

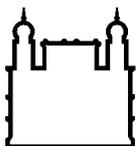
INSTITUTO CARLOS CHAGAS

Mestrado em Biociências

**CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA TcRRM2 DE *Trypanosoma cruzi*:
ENVOLVIMENTO NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA E RESPOSTA A
ESTRESSE**

SHARON DE TOLEDO MARTINS

Curitiba/PR
2012



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

SHARON DE TOLEDO MARTINS

CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA TcRRM2 DE *Trypanosoma cruzi*: ENVOLVIMENTO NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA E RESPOSTA A ESTRESSE

Dissertação apresentada ao Instituto Carlos Chagas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências

Orientadores :Dr Samuel Goldenberg

Dra Lysangela Ronalte Alves

CURITIBA/PR

2012

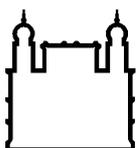
Martins, Sharon de Toledo

Caracterização da proteína TcRRM2 de *Trypanosoma cruzi*: envolvimento na regulação da expressão gênica e resposta a estresse – Curitiba – 2012.
xi, 110 f. II, 30cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Carlos Chagas, Biociências e Biotecnologia, 2012.
Bibliografia: f. 101-109

1. *Trypanosoma cruzi*, 2. Regulação da expressão gênica, 3. Resposta a estresse, 4. TIA1 e TIAR.
I. Caracterização da proteína TcRRM2 de *Trypanosoma cruzi*: envolvimento na regulação da expressão gênica e resposta a estresse

CDD:



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

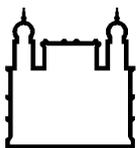
CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA TcRRM2 DE *Trypanosoma cruzi*: ENVOLVIMENTO NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA E RESPOSTA A ESTRESSE

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Sharon de Toledo Martins

Trypanosoma cruzi, o agente etiológico da doença de Chagas, é um organismo amplamente estudado devido a sua importância médica e também por possuir características peculiares que o tornam um bom modelo de estudo para questões biológicas básicas. A repressão de RNAs mensageiros em grânulos citoplasmáticos compostos de complexos mRNA-proteína (mRNPs) é uma importante via de regulação pós transcricional em eucariotos e, recentemente, foi demonstrado que grânulos de RNA estão presentes em *T. cruzi*. TIA1 e TIAR são proteínas envolvidas em splicing, apoptose e regulação pós transcricional, e tem um importante papel na resposta a estresse em eucariotos, já que sob condições de estresse participam da formação de grânulos de estresse citoplasmáticos. TRRM2, uma proteína de *T. cruzi* que possui similaridade com as proteínas TIA humanas, foi escolhida para este estudo. Este trabalho mostra que TRRM2 é expressa ao longo de todas as etapas da metaciclo-gênese do *T. cruzi*, e é conservada em tripanosomatídeos. Esta proteína apresenta uma localização predominantemente nuclear, mesmo sob condições de estresse como ausência de glucose, estresse de temperatura, alterações de PH no meio e tratamento com arsenito de sódio. Verificou-se que TRRM2 não possui o padrão de distribuição de uma proteína TIA canônica, já que a formação de grânulos de estresse contendo esta proteína não foi observada. Entretanto, resultados de ribonômica sugerem que TRRM2 possua um papel importante na regulação da resposta a estresse em *T. cruzi*, já que sua ligação a mRNAs é aumentada durante a condição de estresse nutricional, quando comparada a epimastigotas. Vários mRNAs que se ligam a TRRM2 durante a condição de estresse codificam para proteínas envolvidas em processos metabólicos e mecanismos necessários para a diferenciação do parasita. Estes resultados sugerem que a proteína "TIA-LIKE" de *T. cruzi* possa estar envolvida com uma via de regulação em resposta a estresse que não envolva a formação de grânulos de estresse. A caracterização desta proteína pode ajudar a elucidar melhor os mecanismos de regulação pós transcricional em *T. cruzi*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA TcRRM2 DE *Trypanosoma cruzi*: ENVOLVIMENTO NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA E RESPOSTA A ESTRESSE

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Sharon de Toledo Martins

Trypanosoma cruzi, the etiological agent of Chagas' disease, is widely studied due to its medical importance and particular features that make it an alternative model for basic biological studies. Repression of messenger RNAs in cytoplasmic granules composed of mRNA-protein (mRNP) complexes is an important pathway of posttranscriptional regulation in eukaryotes, and it was recently shown that mRNA granules are present in *T. cruzi*. TIA1/TIAR are proteins involved in splicing, apoptosis and post transcriptional regulation, and play an important role in eukaryote's stress response, since under stress conditions they act in the assembly of cytoplasmic stress granules. TRRM2, a *T. cruzi* protein identified by sequence similarity with human TIA proteins, was chosen for this study. This work shows that this protein is expressed throughout the parasite's life cycle, and that it is conserved among trypanosomatids. This protein shows a mainly nuclear localization, even under stress conditions like glucose starvation, heat, PH changes and sodium arsenite treatment. TRRM2 does not have the distribution pattern of a canonical TIA protein, since the formation of TIA like stress granules is not observed. However, it is interesting noticing that, SOLiD™ sequencing results showed that TRRM2 binds to different subsets of mRNAs under stress conditions, when compared with normally grown epimastigotas. These mRNAs are involved in metabolic pathways and processes needed for differentiation. These results suggest that in *T. cruzi* TIA like proteins may be involved in different stress response pathways, not involving stress granules. The characterization of this protein can help to elucidate the mechanisms of posttranscriptional regulation in *T. cruzi*.

A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família: aos meus pais pela vida, e por sempre incentivarem meus estudos; a minha irmã Samantha por todo o apoio e companheirismo, e ao meu sobrinho Haico por tornar meus dias mais alegres.

Agradeço aos meus orientadores Samuel Goldenberg e Lysangela Ronalte Alves pela confiança em mim depositada e pela enorme contribuição em minha formação como cientista durante o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os colegas do ICC e do Laboratório de Regulação da Expressão gênica que auxiliaram direta ou indiretamente neste trabalho, pelo auxílio e também pelo companheirismo e convivência agradável. A Mariana Serpeloni e Haruo Inoue pelos esforços conjuntos na padronização da lise para a espectrometria de massas; ao Rafael Kessler pelo auxílio nos experimentos de citometria de fluxo; ao pesquisador Maurilio J. Soares pelo auxílio com os experimentos de microscopia eletrônica e a Lysangela Alves pela análise dos dados de seqüenciamento de RNA.

Ao pessoal do preparo pelo apoio técnico sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

A Fabíola Holetz pela revisão criteriosa deste trabalho.

Aos amigos verdadeiros que de perto ou de longe compartilharam alegrias e me ajudaram a seguir em frente nos momentos difíceis, e ao meu namorado Gustavo por todo o carinho apoio e paciência.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - CICLO DE VIDA DO <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
FIGURA 1.2 – Exemplo dos principais pontos de controle da expressão gênica em tripanosomatídeos.	4
FIGURA 1.3 - Demonstração dos diferentes tipos de domínios protéicos encontrados em proteínas de ligação a RNA.....	6
FIGURA 1.4 - Desenho esquemático representando o funcionamento dos regulons pós transcricionais	9
FIGURA 1.5- Interação entre grânulos de estresse, polisomos e “P-bodies” no controle da expressão gênica em eucariotos.	13
FIGURA 3.1 – Esquema da recombinação mediada pela enzima BP Clonase.	22
FIGURA 3.2 – Esquema da recombinação mediada pela enzima LR Clonase.	22
FIGURA 4.1 – Alinhamentos de sequencia primária de TcRRM2 contra sequências de Homo sapiens	37
FIGURA 4.2 – Testes do anticorpo anti- TIA humana contra o extrato de <i>T. cruzi</i> e a proteína recombinante TcRRM2.....	38
FIGURA 4.3 – Alinhamento das sequencias de proteínas TcRRM2e TIA1 e delimitação dos domínios funcionais.....	40
FIGURA 4.4 - Alinhamento das sequências dos ortólogos de TcRRM2 em outros tripanosomatídeos.	41
FIGURA 4.5– Identificação de sequências similares a TcRRM2 em outros tripanosomatídeos ..	42
FIGURA 4.6 – Reconhecimento de uma proteína similar a TcRRM2 em extrato de <i>T. brucei</i>	42
FIGURA 4.7 Imunolocalização do ortólogo em <i>T. brucei</i> de TcRRM2.....	43
FIGURA 4.8- Padrão de reconhecimento do soro anti-TcRRM2 produzido no trabalho prévio. 43	
FIGURA 4.9- Expressão e purificação da proteína recombinante TcRRM2	44
FIGURA 4.10- Teste do antisoro policlonal α TcRRM2	45
FIGURA 4.11 – Teste dos soros purificados	45
FIGURA 4.12 – Perfil eletroforetico dos amplicons obtidos através de PCR de colônia de bactérias transformadas com pTcTAPN/ TRRM2	46
FIGURA 4.13- Alinhamento entre o fragmento seqüenciado a partir do vetor de entrada e TcRRM2	46
FIGURA 4.14 - Perfil eletroforético dos amplicons obtidos a partir de PCR de colônia (A) e PCR de minipreparação (B)	48

FIGURA 4.15 – Perfil eletroforetico de Tc47.9 conjugada as etiquetas do vetor TcPRTAPN.	49
FIGURA 4.16 – Perfil eletroforetico de Tc65.180 conjugada as etiquetas do vetor TcPRTAPN. .	49
FIGURA 4.17 – Análise da expressão da proteína TcRRM2 durante a metaciclo gênese do Trypanosoma. cruzi	50
FIGURA 4.18 – Localização subcelular de TcRRM2 durante as etapas da metaciclo gênese	51
FIGURA 4.19 – Localização subcelular de Tc6180 sob diferentes condições de estresse.	53
FIGURA 4.20 – Determinação dos níveis de morte celular em resposta tratamento por arsenito de sódio..	54
FIGURA 4.21 – Análise da preseça da proteína TcRRM2 nas frações de um gradiente de sacarose	56
FIGURA 4.22 – Análise da preseça da proteína TcRRM2 nas frações de um gradiente de sacarose concentrado com TCA/DOC.	56
FIGURA 4.23 – Análise da localização de TcRRM2 através de fracionamento celular.....	57
FIGURA 4.24- Predição de sítios de fosforilação para a proteína TcRRM2.....	58
FIGURA 4.25- Imunolocalização de TcRRM2 por microscopia eletrônica de Transmissão	60
FIGURA 4.26- Localização subcelular de TcRRM2 após tratamento com sinefungina	61
FIGURA 4.27 – Localização subcelular da proteína TcRRM2 em resposta a Actinomicina D	63
FIGURA 4.28 – Análise de localização e função dos mRNAs associados a TcRRM2 durante condições de estresse nutricional.	69
FIGURA 4.29 - Representação esquemática do metabolismo de fontes de carbono em procíclicos de T. brucei	71
FIGURA 4.30 – Regulação de proteínas pertencentes a cadeia respiratória.....	73
FIGURA 4.31 – Representação esquemática da via das pentoses fosfato.	77
FIGURA 4.32 Análise dos alvos associados a retículo endoplasmático.	82
FIGURA 4.33 – Analise de motivos compartilhados nas regiões 3' e 5' UTR dos mRNAs alvos de TcRRM2	86
FIGURA 4.34 – Teste inicial de amplificação das sondas para RT-PCR (transcrição reversa/ reação em cadeia da polimerase) a partir de DNA genômico	87
FIGURA 4.35 Amplificação por RT-PCR de alvos de TcRRM2 identificados na ribonômica.	87
FIGURA 4.36 – Localização subcelular do mRNA de cruzipaína em epimastigotas e em parasitas submetidos a estresse nutricional.....	89
FIGURA 4.37– Purificação dos anticorpos através de incubação com proteína recombinante ..	90

FIGURA 4.38- Comparação entre os resultados de imunoprecipitação utilizando resina de proteína A sepharose e resina de sepharose ativada.....	92
FIGURA 4.39- Análise dos resultados de imunoprecipitação utilizando resina de sepharose ativada em epimastigotas e em parasitas submetidos a estresse nutricional..	92
FIGURA 4.40 – Padrão de distribuição da proteína TcRRM2 após lise com tampão IMP1.....	95
FIGURA 4.41 – Distribuição das proteínas TcRRM2 e Tc47.9 nas frações de sobrenadante e precipitado após enriquecimento da fração nuclear e lise hipotônica.	95
FIGURA 4.42 – Tentativas de solubilização de TcRRM2	95
FIGURA 4.43- Tentativas de solubilização de TcRRM2 com diferentes concentrações de Noct.	95
FIGURA 4.44 – Imunoprecipitação de TcRRM2 utilizando microesferas magnéticas.....	97

LISTA DE TABELAS

TABELA 4.1 LISTAGEM DOS mRNAs MAIS ASSOCIADOS A TcRRM2 EM EPIMASTIGOTAS E DURANTE ESTRESSE NUTRICIONAL	68
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 CICLO DE VIDA DO <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
1.2 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS	3
1.3 PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO A RNA EM EUCARIOTOS.....	5
1.4 PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO A RNA (RBPs) COM DOMÍNIOS RRM.....	7
1.5 RBPs E A REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS.....	8
1.6 OPERONS PÓS TRANSCRICIONAIS.....	9
1.7 REGULONS DE RNA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS.....	10
1.8 GRANULOS DE REPRESSÃO DE RNA E COMPLEXOS mRNA-PROTEÍNA.....	11
1.9 AS PROTEÍNAS TIA1 E TIAR.....	13
1.10 GRANULOS DE REPRESSÃO DE RNA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS	15
1.11 AS PROTEÍNAS TIA-LIKE EM <i>T. cruzi</i>	18
2. OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	19
3. MATERIAL E METODOS	20
3.1 REAGENTES E TAMPÕES.....	20
3.1.1 Procedência dos reagentes utilizados.....	20
3.1.2 Soluções utilizadas	20
3.2 CLONAGEM MOLECULAR UTILIZANDO O SISTEMA GATEWAY®	21
3.2.1 Recombinação com os vetores de destinação pTcPRTAPN	21
3.2.2 Preparo de bactérias cálcio competentes.....	23
3.2.3 Transformação de bactérias cálcio-competentes	23
3.2.4 Busca de clones positivos através de PCR de colônia.	24
3.2.5 Mini preparação de plasmídeos	24
3.2.6 Sequenciamento	24
3.3 OBTENÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS.....	24
3.4 CULTIVO E MANIPULAÇÃO DE <i>T. cruzi</i>	25
3.4.1 Cultivo de <i>T. cruzi</i>	25
3.4.2 Indução de diferentes tipos de estresse e tratamento com drogas	26
3.4.3 Transfecção e seleção de <i>T. cruzi</i>	26
3.4.4 Extratos de <i>T. cruzi</i> para uso em ensaios de <i>western blot</i>	27
3.4.5 Obtenção de DNA genômico de <i>T. cruzi</i>	27
3.5 CITOMETRIA DE FLUXO.	28

3.6	IMUNOENSAIOS	28
3.6.1	Imunolocalização de TcRRM2 por microscopia de fluorescência.	28
3.6.2	Imunolocalização por microscopia eletrônica de transmissão	29
3.7	DETECÇÃO DE mRNAs ATRAVÉS DE ENSAIO DE HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE <i>in situ</i>	30
3.8	FRACIONAMENTO CELULAR	30
3.9	ANÁLISE DO PERFIL DE SEDIMENTAÇÃO DAS PROTEÍNAS EM GRADIENTE DE SACAROSE. .	31
3.9.1	Obtenção das frações do gradiente de sacarose.....	31
3.9.2	Concentração das frações de gradientes de sacarose	32
3.10	ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO	32
3.10.1	Imunoprecipitação para ribonômica utilizando microesferas magnéticas	32
3.10.2	Imunoprecipitação para proteômica utilizando resina de Sepharose ativada	32
3.10.3	Lavagens e eluições das imunoprecipitações.....	33
3.11	PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS PARA O SEQUENCIAMENTO DE RNA UTILIZANDO A PLATAFORMA SOLID.	34
3.11.1	Preparação inicial.....	34
3.11.2	Transcrição reversa – obtenção de cDNA	34
3.11.3	PCR de emulsão.....	35
3.11.4	Seleção de beads positivas	35
3.11.5	Sequenciamento	35
3.11.6	Análises	36
3.12	CONFIRMAÇÃO DOS RESULTADOS DE RIBONÔMICA.	36
3.12.1	Desenho de oligonucleotídeos iniciadores para RT-PCR (<i>Reverse transcription/ Polymerase chain reaction</i>).	36
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1	ANÁLISES DE SEQUÊNCIA DE Tc65180	37
4.1.1	Estrutura de TcRRM2 e similaridade com proteínas TIA1 E TIAR de <i>Homo sapiens</i>	37
4.1.2	Similaridade de sequência de TcRRM2 com proteínas de outros tripanosomatídeos.....	39
4.2	ANTISOROS POLICLONAIS ANTI TcRRM2.....	43
4.2.1	Produção e teste de antisoros	43
4.2.2	Purificação dos antisoros policlonais anti-TcRRM2.....	45
4.3	CLONAGEM DE TcRRM2 NO VETOR DE SUPEREXPRESSIONE pTcTAPN	46
4.4	DETERMINAÇÃO DOS PADRÕES DE TcRRM2 AO LONGO DA METACICLOGÊNESE	50
4.4.1	Análise da expressão da proteína através de ensaio de “western blot”	50
4.4.2	Identificação da localização subcelular de TcRRM2 por microscopia de fluorescência	50
4.5	TESTES DE VIABILIDADE CELULAR EM RESPOSTA AO ARSENITO DE SÓDIO	54
4.6	ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DE TcRRM2 EM GRADIENTES DE SACAROSE	55
4.7	ANÁLISE DE LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE TcRRM2 POR FRACIONAMENTO CELULAR	57

4.8	DEFINIÇÃO DA LOCALIZAÇÃO SUBNUCLEAR DE TcRRM2 por MICROSCOPIA ELETRONICA DE TRANSMISSÃO.	59
4.9	DETERMINAÇÃO DA LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE TcRRM2 EM RESPOSTA AO TRATAMENTO COM SINEFUNGINA.....	61
4.10	DETERMINAÇÃO DA LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE TcRRM2 APÓS TRATAMENTO COM ACTINOMICINA D.....	62
4.11	IDENTIFICAÇÃO DE mRNAs ALVO DE TcRRM2 POR SEQUENCIAMENTO EM LARGA ESCALA.....	64
4.12	ANÁLISE DOS ALVOS DE Tc65180 RELACIONADOS A METABOLISMO ENERGÉTICO: MITOCÔNDRIA, CLOROPLASTO E CITOSOL.....	70
4.12.1	Alvos envolvidos em metabolismo energético: visão geral.....	70
4.12.2	Análise de alvos relacionados à cadeia respiratória.....	73
4.12.3	Análise de alvos relacionados ao metabolismo de glutamato.....	74
4.12.4	Análise de alvos relacionados ao Ciclo de Krebs.....	75
4.12.5	Análise de alvos relacionados à Via das Pentoses Fosfato (PPP).....	76
4.12.6	Análise de alvos relacionados à resposta a estresse oxidativo.....	77
4.13	ANÁLISE DOS ALVOS DE Tc65180 RELACIONADOS À COMPOSIÇÃO DO FLAGELO.....	79
4.14	ANÁLISE DOS ALVOS DE Tc65180 RELACIONADOS AO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO.....	80
4.15	ANÁLISE DOS ALVOS DE Tc65180 RELACIONADOS AO RESERVOSSOMO.....	83
4.16	IDENTIFICAÇÃO DE MOTIVOS COMPARTILHADOS ENTRE OS mRNAs ASSOCIADOS A TcRRM2.....	85
4.17	CONFIRMAÇÃO DOS mRNAs IDENTIFICADOS NO EXPERIMENTO DE RIBONÔMICA ATRAVÉS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO E RT-PCR.....	86
4.18	_IMUNOLocalização DOS mRNAs ALVO DE TcRRM2 ATRAVÉS DE HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE IN SITU (FISH).....	88
4.19	PURIFICAÇÃO DO ANTISORO ANTI TcRRM2 POR LIGAÇÃO A PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	90
4.20	_ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO UTILIZANDO RESINA DE SEPHAROSE ATIVADA.....	91
4.21	ESTRATEGIAS ALTERNATIVAS DE LISE DE PARASITAS PARA A IMUNOPRECIPITAÇÃO DE TcRRM2.....	93
4.22	IMUNOPRECIPITAÇÃO UTILIZANDO MICROESFERAS MAGNETICAS VISANDO O ISOLAMENTO DE COMPLEXOS PROTEICOS.....	96
5.	CONCLUSÃO.	98
6.	PERSPECTIVAS	100
7.	REFERÊNCIAS	101
8.	ANEXOS	110

1. INTRODUÇÃO

1.1 CICLO DE VIDA DO *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi é um protozoário flagelado pertencente ao reino Protozoa, filo Euglenozoa e ordem kinetoplastida, família tripanosomatidae. A ordem Kinetoplastida é caracterizada pela presença de uma estrutura proeminente denominada cinetoplasto, que corresponde a uma condensação de DNA localizado no interior de uma mitocôndria única que se distribui por todo o protozoário (revisto por DE SOUZA, 2002). Além disso, são observados os glicossomas, organelas semelhantes a peroxissomos onde estão compartimentalizadas várias vias metabólicas, como a via glicolítica (revisto por MICHELS *et al*, 2006). A família Trypanosomatidae contém diversos gêneros, e o gênero *Trypanosoma* se destaca por incluir espécies causadoras de doenças humanas importantes. Além do *T. cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas, os protozoários *Trypanosoma brucei* e as espécies do gênero *Leishmania* possuem grande importância médica por causar a doença do sono, na África e as várias formas de leishmanioses, respectivamente (DUMAS, 2000).

Em seu ciclo de vida na natureza, o *T. cruzi* possui quatro estágios distintos de diferenciação: os estágios amastigota e tripomastigota sanguíneo são encontrados em hospedeiros vertebrados, enquanto epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos se desenvolvem nos insetos vetores (DE SOUZA, 1984). Os hospedeiros do *T. cruzi* em ambiente natural (também chamados reservatórios naturais) consistem geralmente em mamíferos de pequeno porte (como roedores, marsupiais e carnívoros), que não costumam desenvolver nenhum tipo de sintoma devido à infecção. A partir do momento em que houve contato direto do vetor triatomíneo com o homem, iniciou-se uma nova forma de ciclo incluindo o hospedeiro humano, para o qual a infecção por *T. cruzi* tem diversas consequências fisiológicas que em conjunto são denominadas “Doença de Chagas” (revisto por DIAS, 2000).

Desde a descoberta da doença por Carlos Chagas há mais de 100 anos, o *T. cruzi* vem sendo alvo de muitos estudos, porém até hoje não há vacina ou tratamento quimioterápico eficiente para a doença de Chagas. O ciclo da doença apresenta duas fases. Na fase aguda podem ser observadas manifestações de febre, mal estar geral e edemas. Indivíduos que evoluem para a fase crônica podem apresentar manifestações cardíacas ou digestivas (MINTER *et al*, 1973; RASSI, RASSI & LITTLE, 2000). O fato de ser uma doença bastante debilitante e que atinge milhares de pessoas, principalmente na América latina, justifica o grande interesse no estudo deste parasita (<http://apps.who.int/tdr/svc/diseases/chagas>).

Os vetores são insetos hematófagos pertencentes a distintas espécies dentro da subfamília Triatominae (família Reduviidae - ordem Hemiptera), sendo *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma sordida*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* as espécies de maior importância epidemiológica (SHERLOCK, 2000; GARCIA e AZAMBUJA, 2000). A forma clássica ou vetorial da infecção se dá durante o repasto sanguíneo, quando o vetor acaba por eliminar fezes contendo as formas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi*. Os parasitas são internalizados no momento em que o hospedeiro coça o local da picada (criando uma escoriação que facilita a entrada pela pele) ou através do contato com mucosas e membranas conjuntivas. Ao atingir a corrente sanguínea, os parasitas podem infectar células, e são internalizados em vesículas que após a fusão com lisossomos se transformam em vacúolos parasitóforos. Neste compartimento de pH ácido os parasitas se modificam para o estágio amastigota, e após o rompimento da membrana do vacúolo passam a se dividir no citoplasma da célula infectada. Após sucessivas divisões os parasitas transformam-se em tripomastigotas sanguíneos, rompem a célula e são liberados na corrente sanguínea. A partir desta etapa podem então infectar novas células ou ser ingeridos por um inseto que se alimente do sangue do hospedeiro. Quando o inseto ingere o sangue, já em seu estômago, grande parte dos tripomastigotas sanguíneos se transforma em epimastigotas, que migram e se aderem à porção posterior do intestino. Neste ambiente pobre em nutrientes os parasitas passam a sofrer estresse nutricional, o que desencadeia o processo da metaciclogênese (BONALDO, SOUTO-PADRON & DE SOUZA, 1988), transformando os parasitas em tripomastigotas metacíclicos infectivos, completando assim o ciclo (BRENER, 1973; revisto por TYLER e ENGMAN, 2001). O ciclo de vida do *T. cruzi* é demonstrado esquematicamente na Figura 1.1.

Além da forma clássica, existem ainda outras formas importantes de contaminação: através de transfusões com sangue contaminado; contaminação durante o parto, quando o bebê entra em contato com o sangue e as mucosas da mãe; e ainda uma pequena incidência de contaminação por acidentes laboratoriais e transplantes de órgãos (revisto por TEIXEIRA, 2008). Além disso, há também a possibilidade de contaminação alimentar, como ocorrido recentemente no Brasil, quando a contaminação se deu através da ingestão de caldo de cana contaminado com parasitas (STEINDEL *et al*, 2008).

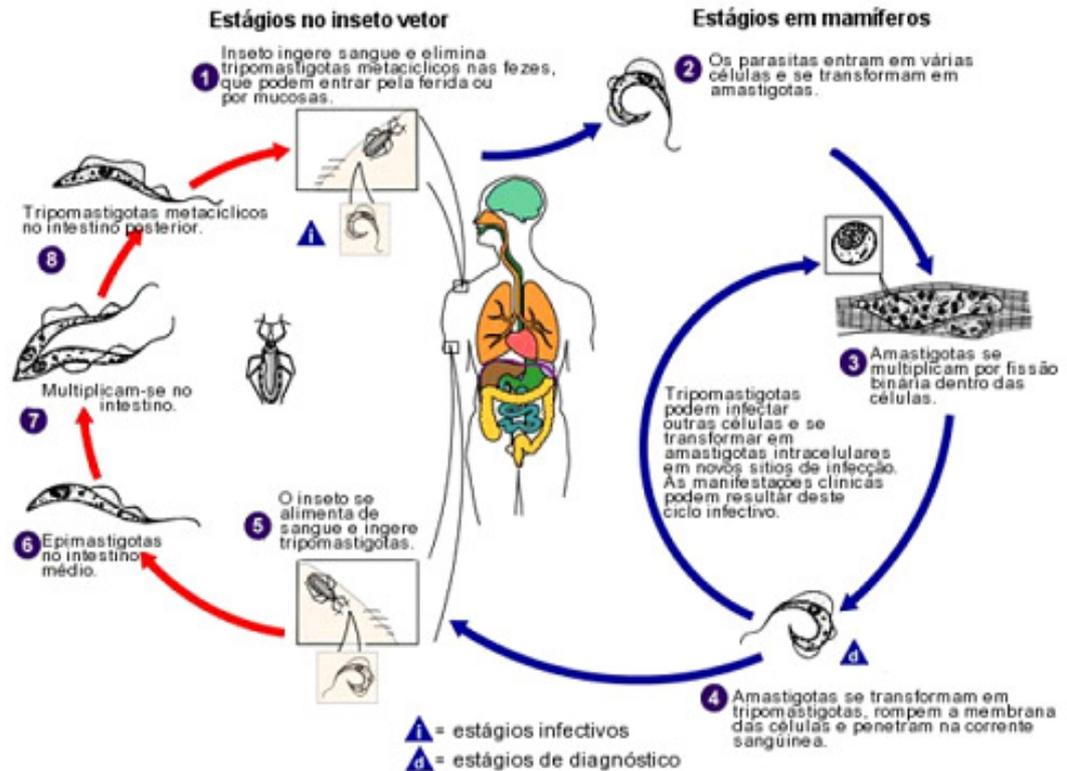


FIGURA 1.1 - CICLO DE VIDA DO *Trypanosoma cruzi*. (modificado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>)

1.2 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS

Existem diversos possíveis pontos de controle na regulação da expressão gênica em tripanosomatídeos comuns a outros eucariotos, além de alguns pontos peculiares. Alguns deles estão exemplificados na figura 1.2.

A transcrição gênica em tripanosomatídeos é bastante peculiar em relação à de outros eucariotos, pois promotores clássicos para a RNA polimerase II não são comuns. Porém, promotores para RNA polimerase I têm sido extensivamente caracterizados, e alguns promotores para a RNA polimerase III já foram identificados. Apesar da maioria dos genes ser transcrita pela RNA polimerase II, existem evidências de que tripanosomatídeos possam realizar transcrição de genes codificadores de proteínas via RNA polimerase I, como é o caso da VSG (“variant surface glycoprotein”) e PARP (“procyclic acid repetitive protein”) de *Trypanosoma brucei* (RUDENKO *et al*, 1991). Acredita-se que a RNA polimerase II nestes organismos tenha uma especificidade muito baixa, e, portanto a etapa de transcrição ocorra indiscriminadamente, gerando grandes pré-mRNAs policistronicos (revisto por GOMEZ *et al*, 2010).

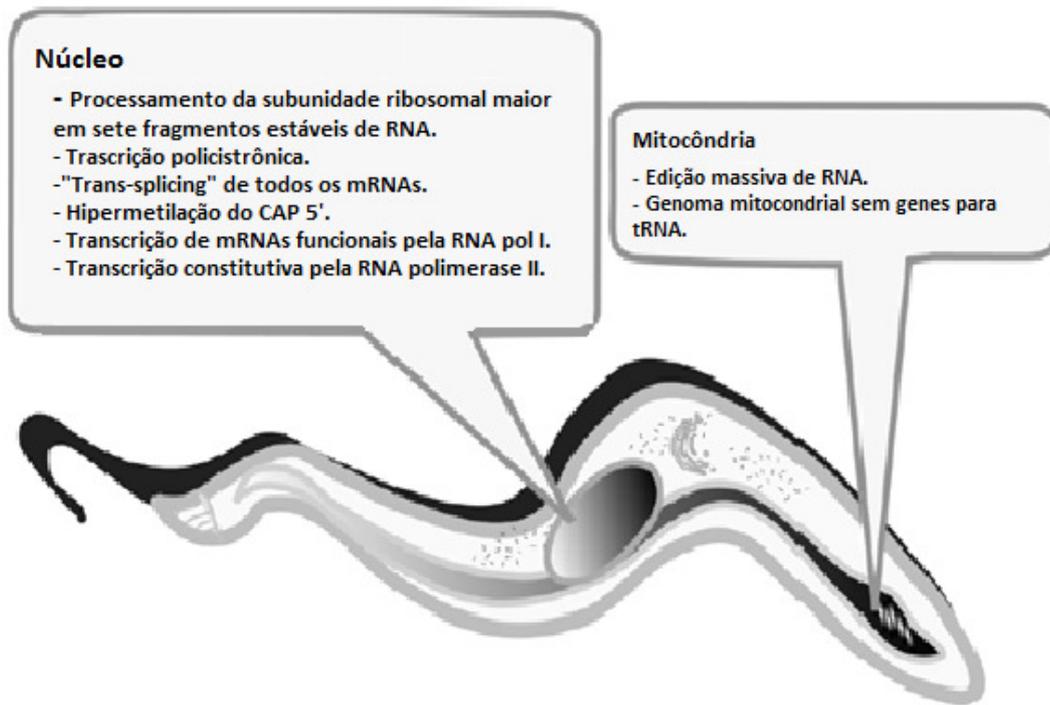


FIGURA 1.2 – Características peculiares do metabolismo de RNA em tripanossomatídeos (modificado de FERNÁNDEZ-MOYA e ESTÉVEZ, 2010).

A ocorrência de íntrons no genoma de tripanossomatídeos é bastante rara (MAIR *et al*, 2000) e os genes são separados por poucas centenas de pares de bases. Além disso, genes próximos fisicamente não são necessariamente relacionados em função. Para originar mRNAs maduros, os transcritos primários policistrônicos sofrem "trans-splicing", que consiste na adição de uma seqüência comum de 39 nucleotídeos à extremidade 5' do mRNA, denominada "spliced leader" (SL) ou mini-exon (PARSONS *et al*, 1984). O "cap" 5' é diferente dos de outros eucariotos, apresentando 4 nucleotídeos altamente modificados além da 7-metilguanossina, e recebe o nome de *cap 4* (BANGS *et al*, 1992). Além disso, os mRNAs maduros possuem sua extremidade 3' poliadenilada.

Na ausência do controle transcricional, a manutenção dos níveis de mRNA na célula é feita através de diversos mecanismos de regulação pós-transcricional. Um importante mecanismo de regulação ocorre através de elementos que se ligam às regiões 3' e 5' não traduzidas (UTR) dos mRNAs (MYUNG *et al*, 2002).

Apesar da regulação de expressão gênica em tripanossomatídeos ser predominantemente pós-transcricional, há evidências de que processos de regulação epigenética também tenham importância nestes parasitas. Assim como nos demais

eucariotos, o DNA de tripanossomatídeos é compactado em nucleossomos e todas as classes de histonas estão presentes. Além disso modificações de histonas como acetilação, metilação e fosforilação já foram descritas em *T. cruzi* e *T. brucei* (revisto por GOMEZ *et al*, 2010).

1.3 PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO A RNA EM EUCARIOTOS

Em eucariotos, as proteínas de ligação a RNA estão envolvidas em vários processos de regulação. Agem desde a regulação da transcrição até os processos de regulação pós-transcricional, como processamento do transcrito primário de RNA mensageiro (splicing e poliadenilação), transporte do mRNA do núcleo para o citoplasma, e estão envolvidas também em processos como a tradução, estabilização e degradação de mRNAs no citoplasma. Além de participarem ativamente nestes processos, as proteínas de ligação a RNA promovem uma interligação entre eles. Problemas em qualquer um dos processos desta complicada cascata de regulação pós-transcricional podem afetar a homeostase celular, e diversas doenças em organismos multicelulares complexos têm origem por falhas nesses processos (revisto por GLISOVIC *et al*, 2008).

Os processos de regulação pós-transcricional em eucariotos evoluíram para um controle cada vez mais preciso e o número de proteínas de ligação a RNA aumentou em paralelo ao aperfeiçoamento destes processos (ANANTHARAMAN, KOONIN & ARAVIND, 2002). Em eucariotos, proteínas de ligação a RNA apresentam uma grande abundância em relação a outras classes de proteínas, enfatizando sua importância na regulação da homeostase celular (MITTAL *et al*, 2009). Além de muito expressas, possuem grande flexibilidade de função dada pela presença de modificações pós-traducionais, como fosforilação, ubiquitinação, metilação de argininas e sumoilação (GLISOVIC *et al*, 2008). Essas modificações podem alterar a afinidade de ligação ao RNA e a localização subcelular destas proteínas.

A expressão de uma proteína de ligação a RNA (“RNA binding protein” ou RBP) é proporcional ao número de alvos controlados por ela. Proteínas que controlam uma grande quantidade de alvos possuem um alto nível de expressão tanto em nível de mRNA quanto em nível de proteína. Além disso, RBPs que controlam um grande número de transcritos costumam ser mais estáveis, pois uma alteração brusca em sua abundância causaria

1.4 PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO A RNA (RBPs) COM DOMÍNIOS RRM

O domínio RRM é um dos domínios protéicos mais abundantes em eucariotos (BATEMAN *et al*, 2002), e geralmente aparece em mais de uma cópia em uma determinada proteína, podendo também aparecer sozinho, ou em conjunto com outros grupos importantes de domínios, como os “zinc finger”, domínios PABP (encontrados na região C-terminal das proteínas de ligação a cauda poli-A), e domínios WW. Através desta plasticidade de configurações de domínios, as proteínas de ligação a RNA podem diversificar suas funções biológicas, além de adquirirem a capacidade de modular, com essas associações, a especificidade e afinidade de ligação ao RNA (revisto por MARIS, DOMINGUEZ & ALLAIN, 2005). Estes domínios são bem caracterizados em eucariotos superiores, e foram observados em outros organismos mantendo funções de regulação, como é o caso das proteínas com estes domínios envolvidas em processamento da região 3’ do mRNA nos cloroplastos de plantas (SCHUSTER & GRUISSEM, 1991).

Os RRM's possuem uma grande importância biológica e proteínas com estes domínios aparecem envolvidas em diversos processos celulares, principalmente naqueles relacionados à regulação pós-transcricional, como processamento do transcrito primário de mRNA, eventos de “splicing” e regulação do “splicing” alternativo, exportação de mRNA do núcleo para o citoplasma, controle da estabilidade e degradação do mRNA, regulação da tradução, e ainda formação do complexo de pré rRNA e edição de RNA (revisto por MARIS, DOMINGUEZ & ALLAIN, 2005).

A combinação de dois ou mais motivos RRM pode aumentar drasticamente a afinidade da ligação da proteína ao alvo, além de permitir o reconhecimento de uma sequência nucleotídica maior quando comparado a capacidade de ligação de um único domínio. Portanto, para que haja o reconhecimento de uma molécula maior de DNA ou RNA é necessário que haja mais de um RRM. Porém, dois domínios adjacentes podem funcionar juntos numa única ligação ou agir separadamente (revisto por MARIS, DOMINGUEZ & ALLAIN, 2005).

Os RRM's são reconhecidos principalmente como domínios de ligação a RNA, pois a primeira proteína com este domínio que teve sua estrutura determinada por cristalografia apresentava a característica de se ligar somente a RNA (OUBRIDGE *et al*, 1994). Porém, estudos recentes demonstram que o domínio é capaz de se ligar também a DNA e proteínas. Não há um padrão geral no reconhecimento de proteínas por domínios RRM, mas o que se sabe é que existem três classes principais de interações proteína-RRM: entre dois RRM's;

entre um RRM ligado a um RNA e a outra proteína que não possua domínios RRM; e finalmente entre o RRM (que não se liga a um RNA) e alguma outra região de uma proteína (revisto por MARIS, DOMINGUEZ & ALLAIN, 2005).

1.5 RBPS E A REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS

As proteínas de ligação a RNA possuem um papel muito importante na regulação da expressão gênica em eucariotos, e são envolvidas em diversos processos como controle da estabilidade, tradução e localização celular de mRNAs, através da associação a elementos *cis* regulatórios presentes principalmente na região 3' dos transcritos.

As RBPs aparecem nos genomas de tripanossomatídeos em grande quantidade, principalmente em comparação aos genomas de outros eucariotos unicelulares (ARCHER *et al*, 2009). Isso é uma evidência da grande importância das RBPs na regulação de expressão gênica destes organismos.

Várias proteínas de ligação a RNA já foram descritas em tripanossomatídeos, apresentando diferentes funções regulatórias e mecanismos de ação. Sabe-se que proteínas como *TcPUF6* (DALLAGIOVANNA *et al*, 2005) e *TcUBP1* (VOLPON *et al*, 2005) estão envolvidas na degradação dos transcritos a elas associados por meio de diferentes mecanismos: *TcUBP1* desestabiliza os transcritos através da interação com a proteína de ligação a cauda poli A (PABP ou “poli A binding protein”), enquanto *TcPUF6* poderia funcionar no recrutamento da maquinaria de degradação para a região 5' do transcrito alvo. Por outro lado, algumas RBPs funcionam como fatores de estabilização dos mRNAs, como é o caso das proteínas *TbDRBD3*, *TbPTB2*, *TbZPF3*, *TbPUF9*, *TbPUF1* e *TbPUF2*. Para as proteínas *TbZPF3* e *TbPUF9* foi sugerido que a estabilização dos mRNAs alvo se dá por competição com fatores de desestabilização, embora os mecanismos de modulação da maioria das RBPs de tripanossomatídeos ainda sejam desconhecidos (revisto por FERNANDEZ-MOYA & ESTEVEZ, 2010).

Há evidências de que *TbDRBD3* e *TbPTB2* estejam também envolvidas no processo de “trans splicing” de alguns mRNAs, pois a depleção destas proteínas gera defeitos no “trans splicing” de alguns transcritos (STEM *et al*, 2009). Esse resultado sugere que uma mesma RBP possa estar envolvida em diferentes mecanismos de regulação pós-transcricional, embora seja difícil determinar se o efeito observado sobre o mecanismo de “trans splicing” é devido a um envolvimento direto da proteína neste processo, ou somente um efeito secundário da depleção (revisto por FERNANDEZ-MOYA & ESTEVEZ, 2010).

Devido à ausência da regulação transcricional eucariótica clássica em tripanossomatídeos, pode-se inferir que as RBPs exerçam nestes organismos o papel regulatório que fatores transcricionais possuem em outros eucariotos. Sabe-se que as RBPs frequentemente se associam a transcritos que codificam proteínas de funções relacionadas, e há evidências de que isso também ocorra em tripanossomatídeos, caracterizando a presença dos mecanismos de regulons e operons pós transcricionais nestes organismos (KEENE, 2007; QUEIROZ *et al*, 2009; OUELLETTE e PAPADOPOULOU, 2009).

1.6 OPERONS PÓS TRANSCRICIONAIS

São chamados de operons ou regulons pós transcricionais os mecanismos pelos quais vários mRNAs são regulados em conjunto por fatores *trans*, que costumam ser proteínas de ligação a RNA, apesar de metabólitos e RNAs não codificantes poderem também funcionar como fatores de regulação. Os mRNAs regulados por meio de operons pós transcricionais são frequentemente relacionados em função (KEENE, 2002; KEENE, 2005).

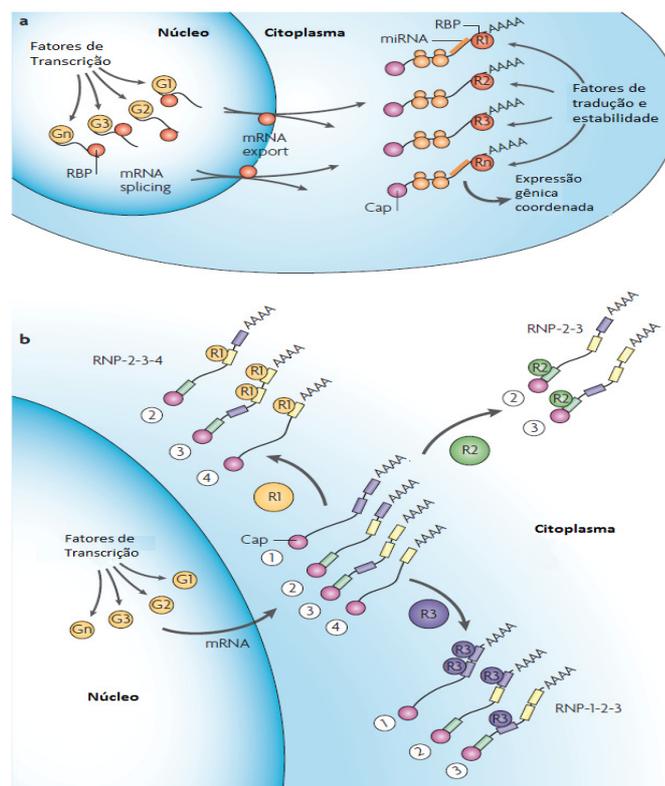


FIGURA 1.4 – Desenho esquemático representando o funcionamento dos regulons pós transcricionais. (modificado de KEENE, 2007)

Um desenho esquemático na Figura 1.4 demonstra que os elementos regulatórios que atuam em *trans* interagem com elementos regulatórios presentes no mRNA alvo

denominados USERS (“untranslated sequence elements for regulation”), através dos quais acontece associação ao mRNP e a regulação de cada mRNA. Os USERS costumam estar posicionados em regiões não codificantes do mRNA (como as regiões 3’ e 5’ UTR), mas podem aparecer também em regiões codificadoras (revisto por KEENE, 2007).

1.7 REGULONS DE RNA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS

Os mecanismos de regulação por operons pós transcricionais já foram bem descritos em células de mamíferos, insetos e leveduras (revisto por KEENE, 2007). Levando em consideração a importância que os mecanismos pós transcricionais possuem na regulação de expressão gênica de tripanossomatídeos, é de se esperar que os regulons estejam presentes nestes organismos, e algumas evidências de sua presença já foram demonstradas (ESTEVEZ, 2008; ARCHER *et al* 2009).

Estudos genômicos recentes em *Trypanosoma brucei* demonstraram a presença de diversos “clusters” de genes co-regulados. Embora muitos dos genes dentro destes “clusters” apresentem funções diversas, uma parte deles apresenta funções relacionadas, e seus padrões de expressão apresentam consistência com o contexto biológico do parasita, como a repressão de proteínas envolvidas com maquinaria traducional durante a transição entre duas formas sanguíneas do *T. brucei* e superexpressão na transição da forma sanguínea para o procíclico (KABANI *et al*, 2009; JENSEN *et al*, 2009; QUEIROZ *et al*, 2009).

Já foi demonstrado que o regulon pode exibir um mecanismo de auto controle, no qual mRNAs que codificam proteínas que fazem parte daquele complexo de regulação, aparecem nos “clusters” junto com os outros mRNAs que estão sendo regulados, tendo sua expressão controlada pelos mesmos elementos (QUEIROZ *et al*, 2009). Parte dessas proteínas auto reguladas são proteínas de ligação a RNA, enfatizando a importância deste grupo na regulação pós-transcricional, já que podem estar envolvidas no controle de expressão de outros genes que fazem parte do regulon (OUELLETTE e PAPADOPOULOS, 2009).

A proteína PUF9 de *T. brucei* foi recentemente associada à regulação de mRNAs que contém um heptâmero conservado na região 3’UTR, através do qual ocorre a ligação da proteína ao mRNA. PUF9 promove o controle de um regulon envolvido no processo de replicação em *T. brucei*, estabilizando determinados mRNAs quando o parasita atinge a fase S do ciclo celular (ARCHER *et al*, 2009). Isso demonstra que os mRNAs alvo de um regulon

podem possuir motivos conservados, embora seja difícil determinar se uma região é responsável pela regulação de determinado mRNA, utilizando somente experimentos em larga escala.

1.8 GRANULOS DE REPRESSÃO DE RNA E COMPLEXOS mRNA-PROTEÍNA

Os mRNAs existem nas células eucarióticas em um equilíbrio dinâmico entre a tradução e estados de repressão traducional. Muitos deles são remodelados e reprimidos nos corpos de processamento (“P-bodies”) e grânulos de estresse.

Os “P-bodies” são agregados citoplasmáticos dinâmicos, formados por complexos mRNA-proteínas, que têm sua formação controlada pela disponibilidade de mRNAs não traduzidos livres no citoplasma (TEIXEIRA *et al*, 2005). Estas estruturas funcionam como sítios de repressão de mRNAs que não estão sendo traduzidos, e aparecem em células submetidas ou não a estresse. São também relacionadas a degradação, já que em sua composição apresentam mRNAs complexados com proteínas envolvidas com a maquinaria de remoção de “cap” (COUGOT, BABAIKO e SERAPHIN, 2004). A degradação do mRNA em eucariotos geralmente é iniciada com o encurtamento da cauda poli A, seguida pela remoção do cap 5´ pela ação das enzimas DCP1 e DCP2, o que resulta na degradação 5´-3´ do mRNA pela exonuclease XRN1. Pode ocorrer alternativamente a degradação 3´-5´ do mRNA através do exossomo (FRANKS e LYKKE-ANDERSEN, 2008). Fatores de iniciação da tradução estão ausentes nos “P-bodies”, com exceção da proteína ligante de “cap” eIF4E (FERRAIUOLO, BASAK e DOSKIE; 2005).

Outro exemplo de grânulos citoplasmáticos de repressão de RNA são os grânulos de estresse, descritos pela primeira vez em células de tomate submetidas a choque térmico (NOVER, SCHARF e NEUMANN; 1983). De forma geral, os grânulos de estresse em mamíferos podem ser definidos pela presença de fatores de iniciação da tradução ligados a mRNAs.

Em condições celulares normais, o processo de tradução inicia-se com a formação de um complexo de pré-iniciação na extremidade 5´ de mRNAs que possuem *cap*. Nesse complexo estão presentes vários fatores de iniciação da tradução eucarióticos (eIF-1, eIF-2, eIF-3 e eIF-5), além da subunidade ribossomal 40S. Quando um códon de início da tradução é reconhecido, os fatores de iniciação se dissociam e a subunidade ribossomal 60S associa-se à 40S, formando um ribossomo completo e permitindo que a tradução ocorra. Quando células eucarióticas são expostas a condições adversas como calor, radiação UV ou condições oxidativas, a tradução é reprogramada para que a célula possa resistir ao estresse

de forma mais eficiente e a maioria dos mRNAs são direcionados para estes grânulos (ANDERSON e KEDERSHA, 2002). A formação de grânulos de estresse pode ser dividida em etapas. A primeira etapa seria a fosforilação do eIF-2 por quinases como PKR, PERK, GCN2 e HR1, tornando os complexos de pré-iniciação não funcionais (formando complexos de pré iniciação 48S), e desta forma bloqueando o início da tradução e causando dissociação de polissomos (revisto por HOLCIK e SONENBERG, 2005). Na segunda etapa, ocorre então o início da nucleação dos grânulos de estresse, quando proteínas como TIA1 (considerada marcadora de grânulos de estresse em mamíferos), TTP, FMRP e GBP3 se ligam a RNAs presentes neste complexo 48S formando pequenos grânulos, caracterizando o início da nucleação. Após a sua formação estes pequenos grânulos são unidos pela proteína PABP1, formando estruturas visíveis microscopicamente. Através de interação proteína-proteína, os grânulos de estresse vão se tornando maiores e algumas proteínas que se ligam às proteínas de nucleação têm papéis importantes em outras funções celulares, indicando que essa agregação de proteínas nos grânulos de estresse promove uma integração de outras funções celulares com a via de resposta a estresse. Os mRNAs aprisionados nos grânulos são sujeitos a triagem dentro dessas estruturas, pois se ligam a várias proteínas com afinidade por RNA. Uma das vias de desestabilização dos grânulos ocorre quando a proteína Hsp70 se liga a domínios “prion like” (ricos em glutamina) de algumas proteínas que estruturam os grânulos de estresse (incluindo a TIA-1), bloqueando a agregação destas proteínas, o que promove a dissociação dos grânulos (revisto por ANDERSON & KEDERSHA, 2007).

BALAGOPAL & PARKER (2009) propuseram um modelo para o metabolismo do mRNA citoplasmático em células eucarióticas denominado ciclo do mRNA. Segundo este modelo, o mRNA é submetido a diversos ciclos de tradução. Devido a condições celulares específicas ou a defeitos em algum estágio da tradução, o mRNA que estava sendo traduzido passa a interagir com proteínas repressoras da tradução como DHH1/RCKp54 e Pat1. Estes mRNAs complexados à maquinaria de “decapping” podem seguir para a degradação, se agregar a “P-bodies” ou o complexo mRNP associado a ele pode sofrer um rearranjo no qual a maquinaria de degradação seja substituída por fatores de iniciação da tradução, o que permite que o mRNA volte ao ciclo de tradução. Porém, se os fatores de iniciação da tradução forem limitantes em determinado momento celular, os mRNAs podem se acumular em grânulos de estresse, que tem sua composição variada dependendo do organismo e do tipo de estresse sofrido pela célula. Pode-se inferir uma preferência de determinados

mRNAs pelo acúmulo em “P-bodies”, grânulos de estresse ou polissomos analisando-se a taxa de transferência do mRNA entre estas estruturas.

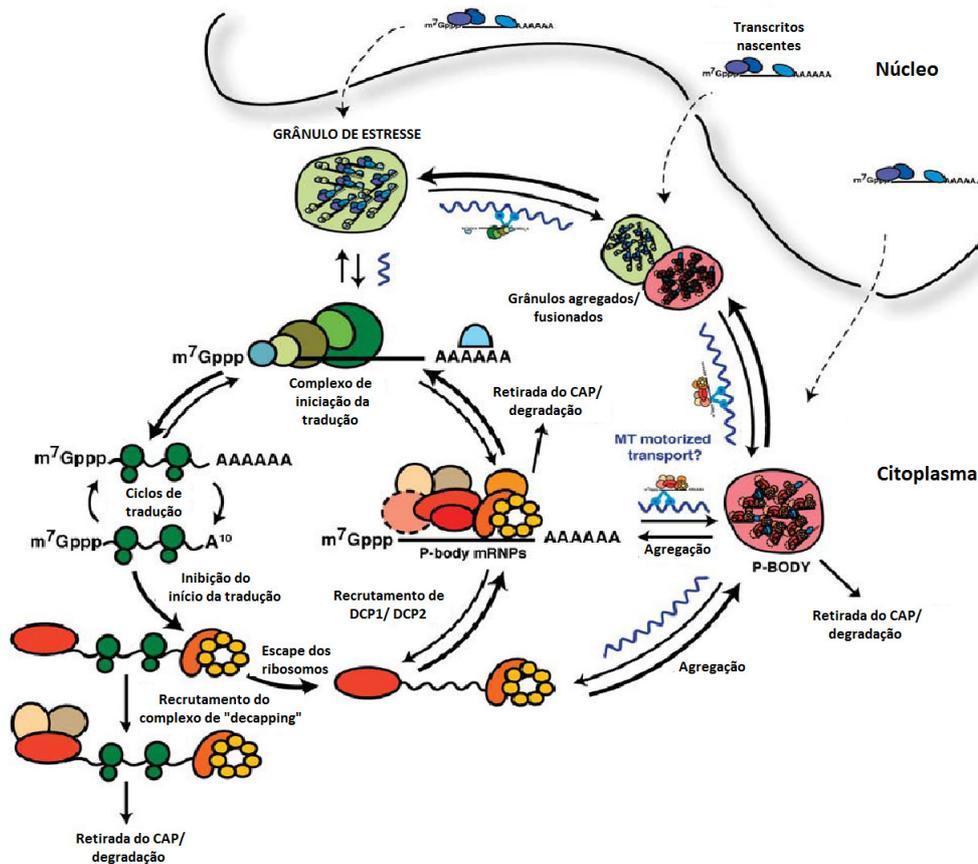


FIGURA 1.5- Interação entre grânulos de estresse, polissomos e “P-bodies” no controle da expressão gênica em eucariotos (adaptado de BALAGOPAL & PARKER, 2009).

1.9 AS PROTEÍNAS TIA1 E TIAR

TIA1 e TIAR são proteínas de ligação a RNA de grande importância em eucariotos superiores, pois estão relacionadas a diversos eventos de regulação da expressão gênica tais como controle de apoptose, “splicing” de pré-mRNAs/controlado do “splicing” alternativo e controle da estabilidade e tradução de mRNAs (revisto por REYES, ALCADE e IZQUIERDO, 2009). Estas proteínas possuem grandes semelhanças estruturais entre si e possuem domínios conservados do tipo RRM, que conferem a elas a capacidade de se ligar a RNA. Ambas possuem duas isoformas, geradas por “splicing” alternativo de seus pré-mRNAs.

Apesar de ambas as proteínas aparecerem concentradas no núcleo de células cultivadas sob condições normais, análise de heterocarion demonstra que estas proteínas

migram constantemente entre o núcleo e o citoplasma (ANDERSON e KEDERSHA, 2002). Sob condições celulares normais, apresentam-se com localização nuclear envolvidas em outras funções que não a resposta a estresse, como “splicing” de pré-mRNAs (LE GUINER et al, 2001). Em diversas condições de estresse essas proteínas acumulam-se em grânulos citoplasmáticos, colocalizando-se com mRNAs que contem cauda poli A (KEDERSHA *et al*, 1999). A necessidade de movimentação entre o núcleo e o citoplasma torna o mecanismo de transporte um fator crítico na disponibilidade das proteínas de “shuttling” para a formação dos grânulos de estresse, sendo a via de transporte um possível alvo de modulação quando há a necessidade de se alterar a velocidade da repressão de mRNA (ANDERSON e KEDERSHA,2007).

TIA1 e TIAR reconhecem preferencialmente regiões de mRNAs ricas em uridina, também denominadas AREs (DEMBER *et al*, 1996), e são capazes de regular a expressão de proteínas codificadas por estes transcritos sem afetar os níveis de transcrição (PIECYK *et al*, 2000). Ensaio de ligação a RNA *in vitro* demonstraram que o primeiro domínio RRM não possui capacidade de ligação aos RNAs alvo. Já o segundo domínio é suficiente para conferir ligação aos elementos ricos em uridinas e o terceiro domínio RRM parece se ligar ao RNA sem necessitar de uma especificidade de sequência (DEMBER *et al*, 1996). Além dos domínios RRM, é descrito um domínio rico em glutamina na região carboxil-terminal destas proteínas, que se assemelha a uma proteína príon (TIAN *et al*, 1991), e confere a essas proteínas as propriedades de auto agregação necessárias para a formação dos grânulos de estresse. Este domínio, quando superexpresso isoladamente, é capaz de se auto agregar e sequestrar proteínas TIA1 e TIAR das células transfectadas, induzindo a formação de grânulos (KEDERSHA *et al*, 1999).

A proteína TIA1 interage com a região 3' UTR de seus mRNAs alvo promovendo a formação de complexos de preiniciação abortivos, impedindo que determinados mRNAs sejam traduzidos (ANDERSON *et al*, 2004). Seu envolvimento na regulação de alguns alvos importantes em células de mamíferos já foi descrito, como na regulação dos mRNAs de TNF α (“tumor necrosis factor alpha”) e de COX-2 (ciclooxigenase 2) (DIXON *et al*, 2003; PIECYK *et al*, 2000). Em situações adversas, a proteína TIA-1 é importante na formação dos grânulos de estresse, devido a suas propriedades de auto agregação (KEDERSHA &ANDERSON,2002).

A proteína TIAR está envolvida na regulação de transcritos contendo AREs através de ligação à região 3'UTR destes transcritos como a metalo-proteínase de matriz humana HMMP13 e o receptor B2 adrenérgico (YU *et al*, 2003; KANDASAMY *et al*, 2005). Análises dos

alvos de TIAR demonstraram que há uma preferência de ligação a alvos contendo sequências ricas em C em sua região 3'UTR (KIM *et al*, 2007). Durante condições de estresse como irradiação por UV, variações de temperatura e estresse oxidativo (KEDERSHA & ANDERSON, 2002) algumas células apresentam grânulos de estresse contendo TIAR, apesar da maioria das células somáticas apresentar a proteína distribuída somente no núcleo em condições celulares normais.

As duas proteínas apresentam diversas similaridades funcionais e estruturais, apesar de estudos com camundongos nocaute demonstrarem efeitos fenotípicos diferentes para cada uma delas. Os mutantes para ambas as proteínas apresentam letalidade bastante elevada (90 a 100% para TIAR e 50% para TIA1). Porém somente os mutantes sem a proteína TIAR apresentam infertilidade e problemas na gametogênese, aparentemente porque a ausência de TIAR causa problemas no desenvolvimento de células germinativas primordiais. Os embriões nocaute para TIA1 e TIAR não chegam nem a se formar, sugerindo que a presença de pelo menos uma destas proteínas seja essencial para o bom funcionamento celular (Revisto por ANDERSON & KEDERSHA, 2002). Isso sugere que apesar de terem mecanismos de ação parecidos, estas proteínas ainda apresentam uma pequena diferença de função e cada uma delas pode ter maior ou menor importância dependendo das condições ou do tipo celular.

1.10 GRANULOS DE REPRESSÃO DE RNA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS

Dados obtidos há mais de vinte anos evidenciam a presença de mRNAs não traduzidos presentes no citoplasma de *T. cruzi*, em outras regiões além dos polissomos (GOLDENBERG *et al*, 1985). As várias lacunas existentes para o entendimento da regulação da expressão gênica em *T. cruzi* levantam a hipótese de que os grânulos de mRNA sejam importantes sítios de estocagem e/ou degradação dos mRNAs nesse organismo.

Muito se discute sobre a composição e formação de grânulos de repressão de mRNA em tripanossomatídeos. Em *Trypanosoma brucei* foi descrita a formação de grânulos de estresse em resposta a choque térmico severo, o que parece ter uma importância biológica para o parasita, já que a repressão temporária dos mRNAs poderia liberar a maquinaria traducional para a expressão de proteínas de resposta a estresse, como as HSPs (“Heat shock proteins”), a fim de manter a homeostase celular até que o estresse cesse ou o parasita se adapte àquela nova condição ambiental. Estes grânulos parecem conter proteínas de ligação a cauda poli A (PABP1 e 2) e fatores de iniciação da tradução como eIF2 α , eIF3B além de

quatro isoformas da proteína eIF4E. Embora a presença da subunidade ribossomal 40S e do fator de iniciação eIF4G não tenham sido verificadas, estas estruturas parecem se assemelhar bastante aos grânulos de estresse de mamíferos. Após cessar o estresse, estas proteínas restauram sua localização celular normal, o que sugere que este tipo de resposta a estresse seja reversível. A formação destes grânulos é dependente dos mRNAs polissomais, sugerindo um equilíbrio dinâmico entre essas estruturas, já que o tratamento dos parasitas com cicloheximida impede sua formação. Além disso, é necessário um estresse celular para sua formação, e não somente a disponibilidade de mRNAs livres, já que o tratamento com puromicina na ausência de estresse não induz a formação de grânulos (KRAMER *et al*, 2008).

Em *T. cruzi* se observa uma redução no número de polissomos durante condições de estresse nutricional, indicando um provável silenciamento traducional dos mRNAs (HOLETZ *et al*, 2007), e os transcritos são aprisionados em grânulos citoplasmáticos. Porém ainda não se sabe se neste organismo a proteína eIF2 α sofre fosforilação em condições de ausência de glucose, o que seria o passo inicial para a formação de grânulos de estresse genuínos (CASSOLA, 2011). Os grânulos de RNAs já foram descritos em *T. cruzi*: estruturas semelhantes a “P-bodies” presentes em condições celulares normais (HOLETZ *et al*, 2007) e os grânulos de RNA que aparecem em resposta a estresse nutricional, mas não podem ser considerados grânulos de estresse genuínos, visto que não possuem tantas semelhanças constitutivas com grânulos de outros organismos, e por este motivo são chamados “grânulos de mRNA” (CASSOLA *et al*, 2007; HOLETZ *et al*, 2007).

Em 2007, HOLETZ *et al* descreveram a presença de estruturas semelhantes a “P-bodies” em *T. cruzi*, através da caracterização da proteína DHH1 neste modelo experimental. A proteína apresenta localização em grânulos citoplasmáticos, que aumentam em tamanho e em número em condições de estresse nutricional, quando há uma diminuição geral na taxa de tradução de mRNAs. Isso sugere que os grânulos observados sejam compostos por mRNPs que se apresentam fora do ciclo de tradução, e que os mRNAs presentes nestes grânulos sejam provenientes de polissomos. Isso se confirma pela diminuição dos grânulos quando a tradução é inibida por tratamento com cicloheximida (e os mRNAs são aprisionados nos polissomos) e pelo aumento da quantidade e tamanho dos grânulos quando os polissomos são dissociados com puromicina. As proteínas DCP1 e DCP2, importantes na composição dos “P-bodies” de mamíferos e leveduras, não foram identificadas até agora em tripanossomatídeos, embora a atividade enzimática de remoção do “cap” já tenha sido detectada em extratos de tripanosomas (MILONE, WILUSZ e

BELLOFATTO, 2004). Outras duas proteínas identificadas em “P-bodies” de *T. cruzi* são XRNA (MANFUL, FADDA e CLAYTON, 2011) e TcPUF6, sendo que esta se colocaliza parcialmente com estas estruturas. Provavelmente está envolvida na degradação de mRNAs através da interação com complexos de degradação, já que a superexpressão desta proteína faz com que a expressão de seus mRNAs-alvo seja reduzida. Em mamíferos, a proteína PUF6 localiza-se em grânulos de estresse, e em leveduras não há colocalização desta proteína com DHH1, sugerindo que as estruturas semelhantes a “P-bodies” encontradas em *T. cruzi* tenham composição e funcionamento diferente do descrito em outros eucariotos (DALLAGIOVANNA *et al* 2008).

Outro tipo de estrutura caracterizada em *T. cruzi* são os “Grânulos de mRNA” formados em resposta a ausência de glucose. Durante o estresse nutricional, acumulam-se nos “grânulos de mRNA” de *T. cruzi* alguns marcadores de grânulos de estresse como PABP1, PABP2 e eIF4E, além das proteínas XRNA e DHH1, características de “P-bodies”. Além disso, aparecem diversas proteínas de ligação a RNA como UBP1, UBP2, RBP3, RBP4, RBP5a e RBP5b. Porém subunidades ribossômicas estão ausentes, assim como a proteína eIF4G, indicando que os transcritos acumulados nestes grânulos podem não se originar de complexos abortivos de pré-iniciação, que seria de se esperar na formação de grânulos de estresse convencionais. Em condições de estresse nutricional estes grânulos colocalizam-se com a proteína DHH1, embora ainda exista uma fração da proteína livre no citoplasma (revisto por CASSOLA, 2011). O estresse por arsenito de sódio é amplamente utilizado na caracterização de grânulos de estresse em diversos organismos, incluindo células de mamíferos. Porém, em *T. cruzi*, o tratamento por arsenito de sódio parece não induzir a formação de grânulos de estresse (CASSOLA e FRASH, 2009), portanto os grânulos formados em resposta a ausência de glucose são os mais estudados como modelo de estresse para este parasita.

Em 2011, CASSOLA descreveu evidências de que exista um único tipo de grânulo citoplasmático de repressão de mRNA em *T. cruzi*. Foi observado que em condições normais de cultivo a proteína XRNA colocaliza-se parcialmente com a proteína UBP1, enquanto em condições de estresse nutricional a colocalização parece completa. Além disso, em um trabalho anterior o mesmo autor observou uma colocalização completa de grânulos contendo DHH1 com os “grânulos de mRNA” durante estresse, o que sustenta a hipótese de que seriam a mesma estrutura (CASSOLA e FRASH, 2009). Todavia ainda não há um consenso se estas estruturas se formam de maneira independente e se colocalizam em alguns

momentos celulares ou ainda, se seriam uma única estrutura com características particulares, acumulando marcadores de “P-bodies” e grânulos de estresse. O estudo da composição e função destas estruturas é necessário para um melhor entendimento dos mecanismos de regulação da expressão gênica em *T. cruzi*.

1.11 AS PROTEÍNAS TIA-LIKE EM *T. cruzi*

As proteínas TIA1 e TIAR possuem papel importante na regulação pós-transcricional da expressão gênica de diversos eucariotos. Seu mecanismo mais estudado é o que envolve a formação de grânulos citoplasmáticos de resposta a estresse, sendo considerada um marcador destes grânulos em diversos organismos.

A importância da regulação pós-transcricional em *T. cruzi*, a evidência de que grânulos de RNA existam neste organismo, bem como a divergência de opiniões quanto a função e composição destes grânulos levaram a um projeto maior que visa a caracterização dos mecanismos de regulação de mRNAs mediados por complexos mRNP em *T. cruzi*.

Devido à importância central da proteína TIA1 na formação de grânulos de estresse em outros eucariotos, e a ausência de caracterização desta proteína em nosso modelo de estudo, foram realizadas buscas em bancos de dados de *T. cruzi* por proteínas que pudessem ser semelhantes a TIA1 e TIAR de mamíferos. Três destas proteínas com semelhança a TIA1/TIAR foram selecionadas, clonadas através do sistema GATEWAY® e sua caracterização inicial foi realizada. Uma destas três proteínas, Tc65180 (também denominada TcRRM2 de acordo com a nomenclatura proposta por GAUDENZI, FRASCH e CLAYTON em 2005), que demonstrou maior semelhança com as proteínas TIA1 e TIAR de *Homo sapiens*, foi selecionada para uma caracterização mais extensa neste trabalho.

A proteína denominada Tc47.9 neste trabalho (anotada no banco de dados como uma prostaglandina F2 alfa sintase), apesar de não possuir domínios aparentes de ligação a RNA, foi identificada como componente de complexos mRNA-proteína em um trabalho prévio desenvolvido no Instituto Carlos Chagas (ALVES *et al*, 2010). Além disso, o mRNA correspondente a Tc47.9 foi encontrado associado a TcRRM2 durante condição de estresse nutricional, o que enfatiza o interesse nesta proteína. Além da caracterização da proteína TcRRM2, alguns ensaios foram realizados neste trabalho com a proteína Tc47.9, como a obtenção de transfectantes expressando Tc47.9 fusionada a um TAG, e a padronização das imunoprecipitações para os experimentos de proteômica, visando a futura caracterização dos complexos protéicos formados por Tc47.9.

2.OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar as interações moleculares da proteína TcRRM2 com mRNAs sob condições de estresse e avaliar seu papel na regulação da expressão gênica de *T. cruzi*.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

A) Caracterização da proteína TcRRM2

- Análise de similaridade de sequência com proteínas TIA humanas e conservação em outros tripanosomatídeos.
- Verificar a associação da proteína em estudo a polissomos e complexos ribonucleoprotéicos, através de análise do perfil de sedimentação desta proteína em gradiente de sacarose.
- Análise da localização subcelular de TcRRM2 sob diferentes condições de estresse através de microscopia de fluorescência.

B) Caracterização dos complexos mRNP associados a TcRRM2:

- Determinação dos RNAs alvo de TcRRM2 por imunoprecipitação e seqüenciamento em larga escala: comparação entre epimastigotas e parasitas submetidos a estresse nutricional.
- Determinação das proteínas presentes nos mRNPs contendo TcRRM2 através de ensaios de imunoprecipitação e espectrometria de massas.

3. MATERIAL E METODOS

3.1 REAGENTES E TAMPÕES

3.1.1 Procedência dos reagentes utilizados

Amersham-Pharmacia Biotech: CNBr activated sepharose 4B, dNTPs, inibidores de proteases, RNase H.

Amersham Biosciences: Membrana de nitrocelulose.

Amresco: detergente Nonidet® NP-40.

Applied Biosystems: SOLID Top Fragment BC Sequencing kit -BC Frag.Lib., MM50/5

Invitrogen: Acrilamida, anticorpo secundário alexa 488, bis-acrilamida, BP clonase *enzyme mix*, DAPI, DTT, EDTA, gel de acrilamida 6% (NovexR), Inibidor de RNase: RNaseOUT™ ,LR clonase *enzyme mix*, *Platinum Taq* DNA polimerase, kit PureLink™ PCR Micro kit, kit RiboMinus™ Concentration Module, sacarose, SYBR gold.

Merck: ácido clorídrico, cloreto de amônio, cloreto de sódio, etanol absoluto, fosfato de potássio monobásico, fosfato de sódio dibásico, hidróxido de sódio, SDS.

New England Biolabs: Goat anti rabbit IgG magnetic beads

Promega: BCIP, Fosfatase alcalina, KIT Impron-II™ Transcriptase reversa, NBT.

Qiagen: kit, MinElute PCR Purification Kit, QIAprep Spin Miniprep; RNeasy® KIT.

Sigma: ampicilina, β-mercaptoetanol, brometo de etídeo, BSA, canamicina, cicloheximida, DEPC, ficoll, n-propil-galacto, paraformaldeído, poli-L-lisina, proteína A-Sepharose CL-4B, triton x-100, tween 20.

USB: persulfato de amônio.

3.1.2 Soluções utilizadas

Agilent: KIT DNA 100 (Agilent 2100 Bioanalyzer)

Água livre de RNase (DEPC): água ultrapura tratada com DEPC (dietil pirocarbonato), na concentração de 1:1000, por 30 minutos em temperatura ambiente, e em seguida autoclavada por 15 minutos.

AP Buffer (tampão de revelação para fosfatase alcalina): Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM.

Azul de comassie: Comassie R-250 0,1% ; metanol 45% ; ácido acético 10%.

Brometo de Etídio: 5,0 µg/mL de brometo de etídio em água destilada.

Ficoll (estoque 10x): azul de bromofenol 0,21%; xileno cianol FF 0,21%; EDTA 0,2 M pH 8,0; glicerina 50%.

Gel de empilhamento para proteínas: 4,75% de acrilamida 33/0,9%; Tris-HCl 120 mM pH 6,8; SDS 0,1%; persulfato de amônio 0,075%; TEMED 0,07%.

Gel de corrida de proteínas: acrilamida:bisacrilamida 33%:0,9% na concentração necessária de acordo com o tamanho da proteína; Tris-HCl 400 mM pH 8,8; SDS 0,1%; persulfato de amônio 0,075% e TEMED 0,07%.

Ponceau S : Ponceau S Sigma P-3504 0,5%, ácido acético 1%.

Solução de bloqueio para western blot: 5% de leite em pó desnatado em PBS 1X e Tween 0,1%.

Tampão de amostra para proteínas 4x : Tris-HCl 40 mM pH 6,8; SDS 1%; β-mercaptoetanol 2,5%; glicerol 6% e azul de bromofenol 0,005%.

Tampão de eletroporação de *T. cruzi*: NaCl 140 mM, HEPES ácido 25 mM, Na₂HPO₄ 0,74 mM.

Tampão de Lise Hipotônica: Tris-HCl 10 mM pH 7,5; MgCl₂ 10mM, NaCl 10 mM.

Tampão PBS - TWEEN 20: PBS -Tween 20 0,05%.

Tampão PBS - solução de uso (*Phosphate-buffer saline*): KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 1,5 mM, NaHPO₄.7H₂O 4,3 mM; NaCl 137 mM.

Tampão de SDS-page : Tris-base 255 mM, Glicina 192 mM, SDS 1%.

Tampão TBE (Solução estoque 10X): Tris-base 89 mM; Ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM pH 8.0

Tampão de transferência (*western blot*) :Tris-base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%.

TE: Tris Hcl 10mM PH 7,5 e EDTA 1 mM.

Tampão TKM: Tris HCl 10mM PH 7,4 , MgCl₂ 10mM, KCl 300mM

Tampão TKM-P: Tris hcl 10mM PH 7,4 MgCl₂ 2mM KCl 500mM

3.2 CLONAGEM MOLECULAR UTILIZANDO O SISTEMA GATEWAY®

3.2.1 Recombinação com os vetores de destinação pTcPRTAPN

Os genes foram amplificados a partir de 100 ng de DNA genômico de *T. cruzi*, utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). A enzima utilizada foi a *Platinum Taq Polimerase High Fidelity* (Invitrogen), que garante uma boa fidelidade de sequência e possui uma taxa de erro menor que a enzima *Taq Polimerase* convencional,

utilizada no trabalho prévio (MARTINS, 2009) quando a clonagem de TcRRM2 foi feita visando a produção de proteínas recombinantes utilizadas para imunização de animais. Como para este trabalho a clonagem visa a produção das proteínas de interesse fusionadas a uma etiqueta para futuros ensaios de atividade e interação, qualquer alteração na seqüência do gene pode prejudicar a atividade da proteína, portanto a amplificação para clonagem no vetor de entrada foi refeita com uma enzima de alta fidelidade. Os *amplicons* foram purificados com uma solução de 30% PEG 8000/ 30mM MgCl₂ e a recombinação entre os *amplicons* flanqueados por sítios AttB e o vetor de entrada da plataforma Gateway® pDONR™221, mediada pela enzima BP clonase, foi feita de acordo com o manual do fabricante (Invitrogen - Catalogo nos. 12535-019 e 12535-027), e o esquema da recombinação é demonstrado na Figura 3.1.



FIGURA 3.1 – Esquema da recombinação mediada pela enzima BP Clonase. Modificado de: www.invitrogen.com

A partir do inserto clonado no vetor de entrada, foi realizada a recombinação com o vetor pTcTAPN, desenvolvido no Instituto Carlos Chagas por BATISTA *et al* (2010), que foi construído de modo que dois sítios ATTR flanqueassem uma seqüência ccdB, que é substituída pelo inserto de interesse após recombinação com o vetor de entrada, mediada pela enzima LR clonase. O processo de recombinação funciona da mesma maneira que a recombinação entre o vetor de entrada e o vetor de destinação do sistema GATEWAY® (Figura 3.2).



FIGURA 3.2 – Esquema da recombinação mediada pela enzima LR Clonase. Modificado de: www.invitrogen.com.

O vetor pTcTAPN pode ser utilizado para a superexpressão das proteínas de interesse, que são expressas fusionadas a uma etiqueta que pode ser utilizada também para ensaios com estas proteínas. Neste estudo, a clonagem em vetor pTcTAPN visa verificar os

efeitos da superexpressão das proteínas de interesse e gerar uma ferramenta para posterior confirmação dos dados de ribonômica. Será possível utilizar os TAGs para realizar a precipitação dos complexos mRNA proteína contendo TcRRM2 ou Tc47.9 e analisar os complexos através de uma técnica diferente da imunoprecipitação utilizando anticorpos, como forma de confirmação dos resultados já obtidos.

3.2.2 Preparo de bactérias cálcio-competentes

O preparo das bactérias cálcio-competentes para transformação foi realizado segundo SAMBROOK *et al* (2001). Uma colônia de bactéria *E. coli* da cepa DH5 α foi inoculada em 5 mL de meio Luria-Bertani (LB) e incubada sob agitação constante de 220 rpm por 16 horas a 37°C. Foi adicionado 10 mL deste pré-inoculo a 100 mL de LB, e a cultura incubada sob as mesmas condições anteriores até atingir a fase de crescimento exponencial (D.O. de 0,6). A cultura foi centrifugada a 4.000 x *g* por 5 minutos a 4°C e as células foram suspensas em 50 mL (metade do volume original) de solução gelada de CaCl₂ 100 mM em tampão HEPES 10 mM pH 7,0 e mantidas por 30 minutos em gelo. A suspensão foi centrifugada e as células foram ssuspensas em 2 mL (1/50 do volume da cultura original) da solução anterior acrescida de 10% de glicerol. As células foram então mantidas em gelo seco por 2 horas, aliqüotadas e armazenadas a – 70°C.

3.2.3 Transformação de bactérias cálcio-competentes

Os plasmídeos recombinados foram incubados com bactérias *Escherichia coli* cálcio-competentes da cepa DH5 α por 30 minutos a 4°C (0,1 μ g de plasmídeo para 50 μ L de *E.coli*), permitindo a adsorção do DNA na superfície bacteriana. As bactérias foram então submetidas a um choque térmico que permitiu a entrada dos plasmídeos (incubação a 42 °C por três minutos seguida de incubação em gelo por dois minutos). Após este tempo as células foram incubadas sob agitação constante a 37°C com meio de cultura LB sem antibiótico, para que pudessem expressar os genes de resistência aos antibióticos antes de serem colocadas em um meio seletivo sólido com antibióticos específicos para a seleção de cada vetor utilizado (pDONR™221 – canamicina 50 μ g/mL, pDEST™17 – ampicilina 100 μ g/mL, pTcPRTAPN– ampicilina 100 μ g/mL). As placas foram incubadas por 18 horas a 37 °C para o crescimento das colônias.

3.2.4 Busca de clones positivos através de PCR de colônia

A PCR de colônia foi utilizada para verificar se as bactérias transformadas possuíam o DNA de interesse. A amplificação foi feita por Reação em cadeia da polimerase utilizando como base para a amplificação uma alíquota das colônias bacterianas crescidas após a transformação. As reações de PCR foram incubadas por 10 minutos a 94^o C para lisar a parede bacteriana, e o ciclo de PCR após esta etapa prosseguiu com a temperatura de anelamento de 60°C por 30 segundos, e a temperatura de extensão de 72°C por 2 minutos e meio para TcRRM2.

3.2.5 Mini preparação de plasmídeos

O isolamento dos plasmídeos de interesse foi realizado através do método de lise alcalina, utilizando-se o kit *Qiaprep[®] Spin Miniprep Kit (QIAGEN)*. As colônias positivas selecionadas foram inoculadas meio LB líquido com antibióticos específicos e incubadas a 37^o C durante 18 horas sob agitação constante de 200 rpm. Após as culturas serem centrifugadas a 12.000 x g por 1 minuto os plasmídeos foram purificados utilizando-se o kit, segundo as recomendações do fabricante, seguindo-se o protocolo para uso em microcentrífuga. Os plasmídeos foram eluídos em água ultrapura e armazenados a -20°C.

3.2.6 Sequenciamento

Os vetores de entrada contendo os insertos foram seqüenciados para confirmação se as seqüências de interesse apresentavam mutações importantes ou problemas de orientação. O seqüenciamento foi realizado de acordo com as especificações do kit *BigDye™ terminator*, utilizando-se o seqüenciador *Automatic sequencer 3730xl (Applied Biosystems)*, através de serviço prestado pelo Instituto Pasteur Korea.

3.3 OBTENÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS

Dois coelhos foram imunizados com as proteínas recombinantes obtidas e purificadas segundo protocolos estabelecidos em um trabalho prévio (MARTINS, 2009), de modo a se obter antisoros policlonais contra a proteína TcRRM2. As imunizações foram feitas pelo serviço de produção de anticorpos do laboratório de imunologia do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Foi retirada uma alíquota de sangue dos animais antes das inoculações para a obtenção de soro pré-imune, utilizado posteriormente

como controle dos experimentos com o soro imune. Foram realizadas então quatro inoculações de 100µg de proteína, com intervalos de 14 dias entre cada uma delas. Dez dias após a última inoculação o sangue dos animais foi coletado e o soro obtido por centrifugação.

3.4 CULTIVO E MANIPULAÇÃO DE *T. cruzi*

3.4.1 Cultivo de *T. cruzi*

Durante o desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas células do clone Dm28c de *T. cruzi* (CONTRERAS *et al*, 1988; GOLDENBERG *et al*, 1985), obtidas em diferentes etapas do processo de metaciclogênese *in vitro*. Este processo de diferenciação consiste na utilização de um meio quimicamente definido capaz de estimular a metaciclogênese pela simulação das condições encontradas na porção final do intestino do inseto triatomíneo, resultando em parasitas com as mesmas propriedades biológicas encontradas nos parasitas encontrados em seu ambiente natural (CONTRERAS *et al*, 1985). Desta maneira é possível obter parasitas em diferentes etapas de diferenciação celular.

Para a obtenção de parasitas epimastigotas, culturas axênicas de *T. cruzi* foram mantidas através de repique a cada três dias, de modo a se obter parasitas em fase logarítmica de crescimento em 72 e 96 horas de cultivo a 28 °C, conforme a curva de crescimento estabelecida por CAMARGO em 1964. Em cada repique foram feitos inóculos de 10⁶ parasitas por mL de meio LIT (“Liver Infusion Tryptose”), composto de extrato de levedura 15 g/L; fosfato de sódio dibásico a 11,56 g/L; glucose a 2,2 g/L; hemina a 0,02 g/L; infusão de fígado a 5 g/L; KCl a 0,4 g/L; NaCl a 4,4 g/L e triptose a 5 g/L. O pH do meio foi ajustado com HCl para 7,2 e o meio suplementado com 10% de soro fetal bovino. As densidades celulares obtidas foram de aproximadamente 2 a 3 x 10⁷ células/mL em 72 horas e de 5 a 6 x 10⁷ células/mL em 96 horas.

Parasitas no final da fase logarítmica de crescimento foram submetidos a estresse nutricional através da substituição do meio LIT pelo meio TAU (“Triatomine Artificial Urine”), pobre em nutrientes e composto por NaCl 190 mM; KCl 17 mM; tampão fosfato 8 mM pH 6,0; MgCl₂ 2 mM e CaCl₂ 2 mM. Após centrifugação a 7000xg por 5 minutos a 4°C, o meio foi substituído e os parasitas incubados em TAU por duas horas a 28 °C, numa concentração de 5.10⁸ parasitas por mL de TAU (CONTRERAS *et al*, 1985).

Para a obtenção de parasitas em diferenciação, as células submetidas a estresse nutricional foram inoculadas em garrafas de cultivo de 300 cm³ contendo 200 mL de meio

TAU suplementado com ácido L-glutâmico 50 mM; L-prolina 10 mM; ácido L-aspartico 2 mM e glucose 10 mM, também chamado de meio TAU3AAG. Os parasitas foram inoculados na concentração de 5×10^6 células por mL de meio, e incubadas a 28 °C por 24 horas, para que aderissem à parede das garrafas de cultivo. O sobrenadante da cultura foi então desprezado e as formas epimastigotas em diferenciação aderidas à parede da garrafa foram liberadas mecanicamente com o auxílio de vortex (BONALDO *et al*, 1988).

Em outro experimento, os parasitas submetidos a adesão foram mantidos por 96 horas à 28°C. Nestas condições, os parasitas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos, que são liberados no sobrenadante da cultura. Ao final das 96 horas, é possível observar que 80 a 90% das células neste sobrenadante são tripomastigotas metacíclicos (BONALDO *et al*, 1988). Os metacíclicos foram concentrados por centrifugação a 10.000 x g por 10 minutos a 10°C e suspensos em solução de PSG (Na₂HPO₄ 47,46 mM; NaCl 36,32 mM; NaH₂PO₄.H₂O 2,5 mM e glucose 55,5 mM). Seguiu-se então a purificação por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE celulose equilibrada em PBS (DE SOUZA, 1984), para a obtenção de extratos protéicos de tripomastigotas metacíclicos. Para ensaios de imunofluorescência não foi realizada a etapa de purificação.

3.4.2 Indução de diferentes tipos de estresse e tratamento com drogas

Para os experimentos com estresse de pH, o meio LIT foi acidificado com HCl até atingir o pH 5,0 e os parasitas incubados por duas horas nestas condições (GÓES, 2008). Para o estresse de temperatura, os parasitas foram incubados em meio LIT por duas horas a 37°C. Para o estresse induzido por arsenito de sódio foi utilizada a concentração de 1,5mM e 2mM da droga em meio LIT a 28°C, seguido de incubação por tempos variáveis (2, 4, 6, 8 e 10 horas). O tratamento com Actinomicina D foi induzido por 24 horas a 28°C, com adição da droga em meio LIT para que atingisse a concentração de 50 µg/mL (NAZER, VERDÚN & SÁNCHEZ, 2011). O tratamento com sinefungina foi realizado por 30 minutos a 28°C, na concentração de 1 µg/mL (MCNALLY & AGABIAN, 1992).

3.4.3 Transfecção e seleção de *T. cruzi*

Para a transfecção foram utilizados parasitas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento, no total de 10^8 células por experimento. Os parasitas foram centrifugados por 5 minutos a 7000xg, lavados com PBS estéril e suspensos em 1 mL de tampão de eletroporação. Em seguida foram coletados 0,4 mL desta suspensão (referente a 4×10^7

células) e transferidos para cubeta de eletroporação de 0,2 mM, previamente incubada em gelo por 10 minutos. Para cada experimento foram utilizados em média 50 µg de DNA, que foi adicionado às células e a mistura foi incubada por 10 minutos em gelo. A mistura foi submetida à eletroporação com dois pulsos de 450 V e 500 µF em eletroporador GenePulser® Apparatus (Bio-Rad) e mantida por 10 minutos no gelo. Como controle da transfecção foram eletroporadas também células sem DNA. As células foram transferidas para garrafas de cultura de 25 cm³ contendo 10 mL de meio LIT com penicilina e procedeu-se a incubação por 24 horas a 28 °C. Após este período de recuperação, os parasitas foram selecionados através da adição do antibiótico G418 na concentração de 500 µg/mL. Aproximadamente 72 horas após a adição das drogas foi feita uma diluição 1:4 dos parasitas em meio contendo a mesma concentração do antibiótico. As culturas foram cultivadas com repiques regulares até que a cultura controle tivesse seu crescimento inibido totalmente. Após a seleção, foi realizada a curva de crescimento das culturas dos transfectantes, para comparação de crescimento com parasitas selvagens (*Wild-type* - WT). Além disso, foi realizada a análise de possíveis alterações morfológicas e de localização celular das proteínas em resposta a superexpressão.

3.4.4 Extratos de *T. cruzi* para uso em ensaios de *western blot*

Os parasitas foram contados e as culturas separadas para que a concentração final do extrato fosse de 10⁶ parasitas por microlitro de extrato. Os parasitas foram centrifugados a 7000xg por 5 minutos e lavados duas vezes em PBS. A quantidade de 10⁸ parasitas foi suspensa em 75 µl de PBS contendo os inibidores de protease PMSF e E64 nas concentrações finais de 1 mM e 1 µM, respectivamente. Foi adicionado tampão de amostra para proteínas contendo β-mercaptoetanol e após serem vortexados os extratos foram fervidos por 5 minutos. Em seguida foram armazenados a -20°C.

3.4.5 Obtenção de DNA genômico de *T. cruzi*

Para a obtenção de DNA genômico de *T. cruzi* foi utilizado o protocolo descrito por FRAGOSO e GOLDENBERG, 1992. Foram separadas 5 x 10¹⁰ células e centrifugadas a 7.000 x g por 10 minutos. Os parasitas foram lavados em PBS e suspensos em 20 mL de tampão de lise hipotônica, sendo posteriormente lisados pela adição de Nonidet P-40 de concentração final de 1% por 3 minutos a 4°C. Após o enriquecimento dos núcleos por três ciclos de centrifugação a 800 x g por 10 minutos a 4°C, foi realizada a digestão do material com

Proteínase K 100 µg/mL por 12 horas a 37 °C em 5 mL de solução de NaCl 10 mM, EDTA 5 mM, SDS 0,5% e Tris-HCl 10 mM pH 7,6. O DNA resultante desta fração foi purificado com fenol saturado em Tris-base 100 mM e dialisado por três vezes com 20 mL de solução contendo NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,6.

3.5 CITOMETRIA DE FLUXO

A viabilidade celular em resposta ao tratamento com arsenito de sódio foi analisada por citometria de fluxo, através de incubação com iodeto de propídeo, um agente intercalante fluorescente que se liga a DNA. Com esta marcação é possível observar morte celular por necrose, já que o processo leva à permeabilização da membrana, permitindo a internalização do corante, e seu acesso ao núcleo da célula, onde ocorre a marcação. Pelo menos 5×10^6 células foram recuperadas por centrifugação a 7.000 x g e lavadas em PBS. A seguir, os parasitas foram incubados com o corante na concentração de 0,5 µg/mL por 15 minutos a 28°C. Os parasitas foram lavados três vezes em PBS e transferidos para tubos de citometria. As amostras foram quantificadas em um citômetro FACSCalibur, e as análises posteriores realizadas no programa WinMDI versão 2.9.

3.6 IMUNOENSAIOS

3.6.1 Imunolocalização de TcRRM2 por microscopia de fluorescência

A localização celular das proteínas estudadas foi verificada através da realização de ensaios de imunofluorescência, utilizando-se parasitas nas condições necessárias para cada experimento (diferentes formas do ciclo de vida, parasitas submetidos a diversos tipos de estresse ou tratados com drogas como a actinomicina D).

As culturas foram centrifugadas a 7000xg por 5 minutos, e os parasitas foram lavados duas vezes com PBS e suspensos em uma solução de paraformaldeído 4%. Após 15 minutos de fixação, foram feitas duas lavagens e os parasitas foram colocados sobre lâminas histológicas (previamente tratadas com poli-L-lisina por 30 minutos) numa concentração de 10^6 parasitas por campo da lâmina, e foram deixados a aderir por 30 minutos. Posteriormente, foi feita a permeabilização dos parasitas com Triton X-100 0,1% por 2 minutos, seguido pela incubação com BSA 1% por 16 horas a 4°C em câmara úmida, visando o bloqueio de sítios de ligação inespecíficos. Foi realizada então a incubação com o antisoro primário na diluição 1:500 (diluído em PBS-BSA 1%.) por uma hora a 37°C. Após a incubação as lâminas foram

lavadas com PBS por três vezes e foi adicionado o anticorpo secundário anti-IgG de coelho, conjugado ao fluoróforo *Alexa 488*, na diluição de 1:400, que foi incubado nas mesmas condições de incubação utilizadas para o anticorpo primário. Após as lavagens do anticorpo secundário as lâminas foram incubadas com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) na diluição 1:1000 em PBS por 10 minutos, e a incubação foi seguida de três lavagens. Após a adição do meio de montagem n-propil-galato foi colocada uma lamínula sobre a lâmina, e o conjunto foi selado com esmalte.

As lâminas foram observadas em microscópio *Nikon E600* e as imagens capturadas com a utilização de câmara CoolSnap (Media Cybernetics). As análises e aquisição de imagens foram feitas com o programa *Image Pro-Plus v. 4.5.1.22* (Media Cybernetics).

3.6.2 Imunolocalização por microscopia eletrônica de transmissão

Para os ensaios de microscopia eletrônica de transmissão, foram utilizados parasitas epimastigotas sob condições normais de cultivo. Após lavagem com PBS os parasitas foram fixados uma solução de glutaraldeído 0,1% e paraformaldeído 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2. Após incubação por 60 minutos em temperatura ambiente os parasitas foram lavados com tampão cacodilato 0,1 M, e submetidos a diversas etapas de desidratação em temperaturas e tempos variáveis: etanol 30% a 4°C por 30 min; etanol 50% a -20°C por 60 min; etanol 70% a -20°C por 60 min; etanol 90% a -20°C por 60 min; e por fim etanol 100% a -20°C por 60 min. Em seguida, o material foi infiltrado em solução de metanol 100% e resina *Lowicryl MonoStep* na proporção de 2:1 e o material incubado a -20°C, por 16 horas. Em seguida, a proporção de metanol foi diminuída, e seguiu-se incubação em solução metanol 100% e resina na proporção 1:1 a -20°C por 16 horas. Após as etapas de infiltração, o material foi emblocado em resina pura e submetido a incubação a -20°C pelo período de 48 a 72 horas sob incidência de luz ultravioleta UVA (360 nm), para que ocorresse a polimerização da resina. As amostras foram então cortadas em um ultramicrotomo Leica modelo M6, de modo a se obter cortes ultrafinos que foram coletados em grades de níquel. Para a marcação das grades com anticorpo de interesse, estas foram incubadas por 30 min em solução de cloreto de amônio 50 mM em PBS. Em seguida as grades foram incubadas por 30 min em solução de bloqueio para imunolocalização e incubadas por 1 hora nesta mesma solução contendo o anticorpo primário diluído 1:20. Após duas lavagens, o material foi incubado por 1 hora com o anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado a partículas de ouro diluído 1:20. Em seguida as grades foram lavadas em solução de bloqueio para imunolocalização e em água

destilada. Finalmente as grades foram contrastadas por 30 min com acetato de uranila (5% em água) e por 2 min em citrato de chumbo e então observadas no Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL modelo 1200EXII de 80 kV (Centro de Microscopia Eletrônica, UFPR).

3.7 DETECÇÃO DE mRNAs ATRAVÉS DE ENSAIO DE HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE *in situ*

O ensaio de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) foi utilizado para a detecção de alguns RNAs mensageiros alvos das proteínas estudadas, de modo a verificar sua distribuição em epimastigotas e em parasitas submetidos a estresse nutricional. O protocolo utilizado para o ensaio de FISH foi adaptado de ZEINER *et al* (2003). As lâminas com regiões delimitadas por teflon foram pré-tratadas com poli-L-lisina por 20 minutos a 37°C, lavadas com água ultrapura e deixadas para secar em temperatura ambiente. Foi separada uma quantidade de parasitas suficiente para se obter 10⁶ células por região da lâmina (em cada uma das regiões uma sonda diferente foi incubada). Os parasitas foram lavados por duas vezes com PBS e posteriormente fixados em solução de paraformaldeído 4%. Após a fixação foram submetidos à adesão na lâmina por 20 minutos, o excesso de parasitas foi retirado e procedeu-se mais uma lavagem com PBS. Seguiu-se então a permeabilização com HCl 0,2 M durante 10 minutos em temperatura ambiente, e após a permeabilização todo o material utilizado foi mantido em condições livres de RNase. Foi realizado um pré-tratamento dos parasitas com um tampão contendo formamida 35% e BSA 0,02% diluídos em SSC 2X. Foram adicionados a este tampão 25 µg de tRNA/mL, 0,98 mg de esperma de salmão (Sigma) por mL e 40 U de *RNaseOUT* (Invitrogen) por mL. A pré incubação se deu durante 30 minutos a 37°C. As sondas conjugadas aos fluoróforos “Cy3” e “Cy5” foram adicionadas ao tampão, na quantidade de 800µg por experimento, e foi realizada uma incubação das lâminas a 65°C durante 3 minutos. Em seguida as lâminas foram incubadas a 37°C por 16 horas para que a hibridização se realizasse. As células foram então lavadas com SSC 2X por duas vezes, SSC 1X por duas vezes e uma vez com PBS. Em seguida os parasitas foram incubadas com DAPI na diluição 1:1000 por 5 minutos (diluído a partir do estoque 1mg/µl). O processo de montagem e observação das lâminas foi realizado como descrito no item 3.6.1

3.8 FRACIONAMENTO CELULAR

Para os experimentos de fracionamento celular foi utilizado um protocolo baseado em ROBERTS *et al* (1998). Foram coletados 2,5 x 10⁸ parasitas epimastigotas sob condições

normais de cultivo e submetidos a diferentes tipos de estresse. As células foram centrifugadas a 6000xg por 5 minutos e então suspensas em 775 µl de tampão de lise hipotônico (Hepes 10 mM pH 7,5; MgCl₂ 1,5 mM, KCl 10 mM; e inibidor de protease EDTA-free - Roche). Em seguida foram incubadas em gelo por 10 minutos. Para a lise, foram adicionados 100 µl de NP-40 10% e as células vortexadas rapidamente. A lise foi acompanhada ao microscópio e interrompida através da adição de 125 µl de solução de sacarose 2M. O material foi centrifugado a 4000xg por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante coletado e o precipitado foi suspenso em volume igual ao sobrenadante, para posterior comparação entre a fração citoplasmática (sobrenadante) e nuclear (precipitado). As frações foram posteriormente submetidas a um ensaio de *western blot* com anticorpo primário anti-TcRRM2 na diluição de 1:500.

3.9 ANÁLISE DO PERFIL DE SEDIMENTAÇÃO DAS PROTEÍNAS EM GRADIENTE DE SACAROSE

3.9.1 Obtenção das frações do gradiente de sacarose

Os ensaios de sedimentação do extrato proteico em gradiente de sacarose foram realizados com parasitas epimastigotas em condições normais de cultivo e submetidos a estresse nutricional, na presença das drogas cicloheximida (que promove a estabilização dos mRNAs nos polissomos) e puomicina (que promove a desestabilização dos polissomos). O protocolo utilizado foi adaptado a partir do protocolo de BRECHT e PARSONS, 1998. Primeiramente foi obtido extrato citoplasmático referente a 10⁹ células submetidas ou não a estresse nutricional em TAU por 2 horas, e tratadas com 100 µg/mL de cicloheximida por 10 minutos em temperatura ambiente, ou com 2 mM de puomicina por 1 hora a 28°C. As células foram centrifugadas a 7000xg por 10 minutos a 4°C e lavadas duas vezes com tampão TKM suplementado com cicloheximida 10 µg/mL ou com TKMP. A lise foi feita com os tampões TKM-cicloheximida e TKMP-puomicina acrescidos de 10% de NP-40, na presença de heparina 10 µg/mL e dos inibidores de protease PMSF 1 mM e E64 10 µM. Após acompanhamento no microscópio, a lise foi parada com sacarose 2M. O material foi centrifugado a 6.000xg por 5 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi recolhido. Os extratos foram adicionados ao topo do gradientes de sacarose 15-55%, preparados com tampão TKM ou TKMP, e submetidos a ultracentrifugação a 59.000 rpm por 2 horas a 4°C. As frações do gradiente foram coletadas utilizando o equipamento ISCO, que separa a amostra em frações de 500µl, traçando um perfil de absorbância em 260nm a medida que a amostra passa pelo

sistema, permitindo a identificação das frações do gradiente. O equipamento funciona através da injeção de sacarose 60% na base do tubo contendo o gradiente e o extrato centrifugado, fazendo com que as frações sejam empurradas até que saiam do sistema e possam ser coletadas. As frações foram submetidas a eletroforese e *western blot*, para verificação do padrão de distribuição da proteína TcRRM2 no gradiente.

3.9.2 Concentração das frações de gradientes de sacarose

As amostras de extrato submetidas a separação por centrifugação em gradiente de sacarose foram reunidas em quatro grupos: fração livre de subunidades ribossomais, fração de monossomos, fração polisomal leve e polisomal pesada. Cada fração foi misturada a 1/100 volumes de DOC 2% (deoxicolato de sódio), vortexada e deixada em incubação a 4°C por 30 minutos. Foi adicionado um volume de 1/10 de TCA 100%, e a mistura foi vortexada e incubada por 16 horas a 4°C. As amostras foram então centrifugadas a 15000xg por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi seco em temperatura ambiente e suspenso em 50 µl de tampão de amostra contendo β-mercaptoetanol. As amostras foram analisadas por gel SDS-PAGE e *western blot*.

3.10 ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO

3.10.1 Imunoprecipitação para ribonômica utilizando microesferas magnéticas

Para a imunoprecipitação visando a identificação dos mRNAs associados às proteínas de interesse foram utilizadas microesferas magnéticas (“goat anti rabbit IgG magnetic beads” – *New England Biolabs*). As microesferas foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas com 15 µl do soro ou 150 µl do anticorpo purificado. Os volumes foram ajustados para 150 µl e a mistura incubada a 4°C sob agitação por duas horas. Após a incubação os tubos foram posicionados em um suporte magnético e o sobrenadante contendo anticorpo não ligado às microesferas foi recolhido. Em seguida, as microesferas foram incubadas com o extrato de *T. cruzi* por 1 hora, e seguiram-se as etapas de lavagem e eluição como descrito no item 3.10.3.

3.10.2 Imunoprecipitação para proteômica utilizando resina de Sepharose ativada

A resina de sepharose ativada por CNBr se liga covalentemente a proteínas de maneira inespecífica, portanto a estratégia de imunoprecipitação com o uso de sepharose

ativada só pode ser utilizada com anticorpos purificados, evitando assim a ligação de outras proteínas presentes no soro do animal utilizado para a inoculação, o que poderia diminuir a eficiência de ligação da resina ao anticorpo de interesse por competição. O anticorpo purificado específico para Tc47.9 foi dosado e a quantidade de resina necessária para a ligação ao anticorpo foi pesada, seguindo a proporção de 1 grama de sepharose para cada 3,5mL de gel, sendo que a capacidade de ligação da resina é de 5 a 10mg de proteína por mL de gel. A resina em pó foi pesada em um tubo “ependorf” compatível com experimentos de proteômica, e lavada por três vezes com HCl 1 mM, com centrifugações de um minuto a 600xg entre as lavagens, sendo a última centrifugação “a seco”, para a retirada do máximo volume possível de HCl. A centrifugação de 600xg por um minuto foi utilizada para todas as lavagens durante a preparação da resina. Imediatamente após a ativação da resina com tampão de acoplamento, o anticorpo diluído em 1,5mL do mesmo tampão foi adicionado, e a mistura foi incubada por 16 horas a 4°C sob movimento constante em um agitador orbital. A amostra foi centrifugada nas mesmas condições anteriores e o sobrenadante resina-anticorpo foi recolhido para análise. Em seguida a resina foi incubada com glicina 0,2 M pH 8, de modo a bloquear os sítios da resina onde as proteínas do extrato de *T. cruzi* poderiam se ligar inespecificamente. O bloqueio foi realizado por 16 horas a 4°C em agitador orbital (como a capacidade de ligação da resina é muito alta, a incubação foi feita com um excesso de resina em relação ao anticorpo, o que poderia agravar o problema de ligações inespecíficas. Por esse motivo foi utilizado um tempo longo de bloqueio). O sobrenadante de bloqueio também foi recolhido, e a resina foi lavada com tampão de acoplamento, seguido de uma lavagem com tampão acetato e outra com tampão de acoplamento. A resina foi então utilizada para incubação com o extrato de *T. cruzi*.

3.10.3 Lavagens e eluições das imunoprecipitações

As microesferas contendo os anticorpos conjugados aos complexos de interesse foram lavadas por quatro vezes com o mesmo tampão utilizado para a lise, e entre as lavagens as amostras foram centrifugadas a 600xg por 1 minuto. As proteínas foram eluídas da resina por mudança de pH, utilizando-se para isso 50µl de glicina. O pH de cada eluato foi imediatamente ajustado após a eluição, e as amostras armazenadas a -20°C. A eluição para as imunoprecipitações visando a obtenção de RNAs foi feita com 200µl de tampão RLT contendo β-mercaptoetanol.

3.11 PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS PARA O SEQUENCIAMENTO DE RNA UTILIZANDO A PLATAFORMA SOLiD

3.11.1 Preparação inicial

Os RNAs provenientes da imunoprecipitação, eluídos em tampão RLT, foram purificados utilizando-se o kit *RNeasy* segundo as recomendações do fabricante. Foram utilizados 100 a 500 ng do RNA purificado para cada amostra. Os mRNAs foram incubados com RNase III (1U) por 5 minutos à 37 °C para a obtenção de fragmentos de 150 a 250 nucleotídeos. A reação de fragmentação foi inibida pela adição de água “RNase free”, e as amostras foram imediatamente refrigeradas a 4°C. O kit RiboMinus™ Concentration Module (Invitrogen) foi utilizado para a concentração da amostra, e foi utilizado segundo recomendações do fabricante.

3.11.2 Transcrição reversa – obtenção de cDNA

Após esta etapa de purificação, um adaptador foi ligado à extremidade 3' dos mRNAs, através de uma reação de hibridização por 16 horas a 16°C. Em seguida foi realizada uma reação de transcrição reversa, na qual o adaptador ligado à extremidade 3' funcionou como um oligonucleotídeo iniciador. A fita simples de cDNA gerada nesta etapa foi purificada com o kit *MinElute PCR purification kit* (Qiagen) de acordo com as recomendações do fabricante. O cDNA purificado foi submetido a eletroforese em gel de acrilamida 6% (Novex^R – Invitrogen) por 25 minutos à 180 V. O gel foi corado com o intercalante SYBR Gold por 5 minutos e os fragmentos de 150 a 250 nucleotídeos foram retirados do gel. Os fragmentos retirados do gel receberam dois adaptadores cada um: o adaptador P1 (específico para cada amostra, funcionando como um código de barras para identificá-las na biblioteca de cDNA) e o adaptador P2 (comum entre as amostras). Para a obtenção da biblioteca de cDNA foi feita uma amplificação *in gel*, utilizando P1 e P2 como iniciadores. O cDNA amplificado passou por uma etapa de purificação com o kit *PureLink™ PCR Micro kit* (Invitrogen), utilizado segundo as recomendações do fabricante. As amostras passaram então por uma análise de tamanho e qualidade no equipamento *Agilent 2100 Bioanalyzer*, utilizando o kit *DNA 1000*.

3.11.3 PCR de emulsão

Com o cDNA obtido foi realizada a PCR de emulsão (ePCR), na qual as amostras foram amplificadas de maneira clonal no interior de micropartículas líquidas de uma emulsão. Em teoria, cada micropartícula da emulsão abriga um único fragmento de cDNA que pode ser amplificado por PCR dentro deste microambiente. Os fragmentos amplificados também foram ligados às microesferas de seqüenciamento através do adaptador P1 presente nas amostras. A escala de preparação da PCR em emulsão (ePCR) escolhida foi a “full scale”, que gera entre 150 e 300 milhões de microesferas. Os cDNAs obtidos de todas as amostras foram misturados na etapa de ePCR, gerando uma biblioteca que pode ter até 16 amostras diferentes, todas identificadas por seus adaptadores que funcionam como códigos de barras (adaptador P1).

Cada uma das bibliotecas foi diluída para duas titulações: 0,5 e 1,0 pM. Deste modo, foram feitas duas ePCRs para cada biblioteca, o que permitiu selecionar a titulação que produziu melhores resultados, tanto no que se refere a quantidade de beads quanto à qualidade da sequência.

3.11.4 Seleção de microesferas positivas

Após a ePCR, as microesferas passaram por um processo de enriquecimento a fim de maximizar a quantidade de microesferas P2 positivos, ou seja, que possuísem fragmentos de DNA completos contendo os adaptadores P1, interno e P2. Nesta etapa foram eliminadas as microesferas que não possuísem DNAs de interesse aderidos a elas. A contagem final de microesferas após o enriquecimento foi feita ao microscópio em uma câmara de Neubauer e seguiu-se para o sequenciamento.

3.11.5 Sequenciamento

As lâminas utilizadas pelo sequenciador SOLiD apresentam as configurações *full* (1 poço), *quad* (4 poços) e *octeto* (8 poços). A configuração *quad* permite um número máximo de microesferas de 60 milhões, e foi utilizada neste experimento. O tempo total de sequenciamento foi de aproximadamente 7 dias, sendo que no primeiro dia foi seqüenciado o adaptador com o código de barras e nos últimos 6 dias foram analisados os fragmentos de 50 pb referentes às amostras.

3.11.6 Análises

As análises das sequências geradas pelo sequenciador SOLiD foram realizadas com base no mapeamento das sequências obtidas no genoma de referência utilizando-se o pacote EDGE R (ROBINSON *et al*, 2010).

3.12 CONFIRMAÇÃO DOS RESULTADOS DE RIBONÔMICA

3.12.1 Desenho de oligonucleotídeos iniciadores para RT-PCR (*Reverse transcription/ Polymerase chain reaction*)

Para o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores para amplificação dos genes identificados na ribonômica, foram escolhidas regiões de 150 a 300 pares de base. Inicialmente as sequências dos genes foram obtidas no banco de dados do *website* www.tritrypdb.org. Foram utilizadas as ferramentas *Edit seq* e *primer select* do programa *lasergene* (DNASTAR, Inc) para selecionar regiões de 150 a 300 pares de base, próximas a região 3' *não-traduzida* dos genes de interesse. Foram selecionados iniciadores com temperatura de anelamento próxima a 55°C a fim de facilitar a posterior amplificação dos fragmentos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISES DE SEQUÊNCIA DE TcRRM2

4.1.1 Estrutura de TcRRM2 e similaridade com proteínas TIA1 E TIAR de *Homo sapiens*

Após a identificação de TcRRM2 em banco de dados de *T. cruzi* como uma proteína semelhante a TIA1 e TIAR, foi realizado um alinhamento de confirmação entre TcRRM2 e o banco de dados de proteínas de *Homo sapiens*. Observou-se que as proteínas TIA1 e TIAR em suas 4 isoformas são as proteínas humanas mais similares a TcRRM2, com cobertura de sequência de aproximadamente 40% (Figura 4.1). Apesar da similaridade entre TcRRM2 e as proteínas humanas não ser extremamente alta, foi considerada relevante levando-se em consideração a distância evolutiva entre dois organismos comparados.

Os genes denominados TcRRM2 e Tc47.9 neste trabalho, são apresentados no banco de dados do website www.genedb.org como Tc00.1047053509965.180 e Tc00.1047053506147.9, respectivamente.

Número de acesso	Descrição	Score máx	Score total	Cobertura	Valor de E
NP_071505.2	nucleolisina TIA-1 isoforma p40 isoforma 2 [Homo sapiens]	<u>82.8</u>	82.8	42%	1e-17
NP_071320.2	nucleolisina TIA-1 isoforma p40 isoforma 1 [Homo sapiens]	<u>81.6</u>	81.6	42%	2e-17
NP_003243.1	nucleolisina TIAR isoforma 1 [Homo sapiens]	<u>73.9</u>	73.9	42%	7e-15
NP_001029097.1	nucleolisina TIAR isoforma 2 [Homo sapiens]	<u>68.2</u>	68.2	42%	7e-13
NP_002559.2	proteína ligadora a cauda poli A 1 [Homo sapiens]	<u>63.2</u>	167	52%	4e-11
NP_037418.3	proteína de ligação a RNA putativa 15B [Homo sapiens]	<u>62.8</u>	154	40%	6e-11
NP_112241.2	proteína ligadora a cauda poli A 3 [Homo sapiens]	<u>61.2</u>	117	40%	2e-10
NP_055816.2	proteína de interação com msx-2 [Homo sapiens]	<u>60.1</u>	100	37%	5e-10
NP_001118228.1	proteína semelhante a PABP1 [Homo sapiens]	<u>56.6</u>	164	41%	4e-09
NP_005372.2	nucleolina [Homo sapiens]	<u>56.2</u>	159	41%	6e-09
NP_001129125.1	PABP 4 isoforma 1 [Homo sapiens]	<u>55.5</u>	139	40%	1e-08

FIGURA 4.1 – Comparação de sequência primária de TcRRM2 contra sequências de *Homo sapiens*.

Número de acesso: Número de acesso da referida proteína no banco de dados; **Descrição:** Anotação da proteína em questão; **Score máx:** Número máximo de homologias encontradas; **Score total:** Número total de homologias encontradas; **Cobertura:** Cobertura de sequência da proteína em questão em relação ao modelo de comparação; **Valor de E:** valor estatístico que mede a confiabilidade do alinhamento.

A fim de testar através de uma abordagem experimental a similaridade entre as proteínas TIA humanas e a proteína TcRRM2 de *T. cruzi*, foi realizado um ensaio de “Western blot” utilizando um anticorpo primário anti TIA1 e TIAR humanas, testado contra extrato protéico de *T. cruzi*. Foi analisada também a ligação do anticorpo anti TIA humano à proteína recombinante TcRRM2 expressa em *E. coli*, a mesma utilizada para a obtenção do antisoro policlonal utilizado neste trabalho. Observou-se o reconhecimento da proteína

recombinante TcRRM2 pelo anticorpo anti TIA1/TIAR de *Homo sapiens*. Quando testado contra extrato de *T. cruzi* o anticorpo reconheceu duas proteínas com tamanho aproximado de 80 kDa no extrato protéico de *T. cruzi*, o que condiz com o tamanho aproximado de TcRRM2 (Figura 4.2). O reconhecimento da proteína de *T. cruzi* por um anticorpo produzido contra a proteína humana evidencia a similaridade entre estas proteínas. Este resultado foi a primeira evidência experimental de que TcRRM2 possui similaridade com a proteína TIA humana e, portanto poderia estar envolvida em mecanismos parecidos de regulação da expressão gênica.

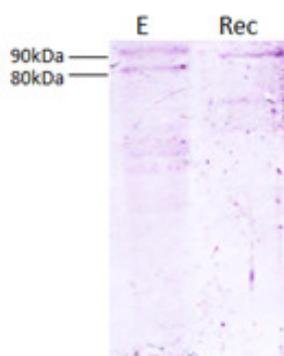


FIGURA 4.2 – Testes do anticorpo anti-TIA humana contra o extrato de *T. cruzi* e a proteína recombinante TcRRM2. E: teste do soro anti TIA humana contra extrato de *T. cruzi*; **Rec:** teste do mesmo soro contra a proteína recombinante de *T. cruzi* TcRRM2.

Foi realizado então o alinhamento de sequências primárias de aminoácidos entre TcRRM2 e umas das isoformas de TIA1 a fim de verificar em quais regiões possuíam maior similaridade. Em **negrito** observa-se os três domínios RRM da TIA1 humana, enquanto em azul escuro estão delimitados os RRM de TcRRM2. Em azul claro estão delimitados os sítios de dimerização de RRM ou de ligação a outras proteínas para ambas. Em vermelho são discriminados os amoniácidos correspondentes aos motivos de ligação a RNA (Figura 4.3).

Observou-se que as regiões de maior semelhança entre as duas proteínas fazem parte dos domínios funcionais de ligação a RNA. Observa-se que na região correspondente ao domínio *prion like* da proteína TIA-1 (em amarelo), responsável pelas propriedades de auto agregação desta proteína, existem grandes regiões não homólogas, o que pode indicar que esta região não seja funcional em TcRRM2, o que dificultaria o envolvimento desta proteína na via tradicional de formação de grânulos citoplasmáticos em resposta a estresse.

FIGURA 4.3 – Alinhamento das sequências de proteínas TcRRM2 e TIA1 e delimitação dos domínios funcionais. Azul claro: sítios de dimerização de RRM; **Azul escuro:** domínios RRM de TcRRM2; **Negrito:** domínios RRM de TIA1. **Vermelho:** motivos de ligação a RNA; **Amarelo:** domínio prion like de TIA1.

4.1.2 Similaridade de sequência de TcRRM2 com proteínas de outros tripanosomatídeos

Através de análise utilizando o banco de dados “orthoMCL” (orthomcl.org), foi realizada busca por ortólogos para TcRRM2 em outros tripanosomatídeos (Figura 4.4). As sequências geradas foram alinhadas através da ferramenta “Clustal W” (THOMPSON, HIGGINS & GIBSON, 1994) e observou-se que diversos parasitas pertencentes a este grupo (*T. brucei*, *T. congolense*, *T. vivax*, *L. major*, *L. infantum*, *L. mexicana* e *L. braziliensis*) possuem proteínas semelhantes a TcRRM2 (Figura 4.5) . A alta conservação desta proteína dentro do grupo é uma evidência de que tenha função importante para estes organismos.

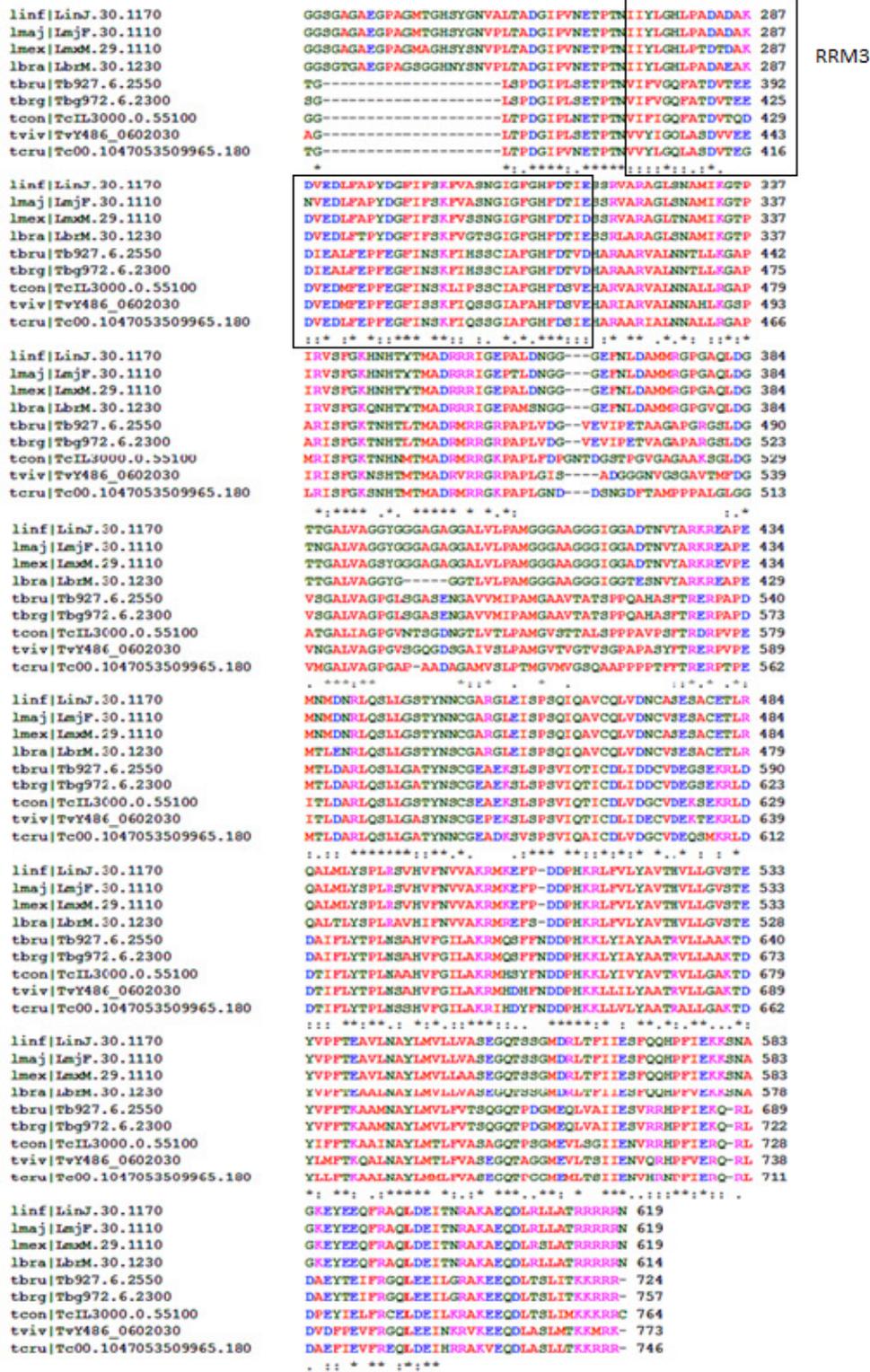


FIGURA 4.4 - Alinhamento das seqüências dos ortólogos de TcRRM2 em outros tripanosomatídeos. As cores delimitam aminoácidos iguais ou funcionalmente semelhantes. Linf: *Leishmania infantum*; Lmaj: *Leishmania major*; Lbra: *Leishmania braziliensis*; Tbru: *Trypanosoma brucei*; Tbrg *Trypanosoma brucei gambiense*; Tcon: *Trypanosoma congolense*; Tviv: *Trypanosoma vivax*; Tcru: *Trypanosoma cruzi*. As seqüências geradas foram alinhadas através da ferramenta "Clustal W" (THOMPSON, HIGGINS & GIBSON, 1994).

Número	Acesso	Táxon	Tam	Descrição
1	lbra LbrM.30.1230	<i>Leishmania braziliensis</i>	614	Proteína de ligação a RNA, putativa
2	linf LinJ.30.1170	<i>Leishmania infantum</i>	619	Proteína de ligação a RNA, putativa
3	lmaj LmjF.30.1110	<i>Leishmania major strain Friedlin</i>	619	Proteína de ligação a RNA, putativa
4	lmex LmxM.29.1110	<i>Leishmania mexicana</i>	619	Proteína de ligação a RNA, putativa
5	tbru Tb427.06.2550	<i>Trypanosoma brucei</i>	724	Proteína de ligação a RNA, putativa
6	tbru Tb927.6.2550	<i>Trypanosoma brucei</i>	724	Proteína de ligação a RNA, putativa
7	tbrg Tbg972.6.2300	<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>	757	Proteína de ligação a RNA, putativa
8	tcon TcIL3000.0.55100	<i>Trypanosoma congolense</i>	764	
9	tcru Tc00.1047053509965.180	<i>Trypanosoma cruzi strain CL Brener</i>	746	Proteína de ligação a RNA, putativa
10	tcru Tc00.1047053509055.10	<i>Trypanosoma cruzi strain CL Brener</i>	347	Proteína de ligação a RNA, putativa
11	tcru Tc00.1047053509053.179	<i>Trypanosoma cruzi strain CL Brener</i>	401	Proteína de ligação a RNA, putativa
12	tvv TvY486_0602030	<i>Trypanosoma vivax</i>	773	Proteína de ligação a RNA, putativa

FIGURA 4.5– Identificação de sequências similares a TcRRM2 em outros tripanosomatídeos. **Acesso:** número de acesso das sequências proteicas no banco de dados; **Taxon:** grupo a que pertence o parasita em questão; **Tam:** tamanho da proteína em aminoácidos; **Descrição:** anotação de função da proteína.

Objetivando confirmar os dados de previsão *in silico* de similaridade entre as proteínas, foram realizados alguns ensaios com o anticorpo produzido contra TcRRM2. Confirmou-se a semelhança entre TcRRM2 e o ortólogo em *T. brucei* através de um ensaio de “Western blot”, onde o anticorpo primário anti TcRRM2 foi testado contra extrato protéico de *T. brucei* onde se observou uma proteína de tamanho esperado que foi reconhecida no extrato de *T. brucei* (Figura 4.6).

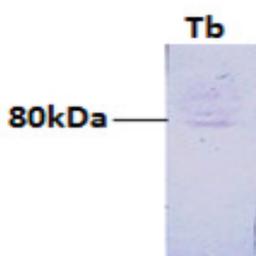


FIGURA 4.6 – Reconhecimento de uma proteína similar a TcRRM2 em extrato de *T. brucei*.

Verificou-se também que a localização subcelular da proteína ortóloga de *T. brucei* é nuclear, semelhante ao padrão observado para TcRRM2, como demonstrado na Figura 4.7. A semelhança entre TcRRM2 e uma proteína de *T. brucei*, que inclusive mantêm a mesma localização subcelular, permite então verificar os efeitos da ausência desta proteína em *T. brucei* através de um *knockdown* por RNA de interferência, já que no modelo experimental *T. cruzi* não é possível realizar este tipo de ensaio. Devido à grande semelhança, estes efeitos funcionais observados poderão ser extrapolados para a proteína de *T. cruzi*.

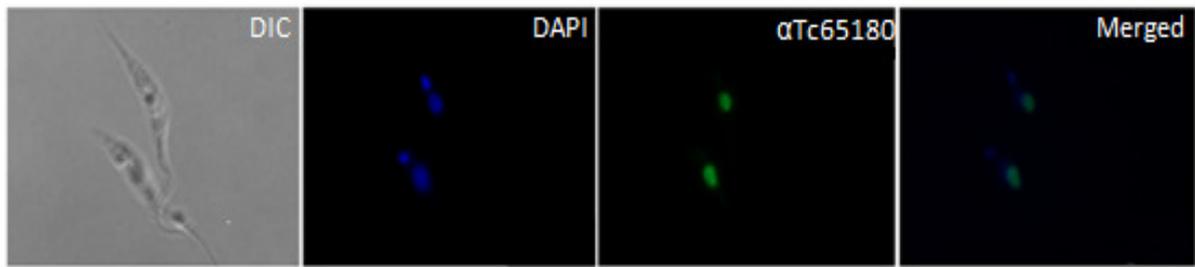


FIGURA 4.7 Imunolocalização do ortólogo em *T. brucei* de TcRRM2. **DIC**: Imagens dos parasitas obtidas através de contraste por interferência diferencial; **αTcRRM2**: visualização da marcação obtida através da incubação dos parasitas com o soro imune anti - proteína TcRRM2; **DAPI**: marcação de DNA presente no núcleo e no cinetoplasto; **MERGED**: sobreposição das marcações provenientes dos soros com a marcação pelo DAPI.

4.2 ANTISOROS POLICLONAIS ANTI TcRRM2

4.2.1 Produção e teste de antisoros

Em um trabalho prévio (MARTINS, 2009), foram produzidos antisoros policlonais em camundongos contra três proteínas de *T. cruzi* com similaridade a TIA1 e TIAR de *Homo sapiens*, incluindo TcRRM2. O anticorpo anti TcRRM2, além de reconhecer a proteína de interesse no extrato de *T. cruzi*, reconhecia também uma proteína um pouco menor, de cerca de 65 kDa, como pode ser observado na Figura 4.8. Diversos ensaios foram realizados objetivando verificar o que seria esta marcação (como “southern blot” e análise por espectrometria de massas) tentando verificar se a marcação de 65 kDa seria uma isoforma da própria proteína ou algum tipo de contaminante no antisoro, Porém nenhuma resposta foi obtida através destes experimentos.

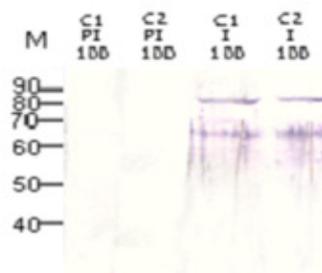


FIGURA 4.8- Padrão de reconhecimento do soro anti-TcRRM2 produzido no trabalho prévio. **C1 e C2**: soros produzidos nos camundongos 1 e 2, respectivamente; **PI e I**: soros pré-ímmunes e ímmunes, respectivamente; **100**: os anticorpos correspondentes foram diluídos na proporção 1:100 para a realização do teste (MARTINS, 2009).

Partiu-se para uma nova purificação de proteínas recombinantes e produção de antisoro policlonal, desta vez em coelhos. As etapas de indução e purificação, demonstradas na figura 4.9, foram realizadas da mesma maneira que no trabalho prévio (MARTINS, 2009).

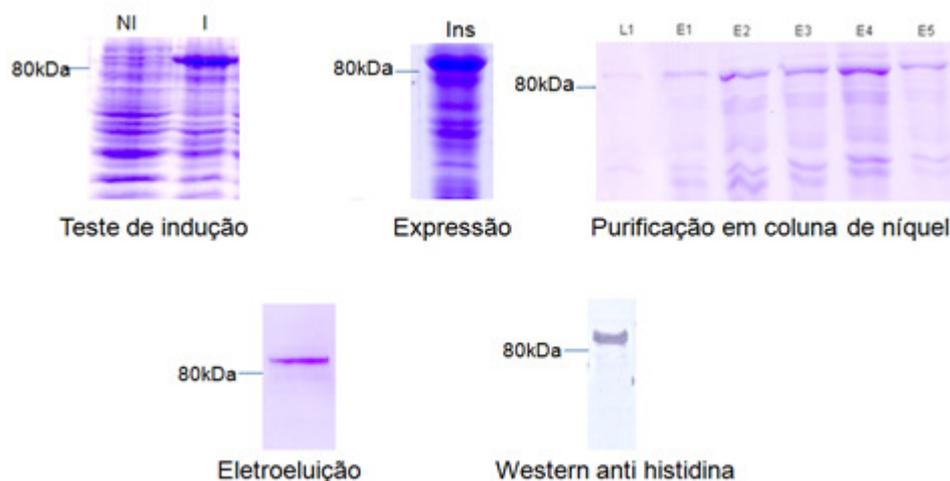


FIGURA 4.9 - Expressão e purificação da proteína recombinante TcRRM2. Teste de indução, verificação da expressão, purificação por cromatografia de afinidade, eletroeluição e confirmação da presença da etiqueta através de “Western blot”. **NI e I:** extratos de bactérias contendo o vetor de expressão, não induzidas e induzidas, respectivamente; **Ins:** extrato induzido correspondente a fração protéica solubilizada com uréia 8M; **L1 /E1 a E5:** frações da purificação por cromatografia de afinidade, correspondentes a lavagem 1 e às eluições 1 a 5, respectivamente;

A reatividade do antisoro policlonal produzido em coelho foi testada contra extrato de *T. cruzi*, e observou-se o reconhecimento específico de um polipeptídeo de 80kDa, predito para TcRRM2 (Figura 4.10). O reconhecimento na região de 50kDa, observado no antisoro produzido anteriormente, não foi observado para o antisoro produzido em coelhos. O soro foi diluído em 1:1000 e 1:2000, e foi observada uma marcação específica em ambos os casos, indicando uma alta titulação do anticorpo. Apesar de específico, a análise de extratos de *T.cruzi* por “Western blot” mostrou reatividade fraca com outros polipeptídeos nos soros imune e pré-imune, havendo, portanto a necessidade de purificação do soro.

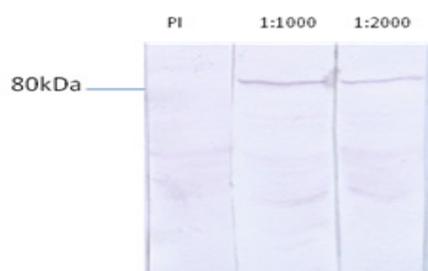


FIGURA 4.10- Teste do antisoro policlonal α TcRRM2. PI: teste do antisoro pré imune; **1:1000 e 1:2000:** teste do antisoro α TcRRM2 nas diluições 1:1000 e 1:2000, respectivamente.

4.2.2 Purificação do antisoro policlonal anti-TcRRM2

Inicialmente o soro produzido em coelhos foi purificado através de adsorção com extrato de *E. coli*, visando retirar anticorpos que pudessem causar uma reação inespecífica. Através da incubação do soro com uma membrana de nitrocelulose contendo proteínas de um extrato bacteriano, foi possível retirar anticorpos eventualmente produzidos contra proteínas de *E.coli* que reconheçam alguma proteína no extrato de *T. cruzi* ou anticorpos provenientes de infecções bacterianas do animal experimental que poderiam causar uma reação cruzada no ensaio de “Western blot” (Figura 4.11).

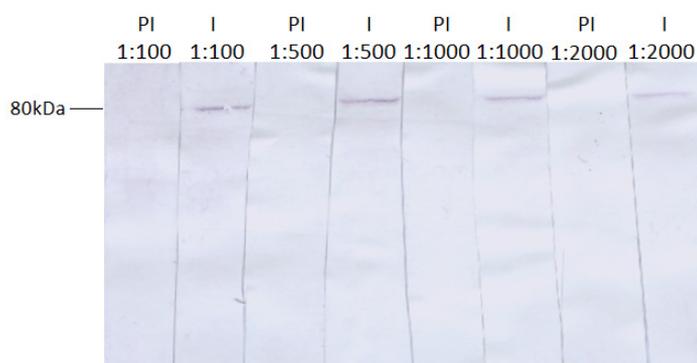


FIGURA 4.11 – Teste dos soros purificados. PI e I: testes correspondentes aos soros pré-ímenes e Imunes, respectivamente; **1:100, 1:500: 1:1000 e 1:2000:** testes do soro purificado α TcRRM2 nas diluições correspondentes a 1:100, 1:500: 1:1000 e 1:2000, respectivamente.

Observou-se que a purificação diminuiu consideravelmente a marcação inespecífica dos soros imune e pré-imune, enquanto a marcação específica foi mantida.

4.3 CLONAGEM DE TcRRM2 NO VETOR DE SUPEREXPRESSIONE pTcTAPN

As proteínas TcRRM2 e Tc47.9 foram clonadas em um vetor de superexpressão produzido no Instituto Carlos Chagas, que permite a expressão das proteínas de interesse associadas à etiqueta “TAP TAG” (“Tandem affinity Purification”), e que permite também a purificação de complexos por outra técnica que não a imunoprecipitação.

Os *amplicons* de interesse foram inicialmente clonados no vetor pDONR™221 através de recombinação BP segundo o manual do sistema GATEWAY® e utilizados para transformar bactérias *E.coli* cálcio-competentes da cepa DH5α. As bactérias transformadas foram crescidas em uma placa de meio sólido seletivo e a recombinação foi testada através de PCR de colônia com iniciadores específicos para TcRRM2, com a utilização de 5 colônias para teste. Foi obtido somente um clone positivo para TcRRM2 (Figura 4.12). Uma colônia correspondente ao clone 1 foi inoculada em meio líquido e deixada crescer por 16 horas, e os plasmídeos foram extraídos das bactérias selecionadas através de minipreparação.

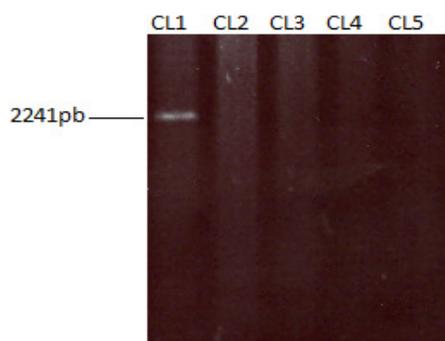


FIGURA 4.12 – Perfil eletroforetico dos amplicons obtidos através de PCR de colônia de bactérias transformadas com pDONR™221 / TcRRM2. CL1, CL2, CL3, CL4 e CL5: correspondem às colônias bacterianas de 1 a 5 testadas por PCR, respectivamente; 2241pb: tamanho em pares de base predito para o amplicon de TRRM2.

Após o isolamento do plasmídeo de interesse, foi realizado o seqüenciamento do vetor pDONR™221 contendo o amplicon de interesse. As seqüências nucleotídicas obtidas foram alinhadas com seqüências do banco de dados “GenBank” através da ferramenta “BlastN”, disponível para uso no site do “National Center of Biotechnology Information” - NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

A seqüência foi inicialmente analisada através da ferramenta “Vecscreen” a fim de se retirar seqüências proveniente de vetores de clonagem que pudessem interferir no alinhamento. Neste caso não foi detectada a presença de vetores e toda a região analisada pertencia ao gene. Foi então utilizada a ferramenta BlastN (ALTSCHUL *et al*, 1990), de modo

a se verificar a similaridade do fragmento a seqüências nucleotídicas de *T. cruzi* disponíveis no banco de dados. Observou-se uma grande semelhança do fragmento seqüenciado com o gene TcRRM2 (Figura 4.13) e o clone 1 foi então utilizado para dar continuidade aos experimentos.

```

_GENE ID: 3552856 Tc00.1047053509965.180 | RNA-binding protein
[Trypanosoma cruzi strain CL Brener] (10 or fewer PubMed links)
Score = 826 bits (447), Expect = 0.0
Identities = 465/474 (98%), Gaps = 0/474 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 1 CGGGGTTTTATTCCACGACCGCCAGGGATGCCACCGCTGCCACCGGCTTTAAAAATACC 60
|||||
Sbjct 24 CGGGGTTTTATTCCACGACCGCCAGGGATGCCACCGCTGCCACCGGCTTTAAAAATACC 83
Query 61 GCGGGCATGACGCCACCGTCGCGCGCCATGCCAGGAATGGCTTCCATGCCACC 120
|||||
Sbjct 84 GCGGGCATGACGCCACCGTCGCGCGCCATGCCAGGAATGGCTTCCATGCCACC 143
Query 121 TAACATGTCGTGTTGGGGCCGCCACAGCCAGAATACAGGTGGGAATGACCGCTCTGC 180
|||||
Sbjct 144 TAACTTGGTGTGTTGGGGCCGCCACAGCCAGAATACAGGTGGGAATGACCGCTCTGC 203
Query 181 CGGTGGTGCGCCGCCCGTGCCTCCCGGTGGATACCCATGCCCGCCAGGTCGTTA 240
|||||
Sbjct 204 TGGTGGCGCGCCGCCCGTGCCTCCCGGTGGATACCCATGCCCGCCAGGTCGTTA 263
Query 241 CCCACAGCCACCTGCTCAC TTGGTCCAAAGACCGCGGGGGACGTGGAACACCGATTCA 300
|||||
Sbjct 264 CCCACAGCCACCTGCTCAC TTGGTCCAAAGACCGCGGGGGACGTGGAACACCGATTCA 323
Query 301 GAATCATCAGCAATGCTTCCGCTGGTCTCGTGGTAACCCAAATGAGATGTATGCGGC 360
|||||
Sbjct 324 GAATCATCAGCAATGCTTCCGCTGGTCTCGTGGTAACCCAAATGAGATGTATGCGGC 383
Query 361 AAGAGATGACACGCCCGCGTGTGTGCCCGGTGCTGATCCGCATGGGTATCCGGCATC 420
|||||
Sbjct 384 AAGAGATGACACGCCCGCGTGTGTGCCCGGTGCTGATCCGCATGGGTATCCGGCATC 443
Query 421 ATCCTACCCCAAGGGCCGTATGGAGGGGCTGTGGACCTGAGGCTGGGGATCA 474
|||||
Sbjct 444 ATCCTACCCCAAGGGCCGTATGGAGGGGCTGTGGACCTGAGGCTGGGGATCA 497

```

FIGURA 4.13- Alinhamento entre o fragmento seqüenciado a partir do vetor de entrada e o gene TcRRM2. **Query:** corresponde à sequencia do fragmento analisado; **Sbjct:** corresponde a sequencia da proteína TcRRM2 disponível no banco de dados. As seqüências nucleotídicas obtidas foram alinhadas com seqüências do banco de dados “GenBank” através da ferramenta “BlastN”, disponível para uso no site do “National Center of Biotechnology Information”

O clone selecionado foi utilizado para recombinação com o vetor de destino pTcTAPN, e a eficiência da recombinação foi testada por PCR de colônia (como descrito em 3.2.4). Das 5 colônias testadas somente uma continha o inserto, e foi selecionada para minipreparação. Após esta etapa, o plasmídeo isolado foi submetido e uma nova PCR e confirmou-se o tamanho esperado de 2241 pares de bases para o inserto. O plasmídeo foi purificado através de midipreparação (Figura 4.14).

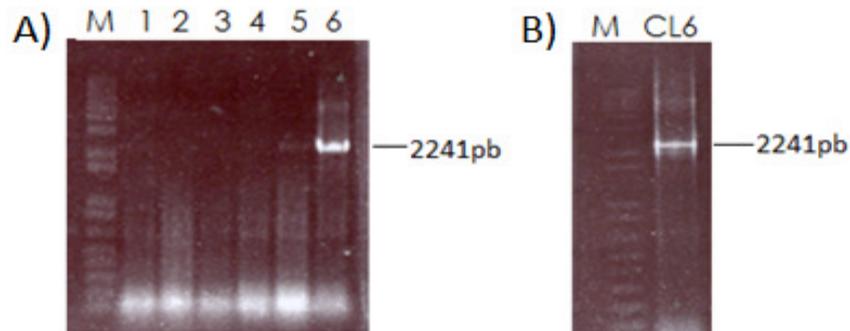


FIGURA 4.14 - Perfil eletroforético dos amplicons obtidos a partir de PCR de colônia (A) e PCR de minipreparação (B). C1, C2, C3, C4, C5, C6: correspondem às colônias bacterianas de 1 a 6 testadas por PCR, respectivamente. **CL6:** PCR a partir do plasmídeo isolado da colônia 6, a única a conter o inserto de interesse. **M:** marcador de peso molecular (*1 Kb plus DNA ladder*, INVITROGEN).

O DNA obtido foi utilizado para a posterior transfecção dos parasitas (como descrito em 3.4.3). Para Tc47.9, o inserto de interesse já havia sido clonado no vetor em um trabalho prévio, portanto foi realizada somente a transfecção e seleção dos parasitas neste trabalho. Após a transfecção e seleção, foram obtidos parasitas expressando as proteínas Tc47.9 e TcRRM2 fusionadas a etiquetas “TAP TAG”, e a confirmação da seleção dos transfectantes foi realizada através de um ensaio de “western blot” comparando extratos de parasitas controle e dos transfectados em relação a presença das proteínas de interesse fusionadas às etiquetas, como demonstrado nas figuras 4.15 e 4.16.

Os parasitas expressando as proteínas modificadas poderão ser utilizados posteriormente para mais uma etapa de confirmação dos resultados de ribonômica, pois através do uso de uma abordagem *in vitro* para confirmação (diferente da abordagem *in vivo* utilizada para os experimentos), a confiabilidade dos resultados é aumentada. Os clones obtidos poderão também ser utilizados para verificar os efeitos da superexpressão das proteínas Tc RRM2 e Tc 47.9 na disponibilidade de seus mRNAs alvo.

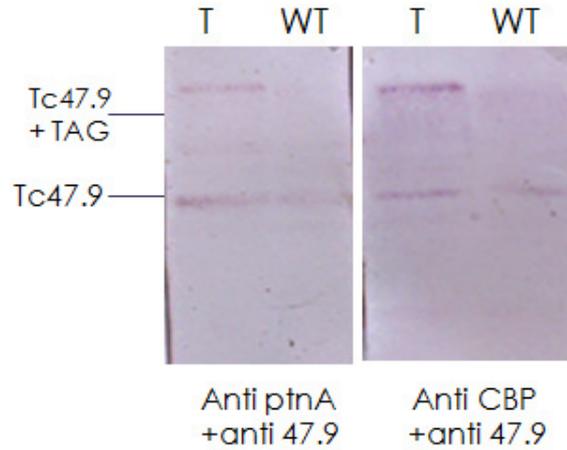


FIGURA 4.15 – Perfil eletroforetico de Tc47.9 conjugada as etiquetas do vetor TcPRTAPN. AntiPTNA + Anti47.9: Membrana incubada com uma mistura do anticorpo específico α Tc47.9 e o anticorpo que reconhece a etiqueta de proteína A, fusionada à proteína expressa; **AntiCBP + Anti47.9:** Membrana incubada com uma mistura do anticorpo específico α Tc47.9 e o anticorpo que reconhece a etiqueta de CBP (“calmodulin-binding peptide”), fusionada à proteína expressa; **T:** canaleta onde foi aplicado extrato do transfectante; **WT:** canaleta onde foi aplicado extrato de parasitas controle.

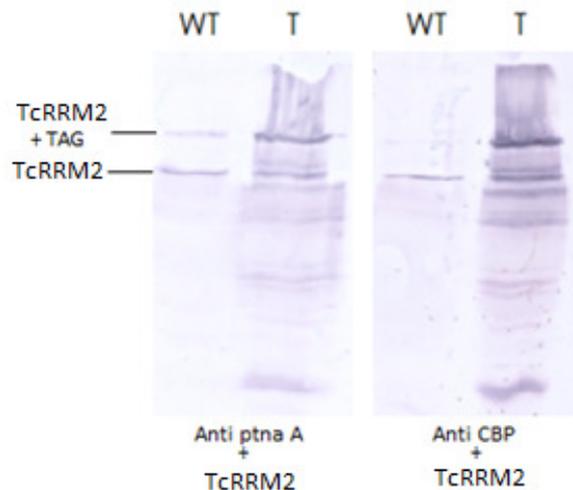


FIGURA 4.16 – Perfil eletroforetico de TcRRM2 conjugada as etiquetas do vetor TcPRTAPN. AntiPTNA + Anti TcRRM2: Membrana incubada com uma mistura do anticorpo específico α Tc65.180 e o anticorpo que reconhece a etiqueta de proteína A, fusionada à proteína expressa; **AntiCBP + Anti TcRRM2:** Membrana incubada com uma mistura do anticorpo específico α TcRRM2 e o anticorpo que reconhece a etiqueta de CBP (“calmodulin-binding peptide”), fusionada à proteína expressa; **T:** canaleta onde foi aplicado extrato do transfectante; **WT:** canaleta onde foi aplicado extrato de parasitas controle.

4.4 DETERMINAÇÃO DOS PADRÕES DE TcRRM2 AO LONGO DA METACICLOGÊNESE

4.4.1 Análise da expressão da proteína através de ensaio de “western blot”

Para a análise dos padrões de expressão de TcRRM2 ao longo da metaciclogênese foram realizados ensaios de “Western blot” utilizando-se extratos correspondentes a 5.10^6 parasitas em diferentes etapas do processo de metaciclogênese. A presença da proteína TcRRM2 foi testada utilizando-se o soro policlonal obtido na diluição de 1:500, para a verificação do padrão de expressão desta proteína, como pode ser observado na figura 4.17.

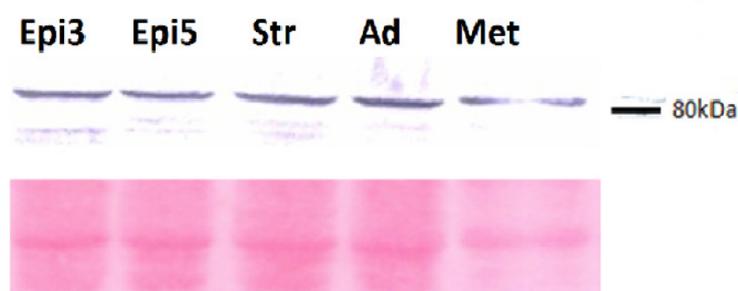


FIGURA 4.17 – Análise da expressão da proteína TcRRM2 durante a metaciclogênese do *T. cruzi*. Testes realizados com extratos de *T. cruzi* nas formas epimastigotas com 3 e 5 dias de cultivo (**Epi3** e **Epi5**); parasitas submetidos a estresse nutricional (**Str**); parasitas aderidos ao frasco de cultura (**Ad**); Tripomastigotas metacíclicos (**Meta**). No controle (imagem inferior) é demonstrada a presença de extrato correspondente a 5.10^6 parasitas nas canaletas, através de coloração da membrana com *Ponceau S* antes da incubação dos anticorpos.

A proteína TcRRM2 apresenta um padrão de expressão uniforme ao longo da metaciclogênese, podendo ser considerada então uma proteína constitutivamente expressa. A diminuição da marcação de TcRRM2 observada nos parasitas tripomastigotas metacíclicos é devido a uma diminuição geral da expressão de proteínas nesta etapa do ciclo de vida, o que se pode observar abaixo nos padrões dos extratos utilizados.

4.4.2 Identificação da localização subcelular de TcRRM2 por microscopia de fluorescência

Após a verificação do padrão de expressão de TcRRM2 ao longo do ciclo de vida, verificou-se a localização subcelular desta proteína nas diferentes etapas de diferenciação do parasita.

Em condições de deficiência de glucose, não foi observada a participação da proteína TcRRM2 na formação de grânulos citoplasmáticos de resposta a estresse, como observado para algumas outras proteínas de *T. cruzi*, como PABP1, UBP1 e UBP2 (revisto por CASSOLA,

2011). Devido a grande importância de TIA1/TIAR na formação de grânulos de estresse em outros organismos, imaginou-se que TcRRM2 pudesse estar envolvida com este tipo de resposta em *T. cruzi*, devido a sua similaridade de sequência com TIA1 e TIAR. Porém, como demonstrado na figura 4.18, observou-se que em todas as etapas da metaciclologênese a proteína TcRRM2 manteve um padrão de marcação nuclear.

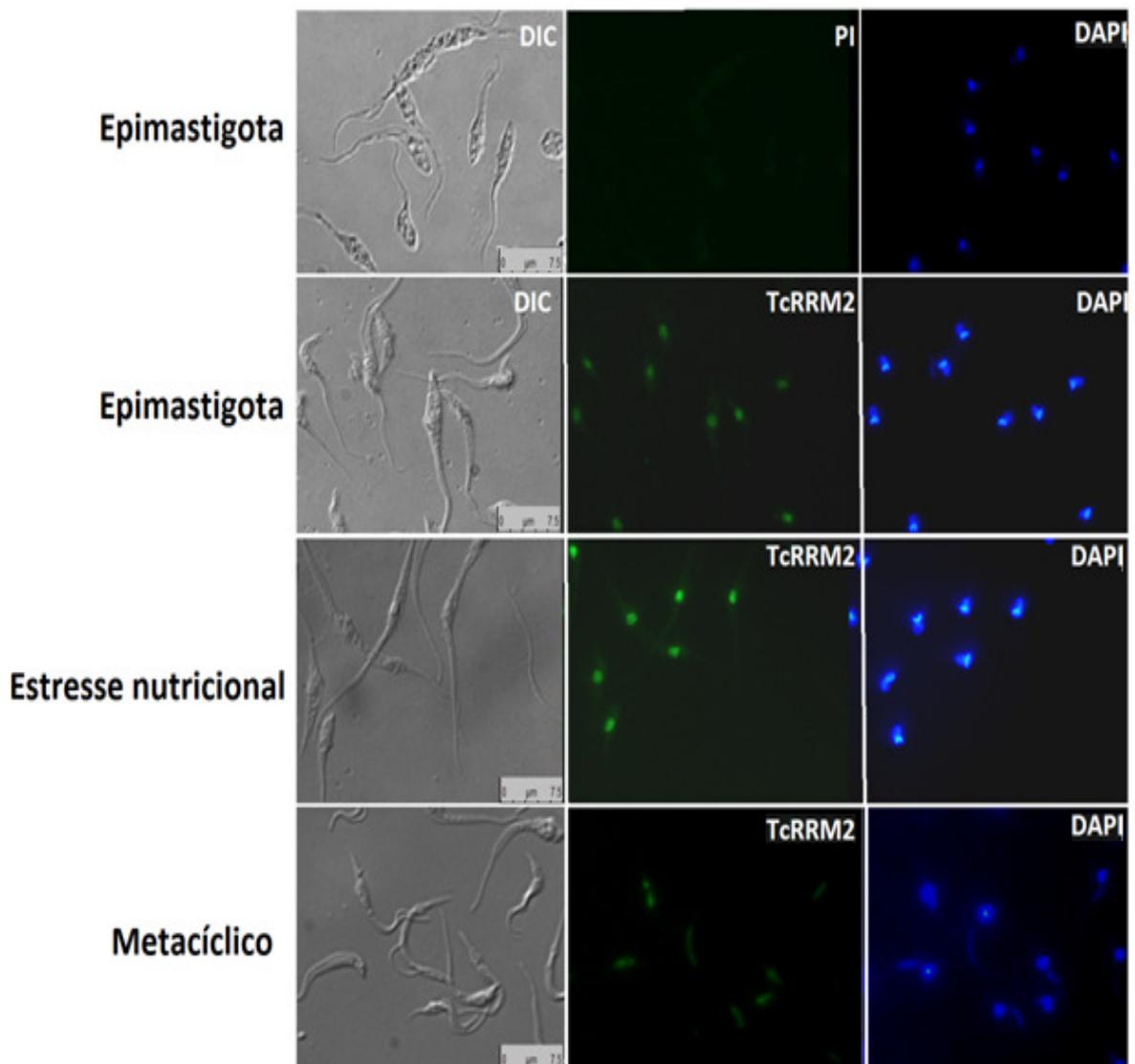


FIGURA 4.18 – Localização subcelular de TcRRM2 durante as etapas da metaciclologênese. DIC: Imagens dos parasitas obtidas através de contraste por interferência diferencial; α TcRRM2: visualização da marcação obtida através da incubação dos parasitas com o soro imune anti - proteína TcRRM2(exceto na foto epimastigotas/PI); DAPI: marcação de DNA presente no núcleo e no cinetoplasto; **Epimastigotas, estresse nutricional, metacíclicos:** incubação dos anticorpos com parasitas epimastigotas, submetidos a ausência de glicose e tripomastigotas metacíclicos, respectivamente.

A partir deste resultado inicial, levantou-se a hipótese de que outras condições de estresse celular poderiam levar ao recrutamento de TcRRM2 para grânulos citoplasmáticos de repressão e remodelamento de mRNA, portanto foram realizados experimentos utilizando outros tipos de estresse.

Foi utilizado o estresse por arsenito de sódio, pois este tipo de estresse é amplamente utilizado na literatura para induzir a formação de grânulos de estresse em diversos tipos celulares. Grânulos citoplasmáticos contendo TIA1 e TIAR são observados em diversos modelos experimentais quando as células são submetidas a tratamento com arsenito de sódio, e em *T. cruzi* já foi demonstrada a capacidade de proteínas de ligação a RNA em modificar sua localização em resposta a estresse induzido por esta droga (revisto por CASSOLA, 2011). Apesar de não ser uma forma natural de estresse, à qual o parasita estaria submetido durante seu ciclo de vida, o estresse por arsenito de sódio é uma ferramenta clássica no estudo de funções de proteínas de resposta a estresse. Foram utilizados também dois tipos de estresses ambientais aos quais o parasita está sujeito durante o seu ciclo de vida, que foram o estresse de pH e o estresse de temperatura, como demonstrado na figura 4.19.

Observou-se que sob todas estas condições a localização subcelular de TcRRM2 se mantém nuclear, e a partir destes resultados concluiu-se que a proteína TcRRM2 não possui o comportamento de uma proteína TIA canônica. Nesta etapa concluiu-se que se TcRRM2 possui algum envolvimento na regulação de mRNAs em resposta a estresse, este efeito não é dependente da realocação desta proteína em grânulos citoplasmáticos.

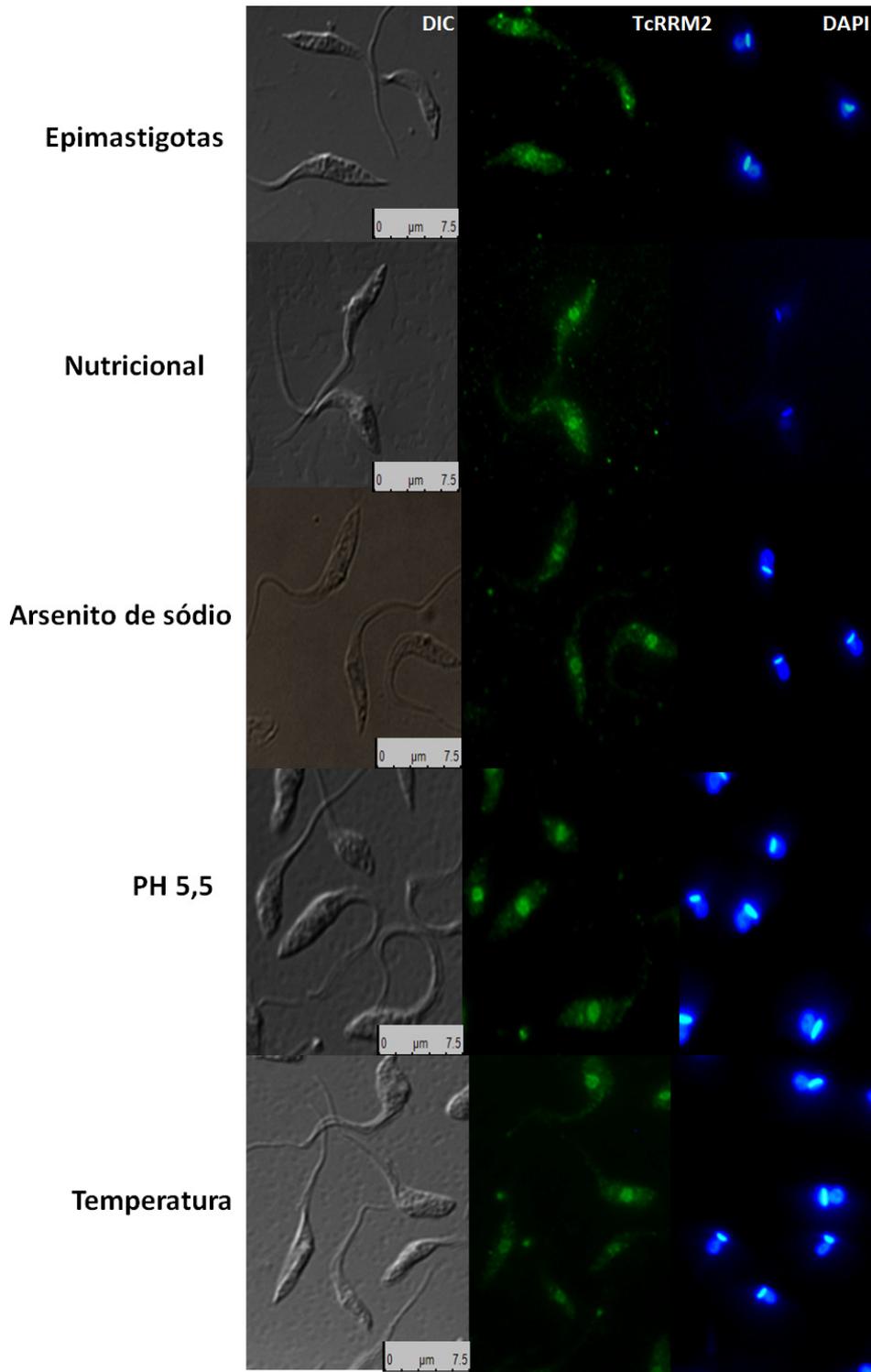
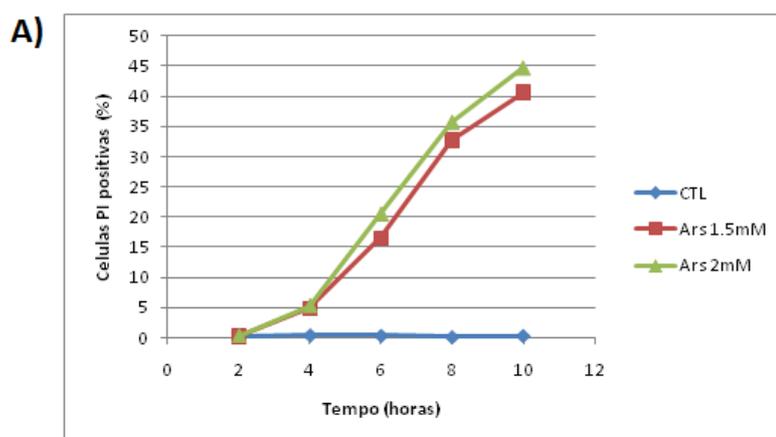


FIGURA 4.19 – Localização subcelular de Tc6180 sob diferentes condições de estresse. **DIC:** Imagens dos parasitas obtidas através de contraste por interferência diferencial; **α TcRRM2:** visualização da marcação obtida através da incubação dos parasitas com o soro imune anti - proteína TcRRM2; **DAPI:** marcação de DNA presente no núcleo e no cinetoplasto; **Epimastigotas, estresse nutricional, arsenito de sódio, PH, Temperatura:** incubação do anticorpo com parasitas submetidos aos referidos tipos de estresse.

4.5 TESTES DE VIABILIDADE CELULAR EM RESPOSTA AO ARSENITO DE SÓDIO

Foram realizados experimentos de imunolocalização por microscopia de fluorescência visando observar a localização subcelular de TcRRM2 em resposta a tratamento com arsenito de sódio. Existem trabalhos na literatura que descrevem tratamentos com a droga por um longo período de tempo, onde a diferença total de localização celular foi observada após de 5 horas de tratamento em tripanosomatídeos (CASSOLA, NOÉ & FRASCH, 2010). Porém, na tentativa de se utilizar as mesmas concentrações de arsenito de sódio utilizadas no experimento prévio, observou-se que em tempos longos de incubação a morfologia dos parasitas mudava drasticamente, o que aparentemente não foi observado no experimento descrito na literatura.

Foi levantada a hipótese de que poderia estar ocorrendo morte celular em resposta ao tratamento com arsenito de sódio. Para isto foi realizada uma curva de viabilidade em resposta a arsenito de sódio através da incorporação do corante vital iodeto de propídeo, que testa a morte dos parasitas por um mecanismo semelhante a necrose, como pode ser observado na Figura 4.20.



B)

T	CTL	Ars 1.5mM	Ars 2mM
2	0,15	0,22	0,3
4	0,42	4,83	5,27
6	0,36	16,5	20,51
8	0,12	32,72	35,74
10	0,33	40,63	44,75

FIGURA 4.20 – Determinação dos níveis de morte celular em resposta a tratamento por arsenito de sódio. CTL: percentagens de permeabilização de células controle, não tratadas com arsenito de sódio; **Ars 1,5mM e Ars 2mM**: percentagens de permeabilização de células tratadas com arsenito de sódio na concentração 1,5mM e 2mM, respectivamente; **T**: tempos de tratamento.

Apesar dos mecanismos de morte celular não serem ainda muito conhecidos em *T. cruzi*, acredita-se que existam diferentes respostas que desencadeiam morte celular, uma delas envolvendo permeabilização de membranas (FERNANDES *et al*, 2010). Através destes testes observou-se que mesmo em tempos longos de tratamento a porcentagem de permeabilização celular foi relativamente baixa para as duas concentrações de droga utilizadas, o que significa que apesar da alteração drástica na morfologia e aparente dano à célula, a membrana celular continuava intacta, caracterizando portanto que a morte celular não ocorreu pela via semelhante a necrose. A morte celular que poderia estar ocorrendo por algum mecanismo semelhante a apoptose, não foi testada, e se confirmada em experimentos futuros poderia elucidar se existem diferentes sensibilidades das cepas de *T. cruzi* em relação a droga arsenito de sódio. A modificação de morfologia parece ser uma resposta natural do *T. cruzi* Dm28c ao tratamento com arsenito de sódio, mas dificulta bastante a visualização de qualquer localização citoplasmática que possa ocorrer em decorrência do tratamento, visto que as células se tornam compactadas e arredondadas, impedindo uma correta localização das estruturas.

4.6 ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DE TcRRM2 EM GRADIENTES DE SACAROSE

A distribuição da proteína TcRRM2 em gradiente de sacarose foi analisada de modo a verificar uma possível associação a polissomos ou a outros complexos pesados citoplasmáticos que não pudessem ser detectados em ensaios de imunofluorescência devido à pouca abundância da proteína. O perfil de sedimentação da proteína TcRRM2 foi analisado na presença da droga cicloheximida (que interrompe a elongação da tradução estabilizando os polissomos) em epimastigotas e em parasitas submetidos a estresse nutricional. Com este ensaio pode-se observar que a proteína somente é detectada em frações não polissomais, se estendendo desde as frações mais leves até as frações correspondentes a monossomos, como observado na Figura 4.21.

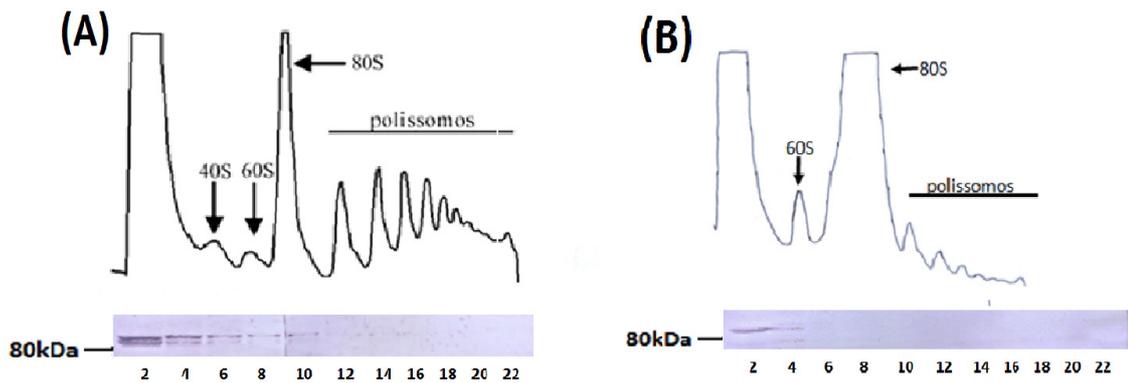


FIGURA 4.21 – Análise da preseça da proteína TcRRM2 nas frações de um gradiente de sacarose. A: Gradiente correspondente a epimastigotas submetidos a tratamento com cicloheximida; **B:** gradiente correspondente a parasitas submetidos a estresse nutricional e tratamento com cicloheximida.

Como uma confirmação adicional da ausência de TcRRM2 em frações pesadas (associadas a polissomos ou a complexos pesados não polissomais, como grânulos de repressão de mRNA), as frações do gradiente foram agrupadas em quatro conjuntos e concentradas utilizando-se o protocolo de TCA-DOC (como descrito em 3.9.2). O primeiro conjunto agrupou as frações livres de ribossomos, o segundo as frações correspondentes a monossomos, o terceiro as frações polisomais leves e o quarto as frações polisomais pesadas. A presença de TcRRM2 nas frações concentradas foi testada por “western blot”, como demonstrado na figura 4.22. Este ensaio confirmou o resultado de que TcRRM2 não se associa a complexos pesados, sejam eles polissomais ou não polissomais.

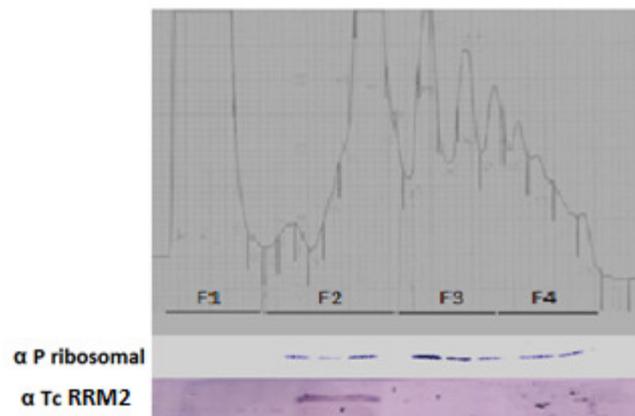


FIGURA 4.22 – Análise da preseça da proteína TcRRM2 nas frações de um gradiente de sacarose concentrado com TCA/DOC. α p ribosomal: controle testando a presença de proteína ribossomal nas frações do gradiente testadas. **α TcRRM2: teste contra as frações do gradiente** utilizando o antisoro específico para TcRRM2. **F1:** Fração livre de ribossomos; **F2:**Fração correspondente a monossomos; **F3:**Fração polisomal leve; **F4:** Fração polisomal pesada.

4.7 ANÁLISE DE LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE TcRRM2 POR FRACIONAMENTO CELULAR

Foi realizada uma outra tentativa de elucidar a localização subcelular de TcRRM2, através de fracionamento celular como descrito em 3.8. Os resultados do teste do anticorpo α TcRRM2 contra frações citoplasmáticas e nucleares, são demonstrados na figura 4.23. Não foi possível esclarecer completamente a localização através desta técnica devido a falta de controles ideais de extravazamento de proteínas nucleares para o citoplasma. Devido a permeabilidade particular de cada proteína à lise, é difícil definir se as frações consideradas citoplasmáticas realmente se referem a proteínas de localização citoplasmática quando a célula está intacta, ou tratam-se somente de proteínas de maior mobilidade, que durante a lise, ou até mesmo durante as etapas de centrifugação do extrato acabam sendo retiradas da fração considerada nuclear.

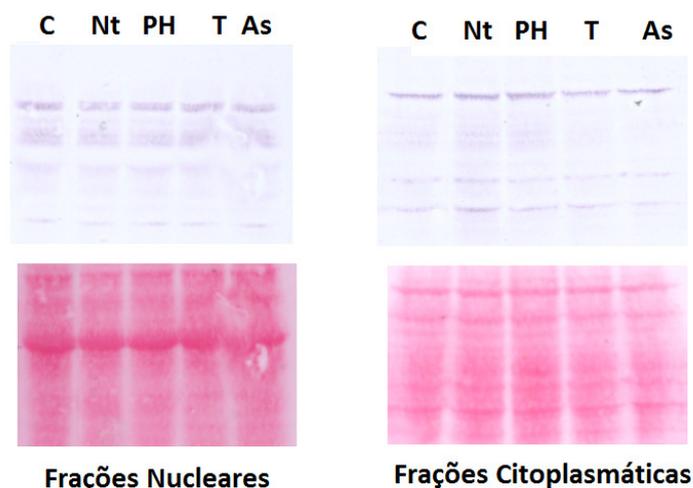


FIGURA 4.23 – Análise da localização de TcRRM2 através de fracionamento celular. C: extrato de parasitas controle; Nt, PH, T, As: os parasitas utilizados para os extratos foram submetidos a estresse nutricional, estresse de PH, estresse de temperatura, e estresse por arsenito de sódio, respectivamente. **Figura superior:** análise das amostras por western blot; **Figura inferior:** marcação da quantidade total de proteína nas canaletas através de coloração com *Ponceau S*.

Apesar do experimento não ter elucidado o problema inicial da localização subcelular, observou-se um resultado bastante interessante. Uma fração considerável da proteína TcRRM2 não é recuperada no sobrenadante do extrato (Figura 4.23). Um experimento adicional de tentativa de obtenção de TcRRM2 por lise dos parasitas demonstrou que mesmo após varias tentativas de solubilização com diferentes abordagens como uso de detergentes em diferentes concentrações e diversas etapas de sonicação, uma parte da proteína continua agregada ao precipitado (fração nuclear). Quando a presença de

TcRRM2 é testada nestas duas frações (precipitado e sobrenadante) se observa o padrão de duas marcações de tamanho bem próximo na fração nuclear (Figura 4.23), em vez de uma única marcação, característica para o anticorpo de TcRRM2 quando testado por “western blot” a partir da fração citoplasmática de um extrato proteico solúvel. Esta marcação dupla pode indicar alguma modificação pós-traducional, como por exemplo, fosforilação, onde a proteína de tamanho maior representa a proteína agregada aos fosfatos, e a de tamanho menor representa a fração de proteína não fosforilada. Análises da sequência primária de TcRRM2 demonstraram diversos sítios prováveis de fosforilação, como demonstrado na Figura 4.24 . Estes sítios são esperados para proteínas de ligação a RNA, e estão presentes também nas proteínas TIA1 e TIAR, sendo que dados na literatura (TIAN et al, 1991; IZQUIERDO e VALCARCÉL, 2007) demonstram que a fosforilação de TIA-1 é um dos sinais celulares que podem acabar desencadeando processos de apoptose.

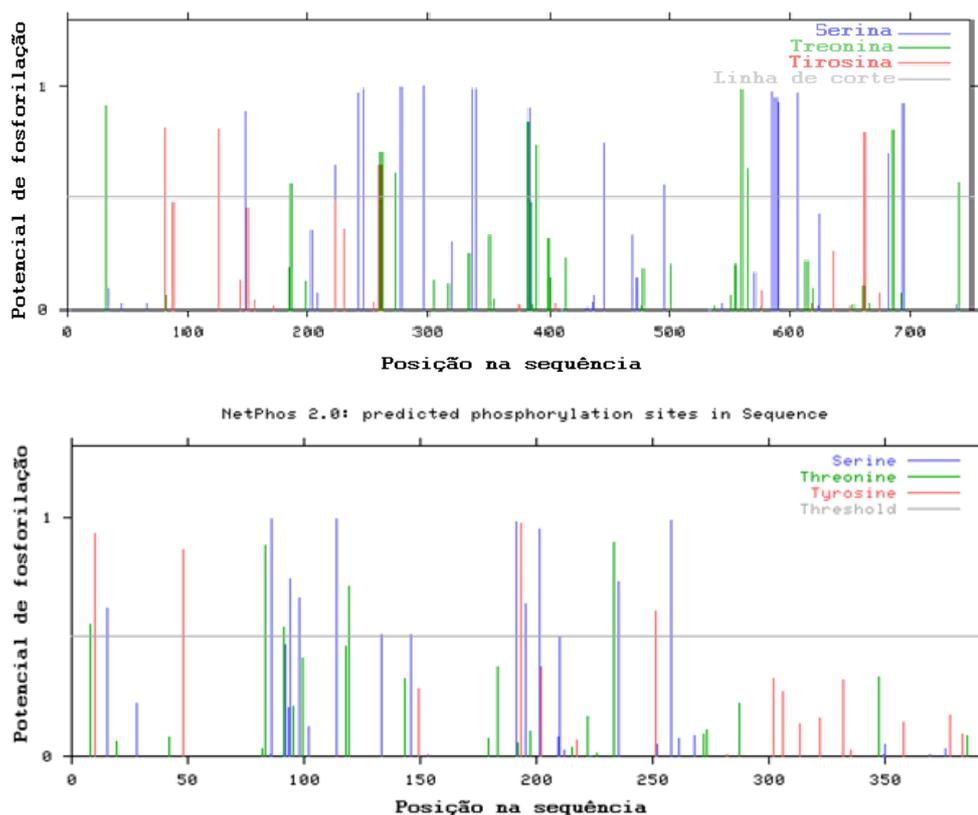


Figura 4.24- Predição de sítios de fosforilação para a proteína TcRRM2 (acima) e proteína TIA1 (abaixo). As barras coloridas representam os sítios de fosforilação correspondentes a serinas (azul), treoninas (verde), e tirosinas (vermelho). Foi utilizada para o alinhamento a isoforma 2 da proteína TIA 1 humana.

4.8 DEFINIÇÃO DA LOCALIZAÇÃO SUBNUCLEAR DE TcRRM2 por MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

A localização subcelular de TcRRM2 foi elucidada através da técnica de microscopia de fluorescência, revelando que a proteína encontra-se dentro do núcleo do parasita. Porém a limitação de resolução desta técnica não permite determinar a exata localização intranuclear desta proteína. Por este motivo, foi realizado um ensaio de imunolocalização por microscopia eletrônica de transmissão.

Em outros eucariotos, as proteínas TIA1 e TIAR são multifuncionais, e aparecem envolvidas em diversos mecanismos de regulação de RNA (revisto por REYES *et al*, 2010). O mesmo parece ser observado para a proteína TcRRM2 de *T. cruzi*. Os ensaios de imunolocalização por microscopia eletrônica de transmissão revelaram que TcRRM2 apresenta-se em duas regiões distintas dentro do núcleo, o nucléolo e regiões pouco eletrodensas de cromatina, como pode ser observado na Figura 4.25.

Recentemente outras funções têm sido atribuídas ao nucléolo, além das funções já bem conhecidas de produção de RNA ribossomal e montagem de ribossomos. Há evidências de que estas estruturas nucleares estejam envolvidas em diversos processos de metabolismo de RNA, já que estudos de proteômica nucleolar apontam a presença de fatores de transcrição e de “splicing” nestas estruturas, além de diversas proteínas de ligação a RNA (ANDERSEN *et al*, 2002).

Além da marcação nucleolar, TcRRM2 parece estar distribuída em um padrão semelhante a de “speckles”. Os “speckles” nucleares são localizados nas regiões intercromatina de células eucarióticas, e são caracterizados como regiões do nucleoplasma envolvidas no processamento de pré-mRNA, ricas em fatores de “splicing”. O padrão de distribuição de proteínas em “speckles” é conhecido para diversos eucariotos, e suspeita-se que estas regiões de cromatina frouxa, distribuídas pelo núcleo próximas às bordas de cromatina condensada, sejam sítios de transcrição e processamento de RNAs mensageiros (revisto por SPECTOR & LAMOND, 2011). Embora o padrão de “speckles” não tenha sido ainda extensivamente caracterizado em *T. cruzi*, é possível supor a partir da localização em “speckles” que determinada proteína possa estar envolvida em mecanismos de processamento de mRNA.

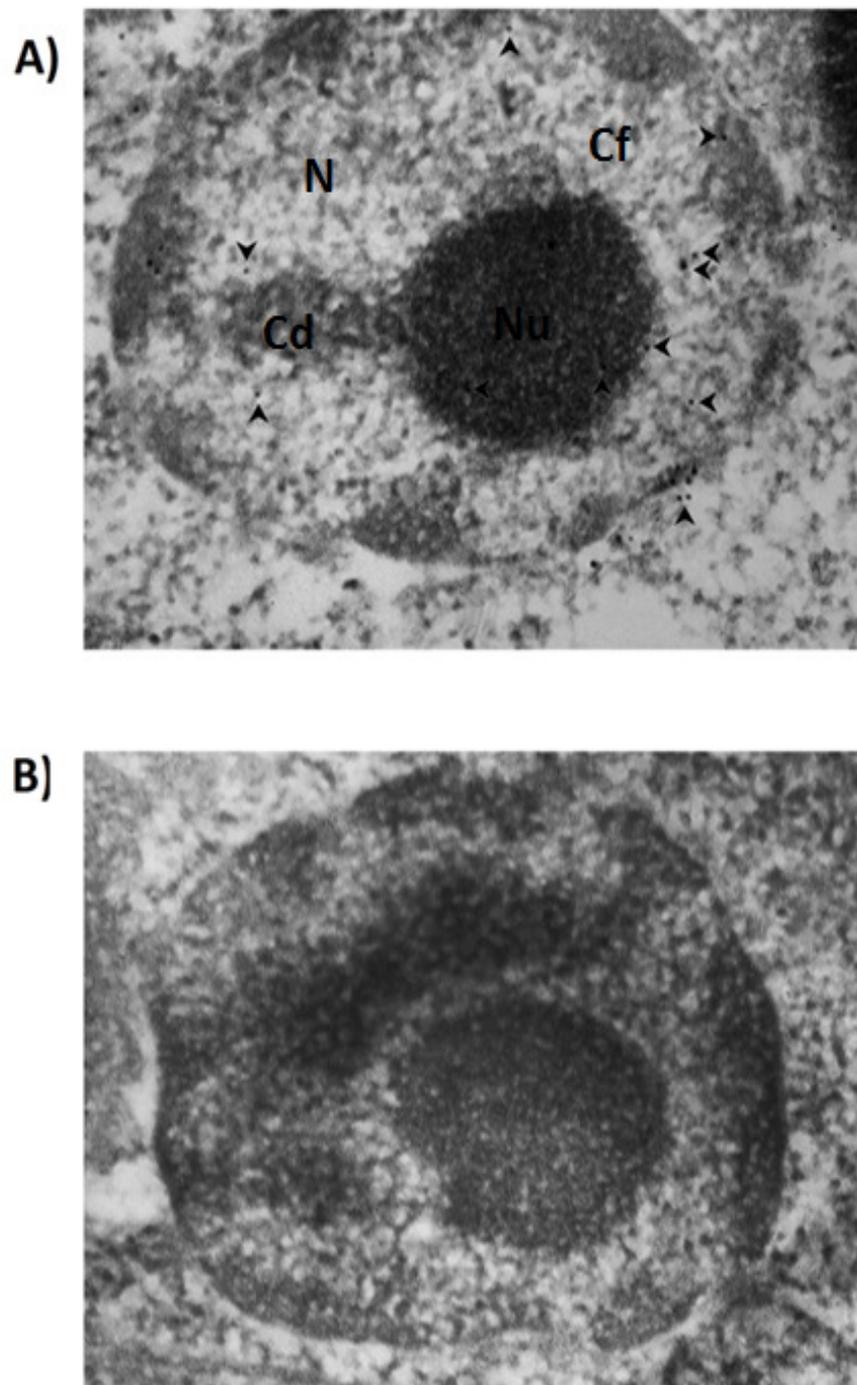


FIGURA 4.25- Imunolocalização de TcRRM2 por microscopia eletrônica de Transmissão. A) Incubação dos cortes com o anticorpo anti TcRRM2. As setas demonstram a localização da proteína TcRRM2 **B)** Controle da contrastação utilizando somente o anticorpo secundário conjugado a microesferas de ouro. **N:** núcleo celular; **Cd:** regiões de cromatina densa; **Cf:** regiões de cromatina frouxa; **Nu:** nucléolo.

4.9 DETERMINAÇÃO DA LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE TcRRM2 EM RESPOSTA AO TRATAMENTO COM SINEFUNGINA

A partir da observação de uma aparente localização em “speckles” para TcRRM2, inferiu-se que esta proteína poderia ter uma função importante no processamento de mRNA em *T. cruzi*. Portanto, foi realizado um tratamento com a droga sinefungina por 30 minutos, na concentração de 1 µg/mL, de modo a inibir o processo de “trans-splicing”, uma das formas mais importantes de processamento do pré-mRNA nestes parasitas. Após o tratamento, a localização subcelular de TcRRM2 foi analisada por microscopia de fluorescência. Foram utilizados como controle do experimento parasitas não tratados, incubados com o mesmo anticorpo utilizado na incubação dos parasitas tratados.

Como demonstrado na Figura 4.26, observou-se que a localização subcelular de TcRRM2 permaneceu igual nos parasitas controle e nos tratados com sinefungina.

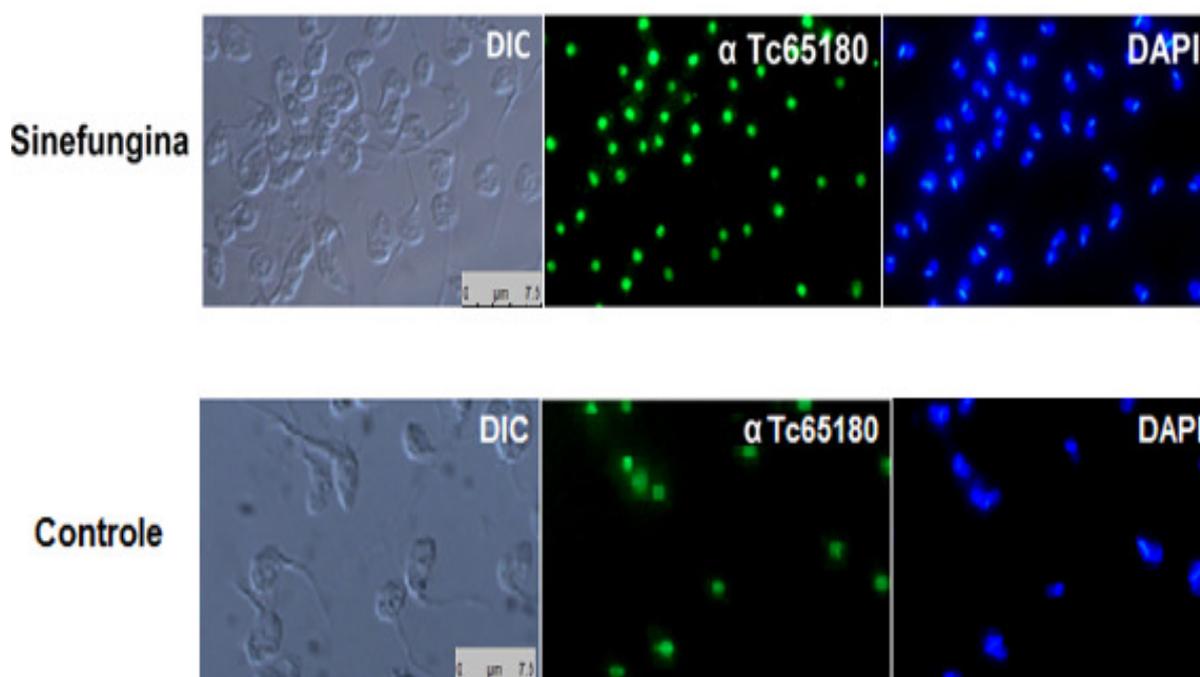


FIGURA 4.26- Localização subcelular de TcRRM2 após tratamento com sinefungina. DIC: Imagens dos parasitas obtidas através de contraste por interferência diferencial; **αTcRRM2:** visualização da marcação obtida através da incubação dos parasitas com o soro imune anti – proteína TcRRM2; **DAPI:** marcação de DNA presente no núcleo e no cinetoplasto; **Controle:** imunolocalização com o mesmo anticorpo em parasitas não tratados com a droga.

4.10 DETERMINAÇÃO DA LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE TcRRM2 APÓS TRATAMENTO COM ACTINOMICINA D

A actinomicina D é uma droga altamente citotóxica inicialmente isolada a partir de leveduras do grupo *Actinomyces*. A estrutura química da actinomicina permite que esta se intercale entre as bases do DNA, preferencialmente em regiões ricas em guanina e citosina, inibindo desta forma a síntese de RNA. A droga também causa dano ao DNA de maneira irreversível. Parasitas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento foram tratados por 24 horas com actinomicina D na concentração de 50 mg/mL, de modo a interromper a transcrição, como descrito anteriormente (NAZER, VERDÚN & SÁNCHEZ, 2011). Os parasitas tratados e não tratados foram incubados com a mesma alíquota de anticorpo primário e as fotografias foram tiradas sob o mesmo tempo de exposição para os parasitas tratados e não tratados (Figura 4.27).

Pode-se observar na Figura 4.27 que nos parasitas submetidos ao tratamento com a droga, a localização celular de TcRRM2 foi alterada, passando a uma localização parcialmente citoplasmática, enquanto nos epimastigotas não tratados observa-se uma marcação somente nuclear, mais intensa que a observada nos parasitas tratados. Como controle foi utilizada a marcação com anticorpo produzido contra a proteína DHH1, uma helicase citoplasmática do tipo DEAD/H-box que não tem sua localização celular alterada pelo tratamento com actinomicina D.

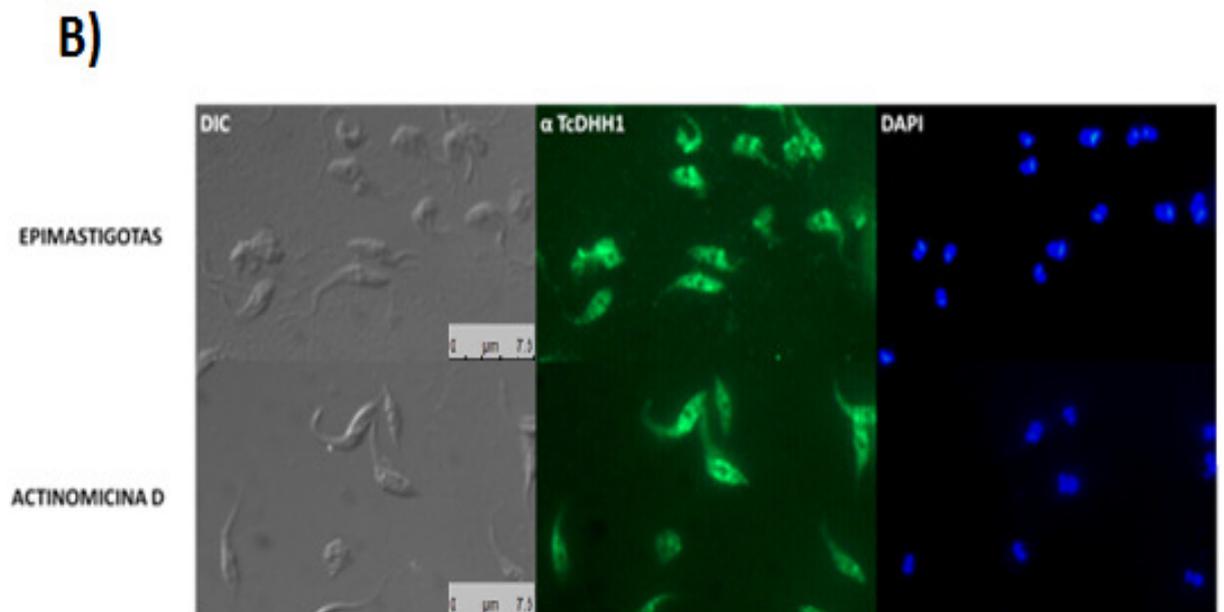
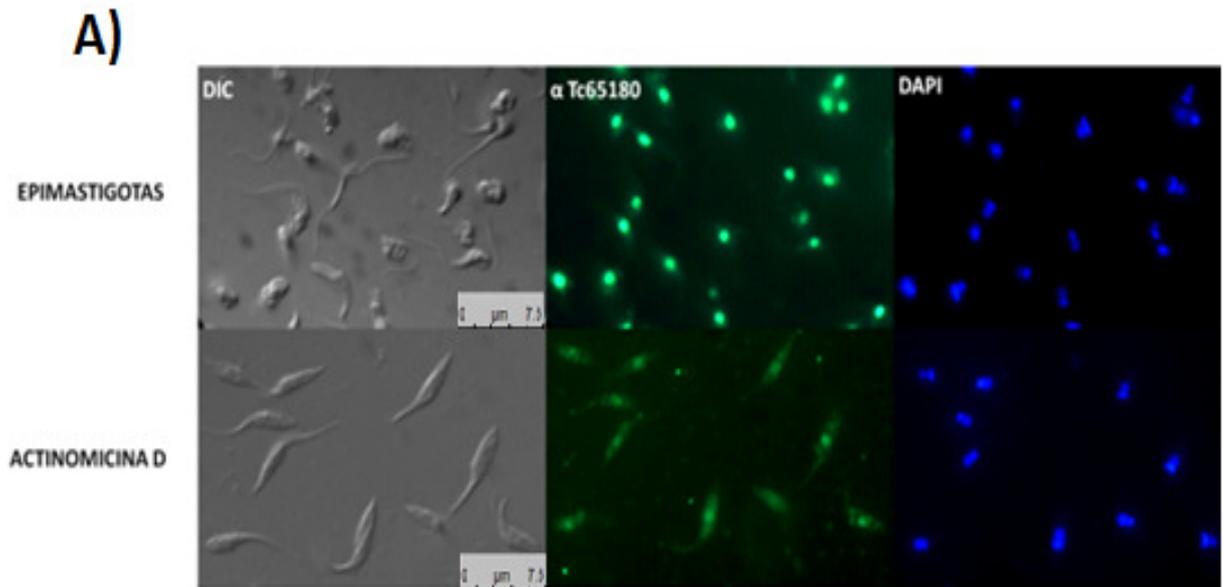


FIGURA 4.27 – Localização subcelular das proteínas TcRRM2(A) e DHH1(B) em parasitas epimastigotas tratados e não tratados com actinomicina D. DIC: Imagens dos parasitas obtidas através de contraste por interferência diferencial; **αTcRRM2:** visualização da marcação obtida através da incubação dos parasitas com o soro imune anti – proteína TcRRM2; **α TcDHH1:** visualização da marcação obtida através da incubação dos parasitas com o soro imune anti – DHH1 **DAPI:** marcação de DNA presente no núcleo e no cinetoplasto; **Actinomicina D:** imunolocalização utilizando parasitas tratados com a droga Actinomicina D por 24 horas; **Epimastigotas:** imunolocalização com o mesmo anticorpo em parasitas não tratados com a droga.

4.11 IDENTIFICAÇÃO DE ALVOS DE TcRRM2 POR SEQUENCIAMENTO EM LARGA ESCALA

Foram realizados experimentos de imunoprecipitação com o antisoro produzido contra a proteína TcRRM2 para isolamento de RNAs associados e ela. Foram utilizados para as imunoprecipitações extratos de epimastigotas e de parasitas submetidos a estresse nutricional. Para cada um dos grupos (epimastigota e estresse) foram realizadas três réplicas de imunoprecipitação, e como controle foram utilizados “pools” de soros pré imunes de diversos coelhos, incluindo o coelho utilizado para imunização da proteína TcRRM2, do qual foi retirado antisoro utilizado no trabalho. Durante a análise dos dados gerados pelo sequenciamento dos RNAs, foram retiradas dos resultados todas as sequências identificadas nas imunoprecipitações realizadas com os soros pré imunes. As imunoprecipitações para o experimento de sequenciamento foram realizadas com antisoros produzidos contra proteínas de localizações e funções totalmente diferentes, sendo que na mesma lâmina existiam experimentos referentes a diferentes projetos. Partindo do princípio que os experimentos não deveriam ser relacionados, mRNAs identificados que foram comuns a todos estes experimentos poderiam ser contaminantes inespecíficos e também foram retirados da análise. Foram utilizados dois parâmetros estatísticos para a análise: o “Fold Change” (FC) e o “False Discovery Rate” (FDR). O FDR, é um método estatístico utilizado em testes de hipóteses múltiplas, que mede a proporção esperada de resultados falso-positivos em um universo de amostras (BENJAMINI & YEKUTIELI, 2001). O “Fold Change” é um número que define o quanto um valor se altera em comparação a um valor inicial. Estas medidas são muito utilizadas em análises de expressão gênica, sendo introduzida em experimentos de microarranjo e estendendo sua aplicação para experimentos de RNAseq, utilizada para analisar em quantas vezes um gene se apresenta superexpresso em determinada amostra quando comparado a quantidade presente em outra amostra (WITTEN & TIBSHIRANI, 2007).

A análise dos resultados de sequenciamento foi bastante rigorosa, sendo que a linha de corte foram sequências com um FDR menor que 1% e um FC maior que 2 vezes de aumento ou diminuição na comparação entre epimastigota e estresse. Com essa análise mais conservadora alguns resultados positivos podem ter sido omitidos. Todavia, esta estratégia de análise aumenta a confiabilidade do experimento apesar de diminuir o número de RNAs identificados, diminuindo consideravelmente a quantidade de resultados falso-positivos. Como o objetivo do experimento foi identificar alvos com elevada confiabilidade para futuras análises, foi priorizada a qualidade dos resultados em detrimento da quantidade. Após estas etapas iniciais de análise e retirada de sequências contaminantes,

partiu-se para a comparação dos RNAs identificados no experimento com epimastigotas e com parasitas submetidos a estresse nutricional. Foram geradas tabelas das sequências mais representadas em epimastigotas em relação a estresse, e contendo também os mRNAs mais representados em parasitas estressados em relação a epimastigotas (Tabela 4.1).

Mais representadas em estresse	Nome da proteína para qual o mRNA codifica	Localização/Processo
Tc00.1047053508851.180	proteína 14-3-3, putativa	Núcleo
Tc00.1047053511589.130	proteína 14-3-3, putativa	Núcleo
Tc00.1047053508961.79	proteína da estrutura paraflagelar 69kDa, putativa	Citoesqueleto
Tc00.1047053511215.119	proteína da estrutura paraflagelar 69kDa, putativa	Citoesqueleto
Tc00.1047053511517.5	proteína de choque termico 70kDa, putativa	Resposta a estresse
Tc00.1047053506357.50	Álcool desidrogenase, putativa	Citoplasma
Tc00.1047053511277.60	Álcool desidrogenase, putativa	Citoplasma
Tc00.1047053509233.180	ATPase subunidade beta, putativa	Mitocôndria
Tc00.1047053511329.10	cisteíno peptidase semelhante a calpaína, putativa, cisteíno peptidase, Clan CA	Ligação a proteínas
Tc00.1047053507537.10	precursor de cruzipaína (pseudogene), putativo, semelhante a catepsina L (pseudogene), putativa	Reservossomo
Tc00.1047053507297.10	precursor de cruzipaína, putativo, semelhante a catepsina L, putativa, principal cisteino proteinase, putativa	Reservossomo
Tc00.1047053507603.270	precursor de cruzipaína, putativo, semelhante a catepsina L, putativa, principal cisteino proteinase, putativa	Reservossomo
Tc00.1047053509429.329	precursor de cruzipaína, putativo, cruzaina, putativa, principal cisteino proteinase, putativa	Reservossomo
Tc00.1047053510073.17	cisteino peptidase (C-terminal), putativa	Reservossomo
Tc00.1047053508595.50	cisteino peptidase, putativa, semelhante a catepsina L, putativa, principal cisteino proteína	Reservossomo
Tc00.1047053507537.20	cisteino peptidase, putativa, cisteino peptidase, cla CA, familia C1, catepsina	Reservossomo
Tc00.1047053507603.260	cisteino peptidase, putativa, cisteino peptidase, cla CA, familia C1, catepsina	Reservossomo
Tc00.1047053509429.320	cisteino peptidase, putativa, cisteino peptidase, cla CA, familia C1, catepsina	Reservossomo
Tc00.1047053506529.360	citocromo C oxidase subunidade IV, putativa	Mitocôndria
Tc00.1047053510889.50	citocromo C oxidase subunidade IV, putativa	Mitocôndria
Tc00.1047053506661.30	ácido graxo elongase, putativa	Retículo Endoplasmático
Tc00.1047053506585.40	proteína regulada pro glucose 78, putativa	Retículo Endoplasmático

Tc00.1047053507875.20	glutamato desidrogenase, putativa	Citoplasma
Tc00.1047053508111.30	glutamato desidrogenase, putativa	Citoplasma
Tc00.1047053432677.20	proteína de choque termico 70kDa, precursor mitocondrial, putativo	Mitocôndria
Tc00.1047053507029.30	proteína de choque termico 70kDa, precursor mitocondrial, putativo	Mitocôndria
Tc00.1047053510121.20	hexoquinase, putativa	Citoplasma
Tc00.1047053506229.30	proteína hipotética	ND
Tc00.1047053508777.50	proteína hipotética	ND
Tc00.1047053509029.80	proteína hipotética	ND
Tc00.1047053511573.20	proteína hipotética	ND
Tc00.1047053511745.60	proteína hipotética	ND
Tc00.1047053503413.4	proteína hipotética, conservada	Tradução
Tc00.1047053503975.100	proteína hipotética, conservada	ND
Tc00.1047053504153.280	proteína hipotética, conservada	ND
Tc00.1047053504423.30	proteína hipotética, conservada	ND
Tc00.1047053506399.80	proteína hipotética, conservada	ND
Tc00.1047053506441.20	proteína hipotética, conservada	ND
Tc00.1047053506859.170	proteína hipotética, conservada	ND
Tc00.1047053506859.180	proteína hipotética, conservada	ND
Tc00.1047053506925.420	proteína hipotética, conservada	Processo Biossintético
Tc00.1047053507569.10	proteína hipotética, conservada	Citoplasma
Tc00.1047053507951.160	proteína hipotética, conservada	ND
Tc00.1047053508265.100	proteína hipotética, conservada	ND
Tc00.1047053508357.9	proteína hipotética, conservada	ND
Tc00.1047053508719.70	proteína hipotética, conservada	ND
Tc00.1047053508909.210	proteína hipotética, conservada	Ligação a proteínas
Tc00.1047053509643.20	proteína hipotética, conservada	Resposta a estresse
Tc00.1047053509791.60	proteína hipotética, conservada	ND
Tc00.1047053509991.20	proteína hipotética, conservada	ND
Tc00.1047053510055.50	proteína hipotética, conservada	ND

Tc00.1047053510877.30	proteína hipotética, conservada	ND
Tc00.1047053511319.20	proteína hipotética, conservada	ND
Tc00.1047053511429.30	proteína hipotética, conservada	ND
Tc00.1047053511537.69	proteína hipotética, conservada	ND
Tc00.1047053511815.170	proteína hipotética, conservada	ND
Tc00.1047053511815.180	proteína hipotética, conservada	ND
Tc00.1047053511909.50	proteína hipotética, conservada	ND
Tc00.1047053508707.310	proteína hipotética, conservada, proteina com repetições ricas em leucina, putative	Citoplasma
Tc00.1047053509057.20	importina alfa, putativa	Transporte
Tc00.1047053509965.110	importina alfa, putativa	Transporte
Tc00.1047053506925.319	isocitrato desidrogenase, putativa	Citoplasma
Tc00.1047053507627.9	cinesina, putativa	Citoesqueleto
Tc00.1047053506297.260	lanosterol 14-alfa-demetilase, putativa	Membrana
Tc00.1047053510101.50	lanosterol 14-alfa-demetilase, putativa	Membrana
Tc00.1047053509551.30	transportador de fosfato mitocondrial, putativo	Mitocôndria
Tc00.1047053439653.10	Fumarato redutase dependente de NADH	Mitocôndria
Tc00.1047053509569.100	nucleosideo fosforilase, putativa	Retículo Endoplasmático
Tc00.1047053506755.20	componente da estrutura paraflagelar, putativo	Citoesqueleto
Tc00.1047053510359.20	componente da estrutura paraflagelar, putativo	Citoesqueleto
Tc00.1047053434931.10	proteína do bastão paraxonemal PAR2, putativa	Citoesqueleto
Tc00.1047053506513.110	peptidase T, putativa, aminotripeptidase, putativa	Citoplasma
Tc00.1047053506297.240	proteína de pré- translocação, putativa, semelhante a SEC61	Transporte
Tc00.1047053510101.70	proteína de pré- translocação, putativa, semelhante a SEC61	Transporte
Tc00.1047053507617.9	prostaglandina F 2 alfa sintase	Peroxisomo
Tc00.1047053508461.80	prostaglandina F 2 alfa sintase	Peroxisomo
Tc00.1047053509505.10	proteina-dissulfeto isomerase, putativa	Retículo Endoplasmático
Tc00.1047053509067.70	proteína semelhante a pirrolina-5-carboxilato sintetase, putativa	Cloroplasto
Tc00.1047053506297.190	piruvato fosfato diquinase, putativa	Cloroplasto

Tc00.1047053510101.140	piruvato fosfato diquinase, putativa	Cloroplasto
Tc00.1047053511229.50	S-adenosilhomocisteino hidrolase, putativa	Citoplasma
Tc00.1047053511589.200	S-adenosilhomocisteino hidrolase, putativa	Citoplasma
Tc00.1047053508671.20	serino carboxipeptidase (CBP1), putativa, serino peptidase, cla SC, familia S10	Reservossomo
Tc00.1047053509695.210	serino carboxipeptidase (CBP1), putativa, serino peptidase, cla SC, familia S10	Reservossomo
Tc00.1047053509695.220	serino carboxipeptidase (CBP1), putativa, serino peptidase, cla SC, familia S10	Reservossomo
Tc00.1047053504191.10	esterol 24-c-metiltransferase, putativa	Reservossomo
Tc00.1047053504191.19	esterol 24-c-metiltransferase, putativa	Reservossomo
Tc00.1047053505683.10	esterol 24-c-metiltransferase, putativa	Reservossomo
Tc00.1047053510185.10	esterol 24-c-metiltransferase, putativa	Reservossomo
Tc00.1047053506321.290	proteína induzida por estresse, st1, putativa	Resposta a estresse
Tc00.1047053508479.340	succinil-CoA sintetase, subunidade alfa, putativa	Mitocôndria
Tc00.1047053503419.30	Redutase dependente de tiol 1, putativa, tiol transferase, putativa, glutathione	Cloroplasto
Tc00.1047053509105.70	Redutase dependente de tiol 1, putativa, tiol transferase, putativa, glutathione	Cloroplasto
Tc00.1047053511067.30	transcetolase, putativa	Citoplasma
Tc00.1047053511903.120	transcetolase, putativa	Citoplasma
Tc00.1047053511385.30	Pirofosfatase translocadora de prótons 1, tipo vacuolar, putativa	Reservossomo
Mais representadas em epimastigotas	Nome da proteína para qual o mRNA codifica	Localização/Processo biológico
Tc00.1047053511805.20	trichialina, putativa	ND
Tc00.1047053511015.30	trichialina, putativa	ND
Tc00.1047053506263.49	proteína hipotética, conservada	Complexo de Golgi
Tc00.1047053510599.70	protamina P1, putativa	ND
Tc00.1047053510827.40	proteína hipotética	ND

TABELA 4.1 LISTAGEM DOS mRNAs MAIS ASSOCIADOS A TcRRM2 EM EPIMASTIGOTAS E DURANTE ESTRESSE NUTRICIONAL. Numeros de acesso dos alvos identificados de acordo com o banco de dados do “website” www.genedb.org. **ND:** não determinado.

Foram identificados 97 mRNAs que se ligam mais a TcRRM2 durante a condição de estresse nutricional do que em epimastigotas sob condições normais de cultivo. Foram identificados somente 5 mRNAs que se ligam mais a TcRRM2 em condições normais de cultivo do que em epimastigotas submetidos a estresse nutricional. Este resultado por si só

já evidencia que TcRRM2 possui um papel importante na resposta a estresse em *T. cruzi*, já que sua ligação a RNAs em condições adversas aumenta consideravelmente. Após esta primeira identificação dos alvos mais representados em cada uma das condições estudadas, foi analisada a classificação destes mRNAs por função ou processo biológico nos quais pudessem estar envolvidos. Além disso, foi realizada uma análise através da ferramenta KEGG (AOKI-KINOSHITA & KANEHISA, 2007) para verificar o envolvimento destes mRNAs associados a TcRRM2 em vias metabólicas específicas.

Os RNAs mais associados a TcRRM2 em epimastigotas codificam, em sua maioria, proteínas hipotéticas de função e localização desconhecidas, sendo somente uma delas anotada como uma proteína pertencente ao complexo de golgi. Durante condições de estresse nutricional, TcRRM2 apresentou ligação a mRNAs relacionados a diversas proteínas de localização celular e funções variadas, como demonstrado na figura 4.28.

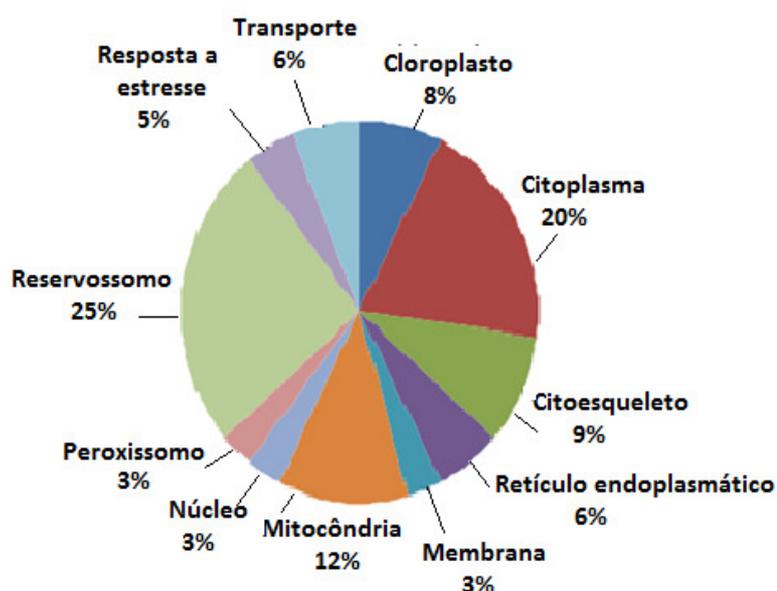


FIGURA 4.28 – Análise de localização dos mRNAs associados a TcRRM2 durante condições de estresse nutricional. Porcentagem dos mRNAs identificados relacionados a organelas e funções específicas.

Quando analisados os alvos de TcRRM2 em condições de estresse nutricional, observa-se que esta proteína se associa a mRNAs endereçados a compartimentos subcelulares como peroxissomos, mitocôndria, reticulo endoplasmático e reservossomos, caracterizando a possibilidade de participação de TcRRM2 em “regulons” pós transcricionais, como já descrito em *T. cruzi* (ESTEVEZ, 2008). Foi realizada uma busca na literatura por

funções das proteínas relativas aos mRNAs que se associam a TcRRM2, e os nomes das proteínas como constam na Tabela 4.1, estão assinalados em negrito no texto em diante.

Em diversos organismos, a ausência de açúcares simples no meio em que se situam leva a um aumento de expressão de genes que restringem as necessidades nutricionais das células, parando o ciclo celular ou aumentando o metabolismo de carboidratos (como através da ativação de enzimas mitocondriais em leveduras). Em *T. cruzi* foi demonstrado que a ausência de glucose leva a uma ativação de enzimas mitocondriais em epimastigotas em fase estacionária. Nestas condições, os parasitas se tornam sensíveis ao tratamento com cianeto e resistentes ao tratamento com o inibidor de oxidase SHAM, indicando uma mudança no metabolismo energético do uso de oxidases alternativas para a respiração mediada por citocromo. A expressão de chaperonas mitocondriais também aumenta na fase estacionária, concordando com o aumento na complexidade estrutural apresentada nesta organela durante o estresse nutricional. De modo a acomodar a reestruturação mitocondrial, ocorrem mudanças importantes na morfologia celular, de modo a aumentar o tamanho da célula. Além disso, há um aumento no tamanho médio do flagelo dos parasitas, devido à necessidade de adesão ao substrato, que culmina na metaciclologênese (Revisto por TYLER & ENGMAN, 2000).

Neste trabalho, foram analisados por seqüenciamento em larga escala os mRNAs que se ligam a TcRRM2, uma proteína de ligação a RNA semelhante as proteínas TIA1 e TIAR de *Homo sapiens*, sabidamente envolvidas em processos de resposta a estresse em outros eucariotos. Durante a condição de estresse nutricional foi observado um aumento da ligação de TcRRM2 a mRNAs relacionados a enzimas do metabolismo energético de *T. cruzi*, enzimas relacionadas a degradação de proteínas e metabolismo de esteróis no reservossomo e relacionadas a biossíntese do flagelo. Foram identificadas ainda proteínas gerais de regulação, como é o caso da proteína 14-3-3, proteínas de resposta a estresse como a chaperona HSP70 e a proteína ST1, entre outras.

4.12 ANÁLISE DOS ALVOS DE TcRRM2 RELACIONADOS A METABOLISMO ENERGÉTICO: MITOCÔNDRIA, CLOROPLASTO E CITOSOL

4.12.1 Alvos envolvidos em metabolismo energético: visão geral

Grande parte dos estudos sobre metabolismo energético em tripanossomatídeos utiliza como modelo experimental o *Trypanosoma brucei*, e há evidências de que o

metabolismo energético de *T. cruzi* e espécies de *Leishmania* se assemelhe ao padrão descrito para as formas procíclicas de *T. brucei* (MICHELS *et al*, 2006). A figura 4.29, modificada a partir de (EBIKEME *et al*, 2010), demonstra as interações entre proteínas de citoplasma, glicosomo e mitocôndria no metabolismo energético de *T. brucei*.

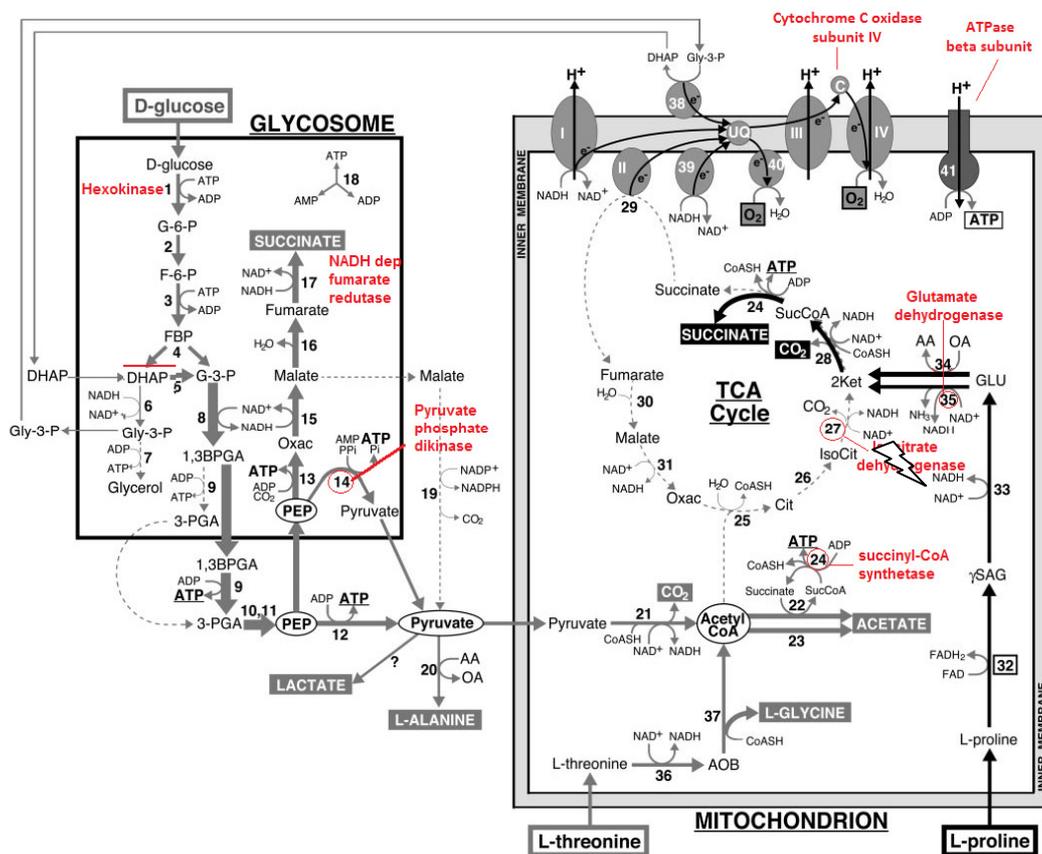


FIGURA 4.29 - Representação esquemática do metabolismo de fontes de carbono em procíclicos de *T. brucei* (modificado de EBIKEME *et al*, 2010). Os produtos finais das reações metabólicas encontram-se destacados em fundo escuro. Os processos determinados com setas pontilhadas ocorrem possivelmente em uma taxa muito baixa, ou não ocorrem sob condições normais de cultivo (meio rico em glucose). As moléculas de ATP sublinhadas são produzidas por fosforilação em nível de substrato, enquanto as circundadas por um retângulo são produzidas por fosforilação oxidativa. Os metabólitos circulados encontram-se em pontos de bifurcação da via. As proteínas marcadas em vermelho apresentam sua expressão regulada por TcRRM2 durante condições de estresse nutricional em *Trypanosoma cruzi*.

Apesar dos parasitas serem capazes de utilizar formas alternativas de obtenção de energia (como degradação de prolina) os procíclicos fazem um eficiente uso de glucose que é a fonte de carbono preferida quando presente em abundância. Apesar da fosforilação oxidativa se encontrar ativa, o mecanismo crítico para o crescimento do parasita é a fosforilação em nível de substrato. A glucose é convertida por fermentação aeróbica em produtos finais parcialmente oxidados, como succinato e acetato (EBIKEME *et al*, 2010).

A partir da glicólise, há a formação de diversos intermediários no glicossomo, até que o fosfoenolpiruvato (PEP) seja produzido no citosol. A partir deste ponto o PEP pode ser utilizado de diferentes maneiras: pode ser diretamente convertido em piruvato no citosol; pode entrar no glicossomo e neste compartimento celular ser convertido em piruvato, que é redirecionado para a mitocôndria e lá utilizado para a produção de acetato, e por fim pode entrar no glicossomo e ser convertido em succinato. Uma via alternativa é aquela em que após a conversão para malato, este seja transportado para a mitocôndria onde ocorreria a produção de succinato por outra via (EBIKEME *et al*, 2010).

O balanço entre consumo e produção de NADH nos glicossomos é uma etapa rigorosamente controlada. O NADH resultante da reação catalisada pela enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase precisa ser re-oxidado ainda dentro desta organela, e há evidências de que as duas NADH oxidoreduases glicosomais (presentes na via de fermentação de succinato) estejam envolvidas neste processo (BESTEIRO *et al*, 2002).

O balanço redox glicossomal também poderia teoricamente ser mantido pelo mecanismo glicerol-3-fosfato/dihidroxiacetona fosfato (Gly-3-P/DHAP), intermediários da via glicolítica. Nesta via estariam envolvidos a enzima glicossomal glicerol-3-fosfato desidrogenase dependente de NADH, que produz Gly-3-P a partir de DHAP; um transportador glicossomal hipotético que troque Gly-3-P por DHAP e a enzima glicerol-3-fosfato dehydrogenase (GPDH) dependente de FAD que regenera DHAP a partir de Gly-3-P (FAD-GPDH). Os elétrons produzidos na reação da enzima FAD-GPDH são transferidos para o oxigênio através da cadeia respiratória mitocondrial. O Gly-3-P poderia ainda ser convertido em glicerol nos glicossomos, com a produção de uma molécula de NAD por molécula de glicerol excretada.

Um estudo com parasitas nocaute para a enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) demonstrou que na ausência da via de fermentação de succinato, a via Gly-3-P/DHAP é preferencialmente utilizada no metabolismo energético (EBIKEME *et al*, 2010).

Três enzimas glicosomais foram encontradas reguladas por TcRRM2 durante a condição de estresse nutricional. O aumento de expressão da **hexoquinase**, primeira enzima da via de processamento de glucose no glicossomo, poderia refletir uma tentativa de aumentar a entrada de glucose no glicossomo, como reflexo da baixa quantidade de glucose disponível no citoplasma devido ao estresse nutricional. O aumento da expressão de **piruvato fosfato diquinase** poderia refletir um aumento da quantidade de piruvato enviada para a mitocôndria, em detrimento do fosfoenolpiruvato enviado para a produção de

succinato. Devido à necessidade de compensação do balanço de NAD dentro do glicosomo, poderia estar ocorrendo uma regulação positiva da enzima **fumarato redutase NADH dependente**, que converte fumarato em succinato.

4.12.2 Análise de alvos relacionados à cadeia respiratória

O transporte de Pi (fosfato inorgânico) para dentro da mitocôndria é essencial para o processo de fosforilação oxidativa que transforma ADP em ATP. Uma proteína transportadora de fosfato, localizada na membrana interna da mitocôndria, é responsável por facilitar o carregamento de Pi para dentro da matriz mitocondrial. Este transporte pode ocorrer de três maneiras: através do simporte fosfato/H⁺ ou do antiporte fosfato OH⁻, além de realizar a troca de fosfatos entre matriz e citoplasma. Desta forma, pode-se dizer que o gradiente de prótons gerado pela cadeia transportadora de elétrons leva a um acúmulo de altos níveis de fosfato na matriz mitocondrial. O fosfato presente na matriz mitocondrial possui duas funções fisiológicas: a primeira é servir como substrato para a fosforilação oxidativa, e síntese de ATP. O fosfato mitocondrial pode também ser enviado de volta para fora da mitocôndria e trocado por ácidos dicarboxílicos como malato e succinato, utilizados para a obtenção de energia (revisto por MCINTOSH & OLIVER, 1994).

Um desenho esquemático contendo os alvos associados a TcRRM2 que estão associados a cadeia respiratória é mostrado na Figura 4.30.

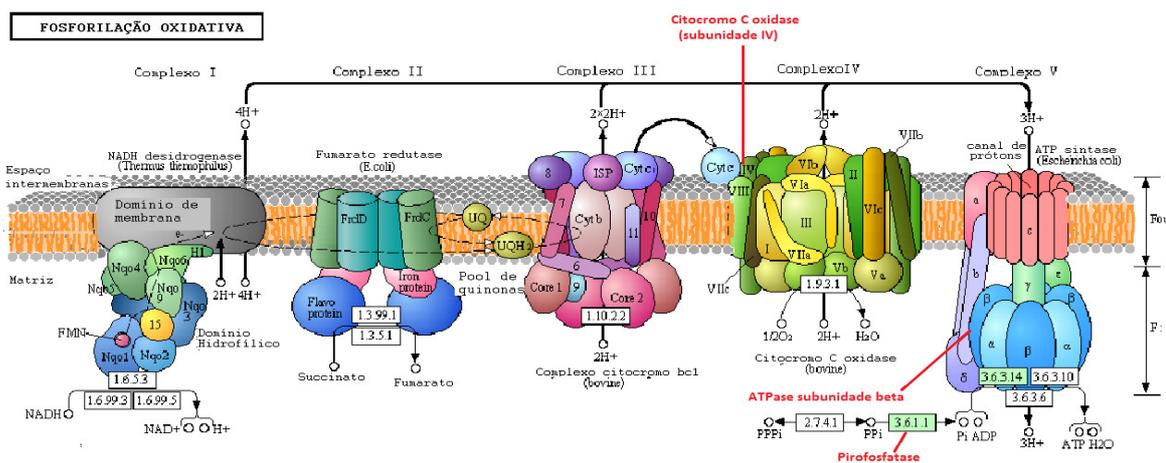


FIGURA 4.30 – Regulação de proteínas pertencentes a cadeia respiratória. Em destaque estão assinaladas as proteínas correspondentes aos mRNAs associados a TcRRM2.

A regulação do **transportador de fosfato mitocondrial** observada durante a condição de estresse nutricional em *T. cruzi* corrobora com os dados na literatura que demonstram

que a fosforilação oxidativa se torna uma importante forma de obtenção de ATP em parasitas cultivados na ausência de glucose. Foi identificada também uma pirofosfatase inorgânica relacionada à cadeia respiratória (**pirofosfatase translocadora de prótons 1, tipo vacuolar, putativa**) associada a TcRRM2 nesta etapa do ciclo de vida. A regulação das enzimas **Citocromo C oxidase** e da subunidade beta da **ATP sintase** condizem com um maior uso da cadeia transportadora de elétrons em parasitas submetidos a esta condição fisiológica (revisto por MCINTOSH & OLIVER, 1994).

4.12.3 Análise de alvos relacionados ao metabolismo de glutamato

Os aminoácidos são essenciais para *T. cruzi*, já que em diversos momentos podem ser utilizados como fonte de energia, e participam em processos metabólicos que ajudam o parasita a se adaptar a novos ambientes. A prolina, metabolicamente relacionada ao glutamato, entre outras funções, ajuda o parasita a crescer em condições de baixa concentração de glucose (MAGDALENO *et al*, 2011).

Já o aminoácido glutamato, está mais envolvido em osmoregulação e controle do volume da célula, mas também pode ser utilizado na obtenção de energia. De acordo suas necessidades nutricionais, o parasita pode utilizar L-glutamato presente na célula para a incorporação em proteínas, ou sua cadeia carbônica pode ser utilizada para obtenção de energia, através de transferência para a via metabólica de arginina ou prolina (MAGDALENO *et al*, 2011).

A enzima **[delta]-pirrolina-5-carboxilato sintetase** é bastante estudada em plantas, e é descrita como capaz de converter glutamato a [delta]-pyrrolina-5-carboxilato. A via de conversão de prolina em plantas é similar a de bactérias. Em *E. coli*, a conversão se inicia através da fosforilação de glutamato por uma γ glutamil quinase, o que da origem a um γ glutamil fosfato. Este composto é reduzido a um semialdeido glutâmico γ (GSA), através da ação de uma GSA desidrogenase. O GSA cicliza espontaneamente para um A-pyrrolina-5-Carboxilato (P5C), que é reduzido por uma P5C redutase para a produção de prolina. Em plantas, a enzima **[delta]-pirrolina-5-carboxilato sintetase** parece ter dupla função, agindo como uma γ glutamil quinase e como uma GSA desidrogenase, levando a formação de [delta]-pyrrolina-5-carboxilato.

Uma enzima semelhante à **pirrolina-5-carboxilato sintetase**, foi identificada entre os alvos de TcRRM2 e possui atividade de glutamato-5-semialdeido desidrogenase de acordo com o website www.tritrypdb.org. Possivelmente esta enzima está agindo no metabolismo

de glutamato para a obtenção de energia durante a condição de estresse nutricional, contribuindo na formação de γ semialdeído glutamato de modo que as cadeias carbônicas do glutamato possam ser mobilizadas para a via de metabolismo de prolina de forma a obter energia.

A enzima **glutamato desidrogenase**, que produz o α -cetoglutarato que é processado no ciclo de Krebs para a obtenção de energia, também se encontra regulada por TcRRM2. Em concordância com os dados na literatura, esses resultados sugerem que o glutamato presente na célula esteja sendo mobilizado para a obtenção de energia, o que condiz com a regulação positiva de enzimas envolvidas neste processo, como demonstrado na Figura 4.29.

4.12.4 Análise de alvos relacionados ao Ciclo de Krebs

Estudos demonstram que em procíclicos de *T. brucei* cultivados sob condições normais, as enzimas do ciclo de Krebs podem possuir outras funções em vez da degradação completa de substratos mitocondriais. Nestes organismos, os nutrientes não são completamente degradados a CO_2 através do ciclo. Em vez disso, a prolina é preferencialmente degradada a succinato, enquanto a glucose é degradada a acetato, succinato e alanina, e a produção de succinato a partir da glucose ocorre preferencialmente no glicossomo (CROSS *et al*, 1975).

As variações na disponibilidade de glucose enfrentadas pelo parasita levam a adaptações do metabolismo. A enzima fosfoglicerato kinase está localizada também nos glicossomos, já que de outro modo ocorreria um déficit de ATP dentro desta organela. Entre outras alterações importantes, as enzimas α -cetoglutarato desidrogenase e **succinil-CoA sintetase** são utilizadas na degradação de prolina e glutamato a succinato. As enzimas do ciclo de Krebs succinato desidrogenase e fumarase seriam utilizadas na gluconeogênese (na etapa de conversão de succinato em malato). Já as enzimas citrato sintase, piruvato desidrogenase e malato desidrogenase seriam utilizadas para transportar acetil-CoA da mitocôndria ao citosol, onde seria utilizado na biossíntese de ácidos graxos (VAN WEELDEN, *et al*, 2005).

A enzima **succinil CoA sintetase** foi identificada associada a TcRRM2 durante condição de estresse nutricional, bem como duas enzimas relacionadas a síntese de α -cetoglutarato por duas diferentes vias (**Isocitrato desidrogenase e glutamato desidrogenase**), embora a enzima α -cetoglutarato desidrogenase não tenha sido identificada. Estes resultados estão em concordância com a hipótese que *T. cruzi* utiliza as

enzimas do ciclo de Krebs para a degradação de aminoácidos de modo a obter energia durante a condição de estresse nutricional.

4.12.5 Análise de alvos relacionados à Via das Pentoses Fosfato (PPP)

Na maioria dos eucariotos, a glucose é metabolizada por duas principais vias: a glicolítica tradicional, também chamada glicólise Embden-Meyerhof, e a via das pentoses fosfato (PPP). Experimentos demonstraram que cerca de 10% da glucose metabolizada pela célula é processada via PPP. A depleção de NADPH induzida pelo tratamento com azul de metileno em baixas concentrações induz um aumento no fluxo de metabolismo de glucose via PPP de 10 para 20%. Aumentando a proporção NADP/NADPH, o azul de metileno inibe a primeira enzima da via, a glucose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH), devido à concentração da coenzima reduzida (Revisto por IGOILLO-ESTEVE *et al*, 2007).

As sete enzimas da via das pentoses fosfato estão presentes em todos os estágios de diferenciação de *T. cruzi*. Em epimastigotas apresentam múltiplas localizações subcelulares, e maior parte da atividade enzimática é detectada em frações citosólicas por diferentes técnicas de investigação. Destas enzimas, seis apresentam maior atividade no tripomastigota metacíclico, incluindo a **transcetolase** (Revisto por IGOILLO-ESTEVE *et al*, 2007), encontrada associada a TcRRM2 durante condição de estresse nutricional. A representação esquemática da via das pentoses fosfato é demonstrada na Figura 4.31.

Em promastigotas de *Leishmania*, já foi demonstrado que a **transcetolase** apresenta uma localização dupla, citoplasmática e glicossomal, que se deve a presença de uma sequência consenso em sua região C terminal. Como a proteína de *T. cruzi* apresenta a mesma região conservada, é provável que sua localização subcelular seja a mesma do ortólogo de *Leishmania*. A localização parcial dentro do glicossomo permite a produção de ribose-5-fosfato (R5P) e NADPH, necessários para outras etapas enzimáticas que ocorrem dentro desta organela. Além disso, o NADPH pode estar envolvido na defesa contra espécies reativas de oxigênio (ROS), provavelmente formados devido à flutuação nos níveis de glucose no meio em que o parasita se encontra (Revisto por IGOILLO-ESTEVE *et al*, 2007).

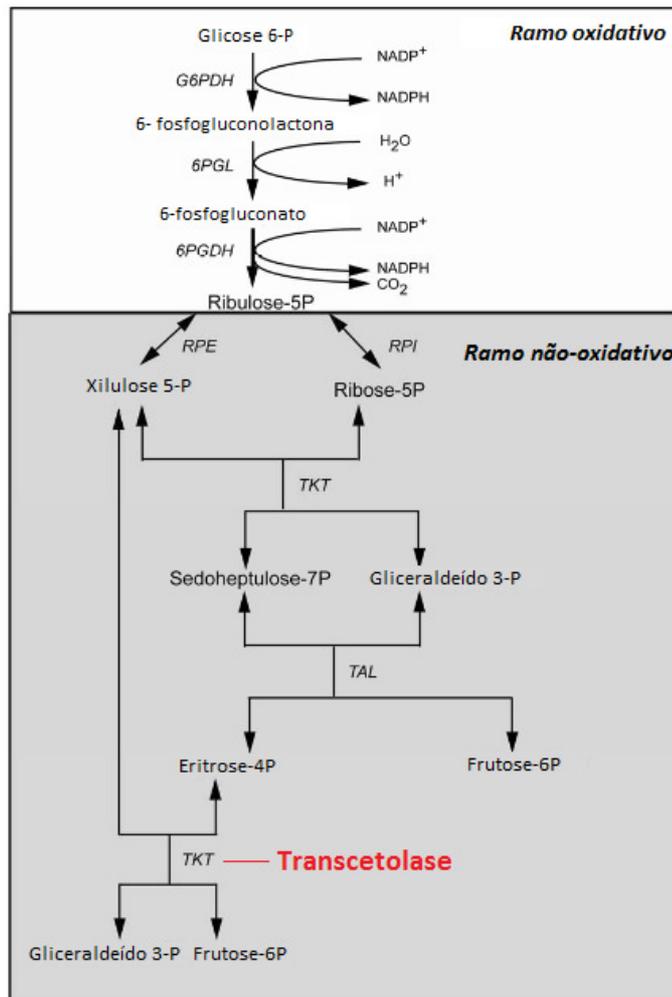


FIGURA 4.31 – Representação esquemática da via das pentoses fosfato. As enzimas envolvidas são glucose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH), 6-fosfogluconolactonase (6-PGL), 6-fosfogluconate desidrogenase (6PGDH), ribose 5-fosfato isomerase (RPI), ribulose 5-fosfato epimerase (RPE), transaldolase (TAL) and transcetolase (TKT). Em destaque estão assinaladas as proteínas correspondentes aos mRNAs associados a TcRRM2. Modificado de (IGOILLO-ESTEVE *et al*, 2007).

A **transcetolase** participa também na etapa final da via das pentoses fosfato, quando ocorre a formação de gliceraldeído-3-fosfato ou frutose-6-fosfato. Desta forma, a **transcetolase** poderia estar funcionando também na regulação da via das pentoses, caso esta seja importante no metabolismo energético do parasita durante condições de estresse nutricional.

4.12.6 Análise de alvos relacionados à resposta a estresse oxidativo

As álcool desidrogenases são enzimas presentes em diversos organismos que facilitam a conversão entre alcoóis e aldeídos ou cetonas, através da redução do NAD⁺. Em mamíferos, esta enzima funciona no processo de detoxificação celular, além de ser importante na biossíntese de diversas moléculas. Em leveduras, plantas e algumas bactérias,

algumas álcool desidrogenases são capazes de catalisar a reação oposta como parte do processo de fermentação, a fim de garantir um suprimento constante de NAD⁺. O consumo de glucose em tripanosomatídeos envolve a geração de produtos reduzidos que podem variar dependendo da espécie, em um mecanismo de fermentação que ocorre em condições anaeróbicas ou aeróbicas, caracterizando a “fermentação aeróbica” da glucose. A produção destes produtos fermentativos se deve, em parte, à relativa ineficiência da cadeia respiratória, que não possui NADH desidrogenase e usa o succinato preferencialmente como substrato (CAZZULO,1992). Portanto, a enzima álcool desidrogenase poderia funcionar em condições celulares normais na geração de NAD⁺.

O estresse oxidativo ocorre quando espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas em excesso ou não são eliminadas eficientemente das células. Estas espécies reativas podem ser radicais livres como íons superóxido, hidroxil, peroxil, hidroperoxil e moléculas não-radicais como peróxido de hidrogênio e ácido hidrocloreto. Organismos vivos necessitam desenvolver mecanismos antioxidantes de defesa, de modo a eliminar espécies reativas de oxigênio e minimizar os danos causados por elas. As enzimas do ciclo da glutathione catalizam a síntese, degradação e reciclagem de moléculas antioxidantes, e podem também funcionar diretamente na remoção de radicais livres da célula (YANG *et al*). As enzimas do tipo glutathione-S-transferase são capazes de catalisar a conjugação de uma glutathione reduzida a centros eletrofílicos de vários tipos de substratos. Esse mecanismo funciona como uma detoxificação de alguns compostos celulares, como lipídeos peroxidados, que se formam, por exemplo, quando radicais livres “roubam” elétrons de lipídeos da membrana celular (DOUGLAS,1987).

Em eucariotos, flutuações agudas dos níveis de glucose são capazes de promover estresse oxidativo. Além disso, o contato da célula com níveis elevados de glucose pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Revisto por YANG *et al*). Durante o seu ciclo de vida, o *T. cruzi* é exposto a diversos ambientes, devido às diferentes condições fisiológicas de seus hospedeiros. Quando invade o hospedeiro vertebrado, o tripomastigota metacíclico atinge a corrente sanguínea, onde é exposto a elevados níveis de glucose, em contraste aos baixos níveis encontrados no intestino do inseto vetor. Neste momento, provavelmente é gerado um estresse oxidativo, em resposta aos elevados níveis de glucose, e deve ocorrer a formação de radicais livres, justificando a necessidade de expressão da enzima glutathione S transferase.

Durante a condição de estresse nutricional, devido a flutuação nos níveis de glucose, provavelmente estas proteínas passam a ser mais necessárias para a célula, justificando a regulação do mRNA correspondente a glutathione S transferase e álcool desidrogenase em complexos mRNP nucleares contendo a proteína TcRRM2, como observado nos resultados de ribonômica.

Observou-se através destas análises que diversos mRNAs ligados a TcRRM2 durante a condição de estresse nutricional correspondem a proteínas envolvidas em processos metabólicos, o que sugere que TcRRM2 possua um papel importante de regulação em *T. cruzi*. Além dessas potenciais funções regulatórias, muitos dos alvos identificados apresentam uma compartimentalização funcional, como é o caso das proteínas de reservossomos, retículo endoplasmático e citoesqueleto, demonstrando o envolvimento dos alvos de TcRRM2 em vias específicas da célula.

4.13 ANÁLISE DOS ALVOS DE TcRRM2 RELACIONADOS À COMPOSIÇÃO DO FLAGELO

Os cílios e flagelos são estruturas complexas, presentes em diversos organismos eucarióticos, desde os unicelulares até os mamíferos. Apesar de possuírem uma estrutura básica conservada entre eles, há uma enorme diversidade de composição molecular e função destas estruturas através das espécies. Em protozoários, o flagelo é particularmente importante, e exerce funções essenciais para a sobrevivência do parasita (revisto por MARANDE & KOHL, 2011).

A ausência de glucose induz mudanças de expressão gênica em epimastigotas que atingiram a fase estacionária, induzindo alterações bioquímicas e morfológicas nos parasitas, muitas delas já importantes para o processo de diferenciação que sucede o estresse nutricional. Algumas dessas alterações envolvem diferença de tamanho e funcionalidade do flagelo (revisto por TYLER e ENGMAN, 2000).

A redução no nível de glicosilação das proteínas de membrana torna a superfície do parasita mais hidrofóbica, o que leva à posterior adesão do flagelo ao substrato onde o parasita se encontra. A depleção de glucose pode também sinalizar para um aumento da expressão de componentes flagelares, utilizando parte da mesma via utilizada para aumentar a expressão de componentes mitocondriais. É observado um aumento do comprimento médio do flagelo, que pode até triplicar de tamanho (TYLER e ENGMAN, 2000).

Em concordância com esse panorama celular, foram identificados no experimento de ribonômica, mRNAs correspondentes a componentes da estrutura flagelar, além do mRNA

codificante para proteína **cinesina**, conhecida como uma proteína motora geralmente associada a citoesqueleto. Os flagelos são montados através do transporte intraflagelar, pela ação de proteínas motoras como cinesina e dineína. Análises filogenéticas e funcionais determinaram que em protozoários são observadas pelo menos 7 diferentes famílias de cinesinas compostas de um domínio motor bem conservado, e outros domínios variáveis, associadas a montagem e função do flagelo (revisto por MARANDE & KOHL, 2011). A regulação positiva da expressão de cinesina pelos mRNPs contendo TcRRM2 durante condições de estresse (mRNA **cinesina, putativa**), poderia ser explicada já que a necessidade de montagem do flagelo ocorre pelo aumento de tamanho observado em condições de ausência de glucose.

A estrutura paraflagelar (também conhecida como estrutura paraxial ou paraxonemal) é uma estrutura que se localiza entre o axonema e a membrana flagelar, de formato cilíndrico e que se estende por quase todo o comprimento do flagelo. Ocorre em diversos grupos que possuem cílios e flagelos, incluindo algas e parasitas da ordem kinetoplastida, e sua estrutura e composição podem ser bem diferentes nos diversos grupos. Os mRNAs **paraflagelar 69kDa, putativa; componente da estrutura paraflagelar, putativo; e componente do bastão paraxonelam PAR2**, regulados por TcRRM2 durante o estresse nutricional, estão provavelmente associados a esta estrutura.

Os dados sugerem que TcRRM2 esteja regulando positivamente a expressão destes alvos, que costumam ter sua expressão aumentada durante a condição de estresse nutricional, e que como observado no trabalho e descrito na literatura, a regulação de componentes flagelares se dá pela mesma via que aumenta a expressão de proteínas mitocondriais durante a ausência de glucose. Esta via de regulação pode envolver a proteína TcRRM2 bem como os complexos mRNP a ela associados.

4.14 ANÁLISE DOS ALVOS DE TcRRM2 RELACIONADOS AO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

Foram identificados mRNAs relacionados ao reticulo endoplasmático, mais associados a TcRRM2 durante a condição de estresse nutricional, como demonstrado na figura 4.32. As proteínas secretadas pelas células são diferenciadas de proteínas citosólicas através do processo de translocação para o reticulo endoplasmático. As proteínas Sec61p, diretamente envolvida no processo de translocação, e BiP (também conhecida como GRP78), envolvida em duas etapas da translocação, além de outras funções, são muito importantes para este processo (SANDERS *et al*, 2004).

A proteína BiP (“Immunoglobulin heavy chain binding protein”) é um dos maiores constituintes do retículo endoplasmático em células de mamíferos. Sua síntese é constitutiva sob condições celulares normais e condições como ausência de glucose ou utilização de drogas que inibem a glicosilação são capazes de aumentar sua expressão. Dados demonstram que BiP se liga transitoriamente a proteínas secretadas e proteínas de membrana no momento em que estão sendo produzidas. BiP também pode se ligar permanentemente a proteínas mal dobradas que se acumulam no retículo e há evidências de que a presença de proteínas dobradas incorretamente podem induzir a um aumento de expressão de BiP (KOZUTSUMI *et al*, 1988).

Um aumento de expressão de biP em *T. cruzi* neste caso, poderia estar associado à presença de proteínas mal dobradas no RE devido ao estresse nutricional, ou ainda à necessidade de uma maior expressão de proteínas secretadas e de membrana associadas à diferenciação e infecção. As glicoproteínas de membrana possuem um papel essencial na infecção, por mediar a interação entre o parasita e a célula do mamífero, momentos antes de sua interiorização. Além disso, sabe-se que a cruzipaina, uma glicoproteína lisossomal, está diretamente envolvida nos processos de diferenciação em *T. cruzi* (CONTE *et al*, 2003).

A associação de BiP a mRNPs contendo TcRRM2, promovendo sua regulação durante o estresse nutricional, seria condizente com os dados na literatura que demonstram uma maior expressão durante esta etapa do ciclo de vida.

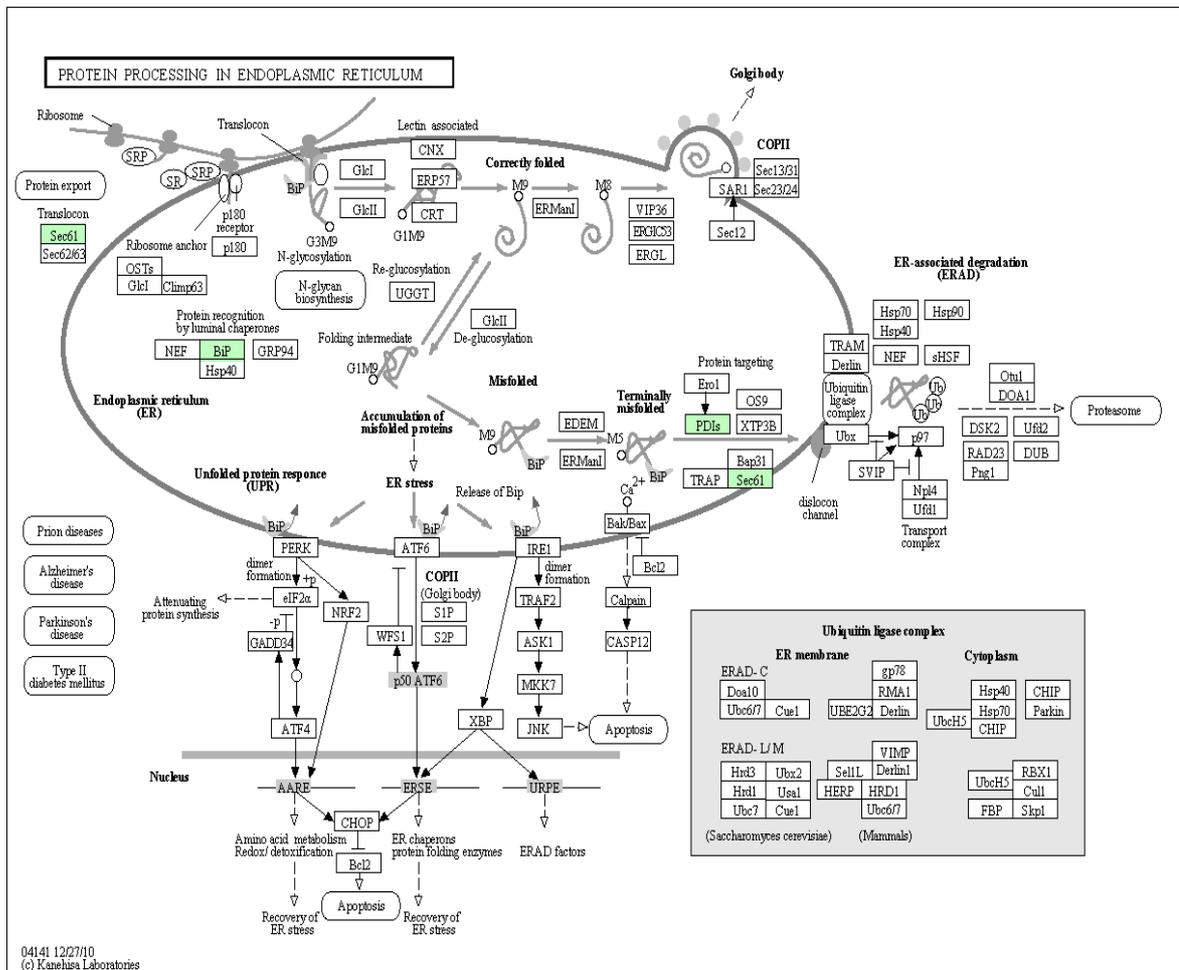
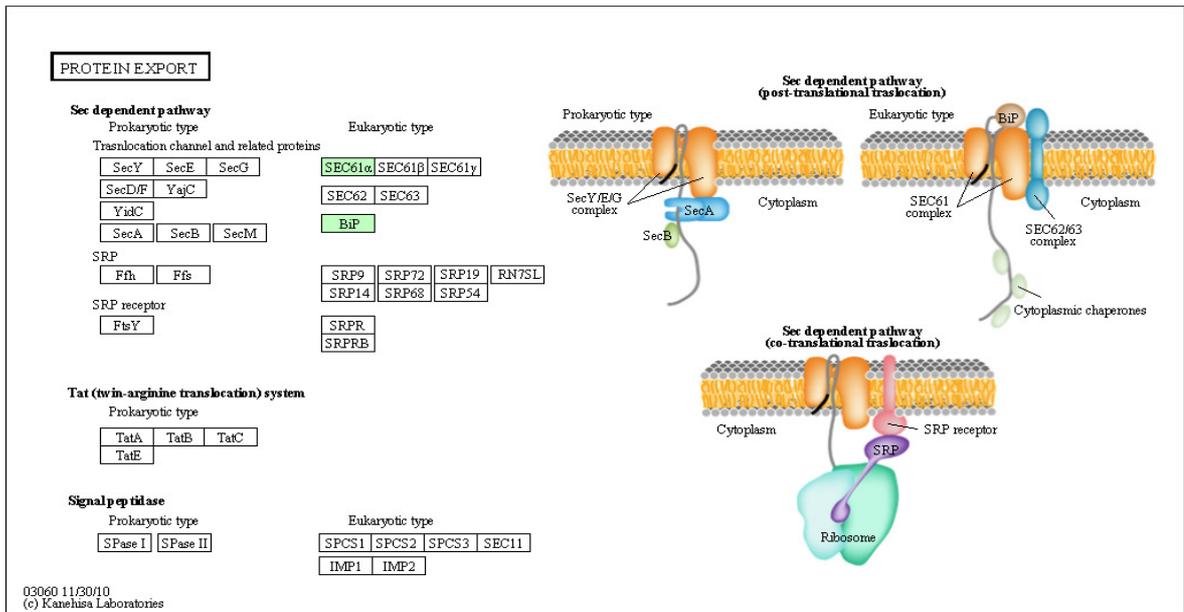


FIGURA 4.32 Análise dos alvos associados a retículo endoplasmático. Assinalados em verde os alvos identificados associados a TcRRM2.

4.15 ANÁLISE DOS ALVOS DE TcRRM2 RELACIONADOS AO RESERVOSSOMO

Os reservossomos são organelas responsáveis pela digestão de materiais endocitados, produção de substratos necessários para alterações metabólicas além de possuírem um papel importante na metaciclogênese, já que no processo de diferenciação de epimastigotas para o estágio infectivo tripomastigota metacíclico, o reservossomo desaparece e todo o seu conteúdo é massivamente degradado (CUNHA-E-SILVA *et al*, 2006).

Análises de proteômica de reservossomos isolados demonstraram a presença nesta organela de diversas proteases, enzimas associadas ao metabolismo de lipídeos, entre outras (SANTANNA *et al*, 2009). Entre as hidrolases ácidas encontradas nos reservossomos, podemos destacar a presença de **cisteíno proteases, cisteíno peptidase calpaína, cisteíno protease C**, todas encontradas ligadas a TcRRM2 durante a condição de estresse nutricional. Apesar de haver controvérsias sobre o reservossomo possuir ou não atividade de lisossomo, resultados de proteômica confirmam que esta organela abriga diversas hidrolases consideradas lisossomais, tendo um importante papel de regulador endógeno de proteínas neste parasita (SANTANNA *et al*, 2009). Estudos demonstram que em parasitas em fase estacionária, sofrendo estresse nutricional a atividade proteolítica nos lisossomos é aumentada (HENRIQUEZ *et al*, 1993). A superexpressão de hidrolases lisossomais durante o estresse condiz com uma maior ligação destas aos mRNPs contendo TcRRM2.

O principal esteroide produzido por *T. cruzi* é o ergosterol (sua via biossintética é sugerida como alvo para a quimioterapia da doença de chagas), e o parasita não sintetiza colesterol. Os epimastigotas adquirem o colesterol que necessitam na forma de LDL, a partir da dieta do inseto hematófago, seu hospedeiro nesta etapa do ciclo de vida. A absorção de colesterol pelo *T. cruzi* ocorre através do citóstoma e da bolsa flagelar, e as vesículas contendo LDL se fundem com endossomos iniciais. As moléculas são então redirecionadas ao reservossomo, última organela da via endocítica do parasita (PEREIRA *et al*, 2011).

Os reservossomos caracterizam-se como organelas arredondadas localizadas na região posterior do parasita, compostos principalmente pelos lipídeos colesterol (“colesteryl esters”) e ergosterol. Contêm em seu interior uma matriz e membranas internas, além de inclusões lipídicas que podem ter o formato de bastões retangulares ou formato discóide. As inclusões lipídicas presentes nos reservossomos são circundadas por uma camada de fosfolipídeos, de maneira similar aos cristais de colesterol observados em lisossomos de células de mamíferos, como uma resposta a uma excessiva internalização de lipoproteínas (PEREIRA *et al*, 2011).

O colesterol é muito importante para a fisiologia celular em diversos organismos, já que está envolvido na fluidez de membrana, regulação do tráfego através da membrana e em eventos de sinalização. Dados na literatura demonstram que as gotas lipídicas retangulares e esféricas presentes nos reservossomos são formadas basicamente por colesterol, e que os epimastigotas são capazes de consumir este estoque de colesterol dos reservossomos quando cultivados em ausência de soro. (PEREIRA *et al*, 2011). A presença de enzimas envolvidas no metabolismo de esteróis entre os alvos de TcRRM2 condiz com a importância do remodelamento destes lipídeos durante a condição de estresse nutricional e metaciclogênese.

A cruzipaina é uma cisteína proteinase da família das papaínas que possui uma grande homologia com a catepsina L, e possui um domínio C terminal incomum, assim como as outras cisteína proteinases de *T. cruzi*. É sintetizada na forma de um precursor que, após clivagem em seu domínio N terminal, da origem à enzima madura. É expressa em diversas isoformas por todo o ciclo de vida do parasita, e codificada por diferentes genes. Sua localização diferencial determina a realização de funções estágio-específicas. Em epimastigotas, a cruzipaina se localiza no reservossomo, em metacíclicos passa a uma localização na bolsa flagelar e no amastigota se espalha na superfície celular, enfatizando sua importância nos processos de crescimento, diferenciação, e infectividade do parasita (GIORDANENGO *et al*, 2002). Diversos mRNAs relacionados à cruzipaina foram encontrados associados a TcRRM2 durante condição de estresse nutricional. Além disso, através do ensaio de FISH observou-se que a localização subcelular do mRNA de cruzipaina durante condição de estresse nutricional torna-se nuclear, condizendo com a localização de TcRRM2 neste estágio do ciclo de vida do parasita, como pode ser observado na Figura 4.36.

Outra proteína de grande importância associada ao processo de infectividade do parasita, localizada entre os alvos de TcRRM2, é a prostaglandina F 2 alfa sintase, também conhecida como OYE (*old yellow enzyme*). A antiga enzima amarela, ou OYE foi originalmente isolada a partir de leveduras na década de 30, como demonstração de uma enzima que necessita de um cofator para sua atividade, no caso o FMN (mononucleotídeo de flavina), derivado da vitamina B2. Há evidências da presença de OYE em bactérias, plantas e leveduras, mas não em animais, o que aumenta o interesse nessa enzima como alvo de drogas, já que a possibilidade de efeitos colaterais no paciente diminui. As famílias de OYE presentes em leveduras e plantas são capazes de reduzir diversos compostos como aldeídos e cetonas insaturados, nitro-ésteres e substratos nitroaromáticos.

A enzima prostaglandina F2 alfa sintase de *T. cruzi* foi inicialmente identificada por KUBATA *et al* em 2002, descrita como uma OYE. A OYE de *T. cruzi* é uma enzima multifuncional, pois além de catalisar a formação de prostaglandina F2alfa, sua atividade é influenciada por drogas tripanocidas. Grande parte das drogas tripanocidas utilizam como mecanismo de ação a redução enzimática, formando radicais aniônicos a partir da droga, que sob condições aeróbicas reduzem oxigênio, levando a formação de íons superóxido que causam estresse oxidativo e morte celular em parasitas suscetíveis. Existem evidências de que esta proteína possui um papel chave no metabolismo de drogas como Naftoquinona e compostos nitroheterocíclicos, já utilizados na quimioterapia da doença de Chagas (KUBATA *et al*, 2002; SUGIYAMA *et al*, 2007).

Juntos estes resultados obtidos no experimento de ribonômica suportam a evidência de que TcRRM2 esteja agindo na regulação de proteínas importantes para o processo de infectividade do parasita e metabolismo de drogas (como cruzipaina e PF2alfa sintase) além de mRNAs associados a diversas vias metabólicas essenciais para o parasita durante a condição de estresse nutricional. Isso evidencia que a via de regulação de mRNAs mediada por mRNPs contendo TcRRM2 possui grande importância na fisiologia do parasita, e pode servir como um futuro alvo de drogas contra a doença de Chagas.

4.16 IDENTIFICAÇÃO DE MOTIVOS COMPARTILHADOS ENTRE OS mRNAs ASSOCIADOS A TcRRM2

Foi realizada a busca por motivos conservados nos mRNAs associados a TcRRM2, através da ferramenta MEME, disponível no website <http://meme.sdsc.edu>. Foram identificados entre os alvos TcRRM2 dois motivos comuns para a maioria dos mRNAs: um deles na região 3'UTR dos mensageiros e outro na região 5'UTR. Dos 101 mRNAs submetidos a análise, 35 deles possuíam o motivo conservado na região 5' UTR e 41 deles possuíam o motivo identificado na região 3' UTR (Figura 4.33).

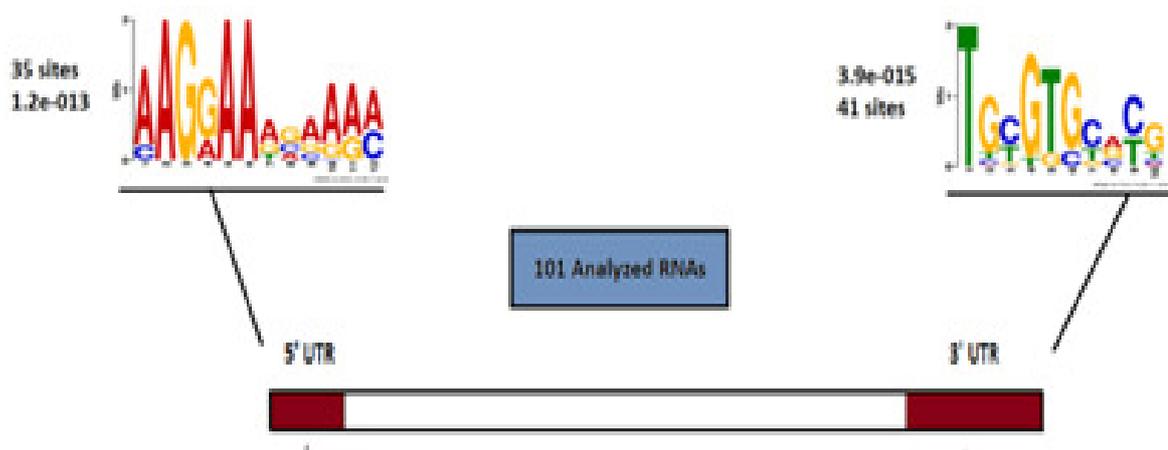


FIGURA 4.33 – Análise de motivos comuns nas regiões 3' e 5' UTR dos mRNAs alvos de TcRRM2

Apesar de ser difícil realizar associação entre os motivos identificados e funções biológicas bem como a motivos regulatórios de outros RNAs conhecidos, a identificação destes motivos é importante, pois possibilita futuras abordagens experimentais para confirmação dos resultados de sequenciamento.

4.17 CONFIRMAÇÃO DOS mRNAs IDENTIFICADOS NO EXPERIMENTO DE RIBONÔMICA ATRAVÉS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO E RT-PCR

Foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores para genes identificados no experimento de ribonômica de modo a confirmar a presença dos mRNAs correspondentes em imunoprecipitados de TcRRM2 através de RT-PCR (transcrição reversa/ reação em cadeia da polimerase). Os IDs dos alvos e as sequências dos iniciadores utilizados para amplificação estão determinados no Anexo 1. Inicialmente os oligonucleotídeos foram testados utilizando-se DNA genômico, e observou-se que todos eles amplificaram corretamente nesta etapa inicial, como demonstrado na Figura 4.34.

Após o teste inicial com DNA genômico, foram testadas amplificações para cada um dos alvos utilizando-se cDNAs provenientes de imunoprecipitados com soros imunes e pré imunes a partir de extratos de epimastigotas e de parasitas submetidos a estresse nutricional. Alguns dos iniciadores não funcionaram quando testados a partir do cDNA, e foram obtidos resultados de confirmação para três genes, correspondentes a PF2 α sintase, proteína do bastão paraflagelar (PFR), e cruzipaína, como observado na figura 4.35.

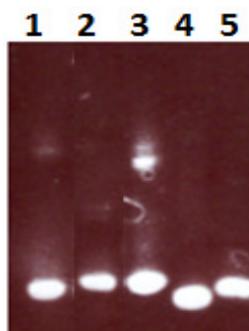


FIGURA 4.34 – Teste inicial de amplificação das sondas para RT-PCR a partir de DNA genômico 1: amplificação do gene PAR2 (proteína do bastão paraflagelar); **2:** amplificação do gene para proteína hipotética conservada pertencente ao complexo de golgi; **3:** amplificação do gene para precursor putativo de cruzipaína; **4:** amplificação do gene para prostaglandina F 2 α sintase; **5:** amplificação do gene lanosterol 14 alfa demetilase putativo.

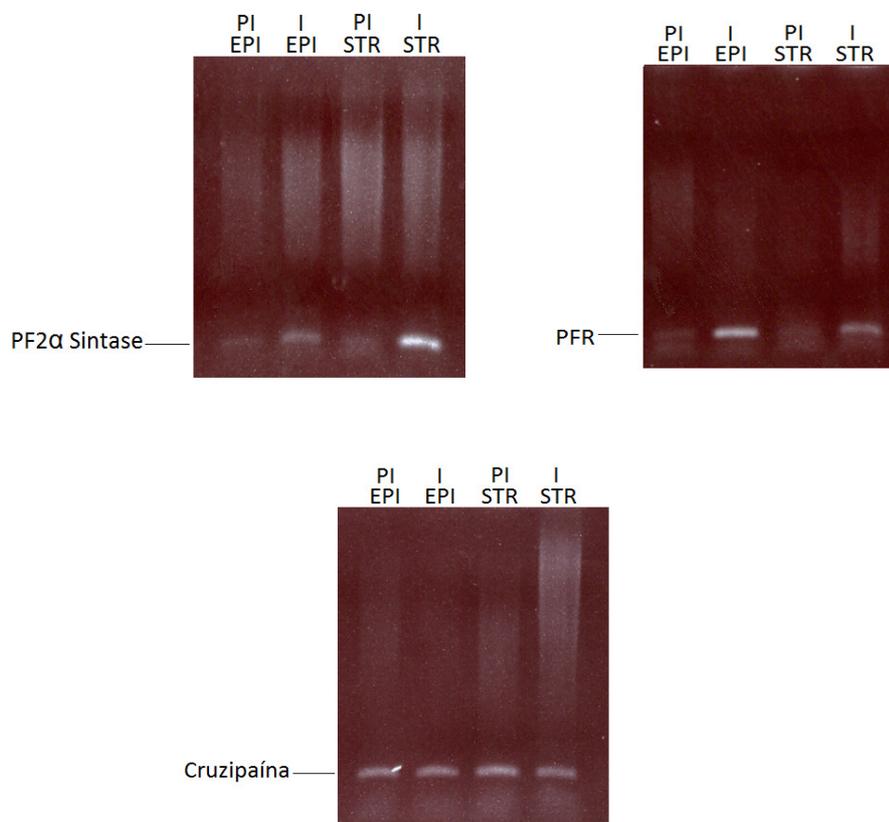


FIGURA 4.35 Amplificação por RT-PCR de alvos de TcRRM2 identificados na ribonômica. PF2 α sintase: resultados correspondentes a amplificação do gene prostaglandina F 2 α sintase; **PFR:** resultados correspondentes a amplificação do gene proteína do bastão paraflagelar (“paraflagellar Rod”); **Cruzipaína:** resultados correspondentes a amplificação do gene cruzipaína; **I e PI:** amplificação a partir de cDNAs obtidos de experimentos de imunoprecipitação com soros Imune e pré Imune, respectivamente; **EPI e STR:** amplificação a partir de cDNAs obtidos de experimentos de imunoprecipitação partindo de parasitas epimastigotas e submetidos a estresse nutricional.

Para os três genes foi observada a amplificação quando partiu-se do cDNA originado dos imunoprecipitados com o anticorpo anti TcRRM2, utilizando extratos de epimastigotas e a parasitas submetidos a estresse nutricional. Para PF2 α sintase e PFR observa-se somente uma pequena “sombra” de fundo nas canaletas correspondentes aos imunoprecipitados de pré-ímmunes, provavelmente provenientes de alguma contaminação, enquanto para os imunoprecipitados com soro ímmune a marcação é forte e específica. Para cruzipaína observou-se uma marcação semelhante nas canaletas correspondentes ao ímmune e ao pré ímmune, talvez devido a grande abundância deste mRNA em relação aos outros, o que poderia exacerbar a contaminação.

Experimentos adicionais (como ensaios de PCR em tempo real) serão necessários para confirmar o resultado relativo à cruzipaina, e também para comparação da quantificação obtidas em epimastigotas e em parasitas submetidos a estresse nutricional, já que a técnica de RT PCR não permite que se tenha um resultado quantitativo.

4.18 IMUNOLocalização DOS mRNAs ALVO DE TcRRM2 ATRAVÉS DE HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE IN SITU (FISH)

A partir dos resultados de sequenciamento obtidos foram escolhidos três mRNA mais representados nas imunoprecipitações de parasitas submetidos a estresse nutricional. A partir destas sequências foram construídas sondas de DNA conjugadas ao fluoróforo Cy5 complementares a estes mRNAs, de modo que estas sequências possuíssem um anelamento complementar aos mRNAs de *T. cruzi* e permitissem a realização de sua imunolocalização através de um ensaio de hibridização fluorescente *in situ*, como demonstrado na Figura 4.36.

Para as três sondas desenhadas, somente a sonda para o mRNA de cruzipaína retornou um bom resultado nos experimentos de FISH. Para as outras duas sondas desenhadas não foi obtido um sinal satisfatório de fluorescência, apesar de utilizadas em uma grande concentração (800 ng de sonda para cada experimento), e isso impediu que sua localização fosse determinada. Este problema pode ter ocorrido devido à baixa abundância do mRNA alvo na célula, ou devido a algum problema de anelamento das sondas a seus mRNAs complementares. No mesmo experimento, porém, foi realizado o anelamento com a sonda de cruzipaína, que gerou resultados satisfatórios, como pode ser observado na Figura 4.36.

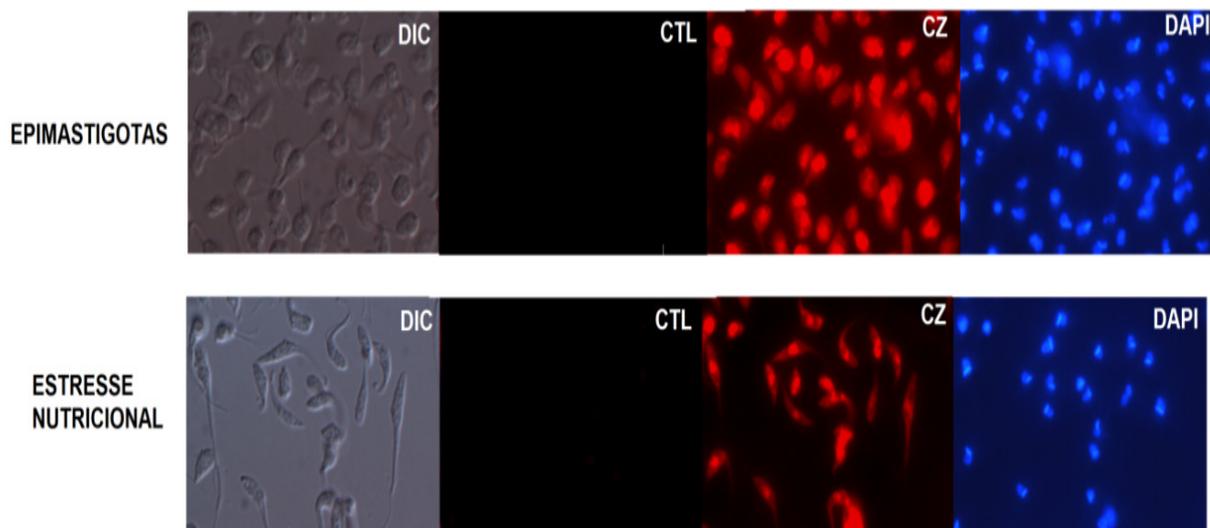


FIGURA 4.36 – Localização subcelular do mRNA de cruzipaina em epimastigotas e em parasitas submetidos a estresse nutricional . DIC: Imagens dos parasitas obtidas através de contraste por interferência diferencial;**CZ:** visualização da marcação obtida através da incubação dos parasitas com a sonda complementar ao mRNA de cruzipaina; **DAPI:** marcação de DNA presente no núcleo e no cinetoplasto; **CTL:** parasitas incubados com os mesmos tampões , porem sem a sonda.

O mRNA de cruzipaina apresentou uma localização citoplasmática em parasitas epimastigotas, e uma localização nuclear em parasitas submetidos a estresse nutricional. Este resultado confirma os resultados de sequenciamento de mRNAs alvo de TcRRM2, já que o mRNA de cruzipaina foi identificado ligado à proteína nuclear TcRRM2 durante condições de estresse nutricional. A cruzipaina é uma cisteino-protease de *T. cruzi* que possui uma enorme importância na sobrevivência do parasita, bem como em seu crescimento e diferenciação. Esta proteína possui localização diferencial de acordo com as etapas do ciclo de vida, sendo encontrada nos reservossomos de epimastigotas. Em tripomastigotas observa-se sua localização na bolsa flagelar, e em amastigotas passa a ser expressa na superfície celular, sendo de fundamental importância para a interação parasita-hospedeiro. A agregação dos mRNAs de cruzipaina a mRNPs nucleares, observado durante a condição de estresse nutricional, poderia funcionar como uma etapa pos-transcricional de regulação da expressão gênica desta proteína. A regulação da expressão de proteínas tão importantes para a sobrevivência e infectividade do parasita sugere que a via de repressão de mRNAs no núcleo durante condições de estresse nutricional deve ser um mecanismo importante de regulação pós-transcricional neste parasita, podendo inclusive funcionar futuramente como alvo de drogas.

4.19 PURIFICAÇÃO DO ANTISORO ANTI TcRRM2 ATRAVÉS DE LIGAÇÃO A PROTEÍNA RECOMBINANTE

O primeiro protocolo que foi testado para imunoprecipitação visando a identificação de proteínas parceiras de TcRRM2 e Tc47.9 utilizava o crosslink químico como estratégia para ligar os anticorpos à resina utilizada na imunoprecipitação. Devido a suspeitas de incompatibilidade entre os reagentes utilizados para o crosslink e a posterior análise dos resultados no LTQ Orbitrap existente no Instituto Carlos Chagas, foram buscadas outras alternativas de ligação do anticorpo à resina.

Um protocolo utilizando resina de proteína A Sepharose foi testado sem as etapas de crosslink químico, porém a grande quantidade de IgG liberada no momento da eluição poderia atrapalhar a análise posterior. Deste modo, foi testado o protocolo utilizando resina de Sepharose ativada com CNBr. Para este experimento foi necessária a purificação do anticorpo a ser utilizado com as proteínas recombinantes utilizadas para sua produção.

Os soros foram misturados a extrato de *E. coli*, a fim de aumentar a eficiência da purificação e posteriormente incubados com uma membrana de nitrocelulose contendo a proteína de interesse imobilizada. Após a incubação, somente os anticorpos específicos que reconheceram as proteínas recombinantes foram eluídos da membrana de nitrocelulose, como demonstrado na figura 4.37.

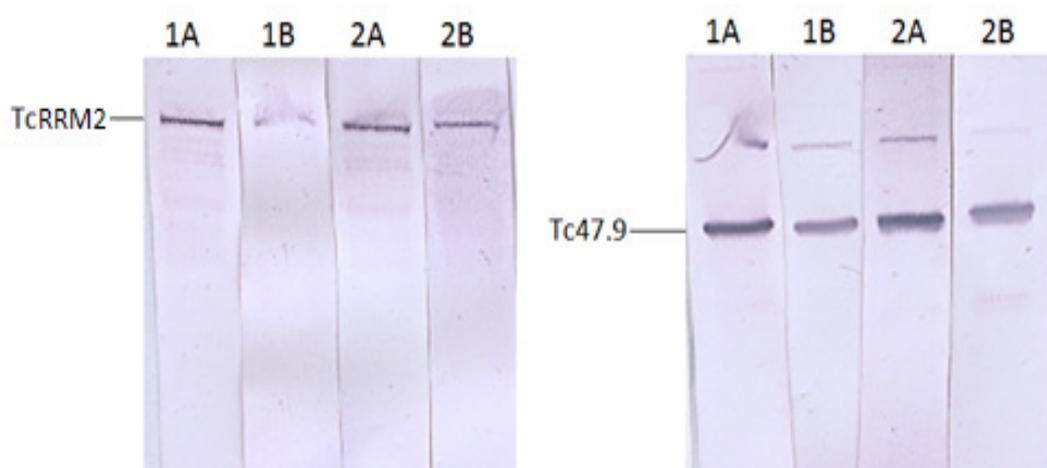


FIGURA 4.37– Purificação dos anticorpos através de incubação com proteína recombinante. 1A, 1B 2A, 2B: alíquotas correspondentes as 4 eluições do anticorpo realizadas na purificação. **TcRRM2 e Tc47.9:** anticorpos anti TcRRM2 e anti Tc47.9, respectivamente.

4.20 ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO UTILIZANDO RESINA DE SEPHAROSE ATIVADA

A purificação dos anticorpos permitiu o início dos testes de imunoprecipitação utilizando resina de Sepharose ativada, já que os anticorpos purificados poderiam ser ligados fortemente à resina sem a necessidade de utilização de *crosslink* químico com DMP (Dimetil pimelimidato) entre a resina e os anticorpos. O protocolo original utilizando resina de Sepharose conjugada a proteína A, amplamente utilizado no laboratório com o objetivo de imunoprecipitar complexos, não gerava resultados satisfatórios na eluição das duas proteínas em estudo.

A comparação inicial entre os dois protocolos demonstrou que o protocolo utilizando Sepharose ativada gerava uma maior recuperação de proteínas na fração eluída do que o protocolo tradicional utilizando proteína A Sepharose, como demonstrado na Figura 4.38. Em seguida foi realizada a comparação entre a obtenção de proteínas com o protocolo de sepharose ativada utilizando epimastigotas e parasitas submetidos a estresse nutricional (Figura 4.39).

Para a proteína Tc 47.9 observou-se um resultado interessante quando foram comparadas as quantidades de proteína obtidas em epimastigotas e em parasitas submetidos a estresse nutricional. Em um trabalho prévio foi descrito que a localização celular de Tc47.9 é nuclear em epimastigotas e durante o estresse nutricional ocorre uma realocação desta proteína em grânulos citoplasmáticos. Como o protocolo utilizado para lise permite uma solubilização parcial de proteínas nucleares no extrato, a menor recuperação nos eluídos de epimastigotas condiz com a menor disponibilidade de Tc47.9 no extrato, enquanto no experimento de estresse nutricional a proteína estaria totalmente disponível em sua forma citoplasmática.

Para a proteína TcRRM2 a imunoprecipitação com Sepharose ativada não resultou em uma boa recuperação de proteína na fração eluída, portanto foi necessária a utilização de outras estratégias.

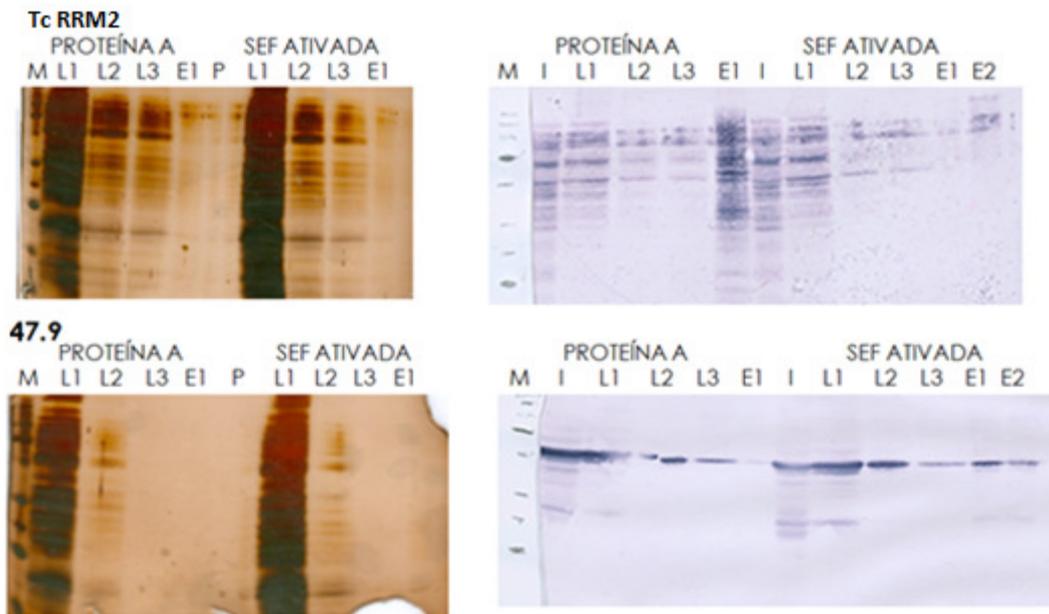


FIGURA 4.38- Comparação entre os resultados de imunoprecipitação utilizando resina de proteína A sepharose e resina de sepharose ativada. I: “input” ou controle com extrato; **L1, L2, L3:** material obtido a partir da primeira, segunda e terceira lavagem, respectivamente; **E1** : material obtido a partir da primeira eluição; **P:** canaleta onde não foi aplicada nenhuma amostra.

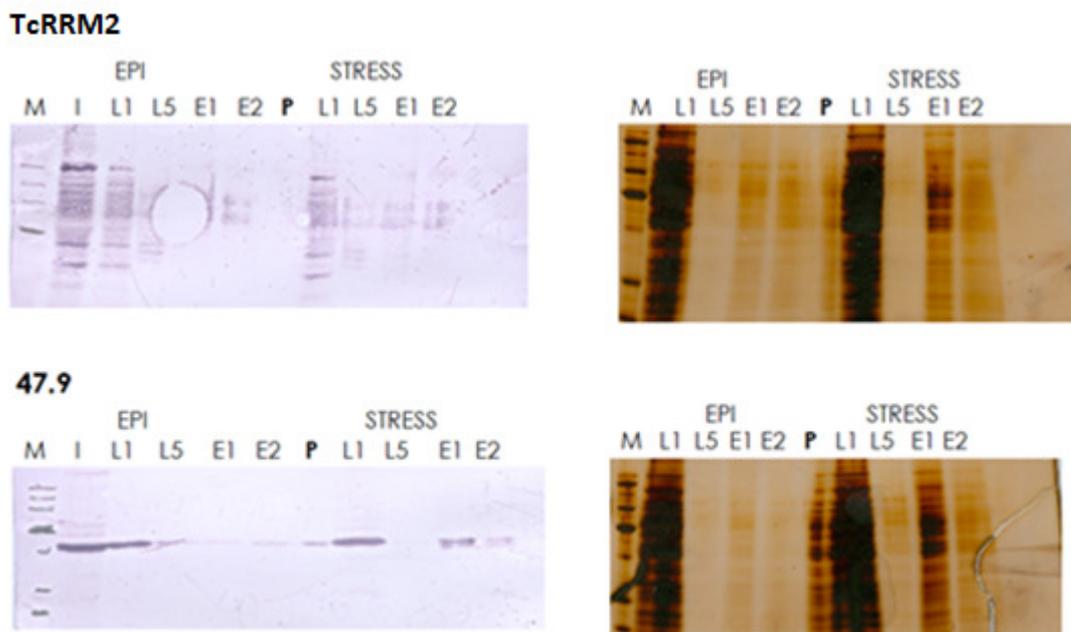


FIGURA 4.39- Análise dos resultados de imunoprecipitação utilizando resina de sepharose ativada em epimastigotas e em parasitas submetidos a estresse nutricional. I: “input” ou controle com extrato; **L1, L5:** material obtido a partir da primeira e quinta lavagem, respectivamente; **E1 e E2:** material obtido a partir da primeira e segunda eluição, respectivamente; **P:** canaleta onde não foi aplicada nenhuma amostra.

4.21 ESTRATEGIAS ALTERNATIVAS DE LISE DE PARASITAS PARA A IMUNOPRECIPITAÇÃO

O protocolo de lise celular utilizado nos experimentos anteriores mostrou que metade da quantidade de proteína disponível nas células não foi solubilizada, e ficando presa ao precipitado foi descartada, como demonstrado na Figura 4.40. Como trata-se de uma proteína relativamente pouco abundante, uma das abordagens utilizadas para tentar uma maior recuperação de TcRRM2 nos eluídos de imunoprecipitação foi a padronização da lise de modo a tentar obter a solubilização total da proteína no extrato utilizado para a imunoprecipitação, maximizando a quantidade da proteína TcRRM2 disponível para ligação com o anticorpo.

Na tentativa de aumentar a obtenção da proteína TcRRM2, foi testado um protocolo para enriquecimento da fração nuclear no extrato total, utilizando lise hipotônica dos parasitas, seguida de centrifugação. O precipitado onde se encontram os núcleos foi separado e submetido a um pulso de sonicação. O material foi novamente centrifugado e obteve-se o sobrenadante correspondente às proteínas solubilizadas a partir dos núcleos e um precipitado com material não solubilizado.

Observou-se que a maior parte da proteína TcRRM2 foi obtida no precipitado, não sendo eficientemente solubilizada com este protocolo utilizado na figura 4.41. Por outro lado, a proteína Tc.47.9, que também possui localização nuclear em epimastigotas solubilizou-se quase completamente com este protocolo. Deste modo, novos protocolos de lise foram testados para a solubilização de TcRRM2.

No decorrer dos experimentos observou-se a incompatibilidade de detergentes não-iônicos, como o NP-40%, com a técnica de espectrometria de massas. Deste modo, foram iniciados os testes de lise por pressão com a utilização de uma bomba de cavitação e o uso de detergentes compatíveis com a técnica de espectrometria, como o Noct (N-octil-B-D-Glicopiranosídeo), como demonstrado na figura 4.42.

Além da dificuldade inicial de solubilização de TcRRM2, havia o problema adicional da não utilização de detergentes. Para o primeiro teste foi realizada a incubação dos parasitas em tampão hipotônico por 30 minutos, de modo a facilitar a lise. Após este período, os parasitas foram submetidos a pressão de 1000psi por 30 minutos em gelo. A pressão de 1000 psi por este período foi padronizada de modo a se obter uma lise da membrana plasmática, mas os núcleos permaneceram intactos. Após centrifugação por 20 minutos a 10000xg, o sobrenadante e precipitado foram coletados e analisados por western blot (Figura 4.42 A) e observou-se que grande parte da proteína se mantinha no precipitado. O

precipitado utilizado para a análise foi então resuspendido em tampão sem detergente e sonificado por 3 vezes de 5 segundos, na potência 2 e centrifugado. O sobrenadante e o precipitado deste experimento foram analisados por western blot, como demonstrado na Figura 4.42 B.). Além de não se observar a solubilização de TcRRM2, aparentemente a proteína foi degradada durante o processo.

Foi realizada uma nova tentativa de lise através da incubação dos parasitas com tampão contendo o detergente Noct na concentração de 0,1%, seguido de 3 pulsos de sonicação por 5 segundos na potência 2. Os parasitas foram centrifugados nas mesmas condições anteriores e em seguida o sobrenadante e o precipitado analisados por western blot. Como pode ser observado na (Figura 4.42, C), a proteína permaneceu completamente no precipitado com a utilização desta estratégia de lise.

Partiu-se então para diversos testes combinando lise por cavitação, incubação com detergente Noct em concentrações mais altas do que as testadas anteriormente e sonicação. A lise por cavitação foi realizada da mesma maneira que anteriormente, de modo a se obter no sobrenadante da primeira centrifugação um precipitado enriquecido em núcleos intactos. Este precipitado foi coletado e cinco diferentes tratamentos foram realizados a partir dele, como demonstrado na Figura 4.43. Nos três primeiros tratamentos os precipitados foram resuspenso em tampão de lise hipotônica e tratados com concentrações crescentes de Noct, com o uso do detergente na concentração 0,5%, 1% e 2%, respectivamente. Para os tratamentos 4 e 5, os parasitas foram incubados com o detergente NP-40 na concentração de 0,5%, porém no tratamento 4 os parasitas foram resuspenso em água ultrapura em vez de tampão hipotônico, de modo a se obter uma condição extremamente hipotônica. Em todos os tratamentos os precipitados foram submetidos a sonicação nas mesmas condições já descritas anteriormente.

Observou-se uma pequena solubilização de TcRRM2 somente nos tratamentos que incluíam o detergente NP-40. É provável que TcRRM2 esteja conjugada a alguma estrutura nuclear que impeça sua solubilização, pois nem mesmo com diversas etapas de sonicação e condições que favoreceriam bastante a quebra de DNA, esta proteína se torna disponível no sobrenadante.

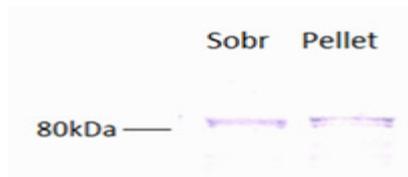


FIGURA 4.40 – Padrão de distribuição da proteína TcRRM2 após lise com tampão IMP1. Sobr: fração solubilizada no extrato; **Pellet:** fração de proteínas agregada ao precipitado.



FIGURA 4.41 – Distribuição das proteínas TcRRM2 e Tc47.9 nas frações de sobrenadante e precipitado após enriquecimento da fração nuclear. 65 e 47: extratos testados para TcRRM2 e Tc47.9; **S:** fração solubilizada no sobrenadante; **P:** fração de proteínas agregada ao precipitado.

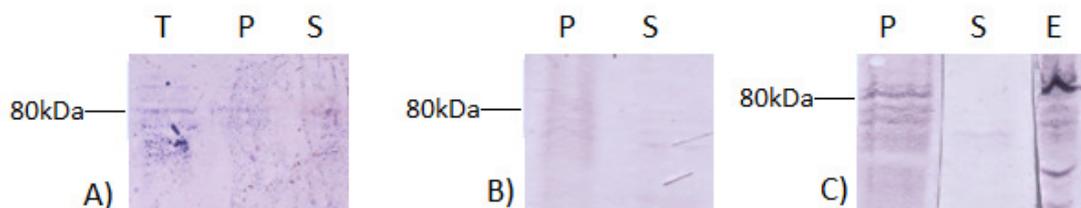


FIGURA 4.42 – Tentativas de solubilização de TcRRM2. T: fração correspondente ao extrato total; **S:** fração de proteínas solubilizada no sobrenadante do extrato; **P:** fração de proteínas agregada ao precipitado, não solubilizada no extrato. **A, B e C:** experimentos independentes de solubilização. **E:** extrato de *T. cruzi*.

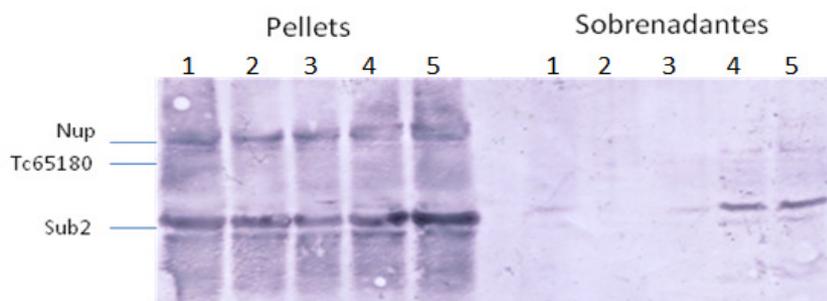


FIGURA 4.43- Tentativas de solubilização de TcRRM2 com diferentes concentrações de Noct. Sobrenadantes: fração solubilizada no sobrenadante do extrato; **Pellets:** fração de proteínas agregada ao precipitado. **1 a 5:** tentativas de solubilização, conforme descrito no texto; **TcRRM2:** marcação com o anticorpo α TcRRM2; **Nup:** marcação com uma nucleoporina; **Sub2:** marcação com anticorpo anti TcSub2, proteína de localização nuclear com relativa mobilidade.

De todos os protocolos testados, o que permitiu uma maior solubilização de TcRRM2 foi o primeiro protocolo de lise utilizando o tampão IMP1, contendo detergente NP-40 na concentração de 0,5%, onde aproximadamente 50% da proteína TcRRM2 encontra-se solubilizada no sobrenadante. A ineficiência do detergente Noct em extrair a proteína TcRRM2, mesmo quando conjugado a outros tratamentos como tampão hipotônico e sonicação, exige que seja utilizado para a lise um detergente incompatível com espectrometria de massas. Portanto, com a utilização deste tipo de lise, será necessário um tratamento das amostras de imunoprecipitação antes do experimento de espectrometria, de modo a eliminar esse detergente. Este tratamento consiste em submeter as amostras a eletroforese e posteriormente retirar somente os peptídeos do gel.

Para Tc 47.9 foram obtidos resultados de solubilização com a estratégia de enriquecimento de núcleo conjugada a lise hipotônica. Como o problema de pouca disponibilidade de TcRRM2 no extrato utilizado para a imunoprecipitação não pôde ser resolvido através da padronização das condições de lise, foi necessária a utilização de uma estratégia alternativa de imunoprecipitação de modo a tentar aumentar a quantidade de proteína recuperada nos eluídos.

4.22 IMUNOPRECIPITAÇÃO UTILIZANDO MICROESFERAS MAGNETICAS VISANDO O ISOLAMENTO DE COMPLEXOS PROTEICOS

Devido as sucessivas tentativas de imunoprecipitação de TcRRM2 com outras resinas sem obter sucesso, foi testado o protocolo de imunoprecipitação com microesferas (“beads”) magnéticas, que foi realizado da mesma forma utilizada nas imunoprecipitações com IMP1. A única diferença entre os protocolos foi a etapa de eluição das proteínas. Os resultados são demonstrados na Figura 4.44.

Observou-se que o protocolo com microesferas magnéticas foi bastante eficiente na obtenção da proteína TcRRM2 nos eluídos, bem como de outras proteínas associadas a ela. Futuramente este protocolo será utilizado para a imunoprecipitação de complexos proteicos, que após purificação em um gel de acrilamida, serão submetidos a análise por espectrometria de massas.

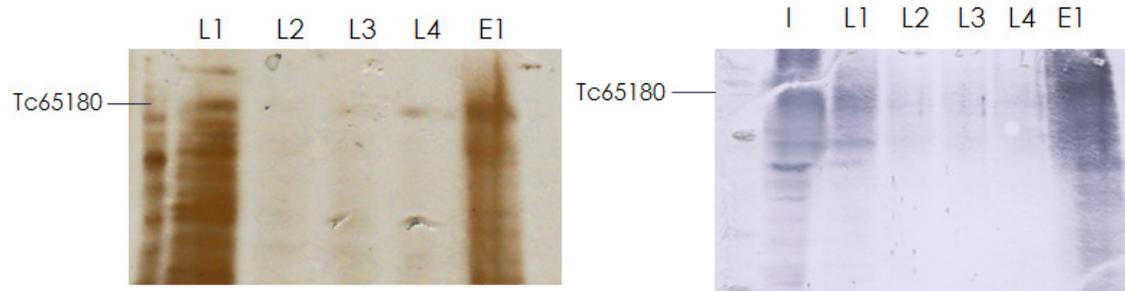


FIGURA 4.44 – Imunoprecipitação de TcRRM2 utilizando microesferas magnéticas. I: “input” ou controle com extrato ;**L1, L2, L3 e L4:** material obtido a partir da primeira, segunda ,terceira e quarta lavagem, respectivamente; **E1** : material obtido a partir da primeira eluição; Esquerda: gel

5. CONCLUSÃO

Apesar da similaridade de sequência primária entre a proteína TIA1 de *Homo sapiens* e TcRRM2 ficar em torno de 40%, observou-se que esta similaridade é funcionalmente significativa, já que o anticorpo anti TIA1 de humano reconhece em extrato de *T. cruzi* uma proteína de tamanho semelhante ao predito para TcRRM2, além de reconhecer a proteína recombinante TcRRM2.

A presença de proteínas altamente semelhantes a TcRRM2 dentro do grupo dos tripanosomatídeos, foi um primeiro indício de que a proteína possuísse funções importantes para estes organismos. Ensaio em *T. brucei* com anticorpo produzido contra TcRRM2 demonstraram que uma proteína do mesmo tamanho e de mesma localização subcelular é reconhecida, sugerindo que a função dos ortólogos de TcRRM2 seja mantida dentro do grupo.

As análises de alinhamento de sequência demonstraram que a similaridade de TcRRM2 com as proteínas TIA1 e TIAR humanas é distribuída principalmente em seus domínios funcionais. Observou-se que o domínio “prion-like” presente na região C-terminal da proteína TIA1 de mamíferos, responsável pelas propriedades de auto agregação destas proteínas, não encontra-se conservado em TcRRM2, corroborando com as observações experimentais de que TcRRM2 não se agrupa em grânulos citoplasmáticos de resposta a estresse.

Análises demonstraram que TcRRM2 mantém seus níveis de expressão estáveis ao longo da metaciclogênese do parasita, bem como sua localização subcelular, que é mantida nuclear. Uma marcação citoplasmática de fundo é observada e diversos ensaios foram realizados tentando determinar se parte desta proteína teria atividade no citoplasma, como fracionamento celular, porém este experimento não foi conclusivo. Os ensaios de sedimentação em gradiente de sacarose demonstraram que TcRRM2 não se associa a complexos citoplasmáticos pesados em epimastigotas ou sob condições de estresse nutricional.

Observou-se que sob condição de estresse nutricional e outros tipos de estresse (como PH, temperatura e arsenito de sódio) a distribuição subcelular de TcRRM2 se mantém constante, corroborando a observação de que TcRRM2 não está envolvida na via canônica de resposta a estresse observada para as proteínas TIA de *Homo sapiens*, com a formação de grânulos citoplasmáticos de repressão de mRNA.

A alteração da localização subcelular em resposta ao tratamento com actinomicina D é uma evidencia de que TcRRM2 possa ter uma mobilidade entre núcleo e citoplasma, já que outras proteínas que realizam “shuttling” já foram caracterizadas como possuindo uma marcação predominantemente nuclear.

Apesar de não participar da via clássica de regulação, o envolvimento de TcRRM2 em mecanismos de resposta a estresse em *T. cruzi* é evidente, como pode ser constatado pelos experimentos de ribonômica. Observou-se que a ligação de TcRRM2 a diversos mRNAs aumenta durante a condição de estresse, muitos deles envolvidos em vias metabólicas e em funções cruciais para a diferenciação, como o remodelamento do flagelo e dos reservossomos.

A localização subnuclear de TcRRM2 sugere que possa estar envolvida com processamento do pré-mRNA. Neste caso uma maior associação aos alvos de mRNA durante a condição de estresse nutricional levaria a uma regulação positiva da expressão destes genes, o que pode ser observado comparando os resultados de ribonômica com dados na literatura. Porém, experimentos adicionais seriam necessários para a confirmação desta hipótese.

O objetivo inicial de caracterização dos complexos protéicos associados a TcRRM2 não pode ser concluído por empecilhos técnicos com o espectrômetro de massas do Instituto Carlos Chagas. Porém, a padronização de imunoprecipitação dos complexos associados a TcRRM2 foi realizada neste trabalho.

6. PERSPECTIVAS

- Identificação das proteínas associadas a TcRRM2, através de imunoprecipitação e espectrometria de massas.
- Realização de experimentos adicionais para verificar a associação de TcRRM2 com processos de “trans splicing”.
- Ensaios de RNA de interferência em *T. brucei* para verificar as conseqüências da ausência de TcRRM2 no panorama celular geral e na expressão de seus alvos durante condições de ausência de glucose.
- Verificação das conseqüências da superexpressão de TcRRM2 no panorama celular geral e na expressão de seus alvos, através de ensaios com parasitas contendo pcPRTAPN conjugado a TcRRM2.

7.REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W. e LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol**,v. 215, p.403-410, 1990.

ALVES, L.R.; AVILA, A.R.; CORREA, A.; HOLETZ, F.B.; MANSUR, F.C.; MANQUE, P.A.; DE MENEZES, J.P.; BUCK, G.A.; KRIEGER, M.A.; GOLDENBERG, S. Proteomic analysis reveals the dynamic association of proteins with translated mRNAs in *Trypanosoma cruzi*. **Gene**, v.452, n.2, p.72-78. 2010.

ALVES, L.R. **Caracterização funcional de complexos mRNA- proteína em *Trypanosoma cruzi***, Tese (doutorado em biologia celular e molecular) – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2010.

ANANTHARAMAN, V.; KOONIN, E. V.; ARAVIND, L. Comparative genomics and evolution of proteins involved in RNA metabolism. **Nucleic Acids Res**, v.30, p. 1427-1464. 2002.

ANDERSEN J.S.; LYON, C.E.; FOX, A.H.; LEUNG, A.K.;LAM, Y.W.; STEEN, H.; MANN, M.; LAMOND, A.I. Directed proteomic analysis of the human nucleolus. **Curr Biol**,v.12,n.1,p.1-11.2002.

ANDERSON, P.; KEDERSHA, N. Visibly stressed: the role of eIF2, TIA-1, and stress granules in protein translation. **Cell Stress Chaperones.**, v.7, n.2, p.213-221. 2002.

ANDERSON, P.;PHILLIPS,K.; STOECKLIN, G.; KEDERSHA, N. Post-transcriptional regulation of proinflammatory proteins. **J. Leukoc. Biol**, v. 76, p.42–47.2004.

ANDERSON, P.; KEDERSHA, N. Stress granules: the Tao of RNA triage. **Trends in biochemical sciences**, v.33, p. 141-150, 2007.

AOKI-KINOSHITA, K.F.; KANEHISA, M. Gene annotation and pathway mapping in KEGG. **Methods Mol Biol**, v. 396, p.71-91.2007.

ARCHER, S.K.; LUU, V.D.; DE QUEIROZ, R.A.; BREMS, S.; CLAYTON, C. *Trypanosoma brucei* PUF9 regulates mRNAs for proteins involved in replicative processes over the cell cycle. **PLoS Pathog**,v.5,n.8, p.e1000565.2009.

BALAGOPAL, V.; PARKER, R. Polysomes, P bodies and stress granules: states and fates of eukaryotic mRNAs. **Curr Opin Cell Biol**, v.21, n.3, p.403-408.2009.

BANGS, J.D.; CRAIN, P.F.; HASHIZUME, T.; MCCLOSKEY, J.A.; BOOTHROYD, J.C. Mass spectrometry of mRNA cap 4 from trypanosomatids reveals two novel nucleosides. **J Biol Chem**, v.267, n.14, p.9805-9815. 1992.

BATEMAN, A.; BIRNEY, E.; CERRUTI, L.; DURBIN,R.; ETWILLER, L.; EDDY, S.R.; GRIFFITHS-JONES, S.; HOWE, K. L.; MARSHALL, M.; SONNHAMMER E. L. The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Res**, v. 30, p. 276–280. 2002.

BATISTA, M.; MARCHINI, F.K.; CELEDON, P.A.; FRAGOSO, S.P.; PROBST, C.M.; PRETI, H.; OZAKI, L.S.; BUCK, G.A.; GOLDENBERG, S.; KRIEGER, M.A. A high-throughput cloning system for reverse genetics in *Trypanosoma cruzi*. **BMC Microbiol**, v.10, p.259.2010.

- BESTEIRO, S.; BIRAN, M.; BITEAU, N.; COUSTOU, V.; BALTZ, T.; CANIONI, P.; BRINGAUD, F. Succinate secreted by *Trypanosoma brucei* is produced by a novel and unique glycosomal enzyme, NADH-dependent fumarate reductase. **J Biol Chem** v.277 ,n.41, p.38001-12.2002.
- BENJAMINI, Y.; YEKUTIELI, D. The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. **Ann. Statist**, v.29, n.4, p.1165-1188. 2001.
- BONALDO, M.C.; SOUTO-PADRON, T.; DE SOUZA, W.; GOLDENBERG, S. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. **J. Cell Biol.** v.106, p.1349-1358. 1988.
- BRECHT, M.; PARSONS, M. Changes in polysome profiles accompany trypanosome development. **Mol. Biochem. Parasitol**, v.97, p.189-198.1998.
- BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Ann Rev of Microbiology**, v. 27, p. 347-82,1973.
- CAMARGO, E.P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v.6, p.93 - 100. 1964.
- CASSOLA, A.; DE GAUDENZI, J.G.; FRASCH, A.C. Recruitment of mRNAs to cytoplasmic ribonucleoprotein granules in trypanosomes. **Mol Microbiol**, v. 65, p. 655-670. 2007.
- CASSOLA, A.;FRASCH, A.C. An RNA recognition motif mediates the nucleocytoplasmic transport of a trypanosome RNA-binding protein. **J Biol Chem**, v.284, p.35015-35028. 2009.
- CASSOLA, A.; NOÉ, G.; FRASCH, A.C. RNA recognition motifs involved in nuclear import of RNA-binding proteins. **RNA Biology**, v.7, n.3, p.1-6. 2010.
- CASSOLA, A. RNA Granules Living a Post-transcriptional Life: the Trypanosomes' Case. **Curr Chem Biol**, v.5, n.2, p. 108-117. 2011.
- CAZZULO, J. J. Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. **FASEBJ**, v.6, p.3153-3161. 1992.
- CONTE, I.; LABRIOLA, C.; CAZZULO, J.J.; DOCAMPO, R.; PARODI, A.J. The interplay between folding-facilitating mechanisms in *Trypanosoma cruzi* endoplasmic reticulum. **Mol Biol Cell**, v.14, n.9, p.3529-3540. 2003.
- CONTRERAS, V.T.;SALLES, J.M.; THOMAS, N.; MOREL, C.M.; GOLDENBERG, S.In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions.**Mol Biochem Parasitol**,v.16,n.3, p.315-327.1985.
- CONTRERAS, V.T.; ARAUJO-JORGE, T.C.; BONALDO, M.C.; THOMAZ, N.; BARBOSA, H.S.; MEIRELLES, M.N. GOLDENBERG, S. Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**,v.83, p.123-133. 1988.
- COUGOT, N.; BABAICO, S.; SERAPHIN, B. Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. **The Journal of Cell Biology**, v.165, n.1 , p. 31-40, 2004.
- CROSS, G.A.; KLEIN, R.A.; LINSTEAD, D.J. Utilization of amino acids by *Trypanosoma brucei* in culture: L-threonine as a precursor for acetate. **Parasitology**, v.71, n.2, p.311–326. 1975.

- CUNHA-E-SILVA, N.; SANT'ANNA, C.; PEREIRA, M.G.; PORTO-CARREIRO, I.; JEOVANO, A.L.; DE SOUZA, W. Resvosomes: multipurpose organelles? **Parasitol Res**, v.99, n.4, p.325-327. 2006.
- DALLAGIOVANNA, B.; PÉREZ,L.; SOTELO-SILVEIRA, J.; SMIRCICH, P.; DUHAGON, M.A.; GARAT, B. *Trypanosoma cruzi*: molecular characterization of TcPUF6, a Pumilio protein. **Exp Parasitol**, v.109, n. 4, p. 260-264. 2005.
- DALLAGIOVANNA, B.; CORREA, A.; PROBST, C.M.; HOLETZ, F. B.;SMIRCICH, P.; DE AGUIAR, A. M.; MANSUR, F.; DA SILVA, C. V.; MORTARA, R.A.; GARAT, B.; BUCK, G.A.; GOLDENBERG, S.; KRIEGER. Functional genomic characterization of mRNAs associated with TcPUF6, a pumilio-like proteinfrom *Trypanosoma cruzi*. **J Biol Chem**, v.283, n.13, p. 8266-8273. 2008.
- DE GAUZENZI, J.; FRASCH, A.C.; CLAYTON, C. RNA-binding domain proteins in Kinetoplastids: a comparative analysis. **Eukaryot Cell**, v. 4, n. 12, p. 2106-2114. 2005.
- DE SOUZA, W. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Int. Rev. Cyt**, v.86, p. 197-283. 1984.
- DEMBER, L.M.; KIM,N.D.; LIU, K.Q.; ANDERSON, P. Individual RNA recognition motifs of TIA-1 and TIAR have different RNA binding specificities. **J Biol Chem**,v. 271, p. 2783–2788. 1996.
- DIAS, J.C.P. Epidemiologia. In **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas** (eds Z. Brener, Z.A. Andrade & M. Barral-Neto), p. 48 - 74. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000.
- DIXON, D. A.; BALCH, G. C. ; KEDERSHA, N. ; ANDERSON, P. ; ZIMMERMAN, G. A.; BEAUCHAMP, R. D. ; PRESCOTT, S. M. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the translational silencer TIA-1. **J. Exp. Med**, v.198, p. 475–481. 2003.
- DOUGLAS KT.Mechanism of action of glutathione-dependent enzymes.**Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol**,v.59,p.103-167.1987.
- DUMAS, M. Sleeping sickness, a reemerging sickness. **Bull. Acad. Natl. Med**, v.184, p. 1867-1885. 2000.
- EBIKEME, C.; HUBERT, J.; BIRAN, M.; GOUSPILLOU, G.; MORAND, P.; PLAZOLLES, N.; GUEGAN, F.; DIOLEZ, P.; FRANCONI, J.M.; PORTAIS, J.C.; BRINGAUD, F. Ablation of Succinate Production from Glucose Metabolism in the Procyclic Trypanosomes Induces Metabolic Switches to the Glycerol 3-Phosphate/Dihydroxyacetone Phosphate Shuttle and to Proline Metabolism. **J Biol Chem**,v.285,n.42,p.32312-32324. 2010.
- ESTEVEZ A.M. The RNA-binding protein TbDRBD3 regulates the stability of a specific subset of mRNAs in trypanosomes. **Nucleic Acids Res**, v.36, p.4573-4586, 2008.
- FERRAIUOLO, M.A.; BASAK, S.; DOSTIE, J. et al. A role for the eIF4E-binding protein 4E-T in P-body formation and mRNA decay. **The Journal of Cell Biology**, v.170, p. 913–924, 2005
- FERNANDES, M.P.; INADA, N.M.; CHIARATTI, M.R.; ARAÚJO, F.F.; MEIRELLES, F.V.;CORREIA, M.T.; COELHO, L.C.; ALVES, M.J.; GADELHA, F.R.; VERCESI, A.E. Mechanism of *Trypanosoma cruzi* death induced by Cratylia mollis seed lectin. **J Bioenerg Biomembr**, v.42, n.1, p. 69-78. 2010.

- FERNANDÉZ-MOYA, S.M.; ESTÉVEZ, A.M. Posttranscriptional control and the role of RNA-binding proteins in gene regulation in trypanosomatid protozoan parasites. **Wiley Interdiscip Rev RNA**, v.1, p.34-46, jul/ago 2010.
- FRANKS, T.M.; LYKKE-ANDERSEN, J. The control of mRNA decapping and P-body formation. **Mol Cell**, v.32, p.605-615.2008.
- GARCIA, E.S; AZAMBUJA, P. Fisiologia de Triatomíneos: desenvolvimento, reprodução e interação com *Trypanosoma cruzi*. In **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas** (eds Z. Brener, Z.A. Andrade & M. Barral-Neto), p. 41 - 47. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000.
- GEA, S.; GUIÑAZU, N.; PELLEGRINI, A.; CARRERA SILVA, E.A.; GIORDANENGO, L.; CANO, R.; AOKI, M.P. Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* cysteine protease in the host-parasite interplay. **Inmunología**, v.25, n.4, p. 225-238. 2006.
- GIORDANENGO, L.; GUIÑAZÚ, N.; STEMPIN, C.; FRETES, R.; CERBÁN, F.; GEA, S. Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, conditions the host immune response in favor of parasite. **Eur J Immunol**, v.32, n.4, p.1003-1011.2002.
- GLISOVIC, T.; BACHORIK, J. L.; YONG, J.; DREYFUSS, G. RNA-binding proteins and posttranscriptional gene regulation. **FEBS Letters**, v. 582, n.14, p.1977-1986 .2008.
- GÓES, V.M. Análise Genômica funcional do *Trypanosoma cruzi* submetido a diferentes tipos de estresse, Tese (doutorado em biologia celular e molecular) – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2008.
- GOLDENBERG, S.; SALLES, J.M.; CONTRERAS, V.; 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 Journal**, v.180, n.2, p. 265-270, 1985.
- GOMEZ, C.; ESTHER RAMIREZ, M.; CALIXTO-GALVEZ, M.; MEDEL, O.; RODRÍGUEZ, M.A. Regulation of gene expression in protozoa parasites. **J Biomed Biotechnol**, v.2010. 2010.
- HENRIQUEZ, D.A.; PEREZ, N.; PANCE, A.; BRADLEY, C. Mechanisms of protein degradation in *Trypanosoma cruzi*. **Biol Res**, v.26, n.1-2, p. 151-157. 1993.
- HOLCIK, M.; SONENBERG, N. Translational control in stress and apoptosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, V. 6, P. 318-327 , 2005.
- HOLETZ, F.B.; CORREA, A.; AVILA, A.R.; NAKAMURA, C.V.; KRIEGER, M.A.; GOLDENBERG, S. Evidence of P-bodylike structures in *Trypanosoma cruzi*. **Biochem Biophys Res Commun**, v.356, p.1062-1067. 2007.
- HU, C.A.; DELAUNEY, A.J.; VERMA, D.P. A bifunctional enzyme (1-pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants (osogaton/ultragen S ation/ftnal comp tatlon/root nodules). **Proc. Natd. Acad. Sci. USA**, v.89, n.19, p.9354-9358. 1992.
- IGOILLO-ESTEVE, M.; MAUGERI, D.; STERN, A.L.; BELUARDI, P.; CAZZULO, J.J. The pentose phosphate pathway in *Trypanosoma cruzi*: a potential target for the chemotherapy of Chagas disease. **An Acad Bras Cienc**, v.79, n.4, p.649-663. 2007.

- IZQUIERDO, J.M.; VALCÁRCEL, J. Fas-activated serine/threonine kinase (FAST K) synergizes with TIA-1/TIAR proteins to regulate Fas alternative splicing. **J Biol Chem**, v.282, n.3, p.1539-43. 2007.
- JENSEN, B. C.; SIVAM, D.; KIFER, C.T.; MYLER, P.J.; PARSONS, M. Widespread variation in transcript abundance within and across developmental stages of *Trypanosoma brucei*. **BMC Genomics**, V.10, P. 482. 2009.
- KABANI, S.; FENN, K.; ROSS, A.; IVENS, A.; SMITH, T.K.; GHAZAL, P.; MATTEWS, K. Genome-wide expression profiling of in vivoderived bloodstream parasite stages and dynamic analysis of mRNA alterations during synchronous differentiation in *Trypanosoma brucei*. **BMC Genomics**, v.10, p. 427. 2009.
- KANDASAMY, K.; JOSEPH, K.; SUBRAMANIAM, K.; RAYMOND, J.R.; THOLANIKUNNEL, B.G. Translational control of beta2-adrenergic receptor mRNA by T-cellrestricted intracellular antigen-related protein. **J Biol Chem**, v.280, p. 1931–1943. 2005.
- KEDERSHA, N.L.; GUPTA, M.; LI, W.; MILLER, I.; ANDERSON, P. RNA binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. **JCell Biol**, v.147, p. 1431–1442. 1999.
- KEDERSHA, N. L.; ANDERSON, P. Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. **Biochem. Soc. Trans**, v .30, p.963–969. 2002.
- KEENE, J. D.; TENENBAUM, S. A. Eukaryotic mRNPs may represent posttranscriptional operons. *Mol. Cell*, v.9, p.1161–1167.2002.
- KEENE, J.D.; LAGER, P. J. Post-transcriptional operons and regulons co-ordinating gene expression. **Chromosome Res**, v.13, p. 327–337.2005.
- KEENE, J. D. RNA regulons: coordination of posttranscriptional events. **Nat Rev Genet**, v.8, p.533-543, 2007.
- KIM, H.S.; KUWANO, Y.; ZHAN, M.; PULLMANN, R.; MAZAN-MAMCZARZ, K.; LI, H.; KEDERSHA, N.; ANDERSON, P.; WILCE, M.C.; GOROSPE, M.; WILCE, J.A.. Elucidation of a C-rich signature motif in target mRNAs of RNA-binding protein TIAR. **Mol Cell Biol**, v.27, p.6806-6817. 2007.
- KOZUTSUMI, Y.; SEGAL, M.; NORMINGTON, K.; GETTING, M.J.; SAMBROOK, J. The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. **Nature**, v.332, n.6163, p.462-464. 1988.
- KRAMER, S.; QUEIROZ, R.; ELLIS, L.; WEBB, H.; HOHEISEL, J.D.; CLAYTON, C. CARRINGTON, M. Heat shock causes a decrease in polysomes and the appearance of stress granules in trypanosomes independently of eIF2(alpha) phosphorylation at Thr169. **J Cell Sci**, v.121, p. 3002-3014. 2008.
- KUBATA, B.K.; KABUTUTU, Z.; NOZAKI, T.; MUNDAY, C.J.; FUKUZUMI, S.; OHKUBO, K.; LAZARUS, M.; MARUYAMA, T.; MARTIN, S.K.; DUSZENKO, M.; URADE, Y. A Key Role for Old Yellow Enzyme in the Metabolism of Drugs by *Trypanosoma cruzi*. **J Exp Med**, v.196, n.9, p.1241-51.2002.

- LE GUINER,C.; LEJEUNE, F.; GALIANA, D.; KISTER, L.;BREATHNACH, R.; STEVENIN, J.; KONCZAK, F. D. G. TIA-1 and TIAR activate splicing of alternative exons with weak 5' splice sites followed by a U-rich stretch on their own pre-mRNAs.The **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 44, p. 40638-40646, 2001.
- MAGDALENO, A.; SUÁREZ MANTILLA, B.; ROCHA, S.C.; PRAL, E.M.; SILBER, A.M. The involvement of GlutamateMetabolism in the Resistance to Thermal, Nutritional, and Oxidative Stress in *Trypanosoma cruzi*. **Enzyme Res.**2011.
- MAIR, G.; SHI, H.; LI, H.; DJIKENG, A.; AVILES, H.O.; BISHOP, J.R.; FALCONE, F.H.; GAVRILESCU, C.; MONTGOMERY, J.L.; SANTORI, M.I.; STERN, L.S.; WANG, Z.; ULLU, E.; TSCHUDI, C. A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. **RNA**, v.6, n.2, p.163-169. 2000.
- MANFUL, T.; FADDA, A.; CLAYTON, C. The role of the 5'-3' exoribonuclease XRNA in transcriptome-wide mRNA degradation. **RNA**, v.17, n.11, p. 2039-2047. 2011.
- MARANDE, W.; KOHL, L. Flagellar kinesins in protists. **Future Microbiol**, v.6, n.2, p.231-246. 2011.
- MARIS, C; DOMINGUEZ, C.; ALLAIN, F. H. T. The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. **Febs J**, v.272, n.9, p. 2118-2131. 2005.
- MARTINS, S.T. **Caracterização de proteínas TIA-like em Trypanosoma cruzi**, Curitiba,UFPR. 2009.
- MCINTOSH, C.A.; OLIVER, D.J. The Phosphate Transporter from Pea Mitochondria, Isolation and Characterization in Proteolipid Vesicles. **Plant Physiol**, v.105, n.1, p.47-52. 1994.
- MCNALLY, K.P.; AGABIAN, N. *Trypanosoma brucei* spliced-leader RNA methylations are required for trans splicing *in vivo*. **Mol Cell Biol**, v.12, n.11, p.4844-4851. 1992.
- MICHELS, P.A.; BRINGAUD, F.; HERMAN, M.; HANNAERT,V. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. **Biochim Biophys Acta**, v.1763, n.12, p.1463-1477. 2006.
- MILONE, J.; WILUSZ, J.; BELLOFATTO,V. Characterization of deadenylation in trypanosome extracts and its inhibition by poly(A)-binding protein Pab1p. **RNA**, v. 10, p. 448-457. 2004.
- MINTER, D.M.; MINTER-GOEDBLOED, E; MARSDEN, P.D.; MILES,M.A.; MACEDO,V. Domestic risk factor – an attempt to assess risk of infection with *Trypanosoma cruzi* in houses in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 67, p.290, 1973.
- MITTAL, N.; ROY, N.; BABU, M. M.; JANGA, S. C. Dissecting the expression dynamics of RNA-binding proteins in posttranscriptional regulatory networks. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 48, p. 20300-20305. 2009.
- MYUNG, K. S.; BEETHAM, J. K.; WILSON, M. E.; DONELSON, J. E. Comparison of the post-transcriptional regulation of the mRNAs for the surface proteins PSA (GP46) and MSP (GP63) of *Leishmania chagasi*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n.19, p. 16489–16497. 2002.

- NÁZER, E.; VERDÚN, R.E.; SÁNCHEZ, D.O. Nucleolar localization of RNA binding proteins induced by actinomycin D and heat shock in *Trypanosoma cruzi*. **PLoS One**,v.6,n.5, e19920. 2011.
- NOVER L, SCHARF KD, NEUMANN D. Formation of cytoplasmic heat shock granules in tomato cell cultures and leaves. **Mol Cell Biol**,v.3, n.9, p.1648-1655. 1983.
- OUBRIDGE, C.; ITO, N.; EVANS, P. R.; TEO, C. H.; NAGAI, K. Crystal structure at 1.92 Å resolution of the RNA-binding domain of the U1A spliceosomal protein complexed with an RNA hairpin. **Nature**, v. 372, p. 432–438. 1994.
- OUELLETTE, M.; PAPADOPOULOU, B. Coordinated gene expression by post-transcriptional regulons in African trypanosomes. **Journal of Biology**, v.8, n.11, p.100. 2009.
- PARSONS, M.; NELSON, R.G.; WATKINS, K.P.; AGABIAN, N. Trypanosome mRNAs share a common 5' spliced leader sequence. **Cell**, v. 38, n. 1, p. 309–316. 1984.
- PEREIRA, M.G.; NAKAYASU, E.S.; SANT'ANNA, C.; DE CICCO, N.N.; ATELLA, G.C.; DE SOUZA, W.; ALMEIDA, I.C.; CUNHA-E-SILVA, N. *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes Are Able to Store and Mobilize High Amounts of Cholesterol in Reservosome Lipid Inclusions. **PLoS One**, v.6, n.7, p. e22359. 2011.
- PIECYK, M.; WAX, S.; BECK, A.R.; KEDERSHA, N.; GUPTA, M.; MARITIM, B.; CHEN, S.; GUEYDAN, C.; KRUY, V.; STREULI, M.; ANDERSON, P. TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF- α . **EMBO J**, v.19, p. 4154–4163. 2000.
- QUEIROZ, R.; BENZ, C.; FELLEBERG, K.; HOHEISEL, J. D.; CLAYTON, C. Transcriptome analysis of differentiating trypanosomes reveals the existence of multiple post-transcriptional regulons. **BMC Genomics**, v.10, p. 495. 2009.
- RASSI, A. JR; RASSI, A.; LITTLE, W.C. Chaga's heart disease. **Clin. Cardiol**,v. 23, n.12, p. 883-889. 2000.
- REYES, R.; ALCALDE, J.; IZQUIERDO, J.M. Depletion of T-cell intracellular antigen proteins promotes cell proliferation. **Genome Biol**, v.10, n.8, p.R87. 2009.
- ROBERTS, T.G.; STURM, N.R.; YEE, B.K.; YU, M.C.; HARTSHORNE, T.; AGABIAN, N.; CAMPBELL, D.A. Three small nucleolar RNAs identified from the spliced leader-associated RNA locus in kinetoplastid protozoans. **Mol Cell Biol**, v.18, n.8, p.4409-4417, 1998.
- ROBINSON, M.D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G.K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v.26, n.1, p.139-140. 2010.
- RUDENKO, G.; CHUNG, H.M.M.; PHAM, V. P.; VAN DER PLOEG, L. H. T. RNA polymerase I can mediate expression of CAT and neo protein-coding genes in *Trypanosoma brucei*. **The EMBO Journal**, v. 10, n.11, p. 3387–3397. 1991.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory**. 2nd Ed. 2001.

- SANDERS, S.L.; WHITFIELD, K.M.; VOGEL, J.P.; ROSE, M.D.; SCHEKMAN, R.W. Sec61p and BiP directly facilitate polypeptide translocation into the ER. **Cell**, v.69, n.2, p.353-365. 2004.
- SANT'ANNA, C.; NAKAYASU, E.S.; PEREIRA, M.G.; LOURENÇO, D.; DE SOUZA, W.; ALMEIDA, I.C.; CUNHA-E-SILVA, N.L. Subcellular proteomics of *Trypanosoma cruzi* reservosomes. **Proteomics**, v.9, n.7, p. 1782-1794. 2009.
- SCHUSTER, G.; GRUISSEM, W. Chloroplast mRNA 3' end processing requires a nuclear-encoded RNA-binding Protein. **EMBO J**, v. 10, p. 1493–1502. 1991.
- SHERLOCK, I.A. Vetores. In **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas** (eds Z. Brener, Z.A. Andrade & M. Barral-Neto), p. 21 - 40. Ganabara Koogan, Rio de Janeiro. 2000.
- SPECTOR, D.L.; LAMOND, A.I. Nuclear speckles. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v.3, n.2, p. a000646.2011.
- STEINDEL, M.; KRAMER PACHECO, L.; SCHOLL, D.; SOARES, M.; DE MORAES, M.H.; EGER, I.; KOSMANN, C.; SINCERO, T.C.; STOCO, P.H.; MURTA, S.M.; DE CARVALHO-PINTO, C.J.; GRISARD, E.C. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.60, n.1, p. 25-32, 2008.
- SUGIYAMA, S.; TOKUOKA, K.; UCHIYAMA, N.; OKAMOTO, N.; OKANO, Y.; MATSUMURA, H.; INAKA, K.; URADE, Y.; INOUE, T. Preparation, crystallization and preliminary crystallographic analysis of old yellow enzyme from *Trypanosoma cruzi*. **Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun**, v. 63, n.Pt 10, p.896-898. 2007.
- TEIXEIRA, D.; SHETH, U.; VALENCIA-SANCHEZ, M.A.; BRENGUES, M.; PARKER, R. Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. **RNA**, v.11, p.371-382.2005.
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res**, v.22, n.22, p.4673-80.
- TIAN, Q.; STREULI, M.; SAITO, H.; SCHLOSSMAN, S.F.; ANDERSON, P. A polyadenylate binding protein localized to the granules of cytolytic lymphocytes induces DNA fragmentation in target cells. **Cell**, v. 67, p. 629–639. 1991.
- TYLER, K.M.; ENGMAN, D.M. Flagellar elongation induced by glucose limitation is preadaptive for *Trypanosoma cruzi* differentiation. **Cell Motil Cytoskeleton**, v.46, n.4, p.269-278. 2000.
- TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal of Parasitology**, v. 31, p. 472-81. 2001.
- VAN WEELDEN, S.W.; VAN HELLEMOND, J.J.; OPPERDOES, F.R.; TIELENS, A.G. New functions for parts of the Krebs cycle in procyclic *Trypanosoma brucei*, a cycle not operating as a cycle. **J Biol Chem**, v.280, n.13, p.12451-12460. 2005.

VOLPON, L.; D'ORSO, I.; YOUNG, C.R.; FRASCH, A.C.; GEHRING, K. NMR structural study of TcUBP1, a single RRM domain protein from *Trypanosoma cruzi*: contribution of a beta hairpin to RNA binding. **Biochemistry**, v. 44, n. 10, p. 3708-3717. 2005

WITTEN, D.; TIBSHIRANI, R. A comparison of fold change and the t-statistic for microarray data analysis. **Technical report, Stanford University**. 2007.

YU, Q.; COK, S.J.; ZENG, C.; MORRISON, A.R. Translational repression of human matrix metalloproteinases-13 by an alternatively spliced form of T-cell-restricted intracellular antigen-related protein (TIAR). **J Biol Chem**, v. 278, p. 1579–1584. 2003.

ZEINER, G.M.; STURM, N.R.; CAMPBELL, D.A. Exportin 1 mediates nuclear export of the kinetoplastid spliced leader RNA. **Eukaryot Cell**, v.2, n.2, p.222-230, 2003.

8.ANEXOS

Numero de Identificação	Nome do gene	Iniciador	Sequência do iniciador
Tc00.1047053434931.10	proteína do bastão paraxonemal PAR2, putativa	1F	31.10F 5'CGCACGACGCACATTCAGC 3'
		1R	31.10R 5'TGCGGGGGTTCAGGTTG 3'
Tc00.1047053506263.49	Proteína hipotética conservada (golgi)	2F	263.49F 5'CCCGATATTCAGGCAGAGAT 3'
		2R	263.49R 5'CAAGTTGGCGGTGAGTCC 3'
Tc00.1047053507603.270	precursor de cruzipaína, putativo, semelhante a catepsina L, putativa, principal cisteino proteinase, putativa	3F	603.270F 5'GGCCACCCGCTGACGAA 3'
		3R	603.270R 5'AACCGGGCCATTGACTGC 3'
Tc00.1047053507617.9	prostaglandina F 2 alfa sintase	4F	617.9F 5'GGGTTTGTATGGCGTTGAGAT 3'
		4R	617.9R 5'GGATATGCGGAGCCCCACAC 3'
Tc00.1047053510101.50	lanosterol 14-alfa-demetilase, putativa	5F	101.50F 5'CATGGTAAAGCGGAGGTCA 3'
		5R	101.50R 5'AAGGCGGTGGCAAGTATGTT 3'

ANEXO 1- Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizado para a amplificação por RT PCR