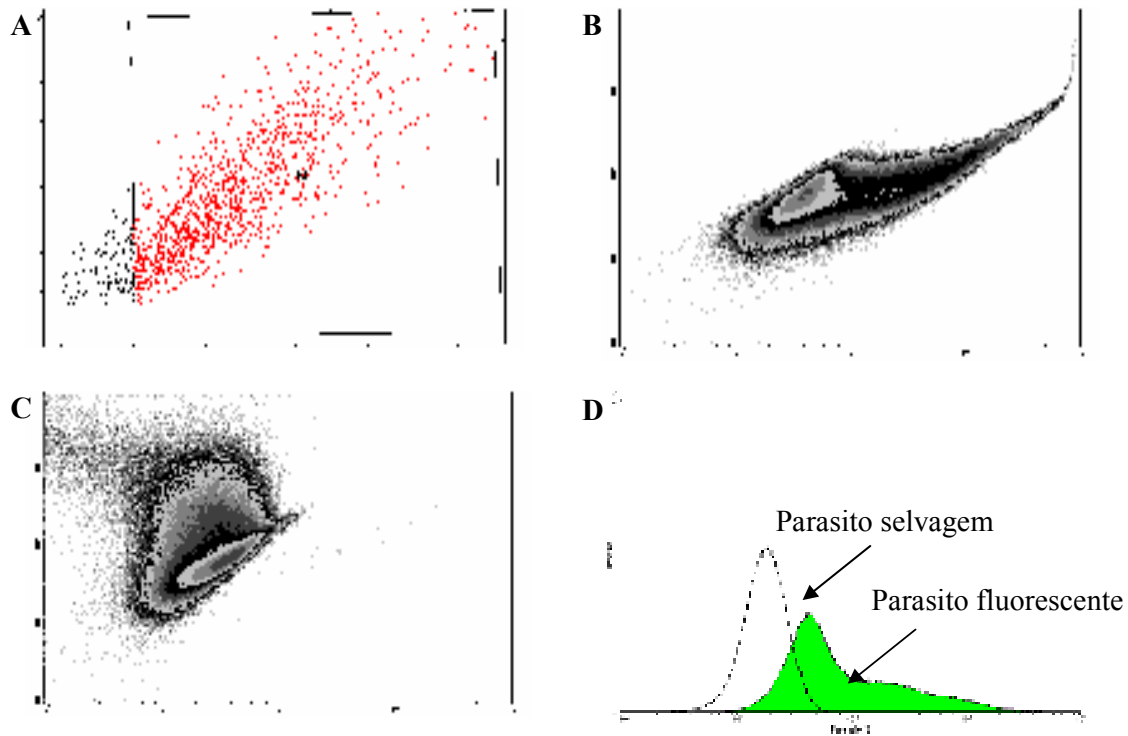


Figura 6A-C: Histogramas das células fluorescentes analisadas no aparelho FACS Vantage. Em (A) o gráfico SSC (granulosidade) x FSC (tamanho das células) mostrando a região selecionada para a leitura da fluorescência. Em (B) e (C) histogramas FL1 (fluorescência verde) x FL2 (fluorescência vermelha), indicando a presença de células expressando GFP (B) e expressando RFP (C). Em (D) o gráfico FL1 ou FL2 X nº de eventos que permite a determinação da porcentagem de parasitos fluorescentes em comparação com o perfil gerado pela linhagem selvagem.

3.5. SEPARAÇÃO DE BANDAS CROMOSSÔMICAS DE *Trypanosoma cruzi* POR PFGE (PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS)

A cultura de *T. cruzi*, em fase exponencial, foi centrifugada a 3000 RPM por 10 min a temperatura ambiente. Logo após, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas cuidadosamente em PBS. Após novo ciclo de lavagem, as células foram ressuspendidas em PSG (NaH₂PO₄ 75 mM, NaCl 60 mM e Glicose 10%), a uma concentração de 5x10⁷ parasitos por 50µl. Igual volume de agarose de baixo ponto de fusão (LMP - *Low Melting Point*) 1%, à temperatura de aproximadamente 40°C, foi acrescida à suspensão de parasitos. Após homogeneização, essa mistura foi distribuída em moldes com volume de 100 µl com concentração final de parasitos de 5x10⁷.

Após solidificação, cerca de 20 min a 4°C, os blocos foram mergulhados em um grande volume de solução ESP (EDTA 0,5 M, Lauroyl sarcosine 1% e Proteinase K 0,5 mg/ml), e mantidos por 48 horas a 50°C sob agitação lenta. Após lavagem em EDTA 0,5 M pH 8,0, os blocos foram armazenados a 4°C nesta solução até o momento da eletroforese (Engman e cols., 1987).

Os blocos contendo moléculas de DNA dos parasitos foram submetidos à PFGE ao lado de um padrão comercial de peso molecular (cromossomos de *Saccharomyces cerevisiae*, New England). As bandas cromossômicas dos parasitos foram separadas através de eletroforese de campo pulsátil (PFGE) conforme descrito por Cano e cols. (1995), com algumas modificações.

Os géis de PFGE foram preparados com agarose SeaKem (FMC – Bioproducts) 0,8% em TBE 0,5X (25 mM Tris-borato/0,5 mM EDTA, pH 8,0). As corridas eletroforéticas foram realizadas por 135 horas com voltagem constante (80V) a 13 °C em aparelho “Gene Navigator System”(Pharmacia). Foram aplicados pulsos homogêneos (N/S, L/O) de 90 s por 30 h, 120 s por 30 h, 200 s por 24 h, 350 s por 25 h e 800 s por 26 h, com interpolação. Após a separação cromossômica os géis foram corados com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e fotografados.

3.5.1. CHROMOBLOT

Após coloração pelo brometo de etídeo e fotografia, os géis foram tratados por 15 minutos com solução de depurinação (HCl 0,25M), transferidos para solução de desnaturação (NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M) por duas vezes durante 30 minutos e, em seguida, incubados em solução de neutralização (Tris-HCl 0,5 M pH 7,0; NaCl 3M)

duas vezes por 30 minutos (Sambrook e cols., 1989). Esses tratamentos foram conduzidos à temperatura ambiente e sob agitação lenta. O DNA foi transferido para membrana de “nylon” Hybond-N (*Amersham*) por meio de capilaridade em solução SSC 10X (NaCl 1,5 M e citrato de sódio 0,15 M pH 7,0) por 24 horas (Sambrook e cols.; 1989). Para tanto, foi montado aparato de transferência composto por um recipiente contendo aproximadamente 1L de solução SSC 10X e sobre o recipiente, uma placa de vidro coberta parcialmente por uma folha de papel filtro fazendo contato com a solução. Logo acima foi posicionado o gel, a membrana de nylon e uma pilha de papel absorvente. Após a transferência, as membranas foram lavadas em SSC 2X e o DNA imobilizado sob luz ultra-violeta por duas vezes na potência de $1200 \times 100 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ no aparelho UVStratalinker (*Stratagene*).

3.5.2. NORTHERN BLOT

As culturas de epimastigotas de *T. cruzi* transfectadas e selvagem, em fase exponencial de crescimento, foram centrifugadas a 3000 RPM por 10 min a temperatura ambiente. Logo após, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas por duas vezes em PBS. O RNA total de aproximadamente 5×10^8 parasitos foi extraído utilizando o *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) seguindo-se os procedimentos recomendados pelo fabricante. O método de extração consiste em lise na presença de isotiocianato de guanidina e cromatografia de afinidade, onde RNAs maiores que 200 pb ligam seletivamente a membrana de sílica-gel. Os géis de agarose para análise das amostras de RNA foram preparados na concentração 1,5 % em tampão MOPS 1X/EDTA (MOPS 0,02 M; Acetato de sódio 5mM; EDTA 1 mM, pH 7,0) e formaldeído 2 %. Foram adicionados 25 μL de tampão de amostra [0,75 mL de Formamida deionizada; 0,15 mL de tampão MOPS 10X; 0,24 mL de Formaldeído; 0,1 mL de Água; 0,1 mL de Glicerol; 0,08 mL de Azul de Bromofenol a 10 % (p/v)] em 10 μg de amostra e incubado a 65 °C por 15 min. Em seguida, 1 μL de EtBr 1,0 mg/mL foi adicionado às amostras e estas aplicadas no gel. Após a corrida, o gel foi analisado em transiluminador de UV. O gel que foi utilizado na transferência foi tratado inicialmente com solução NaOH 50 mM por 20 min, e em SSC 2X por 40 min. Os RNAs foram transferidos para membrana Hybond-N (*AMERSHAM*) por capilaridade em solução SSC 10X.

3.5.3. MARCAÇÃO DE SONDAS RADIOATIVAS

Cerca de 50 ng de fragmentos de DNA correspondente à região codificadora de GFP, RFP e β -tubulina foram radioativamente marcados com 50 μ Ci de [α -³²P]dCTP utilizando 5 μ L da solução de hexanucleotídeos randômicos como iniciadores, 4 μ L dos demais dNTPs não marcados, 5 μ L do tampão da reação e a 2 unidades da enzima Klenow fragment, disponível no *kit Megaprime DNA labelling System (Amersham Pharmacia Biotech)*. Após 10 minutos de marcação, as reações foram bloqueadas com 2 μ L de EDTA 0,5M pH 8,0. A purificação das sondas marcadas foi feita por fracionamento em coluna SephadexTM G-50 (*NickTM Columns System – Amersham Pharmacia Biotech*) previamente equilibrada com tampão TE.

Após a obtenção das sondas, as membranas foram submetidas à pré-hibridação em aproximadamente 30 ml de solução de pré-hibridação (NaH₂PO₄ 0,25 M, SDS 7%, BSA 1% e EDTA 1 mM) em frascos apropriados mantidos em fornos giratórios a 65°C por 1 hora. Após prévia desnaturação por fervura, as sondas marcadas foram adicionadas a 10 ml de solução de pré-hibridação. Para a hibridação, as membranas foram expostas a essa solução e foram mantidas a 65°C por aproximadamente 18 horas (Church e Gilbert, 1984).

Após hibridação, as membranas foram lavadas duas vezes por 15 minutos em forno giratório com solução de lavagem (SSC 2X e SDS 0,2%) a 65°C. Após a lavagem as membranas foram seladas e expostas em filme de raios X (filme de raios-X, *Kodak X-OmatTM*) a -70 °C em cassete e reveladas em diferentes tempos de exposição ou expostas em *screen (Amersham Pharmacia Biotech)* e lidas no aparelho storm 840 (*Amersham Pharmacia Biotech*).

3.6. INFECÇÃO DE CULTURA DE CÉLULAS EM MONOCAMADAS COM *T. cruzi*

Placas de cultura de seis poços contendo uma lamínula de vidro estéril (22 x 22 mm) por poço foram utilizadas para os experimentos de infecção *in vitro*. Cerca de 1 x 10⁵ células Vero foram plaqueadas por poço em meio RPMI (*Sigma*) suplementado com 10% SFB (soro fetal bovino), 25 mM de HEPES (*Sigma*) e 200 UI de penicilina e 0,2 mg de estreptomicina (*culatilab*) e após um período de 24 horas foram infectadas com aproximadamente 1 x 10⁶ formas tripomastigotas das cepas selvagem ou transfectada,

durante 6 dias de cultivo. Para a co-infecção foram utilizados cerca de 1×10^6 tripomastigotas de cada população expressando GFP e RFP.

Para avaliação da infectividade dos parasitos selvagens e transfectantes, três lamínulas contendo células Vero infectadas com os parasitos selvagens e transfectantes foram lavadas com PBS e fixadas com SFB por aproximadamente 10 minutos até secarem por completo. As lamínulas foram incubadas a temperatura ambiente com 100 μ L do corante *May Grunwald* por 1 minuto, em seguida foram adicionados 100 μ L de água pH 7,0, que imediatamente, foram totalmente removidos. Acrescentou-se o corante GIEMSA (2 gotas/mL de água pH 7,0) até cobrir a lamínula. Após 5 minutos, as lamínulas foram lavadas em água corrente filtrada e quando já secas, foram montadas em lâminas, utilizando bálsamo do Canadá (Giaimis e cols., 1992).

A avaliação da infectividade entre parasitos selvagens e transfectantes foi realizada em três experimentos independentes através da contagem em triplicata do número de células Vero que apresentavam ninhos de amastigotas e o número de amastigotas em um total de 100 células Vero.

3.7. INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS COM OS PARASITOS EXPRESSANDO GFP E RFP

Camundongos BALB/c ou GKO (nocaute para interferon gama) com idade de 3-4 semanas, foram intraperitonealmente inoculados com aproximadamente 10^5 formas tripomastigotas dos parasitos geneticamente modificados, provenientes de cultura de células Vero. Sete dias após o inóculo, uma pequena gota de sangue foi extraída, diariamente até o 14º dia, da cauda dos animais e examinada ao microscópio, para verificar a presença de tripomastigotas. Em seguida, procedeu-se a captura da imagem de tripomastigotas sanguíneos em microscópio de fluorescência.

Animais cuja presença de tripomastigotas fluorescentes no sangue foi observada por microscopia ótica de fluorescência foram sacrificados, tendo sido coletados coração, diafragma, esôfago, reto e músculo esquelético para análise. Os órgãos coletados foram lavados em PBS e em seguida congelados a -30°C em *Tissue-Tech O.C.T. (Optical Coherence Tomography - Lightlab)*. Após o congelamento, foram feitos cortes de aproximadamente 7-10 μ m de espessura no aparelho criostato (*Bright – Instrument Company LTDA*). Os cortes foram imediatamente colocados em lâminas de vidro e fixados com paraformaldeído tamponado 4%.

3.8. MICROSCOPIA CONFOCAL

Parte das lamínulas contendo as células Vero infectadas, aquelas co-infectadas com misturas de parasitos expressando GFP e RFP e os tecidos dos animais infectados com os parasitos fluorescentes foram utilizados para captação de imagens em microscopia confocal (Zeiss LSM 510 - *Laser Scanning Microscope*). As imagens foram capturadas em canais separados, utilizando objetiva de 40x com zoom de 2x e filtro para FITC, Rodamina e luz transmitida. As imagens foram superpostas utilizando programa *LSM Image browser*.

Para isto as amostras foram lavadas duas vezes por 3 minutos em PBS gelado suplementado com 3% de SFB (soro fetal bovino) e, fixadas com paraformaldeído 4% em PBS a temperatura ambiente por cerca de 10 minutos. As amostras foram novamente lavadas duas vezes em PBS suplementado com 3% de SFB e tratadas com 1 mg/mL de RNase por 15 minutos a 37 °C e lavadas mais duas vezes em PBS. Em seguida, o DNA das células foi corado por 10 minutos a temperatura ambiente pelo iodeto de propídeo (0,1 mg/mL) ou pelo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (0,1 µg/mL) e preparadas sobre lâminas de vidro contendo um gota de 90% de glicerol e 10% de Tris-HCl 0,5M; pH 9,0.



4. Resultados

4.1. TRANSFECCÃO DE FORMAS EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi* COM OS VETORES pTCRNEOGFP, pTREXGFPNEO E pTREXRFPNEO

Com o objetivo de gerar parasitos transfectantes que expressassem a proteína verde fluorescente, parasitos das cepas JG e Tulahuén foram inicialmente transfectados com o vetor de expressão permanente pTCRNeoGFP. Este é um plasmídeo integrativo, via recombinação homóloga com loco do gene TCR27 (Figura 4). Para permitir recombinação do vetor com o genoma do parasito, o plasmídeo foi previamente digerido com as enzimas *KpnI* e *NotI*, a fim de se liberar o cassete contendo o gene TCR27, promotor de rRNA, GFP, gene de resistência a neomicina e 3'UTR de amastina. Após a eletroporação, os parasitos foram submetidos à seleção dos transformantes na presença de G418, por aproximadamente 25 dias, quando se verificou a total ausência de parasitos transfectantes. Esse experimento foi realizado duas vezes, sendo que em ambos não foram obtidos parasitos fluorescentes.

Buscando uma nova alternativa que permitisse gerar os parasitos expressando GFP e RFP, foi utilizado o vetor pTREX descrito com grande sucesso por Vazques e Levin, (1999) e Lorenzi e cols., (2003). Em dois experimentos independentes, os parasitos das cepas JG e Tulahuén e do clone Col1.7G2 foram transfectados com os vetores de expressão transiente pTREXGFPNeo e pTREXRFPNeo (Figura 5). Após 12 horas da transfecção, parasitos vivos e fluorescentes foram observados em microscópio de fluorescência. Os parasitos das populações JG, Tulahuén e Col.1.7G2 expressaram as proteínas fluorescentes GFP e RFP. Para cada transfecção foram contados aleatoriamente 500 parasitos vinte e quatro horas após a eletroporação. Para a cepa Tulahuén, a eficiência de transfecção foi de 18% para GFP e 15% para RFP, enquanto a cepa JG e clone Col.1.7G2 apresentam valores inferiores a 2% (Figura 7).

Após a verificação da expressão dos genes repórteres, as culturas de epimastigotas transfectadas foram submetidas à seleção de parasitos resistentes ao G418, em meio LIT contendo 200 µg/mL de antibiótico. Esta concentração de G418 foi determinada anteriormente através de uma curva dose-resposta das cepas utilizadas em meio contendo diferentes concentrações do antibiótico. Após a adição da droga não foi observado aumento nas proporções de parasitos fluorescentes através do exame das epimastigotas transfectadas em microscopia de fluorescência. Vinte dias após a eletroporação não foi mais possível observar a presença de parasitos fluorescentes,

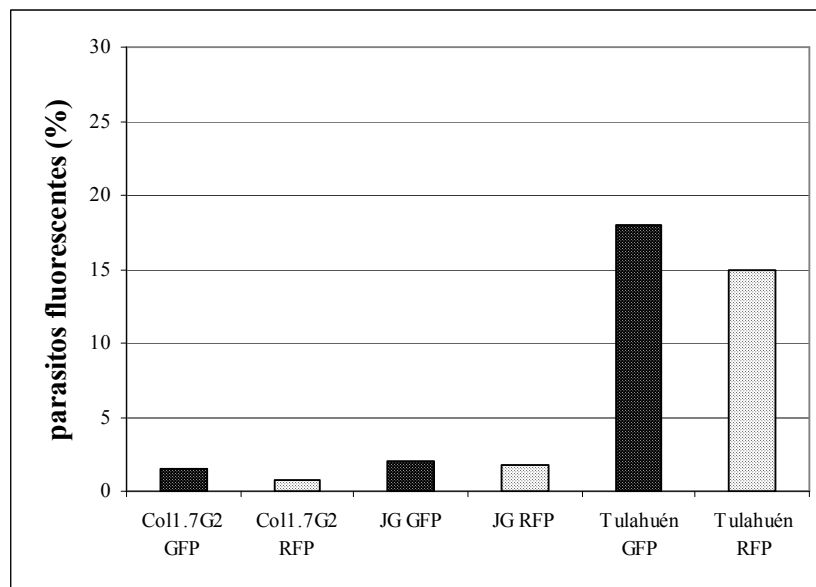


Figura 7: Eficiência do processo de transfecção de *T. cruzi* com os vetores pTREXGFP e pTREXRFP, vinte e quatro horas após a eletroporação. Foi contado o número de parasitos expressando GFP e RFP em total de 500 células, utilizando microscopia de fluorescência. Nas barras cinzas estão representados os parasitos transfectados para GFP e nas pretas aqueles transfectados para RFP.

mesmo estes permanecendo resistentes ao antibiótico. Um novo experimento de transfecção do clone CL Brener com o vetor pTREGFP foi realizado, desta vez, seguindo as condições descritas por Guevara e cols., (2005) que haviam relatado a obtenção de 100% de parasitos transfectados expressando a proteína verde com este mesmo vetor. Assim, os parasitos foram eletroporados com um único pulso de 300V, 1000 μ F e 200 μ g do vetor pTREGFPNeo. Dois dias após a eletroporação, foram adicionados 200 ou 500 μ g/mL de G418, pois esta última foi a concentração da droga utilizada por Guevara e cols., (2005). Mesmo utilizando esse protocolo, sete dias após a transfecção não foram observados 100% de parasitos fluorescentes, como descrito na literatura, mas uma proporção bem inferior, sempre abaixo de a 10%. (Figura 8). A partir desses resultados fez-se necessária a construção de novos vetores que permitissem a expressão de GFP e RFP de forma estável e duradoura em populações de *T. cruzi*.

4.2. CONSTRUÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO PERMANENTE pROCKGFPNEO E pROCKRFPNEO

A fim de gerar parasitos fluorescentes de forma estável foram construídos os vetores de expressão permanente pROCKGFPNeo e pROCKRFPNeo a partir do vetor previamente desenvolvido pelo então estudante de doutorado Wanderson da Rocha denominado pROCKAmaFGFPNeo. Inicialmente, este vetor foi digerido com as enzimas de restrição *Xba*I e *Xho*I para substituição do fragmento AmaFGFP (amastina em fusão com GFP) pelo gene da proteína verde ou vermelha fluorescente. O gene de GFP foi obtido a partir do vetor pTCRNeoGFP7 (Teixeira e cols., 1999) e o gene de RFP foi obtido do vetor pDsRed (Clontech), através da digestão com as mesmas enzimas acima citadas. Estes plasmídeos, além dos genes de resistência a neomicina e das proteínas fluorescentes, contêm em sua seqüência um fragmento do gene multicópia de β -tubulina, uma proteína formadora de microtúbulos em *T. cruzi*, o promotor de RNA ribossômico que assegura um alto nível de transcrição do gene repórter, a região HX1 e a região intergênica e 3'UTR do gene de gGAPDH que promovem o

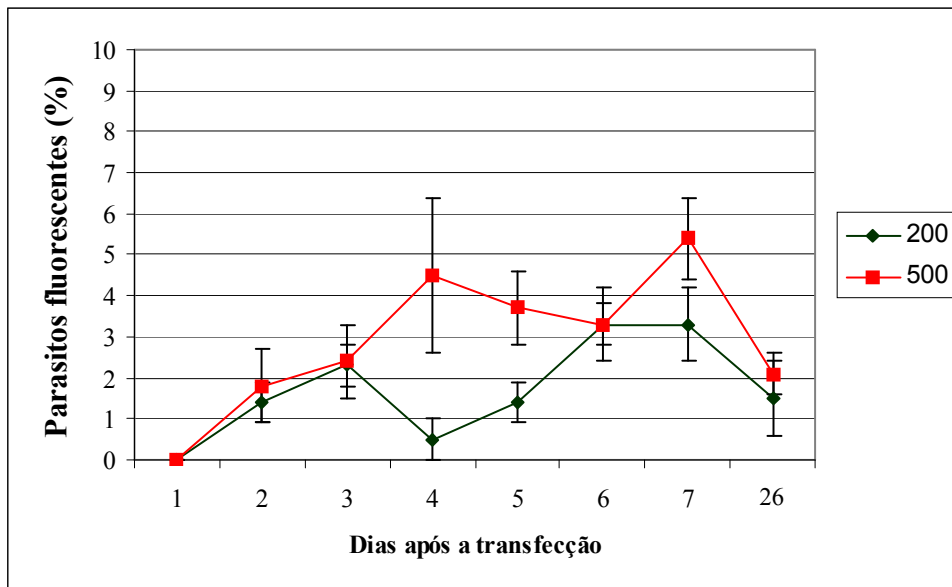


Figura 8: Expressão de GFP no clone CL Brener de *T. cruzi* dirigida pelo vetor pTREXGFP. Foram utilizados 200µg do plasmídeo e os parasitos eletroporados com um único pulso de 300V e 1000µF. Dois dias após a transfecção foram adicionados 200µg (■) e 500µg/mL (◆) de G418 e o número de parasitos expressando GFP foi contado diariamente até o 7º dia e após a seleção em meio contendo antibiótico (26º dia) em microscopia de fluorescência.

processamento do mRNA do gene repórter por *trans-splicing* e poliadenilação. A sequência HX1 é derivada da região intergênica do gene *Tcp2β* (Vazques e Levin, 1999), que codifica uma proteína ribossômica (Figura 9A).

A descrição desses vetores, juntamente com protocolos de eletroporação otimizados com base no percentual de parasitos expressando GFP foram publicados na forma de um artigo na revista *Parasitology Research*(anexo 8.1).

4.3. OBTENÇÃO DE LINHAGENS DE VÁRIAS CEPAS E CLONES DE *T. cruzi* TRANSFECTADAS DE MANEIRA ESTÁVEL COM OS VETORES pROCKGFPNEO E pROCKRFPNEO

Utilizando os protocolos de eletroporação previamente otimizados no laboratório (DaRocha e cols., 2004a), as cepas monoclonais Tulahuén e JG e os clones Col1.7G2 e CL Brener foram transfectados com os vetores pROCKGFPNeo e pROCKRFPNeo

Os parasitos foram transfectados na presença de 50 µg (em 50µL de água) do vetor pROCKGFPNeo ou pROCKRFPNeo previamente linearizados com a enzima *Not* I. No controle da transfecção os parasitos foram eletroporados na presença de 50µL de água estéril. Vinte e quatro horas após a eletroporação foram adicionados 200 µg/mL de G418 e 3 ou 4 semanas depois foi observada a morte dos parasitos controles, indicativo da seleção dos parasitos que receberam os vetores.

As populações de parasitos transfectados e resistentes ao G418 apresentaram intensas fluorescências verde e vermelha, quando examinadas em microscópio de fluorescência. Tanto a mobilidade quanto a morfologia normal dos parasitos foram mantidas (figura 10A-H), indicando que o processo de transfecção e o evento de recombinação com o loco de β-tubulina não alteraram as características morfológicas das células. Foram realizados três experimentos independentes de transfecção para as populações Tulahuén, JG e clone Col1.7G2 e um para o clone CL Brener.

As porcentagens de parasitos GFP positivos das populações Col.1.7.G2, JG e Tulahuén, transfectadas com o vetor pROCKGFPNeo, foram de aproximadamente 11%, 22% e 17% respectivamente no primeiro experimento, 26%, 12% e 28% no segundo experimento e 35%, 26,5% e 36%, no terceiro experimento. Para o vetor pROCKRFPNeo as populações Col.1.7G2, JG e Tulahuén apresentaram uma eficiência de expressão de 0.8%, 14% e 25% respectivamente, no primeiro experimento, de 3%,

A)

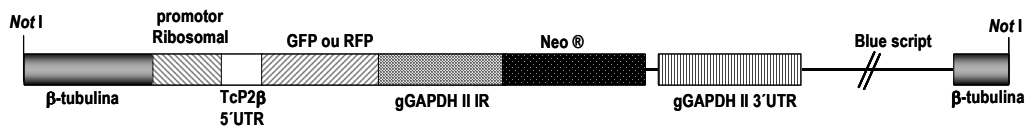


Figura 9A: A) Representação esquemática do pROCKGFP/RFPNeo, um vetor integrativo no loco de β -tubulina para a expressão estável de GFP e RFP em *T. cruzi*, baseado em DaRocha e col., 2004. Este vetor possui um promotor ribossomal que aumenta a expressão heteróloga. HX1 corresponde à região intergênica da proteína ribossomal TcP2 β e que permite a processamento do mRNA de GFP/RFP pela adição da seqüência SL. Região intergênica gGAPDH I/II e 3'UTR gGAPDH II que são eficientes sítios aceptores para *trans-splicing* e poliadenilação dos genes exógenos. Estes plasmídeos também contêm o gene que confere resistência a neomicina para a seleção dos transfectantes.

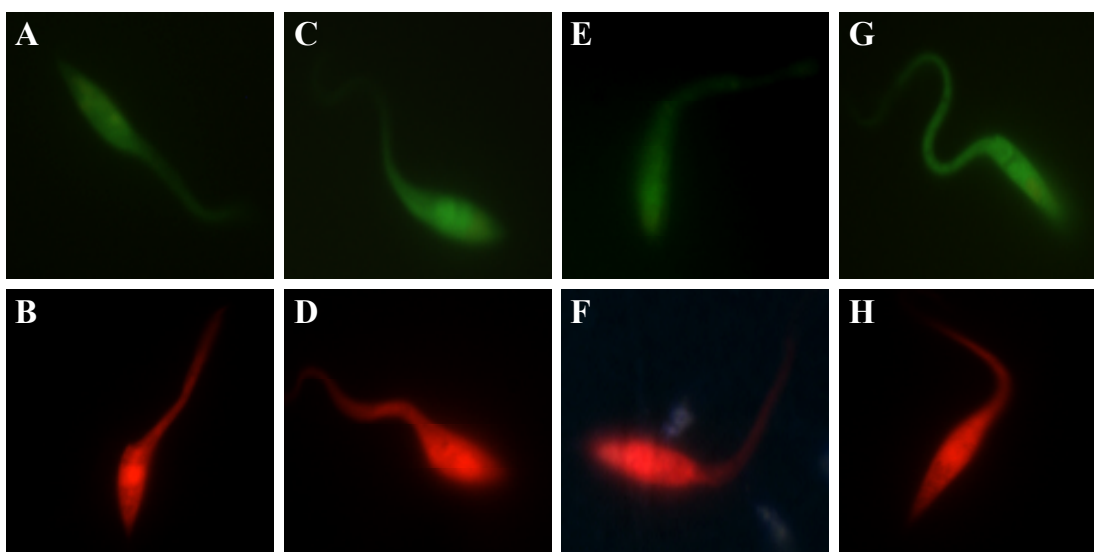


Figura 10A-H: Expressão de GFP e RFP nas formas epimastigotas de *T. cruzi*. A expressão das proteínas verde e vermelha fluorescentes é observada, respectivamente, nas imagens A e B para CL Brener, C e D para Col1.7G2, E e F para a cepa JG e G e H para a cepa Tulahuén. Imagens obtidas em microscópio de fluorescência (Zeiss), utilizando objetiva de 100X, filtros para FITC (parte superior) e rodamina (parte inferior).

9%, 30% e na segunda transfecção e 22%, 12% e 20% na terceira transfecção. Para o clone CL Brener as porcentagens de parasitos GFP e RFP foram 29% e 24% respectivamente. (Figura 11A-B). Estes valores foram obtidos através da contagem manual aleatória de 500 parasitos sob microscopia de fluorescência ou após análise automática no FACScan.

4.4. CLONAGEM DOS PARASITOS GENETICAMENTE MODIFICADOS

Com o objetivo de obter culturas homogêneas dos parasitos fluorescentes foi realizada inicialmente a clonagem dos parasitos geneticamente modificados em placas de 96 poços, por diluição limitante.

Foram obtidos 4 clones das cepas JGRFP (com 63%, 65%, 66% e 88% de parasitos fluorescentes) e TulaRFP (60%, 65%, 70% e 78%), 2 clones da cepa TulaGFP (ambos apresentando 40% de parasitos fluorescentes) e 3 clones para ColGFP (com 32%, 33% e 35% de parasitos fluorescentes). Não foram obtidos clones transfectados da cepa JG expressando GFP, do clone ColRFP e do clone CLBrenerRFP. Após o plaqueamento de CL Brener expressando GFP em placas de ágar-sangue foi selecionado um clone com 100% dos parasitos expressando GFP. No entanto, este não foi capaz de manter as porcentagens, retornando a 30% dos parasitos fluorescentes, em aproximadamente 3 meses.

Com a expectativa de que o processo de clonagens sucessivas pudesse gerar culturas com 100% dos parasitos expressando as proteínas fluorescentes, foi realizado um passo adicional de subclonagem dos clones obtidos previamente em placas de ágar-sangue. Para tanto os clones TulaGFP2 e TulaRFP1 obtidos por diluição limitante, com 40% e 70%, respectivamente, de parasitos expressando as proteínas fluorescentes foram plaqueados em placas de ágar-sangue. Após crescimento, foram selecionadas duas colônias contendo 95% e 84% de parasitos expressando GFP e RFP, respectivamente. Estes clones foram novamente submetidos a um terceiro procedimento de clonagem por plaqueamento gerando colônias com 84% e 96% de parasitos GFP e RFP, respectivamente.

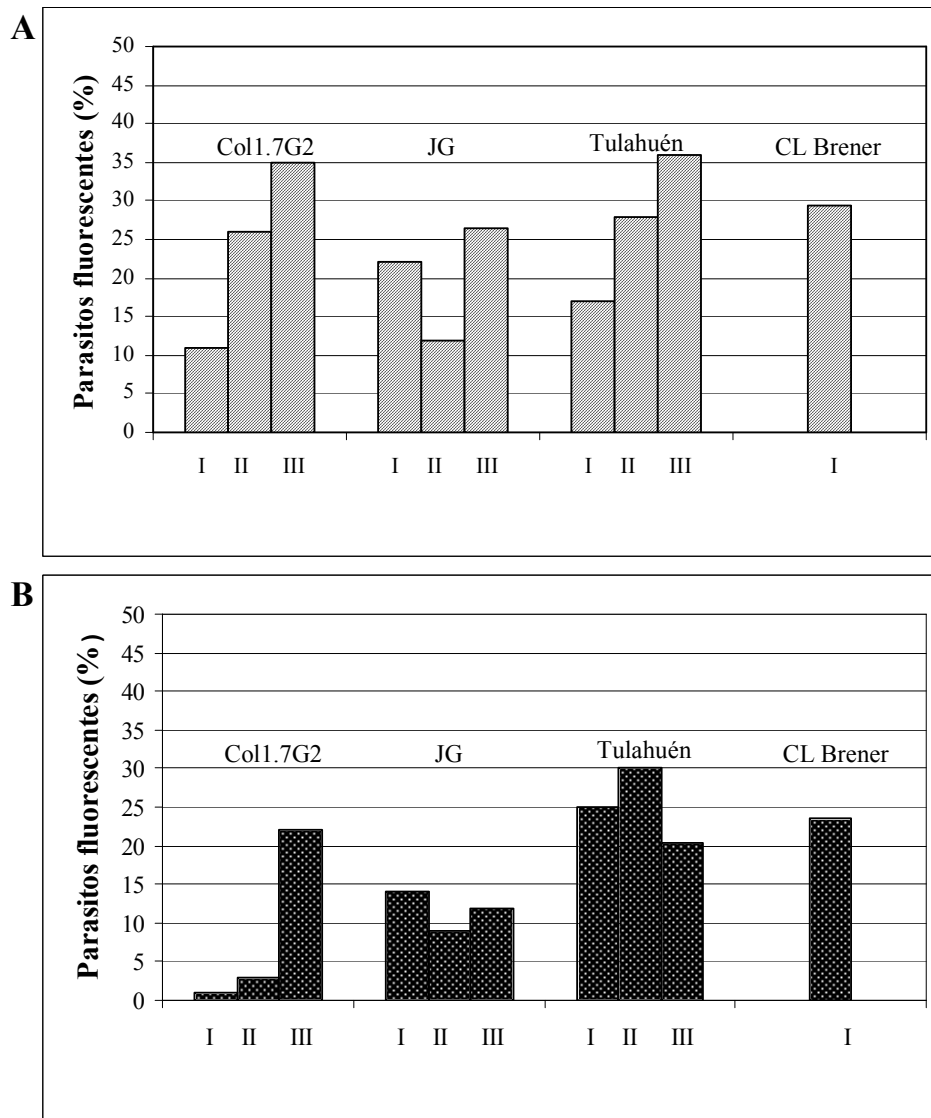


Figura 11A-B: Eficiência do processo de transfecção dos clones Col1.7G2 e CL Brener e das cepas JG e Tulahuén de *T. cruzi* com os vetores de expressão permanente pROCKGFP e pROCKRFP. Após o período de seleção 3 a 4 semanas com 200 μ g/mL de G-418, foram contados o número de parasitos expressando GFP (A) e RFP (B) em um total de 500 células, utilizando microscopia de fluorescência ou aparelho FACScan. Para o clone Col1.7G2 e as cepas JG e Tulahuén foram realizados três experimentos de transfecção (I, II e III) e para o clone CL Brener foi feita uma transfecção (I).

4.5. COMPARAÇÃO DA ESTABILIDADE DA EXPRESSÃO DE GFP E RFP ENTRE OS CLONES E A POPULAÇÃO TRANSFECTADA

As populações de Tulahuén expressando GFP e RFP e os clones TulaGFP1 e 2, TulaRFP 1 e 2 foram cultivadas por 1 e 2 meses, na ausência e na presença de 200 e 400 µg/mL de G418, a fim de comparar a estabilidade da expressão das proteínas fluorescentes entre as populações transfectadas e os clones obtidos por diluição limitante (Figura 12A-F). Foram utilizadas neste estudo as populações de parasitos fluorescentes expressando GFP (Figura 12A) e RFP (Figura 12D) e os clones RFP1 (Figura 12B), RFP2 (Figura 12C), GFP1 (Figura 12E) e GFP2 (Figura 12F), derivados da cepa Tulahuén através de diluição limitante.

Após o cultivo, os parasitos foram fixados e analisados no FACS. A porcentagem de parasitos fluorescentes foi determinada em um total de 10^5 células. Foi observado que nos clones expressando tanto RFP (Figuras 12B e 12C) quanto GFP (Figuras 12E e F), a porcentagem de parasitos fluorescentes se manteve estável ao longo do tempo mesmo na ausência de G418. Enquanto nas populações, a proporção de fluorescentes diminuiu quando cultivadas na ausência do antibiótico, sugerindo que a etapa de clonagem é fundamental para a manutenção da proporção de parasitos fluorescentes na ausência da droga.

Foi também possível observar para os clones expressando GFP e RFP que a porcentagem de parasitos fluorescentes não se alterou com o aumento da concentração de G418 para 400 µg/mL, demonstrando que o nível de expressão das proteínas fluorescentes não pode ser aumentado pelo incremento da concentração de antibiótico.

4.6. AVALIAÇÃO DA INTEGRAÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO PERMANENTE NO GENOMA DO PARASITO.

Para avaliar a integração dos vetores de expressão permanente no genoma dos parasitos foram realizados experimentos de PFGE. Após separação das bandas cromossômicas dos parasitos transfectantes e selvagens, as mesmas foram transferidas para membranas de nylon e em seguida híbridadas com as sondas de GFP, RFP ou β-tubulina. A Figura 13 mostra os resultados encontrados para cada população ou clones transfectados das cepas JG, Col1.7G2 e Tulahuén. Para a cepa JG foi observada a presença de 2 bandas cromossômicas reveladas com a sonda de GFP na

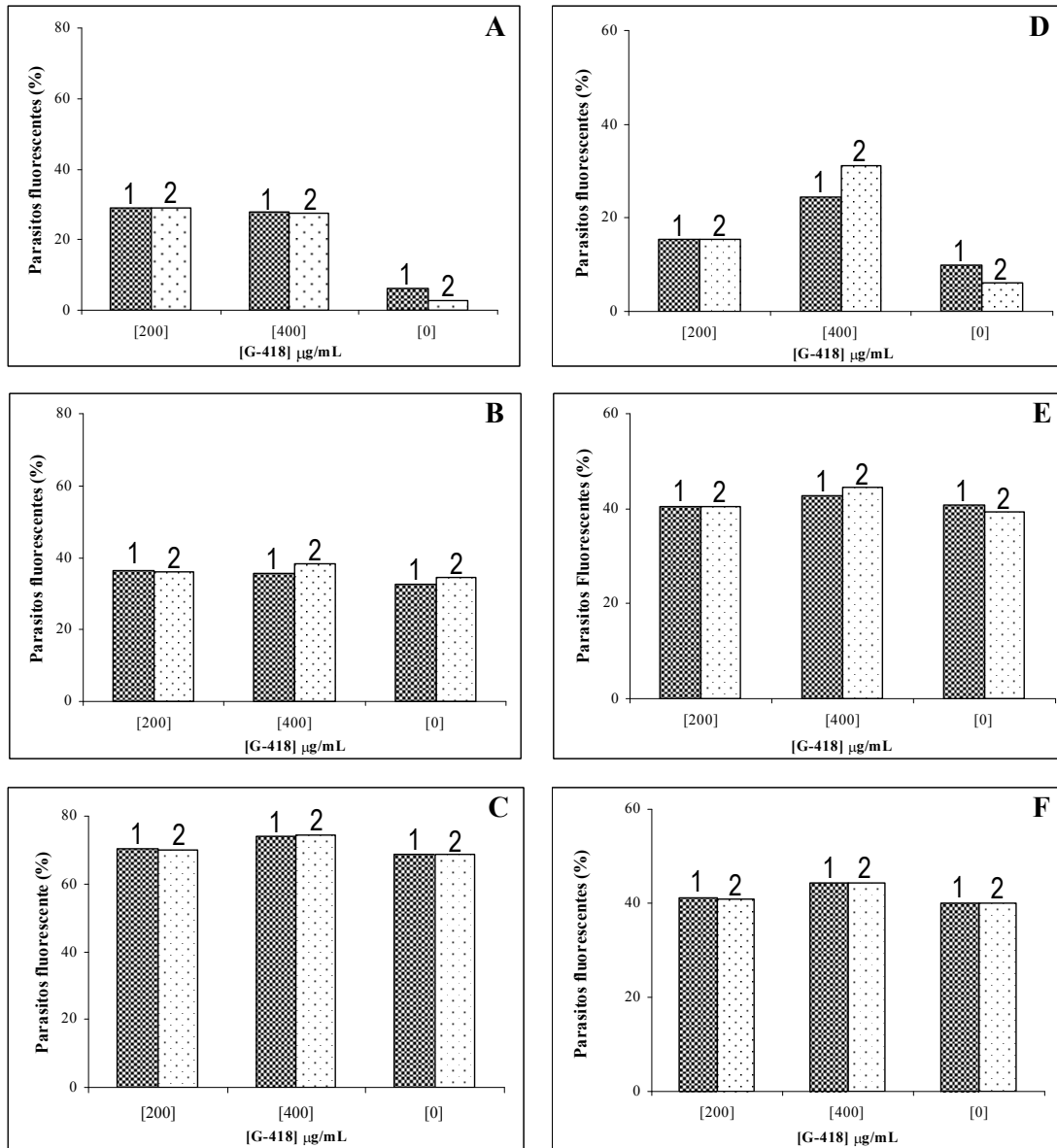


Figura 12A-F: Frequência de epimastigotas da cepa Tulahuén expressando GFP ou RFP. Os parasitos foram transfectados com pROCKRFPNeo (A, B e C) ou pROCKGFPNeo (D, E e F) e selecionados em meio contendo G418. A população transfectada (A e D), bem como, os clones obtidos por diluição seriada (B, C, E e F) foram cultivadas com a droga nas concentrações de 0, 200 ou 400 µg/mL por 1 ou 2 meses, barras escuras e claras, respectivamente.

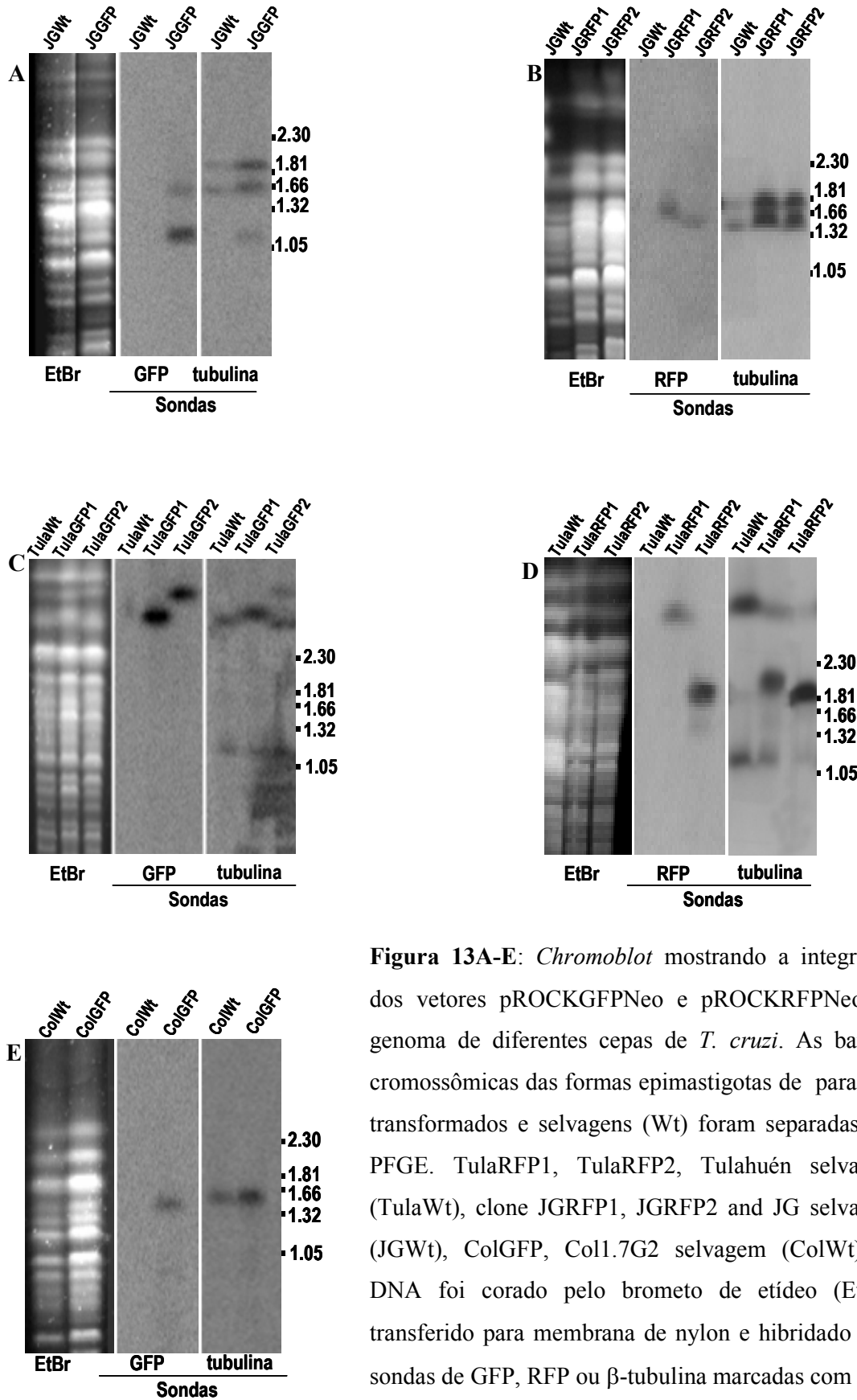


Figura 13A-E: *Chromoblot* mostrando a integração dos vetores pROCKGFPNeo e pROCKRFPNeo no genoma de diferentes cepas de *T. cruzi*. As bandas cromossômicas das formas epimastigotas de parasitos transformados e selvagens (Wt) foram separadas por PFGE. TulaRFP1, TulaRFP2, TulaWt selvaagem (TulaWt), clone JGRFP1, JGRFP2 and JG selvaagem (JGWt), ColGFP, Col1.7G2 selvaagem (ColWt). O DNA foi corado pelo brometo de etídeo (EtBr), transferido para membrana de nylon e hibridado com sondas de GFP, RFP ou β -tubulina marcadas com P³².

canaleta contendo DNA da população transfectada (JGGFP) e nenhuma banda na população não transfectada (JGWt) (Figura 13A). Com a sonda de β -tubulina foi detectada a presença desse gene em 2 bandas cromossômicas no parasito selvagem (JGWt) e em 3 bandas na cepa transfectada (JGGFP). Pode-se observar a correspondência da banda revelada pela sonda de GFP próxima à altura de 1,66 Mb no parasito JGGFP, com a banda cromossômica reconhecida pela sonda de β -tubulina, indicando a integração do vetor pROCKGFPNeo neste loco. A terceira banda revelada pela hibridação com β -tubulina na canaleta contendo DNA de JGGFP entre os padrões de 1,05 e 1,32 Mb, também apresenta correspondência com uma banda cromossômica contendo GFP, porém o parasito selvagem (JGWt) não mostrou a presença dessa terceira banda cromossômica contendo o gene de β -tubulina. Nos clones JGRFP1 e JGRFP2 foi identificada a presença de uma banda reconhecida pela sonda de RFP, sendo as mesmas correspondentes àquelas reconhecidas pela sonda de β -tubulina (Figura 13B).

Para a cepa Tuluahuén, foi detectada a hibridação da sonda de GFP, nos dois clones analisados, porém com duas bandas cromossômicas diferentes (Figura 13C). Para o clone TulaGFP1 observou-se a hibridação da sonda de β -tubulina correspondente a uma única banda cromossomal também revelada pela sonda de GFP. Todavia, no clone TulaGFP2 foi detectada a presença de duas bandas híbridadas com a sonda de β -tubulina, indicando que os genes de α e β -tubulina possam estar arrançados em mais de um cromossomo no genoma deste parasito ou em cromossomos homólogos com tamanhos diferentes. Alternativamente, não é possível descartar a hipótese de que o cassete contendo GFP e cópia do gene de β -tubulina tenham sido integrados em um outro cromossomo, como por exemplo, no loco de GAPDH ou de rDNA, uma vez que partes destes genes também estão presentes nos vetores pROCKGFP/RFPNeo. Esta última possibilidade é reforçada pelo fato de terem sido encontradas 3 bandas cromossômicas de tamanhos distintos hibridando com a sonda de β -tubulina na cepa JGGFP, mas apenas 2 delas na cepa JGWt (Figura 13A). Neste caso a banda adicional conteria a cópia do gene de β -tubulina presente no vetor e integrada juntamente com GFP. Resultados similares foram observados para Tuluahuén transfectada com RFP (Figura 13D). Utilizando-se a sonda de β -tubulina, observa-se na canaleta correspondente ao parasito selvagem (TulaWt), além das duas bandas já observadas para TulaWt na Figura 13C, uma banda adicional de menor intensidade na altura do

padrão de 1,66 Mb. Esse achado pode ser devido ao fato de que o *chromoblot* da figura 13D apresentou uma maior quantidade de DNA para TulaWt do que no experimento da Figura 13C. Utilizando a sonda de RFP foi possível identificar em cada um dos clones TulaRFP1 e TulaRFP2 a presença de uma única banda reconhecida por essa sonda em diferentes posições. Observa-se também que as bandas reconhecidas por RFP estão em posições correspondentes às aquelas reconhecidas por β -tubulina. Também nota-se que nos dois clones analisados a banda intermediária de β -tubulina apresentou sinal mais forte que no parasito selvagem (TulaWt), reforçando a hipótese de policlonalidade para a cepa Tulahuén.

Para Col.1.7G2 (Figura 13E) foi observada a presença de GFP em apenas uma banda cromossômica, nos parasitos transfectados (ColGFP), sendo a mesma ausente no parasito selvagem (ColWt). Com a sonda de β -tubulina, identificou-se também uma banda tanto na canaleta referente ao parasito selvagem (ColWt) quanto no transfectado (ColGFP). Foi observado ainda, que as bandas híbridadas com GFP e β -tubulina estão em posições correspondentes. Esses dados são indicativos de que houve integração do plasmídeo no genoma desse parasito no loco de β -tubulina.

4.7. PRODUÇÃO DE mRNA DIRIGIDA PELOS VETORES DE EXPRESSÃO PERMANENTE.

Para avaliar se os mRNAs de GFP, RFP e Neomicina fosfotransferase nos parasitos transfectados apresentam correta transcrição e processamento foram realizados experimentos de *Northern blot*. Após separação do RNA total dos parasitos transfectantes e selvagens, os mesmos foram transferidas para membranas de nylon e em seguida híbridadas com as sondas de GFP, RFP ou Neomicina. Através da análise de *Northern blot* dos parasitos transfectados foi possível observar o correto processamento dos genes exógenos dirigida pelos vetores pROCKGFPNeo e pROCKRFPNeo. Nos parasitos expressando GFP (TulaGFP2) foi possível observar o reconhecimento da sonda deste gene pelo transcrito de aproximadamente 1,4 Kb referente ao mRNA de GFP (Figura 14A). Nos parasitos expressando RFP foi identificada a hibridação da sonda desse gene por um transcrito esperado de aproximadamente 1,3 Kb (Figura 14B). Em ambos os transformantes, utilizando a sonda de neomicina (neo), observa-se a presença de um transcrito de cerca de 1,5 Kb, referente ao mRNA desse gene (Figura 14 A-B). Em nenhum dos casos foi identificado

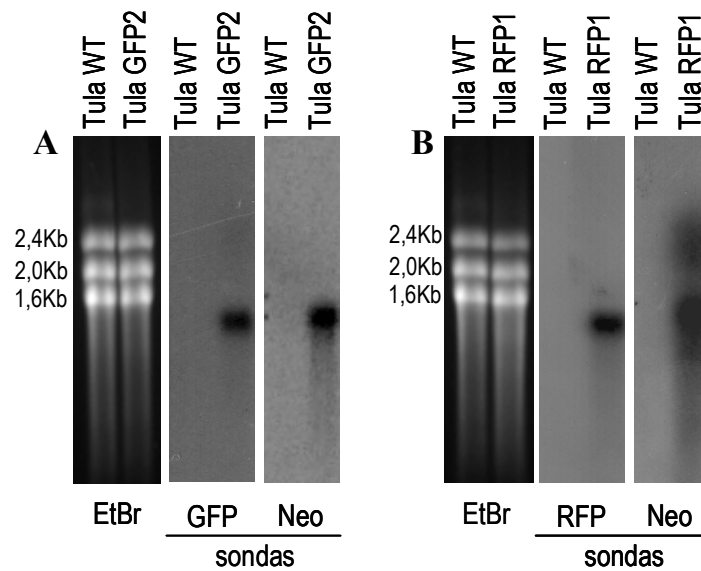


Figura 14A-B: *Northern Blot* mostrando a presença de mRNA dos gene de GFP, RFP e Neomicina nos parasitos transfectados com os vetores pROCKGFPNeo e pROCKRFPNeo. Os RNAs extraídos das formas epimastigotas de parasitos transformados e selvagens (Wt) foram separadas em gel agarose desnaturante. Em A, Tuluhuén selvagem (TulaWt), TulaGFP2clone. Em B, TulaWt e TulaRFP1. O RNA foi corado pelo brometo de etídeo (EtBr), transferido para membrana de nylon e hibridado com sondas de GFP, RFP ou neomicina marcadas com P³².

mRNA de GFP, RFP e Neo nos parasitos selvagens (TulaWt).

4.8. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS FLUORESCENTES NAS OUTRAS FORMAS DO CICLO DE VIDA DO PARASITO.

Para a avaliação da expressão das proteínas fluorescentes nas formas amastigotas e tripomastigotas, foram utilizadas placas de seis poços contendo lamínula estéril. Cerca de 1×10^5 células Vero foram infectadas com aproximadamente 1×10^6 tripomastigotas de parasitos transfectados. Seis dias após a infecção, os núcleos das células Vero e dos parasitos foram coradas pelo DAPI. Estas amostras foram examinadas em microscópio confocal e observou-se que os parasitos transfectados foram capazes de infectar cultura de células e de manter a fluorescência após este período na ausência de G418.

Nos painéis 15A-C, 15D-F e 15G-L são mostradas a expressão de GFP para as populações JG, Col1.7G2 e Tulahuén, respectivamente. Nos painéis 15J-L observam-se a expressão de RFP nas formas intracelulares da cepa Tulahuén. Nota-se também nos ninhos de amastigotas, que algumas delas não exibem fluorescência, uma vez que as populações transfectadas ou até mesmo os clones obtidos, não apresentam 100% dos parasitos fluorescentes. As proporções de tripomastigotas e amastigotas fluorescentes foram mantidas nos clones, enquanto nas populações transfectadas, observou-se uma diminuição no número de parasitos fluorescentes após infecção de células Vero. Observa-se também em uma mesma cultura, a expressão variável de GFP e RFP entre os parasitos, alguns exibem alta fluorescência enquanto outros mostram uma baixa expressão das proteínas exógenas. Após um período de aproximadamente 6 meses de cultivo dessas populações transfectantes em células Vero, na ausência de G418, observa-se que os parasitos continuam expressando GFP e RFP de maneira estável (Figura 10).

4.9. AVALIAÇÃO DA INFECTIVIDADE DOS PARASITOS TRANSFECTADOS EM CULTURA DE CÉLULAS.

Para a avaliação da infectividade dos parasitos transfectados em relação aos selvagens foram utilizadas placas de seis poços contendo lamínula estéril. Cerca de 1×10^5 células Vero foram infectadas com aproximadamente 1×10^6 tripomastigotas de parasitos transfectados ou não transfectados. Seis dias após a infecção, as células Vero

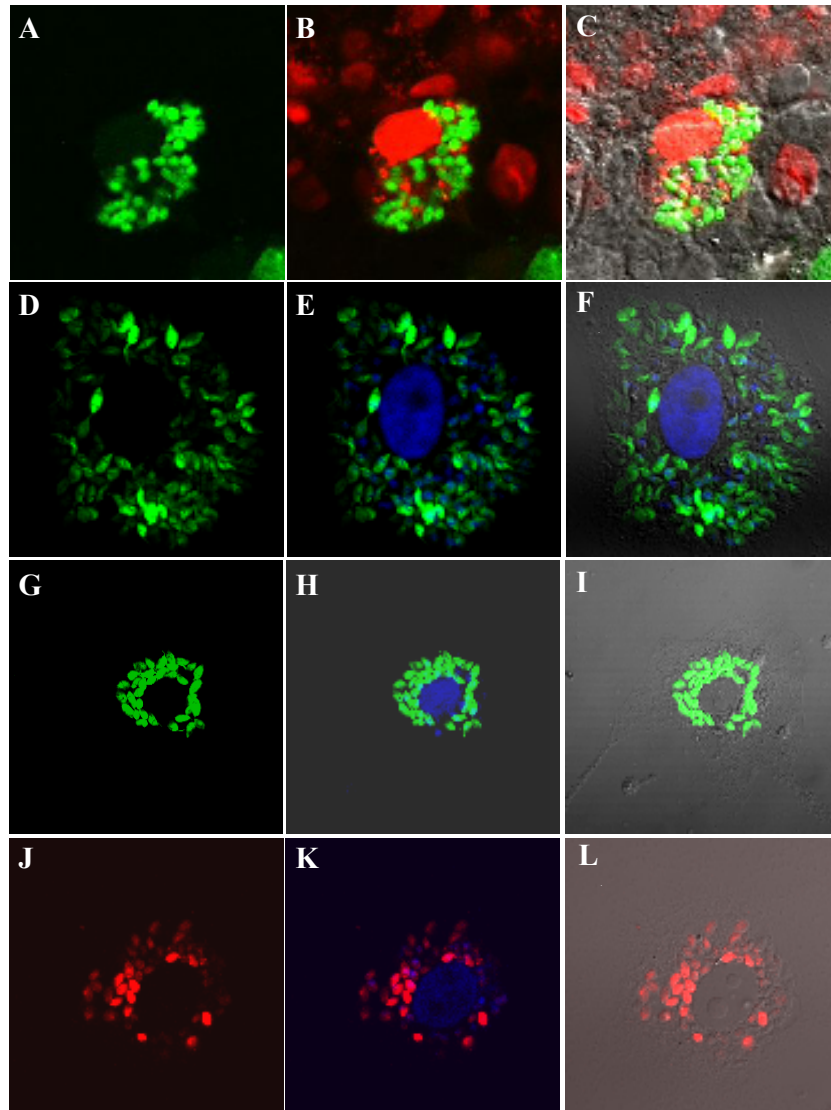


Figura 15A-I: Avaliação da expressão de GFP e RFP na forma intracelular *T. cruzi* através de microscopia confocal. Células Vero foram infectadas com tripomastigotas das cepas JGGFP(A-C), ColGFP (D-F), TulaGFP2 (G-I) e TulaRFP1 (J-L). Em A, D, G e J) imagens dos ninhos de amastigotas expressando as proteínas fluorescentes, B) os núcleos da célula hospedeira e das amastigotas corados pelo iodeto de propídeo e pelo DAPI (E, H e K). Em C, F, I e L a sobreposição das imagens dos parasitos fluorescentes com a imagem em contraste de fase mostrando o ninho de amastigotas. As imagens A-C foram obtidas com objetiva de 63x e as demais imagens com objetivas de 40x em microscópio confocal Zeiss LSM 510.

aderidas às lamínulas e infectadas com essas culturas foram coradas pelos corantes Giemsa e *May Grunwald*. Foram realizadas contagens do número de ninhos e número de amastigotas presentes em 100 células Vero em três experimentos independentes, cada um em triplicata.

Conforme ilustrado na figura 16, não foram encontradas diferenças significativas na infectividade de células em cultura entre os parasitos selvagens e transfectados das diferentes linhagens estudadas (Col1.7G2, JG e Tulahuén). Também não se observou diferença em relação ao número de células infectadas, nem em relação ao número de amastigotas por célula, indicando que o processo de transfecção e recombinação homóloga não comprometeram a etapa de infecção do parasito em cultura de células.

4.10. INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS COM OS PARASITOS EXPRESSANDO GFP E RFP

Para a avaliação da capacidade infectiva de *T. cruzi* expressando GFP e RFP camundongos BALB/c jovens foram infectados com tripomastigotas modificados geneticamente oriundos de cultura de células Vero. Aqueles animais nos quais foram encontrados tripomastigotas fluorescentes no sangue, foram sacrificados e tiveram coração, diafragma, reto, esôfago e músculo esquelético coletados. Os órgãos foram lavados em PBS e congelados em Tissue-Tek O.C.T (*Optical Coherence Tomography* - Miles, Inc., Elkhart, Ind.) e foram feitos cortes no aparelho criostato.

As populações JGGFP, JGRFP, ColGFP, TulaGFP2, TulaRFP1 e CL BrenerGFP e CL BrenerRFP utilizados nos experimentos de infecção em camundongos BALB/c jovens foram capazes de estabelecer infecção nos animais. Na Tabela 1 foram colocadas as porcentagens de parasitos fluorescentes observados após infecção de células e animais. Foram observados tripomastigotas sanguíneos fluorescentes das populações ColGFP, CL BrenerGFP e CL Brener RFP, entre o 10 e 14 dias após a infecção. Nos camundongos infectados, foi verificada a porcentagem de tripomastigotas fluorescentes através da contagem aleatória de 100 parasitos encontrados no sangue dos animais (Tabela 1 - tripomastigotas sanguíneos). Para ColGFP foram observados cerca de 8% de tripomastigotas fluorescentes, com CL Brener GFP 10% e CL Brener RFP menos que 1%. Foram encontrados diversos ninhos de amastigotas corados pelo DAPI nos tecidos dos animais infectados com CL Brener GFP. Porém, os ninhos não

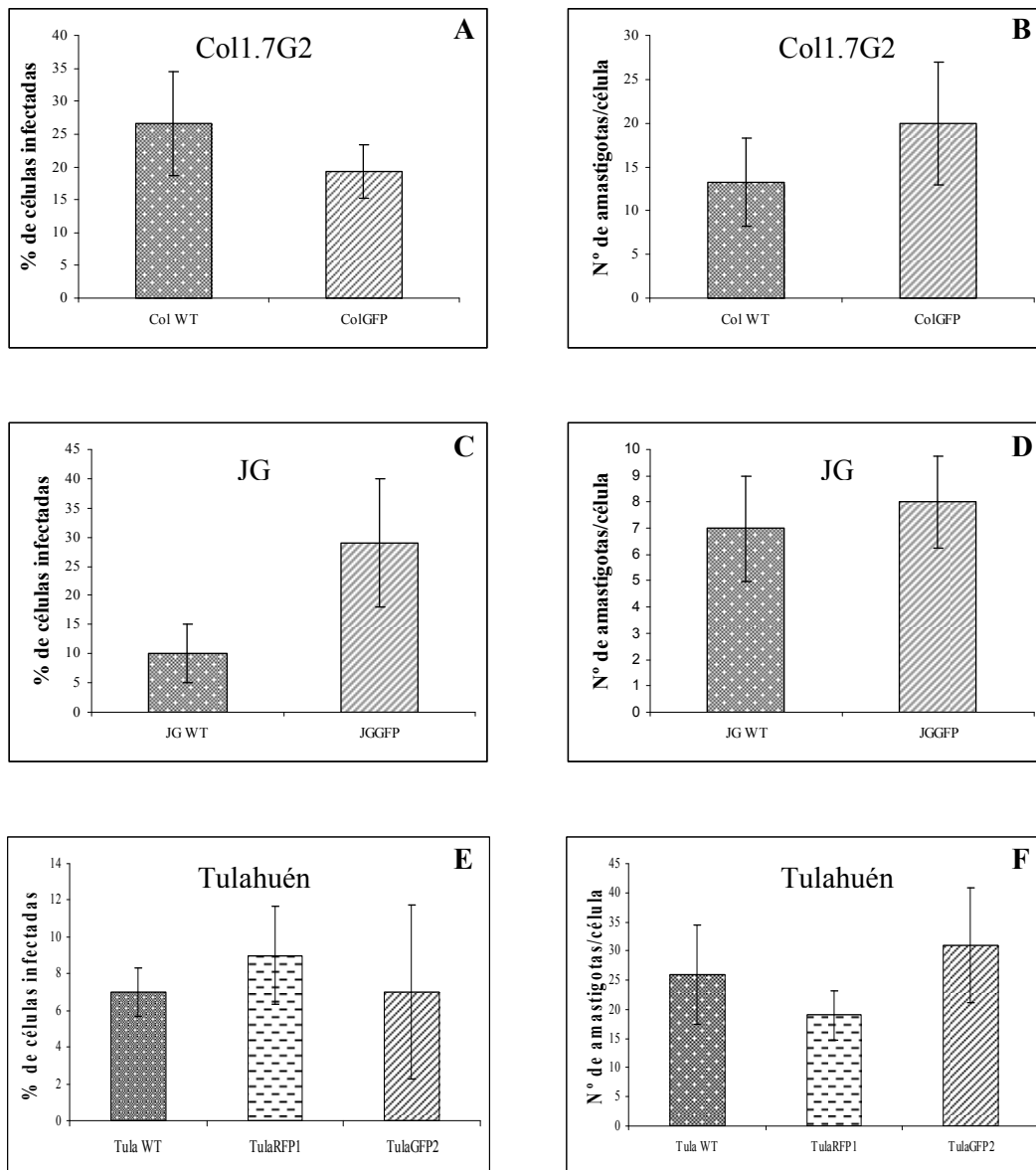


Figura 16A-F: Avaliação da infectividade entre parasitos selvagens e fluorescentes das linhagens Col1.7G2, JG e Tulahuén de *T. cruzi*. Aproximadamente 10^5 células Vero foram infectadas com 10^6 tripomastigotas selvagens (WT) ou transfectados (ColGFP, JGGFP, TulaRFP1 e TulaGFP2). Foram realizados 3 experimentos independentes, no qual determinaram-se a porcentagem de células infectadas e o número de amastigotas por célula para Col1.7G2 (A e D), JG (B e E) e Tulahuén (C e F), após coloração das células com Giemsa.

apresentaram fluorescência. Isso pode ser devido à baixa proporção de parasitos fluorescentes presentes nas amostras inoculadas. Ademais, para aqueles parasitos transfectados, capazes de estabelecer infecção, uma vez que foram observados tripomastigotas no sangue dos animais infectados, mas que, porém, não exibiam fluorescência, foram feitas hemoculturas do sangue dos animais (Tabela 1 – epimastigotas hemocultura). Assim, os parasitos fluorescentes resistentes ao G418 foram recuperados (Tabela 1).

Camundongos GKO – *knockout* para o gene de Interferon- gama, foram também utilizados para experimentos de infecção por serem uma linhagem mais susceptível à infecção pelo *T. cruzi*. Os animais foram inoculados com tripomastigotas do clone TulaGFP1 ou TulaWt. Doze dias após a infecção, foram observados parasitos fluorescentes no sangue dos camundongos (Figura 17A-B). De fato a intensa fluorescência exibida pelos parasitos facilitou sua identificação no sangue dos animais, comparados com animais infectados com parasitos não fluorescentes (dados não mostrados). Foram também analisados outros tecidos corados pelo DAPI e HE. Enquanto as amastigotas fluorescentes foram identificadas no coração (Figuras 17C-D) e diafragma (dados não mostrados), não foi possível identificar parasitos nos focos inflamatórios dos animais infectados com parasitos selvagens (dados não mostrados). É sabido que a cepa Tulahuén apresenta baixa parasitemia e parasitismo tissular, entretanto, o uso dos parasitos fluorescentes claramente permitiu a identificação direta dos mesmos, através de análises de microscopia de fluorescência, sem a necessidade de passos adicionais.

4.11. INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA NA FALHA DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS FLUORESCENTES

A fim de investigar os possíveis mecanismos envolvidos na ausência da expressão das proteínas fluorescentes foi avaliada uma população de JGGFP que deixou de expressar a proteína. A população de JGGFP foi utilizada em infecção de camundongos BALB/c e a hemocultura realizada de animais infectados com a mesma apresentou cerca 13% de parasitos fluorescentes e resistentes ao G418. No entanto, ao longo das passagens em meio LIT (cerca de 2 meses) mesmo suplementado com antibiótico, os parasitos fluorescentes não foram mais observados. A fim de verificar se os parasitos resistentes a G418 haviam perdido o gene de GFP, foi realizada PCR com

Tabela 1: Proporção de parasitos fluorescentes observados após infecções de células Vero e camundongos BALB/c.

linhagem	parasitemia	% Parasitos Fluorescentes			
		epimastigotas (LIT)	tripomastigotas (Vero)	tripomastigotas (sanguíneo)	epimastigotas (hemocultura)
CoIGFP*	+++	22	13	8	ND
JGGFP*	++	28	15	0	13
JGRFP1	++	66	64	0	69
TulaGFP2	+	40	38	0	39
TulaRFP1	+	70	67	0	ND
CLBrenerGFP*	+++	30	25	10	ND
CLBrenerRFP*	+++	23	10	<1	ND

LIT – parasitos transfectados/clonados cultivados em meio LIT

Vero – parasitos derivados de cultura de células Vero

Sanguíneo – parasitos encontrados no sangue de animais infectados

Hemocultura – parasitos derivados do sangue de animais infectados que foram cultivados em meio LIT

ND: não determinado

*: população não clonada

Parasitemia: +++ alta, ++ média, + baixa

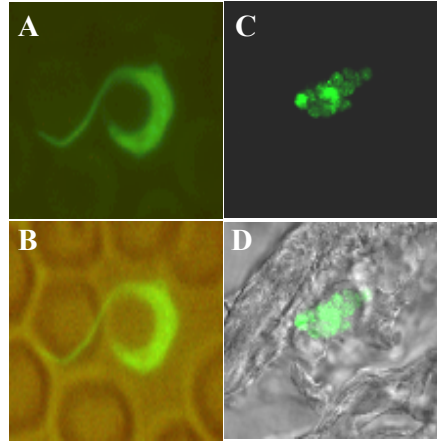


Figura 17A-D: Infecção de camundongos GKO (interferon- γ knockout) com tripomastigotas fluorescentes do clone TulaGFP1 derivados de culturas de células Vero. Em (A) imagem de tripomastigotas sanguíneos expressando GFP. A imagem foi obtida em microscópio de fluorescência Zeiss, com objetiva de 100x, utilizando filtro para FITC e sobreposta com imagem em luz transmitida (B). As imagens (C) e (D) foram obtidas em microscópio confocal Zeiss LSM 510 *laser scanning confocal* de cortes do coração do animal infectado, utilizando objetiva de 63x. (C) corresponde a amastigotas verdes fluorescentes, utilizando filtro para FITC. Em (D) uma sobreposição do ninho verde fluorescente com imagem de contraste de fase do tecido cardíaco

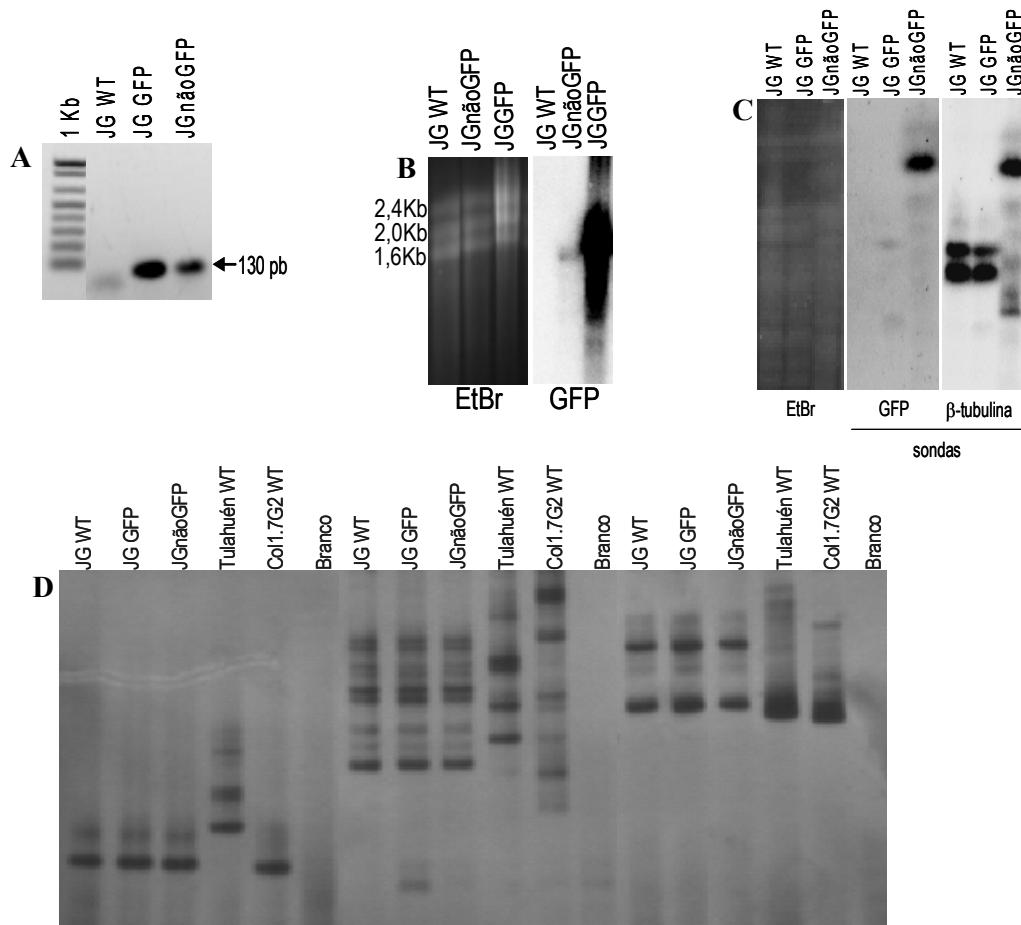


Figura 18A-D: Avaliação dos mecanismos envolvidos na ausência da expressão das proteínas fluorescentes. A) PCR utilizando iniciadores específicos para o gene de GFP para as amostras de DNA dos parasitos selvagens (JGWT), transfectados e com expressão de GFP (JGGFP) e sem expressão de GFP (JGnãogFP) após corrida em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo. B) *Northern blot* utilizando como a sonda o gene de GFP. Os RNAs extraídos das formas epimastigotas de parasitos selvagem (JGWT), dos parasitos sem expressão de GFP (JGnãogFP) e de parasitos com expressão de GFP (JGGFP) foram separados em gel agarose desnaturante. O RNA foi corado pelo brometo de etídeo (EtBr), transferido para membrana de nylon e hibridado com a sondas de GFP marcada com ^{32}P . C) *Chromoblot* utilizando as sondas de GFP e β -tubulina. As bandas cromossômicas das formas epimastigotas de parasitos selvagens (JGWT), de parasitos com expressão de GFP (JGGFP) e parasitos sem expressão de GFP (JGnãogFP) foram separadas por PFGE. O DNA foi corado pelo brometo de etídeo (EtBr), transferido para membrana de nylon e hibridado com sondas de GFP e β -tubulina marcadas com ^{32}P . D) PCR utilizando iniciadores específicos para os locos de microsatélite TcTAC15, TcTAT20 e SCLE10 para as amostras de DNA dos parasitos selvagens (JG Wt, Tulahuén Wt e Col1.7G2 Wt) e para os parasitos transfectados (JGGFP e JGnãogFP).

iniciadores específicos para este gene, na qual se pôde identificar a presença de um produto de tamanho esperado com aproximadamente 140 pb (Figura 18A). Ademais, o RNA destes parasitos foi extraído e utilizado em experimento de *northern blot* com a sonda do gene da proteína verde fluorescente (Figura 18B). Na canaleta referente ao parasito que apresenta expressão de GFP (JGGFP), com aproximadamente 25% de células verde fluorescentes, foi identificada a presença de um transcrito de tamanho esperado para este gene, com aproximadamente 1,4 Kb e com forte intensidade. Para o parasito transformado com o vetor pROCKGFPNeo, porém sem a expressão de GFP, observa-se a presença do mesmo transcrito, porém em pequena quantidade (Figura 18B). No *chromoblot* da Figura 18C, observam-se nas canaletas contendo as bandas cromossômicas dos parasitos selvagem (JG^{Wt}) e expressando GFP (JGGFP) híbridadas com a sonda de β -tubulina o padrão originalmente observado na figura (13A-B). Porém no parasito que perdeu a expressão de GFP, um padrão totalmente diferente daquele anteriormente descrito e observado. Pode-se notar também, a correspondência da banda contendo o gene GFP e a banda de β -tubulina, indicativo de que no parasito obtido da hemocultura de animais infectados com a linhagem JGGFP, parece ter havido recombinação deslocando o gene de GFP para outra banda cromossômica. Para verificar se houve contaminação desta cultura com algumas das outras linhagens mantidas no laboratório, foram realizadas amplificações por PCR para Três locos de microssatélites (TcTAC15, TcTAT20 e SCLE10) utilizando o DNA obtido dessa mesma cultura. Os resultados obtidos mostraram que na amostra de DNA analisada foram encontrados somente os perfis característicos da cepa JG, descartando, então, a possibilidade de contaminação (Figura 18D).

4.12. CO-INFECCÃO DE CÉLULAS VERO COM DOIS PARASITOS EXPRESSANDO PROTEÍNAS FLUORESCENTES DIFERENTES.

Uma questão que continua em aberto na biologia do *T. cruzi* é a possibilidade de diferentes parasitos co-infectarem uma mesma célula hospedeira e se ambos são capazes de se replicarem no citoplasma da célula. Assim, tendo em mãos a ferramenta desenvolvida neste trabalho foi investigada a possibilidade de co-infecção utilizando os parasitos expressando duas proteínas fluorescentes diferentes.

Células Vero foram co-infectadas com TulaRFP2 e TulaGFP1 ou com ColGFP e TulaRFP2. Seis dias depois as células foram fixadas e coradas pelo DAPI e analisadas

em microscopia confocal. Foi observada uma mesma célula infectada simultaneamente com os dois clones expressando as diferentes marcas (Figura 19A-F). Células também foram co-infectadas com duas diferentes populações, pertencente a diferentes linhagens de *T. cruzi*: Col1.7G2 (*T. cruzi* I) expressando GFP (ColGFP) e Tulahuén (*T. cruzi* II) expressando RFP (TulaRFP2) (Figura 19G-L). A detecção de parasitos de duas linhagens distintas dentro da mesma célula é um evento raro (menos que 1% das células infectadas), mas que pôde ser claramente demonstrado através da utilização de parasitos fluorescentes. É mostrado também nas imagens de 19D-F e 19J-L parasitos em processo de diferenciação, onde são visualizados tripomastigotas fluorescentes em ambas as linhagens utilizadas. Em nenhum dos experimentos de co-infecção foram identificados parasitos com fluorescência amarela.

Os resultados de transfecção das diferentes cepas com os vetores pROCKGFPNeo e pROCKRFPNeo, a obtenção e análises da estabilidade dos clones expressando GFP e RFP, as infecções de camundongos e co-infecção de culturas de células Vero foram reunidos e publicados na forma de um artigo na revista *International Journal for Parasitology* (anexo 8.2)

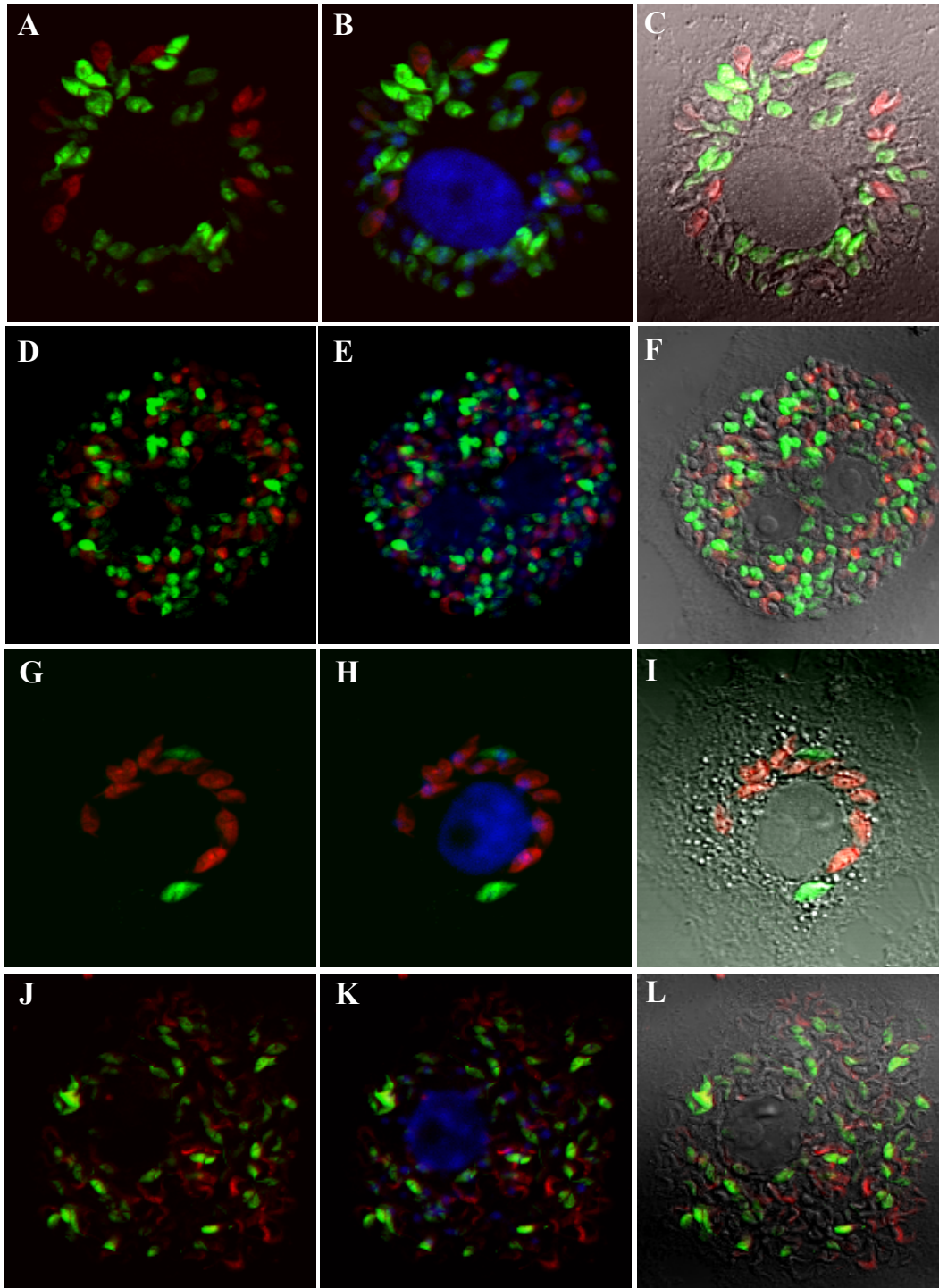


Figura 19A-H: Avaliação da expressão de GFP e RFP em células Vero co-infectadas com TulaGFP1 e TulaRFP2 (A-F) e com ColGFP e TulaRFP2 (G-L), através de microscópio confocal Zeiss LSM 510 *laser scanning confocal*, utilizando objetiva de 40x e zoom de 2x. Em A, D, G e J imagem do ninho de amastigotas expressando GFP e RFP, B, E, H e K sobreposição das amastigotas fluorescentes com os núcleos celular e dos parasitos corados pelo DAPI, em C, F, I e L sobreposição das imagens contendo as amastigotas fluorescentes intracelulares com a imagem da célula hospedeira em contraste de fase.



5. Discussão

Desde a descoberta da doença de Chagas, em 1909, por Carlos Chagas, grandes avanços quanto ao desenvolvimento de técnicas de diagnóstico e caracterização biológica, bioquímica e molecular do parasito *Trypanosoma cruzi* têm sido alcançados. Duas metodologias principais vêm sendo empregadas para investigar a presença de parasitos nos tecidos infectados. Estes métodos são a PCR e a imunohistoquímica e eles permitem demonstrar, respectivamente, a presença de DNA e antígenos dos parasitos nos tecidos analisados. Entretanto, os mesmos não são adequados para demonstrar se parasitos viáveis estão presentes nos tecidos afetados. Neste contexto se coloca o objetivo central deste trabalho que foi o desenvolvimento de populações de *T. cruzi* expressando proteínas fluorescentes verde e vermelha de forma a permitir a detecção de parasitos de forma direta e adequada para diferentes estudos utilizando modelos experimentais da doença de Chagas.

Vários grupos de pesquisa já mostraram a introdução e expressão de genes exógenos em *T. cruzi*. As construções utilizadas nestas transfecções foram, na maioria das vezes, vetores circulares mantidos de forma episomal no núcleo dos parasitos transfectados. Estas construções formam concatâmetros que são mantidos intracelularmente através da presença de antibiótico no meio de cultura (Kelly e cols., 1992) ou podem integrar no genoma da célula hospedeira via recombinação homóloga com seqüências endógenas presentes nas construções (Guevara e cols., 2005; Lorenzi e cols., 2003; Vazquez e Levin, 1999). Os vetores de expressão em *T. cruzi* apresentam uma seqüência promotora da transcrição e regiões regulatórias que permitem o correto processamento do mRNA por *trans-splicing*, adição da cauda poliA e consequente estabilidade da molécula de mRNA. Geralmente, estas construções também apresentam um gene que confere resistência a uma droga utilizada na seleção dos parasitos transfectados.

Uma vez que o objetivo deste trabalho foi desenvolver diferentes populações de *T. cruzi* expressando duas marcas visuais distintas, inicialmente foram utilizados os vetores pTREXGFP e pTREXRFP já amplamente descritos na literatura (Guevara e cols., 2005; Lorenzi e cols., 2003; Vazquez e Levin, 1999). Ao transfectar parasitos com estes vetores, foram observados parasitos fluorescentes com apenas 12 horas após a transfecção. Entretanto, ao longo do tempo, mesmo na presença de G418 (geneticina), as proporções de parasitos fluorescentes diminuíram até não ser mais observada a presença dos mesmos após 20 dias da transfecção.

De acordo com Vazquez e Levin (1999), o vetor pTREX permite a integração dos genes exógenos no genoma dos parasitos por recombinação homóloga com o gene de rDNA, uma vez que parte da seqüência que contém o promotor está presente no vetor (Martinez-Calvillo e cols, 1997; Vasquez e Levin, 1999; Dos Santos e Buck, 2000; Lozenzi e cols, 2003; Guevara e cols., 2005). Guevara e cols., (2005) descreveram a transfecção da cepa CL Brener de *T. cruzi* utilizando 200 µg do vetor pTREXGFP, em meio LIT sem hemina e soro fetal bovino, no qual foi aplicado um único pulso de 300V e 1000 µF. Este grupo descreveu a obtenção de 100% dos parasitos fluorescentes, sete dias após a transfecção, sob a presença de 500 µg/mL G418. No presente trabalho, foram realizados experimentos utilizando o vetor pTREXGFP, as mesmas condições e cepa utilizadas por Guevara e cols., (2005). Porém a porcentagem de parasitos fluorescentes não ultrapassou 10% e, após a eletroporação, o número de parasitos fluorescentes foi decaindo drasticamente. Da mesma forma, em experimentos anteriores (Da Rocha e cols., 2004a), ao transfectar epimastigotas do clone CL Brener com os vetores pTREXGFP e pTREXRFP, nós observamos menos de 10% dos parasitos expressando as proteínas fluorescentes e esta proporção foi reduzida a menos de 1% ao longo de 17 dias.

Apesar de vários grupos de pesquisa terem mostrando a introdução de genes exógenos em *T. cruzi*, poucos descrevem o uso de vetores lineares integrativos contendo seqüências homólogas a genes endógenos. Além de proteínas fluorescentes, populações de *T. cruzi* expressando um outro marcador, o gene da β-galactosidade, foram geradas pela transfecção de parasitos com o plasmídeo pBS-CL-Neo-01/BC-LacZ-10. Este vetor contém o gene de LacZ flanqueado por seqüências que levam a integração dentro do loco de calmodulina/ubiquitina. A expressão da enzima β-galactosidase possibilitou a detecção do *T. cruzi* em tecidos usando o ensaio histoquímico com x-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo) (Buckner e cols., 1999). Porém este método é mais trabalhoso, sendo necessária a adição de substrato e avaliação da atividade enzimática em condições bem monitoradas como concentração do substrato, temperatura e pH ideais, ou seja, muitas variáveis podem interferir nos resultados obtidos. Acima de tudo, os parasitos transfectados com o gene de Lac-Z só podem ser visualizados após coloração o que impede de observá-los vivos.

Em experimentos similares realizados anteriormente por Teixeira e cols., (1999) a cepa Tulahuén de *T. cruzi* foi transfectada com o gene de GFP, o qual integrou-se no

loco do gene TCR27. Este gene possui uma única cópia no genoma do parasito dificultando a integração do vetor. Por outro lado, como a construção usada possui também fragmentos das regiões 3' e 5' UTR dos genes de amastina foi observado um aumento na expressão da proteína fluorescente nas formas amastigotas do parasito, já que essas seqüências levam a uma maior estabilidade do mRNA na forma amastigota do *T. cruzi* (Teixeira e cols., 1995).

No presente trabalho foram gerados parasitos fluorescentes de fácil detecção visual, a partir de diferentes cepas e clones de *T. cruzi*, usando o vetor pROCKGFP/RFPNeo, o qual contém os genes das proteínas fluorescentes GFP ou RFP. Este plasmídeo permite a integração de genes exógenos via recombinação homóloga com o loco de β -tubulina, um gene multicópia, o que facilita o evento de recombinação. A expressão das proteínas fluorescentes apresentou-se uniforme ao longo do corpo do parasito e permitiu detectar células fluorescentes em todas as fases do ciclo do *T. cruzi*, incluindo amastigotas em cultura de células Vero, tripomastigotas em cultura celular, tripomastigotas sanguíneos e amastigotas em tecidos de animais infectados. Isto se deve, em grande parte, ao fato do vetor pROCKNeo apresentar as regiões intergênica e 3'UTR de gGAPDH, as quais contém os sítios para adição do SL e poliadenição dos mRNAs de GFP e RFP. Estas seqüências permitem um eficiente processamento e estabilidade do transcrito nas três fases do ciclo de vida do parasito, uma vez que gGAPDH é um gene de expressão constitutiva.

Em contraste com os resultados obtidos com o vetor pTREXGFP, quatro ou cinco semanas após a eletroporação das formas epimastigotas com os vetores pROCKGFPNeo ou pROCKRFPNeo foram observadas porcentagens, relativamente mais altas, entre 20 e 30%, de células fluorescentes. No entanto, nenhuma das culturas transfectadas apresentou 100% dos parasitos expressando GFP ou RFP, mesmo sendo cultivadas em meio contendo G418. Após a clonagem das populações transfectadas, foi possível aumentar significativamente as porcentagens de parasitos fluorescentes, mas não em sua totalidade. Ao isolar um clone de CL Brener expressando GFP em placa de ágar-sangue, inicialmente observou-se um grande aumento na porcentagem de parasitos verdes fluorescentes, que passou de 30% (população) para 100% (clone). Esta porcentagem, porém, não foi mantida. Com o passar do tempo (cerca de 3 meses de cultivo), foi verificado que esta cultura retornou à proporção de fluorescência original (30%). Ramirez e cols., (2000) mostraram que em parasitos transfectados com o vetor

pTEX contendo o gene de GFP, as porcentagens de parasitos fluorescentes não ultrapassaram 0,5%, havendo redução destas, mesmo na presença de droga. Os autores propuseram que a ausência de parasitos expressando GFP teria sido ocasionada pela diluição da cultura dificultando o seu crescimento. Assim, ao enriquecerem o meio de cultivo, através da adição de 10% de sangue, os parasitos fluorescentes começaram a aparecer na primeira semana após a eletroporação e toda cultura ficou fluorescente entre 3 – 4 semanas depois.

Nos experimentos de clonagem, por diluição seriada ou em placas com ágar, e até mesmo em algumas culturas em meio LIT, realizados no presente trabalho, foram adicionados 10% de sangue e mesmo assim, contudo não foram obtidos resultados semelhantes aos descritos por Ramirez e cols. (2000). Diante disso, várias possibilidades podem ser levantadas para explicar esse fenômeno. Por exemplo, os níveis de expressão provocados pelos vetores pROCKGFPNeo e pROCKRFPNeo são suficientes para a expressão do gene de resistência ao antibiótico, porém ainda são baixos para a detecção das proteínas fluorescentes. Também podemos considerar que após a seleção dos parasitos resistentes ao antibiótico e/ou clonagem dos mesmos tenham ocorrido adicionais eventos de recombinação deslocando os genes exógenos para regiões silentes no genoma do parasito, o que poderia afetar a expressão de GFP e RFP em alguns parasitos. Também é possível que as seqüências regulatórias (HX1 e região intergênica de GAPDH) não estejam mais flanqueando os genes das proteínas fluorescentes ou mesmo que estas tenham sofrido mutação o que impediria o correto processamento do mRNA de GFP ou RFP. Com isso, a estabilidade do mRNA seria fragilizada uma vez que a regulação em *T. cruzi* é pós-transcricional.

Na infecção de camundongos com a população de JG expressando GFP foi observado que esta manteve sua capacidade infectiva, uma vez que tripomastigotas foram encontrados no sangue dos animais, porém não foi possível visualizar parasitos verdes no sangue e nem nos tecidos dos mesmos. Para verificar se estes parasitos teriam perdido os genes de GFP e de resistência à neomicina, foi realizada hemocultura do sangue dos camundongos infectados com a população de JGGFP, sendo possível então identificar a presença de parasitos fluorescentes. Todavia, com o passar do tempo, mesmo cultivadas na presença de G418, a cultura perdeu totalmente os parasitos fluorescentes.

Com o objetivo de melhor entender os mecanismos envolvidos na ausência da expressão do gene de GFP foi investigada a sua manutenção no genoma do parasito. Inicialmente foi realizada uma PCR com iniciadores específicos para o gene da proteína fluorescente a qual resultou na amplificação da banda correspondente à GFP. Uma segunda hipótese foi também investigada: a possibilidade de haver diferentes mecanismos regulatórios atuando sob a expressão de GFP ou RFP e neomicina fosfotransferase nestes parasitos. Através da análise do experimento de *chromoblot* da população JGGFP não fluorescente, foi evidenciado que o perfil da mesma mudou em relação ao parasito selvagem e até mesmo em relação à população transfectada originalmente. Através de análises de microssatélite foi verificado que não houve contaminação dessa cultura com nenhuma das outras populações mantidas no laboratório durante o presente trabalho. Assim, o gene de GFP silenciado na cepa JG parece ter sofrido rearranjo, transferindo-se para uma banda cromossômica diferente da anteriormente observada.

Estudos realizados em nosso laboratório têm demonstrado que a proteína RAD51 de *T. cruzi* parece estar envolvida nos mecanismos de recombinação e reparo de quebra da dupla fita do DNA neste parasito (Regis da Silva, 2006). Estes autores mostraram que a superexpressão de RAD51 em epimastigotas de *T. cruzi* transfectadas, foi capaz de aumentar a taxa de recuperação do padrão normal das bandas cromossômicas depois de irradiação dos parasitos. A atividade da TcRAD51 também foi verificada pelo aumento dos eventos de recombinação em células de mamífero (CHO) transfectadas com o gene dessa proteína. Em virtude disso, não se pode descartar a possibilidade de que mecanismos de recombinação em *T. cruzi* possam estar atuando no desligamento da expressão das proteínas fluorescentes. Através dos processos de recombinação, os genes das proteínas fluorescentes poderiam ser deslocados de sua janela de leitura correta ou até mesmo serem rearranjados em outro cromossomo, abolindo a sua expressão. Essas hipóteses corroboram com a observação de que os parasitos podem sobreviver em meio contendo G418 sem necessariamente expressar as proteínas fluorescentes. A expressão do gene de resistência ao antibiótico é de fundamental importância para a sobrevivência das células, já a expressão de GFP/RFP não é essencial, além de, talvez, representar um gasto energético adicional para o metabolismo celular. No entanto, novas análises do mecanismo de expressão e regulação desses genes são necessárias para que essas questões possam ser melhor esclarecidas. Para isso, novas clonagens dos parasitos

transfectados devem ser realizadas no intuito de isolar clones que deixaram de apresentar parasitos fluorescentes. Análises quanto à presença e localização dos genes exógenos poderão ser feitas e comparadas com a cepa original. O sequenciamento dos genes das proteínas fluorescentes também é um passo importante, uma vez que os mesmos possam ter sofrido mutação alterando a janela de leitura correta.

Nos experimentos de transfecção, aqui realizados, utilizando o vetor pROCKNeo foram observadas diferenças nas porcentagens de parasitos fluorescentes, as quais variaram de experimento para experimento e entre as diferentes cepas utilizadas. Vários fatores podem contribuir para essas diferenças. A princípio, não se pode descartar a interferência de pequenas variações nas condições de crescimento de cada cultura, na eletroporação, na quantidade de DNA adicionado às células e ainda, que algumas cepas possam ser menos susceptíveis a transfecção. Após as clonagens, apesar de não ser obtida toda a cultura expressando GFP ou RFP, foram observadas as maiores proporções de parasitos fluorescentes nos clones isolados das cepas Tulahuén e JG, ambas pertencente ao grupo *T. cruzi* II, ao contrário daqueles clones obtidos da população ColGFP (*T. cruzi* I). Neste sentido, Ramirez e cols. (2000) também observaram diferenças nas proporções de parasitos fluorescentes entre diferentes cepas transfectadas com o gene de GFP. Os autores não conseguiram gerar parasitos transfectantes das cepas pertencentes à linhagem *T. cruzi* I, argumentando diferenças associadas ao promotor ribossomal presente na construção utilizada, proveniente de uma cepa da linhagem *T. cruzi* II. No presente trabalho, foi mostrada a obtenção de parasitos fluorescentes da linhagem *T. cruzi* I transfectados com o promotor de rDNA da linhagem *T. cruzi* II. Este resultado contrasta com os dados obtidos por Ramirez e cols., (2000), mostrando que a presença do promotor de rDNA da linhagem *T. cruzi* II em parasitos da linhagem *T. cruzi* I permitiu a geração de células transfectantes.

Nos experimentos de infecção de camundongos BALB/c inicialmente, foram investigadas as populações JG, Col1.7G2 e CL Brener expressando GFP ou RFP por apresentarem alta infectividade. Os parasitos destas populações foram capazes de estabelecer infecção, uma vez que foram encontrados tripomastigotas no sangue dos animais. No entanto, as mesmas não apresentavam porcentagens de parasitos fluorescentes suficientemente altas para permitir sua visualização nos tecidos. Naqueles camundongos infectados com CL BrenerGFP foram identificados poucos tripomastigotas fluorescentes no sangue e através das análises dos cortes dos tecidos em

microscopia de fluorescência, foram visualizados inúmeros ninhos de amastigotas corados pelo DAPI, porém nenhum deles apresentou a expressão de GFP. Nas hemoculturas dos parasitos recolhidos do sangue dos animais infectados com as populações transfectadas de JG, Col1.7G2 e CL Brener, sempre foram encontradas células fluorescentes e resistentes ao G418. Por outro lado, a cepa Tulahuén que foi aquela pelas quais as maiores porcentagens de parasitos fluorescentes foram obtidas, é sabidamente pouco infectiva para camundongos BALB/c. Assim, foi necessária a infecção de camundongos GKO (interferon gama *knock-out*) que são animais imunossuprimidos com parasitos do clone TulaGFP2, cuja proporção de células fluorescente é alta, permitindo a detecção de ninhos de amastigotas verde-fluorescentes nos tecidos hospedeiros. Diante do exposto fica claro que, os parasitos transfectantes não perderam sua capacidade infectiva e o fato de serem identificados amastigotas fluorescentes nos camundongos imunossuprimidos, reside na baixa parasitemia apresentada pela cepa Tulahuén. O motivo pelo qual, durante o presente trabalho, não realizarmos experimentos de infecções mistas em modelos animais deve-se, em grande parte, ao fato de não serem obtidas populações ou clones das diferentes cepas e linhagens de *T. cruzi*, principalmente de JG e Col1.7G2 apresentando altas proporções de parasitos expressando GFP e RFP.

Nenhum dos trabalhos anteriores que descrevem a expressão de GFP e RFP em *T. cruzi* (Martinez-Calvillo e cols, 1997; Vasquez e Levin, 1999; Ramirez e cols., 2000; Dos Santos e Buck, 2000; Lozenzi e cols, 2003; Guevara e cols., 2005), mostrou a presença de amastigotas fluorescentes em tecidos de animais infectados, embora esse dado seja mencionado. Somente Buckner e cols (1999), utilizando o gene de β -gal mostraram a presença de parasitos geneticamente modificados em tecidos. Dos Santos e Buck (2000) também usaram camundongos imunossuprimidos para realizar experimentos de infecção com parasitos transfectados com vetor episomal e expressando GFP. No entanto, os autores não mostraram imagem dos parasitos fluorescentes nos tecidos ou hemocultura contendo parasitos fluorescentes recolhidos do sangue dos animais infectados, impedindo uma melhor comparação com nossos achados. No trabalho de Dos Santos e Buck (2000) os autores descrevem que os parasitos obtidos por hemocultura foram resistentes ao G418. Guevara e cols., (2005) utilizando o vetor pTREX mostraram imagens de *T. cruzi* e *T. rangeli* expressando GFP e RFP na hemolinfa de *Rhodnius prolixus* experimentalmente infectados isoladamente

ou com misturas dos parasitos. Similar ao trabalho de Dos Santos e Buck (2000), esses autores não mostraram que os parasitos fluorescentes foram capazes de infectar animais.

Através dos *chromoblots* foi mostrado que, para todas as diferentes populações transfectadas foi possível identificar eventos de recombinação homóloga dos vetores pROCKGFPNeo e pROCKRFPNeo com loco de β -tubulina. A comparação da hibridação com as sondas de β -tubulina e GFP mostrou, entretanto, diferenças entre algumas das bandas cromossômicas híbridadas como, por exemplo, para a população de JGGFP. O perfil gerado pelo reconhecimento dessas sondas sugere que pode ter ocorrido eventos de recombinação de alguma outra seqüência presente no vetor pROCKGFPNeo, como por exemplo, rDNA e GAPDH, no genoma do parasito, ou ainda recombinação não homóloga. O gene de GFP foi detectado em duas bandas cromossômicas, sendo que uma delas (a inferior) não corresponde às bandas cromossômicas híbridadas com β -tubulina no parasito selvagem (Figura 13A). É possível que ao integrar-se no genoma do parasito em um cromossomo diferente daquele contendo o cistron de β -tubulina o vetor tenha inserido uma parte da seqüência deste gene. Assim, ao utilizar o gene da β -tubulina como sonda, além desta hibridar com as duas bandas cromossômicas presentes na cepa selvagem, a sonda também reconheceu uma seqüência complementar, referente ao vetor integrado, na banda adicional. Isto explicaria o perfil de três bandas para β -tubulina observado no parasito transfectado, diferente do selvagem que apresentou somente duas bandas. Resultado similar foi observado com a cepa Tuluahuén, mais especificamente com o clone TulaGFP2. Foi verificada para este clone a presença de uma banda superior de menor intensidade que a inferior, revelada pela sonda de β -tubulina (Figura 13C). Essa banda cromossômica superior encontra sua correspondente no *chromoblot* revelado com GFP, sugerindo que a integração de GFP nesse clone se deu via recombinação com outra seqüência que não a do gene alvo.

Trabalhos que descrevem a transfecção de *T. cruzi* com vetores apresentando o promotor de rDNA, mesmo que sejam vetores episomais como pRIBOTEX e pTREX, relatam que os mesmos foram capazes de integrarem-se no genoma dos parasitos via recombinação homóloga como o loco do gene de rDNA (Martinez-Calvillo e cols., 1997; Vazquez e Levin, 1999; Lorenzi e cols., 2003). Ao linearizarem o plasmídeo pTREXGFP, de modo a manter a seqüência intergênica de GAPDH em ambas as extremidades do vetor, os autores esperavam, após a transfecção de formas

epimastigotas de *T. cruzi*, que os genes exógenos fossem integrados no loco de GAPDH, no entanto a integração se deu no loco de rDNA (Lorenzi e cols., 2003). Uma vez que o vetor pROCKNeo também possui o promotor de rDNA e as regiões regulatórias de GAPDH, não se pode descartar a possibilidade de integração dos genes exógenos em algum desses locos.

Outro aspecto a ser ressaltado nos experimentos de *chromoblot*, é o fato de que no clone TulaRFP1 foi verificada a integração de RFP na banda cromossômica superior de β -tubulina (Figura 13D). Porém, nesse mesmo clone utilizando a sonda de β -tubulina, observamos um sinal acentuado na altura do padrão de 1,81 Mb (Figura 13D). Uma vez que os isolados de *T. cruzi* possam apresentar diferentes sub-populações, e que as mesmas não estão presentes em proporções iguais, é possível supôr que, ao clonar a população de TulaGFP selecionou-se um clone pouco representativo da população original. No *chromoblot* da Figura 13D, é possível identificar, após hibridação com a sonda do gene de β -tubulina, a banda de altura intermediária de baixa intensidade no parasito selvagem (TulaWt). No entanto, na figura 13C não foi identificado esse perfil de 3 bandas para TulaWt, o que pode ser devido a menor quantidade de DNA utilizada no ensaio.

A seleção de sub-populações a partir de cepas policlonais em condições de laboratório, é um fenômeno bem documentado na literatura. Por exemplo, o trabalho realizado por Veloso e cols., (2005), o qual quatro populações isoladas de diferentes cães infectados com a cepa Berenice-78 (Be-78) foram inoculadas em camundongos distintos por 25 passagens sucessivas. As análises de cada uma dessas passagens demonstrou a existência de subpopulações distintas presentes na cepa Be-78. A explicação para isto reside no fato de que as sub-populações diferentes existiriam em uma quantidade tão inferior ao clone majoritário dentro da cepa original, que os métodos convencionais de PCR foram incapazes de detectá-las. Sendo assim, é possível que através da clonagem da população de Tulahuén transfectada, uma subpopulação pouco representativa tenha sido selecionada e expandida em cultura, facilitando a identificação de um perfil não percebido nas análises com a população original.

Em todas as três populações estudadas torna-se claro que ocorreu a integração do vetor pROCKGFP/RFPNeo em pelo menos uma das bandas cromossômicas mapeadas com o gene de β -tubulina. Estes dados demonstram a capacidade do vetor de integrar-se no genoma do *T. cruzi*, independentemente da linhagem do parasito (JG e

Tulahuén - *T. cruzi* II ou Col1.7G2 - *T. cruzi* I). Isto provavelmente, deve-se à alta conservação da seqüência gênica de tubulina nas diferentes linhagens de *T. cruzi* e até mesmo entre os diferentes organismos (Maingon e cols., 1988).

É importante ressaltar que a integração dos genes de GFP/RFP no genoma dos parasitos e sua expressão não resultaram em qualquer alteração nas características biológica das células, incluindo morfologia (forma, tamanho e granulosidade), na taxa de crescimento, mobilidade, diferenciação celular e infectividade *in vitro*.

Também, foi nosso interesse, observar se uma mesma célula em cultura poderia ser infectada por mais de um parasito expressando duas marcas diferentes. Isto foi demonstrado nos experimentos de infecção de células Vero com misturas de TulaGFP1 e TulaRFP2 ou ColGFP e TulaRFP. É importante notar que Col1.7G2 é pertencente à linhagem *T. cruzi* I e Tulahuén à linhagem *T. cruzi* II (Figura 19). Pelo nosso conhecimento este é o primeiro trabalho descrito na literatura demonstrando inequivocadamente a invasão de uma mesma célula por dois parasitos pertencentes à linhagens diferentes. Diante disso, pode-se ainda perguntar se haveria uma competição no interior da célula hospedeira levando a uma predominância de um parasito em relação ao outro. Nos experimentos de co-infecção com a mistura TulaGFP2 e Tula RFP1 foi observada uma maior proporção de células co-infectadas do que naqueles onde utilizamos a mistura ColGFP e TulaRFP1. Nestes, foi observada uma proporção de células co-infectadas menor do que 1%, sendo que a proporção de células infectadas com parasitos vermelhos foi maior. Isto pode ser explicado pelo fato de que a dupla infecção de uma célula por parasitos de linhagens distintas seja um evento raro. Além disso, também é possível supôr, que TulaRFP1 seja mais eficiente na invasão e/ou no estabelecimento da infecção em células Vero do que ColGFP. Entretanto, como ColGFP é uma população que apresenta baixa porcentagem de parasitos fluorescentes (20%) em comparação ao clone TulaRFP1 (70-80% de parasitos fluorescentes), o fato de ter sido observado um número maior de células infectadas com os parasitos vermelhos poderia ser ainda resultante dessa diferença na expressão das fluorescências.

Vários grupos interessados no estudo do processo de invasão celular pelo *T. cruzi*, têm mostrado que uma mesma célula pode ser invadida por mais de um parasito da mesma cepa ou linhagem. Os autores destacam a importância da interação do parasito com as moléculas na superfície da célula hospedeira como glicoproteínas ricas em ácido siálico e LAMP (*lysosomal membrane glycoprotein*), associadas às vesículas

lisossomais formando o vacúolo parasitóforo. Também mostram a importância da ativação das vias de transdução de sinal, levando ao aumento do cálcio citossólico na célula hospedeira durante a invasão pelo parasito (Kima e cols., 2000; Lopez e cols., 2002; Andrade e Andrews, 2004). É razoável supor então, que parasitos distintos possam interagir com as moléculas na superfície da célula hospedeira de maneira distinta, alterando o resultado final do processo de invasão. Assim, a eficiência de diferentes cepas do parasito em escapar do vacúolo parasitóforo pode ser responsável por alguns isolados apresentarem melhor invasão e replicação dentro da célula hospedeira em detrimento de outros (Kima e cols., 2000, Andrade e cols., 2004; Lopez e cols., 2002, Fernandes e cols., 2006, Fernandes e cols., 2007). No entanto, nos trabalhos mencionados acima, as infecções são realizadas com as diferentes cepas separadamente. A viabilidade de distintas cepas apresentando marcas visuais diferentes em experimentos de co-infecção permitirá visualizar aquela que invade primeiro e que estabelece melhor infectividade na célula hospedeira.

Uma segunda aplicação em estudos com os parasitos fluorescentes seria a possibilidade de investigar o processo de recombinação em *T. cruzi*. Neste sentido, Gaunt e cols., (2003) descreveram a geração de parasitos híbridos, após co-infecção de cultura de células, com dois clones distintos expressando resistência a diferentes antibióticos. Durante os experimentos de co-infecção, realizados no presente trabalho, não foram identificadas qualquer evidência de que tenha ocorrido recombinação gênica entre os parasitos verdes e vermelhos, quer sejam da mesma linhagem (TulaGFP2 e TulaRFP1) ou de linhagens diferentes (ColGFP – *T. cruzi* I e TulaRFP1 – *T. cruzi* II), uma vez que nenhum parasito de coloração amarela foi visualizado. Uma possibilidade para isso pode ser devida às baixas proporções de parasitos fluorescentes exibidas por ColGFP nos casos de co-infecção com ColGFP e TulaRFP1 ou ao curto período de tempo de manutenção das culturas celulares co-infectadas.

Análises de microssatélites demonstram que o *T. cruzi* tem uma evolução predominante clonal (Valadares e cols., 2007; Oliveira e cols., 1998) e que a reprodução sexual neste parasito é um evento raro (Ayala, 1993; Tibayrenc, 1995). No entanto, os padrões de isoenzimas (Carrasco e cols., 1996; Bogliolo e cols., 1996), RFLP de genes constitutivos (Higo e cols., 2000), RAPD, análises de cariótipos (Brisse e cols., 2003) e de seqüências nucleares e mitocondriais vêm confirmando a existências destes híbridos (Freitas e cols., 2006; Sturm e cols., 2003; Machado e cols., 2001) e com o projeto

genoma do parasito a natureza híbrida ficou claramente demonstrado para o clone CL Brener (El Sayed e cols., 2005). Embora, Gaunt e cols., (2003) tenham demonstrado que o *T. cruzi* seja capaz de realizar eventos de recombinação em condições de laboratório, tanto a frequência quanto o mecanismo como ocorrem as trocas gênicas não são bem conhecidos. No entanto, fica claro que, os eventos de recombinação exercem um papel importante na variabilidade genética deste organismo.

A viabilidade dos parasitos expressando GFP e RFP descritas no presente trabalho constitui certamente uma ferramenta que pode ser aplicada nos estudos de troca genética em *T. cruzi*. Neste caso, é importante que cada uma das populações, além da expressão das diferentes proteínas fluorescentes também apresentassem resistência a antibióticos distintos, como por exemplo neomicina e higromicina, o que facilitaria a seleção dos clones híbridos. Além disso, em ambas as variantes dos vetores pROCKNeo para a expressão de GFP e RFP, a preservação dos sítios múltiplos de clonagem na região 5' destes genes possibilita ainda a sua utilização em estudos de proteínas de fusão e citolocalização. Assim diferentes grupos de pesquisa, incluindo o nosso, tem mostrado grande interesse em estudos de superexpressão e localização de proteínas fusionadas com GFP ou RFP em *T. cruzi*. Nestes casos, o aumento na expressão do gene de interesse, mesmo que seja pequeno, entre 10 e 20%, já é o suficiente para as análises funcionais, localização das proteínas fusionadas aos genes repórteres e para os estudos dos mecanismos de regulação e expressão gênica (Macedo e col., 2006; Da Silva e cols., 2006; Bartholomeu e cols., 2002; Vazquez e Levin, 1999; Coughlin e cols., 1999; Lopes e cols., dados não publicados). Porém, como o objetivo principal do presente trabalho foi gerar uma ferramenta que tenha potencial para ser utilizada em experimentos que exijam quantificação e eficiente visualização dos parasitos intactos, é preciso obter diferentes populações de *T. cruzi* que apresentem grandes proporções de células fluorescentes.

Uma alternativa para melhorar a expressão de GFP e RFP nos parasitos seria a construção de vetores que possam integrar-se na região espaçadora do gene de rDNA, uma vez que este possui um forte promotor da transcrição. Ou ainda, a mudança da região 3'UTR presente no vetor atual pela porção central da 3'UTR de amastina, para melhorar a expressão do gene repórter, principalmente na forma amastigota, permitindo a sua utilização nos estudos da doença de Chagas em modelos animais. Neste sentido, Coughlin e cols., (2000) relataram que a parte central da região 3'UTR de amastina tem

um acentuado efeito na expressão do gene repórter de luciferase, favorecendo fatores *trans* como a clivagem e poliadenilação e a correta distância entre as seqüências pode ser necessária para preservar a estrutura secundária do RNA ou prevenir as atividades endo e exonucleolíticas.

Além dos estudos sobre os processos de infecção e recombinação que foram abordados de maneira inicial nesse trabalho, a expressão de GFP ou RFP nos parasitos transgênicos abre várias outras possibilidades de aplicações em estudos sobre a doença de Chagas. Atualmente está sendo realizado pelo nosso grupo um estudo com o *T. cruzi* utilizando uma abordagem de células únicas, que pode vir a elucidar vários pontos ainda obscuros a respeito da estrutura populacional desse parasito. Uma importante etapa nesse estudo é a separação das células utilizando o aparelho FACS *Cell Sorter*. A fluorescência exibida pelos parasitos recombinantes promoverá uma maior eficiência na separação das células. Outro estudo também realizado pelo nosso grupo consiste em verificar a seleção de populações de *T. cruzi* em infecções mistas desses parasitos nos hospedeiros invertebrados (barbeiros), através dos perfis de alguns locos de microssatélite do parasito encontrados nas fezes dos triatomíneos. Parasitos transgênicos poderiam constituir uma ferramenta alternativa de identificação das populações dominantes nos vetores em infecções mistas com *T. cruzi*. Ainda uma outra aplicação dos parasitos transfectantes seria o estudo de drogas com atividade tripanosomicida. Nesse sentido, Buckner e cols. (1998) avaliaram a atividade de diferentes drogas utilizando a cepa Tulahuén de *T. cruzi* transfectada com o plasmídeo pBS-CL-Neo-01/BC-LacZ-10. Cultivando os parasitos transfectados em diferentes concentrações das drogas em teste, os autores realizaram a quantificação da mortalidade dos parasitos através de um método colorimétrico. A utilização de parasitos transfectados com diferentes genes repórteres permitiria uma maior precisão e automação na comparação dos resultados.



6. Conclusão e Perspectivas

No presente trabalho foram geradas diferentes populações de *T. cruzi* expressando GFP e RFP nas três formas do ciclo de vida do parasito. Apesar da expressão desses marcadores fluorescentes ocorrer de forma estável, nenhuma das culturas transfectadas apresentou 100% de células fluorescentes.

A geração dessas linhagens de parasitos expressando GFP e RFP abre algumas perspectivas:

- A partir da fácil detecção visual, avaliar o processo de troca genética utilizando dois isolados diferentes de *T. cruzi*, uma vez que foi demonstrada a co-infecção de cultura de células por diferentes linhagens do parasito;
- Estudos de invasão celular por diferentes linhagens em uma mesma cultura de células, também poderão ser realizados, procurando determinar diferenças entre as linhagens, quanto a invasão e multiplicação em uma mesma célula através da contagem dos parasitos coloridos em microscópio de fluorescência;
- A fluorescência exibida pelos parasitos permite que os mesmos possam ser utilizados para a otimização dos protocolos de clonagem no *FACS cell sorter*;
- O fato das culturas apresentarem parasitos fluorescentes e não fluorescentes, mesmo após os processos de clonagem, pode servir como ferramenta para os estudos de expressão gênica em *T. cruzi*. Será possível investigar o processo de “desligamento” dos genes das proteínas fluorescentes, avaliando a presença e localização dos genes repórteres em regiões distintas no genoma do parasito;
- A detecção de ninhos fluorescentes em tecidos de animais permite estudar, entre outros, tropismo tecidual e susceptibilidade a tratamento com drogas, utilizando as, diferentes cepas e linhagens de parasitos geneticamente modificados.



7. Bibliografia

- AJIOKA J, SWINDLE J. (1993). The calmodulin-ubiquitin associated genes of *Trypanosoma cruzi*: their identification and transcription. *Mol Biochem Parasitol.* 57(1):127-36.
- ANDRADE L.O., MACHADO C.R., CHIARI E, PENA S.D., MACEDO A.M., (1999) Differential tissue distribution of diverse clones and strains of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Mol. Biochem. Parasitol.* 100, 163-172
- ANDRADE, L.O.; MACHADO, C.R.S.; CHIARI, E.; PENA S.D., MACEDO A.M.,. (2002). *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. *Exp. Parasitol.* 100: 269-275.
- ANDRADE L.O., ANDREWS N.W., (2004). Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. *J. Exp. Med.* 200, 1135-43.
- ANDREWS NW, ABRAMS CK, SLATIN SL, GRIFFITHS G. (1990). A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell.* 61(7):1277-87
- AÑEZ N, CARRASCO H, PARADA H, CRISANTE G, ROJAS A, GONZALEZ N, RAMIREZ JL, GUEVARA P, RIVERO C, BORGES R, SCORZA JV. (1999). Acute Chagas' disease in western Venezuela: a clinical, seroparasitologic, and epidemiologic study. *Am J Trop Med Hyg.* 60(2):215-22
- AÑEZ N, CRISANTE G, DA SILVA FM, ROJAS A, CARRASCO H, e cols. (2004) Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas' disease. *Trop Med Int Health.* (12):1319-26.
- AUFDERHEIDE, A.C.; SALO, W.; MADDEN, M.; STREITZ, J.; BUIKSTRA, J.; GUHL, F.; ARRIAZA, B.; RENIER, C.; WITTMERS, L.E., FORNACIARI, G.; ALLISON, M. (2003). A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc. Natl. Acad. Sci* 101(7):2034-2039.
- AUGUSTO-PINTO, L.; PIMENTA, J.R.; TEIXEIRA, S.M.R.; FERNANDES, O.; CHIARI, E.; PENA, S.D.J.; MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R. (2003). Multilocus genotype data provide evidences that hybrid *Trypanosoma cruzi* strains constitute a third major lineage. *Int. J. Parasitol.* 164(1):117-26
- AYALA, F.J. (1993). *Trypanosoma* and *Leishmania* have clonal population structures of epidemiological significance. *Biol. Res.* 26:47-63.
- BAR-NUN S., SHNEYOUR Y., BECKMANN J.S. (1983) G-418, an elongation inhibitor of 80 S ribosomes. *Biochim Biophys Acta.* 741(1):123-7
- BARTHOLOMEU DC, SILVA RA, GALVAO LM, EL-SAYED NM, DONELSON JE, TEIXEIRA SM. (2002) *Trypanosoma cruzi*: RNA structure and post-transcriptional control of tubulin gene expression. *Exp Parasitol* Nov-Dec;102(3-4):123-33

- BECKMAN, JS, WEBER JL. (1992). Survey of human and rat microsatellites. *Genomics*. 12(4):627-31
- BINGLE L.E., EASTLAKE J.L., BAILEY M., GIBSON W.C. (2001) A novel GFP approach for the analysis of genetic exchange in trypanosomes allowing the in situ detection of mating events. *Microbiology*. 147(Pt 12):3231-40
- BOGLIOLO AR, LAURIA-PIRES L, GIBSON WC. (1996) Polymorphisms in *Trypanosoma cruzi*: evidence of genetic recombination. *Acta Trop*. 61(1):31-40.
- BRANCHE, C., OCHAYA, S., ASLUND, L., ANDERSSON, B., 2006. Comparative karyotyping as a tool for genome structure analysis of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol*. 147, 30-38.
- BRENER, Z. (1977) Intraspecific variation in *Trypanosoma cruzi* two types of parasites populations presenting distinct features. *PAHO, SC. Publ.*, 347, 11-21.
- BRIONES MR, SOUTO RP, STOLF BS, ZINGALES B. (1999). The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Mol Biochem Parasitol*. 104(2):219-32
- BRISSE S, DUJARDIN JC, TIBAYRENC M. (2000). Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Mol Biochem Parasitol*. 111(1):95-105
- BRISSE S, HENRIKSSON J, BARNABE C, e cols. (2003) Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infect Genet Evol*. 2(3):173-83.
- BUCKNER, F.S.; WILSON, A. J., WHITE, T.C. AND VAN VOORHIS, W.C. (1998). Induction of resistance to azole drugs in *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob. Agents and Chemotherapy*, 42 (12): 3245-3250
- BUCKNER, F.S.; WILSON, A. J. AND VAN VOORHIS, W.C. (1999) Detection of live *Trypanosoma cruzi* in tissues of infected mice by using histochemical strain for β -galactosidase. *Infection and Immunity*, 67: 403-409.
- CALIARI MV, DE LANA M, CAJA RA, CARNEIRO CM, BAHIA MT, SANTOS CA, MAGALHAES GA, SAMPAIO IB, TAFURI WL. (2002). Immunohistochemical studies in acute and chronic canine Chagasic cardiomyopathy. *Virchows Arch*. 441(1):69-76.
- CANO, M.I.; GRUBER, A.; VAZQUEZ, M.; CORTÉS, A.; LEVIN, M.J.; GONZÁLEZ, A.; DEGRAVE, W.; RONDINELLI, E.; ZINGALES, B.; RAMIREZ, J.L.; ALONSO, C.; REQUENA, J.M.; AND SILVEIRA, L.F. (1995). Molecular Karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 71:273-278.

- CARRASCO HJ, FRAME IA, VALENTE SA, (1996). Genetic exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic populations of *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg.* 54(4):418-24.
- CHURCH, G.M., GILBERT, W. (1984). Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81(7):1991-5.
- CLAYTON CE. (2002). Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J.* 21(8):1881-8.
- CORREA-DE-SANTANA E., PAEZ-PEREDA M., THEODOROPOULOU M., KENJI NIHEI O., GRUEBLER Y., BOZZA M., ARZT E., VILLA-VERDE D.M., RENNER U., STALLA J., STALLA G.K., SAVINO W., 2006. Hypothalamus-pituitary-adrenal axis during *Trypanosoma cruzi* acute infection in mice. *J. Neuroimmunol.* 173, 12-22.
- COUGHLIN, B.C.; TEIXEIRA, S.M.R.; KIRCHHOFF, L.V. AND DONELSON, J.E. (1999). Amastin mRNA abundance in *Trypanosoma cruzi* is controlled by a 3' untranslated region position-dependent cis-element and an untranslated region-binding protein. *The J. of Biol. Chem.* 275:12051-12060.
- COURA JR, JUNQUEIRA AC, FERNANDES O, VALENTE SA, MILES MA. (2002). Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol.* 18(4):171-6
- CRUZ-ROBLES D, REYES PA, MONTEON-PADILLA VM, (2004) MHC class I and class II genes in Mexican patients with Chagas disease. *Hum Immunol.* 65(1):60-5.
- DAROCHA, W.D.; SILVA, R.A.; BARTHOLOMEU, D.C., PIRES, S.F., FREITAS, J.M., MACEDO, A.M., VAZQUEZ, M.P., LEVIN, M.J., TEIXEIRA, S.M. (2004a). Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. *Parasitol. Res.* 92 (2):113-20
- DAROCHA, W.D., OTSU, K., TEIXEIRA, S.M., DONELSON, J.E.. (2004b). Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 133(2):175-86
- DA SILVA RA, BARTHOLOMEU DC, TEIXEIRA SM. (2006). Control mechanisms of tubulin gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol.* 36(1):87-96.
- DE ARAÚJO, S.M. & CHIARI, E. (1970) Caracterização biológica de clones da cepa Y, CL e MR de *Trypanosoma cruzi* em camundongos C3H isogênicos. *Mem. Inst. Osw. Cruz,* 83, 175-81.
- DE FREITAS J.M., LAGES-SILVA E., CREMA E., PENA S.D., MACEDO A.M., (2005). Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. *Int. J. Parasitol.* 1, 411-417.
- DE FREITAS JM, AUGUSTO-PINTO L, PIMENTA JR, BASTOS-RODRIGUES L, GONCALVES VF, TEIXEIRA SM, CHIARI E, JUNQUEIRA AC, FERNANDES O, MACEDO AM, MACHADO CR, PENA SD. (2006). Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog.* 2(3): 226-235

DI NOIA, J.M.; D'ORSO, I.; SANCHEZ, D.O.; FRASCH, A.C.; (2000). AU-rich elements in the 3'-untranslated region of a new mucin-type gene family of *Trypanosoma cruzi* confers mRNA instability and modulates translation efficiency. *J Biol Chem.* 275(14):10218-27.

DIAS JC. (1991) Chagas disease control in Brazil: which strategy after the attack phase? *Ann Soc Belg Med Trop.* 71 Suppl 1:75-86.

DIAS, J.C.P. (2000). Epidemiologia. Em Brener Z, Andrade ZA e Barral-Netto M (2000). *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Segunda Edição, Editora Guanabara Koogan, RJ, 48-74.

DONELSON, J.E.; ZENG, W. (1990). A comparison of trans-RNA splicing in trypanosomes and nematodes. *Parasitology Today*, 6:327-703.

D'ORSO I., FRASCH A.C. (2001). TcUBP-1, a developmentally regulated U-rich RNA-binding protein involved in selective mRNA destabilization in trypanosomes. *J Biol Chem.* 276(37):34801-9.

DOS SANTOS WG, BUCK GA. (2000) Simultaneous stable expression of neomycin phosphotransferase and green fluorescence protein genes in *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol.* 86(6):1281-8

EL-SAYED, N.M.; MYLER, P.J.; BARTHOLOMEU, D.C. E COLS. (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science.* 320:409-15.

ENGMAN D.M., REDDY L.V., DONELSON J.E., KIRCHHOFF L.V., 1987. *Trypanosoma cruzi* exhibits inter- and intra-strain heterogeneity in molecular karyotype and chromosomal gene location. *Mol. Biochem. Parasitol.* 15, 115-123.

FERNANDES O., SOUTO R.P., CASTRO J.A., PEREIRA J.B., FERNANDES N.C., JUNQUEIRA A.C., NAIFF R.D., BARRETT T.V., DEGRAVE W., ZINGALES B., CAMPBELL D.A., COURA J.R. (1998). Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. *Am J Trop Med Hyg.* 58(6):807-11.

FERNANDES, A. B., NEIRA. I., FERREIRA, A. T., MORTARA, R. A. (2006). Cell invasion by *Trypanosoma cruzi* amastigotes of distinct infectivities: studies on signaling pathways. *Parasitol Res* 100:59–68

FERNANDES, M.C., L'ABBATE, C., KINDRO ANDREOLI, W., MORTARA, R.A.. (2007). *Trypanosoma cruzi* cell invasion and traffic: influence of *Coxiella burnetii* and pH in a comparative study between distinct infective forms. *Microb Pathog.* 43(1):22-36.

GAUNT M.W., YEO M., FRAME I.A., STOTHARD J.R., e cols. (2003). Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature.* 421(6926):936-9.

- GARCIA BORRAS S, DIEZ C, COTORRUELO C, e cols., (2006) HLA class II DRB1 polymorphism in Argentinians undergoing chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *Ann Clin Biochem.* 43(Pt 3):214-6.
- GIAIMIS J, LOMBARD Y, MAKAYA-KUMBA M, FONTENEAU P, POINDRON P. (1992) A new and simple method for studying the binding and ingestion steps in the phagocytosis of yeasts. *J Immunol Methods.* 154(2):185-93
- GIBSON W., PEACOCK L., FERRIS V., WILLIAMS K., BAILEY M., 2006. Analysis of a cross between green and red fluorescent trypanosomes. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 557-559.
- GILINGER G, BELLOFATTO V. (2001). Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. *Nucleic Acids Res.* 29(7):1556-64.
- GOMES ML, ARAUJO SM, CHIARI E. (1991) *Trypanosoma cruzi*: growth of clones on solid medium using culture and blood forms. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 86(1):131-2
- GUARNER J, BARTLETT J, ZAKI SR, COLLEY DG, GRIJALVA MJ, POWELL MR. (2001). Mouse model for Chagas disease: immunohistochemical distribution of different stages of *Trypanosoma cruzi* in tissues throughout infection. *Am J Trop Med Hyg.* 65(2):152-8
- GUEVARA P., DIAS M., ROJAS A., CRISANTE G., ABREU-BLANCO M.T., UMEZAWA E., VAZQUEZ M., LEVIN M., ANEZ N., RAMIREZ J.L., (2005) Expression of fluorescent genes in *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): its application to parasite-vector biology. *J. Med. Entomol.* 42, 48-56.
- HIGO H, YANAGI T, MATTA V, e cols., (2000). Genetic structure of *Trypanosoma cruzi* in american continents: special emphasis on sexual reproduction in Central America. *Parasitology.* 121 (Pt 4):403-8.
- IVENS, A.C.; PEACOCK, C. S. e cols., (2005). The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science.* 309: 436 – 442.
- JUNQUEIRA, C.V., DEGRAVE, W. BRANDÃO, A. (2005). Minirele organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. *Trends Parasitol.* 21(6):270-2
- KALIL J, CUNHA-NETO E. (1996) Autoimmunity in Chagas disease cardiomyopathy: Fulfilling the criteria at last? *Parasitol Today.* 12(10):396-9.
- KELLY J.M., WARD H.M., MILES M.A., KENDALL G. (1992). A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Nucleic Acids Res.* 20(15):3963-9

- KIMA P.E., BURLEIGH B., ANDREWS N.W. (2000) Surface-targeted lysosomal membrane glycoprotein-1 (Lamp-1) enhances lysosome exocytosis and cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Cell Microbiol.* 2(6):477-86
- LABAN A., WIRTH D.F. (1989). Transfection of *Leishmania enriettii* and expression of chloramphenicol acetyltransferase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86(23):9119-23
- LAGES-SILVA E, RAMIREZ LE, PEDROSA AL, CREMA E, DA CUNHA GALVAO LM, JUNHO PENA SD, MACEDO AM, CHIARI E. (2006). Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil. *J Clin Microbiol.* 44(6):2167-71.
- LEVITUS, G.; HONTEBEYRIE-JOSKOWIEZ, M.; VAN REGENMORTEL, M.H.V.; LEVIN, M.J. (1991). Humoral autoimmune response to ribosomal P proteins in chronic Chagas heart disease. *Clin. Exp. Immunol.* 85:413-417.
- LEY V, ANDREWS NW, ROBBINS ES, NUSSENZWEIG V. (1988). Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *J Exp Med.* 168(2):649-59.
- LOPEZ M., HUYNH C., ANDRADE L.O., PYPART M., ANDREWS N.W. (2002) Role for sialic acid in the formation of tight lysosome-derived vacuoles during *Trypanosoma cruzi* invasion. *Mol Biochem Parasitol.* 119(1):141-5.
- LORENZI H.A., VAZQUEZ M.P., LEVIN M.J. (2003). Integration of expression vectors into the ribosomal locus of *Trypanosoma cruzi*. *Gene.* 310:91-9
- MACEDO, A.M.; MARTINS, M.S.; CHIARI, E.; PENA, S.D.J.; (1992). DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. *Mol.Biochem. Parasitol.* 55: 147-154.
- MACEDO, A.M.; PENA, S.D.J. (1998) Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitology Today.* 14(03):119-123.
- MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; OLIVEIRA, R.P.; PENA, S.D.J. (2004) *Trypanosoma cruzi*: Genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. *Men. Inst. Oswaldo Cruz.* 99(1):1-12.
- MACÊDO, C.D.; DAROCHA, W.D.; MORTARA, R.A.; PRADO, M.A.; TEIXEIRA, S.M.; (2006). Characterization of a *Trypanosoma cruzi* antigen with homology to intracellular mammalian lectins. *Int J Parasitol.* 36(14):1473-84
- MACHADO C.A. E AYALA F.J. (2001) Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 7396-7401

- MACHADO C.A. E AYALA F.J. (2002). Sequence variation in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) and trypanothione reductase (TR) genes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 121(1):33-47.
- MAINGON R, GERKE R, RODRIGUEZ M, URBINA J, HOENICKA J, NEGRI S, AGUIRRE T, NEHLIN J, KNAPP T, CRAMPTON J. (1988). The tubulin genes of *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Biochem.* 171(1-2):285-91.
- MAIR, G.; SHI, H.; DJIKENG, A.; AVILES, H.O.; BISHOP, J.R. e col. (2000). A new twist in trypanosome RNA metabolism: *cis*-splicing of pre-mRNA. *RNA*, 6:163-169.
- MARTINEZ-CALVILLO S., LOPEZ I., HERNANDEZ R. (1997). pRIBOTEX expression vector: a pTEX derivative for a rapid selection of *Trypanosoma cruzi* transfectants. *Gene.* 199(1-2):71-6.
- MATTHEWS, K.R.; TSCHUDI, C.; ULLU, E.; (1994). A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes Dev.* 8(4):491-501.
- MILES MA, SOUZA A, PÓVOA M e cols., (1978) Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazoniam Brazil. *Nature* 272, 819-821.
- MISTELI T., SPECTOR D.L. (1997). Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. *Nat Biotechnol.* 15(10):961-4.
- MIZUNO H., SAWANO A., ELI P., HAMA H., MIYAWAKI A. (2001). Red fluorescent protein from *Discosoma* as a fusion tag and a partner for fluorescence resonance energy transfer. *Biochemistry.* 40(8):2502-10
- MOMEN, H. (1999). Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a commentary on characterization and nomenclature. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94(1)181-184.
- MORTARA, R.A. (1991). *Trypanosoma cruzi*: amastigotes and trypomastigotes interact with different structures on the surface of HeLa cells. *Exp Parasitol.* 73(1):1-14.
- NAKAAR V, DARE AO, HONG D, ULLU E, TSCHUDI C. (1994). Upstream tRNA genes are essential for expression of small nuclear and cytoplasmic RNA genes in trypanosomes. *Mol Cell Biol.* 14(10):6736-42
- NAZAKI, T. AND CROSS, G.A.M. (1995). Effects of 3' untranslated and intergenic regions on gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. And Biochem. Parasitol.* 75:55-67.
- OLIVEIRA R.P.; BROUDE N.E.; MACEDO A.M.; CANTOR C.R.; SMITH C.L.; PENA, S.D.J. (1998). Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 95:3776-3780

- OLIVEIRA R.P.; MELO A.I.R.; MACEDO A.M.; CHIARI E.; PENA, S.D.J. (1999). The population structure of *Trypanosoma cruzi*: expanded analysis of 54 strain using eight polymorphic Ca-repeat microsatellites. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 94
- PALENCHAR J.B., BELLOFATTO V. (2006). Gene transcription in trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol*. 46(2):135-41.
- PAYS E. (2006). The variant surface glycoprotein as a tool for adaptation in African trypanosomes. *Microbes Infect*. 8(3):930-7
- PEDROSO A., CUPOLILLO E., ZINGALES B., 2003. Evaluation of *Trypanosoma cruzi* hybrid stocks based on chromosomal size variation. *Mol. Biochem. Parasitol*. 129, 79-90.
- PORCILE P.E., SANTOS M.R., SOUZA R.T., VERBISCK N.V., BRANDAO A., URMENYI T., SILVA R., RONDINELLI E., LORENZI H., LEVIN M.J., DEGRAVE W., FRANCO DA SILVEIRA J. (2003) A refined molecular karyotype for the reference strain of the *Trypanosoma cruzi* genome project (clone CL Brener) by assignment of chromosome markers. *Gene*. Apr 10;308:53-65.
- PRATA, A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas' disease. *The Lancet Infectious Diseases*. 1:92-100.
- RAMIREZ M.I., YAMAUCHI L.M., DE FREITAS L.H.J., UEMURA H., SCHENKMAN S. (2000) The use of the green fluorescent protein to monitor and improve transfection in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 111(1):235-40
- REGIS-DA-SILVA C.G., FREITAS J.M., PASSOS-SILVA D.G e cols. (2006) Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Rad51 gene and its role in recombination events associated with the parasite resistance to ionizing radiation. *Mol Biochem Parasitol*. 149(2):191-200
- ROBISON K, GILBERT W, CHURCH GM. (1994). Large scale bacterial gene discovery by similarity search. *Nat Genet*. 7(2):205-14.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. and MANIATIS, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANTOS, W.G.; METCHEVA, I.; BUCK, G.A. (2000). Colony polymerase chain reaction of stably transfected *Trypanosoma cruzi* grown on solid medium. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 95:111-114.
- SILVEIRA JF (2000) Biologia Molecular do *Trypanosoma cruzi*. Em Brener Z, Andrade ZA e Barral-Netto M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Segunda Edição, Editora Guanabara Koogan, RJ, 48-74.
- SOUTO, R.P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A.M. (1996) DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol*. 83, 141-152.

- STURM NR, VARGAS NS, WESTENBERGER SJ, e cols.,. (2003) Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol.* 33(3):269-79.
- TANOWITZ, H.B. (1992) Chagas disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 5:400-419
- TAYLOR M.C., KELLY J.M. (2006). pTcINDEX: a stable tetracycline-regulated expression vector for *Trypanosoma cruzi*, *BMC Biotechnol.* 6;6:32
- TEIXEIRA MM, DA SILVA FM, MARCILI e cols.,. (2006) Short communication: *Trypanosoma cruzi* lineage I in endomyocardial biopsy from a north-eastern Brazilian patient at end-stage chronic Chagasic cardiomyopathy. *Trop Med Int Health.* 11(3):294-8.
- TEIXIERA, S.M.R.; RUSSELL, D.G.; KIRCHHOFF, L.V. AND DONELSON, J.E. (1994). A differentially expressed gene family encoding "amastin", a surface protein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *The Journal of Biological Chemistry*, 269:20509-20516
- TEIXIERA, S.M.R.; KIRCHHOFF, L.V. AND DONELSON, J.E. (1995). Post-transcriptional elements regulating expression of mRNAs from the Amastin/Tuzin gene cluster of *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Biological Chemistry*, 270:22586-22594.
- TEIXEIRA, S.M.R. (1998). Control of gene expression in *Trypanosomatidae*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 31:1503-1516.
- TEIXIERA, S.M.R.; OTSU, K.; HILL, K.L.; KIRCHHOFF, L.V. AND DONELSON, J.E. (1999). Expression of a marker for intracellular *Trypanosoma cruzi* amastigotes in extracellular spheromastigotes. *Mol. And Bioch. Parasit.* 98: 265-270.
- TEIXEIRA, S.M., DAROCHA, W.D. (2003). Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. *Genet Mol Res.*;2(1):148-58.
- TIBAYRENC, M. (1995). Population genetic of parasitic protozoa and other microorganisms. *Adv. Parasitol.* 36:48-115.
- VAGO, A.R.; MACEDO, A.M.; OLIVEIRA, R.P. (1996) kDNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissue. *Am. J. Pathol.* 149, 2153-9.
- VAGO, A.R.; ANDRADE, L.O.; MACEDO, A.M. e col. (2000) Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am. J. Pathol.* 156, 1805-1809.
- VALADARES, H. M. S., PIMENTA, J. R., DE FREITAS, J. M. e cols. (2007). Genetic profiling of *Trypanosoma cruzi* directly in human and animal infected tissues using nested PCR of polymorphic microsatellites. (artigo submetido)

- VAZQUEZ, M.P.; LEVIN, M.J. (1999) Functional analysis of the regions os TcP2 β gene loci allow the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. *Gene* 239: 217-225
- VELOSO VM, ROMANHA AJ, LANA M, MURTA SM, CARNEIRO CM, ALVES CF, BORGES EC, TAFURI WL, MACHADO-COELHO GL, CHIARI E, BAHIA MT. (2005). Influence of the long-term *Trypanosoma cruzi* infection in vertebrate host on the genetic and biological diversity of the parasite. *Parasitol Res.* 96(6):382-9. Epub 2005 Jun 7.
- ZINGALES B, SOUTO RP, MANGIA RH, LISBOA CV, CAMPBELL DA, COURA JR, JANSEN A, FERNANDES O. (1998). Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Int J Parasitol.* 28(1):105-12
- WHO (2005). <http://www.who.int/tdr/diseases/Chagas/files/chagas-poster.pdf>
- WOOLSEY AM, SUNWOO L, PETERSEN CA, BRACHMANN SM, CANTLEY LC, BURLEIGH BA. (2003). Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. *J Cell Sci.* 116(Pt 17):3611-22.
- YEO M, ACOSTA N, LLEWELLYN M, SANCHEZ H, ADAMSON S, MILES GA, LOPEZ E, GONZALEZ N, PATTERSON JS, GAUNT MW, DE ARIAS AR, MILES MA. (2005). Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int J Parasitol.* 35(2):225-33.
- YOSHIDA N. (2006). Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An Acad Bras Cienc.* 78(1):87-111.



8. Anexos