

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS
Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

Saloê Bispo Poubel

Regulação da expressão do gene TcSof1 em *Trypanosoma cruzi*

Tese apresentada ao Instituto Carlos Chagas
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Biociências.

Orientador (es): Prof. Dr. Bruno Dallagiovanna

CURITIBA/PR

2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

P872 Poubel, Saloê Bispo

Regulação da expressão do gene TcSof1 em *Trypanosoma cruzi* /
Saloê Bispo Poubel. – Curitiba, 2014.

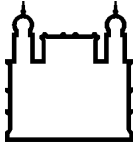
xii, 113 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) - Instituto Carlos Chagas, Pós-Graduação em
Biociências e Biotecnologia, 2014.

Bibliografia: f. 77-87

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. *Ribosome Footprinting*. 3. *RNA-seq*. 4.
Regulação da expressão gênica. I. Título.

CDD 616.9363



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Ata da Sessão Pública de exame de tese para obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia.



Ministério da Saúde
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
Instituto Carlos Chagas
Coordenação Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia e
Biotecnologia



Ata da Sessão Pública de exame de tese para obtenção do grau de **Doutora** em Biotecnologia e
Biotecnologia.

Aos 20 dias do mês de março de dois mil e quatorze, às treze horas e trinta minutos, nas dependências do Instituto Carlos Chagas/Fiocruz Paraná, reuniu-se a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biotecnologia, composta pelos Professores: Dr. Marco Krieger, Dr. Sérgio Schenkman e Dra. Sheila Nardelli, com a finalidade de julgar a tese do(a) candidato(a) **Salô Bispo Poubel**, intitulada: "**Regulação da expressão do gene TcSof1 em Trypanosoma cruzi**", sob a orientação de Bruno Dallagiovanna Muñiz, para obtenção do grau de Doutora em Biotecnologia e Biotecnologia. O(a) candidato(a) teve até 45 (quarenta e cinco) minutos para a apresentação, e cada examinador teve um tempo máximo de arguição de 30 (trinta) minutos, seguido de 30 (trinta) minutos para resposta do(a) candidato(a) ou de 60 (sessenta) minutos quando houve diálogo na arguição. O desenvolvimento dos trabalhos seguiu o roteiro de sessão de defesa, estabelecido pela Coordenação do Programa, com abertura, condução e encerramento da sessão solene de defesa feito pelo Presidente **Dr. Marco Krieger**. Após haver analisado o referido trabalho e arguido o(a) candidato(a), os membros da banca examinadora deliberaram pela:

() Aprovação da tese por unanimidade

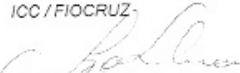
() Aprovação somente após satisfazer as exigências de modificações no prazo fixado pela banca (não superior a noventa dias).


() Reprovação da tese


Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da banca, na ordem acima determinada, e pelo(a) candidato(a).

Curitiba, 20 de março de 2014


Prof. Dr. Marco Krieger
ICC / FIOCRUZ


Prof. Dr. Sérgio Schenkman
UNIFESP


Prof. Dra. Sheila Nardelli
ICC / FIOCRUZ


Conferido com o original

Karin Goebel
Analista de Gestão em Saúde
Matrícula Sispq 1956267
Instituto Carlos Chagas - Fiocruz PR

Candidato(a):



Instituto Carlos Chagas - ICC - Fiocruz - PR
Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader, 3775 - CIC
CEP 81350 010 - Curitiba - Paraná - Brasil. Tel: +55 41 3316-3230

Aos meus pais, ao meu querido marido Jackson
e aos meus filhos Luiz Alonso e Guilherme,
pelo amor compreensão e apoio.

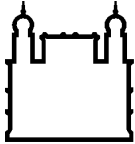
“Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocarmos nela, corre por nossa conta.”

Chico Xavier

Sumário

ABSTRACT	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> e Doença de Chagas	1
1.2 O ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	1
1.3 Metaciclogênese	3
1.4 <i>Tripomastigota</i> metacíclico	4
1.5 <i>Biologia Molecular do T. cruzi</i>	6
1.5.1 O genoma	6
1.5.2 Controle da expressão gênica	7
1.6 <i>Biogênese do ribossomo e a proteína TcSOF1</i>	12
1.7 <i>Técnicas utilizadas para análise da expressão gênica de T. cruzi</i>	16
2 OBJETIVOS:	20
2.1 <i>Objetivo Geral:</i>	20
2.2 <i>Objetivos específicos:</i>	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 <i>Cultivo do Parasita</i>	21
3.1.1 Meios de Cultura	21
3.1.2 Epimastigotas em fase logarítmica de crescimento.	21
3.1.3 <i>Tripomastigotas</i> metacíclicos.	21
3.2 <i>Clonagem e Sequenciamento de pequenos RNAs para identificação de RNA anti-sentido ao mRNA de TcSof1 .</i>	22
3.2.1 Extração dos pequenos RNAs.	22
3.2.2 Isolamento, purificação e clonagem de pequenos RNAs.	22
3.3 <i>Hibridação In Situ por Fluorescência (FISH)</i>	23
3.4 <i>Separação de Polissomos em Gradiente de sacarose</i>	24
3.5 <i>Análises de Northern blot</i>	25
3.6 <i>Análises de Western blot</i>	26
3.7 <i>Ribosome Footprinting</i>	27
3.7.1 Obtenção de RNA polissomal das formas epimastigotas e metacíclicas.	27
3.7.2 Digestão com endonuclease.	27
3.8 <i>Extração e isolamento de RNA</i>	27
3.8.1 Extração de RNA.	27
3.8.2 Isolamento dos fragmentos.	28
3.8.3 Isolamento de RNA poliA.	28
3.9 <i>Determinação da dosagem de harringtonina</i>	28
3.10 <i>Sequenciamento em larga escala</i>	29
3.10.1 Preparo do material para a reação de sequenciamento.	29
3.10.2 Reação de amplificação em emulsão.	30
3.10.3 Preparo das lâminas e reação de sequenciamento.	30
3.11 <i>Análises Bioinformáticas</i>	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 <i>Isolamento e análise de pequenos RNAs não codificadores em formas metacíclicas de T. cruzi.</i>	32
4.2 <i>Estudo do tradutoma de T. cruzi :</i>	39
4.3 <i>Qualidade das sequências:</i>	44
4.4 <i>Análise da Reprodutibilidade Biológica</i>	52
4.5 <i>Alinhamentos das leituras frente ao genoma de referência.</i>	54
4.6 <i>Análise de expressão genica ao longo da metaciclogênese de T. cruzi</i>	61

<i>4.7 Identificação de genes associados a polissomos com regulação negativa da tradução.</i>	62
<i>4.8 Análise do gene de TcSof1 e dos genes TcImp3, TcImp4 e TcDhr1 após tratamento com a droga harringtonina.</i>	71
5 CONCLUSÃO	76
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	77
Anexo 1. Publicação	89
Anexo 2. Perfil de sedimentação dos mRNAs em gradiente de sacarose.	92
Anexo 3. Representação gráfica da qualidade média por base dos dados.	93
Anexo 4. Mapeamento das leituras ao longo dos genes.	103
Anexo 5. Análise das sequências do mapeamento dos transcritos de TcSof1, TcImp3, TcImp4	107



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

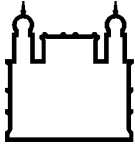
Regulação da expressão do gene TcSof1 em *Trypanosoma cruzi*

Saloê Bispo Poubel

O *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da Doença de Chagas. O controle da expressão de genes é fundamental para gerar as mudanças morfológicas durante o ciclo de vida do parasita. Entretanto, os tripanosomatídeos possuem peculiaridades quanto a sua biologia molecular, como por exemplo, a transcrição policistrônica e a ausência de promotores definidos para a RNA polimerase II. Acredita-se, portanto, que grande parte da regulação da expressão gênica nestes parasitas ocorra em nível pós-transcricional por mecanismos que envolvem mudanças na estabilidade e no acesso dos mRNAs aos polissomos. Estudos prévios do nosso grupo mostraram que alguns mRNAs que codificam proteínas do complexo proceossomo (SSU) em *T. cruzi* são mais abundantes em tripomastigotas metacíclicos que em epimastigotas. No entanto, apesar da grande quantidade de mRNAs da proteína TcSof1 nas formas infectantes, o mRNA de TcSof1, esta imobilizado dentro dos polissomos e não é traduzido. O sequestro de mRNA dentro polissomos é uma maneira de bloquear a tradução, sugerindo um mecanismo de regulação negativa da tradução, provavelmente nas etapas de alongação e terminação.

O objetivo do nosso trabalho foi caracterizar os mecanismos de regulação da expressão gênica envolvidos na expressão negativa do gene de TcSof1 na forma tripomastigota metacíclica de *T. cruzi*. Primeiramente isolamos e analisamos mais de 500 RNAs pequenos na forma metacíclica que pudessem estar regulando negativamente a tradução de TcSof1. Embora, nenhum RNA regulador tenha sido identificado, uma grande população de fragmentos de tRNAs foi encontrada. Sua participação na maquinaria de tradução ativa foi excluída, uma vez que os mesmos não foram detectados associados aos polissomos ou ribossomos.

Padronizamos e empregamos a técnica de *Ribosome Footprinting* para a análise da eficiência de tradução em *T. cruzi*, avaliando a população de mRNA total e os mRNA que estavam associados aos ribossomos, provenientes da forma metacíclica. Os resultados mostraram que de aproximadamente 9.000 genes presentes nesta etapa do ciclo de vida, apenas 4.241 estavam associados aos ribossomos nas amostras do *footprinting*, ao contrário do que foi visto na forma epimastigota, onde dos 9.000 genes presentes 7.419 genes estavam associados aos polissomos. Este resultado indica que quase a metade dos genes transcritos nas formas tripomastigotas estão sendo regulados negativamente, provavelmente em nível de tradução. Confirmamos com esta técnica a presença do mRNA de TcSof1 associado aos polissomos na forma metacíclica mesmo sem haver expressão da proteína nesta forma, e outros genes que apresentam o mesmo padrão de expressão também foram analisados. Através do tratamento dos parasitas com a droga harringtonina, um inibidor da tradução, seguido das análises por *Ribosome Footprinting*, foi possível evidenciar um acúmulo de ribossomos nos locais de início da tradução da maioria dos mRNAs mostrando que a droga bloqueia os ribossomos no sítio de início da tradução. Pelo contrário, o mRNA de TcSof1 apresentou marcas de ribossomo ao longo de toda a região codificante do gene nas formas metacíclicas, sugerindo que os ribossomos estão parados na etapa de alongação da tradução. Este resultado confirmou que a ausência de expressão desta proteína nesta etapa do ciclo de vida do parasita, é controlada em nível de tradução por um mecanismo de parada dos ribossomos nos polissomos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

TcSof1 gene expression regulation in *Trypanosoma cruzi*

ABSTRACT

Saloê Bispo Poubel

Trypanosoma cruzi is the etiologic agent of Chagas disease. The parasite alternates between different morphological and functional forms during its life cycle. Control of gene expression is key to generate the morphological changes during the life cycle of the parasite. However, trypanosomatids display very peculiar cellular processes, as polycistronic transcription and the lack of canonical RNA II polymerase promoters. Therefore, gene expression regulation occurs mainly at the posttranscriptional level by mechanisms that involve changes in the stability of mRNAs and their access to polysomes. Previous studies from our group have shown that some mRNAs, which encode proteins of the processome complex (SSU) in *T. cruzi*, are more abundant in metacyclic trypomastigote than in epimastigote stages. However, even though a greater amount of TcSof1 mRNA is observed in the infective forms and is associated with the polysomes it is not translated. Trapping the mRNA in polysomes is a way to block translation, suggesting a mechanism of translation down-regulation, probably during the elongation and termination stages.

The aim of our study was to characterize the mechanisms of gene expression regulation involved in the negative expression of TcSof1 gene in the metacyclic stage of *T. cruzi*. First, we isolated and analyzed more than 500 small RNAs in the metacyclic form that could be negatively regulating the translation of TcSof1 gene. Although no regulatory RNA was identified, a large population of tRNAs fragments was found. Their association to the active translation machinery was excluded, since they were not detected in association with polysomes or ribosomes.

After that, we standardized and applied the Ribosome Footprinting technique to analyze translation efficiency in *T. cruzi*, and to assess which mRNAs were protected by ribosomes in the metacyclic form. Our results showed that from some 9,000 genes present in this life cycle stage, only 4,241 were associated with ribosomes. On the other hand, in epimastigote forms from 9,000 genes present, 7,419 genes were associated with polysomes. This indicates that almost half of the transcribed genes in metacyclic trypomastigotes are being negatively regulated, probably at translation level. Through the ribosome profiling technique we confirmed our previous results and showed that TcSof1 mRNA is associated to metacyclic polysomes though the protein is not expressed in this form. Similarly, other genes that have the same TcSof1 expression pattern were also analyzed.

By treating parasites with harringtonine, an inhibitor of translation, followed by Ribosome Footprinting analysis, it was possible to show an accumulation of ribosomes at the initiation translation sites of most mRNAs. We could observe the presence of ribosome footprints along the coding region of TcSof1 gene in metacyclic forms, suggesting that ribosomes are stalled onto the mRNA. This result confirms that the absence of protein expression at this stage is controlled at the translation level by a mechanism that stalls the ribosomes on the mRNA.

LISTA DE ABREVIATURAS

‰: porcentagem

ARE: elementos ricos em AU (AU rich elements)

ATP: adenosina trifosfato

BLAST: ferramenta de comparação de sequências do banco de dados Genbank (BasicLocal Alignment Tool)

cDNA: DNA complementar

DNA: ácido desoxirribonucleico

DNase: desoxirribonuclease

dNTP: desoxiribonucleotídeos trifosfato

FC: fold change

FISH: hibridação fluorescente in situ

g: aceleração da gravidade

HCl: ácido clorídrico

kb: quilobase

KCl: cloreto de potássio

kDNA: DNA do cinetoplasto

LB: meio de cultura Luria-Bertani

LIT: meio de infusão de fígado e triptose (liver infusion triptose)

M: molar

mg: miligrama

MgCl₂: cloreto de magnésio

mL: mililitro

mM: milimolar

MOPS: ácido propanosulfônico (3-N-Morfolino)

mRNA: RNA mensageiro

NaCl: cloreto de sódio

NCBI: National Center of Biotechnology Information

ng: nanograma

°C: graus Célsius

ORF: região de leitura aberta

P-bodies: corpos de processamento (processing bodies)

PBS: tampão fosfato-salina
PHRED Phil's Read Editor
PCR: reação em cadeia da polimerase
pH: potencial hidrogeniônico
RNA: ácido ribonucléico
RNase: ribonuclease
rpm: rotações por minuto
SDS: sódio dodecil sulfato
SFB: soro fetal bovino
SSC: tampão citrato-salino
TAU: meio urina artificial de triatomíneo
Tris: hidroximetil aminoetano
UTR: região não traduzida
 μg : micrograma
 μL : microlitro
 μm : micrômetro
mM: milimolar

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de reads geradas após sequenciamento.....	44
Tabela 2. Relação entre valor PHRED e probabilidade de erro na determinação de uma base.....	50
Tabela 3. A tabela mostra o número total de sequências geradas após o <i>trimming</i> para eliminar sequências de baixa qualidade e sequências correspondentes aos adaptadores.....	54
Tabela 4. Sequências mapeadas utilizando o genoma <i>T. cruzi</i> haplóide Esmeraldo-Like.....	56
Tabela 5. Sequências mapeadas utilizando o genoma <i>T. cruzi</i> haplóide Esmeraldo-Like.....	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
Figura 1.2: Visão geral de uma forma tripomastigota metacíclica observada com um microscópio eletrônico de alta voltagem (Ferreira et al., 2008).....	5
Figura 1.3: Modelo proposto por Granneman e colaboradores para a montagem e processamento de pré-ribossomos em <i>S. cerevisiae</i>	14
Figura 1.4: Esquema das principais etapas do protocolo de <i>Ribosome Footprinting</i> , conforme descrito no Ingolia et al 2009.....	18
Figura 4.1: Ensaio de <i>Northern blot</i> para análise de pequenos RNAs de sequência anti-sentido a região 3' UTR do gene de TcSof1.....	32
Figura 4.2: Porcentagem de pequenos RNAs de 20-70 nucleotídeos obtidos nas formas epimastigotas e metacíclicas.....	34
Figura 4.3: Localização subcelular de fragmentos de tRNAs nas formas tripomastigotas metacíclicas.....	36
Figure 4.4: Análise da associação de tsRNAs com polissomos.....	38
Figura 4.5: Testes de padronização da técnica de <i>Ribosome Footprinting</i> em <i>T. cruzi</i>	41
Figura 4.6: Perfil Eletroforético das bibliotecas de cDNA obtidas a partir dos fragmentos purificados pela técnica de <i>Ribosome Footprinting</i> em <i>T. cruzi</i>	43
Figura 4.7: Representação gráfica da qualidade média por base.....	46
Figura 4.8: Gráfico de distribuição por tamanho das sequências.....	47
Figura 4.9: Os cinco 5mers mais sobre-representados.....	48
Figura 4.10: Frequência de cada base ao longo da leitura.....	49
Figura 4.11: Gráfico representativo do valor de qualidade Phred.....	51
Figura 4.12: Gráfico de correlação de Pearson.....	53
Figura 4.13: Mapeamento das leituras ao longo do gene de alfa tubulina obtidos pela técnica de <i>Ribosome Footprinting</i>	57
Figura 4.14: Mapeamento das leituras ao longo do gene de TcSof1 obtidos pela técnica de <i>Ribosome Footprinting</i>	58

Figura 4.15: Mapeamento das leituras ao longo do gene de TcSof1 obtidos pela técnica de <i>Ribosome Footprinting</i> na forma metacíclica de <i>T. cruzi</i>	59
Figura 4.16: Análise de expressão de <i>T. cruzi</i> nas formas epimastigotas e metacíclicas.....	62
Figura 4.17: Curvas de crescimento de <i>T. cruzi</i> na presença de diferentes concentrações de harringtonina.....	63
Figura 4.18: Análise do perfil de polissomos da forma epimastigota de <i>T. cruzi</i> tratada com Harringtonina.....	66
Figura 4.19: Análise do perfil de polissomos da forma metacíclica de <i>T. cruzi</i>	68
Figura 4.20: Alinhamento das leituras obtidas pela técnica de <i>Ribosome Footprinting</i> nas formas metacíclicas de <i>T. cruzi</i> tratadas com cicloheximida e harringtonina.....	69
Figura 4.21: Alinhamento das leituras obtido pela técnica de <i>Ribosome Footprinting</i> nas formas metacíclicas de <i>T. cruzi</i> tratadas com cicloheximida e harringtonina.....	71
Figura 4.22: Mapeamento das leituras ao longo do gene de TcSof1 obtidos pela técnica de <i>Ribosome Footprinting</i> tratadas com harringtonina.....	72
Figura 4.23: Mapeamento das leituras ao longo do gene de TcDhr1 obtidos pela técnica de <i>Ribosome Footprinting</i> tratadas com cicloheximida e harringtonina.....	73
Figura 4.24: Análise das sequências do perfil de expressão do transcrito de TcDhr1 obtido com a técnica de <i>Ribosome Footprinting</i> na forma metacíclica de <i>T. cruzi</i> tratada com harringtonina.....	74

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas

A tripanossomíase americana ou doença de Chagas, nomeada assim após a descoberta da doença, em 1909, pelo médico brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, é uma zoonose causada pelo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*).

O DNA do parasita foi encontrado em tecidos de múmias de civilizações pré-colombianas, existindo portanto registros de *T. cruzi* em amostras de tecido humano há pelo menos 4.000 anos (Guhl *et al.*, 1997).

A área de transmissão enzoótica abrange principalmente a América Latina e México. No entanto, nas últimas décadas, a doença de Chagas tem sido cada vez mais detectada nos Estados Unidos da América, Canadá, Japão e alguns países da Europa. Isto é devido principalmente a mobilidade da população entre a América Latina e o resto do mundo (Brener *et al.*, 2000; WHO, 2014).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, cerca de 7 a 8 milhões de pessoas são infectadas em todo o mundo, principalmente na América Latina onde a doença de Chagas é endêmica. O custo do tratamento para a doença de Chagas continua sendo substancial. Só na Colômbia, o custo anual dos cuidados médicos para todos os pacientes com a doença foi estimado em cerca de 267.000 mil dólares. Além disso, a pulverização de inseticidas para controle de vetores custa quase 5 milhões de dólares por ano (WHO, 2014, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>).

T. cruzi pertence a família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida, e apresenta uma estrutura especial, denominada de cinetoplasto ou kDNA, uma extensão da mitocôndria única que contem entre 15 e 30% do DNA total do parasita. (Ferreira *et al.*, 2003). Além do cinetoplasto, outras estruturas peculiares estão presentes, como os reservossomos, microtúbulos subpeliculares, e glicossomos (Michels *et al.*, 2006).

1.2 O ciclo de vida do *T. cruzi*

O *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida complexo, envolvendo três estágios de desenvolvimento morfológico e funcionais bem definidos: epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas. As formas epimastigotas replicam-se no intestino

médio do inseto hospedeiro e diferenciam-se em formas tripomastigotas metacíclicas. (De Souza, 1984). A forma tripomastigota metacíclica (não replicativa) é encontrada na porção distal do intestino dos triatomíneos infectados (hemíptero da família Reduviidae) e são consideradas infectantes aos hospedeiros vertebrados. Estas são eliminadas nas fezes e urina do inseto vetor, sendo transmitidos aos seres humanos e demais mamíferos hospedeiros através das mucosas, da conjuntiva ou de lesões de descontinuidade na pele (Ferreira *et al.*, 2003).

Uma vez na corrente sanguínea, os parasitas são fagocitados por células do sistema mononuclear fagocitário ou penetram ativamente em células sem grande capacidade fagocitária (Brener *et al.* 2000).

Quando os tripomastigotas penetram em células não-fagocitárias, como as musculares ou nervosas, não ocorre a formação de projeções citoplasmáticas na célula hospedeira que caracterizam a fagocitose. A adesão do parasita a receptores de membrana da célula hospedeira atrai lisossomos dessa célula para o pólo a ser invadido. A mobilização de lisossomos resulta da ativação de vias de sinalização intracelular dependentes de cálcio, bem como da ativação de receptor para a citocina TGF-B, presente na célula hospedeira (Burleigh e Andrews, 1998). As principais moléculas de superfície dos tripomastigotas envolvidas no processo de adesão e penetração nas células hospedeiras pertencem à família da transialidade. Esta catalisa a transferência de resíduos de ácido siálico para a superfície do parasita, onde, desempenham um importante papel durante a invasão celular (Schenckman *et al.*, 1993).

Dentro das células hospedeiras, os tripomastigotas podem ser encontrado no interior de um vacúolo, denominado vacúolo parasitóforo. Imediatamente inicia um processo de transformação para a forma amastigota. O baixo pH é ideal para a ação coordenada de enzimas de *T. cruzi*, como a Tc-Tox e a transialidade, que lisam esses vacúolos. Desta forma, os amastigotas, depois de uma ou duas horas de permanência no vacúolo ácido, escapam para o citossol das células hospedeiras, onde começam a multiplicar-se (Brener *et al.* 2000).

Ao final de diversas etapas de multiplicação por fissão binária, inicia-se um processo quase que sincrônico de transformação das formas amastigotas em tripomastigotas sanguíneos. Logo que as formas adquirem um flagelo mais longo, iniciam um movimento intenso, que, aparentemente é o responsável pela rotura da célula hospedeira, liberando centenas de tripomastigotas sanguíneos que se

disseminam por via hematogênica, invadindo novas células. Estas podem ser fagocitadas ou penetrar ativamente na célula hospedeira como citado anteriormente. Esta forma também podem ser ingeridas pelo inseto vetor onde se diferenciam na forma epimastigota completando o ciclo como exemplificado na figura 1.1 (Burleigh e Andrews, 1998; Ferreira *et al.*, 2003; CDC.gov 2013).

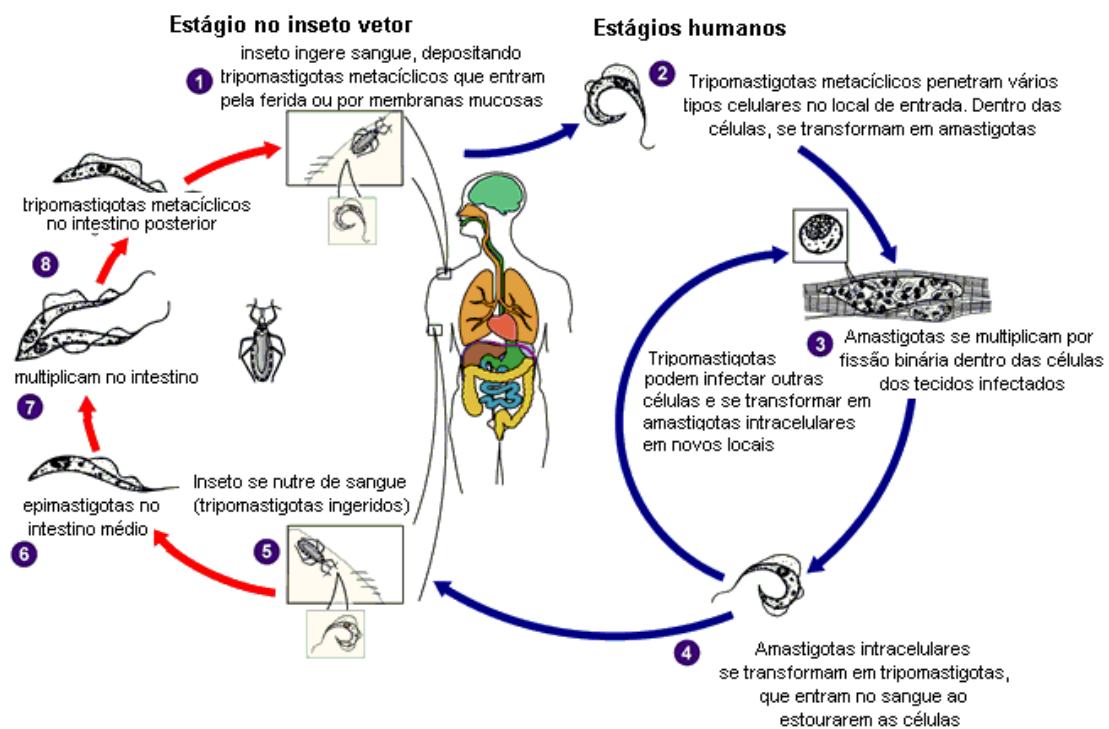


Figura 1.1: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. (Fonte: www.dpd.cdc.gov/dpdx).

1.3 Metaciclogênese

A metaciclogênese é o processo de diferenciação das formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas. Ocorre naturalmente no intestino do inseto vetor, quando as formas epimastigotas submetidas a estresse nutricional aderem ao epitélio do reto do inseto vetor diferenciando-se em tripomastigotas metacíclicas (De Souza, 1984).

O processo de metaciclogênese pode ser mimetizado *in vitro* utilizando-se meio quimicamente definido, o qual simula as condições da urina do inseto vetor (Contreras *et al.*, 1988). Dessa forma, a metaciclogênese *in vitro* torna-se um importante modelo para o estudo das alterações morfológicas, metabólicas e de expressão gênica que ocorrem durante a diferenciação do parasita (Goldenberg *et al.*,

1985).

Nesse processo, as formas epimastigotas cultivadas até a fase estacionária de crescimento são incubadas no meio TAU (*Triatomine Artificial Urine*), um meio sem qualquer fonte de carbono, a fim de causar um estresse nutricional no parasita e disparar a diferenciação. Em seguida, os parasitas são transferidos para o meio TAU3AAG (*Triatomine Artificial Urine* enriquecido com prolina, glutamina, aspartato, e glicose) a 28 °C. Os epimastigotas aderem - se a superfície do frasco de cultura, através do flagelo e indiretamente por interdigitações com outros parasitas, mimetizando o que ocorre no intestino do inseto. Esta fase é de grande importância para que o processo de diferenciação se conclua. Após aproximadamente 96 horas, os parasitas já diferenciados, desadere do frasco de cultura, ficando livre no sobrenadante (Goldenberg *et al.*, 1987; Bonaldo *et al.*, 1988; Contreras *et al.*, 1988; Kollien *et al.*, 1998).

1.4 Tripomastigota metacíclico

Tripomastigotas metacíclicos possuem particularidades em sua morfologia que os diferem das formas replicativas, tais como, forma alongada, cinetoplasto arredondado localizado na região posterior ao núcleo e um flagelo emergindo da bolsa flagelar que se localiza lateralmente na região posterior do parasita. O flagelo se adere ao longo do corpo do parasita a través de uma membrana flagelar, tornando-se livre na região anterior (Brener *et al.*, 2000).

Nas formas replicativas, o núcleo apresenta-se esférico, com poucas regiões de heterocromatina e com um nucléolo grande. Já nas formas tripomastigotas, o núcleo apresenta-se alongado, com várias regiões de heterocromatina e sem nucléolo.

Os níveis de compactação da cromatina, observados ao longo do ciclo celular do *T. cruzi*, estão associados aos padrões de transcrição. Desta forma, quanto mais heterocromatina, menor os níveis de transcrição (Elias *et al.*, 2001).

A utilização de várias abordagens para o estudo do processo de diferenciação da forma epimastigota para a forma tripomastigota metacíclica têm mostrado que este processo ocorre gradualmente, resultado da modulação no perfil de expressão gênica

(Contreras *et al.*, 1985; Goldenberg *et al.*, 1985). Ferreira e colaboradores (2008) analisando a presença da RNA polimerase II e a atividade transcricional em metacíclicos e observaram que a presença da enzima e a atividade transcricional permanecem inalteradas durante todas as etapas da metaciclogênese, diminuindo apenas quando as formas metacíclicas são formadas. Isso sugere que a diferenciação requer uma atividade transcricional, necessária para uma intensa remodelação da célula, que acontece até o cinetoplasto e o flagelo atingirem uma posição posterior no corpo do tripomastigota metacíclico. Durante a metaciclogênese, a expressão de vários genes é regulada em nível pós-transcricional, através da mobilização de sequências de mRNA para os polissomos como ocorre, por exemplo, com os genes envolvidos no processamento de RNA ribossomal (Ávila *et al.*, 2001; Fragoso *et al.*, 2003; Nardelli *et al.*, 2007).



Figura 1.2: Visão geral de uma forma tripomastigota metacíclica observada com um microscópio eletrônico de alta voltagem (Ferreira *et al.*, 2008).

1.5 Biologia Molecular do *T. cruzi*

1.5.1 O genoma

O genoma nuclear do *T. cruzi*, tal como ocorre com os outros eucariotos, é composto por sequências de DNA que podem ser agrupadas em 3 classes majoritárias: sequências codificadoras de proteínas, de RNAs e sequências repetitivas (Brener *et al.* 2000).

O genoma de *T. cruzi* juntamente com o genoma de outros tripanossomatídeos causadores de doenças tropicais importantes, entre eles *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major*, foram sequenciados em 2005, por um consórcio internacional, utilizando a estratégia de WGS “Whole Genome Shotgun”. O tamanho do genoma está em torno de 106,4-110,7 Mb, maior do que o que foi descrito anteriormente pela técnica de eletroforese em campo pulsante (*Pulsed-field gel electrophoresis*, PFGE) (Berrimam *et al.*, 2005; El-Sayed *et al.*, 2005; Ivens *et al.*, 2005). A cepa escolhida como referência para o projeto genoma foi a CL Brener, uma linhagem híbrida classificada como pertencente ao grupo VI do *T. cruzi* (Zingales *et al.*, 2009).

Foram identificados aproximadamente 22.570 genes codificadores de proteínas, sendo que desses, 6.159 representam alelos presentes no haplótipo do tipo Esmeraldo, 6.043 representam alelos provenientes de haplótipo do tipo não-Esmeraldo, e 10.368 representam sequências que não puderam ser relacionadas a nenhum haplótipo em particular. Mais de 50% deste genoma é composto por sequências repetitivas, principalmente de retrotransposons, RHSs (*retrotransposon hot spot proteins*), que podem estar agrupadas em grandes clusters frequentemente encontradas em regiões subteloméricas. Estes fragmentos repetitivos, juntamente com a natureza híbrida da cepa escolhida para o projeto, dificultaram o processo de montagem do genoma tornando o mesmo muito trabalhoso (El-Sayed *et al.*, 2005 a). O genoma do *T. cruzi* tem a tendência de apresentar genes duplicados e agrupados em tandem, esta característica pode estar relacionada a um processo evolutivo de adaptação genética (Silveira, 2000). Outro fato que chama atenção no genoma deste parasita é a rara presença de genes com sequências intrônicas, como é o caso do gene da enzima poli-A polimerase. (Simpson *et al.*, 2006). Após a publicação do genoma, Weatherly e colaboradores (2009) apresentaram a montagem dos cromossomos de *T. cruzi* na qual eles propõem a existência de 41 cromossomos, sendo que a maioria ocorre aos pares,

mas não descartando a possibilidade da existência de cromossomos presentes em uma única cópia ou em cópias múltiplas (Cano *et al.*, 1995). Outro fato peculiar aos tripanossomatídeos é a ausência de condensação cromossômica, apesar do cariótipo ser estável nas diferentes formas evolutivas (Aymerich e Goldenberg, 1989).

Após as análises do genoma pelo grupo de El-Sayed em 2005, uma nova e grande família multigênica denominada MASP (*mucin-associated surface protein*) foi identificada. Assim, 18% dos genes codificam proteínas de superfície tais como as associadas à mucina (MASP), trans-sialidades (TS), e a glicoproteína de superfície gp63, as quais são geralmente específicas deste parasita (El-Sayed *et al.*, 2005).

Paralelo à publicação do genoma, Atwood e colaboradores (2005) publicaram a análise proteômica das diferentes fases do ciclo de vida do *T. cruzi*. Com este trabalho foi possível identificar 2.784 proteínas diferencialmente expressas durante o ciclo de vida do parasita, das quais 36% são proteínas hipotéticas. Neste trabalho, os autores não identificaram proteínas unicamente expressas na forma metacíclica. Em contrapartida, algumas proteínas expressas nas outras formas do ciclo de vida, não foram observadas na forma metacíclica, evidenciando a complexidade da expressão gênica do parasita.

1.5.2 Controle da expressão gênica

Os tripanosomatídeos divergiram cedo da linhagem evolutiva que originou os demais eucariotos, apresentam características biológicas únicas tais como, a transcrição policistrônica, a ausência de sequências promotoras típicas para a RNA polimerase II e o fato de genes presentes na mesma unidade policistrônica, com funções geralmente não relacionadas, apresentarem níveis de mRNA processado distintos. O processamento dos RNAs mensageiros ocorre por *trans-splicing* e poliadenilação. No processo de *trans-splicing* uma sequência conservada de 39 nucleotídeos denominada de sequência líder (*spliced leader* - SL) ou mini-éxon, é adicionada na extremidade 5' de cada gene, com a adição simultânea da cauda Poli-A nas extremidades 3'. Além disso, como regra geral, em tripanosomatídeos raros genes apresentam sequências intrônicas. Uma exceção é o gene da enzima poli-A polimerase que apresenta um íntron que é removido por *cis-splicing*. (Muhich e Boothroyd, 1988; Bruzik *et al.*, 1988; Vickerman, 1994; Harris, Jr. *et al.*, 1995;

Clayton, 2002; Simpson *et al.*, 2006).

Os três tipos de RNA polimerases (RNA pol I, RNA pol II e RNA pol III), descritos em eucariotos superiores, já foram identificados em tripanossomatídeos através de similaridades estruturais (Palenchar e Bellofatto, 2006; Das *et al.*, 2008;). A RNA polimerase I transcreve os genes que codificam os RNAs ribossomais, com exceção do rRNA 5S; a RNA polimerase II transcreve os genes que são traduzidos em proteínas; e a RNA polimerase III, transcreve pequenos RNAs, tais como tRNAs e o rRNA 5S. Entretanto, não foram identificadas sequências promotoras canônicas para a RNA polimerase II, com a exceção do gene do mini-éxon (SL-RNA) (Gillinger e Bellofatto, 2001).

Desta forma, os tripanossomatídeos parecem ter perdido a capacidade de regular sua transcrição, e a regulação da expressão gênica ocorre predominantemente por mecanismos pós-transcricionais em nível de metabolismo de mRNAs e proteínas. Entre os processos conhecidos podemos destacar, adição da cauda poli-A e mini-éxon (SL) nos pré-mRNAs, transporte dos mRNAs do núcleo ao citoplasma, controle da estabilidade dos mRNAs maduros e acesso dos mRNAs à maquinaria de tradução (Clayton, 2002; Ávila *et al.*, 2003; Serpeloni *et al.*, 2011).

São conhecidos poucos exemplos de genes que são regulados em nível de processamento de pré-mRNA em tripanossomatídeos. Kapotas e Bellofatto (1993) propuseram uma relação entre a maquinaria de *splicing* e tradução para tentar explicar a expressão reduzida da proteína fosfoglicerato quinase A (PGKA) nas duas formas evolutivas do *T. brucei*. Os genes de PGKA, PGKB, PGKC são transcritos na mesma unidade policistônica, entretanto, apresentam diferenças nos níveis finais de expressão, com redução de PGKA. Os autores propõem que a diferença no nível de expressão pode estar relacionada à baixa eficiência de adição do mini-éxon (SL) ao sítioceptor de *splicing* (SAS) devido a uma diferença no padrão da sequência de pirimidina na região intergênica do gene da PGKA.

A via de exportação de mRNA a partir do núcleo é mal compreendida em tripanossomatídeos. Serpeloni e colaboradores (2011) caracterizaram funcionalmente o gene Sub2, o qual faz parte do complexo TREX de exportação de mRNAs em *T. cruzi*. Através de experimentos de interferência de RNA do gene Sub2 de *T. brucei*, os autores demonstraram que a ausência da proteína Sub2 promove o acúmulo de mRNA no núcleo e a diminuição dos níveis de tradução, indicando seu papel como componente da via de exportação/transcrição de mRNAs em tripanossomatídeos.

Outra forma de regulação da expressão gênica é através do controle da estabilidade dos mRNAs maduros. Estudos têm demonstrado que a abundância do mRNA em estágios específicos do ciclo de vida ocorre por estabilidade diferencial desses mRNAs e não por aumento do nível de transcrição do gene (Teixeira *et al.*, 1999; Coughlin *et al.*, 2000; Bartholomeu *et al.*, 2002; Yamada-Ogatta *et al.*, 2004; Da Silva *et al.*, 2006; Gentil *et al.*, 2009). Uma forma de modular a estabilidade e/ou a eficiência de tradução dos mRNAs, envolve a presença de sequências regulatórias nas regiões não traduzidas dos transcritos. Isso ocorre através da interação entre fatores regulatórios, ou elementos em *trans*, e sequências específicas nestas regiões conhecidas como elementos em *cis*. Holtz e colaboradores (1997) analisaram possíveis sequências regulatórias no mRNA de uma das principais glicoproteínas de superfície da forma procíclica de *T. brucei*, a PARP (*procyclic acidic repetitive protein*), e constataram que a abundância do mRNA de PARP é fortemente regulada pela presença de uma sequência de polipirimidina conservada na região 3' – UTR de todos os genes de PARP. Esta sequência reduz a estabilidade do RNA diminuindo a tradução da proteína nas formas sanguíneas do parasita.

Da mesma forma, Teixeira e colaboradores (2003) utilizaram ensaios com gene repórter para investigar o papel de elementos na região 3'-UTR do mRNA da amastina, que é mais abundante na forma amastigota do que na forma epimastigota. Para isso, os autores utilizaram a sequência da 3'-UTR do gene da amastina fusionada ao gene da luciferase e transfectando nas formas epimastigota e amastigota mostraram que a luciferase foi muito mais expressa na forma amastigota do que na forma epimastigota, mostrando o importante papel destas regiões na regulação de transcritos específicos. Em 2006, Da Silva e colaboradores mostraram que sequências reguladoras presentes na região 3'-UTR do mRNA de tubulina de *T. cruzi* estão envolvidas na modulação da estabilidade destes transcritos, o que ocorre em resposta à alteração na dinâmica dos microtúbulos no parasita.

Uma vez que o mRNA maduro tenha sido transportado para o citoplasma a forma mais comum de regular os níveis protéicos em eucariotos é pelo controle da etapa inicial da tradução. A tradução é iniciada por dois mecanismos bem caracterizados: a tradução dependente do cap 5', e a independente do cap 5'. A iniciação independente do cap é mediada por elementos regulatórios em *cis* que funcionam como sítio interno de entrada dos ribossomos (IRES) (Holcik e Sonenberg *et al.*, 2000). O mecanismo canônico dependente do cap 5', inicia-se a partir da

ligação do complexo ternário eIF4F (eIF4E, eIF4A, e eIF4G), via eIF4E, ao cap presente na extremidade 5' do mRNA e a ligação das proteínas PABP (*poliA binding protein*) na cauda de poli(A), promovendo a circularização do mRNA (Kapp *et al.*, 2003). A circularização aumenta a tradução devido ao reenvio dos ribossomos que já terminaram a tradução para a região 5', facilitando o reinício da síntese. Paralelo a isso ocorre a formação do complexo de pré-iniciação 43S, onde a subunidade 40S se associa ao complexo ternário (eIF2-GTP-tRNAⁱ Met) e aos fatores eIF1, eIF1A, eIF5 e eIF3. Posteriormente a esta ligação, o complexo 48S é formado pelas interações entre eIF4G e eIF3 (Sonenberg *et al.*, 2003; Kapp *et al.*, 2003).

O posicionamento do metionil-tRNA Met no sítio P (peptidil) do complexo 48S leva ao recrutamento da subunidade ribossomal 60S, e a formação do complexo 80S, dando início ao processo de alongação da tradução (Kapp *et al.*, 2003; Sonenberg *et al.*, 2009).

Em tripanossomatídeos, seis possíveis homólogos para o fator de iniciação eIF4E já foram identificados, em *Leishmania*, esses homólogos seriam capazes de interagir com o *cap* de tripanossomatídeos, uma vez que este é diferente do *cap* dos outros eucariotos (Dhalia *et al.*, 2005; Yoffe *et al.*, 2006; Clayton *et al.*, 2007). Para os fatores eIF4A e eIF4G, foram encontrados homólogos em *L. major* e *T. brucei* (Dhalia *et al.*, 2005; Dhalia *et al.*, 2006).

A fosforilação das 4E-BPs é um mecanismo regulador importante da síntese de proteínas. As 4E-BPs são proteínas que competem com o fator eIF4G pela ligação ao fator eIF4E, bloqueando assim a montagem do complexo eIF4F reprimindo o início da tradução. Na forma hipofosforilada, as proteínas 4E-BPs têm maior afinidade pelo eIF4E, sendo assim, quando hiperfosforiladas não se ligam ao eIF4E e o início da síntese protéica é favorecido (revisado por Kong e Lasko, 2012).

Outra forma de regular a tradução é pela fosforilação de eIF2 (complexo ternário). A disponibilidade de eIF2-GTP é determinada pela atividade de eIF2B, quando a serina 51 deste fator está fosforilada ocorre um aumento da afinidade entre eIF2-GDP e eIF2B. Com isso, não ocorre a troca de GDP por GTP e consequentemente resulta na redução do complexo ternário acarretando uma queda global da iniciação da tradução (Sonenberg *et al.*, 2003).

Em tripanossomas, foram caracterizadas três quinases potenciais para eIF2 (eIF2K1, K2 e K3) que são capazes de fosforilar a serina 51 do eIF2 de levedura e mamífero (Moraes *et al.*, 2007). Chow e colaboradores (2011) estudando o papel do

fator eIF2 alfa em *Leishmania infantum*, demonstraram que a fosforilação deste fator desempenha um papel importante na diferenciação das formas promastigotas em amastigotas. Já em *T. cruzi* a fosforilação do eIF2 alfa é necessária para a diferenciação das formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas (Chow *et al.*, 2011).

Outra etapa importante na regulação da expressão gênica é a etapa de alongação da tradução, sendo extremamente conservada entre procariotos e eucariotos. O fator de alongação eucariótico eEF1A, na sua forma eEF1A-GTP, liga-se a um tRNA aminoacilado correspondente ao segundo códon do mRNA e o posiciona no sítio A (aminoacil). Esse evento leva à hidrólise do GTP e desligamento do eEF1A do ribossomo, permitindo a total acomodação do tRNA aminoacilado no sítio A. Rapidamente, o sítio catalítico ribossomal PTC (*Peptidyl Transferase Center*) leva à formação da ligação peptídica (Alberts, 2010). As proteínas TbRACK1 de *T. brucei*, homólogas a RACK1 (*Receptor for Activated C-Kinase 1*) de eucarioto, já foram associadas a regulação de uma série de atividades celulares através da interação com o fator eEF1A inibindo a tradução (Regmi *et al.*, 2008).

A translocação do tRNA do sítio A para o sítio P e do tRNA do sítio P para o sítio E requer a ação de um segundo fator de alongação, o eEF2. Este só pode se ligar ao ribossomo quando associado a GTP. Depois da reação da peptidil-transferase o deslocamento do tRNA do sítio A expõe um sítio de ligação para o eEF2 na porção do sítio A situada na subunidade maior. Ao se ligarem, eEF2 e GTP interagem como centro de ligação de fator da subunidade maior o que estimula a hidrólise de GTP. Esta hidrólise altera a conformação do eEF2, permitindo-lhe alcançar a subunidade menor e desencadear a translocação do tRNA do sítio A. Após a translocação completa do ribossomo, a afinidade da estrutura ribossômica resultante pelo eEF2 é drasticamente reduzida culminando na liberação do fator de alongação e resultando na translocação do tRNA, bem como no deslocamento do mRNA em exatamente três pares de bases (Watson *et al.*, 2006).

A fosforilação de eEF2 pela quinase eEF2K é um potente inibidor da tradução na fase da alongação (Carlberg *et al.*, 1990; Kong *et al.*, 2012).

Em tripanosomatídeos, já foi identificado um grande número de possíveis proteínas quinases que poderiam atuar no controle da atividade protéica por fosforilação ou desfosforilação do fator eEF2 (Parsons *et al.*, 2005).

O acesso dos mRNAs aos polissomos e o controle em nível de tradução, seja nas

etapas de iniciação, alongação ou terminação, podem ser mecanismos explorados pelos tripanossomatídeos para regular sua expressão gênica.

Assim, a análise comparativa dos mRNAs presentes nas frações polissomais e não polissomais das diferentes formas do ciclo de vida é importante para a identificação de mRNAs diferencialmente regulados. Dallagiovanna e colaboradores, em 2001 estudando uma família de proteínas de ligação a quitina (CBLPs) de *T. cruzi* mostraram que os mRNAs das CBLPs estão associados aos polissomos somente nas formas epimastigotas aderidas (denominação da forma epimastigota em diferenciação no processo de metaciclogênese *in vitro*), com uma maior acúmulo após 24 horas de diferenciação.

Fragoso (2003) estudando o gene TcImp4 e Nardelli (2007) o gene de TcSof1, ambas proteínas de grande homologia com proteínas constituintes do complexo U3snoRNP de *S. cerevisiae*. Demonstraram que estas não são expressas na forma metacíclica, entretanto, seus mRNAs foram encontrados associados aos polissomos, sugerindo um mecanismo de regulação da expressão gênica estágio-específica em *T. cruzi* em nível traducional (Fragoso *et al.*, 2003; Nardelli *et al.*, 2007).

1.6 Biogênese do ribossomo e a proteína TcSOF1

A biogênese dos ribossomos é um processo altamente complexo que representa um grande gasto de energia para a célula. Este envolve a transcrição coordenada entre as três RNAs polimerases, a maturação dos rRNAs a partir de transcritos primários e sua associação com as 80 proteínas ribossomais, dando origem aos ribossomos maduros no citoplasma (Venema e Tollervey, 1999).

Em eucariotos, a transcrição e as etapas de processamento de rRNA ocorrem no nucléolo (Kressler *et al.*, 1999). A polimerase I transcreve o pré-rRNA 35S, que contém os rRNAs 18S, 5.8S e 25S, estes sofrem extenso processamento, o que inclui sucessivas clivagens e diversas modificações decorrentes da ação de cerca de 200 proteínas, entre elas endonucleases e exonucleases (figura. 1.3), além da participação de complexos ribonucleoprotéicos nucleolares (snoRNPs). O pré-rRNA 5S é transcrito pela polimerase III e seu processamento é por uma via independente, onde uma exonuclease cliva a extremidade 3' removendo um segmento de 7 a 13 nucleotídeos (Piper *et al.*, 1984; Venema e Tollervey, 1999).

Os genes para os RNAs ribossomais (rRNA) dos tripanossomatídeos são organizados em repetições em tandem, e o mecanismo de síntese das proteínas ribossomais é altamente conservado (Dlakic *et.al.*, 2005).

TcSof1 é uma proteína ortóloga a Sof1p de *Saccharomyces cerevisiae*, proteína envolvida no processamento de rRNA. Esta proteína faz parte do SSU processomo ou complexo U3snoRNP. Esse complexo em levedura é composto por mais de 30 proteínas, sendo que sete são específicas desse complexo (Sof1p, Imp4p, Imp3p, Lcp5p, Dhr1p, Mpp10p e Rrp9p) (Grandi *et al.*, 2002; Bernstein *et al.*, 2004).

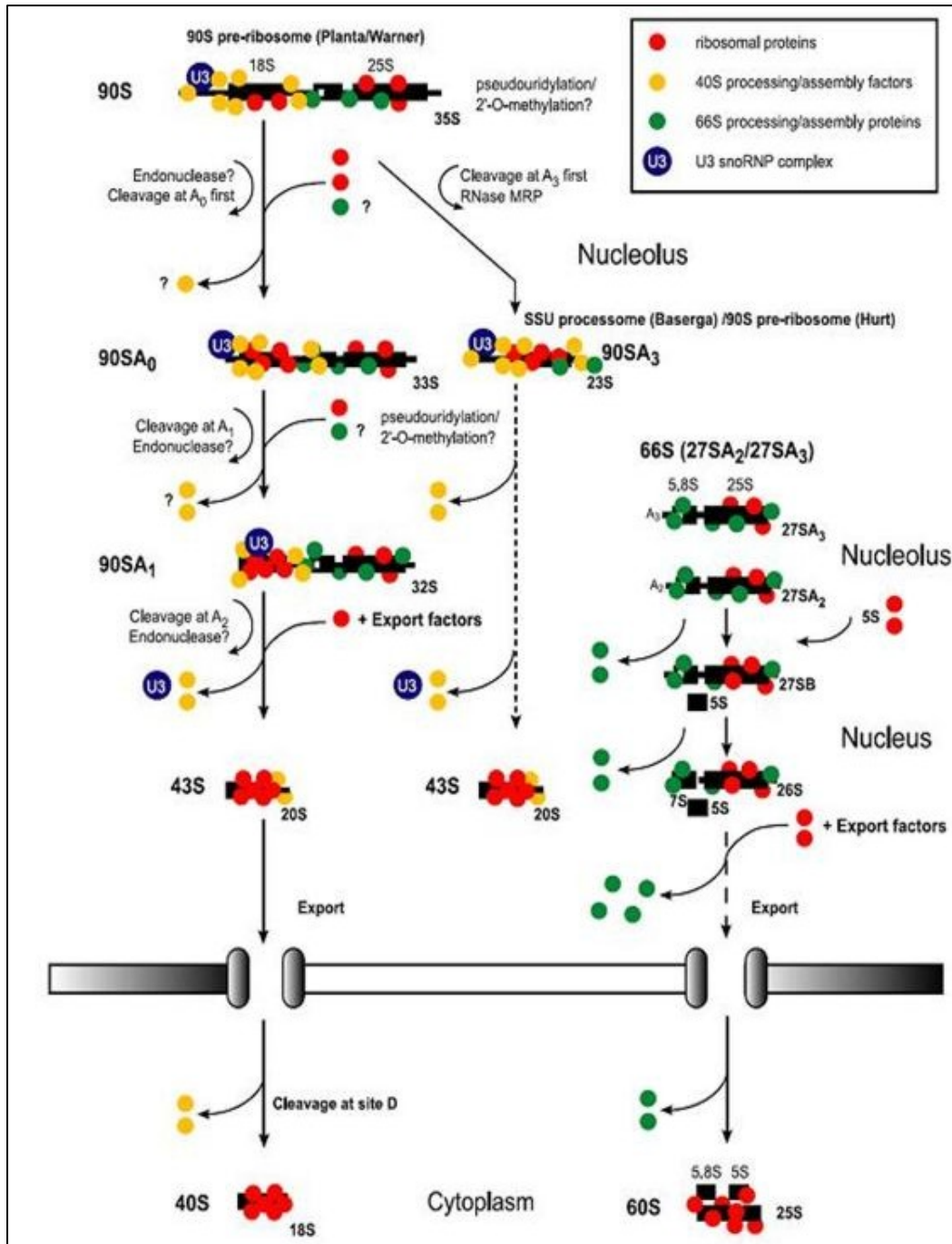


Figura 1.3: Modelo proposto por Granneman e colaboradores para a montagem e processamento de pré-ribossomos em *S. cerevisiae*: As classes de fatores envolvidos neste processo são indicados por cor. A transcrição de pré-rRNA principal é co-transcricionalmente montado no ribossomo pré-90S, que contém ambos os fatores de montagem do 40S e 60S. Dentro deste complexo, o pré-rRNA é clivado no local A₀ ou local A₃, obtendo-se o 90S A₀ e 90S_{A3}, respectivamente. O 90S A₀ é clivada em locais A₁ e A₂, por endonucleases, antes de ser finalmente convertidos em 43S e 66S pré-ribossomas. Clivagens nesses locais pode exigir associação e / ou dissociação de fatores de montagem de ribossomo (indicadas pelas setas e pontos coloridos) e cada passos discretos envolve intermediários de

montagem de ribossomo diferentes, mas que se sobrepõem composições protéicas. Os primeiros 66S pré-ribossomas, contendo 27S A2 pré-rRNA ou 27S A3 pré-rRNA, são submetidos a várias etapas de processamento sequenciais no nucleoplasma envolvendo inúmeras proteínas de processamento antes de ser exportado para o citoplasma como subunidade ribossomal 60S maduro. Os pré-43S sofre clivagem no sítio D, originando o 40S maduro no citoplasma. (Fonte: Granneman e Baserga, 2004).

Experimentos de imunoprecipitação demonstraram que a proteína Sof1p precipita exclusivamente o U3 snoRNA, entretanto, experimento de co-immunoprecipitação utilizando células depletadas de Sof1p ou U3 snoRNA demonstrou que as duas se associam de forma independente ao RNA precursor do 35S, sugerindo que proteína Sof1p atue em outros complexos (Bax *et al.*, 2006).

A função específica da proteína Sof1, tanto em tripanossomatídeos quanto nos demais organismos, ainda permanece desconhecida. Porém a presença do domínio WD sugere um possível envolvimento na montagem do complexo SSU (Smith *et al.*, 1999; Nardelli *et al.*, 2007). A ausência da proteína Sof1p resulta em defeitos no processamento do pré-rRNA, sendo portanto, essencial para a célula (Bax *et al.*, 2006).

Nardelli e colaboradores (2007) demonstraram que TcSof1 e outros genes envolvidos no processamento de rRNA, tais com *TcImp4*, *TcDhr1* e *TcImp3*, mostravam-se aumentados nas frações polissomais das formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*. No entanto, em ensaio de *Western blot* os autores mostraram que a proteína TcSof1 não se encontra presente nas formas tripomastigotas metacíclicas, apesar do mRNA se encontrar associado aos polissomos nesta forma.

A concentração de RNA total não foi alterada, indicando que a regulação negativa destes genes nas formas tripomastigotas metacíclicas parece estar ocorrendo em nível da tradução, provavelmente no que se refere à elongação e terminação. Ao contrário do que ocorre em levedura, onde o processamento de rRNA está relacionado ao crescimento, tamanho celular e ciclo celular, em tripanossomatídeos, esse processo parece não contribuir com o ciclo celular, embora esteja claramente relacionado a proliferação celular dos parasitas.

1.7 Técnicas utilizadas para análise da expressão gênica de *T. cruzi*

A capacidade de detectar alterações na expressão de genes é essencial para a compreensão dos determinantes genéticos e das respostas moleculares da célula a novas condições. Por vários anos, diversos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de entender os mecanismos envolvidos na regulação da expressão gênica em *T. cruzi*.

Uma técnica muito utilizada para o estudo da regulação em nível traducional é a análise de sedimentação de polissomos em gradientes de sacarose, onde mRNAs citoplasmáticos passam por um processo de sedimentação em gradientes de densidade. Dessa forma, os mRNAs que estão em diferentes etapas do processo da tradução sedimentam nas distintas frações do gradiente proporcionalmente a sua massa. Quanto mais ribossomos estiverem ligados a um mRNA, maior sua densidade e conseqüentemente, maior será seu coeficiente de sedimentação através do gradiente. Através de análises de gradientes de sedimentação em sacarose é possível observar a distribuição de um dado mRNA, em frações livres de ribossomos, onde o RNA não se encontra associado a nenhum ribossomo, na fração monossômica, onde o mRNA está associado as subunidades 40, 60 ou 80S e na fração pesada ou polissomal, onde mRNAs encontram se associados aos poliribossomos.

A partir deste tipo de análise, estudos mostraram que a proteína TcJ6p, de *Trypanosoma cruzi*, que possui um domínio Dnaj e é homóloga à co-chaperona Sis1 de levedura, estava intimamente associada às subunidades ribossomais, aos monossomos 80S e polissomos curtos, sugerindo que TcJ6p está envolvida na iniciação da tradução (Salmon *et al.*, 2001). Foi possível também, estudar a expressão diferencial de genes envolvidos na metacicloênese de *T. cruzi* (Ávila *et al.*, 2003; Fragoso *et al.*, 2003; Nardelli *et al.*, 2007), e a presença de estruturas citoplasmáticas tipo *P-body* neste parasita (Holetz *et al.*, 2007).

Outra abordagem muito utilizada para estudar a regulação de expressão gênica em tripanossomatídeos são as metodologias de análises da expressão gênica em larga escala, que promove um entendimento global da expressão gênica nestes organismos. Uma das metodologias que foram muito utilizadas é a de microarranjo de DNA ou chips de DNA, descrito inicialmente em 1995 por Schena e colaboradores. Esta técnica consiste em uma coleção de sequências nucleotídicas fixadas a uma lâmina de

vidro, resina ou plástico como pontos microscópicos em uma ordem específica. As sequências imobilizadas na lâmina podem ser de DNA genômico, cDNA ou oligonucleotídeos que apresentam a fase aberta de leitura dos genes (ORFs).

Diehl e colaboradores utilizaram esta técnica em 2002 para análise de expressão diferencial entre as formas sanguínea e procíclica de *T. brucei*. Em 2003, Saxena e colaboradores analisaram microarranjos de aproximadamente 9.200 sequências proveniente de *Leishmania major* para análise de diferenciação deste parasita. Simultaneamente ao trabalho de Diehl, Minning e colaboradores (2009), analisaram a regulação global da abundância dos transcritos em *T. cruzi* utilizando microarranjo de DNA dos quatro estágios do ciclo de vida do parasita. Com isso foi possível observar que mais de 50% dos genes detectados nos microarranjos estavam regulados de forma significativa durante o ciclo de vida do *T. cruzi*.

Mais recentemente, foi introduzida a técnica de sequenciamento de RNA, RNA-seq, também chamado de *whole transcriptome shotgun sequencing* ("WTSS"). É uma tecnologia que utiliza a capacidade saturante de sequenciamento de última geração para revelar um retrato da presença e quantidade de RNA a partir de um genoma em um determinado momento (Chu *et al.*, 2012). Alguns trabalhos de análise de RNA-seq em Tripanossomatídeos já foram publicados. Siegel (2010) utilizou RNA-seq para identificar sítios de splicing e poliadenilação dos mRNAs mais abundantes de *Trypanosoma brucei*. Em 2012 Shulamit e colaboradores utilizaram a técnica de sequenciamento de RNA para investigar RNAs não-codificantes em *Trypanosoma brucei*. Kolev (2010), Greif (2013) e Rastrojo (2013) utilizaram RNA-seq para análise do transcriptoma de *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma vivax* e de *Leishmania major* (Kolev *et al.*, 2010; Greif *et al.*, 2013; Rastrojo *et al.*, 2013).

No entanto, a vida de um mRNA na célula é governado por uma rede complexa de interação com proteínas que determinam desde seu processamento, estocagem ou degradação, e em última etapa, a tradução. Assim, a quantidade de um determinado mRNA no citoplasma não reflete o nível de expressão da proteína (De Souza, 2009; Plotkin *et al.*, 2010). Por exemplo, duas moléculas de mRNA presentes em uma mesma fração polissomal podem estar sendo traduzidas em taxas diferentes ou, até mesmo, não estarem sendo traduzidas (Arava, 2003; Nardelli *et al.*, 2007).

Por isso, a fim de conhecer a composição protéica celular e acompanhar suas mudanças ao longo do tempo, é preciso primeiramente estabelecer a relação entre os

padrões de expressão de mRNA e as proteínas que serão efetivamente sintetizadas a partir deles (Namy *et al.*, 2004; Tian *et al.*, 2004; Sonenberg e Hinnebusch, 2007).

Assim, uma nova proposta para o estudo do tradutoma celular foi desenvolvido em 2009 por Ingolia e colaboradores. Os autores apresentaram a técnica de *Ribosome Footprinting*, que tem como objetivo gerar um perfil dos mRNAs no momento que estão sendo traduzidos, capturando o local exato do ribossomo sobre o mRNA.

A técnica é baseada no isolamento de sequências de cerca de 30 nucleotídeos protegidas pelos ribossomos associados ao mRNA (conhecida como *footprinting*). Após o isolamento e purificação, estas sequências de 30 nucleotídeos são convertidas em biblioteca de cDNA e sequenciadas através de *deep sequencing*, fornecendo uma medida de alta precisão do processo de tradução *in vivo* (Figura 1.4) (Ingolia *et al.*, 2009; Ingolia *et al.*, 2011).

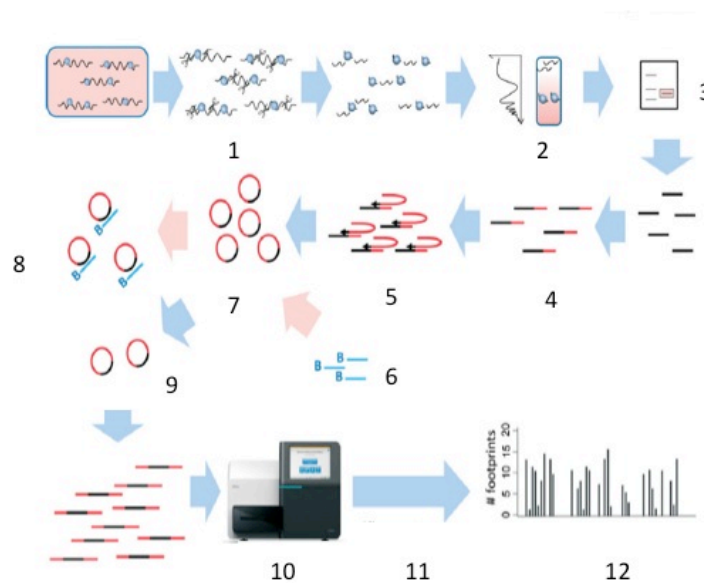


Figura 1.4: Esquema das principais etapas do protocolo de *Ribosome Footprinting*, conforme descrito no Ingolia *et al* 2009. 1 – Lise e digestão do RNA; 2 – Colchão de sacarose; 3 – Fracionamento por tamanho dos fragmentos; 4 - Adaptadores; 5 – Transcriptase reversa; 6 – Hibridização das sondas de rRNA; 7 – Circularização; 8 – Depleção dos rRNA; 9 – Amplificação; 10 – Sequenciamento; 11 - Alinhamento com o genoma referencial; 12 – Perfil ribossomal.

Essa técnica permite a obtenção de mRNAs que efetivamente estão associadas aos ribossomos, fornecendo uma medida de alta precisão do processo de tradução *in vivo* (Ingolia *et al.*, 2009; Ingolia *et al.*, 2011). Possibilita estudar fenômenos biológicos como *splicing* alternativo que consiste em um rearranjo das regiões codificadoras no qual o mRNA transcrito pode formar diferentes produtos e isoformas (Nilsen e Graveley, 2010), a utilização de códons alternativos ou seja, início da tradução por códons que não sejam AUG (Curran e Kolakofsky, 1988; Touriol *et al.*, 2003), e sítios internos de entrada de ribossomos (Vagner *et al.*, 2001), que até então eram estudados por técnicas mais tradicionais que apresentavam baixa sensibilidade para estes fenômenos. Além disso, a técnica de *Ribosome Footprinting* tem se revelado muito eficiente para estudos de sítios de pausas dos ribossomos sobre os mRNAs, que poderiam atuar como reguladores chaves no processo traducional.

Outra estratégia desenvolvida por Ingolia e colaboradores (2011) foi a utilização da droga harringtonina no estudo do processo de início da tradução. Estudos mostraram que a harringtonina se liga a ribossomos livres e monossomos, mas não interage com polirribossomos. Este alcalóide bloqueia a formação da ligação peptídica e inibe a ligação do aminoacil tRNA, mas não afeta o posicionamento do Met-tRNA no sítio doador. Desta forma, os ribossomos que estão na fase de alongação da tradução não são afetados, ao passo que uma subunidade 60S vinculada com harringtonina formará um monossomo (80S) no códon de início, mas este não se move para a fase de alongação (Fresno *et al.*, 1977). Assim, após o tratamento de leveduras com a droga harringtonina, Ingolia e colaboradores (2011) determinaram a existência de ORFs não anotadas ou modificadas, a taxa de tradução na fase de alongação, e ORFs que codificam proteínas pequenas com possível potencial regulatório (Ingolia *et al.*, 2011).

Com base nestas informações, nós visamos a aplicação das técnicas de *Ribosome Footprinting* para tentar elucidar o mecanismo envolvido na regulação negativa de TcSof1 e outros genes na forma tripomastigota metacíclica que estariam sendo regulados como o gene de TcSof1, uma vez que o mecanismo envolvido neste controle em *T. cruzi* ainda é desconhecido.

2 OBJETIVOS:

2.1 Objetivo Geral:

- Caracterizar os mecanismos de regulação da expressão gênica envolvidos na expressão negativa do gene TcSof1 e de genes que são regulados negativamente por um mecanismo comum ao mRNA de TcSof1 na forma tripomastigota metacíclica de *Trypanosoma cruzi*.

2.2 Objetivos específicos:

- Determinar a existência de RNAs anti-sentido a região 3'-UTR do gene de TcSof1.
- Padronizar a técnica de *Ribosome Footprinting* em *T. cruzi*.
 - Isolar os complexos ribossomo-mRNA e realizar a digestão enzimática e purificação dos fragmentos de mRNAs protegidos pelos ribossomos.
 - Sequenciar os fragmentos obtidos utilizando uma plataforma de sequenciamento em larga escala,
- Analisar comparativamente os perfis de expressão dos transcritos associados aos ribossomos, para identificação de genes regulados negativamente por um mecanismo comum ao mRNA de TcSof1 utilizando ferramentas de bioinformática.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultivo do Parasita

3.1.1 Meios de Cultura

Meio LIT (*liver infusion tryptose*) - infusão de fígado 0,5 %, NaCl 75,3 mM, KCl 5,4 mM, glicose 10 mM, bacto-triptose 0,5 % , Na₂HPO₄ 56,4 mM, hemina 0,0025 %, soro fetal bovino 10 % e extrato de levedura 15 g/L.

Meio TAU (*Triatomine Artificial Urine*) - NaCl 190 mM, KCl 17 mM, MgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 2 mM e tampão fosfato pH 6 8 mM.

Meio TAU3AAG – meio TAU suplementado com L-prolina 10 mM, glutamato sódico 50 mM, aspartato sódico 2 mM e glicose 10 mM.

3.1.2 Epimastigotas em fase logarítmica de crescimento.

A cultura axênica do clone Dm28c de *T. cruzi* (Goldenberg *et al.*, 1984; Contreras *et al.*, 1988) foi mantida em meio LIT suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino) a 28°C e a cada três dias foi feito novo cultivo com inóculo de 1×10^6 células/ml. As formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento foram obtidas após 72 horas de cultivo, onde a densidade celular é de aproximadamente 3×10^7 células/ml. Estas condições foram estabelecidas de acordo com a curva de crescimento em meio LIT a 28°C (Camargo, 1964).

3.1.3 Tripomastigotas metacíclicos.

As formas epimastigotas em final da fase logarítmica de crescimento, ou seja, no quinto dia de cultivo com densidade celular de aproximadamente 5×10^7 células/mL, são centrifugadas a 7.000 x g durante 5 minutos a 25°C. Após a centrifugação as células são submetidas a estresse nutricional sendo mantidas em meio TAU na concentração de 5×10^8 células/mL, por duas horas a 28°C (Contreras *et al.*, 1985).

Após este período, as formas epimastigotas submetidas ao estresse nutricional foram incubadas em meio TAU 3AAG em garrafas de cultivo celular (modelo: 90300

marca: TPP de 300 cm²). Nestas condições e sem agitação, as formas epimastigotas aderem-se ao substrato e diferenciam-se nas formas tripomastigotas metacíclicas que aparecem livres no sobrenadante da cultura. Ao final das 96 horas, é possível observar que 80 a 90% das células neste sobrenadante são tripomastigotas metacíclicas (Bonaldo *et al.*, 1988). O sobrenadante da cultura foi centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos a 25°C, ressuspensas em solução de PSG e purificadas por cromatografia de troca iônica em coluna de resina DEAE celulose equilibrada em PBS (De Souza, 1984). A partir dos dados gerados durante a padronização da técnica de *Ribosome Footprinting* nas formas epimastigotas, e tendo em vista que nas formas metacíclicas a quantidade de RNA polissomal é pelo menos 10 vezes menor que nas formas epimastigotas (Ávila *et al.*, 2003; Holetz *et al.*, 2007), foi estabelecido que seria necessário realizar a extração dos fragmentos de mRNA a partir de $2,5 \times 10^{10}$ metacíclicos por réplica técnica e biológica. Sendo assim, foi necessário o cultivo em 400 garrafas com inóculo de 1×10^9 epimastigotas para a obtenção do número de metacíclicos suficientes após a purificação pela resina de DEAE celulose.

3.2 Clonagem e Sequenciamento de pequenos RNAs para identificação de RNA anti-sentido ao mRNA de TcSof1 .

3.2.1 Extração dos pequenos RNAs.

O RNA total de 1×10^9 parasitas na forma metacíclica foi extraído usando o reagente Trizol (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante, seguido por precipitação com uma solução final de etanol 80%, acetato de sódio 300 mM e 15 µg do coprecipitante GlycoBlue™ (Ambion®).

3.2.2 Isolamento, purificação e clonagem de pequenos RNAs.

Após a extração do RNA total com Trizol, os pequenos RNAs entre 20 e 70 nucleotídeos de tamanho foram fracionados em gel de acrilamida desnaturante 15% com 8 M de uréia e o gel foi corado com brometo de etídio. Marcadores de DNA de diferentes tamanhos foram utilizados para identificar bandas com as dimensões desejadas que foram retiradas do gel e purificadas. Para isso, o fragmento de gel coletado foi macerado e 100 µL de água livre de nuclease foram acrescentados, estes

foram aquecidos a 70°C por 10 minutos. Em seguida, o RNA foi precipitado através de incubação com uma solução final de etanol 80%, acetato de sódio 300 mM e 15 µg do coprecipitante GlycoBlue™ (Ambion®) por 18 horas a -20° C e centrifugação por 1 hora a 4°C a 16100 x g. O RNA obtido foi lavado com etanol 80%, aquecido a 65°C para secagem e ressuspendido em água livre de nuclease. As amostras de RNA foram quantificadas a 260 nm no espectrofotômetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific).

Após a purificação dos pequenos RNAs, procedeu-se a inclusão de adaptadores nas extremidades 5' e 3' contendo locais de clivagem para a enzima de restrição Ban I, estes foram submetidos a transcrição reversa e amplificados por PCR. O produto de PCR foi digerido pela enzima BanI e os fragmentos foram concatamerizados e clonados em pGEM-T easy (Promega Corp.) de acordo com as instruções do fabricante. Após transfecção em células cálcio competentes, o DNA das colônias desejadas foi extraído e submetido ao sequenciamento.

3.3 Hibridação *In Situ* por Fluorescência (FISH)

A técnica de FISH foi realizada seguindo o protocolo adaptado de Zeiner e colaboradores (2003). Foram utilizados para este ensaio 10^7 células/ml de parasitas nas formas epimastigotas e metacíclicas. Estes foram centrifugados a 7000 x g por 5 minutos a 4°C e lavados duas vezes em PBS nas mesmas condições de centrifugação. As células foram ressuspendidas em 1 mL de tampão de fixação (4% de paraformaldeído em PBS) e fixadas por 20 minutos em temperatura ambiente. As células foram lavadas duas vezes com PBS por 5 minutos a 7000 x g e ressuspensas de modo que ficassem 5×10^6 por poço da lamina com campos delimitados por teflon. As células aderiram na lâmina por 10 minutos em temperatura ambiente e foram posteriormente desidratadas a 80°C por 10 minutos. Em seguida foram feitas várias etapas de lavagem: inicialmente duas vezes com SSC 2 X por 5 minutos cada e em seguida duas vezes com formamida 50% e SSC 2 X por 5 minutos cada. As amostras foram incubadas durante 2 h em temperatura ambiente em 2% de BSA, 5X Denhardt, 4xSSC e 35% formamida.

Foi utilizado 1 ng/ml^{-1} de sonda diluída em 20 µl de tampão de hibridação (2,5 mg/ml de tRNA, 0,02% de BSA, formamida 50%, SSC 2X e 40 U/mL de inibidor de RNase—RNaseOUT™), a hibridação foi realizada por 16 horas em temperatura

ambiente em câmara úmida.

Várias etapas de lavagem foram realizadas em tampão com concentrações decrescentes: duas vezes com formamida 40% em SSC 2X por 5 minutos cada, duas vezes com SSC 2X por 5 minutos cada e por ultimo uma vez com SSC 1X por 5 minutos. O núcleo e o cinetoplasto foram corados com 1µg/mL de DAPI por 10 minutos seguido de quatro lavagens com SSC 0,5 X por 5 minutos. Em cada poço da lâmina foi adicionado 10 µl de N-propil galacto coberto por lamínula e selada com esmalte. A visualização das imagens foi feita no microscópio de fluorescência Olympus IX 81 com a objetiva de 100 x. As imagens foram capturadas usando a câmara Hamamatsu Orca-ER (Diagnostic Instruments), e analisadas com o programa Image Pro-Plus v. 4.5.1.22 (Media Cybernetics).

3.4 Separação de Polissomos em Gradiente de sacarose

O perfil de sedimentação de polissomos foi obtido através de centrifugação de extratos citoplasmáticos das formas epimastigotas e metacíclicas em gradientes de densidade de sacarose como descrito por Holetz *et al.*, 2007. Para tanto, o extrato citoplasmático de 2×10^9 células foi obtido em condições apropriadas para a estabilização de mRNAs envolvidos na tradução na forma de polissomos. Após a incubação das células com 100 µg/mL de cicloheximida por 10 minutos em temperatura ambiente e para os experimentos utilizando harringtonina as células foram incubadas com 16 µg/mL por uma hora a 28°C. as células foram centrifugadas a 7.000 x g por 10 minutos a 4 °C e lavadas duas vezes com tampão TKM (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; KCl 300 mM e MgCl₂ 10 mM) suplementado com 10 µg/ml de cicloheximida ou 2 µg/ml de harringtonina. Após descartar o sobrenadante, as células foram suspensas em 450 µL de TKM suplementado com 100 µg/mL de cicloheximida ou 16 µg/mL de harringtonina, inibidores de RNAses e proteases também foram adicionados: 10 µg/mL de heparina, 10 µM de E-64 e 1 mM de PMSF. A suspensão foi transferida para novo tubo contendo 50 µL de tampão de lise (tampão TKM acrescido de 10% de NP-40 e 2M de sacarose) e homogeneizada por pipetagem. A lise foi monitorada em microscópio. O lisado foi centrifugado a 16.000 x g por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante (500 µL, equivalentes a 2×10^9 células) foi adicionado no topo do gradiente de sacarose linear (15 - 55%) preparado em tampão

TKM acrescido dos inibidores já mencionados. O gradiente foi centrifugado a 192.000 x g por 2 horas a 4 °C em ultracentrífuga Beckman com rotor SW40.

Para os ensaios de dissociação de polissomos com puromicina, 2×10^9 células foram incubadas com 2 mM de puromicina por uma hora a 28°C. Após a incubação, as células foram centrifugadas a 7.000 x g por 10 minutos a 4°C e lavadas duas vezes com tampão TKM-P (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; KCl 500 mM e MgCl₂ 2 mM). As condições de lise foram as mesmas já mencionadas para os testes com cicloheximida e harringtonina alterando-se apenas a composição do tampão de lise (tampão TKM-P acrescido de 10% de NP-40, 2 M de sacarose e 2 mM de puromicina). O sobrenadante obtido após a lise foi adicionado no topo do gradiente de sacarose preparado com tampão TKM-P e centrifugado em ultracentrífuga como descrito acima.

Após a centrifugação dos gradientes de sacarose, 500 µL de cada fração foram coletados utilizando o equipamento *ISCO gradient fractionation system*. Este equipamento destina-se à coleta e quantificação de frações de gradientes de densidade e fornece um perfil de absorvância contínuo (filtro 256 nm) à medida que as frações são coletadas. O fracionamento é obtido com a introdução de uma solução pesada (sacarose 60%) que é injetada perfurando-se a base do tudo que contém o gradiente previamente centrifugado. As frações foram reunidas em 3 grupos: fração livre de ribossomos, fração monossômica e fração polissomal.

3.5 Análises de Northern blot

Os ensaios de Northern blot foram realizados utilizando os RNAs provenientes dos gradientes de sacarose separados em gel de poliacrilamida desnaturante 15%, corados com brometo de etídio, e transferidos para uma membrana nylon (Hybond N, Amersham Biosciences). O RNA foi pré-hibridizado durante 2 horas em tampão Church modificado (5 % de dodecil sulfato de sódio (SDS), EDTA 1 mM em tampão fosfato de sódio 0,25 M, pH 7,2). A hibridação ocorreu por 18 horas a 40 °C, num tampão contendo 0,5 M de fosfato de sódio, pH 7,2, SDS a 5%, BSA a 0,5%, EDTA a 1 mM e a sonda de DNA com a extremidade 5' marcada.

3'UTR deTcSof1 -5' (5' AUAUAUAUACGGUUUGUGGUAGGUUUUGUUAUU
UCAGGAAGAAUAUAAUAUUACA3'

tRNAGlu UUC - 5' - (5'CAG GTG TTG TAA CCG TTA TAC CAT ATC 3')
3' - (5' TTC CGA TAC CGG GAA TCG A 3')

As sondas foram radiomarcadas utilizando o Kit *Nick Translation System* (invitrogen) e [γ -32P] ATP e purificado por filtração em gel através de micro-coluna ProbeQuant G-50 (Amersham Biosciences). Após a hibridação, a membrana foi lavada duas vezes em SSC 2 X; SDS 0,1%, por 30 min a 42 °C, uma vez em SSC 1 X; SDS 0,1% á 55 °C e uma vez em SSC 0,5 X; SDS 0,1 % a 65°C e exposta em filmes de raios-X (*X-ray Hyperfilm MP, Amersham Biosciences*).

3.6 Análises de *Western blot*

A fração citosólica foi obtida por lise suave das formas metacíclicas em tampão hipotônico (KCl 300 mM, MgCl₂ 10 mM, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,5% NP40) durante 5 min. Após a lise, as células foram centrifugadas a 16.000 x g durante 20 min a 4°C, o sobrenadante foi recolhido como fração solúvel (S) e o precipitado como fração insolúvel (P). Os extratos foram fracionados em SDS-PAGE 10% e transferidos para membrana de nitrocelulose Hybond-C (Amersham), por 16 horas à 20 volts. Terminada a transferência, a membrana foi corada com solução de Ponceau (Ponceau S 0,5% e ácido acético 1%) para verificar a qualidade da transferência e em seguida descorada em água destilada e incubada em solução de bloqueio (PBS, Tween 20 0,1% e leite em pó desnatado 5%) por uma hora em temperatura ambiente. Após essa incubação, a membrana foi incubada em 1 mL de PBS 1X/Tween 0,1% contendo o anticorpo primário anti-TcPUF6 (1/250) ou anti-Dinamina (1/200) permanecendo por uma hora a 37 °C e, em seguida, lavada três vezes por 5 minutos com PBS 1X/Tween 0,1%, seguido de incubação com o anticorpo secundário, anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Amersham Biosciences) na diluição de 1/8000 por 1 hora a 37°C. O produto da reação enzimática foi detectado por quimioluminescência, através do kit ECL *Western blotting* (Amersham Biosciences) seguindo as instruções do fabricante.

3.7 Ribosome Footprinting

3.7.1 Obtenção de RNA polissomal das formas epimastigotas e metacíclicas.

Foram incubados $2,5 \times 10^9$ epimastigotas e 5×10^9 metacíclicos com 100 µg/ml de cicloheximida por 10 minutos a 28° C. Em seguida foram centrifugados por 5 min a 7000 x g. O sedimento de parasitas foi lavado duas vezes com tampão NKM (NaCl 140 mM; KCl 5 mM e MgCl₂ 1,5 mM) suplementado com cicloheximida (100 µg/mL) e 5 mM de 2-mercaptoetanol e lisados com adição de 1% de NP-40. A lise foi acompanhada em microscópio ótico e interrompida com uma solução de sacarose 2M. O lisado foi centrifugado a 10.000 x g por 30 min à 4°C. O sobrenadante obtido foi adicionado sobre um colchão de sacarose 2M (para as células tratadas com cicloheximida) ou 1M (para as células tratadas com harringtonina) e submetido a ultra centrifugação a 192.000 x g por 2 horas a 4°C

3.7.2 Digestão com endonuclease.

O precipitado de RNA polissomal obtido após a ultracentrifugação em colchão de sacarose foi solubilizado em tampão de lise hipotônico e 250 unidades da endonuclease Benzonase™, foram adicionadas à mistura. O material foi incubado por 10 minutos a 25°C. Ao final do período de incubação, a ação da endonuclease foi inibida acrescentando-se o tampão para extração de RNA do kit mirVana™ conforme descrito abaixo

3.8 Extração e isolamento de RNA

3.8.1 Extração de RNA.

Os RNAs obtidos tanto do gradiente de sacarose para o experimento de perfil de sedimentação de polissomos, quanto do RNA total para o experimento de *Ribosome Footprinting* das formas epimastigotas ($2,5 \times 10^9$ parasitas) e metacíclicas ($5 \cdot 10^9$ parasitas), foram extraído usando o reagente Trizol (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, o RNA foi precipitado através de incubação com uma solução final de etanol 80%, acetato de sódio 300 mM e 15 µg do coprecipitante *GlycoBlue*™ (Ambion®), por 18 horas a -20°C e centrifugação por

1 hora a 4°C a 16100 x g. Ao final do processo, o RNA obtido foi eluído em água livre de nuclease e quantificado por espectrofotometria (NanoDrop® ND-1000).

Para extração dos fragmentos de RNA obtidos após a digestão do precipitado polissomal (como descrito no tópico 3.7.2), foi utilizado o kit mirVana™ miRNA Isolation Kit (Ambion), seguindo-se o protocolo especificado pelo fornecedor. Este kit permite uma extração com enriquecimento dos pequenos RNAs. As amostras de RNA extraídas foram ressuspensas em água livre de nuclease.

3.8.2 Isolamento dos fragmentos.

Para o isolamento dos fragmentos de interesse (aproximadamente 30 nucleotídeos) foi utilizado o sistema FlashPAGE™ *Fractionator* (Ambion) de acordo com as recomendações do fabricante.

3.8.3 Isolamento de RNA poliA.

Para isolamento do RNA poliA foi utilizado o kit PolyA Tract® mRNA *Isolation Systems IV* (Promega). O protocolo consistiu na extração do RNA total (obtido como descrito no tópico 3.2.1), aquecido a 65°C por 10 minutos e incubado com sondas de oligoDT conjugadas a biotina (30 minutos em temperatura ambiente), as quais hibridizam com a cauda poliA do RNAm. Em seguida, foi feita a incubação do material com *beads* magnéticas conjugadas a estreptavidina. A seguir, foi utilizado um suporte magnetizado para imobilizar o RNA ligado às *beads* (que corresponde ao RNA poliA) e foram feitas sucessivas lavagens. Por fim, o RNA poliA foi eluído em 150 µL de água livre de DNase-RNase. Este volume foi reduzido para 20 µL, através de aquecimento a 65°C sob pressão reduzida (utilizando-se o sistema *SpeedVac Concentrator*, modelo SPD131DDA) e a solução final obtida foi armazenada a -80°C

3.9 Determinação da dosagem de harringtonina

Foram realizadas curvas de crescimento dos parasitas utilizando diferentes concentrações de harringtonina. Neste experimento foram utilizadas culturas de epimastigotas em fase exponencial de crescimento, iniciando-se com 1×10^6 células por ml. As concentrações de harringtonina utilizadas para *T. cruzi* foram

0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 16 µg/ml. Para as avaliações realizadas foram feitos controles através de culturas sem a adição de harringtonina. As contagens foram realizadas a cada 24 horas num período que variou entre 0 e 96 horas.

3.10 Sequenciamento em larga escala

Os fragmentos de aproximadamente 30 nucleotídeos obtidos após a digestão do precipitado polissomal e o conteúdo total de mRNA das formas epimastigotas e metacíclicas foram submetidos ao processo de análise de transcriptoma completo (Cloonan *et al.*, 2008) utilizando a plataforma SOLiD.

3.10.1 Preparo do material para a reação de sequenciamento.

Iniciamos o preparo do material para sequenciamento a partir de 200 ng de mRNA poli-A e 50 ng das amostras do *footprinting*, com a quantificação e qualidade analisadas pelo uso do equipamento *Bioanalyzer* (Agilent) utilizando-se o chip de small RNA. O RNA referente ao mRNA poli-A foi fragmentado por RNase III (*Applied Biosystems*), a fim de que fossem obtidos fragmentos de RNA de 150 a 200 nt. A reação foi incubada em um termociclador a 37 °C por 10 minutos e, após esse tempo, adiciona-se 90 µL de água livre de DNase-RNase. O RNA passou por um processo de limpeza através do kit *RiboMinus Concentration Module* (Invitrogen).

Após a fragmentação dos RNAs provenientes das amostras de mRNA poli-A, estes juntamente com as amostras do *footprinting*, passaram para a etapa de incorporação de adaptadores (P1 e P2) nas extremidades dos fragmentos utilizando o kit *Total RNA-Seq* (Applied).

Em seguida, as amostras foram submetidas a uma reação de transcrição reversa. Após o término da reação de transcrição reversa, o material foi purificado utilizando o kit *MinElute PCR Purification* (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

O próximo passo foi a seleção dos fragmentos de cDNA pelo sistema *Novex* de gel com uréia e TBE (Invitrogen). A excisão das bandas correspondente as amostra de mRNA poli-A foi de 150 a 250 pb, enquanto que as referentes as amostras do *footprinting* foram de 70 a 90 pb. As amostras foram amplificadas por PCR, utilizando o kit *Whole Transcriptome*. Após amplificação, o material foi purificado com o kit *PureLink PCR Micro* (Invitrogen) e sua qualidade foi verificada com o uso

do *Bioanalyzer*.

3.10.2 Reação de amplificação em emulsão.

As bibliotecas de cDNA foram amplificadas em uma reação de PCR em emulsão (ePCR), na qual as moléculas de DNA são aprisionadas, juntamente com partículas magnéticas e reagentes de PCR, em micelas de óleo, formando um micro reator. Após a realização da ePCR, os reatores foram desfeitos com a adição de 2-butanol. Após a homogeneização das soluções, estas foram centrifugadas a 2.200 x g por 5 minutos. O precipitado contendo as partículas com os amplicons passaram para a etapa de enriquecimento das partículas magnéticas utilizando o kit *Bead Enrichment (Applied Biosystems)*, que consiste em aumentar a concentração de partículas carregadas com as moléculas de DNA prontas para serem sequenciadas e a eliminação das partículas vazias.

3.10.3 Preparo das lâminas e reação de sequenciamento.

Para o depósito das bibliotecas nas lâminas que foram inseridas no sequenciador SOLiD (Applied Biosystems) foi utilizado o kit *Bead Deposition (Applied Biosystems)*. Este modifica as extremidades 3' do material aderido às partículas magnéticas para promover a ligação à superfície das lâminas.

3.11 Análises Bioinformáticas

A análise dos dados considerou os vários níveis de complexidade: controle de qualidade do processo de sequenciamento, *trimming* (remoção dos adaptadores e *barcodes* das sequências), seguida da seleção de sequências segundo o tamanho e qualidade, a fim de eliminar as sequências não informativas (adaptadores e *barcodes*), análise da reprodutibilidade biológica, análises estatísticas, análise de transcriptomas pela metodologia RNA-Seq, utilizando o *software CLC Bio Genomics Workbench* (<http://www.clcbio.com/>), e *softwares* públicos para análises genômicas.

As análises foram realizadas em colaboração com o grupo do Dr. José Sotelo, como parte do treinamento em bioinformática no Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) Montevideo, Uruguay e no Centro de

Bioinformática e Biologia Computacional da Universidade de Maryland (USA) em colaboração com o Dr. Trey Belew sobre supervisão do Dr. El-Sayed.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento e análise de pequenos RNAs não codificadores em formas metacíclicas de *T. cruzi*.

Na tentativa de identificar fatores reguladores em *trans*, que poderiam estar se ligando à região 3' UTR do mRNA da proteína TcSof1, utilizamos sondas de RNA com 54 bases de sequência igual à 3' UTR da TcSof1 em ensaios de *Northern blot*. Esta sonda hibridou somente na amostra de RNA total da forma metacíclica, especificamente a um RNA de tamanho menor aos tRNAs, (Figura 4.1b). Este resultado evidenciou a presença de um RNA pequeno de sequência anti-sentido a região 3' UTR do mRNA de TcSof1. Pequenos RNAs de sequência complementar a um determinado mRNA podem se ligar as regiões 3'UTR no mRNA e regularem sua tradução (Militello *et al.*, 2008). Estes experimentos são resultados preliminares desenvolvidos pelo nosso grupo.

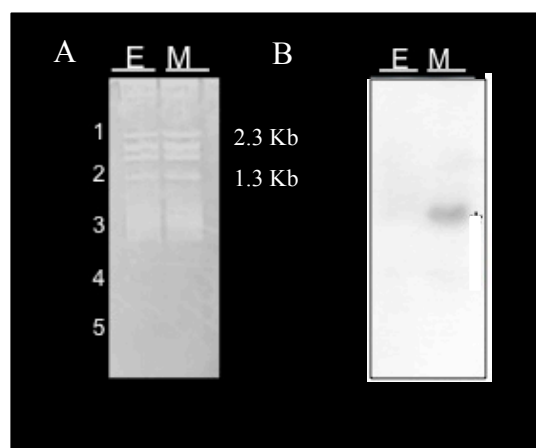


Figura 4.1:Ensaio de *Northern blot* para análise de pequenosRNAs de sequência anti - sentido a região 3' UTR do gene de TcSof1. **A:** Gel de poliacrilamida 15% com 8M Uréia, 8µg de RNA total de *T. cruzi* nas formas epimastigota (E) e metacíclico (M); **B:** Hibridização utilizando a sonda de RNA em ensaio de *Northern blot* usando sequência sentido a 3' – UTR de TcSof1, onde é possível observar marcação da sonda apenas na canaleta referente ao RNA proveniente da forma metacíclica.

Desta forma, passamos para a investigação de pequenos RNAs que poderiam estar associados á região 3' UTR de TcSof1 em tripomastigotas metacíclicos. O primeiro passo foi caracterizar a população de pequenos RNAs anti-sentido á região 3'UTR do gene de TcSof1. Para isso,RNAs de tamanho entre 20 – 70 nucleotídeos foram purificados a partir de RNA total de *T. cruzi* na forma metacíclica em gel de poliacrilamida 15% com 8 M de ureia (figura 4.2). Após a purificação, adaptadores foram ligados as extremidades 5' e 3' e estes submetidos a reação de transcriptase reversa.

A biblioteca de cDNA foi amplificada através de PCR e uma segunda PCR foi realizada para permitir a concatenização (técnica realizada no Instituto Pasteur de Montevideo, pela Dra. Larissa Reifur) e estas sequências foram clonadas em vetor pGEM-T e sequenciadas.

As análises foram realizadas em colaboração com a Dra. Maria Rosa Garcia-Silva do Instituto Pasteur de Montevideo, onde 844 clones foram sequenciados e comparados com os bancos de dados disponíveis utilizando o algoritmo BLAST. Entre os 509 RNAs de 20-70 nucleotídeos identificados, 2,16% não apresentaram resultados no genoma, revelando potenciais partes do genoma que não tenham sido sequenciados, DNA exógeno, ou proveniente de contaminação. Ainda, 0,98% são referentes a pequenos RNAs nucleolares, 2,95% referentes a regiões intergênicas, 6,09% de RNAs mensageiros e 24,56% de RNA ribossomal (rRNA).

Entretanto, de todas as sequências mapeadas, 70% correspondem a fragmentos de tRNA. Estes pareciam ser o resultado de uma clivagem específica no laço maior do tRNA, gerando fragmentos referentes a extremidade 5' ou 3' do tRNA. A existência de fragmentos derivados de tRNA já tinha sido identificada em *T. cruzi* na forma epimastigota (Garcia - Silva *et al.*, 2010), porém quando comparamos as populações de fragmentos de tRNA (tsRNA) entre a forma epimastigota e a forma metacíclica observamos quase 3 vezes mais tsRNAs na forma metacíclica (Figura 4.2).

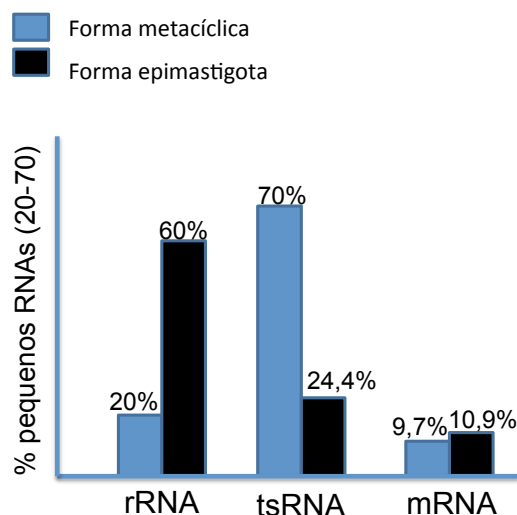


Figura 4.2: Porcentagem de pequenos RNAs de 20-70 nucleotídeos obtidos nas formas epimastigotas e metacíclicas. Resultado comparativo do sequenciamento dos pequenos RNAs em *T. cruzi* nas formas epimastigotas e metacíclicas mostra que a população de pequenos RNAs entre 20-70 nucleotídeos presentes nestas formas são de RNAs derivados de rRNA, mRNA e tRNA (tsRNA).

Considerando as características transcricionais de *T. cruzi*, várias evidências apontam para o intenso controle em nível pós-transcricional no processo de diferenciação do parasita (Moore, 2005; Keene, 2007). Assim, é possível cogitar que exista uma via alternativa para compensar a ausência de um sistema de RNA de interferência como é encontrado em *T. brucei* (Dumas *et al.*, 2006 ; Militello *et al.*, 2008). Mesmo após todas as buscas não foi encontrado nenhum RNA pequeno anti-sentido à região 3'-UTR do gene de TcSof1. Franzén e colaboradores (2011) investigaram a presença de pequenos RNAs não codificantes em *T. cruzi* utilizando sequenciamento em larga escala, mas também não encontraram nenhuma evidência de pequenos RNAs não-codificantes tais como os microRNAs e siRNAs, confirmando resultados de trabalhos anteriores que citam a ausência de uma via canônica de RNAi em *T.cruzi* (DaRocha *et al.*, 2004; Garcia-Silva *et al.*, 2010). Porém, cerca de 95-98% das sequências analisadas pelos autores correspondiam a pequenos RNAs derivados de tRNA, rRNAs, snRNAs e snoRNAs, sendo a maior população a de fragmentos de tRNA, corroborando com os nossos resultados.

Trabalhos prévios sugerem que tsRNAs poderiam estar envolvidos no controle da expressão diferencial de genes em leveduras, células de mamíferos e em protozoários como *Giardia lamblia* e *Tetrahymena thermophila* (Lee e Collins 2005; Li *et al.*, 2008; Pederson *et al.*, 2010). Recentemente, Gebetsberger e Polacek (2013), identificaram tsRNAs que se associam aos ribossomos e funcionam como RNA reguladores não codificantes em *Haloferax volcanii*. Estes se ligam em uma região específica da subunidade menor dos ribossomos de *H. volcanii*, interferindo na atividade da peptidil transferase e como consequência regulam a expressão gênica de *H. volcanii* sob condições de estresse.

Embora não tenha sido relatado uma relevância biológica dos fragmentos de tRNAs em *T. cruzi* na forma epimastigota, estes apresentaram-se mais abundantes e com localização granular no citoplasma quando os epimastigotas foram submetidos a estresse nutricional (Garcia -Silva *et al.* 2010).

Desta forma fomos examinar a localização subcelular do fragmento mais abundante presente em tripomastigota metacíclico (tRNA^{Glu}-UUC) pela metodologia de hibridação fluorescente *in situ*. A técnica de hibridação fluorescente *in situ*, é uma ferramenta bastante útil para a detecção de sequências específicas de DNA ou RNA em células e tecidos. Essa técnica é útil para visualização da localização de RNAs e para a compreensão do papel da localização destes no mecanismo pós-transcricional de controle da expressão gênica em *T. cruzi* (Garcia -Silva *et al.* 2010; Alves *et al.*, 2013).

Esta metodologia foi aplicada tanto para as formas epimastigotas submetidas a estresse nutricional quanto para a forma metacíclica. Da mesma maneira como foi descrito por Garcia-Silva e colaboradores (2010), demonstramos por ensaios de FISH que os fragmentos de tRNA^{Glu} apresentaram uma distribuição granular para a forma epimastigota submetida a estresse nutricional (Figura 4.3 C). No entanto na forma metacíclica estes grânulos se desfizeram e os fragmentos de tRNA^{Glu} aparecem dispersos no citoplasma. Uma dúvida que nos surgiu foi se a lise poderia estar desfazendo estes grânulos na forma metacíclica, deixando então os fragmentos dispersos por todo o citoplasma. Para confirmar isso, fizemos uma lise leve das células da forma metacíclica e separamos o conteúdo citosólico solúvel da fração contendo organelas insolúveis, tais como vesículas e membranas celulares. O processo de separação foi confirmado por *Western blot* utilizando anticorpos para TcPUF6, uma proteína citosólica de ligação a RNA (Dallagiovanna *et al.* 2005), e

Dinamina , uma proteína de membrana presente nas vesículas endocíticas (Pucadyil e Schmid, 2009) (Figuras 4.3 F e L).

Para o ensaio de *Northern blot* foram utilizados RNA total extraído a partir das duas frações e sonda referente a sequência complementar do fragmento de tRNA^{Glu}. Com isso foi possível confirmar a presença dos fragmentos tanto na fração solúvel como na insolúvel (Figura 4.3 E), porém o sinal observado na fração celular insolúvel não descarta a possibilidade de sua presença em vesículas intracelulares menores. O padrão de fragmentos de tRNAs dispersos no citoplasma contrasta com o padrão granular observado em fragmentos de tRNA nas formas epimastigotas (Garcia - Silva *et al.* 2010). Além de observar este mesmo padrão, os autores também descreveram uma co- localização parcial destes fragmentos com os reservossomos (organelas granulares na extremidade posterior do parasita). Portanto, nossos resultados demonstram que os fragmentos de tRNA mudam drasticamente a sua localização após a metaciclogênese. Esta mudança pode estar relacionada com a ausência de reservossomos nas formas metacíclicas (Figueiredo *et al.*, 2004), sugerindo papéis distintos destes fragmentos durante as diferentes fases do parasita .

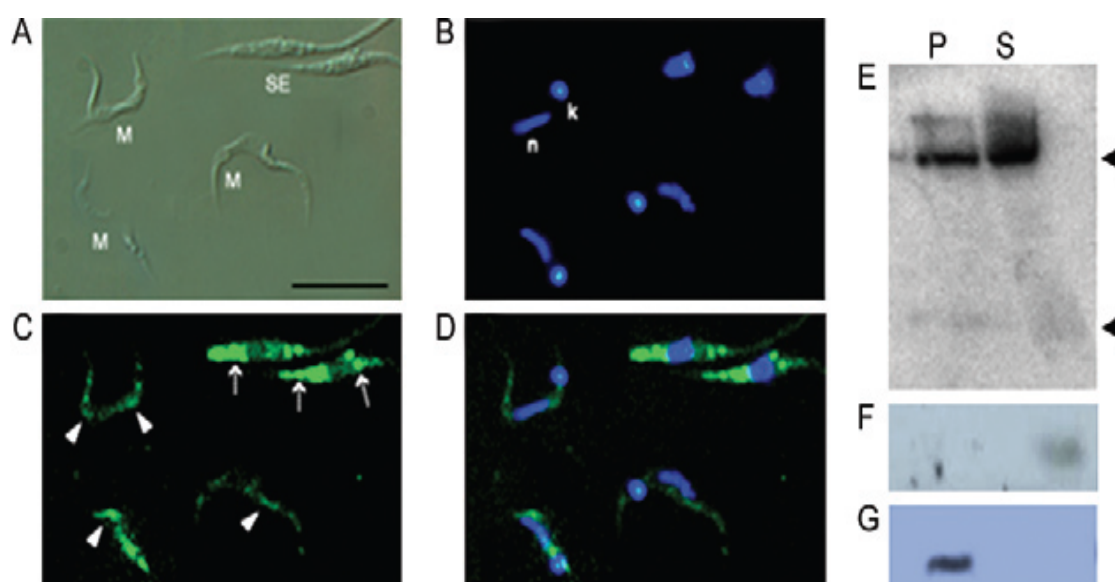


Figura 4.3: Localização subcelular de fragmentos de tRNAs nas formas tripomastigotas metacíclicas. **A:** Contraste de imagem diferencial das formas metacíclica (M) e epimastigota submetido a estresse nutricional (SE); **B:** Núcleos (n) e cinetoplastos (K) foram corados com DAPI; **C:** Sondas com isotiocianato de fluoresceína (FITC)- marcando o fragmento 3' tRNA^{Glu}-UUC (5'TTCCGATACCGGGAATCGA3') em SE (setas) e formas M (pontas de seta), **D:**

Sobreposição das imagens B e C (barra = 10 μ m). As células foram observadas em microscópio Olympus IX 81 acoplado a uma câmara Hamamatsu Orca-ER (Diagnostic Instruments); E: o RNA total a partir das frações solúvel (S) e insolúvel (P) das células de metacíclicos foi analisado com a sonda marcada radioativamente 3'tRNA^{Glu}-UUC, como em Garcia-Silva *et al.* (2010). Ensaio de *Western blot*, utilizando anti TcPUF6 (1/250) (F) e anti-Dinamina (1/200) (G) para avaliar a identidade de ambas as frações.

Desta forma, fomos avaliar se a população destes fragmentos de tRNA poderia estar envolvida na expressão gênica de *T. cruzi* associando-se aos mRNAs e regulando a expressão dos transcritos que estão na etapa de tradução. Em *T. cruzi* alguns genes já foram descritos cuja regulação ocorre por mobilização diferencial do mRNA aos polissomos (Dallagiovanna *et al.*, 2001; Ávila *et al.*, 2001; Ávila *et al.*, 2003; Nardelli *et al.*, 2007).

Para isso, investigamos a possível associação de tsRNA, com os poliribossomos. As formas metacíclicas e epimastigotas foram tratadas com cicloheximida e os perfis polissomais foram obtidos a partir de centrifugação em gradientes de sacarose (Figuras 4.4 A, D). Os parasitas foram tratados com puromicina como controle negativo (anexo 2). Os RNAs presentes nas frações correspondentes a fração livre de ribossomos, a fração monossomal e a fração polissomal foram extraídos e separados em gel de poliacrilamida. Logo após o gel ser corado já foi possível observar uma concentração de RNAs pequenos na fração livre de ribossomos das formas metacíclicas e epimastigotas (Figuras 4.4 B, E). Mediante análise de *Northern blot*, utilizando sonda complementar ao fragmento tRNA^{Glu}, foi possível confirmar que estes fragmentos encontram-se nas frações livres de ribossomo tanto nas formas metacíclicas quanto nas formas epimastigotas (Figuras 4.4 C, F). Diferente do que foi visto em outros organismos, estes fragmentos parecem não estar interagindo com os transcritos associados aos polissomos e conseqüentemente, não estariam regulando a tradução no parasita.

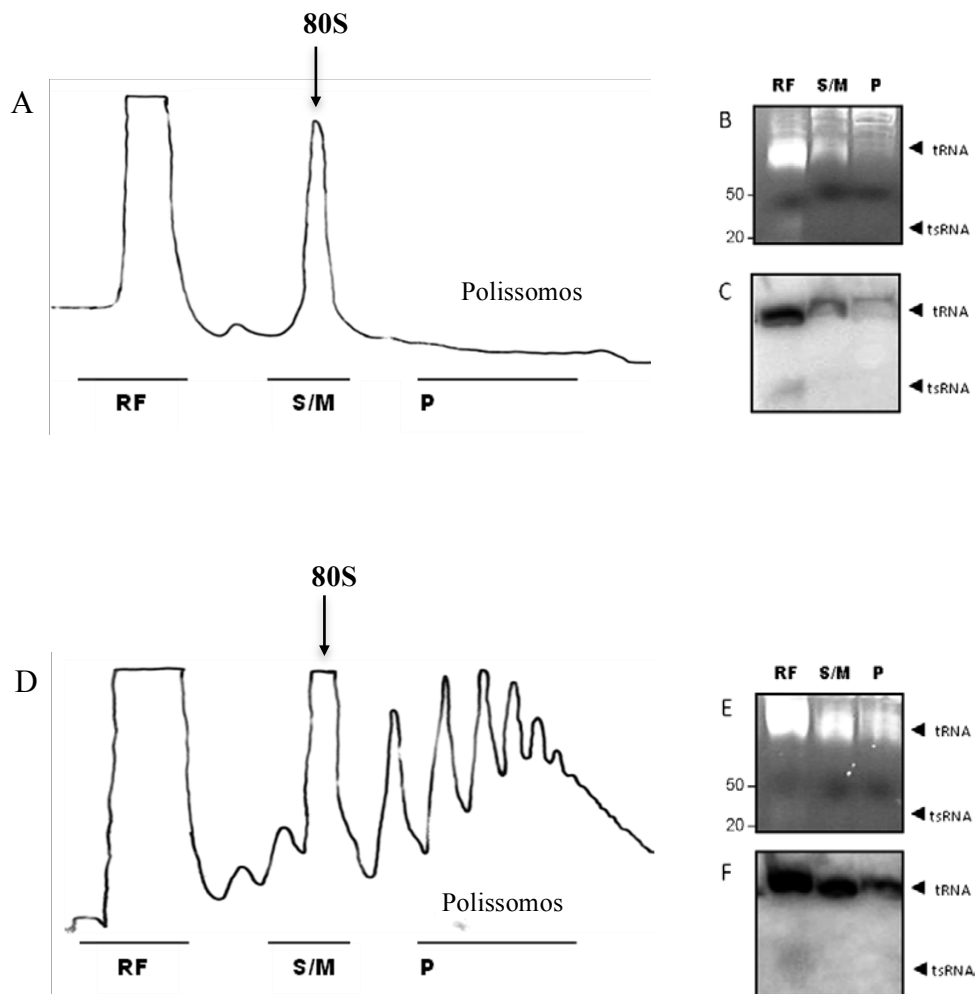


Figure 4.4: Análise da associação de tsRNAs com polissomos. Fragmentos de tRNA (tsRNA) não estão associados com os polissomos. **A:** Perfil polissomal da forma tripomastigota metacíclica e **D** da forma epimastigota. A posição da fração monossômica (80S) e polissomos estão indicadas no gradiente de sacarose. As frações foram coletadas e reunidas em três grupos (RF - livre de ribossomos, S/M – subunidades 40S, 60S e monossomos e P - polissomal). **B** e **E:** O RNA purificado e separado em gel de acrilamida a 15%. **C** e **F:** *Northern blot*, das formas metacíclicas (**C**) e epimastigota (**F**) analisados com a sonda tRNA^{Glu-UUC} marcada radioativamente. A sonda hibridizou apenas na posição correspondente a fração livre de polissomos.

4.2 Estudo do tradutoma de *T. cruzi* :

Vários genes já foram caracterizados em *T. cruzi* apresentando regulação por mobilização diferencial dos mRNAs aos polissomos, tais como o gene de TcSof1, TcImp4, TcImp3 (Fragoso *et al.*, 2003; Nardelli *et al.*, 2007). Na tentativa de definir quais são as proteínas expressas nas diferentes etapas do ciclo de vida deste parasita, várias pesquisas foram realizadas utilizando metodologias de ponta, como por exemplo, a análise de expressão gênica por microarranjos de DNA ou proteômica quantitativa da metaciclo gênese (Godoy *et al.*, 2011) entre outras. Entretanto, a falta de conhecimento científico a este respeito ainda permanece, uma vez que estas abordagens não refletem a relação direta entre os padrões de expressão de mRNA e as proteínas que serão efetivamente sintetizadas a partir deles.

Visando caracterizar a população de mRNAs da forma metacíclica que estaria sendo regulada negativamente por um mecanismo comum ao mRNA de TcSof1, ou seja, a presença do mRNA de TcSof1 na fração polissomal da forma metacíclica com a ausência da proteína nesta fase do ciclo de vida do parasita e na tentativa de identificar em que passo da tradução estes mRNAs estão sendo regulados, utilizamos a técnica de *Ribosome Footprinting* ou *footprinting*.

A obtenção de fragmentos de mRNA protegidos pelos ribossomos (RFP), a purificação destas sequências e seu posterior sequenciamento (através de *deep sequencing*) permite a obtenção das sequências de mRNA que efetivamente estão associadas a maquinaria de tradução, fornecendo uma medida de alta precisão do processo de tradução *in vivo* (Ingolia *et al.*, 2009). Entretanto, esta é a primeira vez que esta técnica é utilizada em *T. cruzi*, um organismo patogênico com controle da expressão gênica quase que exclusivamente pós – transcricional.

Para isso, primeiramente iniciamos a padronização da técnica de *Ribosome Footprinting* em formas epimastigotas de *T. cruzi*. Determinamos o número de parasitas necessários para a obtenção de quantidade suficiente de sequências de mRNA protegidas pelos ribossomos (*footprinting*). Após a obtenção do mRNA polissomal (protocolo baseado em Holetz *et al.*, 2007), realizamos vários ensaios a fim de determinar qual a melhor enzima, concentração, temperatura e tempo de digestão dos fragmentos de mRNA não protegidos pelos ribossomos. A enzima

benzonase apresentou a melhor digestão, no qual foi possível obter os fragmentos referentes a cobertura do ribossomo. Esta enzima é uma endonuclease proveniente de engenharia genética a partir de uma endonuclease encontrada na bactéria *Serratia marcescens* que tem a propriedade de após a clivagem manter as extremidades fosforiladas, o que facilitou sobremaneira a etapa de ligação dos adaptadores para a obtenção da biblioteca de cDNA para o sequenciamento.

Os fragmentos obtidos após a digestão do RNA polissomal foram imediatamente extraídos. Para estabelecer o melhor método de extração para este experimento, utilizamos o kit mirVana™ *miRNA Isolation Kit* (Ambion) seguindo o protocolo especificado pelo fornecedor, e o protocolo de extração de RNA total com Trizol. Em seguida, procedemos a purificação dos fragmentos de 30 nucleotídeos em sistema *FlashPAGE™ Fractionator* (Ambion). Este sistema se baseia na separação dos fragmentos por eletroforese em gel sendo possível parar a corrida e coletar os fragmentos de RNA por tamanho, de acordo com o tempo da corrida.

Após todos estes testes estabelecemos a utilização do *kit mirVana* para a extração dos fragmentos protegidos pelos ribossomos, uma vez que este kit permite uma extração com enriquecimento de pequenos RNAs. As sequências correspondentes a aproximadamente 32 nucleotídeos, foram obtidas após entre 15 a 20 minutos de corrida da eletroforese pelo *FlashPAGE*. Os fragmentos purificados foram visualizados, quantificados no equipamento *Bioanalyzer* utilizando o chip para pequenos RNAs e sequenciados. (Figura 4.5 A, B)

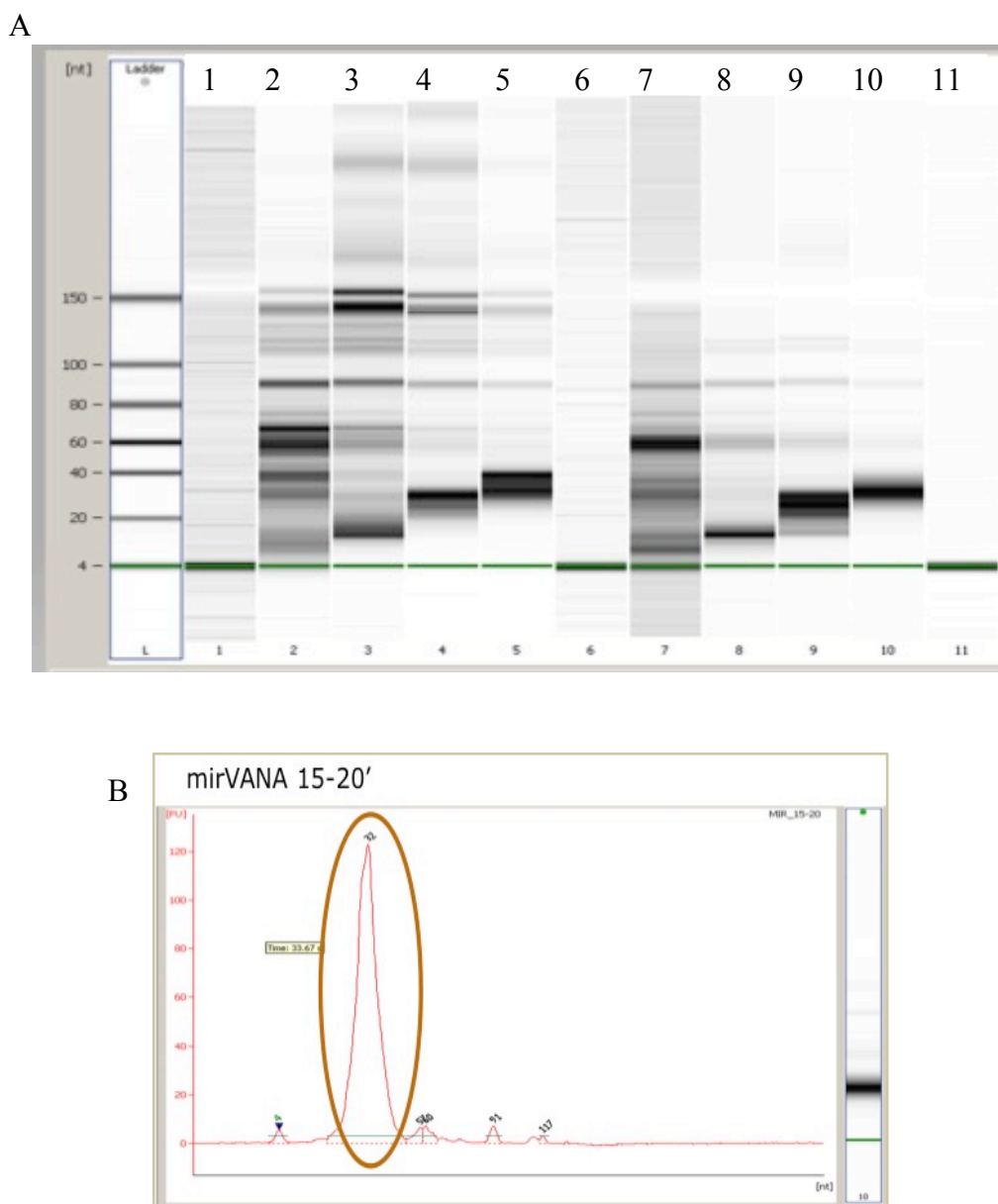


Figura 4.5: Testes de padronização da técnica de *Ribosome Footprinting* em *T. cruzi*. **A:** Gel virtual de RNA gerado pelo equipamento Bioanalyzer – L= marcador de peso molecular, 1 = RNA extraído com trizol purificado pelo *flash page* nos tempos de 0-8', 2 = 8-10', 3 = 10-12', 4 = 12-15', 5 = 15-20', 6 = RNA extraído com o kit mirVana purificado pelo *flash page* nos tempos de 0-8', 7 = 8-10', 8 = 10-12', 9 = 12-15', 10 = 15-20', 11= água; **B:** Eletroferograma da fração correspondente a eletroforese com tempo de corrida entre 15 a 20 minutos.

A partir dos resultados obtidos pela técnica de *Ribosome Footprinting* da forma epimastigota, partimos para o experimento de *Ribosome Footprinting* em larga escala nas formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*. Cada experimento foi feito em triplicata, sendo que cada triplicata foi dividida em duas amostras de 5×10^9 células para a obtenção de RNA poli-A total e para a obtenção dos fragmentos protegidos pelos ribossomos, o *Ribosome Footprintig*.

Após a realização de duas metaciclogêneses *in vitro* foram obtidos $1,5 \times 10^{10}$ parasitas na forma metacíclica de *T. cruzi*. A partir da primeira metaciclogênese obtivemos 1×10^{10} parasitas que foram separados em dois grupos (réplicas técnicas). A partir da segunda metaciclogênese, obtivemos 5×10^9 metacíclicos. Assim, as análises descritas a seguir, correspondem a três réplicas técnicas e duas réplicas biológicas.

Após a obtenção da fração polissomal, o precipitado de RNA foi digerido e os fragmentos purificados e quantificados como descrito anteriormente para a forma epimastigota. (Figura 4.6 A e B).

A qualidade e a quantidade de cDNA obtido a partir dos fragmentos purificados (sequências de aproximadamente 140 nucleotídeos referentes aos fragmentos do *footprinting* mais os adaptadores para o sequenciamento) e de RNA-poliA total (sequências de aproximadamente 200 nucleotídeos) foram também determinadas no equipamento *Bioanalyzer* (Figura 4.6 C).

Tendo obtido a concentração de fragmentos de RNA necessária, iniciamos o protocolo de sequenciamento em larga escala na plataforma SOLiD (Cloonan *et al.*, 2008).

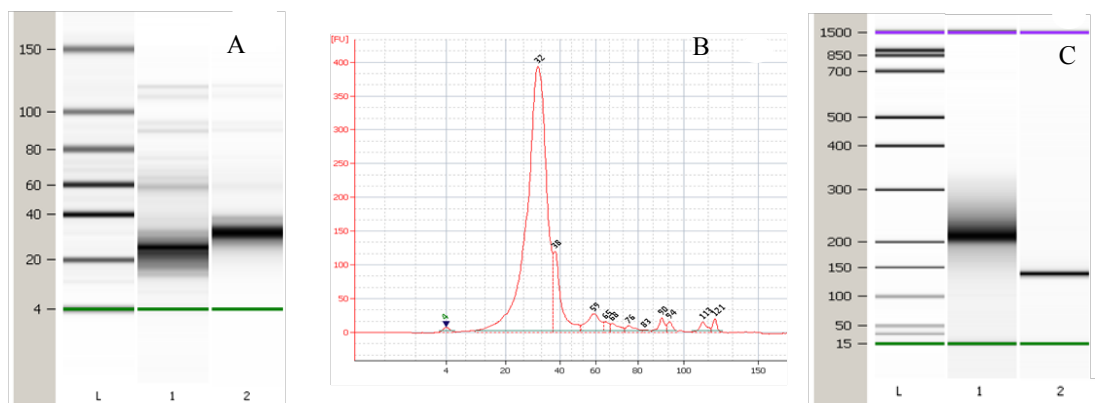


Figura 4.6: Perfil Eletroforético das bibliotecas de cDNA obtidas a partir dos fragmentos purificados pela técnica de *Ribosome Footprinting* *T. cruzi*. **A:** Gel virtual de RNA gerado pelo equipamento Bioanalyzer – L= marcador de peso molecular, 1 = fração não purificada, 2 = fração purificada das sequências de mRNA protegidos pelos ribossomos; **B:** Eletroferograma da fração purificada. **C:** Gel virtual de DNA gerado pelo equipamento Bioanalyzer – L = marcador de peso molecular, 1 = biblioteca de cDNA obtida após amplificação de fragmentos de 200 a 250 nucleotídeos gerados a partir do RNAPoliA total. 2 = biblioteca de cDNA de 120 a 140 nucleotídeos obtidas após a amplificação dos fragmentos de mRNA protegidos pelos ribossomos.

Ao final do sequenciamento, iniciamos a análise das sequências. O número de leituras obtidas para cada amostra está representado na Tabela 1.

As três réplicas das bibliotecas de RNA-poliA geraram um total de cerca de 48 milhões de leituras. Enquanto que para as réplicas referentes ao *footprinting* (RFP) obtivemos um total aproximado de 370 milhões de leituras.

Tabela 1: Número de leituras geradas após sequenciamento.

Amostras da forma Metacíclica	Numero de leituras obtidas
RNA-poliA_1	22,414,554
RNA-poliA_2	11,642,477
RNA-poliA_3	13,874,418
Total_ RNA-poliA	47,931,449
RFP_1	86,956,133
RFP_2	97,312,421
RFP_3	185,388,165
Total_ RFP	369,656,719

4.3 Qualidade das sequências:

Uma análise criteriosa para obtenção de sequências de boa qualidade é essencial para um bom trabalho de análises genômicas. Para isso, os resultados dos sequenciamentos foram avaliados com relação à qualidade das sequências obtidas, utilizando a plataforma do software CLC (*CLC Genomics Workbench*) e o programa *FastQ*.

Para analisar a qualidade das leituras pelo programa *FastQC report*, importamos as sequências para a plataforma do software CLC Genomics Workbench para converter as sequências em formato colorspace FastQ, uma vez que, o software *FastQC* não lê o formato em que as sequências saem do sequenciador SOLiD™.

As sequências foram analisadas antes e depois do *trimming* (retirada de sequências menores de 15 nucleotídeos e adaptadores), o *software* nos permitiu gerar gráficos da distribuição das sequências, levando em consideração a qualidade média total por base e qualidade média de todas as leituras.

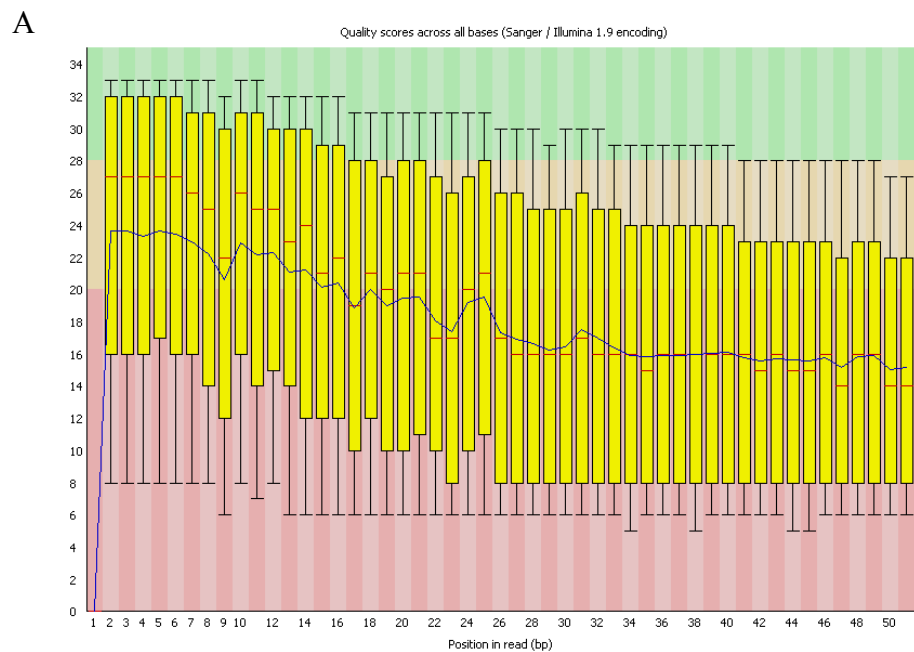
Quando analisamos os gráficos antes do *trimming*, observamos uma queda na qualidade das sequências, referentes a área rosa do gráfico (Figura 4.7 A), tanto para todas as bibliotecas de *Ribosome Footprinting* como para as de RNA-poliA.

Ao contrário de outros equipamentos de sequenciamento massivo, o SOLiD™ não dispõe de um programa interno que realize o processo de pré filtragem de dados

de qualidade ruim (Sasson *et al.*, 2010), o que resulta em grande quantidade de leituras pouco informativas e descartáveis, justificando uma qualidade ruim próximo da extremidade 3' das amostras avaliadas.

Através do software CLC efetuamos o *trimming*, no qual retiramos o adaptador P2 e os *barcodes* para as bibliotecas de *footprinting* e eliminamos sequências menores que 15 nucleotídeos para as bibliotecas de *footprinting* e RNA-poliA.

Observamos um aumento na qualidade das sequências para todas as bibliotecas, figura 4.7 B.



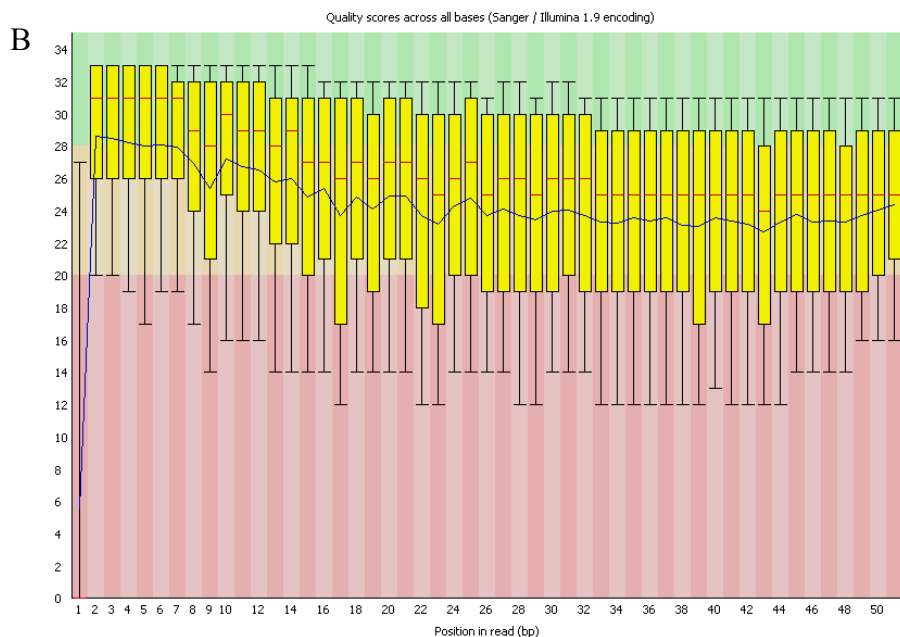


Figura 4.7: Representação gráfica da qualidade média por base. Verde: Ótima qualidade; Laranja: Boa qualidade; Rosa: Qualidade ruim, as sequências são representadas pelas barras amarelas. **A:** Gráfico gerado antes do *trimming*, onde é possível observar uma queda da qualidade ao longo de toda a sequência; **B:** Gráfico gerado após *trimming*, onde as sequências apresentaram boa qualidade.

Uma vez que sequências de baixa qualidade foram retiradas, que poderiam ser produto de contaminação ou degradação do RNA, o próximo passo foi a verificação do tamanho das sequências para as amostras de *footprinting* que deveriam ter um enriquecimento dos fragmentos entre 34 - 37 nucleotídeos.

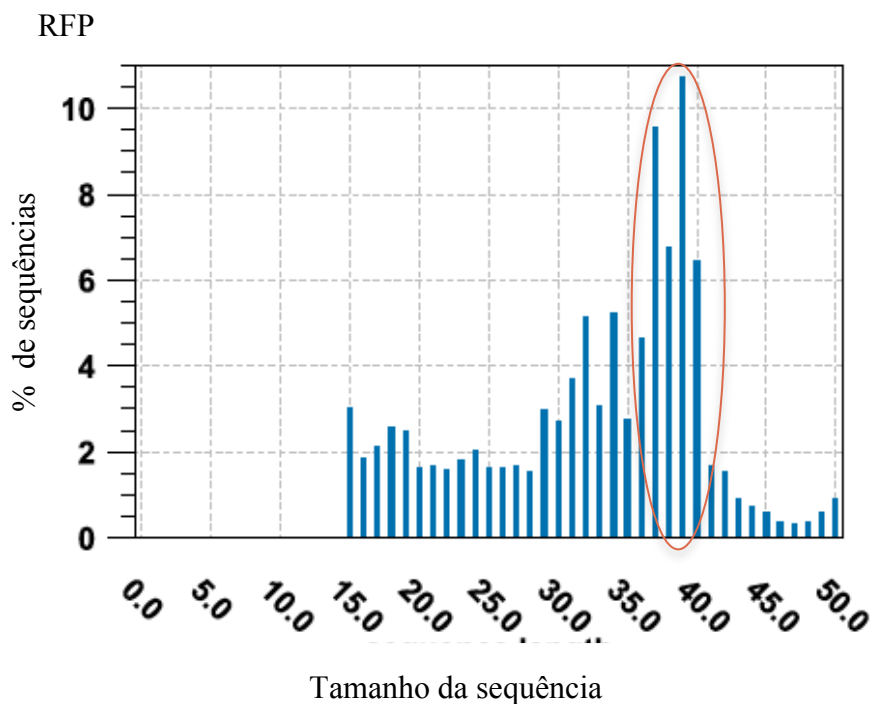


Figura 4.8: Gráfico de distribuição por tamanho das sequências. O eixo X representa o tamanho das sequências em quanto que no eixo Y temos a porcentagem (%) de sequências em relação ao tamanho. As sequências apresentaram um enriquecimento de sequências entre 34 a 40 nucleotídeos como evidenciado pelo círculo.

No entanto, após análise de tamanho das sequências, observamos um enriquecimento de sequências entre 34 a 40 nucleotídeos (figura 4.8). Após o *trimming*, a grande maioria das sequências correspondentes a mais de 37 nucleotídeos deveriam ser descartadas, uma vez que não refletiam os fragmentos protegidos pelos ribossomos. Em *Drosophila melanogaster*, o *footprinting* dos ribossomos apresentam tamanho entre 28-34 nucleotídeos (Dunnet *al.*, 2013), no entanto em *Escherichia coli* os fragmentos variaram entre 25-42 nucleotídeos (Wei Liet *al.*, 2012).

A análise estrutural da subunidade ribossomal 80S de *T. cruzi* foi realizada por Gao e colaboradores em 2005, onde resultados de Cryo-EM mostraram que a subunidade ribossomal 80S de *T. cruzi* está associada com uma pequena estrutura do rRNA 18S, que juntas formam uma grande hélice com a sua extremidade superior

localizada na proximidade do canal de saída do mRNA. A comparação com os rRNA 18S de outros eucariotos, mostrou que esta característica existe apenas em tripanossomas. Assim, esta estrutura 80S diferenciada presente em *T. cruzi* poderia justificar a presença de fragmentos protegidos pelos ribossomos um pouco maior do que os apresentados por Ingolia e colaboradores (2009).

No entanto, com o auxílio do software *FastQC report* e CLC e utilizando análise de super representação (*Over-representation analyses*), vimos que ao final das sequências com mais de 37 nucleotídeos havia uma sequência nucleotídica super representada, (figura 4.9).

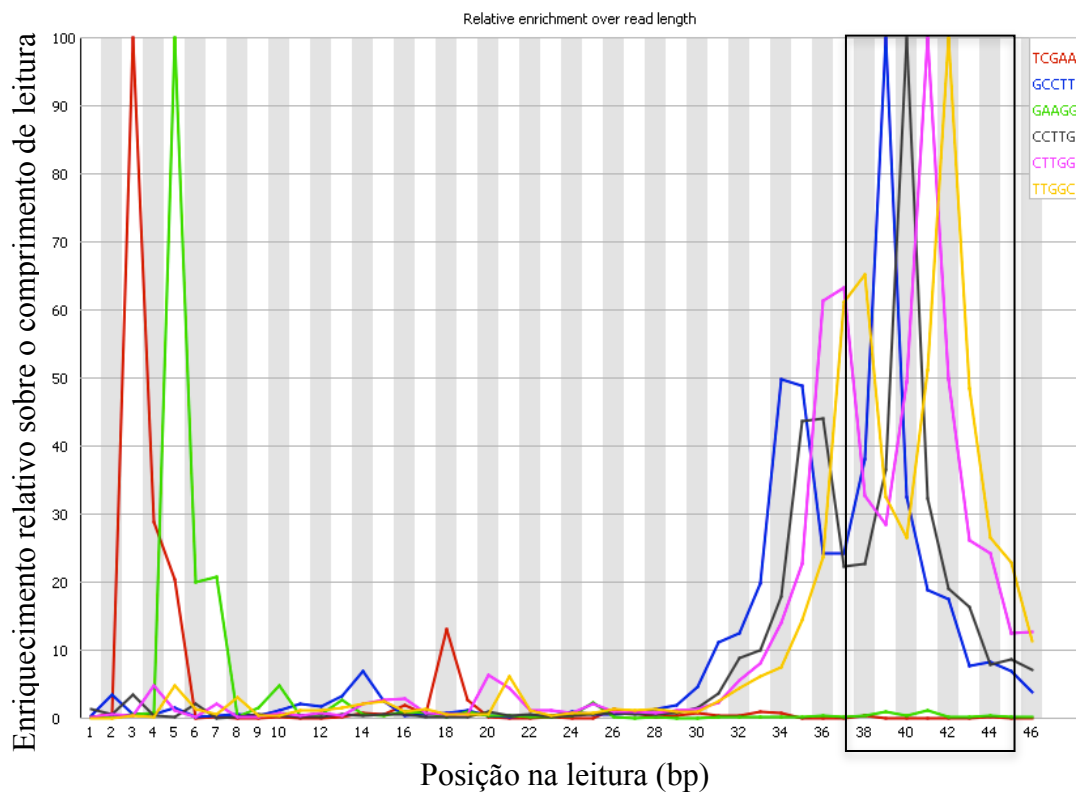


Figura 4.9: Os cinco mers mais sobre-representados. A sobre-representação de uma sequência de 5 nucleotídeos é representada pelas quatro cores que corresponde as bases A, T, G ou C. A frequência esperada é calculada como o produto da probabilidade empírico de nucleotídeos que compõem o 5mer. (5mers que contêm bases ambíguas são ignorados). Ao final das sequências com mais de 37 nucleotídeos, é possível observar sequências nucleotídicas super representadas.

Com ajuda do algoritmo BLAST de análise de sequências, procuramos possíveis alinhamentos deste fragmento. Confirmamos que tal fragmento não era compatível a nenhuma sequência depositada nos bancos de dados (<http://tritrypdb.org> e <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Após várias investigações, vimos que a sequência se referia a um fragmento do *barcode* na porção 3' das sequências.

Um novo *trimming* mais específico foi realizado, onde foram retirados primeiramente os *barcodes* e posteriormente a retirada dos nucleotídeos referentes ao adaptador P2. Desta forma obtivemos um enriquecimento das sequências com 32-37 nucleotídeos referentes as sequências de mRNAs protegidas pelos ribossomos (Figura 4.10).

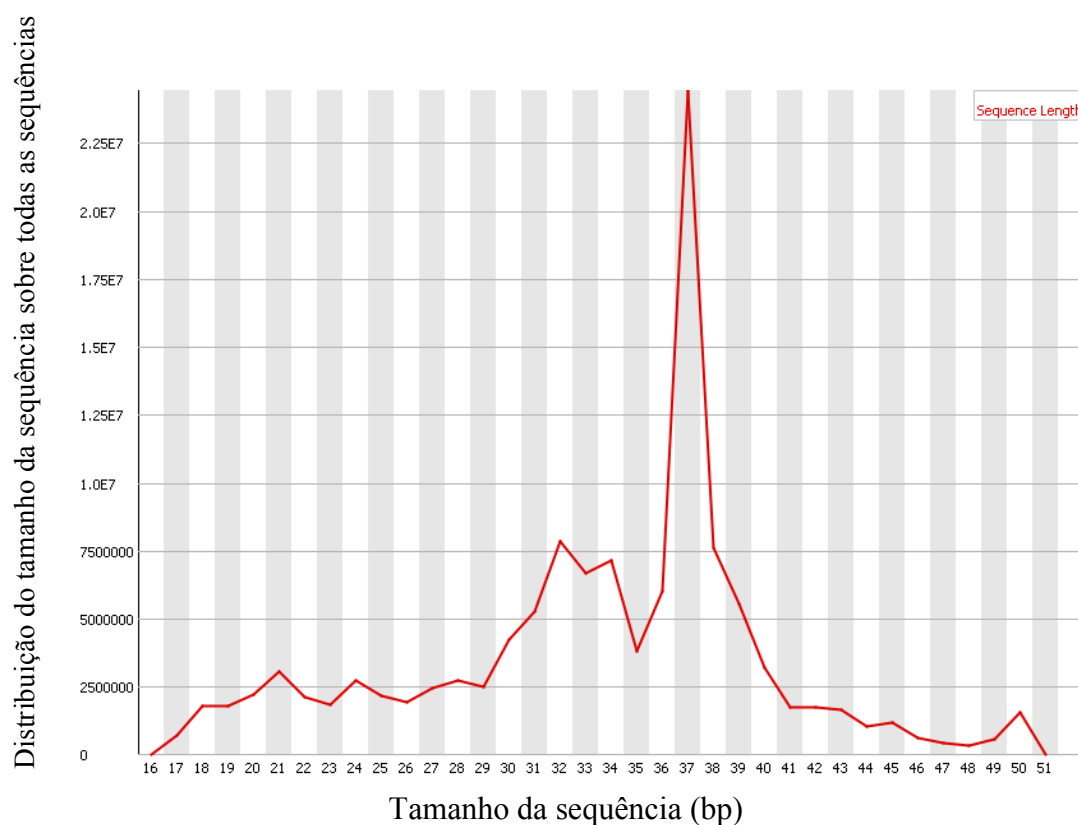


Figura 4.10: Frequência de cada base ao longo da leitura. O gráfico retrata a distribuição das sequências por tamanho ao longo das leituras, onde o eixo X mostra o tamanho das sequências e no eixo Y o número de sequências. É possível verificar um enriquecimento de sequências entre 30 e 37 nucleotídeos. Gráficos gerados pelo software FASTQC.

O mesmo procedimento foi realizado para as sequências provenientes das bibliotecas de RNA-poliA, no qual foi feita análise de qualidade antes e depois do *trimming* (figura em anexo).

Antes de iniciarmos o mapeamento das sequências contra o genoma do *T. cruzi*, passamos as bibliotecas por uma última análise de qualidade, que se refere a confiabilidade das bases adicionadas durante o processo de sequenciamento. Esta análise é de grande importância, uma vez que reduz a frequência de alinhamentos incorretos que são normalmente causados por erros nas leituras.

A confiabilidade da identificação de cada base sequenciada é dada pelo valor ou escore de qualidade da base. A métrica mais utilizada é o valor de qualidade Phred (Q), que é dado pela fórmula representada abaixo, onde P é a probabilidade da base ter sido erroneamente identificada, (Ewing *et al.*, 1998).

O valor de qualidade de PHRED é medido através da seguinte fórmula:

$$PQV = -10 \log_{10} (p),$$

sendo p = a probabilidade de ocorrência do erro.

A qualidade de cada base varia entre 10 e 50, onde base igual a 30 representa sequências de alta qualidade e confiabilidade, conforme mostrado na tabela abaixo.

Tabela 2. Relação entre valor PHRED e probabilidade de erro na determinação de uma base

Valor de PHRED	Probabilidade de uma base mal determinada	Precisão
10	1 em 10	90%
20	1 em 100	99%
30	1 em 1000	99,9%
40	1 em 10000	99,99%
50	1 em 100000	99,999%

Dessa forma, todas as nove bibliotecas (três referentes ao *footprinting*, três de RNA-poliA e três referentes as amostras de *footprinting* tratadas com harringtonina, esta última será descrita posteriormente) foram avaliadas pelo valor

de qualidade Phred, utilizando o *software* CLC, antes e depois das sequências serem submetidas ao *trimming*.

As regiões das sequências de baixa qualidade como mostrado na figura 4.11A, foram eliminadas no *trimming*, desta forma obtivemos bibliotecas com sequências de altíssima qualidade (Figura 4.11B), diminuindo a probabilidade de erros de identificação de bases e propiciando um alinhamento de qualidade e de alta fidelidade.

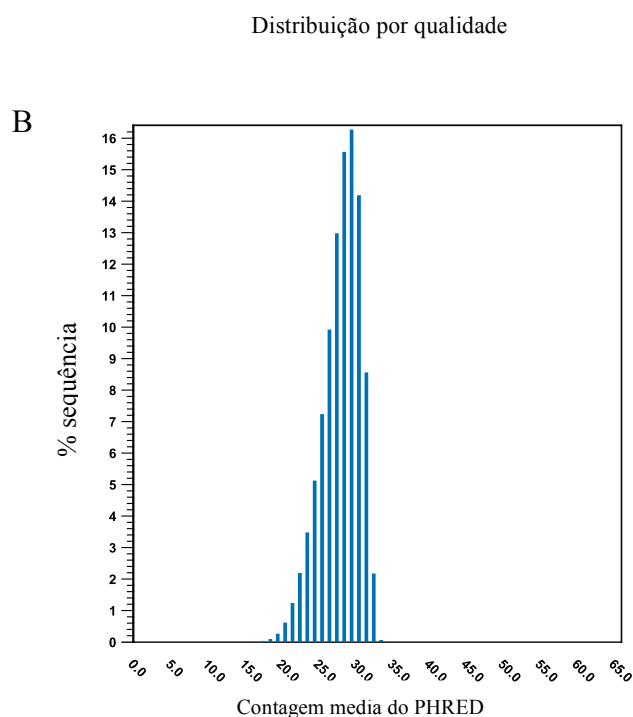
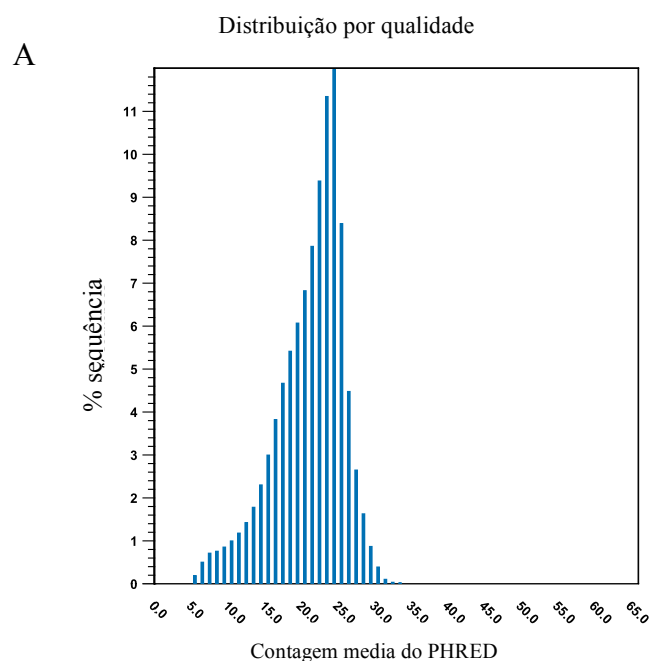


Figura 4.11: Gráfico representativo do valor de qualidade Phred. O eixo X representa a contagem média do PHRED, em quanto que, o eixo Y representa a porcentagem de sequência (%). **A:** Análise das sequências antes do *trimming*; **B:** Análise das sequências depois do *trimming*.

4.4 Análise da Reprodutibilidade Biológica

Outro tipo de inspeção realizada antes da análise propriamente dita dos dados, foi a análise da reprodutibilidade das réplicas biológicas. Para isso, utilizamos o coeficiente de correlação de Pearson.

O coeficiente de correlação de Pearson é uma medida do grau de relação linear entre duas variáveis quantitativas. Este coeficiente varia entre os valores -1 e 1. O valor 0 (zero) significa que não há relação linear, o valor 1 indica uma relação linear perfeita e o valor -1 também indica uma relação linear perfeita mas inversa, ou seja, quando uma das variáveis aumenta a outra diminui. Quanto mais próximo estiver de 1 ou -1, mais forte é a associação linear entre as duas variáveis.

Com estas análises podemos afirmar que as réplicas biológicas foram reprodutivas, aumentando a confiabilidade dos dados.

Na figura 4.12 A e B podemos observar que a correlação entre réplicas de *footprinting* e as de RNA-poliA foram em geral altas, as amostras de RNA-poliA chegaram a um valor de correlação igual a 0,96 enquanto que as de *footprinting* um valor igual a 0,86.

As réplicas biológicas apresentaram uma alta correlação de Pearson positiva, e portanto a grande reprodutibilidade entre as bibliotecas demonstrou a robustez da abordagem de *Ribosome Footprinting (footprinting)*.

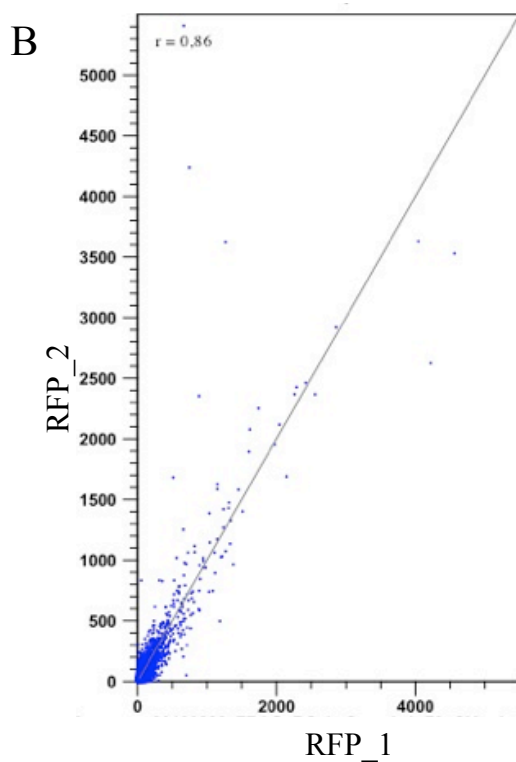
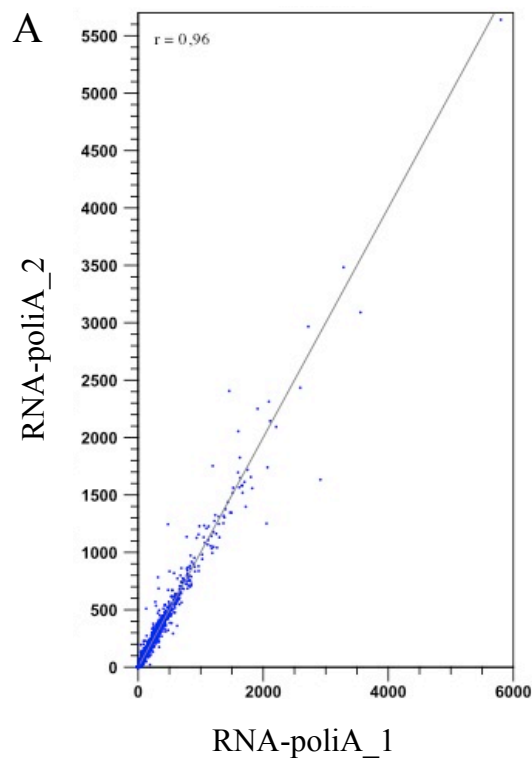


Figura 4.12: Gráfico de correlação de Pearson. **A:** Coeficiente de correlação de Pearson entre as réplicas 1 e 2 de RNA-poliA; **B:** Coeficiente de correlação de Pearson entre as réplicas 1 e 2 de *footprinting*.

Após a seleção por tamanho e as análises de qualidade, o número de sequências obtidas para cada uma das seis bibliotecas se encontra na tabela 3.

Tabela 3: A tabela mostra o número total de sequências geradas após o *trimming* para eliminar sequências de baixa qualidade e sequências correspondentes aos adaptadores.

Amostras da forma Metacíclica	Número de sequências após <i>trimming</i> e análise de qualidade
RNA-poliA_1	7,866,215
RNA-poliA_2	4,176,487
RNA-poliA_3	4,539,783
Total_ RNA-poliA	16,582,485
RFP_1	40,978,892
RFP_2	42,625,177
RFP_3	90,711,620
Total_ RFP	174,315,689

4.5 Alinhamentos das leituras frente ao genoma de referência.

Estudos de similaridade das leituras frente ao genoma de referência (mapeamento) foram realizados utilizando o *software* CLC.

O mapeamento foi realizado com os genomas referência do *T. cruzi* depositado nos bancos de dados (<http://tritrypdb.org/common/downloads/release-6.0> e <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/term=Trypanosoma+cruzi>). Entretanto o genoma do *T. cruzi* apresenta grande quantidade de sequências repetitivas, impedindo uma montagem haplóide que defina o genoma completo deste parasita (El-Sayed *et al.*, 2005). Desta forma, iniciamos as nossas análises pelo genoma do haplótipo Esmeraldo-like.

Das 6 milhões de sequências referentes as bibliotecas de RNA-poliA, aproximadamente 5,6 milhões de leituras mapearam no genoma do *T. cruzi*, sendo que destas, 3% eram referentes a sequência de RNA ribossomal. Para as bibliotecas de *footprinting*, mais de 20 milhões de leituras são compatíveis a sequências de rRNA (Tabela 3). Segundo Ingolia e colaboradores (2009), o fato das bibliotecas de *Ribosome Footprintig* apresentarem valores altos de sequências de rRNA não é de se surpreender, uma vez que há milhões de bases de rRNA protegendo apenas algumas dezenas de bases de fragmentos de mRNA.

Analisando as sequências de rRNA presentes nas amostras de *Ribosome Footprinting*, estes autores observaram que sequências específicas do rRNA estavam presentes em todas as amostras. A nuclease utilizada na técnica em questão, apresenta um clivagem reprodutível a um número limitado de posições no RNA ribossomal. Desta forma, os autores descrevem uma forma de eliminar boa parte desta contaminação, utilizando a técnica de cromatografia de afinidade, onde oligonucleotídeos com sequência anti-sentido a estas sequências de RNAs ribossomais são imobilizadas em *beads* biotinizadas e com auxílio de uma matriz de streptavidina estas sequências são eliminadas das bibliotecas de cDNA antes de iniciar o processo de sequenciamento. No entanto, ainda não foi possível a utilização deste sistema em *T. cruzi*, pois não existe um kit disponível comercialmente que contenha sequências anti-sentido à rRNA de trypanossomatídeos, e conseqüentemente a purificação destes rRNAs não é eficiente quando os kits comerciais disponíveis são utilizados para este fim. Em colaboração com grupo do Dr. José Sotelo do Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) Montevideo, Uruguay, as sequências referentes aos RNA ribossomais foram retiradas das bibliotecas em etapa anterior à análises, por *scripts* em linguagem de programação.

Tabela 4: Sequências mapeadas utilizando o genoma *T. cruzi* haploide Esmeraldo-Like.

Amostras da forma Metacíclica	Esmeraldo-Like		
	Sequências mapeadas	Sequências mapeadas sem rRNA	Sequências mapeadas para rRNA
RNA-poliA_1	2,932,406	2,874,456	57,950
RNA-poliA_2	1,557,817	1,539,623	18,194
RNA-poliA_3	1,302,744	1,190,596	112,148
Total_ RNA-poliA	5,792,967	5,604,675	188,292
RFP_1	9,204,360	3,508,102	5,696,258
RFP_2	11,008,360	4,039,125	6,969,478
RFP_3	16,765,595	9,159,665	7,605,930
Total_ RFP	36,978,558	16,706,892	20,271,666

Para assegurar que fosse possível observar um acúmulo diferencial de leituras ao longo das CDS (*Coding DNA Sequence*), utilizamos o critério de analisar apenas os genes que apresentaram mais de 100 leituras/gene. Além disso, verificamos a distribuição das leituras ao longo de genes altamente expressos e conhecidamente não regulados durante o ciclo de vida, os quais deveriam ter uma alta cobertura, ou seja, um alto número de leituras por gene. Um exemplo utilizado foi o gene da alfa tubulina, cuja expressão não sofre regulação na forma metacíclica (Gonzalez-Pino *et al.*, 1999; Da Silva *et al.*, 2006). Godoy e colaboradores (2012) estudando o proteoma durante a metaciclogênese de *T. cruzi* utilizando proteômica quantitativa, também evidenciaram a expressão deste gene ao longo de todo o processo de diferenciação do parasita.

O alinhamento dos fragmentos protegidos pelos ribossomos para o gene de alfa tubulina revelou que os ribossomos se encontravam ao longo da CDS, tanto para os mRNAs de alfa tubulina provenientes das amostras de *footprinting* da forma epimastigota (Figura 4.13 A), como as da forma metacíclica (Figura 4.13 B).

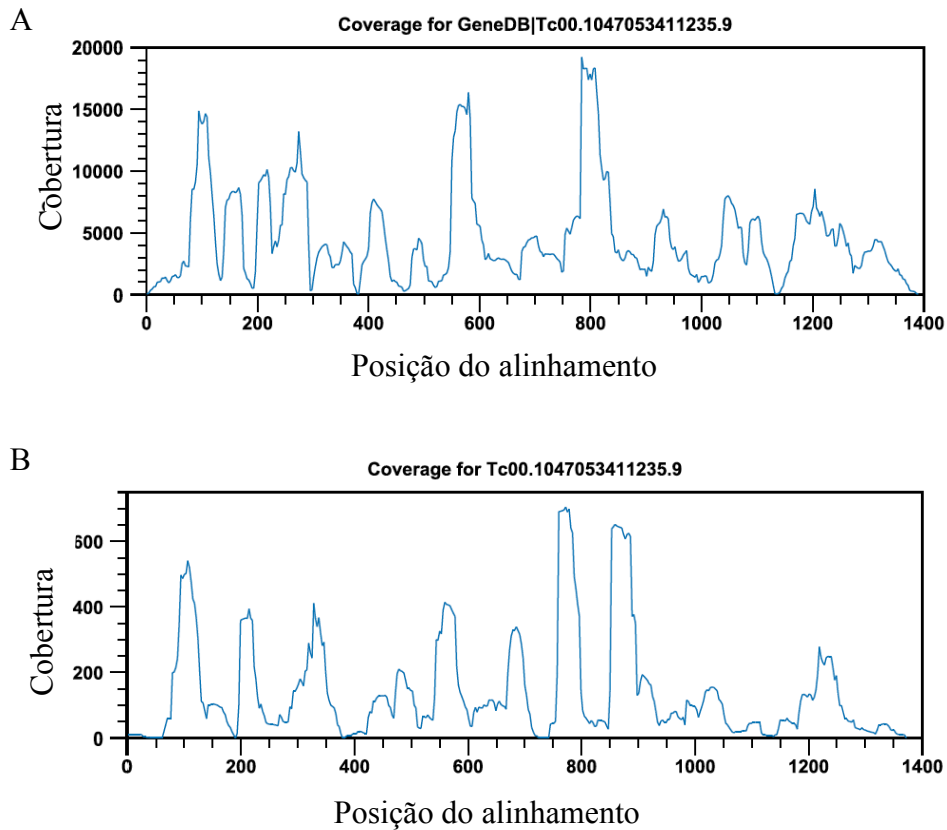


Figura 4.13: Mapeamento das leituras ao longo do gene de alfa tubulina obtidos pela técnica de *Ribosome Footprinting*. O eixo X representa o posicionamento das leituras mapeadas ao longo do gene, o eixo Y representa o numero de leituras para cada posição do gene. **A:** Perfil ribossomal do gene alfa tubulinana forma epimastigota; **B:** Perfil ribossomal do gene alfa tubulinana forma metacíclica

Os picos nos gráficos representam o acúmulo das leituras em uma determinada região ao longo do gene. Segundo Ingolia e colaboradores (2009), a contagem de leituras em um determinado códon deve ser proporcional ao tempo de permanência do ribossomo neste local. Desta forma, esta diferença de densidade das leituras, ou seja, de fragmentos cobertos pelo ribossomos, representam a diferença da velocidade que o ribossomo passa por cada região. Estudando o perfil ribossomal de leveduras e células de mamíferos foi possível encontrar pausas mais pronunciadas onde a densidade de ribossomos (*footprinting*) é 25 vezes maior do que a média observada em todo o corpo do gene (Ingolia *et al.*, 2012). Segundo os autores as análises de sequências das pausas revelaram que codificam uma sequência peptídica consenso, com forte enriquecimento de glutamato ou aspartato no sítio A do ribossomo em pausa, precedido por uma prolina ou glicina e então, outra prolina. A partir deste

resultado, os autores sugerem que a identidade do tRNA e a sequência do peptídeo nascente podem influenciar a cinética da elongação. Em contrapartida, sugerem também que a velocidade dos ribossomos não depende da presença de códons raros. Este resultado tem gerado certa polêmica na comunidade científica. Outro trabalho mais recente, no qual os autores reanalisaram os dados obtidos por de Ingolia e colaboradores em 2011, mostrou que a velocidade da elongação é afetada por fatores como a adaptação de códons ao *pool* de tRNA e a estruturas secundárias do mRNA e forneceram evidências de que a velocidade da elongação tende a aumentar ao longo da sequência codificante (Dana e Tuller, 2012).

Assim, como a cobertura dos fragmentos protegidos pelos ribossomos define as sequências que estão sendo traduzidas, passamos para as análises do perfil de expressão do gene TcSof1. Em uma primeira análise nas bibliotecas de *footprinting* da forma epimastigota, uma vez que já foi mostrado que a proteína TcSof1 encontrava-se presente nesta forma. No entanto, nas bibliotecas mapeadas contra o genoma de *T. cruzi* utilizando o haplóide Esmeraldo, não encontramos leituras referentes a este gene. Desta forma, passamos a um novo mapeamento utilizando o genoma do haplóide não-Esmeraldo. A partir dos dados de alinhamento de cada uma das bibliotecas foi possível visualizar o perfil ribossomal do gene de TcSof1 na forma epimastigota (Figura 4.14).

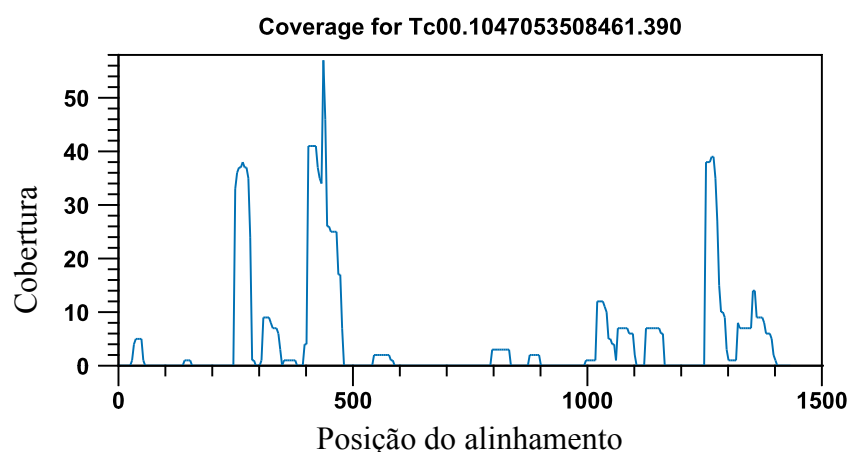


Figura 4.14: Mapeamento das leituras ao longo do gene de TcSof1 obtidos pela técnica de *Ribosome Footprinting*. O eixo X representa o posicionamento das

leituras mapeadas ao longo do gene, o eixo Y representa o numero de leituras para cada posição do gene. Cobertura do ribossomo ao longo de todo o gene.

O gene de TcSof1 apresenta um perfil de mapeamento que foi considerado como padrão para genes que estão sendo traduzidos, onde é possível visualizar leituras correspondentes ao posicionamento do ribossomo ao longo de todo o gene.

Quando analisamos as sequências provenientes do *footprinting* da forma metacíclica, os mRNAs de TcSof1, TcImp3, TcImp4 e TcDhr1 mostraram - se presentes e com valores de cobertura chegando a mais 300 leituras mapeadas, mostrando que estes genes realmente encontram-se associados aos polissomos nas formas metacíclicas.

Analisando os gráficos do *footprinting* do gene de TcSof1 como mostrado na figura 4.15, foi possível observar uma alteração no perfil ribossomal, onde as leituras parecem se acumular na porção final do gene. Para os genes de TcImp3, TcImp4 e TcDhr1, também foi observado um perfil de acúmulo de leituras, porém, com um padrão diferente (Figuras em anexo). Este perfil de mapeamento parece indicar uma possível regulação na fase da elongação da tradução, pois embora os mRNAs destes genes estejam presentes nos polissomos, análises de *Western blot* revelaram que as respectivas proteínas não são expressas nesta forma (Nardelli *et al.*, 2007).

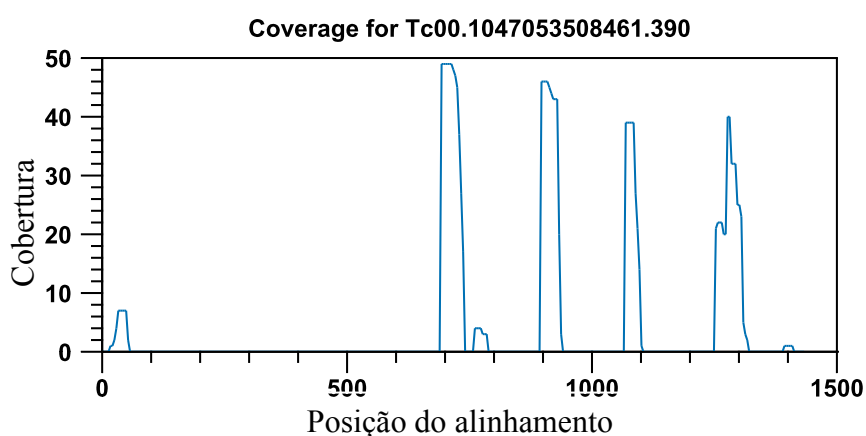


Figura 4.15: Mapeamento das leituras ao longo do gene de TcSof1 obtidos pela técnica de *Ribosome Footprinting* na forma metacíclica de *T. cruzi*. O eixo X representa o posicionamento das leituras mapeadas ao longo do gene, o eixo Y

representa o número de leituras para cada posição do gene. Leituras na porção final do gene de TcSof1.

Este tipo de regulação em nível da elongação da tradução já foi observada em outros eucariotos, como por exemplo a proteína Stm1 de levedura que se associa a unidade 80S do ribossomo, bloqueando a tradução dos seus mRNAs alvos. Estes alvos podem então ser enviados para a degradação ou permanecerem parados em estado de pausa, permitindo uma retomada imediata da tradução (Balagopal e Parker, 2011). Outro exemplo de regulação em nível de elongação da tradução foi visto em neurônios de camundongos pela técnica de HITS-CLIP (que consiste na imunoprecipitação de moléculas alvos seguido de sequenciamento de alta capacidade), onde mostraram que a proteína FMRP se associa a transcritos alvos de células de cérebro de camundongos em regiões de sinapses, modulando a tradução destes e favorecendo a plasticidade neuronal. FMRP se liga as sequências codificantes destes mRNAs que já estão associados aos polissomos e desta forma impede a translocação dos ribossomos. (Darnell *et al.*, 2011; Kong *et al.*, 2012).

Em tripanossomatídeos, já foi identificado um grande número de possíveis proteínas quinases que poderiam estar atuando no controle da síntese protéica por fosforilação/desfosforilação (Parsons *et al.*, 2005). A proteína TbTRACK homóloga a RACK1 (*Receptor for Activated C-Kinase 1*) de eucarioto, já foi associada a regulação de uma série de atividades celulares. Dentre elas, o crescimento celular através da interação com o fator eucariótico de elongação 1A (eEF1A) inibindo a tradução (Regmi *et al.*, 2008).

A interação de proteínas com domínios RRM (*RNA recognition motifs*), proteínas com domínio Pumilio (PUF) e domínio de interação com RNA dedo de zinco CCCH, através de motivos no mRNA nesses parasitas, tem demonstrado um importante regulador da expressão gênica (Ivens *et al.*, 2005; De Gaudenzi *et al.*, 2005; Clayton *et al.*, 2007). Desta forma, a estagnação da tradução na fase da elongação parece ser um mecanismo eficiente para as células, pois podem alcançar um controle preciso e rápido da síntese protéica.

4.6 Análise de expressão gênica ao longo da metaciclogênese de *T. cruzi*

Para avaliar a expressão dos genes em *T. cruzi* nas formas epimastigota e metacíclica, as bibliotecas foram normalizadas, um passo importante para análise de RNA-seq. Desta forma, foram eliminados os genes que não apresentavam leituras em nenhuma das réplicas de RNA-poliA, ou seja, só foram analisados os genes que se apresentavam nas réplicas de RNA-poliA e *footprinting*, com isso foi possível observar a expressão diferencial do parasita nas formas epimastigota e metacíclica.

Em epimastigotas, dos ~ 9.000 genes presentes nas bibliotecas de RNA-poliA ou seja, dos quase 10.000 genes presentes em *T. cruzi*, 9.000 foram transcritos, processados e exportados para o citoplasma. Destes, 7.419 genes associam-se aos polissomos, sugerindo que nesta estapa do ciclo de vida, quase todos os genes estão sendo transcritos, e destes, a maioria está sendo traduzida.

Para as réplicas provenientes da forma metacíclica, também identificamos mais de 9.000 genes, sendo que destes, 4.241 genes estão associados a maquinaria de tradução. No entanto, 4.584 genes se encontram apenas na fração correspondente ao RNA-poliA total, indicando que quase a metade dos genes transcritos estão de alguma forma com a tradução regulada negativamente (Figura 4.16). Trabalhos anteriores já demonstraram que moléculas de mRNA podem ser manter estáveis e não associadas a polissomos no citoplasma (Goldenberg *et al.*, 1985). No entanto, os 4.241 genes identificados nas amostras do *footprinting*, não indicam efetivamente que estes estejam todos sendo traduzidos, uma vez que evidências de controle de mRNAs associados à maquinaria de tradução na expressão diferencial de alguns genes diferencialmente expressos durante a metaciclogênese de *T. cruzi* foram descritos (Ávila *et al.*, 2001; Dallagiovanna *et al.*, 2001; Fragoso *et al.*, 2003).

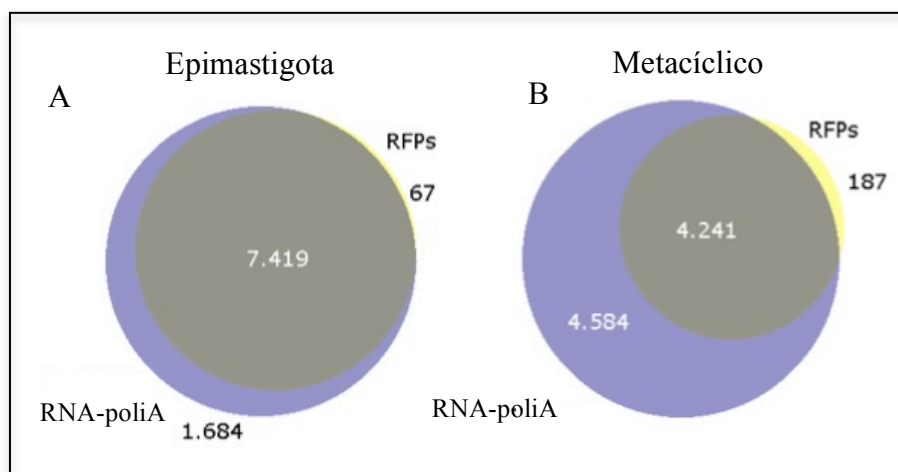


Figura 4.16: Análise de expressão de *T. cruzi* nas formas epimastigota e metacíclica. A esfera roxa representa os genes presentes nas bibliotecas referentes ao RNA-poliA e a esfera amarela representa os genes presentes nas bibliotecas referentes de *footprinting*. **A:** Análise de RNA-poliA vs *footprinting* da forma epimastigota. **B:** Análise de RNA-poliA vs *footprinting* da forma metacíclica.

4.7 Identificação de genes associados a polissomos com regulação negativa da tradução.

Na tentativa de caracterizar genes em tripomastigotas metacíclicos que estariam sendo regulados negativamente por um mecanismo similar ao do mRNA de TcSof1, utilizamos a estratégia desenvolvida por Ingolia e colaboradores (2011) que utiliza a droga harringtonina para estudar os processo de início da tradução. Estudos mostraram que a harringtonina se liga a ribossomos livres e monossomos, mas não interage com polirribossomos. Este alcalóide bloqueia a formação da ligação peptídica e inibe a ligação do aminoacil tRNA, mas não afeta o posicionamento do Met-tRNA no sítio doador. Desta forma, os ribossomos que estão na fase de alongação da tradução não são afetados, ao passo que uma subunidade 60S vinculada com harringtonina formará um monossomo (80S) no códon de início, mas este não se move para a fase de alongação (Fresno *et al*, 1977). Assim, podemos inferir que aqueles mRNAs que estão parados nos polissomos, como é o caso do mRNA da TcSof1, não serão afetados.

Para determinar a concentração de harringtonina a ser utilizada, uma vez que a técnica de *Ribosome Footprinting* utilizando a droga harringtonina ainda não tinha sido utilizada em *T. cruzi*, tratamos o parasita com diferentes concentrações da droga e determinamos sua viabilidade e crescimento por até 96 horas. No ensaio com 0,5 a 2µg/ml de harringtonina, não observamos no final da fase exponencial uma taxa de divisão celular muito inferior ao controle. As culturas tratadas com 8 e 16µg/ml apresentaram diminuição considerável da taxa de crescimento celular, porém apenas após 24h (Figura 4.17).

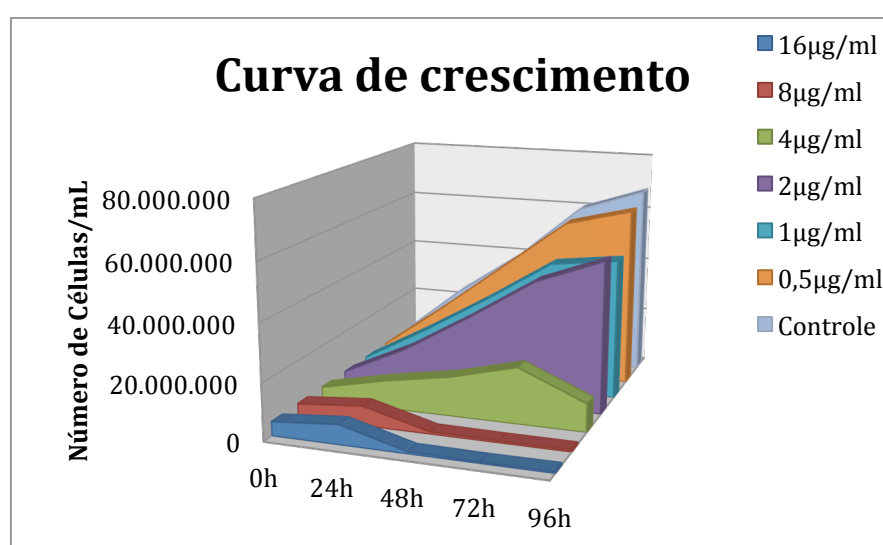


Figura 4.17: Curvas de crescimento de *T. cruzi* na presença de diferentes concentrações de harringtonina.

O próximo passo para estabelecer a concentração a ser utilizada de harringtonina, foi verificar a concentração da droga que inibe a tradução em *T. cruzi*. Como dito anteriormente os ribossomos que estão na fase de alongação não são afetados pela harringtonina (Ingolia *et al.*, 2009), assim, uma diminuição na fração polissomal poderia indicar uma inibição no início da tradução.

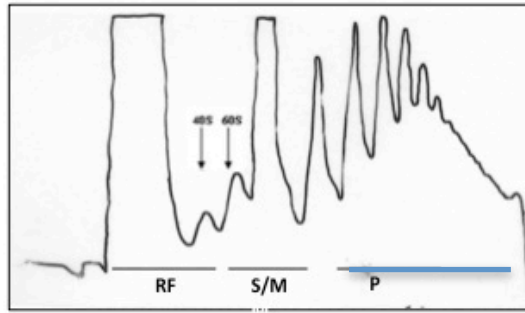
O perfil de sedimentação de polissomos foi obtido através da centrifugação de extratos citoplasmáticos da forma epimastigota tratados com diferentes concentrações de harringtonina em gradientes de densidade de sacarose, como descrito no item 3.4

de Material e Métodos. Após a centrifugação dos gradientes de sacarose, as frações do gradiente foram coletadas utilizando o equipamento ISCO. As frações foram reunidas de acordo com a ausência de ribossomos, presença das subunidades 40S e 60S e monossomos e fração polissomal, denominadas de RF, S/M e P, respectivamente.

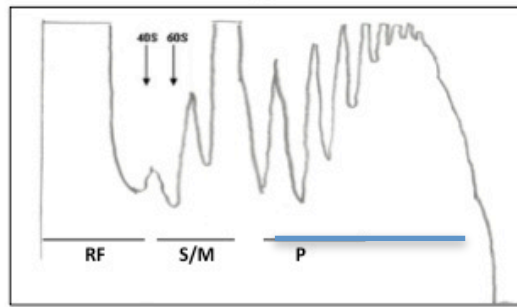
Um perfil de sedimentação típico de polissomos foi obtido quando o extrato das formas epimastigotas foi tratado com cicloheximida, uma droga que inibe a função do fator de tradução eEF2, que atua na translocação do peptidil-tRNA do sítio A do ribossomo para o sítio P, bloqueando dessa maneira a elongação da tradução e mantendo os ribossomos associados ao mRNA (Schneider-Poetsch, 2010), sendo considerado como controle (Figura 4.18 A). Os resultados do perfil de sedimentação obtido quando a cultura das formas epimastigotas foi tratada com harringtonina, mostram uma diminuição na fração polissomal somente com concentrações maiores de 8 µg/ml de harringtonina (Figuras 4.18B, C, D, E e F).

Desta forma, passamos para o ensaio de sedimentação em gradientes de sacarose para a forma metacíclica utilizando a concentração de 16 µg/ml de harringtonina e constatamos uma diminuição na fração polissomal (Figura 4.19). Assim, tendo definido a concentração ideal de harringtonina, iniciamos os experimentos de *Ribosome Footprinting*.

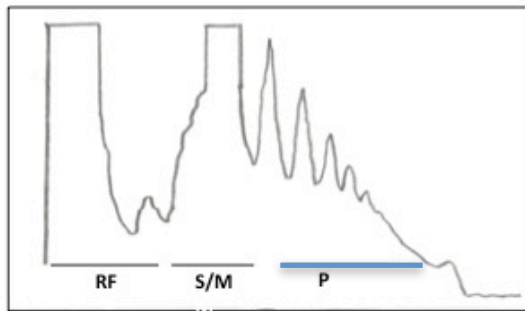
A



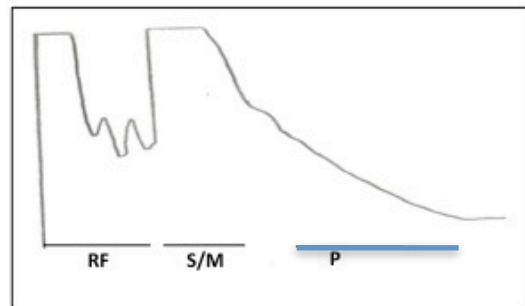
B



C



D



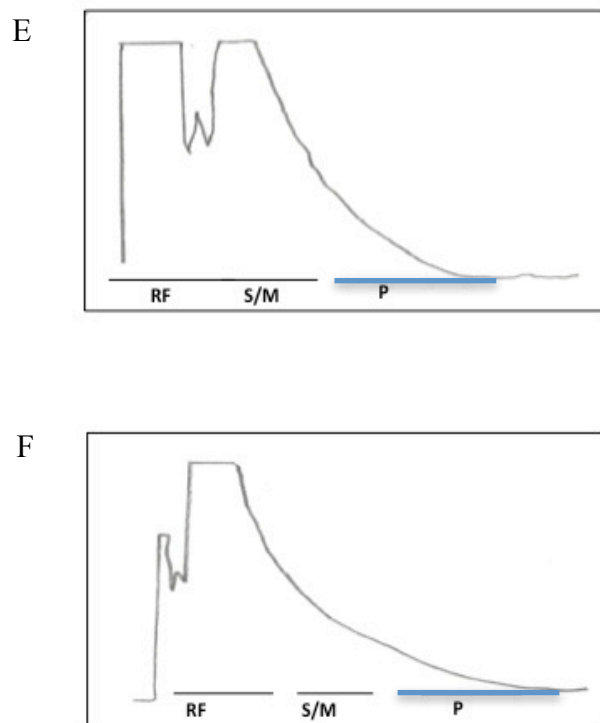


Figura 4.18: Análise do perfil de polissomos da forma epimastigota de *T. cruzi* tratada com Harringtonina. Perfil de polissomos separados por gradiente de sacarose (15 – 55%) utilizando harringtonina e cicloheximida . Absorbância: 280 nm. As frações (RF-Ribossomo livre; S/M-Subunidades e monossomos e P-Polissomos) **A:** Forma epimastigota tratado com cicloheximida; **B:** Forma epimastigota tratado com 2 $\mu\text{g/ml}$ de harringtonina; **C:** Forma epimastigota tratado com 4 $\mu\text{g/ml}$ de harringtonina; **D:** Forma epimastigota tratado com 8 $\mu\text{g/ml}$ de harringtonina; **E:** Forma epimastigota tratado com 16 $\mu\text{g/ml}$ de harringtonina; **F:** Forma epimastigota tratado com 32 $\mu\text{g/ml}$ de harringtonina.

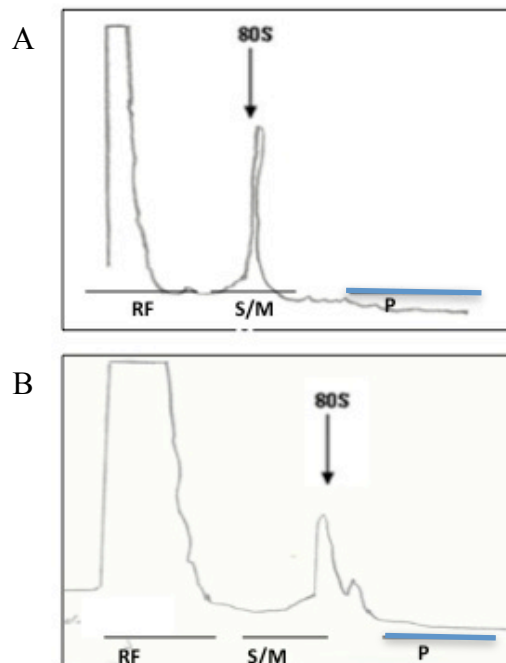


Figura 4.19: Análise do perfil de polissomos da forma metacíclica de *T. cruzi*. Perfil de polissomos separados por gradiente de sacarose (15 – 55%) utilizando harringtonina e cicloheximida . Absorbância: 280 nm. As frações (RF-Ribossomo livre; S/M-Subunidades e monossomos e P-Polissomos) **A**: Forma metacíclica tratada com cicloheximida; **B**: Forma metacíclica tratada com 16 µg/ml de harringtonina;

Os experimentos de *Ribosome Footprinting* da forma metacíclica de *T. cruzi* foi conduzido tratando a cultura com 16 µg/ml de harringtonina por uma hora seguindo todos os procedimentos descritos acima, incluindo protocolo de *Ribosome Footprinting* e análise das sequências após sequenciamento.

O primeiro passo foi verificar se poderíamos monitorar a cinética de tradução detectando sítios de início de tradução e mRNAs que mantiveram seu perfil de mobilização nos polissomos mesmo após o tratamento com a harringtonina.

As bibliotecas foram mapeadas frente ao genoma de referência utilizando o *software* CLC. Os valores obtidos durante as etapas de *trimming* e mapeamento estão na tabela 5.

Tabela 5: Sequências mapeadas utilizando o genoma *T. cruzi* haploide Esmeraldo-Like

Amostras da forma metacíclica	Sequências após trimming	Sequências mapeadas	Sequências mapeadas sem rRNA
RFP_Harring1	51.787.227	10.555.699	6.438.977
RFP_Harring2	36.650.766	7.518.798	3.458.647
RFP_Harring3	80.539.537	197.872	128.617
Total	168.977.530	18.272.369	10.026.241

Visando tornar os resultados do alinhamento acessíveis à análise por outras ferramentas de bioinformática, as sequências passaram por uma série de etapas de conversão de formatos. O formato SAM (*Sequence Alignment/Map*), é um formato tipo texto e delimitado por tabulação, este apresenta essa proposta de servir como um padrão comum entre as ferramentas de alinhamento. O formato SAM é acompanhado por um pacote de utilitários denominado SAMtools, o qual é capaz de realizar várias manipulações em dados de alinhamentos que estejam nesse formato (samtools.sourceforge.net).

De posse do arquivo SAM, o próximo passo foi obter os respectivos arquivos compactado em formato BAM (*Binary Alignment/Map*). Esse arquivo contém as mesmas informações que o arquivo SAM, porém consome menos memória e as informações são acessadas mais facilmente em operações de busca.

Desta forma, os resultados foram visualizados utilizando o programa *Integrative Genomics Viewer* (IGV) e o *software* CLC. O programa IGV é frequentemente utilizado para visualizar conjuntos de dados provenientes de RNA-Seq, onde é possível observar alinhamento em regiões específicas no genoma de interesse. As três réplicas de *footprinting* tratadas com harringtonina foram concatenadas para que pudéssemos obter o maior número de leituras, e o mesmo procedimento foi realizado para as bibliotecas de *footprinting* tratadas com cicloheximida.

Pelo programa IGV é possível observar que as amostras tratadas com cicloheximida apresentaram leituras ao longo de todo o gene (Figura 4.20 A), como visto anteriormente para perfis de genes com expressão ativa em *T. cruzi* nas formas

epimastigota e metacíclica. Entretanto, para as amostras tratadas com harringtonina as leituras parecem concentradas no início do gene. Analisando os 41 cromossomos presentes no haplóide não Esmeraldo de *T. cruzi* (<http://tritrypdb.org/common/downloads/release-6.0>), foi possível observar que grande parte das leituras acumularam -se no início dos genes (Figura 4.20 B).

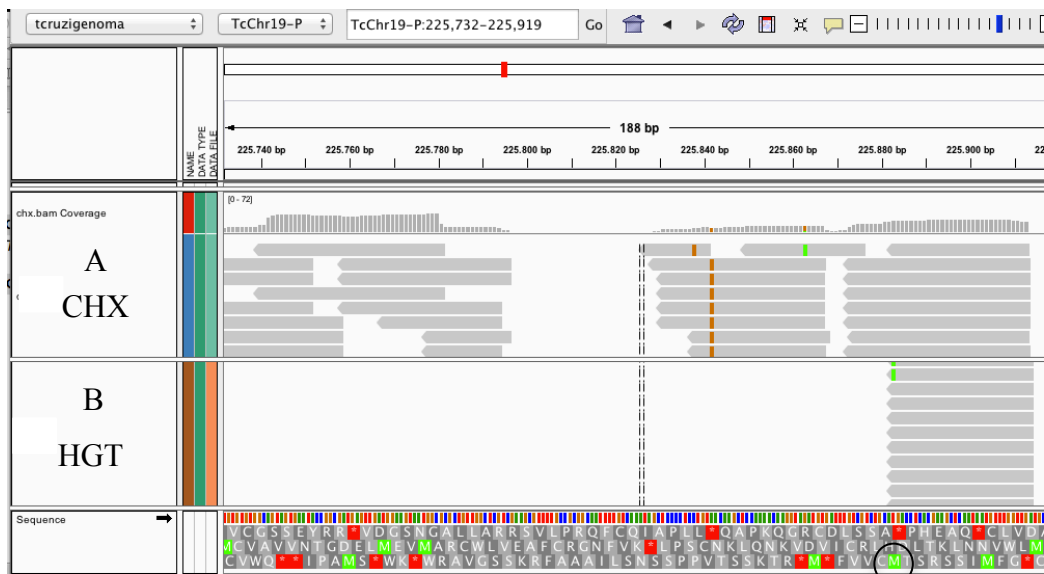


Figura 4.20: Alinhamento das leituras obtida pela técnica de *Ribosome Footprintig* na forma metacíclica de *T. cruzi* tratadas com cicloheximida e harringtonina. As imagens mostram o alinhamento das leituras geradas com a técnica de *Ribosome Footprinting* no programa IGV (<http://www.broadinstitute.org/igv>), contra o cromossomo 21 (haplótipo não-Esmeraldo) de *T. cruzi*. **A:** Leitura ao longo de todos os genes nas amostras tratadas com cicloheximida (CHX); **B:** Acúmulo das leitura no início dos genes nas amostras tratadas com harringtonina (HGT), o círculo indica o AUG no início do gene.

Como dito anteriormente, kinetoplastídeos apresentam características biológicas únicas tais como, a transcrição policistrônica de unidades transcricionais que contêm vários genes com funções geralmente não relacionadas (Vickerman, 1994; Muhich e Boothroyd, 1988; Clayton, 2002; Palenchar, 2006). Analisando os cromossomos podemos observar na figura 4.21 A e B, a parada da tradução de duas proteínas hipotéticas conservadas em tandem. Uma análise mais detalhada, demonstrou o

acúmulo das leituras próximas ao códon de início AUG, indicado pelo quadrado verde referente ao aminoácido metionina, evidenciado pelo círculo (Figura 4.21 C). Outras proteínas também foram analisadas e mostraram o mesmo padrão de parada no início da tradução próximo ao códon de início AUG, como exemplificado nas figuras em anexo.

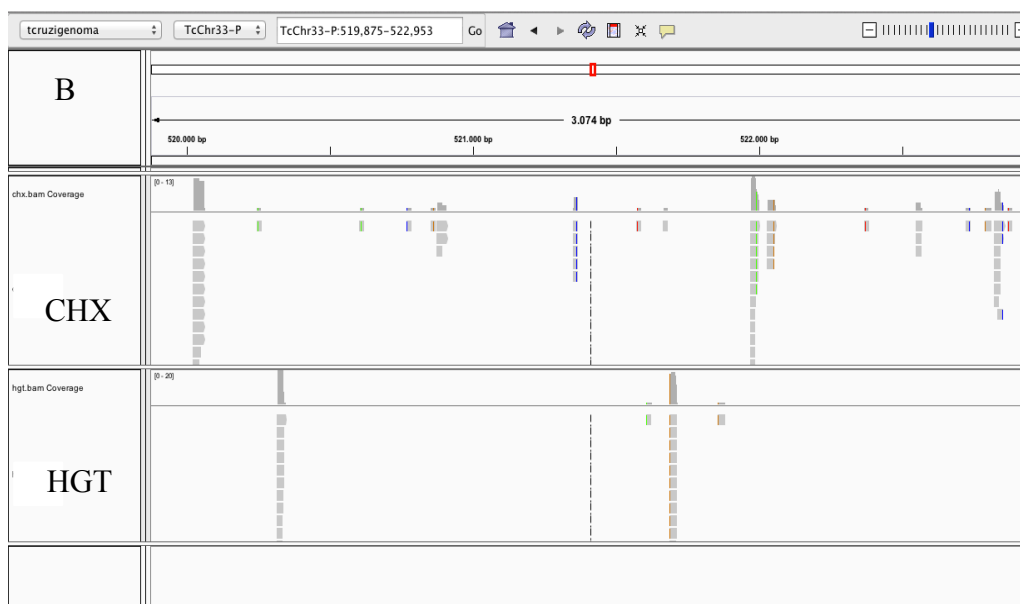
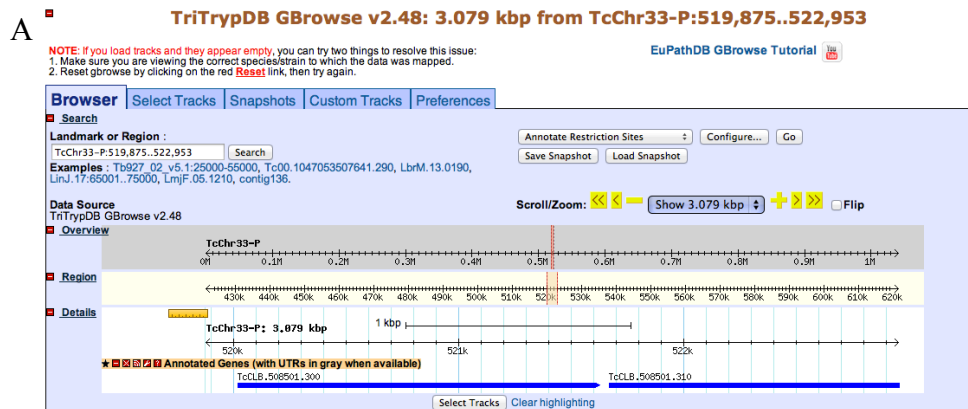




Figura 4.21: Alinhamento das leituras obtido pela técnica de *Ribosome Footprinting* na forma metacíclica de *T. cruzi* tratada com cicloheximida e harringtonina. As imagens mostram o alinhamento das leituras geradas com a técnica de *Ribosome Footprinting* no programa IGV (<http://www.broadinstitute.org/igv>), contra o cromossomo 33 (haplótipo não-Esmeraldo) de *T. cruzi*. **A:** Visualização gráfica do posicionamento de duas proteínas hipotéticas utilizando o TriTrypDB GBrowse v2.48; **B:** Leituras ao longo de todos os genes nas amostras tratadas com cicloheximida (CHX) e acúmulo das leituras no início dos genes nas amostras tratadas com harringtonina (HGT); **C:** Acúmulo das leituras próximos ao códon de início AUG, indicado pelo quadrado verde referente ao aminoácido metionina, evidenciado pelo círculo.

4.8 Análise do gene de TcSof1 e dos genes TcImp3, TcImp4 e TcDhr1 após tratamento com a droga harringtonina.

Confirmamos que o tratamento com a droga harringtonina também leva ao acúmulo de ribossomos nos locais de início da tradução em *T. cruzi* na forma metacíclica. Desta forma, fomos analisar qual o padrão de distribuição das leituras dos genes TcImp3, TcImp4 e TcDhr1, e se estes genes estão realmente sendo regulados negativamente por um mecanismo comum ao mRNA de TcSof1. Além disso, esta análise é importante para verificar se a droga não mudou a condição destes

genes, uma vez que eles já se apresentavam parados nos polissomos, cuja regulação parece estar acontecendo em nível de elongação.

Não ocorreu uma mudança expressiva no perfil de mapeamento, as leituras apresentaram-se apenas no final do gene (Figura 4.22) para o gene de TcSof1.

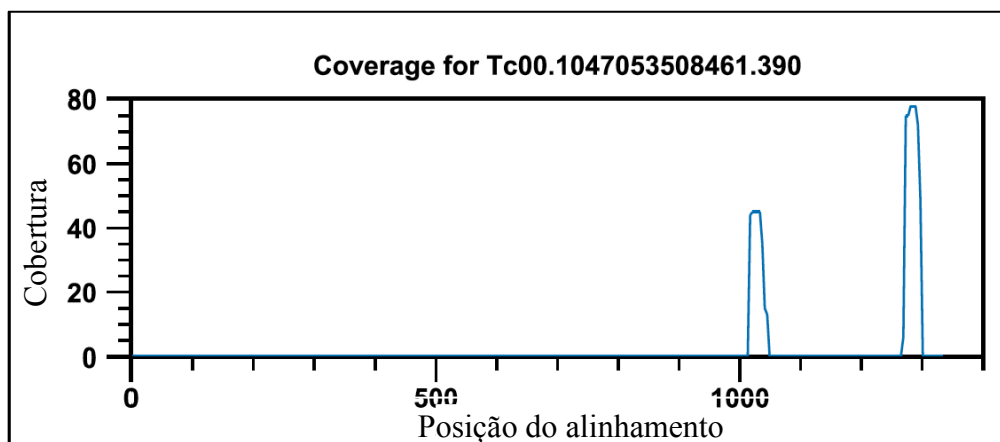
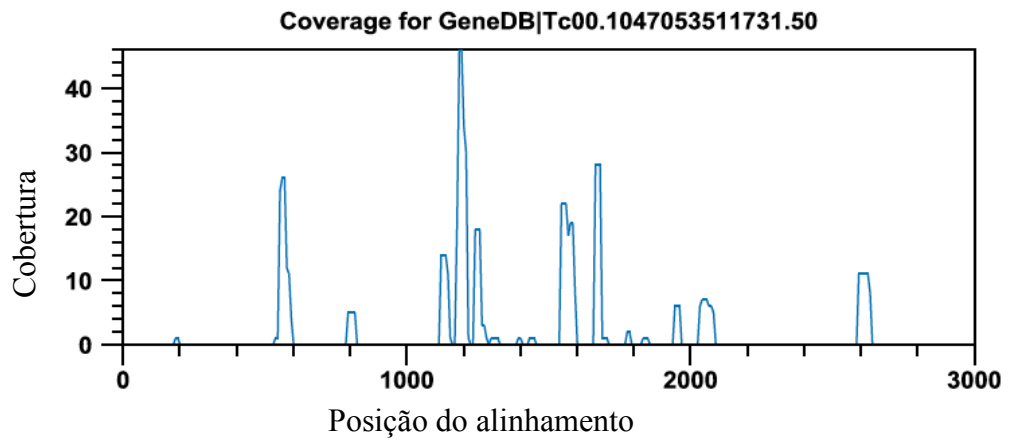


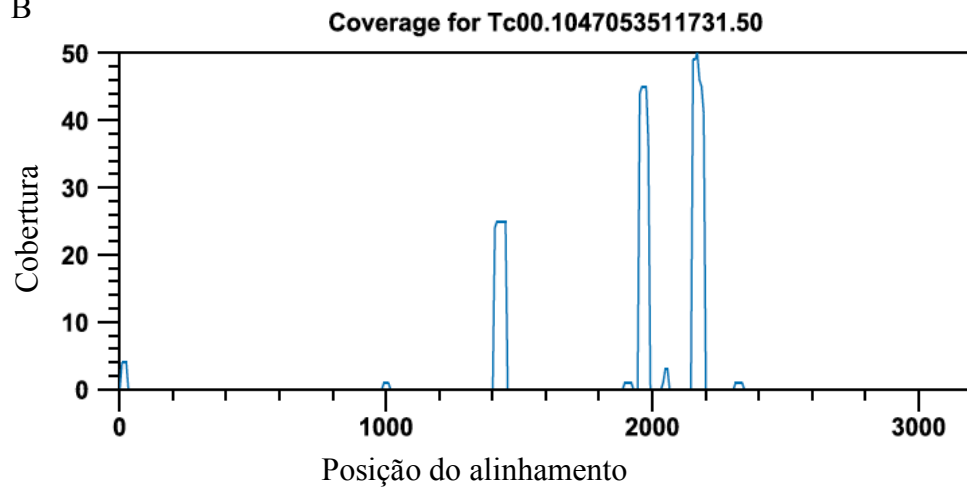
Figura 4.22: Mapeamento das leituras ao longo do gene de TcSof1 obtidos pela técnica de *Ribosome Footprinting* tratadas com harringtonina. O eixo X representa o posicionamento das leituras mapeadas ao longo do gene, o eixo Y representa o número de leituras para cada posição do gene. O padrão de acúmulo das leituras na porção final do gene de TcSof1 é mantido como observado no *Ribosome Footprinting* na forma metacíclica de *T. cruzi* tratadas com cicloheximida.

TcDhr1 é uma proteína que como a TcSof1 faz parte do complexo U3snoRNP, e em levedura também está envolvida no processamento do rRNA 18S. (Bernstein *et al.*, 2004). Na forma epimastigota é possível evidenciar a distribuição das leituras ao longo de todo o gene, corroborando os dados de Nardelli e colaboradores (2007) que mostraram que este gene é expresso nesta etapa do ciclo de vida (Figura 4.23 A). Da mesma maneira, na forma metacíclica não foi evidenciado a expressão deste gene, mas no entanto seus mRNAs encontravam-se associados ao polissomos (Figura 4.23 B). Entretanto, quando analisamos o perfil do gene TcDhr1 após o tratamento com harringtonina, podemos observar que as leituras se acumulam na posição 1.400-1.420 e 2.000 do mRNA (Figura 4.23 C).

A



B



C

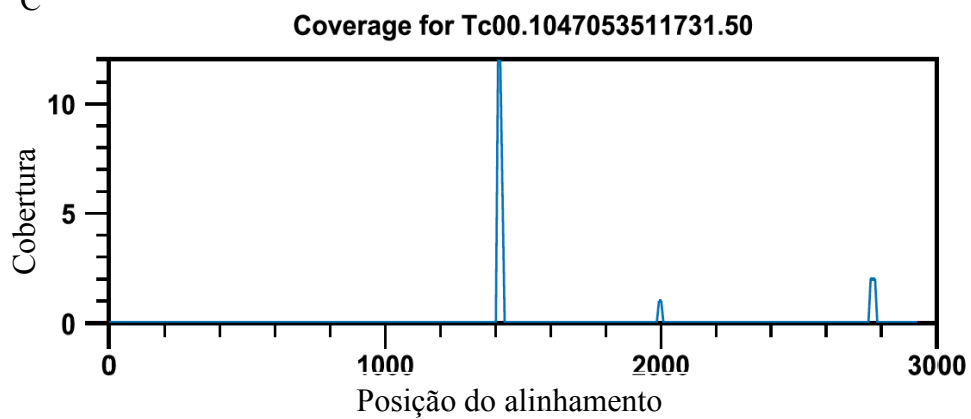


Figura 4.23: Mapeamento das leituras ao longo do gene de TcDhr1 obtidos pela técnica de *Ribosome Footprinting* tratadas com cicloheximida e harringtonina. O eixo X representa o posicionamento das leituras mapeadas ao longo do gene, o eixo Y representa o numero de leituras para cada posição do gene. **A:** *Ribosome Footprinting* na forma epimastigota tratadas com cicloheximida onde as leituras se encontram ao longo de todo o gene; **B:** *Ribosome Footprinting* na forma metacíclica tratada com cicloheximida, onde as leituras se acumulam próximo da porção final do gene; **C:** *Ribosome Footprinting* na forma metacíclica tratada com harringtonina, as leituras continuaram se acumulando na posição 1.400-1.420 e 2.000 do mRNA.

A visão mais detalhada destas regiões, demonstrou a presença do que poderia ser um códon de parada TGA (Figura 4.24 A e B). Este poderia ser um tipo de regulação que o parasita pode estar usando como mais um recurso para adaptar-se rapidamente aos distintos micro ambientes presentes durante a passagem por seus hospedeiros. Porém, experimentos adicionais serão realizados para comprovar esta hipótese. Em *Drosophila*, mecanismos de regulação na tradução podem funcionar como um meio de regulação rápida, controlando a expressão de diversos genes e a localização dos mesmos. (Wilhelm e Smibert, 2005).

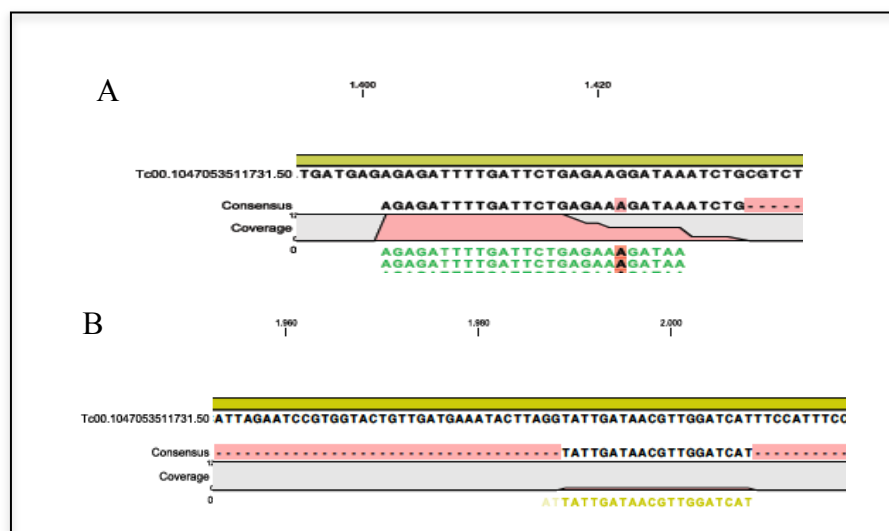


Figura 4.24: Análise das seqüências do perfil de expressão do transcrito de TcDhr1 obtido com a técnica de *Ribosome Footprinting* na forma metacíclica de *T. cruzi* tratada com harringtonina. A: seqüências nucleotídicas da posição 1.400-1.420 do mRNA de TcDhr1; **B:** seqüências nucleotídicas da posição 2.000 do

mRNA de TcDhr1.

Os demais genes que já tinham sido citados (TcImp3 e TcImp4), mantiveram as leituras acumuladas em diferentes posições dos genes (Figuras em anexo).

As análises mostraram informações valiosas a respeito da regulação traducional em *T. cruzi*, porém os mecanismos envolvidos na regulação negativa de TcSof1 e outros genes na forma tripomastigota metacíclica ainda é desconhecido. No entanto, a presença de genes associados a maquinaria de tradução, mas com regulação negativa, não parece ser um fenômeno isolado em *T. cruzi* como observado nos resultados do experimento utilizando harringtonina como inibidor da tradução.

A inibição da síntese proteica na fase da elongação, é uma importante estratégia desenvolvida pelas células para economizar energia, pois toda a maquinaria permanece montada, deste modo a síntese de proteínas pode recomeçar rapidamente assim que o metabolismo energético for recuperado (Browne & Proud, 2002).

Desta forma os dados obtidos contribuirão sobremaneira para um possível entendimento dos mecanismos que controlam a tradução de transcritos específicos em *T. cruzi* na forma metacíclica.

5 CONCLUSÃO

Ao longo deste trabalho foi possível:

1. Excluir a participação dos fragmentos tRNA na maquinaria de tradução ativa, pois os mesmos não foram detectados associados aos polissomos ou ribossomos.

2. Padronizar e apresentar do primeiro *Ribosome Footprinting* de *T. cruzi*, um protozoário com controle predominantemente pós-transcricional de expressão gênica.

2.1 Evidenciar a presença do mRNA de TcSof1 associado aos polissomos na forma metacíclica mesmo sem haver expressão da proteína nesta forma.

2.2 Evidenciar a presença dos RNAs mensageiros de TcImp3, TcImp4 e TcDhr1, associados aos polissomos.

3. Analisar a expressão gênica das formas epimastigota e metacíclica, avaliando o mRNA total e os mRNA que estavam associados aos ribossomos, provenientes da forma metacíclica. Dos mais de 9.000 genes presentes, apenas 4.241 estavam nas amostras do *footprinting*, ou seja quase a metade dos genes transcritos não estão associados aos ribossomos, diferentemente do que foi visto na forma epimastigota onde dos ~ 9.000 genes presentes, 7.419 genes estavam associados aos polissomos, evidenciando uma alta taxa de tradução .

4. Utilizar a droga harringtonina evidenciando sua eficácia em *T. cruzi*, causando redução da fração polissomal e acúmulo de ribossomos em sítios de início de tradução.

5. No caso de TcSof1 e dos genes TcImp3, TcImp4 e TcDhr1 após tratamento com a droga harringtonina, a cobertura das leituras mantiveram-se acumuladas na porção final do genes, evidenciando uma regulação em nível da tradução provavelmente na fase da elongação

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Aymerich S, Godenberg S. The Karyotype of *Trypanosoma cruzi* Dm 28c: comparison with other T. cruzi strains and trypanosomatids. Exp. Parasitol (1989) 69(2): 107-15.

Arava Y, Wang Y, Storey JD, Liu CL, Brown PO, Herschlag D. Genome-wide analysis of mRNA translation profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci USA (2003), 100:3889–3894.

Atwood J. A., Weatherly D. B., Minning T. A., Bundy B., Cavola C., Opperdoes F. R., Orlando R., Tarleton R. L. The *Trypanosoma cruzi* proteome. Science, (2005), 309:473-476.

Avila AR, Dallagiovanna B, Yamada-Ogatta SF, Monteiro-Goes V, Fragoso SP, Krieger MA, Goldenberg S. Stage-specific gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. Genet Mol Res. (2003) 31;2(1):159-68. Review.

Avila A.R, Yamada-Ogatta S.F, da Silva Monteiro V, Krieger M.A, Nakamura C.V, de Souza W, Goldenberg S. Cloning and characterization of the metacyclogenin gene, which is specifically expressed during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. Mol Biochem Parasitol. (2001), 117(2):169-77.

Bartholomeu D.C., Silva R.A., Galvão L.M., El-Sayed N.M., Donelson J.E., Teixeira, S.M. *Trypanosoma cruzi*: RNA structure and post-transcriptional control of tubulin gene expression. Exp. Parasitol. (2002), 102(3-4): 123-133.

Balagopal, V., Parker, R. Stm1 modulates translation after 80S formation in *Saccharomyces cerevisiae*. RNA, (2011), 17 835–842.

Bax R., Vos H.R, Raue H.A, Vos J.C. *Saccharomyces cerevisiae* Sof1p associates with 35S Pre-rRNA independent from U3 snoRNA and Rrp5p. Eukaryot Cell. (2006), 5(3):427-34.

Berriman M., Ghedin E., Hertz-Fowler. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. Science (2005), 309: 416-422.

Brener Z., Andrade Z.A. Barral-Neto M. *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas. (2000).

Bonaldo M.C., Souto-Padron T., De Souza W., Goldenberg S. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. *J. Cell. Biol.* (1988), 106, 1349-1358.

Browne, G.J., Proud, C.G. Regulation of peptide-chain elongation in mammalian cells. *Eur. J. biochem.*(2002), 269, 5360-5368.

Bruzik J.P., Van D.K., Hirsh D., Steitz J.A. Trans splicing involves a novel form of small nuclear ribonucleoprotein particles. *Nature.* (1988), 335, 559-562.

Buleigh B.A., Andrews N.W. Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Current Opinion in Microbiology*, (1998), Pages 461-465.

Cano M.I., Gruber A., Vasquez M., Cortes A., Levin M.J., Gonzales A., Degrave W.M., Rondinelli E., Zingales B., Ramirez J.L., Alonso C., Requema J.M., Franco da Silveira J. *Trypanosoma cruzi* genome project: molecular karyotype of clone CL Brener. *Mol. Biochem. Parasitol.* (1995), 71, 273 – 278.

CDC.gov. (2013), www.dpd.cdc.gov/dpdx.

Contreras V.T., Araujo-Jorge T.C., Bonaldo M.C., Thomas N., Barbosa H.S., Meirelles M.N.L., Goldenberg S. Biological aspects of the Dm28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* (1988), 83, 123 - 133.

Chu Y, Corey D.R. RNA sequencing: platform selection, experimental design, and data interpretation. *Nucleic Acid Ther.* (2012) 22 (4): 271–4.

Clayton C.E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J.* (2002) 21, 1881-1888.

Clayton C., Shapira M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Molecular & Biochemical Parasitology*, (2007) 156, 93–101.

Coughlin B. C., Teixeira S. M., Kirchhoff L. V., Donelson J. E. Amastin mRNA abundance in *Trypanosoma cruzi* is controlled by a 3'-untranslated region position-dependent cis element and an untranslated region-binding protein. *The Journal of Biochemical Chemistry*, (2000) 275, 12051-12060.

Curran, J., Kolakofsky D. Ribosomal initiation from an ACG codon in the Sendai virus P/C mRNA. The EMBO journal. (1988) 1, 245-51.

DaRocha WD, Otsu K, Teixeira SM, Donelson JE. Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol, (2004) 133: 175–186.

Da Silva R.A., Bartholomeu D.C, Teixeira S.M. Control of tubulin gene expression in *Trypanosoma cruzi*. Int. J. Parasitol. (2006), 36(1): 87-96.

Dhalia R., Marinsek N., Reis C.R., Katz R., Muniz J.R., Standart N., Carrington M., Melo N.O.P, The Two eIF4A helicases in *Trypanosoma brucei* are functionally distinct. Nucleic Acids Res. (2006), 34:2495-2507.

Dhalia R., Reis C.R., Freire E.R. Translation initiation in *Leishmania major*: Characterisation of multiple eIF4F subunit homologues. Mol. Biochem. Parasitol. (2005), 140:23-41.

Dallagiovanna B., Plazanet-Menut C., Ogatta S.F., Avila A.R., Krieger M.A., Goldenberg S. *Trypanosoma cruzi*: a gene family encoding chitin-binding-like proteins in posttranscriptionally regulated during metacyclogenesis. Exp. Parasitol. (2001), 99, 7-16.

Dallagiovanna B., Correa A., Probst C. M., Holetz F., Smircich P., De Aguiar A. M., Mansur F., Da Silva C. V., Mortara R. A., Garat B., Buck G. A., Goldenberg S., Krieger M. A. Functional genomic characterization of mRNAs associated with TcPUF6, a pumilio-like protein from *Trypanosoma cruzi*. The Journal of Biological Chemistry, (2008), 13, 8266- 8273.

Dallagiovanna B., Plazanet-Menut C., Ogatta S.F., Avila A.R., Krieger M.A., Goldenberg S. *Trypanosoma cruzi*: a gene family encoding chitin-binding-like proteins is posttranscriptionally regulated during metacyclogenesis. Exp Parasitol. (2001), 99, 7-16.

Darnell J. C. FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and 70 autism. Cell, (2011) 146, 247–261.

Das A., Banday M., Bellofatto V. RNA polymerase transcription machinery in trypanosomes. Eukaryot. Cell. (2008), 7, 429-434.

Da Silva R.A., Bartholomeu D.C., Teixeira S.M. Control mechanisms of tubulin geneexpression in *Trypanosoma cruzi*. Int J Parasitol. (2006), 36(1),87-96.

De Gaudenzi J., Frasch A.C., Clayton C. RNA-binding domain protein in kinetoplastids: a comparative analysis. *Eukaryotic Cell*. (2005), 4, 2106-2114.

De Souza W. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Cell. Int. Rev. Cyt.* (1984), 86,197-283.

Dlagic, M. The ribosomal subunit assembly line. *Genome Biol.* (2005), 6:234.

De Souza AR, Penalva LO, Marcotte EM, Vogel C. Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol Biosyst* (2009), 5:1512–1526.

El-Sayed N. M., Myler P. J., Bartholomeu D. C., Nilsson D., Aggarwal G., Tran A. N., Ghedin E., Worthey E. A., Delcher A. L., Blandin G., Westenberger S. J., Caler E., Cerqueira G.C., Branche C., Haas B., Anupama A., Arner E., Aslund L., Attipoe P., Bontempi E., Bringaud F., Burton P., Cadag E., Campbell D.A., Carrington M., Crabtree J., Darban H., da Silveira J.F., de Jong P., Edwards K., Englund P.T., Fazelina G., Feldblyum T., Ferella M., Frasch A.C., Gull K., Horn D., Hou L., Huang Y., Kindlund E., Klingbeil M., Kluge S., Koo H., Lacerda D., Levin M.J., Lorenzi H., Louie T., Machado C.R., McCulloch R., McKenna A., Mizuno Y., Mottram J.C., Nelson S., Ochaya S., Osoegawa K., Pai G., Parsons M., Pentony M., Pettersson U., Pop M., Ramirez J.L., Rinta J., Robertson L., Salzberg S.L., Sanchez D.O., Seyler A., Sharma R., Shetty J., Simpson A.J., Sisk E., Tammi M.T., Tarleton R., Teixeira S., Van Aken S., Vogt C., Ward P.N., Wickstead B., Wortman J., White O., Fraser C.M., Stuart K.D., Andersson B. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. (2005), 309, 409-415, (a).

El-Sayed N. M., Myler P. J., Blandin G., Berriman M., Crabtree J., Aggarwal G., Caler E., Renault H., Worthey E. A., Hertz-Fowler C., Ghedin E., Peacock C. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science*. (2005), 309, 404-409 (b).

Elias M.C.; Nardelli S.C.; Schenkman S. Chromatin and nuclear organization in *Trypanosoma cruzi*. *Future Microbiol.* (2009), 4: 1065-1074.

Ferreira M.U., Foronda A.S., Schumaker T.S. Fundamentos biológicos da parasitologia humana/Biological basis of human parasitology. (2003), 156.

Ferreira L.R.P., Dossin F.M, Ramos T.C, Freymüller E., Schenkman S. Active transcription and ultrastructural changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis, *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. (2008), 157-166.

Fragoso S.P., Plazanet-Menut C., Carreira M.A., Motta M.C., Dallagiovana B., Krieger M.A., Goldenberg S. Cloning and characterization of a gene encoding a putative protein associated with U3 small nucleolar ribonucleoprotein in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* (2003), 126(1):113-7.

Gao H., Ayub M.J, Levin J.M., Frank J. The structure of the 80S ribosome from *Trypanosoma cruzi* reveals unique rRNA components Instituto de Ingenieria Genetica y Biologia Molecular, National Research Council. (CONICET). (2005), 1428.

Garcia-Silva M.R., Frugier M., Tosar J.P., Correa-Dominguez A., Ronalte-Alves L., Parodi- Talice A., Rovira C., Robello C., Goldenberg S., Cayota A. A population of tRNA-derived small RNAs is actively produced in *Trypanosoma cruzi* and recruited to specific cytoplasmic granules. *Mol Biochem Parasitol.* (2010) 171, 64-73.

Garcia Silva MR, Tosar JP, Frugier M, Pantano S, Bonilla B, et al. Cloning, characterization and subcellular localization of a *Trypanosoma cruzi* argonaute protein defining a new subfamily distinctive of trypanosomatids. *Gene.* (2010) 466: 26–35.

Gebetsberger J., Zywicki M., Künzi A., Polacek M. tRNA-Derived Fragments Target the Ribosome and Function as Regulatory Non-Coding RNA in *Haloferax volcanii*. *Hindawi Publishing Corporation Archaea*,(2012) 10.1155-2012-260909.

Gentil, L. G., Cordero E. M., Do Carmo M. S., Dos Santos M. R., Da Silveira J. F. Posttranscriptional mechanisms involved in the control of expression of the stage-specific GP82 surface glycoprotein in *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica.* (2009),109, 152-158.

Gillinger, G. & Bellofatto, V. Trypanosome spliced leader RNA genes contains the first identified RNA polymerase II promoter in these organisms. *Nucleic Acids. Res.* (2001), 29: 1556-1564.

Godoy, L. M., Marchini F. K., Pavoni D. P, Rampazzo R. C. P., Probst C. M., Goldenberg S., Krieger M. A. Quantitative Proteomics of *Trypanosoma cruzi* During Metacyclogenesis. *Proteomics (Weinheim. Print)* (2012).

Goldenberg S., Salles J.M., Contreras V.T., Lima Franco M.P., Katzin A.M., Colli W., Morel, C.M. Characterization of messenger RNA from epimastigotes and metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *FEBS.* (1985), 180, 265 - 270.

González-Pino M.J., Rangel-Aldao R., Slezynger T.C. Expression of alpha- and beta-tubulin genes during growth of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *DNA Cell Biol.* (1999) 18(6):449- 55.

Grandi P., Rybin V., Bassler J., Petfalski E., Strauss D., Marzioch M., Schafer T., Kuster B., Tschochner H., Tollervey D., Gavin A.C., Hurt E. 90S pre-ribosomes include the 35S prerRNA, the U3 snoRNP, and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors. *Mol Cell.* (2002),10(1):105-15.

Greif G., Ponce de Leon M., Lamolle G., Rodriguez M., Piñeyro D., Tavares-Marques L.M., Reyna-Bello A., Robello C., Alvarez-Valin F. Transcriptome analysis of the bloodstream stage from the parasite *Trypanosoma vivax*. *BMC Genomics.* (2013),10.1186/1471-2164-14- 149.

Guhl F., Jaramillo C., Yockteng R., Vallejo G. A., Cárdenas-Arroyo E. F. *Trypanosoma cruzi* DNA in human mummies *Lancet.* (1997), 349:1370.

Harris K.A., Jr. Crothers D.M., Ullu E. In vivo structural analysis of spliced leader RNAs in *Trypanosoma brucei* and *Leptomonas collosoma*: a flexible structure that is independent of cap4 methylations. *RNA.* (1995), 1, 351-362.

Holcik M., Sonenberg N., Korneluk R.G. Internal ribosome inicitiation of translation and the control of the cell death. *Trends Genet.* (2000), 16(10): 469-73.

Holetz F.B., Correa A., Ávila A.R., Nakamura C.V., Krieger M.A., Goldenberg S. Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2007), 356, 1062-1067.

Hotz H. R., Hartmann C., Huober K., Hug M., Clayton C. Mechanisms of developmental regulation in *Trypanosoma brucei*: a polypyrimidine tract in the 3'-untranslated region of a surface protein mRNA affects RNA abundance and translation. *Nucleic Acids Res.* (1997) 25(15), 3017-3026.

Ingolia N.T., Ghaemmaghami S., Newman J.R., Weissman J.S. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science.* (2009), 324, 218-23.

Ingolia N.T., Lareau L.F., Weissman J.S. Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. *Cell.* (2011), 147, 789, 802.

Ingolia N.T., Brar G.A., Rouskin S., McGeachy A.M., Weissman J.S. The ribosome profiling strategy for monitoring translation in vivo by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments. *Nat Protoc* (2012), 7:1534–1550.

Ivens A.C., Peacock C.S.,Worthey E.A.The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. Science. (2005), 309: 436-442.

Kong J., Lasko P. Translational control in cellular and developmental processes, Nature Reviews | Genetics. (2012), 13.

Kapotas N., Bellofatto V. Differential response to RNA trans-splicing signals within the phosphoglycerate kinase gene cluster in *Trypanosoma brucei*. Nucleic Acids. Res. (1993), 21, 4067- 4072.

Keene J.D. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. Nat. Rev. Genet. (2007), 8, 533-543.

Kollien A.H, Schmidt J, Schaub G.A. Modes of association of *Trypanosoma cruzi* with the intestinal tract of the vector *Triatoma infestans*Original Research ArticleActa Tropica, (1998), 127-141.

Kolev, N.G.; Franklin, J.B.; Carmi, S.; Shi, H.; Michael, S.; Tschudi, C. The transcriptome of the human pathogen *Trypanosoma brucei* at single-nucleotide resolution. **PLoS Pathogens**, (2010), 6(9):1001090.

Lee S.R., Collins K. Starvation-induced cleavage of the tRNA anticodon loop in *Tetrahymena thermophila*. J Biol Chem. (2005), 280, 42744-42749.

Lenzi H.L., Oliveira D. N., Lima M. T.,Gatas C. R. *Trypanosoma cruzi*: paninfectivity of CL strain during murine acute infection. Experimental Parasitology. (1996), 84:16-27.

Fresno M., Jimenez A., Vazquez D. Inhibition of Translation in Eukaryotic Systems by Harringtonine Eur. J. Biochem. (1977), 72, 323-330.

Gebauer F., Hentze M.W. Molecular mechanisms of translational control. Nat Rev. Mol. Cell Biol, 5:827-835.

Kapp L.D., Lorsch J.R. The molecular mechanics of eukaryotic translation initiation, Bioessays. (2003); 25:1201-11.

Michels P.A., Bringaud F., Herman M., Hannaert V. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochim. Biophys. Acta.* (2006), 1763 (12): 1463-1477.

Minning T. A., Weatherly D. B., Flibotte S., Tarleton R. L. Widespread, focal copy number variations (CNV) and whole chromosome aneuploidies in *Trypanosoma cruzi* strains revealed by array comparative genomic hybridization. *BMC Genomics.* (2011), 12, 139.

Moore M.J. From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science* (2005), 309: 1514-1518.

Muhich M.L., Boothroyd J.C. Polycistronic transcripts in trypanosomes and their accumulation during heat shock: evidence for a precursor role in mRNA synthesis. *Mol. Cell Biol.* (1988), 8, 3837-3846.

Namy O., Rousset J.P., Naphine S., Brierley I. Reprogrammed genetic decoding in cellular gene expression. *Molecular cell.* (2004), 13, (2)157-68.

Nardelli S.C., Avila A.R., Freund A., Motta M.C., Manhães L., de Jesus T.C., Schenkman S., Fragoso S.P., Krieger M.A., Goldenberg S., Dallagiovanna B. Small-subunit rRNA processome proteins are translationally regulated during differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Eukaryot. Cell*, (2007), 6(2): 337-345.

Nilsen T.W., Graveley B.R. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature.* (2010), 463, 7280, 457-63.

Palenchar J.B., Bellofatto V. Gene transcription in trypanosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology.* (2006) 146(2):135-41.

Plotkin J.B. Transcriptional regulation is only half the story. *Mol Syst Biol.* (2010), 6:406.

Pucadyil T.J, Schmid, S.L. Conserved functions of membrane active GTPases in coated vesicle formation. *Science.* (2009) 325, 1217-1220.

Rastrojo A., Carrasco-Ramiro F., Martín D., Crespillo A., Reguera M. R., Aguado B., Requena J. M. The transcriptome of *Leishmania major* in the axenic promastigote stage: transcript annotation and relative expression levels by RNA-seq. *BMC Genomic.* (2013), 14:223.

Salmon D., Montero-Lomeli M., Goldenberg S. A DnaJ-like protein homologous to the yeast co-chaperone Sisl (TcJ6p) is involved in initiation of translation in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol Chem.* (2001), 276(47): 43970-9.

Sasson A., Michael T.P. Filtering error from SOLiD Output. *Bioinformatics.* (2010), 26 (6):849-850.

Schena M., Shalon D., Davis R. W., Brown P.O. Quantitative monitoring of gene expression. patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* (1995), 270, 5235, 467-470.

Schneider-Poetsch T., Jianhua J., Eyler D. E., Dang Y., Shridhar B., Merrick W. C., Green R., Shen R., Liu J.O. Inhibition of Eukaryotic Translation Elongation by Cycloheximide and Lactimidomycin. *Nat Chem Biol.* (2010), 6(3): 209–217.

Serpeloni M., Moraes C.B., Muniz J.R., Motta M.C., Ramos A.S., Kessler R.L., Inoue A.H., Darocha W.D., Yamada-Ogatta S.F. Fragoso S.P., Goldenberg S., Freitas-Junior L.H., Avila A.R. An essential nuclear protein in trypanosomes is a component of mRNA transcription/export pathway. *PLoS One* (2011), 6(6):e20730 a.

Siegel T.N., Hekstra D.R., Wang X., Dewell S., Cross G.A. Genome-wide analysis of mRNA abundance in two life-cycle stages of *Trypanosoma brucei* and identification of splicing and polyadenylation sites. *Nucleic Acids Research.* (2010), 38(15), 4946-4957.

Silveira J.F. *Biologia Molecular do Trypanosoma cruzi*. In: Brener Z., Andrade Z.A. Barral- Neto M. *Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas.* (2000), Cap 8, p.127-147.

Simpson A. G. B., Stevens J. R., Lukes, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends in Parasitology,* (2006), 22, 4, 168-174.

Shulamit M., Tirza D., Sachin K. G., Omri W., Romano M., Visnovezky D., Sorek R., Unger R., Ullu E. RNA-seq analysis of small RNPs in *Trypanosoma brucei* reveals a rich repertoire of non-coding RNAs. *Nucleic Acids Research* (2012), 1282–1298.

Smith C.R. Jr., Powell R.G., Mikolajczak K.L. The genus *Cephalotaxus*: source of homoharringtonine and related anticancer alkaloids. *Cancer Treat Rep.* (1976), 60, 1157-70.

Smith T.F., Gaitatzes C., Saxena K., Neer E.J. **The WD repeat: a common architecture for diverse functions.** Trends Biochem. Sci. (1999); 24, 181-185.

Sonenberg N., Dever T.E. Eukaryotic translation initiation factors and regulators. Curr opin. Struct biol (2003); 13:56-63.

Sonenberg N., Hinnebush A.G. New modes of translational control in development, behaviour, and disease. Molecular Cell. (2007), 28, (5), 721-9.

Teixeira S.M. Control of gene expression in Trypanosomatidae. Brazilian Journal of Medical and Biological Research.(1998), 31(12):1503-16.

Teixeira S.M., Kirchhoff L.V., Donelson J.E. Trypanosoma cruzi: supression of tuzin gene expression by its 5'-UTR and spliced leader addition site. Exp. Parasitol. (1999), 93(3): 143- 151.

Tian Q., Stepaniants S.B., Mao M., Weng L. Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in mammalian cells. Molecular and cellular proteomics: MCP. (2004), 3, 10, 960-9.

Tomlinson S., Vandekerckhove F., Frevert U., Nussenzweig V. The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. Parasitology,(1995), 110, 547-554.

Touriol C., Bornes S., Bonnal S., Audigier S, Prats H., Prats A.C., Vagner S. Generation of protein isoform diversity by alternative initiation of translation at non-AUG codons. Biology of the cell under the auspices if the European Cell Biology Organization. (2003), 95, 3-4, 168- 78.

Urbina J.A. Chemotherapy of Chagas' disease: the how and the why. Journal of Molecular Medicine. (1999), 77(3):332-8.

Vagner S., Galy B., Pyronnet S. Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites. EMBO reports. (2001), v. 2, n. 10, p. 893-8.

Vargas M.C., N.S., Zingales, B., Schenkman, B., Organization of satellite DNA in the genome of *Trypanosoma cruzi*. Molecular and Biochemical Parasitology. (2001), 1-9.

Vickerman K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *Int J. Parasitol.* (1994) 24(8): 13117-31.

Yamada-Ogatta S.F., Motta M.C., Toma H.K., Monteiro-Goes V., Avila A.R., Muniz B.D., Nakamura C., Fragoso S.P., Goldenberg S., Krieger M.A. *Trypanosoma cruzi*: cloning and characterization of two genes whose expression is up-regulated in metacyclic trypomastigotes. *Acta Tropica.* (2004), 90(2):171-9.

Yoffe Y., Zuberek J., Lener A. Binding specificities and potential roles of isoforms of eukaryotic initiation factor 4E in *Leishmania*. *Eukaryot. Cell*, 5:1969-1979.

Weatherly D.B., Boehlke C., Tarleton R. L. Chromosome level assembly of the hybrid *trypanosoma cruzi* genome *BMC genomics.* (2009) v. 10, p. 255.

Wilhelm J.E., Smibert C.A. Mechanisms of translational regulation in *Drosophila*. *Biol Cell.* (2005) Apr;97(4):235-52. Review.

WHO. (2014), <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.

Zingales B., Andrade S.G., Briones M.R. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (2009), 104 (7):1051-1054.

ANEXOS

Distinct subcellular localization of tRNA-derived fragments in the infective metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*

Larissa Reifur^{1,3}, Maria Rosa Garcia-Silva², Saloê Bispo Poubel¹, Lysangela Ronalte Alves¹, Paulo Arauco¹, Diane Kelly Buiar³, Samuel Goldenberg¹, Alfonso Cayota², Bruno Dallagiovanna^{1/4}

¹Instituto Carlos Chagas-Fiocruz, Curitiba, PR, Brasil ²Functional Genomics Unit, Institut Pasteur de Montevideo, Mataojo, MV, Uruguay

³Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

Small non-coding RNAs derived from transfer RNAs have been identified as a broadly conserved prokaryotic and eukaryotic response to stress. Their presence coincides with changes in developmental state associated with gene expression regulation. In the epimastigote form of Trypanosoma cruzi, tRNA fragments localize to posterior cytoplasmic granules. In the infective metacyclic form of the parasite, we found tRNA-derived fragments to be abundant and evenly distributed within the cytoplasm. The fragments were not associated with polysomes, suggesting that the tRNA-derived fragments may not be directly involved in translation control in metacyclics.

Key words: *Trypanosoma cruzi* - tRNA-derived fragments - subcellular localisation

The non-infective epimastigote form of *Trypanosoma cruzi* undergoes metabolic and morphological adaptations to differentiate into the pathogenic metacyclic trypomastigote form, which causes Chagas disease in mammals (Figueiredo et al. 2000). Morphological changes are associated with and preceded by a shift in metabolism, which is correlated with the differential expression of several genes (Minning et al. 2009). Although the metabolism of the replicative epimastigote is fully active, with constitutive polycistronic transcription, starvation reduces the transcriptional rates of the RNA polymerases in metacyclics (Ferreira et al. 2008). Despite the reduced level of transcription, translation is detected in these non-replicative forms, indicating that gene expression control in metacyclics occurs primarily at the post-transcriptional level (reviewed in Haile & Papadopoulou 2007).

Considering the almost exclusive post-transcriptional control of gene expression in *T. cruzi*, it would be surprising if this organism did not have an alternative pathway to compensate for the absence of an RNA interference system. A myriad of small non-coding RNAs have been reported in trypanosomatids (Dumas et al. 2006, Garcia-Silva et al. 2010, Michaeli et al. 2012), canonical microRNAs, and siRNAs have not been detected in *T. cruzi* (Franzén et al. 2011). Short (20-35 nt) RNAs derived from tRNAs were first observed in cytoplasmic granules in the epimastigote form of *T. cruzi* after an ini-

tial fingerprint sequencing of 348 clones (Garcia-Silva et al. 2010). Although 26% of the sequenced clones represented tRNA-derived fragments, a more thorough sequencing of the small RNAs from epimastigotes showed that 65.3% of more than 282.000 clones represented tRNA-derived fragments (Franzén et al. 2011). The composition of the small RNA population in *T. cruzi* was strikingly different from that observed in *Trypanosoma brucei*, reflecting clear differences in the molecular biology of the two parasites (Michaeli et al. 2012). Nonetheless, the relative abundance of tRNA-derived fragments could be related to gene expression control under various types of cellular stress, as has been suggested for prokaryotes, yeast, mammalian cells, the protozoans *Giardia lamblia* and *Tetrahymena thermophila* (Lee & Collins 2005, Li et al. 2008, Pederson 2010).

In this study, we conducted further analyses of the relative abundance and subcellular localization of *T. cruzi* tRNA-derived fragments during the infective stage of the parasite. We used *T. cruzi* metacyclic trypomastigotes derived from Dm28c epimastigotes cultured in vitro, as described by Contreras et al. (1985). Total RNA was extracted using TRIzol (Invitrogen) and size fractionated on a denaturing 15% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) gel. Subsequently, 18-40 nt RNAs were excised from the gel, purified and cloned as described by Garcia-Silva et al. (2010). To recover the small RNAs, specific oligonucleotide adaptors containing Ban 1 restriction sites were ligated to the 5' and 3' ends. The RNAs were then reverse transcribed, amplified by polymerase chain reaction for 10 cycles, Ban 1-digested, concatamerized, cloned into the pGEM T-easy vector (Promega Corp) and sequenced. Analyses were performed using the public GenBank (ncbi.nlm.nih.gov/genbank), GeneDB (genedb.org) and TriTrypDB (tritrypdb.org/tritrypdb) databases.

From a total of 844 clones analysed, 509 sequences aligned with the *T. cruzi* genome, whereas 2.16% showed no matches, indicating that these sequences may correspond to regions of the genome that have not been se-

Financial support: FIOCRUZ, Araucaria Foundation (18.456) (to LR) SG, LRA and BD received fellowships from CNPq, SBP received a fellowship from CAPES and DKB received a fellowship from UFPR/TN. + Corresponding author: brunod@tecpar.br

Received 20 December 2011

Accepted 10 May 2012

quenced, exogenous contaminating DNA or differences between the reference strain and the strain used in this study. No sequences matched small nuclear RNA sequences, but 0.98% mapped to small nucleolar RNAs, 2.95% mapped to intergenic regions, 6.09% mapped to mRNAs and 24.56% mapped to rRNAs. Most of the cloned sequences (63.26%) were fragments derived from tRNAs that appeared to be the result of a specific cleavage at or around the anticodon loop (Supplementary data). The tRNA fragments averaged 33 nt in length and were mostly derived from the 3' end (86.96%) of a restricted group of isoacceptors. In contrast with the RNAs obtained from an epimastigote population sequenced by Garcia-Silva et al. (2010), the tRNA-derived fragments obtained in this study from metacyclics exhibited differences with respect to abundance (tRNA fragments composed 63.26% of the small RNAs in metacyclics versus 26% in epimastigotes), orientation (most of the tRNA fragments were derived from the 3' side of the tRNAs in metacyclics vs. the 5' side in epimastigotes) and origin (in metacyclics, fragments were derived mostly from tRNA^{Gln}, tRNA^{Trp} and tRNA^{Val}; in epimastigotes, they were generally derived from tRNA^{Asp} and tRNA^{Glu}). The relative abundances of most fragments did not correspond to either tRNA gene copy number or codon usage (Horn 2008, Padilla-Mejia et al. 2009), consistent with previous reports (Franzén et al. 2011). As reported by Franzén et al. (2011), we observed that the majority of the fragments were derived from the 3' side of the tRNAs and a significant proportion of these fragments (24.53%) carried the 3' CCA sequence, indicating that both mature and pre-tRNAs undergo the cleavage process. The biological importance of these tRNA fragments is unknown, but we expected that a higher percentage of these fragments would be observed in metacyclics because stressed epimastigotes showed only a slight increase in tRNA-derived fragments (Garcia-Silva et al. 2010). This phenomenon is likely observed because tRNA cleavage is a conserved process in cells under various types of stress and metacyclic trypomastigotes are the product of epimastigote differentiation triggered by nutritional stress (Contreras et al. 1985). A comparison of our results with those of Garcia-Silva et al. (2010) demonstrates that the percentage of tRNA fragments is clearly higher in metacyclics. In contrast, this difference is not observed by Franzén et al. (2011). Moreover, the epimastigote tRNA-derived fragments sequenced by Franzén et al. (2011) are mostly derived from the 3' arm of tRNA^{His}. These discrepancies could be due to differences in the strains analysed in the two studies and to the cloning and sequencing methods used. Franzén et al. (2011) used a different strain (CL Brener) and analysed a much larger number of clones using RNAseq, which provided a higher coverage of the parasite genome.

The cloned RNA sequences were aligned using the LocARNA server (Will et al. 2007) and the secondary structures identified using the RNAalifold server (Bernhart et al. 2008) from the Vienna RNA package and were adjusted manually according to the secondary structural domains of canonical tRNAs. The predicted secondary structures adopted by the most abundant 3' tRNA frag-

ments revealed that, upon cleavage around the anticodon nucleotides, the tRNA fragment maintained the TψC loop conformation and was extended a few extra base pairs into the double-stranded stem, resulting in an energetically favourable structure (Supplementary data). Although this result is based only on computational calculations and does not confirm the true molecular structure *in vivo*, the fact that the most abundant tRNA-derived fragments can assume a similar, relatively stable configuration suggests a structural (or functional) significance.

The subcellular localization of the tRNA-derived fragments in the metacyclic forms was evaluated through fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) using probes complementary to the 5' and 3' ends of tRNA^{Gln-UUC} (the most abundantly cloned tRNA fragment). FISH assays showed that these fragments are dispersed throughout the cytoplasm in metacyclics, whereas stressed epimastigotes exhibited the same posterior granular distribution as non-stressed epimastigotes (Fig. 1). To further analyze the cellular localization of the tRNA-derived fragments, metacyclic cells were gently lysed in lysis buffer (300 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl 7.4 pH and 0.5% NP40) for 5 min. Two fractions were collected: the supernatant, containing only the soluble cytosol contents (S), and the insoluble fraction, or pellet (P), containing insoluble organelles, vesicles and cellular membranes. Both fractions were loaded on a sodium dodecyl sulphate-PAGE (10%) and transferred onto Hybond-C membranes (Amersham). Western blots were performed using antibodies to TcPUF6 (1/250), a cytosolic RNA binding protein (Dallagiovanna et al. 2005), and dynamin (1/200), a membrane protein present in endocytic vesicles (Pucadyil & Schmid 2009) (Fig. 2F, G). Northern blots were conducted using total RNA extracted from the two cell fractions (S and P) and a ra-

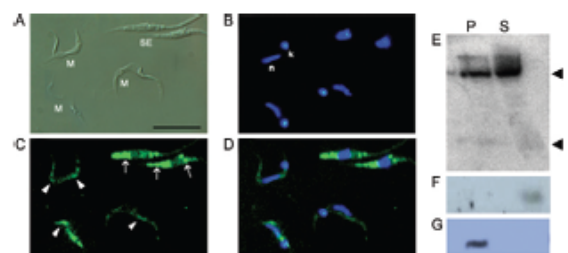


Fig. 1: subcellular localization of tRNA-derived RNAs in metacyclic trypomastigote forms. A: differential imaging contrast of metacyclic (M) and stressed epimastigote forms (SE); B: 4',6-diamidino-2-phenylindole staining was used as a reference to identify nuclei (n) and kinetoplast (k); C: fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled probes recognizing the 3' fragment tRNA^{Gln-UUC} (5' TTCCGATACCGGAATCGA3') in SE (arrows) and M forms (arrowheads); D: merged images (Bar = 10 µm). Cells were observed under an Olympus IX 81 microscope coupled to a Hamamatsu Orca-ER camera (Diagnostic Instruments); E: total RNA from soluble (S) and insoluble (P) metacyclic cell fractions were analyzed with the radioactively labelled probe 3'tRNA^{Gln-UUC}, as in Garcia-Silva et al. (2010). Western blot assays with F (anti TcPUF6) and G (anti-Dynamin) sera were performed to assess the identity of both fractions.

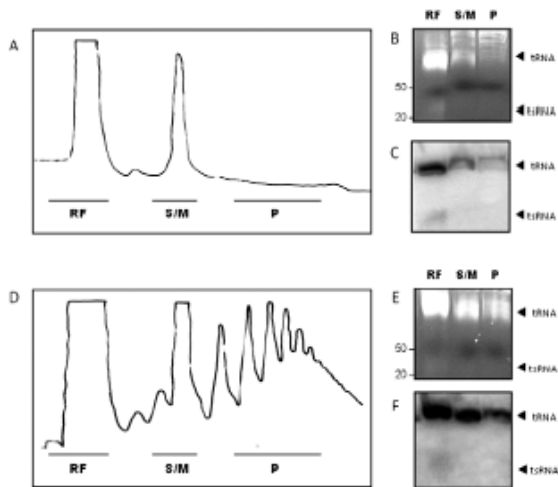


Fig. 2: tRNA-derived fragments are not associated with polysomes. Polysome profiles of (A) metacyclic trypomastigote and (D) epimastigote forms. Fractions were collected and pooled (RF: ribosome free; S/M: subunits and monomers; P: polysomes). RNA was purified and separated into 15% acrylamide gels (B, E). Northern blots of metacyclic (C) and epimastigote RNA (F) analyzed with the radioactively labelled probe tRNA^{Gln-UUC}, as in Fig. 1.

diolabeled probe specific to the tRNA^{Gln-UUC} fragment. The tRNA-derived fragments were detected in both fractions, supporting the dispersed pattern observed in the immunofluorescence assays (Fig. 2E). The signal observed for the insoluble cellular fraction could indicate the presence of these RNAs in smaller intracellular vesicles. Nonetheless, their dispersed pattern in the cytoplasm in metacyclics contrasts with the granular and posterior localization in epimastigotes, in which a partial co-localization with reservosomes has been inferred. The dismantling of the tRNA fragments in metacyclics could be correlated with the absence of reservosomes in this life stage (Figueiredo et al. 2000) and is consistent with the described cytoplasmic localization of the type II tRNA-derived fragments. Type II tRNA-derived fragments are most likely generated in the cytosol by RNaseZ cleavage and by RNA polymerase III termination and these fragments have been found to coimmunoprecipitate with Argonaute proteins (Elbarbary et al. 2009, Haussecker et al. 2010). This dramatic change in subcellular localization is puzzling and suggests distinct roles for these molecules during the different stages of the parasite life cycle.

To determine whether the dispersed tRNA-derived fragments were associated with translating polysomes, metacyclic and epimastigote forms of *T. cruzi* were treated with cycloheximide and the polysomes were purified and separated on sucrose gradients, as previously described (Nardelli et al. 2007) (Fig. 2A, D). Parasite extracts were also treated with puromycin as a negative control (not shown). The polysomes, monosomes and ribosome-free fractions were pooled and the total RNA was extracted. After acrylamide gel separation and staining, a high concentration of small RNAs was

observed in the ribosome-free pool for the metacyclic and epimastigote forms and a faint small RNA signal was observed in the ribosome-containing fractions (Fig. 2B, E). Northern blot analysis confirmed that tRNA-derived fragments from metacyclics and epimastigotes were concentrated in the ribosome-free fractions (Fig. 2C, F). Therefore, tRNA-derived fragments may not be related to the repression of the translational machinery. The knockdown of the tRNA-derived fragments and structural analysis should be used to help uncover the biological importance of these RNAs.

ACKNOWLEDGEMENTS

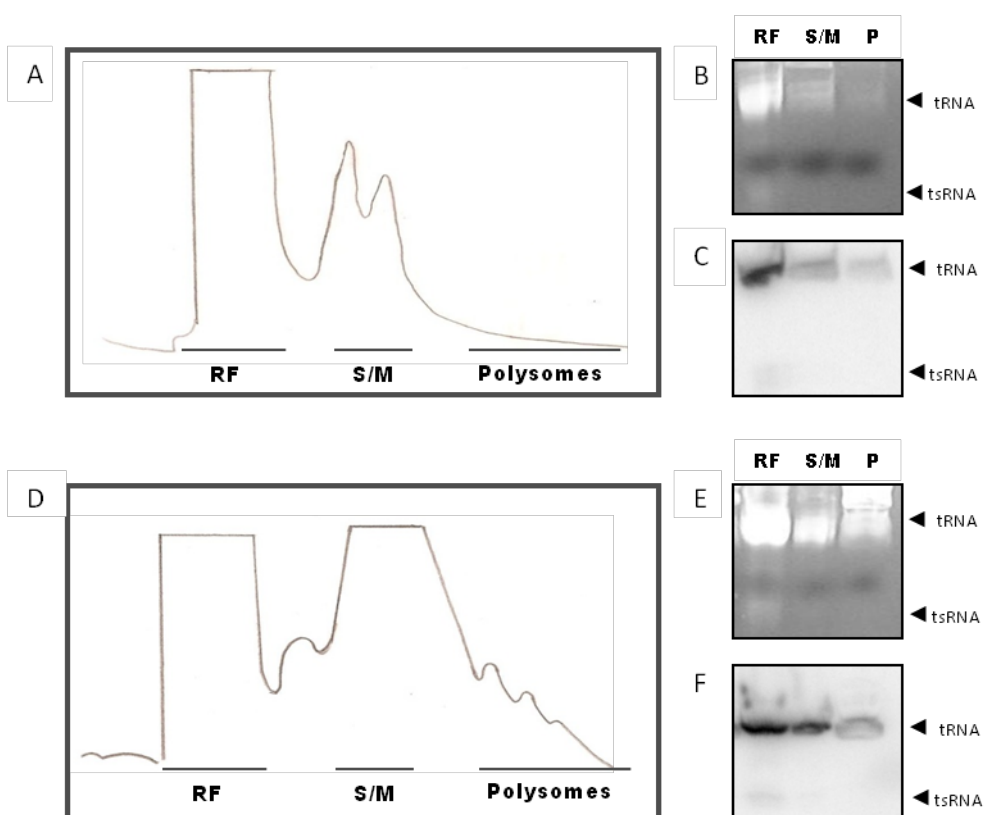
To Dr Donna J Koslowsky, Dr Laura E Yu and the reviewers, for critical reading of the manuscript, to Stenio Frago and Rosana Gonçalves, for the anti-Dynamin serum, and Nilsson Fidencio, for technical assistance.

REFERENCES

- Bernhart SH, Hofacker IL, Will S, Gruber AR, Stadler PF 2008. RNAalifold: improved consensus structure prediction for RNA alignments. *BMC Bioinformatics* 9: 474.
- Contreras VT, Salles JM, Thomas N, Morel CM, Goldenberg S 1985. *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol Biochem Parasitol* 16: 315-327.
- Dallagiovanna B, Perez L, Sotelo-Silveira J, Smircich P, Duhagon MA, Garat B 2005. *Trypanosoma cruzi*: molecular characterization of TcPUF6, a Pumilio protein. *Exp Parasitol* 109: 260-264.
- Dumas C, Chow C, Muller M, Papadopoulou B 2006. A novel class of developmentally regulated noncoding RNAs in *Leishmania*. *Eukaryot Cell* 5: 2033-2046.
- Elbarbary RA, Takaku H, Uchiyama N, Tamiya H, Abe M, Takahashi M, Nishida H, Nashimoto M 2009. Modulation of gene expression by human cytosolic tRNase Z(L) through 5'-half-tRNA. *PLoS ONE* 4: e5908.
- Ferreira LR, Dossin F de M, Ramos TC, Freymuller E, Schenkman S 2008. Active transcription and ultrastructural changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *An Acad Bras Cienc* 80: 157-166.
- Figueiredo RC, Rosa DS, Soares MJ 2000. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. *J Parasitol* 80: 1213-1218.
- Franzén O, Arner E, Ferella M, Nilsson D, Respuela P, Carninci P, Hayashizaki Y, Ashund L, Andersson B, Daub CO 2011. The short non-coding transcriptome of the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1283.
- Garcia-Silva MR, Frugier M, Tosar JP, Correa-Dominguez A, Ronal-te-Alves L, Parodi-Talice A, Rovira C, Robello C, Goldenberg S, Cayota A 2010. A population of tRNA-derived small RNAs is actively produced in *Trypanosoma cruzi* and recruited to specific cytoplasmic granules. *Mol Biochem Parasitol* 171: 64-73.
- Haile S, Papadopoulou B 2007. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol* 10: 569-577.
- Haussecker D, Huang Y, Lau A, Parameswaran P, Fire AZ, Kay MA, 2010. Human tRNA-derived small RNAs in the global regulation of RNA silencing. *RNA* 16: 673-695.
- Horn D 2008. Codon usage suggests that translational selection has a major impact on protein expression in trypanosomatids. *BMC Genomics* 9: 2.

Anexo 2. Perfil de sedimentação dos mRNAs em gradiente de sacarose.

Perfil de sedimentação dos mRNAs em gradientes de sacarose: Gradiente de sacarose (15 – 55%), fragmentos de tRNA (tsRNA) encontram se na fração livre de ribossomos uma vez que as células foram tratadas com puromicina. (A) perfil polissomal da forma tripomastigota metacíclica e (D) da formas epimastigotas. A posição do 80S monossomica e polissomos estão indicadas no gradiente de sacarose. As frações foram coletadas e reunidas em três grupos (RF - livre de ribossomos, S/M - subunidades de monossomos e P - polissomal), RNA purificado e separado em géis de acrilamida a 15% (B e E). Figuras representativas para Northern blots, metacíclicos (C) e epimastigotas (F) analisados com a sonda tRNA^{Glu-UUC} marcada com radioativamente.

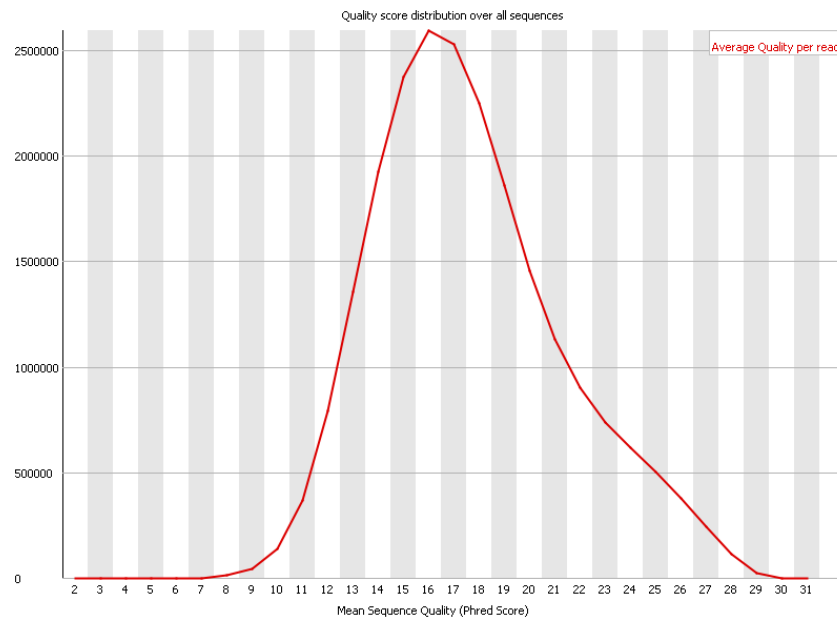
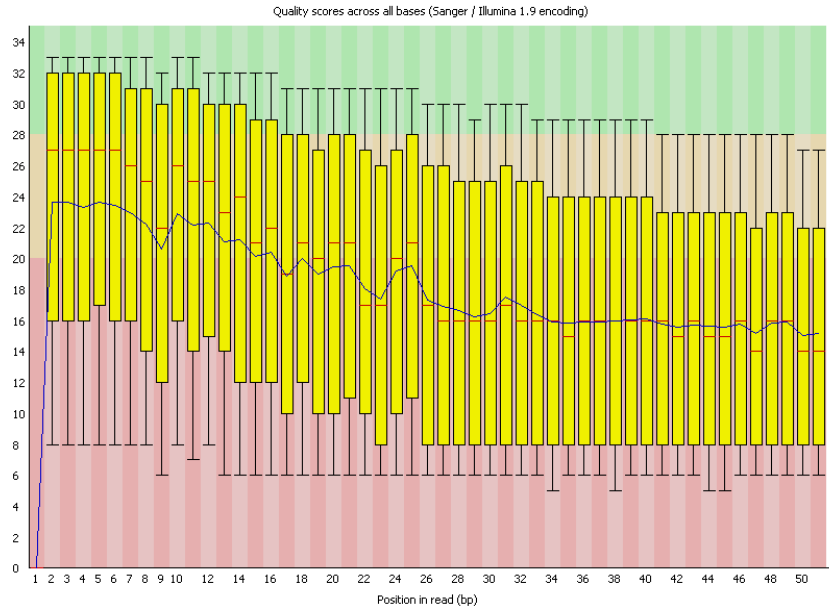


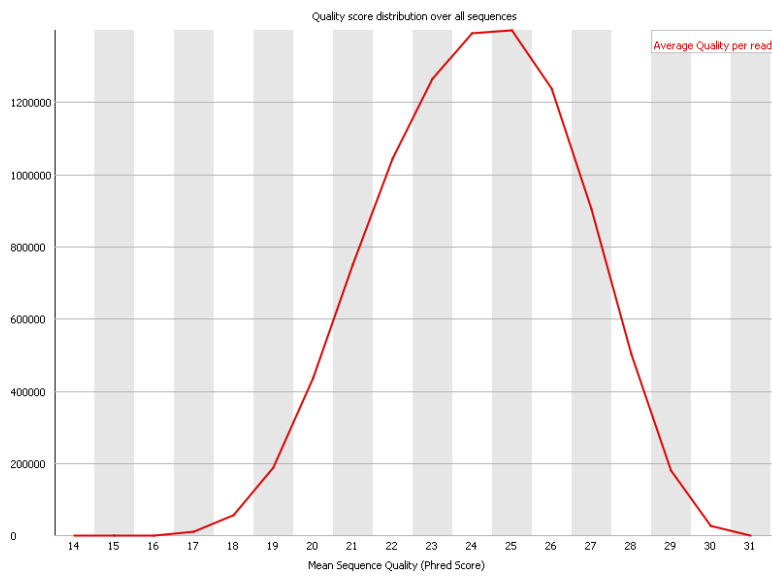
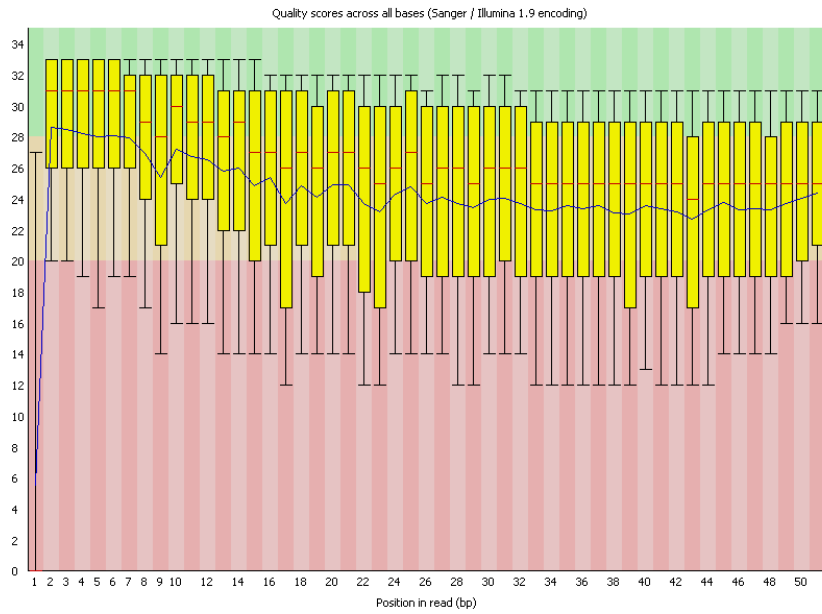
Anexo 3. Representação gráfica da qualidade média por base dos dados.

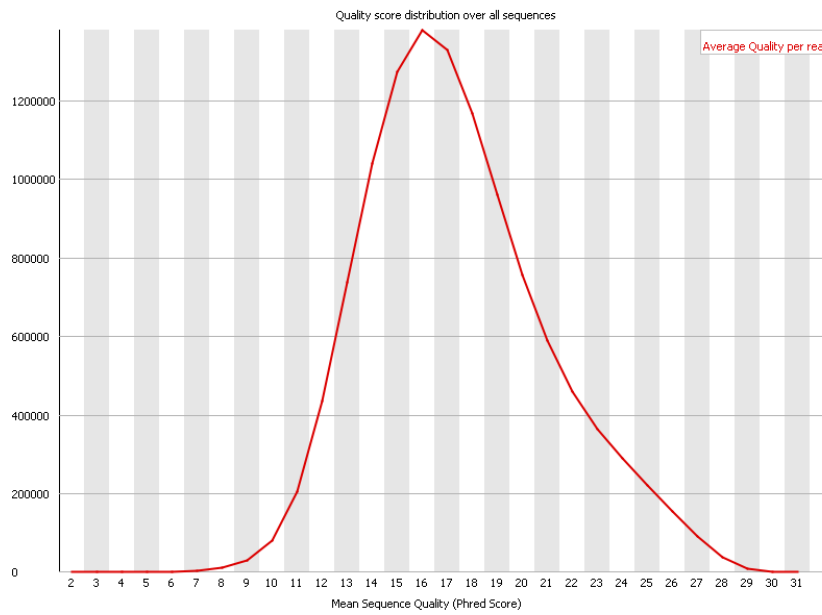
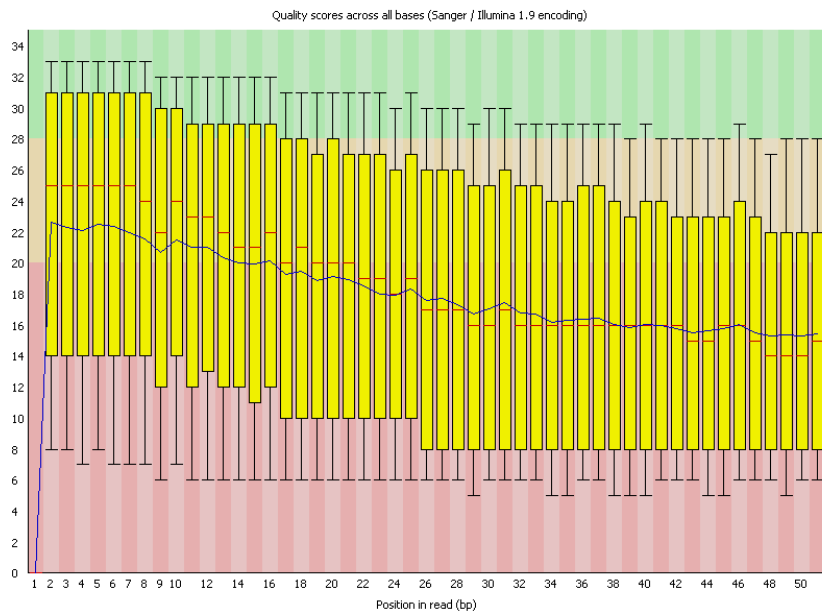
Verde: Boa qualidade; laranja: Qualidade razoável; Verde: Qualidade ruim.

Gráficos gerados antes do *trimming*.

A. Bibliotecas de RNA-poli A

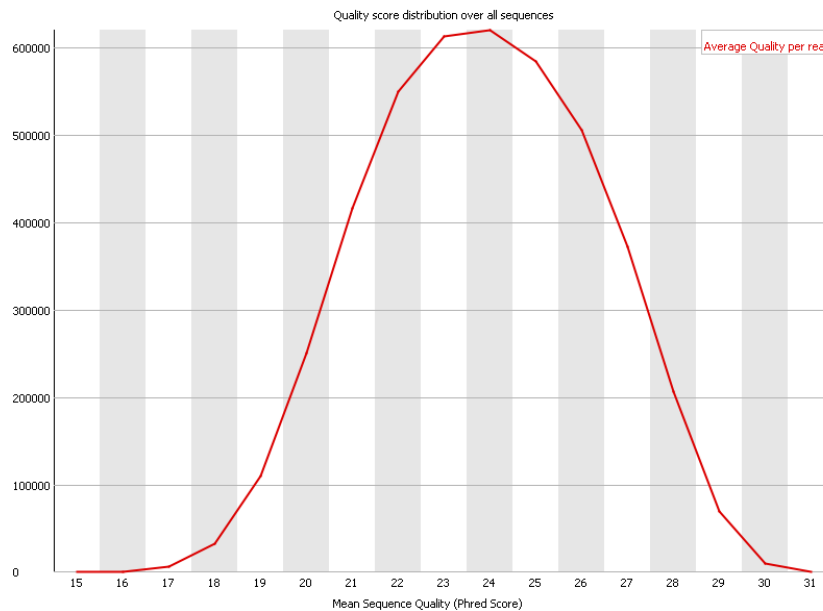
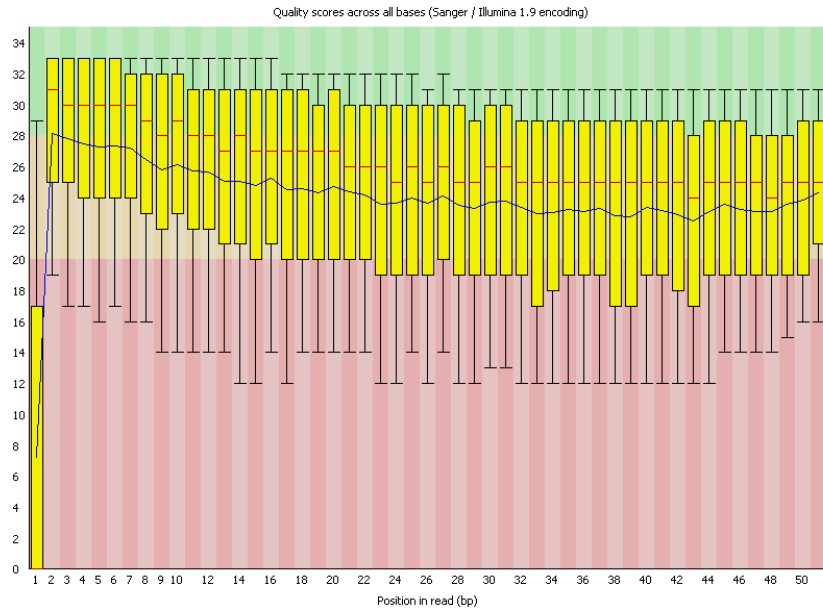


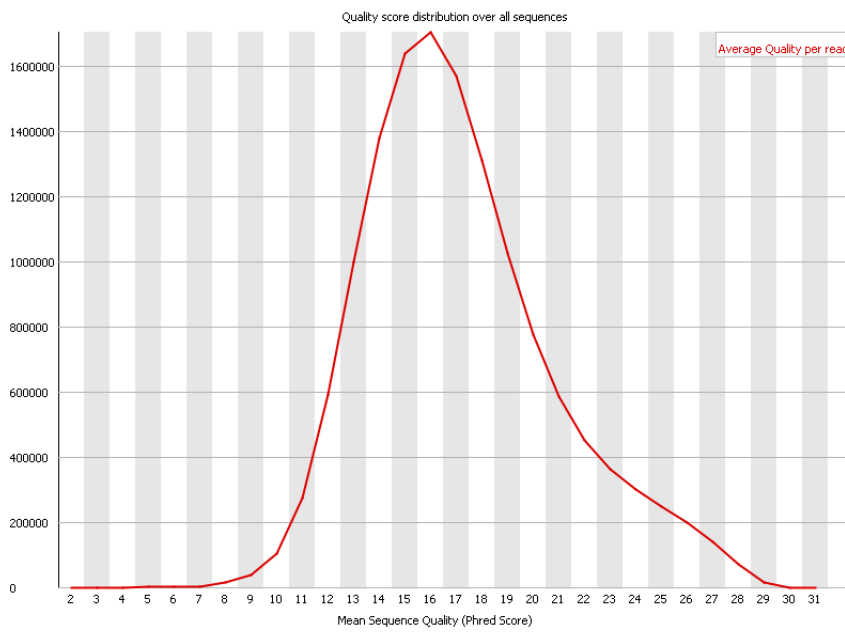
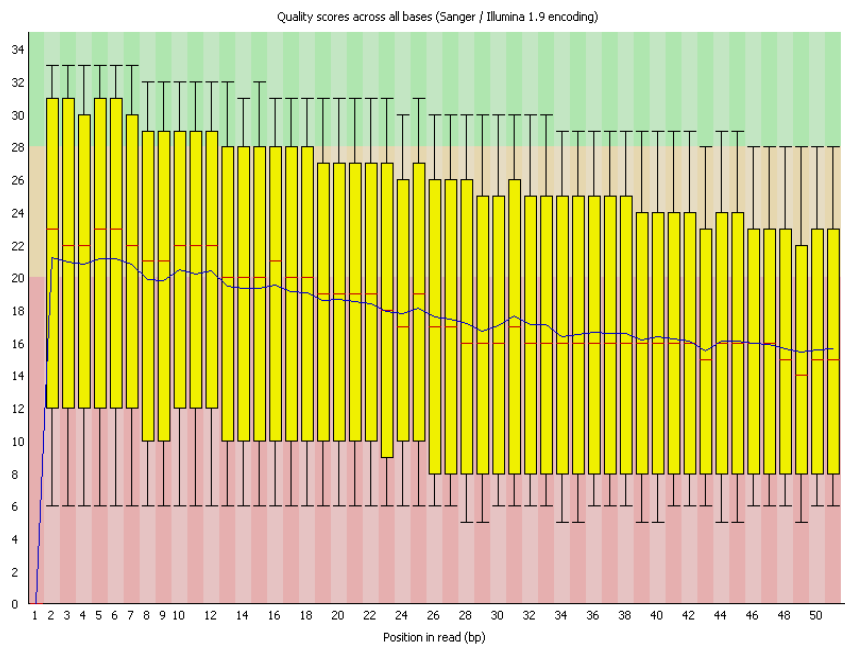


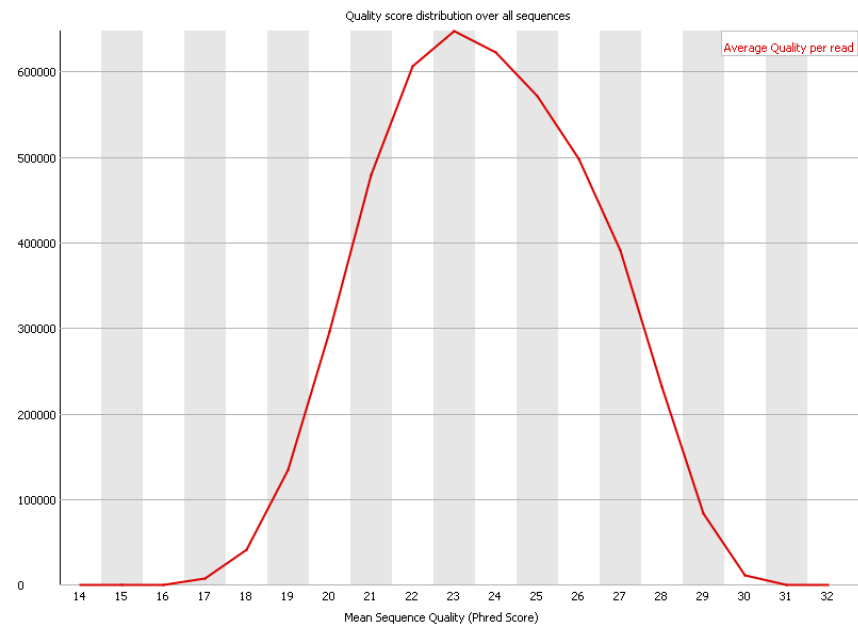
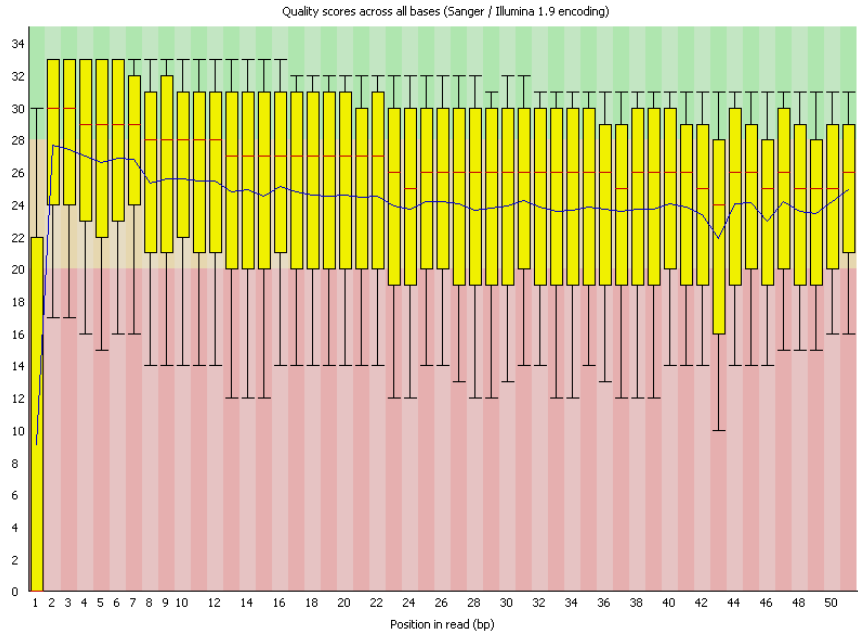


Gráficos gerados após *trimming* ($p>0.05$).

B. Bibliotecas de RNA-poli A

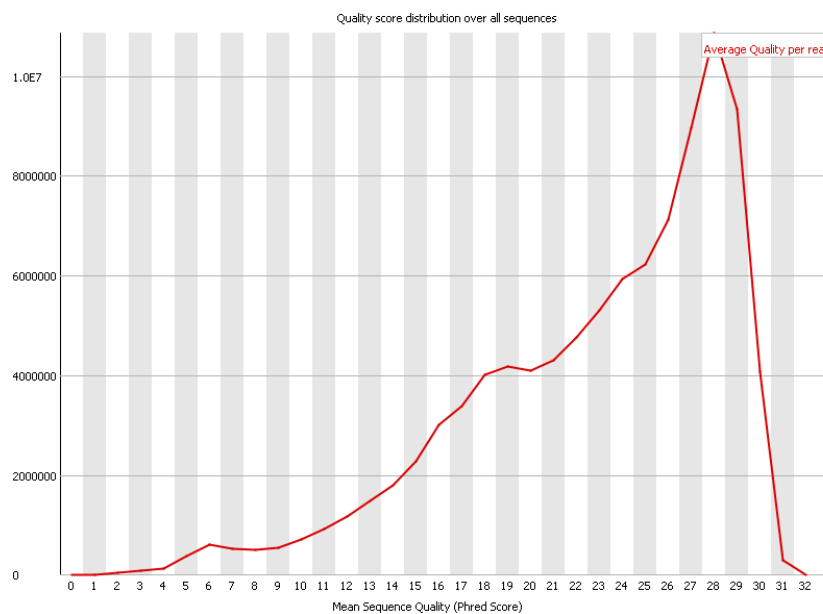
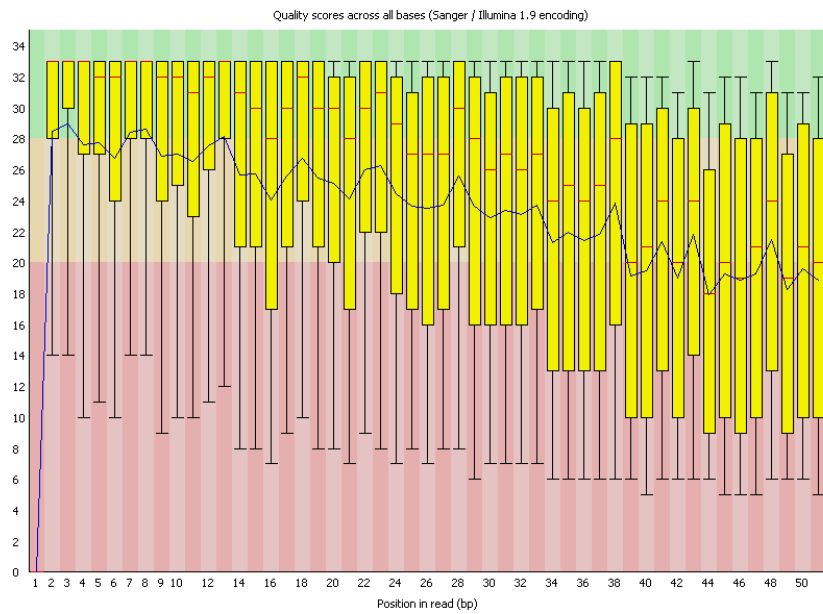


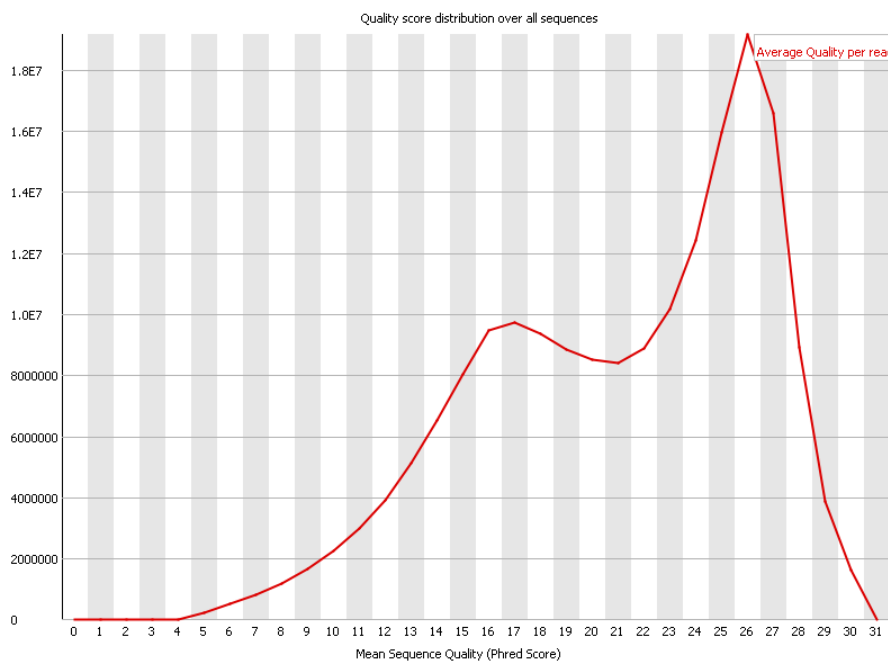
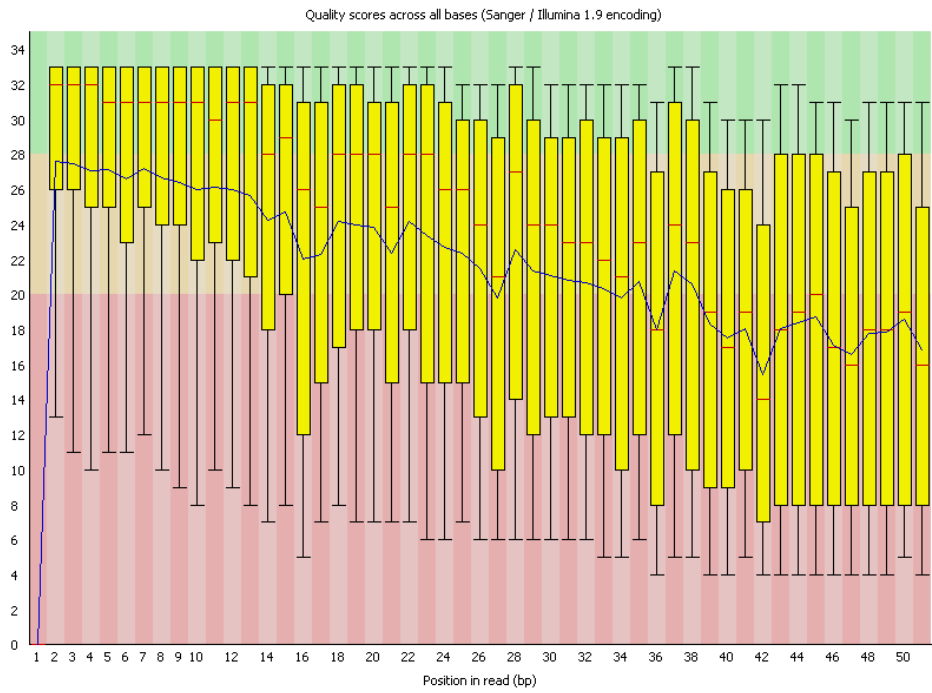


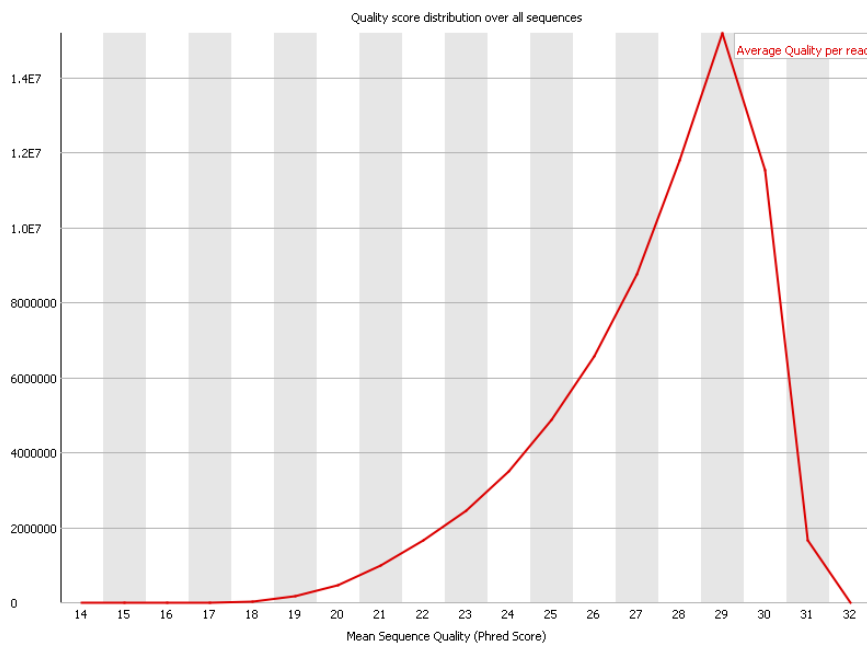
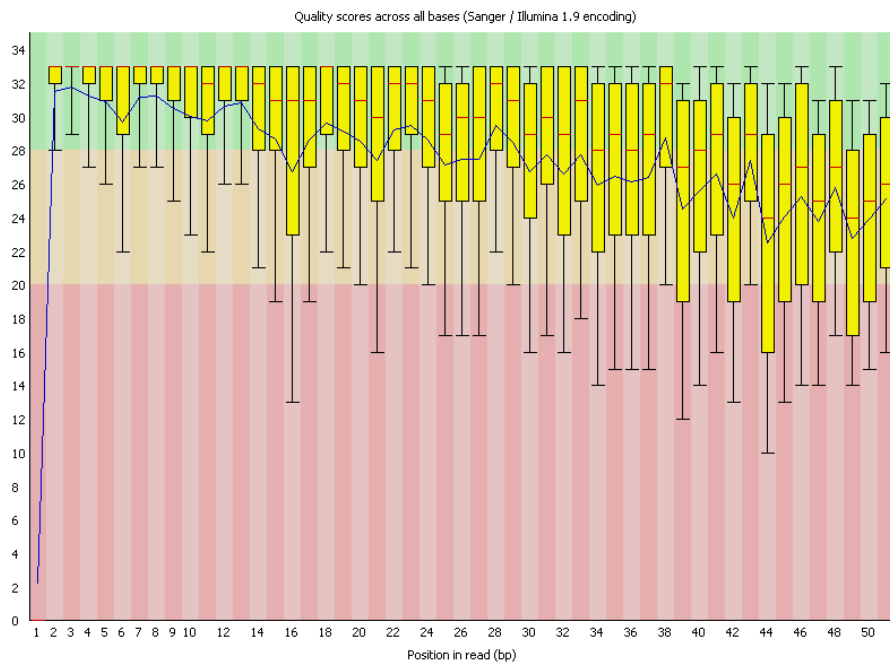


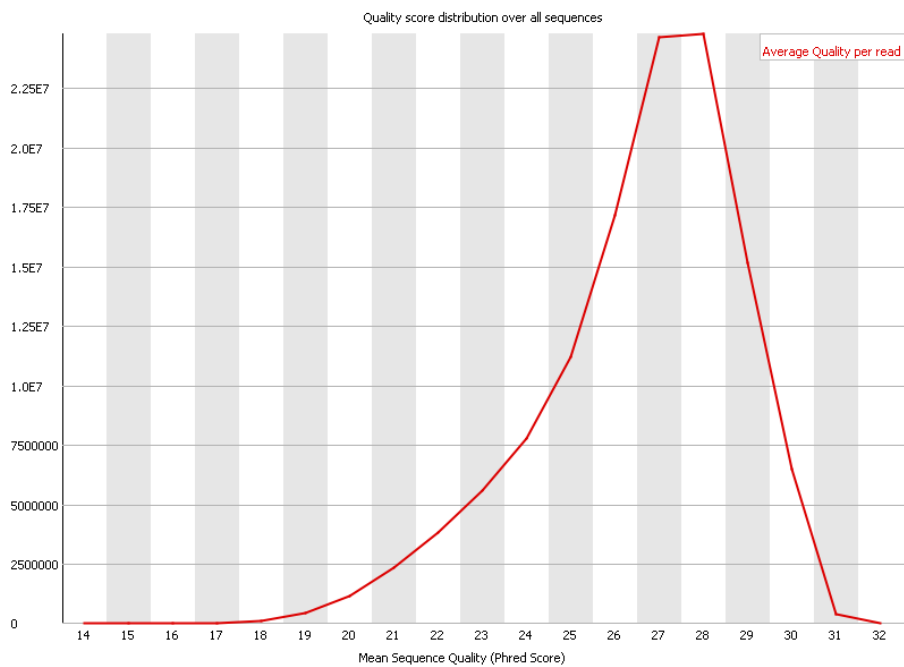
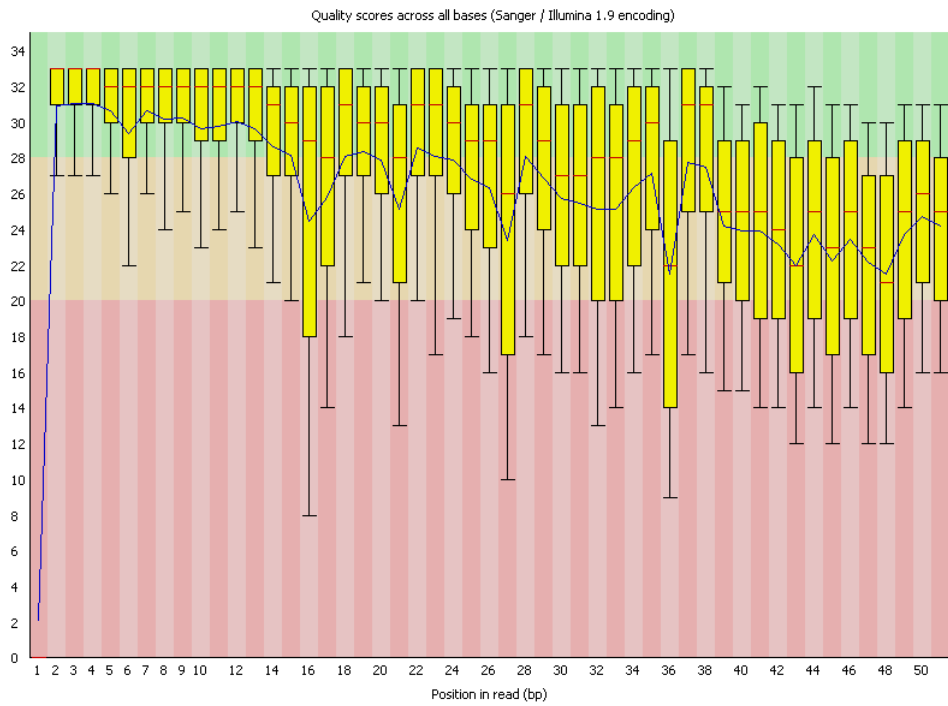
Gráficos gerados antes do *trimming*.

C. Bibliotecas de *Ribosome Footprinting*







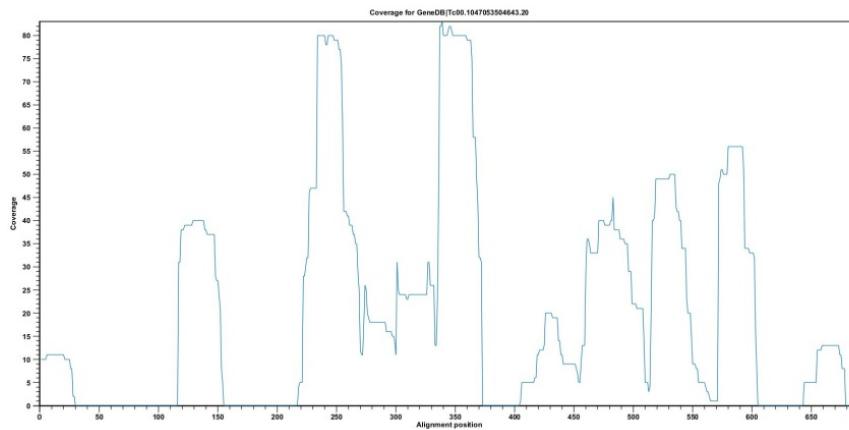


Anexo 4. Mapeamento das leituras ao longo dos genes.

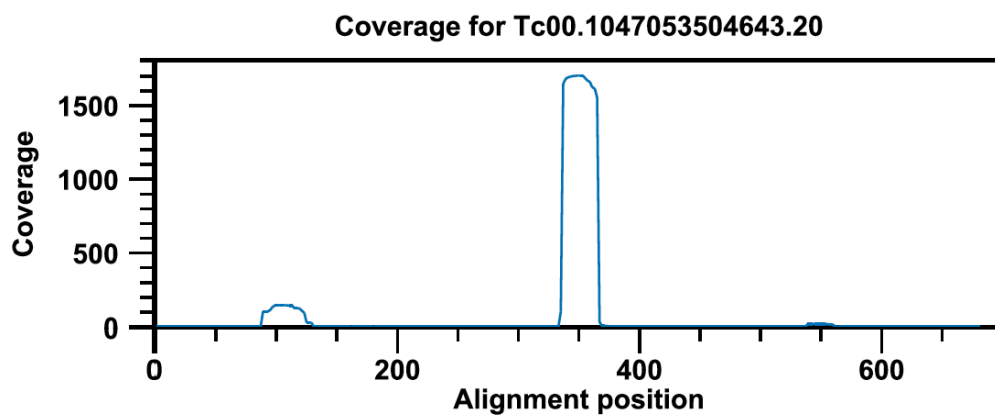
Mapeamento das leituras ao longo dos genes obtido com a técnica de *Ribosome Footprinting* nas formas epimastigota e metacíclica de *T. cruzi*. O eixo X representa o posicionamento das leituras mapeadas ao longo do gene, o eixo Y representa o numero de leituras para cada posição do gene.

A. TcImp3

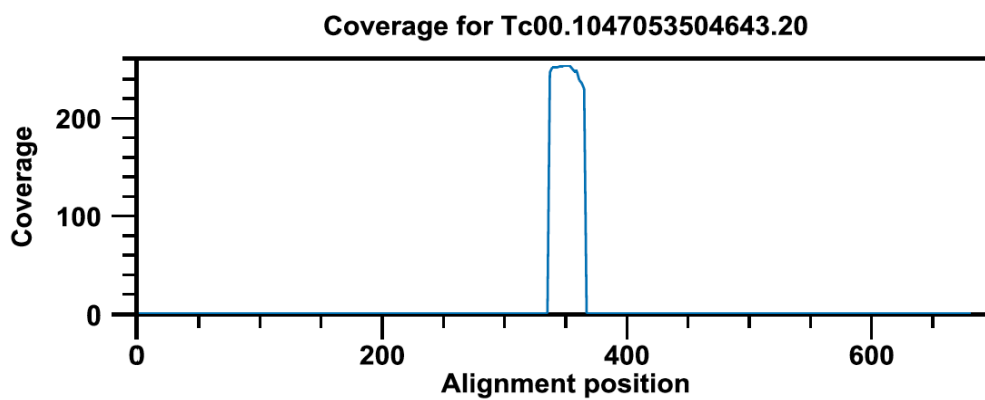
Forma epimastigota



Forma metacíclica

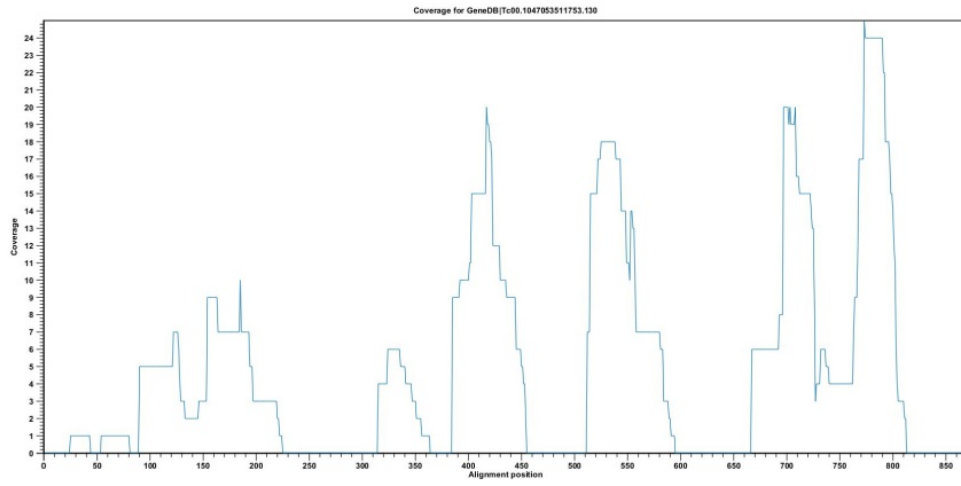


Forma metacíclica tratada com harringtonina.

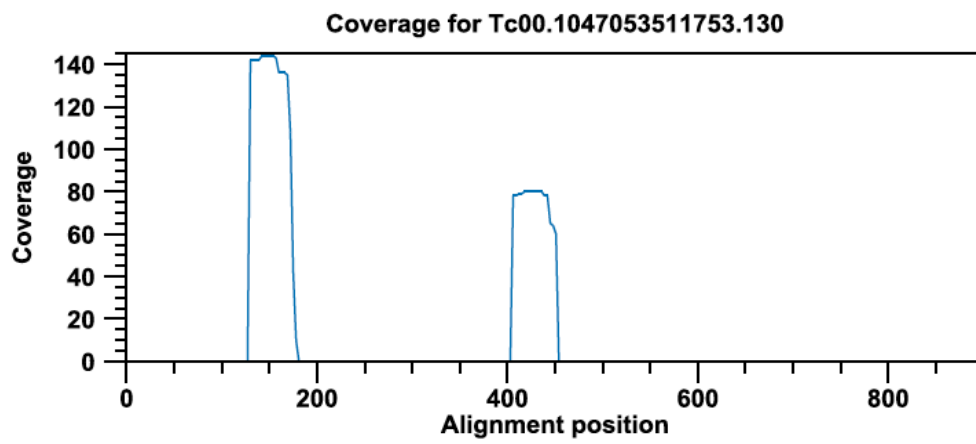


B. TcImp4

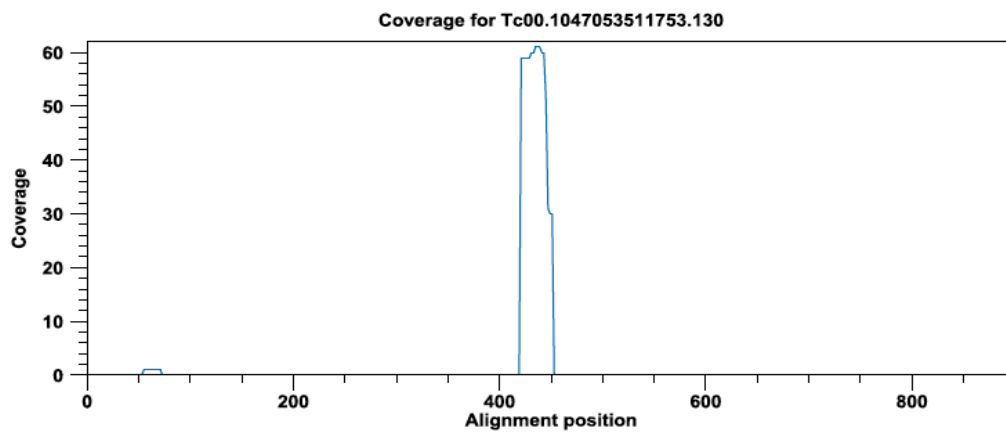
Forma epimastigota



Forma metacíclica



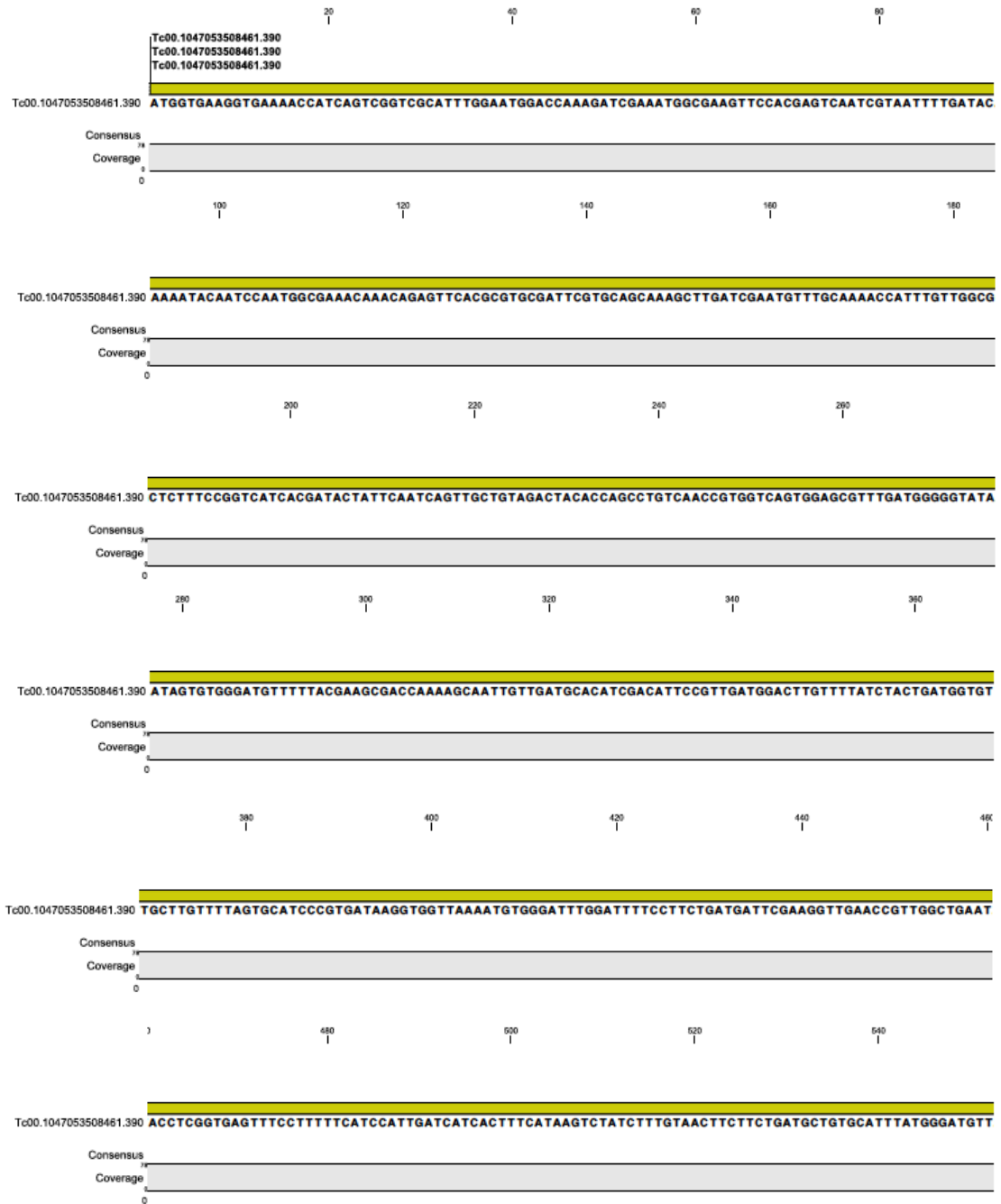
Forma metacíclica tratada com harringtonina.

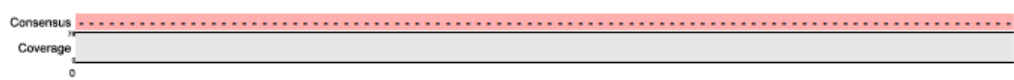
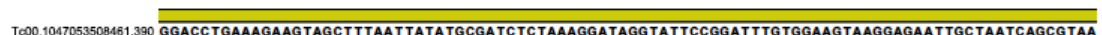
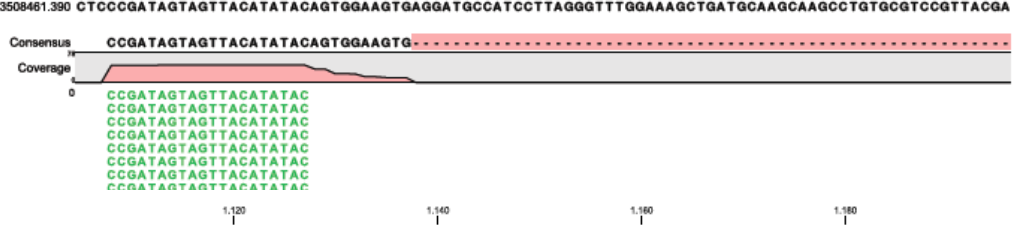
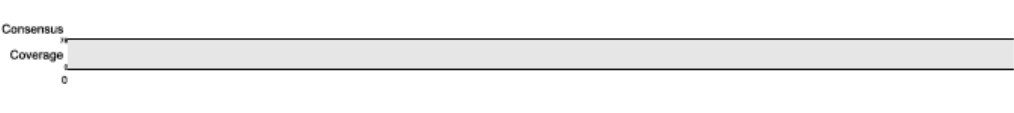
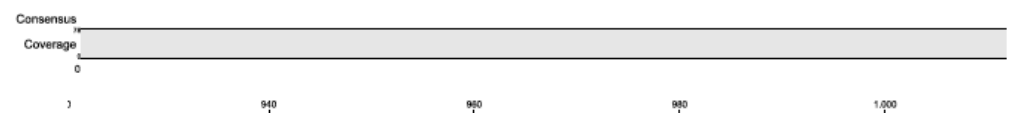
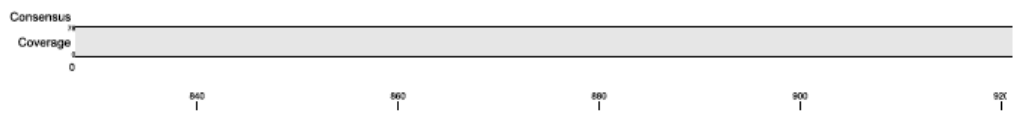
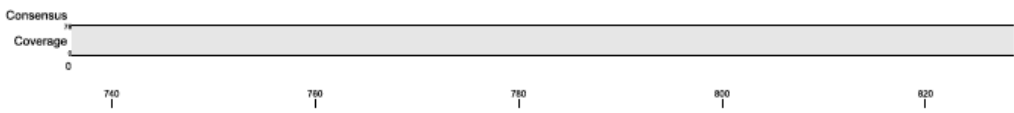
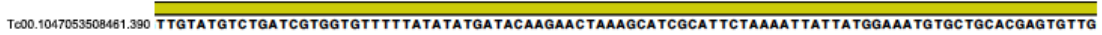
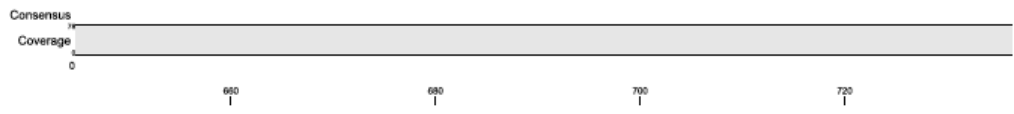
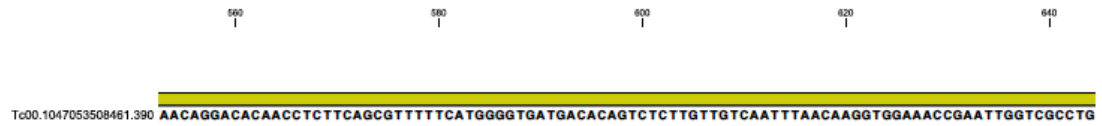


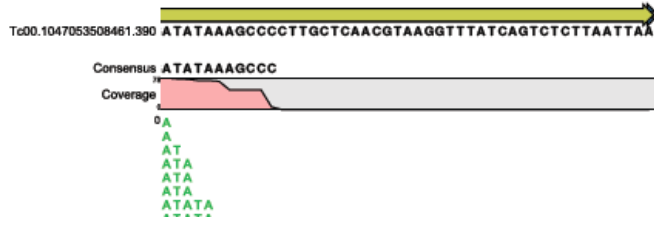
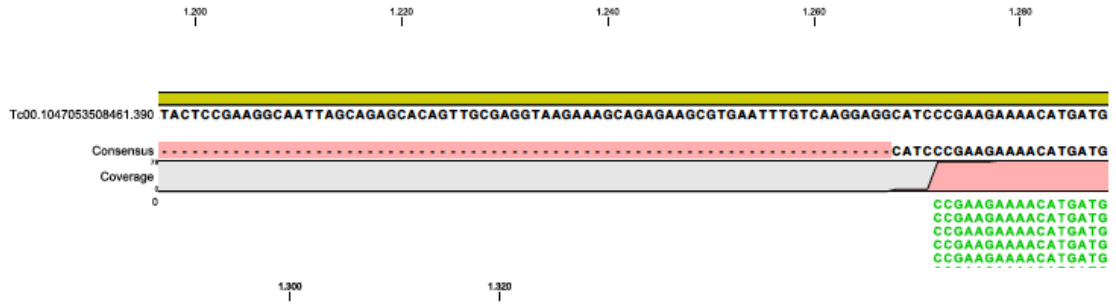
Anexo 5. Análise das sequências do mapeamento dos transcritos de TcSof1, TcImp3, TcImp4

Sequências obtido com a técnica de *Ribosome Footprinting* nas formas metacíclicas de *T. cruzi* tratadas com harringtonina utilizando o *software* CLC.

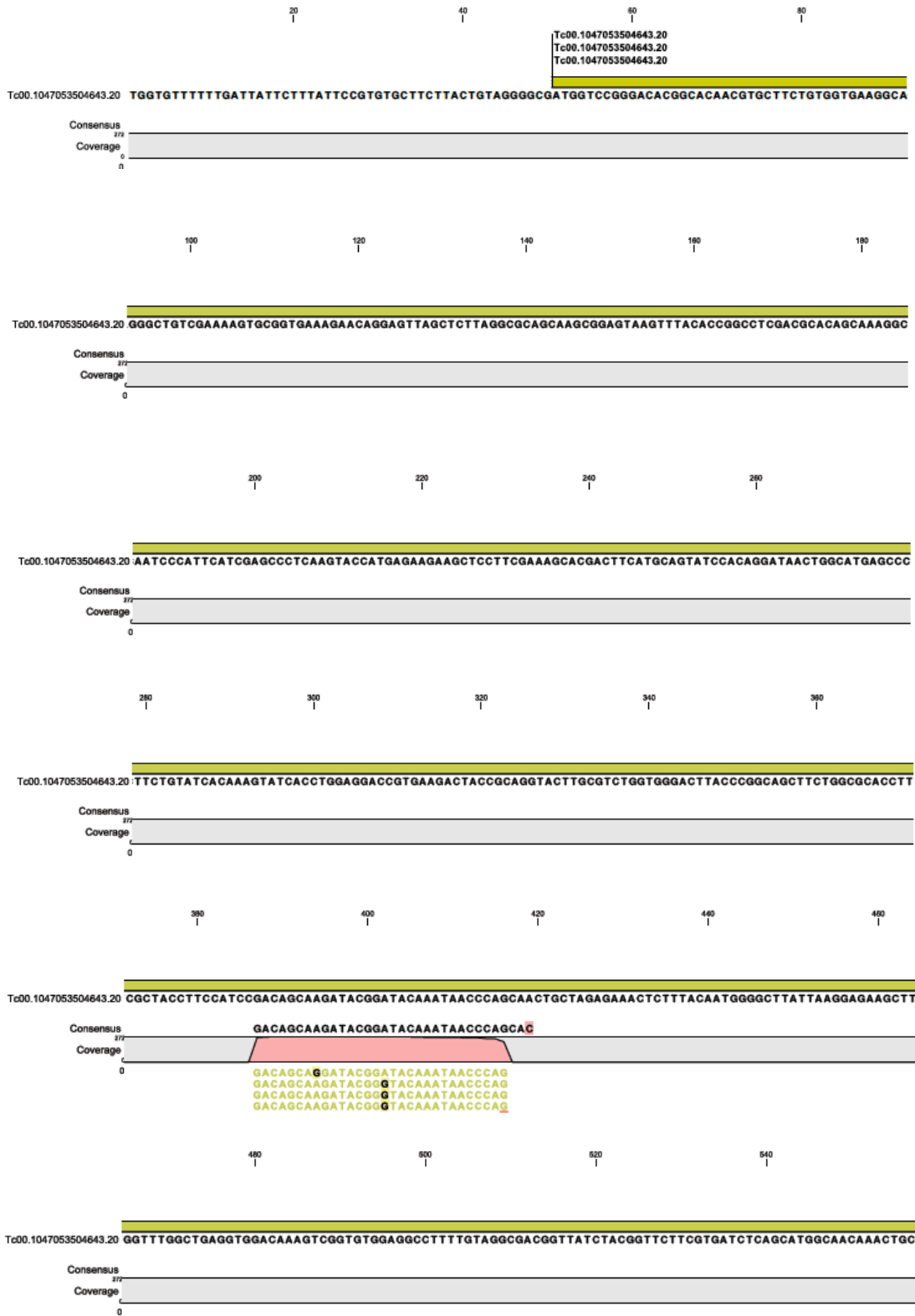
A. TcSOF1

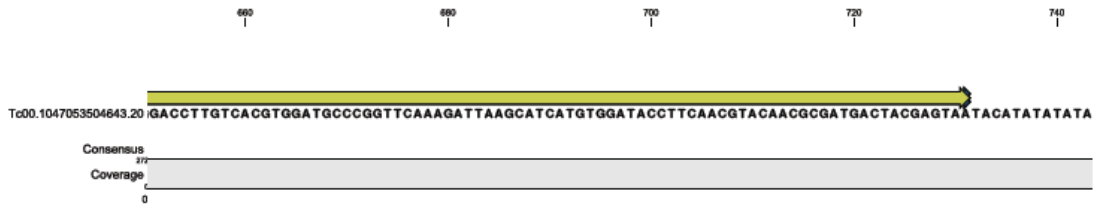
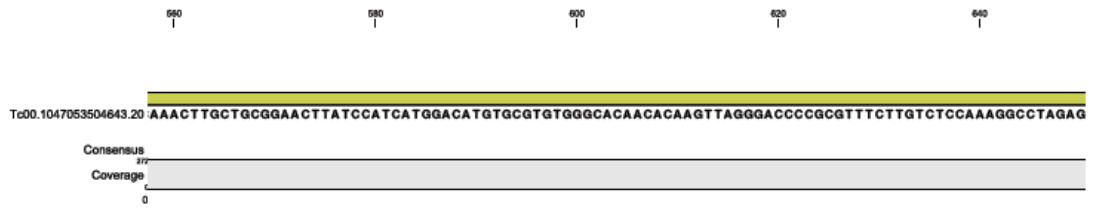






B. TcIMP3





C. TcIMP4

