

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

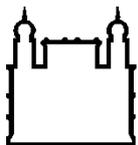
INSTITUTO CARLOS CHAGAS
Mestrado em Biociências e Biotecnologia

CARACTERIZAÇÃO DE TcRBSR1 EM *Trypanosoma cruzi*

JULIANE SOLDI MALGARIN

CURITIBA/PR

2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS
Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

JULIANE SOLDI MALGARIN

CARACTERIZAÇÃO DE TcRBSR1 EM *Trypanosoma cruzi*

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

Orientadores: Dra. Lysangela Ronalte Alves
Dr. Samuel Goldenberg

CURITIBA/PR
2015

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

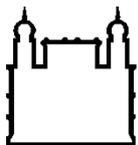
M248 Malgarin, Juliane Soldi

Caracterização de TcRBSR1 em *Trypanosoma cruzi* / Juliane Soldi Malgarin. – Curitiba, 2015.
vii, 92 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Carlos Chagas, Pós-Graduação em Biociência e Biotecnologia, 2015.
Bibliografia: f. 83-92

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Doença de Chagas. 3. Regulação pós-transcricional. 4. Proteína ligadora a RNA. 5. Domínio de reconhecimento a RNA. I. Título.

CDD 616.9363



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

CARACTERIZAÇÃO DE TcRBSR1 EM *Trypanosoma cruzi*

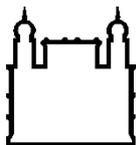
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Juliane Soldi Malgarin

Trypanosoma cruzi é o protozoário causador da doença de Chagas que afeta milhões de pessoas no mundo. A regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos se dá majoritariamente a nível pós-transcricional diferindo daquela de outros eucariotos. Apesar de demonstrada a mobilização diferencial de mRNAs em *T. cruzi* e a importância da regulação pós-transcricional, poucas proteínas de ligação ao RNA foram caracterizadas até o momento. O domínio *RNA Recognition Motif* (RRM) de ligação ao RNA é um dos mais abundantes domínios encontrados em proteínas de ligação a RNA (RBPs). Proteínas com esse domínio RRM estão envolvidas na maioria dos processos pós-transcricionais. RBPs associadas a moléculas de mRNA e outras proteínas regulatórias formam os complexos ribonucleoproteicos (mRNPs), que estão envolvidos na regulação do RNA. Nesse trabalho, reportamos a caracterização de uma proteína de ligação a mRNAs que apresenta domínio RRM, denominada RBSR1. A proteína foi fusionada a uma etiqueta TAP-*tagging* N-terminal (RBSR1-TAP *tagging*) e os experimentos foram realizados com parasitas transfectados. Ensaio de imunofluorescência, para determinar a localização da proteína, mostraram que a proteína apresenta um padrão de migração entre o núcleo e o citoplasma em diferentes etapas da diferenciação do parasita e que sua expressão é regulada ao longo do ciclo de vida, não sendo expressa em tripomastigotas metacíclicos. O ensaio também foi realizado sob condições de estresse e demonstrou-se a mudança de localização da proteína RBSR1 quando submetida a estresse nutricional e oxidativo. O perfil de polissomos em gradiente de sacarose mostrou que RBSR1, tanto em epimastigotas, quanto sob estresse nutricional, está relacionada a complexos ribonucleoproteicos pesados não associados à tradução. Foram realizados ensaios de imunoprecipitação para identificação dos mRNAs alvos da proteína, seguido de sequenciamento massivo, onde observou-se transcritos que codificam para proteínas ribossomais e também proteínas hipotéticas. Também foi realizada a identificação de proteínas parceiras a RBSR1 por imunoprecipitação de formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento e sob estresse nutricional, seguida de espectrometria de massas. Em epimastigotas em crescimento exponencial foram identificadas 86 proteínas parceiras e sob estresse nutricional 31 proteínas, observou-se alta heterogeneidade das parceiras, a qual pode ser explicada pela mobilidade apresentada por RBSR1 nas diversas formas do parasita. Adicionalmente, foram vistas várias proteínas que se associam a grânulos de RNA, como por exemplo DHH1 e HSP70, e dessa forma é possível que haja a associação de RBSR1 com esses grânulos. O estudo do papel das RBPs na modulação da expressão gênica em tripanossomatídeos pode pavimentar o caminho para o desenvolvimento de novas estratégias para combater as doenças causadas por esses organismos e ajudar a elucidar sua biologia.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, doença de Chagas, Regulação pós-transcricional, Proteína ligadora a RNA, Domínio de reconhecimento a RNA.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

CHARACTERIZATION OF TcRBSR1 IN *Trypanosoma cruzi*

ABSTRACT

MASTER THESIS

Juliane Soldi Malgarin

Trypanosoma cruzi is the causative agent of Chagas disease, a neglected disorder that affects millions of people around the world. Gene regulation is mainly post-transcriptional in trypanosomatids differing from other eukaryotes. Although the differential mobilization of mRNAs has been demonstrated in *T. cruzi* and despite the importance of post-transcriptional regulation in these organisms, just a few RNA binding proteins have been characterized so far. The RNA Recognition Motif (RRM) is the most important and most common domain in RNA binding proteins (RBPs). Proteins with this domain are involved in the majority of the post-transcriptional processes. RBPs associate with mRNA molecules and other regulatory proteins, forming ribonucleoprotein (mRNP) complexes, which are involved in several levels of RNA regulation. Here, we report the characterization of RBSR1, an RNA binding protein with RRM domain. The protein was tagged with TAP-*tagging* label and the assays were performed with transfected parasites (RBSR1-TAP *tagging*). Immunofluorescence assays to determine the localization of protein showed that it shifts from the nucleus to the cytoplasm throughout the parasite's differentiation and was regulated as is not expressed in metacyclic trypomastigotes. The assay was also performed under stress conditions and confirmed that changes the localization of RBSR1 when the parasites are under nutritional and oxidative stress conditions. The polysome profile in sucrose gradients showed that TcRBSR1 is associated with heavy ribonucleoprotein complexes not associated to translation. Immunoprecipitation assays were performed to identify the mRNA targets associated to the protein through next generation sequencing. Furthermore, identification of RBSR1 partners was made by mass spectrometry analysis of proteins immunoprecipitated from epimastigotes 3 days and under nutritional stress conditions. The data indicated that, 86 partners were identified in epimastigotes 3 days whereas 31 partners of RBSR1 under nutritional stress conditions. It was observed a high heterogeneity of the partners of RBSR1, which might be explained by the mobility of RBSR1 between nucleus and cytoplasm in different forms of parasite. Among the proteins associated to RBSR1 there were proteins that associate with RNA granules, as DHH1 and HSP70. Hence it is likely that RBSR1 also associates with RNA granules. The study of the role of RBPs in modulating gene expression in trypanosomatids might pave the way to the development of new strategies to tackling the diseases caused by these organisms and help to elucidate their biology.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease, post-transcriptional regulation, RNA binding protein, RNA Recognition Motif.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família: aos meus pais por sempre incentivarem meus estudos, por todo apoio e companheirismo; a minha irmã Caroline por sempre acreditar em mim e me dar forças nos momentos mais difíceis, a vocês reservo minha gratidão e amor eternos!

Agradeço aos meus orientadores Lysangela Ronalte Alves e Samuel Goldenberg, pela orientação e pela contribuição em minha formação como cientista durante o desenvolvimento desse trabalho.

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

Aos colegas do ICC que auxiliaram direta, ou indiretamente nesse trabalho. A Bruna Marcon, por todo o auxílio com os experimentos de microscopia. A Dra. Lysangela Alves pela análise dos dados de sequenciamento de RNA. Ao Dr. Paulo Costa Carvalho pela paciência e ajuda na análise dos dados proteômicos. Ao Haruo Inoe por todo o tempo e ensinamentos a mim depositados. A Dra. Fabíola Holetz e Dra. Salôê Bispo pela ajuda na realização dos experimentos de gradiente de sacarose, sem elas, não seria possível. A Sharon Toledo por todo apoio, paciência e conhecimentos transmitidos.

Às plataformas de espectrometria de massas (RPT02H), sequenciamento de DNA (RPT01G) e Microscopia Confocal e Deconvolução (RPT07C) do Instituto Carlos Chagas com o apoio da Rede de Plataformas Tecnológicas do Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde da Fiocruz.

Aos demais pesquisadores do Laboratório de Regulação da Expressão Gênica, por todas as dicas e sugestões.

À Coordenação do Curso de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia do Instituto Carlos Chagas e seus funcionários pelo auxílio.

Ao meu noivo Evandro, por todo carinho, paciência, companheirismo e disposição para me ajudar em todos os momentos, sempre esteve ao meu lado com palavras de conforto e amor. Sem seu apoio o trabalho teria sido muito mais difícil. Amo você.

Aos meus amigos verdadeiros, pelo amor, carinho, apoio e amizade sincera.

À CAPES, Fundação Araucária e Fiocruz pelo auxílio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
FIGURA 1.2 Papel das proteínas SR na exportação de mRNA em mamíferos	6
FIGURA 1.3 Interação entre o domínio RRM e RNA	8
FIGURA 1.4 Modelo integrando grânulos de estresse e <i>P-bodies</i> no ciclo do mRNP	11
FIGURA 1.5 Recrutamento do complexo TREX durante o <i>splicing</i>	15
FIGURA 1.6 Um modelo do papel da desfosforilação das proteínas SR na exportação de mRNA	16
FIGURA 3.1 Mapa do vetor de entrada pDONR TM 221	24
FIGURA 3.2 Esquema de recombinação mediado pela enzima BP Clonase	24
FIGURA 3.3 Mapa ilustrativo do vetor pDEST TM 17	25
FIGURA 3.4 Esquema de recombinação mediado pela enzima LR Clonase	25
FIGURA 4.1 Análise da estrutura da proteína TcRBSR1	46
FIGURA 4.2 Análise por PCR para confirmação da clonagem de TcRBSR1.....	47
FIGURA 4.3 Expressão da proteína recombinante TcRBSR1	48
FIGURA 4.4 Purificação da proteína recombinante TcRBSR1	50
FIGURA 4.5 Padrão de reconhecimento do soro anti-RBSR1	51
FIGURA 4.6 Clonagem de TcRBSR1 no vetor pTcTAPN	53
FIGURA 4.7 Análise da expressão da proteína TcRBSR1 durante a metaciclogênese de <i>T. cruzi</i>	53
FIGURA 4.8 Localização subcelular de TcRBSR1 em parasitas epimastigotas três e cinco dias.....	55
FIGURA 4.9 Localização subcelular de TcRBSR1 durante as etapas da metaciclogênese.....	56
FIGURA 4.10 Colocalização subcelular da proteína TcRBSR1 com TcDHH1	58
FIGURA 4.11 Colocalização da proteína TcRBSR1 e TcNUP-1	59
FIGURA 4.12 Localização subcelular da proteína TcRBSR1 e posterior recuperação do parasita	61
FIGURA 4.13 Localização subcelular de TcRBSR1 em condições de estresse por arsenito de sódio 2mM com posterior recuperação dos parasitas	63
FIGURA 4.14 Perfil de sedimentação da proteína TcRBSR1 em gradiente de sacarose	65
FIGURA 4.15 Ensaio de imunoprecipitação da proteína TcRBSR1 fusionada ao TAP- <i>tagging</i> para análise ribonômica	67
FIGURA 4.16 Ensaio de imunoprecipitação da proteína TcRBSR1 fusionada ao TAP- <i>tagging</i> para análise proteômica	69
FIGURA 4.17 Análise de proteínas parceiras a TcRBSR1 por diagrama de Venn.....	70

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do gene de interesse	22
TABELA 4.1 Identificação dos transcritos alvos de TcRBSR1 em epimastigotas 3 dias.....	67
TABELA 4.2 Proteínas identificadas no complexo RBSR1-TAP tagging em epimastigotas três dias	73
TABELA 4.3 Proteínas identificadas no complexo RBSR1-TAP tagging em epimastigotas sob estresse nutricional	78

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> E A DOENÇA DE CHAGAS	1
1.2 CICLO DE VIDA E METACICLOGÊNESE	1
1.3 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS	4
1.4 PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO A RNA	5
1.5 PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO A RNA (RBPs) CONTENDO DOMÍNIO RRM	6
1.6 GRÂNULOS DE RNA e mRNPs.....	8
1.7 EXPORTAÇÃO E MOVIMENTAÇÃO DE mRNA EM EUKARIOTOS DO NÚCLEO AO CITOPLASMA.....	14
2. OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES	19
3.1.1 Procedência dos reagentes e materiais	19
3.1.2 Soluções utilizadas	20
3.1.3 Meios de Cultura	21
3.2 CLONAGEM MOLECULAR DO GENE E EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	21
3.2.1 Amplificação de gene por PCR.....	21
3.2.2 Eletroforese de DNA	22
3.2.3 Clonagem em vetor de entrada pDONR™221	23
3.2.4 Subclonagem em vetor de expressão pDEST™17	24
3.2.5 Clonagem em vetores para expressão da proteína fusionada a TAP-tag (<i>Tandem Affinity Purification</i>).....	25
3.2.6 Preparo de células <i>E. coli</i> cálcio- competentes	26
3.2.7 Transformação de bactérias cálcio competentes com plasmídeo	26
3.2.8 PCR de colônia	27
3.2.9 Mini preparação de plasmídeos.....	27
3.3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM SISTEMAS BACTERIANOS	28
3.3.1 Transformação de bactérias cálcio competentes com o vetor de expressão.....	28
3.3.2 Condições estabelecidas para induzir a expressão de proteína recombinante	28
3.3.3 Obtenção de proteínas recombinantes	29
3.3.4 Produção de extratos de proteína	30
3.3.5 Eletroforese de proteína em gel desnaturante de poliacrilamida (<i>SDS-Page</i>).....	30
3.3.6 Ensaio de <i>western blotting</i> através de revelação por fosfatase alcalina.....	31
3.3.7 Ensaio de <i>western blotting</i> através de detecção por Odyssey®	32
3.3.8 Purificação das proteínas por cromatografia de afinidade e eletroeluição	32
3.3.9 Detecção da proteína recombinante por ensaio de <i>western blot</i> com anticorpos anti-histidina	33
3.4 OBTENÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS.....	33
3.4.1 Teste de soro pré-imune.....	33

3.4.2	Produção de anticorpos policlonais e análises por <i>western blotting</i>	34
3.5	CULTIVO E MANIPULAÇÃO DE <i>T. cruzi</i>	34
3.5.1	Cultivo de <i>T. cruzi</i>	34
3.5.2	Transfecção e seleção de <i>T. cruzi</i>	36
3.5.3	Extratos proteicos de <i>T. cruzi</i>	36
3.5.4	Quantificação fluorométrica por Qubit®.....	37
3.5.5	Obtenção de DNA genômico de <i>T. cruzi</i>	37
3.5.6	Congelamento de células de <i>T. cruzi</i>	38
3.5.7	<i>Cell Sorting</i> por citometria de fluxo.....	38
3.6	IMUNOENSAIOS.....	38
3.6.1	Imunolocalização por microscopia de fluorescência.....	38
3.7	ANÁLISE DO PERFIL DE SEDIMENTAÇÃO DA PROTEÍNA EM GRADIENTE DE SACAROSE 39	
3.7.1	Obtenção das frações do gradiente de sacarose.....	39
3.8	ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO.....	40
3.8.1	Imunoprecipitação para análise proteômica.....	40
3.8.2	Imunoprecipitação para análise ribonômica.....	41
3.9	PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS PARA O SEQUENCIAMENTO DE RNA UTILIZANDO A PLATAFORMA SOLiD.....	41
3.9.1	Preparação inicial.....	42
3.9.2	Transcrição reversa – obtenção de cDNA.....	42
3.9.3	PCR de emulsão.....	43
3.9.4	Seleção de microesferas positivas.....	43
3.9.5	Sequenciamento.....	43
3.9.6	Análises.....	44
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1	ANÁLISE DE SEQUÊNCIA DE RBSR1.....	45
4.2	CLONAGEM E EXPRESSÃO DE TcRBSR1.....	46
4.3	PRODUÇÃO DE ANTISOROS POLICLONAIS ANTI RBSR1.....	50
4.3.1	Produção e teste de antisoros.....	50
4.4	CLONAGEM DE RBSR1 NO VETOR pTcTAPN.....	52
4.5	DETERMINAÇÃO DOS PADRÕES DE RBSR1 AO LONGO DA METACICLOGÊNESE.....	53
4.5.1	Análise da expressão da proteína através de ensaios de <i>western blot</i>	53
4.5.2	Identificação da localização subcelular de RBSR1 por microscopia de fluorescência.....	54
4.6	PERFIL DE SEDIMENTAÇÃO DA PROTEÍNA RBSR1 EM GRADIENTE DE SACAROSE.....	64
4.7	IDENTIFICAÇÃO DOS TRANSCRITOS ALVOS DE RBSR1 POR SEQUENCIAMENTO EM LARGA ESCALA.....	66
4.8	IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS PARCEIRAS DE RBSR1 POR ANÁLISE PROTEÔMICA.....	68
5.	CONCLUSÕES.....	81
6.	REFERÊNCIAS.....	83

1. INTRODUÇÃO

1.1 *TRYPANOSOMA CRUZI* E A DOENÇA DE CHAGAS

O *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) é um protozoário flagelado agente causador da doença de Chagas (CHAGAS, 1909) pertencente ao reino Protista, ordem Kinetoplastida (LEVINE, 1980), família Tripanosomatidae. Essa ordem abrange protozoários flagelados que possuem uma região especializada conhecida por cinetoplasto, onde reside o DNA mitocondrial, também conhecido por kDNA (SHAPIRO e ENGLUND, 1995; DE SOUZA, 2002).

A doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, ocorre principalmente nas Américas, segundo a Organização Mundial da Saúde, há cerca de 10 milhões de indivíduos infectados nas Américas, sendo que somente no Brasil há 2 milhões de chagásicos (WHO-Bulletin of the World Health Organization, 2009).

A doença apresenta inicialmente uma fase aguda, podendo aparecer quadros de febre, mal estar e edemas no local da entrada do parasita (chagoma de inoculação) que tende a desaparecer com o curso da infecção (KROPF, AZEVEDO e FERREIRA, 2000). A infecção aguda pode progredir para a fase crônica que pode ser indeterminada ou apresentando manifestações tanto cardíacas, quanto digestivas (DIAS, 2000). Porém, até o momento não existe vacina ou tratamento quimioterápico eficiente para a doença (WHO, 2005).

A transmissão da doença ocorre de diferentes formas, dentre elas a mais comum é pela via vetorial, que consiste na transmissão do parasita por meio de excretas do inseto vetor hematófago pertencente à ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae (LARANJA *et al.*, 1956). A principal característica biológica dos triatomíneos é que são obrigatoriamente hematófagos e necessitam do repasto sanguíneo para completar o desenvolvimento (DIAS, 2000). As outras vias de transmissão podem ocorrer por transfusão sanguínea ou via oral e, com menos frequência, por via congênita, acidentes de laboratório ou transplantes de órgãos (TANOWITZ *et al.*, 1992; SCHMUNIS, 2000; BELTRÃO *et al.*, 2009). Vale ressaltar que praticamente todas as células nucleadas do hospedeiro mamífero podem ser parasitadas (LENZI *et al.*, 1996).

1.2 CICLO DE VIDA E METACICLOGÊNESE

O *T. cruzi*, sendo um microrganismo heteroxênico, possui um ciclo biológico alternado entre hospedeiro vertebrado (mamíferos) e invertebrado (triatomíneos) (LARANJA *et al.*, 1956); seu ciclo de vida natural se dá por quatro estágios distintos de diferenciação, sendo que dois estágios são encontrados em hospedeiros vertebrados, amastigota e tripomastigota sanguíneo, enquanto epimastigota e tripomastigota metacíclico se desenvolvem no inseto vetor (DE SOUZA, 1984).

Uma característica desse parasita é apresentar diferentes morfologias durante o ciclo biológico. A classificação baseia-se na posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e o local de onde emerge o flagelo. No caso dos tripomastigotas, que são as formas infectivas, não multiplicativas, encontradas no sangue do hospedeiro vertebrado (tripomastigotas sanguíneos) ou na porção distal do intestino do inseto vetor (tripomastigotas metacíclicos), são alongados e possuem cinetoplasto posterior ao núcleo. Já as formas epimastigotas são fusiformes e possuem o cinetoplasto em forma de bastão, localizado próximo a bolsa flagelar, na porção anterior e não são consideradas formas infectivas (TEIXEIRA *et al.*, 2013). As formas amastigotas são arredondadas com flagelo bem reduzido e núcleo relativamente grande, redondo e excêntrico, o cinetoplasto em forma de bastão, entre o núcleo e o flagelo; é considerada uma forma infectiva e multiplicativa (TEIXEIRA *et al.*, 2013).

A forma tripomastigota metacíclica é a forma infectiva para o hospedeiro mamífero no ciclo de transmissão natural, sendo encontrada nas porções distais do intestino de triatomíneos infectados, sendo eliminada durante o repasto sanguíneo junto às fezes e urina do inseto. A penetração do parasita na corrente sanguínea pode ocorrer por vias de descontinuidade ou mucosa, quando o hospedeiro coça o local da picada, seguida de internalização nas células hospedeiras. Dentro da célula, o parasita permanece algumas horas no interior do vacúolo parasitóforo (GARCIA e AZAMBUJA, 1991; DE SOUZA, 2002; TEIXEIRA, NASCIMENTO e STURM, 2006), que funde então com lisossomos. Em consequência ocorre um aumento da acidez no interior dessa estrutura o que leva ao início do processo de diferenciação para forma amastigota (TYLER, 2001).

No momento em que os amastigotas atingem o citoplasma das células, passam a se dividir, por fissão binária, e iniciam o processo de diferenciação em tripomastigotas sanguíneos (MEYER e DE SOUZA, 1976) que rompem as células e são liberados na corrente sanguínea. Essas formas podem infectar novas células ou infectar triatomíneos durante seu repasto sanguíneo, dando continuidade ao ciclo de infecção (DE SOUZA, 2002). As formas sanguíneas ingeridas pelo triatomíneo se

diferenciam em epimastigotas na porção anterior no estômago do inseto dividindo-se por fissão binária; elas aderem às membranas perimicrovilares do intestino na porção distal do trato digestivo, diferenciando-se em formas tripomastigotas metacíclicas, que posteriormente são liberadas com as fezes do triatomíneo (BONALDO *et al.*, 1988; GONZALEZ *et al.*, 1999). O ciclo de vida do *T. cruzi* é demonstrado esquematicamente na Figura 1.1.

Esse processo de diferenciação celular de formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas que ocorre no trato digestivo do triatomíneo é conhecida como metaciclogênese; essa é considerada primordial para o ciclo biológico do parasita e pode ser reproduzida *in vitro* em meio LIT ou em outros meios de cultura em cultivo axênico (CAMARGO, 1964; CASTELLANI, RIBEIRO e FERNANDES, 1967; LANAR, 1979; RONDINELLI *et al.*, 1988).

Em geral, o uso desses meios induz a multiplicação celular e com isso, Contreras e colaboradores, em 1985, desenvolveram condições para metaciclogênese *in vitro* na ausência de multiplicação celular. Nesse método, alta densidade de epimastigotas, previamente cultivados em meio LIT, são incubados ligeiramente numa solução hipertônica, a qual se assemelha as condições iônicas encontradas na urina do inseto (TAU, pH 6,0). Esse meio é considerado muito pobre e devido à falta de nutrientes ocorre um estresse nutricional e metabólico no parasita, afetando o programa de expressão gênica do mesmo (GOLDENBERG *et al.*, 1984). Posteriormente, os mesmos são incubados em meio TAU3AAG (TAU suplementado com L- prolina, L- ácido glutâmico, L- ácido aspártico e glicose) permitindo a diferenciação em tripomastigotas metacíclicos (GOLDENBERG *et al.*, 1987).

Há evidências de que a expressão de genes específicos de tripomastigotas precede as alterações morfológicas desse estágio e as modificações na expressão gênica, que ocorrem nas primeiras 24 horas. Portanto, a metaciclogênese se torna um excelente modelo de estudo para caracterização de genes diferencialmente expressos (CONTRERAS, MOREL e GOLDENBERG, 1985; ÁVILA *et al.*, 2001).

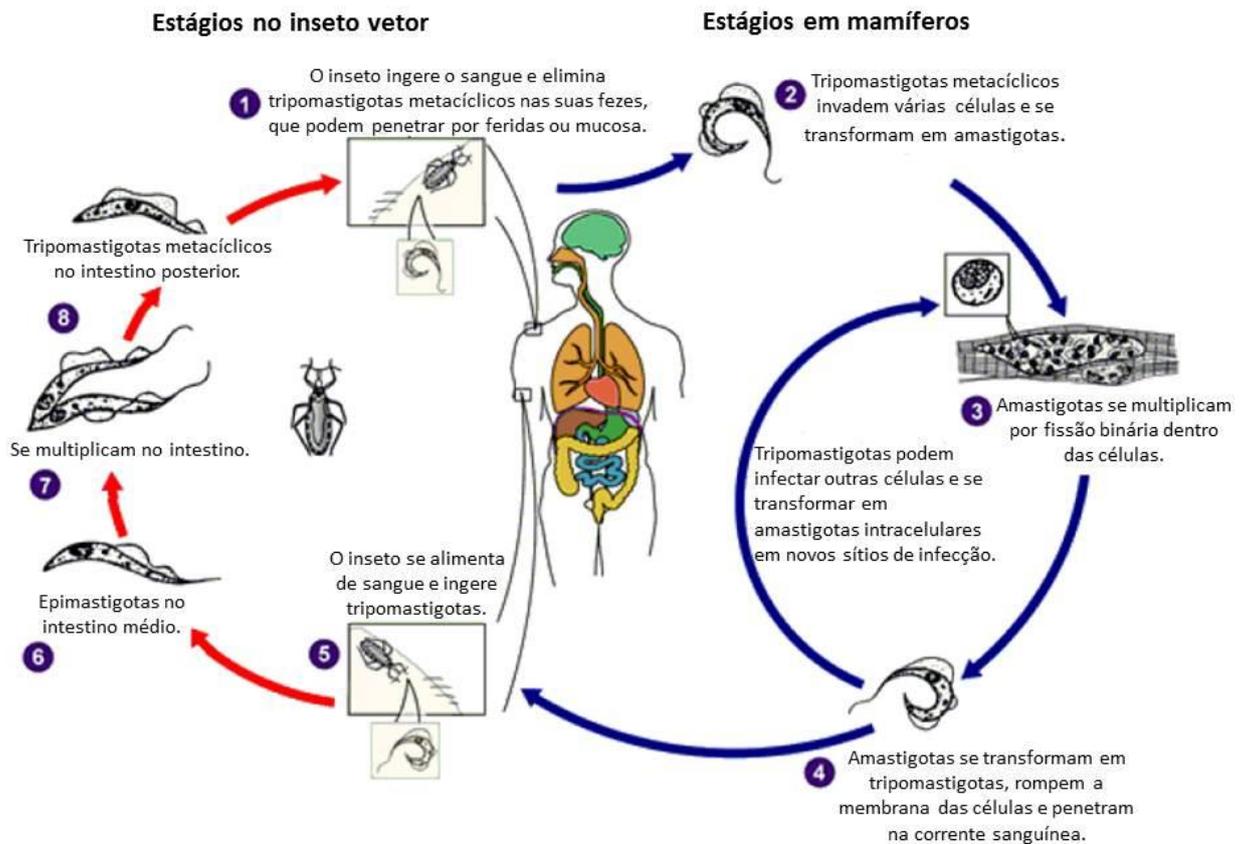


FIGURA 1.1 – Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (modificado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>).

1.3 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS

O processo de regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos apresenta diferenças em relação à maioria dos eucariotos. Existem diversos pontos de controle da regulação da expressão gênica e alguns peculiares como, por exemplo, edição massiva do RNA mitocondrial ou ainda o *trans-splicing* de todos os mRNAs nucleares, a transcrição policistrônica pela RNA polimerase II, ou ainda a transcrição de alguns mRNAs funcionais pela RNA polimerase I (FERNÁNDEZ-MOYA e ESTÉVEZ, 2010).

A transcrição gênica em tripanossomatídeos difere em relação a outros eucariotos, pois até o presente não foram descritos promotores canônicos para RNA polimerase II embora tenham sido caracterizados aqueles para RNA polimerase I e III. As regiões codificadoras podem estar ordenadas em grupos em uma mesma fita de DNA sendo que a ocorrência de íntrons no genoma de tripanossomatídeos é bastante rara (MAIR *et al.*, 2000). A transcrição resulta em RNAs policistrônicos com

informações de vários genes, sem necessariamente, possuírem correlação de função (TEIXEIRA e DAROCHA, 2003).

Os transcritos primários policistrônicos são processados por *trans-splicing*, o qual consiste na adição de uma sequência conservada de 39 nucleotídeos na extremidade 5' de cada mRNA, denominada sequência líder - *spliced leader* (SL) ou mini-exon (SUTTON E BOOTHROYD, 1986; LIANG *et al.*, 2003) e adição de uma cauda de adeninas (poli-A) na extremidade 3'. A estrutura do *cap* dos tripanossomatídeos é diferente, pois a mesma é composta por quatro nucleotídeos altamente modificados em adição à 7-metilguanossina, sendo assim denominado de *cap-4* (m7 Gpppm2 6 AmpAmpCmpm3Ump) (BANGS *et al.*, 1992).

A transcrição policistrônica e a ausência de promotores clássicos de RNA polimerase II (PALENCHAR e BELLOFATO, 2006) indicam que o início da transcrição não é uma etapa crucial para regulação da expressão gênica em *T. cruzi* (CLAYTON, 2002). Acredita-se que a maior parte da regulação nesses organismos deva ocorrer a nível pós transcricional sendo que um importante mecanismo de regulação ocorre através de elementos que se ligam às regiões 5'e 3' não traduzidas, UTRs, dos mRNAs (COUGHLIN *et al.*, 2000; QUIJADA *et al.*, 2000; MYUNG *et al.*, 2002).

Como citado anteriormente, existe uma variedade de formas e hospedeiros que o parasita apresenta durante seu ciclo de vida, resultando em grandes mudanças no perfil de expressão gênica nas diferentes etapas de diferenciação durante o ciclo de vida desse parasita (GOLDENBERG *et al.*, 1985) tornando o papel da regulação da expressão gênica decisivo na adaptação do parasita durante o ciclo de vida.

1.4 PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO A RNA

As características peculiares na estrutura de genes e transcrição de RNA em tripanossomatídeos faz com que a regulação gênica ocorra majoritariamente a nível pós transcricional. As proteínas de ligação a RNA estão envolvidas em vários processos de regulação como: processamento do transcrito primário de RNA mensageiro (poliadenilação e *splicing*), tradução, estabilização e degradação de mRNAs no citoplasma, como também, e não menos importante, o transporte de mRNA do núcleo para o citoplasma (GLISOVIC *et al.*, 2008).

As proteínas de ligação a RNA – *RNA binding protein* (RBP) possuem um papel principal e formam os complexos ribonucleoproteicos (mRNPs) (DREYFUSS *et al.*, 2000) que direcionam os mRNAs do núcleo para o citoplasma visando sua tradução, estocagem ou degradação (KEENE, 2001). Diversas famílias de RBPs já estão bem caracterizadas em eucariotos, como por exemplo: KH (*K-homology*); RGG Box (Arg- Gly- Gly); DEAD/DEAH Box; *zinc finger* (ZnF, dedo de zinco); de ligação a RNA dupla fita dsRBD; *cold-shock*; Pumilio/FBF (PUF ou Pum-HD) e *Piwi/Argonaute/Zwille* (PAZ) (GLISOVIC *et al.*, 2008); Há também o domínio RBD (*RNA binding domain*) também conhecido por RNP (*ribonucleoprotein*) ou RRM (*RNA recognition motif*), esse domínio é um dos mais abundantes encontrados.

As RBPs podem conter mais de um domínio especializado na ligação ao RNA, ou domínios acessórios que interagem com outras moléculas; RBPs que controlam um grande número de transcritos costumam ser mais estáveis. Um exemplo interessante de proteína de ligação a RNA, em célula de mamífero, são as proteínas SR. Elas possuem um ou dois domínios RRM e apresentam também um domínio rico em serinas e argininas, o qual possibilita sua interação com outras proteínas. Há interação direta dessas proteínas no processamento de RNA e sua função vai desde envolvimento no *splicing*, exportação de mRNA entre núcleo e citoplasma, degradação, até tradução de mRNA (SHEPARD e HERTEL, 2009; GODIN e VARANI, 2007). A figura 1.2 mostra esquematicamente a importância do domínio RS.



FIGURA 1.2 – O domínio RS medeia as redes de interações de transcrição, *splicing*, exportação e vigilância de mRNA. Proteínas SR estão associadas diretamente com a maquinaria de transcrição, elementos regulatórios de *splicing* de pré-mRNA, *branchpoint*, maturação de mRNA e sítio de *splicing* em 5' (modificado de GODIN e VARANI, 2007).

1.5 PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO A RNA (RBPs) CONTENDO DOMÍNIO RRM

O domínio RRM (*RNA Recognition Motif*) de ligação ao RNA é considerado um dos mais abundantes domínios encontrados em proteínas de ligação a RNA em eucariotos superiores (VENTER *et al.*, 2001). Proteínas que contém esse domínio estão envolvidas na maioria dos processos pós transcricionais de regulação da expressão gênica e podem se ligar com fraca ou forte afinidade e especificidade a RNAs e interagir com transcritos de diferentes comprimentos (CLÉRY *et al.*, 2008). Adicionalmente também podem interagir com outros RRM, sendo esta uma das razões porque os complexos proteína-RRM são tão numerosos e têm um papel importante no metabolismo de RNA da célula (CLÉRY *et al.*, 2008).

A sequência consenso do domínio RRM é composta por aproximadamente 90 aminoácidos, os quais formam o domínio de ligação a RNA (*RNA-binding domain – RBD*), o qual se liga a pré-mRNA, mRNA, rRNA ou snRNA. O domínio também contém dois motivos conservados: RNP1 e RNP2; sua estrutura possui quatro folhas β antiparalelas entremeadas por duas α -hélices ($\beta\alpha\beta\alpha\beta$), três resíduos conservados na folha β localizados nos motivos conservados realizam a interação com a molécula de RNA, uma arginina ou lisina que forma uma “ponte de sal” com o esqueleto fosfodiéster e dois resíduos aromáticos, que fazem interações por empilhamento das nucleobases. De 2 a 8 nucleotídeos podem ser reconhecidos, dependendo da estrutura apresentada pelo RNA (BURD *et al.*, 1994; LUNDE, MOORE e VARANI, 2007; CLÉRY *et al.*, 2008), na Figura 1.3 observa-se essa interação entre domínio RRM e RNA. Esse domínio de vital importância em eucariotos superiores está também presente em *T. cruzi*.

De Gaudenzi e colaboradores (2005) descreveram aproximadamente 79 proteínas com o domínio RRM em *T. cruzi*, porém, poucas foram caracterizadas, tornando-se um importante e interessante alvo de estudo. Um exemplo de uma proteína que já foi caracterizada é a TcUBP1. Essa proteína de ligação a RNA contém um único motivo RRM, que atua como um fator *trans* na desestabilização de mRNAs por se ligar a elementos ricos em AU das regiões 3' não traduzidas do mRNA da SMUG mucina; sua região C-terminal, a qual é rica em glicinas, permite homodimerização ou heterodimerização com a proteína TcUBP2 formando um complexo de regulação negativa sendo essa ligação rompida pela PABP - proteína de ligação a poli(A) (D'ORSO e FRASCH, 2002; DE GAUDENZI *et al.*, 2005).

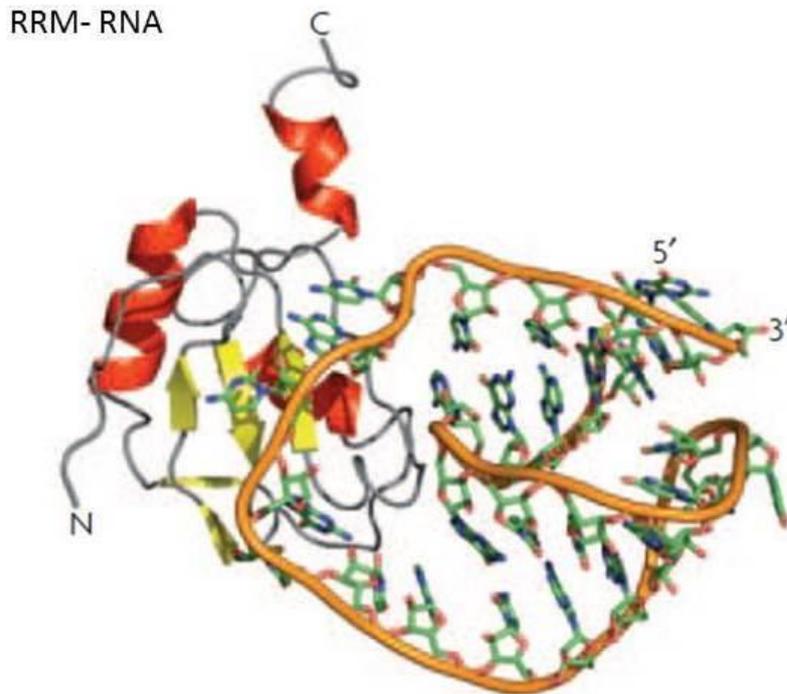


FIGURA 1.3 – Interação entre o domínio RRM e RNA. Estrutura tridimensional da interação entre o domínio RRM N-terminal da proteína humana U1A e uma molécula de RNA. Nesta estrutura bases em fitas simples são reconhecidas especificamente pela folha- β da proteína e duas alças que conectam os elementos da estrutura secundária (modificado de LUNDE, MOORE, VARANI, 2007).

1.6 GRÂNULOS DE RNA e mRNPs

O controle da tradução e degradação de mRNA é extremamente importante para a regulação da expressão gênica em eucariotos (PARKER e SHETH, 2007). Ambos os processos têm o envolvimento do cap 5' (7 metil guanossina – m^7G) do mRNA, o qual é considerado muito importante para tradução da maioria dos mRNAs e ao mesmo tempo protege da degradação exonucleotídica 5'-3' (FRANKS e LYKKE-ANDERSEN, 2008). Em eucariotos a degradação do mRNA é usualmente iniciada através do encurtamento da cauda poli-A, seguida pela remoção do cap 5' pela ação das enzimas Dcp1p/Dcp2p, o que resulta na degradação 5'-3' do mRNA pela exonuclease Xrn1p. Pode ocorrer alternativamente a degradação 5'-3' do mRNA através do exossomo (PARKER e SHETH, 2007; FRANKS e LYKKE-ANDERSEN, 2008).

A localização dos mRNPs está relacionada diretamente com a competição entre mRNPs que estão prontos para tradução, e os agregados a maquinaria de *decapping*. Enquanto os mRNAs relacionados a tradução estão distribuídos por todo o citoplasma, os mRNAs complexados a maquinaria de *decapping* estão

concentrados em grânulos de estresse ou *P-bodies* (BALAGOPAL e PARKER, 2009).

Os *P-bodies* são complexos de mRNAs associados a proteínas (mRNPs) e tem sua formação controlada pela disponibilidade de mRNAs não traduzidos e livres no citoplasma (TEIXEIRA, 2005). Os *P-bodies* contêm componentes da maquinaria de degradação 5' - 3', como por exemplo a XRN1 (BASHKIROV et al., 1997), mecanismos de indução de silenciamento, como exemplo a Argonauta (BEHM-ANSMANT et al., 2006) e também componentes da maquinaria de degradação *nonsense*, como por exemplo SMG 7 (UNTERHOLZNER e IZAURRALDE, 2004).

Por serem considerados estruturas dinâmicas, os *P-bodies* são formados de mRNAs não traduzidos e proteínas específicas, podendo responder a diferentes condições de estresse com aumento de número e tamanho (TEIXEIRA, 2005; BALAGOPAL e PARKER, 2009). Quando estão sob condições de estresse, a maioria dos mRNAs são não traduzidos, e esses estão prontos para estocagem ou degradação induzindo, portanto a formação de *P-bodies* (TEIXEIRA, 2005).

Os mRNAs citoplasmáticos não traduzidos podem formar outro grânulo citoplasmático RNP denominado grânulo de estresse contendo mRNAs não traduzidos complexados a fatores de início da tradução (eIF4E, eIF4G, eIF4A, eIF3 e eIF2), a subunidade ribossomal 40 S e Pabp1 (*poly A binding protein*) (ANDERSON e KEDERSHA, 2006).

Estudos mostram que *P-bodies* e grânulos de estresse interagem fisicamente e que os mRNAs podem se mover entre esses dois compartimentos. Um exemplo ocorre em células de mamíferos que quando tratadas com arsenito, ambos, *P-bodies* e grânulos de estresse, estão aumentados, estando os *P-bodies* intimamente ligados aos grânulos de estresse (KEDERSHA et al., 2005; WILCZYNSKA et al., 2005).

Conclui-se que, há uma dinâmica de mRNPs no citoplasma de forma que os mRNAs podem se deslocar entre polissomos, *P-bodies* e grânulos de estresse (BALAGOPAL e PARKER, 2009). O uso de inibidores de início da tradução, indutores de diferentes estresses, ou ainda mutações podem resultar na perda de mRNAs dos polissomos e o consequente aumento de mRNAs em *P-bodies* e grânulos de estresse (TEIXEIRA et al., 2005; ANDERSON e KEDERSHA, 2006; KEDERSHA et al., 2005). Contrariamente, no caso de drogas que bloqueiam a saída dos mRNAs traduzidos dos polissomos observa-se uma diminuição na quantidade de *P-bodies* e grânulos de estresse, sugerindo que há um equilíbrio dinâmico entre

os mRNAs desses compartimentos e dos polissomos (TEIXEIRA *et al.*, 2005; KEDERSHA *et al.*, 2000; MOLLET *et al.*, 2008).

BALAGOPAL e PARKER (2009) propuseram um modelo para o metabolismo de mRNA citoplasmático em células eucarióticas, o qual foi chamado de ciclo do mRNA, mostrando que há migração de mRNA entre *P-bodies*, grânulos de estresse e polissomos. Segundo esse modelo os transcritos nascentes são exportados do núcleo e podem ser traduzidos ou direcionados tanto para *P-bodies*, como grânulos de estresse. Os mRNA após diversos ciclos de tradução ou em caso de condições celulares específicas que afetem a tradução associam-se com proteínas repressoras da tradução podendo então ser degradados ou estocados para tradução posterior (Figura 1.4).

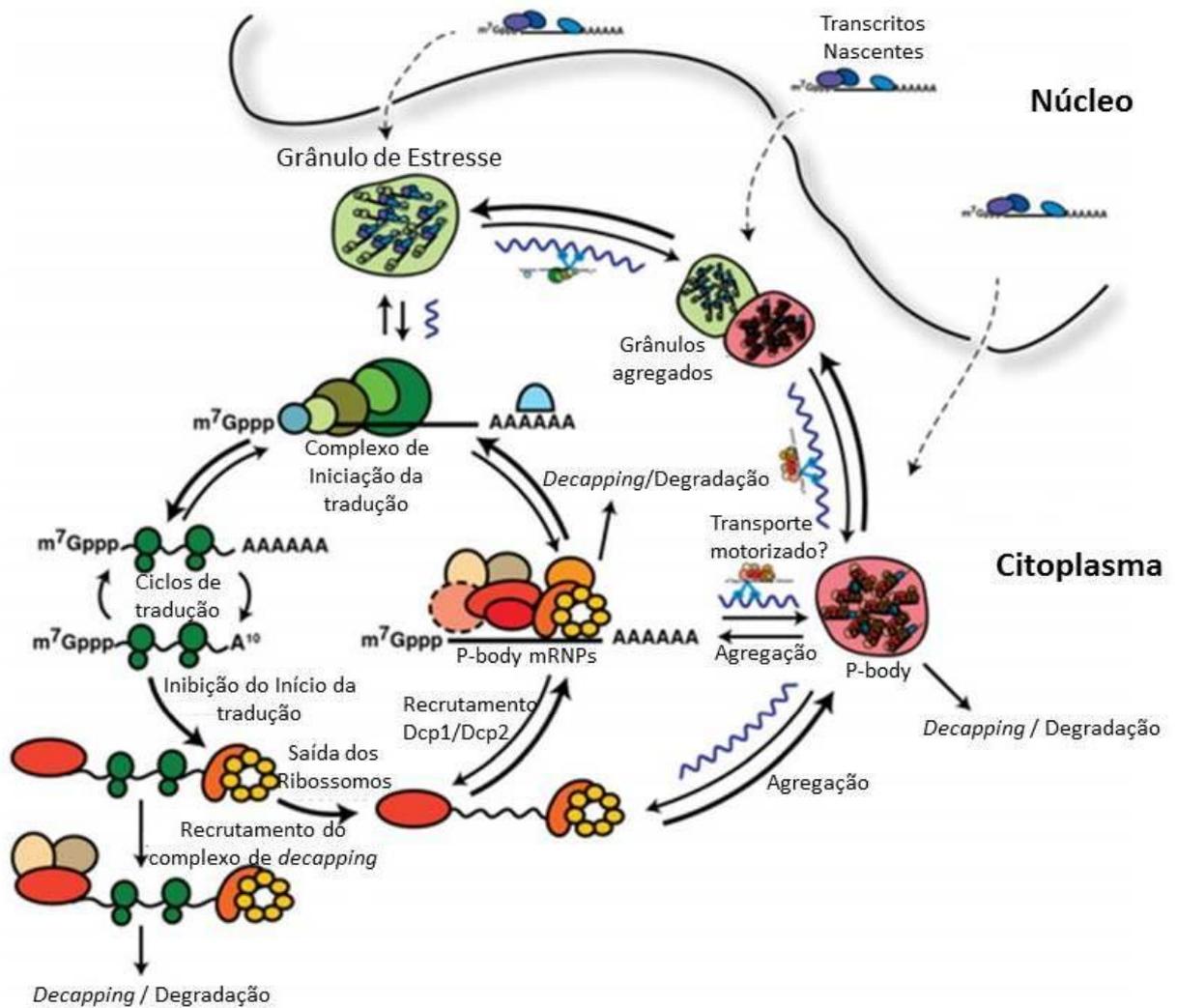


FIGURA 1.4 – Modelo integrando grânulos de estresse e *P-bodies* no ciclo do mRNP. Modelo especulativo de transições do mRNP, particularmente durante o estresse (Adaptado de BALAGOPAL e PARKER, 2009).

As proteínas TIA-1 e TIAR são proteínas de ligação a RNA, com domínio RRM, de grande importância, pois estão relacionadas a diversos eventos de regulação da expressão gênica (DEMBER, 1996). Observações sugerem fortemente que TIA-1 e TIAR estão envolvidas na sinalização de morte apoptótica da célula (KAWAKAMI *et al.*, 1992); sendo que, TIAR é translocada do núcleo para o citoplasma em resposta exógena ao desencadeamento do processo de apoptose (TAUPIN *et al.*, 1994) e TIA-1 é fosforilada por uma serina/treonina quinase, a qual é ativada durante o processo de apoptose mediado por Fas (TIAN *et al.*, 1995).

TIA-1 e TIAR são proteínas de ligação a RNA e ambas possuem três domínios RRM amino terminais, sendo que, os mesmos são muito similares entre as duas proteínas. O primeiro domínio tem 79% de identidade, o segundo 89% e o terceiro domínio possui 91% de identidade de aminoácidos entre as duas proteínas.

Ensaio de ligação a RNA *in vitro* mostraram que o segundo domínio RRM, de ambas as proteínas, liga-se ao RNA com a mesma especificidade de sequência como se fosse sua sequência total. No entanto, os domínios RRM 1 e RRM 3, quando expressos isoladamente, não se ligam a sequências específicas de RNA, todavia a afinidade de RRM 2 ligar-se a sequência selecionada de RNA aumenta quando é expressa juntamente com os outros dois domínios (DEMBER *et al.*, 1996).

Outro dado interessante é que as proteínas TIA-1 e TIAR reconhecem preferencialmente regiões ricas em uridina (AREs) em mRNAs, variando de três a onze nucleotídeos (DEMBER *et al.*, 1996). A proteína TIA-1 interage com a região 3' UTR dos mRNAs promovendo a degradação dos mRNAs e inibindo a síntese de proteínas (ANDERSON *et al.*, 2004). Já foi descrito seu envolvimento em alguns alvos, como por exemplo, a regulação de mRNAs de COX-2 (ciclooxigenase 2) (DIXON *et al.*, 2003). TIAR também se encontra envolvida na regulação dos transcritos que contêm AREs através da ligação à região 3' UTR, como por exemplo o fator alfa de necrose tumoral (GUEYDAN *et al.*, 1999).

Quando o complexo de proteínas responsável pelo início da tradução está inativo, o mesmo permite que TIA-1, TIAR ou ambas redirecionem os mRNAs não traduzidos dos polissomos para os grânulos de estresse regulando o equilíbrio entre polissomos e grânulos de estresse, pois TIA-1 e TIAR podem influenciar a frequência com que esses transcritos são classificados para voltarem ao processo de tradução ou permanecerem em grânulos de estresse (ANDERSON e KEDERSHA, 2002).

Estudos mostraram que TIA-1 e TIAR possuem localização nuclear em células cultivadas sob condições normais, porém análises de heterocarion afirmam que as mesmas realizam migração constante entre núcleo e citoplasma, mostrando, portanto que em resposta ao estresse ambiental são vistas acumuladas no citoplasma, agregando-se em grânulos de estresse (ANDERSON e KEDERSHA, 2002), e também que se co-localizam quando submetidas ao estresse (KEDERSHA *et al.*, 1999); e por fim, quando acumuladas no núcleo estão envolvidas em outras funções como, por exemplo, o *splicing* de pré-mRNAs (LE GUINER *et al.*, 2001).

Os tripanossomas são exemplos notáveis da importância do metabolismo de mRNA na regulação da expressão gênica (CASSOLA, DE GAUDENZI e FRASCH, 2007). GOLDENBERG e colaboradores (1985) demonstraram a presença de mRNAs não traduzidos não associados a polissomos, sugerindo que os grânulos de mRNA podem atuar como centros de estocagem ou degradação desses transcritos.

Muito se discute com relação aos grânulos de RNA em tripanossomas, pois não se sabe se essas estruturas são ancestrais a outros grânulos de mRNA encontrados em células de mamíferos (CASSOLA, DE GAUDENZI e FRASCH, 2007) e qual sua real composição e formação (KRAMER, 2008). Os grânulos de RNA foram descritos em *T. cruzi* como estruturas semelhantes a *P-bodies* em condições celulares normais (HOLETZ *et al.*, 2007) e quando submetidos a estresse observou-se um perfil mais parecido a grânulos de estresse (HOLETZ *et al.*, 2010).

Os grânulos de RNA que aparecem em resposta ao estresse nutricional não podem ser considerados grânulos de estresse genuínos, visto que não possuem uma semelhança proteômica com os grânulos encontrados em outros organismos. Em condições celulares normais também não foi encontrado o core de proteínas identificadas previamente em outros trabalhos com *P-bodies*. Por esse motivo são denominados simplesmente de grânulos de RNA (CASSOLA *et al.*, 2007; HOLETZ *et al.*, 2007; HOLETZ *et al.*, 2010).

HOLETZ e colaboradores (2007) mostraram através da caracterização da proteína DHH1, a presença de estruturas semelhantes a *P-bodies*. Através de ensaios de imunofluorescência, em condições normais celulares, se observou a proteína concentrada no citoplasma em forma de grânulos e que, em condições de estresse, houve um aumento em tamanho e número desses grânulos. Interessantemente, esse aumento de número de grânulos se correlaciona com a diminuição da atividade de tradução de mRNAs.

Outro experimento importante realizado foi o perfil de polissomos para análise de sua relação com o processo de tradução. Foi observado que, o tratamento com cicloheximida, a qual inibe a elongação da tradução devido ao aprisionamento dos mRNAs nos polissomos, houve uma diminuição dos grânulos citoplasmáticos comparado a uma célula não tratada. Já quando foi realizado o tratamento com puromicina, a qual causa uma terminação precoce da tradução e a dissociação dos polissomos, houve aumento da quantidade e tamanho dos grânulos. Esses resultados indicam que a proteína está associada a diversos complexos que co-sedimentam com polissomos, porém, não associada a maquinaria de tradução (HOLETZ *et al.*, 2007).

Outra proteína identificada em estruturas semelhantes a *P-bodies* em *T. cruzi* foi a TcPUF6. A superexpressão dessa proteína faz com que haja redução da expressão de seus mRNAs. Em mamíferos, se observa que a proteína PUF6 se localiza em grânulos de estresse e em leveduras não há co-localização da mesma

com DHH1. No entanto experimentos de associação de PUF6 com DHH1 sugerem que PUF6 promova a degradação de seus mRNAs por meio da interação com a maquinaria de degradação. Por fim, essa interação entre PUF6 e DHH1 em *T. cruzi* pode sugerir que essas estruturas chamadas de *P-bodies like* possam ter diferenças na sua estrutura e função em *T. cruzi* quando comparado a outros eucariotos (DALLAGIOVANNA *et al.*, 2008).

CASSOLA e colaboradores (2009) mostraram que a proteína TcUBP1 (ligadora de RNA que possui um único motivo RRM e é o responsável pela estabilização de mRNA) em condições normais celulares, se encontrava no citoplasma e em situações de estresse a mesma passava a se localizar no núcleo. Essas evidências indicam que há um transporte entre núcleo e citoplasma, e que o seu único domínio RRM é fundamental para que ocorra a mudança de localização. Outro dado interessante foi de que o estresse gerado devido ao tratamento com arsenito de sódio parece não induzir a formação de grânulos de estresse, porém em outros organismos já foi visto e amplamente utilizado para caracterização de grânulos de estresse.

1.7 EXPORTAÇÃO E MOVIMENTAÇÃO DE mRNA EM EUCARIOTOS DO NÚCLEO AO CITOPLASMA

Os complexos de poro nuclear (NPC) são formados por proteínas denominadas nucleoporinas, as quais totalizam uma massa de aproximadamente 125 MDa e podem ser compostos por 50 a 100 diferentes proteínas (ALLEN *et al.*, 2000). Moléculas menores que 40 kDa possuem livre acesso, processo conhecido por difusão passiva, enquanto que, as macromoléculas atravessam o núcleo com o auxílio de proteínas, através de um processo seletivo que necessita de sinais de transporte (YONEDA, 2000).

O trabalho de REED e CHENG (2005) mostrou, em mamíferos, que proteínas SR se associam com o complexo TREX, que é recrutado para o mRNA durante o *splicing*. Esse trabalho mostrou também que as proteínas SR possuem um papel conservado na exportação de mRNA e podem estar envolvidas na interação com TAP (receptor de exportação). A figura 1.5 mostra um esquema da associação entre o complexo TREX e “spliceossomo” em humanos.

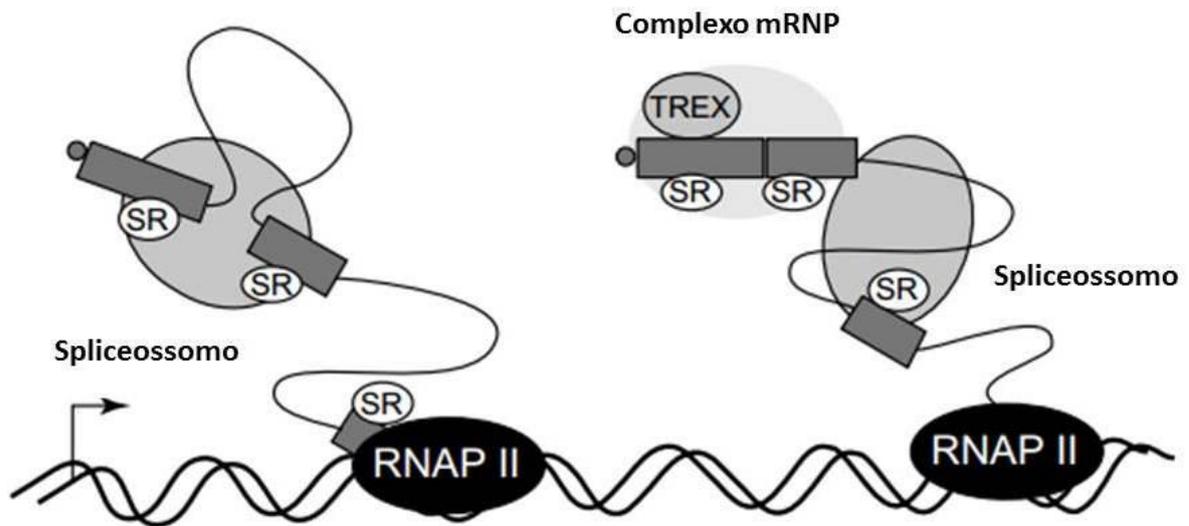


FIGURA 1.5 – Recrutamento do complexo TREX durante o *splicing*. A montagem do “spliceossomo” e *splicing* ocorre quando o transcrito é sintetizado pela RNA polimerase II (RNAP II). Proteínas SR (SR), as quais recrutam o “spliceossomo”, permanecem ligadas ao mRNA realizando o recrutamento do complexo TREX (modificado de REED e CHENG, 2005).

Observou-se em outro trabalho que as proteínas SR estão em constante migração do núcleo celular ao citoplasma. A associação do complexo de exportação a fatores de *splicing* reflete um mecanismo que seleciona o mRNA corretamente processado em detrimento ao pré-mRNA (SANFORD e BRUZIK, 2001; HUANG, YARIO e STEITZ, 2004). O domínio SR une-se à proteína TAP, receptora de exportação, para realizar tal tarefa (CÁCERES, SCRETON e KRAINER, 1998). Sabe-se que a fosforilação dos domínios SR regula a interação entre essas proteínas e TAP. Quando fosforilados interagem com TAP e quando desfosforilados associa-se a mRNA e TAP mostrando ser um mecanismo seletivo de exportação de mRNAs corretamente processados (HUANG, YARIO e STEITZ, 2004). A figura 1.6 mostra o importante papel das proteínas SR na exportação de mRNA em humanos.

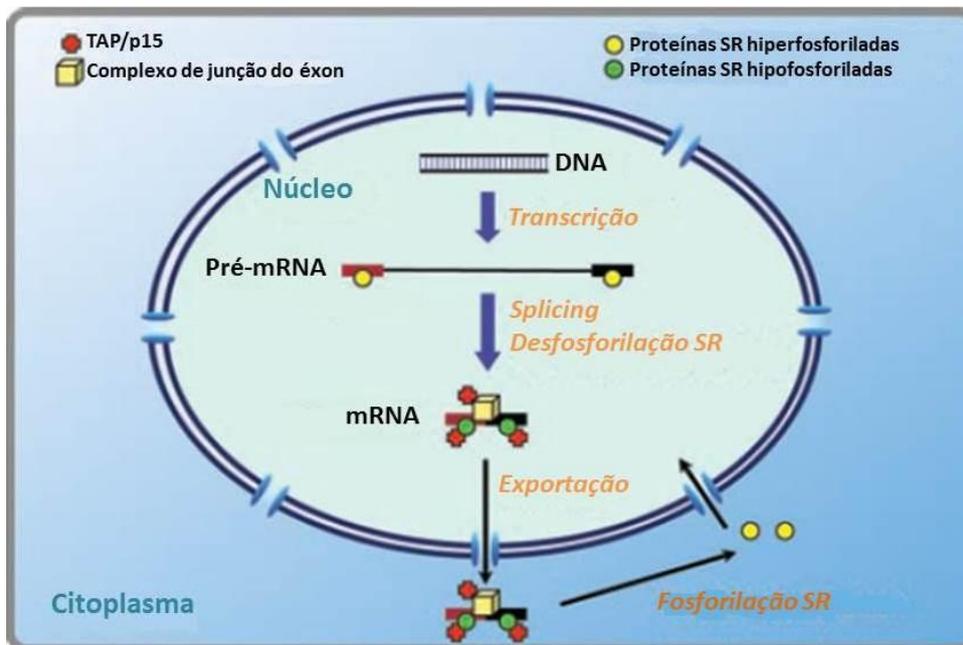


FIGURA 1.6 – Um modelo do papel da desfosforilação das proteínas SR na exportação de mRNA. As proteínas SR hiperfosforiladas são recrutadas ao pré-mRNA potencializando o evento do *splicing*, com isso ocorre a desfosforilação das mesmas, as quais se tornam hipofosforiladas, porém mantendo-se associadas ao mRNA. A proteína TAP é então recrutada, juntamente com o complexo de junção do éxon permitindo a exportação da molécula. Após a exportação do mRNA para o citoplasma ocorre a fosforilação de proteínas SR novamente, as quais se dissociam dos complexos mRNPs e retornam ao núcleo (modificado de HUANG, YARIO e STEITZ, 2004).

Essa migração constante que ocorre entre núcleo e citoplasma torna o mecanismo de transporte um acontecimento crítico da disponibilidade das proteínas na célula e ao mesmo tempo essencial para formação dos grânulos, assim, torna-se um possível alvo de modulação da expressão gênica (ANDERSON e KEDERSHA, 2007).

Devido à importância de caracterização de proteínas de ligação a RNA, as quais estão relacionadas intimamente ao processo de regulação da expressão gênica DE GAUDENZI e colaboradores (2005), como dito anteriormente, descreveram várias proteínas com o domínio RRM em *T. cruzi*, porém, poucas foram caracterizadas.

ALVES e colaboradores (2010), realizaram um estudo com o intuito de caracterizar os complexos ribonucleoproteicos (mRNPs) associados à tradução, estocagem ou degradação em *T. cruzi*. Foram utilizadas esferas magnéticas de oligo dT para capturar complexos de mRNA associados a proteínas presentes em frações polissomais ou pós-polissomais separadas através de um colchão de sacarose. As proteínas desse complexo foram identificadas por espectrometria de massas. Dentre as proteínas identificadas por ALVES e colaboradores (2010) encontra-se RBSR1.

A proteína RBSR1 foi primeiramente identificada e nomeada no trabalho de DE GAUDENZI (2005) como uma proteína com domínio RRM, e posteriormente foi encontrada na fração polissomal de epimastigotas sob estresse nutricional no trabalho de ALVES (2010). Trata-se de uma *RNA-binding protein*, que possui um domínio RRM e uma sequência rica em poli-arginina, a presença desses domínios e a importância dos mesmos nos mecanismos de regulação pós-transcricionais do parasita torna essa proteína um interessante alvo de estudo. A proteína RBSR1 foi selecionada para caracterização e análise dos complexos ribonucleoproteicos a ela associados. Com essas informações é possível avaliar seu provável papel na regulação da expressão gênica do parasita.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a caracterização da proteína RBSR1 e suas interações moleculares sob condições normais e sob diferentes tipos de estresse além de avaliar seu papel na regulação da expressão gênica de *T. cruzi*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A) Realizar a caracterização da proteína RBSR1

- Determinar a localização subcelular de RBSR1 sob condições normais e estresse através de microscopia de fluorescência;
- Determinar o padrão de expressão de RBSR1 ao longo do ciclo de vida do parasita.
- Determinar o perfil de sedimentação de RBSR1 em gradiente de sacarose visando à associação da proteína a polissomos e complexos ribonucleoproteicos.

B) Realizar a caracterização dos complexos mRNPs associados a RBSR1

- Determinação de RNAs alvo da proteína por ensaio de imunoprecipitação e sequenciamento em larga escala em formas epimastigotas do parasita.
- Determinação de proteínas presentes nos mRNPs contendo RBSR1 através de ensaio de imunoprecipitação e espectrometria de massas em formas epimastigotas e sob estresse nutricional do parasita.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

3.1.1 Procedência dos reagentes e materiais

Amicon: microcon 10.

Amersham-Pharmacia Biotech: dNTPs.

Amersham Biosciences: membrana de nitrocelulose.

Amresco: detergente Nonidet® NP-40.

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

Appligene: proteinase K.

BioRad: agarose, azul de bromofenol.

Cult-lab: soro fetal bovino.

Gibco: gentamicina.

Invitrogen: acrilamida, anticorpo secundário Alexa 488, bis-acrilamida, BP clonase™ *enzyme mix*, DAPI, DTT, EDTA, gel de acrilamida 6%, inibidor de RNase OUT™, LR clonase™ *enzyme mix*, *Platinum* Taq DNA polimerase, kit PureLink™ PCR Micro kit, kit RiboMinus™ Concentration Module, RNaseOUT™, 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.

Promega: BCIP, fosfatase alcalina, NBT.

Qiagen: coluna de Ni-NTA (nitrile-triacetic acid- QIAexpress System), MiniElute PCR Purification kit, QIAprep Spin Miniprep, RNeasy® kit.

Roche: protease inhibitor cocktail EDTA-free.

Sigma-Aldrich: membranas de diálise.

Sigma: adjuvante completo de Freud, ampicilina, β-mercaptoetanol, brometo de etídeo, BSA, canamicina, cicloheximida, cloranfenicol, DEPC, DMSO, ficoll, heparina, hepes, imidazol, IPTG, n-propil galacto, paraformaldeído, poli-L-lisina, puromicina, triton x-100, tween 20.

TPP: garrafa para cultivo celular.

USB: persulfato de amônio, polietilenoglicol, uréia.

Vetec: glicina.

3.1.2 Soluções utilizadas

Água livre de RNase (DEPC): Água ultrapura tratada com dietil pirocarbonato (DEPC), na concentração de 1:1000 por 30 minutos a 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 Coomassie: Coomassie 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 separação para proteínas: Acrilamida : bisacrilamida 33% : 0,9%, 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%.

Solução de PSG: NaH₂PO₄ 2,5 mM, NaCl 300 mM, glicose 55 mM.

Solução de purificação de proteína: NaH₂PO₄ 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,0, Triton 2%, Uréia 8 M.

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%.

Tampão de eluição (coluna de níquel): NaCl 300 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, Imidazol 300 mM, Uréia 8 M.

Tampão IMP-0: NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7,5.

Tampão IMP-1: NaCl 150 mM, NP- 40 0,5%, Tris-HCl 20 mM pH 7,5.

Tampão de ligação (coluna de níquel): NaCl 300 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, Imidazol 10 mM, Uréia 8 M.

Tampão NKM: Hepes 10 mM pH 7,4, KCl 5 mM, MgCl₂ 1,5 mM, NaCl 140 mM.

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

Tampão PBS (*Phospatase-buffer saline*): KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, NaHPO₄.7HO 4,3 mM, NaCl 137 mM.

Tampão de Revelação por Fosfatase Alcalina (*AP buffer*): MgCl₂ 5 mM, NaCl 100 mM, Tris-HCl 100 mM pH 9,5.

Tampão de *SDS-PAGE*: Tris-base 255 mM, glicina 192 mM, SDS 1%.

Tampão de sonicação: Inibidor de protease EDTA-free, lisozima 50 µg/mL, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0.

Tampão TBE: Tris-base 89 mM, Ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM pH 8,0.

TE: Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM.

Tampão TKM: Tris-HCl 10mM pH 7,4, MgCl₂ 10 mM, KCl 300 mM.

Tampão TKMP: Tris-HCl 10mM pH 7,4, MgCl₂ 2 mM, KCl 500 mM.

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

3.1.3 Meios de Cultura

LB: Bacto-triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 85,6 mM.

LIT: Infuso de fígado (Difco) 0,5%, Bacto-triptose (Difco) 0,5%, Soro fetal bovino (Cult Lab) 10%, Hemina 0,0025%, Glicose 10 mM, NaCl 75,3 mM, KCl 5,4 mM, Na₂HPO₄ 56,4 mM.

TAU (*Triatomine Artificial Urine*): NaCl 190 mM, KCl 17 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 2 mM, Tampão fosfato 8 mM pH 6,0 (NaH₂PO₄ 0,2 M), NaHCO₃ 0,035%.

TAU-3AAG: Meio TAU + Glicose 10 mM, Ácido L-aspartico 2 mM, Ácido L-glutâmico 50 mM, L-prolina 10 mM.

3.2 CLONAGEM MOLECULAR DO GENE E EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

3.2.1 Amplificação de gene por PCR

Os iniciadores para o gene selecionado foram desenhados com o auxílio do programa *Primer Select (Laser Gene, DNA Star)* (Tabela 3.1). Para a amplificação do gene por PCR foram testadas diferentes temperaturas e concentrações de

reagentes objetivando o melhor desempenho da reação de PCR. Para uma menor taxa de erro utilizou-se a enzima de alta fidelidade *Platinum Taq Polimerase High Fidelity* (Invitrogen) 1 U/ μ L, garantindo a boa fidelidade das sequências. Foram adicionados também 2,5 mM de dNTP, 2 mM de $MgSO_4$, 10 pmol dos oligonucleotídeos (*forward* e *reverse*), 100 ng de DNA genômico de *T. cruzi* como molde, tampão específico para a enzima utilizada, água ultrapura para completar a reação. A ciclagem para a amplificação do gene que codifica para TcRBSR1 (6625.70) consistiu de um passo inicial de 2 minutos a 94°C, seguido por 25 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 54°C e 1 minuto a 68°C. Após a PCR uma alíquota de 5 μ L de cada reação foi misturada com tampão de amostra de DNA e analisada em gel de agarose 1% em tampão TBE a fim de determinar o rendimento e a especificidade da reação.

Os *amplicons* gerados a partir da PCR foram purificados com uma solução de 30% PEG 8000/ 30 mM $MgCl_2$, o DNA foi suspenso em TE e adicionada a solução de PEG/ $MgCl_2$, em volume de 1:1, seguindo orientações fornecidas pelo sistema de purificação da plataforma *Gateway*®. A mistura foi agitada vigorosamente e centrifugada por 15 minutos a 10.000 x g, já o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e o sedimento contendo o DNA foi seco a 60°C por 15 minutos. O sedimento foi suspenso em 10 μ L de tampão TE e as amostras armazenadas a -20°C.

TABELA 3.1 – Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do gene de interesse.

Gene	Sequência dos oligonucleotídeos
Tc00.104753506625.70	F 5' ATGACGCGTGTGTACGTCGGTA 3'
	R 5' TCATGATGACAATGAGGAACGG 3'

3.2.2 Eletroforese de DNA

A amostra foi analisada por eletroforese horizontal utilizando géis de agarose 1%, como descrito por Sambrook e colaboradores (1989). O tampão utilizado foi TBE 1X, o gel foi submerso no mesmo tampão e submetido a uma diferença de potencial (70 a 100 V) com amperagem constante; e como marcador de massa molecular foi utilizado 1kb *Plus* (Invitrogen).

Para visualização do resultado, as moléculas foram coradas após imersão do gel em solução de brometo de etídio 0,5 µg/mL por aproximadamente 20 minutos e visualizadas em transiluminador com luz ultravioleta (260 nm), acoplado ao sistema de fotodocumentação (*UV White Darkroom – UVP Bioimaging Systems*).

3.2.3 Clonagem em vetor de entrada pDONR™221

O produto de PCR purificado foi clonado em vetor de entrada da plataforma de clonagem comercial Gateway® (Invitrogen). Essa plataforma se baseia na recombinação utilizando sequências sítio específicas do bacteriófago lambda (LANDY, 1989), permitindo que, a partir do clone de entrada, seja feita a passagem de forma rápida e eficiente, do inserto para um vetor de destino, o qual pode ser dos mais variados tipos, de acordo com a necessidade de caracterização funcional.

Para gerar um clone de entrada é necessário que ocorra recombinação entre os sítios específicos *attB* inseridos no produto de PCR e *attP* do vetor pDONR™221, dando origem aos sítios *attL* no vetor e *attR* no produto intermediário. A enzima utilizada nessa reação é formada por uma integrase do bacteriófago lambda (Int) e um fator de integração do hospedeiro de *E. coli* (IHF) (*BP Clonase™ enzyme mix*) (Figura 3.1). O vetor pDONR™221 contém um gene de resistência a canamicina utilizado para selecionar as colônias, e regiões *AttP1* e *AttP2*, utilizadas na recombinação com os produtos de PCR flanqueados por regiões *AttB* (Figura 3.2).

A inserção dos produtos de PCR no vetor pDONR™221 foi realizada conforme orientações do fabricante (*Gateway BP clonase Enzyme mix*). A reação foi feita com 150 ng do produto de PCR, 150 ng do plasmídeo pDONR™221 num volume final de 10 µL completados com TE e incubada a 25°C por 16 horas. Após essa etapa, foi adicionado 1 µL de proteinase K e a reação incubada por 10 minutos a 37°C.

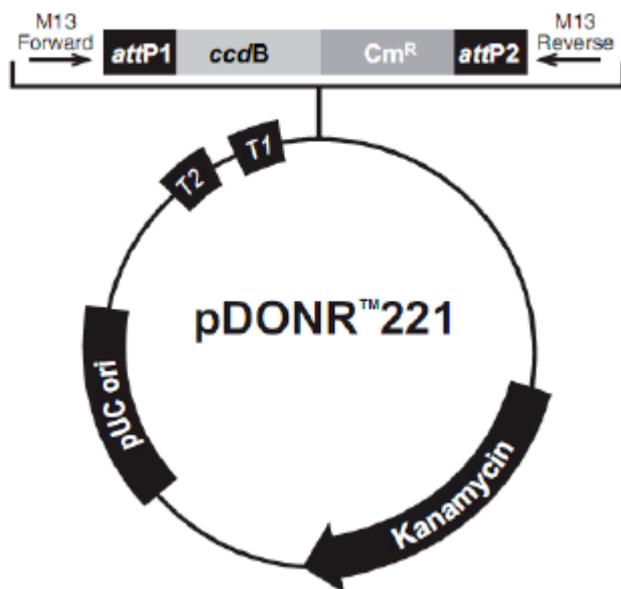


FIGURA 3.1 – Mapa do vetor de entrada pDONR™221. pUC ori: origem de replicação de alta cópia. attP1/attP2: sequência de 200 bp presente no pDONR para recombinação com sítio attB presente no produto PCR. ccdB: gene que permite seleção negativa do pDONR, interferindo na DNA girase de *E. coli*, que é substituído após recombinação com o sítio attB do produto de PCR. Kanamycin: gene de resistência a canamicina. CmR: gene de resistência ao cloranfenicol. T1/T2: terminadores de transcrição. M13 Forward e Reverse: Oligonucleotídeos iniciadores do vetor utilizados para sequenciamento (FONTE: Catálogo Gateway® Technology Invitrogen).

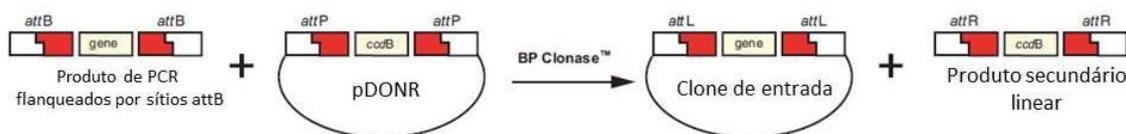


FIGURA 3.2 – Esquema de recombinação mediado pela enzima BP Clonase (modificado de: www.invitrogen.com).

3.2.4 Subclonagem em vetor de expressão pDEST™17

A transferência do inserto do vetor de entrada para o vetor de destino (pDEST™17) é facilitada pela recombinação dos sítios attL presentes no clone de entrada com os sítios attR do vetor com o uso de *LR Clonase™ enzyme mix* originando o clone de expressão. O vetor pDEST™17 foi escolhido como vetor de destino, o qual é apropriado para a expressão heteróloga da proteína de interesse em *E. coli*. O plasmídeo permite a expressão da proteína de interesse fusionada a uma sequência de seis histidinas em sua extremidade N-terminal, um gene de resistência a ampicilina (utilizado para selecionar as colônias positivas através de meio seletivo), regiões attR1 e attL1, utilizadas para a recombinação com o vetor de

entrada pDONR™ 221, além de regiões para contra seleção e manutenção do plasmídeo (figura 3.3).

A partir do inserto clonado no vetor de entrada, foi realizada a subclonagem com o vetor de expressão pDEST™17 seguindo as especificações do fabricante (Invitrogen – Catálogo nº 11789-013 e 11789-021) e é mostrado um esquema na figura 3.4.

Para isso, 150 ng do vetor de entrada, pDONR™221 contendo o gene de interesse, foram adicionados a 150 ng do vetor pDEST™17, e o volume final da reação foi ajustado para 10 µL com TE. A reação foi incubada a 25°C por 16 horas. Após essa etapa, foi adicionado 1 µL de proteinase K e a reação incubada por 10 minutos a 37°C.

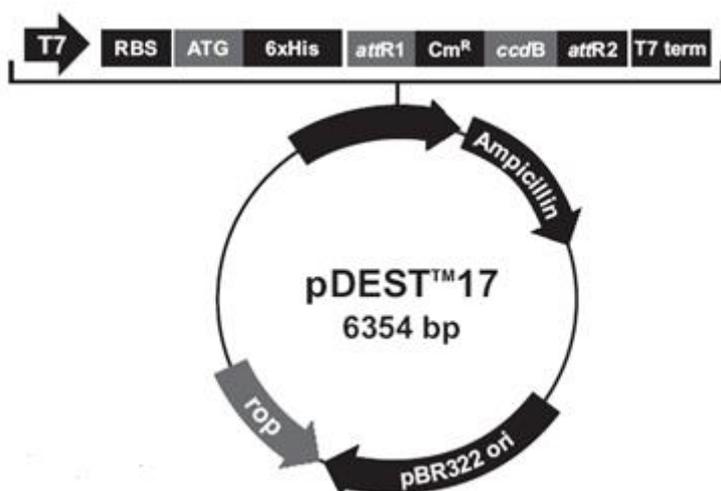


FIGURA 3.3 – Mapa ilustrativo do vetor de expressão pDEST™17. T7: promotor para RNA polimerase T7; RBS: sequência de ligação a ribossomos; ATG: códon de início; 6xhis: região codificadora para um tag de seis histidinas; attR1 e attR2: sequências que permitem a recombinação com o vetor pDONR™221; CMR: gene de resistência ao cloranfenicol para contra seleção do plasmídeo; ccdB: gene letal que evita o crescimento de colônias com plasmídeo pDEST sem o gene de interesse; T7 term: sequência que permite o término da transcrição; Ampicillin: gene de resistência ao antibiótico ampicilina; pBR322 ori: origem da replicação para duplicação do DNA e manutenção do plasmídeo.

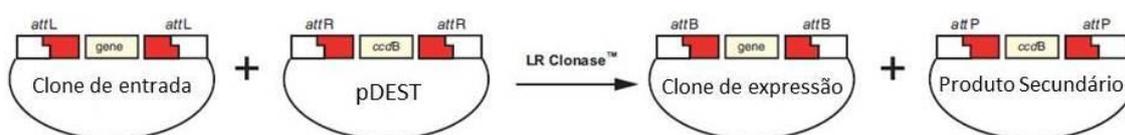


FIGURA 3.4 – Esquema de recombinação mediado pela enzima LR Clonase (modificado de: www.invitrogen.com).

3.2.5 Clonagem em vetores para expressão da proteína fusionada a TAP-tag (Tandem Affinity Purification)

Foram construídos em nosso instituto vetores para expressão de proteínas em *T. cruzi* que permitem a rápida clonagem de genes através do sistema Gateway® (BATISTA, 2008). O vetor pTcPRTAPN permite a expressão da proteína fusionada a uma etiqueta N- terminal permitindo purificação serial da proteína por ensaio de TAP-tag (RIGAUT *et al.*, 1999; PUIG *et al.*, 2001), e confere resistência ao antibiótico G418.

A esse vetor foi inserido o gene de interesse por recombinação. Ele possui o sítio *attR*, que interage com o sítio *attL* do inserto clonado no vetor de entrada. A reação de recombinação continha 150 ng do vetor de entrada com inserto (pDONRTM221), 150 ng do vetor de expressão, 1 µL do complexo enzimático *LR Clonase IITM* na presença de tampão TE. A reação foi incubada a 25°C por 16 horas e a reação foi interrompida adicionando 1 µL de proteinase K e a reação incubada por 10 minutos a 37°C. Esta reação formou o sítio *attB* entre o vetor de expressão e o inserto. Os clones positivos foram selecionados por PCR de colônia e tiveram o DNA plasmidial extraído. Após análise por sequenciamento o melhor clone foi utilizado para transfecção em *T. cruzi*.

3.2.6 Preparo de células *E. coli* cálcio- competentes

O preparo das bactérias cálcio- competentes para posterior transformação foi realizado segundo SAMBROOK e colaboradores (2001). Uma colônia de bactéria *E. coli* da cepa DH5α foi inoculada em meio LB, com incubação sob agitação constante 400 x g por 16 horas a 37°C. Após isso, foram adicionados 10 mL dessa cultura a 100 mL de LB e a cultura foi incubada sob agitação constante 400 x g a 37°C até atingir a fase de crescimento exponencial (D.O. de 0,6). A cultura foi então centrifugada a 4.000 x g por 5 minutos a 4°C e as células foram suspensas em 50 mL 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 suspensas em 2 mL da solução anterior acrescida de 10% de glicerol. As células foram mantidas em gelo seco por 2 horas e posteriormente aliquotadas em tubos e armazenadas a -80°C.

3.2.7 Transformação de bactérias cálcio competentes com plasmídeo

Os plasmídeos recombinados foram incubados com bactérias *Escherichia coli* cálcio-competentes (DH5 α) por 30 minutos no gelo (0,1 μ g de plasmídeo para 50 μ L de *E. coli*). Após esse período, as bactérias foram submetidas a um choque térmico sendo incubadas a 42°C por 3 minutos e as suspensões bacterianas foram imediatamente colocadas no gelo por 2 minutos. Em seguida, foi adicionado 1 mL de meio de cultura Luria-Bertani (LB) sem antibiótico e as células foram incubadas sob agitação constante a 37°C por 45 minutos para que houvesse a recuperação das mesmas. Por fim, as bactérias foram estriadas em placas contendo 25 mL de meio sólido LB + ágar e antibiótico específico de acordo com a resistência que cada vetor confere às bactérias transformadas (pDONR™221 – canamicina 50 μ g/ml , pDEST™17 – ampicilina 100 μ g/mL e cloranfenicol 34 μ g/mL). As placas foram incubadas por 18 horas a 37°C para crescimento das colônias.

3.2.8 PCR de colônia

Após o crescimento em meio seletivo, foi coletada com palito uma quantidade mínima de cada colônia e colocada em tubo para realização da reação de PCR. Foram acrescentados aos tubos de PCR os reagentes e os oligonucleotídeos iniciadores que anelam com regiões que flanqueiam o fragmento de DNA a ser amplificado, em um volume final de reação de 20 μ L. As amostras foram incubadas inicialmente com um *holding* de 94°C por 10 minutos, seguidos de 25 ciclos de amplificação. As temperaturas, tempo de anelamento e extensão foram realizados como citado no item 3.2.1.

3.2.9 Mini preparação de plasmídeos

O isolamento do plasmídeo de interesse foi realizado através do método de lise alcalina utilizando o kit *Qiaprep® Spin Miniprep Kit* (QIAGEN). As colônias positivas selecionadas foram incubadas em meio LB líquido com o antibiótico específico durante 18 horas a 37°C sob agitação constante. Após as culturas serem centrifugadas a 12.000 x *g* por 1 minuto, os plasmídeos foram purificados utilizando o kit segundo as recomendações do fabricante. Os plasmídeos foram eluídos em água ultrapura e armazenados a – 20°C.

3.3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM SISTEMAS BACTERIANOS

3.3.1 Transformação de bactérias cálcio competentes com o vetor de expressão

A transformação foi realizada da mesma forma descrita no item 3.2.8, porém as bactérias utilizadas são da cepa de expressão de *E. coli*, BL21 (DE3) pLysS. Essa bactéria contém um gene codificador para RNA polimerase T7 sob controle de um promotor lacUV5. O IPTG, um análogo sintético da lactose, liga-se ao repressor do operon lacUV5 e permite que a RNA polimerase se ligue ao promotor lac, possibilitando a expressão regulada da polimerase T7. Esta enzima se liga ao promotor T7 presente no vetor pDESTTM17 possibilitando a expressão do gene presente no vetor. O plasmídeo pLysS presente nessa cepa confere resistência ao cloranfenicol e codifica para a produção de lisozima T7, impedindo a expressão da RNA polimerase T7 na ausência do IPTG, o qual inibe a expressão basal da proteína recombinante.

Outra abordagem utilizada foi a expressão em cepa de *E. coli* RosettaTM 2 (DE3), derivada de BL21, a qual é utilizada para auxiliar na expressão de células eucarióticas que contém códons raramente utilizados em *E. coli*. A cepa de RosettaTM 2 (DE3) contém tRNAs para os códons: AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA e CGG em um plasmídeo que confere resistência ao cloranfenicol. Ao suplementar esses tRNAs raros a RosettaTM 2 (DE3) fornece uma tradução “universal”, a qual antes era limitada devido às diferenças encontradas entre os códons utilizados pelo *T. cruzi* dos utilizados pela *E. coli*. Realizando esse ajuste, há uma melhora na expressão de algumas proteínas (*Bacterial Protein Expression – Catálogo Novagen 2009/2010*).

3.3.2 Condições estabelecidas para induzir a expressão de proteína recombinante

Os testes de expressão foram realizados primeiramente em pequenos volumes para verificar se os clones selecionados expressavam a proteína de interesse e sob quais condições melhor ocorria. Como primeiro passo foi feito um pré-inóculo de uma colônia bacteriana, de um clone previamente selecionado,

colocada em 2 mL meio LB líquido contendo os antibióticos necessários (ampicilina 100 µg/mL e cloranfenicol 34 µg/mL), e deixado a 37°C por 18 horas sob agitação constante.

Após esse tempo, uma alíquota dessa cultura foi colocada em meio LB líquido com os mesmos antibióticos na proporção de 1:25, incubada sob agitação constante a 37°C até que as bactérias atingissem crescimento exponencial e chegassem a uma densidade óptica (D.O.) de 0,4 a 0,6. No momento em que se atingiu a D.O. foi adicionado um análogo sintético da lactose, o IPTG, na cultura em concentração final de 1 mM para que ocorresse então, a indução da expressão da proteína de interesse.

A partir disso, houve padronização para proteína RBSR1, uma indução com IPTG 1 mM por 3 horas a 37°C sob agitação constante. Paralelamente a esse experimento foram realizados cultivos nas mesmas condições sem a adição de IPTG para controle de alíquotas não induzidas. Por fim, também foram feitos extratos com ambas as culturas (induzido e não induzido de cada proteína) para testes de expressão.

3.3.3 Obtenção de proteínas recombinantes

Seguindo o protocolo já especificado acima, e após a indução com IPTG, a cultura foi centrifugada a 4°C por 10 minutos a 6.000 x g, o sobrenadante foi descartado e o sedimento bacteriano foi suspenso em tampão de sonicação. A sonicação ocorreu em gelo durante 15 segundos, na potência 4, seguida de 5 repetições, de modo a lisar as células (Homogenizador 4710 - Cole Parmer). Para a obtenção da fração solúvel a cultura foi novamente centrifugada a 4°C por 10 minutos a 18.000 x g e o sobrenadante, denominado “fração solúvel” foi coletado.

O pellet restante foi suspenso em uma solução de purificação contendo 8M de uréia e a mistura foi agitada vigorosamente, sendo centrifugada nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com o mesmo tampão e centrifugação, após as lavagens o pellet foi suspenso na mesma solução e foi sonicado nas mesmas condições anteriores. Para a obtenção da “fração insolúvel”, a cultura foi centrifugada a 18.000 x g por 10 minutos a 4°C.

Seguindo o protocolo acima padronizado foi realizado o mesmo experimento, nas mesmas condições, mas num volume maior, de 1 litro, para obtenção de uma

quantidade maior de proteína objetivando posterior produção de antisoro. Portanto, após a indução com IPTG, a cultura foi centrifugada a 4°C por 10 minutos a 18.000 x g, e a massa de célula foi pesada para que, posteriormente, pudéssemos suspender a cada 1 grama de célula, 1 mL de tampão de sonicação. A partir disso realizou-se uma lise inicial utilizando um microfluidificador e a fração insolúvel foi obtida após uma centrifugação de 30.000 x g, a 4°C por 20 minutos.

O pellet foi suspenso em solução de purificação com inibidor de protease, sendo aproximadamente, 5 mL do mesmo para cada 1 grama de pellet. A cultura foi homogeneizada por sonicação em gelo, na potência 5, por 20 segundos, seguida de 6 repetições, até que a homogeneização fosse completa. Sedimentou-se então os corpos de inclusão por centrifugação de 30.000 x g, 4°C, por 20 minutos. Analisou-se a pureza dos corpos de inclusão em gel desnaturante de poliacrilamida.

3.3.4 Produção de extratos de proteína

Foram feitos extratos da proteína para observar a purificação em questão e posterior produção de antisoro. As bactérias foram sedimentadas por centrifugação a 5.000 x g por 5 minutos, o sedimento bacteriano foi lavado uma vez com PBS e após isso foi suspenso em tampão de amostra 4X. Os extratos foram vortexados com posterior aquecimento a 95°C por 5 minutos. Por fim, os extratos proteicos foram centrifugados a 16.000 x g por 1 minuto e aplicado o sobrenadante em gel desnaturante de poliacrilamida para análise.

3.3.5 Eletroforese de proteína em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-Page)

A eletroforese se caracteriza por um método relacionado à migração de partículas carregadas em um determinado meio, sob a influência de uma diferença de potencial. O entendimento da interação entre a partícula carregada, o meio onde ela está suspensa e o comportamento deste sistema permite uma avaliação mais precisa do fenômeno migratório verificado (SILVA JÚNIOR, 2001).

O gel desnaturante de poliacrilamida (*SDS-Page*) é composto por duas partes, a primeira que é uma região de empilhamento (com concentração de acrilamida de 4,75%) chamada de gel *stacking*, e a outra, gel de separação, que possui concentração de acrilamida variável, dependendo o tamanho da proteína em

estudo. Nos extratos proteicos foi adicionado tampão de amostra, aplicados em gel e submetidos à eletroforese com amperagem de 30 mA por gel. O marcador de peso molecular utilizado foi o *BenchMark™ Protein Lader* (Invitrogen). Após corrida, os géis foram corados com azul de coomassie R-250 por cerca de 20 minutos e descorados alternando entre água quente e fria.

3.3.6 Ensaio de *western blotting* através de revelação por fosfatase alcalina

A técnica de *western blotting* associa a eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (*SDS-Page*) à detecção das proteínas com anticorpos mono ou policlonais dirigidos contra uma ou algumas bandas separadas após a migração eletroforética. Para tanto, após o ensaio de eletroforese, as bandas dos polipeptídeos devem ser transportadas através da corrente elétrica para um suporte de nitrocelulose onde se fixam. Ocorre a saturação dos sítios livres da membrana de nitrocelulose com proteínas sem especificidade de ligação com os anticorpos a serem empregados na detecção e as bandas proteicas reagem com seus anticorpos específicos. Após a retirada do excesso de anticorpo o complexo proteína- anticorpo reage com um segundo anticorpo que está ligado a uma enzima e por fim, a banda é revelada pela ação da reação de enzima com substrato (TOWBIN, STAEHELIN e GORDON, 1979; SILVA JÚNIOR, 2001).

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada e o gel foi colocado sobre uma membrana de nitrocelulose (*Hybond™ C-Extra, Amersham Biosciences*) e submetido a uma corrente elétrica de 20 V por 18 horas ou 90 V por 1 hora, imerso em tampão de transferência. Após isso, a membrana foi corada com *Ponceau S* por 5 minutos e lavada com água destilada para confirmar transferência. A membrana foi imersa em solução de bloqueio (PBS-Tween 0,1% e leite desnatado 5%) por 1 hora, sob agitação. Após isso, foi realizada a incubação da mesma com os anticorpos específicos, e após cada incubação foram realizadas três lavagens com PBS-Tween 0,1% de 5 minutos, sob agitação. A revelação foi realizada de acordo com a incubação de anticorpos secundários, para revelação com fosfatase alcalina, foi utilizado 10 mL de uma solução de revelação, AP buffer contendo 0,165 mg/mL de BCIP (*5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt*) e 0,33 mg/mL de NBT (*nitro-blue tetrazolium chloride*). As membranas foram então imersas nessa solução

e deixadas por, no máximo, 10 minutos; após esse período as mesmas foram colocadas em EDTA 10 mM para que ocorresse a parada da reação.

3.3.7 Ensaio de *western blotting* através de detecção por Odyssey®

Buscando um método mais sensível de revelação, foi utilizada a detecção de anticorpo por Odyssey® (LI-COR). Esse método de detecção utiliza lasers para excitar fluoróforos de comprimento de onda entre 700 nm e 800 nm. A emissão dos fluoróforos conjugados aos anticorpos é detectada para gerar uma imagem da amostra.

Este ensaio possui algumas peculiaridades: o anticorpo secundário é conjugado a um Alexa 700 ou 800 nm e a revelação se dá pela excitação de fluoróforos. Após a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose e incubação com o anticorpo primário, foram realizadas três lavagens com PBS-Tween 0,1%, seguida de incubação com anticorpo secundário, anti-IgG de coelho ou camundongo conjugado a Alexa 700 ou 800 nm na diluição de 1:4.000, por 1 hora a temperatura ambiente. A última lavagem é realizada somente com PBS e a revelação ocorre através do equipamento Odyssey®.

3.3.8 Purificação das proteínas por cromatografia de afinidade e eletroeluição

Para uma purificação de qualidade e posterior produção de anticorpo foi realizada purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel - ácido nitrilotriacético (Ni-NTA). Em 1 mL de resina Ni-NTA (*Quiagen*) foram incubados 5 mL de extrato com a proteína recombinante deixando por 1 hora em agitador orbital a 4°C. Em seguida, coletou-se por gravidade o material não ligado à resina e o mesmo foi chamado de *flow through*. Realizou-se três lavagens da coluna com 5 mL de tampão de ligação e coletando 1 mL de lavado. Posteriormente as lavagens, foram realizadas cinco eluições com 500 µL de tampão de eluição contendo imidazol em diferentes concentrações (300 mM, 500 mM e 750 mM), para possível observação do desligamento das proteínas com cauda de histidina da coluna de purificação; o imidazol compete com a histidina na ligação ao níquel promovendo o desligamento das proteínas com cauda de histidina da coluna. A análise da

qualidade da purificação foi realizada por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida.

Uma segunda etapa de purificação é a eletroeluição das proteínas em gel preparativo. A qual se dá pela mistura das frações eluídas obtidas anteriormente e aplicadas em gel desnaturante por 2 horas a 30 mA. Após a corrida, o gel foi mergulhado em uma solução de KCl 100 mM, por 10 minutos a 4°C, para que ocorresse a marcação da região onde se encontrava a proteína de interesse e pudéssemos cortá-la e coloca-la em uma membrana de diálise contendo 1 mL de tampão *SDS-Page*. O sistema foi imerso no mesmo tampão e submetido a uma corrente de 60 V por 2 horas, invertendo a polaridade no último minuto. Por fim, a solução foi coletada da membrana de diálise e quantificada utilizando o Qubit®, um equipamento quantificador fluorométrico. Para facilitar as inoculações posteriores, foi realizada a concentração da proteína eletroeluída por filtros Microcon®. Assim, houve a diminuição de volume e concentração da proteína.

3.3.9 Detecção da proteína recombinante por ensaio de *western blot* com anticorpos anti- histidina

Para que pudéssemos confirmar que a proteína encontrada no gel desnaturante de poliacrilamida seria a proteína de interesse, realizou-se um ensaio de *western blot* utilizando um anticorpo primário anti- histidina e um anticorpo secundário anti- IgG de camundongo conjugado a fosfatase alcalina, descrito no item 3.3.6.

3.4 OBTENÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS

3.4.1 Teste de soro pré-imune

Para verificar se o soro dos animais que seriam utilizados para produção de anticorpo não possuía nenhuma reação cruzada com proteínas presentes no extrato de *T. cruzi* foi realizado o teste com soro pré-imune, o qual se baseia na retirada de uma alíquota de 200 µL de sangue pela cauda de cada camundongo, com posterior incubação a 37°C por 30 minutos e centrifugação a 5.000 x g por 10 minutos. O soro pré-imune (sobrenadante) é então retirado e armazenado em novo tubo a -20°C.

O soro foi, portanto, testado contra extrato proteico de *T. cruzi* por ensaios de *western blot* e a diluição utilizada foi 1:100, previamente padronizada no laboratório.

3.4.2 Produção de anticorpos policlonais e análises por *western blotting*

A proteína recombinante foi inoculada em camundongos da linhagem Swiss, com mais de 40 dias de vida e a escolha do sexo foi realizada pela disponibilidade do biotério do Instituto Carlos Chagas. Para a primeira imunização foram utilizados 50 µg de proteína recombinante recuperada do gel preparativo, como descrito no item 3.3.8. A proteína foi diluída em adjuvante Freund completo e administrada via intraperitoneal em cinco camundongos. A proporção adjuvante / solução de proteína foi de 1:1 e o volume da solução de proteína foi completado com solução salina 0,9%. Após 10 dias da primeira imunização, foi inoculada a segunda dose do antígeno misturada em adjuvante Alu-gel. Foram realizadas ainda três inoculações subsequentes, com intervalos de 10 dias. Após cinco dias da quarta inoculação retirou-se uma alíquota de 200 µL de sangue da cauda dos camundongos para teste do soro imune observando se havia ocorrido a produção de anticorpo. Cinco dias após a quinta e última inoculação procedeu-se à coleta do soro. Os animais foram sedados com 0,2 mg de cetamina e 2 mg de xilasina e o sangue foi coletado por punção cardíaca, incubado por 30 minutos a 37°C e em seguida centrifugado por 10 minutos a 5000 x g, para a obtenção do soro que foi alíquotado e armazenado a -20 °C.

Para os ensaios de *western blotting*, o extrato proteico de epimastigotas, equivalente a $5,0 \times 10^6$ células, foi submetido à eletroforese em gel desnaturante SDS-PAGE como descrito no item 3.3.5. Após a incubação da membrana com a solução de bloqueio, a mesma foi incubada com o anticorpo primário, nesse caso o policlonal obtido, permanecendo por 1 hora, a 37°C. E o anticorpo secundário utilizado foi um anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina.

3.5 CULTIVO E MANIPULAÇÃO DE *T. cruzi*

3.5.1 Cultivo de *T. cruzi*

Para o desenvolvimento desse trabalho foram utilizadas células do clone Dm28c (CONTRERAS *et al.*, 1988; GOLDENBERG *et al.*, 1985) de *T. cruzi*, 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 através da simulação das condições encontradas na porção final do intestino do inseto triatomíneo, resultando em parasitas com as mesmas propriedades biológicas encontradas nos parasitas em seu ambiente natural (CONTRERAS *et al.*, 1985). Dessa maneira é possível obter parasitas em diferentes etapas de diferenciação celular.

Para obtenção de parasitas epimastigotas, culturas axênicas de *T. cruzi* foram mantidas em meio LIT. O pH do meio foi ajustado com HCl para 7,2 e o meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino. Os repiques foram realizados a cada três dias, sendo inóculos de $1,0 \times 10^6$ parasitas/mL de meio LIT, a 28°C. As formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento são obtidas após 72 e 96 horas de cultivo a 28°C, conforme a curva de crescimento estabelecida por CAMARGO (1964). As densidades celulares obtidas para *T. cruzi wild type* foram de aproximadamente 2 a 3×10^7 células/mL em 72 horas e de 5 a 6×10^7 células/mL em 96 horas.

Parasitas no final da fase logarítmica de crescimento, ou seja, no quinto dia de cultivo com densidade celular de aproximadamente 5×10^7 células/mL, foram submetidos a estresse nutricional através da substituição do meio LIT pelo meio TAU, o qual é pobre em nutrientes. Após centrifugação a $7.000 \times g$ por 5 minutos a 4°C, o meio foi substituído e os parasitas incubados em meio TAU por duas horas a 28°C, numa concentração de $5,0 \times 10^8$ parasitas para cada mL de meio TAU (CONTRERAS *et al.*, 1985).

Para a obtenção de parasitas em diferenciação, as células submetidas ao estresse nutricional foram colocadas em garrafas de cultivo de 300 cm^3 contendo 200 mL de meio TAU3AAG, o qual é um meio suplementado com ácido L-glutâmico 50 mM; L-prolina 10 mM; ácido-aspártico 2 mM e glucose 10 mM, numa concentração de $5,0 \times 10^6$ células por mL de meio, sendo, por fim, incubadas a 28°C por 24 horas, para que ocorresse a aderência das mesmas à parede da garrafa de cultivo. Para obtenção das células aderidas, o sobrenadante foi desprezado e as formas epimastigotas em diferenciação aderidas à parede da garrafa foram liberadas mecanicamente sob forte agitação com o auxílio de vortex (BONALDO *et al.*, 1988).

No caso da obtenção das formas tripomastigotas metacíclicas, os parasitas submetidos à adesão foram mantidos por 96 horas à 28°C. Nessas condições, os parasitas se diferenciaram liberando-se no sobrenadante da cultura. Ao final das 96 horas é possível observar que 80 a 90% das células do sobrenadante são tripomastigotas metacíclicas (BONALDO *et al.*, 1988). Ocorreu centrifugação a 10.000 x g por 10 minutos, a 10°C para concentração dos metacíclicos e suspensos em solução de PSG (Na₂HPO₄ 47,46 mM; NaCl 36,32 mM; Na₂HPO₄.H₂O 2,5 mM e glucose 55,5 mM) e purificadas em cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE celulose previamente equilibrada com PBS (DE SOUZA *et al.*, 1984) para obtenção dos extratos proteicos de tripomastigotas metacíclicos. Para ensaios de imunofluorescência não foi realizada a etapa de purificação.

3.5.2 Transfecção e seleção de *T. cruzi*

Foram utilizados parasitas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento, no total de $1,0 \times 10^8$ células por experimento. Os parasitas foram centrifugados a 7.000 x g, por 5 minutos, lavados com PBS estéril e suspensos em 1 mL de tampão de eletroporação. Em seguida, foram coletados 0,4 mL dessa suspensão, referente a $4,0 \times 10^7$ células, e transferidos para cubetas de eletroporação. Para cada experimento foram utilizados em média 50 µg de DNA, previamente adicionado às células, e a mistura foi incubada em gelo por 10 minutos. Após isso, a mesma foi submetida à eletroporação com dois pulsos de 450 V e 500 µF em eletroporador *GenePulser Apparatus*® (Bio-Rad) e mantidas em banho de gelo. As células foram transferidas para garrafas de cultura de 25 cm³ contendo 10 mL de meio LIT com penicilina, sendo incubadas por 24 horas, a 28°C. Após o período de recuperação, os parasitas foram selecionados através da adição do antibiótico G418 na concentração de 250 µg/mL. As culturas foram cultivadas com repiques regulares até que a cultura controle tivesse seu crescimento inibido totalmente. Como controle da transfecção foram eletroporadas também células sem DNA.

3.5.3 Extratos proteicos de *T. cruzi*

Os parasitas de cada etapa do item 3.5.1 foram contados e as culturas separadas para a concentração final de $1,0 \times 10^6$ células, sendo centrifugados a

7.000 x g por 10 minutos, os parasitas foram lavados com PBS por três vezes, seguidos pelos passos de centrifugação. Em um tubo as células foram homogeneizadas em PBS, tampão de amostra, contendo β -mercaptoetanol, e inibidor de protease (*Protease Inhibitor Cocktail complete*, EDTA-free, Roche) conforme proporção; já no outro tubo foi adicionado somente PBS e inibidor de protease. Para a amostra contendo somente o PBS se realizou a lise dos parasitas por congelamento e descongelamento dos mesmos, utilizando o banho-maria a 37°C e o gelo seco. Após monitoramento da lise por microscópio, foram quantificados por Qubit®. Esse procedimento permite que possamos equalizar as amostras por quantidade de proteínas e não pelo número de parasitas. As amostras foram vortexadas e fervidas por 5 minutos a 95°C. A quantidade de proteína de cada tubo foi analisada e aplicada igualmente em todos os poços em gel de poliacrilamida. Os tubos foram armazenados a – 20°C.

3.5.4 Quantificação fluorométrica por Qubit®

A quantificação pelo equipamento Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen) se dá pela reação da amostra em estudo com um mix de fluoróforo e tampão. Portanto o ensaio se iniciou com a mistura de tampão e fluoróforo, e a amostra foi adicionada a essa mistura, sempre com um volume final de 200 μ L. Por fim, o tubo foi vortexado por 3 segundos e deixado por 2 minutos no escuro a temperatura ambiente, no caso de RNA e DNA, já para quantificação de proteínas deixou-se 15 minutos a amostra no escuro a temperatura ambiente para posterior leitura.

3.5.5 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 $5,0 \times 10^{10}$ células e centrifugadas a 7.000 x g por 10 minutos. Os parasitas foram lavados com PBS e suspensos em solução de lise, sendo lisados pela adição de Nonidet P-40 1% por 3 minutos a 4°C. Após o enriquecimento dos núcleos por três ciclos de centrifugação a 8.000 x g por 10 minutos a 4°C, foi realizada a digestão do material com Proteinase K 100 μ g/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 dessa

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.

3.5.6 Congelamento de células de *T. cruzi*

Foram centrifugadas $2,0 \times 10^7$ células para cada criotubo de congelamento, $3.000 \times g$, 5 minutos a temperatura ambiente. Após isso, o pellet formado (40% da cultura) foi ressuspendido em LIT e acrescentado 50% de soro fetal bovino e 10% de glicerol estéril, sendo 1mL de volume final por tubo. A mistura foi vortexada e distribuída nos tubos. Após isso os tubos ficaram por 15 minutos na geladeira, seguido de 2 horas a -20°C e 12 horas a -80°C . Por fim, no dia seguinte colocados em nitrogênio líquido. Sendo que, após um mês foram descongelados para se realizar o teste do descongelamento.

3.5.7 Cell Sorting por citometria de fluxo

Foram centrifugadas $5,0 \times 10^6$ células a $3.000 \times g$, 10 minutos a temperatura ambiente, e as mesmas foram suspendidas em PBS com pastilha (especial para uso do citômetro de fluxo FACSAria II), para que tivéssemos em média, 3.000 eventos por segundo. Após isso, preparou-se uma placa de 96 poços, de fundo chato, contendo: 100% LIT, 1X penicilina/streptomomicina, ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, gentamicina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G418 (antibiótico de seleção do transfectante). Com o *sorting* realizado, os parasitas foram cultivados a 28°C , CO_2 5%, durante três semanas, com acompanhamento de crescimento pelo microscópio.

3.6 IMUNOENSAIOS

3.6.1 Imunolocalização por microscopia de fluorescência

Para verificar a localização da proteína estudada foram realizados ensaios de imunofluorescência, utilizando-se os parasitas nas condições necessárias para cada experimento (diferentes formas da metaciclo-gênese, parasita submetido a estresse e parasitas submetidos a diferentes drogas).

As células foram centrifugadas a 5.000 x g por 5 minutos, e os parasitas foram lavados duas vezes com PSG e suspensos em paraformaldeído 4%. Colocou-se $1,0 \times 10^7$ parasitas por campo da lâmina, previamente tratada com poli-L-lisina por 30 minutos, deixando por 10 minutos. Após fixação dos mesmos na lâmina, e monitoramento por microscópio, a lâmina foi lavada três vezes com PBS. Posteriormente, foi realizada a permeabilização dos parasitas com Triton X-100 0,1% por 2 minutos, seguido por mais três lavagens com PBS 1X e por fim, a incubação da lâmina com PBS – BSA 1% por 16 horas a 4°C, visando o bloqueio de sítios de ligação inespecíficos. Foi incubado o anticorpo primário (diluído em PBS – BSA 1%) por uma hora a 37°C. Após a incubação a lâmina foi lavada com PBS por três vezes e foi adicionado o anticorpo secundário de acordo com o anticorpo primário utilizado, nas mesmas condições da primeira incubação. Após as lavagens do anticorpo secundário a lâmina foi incubada com DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride*) na diluição de 1: 20.000 em PBS por 20 minutos, e a incubação foi seguida de cinco lavagens com PBS. Após a adição de n-propil-galacto, para preservação da fluorescência, foi colocada uma lamínula sobre a lâmina, e o conjunto foi selado com esmalte.

As lâminas foram analisadas em microscópio *Nikon E600* e as imagens foram obtidas em microscópio de deconvolução (modelo DMI6000B – Leica). A análise por deconvolução foi realizada através do software LAS AF da Leica e o algoritmo de deconvolução utilizado foi o Blind.

3.7 ANÁLISE DO PERFIL DE SEDIMENTAÇÃO DA PROTEÍNA EM GRADIENTE DE SACAROSE

3.7.1 Obtenção das frações do gradiente de sacarose

A análise dos perfis de sedimentação do extrato proteico em gradiente de sacarose foi realizada com parasitas epimastigotas em condições normais de cultivo e, também, parasitas epimastigotas submetidos a estresse nutricional, ambos na presença das drogas cicloheximida, a qual promove a estabilização dos mRNAs nos polissomos, e puomicina que promove a desestabilização dos polissomos, dissociando-os.

O protocolo utilizado foi adaptado a partir do trabalho de HOLETZ e colaboradores (2008). Primeiramente obteve-se o extrato citoplasmático de $1,0 \times 10^9$ células submetidas ou não a estresse nutricional em TAU por 2 horas, e tratadas com 100 $\mu\text{g/mL}$ de cicloheximida por 15 minutos a 28°C, ou com puromicina 2 mM por uma hora a 28°C. As células foram centrifugadas a 7.000 x g por 10 minutos a 4°C e lavadas duas vezes com tampão NKM. Os pellets foram suspensos em tampão TKM (cicloheximida) e TKMP (puromicina), e após homogeneização adicionou-se tampão de lise (IMP-1), inibidor de protease e RNase OUT. Após acompanhamento da lise pelo microscópio, a amostra foi centrifugada a 16.000 x g por 15 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi recolhido.

Os extratos foram adicionados ao topo do gradiente de sacarose 15 – 55%, preparados com tampão TKM ou TKMP, e submetidos à ultracentrifugação a 38.000 rpm por 2 horas a 4°C. As frações do gradiente foram coletadas pelo método de contagem de gotas utilizando o equipamento ISCO, o qual separa em alíquotas de 500 μL , traçando um perfil de absorbância de 260nm à medida que a amostra passa pelo sistema permitindo a identificação das frações do gradiente. As frações do gradiente de sacarose foram reunidas em quatro grupos: fração livre de subunidades ribossomais, fração de monosomos, fração polisomal leve e fração polisomal pesada. O fracionamento ocorre a partir da injeção de uma concentração de sacarose de 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 à eletroforese em gel de poliacrilamida e *western blotting*, para verificação do padrão de distribuição da proteína de estudo no gradiente.

3.8 ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO

3.8.1 Imunoprecipitação para análise proteômica

Para o ensaio de imunoprecipitação objetivando a detecção de complexos proteicos, foram utilizados 50 μL de esferas magnéticas α - rabbit IgG. As microesferas foram lavadas uma vez com tampão IMP-1, e em seguida adicionado o anticorpo α - proteína A (1:40.000) diluído em tampão IMP-1 deixando por 16 horas na câmara fria, agitando lentamente. Após incubação os tubos foram posicionados

em suporte magnético e o sobrenadante contendo o anticorpo não ligado às microesferas foi recolhido. Após uma lavagem com IMP-1 as microesferas foram incubadas com extrato de *T. cruzi* por 2 horas, em câmara fria agitando lentamente.

Os extratos de *T. cruzi* foram obtidos a partir de $1,0 \times 10^9$ parasitas por imunoprecipitação, os quais foram centrifugados a $5.000 \times g$, 5 minutos a 4°C . Após centrifugação, os mesmos foram lavados por duas vezes com tampão NKM, prosseguindo com a mesma centrifugação após cada lavagem. Para uma lise eficiente, utilizou-se um tampão de lise com 0,5% de NP-40, com adição de inibidor de protease EDTA-free e RNase OUT. Acompanhou-se pelo microscópio a lise dos parasitas, e após isso o lisado foi centrifugado a $10.000 \times g$ por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi recolhido e colocado no tubo onde contém as microesferas, já previamente ligadas ao anticorpo. Deixando por 2 horas, em câmara fria agitando lentamente.

Após a incubação, as microesferas contendo os anticorpos conjugados aos complexos de interesse, foram lavadas por 5 vezes com 1 mL de tampão IMP-0 em suporte magnético. As proteínas foram eluídas da resina por mudança de pH utilizando 50 μL de glicina (0,2 M, pH 2,5) agitando vigorosamente por 5 minutos e por fim, retirou-se a alíquota com ajuda do suporte magnético e a mesma foi colocada em um novo tubo contendo Tris-HCl 1M, pH 9,5 para ajustar o pH de cada eluato. As amostras foram armazenadas a -20°C .

3.8.2 Imunoprecipitação para análise ribonômica

Para os ensaios de imunoprecipitação com enfoque na análise de mRNAs alvos o protocolo se manteve o mesmo, já descrito acima, pois utilizou-se as mesmas esferas magnéticas e também o mesmo anticorpo. Porém visando a obtenção dos RNAs foi utilizado 450 μL de RLT acrescido de β -mercaptoetanol do kit *RNeasy*®, o qual foi armazenado a -80°C , para posterior purificação e extração de RNA.

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

3.9.1 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 de 50 a 500 ng do RNA purificado para cada amostra. Os mRNAs foram incubados com RNase III (1U) por 5 minutos a 37°C para a obtenção dos 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*TM *Concentration Module* (Invitrogen) foi utilizado para a concentração da amostra, e foi utilizado segundo recomendações do fabricante.

3.9.2 Transcrição reversa – obtenção de cDNA

Após 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 nessa etapa foi purificada com o kit *MiniElute PCR purification* (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 a 180V. O gel foi corado com o intercalante *SYBR Gold* por 5 minutos e os fragmentos de 150 a 250 nucleotídeos foram cortados do gel com ajuda de um equipamento com UV. Os fragmentos retirados do gel foram cortados em 4 porções: A, B, C e D, sendo utilizadas para o próximo passo as frações B e C, as quais são consideradas as mais enriquecidas; essas receberam dois adaptadores cada um: o adaptador P1 (específico para cada amostra, funcionando como um código de barras para identifica-las na biblioteca de cDNA, chamados de barcodes) e o adaptador P2 (comum entre as amostras). Para 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*TM *PCR Micro* (Invitrogen), utilizado segundo as recomendações do fabricante. As amostras passaram então por uma análise de quantidade do material no equipamento Qubit®. Finalmente as bibliotecas com todos os barcodes juntos em um único tubo.

3.9.3 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 desse microambiente. Os fragmentos amplificados também foram ligados às microesferas de sequenciamento através do adaptador P1 presente nas amostras. A escala de preparação da PCR em emulsão 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, no caso, o adaptador P1.

Cada uma das bibliotecas foi diluída para duas titulações: 0,5 e 1,0 pM. Desse 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.

3.9.4 Seleção de microesferas positivas

Após realizada a ePCR as microesferas passaram por um processo de enriquecimento a fim de maximizar a quantidade de microesferas P2 positivas, ou seja, que possuíssem os fragmentos de DNA completos contendo os adaptadores P1, interno e P2. Nessa etapa foram eliminadas as microesferas que não possuíssem 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.

3.9.5 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 a utilizada nesse experimento. O tempo total de sequenciamento foi de aproximadamente 7 dias, sendo que no

primeiro dia foi sequenciado o adaptador com o código de barras e nos últimos 6 dias foram analisados os fragmentos de 50 pb referentes às amostras.

3.9.6 Análises

As análises das sequências geradas pelo sequenciador SOLiD foram realizadas com base no mapeamento das sequências obtidas no genoma de referência utilizando o programa *CLC BioWorkbenchTM*, considerando os níveis de confiabilidade estatística de $\leq 1\%$ (*false discovery rate*, FDR), e também foi utilizado um valor de *fold-change* de 4 vezes, como critério para seleção dos genes diferencialmente expressos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE DE SEQUÊNCIA DE RBSR1

A proteína RBSR1 é descrita como uma *RNA-binding protein*, com domínio RRM, que possui aproximadamente 17,7 kDa e 147 aminoácidos. Um PI teórico de 11,71 e dentre os aminoácidos, os mais abundantes são: arginina (24%) e serina (14%).

A partir do programa PsiPred (*Psi-blast secondary structure prediction*), uma ferramenta de bioinformática para análise de sequência proteica e predição de estruturas secundárias (MCGUFFIN, BRYSON e JONES, 2000), observou-se por quais domínios RBSR1 seria composta, e percebeu-se que a mesma é composta por um domínio RRM na porção N-terminal, há sequências de poli-arginina na porção carboxi-terminal e acreditamos também que, nessa mesma região, possa ter um domínio rico em serinas e argininas (Figura 4.1).

O domínio RRM é composto por quatro folhas β antiparalelas entremeadas por duas α -hélices ($\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$), três resíduos conservados na folha β localizados nos motivos conservados realizam a interação com a molécula de RNA, uma arginina ou lisina que forma uma “ponte de sal” com o esqueleto fosfodiéster e dois resíduos aromáticos, que fazem interações por empilhamento das núcleobases. De 2 a 8 nucleotídeos podem ser reconhecidos, dependendo da estrutura apresentada pelo RNA (BURD *et al.*, 1994; LUNDE, MOORE, VARANI, 2007; CLÉRY *et al.*, 2008). Proteínas que contêm esse domínio estão envolvidas na maioria dos processos pós transcricionais de regulação da expressão gênica, o mesmo pode se ligar com fraca ou forte afinidade e especificidade a RNAs e interagir com transcritos de diferentes comprimentos (CLÉRY *et al.*, 2008).

As proteínas ricas em sequências de poli-arginina que se ligam a RNA possuem sequências que contêm de 5 a 11 argininas e podem estar envolvidas no processo de regulação de RNA (BAYER *et al.*, 2005). Já foi visto anteriormente que essas regiões são consideradas muito importantes por facilitarem a penetração e permeabilidade das proteínas nas células (FUTAKI *et al.*, 2001).

Outra hipótese seria que na região carboxi terminal de RBSR1 haveria uma região rica em serinas e argininas, sendo consideradas proteínas SR. As proteínas SR se caracterizam por possuírem um ou dois domínio RRM na região N-terminal

seguido de repetições de arginina e serina, as quais podem incluir múltiplos sítios de fosforilação (SANFORD e BRUZIK, 2003; GODIN *et al.*, 2007). Esse domínio possibilita sua interação com outras proteínas, podendo estar associada à maquinaria de *splicing* do pré-mRNA, exportação de mRNA entre núcleo e citoplasma, degradação e até tradução de mRNA (SHEPARD e HERTEL, 2009; GODIN *et al.*, 2007; GILBERT e GUTHRIE, 2004).

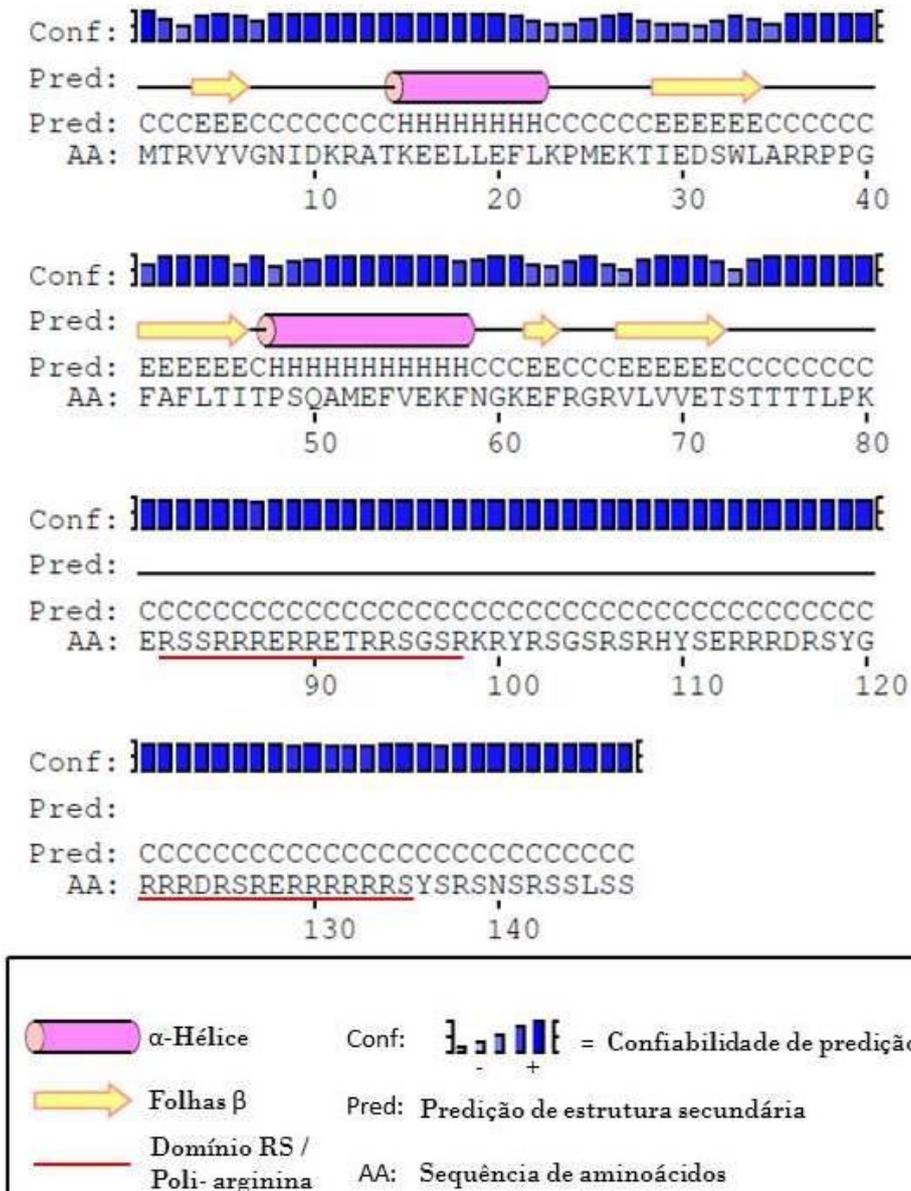


FIGURA 4.1- Análise da estrutura da proteína RBSR1 (modificado de <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>).

4.2 CLONAGEM E EXPRESSÃO DE TcRBSR1

A amplificação do gene TcRBSR1 foi realizada a partir de DNA genômico de *T. cruzi* pela técnica de Reação de Cadeia de Polimerase (PCR). Os oligonucleotídeos foram desenhados contendo além da sequência de anelamento do gene alvo, os sítios de recombinação *attB* a montante do gene de modo a permitir a recombinação dos amplicons com o vetor de entrada pDONRTM221 do sistema Gateway® (Invitrogen). A confirmação da amplificação do gene foi realizada em gel de agarose 1% onde se pode observar o fragmento correspondente de 444 pares de base. Após a purificação dos amplicons, realizou-se a clonagem em vetor de entrada pDONRTM221. Os plasmídeos recombinados foram transformados em bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5α cálcio-competentes e após confirmação por PCR e sequenciamento realizou-se a sub clonagem em vetor de expressão pDESTTM17 e o produto da recombinação também foi transformado em bactéria DH5α (Figura 4.2).

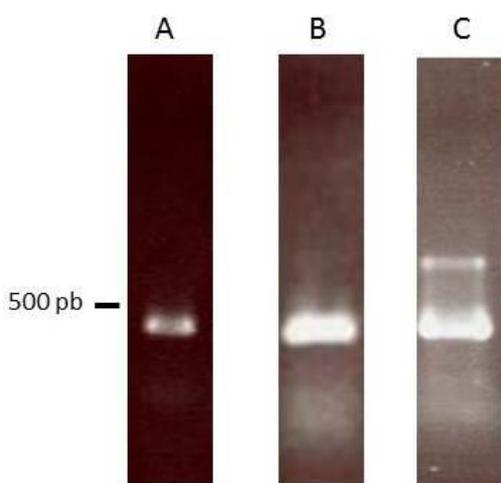


FIGURA 4.2 – Análise por PCR para confirmação da clonagem de TcRBSR1. A: confirmação do tamanho de pares de base dos amplicons (fragmento correspondente a 444 pares de bases). B: confirmação da clonagem em vetor de entrada pDONRTM221. C: confirmação da sub clonagem em vetor de expressão pDESTTM17. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Para a expressão da proteína recombinante foram utilizadas duas cepas de *E. coli*, BL21(DE3)pLysS e RosettaTM 2 (DE3). Inicialmente foi utilizada a cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS, porém nesse caso o nível de expressão foi muito baixo (Figura 4.3 a). Através de análises da sequência do gene TcRBSR1 foi verificada a presença de códons raros para expressão heteróloga em sistema bacteriano. Os níveis de expressão gênica dependem de inúmeros fatores tais como: sequência do promotor e elementos regulatórios. Um dos mais importantes é a adaptação do uso de códons do gene transcrito, isso acontece porque genes altamente transcritos usam apenas um pequeno grupo de códons que são reconhecidos pelos tipos mais abundantes de tRNA (LITHWICK *et al.*, 2003; IKEMURA, 1981). A força que modula

essa adaptação é chamada de seleção traducional que leva a um uso desigual de códons que codificam para o mesmo aminoácido (ROCHA, 2004). Assim se o gene contém códons que são raramente utilizados pelo hospedeiro, onde se deseja expressar a proteína de interesse, seu nível de expressão não será máximo. Essa é uma das limitações encontradas na expressão heteróloga de proteínas (GUSTAFSSON *et al.*, 2004). Com o intuito de sanar o problema, foram estimadas as preferências de códons em células de *E. coli* utilizando o CAI (*Codon Adaptation Index*), onde o valores variam de 0 (quando o uso de códons da sequência e do hospedeiro são muito diferentes) a 1 (quando ambos códons são os mesmos). Valor acima de 0,8 é considerado um valor bom para alcançar altos níveis de expressão no hospedeiro. Os valores de CAI para a expressão da proteína TcRBSR1 em *E. coli* era de 0,62. Portanto, para minimizar esse problema foi utilizada a cepa de *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3), a qual contém um plasmídeo que codifica para alguns tRNAs raros em *E. coli*, maximizando dessa forma a expressão da proteína (Figura 4.3 b).

Foram realizados testes de expressão para verificar se os clones selecionados expressavam a proteína RBSR1 com peso molecular de 17,7 kDa, porém devido a fusão da cauda de histidina à proteína, seu peso molecular aumentou para aproximadamente 22 kDa. Para verificar a eficiência da indução, os extratos bacterianos induzidos foram analisados por gel SDS-PAGE 15%.

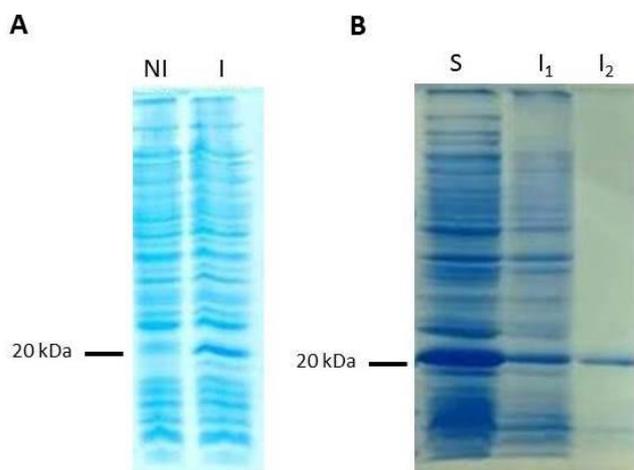


FIGURA 4.3 – Expressão da proteína recombinante RBSR1. **A:** teste de indução (*E. coli* BL21(DE3) pLysS). **NI e I:** extratos bacterianos contendo o vetor de expressão, não induzidos e induzidos, respectivamente. **B:** expressão da proteína RBSR1 (*E. coli* Rosetta™ 2 (DE3)). **S, I₁ e I₂:** extrato induzido correspondente à fração solúvel e insolúvel (I₁: uma sonicação após adição da solução de purificação e I₂: duas sonicacões após adição da solução de purificação), respectivamente. Solução de purificação: NaH₂PO₄ [100mM], Tris-HCl [10mM] pH 8,0, Ureia [8M], Triton [2%]. Gel SDS-Page 15% corados com comassie blue.

Após verificação das melhores condições de expressão em *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) da proteína RBSR1, realizou-se o experimento com 500 mL de cultura para obtenção de uma maior quantidade de proteína. As condições ideais determinadas para o experimento foram: 1mM de IPTG com indução de 3 horas, a 37°C.

Partiu-se para a purificação por cromatografia de afinidade utilizando o equipamento AKTA. O aparelho consiste em um sistema de cromatografia líquida (*Fast Protein Liquid Chromatography*, FPLC) utilizado para analisar, identificar e purificar proteínas. No mesmo é acoplada uma coluna de níquel-ácido nitrilotriacético, a qual realiza a purificação por afinidade, como já mencionado.

Inicialmente foram realizadas lavagens com tampão de ligação para equilíbrio da coluna e ligação da proteína. Após isso, realizou-se a eluição diferencial através de um gradiente crescente de imidazol e a confirmação se deu por um ensaio de *western blot* das frações obtidas durante a cromatografia (Figura 4.4 a). A purificação não foi considerada satisfatória, pois a maior parte da proteína se concentrou nos lavados, dessa forma foi necessário uma re-purificação da mesma. Com isso, as frações dos lavados 1 e 5 foram manualmente purificadas em bancada e após esse novo passo de purificação, se observou por gel SDS-PAGE 15% um melhor nível de pureza da proteína na fração de eluído 1 e a mesma foi confirmada através da técnica de *western blot* (Figura 4.4 b).

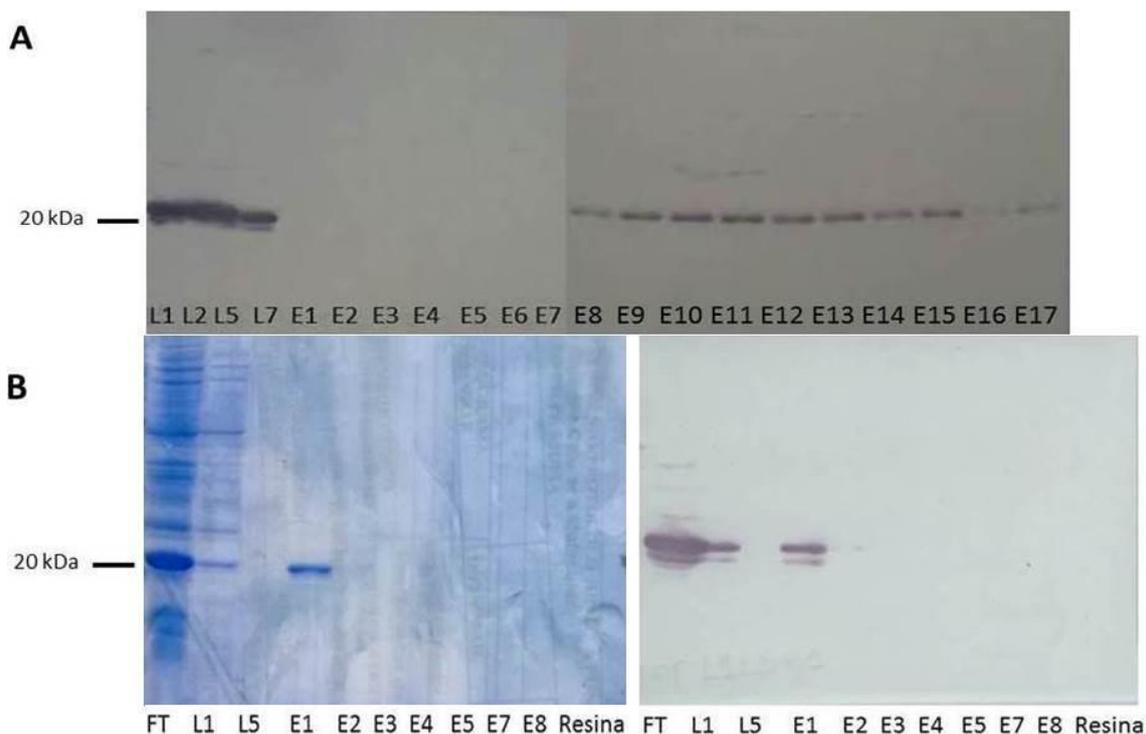


FIGURA 4.4 – Purificação da proteína recombinante RBSR1 por cromatografia de afinidade. A: Purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade (AKTA), confirmação por ensaio de *western blotting* utilizando anticorpo específico contra a cauda de histidina (α -histidina) **L1, L2, L5 e L7:** frações da purificação por cromatografia de afinidade correspondente as lavagens 1, 2, 5 e 7, respectivamente. **E1 a E17:** frações da purificação correspondente as eluições 1 a 17 respectivamente. **B:** Re-purificação da proteína recombinante RBSR1 por cromatografia de afinidade (bancada) e confirmação por gel SDS-PAGE 15% e *western blotting* utilizando anticorpo específico contra a cauda de histidina (α -histidina), respectivamente. **L1 e L5:** frações da purificação por cromatografia de afinidade correspondente as lavagens 1 e 5 respectivamente. **E1, E2, E3, E4, E5, E7, E8 e resina:** frações da purificação correspondente as eluições 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8 e resina, respectivamente.

4.3 PRODUÇÃO DE ANTISOROS POLICLONAIS ANTI RBSR1

4.3.1 Produção e teste de antisoros

A proteína purificada foi concentrada com o uso de filtros Microcon® e foi obtida uma concentração de 1,99 mg/mL, quantidade suficiente para iniciar a inoculação de 25 ug da proteína em camundongos Swiss em intervalos de 15 dias por 5 vezes a fim de se obter um anticorpo policlonal contra a proteína RBSR1. Antes da primeira inoculação foi realizada a coleta do soro pré-imune de três camundongos com o intuito de verificar a existência de anticorpos que poderiam apresentar reação cruzada com proteínas presentes no extrato proteico de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Utilizando esse soro, foi feito um ensaio de *western blot* com os soros diluídos na proporção 1:100. Como mostrado na figura 4.5 não houve

reconhecimento dos anticorpos presentes no soro por nenhuma proteína do extrato proteico de *T. cruzi*.

Foram realizadas cinco inoculações via intraperitoneal nos camundongos, e uma alíquota de soro dos camundongos imunizados foi coletada para análise por *western blot*. O ensaio realizado com diluição de 1:100 mostrou inespecificidade do soro e a incapacidade em reconhecer a proteína de interesse (Figura 4.5).

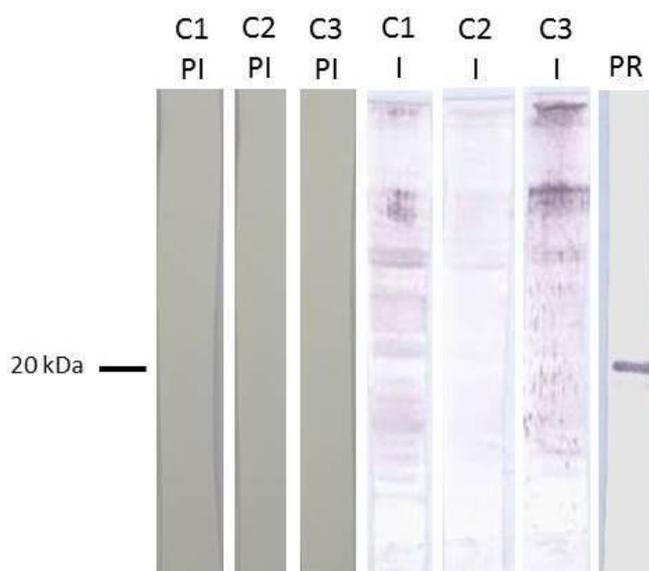


FIGURA 4.5 – Padrão de reconhecimento do soro anti-RBSR1. Ensaio de *western blotting* para análise do soro pré imune (C1/PI, C2/PI, C3/PI) e imune (C1/I, C2/I, C3/I) utilizando soro de três camundongos da linhagem *Swiss* contra extrato proteico de *T. cruzi* e anticorpo específico contra a cauda de histidina (α -histidina) (PR). **C1, C2 e C3:** soros produzidos nos camundongos 1, 2 e 3, respectivamente. **PI e I:** soros pré-ímenes e ímenes, respectivamente diluição 1:100. **PR:** proteína recombinante anti-histidina (1:3.000). Revelação por fosfatase alcalina.

A imunogenicidade é a habilidade de uma molécula a induzir uma resposta imune. Isso é determinado por dois fatores que estão intimamente ligados: a estrutura da molécula e o animal utilizado para tal função (GREENFIELD, 2014). Outro ponto importante é a escolha de um bom adjuvante. Os adjuvantes são de dois tipos: a base de óleo ou a base de água, e sua escolha é essencial para induzir uma boa resposta (GREENFIELD, 2014; ALVING e MATYAS, 2005). Levando em consideração tais pontos e observando, por especulações em programas computacionais, a baixa imunogenicidade da proteína RBSR1, iniciamos uma busca tentando melhorar a resposta.

O adjuvante de Freund é comumente um dos mais utilizados devido sua forte estimulação e prolongada resposta no animal, porém sua principal desvantagem é sua resposta inflamatória forte, sendo muito agressivo e passível de persistentes granulomas no animal. Uma alternativa comum de substituição é o adjuvante de

hidróxido de alumínio (Alu-gel), pois o mesmo evita muitos dos danos nocivos que o adjuvante de Freund apresenta; adicionalmente possui boa geração de memória e suaves reações inflamatórias, sendo considerado mais seguro, embora seja considerado um dos mais fracos (GREENFIELD, 2014; BAYLOR, EGAN e RICHMAN, 2002).

Decidiu-se então, alterar o protocolo padrão de imunizações e utilizar somente o adjuvante Alu-gel, para observar se haveria melhora na produção do anticorpo. Porém, não obtivemos bons resultados, como observados na figura 4.5 e dessa forma, vendo a dificuldade de produção de anticorpo, partiu-se para a obtenção de cepas transfectantes que expressassem a proteína RBSR1 com alguma etiqueta.

4.4 CLONAGEM DE RBSR1 NO VETOR pTcTAPN

Visto a dificuldade de produzir anticorpos contra RBSR1 partiu-se para clonagem em vetor pTcTAPN produzido no Instituto Carlos Chagas (BATISTA, 2008), que permite a expressão da proteína de interesse associada a etiqueta TAP-tag (*Tandem affinity purification*) em *T. cruzi* (RIGAUT *et al.*, 1999; PUIG *et al.*, 2001). Os amplicons de interesse foram inicialmente clonados no vetor de entrada pDONRTM221 através da recombinação BP segundo o manual do sistema Gateway® e os mesmos foram utilizados para transformar bactérias *E. coli* cálcio competentes da cepa DH5α. A recombinação foi testada por PCR de colônia com iniciadores específicos para RBSR1 (Figura 4.6 a).

Após isolamento do plasmídeo de interesse foi realizado o sequenciamento do vetor pDONRTM221 contendo o amplicon de interesse. O clone selecionado foi utilizado para recombinação com o vetor de destino pTcTAPN e o plasmídeo foi purificado através de minipreparação.

O vetor obtido foi utilizado para transfecção dos parasitas e a confirmação da fusão da etiqueta TAP-tag e seleção dos transfectantes foram realizadas pela técnica de *western blot* utilizando extratos de parasitas transfectados. O tamanho esperado da proteína fusionada a etiqueta era de aproximadamente 40 kDa (proteína A: aproximadamente 20 kDa; RBSR1: 17,7 kDa) (Figura 4.6 b).

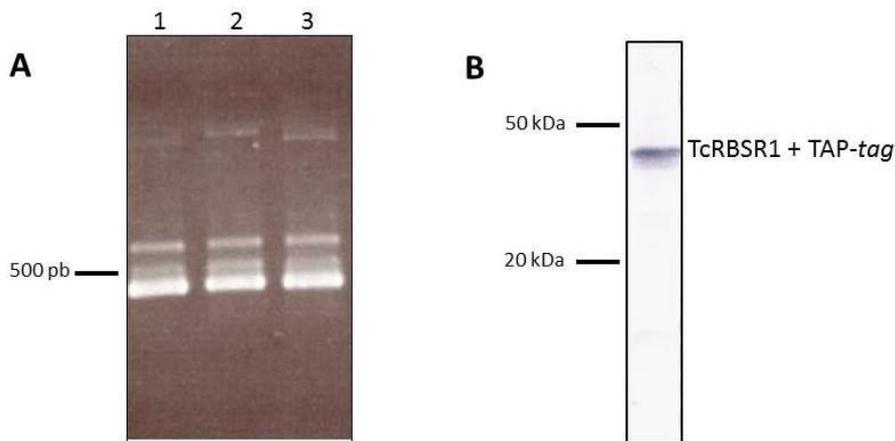


FIGURA 4.6 – Perfil eletroforético dos amplicons obtidos a partir de PCR de colônia (A) e *Western blotting* de RBSR1 conjugada a etiqueta do vetor pTcTAPN (B). A: 1, 2 e 3: correspondem as colônias de 1 a 3 testadas por PCR de colônia dos clones de pTcTAPN, respectivamente. B: Foi aplicado extrato do transfectante e a membrana foi incubada com anticorpo anti-proteína A (1:40.000), a qual se encontra fusionada a proteína TcRBSR1.

4.5 DETERMINAÇÃO DOS PADRÕES DE RBSR1 AO LONGO DA METACICLOGÊNESE

4.5.1 Análise da expressão da proteína através de ensaios de *western blot*

Para análise do padrão de expressão de RBSR1 ao longo da metaciclogênese foram realizados ensaios de *western blot* utilizando extratos correspondentes a 10 µg de proteína total em diferentes etapas do processo de metaciclogênese (epimastigotas 3 dias, epimastigotas sob estresse nutricional, epimastigotas aderidos ao substrato por 24 horas e tripomastigotas metacíclicos). A presença da proteína RBSR1 foi testada utilizando os extratos dos transfectantes contendo a proteína fusionada ao TAP-tag de cada uma das fases da metaciclogênese na diluição de 1:40.000 (α-proteína-A) (Figura 4.7).

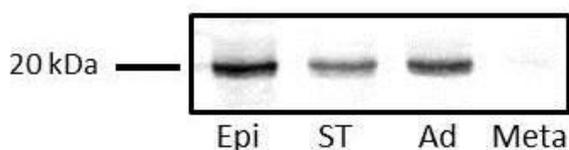


FIGURA 4.7 – Ensaio de *western blot* de extrato dos transfectantes da proteína RBSR1 em diferentes etapas do processo de metaciclogênese. Epi: epimastigotas 3 dias; ST: epimastigotas sob estresse nutricional; Ad: epimastigotas em diferenciação aderidos 24 horas; Meta: parasitas tripomastigotas metacíclicos. Anticorpo primário utilizado α-proteína-A 1:40.000 e anticorpo secundário IRDye 800 1:15:000. Revelação: *Odyssey® CLx Infrared Imaging System*.

Com o ensaio de *western blot* pode-se observar que, RBSR1 está mais expressa em todas as formas analisadas (epimastigotas 3 dias, parasitas sob estresse nutricional e em parasitas em diferenciação aderidos 24 horas) porém a mesma não é expressa em tripomastigotas metacíclicos. Levando em consideração esse dado, seguiu-se com o ensaio de imunofluorescência para análise de localização de RBSR1, e também confirmar por ensaio de imunofluorescência os dados obtidos por *western blot*.

4.5.2 Identificação da localização subcelular de RBSR1 por microscopia de fluorescência

Após a verificação do padrão de expressão da proteína RBSR1 ao longo da metaciclogênese, foi observada a localização da mesma nas diferentes etapas de diferenciação do parasita pela técnica de imunofluorescência. Foram utilizados epimastigotas três e cinco dias (Figura 4.8), parasitas sob estresse nutricional, aderidos 24 horas e tripomastigotas metacíclicos (Figura 4.9). Como controle isotópico foi utilizado um anticorpo IgG produzido em coelho contra uma proteína humana (IRF3), um anticorpo da mesma classe que anti- proteína A, porém sem especificidade contra a mesma (Catálogo 4302 – Cell Signaling Technology).

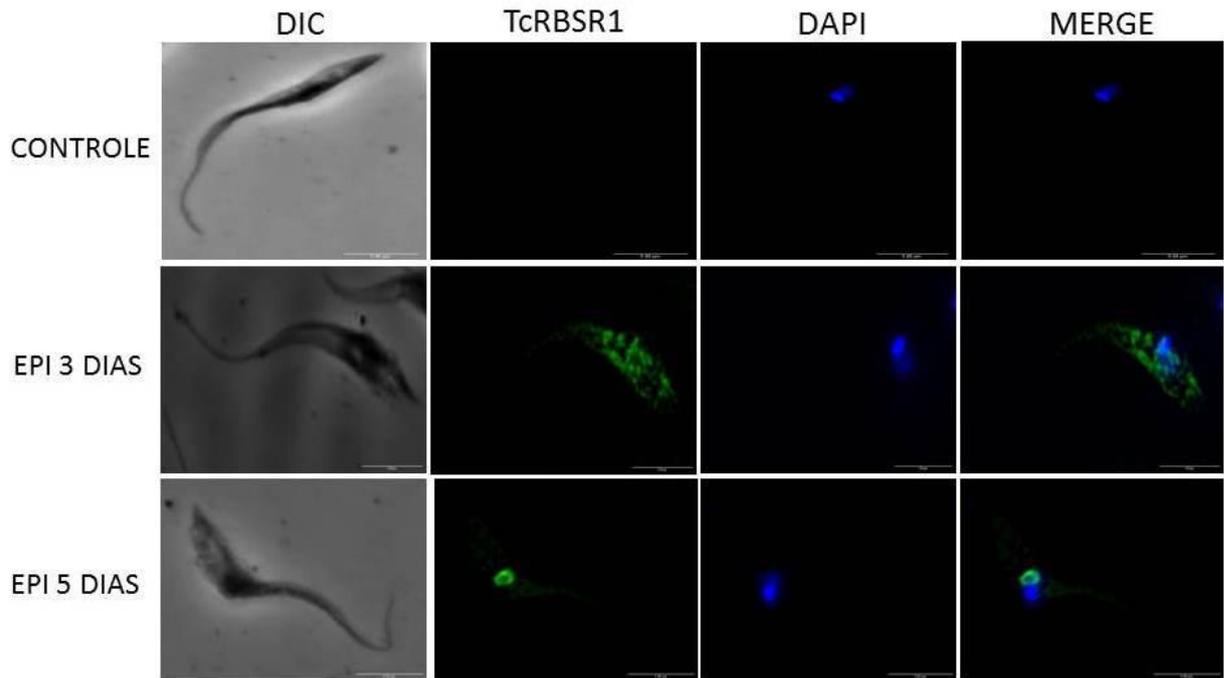


FIGURA 4.8 – Localização subcelular de RBSR1. **DIC:** imagens dos parasitas obtidas através do contraste por interferência diferencial; **RBSR1:** visualização da marcação obtida por incubação dos parasitas com o anticorpo α -proteína A (1:40.000); **DAPI:** marcação de DNA presente no núcleo e cinetoplasto; **MERGE:** sobreposição das imagens TcRBSR1 e DAPI; **CONTROLE:** IgG α -coelho (1:10.000); **EPI 3 DIAS e EPI 5 DIAS:** incubação dos respectivos anticorpos com os parasitas epimastigotas 3 dias e 5 dias. Imagens processadas por deconvolução.

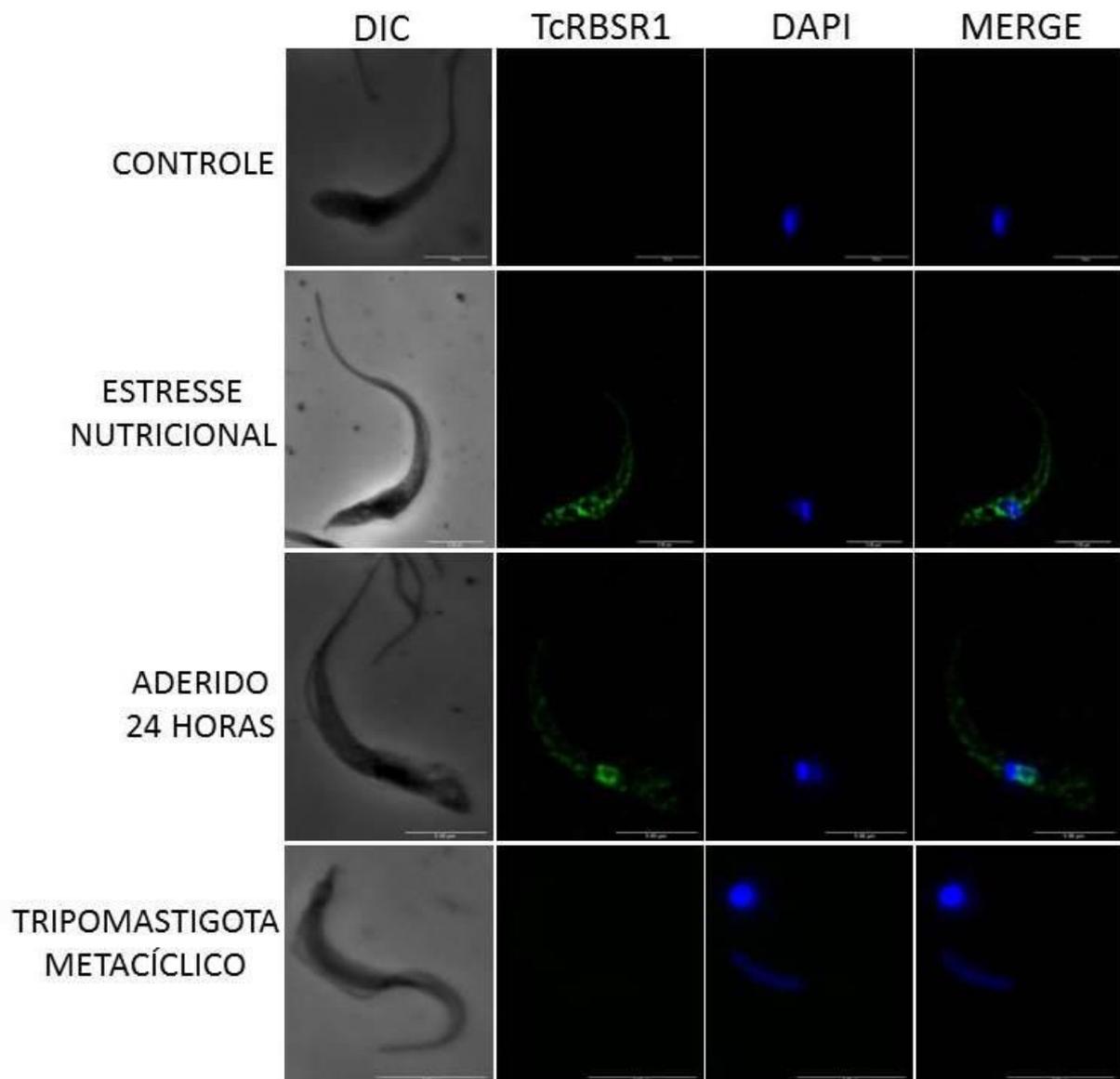


FIGURA 4.9 – Localização subcelular da proteína RBSR1 durante as etapas da metaciclo gênese. DIC: imagens dos parasitas obtidas através do contraste por interferência diferencial; **RBSR1:** visualização da marcação obtida por incubação dos parasitas com o anticorpo α -proteína A (1:40.000); **DAPI:** marcação de DNA presente no núcleo e cinetoplasto; **MERGE:** sobreposição das imagens TcRBSR1 e DAPI; **CONTROLE:** IgG α -coelho (1:10.000); **ESTRESSE NUTRICIONAL, ADERIDO 24 HORAS e TRIPOMASTIGOTA METACÍCLICO:** incubação dos anticorpos com parasitas sob estresse nutricional, aderidos 24 horas e tripomastigotas metacíclicos, respectivamente. Imagens processadas por deconvolução.

Em formas epimastigotas de três dias de crescimento observa-se uma localização citoplasmática com padrão granular. Todavia, nas formas epimastigotas cinco dias de cultivo a localização é nuclear (Figura 4.8).

Partindo desse resultado realizou-se um ensaio de imunofluorescência para observar como a proteína RBSR1 se comportaria na metaciclo gênese. Quando os parasitas foram submetidos ao estresse nutricional, a proteína alterou sua localização para o citoplasma, possuindo padrão granular, porém quando os parasitas ficaram aderidos 24 horas, a mesma retornou para o núcleo, mostrando a

mobilidade da proteína entre as formas apresentadas, porém não se sabe ao certo como RBSR1 está se comportando em cada uma das formas apresentadas. Já no caso de tripomastigota metacíclico, confirma o resultado observado por *western blot* e RBSR1 não é expressa nessa forma do parasita (Figura 4.9).

Acredita-se que a proteína RBSR1 possua um papel importante ao longo da metaciclo gênese, pois se comporta de maneira dinâmica nas diferentes formas apresentadas. Os complexos mRNPs transcritos são mobilizados para os polissomos para a tradução; alternativamente podem ser direcionados para degradação ou ainda reprimidos e estocados. Diferentes RBPs com domínio RRM estão presentes nos grânulos de mRNA e muitas delas podem ser requeridas para a estabilização de mRNAs. Por exemplo, a TcUBP2 a proteína presente em grânulos de mRNA em epimastigotas, sugere-se ser necessária para a estabilização de mRNAs de mucinas (CASSOLA, DE GAUDENZI e FRASCH, 2007; D'ORSO e FRASCH, 2002; DE GAUDENZI *et al.*, 2011). Podemos especular que RBSR1 esteja associada à mRNPs que estocam ou degradam mRNAs em epimastigotas sob estresse nutricional, quando a proteína se encontra distribuída no citoplasma em forma de grânulos (HOLETZ, *et al.*, 2007; CASSOLA, DE GAUDENZI e FRASCH, 2007; CASSOLA, 2011).

Em epimastigotas cinco dias e aderidos 24 horas, a proteína está localizada no núcleo e a mesma pode estar envolvida com o processamento de pré-mRNAs, como no caso de TIA-1 e TIAR, que em condições celulares normais, apresentam uma localização nuclear envolvidas em outras funções que não em resposta ao estresse, como por exemplo, o *splicing* de pré-mRNAs (LE GUINER *et al.*, 2001). Também, como já discutido anteriormente, devido a sequência da proteína RBSR1, talvez possa apresentar um domínio RS, e com isso esteja envolvida também com exportação de mRNA entre núcleo e citoplasma, degradação e até tradução (SHEPARD e HERTEL, 2009; GODIN *et al.*, 2007; GILBERT e GUTHRIE, 2004).

Porém, vale ressaltar, que devido à sequência de RBSR1 carboxi-terminal possuir segmentos ricos em arginina, essas sequências com resíduos de arginina podem estar facilitando a permeabilidade da proteína na célula, podendo explicar a mobilidade observada pelo ensaio de imunofluorescência (FUTAKI *et al.*, 2001).

Holetz e colaboradores (2007) publicaram um trabalho com a proteína TcDHH1, em *T. cruzi*, a qual apresenta um padrão granular citoplasmático em condições normais de cultivo bem como sob estresse nutricional, formando grânulos de RNA assemelhados a P-bodies. Como visto, a proteína RBSR1 apresenta um

padrão muito parecido quando associada ao estresse nutricional, realizou-se um ensaio de imunolocalização para observar se havia colocalização entre as duas proteínas. Observou-se que alguns grânulos de RNA se colocalizam, porém muitos parecem estar adjacentes (Figura 4.10).

Esses ensaios indicam que, possivelmente RBSR1 interaja parcialmente com DHH1 estando envolvida com a formação de mRNPs similares àqueles que contêm DHH1. As duas proteínas podem interagir na regulação da expressão gênica, mesmo que não haja uma colocalização total entre elas.

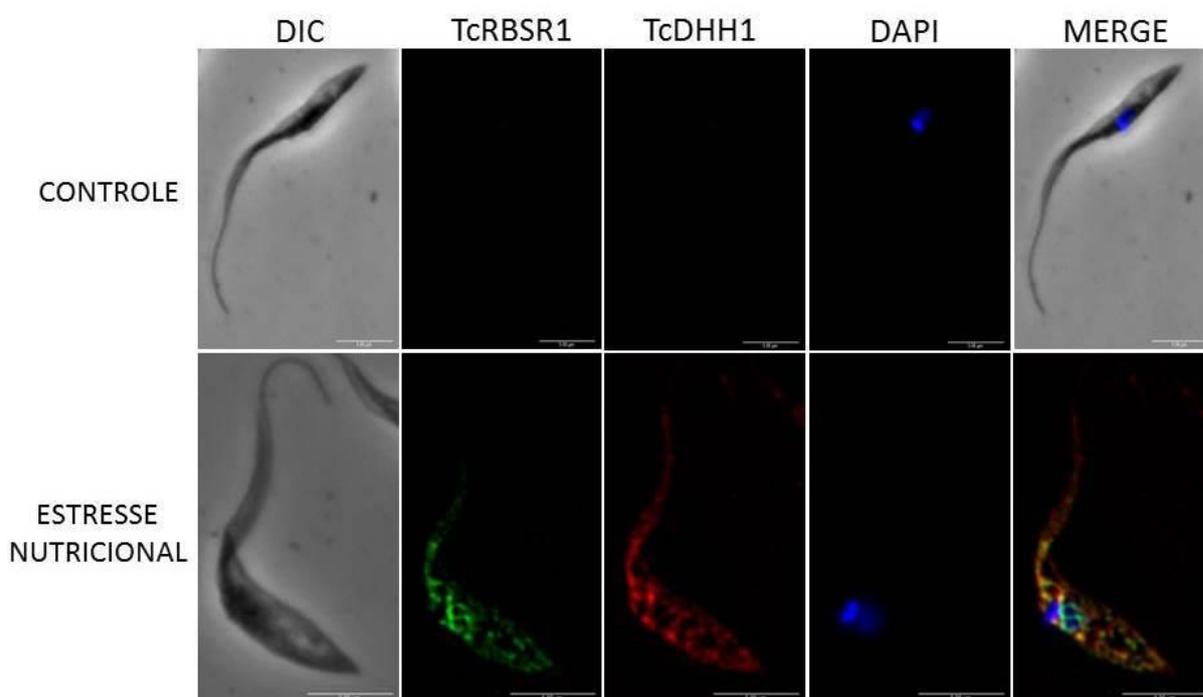


FIGURA 4.10 – Colocalização subcelular da proteína RBSR1 com DHH1. **DIC:** imagens dos parasitas obtidas através do contraste por interferência diferencial; **TcRBSR1:** visualização da marcação obtida por incubação dos parasitas com o anticorpo α -proteína A (1:40.000); **TcDHH1:** visualização da marcação obtida por incubação dos parasitas com o anticorpo α -DHH1 (1:500); **DAPI:** marcação de DNA presente no núcleo e cinetoplasto; **MERGE:** sobreposição das imagens TcRBSR1, TcDHH1 e DAPI; **CONTROLE:** IgG α -coelho (1:10.000); **ESTRESSE NUTRICIONAL:** incubação do anticorpo com parasitas sob estresse nutricional. Imagens processadas por deconvolução.

Previamente foi observado que RBSR1 apresenta um padrão de marcação nuclear em epimastigotas 5 dias e aderidos 24 horas e PICCHI e colaboradores (2011) observaram que a proteína TcNUP-1, em *T. cruzi*, se encontra exclusivamente no núcleo e com padrão de localização perinuclear nas formas epimastigotas do parasita. Dessa forma, foi realizado um experimento de imunolocalização de RBSR1 com NUP-1 objetivando investigar a colocalização das mesmas.

Os resultados obtidos indicam que há a colocalização entre as duas proteínas (Figura 4.11) e, dessa forma as mesmas podem estar associadas, ou somente localizadas no mesmo espaço, nessas formas do parasita. NUP-1 se encontra no núcleo em todas as formas do parasita, já RBSR1 se encontra no núcleo somente em epimastigotas 5 dias e aderidos 24 horas e não nas outras do parasita. Assim, o papel biológico da RBSR1 poderia ser distinto de acordo com a etapa de desenvolvimento do parasita.

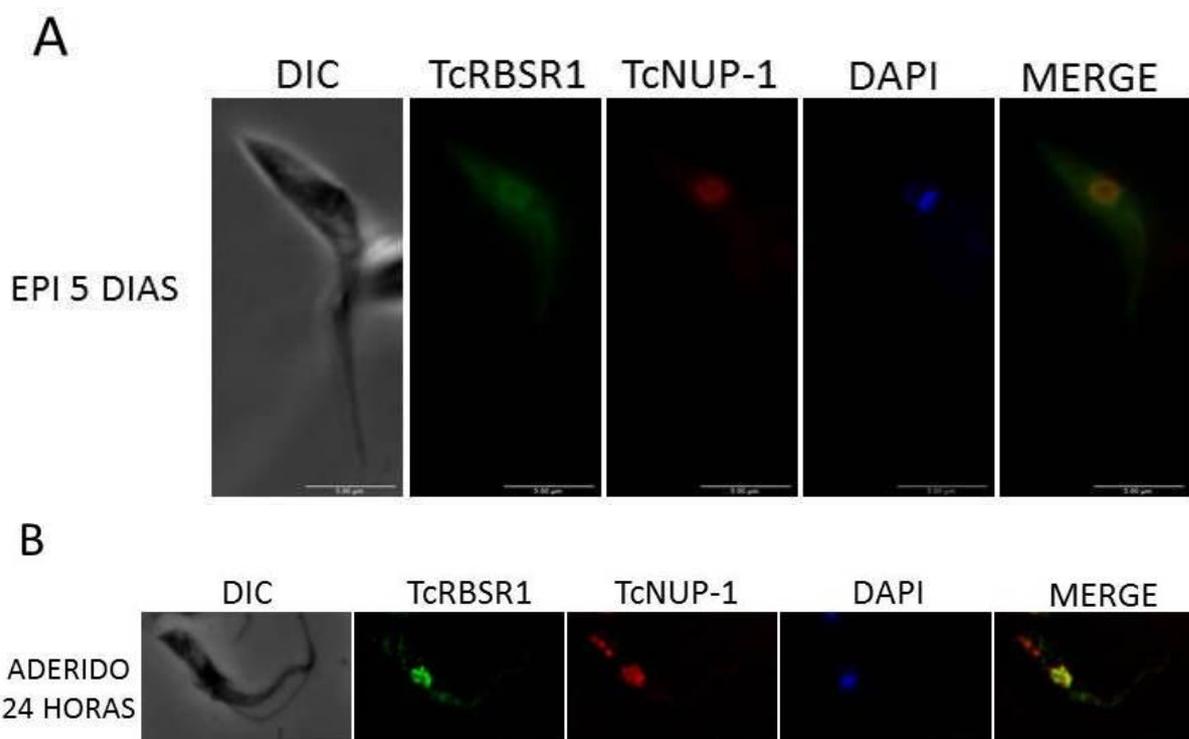


FIGURA 4.11 – Colocalização nuclear da proteína RBSR1 e NUP-1. A: Parasitas epimastigotas 5 dias. DIC: imagens dos parasitas obtidas através do contraste por interferência diferencial; TcRBSR1: visualização da marcação obtida por incubação dos parasitas com o anticorpo α -proteína A (1:40.000); TcNUP-1: visualização da marcação obtida por incubação dos parasitas com o anticorpo α -NUP-1 (1:500); DAPI: marcação de DNA presente no núcleo e cinetoplasto; MERGE: sobreposição das imagens TcRBSR1 e TcNUP-1. Imagem não processada por deconvolução. **B: Parasitas aderidos 24 horas.** DIC: imagens dos parasitas obtidas através do contraste por interferência diferencial; TcRBSR1: visualização da marcação obtida por incubação dos parasitas com o anticorpo α -proteína A (1:40.000); TcNUP-1: visualização da marcação obtida por incubação dos parasitas com o anticorpo α -NUP-1 (1:500); DAPI: marcação de DNA presente no núcleo e cinetoplasto; MERGE: sobreposição das imagens TcRBSR1 e TcNUP-1. Imagem processada por deconvolução.

A partir deste resultado inicial, mostrando a migração da proteína para o citoplasma quando se encontra em condições de estresse nutricional, decidiu-se realizar um ensaio que pudéssemos observar o que ocorreria se após o estresse colocássemos os parasitas novamente em meio com nutrientes, se haveria recuperação dos mesmos, e possível mudança de localização.

Há trabalhos que mostram que, parasitas submetidos a estresse com arsenito de sódio, quando colocados novamente em meio fresco com adição de cicloheximida, para inibir a síntese de novas proteínas, demonstraram que houve retorno da proteína para o citoplasma, sugerindo que a viabilidade do parasita não foi comprometida, por apresentar a mesma morfologia e motilidade de um parasita não tratado (CASSOLA e FRASCH, 2009).

Observamos que, com o parasita submetido ao estresse nutricional, a proteína RBSR1 se localiza no citoplasma, porém quando colocamos em meio LIT observamos que após 30 minutos, há migração de RBSR1 para o núcleo, mostrando, como na literatura, que há alteração na localização da proteína e que, apesar do estresse gerado no parasita, sua morfologia e motilidade não foram alterados (Figura 4.12).

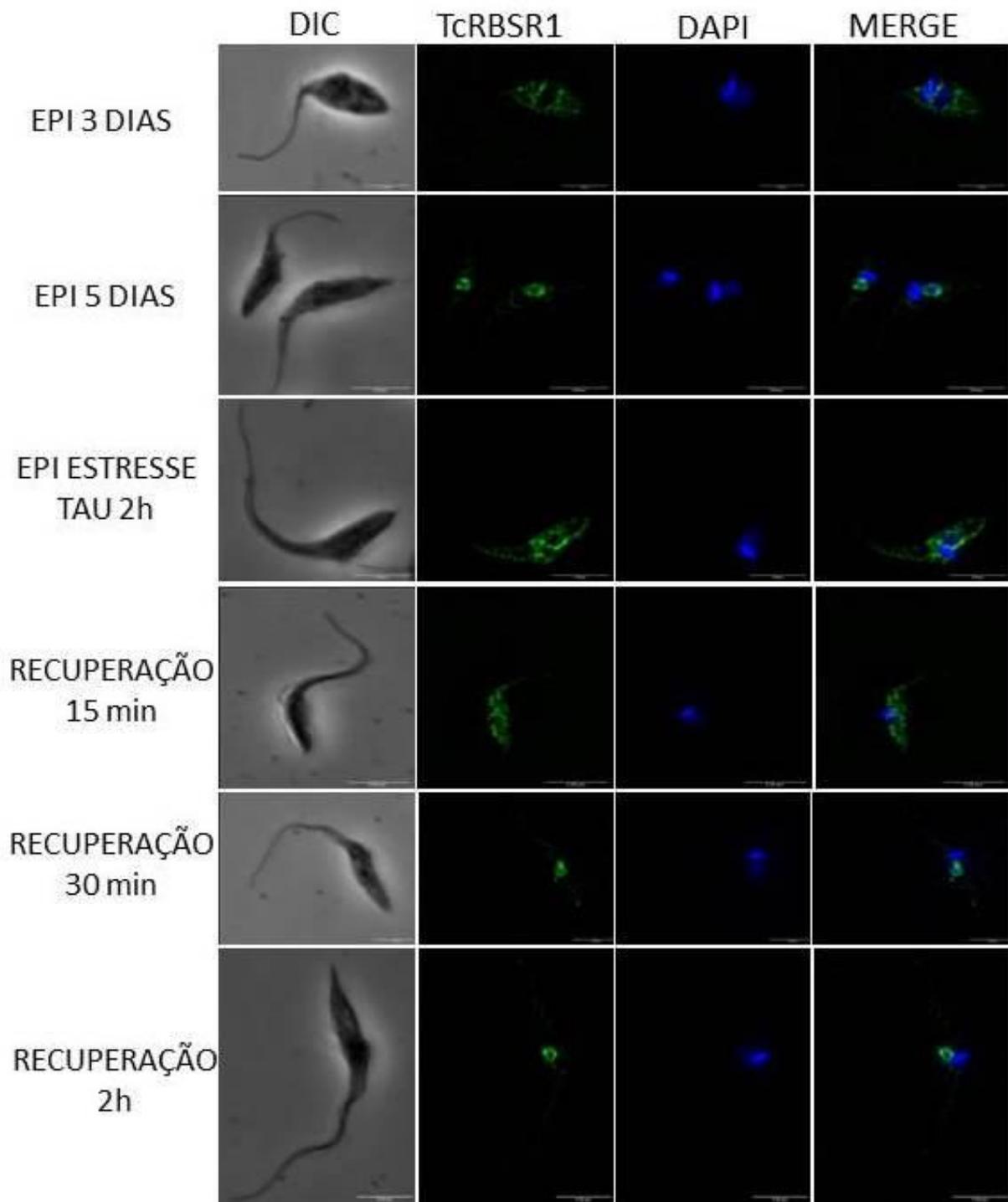


FIGURA 4.12 – Localização subcelular da proteína TcRBSR1 em diferentes formas do parasita. **DIC:** imagens dos parasitas obtidas através do contraste por interferência diferencial; **RBSR1:** visualização da marcação obtida por incubação dos parasitas com o anticorpo α -proteína A (1:40.000); **DAPI:** marcação de DNA presente no núcleo e cinetoplasto; **MERGE:** sobreposição das imagens TcRBSR1 e DAPI; **EPI 3 DIAS, EPI 5 DIAS, ESTRESSE TAU 2h, RECUPERAÇÃO 15 min, RECUPERAÇÃO 30 min, RECUPERAÇÃO 2h:** incubação dos anticorpos com os parasitas epimastigotas 3 dias, epimastigotas 5 dias, sob estresse nutricional, recuperação com meio LIT por 15 minutos, recuperação com meio LIT por 30 minutos e recuperação com meio LIT por 2 horas, respectivamente. Imagens processadas por deconvolução.

A partir destes ensaios, e observando que em condições de estresse nutricional RBSR1 estaria migrando para o citoplasma, decidiu-se realizar um novo

ensaio com outro tipo de estresse, para analisar se a proteína estaria migrando para o citoplasma somente em condições de estresse nutricional, ou estaria respondendo a um estímulo de estresse geral.

O arsenito de sódio é amplamente utilizado para induzir a formação de grânulos de estresse em diversos tipos celulares. Sua utilização no estudo de funções de proteínas de resposta a estresse é considerado uma ferramenta clássica de estudo. TIA-1 e TIAR, em diversas condições de estresse, se acumulam em grânulos citoplasmáticos, os quais são observados em diversos modelos experimentais quando as células são submetidas ao estresse por arsenito de sódio; em *T. cruzi* já foi demonstrada a capacidade de proteínas de ligação a RNA em ter sua localização modificada devido à resposta ao estresse induzido por essa droga (KEDERSHA *et al.*, 1999; ANDERSON e KEDERSHA, 2007; CASSOLA e FRASCH, 2009; CASSOLA, 2011).

Foram relatadas na literatura algumas proteínas da família das RBPs com domínio RRM que apresentam mudança de localização. Um exemplo é o caso da TcUPB1, a qual em epimastigotas apresenta uma localização essencialmente citoplasmática mas que, quando submetida ao estresse por arsenito de sódio, é capaz de se acumular no núcleo em grande quantidade, mostrando a inibição na formação de grânulos citoplasmáticos. A cinética desse acúmulo no núcleo com posterior exportação para o citoplasma torna o mecanismo de transporte um fator crítico na disponibilidade das proteínas de *shuttling* para formação dos grânulos de estresse, sendo um alvo de modulação essa via de transporte, quando há a necessidade de alterar a velocidade de repressão dos mRNAs (CASSOLA e FRASCH, 2009; ANDERSON e KEDERSHA, 2007).

Dessa forma, realizou-se um ensaio com epimastigotas 5 dias submetidos a estresse por arsenito de sódio 2 mM, por 5 horas (CASSOLA, NOÉ e FRASCH, 2010), para analisar se haveria o recrutamento de RBSR1 para grânulos citoplasmáticos, e também uma posterior recuperação de 1 hora dos parasitas em meio LIT para analisarmos o comportamento de RBSR1 na célula após o estresse (Figura 4.13).

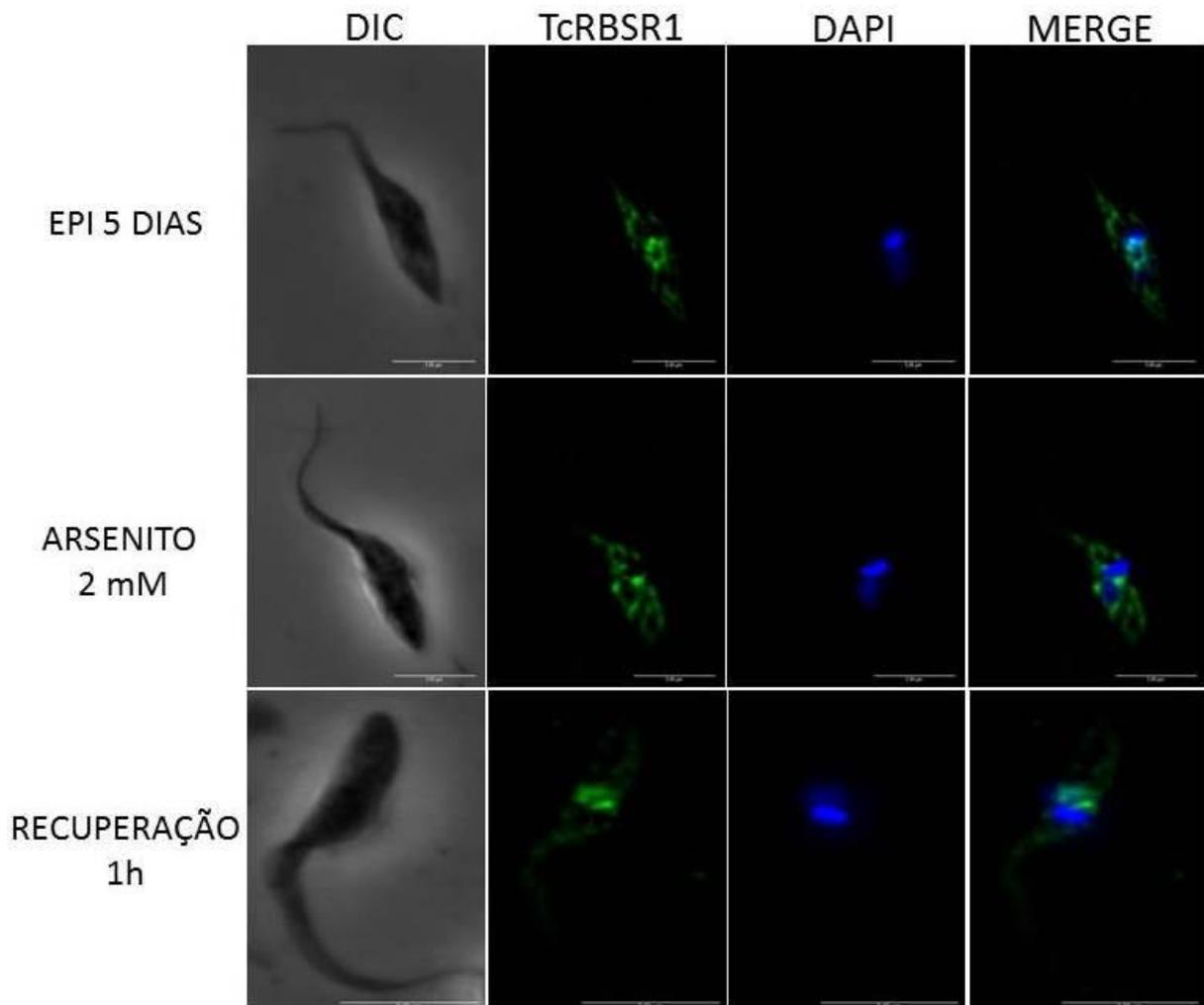


FIGURA 4.13 – Localização subcelular de RBSR1 sob condições de estresse por arsenito de sódio 2 mM. **DIC:** imagens dos parasitas obtidas através do contraste por interferência diferencial; **TcRBSR1:** visualização da marcação obtida por incubação dos parasitas com o anticorpo α -proteína A (1:40.000); **DAPI:** marcação de DNA presente no núcleo e cinetoplasto; **MERGE:** sobreposição das imagens TcRBSR1 e DAPI; **EPI 5 DIAS, ARSENITO 2 Mm e RECUPERAÇÃO 1h:** incubação dos parasitas epimastigotas 5 dias, submetidos a estresse por arsenito de sódio 2 mM e recuperação com LIT por 1 horas, respectivamente. Imagens processadas por deconvolução.

Os trabalhos prévios mostram proteínas que possuem localização citoplasmática e passam a se encontrar no núcleo após o estresse por arsenito de sódio (CASSOLA, NOÉ e FRASCH, 2010; CASSOLA e FRASCH, 2009) e que esse estresse gerado pelo arsenito de sódio causa acúmulo de proteína no núcleo e não na formação dos grânulos citoplasmáticos (CASSOLA e FRASCH, 2009). No entanto, para RBSR1, a proteína se encontra no núcleo em epimastigotas 5 dias e, devido ao estresse, tanto nutricional, como oxidativo, passa a se localizar no citoplasma. Portanto, acreditamos que há formação dos grânulos citoplasmáticos gerados em resposta ao estresse.

Também foi possível observar a recuperação do parasita após o retorno às condições normais de cultivo. Houve tanto a mudança de localização quanto a reversão da morfologia do parasita, alterada quando sob estresse.

O início da tradução é o passo mais regulado na síntese de proteínas em eucariotos (GROPPO e RICHTER, 2009). Os transcritos maduros são exportados do núcleo para o citoplasma e uma vez no citoplasma o balanço entre *turnover* de mRNAs, tradução e silenciamento determinam os níveis de cada proteína (D'ORSO, GAUDENZI e FRASCH, 2003; CLAYTON e SHAPIRA, 2007).

Acredita-se que, RBSR1 possua algum envolvimento na regulação de mRNAs em resposta ao estresse, e esse efeito é dependente da realocização dessa proteína em grânulos citoplasmáticos. Portanto, há a participação de TcRBSR1 na formação de grânulos citoplasmáticos de resposta ao estresse, como observado para algumas proteínas de *T. cruzi*, como PABP1, UBP1 e UBP2 (CASSOLA, 2011).

4.6 PERFIL DE SEDIMENTAÇÃO DA PROTEÍNA RBSR1 EM GRADIENTE DE SACAROSE

A tradução de mRNAs em células eucarióticas é iniciada pela montagem e ativação da subunidade 40S, seguida de sua associação com a subunidade 60S, assim formando o ribossomo (80S). Em seguida há a elongação da tradução, e a molécula de mRNA associa-se então diversos ribossomos para formar o polissomo (GROPPO e RICHTER, 2009; HU e COLLER, 2013).

Dessa forma, foi realizada análise de distribuição da proteína RBSR1 em gradiente de sacarose tanto em epimastigotas três dias, quanto sob estresse nutricional, de modo a verificar uma possível associação da proteína ao processo de tradução ou se a mesma poderia estar associada a complexos ribonucleoproteicos pesados não comprometidos com a tradução.

Para isso, foi utilizada primeiramente a droga cicloheximida, uma inibidora da atividade peptidil transferase da subunidade 60S, que bloqueia a elongação da tradução e estabiliza os mRNAs nos polissomos; nesse caso, verificamos que a proteína estava presente desde as subunidades livres, 40S e 60S, nos monossomos (80S), até os polissomos (frações pesadas) (Figura 1.14)

Para distinguir se a proteína RBSR1 estava associada aos polissomos ou se estaria presente em complexos pesados que co-sedimentam com os polissomos, os

parasitas foram tratados com a droga puromicina, uma droga que causa a terminação precoce da tradução, desestabilização dos polissomos e a dissociação dos mesmos. Com esse tratamento, verificamos que a proteína também se encontrava presente em todas as subunidades, desde as frações mais leves, até as mais pesadas. Esses resultados indicam que a proteína RBSR1 está associada a complexos ribonucleoproteicos pesados não comprometidos com a tradução (Figura 4.14).

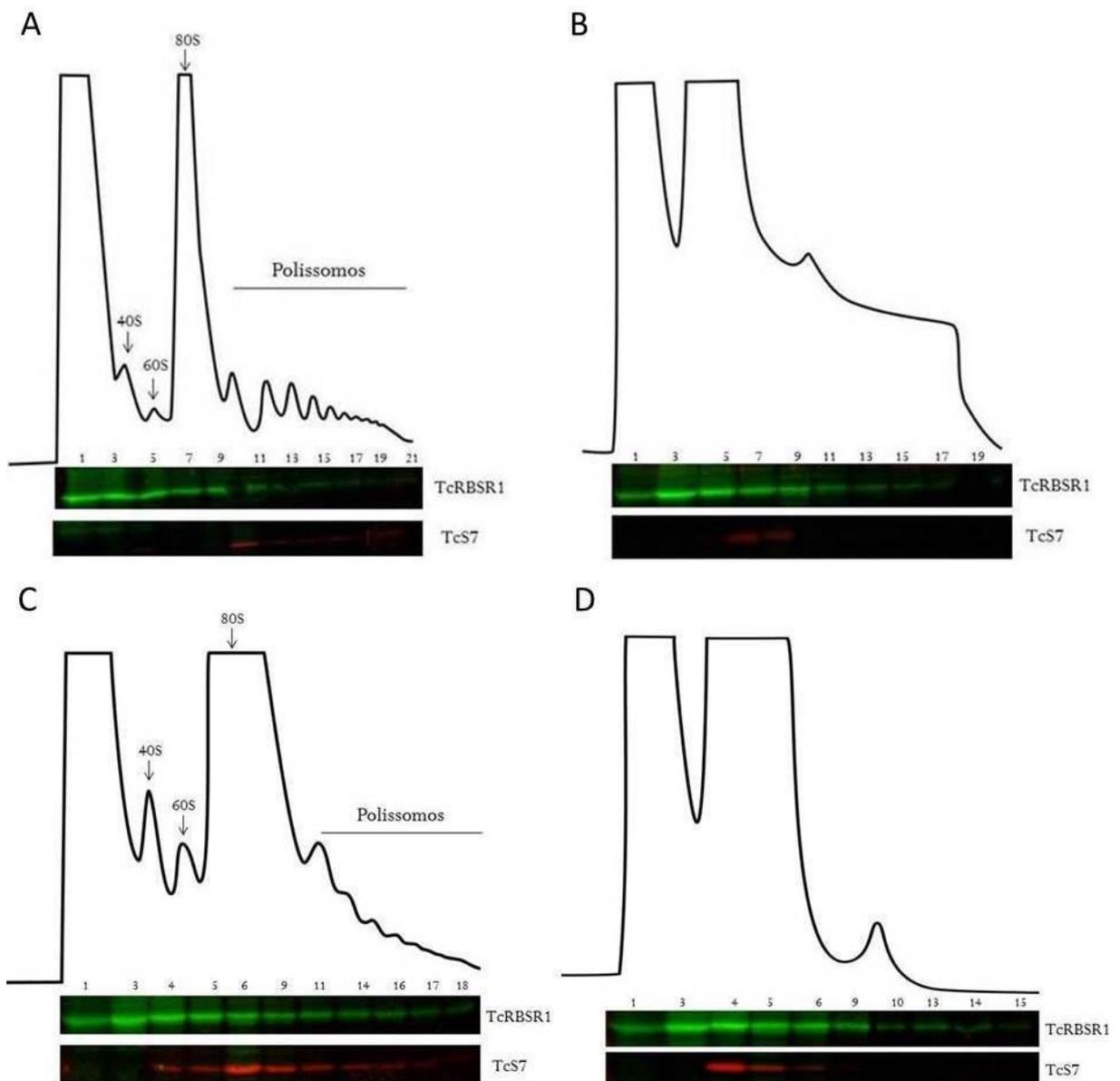


FIGURA 4.14 – Perfil de sedimentação da proteína RBSR1 em gradiente de sacarose (15 – 55%). **A:** gradiente correspondente a epimastigotas três dias submetidos a tratamento com cicloheximida. **B:** gradiente correspondente a epimastigotas três dias submetidos a tratamento com puromicina. **C:** gradiente correspondente a epimastigotas sob estresse nutricional submetidos a tratamento com cicloheximida. **D:** gradiente correspondente a epimastigotas sob estresse nutricional submetidos a tratamento com puromicina. As posições da subunidades 40S, 60S, o monômero 80S e os polissomos estão indicados. As frações foram analisadas por *western blotting* com anticorpo α -proteína A (1:40.000). TcS7: proteína ribossomal utilizada como controle do experimento.

4.7 IDENTIFICAÇÃO DOS TRANSCRITOS ALVOS DE RBSR1 POR SEQUENCIAMENTO EM LARGA ESCALA

Para a caracterização dos mRNAs alvo que se associam a RBSR1 foram realizados ensaios de imunoprecipitação da proteína TcRBSR1 fusionada ao TAP-tag contra o anticorpo anti-proteína A. Foram utilizados transfectantes (RBSR1+TAP-tag) epimastigotas 3 dias, e como controle utilizou-se epimastigotas 3 dias selvagem, sendo realizadas três réplicas de imunoprecipitação para cada experimento (Figura 4.15).

Utilizou-se dois parâmetros principais para tal análise, o *Fold Change* (FC) e o *False Discovery Rate* (FDR). O *Fold Change* é considerado o número que define o quanto um valor se altera em comparação a um valor inicial, sendo, portanto utilizada para análises de expressão gênica, ou seja, quantas vezes um gene se apresenta super expresso em determinada amostra quando comparado à quantidade presente em outra amostra (WITTEN e TIBSHIRANI, 2007). Já o FDR é um método estatístico utilizado para testes de hipóteses múltiplas, medindo a proporção esperada de resultados falso-positivos em um total de amostras (BENJAMIN e YEKUTIELI, 2001).

As leituras geradas pelo sequenciamento na plataforma SOLiD foram alinhadas ao genoma de *T. cruzi* usando a ferramenta *CLC BioWorkbenchTM*. Após o alinhamento de *reads* ao genoma de referência, foi realizada a normalização dos dados seguido do teste estatístico beta binomial (BAGGERLY *et al.*, 2003); considerou-se o nível de confiabilidade estatística $FDR \leq 0.01$, corrigido pelo teste estatístico e foi utilizado um valor de alteração absoluta de 4 vezes (*Fold Change*) como critério para seleção de genes diferencialmente expressos. Com essa análise mais conservadora alguns alvos podem ter sido excluídos das análises, todavia essa estratégia aumenta a confiabilidade do experimento apesar de diminuir o número de RNAs identificados, diminuindo consideravelmente a quantidade de resultados falso-positivos.

Para as análises, foram cruzados os dados entre o controle e as amostras de epimastigotas três dias do transfectante RBSR1+TAP-tag (Tabela 4.1). Após esse resultado, as sequências dos RNAs alvos identificados foram analisadas pela plataforma KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*).

Foram identificados 34 mRNAs que se ligam a RBSR1 em epimastigotas sob condições normais de cultivo. Os RNAs associados codificam, em sua maioria, para

proteínas hipotéticas de função e localização desconhecidas (50%), e outra grande parte a proteína ribossomais (23,5%). Porém, necessita-se de mais estudos para comprovação dos resultados, como por exemplo, ensaios de FISH (*Fluorescent in situ hybridization*), PCR em tempo real, nocaute gênico, entre outros.

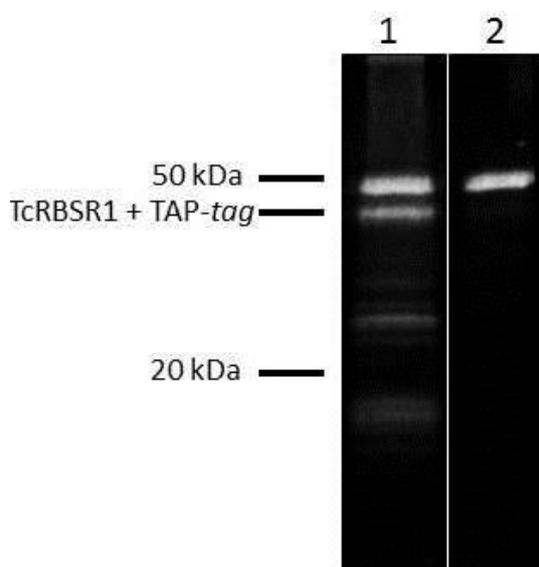


FIGURA 4.15 – Ensaio de imunoprecipitação da proteína TcRBSR1 fusionada ao TAP-tagging contra o anticorpo α -proteína A. 1: material obtido a partir da eluição de TcRBSR1+ TAP-tag. 2: material obtido a partir da eluição de *wild type* (W.T.). Ensaio de *western blot* para confirmação de imunoprecipitação, anticorpo primário utilizado α -proteína-A (1:40.000) e anticorpo secundário IRDye 800 (1:15:000). Revelação: Odyssey® CLx Infrared Imaging System.

TABELA 4.1 – Identificação dos transcritos alvos de RBSR1 em epimastigotas três dias.

ID	Fold Change	Nome da proteína para qual o mRNA codifica
Tc00.1047053510755.110	-17,181351	Proteína hipotética
Tc00.1047053509561.70	-11,562714	Proteína hipotética
Tc00.1047053511727.290	-7,9557488	RNA-binding protein
Tc00.1047053507093.260	-5,0295329	Transportador ABC
Tc00.1047053506925.120	5,3354186	Fator de iniciação eucariótico 5a
Tc00.1047053506369.70	6,3263308	Histona H1
Tc00.1047053506793.90	10,919649	Proteína hipotética
Tc00.1047053508547.80	14,499796	Proteína hipotética
Tc00.1047053503395.40	15,161525	Proteína ribossomal 60S, L18
Tc00.1047053507925.50	45,839213	Proteína hipotética
Tc00.1047053506559.470	-1,8E+308	Proteína ribossomal L35A
Tc00.1047053507501.20	-1,8E+308	Proteína hipotética
Tc00.1047053508153.184	-1,8E+308	Proteína ribossomal 60S, L39
Tc00.1047053510943.26	-1,8E+308	Proteína ribossomal L38
Tc00.1047053510535.100	-1,8E+308	Cisteína C peptidase
Tc00.1047053506979.50	-1,8E+308	Proteína hipotética
Tc00.1047053503453.40	-1,8E+308	Proteína ribossomal 60S, L30
Tc00.1047053504105.94	-1,8E+308	Proteína ribossomal S25
Tc00.1047053508405.80	-1,8E+308	Separase

Tc00.1047053507049.10	-1,8E+308	Proteína hipotética
Tc00.1047053503821.19	-1,8E+308	Proteína hipotética
Tc00.1047053507519.30	-1,8E+308	Proteína hipotética
Tc00.1047053510123.24	-1,8E+308	Proteína hipotética
Tc00.1047053511527.34	-1,8E+308	Proteína ribossomal 60S, L2
Tc00.1047053509331.74	-1,8E+308	Proteína hipotética
Tc00.1047053503453.30	-1,8E+308	Proteína ribossomal 60S, L30
Tc00.1047053506145.24	-1,8E+308	Proteína hipotética
Tc00.1047053506529.330	-1,8E+308	Proteína hipotética
Tc00.1047053509671.20	-1,8E+308	Proteína hipotética
Tc00.1047053503731.9	-1,8E+308	Proteína hipotética
Tc00.1047053506985.30	-1,8E+308	Proteassomo subunidade alfa 3
Tc00.1047053450161.10	-1,8E+308	Transportador de Cátion
Tc00.1047053506579.60	-1,8E+308	Proteína hipotética
Tc00.1047053401469.10	-1,8E+308	Proteína dedo de zinco 2

4.8 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS PARCEIRAS DE RBSR1 POR ANÁLISE PROTEÔMICA

Foram realizados ensaios de imunoprecipitação da proteína RBSR1 fusionada ao TAP-*tag* contra o anticorpo α -proteína A (Figura 4.16) seguido de espectrometria de massas. Foram utilizados transfectantes (RBSR1+TAP-*tag*) epimastigotas 3 dias e epimastigotes submetidos a estresse nutricional. Como controle utilizou-se TAP-tagging vazio (parasitas transfectados com vetor sem o inserto), sendo realizadas três réplicas de imunoprecipitação para cada experimento, e lembrando que cada réplica foi passada três vezes no espectrômetro de massas.

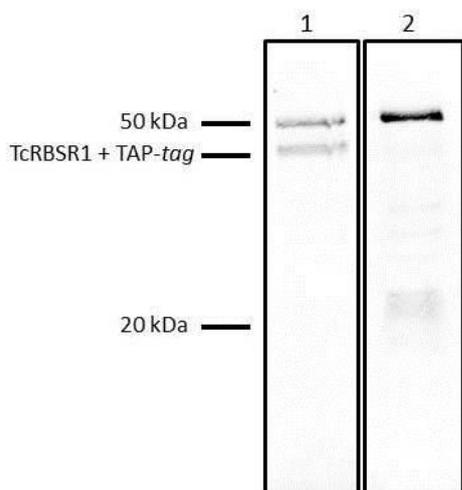


FIGURA 4.16 – Ensaio de *western blot* do eluído resultante de imunoprecipitação da proteína RBSR1 fusionada ao TAP-tag para análise proteômica. 1: material obtido a partir da eluição de RBSR1+ TAP-tag. **2:** material obtido a partir da eluição do controle TAP-tagging vazio. Ensaio de *western blot* para confirmação de imunoprecipitação, anticorpo primário utilizado α -proteína-A (1:40.000) e anticorpo secundário IRDye 800 (1:15:000). Revelação: Odyssey® CLx Infrared Imaging System.

A identificação dos peptídeos foi realizada utilizando o programa ProLuCID, o qual compara espectros experimentais contra teóricos, gerados a partir de um banco de sequências, selecionando o peptídeo cujo espectro teórico mais se assemelha ao experimental (XU *et al.*, 2006). Um relatório contendo as proteínas identificadas pelo programa ProLuCID foi gerado pelo programa *Search Engine Processor* (CARVALHO *et al.*, 2012 a). A seleção de proteínas foi realizada levando em consideração duas ou mais evidências (dois peptídeos diferentes ou o mesmo peptídeo com estado de carga diferente), com um $p < 0.05$. E utilizando o programa *PatternLab for Proteomics* (CARVALHO *et al.*, 2012 b) comparou-se as amostras de epimastigotas três dias contra o controle TAP-tagging vazio (Figura 4.17 a) e as amostras epimastigotas sob estresse nutricional contra o controle TAP-tagging vazio (Figura 4.17 b).

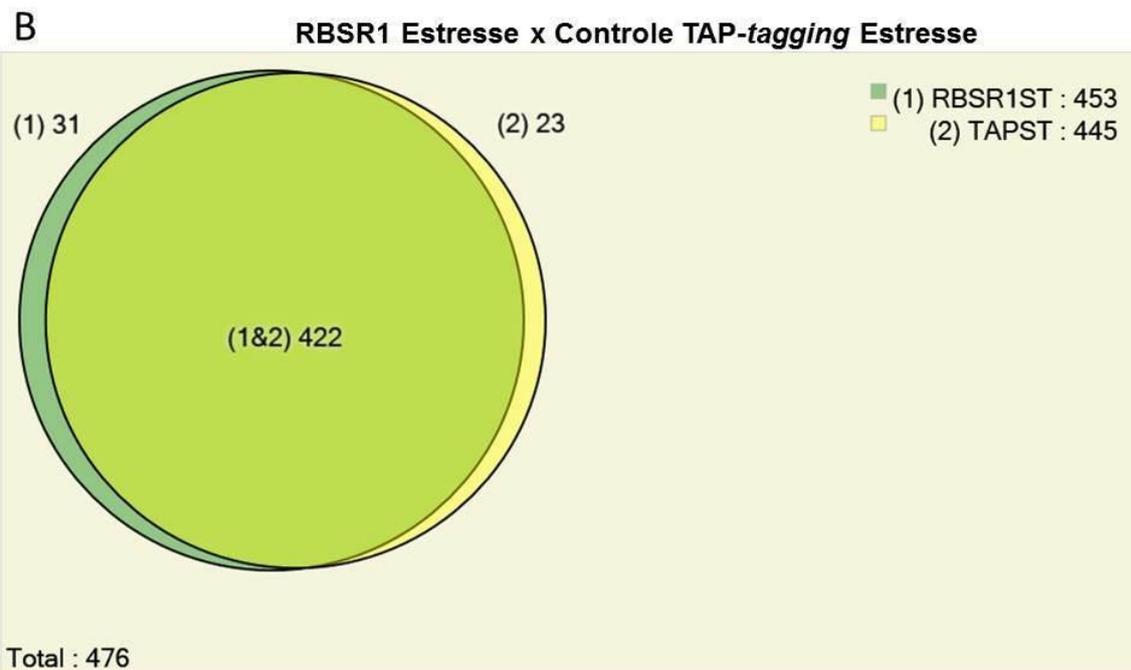
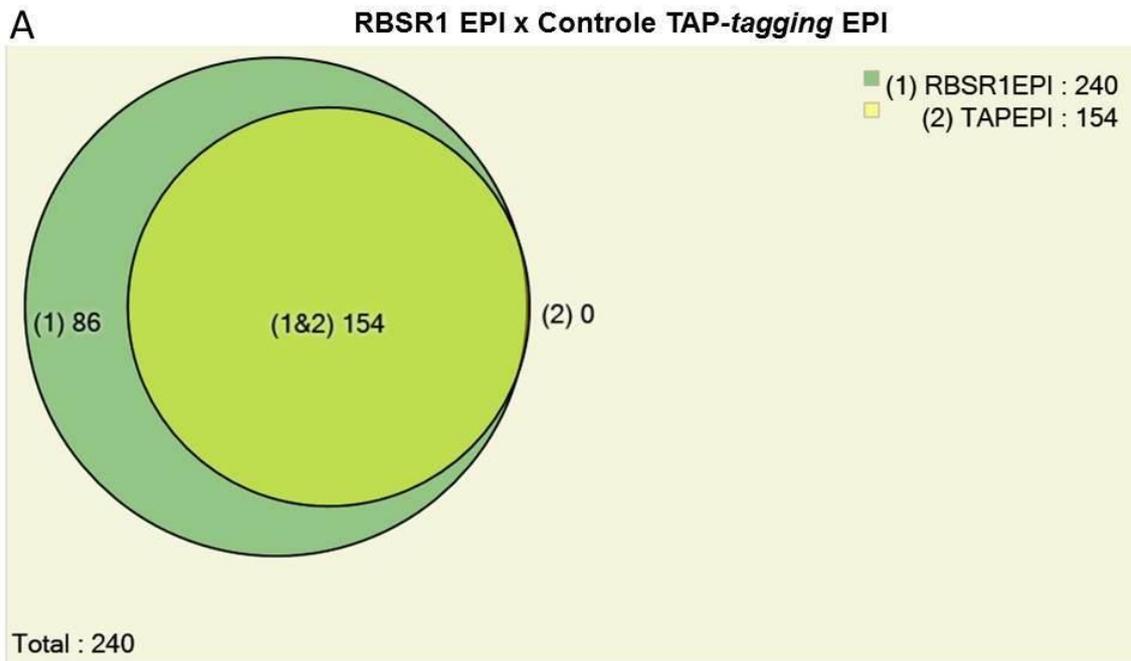


FIGURA 4.17 – Análise por diagrama de Venn a relação de proteínas encontradas em epimastigotas 3 dias e controle TAP-tagging e epimastigotas sob estresse nutricional e controle TAP-tagging.

Foram identificadas 86 proteínas específicas do complexo RBSR1-TAP tagging em epimastigotas 3 dias (Tabela 4.2), e 31 proteínas sob estresse nutricional (Tabela 4.3).

Pode-se observar na tabela 4.2, correspondente as proteínas parceiras de RBSR1 em epimastigotas 3 dias, que não há predominância de um grupo de proteínas. Em ensaios de imunofluorescência, em parasitas epimastigotas 3 dias, a proteína RBSR1 se encontra no citoplasma com padrão granular, encontramos

algumas proteínas, como: RNA helicase ATP-dependente DEAD/H, HSP70 (*heat shock protein 70*), HSP85 (*heat shock protein 85*), e também proteínas da subunidade ribossomal 40S, que poderiam estar associadas a grânulos de RNA. Porém não se pode inferir a sua associação com *P-bodies*, pois os dados proteômicos não apresentam o cerne de *P-bodies* de mamíferos e leveduras, como LSMs, proteínas de *decapping* (DCP1/ DCP2) e as exonucleases 5'-3' XRN1 (HOLETZ *et al.*, 2010) para confirmar tal hipótese.

A proteína HSP70 pode modular a interação de mRNA com proteínas regulatórias podendo influenciar na estabilidade do mRNA, e também na tradução. Foi observado em um trabalho que HSP70 é um potente regulador da formação do complexo entre a 3'UTR do mRNA da eritropoietina (Epo mRNA) e sua proteína específica de ligação, proteína eritropoietina de ligação a RNA (ERBP). Para a montagem desse complexo é necessário a estabilização do mRNA de eritropoietina, e viu-se que há envolvimento de HSP70 na formação do complexo ERBP-Epo mRNA, e sugeriu-se que o papel de HSP70 pode estar envolvido na regulação da estabilidade do mRNA de eritropoietina (SCANDURRO *et al.*, 1997).

Em outro trabalho, observou-se em mamíferos, que HSP70 liga em regiões ricas de AU de RNA, podendo participar da estabilidade de mRNA ou ativação da tradução. Foram realizados ensaio de imunoprecipitação de complexos RNA-proteína formados *in vitro* entre proteínas citoplasmáticas de linfócitos humanos e regiões ricas em AU de RNA e observaram que, as proteínas de choque térmico, podem atuar como ligadoras de RNA, participando dos processos regulatórios de degradação ou tradução de mRNA (HENICS *et al.*, 1999).

Proteínas de montagem de nucleossomo (*nucleosome assembly protein - NAP1*) e proteínas semelhantes a proteínas de montagem de nucleossomo (*nucleosome assembly protein-like - NAP1L*) também foram encontradas nesse ensaio proteômico. Em levedura já foi visto que NAP1 tem um importante papel de regulação de atividade transcricional modulando locais da estrutura da cromatina. Foi realizado um ensaio com *Saccharomyces cerevisiae* e foi observada a associação de Nap1 com a cromatina, sugerindo que a função de Nap1 é de facilitar a remontagem do nucleossomo durante a alongação da transcrição (ROSÁRIO e PEMBERTON, 2008).

Encontramos também nesse ensaio, a proteína DHH1, uma DEAD-box RNA helicase, altamente conservada entre os eucariotos e considerada marcadora de *P-*

bodies (não exclusivamente) em mamíferos e leveduras (OLSZEWSKA *et al.*, 2012; TEIXEIRA e PARKER, 2007).

TABELA 4.2 – Proteínas identificadas no complexo RBSR1-TAP *tagging* em epimastigotas três dias.

ID	Replicata	Contagem total de espectros	Descrição
Tc00.1047053510121.20	2	52	hexoquinase, putativa
Tc00.1047053507093.300	2	40	proteína hipotética, conservada
Tc00.1047053511287.49	2	39	prostaglandina F sintetase, putativa aldo/ceto redutase, putativa
Tc00.1047053504001.10	2	39	proteína hipotética, conservada
Tc00.1047053504089.60	2	38	proteína hipotética, conservada
Tc00.1047053510663.30	2	34	60S proteína ribossomal subunidade L31, putativa
contaminante_KERATIN17	2	34	
Tc00.1047053504089.70	2	33	proteína hipotética, conservada
Tc00.1047053504001.20	2	33	proteína hipotética, conservada
Tc00.1047053510663.19	2	33	60S proteína ribossomal subunidadeL31, putativa
Tc00.1047053510737.79	2	33	60S proteína ribossomal subunidadeL31, putativa
Tc00.1047053510737.70	2	33	60S proteína ribossomal subunidadeL31, putativa
Tc00.1047053508413.50	2	31	proteína ligadora de RNA, putativa
Tc00.1047053510755.120	2	31	proteína ligadora de RNA, putativa
Tc00.1047053504839.50	2	30	proteína semelhante a proteína de montagem de nucleossomo, putativa
Tc00.1047053505983.20	2	28	proteína semelhante a proteína de montagem de nucleossomo, putativa
Tc00.1047053511211.160	2	28	proteína de choque térmico 70 (HSP70), putativa
Tc00.1047053506579.20	2	26	proteína hipotética, conservada
Tc00.1047053508441.20	2	25	fosfoenolpiruvato carboxiquinase glicosomal, putativa
Tc00.1047053506519.130	2	25	inosina-5'-monofosfato dehidrogenase, putativa
Tc00.1047053508169.20	2	23	fator de alongação 2, putativa
Tc00.1047053510755.89	2	23	proteína de membrana dos kinetoplastídeos KMP-11, putativa
Tc00.1047053510963.90	2	23	fator de alongação 2, putativa
Tc00.1047053507713.30	2	22	proteína de choque térmico 85, putativa
Tc00.1047053509643.130	2	20	proteína de choque térmico 85, putativa
Tc00.1047053509105.140	2	20	proteína de choque térmico 85, putativa
Tc00.1047053507963.79	2	19	proteína de montagem de nucleossomo, putativa
Tc00.1047053487507.10	2	19	triparedoxina peroxidase, putativa

Tc00.1047053506625.70	2	19	proteína ligadora de RNA, putativa
Tc00.1047053506817.50	2	18	proteína ribossomal L27, putativa
Tc00.1047053506593.30	2	18	proteína ribossomal S7, putativa
Tc00.1047053511809.130	2	18	40S proteína ribossomal S15, putativa
Tc00.1047053511811.10	2	17	40S proteína ribossomal S15, putativa
Tc00.1047053511809.99	2	17	40S proteína ribossomal S15, putativa
Tc00.1047053503453.30	2	17	60S proteína ribossomal L30, putativa
Tc00.1047053509317.60	2	17	proteína ligadora de RNA, putativa
Tc00.1047053504839.44	2	17	triparedoxina peroxidase
Tc00.1047053504037.30	2	17	60S proteína ribossomal L12, putativa
Tc00.1047053509445.10	2	17	triparedoxina peroxidase, putativa
Tc00.1047053505983.9	2	17	triparedoxina peroxidase, putativa
Tc00.1047053507259.10	2	17	triparedoxina peroxidase, putativa
Tc00.1047053504839.28	2	17	triparedoxina peroxidase, putativa
Tc00.1047053508413.44	2	16	60S proteína ribossomal L12, putativa
Tc00.1047053511621.50	2	16	proteína ligadora de RNA, putativa
Tc00.1047053506593.19	2	16	proteína ribossomal S7, putativa
contaminante_KERATIN21	2	16	
Tc00.1047053510755.129	2	16	60S proteína ribossomal L12, putativa
Tc00.1047053511071.171	2	16	60S proteína ribossomal L12, putativa
Tc00.1047053506829.39	2	15	proteína ribossomal S7, putativa
Tc00.1047053503453.40	2	15	60S proteína ribossomal L30, putativa
Tc00.1047053506959.130	2	15	60S proteína ribossomal L30, putativa
Tc00.1047053508111.30	2	14	glutamato dehidrogenase, putativa
Tc00.1047053511293.69	2	14	malato glicosomal dehidrogenase, putativa
Tc00.1047053511181.50	2	14	peptidase de processo mitocondrial, subunidade beta, putativa metallo-peptidase, Clan ME, Família M16, putativa
Tc00.1047053511287.110	2	12	proteína hipotética, conservada
Tc00.1047053508895.60	2	12	proteína ligadora de RNA, putativa
Tc00.1047053506885.14	2	11	proteína ribossomal L37, putativa
Tc00.1047053507773.34	2	11	60S proteína ribossomal L37, putativa

Tc00.1047053510431.274	2	11	60S proteína ribossomal L37, putativa
Tc00.1047053506585.40	2	11	proteína glicose-regulada 78, putativa
Tc00.1047053511545.20	2	11	proteína ribossomal L27, putativa
Tc00.1047053506959.30	2	11	RNA helicase ATP-dependente DEAD/H, putativa
Tc00.1047053506817.30	2	11	proteína ribossomal L27, putativa
Tc00.1047053511545.40	2	11	proteína ribossomal L27, putativa
Tc00.1047053509749.36	2	11	proteína ribossomal L29, putativa
Tc00.1047053506789.260	2	10	proteína hipotética, conservada
Tc00.1047053510187.50	2	10	tirosina aminotransferase
Tc00.1047053509749.33	2	10	proteína ribossomal L29, putativa
Tc00.1047053510719.35	2	10	proteína ribossomal L29, putativa
Tc00.1047053505977.26	2	10	60S proteína acídica ribossomal P2, putativa
Tc00.1047053508387.40	2	10	proteína hipotética, conservada
Tc00.1047053510719.30	2	10	proteína ribossomal L29, putativa
Tc00.1047053510821.50	2	9	fator de replicação A subunidade 28 kDa, putativa
Tc00.1047053506949.50	2	9	citocromo c, putativa
Tc00.1047053508959.4	2	9	citocromo c, putativa
Tc00.1047053510187.30	2	9	tirosina aminotransferase
Tc00.1047053510187.40	2	9	tirosina aminotransferase
Tc00.1047053511461.20	2	9	tirosina aminotransferase
Tc00.1047053510679.40	2	8	proteína hipotética
Tc00.1047053506963.10	2	8	60S proteína ribossomal L10a, putativa
Tc00.1047053508175.329	2	7	60S proteína ribossomal L19, putativa
Tc00.1047053511233.7	2	7	60S proteína ribossomal L10a, putativa
Tc00.1047053511277.160	2	7	60S proteína ribossomal L10a, putativa
Tc00.1047053508175.309	2	6	60S proteína ribossomal L19, putativa
Tc00.1047053509149.60	2	6	60S proteína ribossomal L19, putativa
Tc00.1047053509149.40	2	6	60S proteína ribossomal L19, putativa

Replicata: foram realizadas no mínimo duas replicatas técnicas, e de cada replicata foram realizadas duas corridas. Contagem total de espectros: o valor observado na tabela é de quantas vezes a proteína foi identificada.

Foram encontradas 31 proteínas possíveis parceiras de RBSR1, quando o ensaio foi realizado em parasitas sob estresse nutricional. Observamos que, aproximadamente 30% são proteínas hipotéticas, e levando em consideração os ensaios de imunofluorescência de RBSR1 em epimastigotas sob estresse observamos que, a localização de RBSR1 se encontra no citoplasma com padrão granular. Foi também realizado o ensaio de colocalização de RBSR1 com DHH1, que é considerada uma proteína de grânulos de RNA, e observamos que possivelmente RBSR1 interaja parcialmente com DHH1 estando envolvida com a formação de mRNPs similares àqueles que contêm DHH1.

Levando em consideração o complexo de proteínas associadas à proteína DHH1 (HOLETZ *et al.*, 2010) encontramos nesse ensaio proteômico somente a proteína ligadora a poliadenilato 1. Essa proteína tem a função de ligação a cauda poli (A) em mRNAs, podendo estar envolvida em processos regulatórios citoplasmáticos do metabolismo de mRNA, promovendo a tradução e *turnover* do mRNA (KOZLOV e GEHRING, 2010).

Já foi visto que, PABP se liga em regiões auto-reguladas ricas em adeninas (ARS) do seu mRNA e reprime a tradução, protelando o movimento da subunidade ribossomal 40S ao longo da 5'UTR (BAG, 2001). E para que a interação de PABP com as sequências auto-reguladas ocorra, precisa-se de no mínimo, 4 domínios ligadores de RNA (PATEL e BAG, 2006). Porém, no nosso estudo, como encontramos somente a proteína ligadora a poliadenilato 1, e não um core de proteínas relacionadas a grânulos de RNA, concluímos não ser suficiente para inferir que RBSR1, sob estresse nutricional, está relacionada a grânulos de RNA.

Dentre as proteínas que co-imunoprecipitaram com RBSR1 em situação de estresse podemos também destacar a calmodulina. Essa proteína representa a maior parte das proteínas ligadoras a cálcio, e é considerada uma reguladora essencial para os processos intracelulares em resposta a estresse. (O'CONNELL *et al.*, 2011).

Um estudo realizado com a proteína CPSF30, uma proteína ligadora de RNA, com domínio CCCH *zinc finger*, que se liga a calmodulina e é considerada um fator específico de poliadenilação, foi realizado em *Arabidopsis thaliana*, e observou-se que a atividade da proteína ligadora de RNA interage com calmodulina, porém na presença de calmodulina e cálcio, a atividade da proteína é inibida, mostrando que, o processamento de RNA em plantas é provavelmente regulado pelo estímulo de sinais pela calmodulina (DELANEY *et al.*, 2006).

Outro estudo com a proteína LPI, isoforma de PEP19, de cérebro de rato, a proteína é uma ligadora de calmodulina, está envolvida no metabolismo do cálcio, e pode se ligar a RNA de histona. Observou-se que tanto a proteína PEP19, quanto sua isoforma, LPI, ligam-se ao mRNA da histona H1, e essa ligação é afetada pela calmodulina, sugerindo que, no cérebro, a regulação pós transcricional da síntese de histona H1 pode ser regulada por sinais de cálcio e talvez por atividade neural (SALADINO *et al.*, 2012).

TABELA 4.3 – Proteínas identificadas no complexo RBSR1-TAP *tagging* em parasitas sob estresse nutricional.

ID	Replicata	Contagem total de espectros	Descrição
Tc00.1047053506625.70	3	51	proteína ligadora de RNA, putativa
Tc00.1047053509317.60	3	43	proteína ligadora de RNA, putativa
Tc00.1047053506579.20	3	34	proteína hipotética, conservada
Tc00.1047053510089.200	3	34	proteína hipotética, conservada
Tc00.1047053503899.80	3	32	proteína hipotética, conservada
Tc00.1047053510089.110	3	28	proteína hipotética, conservada
Tc00.1047053510421.130	3	28	proteína hipotética, conservada
Tc00.1047053509859.10	3	26	proteína hipotética, conservada
Tc00.1047053510821.60	3	20	ribonucleoproteína p18, precursor mitocondrial, putativa
Tc00.1047053510729.220	3	20	proteína hipotética, conservada
Tc00.1047053506341.10	3	17	proteína semelhante a N-acetilglicosamina-6-fosfato deacetilase
Tc00.1047053506507.10	3	16	proteína semelhante a N-acetilglicosamina-6-fosfato deacetilase, putativa
Tc00.1047053506885.70	3	15	proteína ligadora de poliadenilato 1, putativa
Tc00.1047053506391.20	3	14	calmodulina, putativa
Tc00.1047053507483.39	3	14	calmodulina
Tc00.1047053506391.10	3	14	calmodulina
Tc00.1047053507483.30	3	14	calmodulina, putativa
Tc00.1047053507483.50	3	14	calmodulina
Tc00.1047053510101.140	2	93	piruvato fosfato dikinase, putativa
Tc00.1047053503715.10	2	21	fator de splicing TSR1, putativa
Tc00.1047053509607.30	2	14	fator de splicing TSR1, putativa
Tc00.1047053510515.30	2	12	proteína hipotética, conservada
contaminante_NRL_1MCOL	2	11	imunoglobulina g1 (igg1)
Tc00.1047053507831.70	2	10	piruvato desidrogenase E1 componente subunidade alfa, putativa
Tc00.1047053511261.160	2	10	piruvato desidrogenase E1 componente subunidade alfa, putativa
Tc00.1047053506735.10	2	10	peptidase de processo mitocondrial subunidade alfa, putativa
Tc00.1047053511277.580	2	9	proteína ligadora de RNA, putativa

Tc00.1047053510609.50	2	8	fator de ligação a receptor nuclear, putativa
Tc00.1047053504797.130	2	7	proteína hipotética, conservada
Tc00.1047053506357.40	2	7	fator de elongação Tu, putativa
Tc00.1047053511277.70	2	6	fator de elongação Tu, putativa

Replicata: foram realizadas no mínimo duas replicatas técnicas, e de cada replicata foram realizadas duas corridas. Contagem total de espectros: o valor observado na tabela é de quantas vezes a proteína foi identificada.

Grânulos de mRNAs foram identificados recentemente em tripanossomatídeos, e algumas proteínas constituintes de *P-bodies* de mamíferos e leveduras foram identificados em tripanossomatídeos, como por exemplo: TcDHH1 (HOLETZ *et al.*, 2007), TcXRNA (CASSOLA *et al.*, 2007), TcPUF6 (DALLAGIOVANNA *et al.*, 2005), entre outras. Através de ensaios de imunoprecipitação seguidos por espectrometria de massas pode-se observar que TcDHH1 demonstrou maior similaridade com grânulos de estresse, como as proteínas de choque térmico e também proteínas da subunidade ribossomal 40S (HOLETZ *et al.*, 2010). Percebemos um perfil semelhante no ensaio de espectrometria de massas do complexo RBSR1-TAP-*tagging* em epimastigotas 3 dias. No caso de epimastigotas sob estresse nutricional, também encontramos poucas proteínas que se associassem a tal função. Portanto, o complexo de proteínas que fazem parte dos grânulos de RNA é muito maior, levando a maiores estudos de RBSR1, para observar se realmente há formação de complexos de RNA, e qual o envolvimento da mesma na regulação da expressão gênica do parasita.

Outra hipótese é que, devido a heterogeneidade do perfil de proteínas parceiras apresentado no ensaio de espectrometria, tanto de epimastigotas 3 dias, quanto sob estresse nutricional, acredita-se que seja devido ao padrão de migração entre núcleo e citoplasma nas diferentes etapas da diferenciação do parasita.

5. CONCLUSÕES

A proteína RBSR1 tem sua expressão regulada ao longo da metaciclo gênese, não sendo expressa em tripomastigota metacíclicos, indicando um papel de regulação durante a diferenciação.

A localização subcelular da proteína em epimastigotas de três dias e em parasitas sob estresse nutricional apresenta um padrão citoplasmático granular; já em epimastigotas de 5 dias e parasitas aderidos de 24 horas, observa-se um padrão nuclear. RBSR1 pode estar envolvida em diferentes funções nas diversas formas do parasita e é evidente sua mobilidade entre o núcleo e o citoplasma.

Em ensaios de imunofluorescência de epimastigotas de 5 dias de cultivo submetidos a estresse nutricional e por arsenito de sódio 2 mM, observou-se que a distribuição da proteína RBSR1 em condições de estresse é alterada, pois em epimastigotas 5 dias a proteína se encontra no núcleo e após o estresse passa a se encontrar no citoplasma com padrão granular, sendo um indício de que a proteína possa estar associada a grânulos de RNA, o que já foi visto em células de mamífero.

Quando se realizou o ensaio de imunofluorescência de epimastigotas 5 dias sob estresse nutricional e por arsenito de sódio 2 mM, com posterior recuperação do parasita, houve retorno da proteína para sua localização original, confirmando o *shuttling* apresentado pela proteína.

Os ensaios de sedimentação em gradiente de sacarose demonstraram que RBSR1 está associada, tanto em epimastigotas três dias, quanto sob estresse nutricional, a complexos ribonucleoproteicos pesados não comprometidos com a tradução.

Experimentos de ribonômica para investigar os mRNAs ligados a RBSR1 na forma epimastigotes em crescimento exponencial (quando a proteína se encontra no citoplasma) mostraram RNAs que codificam para proteínas hipotéticas e ribossomais. Não houve a identificação de enriquecimento dos transcritos para determinada via metabólica, com exceção dos 23% de transcritos que codificam para proteínas ribossomais, indicando que RBSR1 pode ter algum papel na regulação desses mRNAs.

A partir dos ensaios de imunoprecipitação, concluímos que os complexos proteicos associados a RBSR1 não mostraram predominância de um grupo de proteínas, embora entre as mesmas tenhamos observado proteínas que se

associam a grânulos de RNA e dessa forma, acredita-se que, RBSR1, visto seu comportamento sob estresse, pode estar associada a grânulos de RNA. Outra hipótese é que, devido à mobilidade de RBSR1 nas diferentes formas do parasita, as proteínas parceiras a ela não apresentem um perfil predominante.

6. REFERÊNCIAS

ALLEN, T.D.; CRONSHAW, J.M.; BAGLEY, S.; KISELEVA, E.; GOLDBERG, M.W. The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. **J Cell Sci.** v. 113, p. 1651-1659. 2000.

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.

ALVING, C.L.; MATYAS, G.R. Design and selection of vaccine adjuvants: principles and practice. *Vaccines for Poverty-related diseases from bench to field.* p. 99-118. 2005.

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. RNA granules. **J. Cell. Biol.** v.172, n. 6, p. 803-808. 2006

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

ÁVILA, A.R.; YAMADA-OGATTA, S.F.; DA SILVA MONTEIRO, V.; KRIEGER, M.A. NAKAMURA, C.V.; DE SOUZA, W.; GOLDENBERG, S. Cloning and characterization of the metacyclogenin gene, which is specifically, expressed during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 117, n. 2, p. 169-170. 2001.

BAG, J. Protein synthesis post-translation modification and degradation: Feedback inhibitor of poli(A)-binding protein mRNA translation: a possible mechanism of translation arrest by stalled 40S ribosomal subunits. **J Biol Chem.** v. 276, p. 47352-47360. 2001.

BAGGERLY, K.A.; DENG, L.; MORRIS, J.S.; ALDAZ, C.M. Differential expression in SAGE: accounting for normal between-library variation. **Bioinformatics.** v. 19, n. 12, p. 1477-1483. 2003.

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.

BASHKIROV, V.I.; SHERTHAN, H.; SOLINGER, J.A.; BUERSTEDDE, J.; HEYER, W. A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mXRN1p) with preference for G4 tetraplex substrates. **The Journal of Cell Biology.** v. 136, n. 4, p. 761-773. 1997.

BATISTA M. Construção de vetores para caracterização de genes de *Trypanosoma cruzi* em um sistema para clonagem em alta demanda. Dissertação de mestrado. 2008, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

- BAYER, T.S.; BOOTH, L.N.; KNUDSEN, S.M.; ELLINGTON, A.D. Arginine-rich motifs present multiple interfaces for specific binding by RNA. **RNA**. v. 11, p. 1848-1857. 2005.
- BAYLOR, N.W.; EGAN, W.; RICHMAN, P. Aluminum salts in vaccines – US Perspectives. **Vaccine**. v. 20, p. S18-S23. 2002.
- BELTRÃO, H.B. M.; CERRONI, M.P.; FREITAS, D.R.C.; PINTO, A.Y.N.; VALENTE, S.A.; COSTA, S.A.; SOBEL, J. Investigation of two outbreaks of suspected oral transmission of acute Chagas disease in the Amazon region, Pará State, Brazil, in 2009. **Trop. Doct.** v. 39, n. 4, p. 231-232. 2009.
- BEHM-ANSMANT. I.; REHWINKEL, J.; DOERKS, T.; STARK, A.; BORK, P.; IZAURRALDE, E. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. **Genes Dev.** v. 20, p. 1885-1898. 2006.
- 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.
- BURD, C. G.; DREYFUSS, G. Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. **Science**, v. 265, n. 5172, p. 615-621. 1994.
- CÁCERES, J.F.; SCREATON, G.R.; KRAINER, A.R. A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm. **Genes Dev.** v. 12, p.55–66. 1998.
- CAMARGO, E.P. Growth and differentiation in Trypanosoma cruzi. **Rev. Inst. Med. Trop.** v.6, p. 93-100. 1964.
- CARVALHO, P.C.; FISHER, J.S.; XU, T.; COCIORVA, D.; BALBUENA, T.S.; VALENTE, R.H.; PERALES, J.; YATES, J.R. 3rd; BARBOSA, V.C. Search engine processor: Filtering and organizing peptide spectrum matches. **Proteomics**. v. 12, n. 7, p. 944-949. 2012 a.
- CARVALHO, P.C.; FISHER, J.S.; XU, T.; YATES, J.R. 3rd; BARBOSA, V.C. PatternLab: from mass spectra to label-free differential shotgun proteomics. **Curr. Protoc Bioinformatics**. Chapter 13. 2012 b.
- 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.
- CASTELLANI, O.; RIBEIRO, L.V.; FERNANDES, J.F. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. **J. Protozool.** v. 14, n.3, p. 447-451. 1967.
- CHAGAS, C. New human trypanosomiasis. Morphology and life cycle of *Schizotrypanum cruzi*, the cause of a new human disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 1, p. 159-218. 1909.
- CLAYTON, C. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. **EMBO J.** v. 21, n. 8, p. 1881-1888. 2002.
- CLAYTON, C.; SHAPIRA, M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. **Mol Biochem Parasitol.** v. 156, n. 2, p. 93-101. 2007.
- CLÉRY, A.; BLATTER, M.; ALLAIN, F.H. RNA recognition motifs: boring? Not quite. **Curr Opin Struct Biol.** v. 18, n. 3, p. 290-298. 2008.
- CONTRERAS, V. T.; MOREL, C.; GOLDENBERG, S. Stage specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 14, p. 83-96. 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.
- COUGHLIN, B.C.; TEIXEIRA, S.M.; KIRCHHOFF, L.V.; Donelson, J.E. Amastin mRNA abundance in *Trypanosoma cruzi* is controlled by a 3'-untranslated region position-dependent cis-element and an untranslated region-binding protein. **J. Biol. Chem.** v. 275, n.16, p. 12051-12060. 2000.
- 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, M.A. Functional genomic characterization of mRNAs associated with TcPUF6, a pumiliolike protein from *Trypanosoma cruzi*. **J Biol Chem.** v.283, n.13, p. 8266-8273. 2008.
- DE GAUDENZI, 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 GAUDENZI, J.; NOÉ, G.; CAMPO, V.A.; FRASCH, A.C.; CASSOLA, A. Gene expression regulation in trypanosomatids. **Essays Biochem.** v. 51, p. 31-46. 2011.
- 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.
- 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.

D'ORSO, I.; FRASCH, A.C.C. TcUBP-1, an mRNA destabilizing factor from trypanosomes, homodimerizes and interacts with novel AU-rich element- and Poly(A)-binding proteins forming a ribonucleoprotein complex. **J Biol Chem**, v. 277, n.52, p. 50520-50528. 2002.

D'ORSO, I.; DE GAUDENZI, J.G.; FRASCH, A.C. RNA-binding proteins and mRNA turnover in trypanosomes. **Trends Parasitol.** v. 19, p. 151-155. 2003.

DELANEY, K.J.; XU, R.; ZHANG, J.; LI, Q.Q.; YUN, K.; FALCONE, D.L.; HUNT, A.G. Calmodulin interacts with and regulates the RNA-binding activity of an Arabidopsis polyadenylation factor subunit^{1[OH]}. **Plant Physiology**. v. 140, p. 1507-1521. 2006.

DE SOUZA, W. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Int. Rev. Cyt**, v. 86, p. 197-283. 1984.

DE SOUZA, W. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Curr. Pharm. Des.** v. 8, p. 269-285. 2002.

DIAS, J.C.P. Epidemiologia. Em *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas (eds Z. Brener, Z.A. Andrade & M. Barral-Neto), p. 48-74. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000.

DREYFUSS, G.; KIM V.N.; KATAOKA, N. Messenger-RNA binding proteins and the messages they carry. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.** v. 3, p. 195-205. 2002.

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. 2010.

FRAGOSO, S.P.; GOLDENBERG, S. Cloning and characterization of the gene encoding *Trypanosoma cruzi* DNA topoisomerase II. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 55, n. 1-2, p. 127-134. 1992.

FRANKS, T.M.; LYKKE-ANDERSEN, J. The control of mRNA decapping and P-body formation. **Mol Cell**, v. 32, p. 605-615. 2008.

FUTAKI, S.; SUZUKI, T.; OHASHI, W.; YAGAMI, T.; TANAKA, S.; UEDA, K.; SUGIURA, Y. Arginine-rich Peptides: An abundant source of membrane-permeable peptides have potential as carriers for intracellular protein delivery. **J Biol Chem**. v. 276, n. 8, p. 5836-5840. 2001.

GARCIA, E.S.; AZAMBUJA, P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. **Parasitol. Today**. v. 7, p. 240-45. 1991.

GILBERT, W.; GUTHRIE, C. The Glc7p nuclear phosphatase promotes mRNA export by facilitating association of Mex67p with mRNA. **Molecular Cell**. v. 13, p. 201-212. 2004.

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.

GODIN, K. S.; VARANI, G. Point of View: How Arginine-rich domains coordinate mRNA maturation events. **RNA Biology**. v. 4, n. 2, p. 69-75. 2007.

GOLDENBERG, S.; CONTRERAS, V.T.; SALLES, J.M.; FRANCO, M.P.A.L.; BONALDO, M.C.; VALLE, D.; GONÇALVES, A.M.; MOREL, C.M. Perspectives of

vaccination against Chagas Disease through biotechnology. II – Gene expression in *T. cruzi* trypomastigotes and cell-free translation of mRNAs coding for relevant surface antigens. In: **New Approaches to Vaccine Development**. TORRIGIANI, O. (Ed). Schwabe e Co., Basel, Switzerland, p. 442-459. 1984.

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.

GOLDENBERG, S.; CONTRERAS, V.T.; BONALDO, M.C.; SALLES, J.M.; FRANCO, M.P.A.L.; LAFAILLE, J.; GONZALES-PERDOMO, M.; LINSS, J.; MOREL, C.M. *In vitro* differentiation systems for the study of differential gene expression during *Trypanosoma cruzi* development. In: **Molecular Strategies of Parasitic Invasion**. p. 203-212. 1987.

GONZALEZ, M.S.; NOGUEIRA, N.F.; MELLO, C.B.; DE SOUZA W.; SCHAUB, G.A.; AZAMBUJA, P.; GARCIA, E.S. Influence of brain and azadirachtin on *Trypanosoma cruzi* development in the vector, *Rhodnius prolixus*. **Exp. Parasitol.** v. 92, p. 100-108. 1999.

GREENFIELD, E. A. Antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2 edição. 2014.

GROPPO, R.; RICHTER, J.D. Translational control from head to tail. **Curr Opin Cell Biol.** v. 21, n. 3, p. 444-451. 2009.

GUEYDAN, C.; DROOGMANS, L.; CHALON, P.; HUEZ, G.; CAPUT, D.; KRUYSS, V. Identification of TIAR as a protein binding to the translational regulatory AU-rich element of tumor necrosis factor alpha mRNA. **J Biol Chem.** v. 274, n. 4, p. 2322-2326. 1999.

GUSTAFSSON, C.; GOVINDARAJAN, S.; MINSHULL, J. Codon bias and heterologous protein expression. **Trends Biotechnol.** v. 22, p. 346-353, 2004.

HENICS, T.; NAGY, E.; OH, H.J.; CSERMELY, P.; GABAIN, A.; SUBJECK, J.R. Mammalian Hsp70 and Hsp110 proteins bind to RNA motifs involved in mRNA stability. **J Biol Chem.** v. 274, n. 24, p. 17318-17324. 1999.

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.

HOLETZ, F.B. Grânulos de processamento de mRNA em *Trypanosoma cruzi*. Tese de Doutorado. 2008, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro.

HOLETZ, F.B.; ALVES, L.R.; PROBST, C.M.; DALLAGIOVANNA, B.; MARCHINI, F.K.; MANQUE, P.; BUCK, G.; KRIEGER, M.A.; CORREA, A.; GOLDENBERG, S. Protein and mRNA content of TcDHH1 containing mRNPs in *Trypanosoma cruzi*. **The FEBS Journal.** v. 277, p. 3415-3426. 2010.

HU, W.; COLLIER, J. Polysome analysis for determining mRNA and ribosome association in *Saccharomyces cerevisiae*. **Methods Enzymol.** v. 530, p. 193-206. 2013.

HUANG, Y.; YARIO, T.A.; STEITZ, J.A. A molecular link between SR protein dephosphorylation and mRNA export. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 101, p. 9666-9670. 2004.

IKEMURA T. Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes: a proposal for a synonymous codon choice that is optimal for the *E. coli* translational system. **J. Mol. Biol.** v. 151, p. 389-409, 1981.

KAWAKAMI, A.; TIAN, Q.; DUAN, X.; STREULI, M.; SCHLOSSMAN, S.F.; ANDERSON, P. Identification and functional characterization of a TIA-1 related nucleolysin. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 89, n. 18, p. 8681-8685. 1992.

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. **J Cell Biol.** v. 147, p. 1431-1442. 1999.

KEDERSHA, N.L.; STOECKLIN, G.; AYODELE, M.; YACONO, P.; LYKKE-ANDERSEN, J.; FRITZLER, M.J.; SCHEUNER, D.; KAUFMAN, R.J.; GOLAN, D.E.; ANDERSON, P. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. **J Cell Biol.** v. 169, n. 6, p. 871-884. 2005.

KEDERSHA, N.L.; CHO, M.R.; LI, W.; YACONO, P.W.; CHEN, S.; GILKS, N.; GOLAN, D.E.; ANDERSON, P. Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. **J Cell Biol.** v. 151, n. 6, p. 1257-1268. 2000.

KEENE, J.D. Ribonucleoprotein infrastructure regulating the flow of genetic information between the genome and the proteome. **Proc. Natl Acad. Sci USA.** v. 98, p. 7018-7024. 2001.

KOZLOV, G.; GEHRING, K. Molecular basis of eRF3 recognition by the MLLE domain of poly(A)-binding protein. **Plos One.** v. 5, n. 4. 2010.

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.

KROPF, S.P.; AZEVEDO, N.; FERREIRA, L.O. Doença de Chagas: a construção de um fato científico e de um problema de saúde pública no Brasil. In: **Ciênc. Saúde Coletiva.** v. 5, n. 2. p. 347-365. 2000.

LANAR, D.E. Growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi* cultivated with a *Triatoma infestans* embryo cell line. **J. Protozool.** v. 26, n. 3, p. 457-462. 1979.

LANDY, A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. **Annu. Rev. Biochem.** v. 58, p. 913 - 949. 1989.

LARANJA, F.S.; DIAS, E.; NÓBREGA, G.; MIRANDA, A. Chagas' Disease: A Clinical, Epidemiologic, and Pathologic Study. **Circulation.** v. 14, p. 1035-60. 1956.

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.

LENZI, H. L.; OLIVEIRA, D.N.; LIMA, M.T.; GATASS, C.R. *Trypanosoma cruzi*: paninfectivity of CL strain during murine acute infection. **Experimental Parasitology**. v. 84, p. 16-27. 1996.

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

LIANG, X.; HARITAN, A.; ULIEL, S.; MICHAELI, S. Trans and cis *Splicing* in Trypanosomatids: Mechanism, Factors, and Regulation. **Eukaryot. Cell**. v. 2, p. 830-840. 2003.

LITHWICK G, MARGALIT H. Hierarchy of sequence-dependent features associated with prokaryotic translation. **Genome Res**. v. 13, p. 2665-2673, 2003.

LUNDE, B.M.; MOORE, C.; VARANI, G. RNA-binding proteins: modular design for efficient function. **Nat Rev Mol Cell Biol**. v. 8, p. 479-490. 2007.

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.

MCGUFFIN, L.J.; BRYSON, K.; JONES, D.T. The PSIPRED protein structure prediction server. **Bioinformatics**. v. 16, n. 4, p. 404-405. 2000.

MEYER H.; DE SOUZA W. Electron microscopic study of *Trypanosoma cruzi* periplast in tissuecultures. I. Number and arrangement of the peripheral microtubules in the various forms ofthe parasite's life cycle. **J. Protozool**. v. 23, n. 3, p. 385-90. 1976.

MOLLET, S.; COUGOT, N.; WILCZYNSKA, A.; DAUTRI, F.; KRESS, M.; BERTRAND, E. Translationally repressed mRNA transiently cycles through stress granules during stress. **Mol Biol Cell**. v. 19, n. 10, p. 4469-4479. 2008.

MYUNG, K. S.; BEETHAM, J. K.; WILSON, M. E.; DONELSON, J. E. Comparison of the posttranscriptional 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.

O'CONNELL, D.J.; BAUER, M.; LINSE, S.; CAHILL, D.J. Probing calmodulin protein-protein interactions using high-content protein arrays. **Methods Mol Biol**. v. 785, p. 289-303. 2011.

OLSZEWSKA, M; BUJARSKI, J.J.; KURPISZ, M. P-bodies and their functions during mRNA cell cycle: mini-review. **Cell Biochem Funct**. v. 30, n. 3, p. 177-182. 2012.

PALENCHAR, J.B. & BELLOFATTO, V. Gene transcription in trypanosomes. **Mol. Biochem. Parasitol**. v. 146, p. 135–141. 2006.

PARKER, R. & SHETH, U. P bodies and the control of mRNA translation and degradation. **Mol. Cell**. v. 25, p. 635 - 646. 2007.

PATEL, G.P.; BAG, J. IMP1 interacts with poli(A)binding protein (PABP) and the autoregulatory translational control element of PABP-mRNA through the KH III-IV domain. **FEBS J.** v. 273, n. 24, p. 5678-5690. 2006.

PICCHI, G.F.A.; FERREIRA, A.M.T.; SOUZA, F.S.P. LOURENÇO, E.E.; ARAUCO, P.R.C.; LORUSSO, A.; BORDIGNON, J.; KRIEGER, M.A.; GOLDENBERG, S.; FRAGOSO, S.P. Trypanosoma cruzi: identification of DNA targets of the nuclear periphery coiled-coil protein TcNUP-1. **Experimental Parasitology.** v. 127, p. 147-152. 2011.

PUIG, O.; CASPARY, F.; RIGAUT, G.; RUTZ, B.; BOUVERET, E.; BRAGADO-NILSSON, E.; WILM, M.; SÉRAPHIN, B. The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. **Methods.** v. 24, n. 3, p. 218-229. 2001.

REED, R.; CHENG, H. TREX, SR proteins and export of mRNA. **Current Opinion in Cell Biology.** v. 17, p. 269-273. 2005.

RIGAUT, G.; SHEVCHENKO, A.; RUTZ, B.; WILM, M.; MANN, M.; and SÉRAPHIN, B. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. **Nature.** v. 17, p. 1030-1032. 1999.

RONDINELLI, E.; SILVA, R.; CARVALHO, J.F.O.; SOARES, C.M.A.; CARVALHO, E.F.; CASTRO, F.T. *Trypanosoma cruzi*: an *in vitro* cycle of cell differentiation in axenic culture. **Exp. Parasitol.** v. 66, p. 197-204. 1988.

ROSÁRIO, B.C.; PEMBERTON, L.F. Nap1 links transcription elongation, chromatin assembly, and messenger RNP complex biogenesis. **Mol Cell Biol.** v. 28, n. 7, p. 2113-2124. 2008.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory.** 2ndEd. 2001.

SANFORD, J.; BRUZYK, J.P. Regulation of SR protein localization during development. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 98, p. 10184–10189. 2001.

SCANDURRO, A.B.; RONDON, I.J.; WILSON, R.B.; TENENBAUM, S.A.; GARRY, R.F.; BECKMAN, B.S. Interaction of erythropoietin RNA binding protein with erythropoietin RNA requires an association with heat shock protein 70. **Kidney Int.** v. 51, n. 2, p. 579-584. 1997.

SCHMUNIS, G.A. A tripanossomíase americana e seu impacto na saúde pública das Américas. In: *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas: Zigman Brener, Zilton, Andrade; Manoel Barral-Neto. 2 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2000.

SALADINO, P.; LIEGRO, C.M.; PROIA, P.; SALA, A.; SCHIERA, G.; CICERO, A.; LIEGRO, I. RNA-binding activity of the rat calmodulin-binding PEP-19 protein and of the long PEP-19 isoform. **Int J Mol Med.** v. 29, n. 2, p. 141-145. 2012.

SHAPIRO, T.A.; ENGLUND, P.T. The Structure and Replication of Kinetoplast DNA. **Annu. Rev. Microbiol.** v. 49, p. 117-43. 1995.

SHEPARD, P.J.; HERTEL, K.J. Protein Family Review: The SR Protein Family. **Genome Biology.** v. 10, p. 242-242.9. 2009.

SILVA JÚNIOR, J.G. Eletroforese de Proteínas – Guia teórico-prático. p. 19-28. Rio de Janeiro. Editora Interciência. 2001.

SUTTON, R.E. & BOOTHROYD, J.C. Evidence for trans *splicing* in trypanosomes. **Cell**. v. 14, p. 527-535. 1986.

TANOWITZ, H.B.; KIRCHHOFF, L.V.; SIMON, D.; MORRIS, S.A.; WEISS, L.M.; WITTNER, M. Chagas' disease. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 5, n. 4, p. 400-19. 1992.

TAUPIN, J.; TIAN, Q.; KEDERSHA, N.; ROBERTSON, M.; ANDERSON, P. The RNA-binding protein TIAR is translocated from the nucleus to the cytoplasm during Fas-mediated apoptotic cell death. **Proc. Natl Acad. Sci USA**. v. 92, p. 1629-1633. 1995.

TEIXEIRA, A.R.; NASCIMENTO, R.J.; STURM, N.R. Evolution and pathology in Chagas disease – a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 101, n. 5, p. 463-91. 2006.

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.

TEIXEIRA, D.; PARKER, R. Analysis of P-body assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Biol Cell**. v. 18, n. 6, p. 2274-2287. 2007.

TEIXEIRA, D.E.; BENCHIMOL, M.; CREPALDI, P.H.; DE SOUZA, W. Atlas didático: ciclo de vida do trypanosoma cruzi. 1 edição. 2013. (<http://www.open.edu/openlearnworks/course/view.php?id=1292>)

TEIXEIRA S.M.R. & DA ROCHA W.D. Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. **Gen. Mol. Res.** v. 2, n. 1, p. 148-158. 2003.

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.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 76, p. 4350-4354. 1979.

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. 2001.

QUIJADA, L.; SOTO, M.; ALONSO, C.; REQUENA, J.M. Identification of a putative regulatory element in the 3'-untranslated region that controls expression of HSP70 in *Leishmania infantum*. **Mol. Biochem. Parasitol**. v. 110, p. 79–91. 2000.

UNTERHOLZNER, L.; IZAURRALDE, E. SMG7 acts as a molecular link between mRNA surveillance and mRNA decay. **Mol Cell**. v. 16, n. 4, p. 587-596. 2004.

VENTER JC, ADAMS MD, MYERS EW, ET AL. The sequence of the Human genome. **Science**. v. 291, n. 5507, p. 1304-1351. 2001.

WILCZYNSKA, A.; AIQUEPERSE, C.; KRESS, M.; DAUTRY, F.; WEIL, D. The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules. *J Cell Sci.* v. 118, p. 981-992. 2005.

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

YONEDA, Y. Nucleocytoplasmic protein traffic and its significance to cell function. **Genes Cells.** v. 5, n. 10, p. 777-787. 2000.

ZHANG, T.; DELESTIENNE, N.; HUEZ, G.; KRUYSS, V.; GUEYDAN, C. Identification of the sequence determinants mediating the nucleo-cytoplasmic shuttling of TIAR and TIA-1 RNA-binding proteins. *J Cell Sci.* v. 118, p. 5453-5463. 2005.