

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO CARLOS CHAGAS**

**Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia**

**HÁLISSON TESSEROLI MIOT**

**CARACTERIZAÇÃO DE COMPONENTES DA VIA TOR (*TARGET OF  
RAPAMYCIN*) EM *Trypanosoma cruzi***

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

**Orientador(es): Dr Samuel Goldenberg**

**Dra Fabíola Barbieri Holetz**

**CURITIBA/PR**

**2014**

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

M669 Miot, Hálisson Tesseroli

Caracterização de componentes da via TOR (target of rapamycin) em  
*Trypanosoma cruzi* / Hálisson Tesseroli Miot. – Curitiba, 2014.


xv, 191 f.: il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Carlos Chagas, Pós-Graduação  
em Biociências e Biotecnologia, 2014.

Bibliografia: f. 158-184

1. TOR. 2. Rapamicina. 3. FKBP12. 4. *Trypanosoma cruzi*. I. Título.

CDD 616.9363

A decorative flourish in a dark red color, featuring elegant, swirling lines and small circular accents, positioned to the left of the text.

**Aos meus pais, Valdemar e Elizeth, pelo amor, pelos conselhos,  
pela paciência, pelo cuidado e pelas oportunidades na vida.  
O que sou hoje é, e sempre será, reflexo de vocês.**

**“Eu tenho olhos de tigre, lutador  
Danço entre as chamas  
Porque eu sou um campeão  
E você vai me ouvir rugir  
Alto, tão alto quanto um leão  
Porque eu sou um campeão  
E você vai me ouvir rugir”.**



**Katy Perry**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus pela oportunidade de estar aprendendo tanto intelectualmente quanto moralmente na escola da vida.

Aos meus pais que sempre se fizeram presentes na minha vida, contribuindo para a minha educação desde que eu era “pequeninho”.

Gostaria de agradecer também aos meus orientadores, Dr Samuel Goldenberg e Dra Fabíola Barbieri Holetz pela confiança depositada, pelos momentos de desabafo, pelos ensinamentos e acima de tudo pelo meu amadurecimento científico. A partir desse momento vocês são contribuintes do meu aperfeiçoamento profissional.

Ao Dr Lauro Manhães por ter me orientado logo quando entrei no ICC e também por ter acreditado no meu potencial para seguir em frente com esse projeto tão fascinante.

Ao Dr Stenio Perdigão Fragoso por ter participado ativamente da minha formação e por ter sempre aquele “tempinho” em ouvir minhas dúvidas.

Ao Dr Fabrício Marchini pela troca de idéias e análises envolvendo o mundo da proteômica. Gostaria de agradecer também a ajuda envolvendo os experimentos de manuseio de animais.

Ao Dr Nilson Zanchin pelas conversas, idéias e ajuda nos experimentos envolvendo os cromatógrafos.

Ao Dr Bruno Dallagiovana Muñoz e à Dra Ana Luiza Pamplona Mosimann pelo acompanhamento docente durante esses dois anos de trabalho.

Ao Dr Maurílio Soares pelo auxílio e ensino das técnicas de microscopia.

A todos do Laboratório de Regulação da Expressão Gênica: Amanda, Andrea, Augusto, Bruno, Bruno (B2), Eliza, Elô, Gabi, Haruo, Ize, Jimena, Ju, Lys, Malu, Pá, Pri, Rodrigo, Saloê e Shá pela amizade. Em especial às minhas amigas Camyla, Mari Serpeloni e Sheila pelo companheirismo incondicional e por sempre estarem à postos em ajudar nos momentos mais difíceis, principalmente nos que eu não conseguia dizer “bom dia”.

Um agradecimento especial à minhas duas amigas Fer Mansur e Mari Ferrarini, que mesmo da “terra do Tio Sam” ou da “terra da baguete” torceram, incentivaram e acreditaram no meu trabalho.

A todos do Lab2 (Laboratório de Biologia Molecular de Tripanossomatídeos): Cláudia, Flavinha, Fernando, Gisele, Mônica e Didi pela amizade e ajuda.

Ao todos do Laboratório de Biologia Básica de Células-tronco, Laboratório de Genômica Funcional, Laboratório de Biologia Celular e Laboratório de Proteômica e Engenharia de Proteínas pela amizade e ajuda, em especial ao Felipe pelo suporte na bioinformática.

Ao pessoal do Lab3 (Laboratório de Virologia Molecular), em especial ao Giovanni e Daisy pela amizade e ajuda.

À equipe técnica do ICC: Nilson, Tânia, Silvio, Sibeles, Vanessa e Hellen por tornar o meu trabalho muito mais fácil diversas vezes.

À equipe administrativa, em especial à Cris, pela amizade e ajuda.

À Pós-Graduação em Biociência e Biotecnologia do ICC pelo excelente trabalho, ajuda e apoio nos assuntos acadêmicos.

Ao CNPq, CAPES e FIOCRUZ pelo auxílio financeiro.

Aos meus amigos, Si, Jana, Franklin, Alex, Gui, San, Rô, Carol Bugay, Dani Buosi, Sônia que muitas vezes, mesmo que virtualmente, torceram e me apoiaram em cada conquista da minha vida.

Em especial ao Maycon pelo companheirismo e apoio nas horas difíceis e principalmente pela alegria de todos esses anos.

A todos o meu, MUITO OBRIGADO!

## RESUMO

Uma das vias de sinalização mais estudada nos últimos anos, é a via TOR (*target of rapamycin*), um importante sensor nutricional presente em eucariotos. O efeito da rapamicina é dependente de sua interação com a proteína FKBP12 que por sua vez, interage com a proteína TOR, impedindo o acesso da mesma aos seus substratos. Por meio de identificação *in silico* demonstramos a existência dos genes TOR1, TOR2, TOR-like1, TOR-like2, Raptor, AVO3, Raptor-like e FKBP12 em *Trypanosoma cruzi*. O tratamento das formas epimastigotas com rapamicina induziu expressiva alteração morfológica e redução da proliferação celular, corroborando a presença desta via no parasita. Os genes foram clonados, as proteínas foram expressas, purificadas e inoculadas em camundongos e coelhos para obtenção de anticorpos. Apenas o anticorpo para a proteína FKBP12 apresentou alta especificidade e foi demonstrado através de ensaio de imunofluorescência indireta que esta proteína localiza-se no núcleo, e confirmado através de *western blot* com extrato da fração nuclear do parasita. Através de ensaios de imunoprecipitação em parasitas não-tratados, tratados com rapamicina e parasitas submetidos a estresse nutricional e posterior análise por espectrometria de massas, identificamos os complexos proteicos que se associam com a proteína FKBP12. Proteínas como Hsp90, H2A, proteínas ribossomais e de ligação à RNA foram identificadas, demonstrando que a proteína FKBP12 está envolvida na biogênese de ribossomos, modificação da estrutura da cromatina e transporte de mRNA. Foi visto ainda que o processo de tradução parece estar sendo afetado após o tratamento com 5 µg/mL de rapamicina, pois houve uma redução de proteínas envolvidas com esse evento identificadas no experimento de imunoprecipitação. Foi realizado o *knock-out* de um alelo do gene da proteína FKBP12 e a sua confirmação ainda será realizada. O fracionamento dos extratos proteicos de parasitas em gradiente de sacarose mostraram a mobilização da proteína ribossomal S6 da fração polissomal para as frações leves, quando os parasitas foram tratados com rapamicina e submetidos a estresse nutricional. Este resultado sugere que nestas condições, a via TOR esteja inibida, e a proteína ribossomal S6, um dos alvos desta via, não está fosforilada, conseqüentemente, afetando o processo de tradução celular.

## ABSTRACT

One of the most signaling pathways studied in recent years, is TOR pathway (Target Of Rapamycin), an important nutritional sensor present in eukaryotes. The effect of rapamycin is dependent on its interaction with FKBP12 protein which in turn, interacts with the TOR protein, preventing the access to its substrates. Through *in silico* identification demonstrate the existence of TOR1, TOR2, TOR-like1, TOR-like2, Raptor, AVO3, Raptor-like and FKBP12 in *Trypanosoma cruzi* genes. Preliminary data showed that the treatment of epimastigotas forms with rapamycin induced morphological changes and reduction of cell proliferation, reinforcing the presence of this pathway in the parasite. These genes were cloned, the proteins were expressed, purified, and inoculated in mice to produce antibodies. Only the antibody to FKBP12 protein showed high specificity and was demonstrated by indirect immunofluorescence assay that this protein is located in the nucleus, and confirmed by *western blot* with nuclear extract fraction of the parasite. Through immunoprecipitation assays in untreated parasites, parasites treated with rapamycin and subjected to nutritional stress and subsequent analysis by mass spectrometry, we identified the protein complexes that associate with FKBP12 protein. Proteins like Hsp90, H2A, ribosomal proteins and RNA binding were identified, thus demonstrating that the FKBP12 protein is involved in ribosome biogenesis, modification of chromatin structure and mRNA transport. It was also seen that the process of translation seems to be affected after treatment with 5 mg/mL rapamycin, because there was a reduction of proteins involved with this event identified in immunoprecipitation experiments. The *knock-out* was conducted of an allele of the FKBP12 protein gene and its confirmation will still be held. The fractionation of protein extracts of parasites sucrose gradient showed the mobilization of ribosomal protein S6 polysomal fraction to light fractions, where the parasites were treated with rapamycin and subjected to nutritional stress. This result suggests that under these conditions the TOR pathway is inhibited, and the ribosomal protein S6, one of the targets of this pathway is not phosphorylated, thus affecting the process of cell translation.



## LISTA DE FIGURAS

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Figura 01 | Formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....   | 03 |
| Figura 02 | Esquema do ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....  | 05 |
| Figura 03 | Mecanismo de <i>trans-splicing</i> .....  | 13 |
| Figura 04 | Cascata de sinalização dependente das quinases da via TOR ....  | 15 |
| Figura 05 | Alvos de fosforilação das quinases da via TOR .....   | 17 |
| Figura 06 | Complexos TOR1 e TOR2 presentes em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....  | 19 |
| Figura 07 | Complexos TOR1 e TOR2 presentes em mamíferos .....  | 21 |
| Figura 08 | Mecanismo de ligação FKBP12-rapamicina .....  | 23 |
| Figura 09 | Efeito da Rapamicina na proliferação e sobrevivência de epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> cultivados em meio LIT suplementado com diferentes concentrações de SFB ..... | 30 |
| Figura 10 | Efeito da rapamicina sobre a metaciclogênese do <i>T. cruzi</i> .....   | 31 |
| Figura 11 | Recombinações entre os vetores da plataforma Gateway®.....  | 46 |
| Figura 12 | Desenho esquemático dos vetores de destino da plataforma Gateway® disponíveis no Instituto Carlos Chagas .....  | 47 |
| Figura 13 | Mapa do vetor de entrada pDONR™221 .....  | 48 |
| Figura 14 | Mapa do vetor pDEST™17 e pDEST™15 de expressão de genes em bactérias e do vetor pTcFLAG de transfecção e expressão de proteínas em <i>T. cruzi</i> .....                        | 50 |
| Figura 15 | Mapa do vetor pGEM®-TEasy utilizado nas clonagens .....   | 57 |
| Figura 16 | Vetores utilizados para o nocaute do gene FKBP12 de <i>T. cruzi</i> ...   | 69 |
| Figura 17 | Ilustração da construção do gene de resistência flanqueado pelas regiões intergênicas .....   | 72 |
| Figura 18 | Amplificação dos genes e expressão das proteínas envolvidas na via TOR de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....  | 78 |
| Figura 19 | <i>Western blot</i> das proteínas Raptor, Raptor-like, AVO3 e TOR1 de <i>T. cruzi</i> .....   | 80 |
| Figura 20 | <i>Western blot</i> da proteína FKBP12 de <i>T. cruzi</i> .....   | 80 |
| Figura 21 | <i>Western blot</i> e imunolocalização da proteína TOR1:FLAG .....  | 82 |
| Figura 22 | Caracterização da proteína FKBP12 de <i>T. cruzi</i> .....  | 83 |

|           |  |     |
|-----------|--|-----|
| Figura 23 | Imunolocalização da proteína FKBP12 de <i>T. cruzi</i> .....   | 84  |
| Figura 24 | Imunolocalização da proteína FKBP12 em parasitas tratados com rapamicina .....   | 85  |
| Figura 25 | Purificação do complexo contendo a proteína FKBP12 de <i>T. cruzi</i> através de cromatografia de gel filtração .....  | 87  |
| Figura 26 | Purificação do complexo contendo a proteína FKBP12 de <i>T. cruzi</i> através de cromatografia .....   | 88  |
| Figura 27 | Imunoprecipitação da proteína FKBP12 de <i>T. cruzi</i> .....  | 90  |
| Figura 28 | Domínios conservados encontrados na proteína TPR de <i>T. cruzi</i> .  | 106 |
| Figura 29 | Rede de interação da proteína <u>Tb927.2.5150</u> .....  | 107 |
| Figura 30 | Rede de interação da proteína <u>Tb11.1380</u> .....   | 108 |
| Figura 31 | Rede de interação da proteína <u>Tb09.v1.0350</u> .....  | 109 |
| Figura 32 | Rede de interação da proteína <u>XP_001189793</u> .....  | 110 |
| Figura 33 | Eventos nucleares envolvendo a família das FKBP's .....  | 111 |
| Figura 34 | Rede de interação da proteína <u>Tb927.6.4950</u> .....  | 113 |
| Figura 35 | Rede de interação da proteína <u>Tb11.02.3990</u> .....  | 114 |
| Figura 36 | Domínios conservados encontrados na proteína Histona H2A de <i>T. cruzi</i> .....  | 116 |
| Figura 37 | Rede de interação da proteína <u>Tb927.7.6360</u> .....  | 117 |
| Figura 38 | Rede de interação da proteína <u>Tb11.02.4300</u> .....  | 118 |
| Figura 39 | Rede de interação da proteína <u>LinJ20.0980</u> .....   | 119 |
| Figura 40 | Domínios conservados encontrados na proteína Pumilio de <i>T. cruzi</i> .....  | 122 |
| Figura 41 | Rede de interação da proteína <u>Tb10.26.0140</u> .....  | 123 |
| Figura 42 | Rede de interação da proteína <u>Tb927.7.280</u> .....   | 123 |
| Figura 43 | Rede de interação da proteína <u>Tb927.4.410</u> .....   | 125 |
| Figura 44 | Classificação de acordo com o processo biológico das proteínas identificadas na imunoprecipitação de epimastigotas em fase logarítmica de crescimento cultivados em meio LIT ..... | 126 |
| Figura 45 | Classificação de acordo com o processo biológico das proteínas identificadas na imunoprecipitação de epimastigotas cultivados em meio LIT sem SFB .....                            | 127 |

|           |   |     |
|-----------|---|-----|
| Figura 46 | Classificação de acordo com o processo biológico das proteínas identificadas na imunoprecipitação de epimastigotas sob estresse nutricional de 2h .....   | 127 |
| Figura 47 | Classificação de acordo com o processo biológico das proteínas identificadas na imunoprecipitação de epimastigotas cultivados em meio LIT sem SFB e sob tratamento com rapamicina (5 µg/mL por 2h) .....  | 128 |
| Figura 48 | Classificação de acordo com o processo biológico das proteínas identificadas na imunoprecipitação de epimastigotas cultivados em meio LIT sem SFB e sob tratamento com rapamicina (5 µg/mL por 24h) ..... | 128 |
| Figura 49 | Classificação de acordo com a função molecular das proteínas identificadas na imunoprecipitação de epimastigotas em fase logarítmica de crescimento cultivados em meio LIT .....                          | 129 |
| Figura 50 | Classificação de acordo com a função molecular das proteínas identificadas na imunoprecipitação de epimastigotas cultivados em meio LIT sem SFB.....  | 130 |
| Figura 51 | Classificação de acordo com a função molecular das proteínas identificadas na imunoprecipitação de epimastigotas sob estresse nutricional de 2h .....   | 130 |
| Figura 52 | Classificação de acordo com a função molecular das proteínas identificadas na imunoprecipitação de epimastigotas cultivados em meio LIT sem SFB e sob tratamento com rapamicina (5 µg/mL por 2 h) .....   | 131 |
| Figura 53 | Classificação de acordo com a função molecular das proteínas identificadas na imunoprecipitação de epimastigotas cultivados em meio LIT sem SFB e sob tratamento com rapamicina (10 µg/mL por 2 h) .....  | 131 |
| Figura 54 | Caracterização da proteína FKBP12:FLAG em <i>T. cruzi</i> .....   | 133 |
| Figura 55 | Expressão, purificação e ensaio de <i>pull down</i> da proteína FKBP12 de <i>T. cruzi</i> .....   | 135 |
| Figura 56 | Ensaio de <i>Southern blot</i> para verificar o número de cópias do gene de FKBP12 de <i>T. cruzi</i> .....   | 137 |
| Figura 57 | Caracterização da proteína rpS6 de <i>T. cruzi</i> .....  | 140 |

|           |   |     |
|-----------|---|-----|
| Figura 58 | Perfil de sedimentação da proteína rpS6 de epimastigotas em fase logarítmica de crescimento, tratadas com cicloheximida ..... | 141 |
| Figura 59 | Perfil de sedimentação da proteína rpS6 de epimastigotas em fase logarítmica de crescimento, tratadas com puromicina .....    | 142 |
| Figura 60 | Perfil de sedimentação da proteína rpS6 .....   | 144 |

## LISTA DE QUADROS

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Quadro 01 | Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores para cada gene selecionado bem como o tamanho esperado do amplicon (bp) .....   | 42 |
| Quadro 02 | Concentrações dos reagentes utilizados nas reações de PCR .....   | 43 |
| Quadro 03 | Temperaturas ideais de anelamento para amplificação dos genes por PCR .....   | 43 |
| Quadro 04 | Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores para cada gene selecionado bem como o tamanho esperado do amplicon (bp) .....   | 55 |
| Quadro 05 | Oligonucleotídeos iniciadores utilizados .....  | 70 |
| Quadro 06 | Genes de <i>T. cruzi</i> ortólogos aos genes de <i>T. brucei</i> descritos como componentes da via TOR com algumas de suas características .....  | 75 |
| Quadro 07 | Porcentagem de identidade de proteínas da via TOR de <i>T. cruzi</i> com seus ortólogos de diversos organismos .....  | 76 |
| Quadro 08 | Lista de proteínas associadas à FKBP12, de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> cultivadas em meio LIT, obtidas por imunoprecipitação .....  | 91 |
| Quadro 09 | Lista de proteínas associadas à FKBP12, de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> cultivadas em meio LIT sem SFB, obtidas por imunoprecipitação .....  | 93 |
| Quadro 10 | Lista de proteínas associadas à FKBP12 de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> cultivadas em meio LIT sem SFB e tratadas com rapamicina (5,0 µg/mL por 2 h) obtidas por imunoprecipitação .....  | 95 |
| Quadro 11 | Lista de proteínas associadas à FKBP12 de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> cultivadas em meio LIT sem SFB e tratadas com rapamicina (5,0 µg/mL por 24 h) obtidas por imunoprecipitação ..... | 97 |

|           |  |     |
|-----------|--|-----|
| Quadro 12 | Lista de proteínas associadas à FKBP12 de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> cultivadas em meio LIT sem SFB e tratadas com rapamicina (10,0 µg/mL por 2 h) obtidas por imunoprecipitação .....                | 98  |
| Quadro 13 | Lista de proteínas associadas à FKBP12 de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> cultivadas em meio LIT sem SFB e tratadas com rapamicina (10,0 µg/mL por 24 h) obtidas por imunoprecipitação .....               | 100 |
| Quadro 14 | Lista de proteínas associadas à FKBP12 de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> sob estresse nutricional de 2 h, obtidas por imunoprecipitação .....   | 102 |
| Quadro 15 | Lista de proteínas específicas associadas à FKBP12, de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> cultivadas em meio LIT, obtidas por imunoprecipitação .....   | 104 |
| Quadro 16 | Lista de proteínas específicas associadas à FKBP12, de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> cultivadas em meio LIT sem SFB, obtidas por imunoprecipitação .....   | 112 |
| Quadro 17 | Lista de proteínas específicas associadas à FKBP12, de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> cultivadas em meio LIT sem SFB e tratadas com rapamicina (10,0 µg/mL por 24 h), obtidas por imunoprecipitação ..... | 115 |
| Quadro 18 | Lista de proteínas específicas associadas à FKBP12, de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> sob estresse nutricional por 2 h, obtidas por imunoprecipitação .....   | 120 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

BCIP – 5-bromo 4-cloro 3-indolil fosfato  
BLASTP – *Basic Local Alignment Search Tool Program*  
BSA – Albumina sérica bovina  
DAPI – 4'-6-diamidino-2-fenilindol  
Dm – *Didelphis marsupialis*  
DNA – Ácido desoxirribonucléico  
dNTP – Desoxirribonucleotídeo  
D.O. – Densidade Óptica  
EDTA – Ácido etileno-diamino-tetracético  
G418 – Antibiótico aminoglicosídeo relacionado à gentamicina  
HEPES – Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2'-etanossulfônico  
ICC – Instituto Carlos Chagas  
IPTG – Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo  
kDa – kilo-Dalton  
LB – Meio Luria-Bertani  
LIT – Meio Infusão de fígado e triptose (*Liver Infusion Tryptose*)  
LRR – *Leucine Rich Repeat*  
mRNA – RNA mensageiro  
mRNP – Complexo ribonucleoprotéico  
NBT – Nitroazul de tetrazólio  
PBS – Solução salina tamponada com fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)  
PCR – Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)  
PFA – Paraformaldeído  
PMSF – Fluoreto de fenil metil sulfonil  
RBP – Proteínas de ligação a RNA (*RNA binding proteins*)  
RNA – Ácido ribonucléico  
rRNA – RNA Ribossomal  
SDS – Dodecil sulfato de sódio  
SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS  
SFB – Soro fetal bovino  
TAU – Meio Urina artificial de Triatomíneo (*Triatomine Artificial Urine*)  
TBE – Tampão Tris-Borato-EDTA

TRIS – Tris-hidroximetil aminometano

TOR – *Target of rapamycin*

TORC – *Target of rapamycin complex*

tRNA – RNA transportador

Tween 20 – Monolaurato de polioxietileno (20) sorbitana

UTR – Região não traduzida (*Untranslated region*)

X-Gal – 5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -D-galactopiranosídeo



## LISTA DE SÍMBOLOS

°C - Grau Celsius  
% - Porcentagem  
cm - centímetro  
μF - MicroFaraday  
μg - Micrograma  
μL - Microlitro  
μM - Micromolar  
g - Grama (unidade de medida de massa)  
*g* - Aceleração de gravidade  
h - hora  
kDa - QuiloDalton  
L - litro  
M - Molar  
mg - Miligrama  
mL - Mililitro  
mM - Milimolar  
ng - Nanograma  
nm - Nanômetro  
bp - Pares de bases  
pH - Potencial hidrogeniônico  
U - Unidade  
V-Volt

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 1  |
| 1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> .....   | 1  |
| 1.1.1 HISTÓRIA E TAXONOMIA.....  | 1  |
| 1.1.2 CICLO DE VIDA DO <i>Trypanosoma cruzi</i> .....                            | 2  |
| 1.1.3 A METACICLOGÊNESE .....  | 5  |
| 1.2 EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS .....                                 | 7  |
| 1.2.1 ORGANIZAÇÃO GENÔMICA .....   | 7  |
| 1.2.2 TRANSCRIÇÃO, EXPRESSÃO E REGULAÇÃO GÊNICA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS .....      | 11 |
| 1.3 SENSORES NUTRICIONAIS E A VIA TOR.....                                       | 14 |
| 1.3.1 COMPONENTES DA VIA TOR .....   | 18 |
| 1.4 ENVOLVIMENTO DE TOR EM EVENTOS CELULARES.....                                | 23 |
| 1.5 A VIA TOR NO <i>Trypanosoma cruzi</i> .....                                  | 27 |
| 2. OBJETIVOS .....   | 32 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL.....  | 32 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 32 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS .....  | 33 |
| 3.1 PROCEDÊNCIA DOS REAGENTES E MATERIAIS.....                                   | 33 |
| 3.2 SOLUÇÕES E TAMPÕES.....  | 34 |
| 3.3 MEIOS DE CULTIVO .....   | 36 |
| 3.4 ORGANISMOS MODELO .....  | 36 |
| 3.4.1 <i>Escherichia coli</i> .....  | 36 |
| 3.4.2 <i>Trypanosoma cruzi</i> .....   | 36 |
| 3.5 CULTIVO DE <i>T. cruzi</i> .....   | 37 |
| 3.5.1 EPIMASTIGOTAS EM FASE LOGARÍTMICA DE CRESCIMENTO..                         | 37 |
| 3.5.2 EPIMASTIGOTAS SOB ESTRESSE NUTRICIONAL .....                               | 37 |
| 3.5.3 DIFERENCIAÇÃO EM TRIPOMASTIGOTAS METACÍCLICOS.....                         | 38 |
| 3.6 OBTENÇÃO DE DNA DE <i>Trypanosoma cruzi</i> .....                            | 38 |
| 3.7 OBTENÇÃO DE EXTRATO PROTÉICO DE <i>Trypanosoma cruzi</i> .....               | 39 |
| 3.8 TRANSFEÇÃO DE <i>T. cruzi</i> POR ELETROPORAÇÃO E SELEÇÃO DE PARASITAS ..... | 39 |
| 3.9 PREPARAÇÃO DE BACTÉRIAS CÁLCIO-COMPETENTES.....                              | 40 |

|   |    |
|---|----|
| 3.10 TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS CÁLCIO-COMPETENTES.....   | 40 |
| 3.11 PCR DE COLÔNIA.....  | 41 |
| 3.12 CLONAGEM E EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM SISTEMA HETERÓLOGO .....  | 41 |
| 3.12.1 DESENHO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES .....   | 41 |
| 3.12.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....  | 42 |
| 3.12.3 ELETROFORESE DE DNA.....   | 44 |
| 3.12.4 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR .....  | 44 |
| 3.12.5 PLATAFORMA GATEWAY® DE CLONAGEM .....  | 44 |
| 3.12.6 OBTENÇÃO DE CLONES EM VETOR DE ENTRADA .....   | 47 |
| 3.12.7 OBTENÇÃO DOS CLONES EM VETOR DE DESTINO .....  | 48 |
| 3.12.8 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES .....   | 51 |
| 3.12.9 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES SOLÚVEIS .....  | 52 |
| 3.13 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS.....   | 54 |
| 3.13.1 SDS-PAGE.....  | 54 |
| 3.13.2 COLORAÇÃO POR PRATA.....   | 54 |
| 3.14 CLONAGEM DOS GENES DE INTERESSE PARA INTEGRAÇÃO NO GENOMA OU NA FORMA EPISSOMAL VISANDO A EXPRESSÃO DE PROTEÍNA FUSIONADA A FLAG C-TERMINAL EM <i>T. cruzi</i> ..... | 54 |
| 3.15 ENSAIOS IMUNOLÓGICOS .....   | 58 |
| 3.15.1 OBTENÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ATRAVÉS DE INOCULAÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE EM COELHOS E CAMUNDONGOS .....   | 58 |
| 3.15.2 PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS POLICLONAIS .....   | 59 |
| 3.15.3 ENSAIO DE <i>WESTERN BLOT</i> (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979).....   | 59 |
| 3.15.4 ENSAIO DE <i>WESTERN BLOT</i> COM REVELAÇÃO POR FOSFATASE ALCALINA.....  | 59 |
| 3.15.5 ENSAIO DE <i>WESTERN BLOT</i> COM REVELAÇÃO POR PEROXIDASE (QUIMIOLUMINESCÊNCIA) .....   | 60 |
| 3.15.6 IMUNOLocalização celular por MICROSCOPIA ÓTICA DE FLUORESCÊNCIA E CONFOCAL.....  | 60 |

|  |     |
|--|-----|
| 3.15.7 ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO .....  | 62  |
| 3.16 <i>PULL DOWN</i> DOS COMPLEXOS PROTÉICOS CONTENDO A<br>PROTEÍNA FKBP12.....   | 66  |
| 3.17 CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRAÇÃO E TROCA IÔNICA .....   | 67  |
| 3.18 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE PROTEÍNAS POR<br>ABORDAGENS DE GENÉTICA REVERSA.....  | 68  |
| 3.18.1 NOCAUTE GÊNICO EM <i>T. cruzi</i> .....   | 68  |
| 3.18.2 CLONAGEM DE REGIÃO <i>UPSTREAM</i> do gene FKBP12.....  | 70  |
| 3.18.3 CLONAGEM DE REGIÃO <i>DOWNSTREAM</i> do gene FKBP12.....  | 71  |
| 3.19 ENSAIOS DE SEDIMENTAÇÃO EM GRADIENTE DE SACAROSE ....   | 73  |
| 4. RESULTADOS .....  | 75  |
| 4.1 IDENTIFICAÇÃO, CLONAGEM E EXPRESSÃO DE GENES SEJAM<br>RELACIONADOS À VIA TOR EM <i>Trypanosoma cruzi</i> .....   | 75  |
| 4.2 OBTENÇÃO DOS ANTICORPOS POLICLONAIS PARA AS PROTEÍNAS<br>DA VIA TOR.....   | 79  |
| 4.3 CONSTRUÇÃO DE VETORES PARA INTEGRAÇÃO DE UMA<br>ETIQUETA NA PORÇÃO C-TERMINAL DE PROTEÍNAS DE INTERESSE,<br>NO CONTEXTO GENÔMICO DO <i>T. cruzi</i> .....      | 80  |
| 4.4 CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA FKBP12 DURANTE O CICLO DE<br>VIDA DO <i>T. cruzi</i> .....  | 82  |
| 4.5 LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DA PROTEÍNA FKBP12 DURANTE O<br>CICLO DE VIDA DO <i>T. cruzi</i> EM PARASITAS CULTIVADOS NA PRESENÇA<br>OU AUSÊNCIA DE RAPAMICINA ..... | 83  |
| 4.6 ISOLAMENTO DO COMPLEXO PROTEICO NATIVO CONTENDO A<br>PROTEÍNA FKBP12 DE <i>T. cruzi</i> POR CROMATOGRAFIA.....   | 86  |
| 4.7 CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS À FKBP12 DE <i>T.</i><br><i>cruzi</i> POR ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO.....   | 89  |
| 4.8 CONSTRUÇÃO DE VETORES PARA EXPRESSÃO EPISSOMAL DA<br>PROTEÍNA FKBP12 DE <i>T. cruzi</i> FUSIONADA À ETIQUETA FLAG C-<br>TERMINAL .....                         | 132 |
| 4.9 <i>PULL DOWN</i> .....   | 134 |
| 4.10 CONSTRUÇÃO DE VETORES PARA NOCAUTE GÊNICO DA<br>PROTEÍNA FKBP12 DE <i>T. cruzi</i> .....  | 135 |
| 4.11 ENSAIOS DE SEDIMENTAÇÃO EM GRADIENTE DE SACAROSE ..   | 137 |

|                                     |     |
|-------------------------------------|-----|
| 5. DISCUSSÃO .....                  | 145 |
| 6. CONCLUSÕES .....                 | 155 |
| 7. PERSPECTIVAS .....               | 157 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... | 158 |
| ANEXOS .....                        | 185 |

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 *Trypanosoma cruzi*

### 1.1.1 HISTÓRIA E TAXONOMIA

A Doença de Chagas foi descrita pela primeira vez em 1909 pelo cientista brasileiro Carlos Chagas (CHAGAS, 1909), enviado por Oswaldo Cruz à frente de construção da ala mineira da Estrada de Ferro Central do Brasil em Lassance (MG), para estudar uma doença que acometia os trabalhadores da região. A partir desse momento, de maneira notável, ele descreveu o parasita causador da doença, os vetores (insetos hematófagos comumente conhecidos como “barbeiro”), o ciclo de vida do parasita e vários aspectos epidemiológicos, clínicos e sociais da doença.

Essa enfermidade tornou-se um dos principais problemas de saúde pública em certas regiões do Brasil e da América Latina, despertando a comunidade científica para seu estudo e combate. Centros de pesquisa e universidades brasileiras começaram então o seu estudo, sendo o Instituto Oswaldo Cruz (RJ) o pioneiro.

Apesar das pesquisas já durarem mais de um século, com importantes avanços no conhecimento da doença, ainda não existe uma vacina ou um tratamento eficaz para a fase crônica da doença (WHO, 2010) e os métodos de diagnóstico ainda não chegaram ao nível de precisão, custo e acessibilidade desejáveis. Além disso, este organismo apresenta características peculiares quando comparados a outros eucariotos o que os torna um ótimo modelo de estudo de questões biológicas básicas.

Na classificação taxonômica, o *Trypanosoma cruzi* pertence ao reino Protozoa e ordem Kinetoplastida. Essa ordem apresenta como características a presença de uma estrutura proeminente, conhecida como cinetoplasto que corresponde a uma condensação de DNA localizado no interior de uma mitocôndria única e ramificada por todo o corpo do parasita (TEIXEIRA *et al.*, 2011) e ainda a presença de glicossomas, organelas parecidas com peroxissomos onde estão compartimentalizadas várias vias metabólicas, tais como a maior parte das enzimas da via glicolítica (revisito por MICHELS *et al.*, 2006). A família Trypanosomatidae contém diversos gêneros, dentre eles se

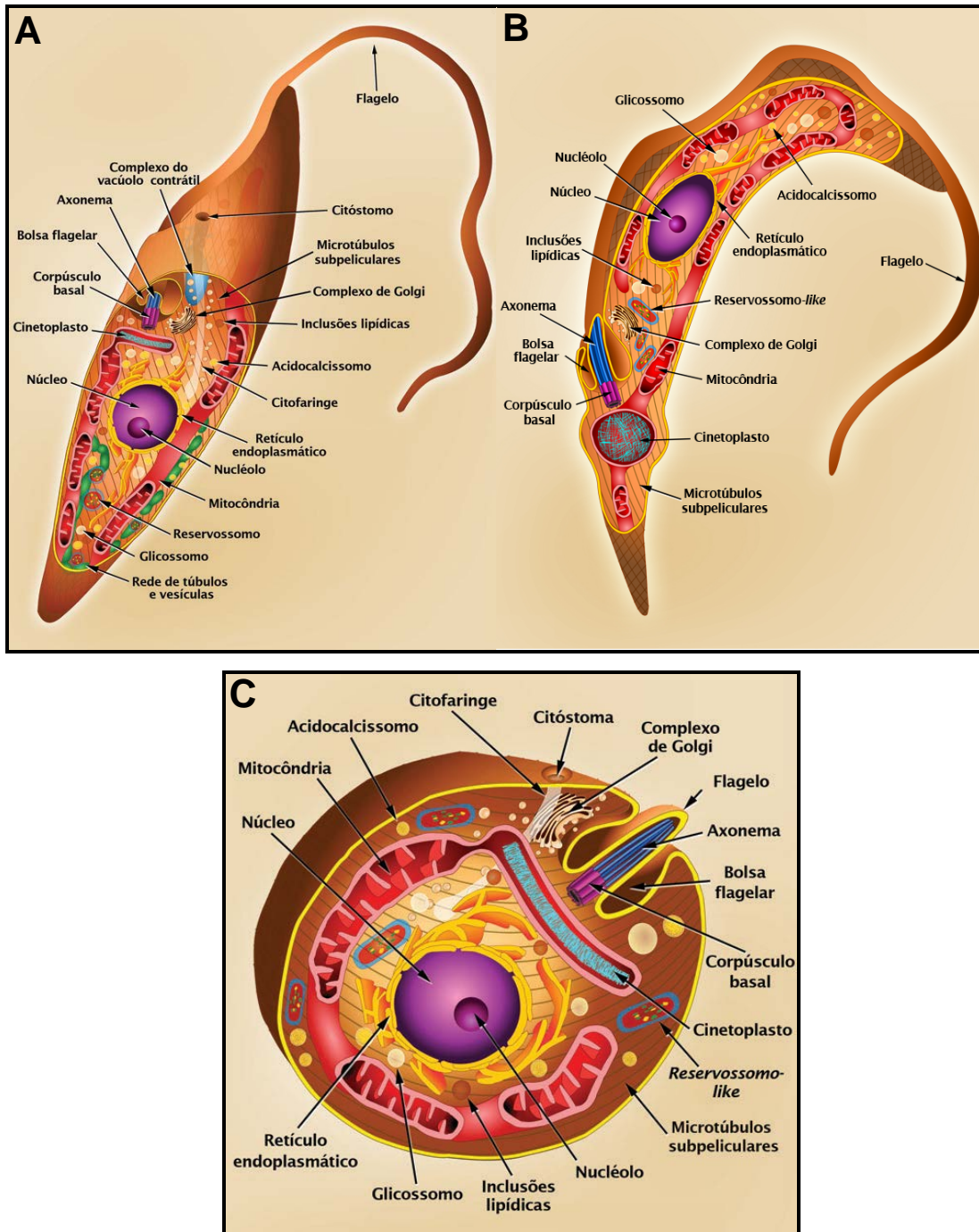
destacam os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*) gênero *Trypanosoma* inclui além do *Trypanosoma cruzi* outros protozoários de importância médica como o *Trypanosoma brucei rhodesiense* e o *Trypanosoma brucei gambiense*, causadores, no homem, da doença do sono e presentes na África Oriental e Ocidental, respectivamente (DUMAS, 2000).

### 1.1.2 CICLO DE VIDA DO *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* apresenta um ciclo de vida complexo, envolvendo hospedeiros mamíferos e insetos da ordem Hemiptera, família Reduviidae. Como os ambientes em que o *T. cruzi* se desenvolve são distintos em suas características físico-químicas, este desenvolveu estratégias ao longo da evolução que o permitiram lidar com essas diferenças. Muitas características do parasita como morfologia, ciclos metabólicos, expressão diferenciada de moléculas internas e de superfície, capacidade de infecção, de multiplicação, entre outras, devem ser reprogramadas a cada novo ambiente. Com base nestas mudanças, o *T. cruzi* apresenta em seu ciclo de vida três estágios de vida bem caracterizados: epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas. Estas formas evolutivas podem ser visualizadas na Figura 01. Há ainda as formas variantes, mais facilmente observadas durante a transição entre os estágios evolutivos e ainda pouco estudadas.

Conforme já mencionado, os estágios evolutivos diferenciam-se entre si de acordo com diversos critérios e o mais utilizado e de maior facilidade de percepção ao microscópio é o morfoestrutural. Com base na forma e na distribuição do cinetoplasto em relação ao núcleo, pode-se designar o parasita observado a um dos três estágios mencionados: epimastigotas, medindo entre 20 e 40  $\mu\text{m}$ , possui a maior parte do flagelo despreendida do corpo celular e o cinetoplasto posicionado anteriormente em relação ao núcleo; tripomastigotas, medindo aproximadamente 25  $\mu\text{m}$  de comprimento e 2  $\mu\text{m}$  de diâmetro, possuem o cinetoplasto posterior ao núcleo e a maior parte do flagelo concorrendo ao corpo celular; amastigotas, apresentando forma arredondada e com flagelo muito curto, quase imperceptível, medem cerca de 5  $\mu\text{m}$  de

diâmetro (TEIXEIRA, 2011; TYLER e ENGMAN, 2001). Estas e outras características celulares podem ser vistas na Figura 01.



**Figura 01. Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*. A) Epimastigota. B) Tripomastigota metacíclica. C) Amastigota.**

Fonte: Atlas Didático – Ciclo de Vida do *Trypanosoma cruzi*, 2011.

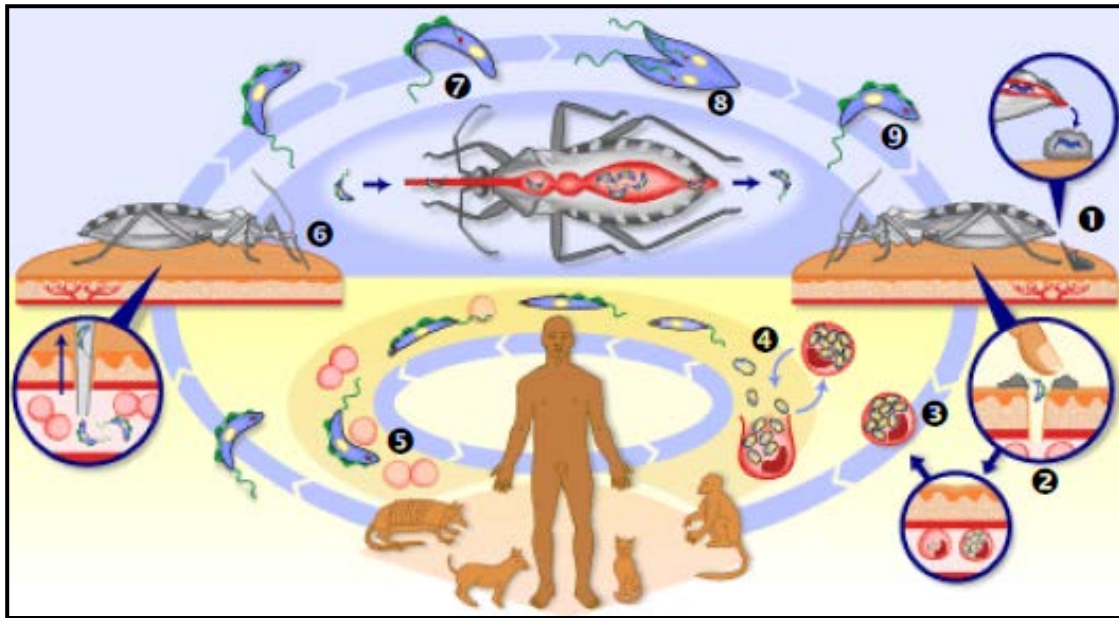


A Figura 02 ilustra o ciclo de vida do *T. cruzi*. A contaminação de um mamífero, que pode ser um humano, é dada quando um inseto hematófago infectado da subfamília Triatominae pica o hospedeiro mamífero para se alimentar.

Neste processo, o inseto pode defecar e urinar, depositando sobre a pele ou mucosa do mamífero a forma tripomastigota metacíclica, infectiva e não replicativa (❶). Pelo reflexo de coçar dos mamíferos, os tripomastigotas metacíclicos acessam mais facilmente a circulação sanguínea, e invadem outras células do hospedeiro (❷). Inicialmente, o parasita é mantido em um compartimento denominado vacúolo parasitóforo, mas em seguida, escapa deste para o citoplasma, onde se diferencia na forma amastigota e se multiplica por fissão binária, podendo tomar todo o citoplasma (❸). Em geral, os amastigotas se diferenciam na forma tripomastigota antes da célula hospedeira ser rompida pelo excesso de parasitas (❹). Assim, há o surgimento de uma forma intermediária designada por alguns autores como *epimastigote-like*, por se assemelhar morfológicamente, e por outros critérios, à forma epimastigota, porém, de menor tamanho (FAUCHER *et al.*, 1995; ALMEIDA-DE-FARIA *et al.*, 1999).

Esses tripomastigotas infectam novas células dando origem a um ciclo particular no hospedeiro mamífero (❺). Eles também podem ser sugados pelo inseto vetor durante o repasto sanguíneo (❻), indo parar na porção anterior de seu intestino. Neste novo ambiente, os tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas (❼) podendo passar pelos estágios amastigota e esferomastigota (TYLER e ENGMAN, 2001). Quando alcançam a porção posterior, começam a multiplicar-se por divisão binária (❸), podendo aderir-se às células intestinais via hemidesmossomos (ZELEDON, 1997, TEIXEIRA, 2011). Ao chegarem à ampola retal, os epimastigotas aderem-se por hidrofobicidade à cutícula cerosa que recobre a parede desta região. Este evento tem sido considerado importante no disparo da metaciclogênese (BONALDO *et al.*, 1988; KLEFFMANN *et al.*, 1998), assim como o estado nutricional do inseto vetor, a

cepa de *T. cruzi* em questão, o pH e a osmolaridade do meio, a presença de soro de mamífero e de componentes da hemolinfa, e o AMP cíclico (GONZALEZ-PERDOMO *et al.*, 1988). Uma vez completada a diferenciação (9), os tripomastigotas metacíclicos se soltam da cutícula, podendo ser eliminados na urina ou fezes do inseto em seu próximo repasto sanguíneo.



**Figura 02. Esquema do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.**

Fonte: TDR/Welcome Trust (com modificações).

### 1.1.3 A METACICLOGÊNESE

As diferentes formas do *T. cruzi* durante seu ciclo de vida diferem em nível morfológico, ultraestrutural, funcional, bioquímico, fisiológico e de expressão gênica. Essas alterações são resultados de uma reprogramação gênica feita pelo parasito em resposta a uma variedade de estímulos, como disponibilidade ou não de nutrientes e fatores de crescimento, mudanças de temperatura, pH, osmolaridade, entre outros. A obtenção das formas evolutivas do *T. cruzi* em laboratório tem permitido o estudo mais aprofundado de cada uma delas, e para isso, diversos protocolos foram desenvolvidos para a geração de tripomastigotas e amastigotas.

A metaciclologênese (CONTRERAS *et al.*, 1985) têm sido utilizada para obter a forma tripomastigota. Este tipo de abordagem tem também possibilitado o estudo de diversos aspectos da transição entre os estágios evolutivos.

Como dito anteriormente, a metaciclologênese do *T. cruzi* ocorre naturalmente na porção final do intestino do inseto vetor decorrente das novas condições físico-químicas encontradas pelo parasita neste novo ambiente. Dentre tais condições destacam-se as mudanças na composição nutricional e na disponibilidade de mitógenos e fatores de crescimento. A metaciclologênese é reproduzida em laboratório através do uso do meio TAU3AAG (*Triatomine Artificial Urine* - urina artificial de barbeiro suplementado com ácido aspártico, ácido glutâmico, prolina e glicose), que busca mimetizar as condições encontradas no intestino do barbeiro. A adesão do parasita ao substrato (neste caso o plástico da garrafa de cultura) mostrou-se fundamental para a metaciclologênese *in vitro* (BONALDO *et al.*, 1988), assim como a adesão à membrana perimicrovilar o é *in vivo* (GONZALEZ *et al.*, 2006; ALVES *et al.*, 2007). Epimastigotas em início de fase estacionária de crescimento são submetidos a estresse nutricional (em meio TAU) e então transferidos para o meio TAU3AAG, onde parte da população se diferencia em tripomastigotas metacíclicos, perde a adesão à garrafa e passa ao sobrenadante da cultura.

Em situação semelhante de escassez de nutrientes e privação de fatores de crescimento, as células eucarióticas em geral, chegam ao ponto em que algumas possibilidades se apresentam: podem entrar em autofagia e começar a consumir o próprio citoplasma na tentativa de prover os nutrientes necessários para manter as reações essenciais, aumentando as chances de sobrevivência caso haja um novo fornecimento de nutrientes; podem entrar em apoptose (no caso de organismos multicelulares) e morrer sem que haja o disparo de resposta inflamatória por parte do organismo; ou podem entrar em processo de diferenciação (se houver), que acaba impulsionando-as a um novo estágio de seu ciclo de vida, capaz de lidar com as novas condições impostas pelo meio.

No caso do *T. cruzi*, as formas tripomastigotas metacíclicas são mais resistentes a ambientes com características físicas, químicas e biológicas potencialmente adversas. O parasita, após deixar o interior do hospedeiro invertebrado, passa um período exposto ao ambiente, se transfere para o

interior de um mamífero e, em seguida, para o interior das células desse novo hospedeiro. Os metacíclicos precisam ser capazes de sobreviver a esses novos ambientes até o ponto de, no interior da célula, diferenciar-se em amastigotas, levando a multiplicação do parasita e seu estabelecimento em mais um organismo. Tal estratégia tem se mostrado bem sucedida, garantido ao *T. cruzi* notável sucesso evolutivo, com vasta quantidade e variedade de hospedeiros em potencial (CONTRERAS; MOREL; GOLDENBERG, 1985a; ÁVILA *et al.*, 2001).

## 1.2 EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS

### 1.2.1 ORGANIZAÇÃO GENÔMICA

A diversidade genética do *T. cruzi* tem sido observada já há algum tempo através de diferentes abordagens, como busca por marcadores enzimáticos, polimorfismos no tamanho de fragmentos de restrição do kDNA, cariótipos moleculares, *fingerprints* de DNA, entre outros (MILES, 1983; MOREL *et al.*, 1980; HENRIKSON *et al.*, 1993; MACEDO *et al.*, 1992). Com base nestas análises, o *T. cruzi* pode ser classificado em dois grupos: os integrantes do grupo 1 estão envolvidos no ciclo de transmissão selvagem e na infecção de marsupiais; os do grupo 2 estão associados ao ciclo doméstico, transmissão e à infecção dos outros mamíferos (FERNANDES *et al.*, 1998; ZINGALES *et al.*, 1998). Essa diversidade também se aplica à quantidade total de material genético, que pode variar em mais de 100% entre cepas e até mesmo entre clones derivados da mesma cepa (KOOY *et al.*, 1989; THOMPSON e DVORAK, 1989; MCDANIEL e DVORAK, 1993).

O genoma do *T. cruzi* é marcado por conter várias sequências de DNA repetidas em *tandem*. Tais sequências são compostas por genes codificadores de proteínas, como as que formam o glicocálice do parasita, e cuja localização pode ser dispersa pelo genoma e em áreas mais específicas como as regiões subteloméricas. Outros membros deste grupo são os genes que codificam os diferentes tipos de RNA e as proteínas constitutivas (*housekeeping*) como histonas, tubulina, actina, entre outras. Sequências repetitivas também são características para os elementos de transposição (como os retrotransposons),

micro e minisatélites, e sequências intercalantes. No genoma, há ainda aqueles genes codificadores de proteínas de cópia única, além de sequências que atuam como espaçadores ou conectores. Elas podem estar situadas tanto entre os genes codificadores de proteínas quanto entre os genes codificadores de RNA.

Além do DNA nuclear, o *T. cruzi* possui o DNA de sua única mitocôndria, ou kDNA, que forma uma estrutura celular característica da ordem Kinetoplastida, o cinetoplasto. Tal estrutura é composta por algumas dúzias de maxicírculos de aproximadamente 23 kpb e por milhares de minicírculos contendo por volta de 1,4 kpb, todos concatenados formando uma rede complexa. O kDNA representa 10 a 15% do DNA total da célula (LUKES *et al.*, 2002; JUNQUEIRA *et al.*, 2005). Os maxicírculos contêm parte dos genes responsáveis por manter as funções da mitocôndria (WESTEMBERGER *et al.*, 2005). Muitos deles sofrem regulação pós-transcricional num processo conhecido como edição de RNA, no qual a molécula de mRNA sofre adição ou deleção de uma ou mais resíduos de uridina (SIMPSON *et al.*, 2004). Os minicírculos se encarregam de codificar os RNA guia, pequenos transcritos que servem de molde para a edição dos mRNAs mitocondriais. Outra característica dos minicírculos é sua capacidade de se integrar ao genoma do hospedeiro e agir como um fator mutagênico (TEIXEIRA *et al.*, 1991; SIMÕES-BARBOSA *et al.*, 1999), podendo estar relacionado à patologia na doença de Chagas (NITZ *et al.*, 2004).

Os cromossomos do *T. cruzi* têm a característica de não se condensar durante a divisão celular, o que inviabiliza seu estudo por métodos convencionais de citogenética, amplamente aplicados a eucariotos superiores. Com o desenvolvimento da eletroforese de campo pulsado, essa barreira foi superada, permitindo a separação de cromossomos inteiros. Somado a isso, a associação de técnicas de hibridização usando diferentes sondas de DNA permitiu a obtenção de cariótipos moleculares e a observação de que o tamanho, o número de bandas dos cromossomos e a localização dos genes nestes, variam grandemente entre cepas e clones de *T. cruzi*, evidenciando a alta plasticidade deste genoma (GIBSON e MILES, 1986; AYMERICH e GOLDENBERG, 1989; WAGNER e SO, 1990; CANO *et al.*, 1995). Essa plasticidade se evidencia no caráter híbrido e aneuplóide do *T. cruzi*, que pode

conferir mecanismos de sobrevivência ao estresse ambiental, promover heterogeneidade intra-específica e gerar a diversidade observada na doença de Chagas (MCDANIEL e DVORAK, 1993). Apesar de tantas mudanças, o cariótipo do clone Dm28c se mostrou praticamente inalterado nas formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas, indicando que não há rearranjos aparentes nos cromossomos deste clone nesta parte do ciclo de vida do parasita. Além disso, este trabalho demonstrou pela primeira vez a ausência de mini-cromossomos em *T. cruzi* (AYMERICH e GOLDENBERG, 1989). Tais estruturas são abundantes em *T. brucei*, havendo aproximadamente 100 mini-cromossomos com tamanho entre 50 e 150 kbp (WILLIAMS *et al.*, 1982; VAN DER PLOEG *et al.*, 1984a). Nelas, há repetições de vários tipos de sequências encontradas nos cromossomos maiores, inclusive sequências de regiões teloméricas (DE LANGE *et al.*, 1983) e subteloméricas (BLACKBURN e CHALLONER, 1984; VAN DER PLOEG *et al.*, 1984b). Os únicos genes conhecidos presentes nos mini-cromossomos são os da VSG, apesar de não serem transcritos a partir desta estrutura (BORST, 1986). Sugere-se que os mini-cromossomos estejam envolvidos no aumento do repertório dos genes da VSG (VAN DER PLOEG *et al.*, 1984a), uma vez que não estão presentes em flagelados da ordem Kinetoplastida que não lançam mão do processo de variação antigênica semelhante ao do *T. brucei* (VAN DER PLOEG *et al.*, 1984c).

Análises de densitometria, baseados em cariótipos moleculares feitos com o DNA da cepa CL Brener, estimaram que o tamanho do genoma nuclear diplóide é de aproximadamente 87 mpb, com 64 cromossomos de tamanhos entre 0,45 e 4,0 mpb, cabendo frisar que os métodos empregados nestas medições tinham limitações na precisão reconhecidas pelos próprios autores (CANO *et al.*, 1995). Tal dado contrasta com resultados anteriores obtidos através de análise por microfluorimetria direta, que sugerem um tamanho entre 94 e 150 mpb (KOOY *et al.*, 1989). Num outro estudo, em que foram testadas diferentes condições de separação e hibridização com marcadores cromossomais, o número de cromossomos foi estimado em torno de 40, cujos tamanhos também ficavam entre 0,45 e 4,0 mpb (HENRICKSSON *et al.*, 1995).

Com a publicação da sequência do genoma do *T. cruzi* (baseada na cepa CL Brener), seu tamanho foi revisto para aproximadamente 110 mpb no

genoma diplóide (EL SAYED *et al.*, 2005) e o caráter híbrido de sua origem, reforçado. A análise dos genes anotados indicou a presença de dois haplótipos ao se comparar os *contigs* com dados do genoma da cepa Esmeraldo (EL SAYED *et al.*, 2005).

Conforme já visto, as cepas de *T. cruzi* são divididas em grupo I e II, de acordo com os hospedeiros que infectam. Estes grupos, por sua vez, estão divididos em subgrupos, em que um ou mais membros podem ter dado origem a outras cepas em outros subgrupos, formando cepas híbridas. Assim, a cepa Esmeraldo é membro do subgrupo *T. cruzi* IIb, um dos progenitores do subgrupo IIc, ao qual pertence a cepa CL Brener (ZINGALES *et al.*, 1997). A origem deste subgrupo é reconhecida por vários autores (MACHADO e AYALA, 2001; GAUNT *et al.*, 2003; BRISSE *et al.*, 2003) como sendo um híbrido entre os subgrupos IIb e IIc. O subgrupo IIc por sua vez é aparentemente um híbrido derivado do grupo *T. cruzi* I (WESTENBERGER *et al.*, 2005). Tais observações sugerem a participação de vários progenitores durante a evolução das cepas híbridas de *T. cruzi*.

Outra característica marcante no genoma do *T. cruzi* são as sequências repetitivas de DNA. Elas representam pelo menos 50% de todo o genoma e são formadas principalmente pelas famílias de genes que compõem as proteínas de superfície, como as proteínas de superfície associadas à mucina (MASP), as mucinas, os integrantes da superfamília das trans-sialidases e as glicoproteínas de superfície gp63. Esses genes totalizam 18% dos genes codificadores de proteínas no *T. cruzi*. Estão também incluídas neste grupo de sequências repetitivas as repetições subteloméricas e os elementos de transposição. Estes, respondem por 5% dos doze mil genes estimados no genoma haplóide do *T. cruzi*. Conforme visto em outros tripanosomatídeos, grande parte destes genes encontra-se disposta em extensas unidades repetitivas formadas por até centenas de cópias, resultando num padrão onde a fita codificante se alterna em grandes blocos (EL SAYED *et al.*, 2005).

## 1.2.2 TRANSCRIÇÃO, EXPRESSÃO E REGULAÇÃO GÊNICA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS

A maturação dos transcritos em parasitas da ordem Kinetoplastida, entre eles os tripanossomatídeos, difere da maioria dos eucariotos (CLAYTON, 2002). As regiões codificadoras estão ordenadas em grupos em uma mesma fita de DNA e na quase totalidade dos casos não apresentam interrupções por íntrons, com exceção do gene que codifica para a enzima poli-A polimerase, relatado em *T. cruzi* e *T. brucei* (MAIR *et al.*, 2000). A transcrição resulta na formação de RNAs denominados policistrônicos que contêm a informação de diversos genes, os quais não possuem necessariamente funções relacionadas (JOHNSON; KOOTER; BORST, 1987; TEIXEIRA; DAROCHA, 2003). Uma peculiaridade neste processo é que genes de um mesmo transcrito policistrônico podem ser expressos em níveis diferentes, ressaltando a importância de mecanismos pós-transcricionais no controle da expressão gênica (revisito por VANHAMME e PAYS, 1995; CLAYTON e SHAPIRA, 2007).

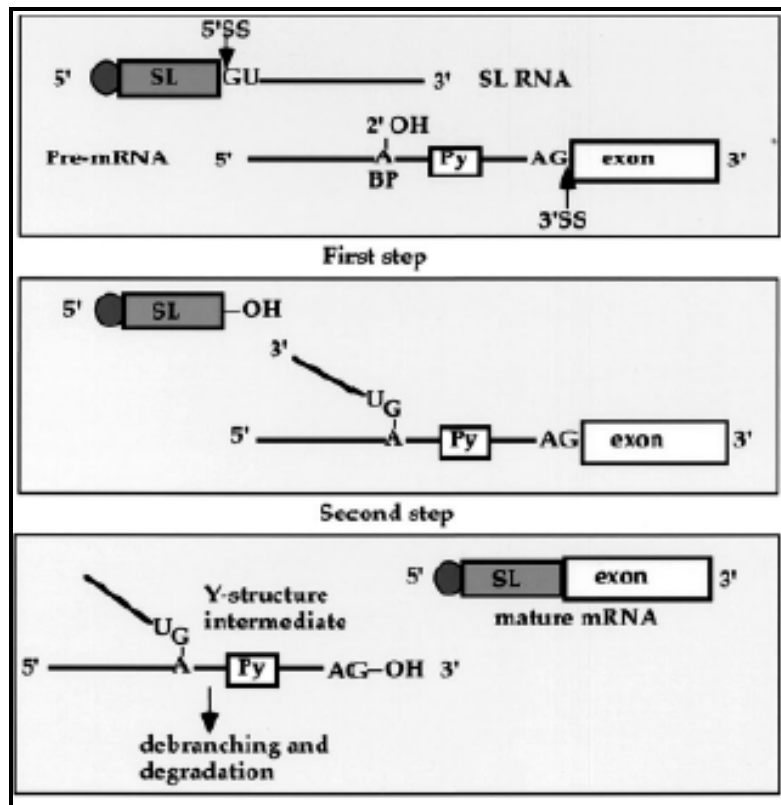
Outra peculiaridade inclui a diferença observada entre as RNA polimerases dos tripanossomatídeos em relação às de eucariotos superiores que são as alterações na extensão C-terminal da RNA polimerase II (ausência das repetições em *tandem* de heptapeptídeos nos tripanossomas). Há também a susceptibilidade das RNA polimerases dos tripanossomatídeos a diferentes concentrações de inibidores como a  $\alpha$ -amanitina, o que auxilia no estudo funcional destas enzimas *T. brucei* e *T. cruzi*, por exemplo (LAUFER *et al.*, 1999; CAMPBELL; THOMAS; STURM, 2003; DOSSIN; SCHENKMAN, 2005).

Anteriormente ao início da tradução, os transcritos policistrônicos requerem processamento para gerar RNAs mensageiros (mRNAs) maduros e individualizados referentes aos respectivos genes. Neste caso, o processamento é decorrente de um evento denominado *trans-splicing* que adiciona uma sequência conservada na extremidade 5' de cada mRNA e da adição de uma cauda de adeninas (poli-A) na extremidade 3' (LIANG *et al.*, 2003). O *trans-splicing* foi inicialmente caracterizado em tripanossomatídeos em estudos sobre glicoproteínas variáveis de superfície (VSGs) de *T. brucei*, quando foi observado que os mRNAs apresentavam aproximadamente 39 nucleotídeos observados na extremidade 5', denominada então de sequência



líder - *spliced leader* (SL), ou mini-exon (BOOTHROYD; GROSS, 1982; NELSON *et al.*, 1983). Posteriormente, a presença de sequências homólogas de SL foram observadas em transcritos de outros tripanossomatídeos como *T. cruzi* e *Leptomonas collosoma* (NELSON *et al.*, 1983; DE LANGE *et al.*, 1984). O SL origina-se de um transcrito de aproximadamente 141 nucleotídeos e é adicionado na porção 5' da sequência codificante presente nos RNAs policistrônicos precursores, originando unidades monocistrônicas que serão traduzidas (VAN DER PLOEG *et al.*, 1982). Como pode ser observado na Figura 03, uma porção rica em polipirimidinas, crucial para o processo de *trans-splicing*, está localizada na região intergênica que precede o sítio de adição de SL do pré-mRNA (HUG *et al.*, 1994). A adição de SL é direcionada pela região acceptora de SL-RNA que possui o dinucleotídeo AG na região 3' da região do RNA policistrônico primário que será removida (LEBOWITZ *et al.*, 1993; MATTHEWS; TSCHUDI; ULLU, 1994). Sabe-se também que a conservação da distância entre a região acceptora - 3'AG - e a região de poliadenilação é importante para que o processamento ocorra corretamente, revelando assim o papel de regiões intergênicas na regulação do *trans-splicing* (revisto por TEIXEIRA, 1998) e conseqüentemente na expressão gênica nestes organismos.

As características peculiares na estrutura de genes e transcrição do RNA fazem com que a regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos seja praticamente, se não exclusivamente pós-transcricional, diferente da maioria dos eucariotos superiores, onde é evidente a importância de um controle transcricional complementando os controles em nível pós-transcricional. Neste último caso, proteínas de ligação a RNA (RBPs) possuem um papel principal (revisto por DREYFUSS; KIM; KATAOKA, 2002) e originam complexos ribonucleoproteicos (mRNPs) que direcionam o mRNA ao citoplasma para tradução ou degradação (KEENE, 2001). Além disso, as RBPs participam de diferentes eventos moleculares como *splicing* alternativo, poliadenilação, exportação, localização, tradução e estabilidade de mRNAs (revisto por GLISOVIC *et al.*, 2008).



**Figura 03. Mecanismo de *trans-splicing*.** Estão indicadas a região 5'GU no sítio de clivagem do SL-RNA e a região aceptora 3'AG presente no pré-mRNA. BP: ponto de ramificação. Py: região rica em polipirimidina.

FONTE: LIANG *et al.*, 2003

Os tripanossomatídeos também possuem proteínas de ligação a RNA como protagonistas na regulação da expressão gênica (D'ORSO, DEGAUDENZI; FRASCH, 2003, DEGAUDENZI; FRASCH; CLAYTON, 2005, CARO *et al.*, 2006), como por exemplo, PABP1, TcUBP1, TcSR, p34 e p37 (revisto por D'ORSO, DEGAUDENZI; FRASCH 2003). De modo geral, estas proteínas reconhecem sequências presentes nas regiões não traduzidas localizadas na extremidade 3' de mRNAs denominadas de 3'UTR.

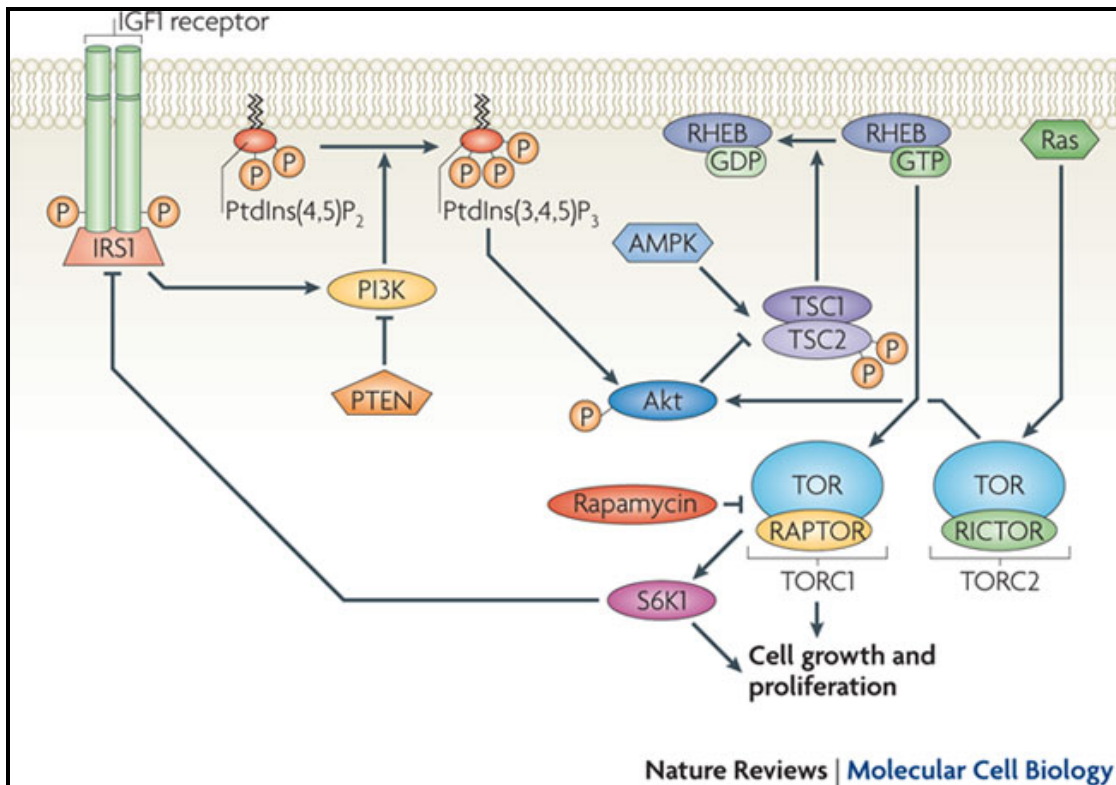
Ensaio com gene repórter luciferase mostraram que a sequência 3'UTR de diferentes genes estágios-específicos, como gp72, gp85 e gp82, podem alterar os níveis de expressão de luciferase. Por exemplo, as inserções de 3'UTR dos genes estágios-específicos gp72 e gp85 resultaram em diminuição dos níveis de transcritos em epimastigotas, promovendo a instabilidade ou maturação ineficiente do mRNA (NOZAKI; CROSS, 1995). Em mamíferos, a

estabilidade de mRNAs é regulada em parte por um elemento desestabilizador rico em AU na região 3'UTR, denominada ARE – AU *rich element* (CHEN; SHYU, 1995). Da mesma forma, elementos estáveis ricos em U – UREs, estrutural e funcionalmente relacionados aos AREs, foram encontrados na região 3'UTR de diferentes transcritos de *T. brucei*, que são estáveis na forma procíclica mas instáveis na forma sanguínea (revisto por CLAYTON e SHAPIRA, 2007), bem como em alguns mRNAs de *T. cruzi* (D'ORSO, DEGAUDENZI; FRASCH, 2003) e de *Leishmania* (revisto por HAILE; PAPADOPOULOU, 2007).

Existem várias evidências para o papel de elementos presentes em moléculas de mRNA e de RBPs no controle da estabilidade e tradução de mRNA em tripanossomatídeos, contudo, pouco foi publicado até o momento quanto à maquinaria e mecanismos envolvidos com outros eventos pós-transcricionais.

### 1.3 SENSORES NUTRICIONAIS E A VIA TOR

Os mecanismos de sinalização celular responsáveis por detectar a presença de nutrientes e fatores de crescimento no meio, bem como a maneira como a célula responde a tais estímulos têm sido estudados em diversos organismos. Uma das vias mais conhecidas é a da PI3K (3-fosfatidil-inositol kinase), que controla o crescimento celular (KOZMA e THOMAS, 2002; OLDHAM e HAFEN, 2003), proliferação, diferenciação entre outras (Figura 04). Em mamíferos, fatores de crescimento, como a insulina atuam ativando essa enzima, que fosforila a hidroxila da posição 3' do composto inositol-4,5-bisfosfato da molécula de fosfatidilinositol, gerando fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) (MA e BLENIS, 2006).



**Figura 04. Cascata de sinalização dependente das quinases da via TOR.** Complexo TOR1 (mTORC1 em mamíferos), contém uma proteína reguladora - associada a TOR (RAPTOR) e é sensível à rapamicina. TORC1 responde à disponibilidade de nutrientes e regula o crescimento celular e proliferação. A insulina ou fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) sinaliza (IIS) ativando a cascata com TORC1 em suas funções de regulação de crescimento. A fosfoinositol 3 quinase (PI3K) pode ser ativada pelo IIS e, por sua vez ativar Akt, que fosforila esclerose tuberosa 2 (TSC2). Isto remove a inibição mediada pelo homólogo Ras enriquecido no cérebro (Rheb) em TSC2, permitindo que Rheb ative TORC1. Em condições de baixa disponibilidade de nutrientes, AMP proteína quinase ativada (AMPK) promove a repressão em Rheb mediada por TSC1-TSC2. O alvo a jusante de TORC1 é a S6 quinase 1 (S6K1), que promove o crescimento celular e a proliferação mas também pode controlar negativamente o IIS. Uma sinalização paralela é também fornecida por TORC2, que fosforila Akt. IRS1, substrato do receptor da insulina 1; PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, fosfatidilinositol-4,5-bifosfato; PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato; rictor, parceiro de TOR insensível à rapamicina.

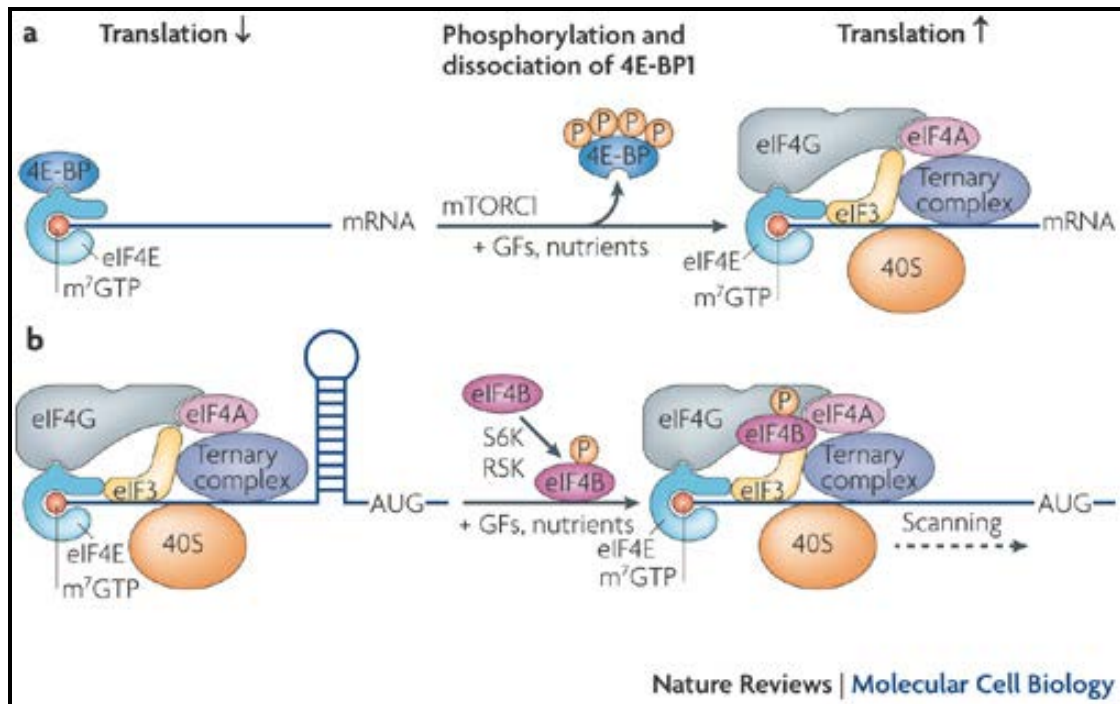
Fonte: BURTNER e KENNEDY, 2010.

Várias enzimas que integram cascatas sinalizadoras possuem domínios, como o domínio homólogo à plecstrina, que reconhecem e se ligam a PIP3 como etapa crucial na transmissão de sinal. Dentre elas podem ser citadas a proteína quinase 1 dependente de PIP3 (PDK1) e a proteína quinase B, também conhecida como Akt. Ambas são recrutadas para a face intracelular da membrana plasmática, onde PDK1 fosforila Akt e dispara uma cascata de

sinais que termina por fosforilar a proteína kinase S6K. Tal enzima fosforila vários resíduos do polipeptídeo ribossomal S6, aumentando a capacidade do mecanismo de tradução celular. Outro alvo bem investigado desta via é a proteína 4EBP1, que se liga ao fator de iniciação da transcrição em eucariotos 4E (eIF4E). Este fator reconhece a estrutura do CAP na região 5' da maioria dos mRNA eucarióticos, dando início a tradução. A fosforilação de 4EBP1 resulta na dissociação de eIF4E liberando-o para iniciar a tradução (MA e BLENIS, 2009). Essa cascata de sinalização pode ser visualizada na Figura 05.

Uma das vias de sinalização mais estudadas nos últimos anos é a via TOR, um importante sensor nutricional presente em eucariotos. A principal proteína da via foi descoberta em leveduras mutantes resistentes ao efeito inibitório de crescimento da droga rapamicina (um composto antifúngico produzido por *Streptomyces hygroscopicus* e análogo ao antibiótico macrolídeo FK506), sendo assim denominada TOR (*target of rapamycin*). Simultaneamente, foi demonstrado que o efeito da rapamicina é dependente de sua interação com a proteína FKBP12 e esta, por sua vez, interage com a proteína TOR, impedindo o acesso da mesma aos seus substratos (WULLSCHLEGER *et al.*, 2006).

Essa via conta com uma série de proteínas quinases atuantes na transmissão de sinais extracelulares, mais especificamente, na detecção de nutrientes e fatores de crescimento presentes no meio. Tais proteínas possuem em sua porção C-terminal uma região com alta homologia ao domínio catalítico da PI3K, o que as levaram a ser denominadas quinases relacionadas à fosfatidilinositol quinase (PIKKs).



**Figura 05. Alvos de fosforilação das quinases da via TOR. a)** O recrutamento da subunidade ribossomal 40S para a extremidade 5' do mRNA é um passo fundamental e limitante da tradução. Um número de fatores de iniciação da tradução, incluindo a ligação ao CAP 5' do fator eucariótico de início de tradução 4E (eIF4E), possuem um papel essencial neste processo. Mediada por eventos de fosforilação e de transdução de sinal regulam a função de eIF4E. Por exemplo, proteínas de ligação 4E (4E- BPs) hipofosforiladas se ligam fortemente à eIF4E, impedindo assim a sua interação com eIF4G e assim, inibir a tradução. O complexo TOR1 (mTORC1) promove indiretamente a fosforilação de 4E-BPs, liberando o 4E-BP de eIF4E, resultando no recrutamento de eIF4G para o CAP 5' e assim, permitir a iniciação da tradução. **b)** Outro fator de iniciação bem estudado que é alvo de vias de transdução de sinal é o eIF4B. A proteína 40S ribossomal S6 quinase (S6K) ou ribossomal S6 quinase (RSK) promove a fosforilação de eIF4B, que é recrutada para o complexo de pré-iniciação da tradução fazendo com que a atividade helicase de eIF4A aumente. Isto é particularmente importante para a tradução de mRNAs que contêm as sequências da região não traduzida 5' estruturadas na forma de "grampos", pois o desenrolar destas estruturas de RNA é necessário para o eficiente encaixe da subunidade 40S no códon de iniciação. GF, factor de crescimento. Fonte: MA e BLENIS, 2009.

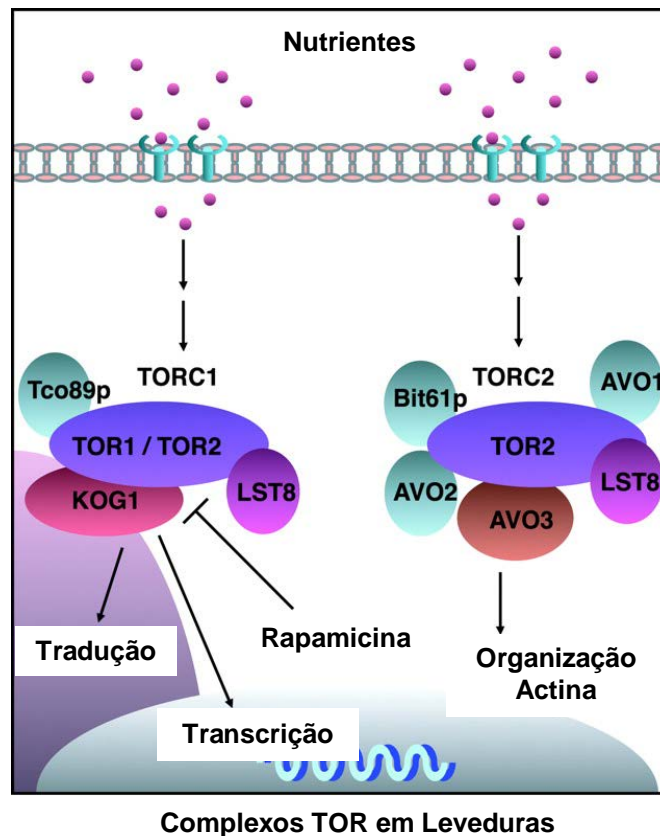
As PIKKs estão envolvidas em diversos fenômenos como controle do crescimento celular, regulação do ciclo celular e regulação do ponto de checagem de danos do DNA, e têm preferência por fosforilar resíduos de serina e treonina de suas moléculas alvo (BRUNN *et al.*, 1997; BURNET *et al.*, 1998; ISOTANI *et al.*, 1999).

Homólogos de TOR têm sido descritos em diversos organismos como mamíferos (BROWN *et al.*, 1995), *Drosophila* (OLDHAM *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2000), *Caenorhabditis elegans* (LONG *et al.*, 2002), *Cryptococcus neoformans* (CRUZ *et al.*, 1999) e *Arabidopsis thaliana* (MENAND *et al.*, 2002), sugerindo que esta quinase se apresenta conservada evolutivamente. Através das respostas celulares induzidas pela rapamicina, vários alvos de TOR foram identificados em mamíferos, fornecendo um panorama dos diferentes processos em que ela está envolvida. Dentre os alvos podem se destacar: substrato receptor de insulina 1 (IRS-1) (HARTMAN *et al.*, 2001; HARUTA *et al.*, 2000; TAKANO *et al.*, 2001); glicogênio sintase (AZPIAZU *et al.*, 1996; BROWN *et al.*, 1994), proteína de ligação citoplasmática 170 (CLIP-170) (CHOI *et al.*, 2000; CHOI *et al.*, 2002); proteína kinase do fator de alongação eucariótico 2 (eEF2) (REDPATH *et al.*, 1996); fator 1 $\alpha$  induzido por hipóxia (HUDSON *et al.*, 2002; TREINS *et al.*, 2002); inibidores de kinases dependentes de ciclina p27 e p21 (HUANG *et al.*, 2001; ILYIN *et al.*, 2003); proteína retinoblastoma (USUI *et al.*, 2000); proteína de ligação ao fator 4E de iniciação em eucariotos (4EBP) (GRAVES *et al.*, 1995; LIN *et al.*, 1994); kinase 1 S6 ribossomal (CHUNG *et al.*, 1992; PRICE *et al.*, 1992); STAT 3 (YOKOGAMI *et al.*, 2000); Lipina (HUFFMAN *et al.*, 2002), PKC $\alpha$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$  (PAREKH *et al.*, 1999; SARBASSOV *et al.*, 2004) e proteína fosfatase 2A (PP2A) (BEGUM e RAGOLIA, 1996; PETERSON *et al.*, 1999).

### 1.3.1 COMPONENTES DA VIA TOR

Em *Saccharomyces cerevisiae* foram identificados originalmente os genes *TOR1* e *TOR2*, que codificam os alvos da rapamicina (KUNZ *et al.*, 1993). As proteínas têm massa aproximada de 280 kDa, identidade de sequência de 67%, e papel crucial em eventos como iniciação da tradução, progresso do ciclo celular, resposta a nutrientes (BARBET *et al.*, 1996) e regulação da polarização do citoesqueleto de actina durante o ciclo celular (SCHMIDT *et al.*, 1997; SCHMIDT e HALL, 1998; SCHMIDT *et al.*, 1996). As três primeiras funções são passíveis de inibição pela rapamicina e são desencadeadas pelo complexo TOR1 (TORC1), resultado da interação de

TOR1 ou TOR2 com as proteínas Kog1 (*Kontroller of growth*), Lst8 (*Lethal with sec thirteenth*) e Tco89. A última função é exclusiva de TOR2 e não é afetada pela rapamicina. Isto se dá devido à ausência de ligação entre o complexo rapamicina-FKBP12 com o complexo TOR2 (TORC2). Este complexo é resultado da interação exclusiva de TOR2 com proteínas como Avo1 (*Adheres voraciously to Tor2*), Avo2, Avo3, Lst8 e Bit61. A Figura 06 mostra os componentes dos dois complexos TOR presentes em *Saccharomyces cerevisiae* bem como de seus alvos.



**Figura 06. Complexos TOR1 e TOR2 presentes em *Saccharomyces cerevisiae*.** Complexo TOR1 contendo TOR1 ou TOR2 com Kog1, Lst8 e Tco89. TORC1 regula uma variedade de processos incluindo transcrição, renovação de mRNA, renovação de proteínas e tradução. Todas essas funções desempenhadas por TORC1 são inibidas pela rapamicina. O complexo TORC2 consiste de TOR2, Avo1-3, Bit61 e Lst8. TORC2 regula a organização do citoesqueleto. Esta é uma função específica de TORC2 e não é inibida pela rapamicina.  
 Fonte: INOKI *et al.*, 2005.

Em mamíferos há apenas um gene TOR denominado mTOR e que pode ser visualizado na Figura 7, que forma um complexo funcional com as proteínas Raptor (*Regulatory associated protein of mTor*, equivalente a Kog1



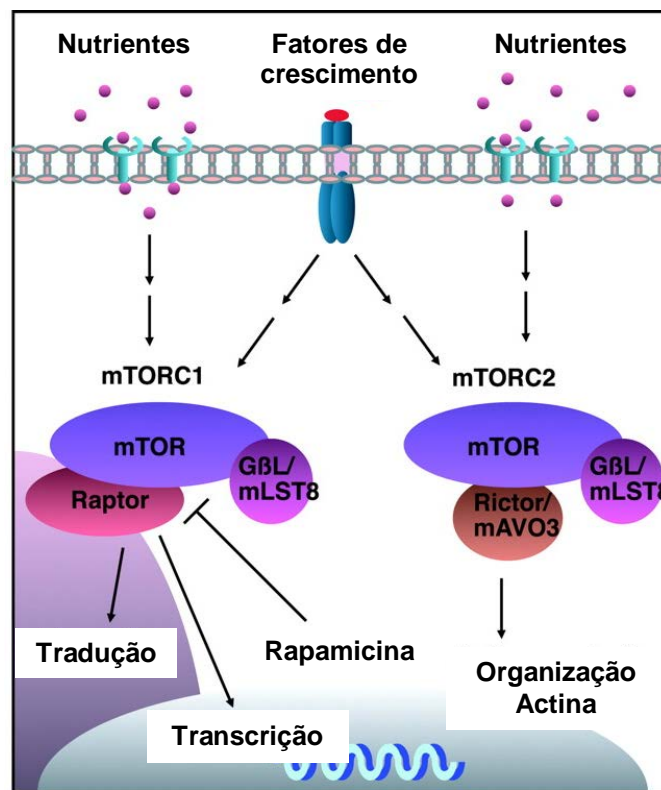
de levedura) e mLst8/GβL (ortóloga da proteína Lst8 de levedura) (HARA *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2003), indicando a existência de um complexo mTORC1. Como tais proteínas possuem os motivos de interação proteína-proteína WD40 e HEAT repetidos várias vezes, sugere-se que mTORC1 opere como um centro de ligação na sinalização via TOR.

A proteína Raptor tem a capacidade de fazer o complexo fosforilar, de maneira eficiente, S6K e 4EBP1, enquanto que em sua ausência, a fosforilação desses substratos é reduzida (HARA *et al.*, 2002). Outra possibilidade é que mTOR não fosforile diretamente S6K e 4EBP1, mas que haja quinases ainda não descritas cujas atividades dependam de mTOR (BEUGNET, 2003).

Outros eventos atribuídos a Raptor, quando uma redução em sua expressão é induzida, são a diminuição da expressão de mTOR (indicando que Raptor contribui para a manutenção de sua estabilidade proteica) e a diminuição do tamanho celular, como consequência da menor fosforilação de S6K (KIM *et al.*, 2002). Alguns modelos sobre a atuação de Raptor têm sido propostos: um deles sugere que Raptor funcionaria como uma proteína adaptadora, permitindo a ligação entre mTOR e seus substratos (HARA *et al.*, 2002). Outro grupo demonstrou que na presença de agentes que inibem a sinalização por mTOR (por afetar funções mitocondriais ou o metabolismo energético) Raptor se liga a este em um estado de alta afinidade, situação em que a atividade de mTOR seria inibida. Já quando há fatores que estimulam a atividade de mTOR, como aminoácidos, Raptor se liga a mTOR em um estado de baixa afinidade, aumentando assim a atividade de mTOR (KIM *et al.*, 2002).

A proteína GβL (ou mLst8) por sua vez interage com mTOR dentro de seu domínio quinase. A regulação negativa de sua expressão inibe a fosforilação de S6K em resposta a aminoácidos e soro. Outro fenótipo observado é a diminuição no tamanho celular. Assim, GβL regula positivamente a atividade de mTOR favorecendo a interação deste com seus substratos. No entanto, ao contrário de Raptor, GβL não interage com os tais substratos nem regula os níveis proteicos de mTOR (KIM *et al.*, 2003). Por fim, acredita-se que GβL seja necessária na formação do complexo Raptor-mTOR, pois quando sofre regulação negativa, a associação entre Raptor e mTOR é diminuída. Já quando é superexpressa, essa mesma associação se estabiliza, aumentando a atividade quinase de mTOR (KIM *et al.*, 2003).

Recentemente, esforços têm sido direcionados na identificação de um complexo mTOR insensível à rapamicina. Com isso foi identificado um novo componente denominado Rictor (*Rapamycin-insensitive companion of mTOR*), equivalente a Avo3 de leveduras inclusive por não haver a presença de Raptor. Estudos têm demonstrado que este complexo desempenha importante papel ao regular a organização do citoesqueleto, aparentemente situando-se num nível acima das GTPases Rho e da PKC $\alpha$ , na cascata de sinais (LOEWITH *et al.*, 2002; SARVASSOV *et al.*, 2004). Esses distintos arranjos proteicos dependentes de uma única quinase TOR (mTOR) em mamíferos é melhor compreendido na Figura 07.



**Complexos TOR em Mamíferos**

**Figura 07. Complexos TOR1 e TOR2 presentes em mamíferos.** A proteína TOR de mamíferos também forma dois complexos, mTORC1 consiste de mTOR, Raptor e GβL (mLst8). As funções identificadas do complexo mTORC1 são similares às descritas em leveduras. Recentemente Rictor (mAVO3) foi identificada como componente de mTORC2. Rictor e GβL estão envolvidas na regulação da organização do citoesqueleto de um modo insensível à rapamicina.

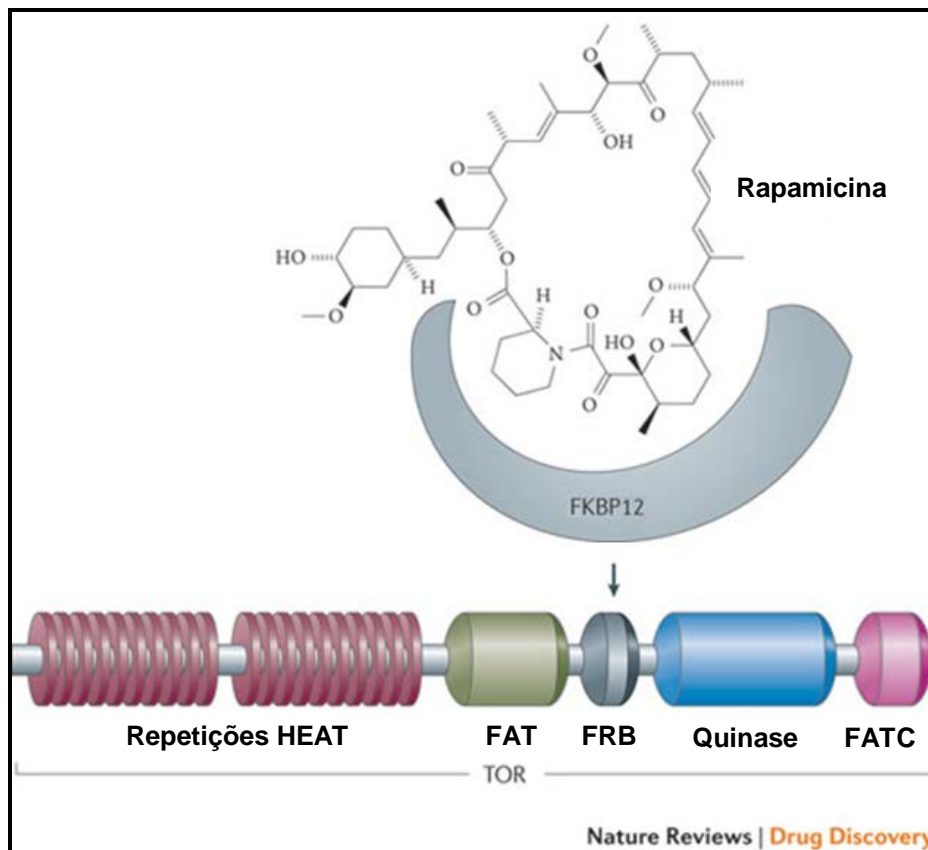
Fonte: INOKI *et al.*, 2005.

Outra proteína que deve ser mencionada neste tópico é a proteína FKBP12. Esta proteína não é um componente da via TOR mas, como descrito anteriormente, tem importante papel na inibição das quinases desta via (Figura 08). As proteínas da família FKBP são enzimas com atividade de peptidil-prolil *cis-trans* isomerase (PPIase) e realizam a isomerização da ligação peptídica entre uma prolina e um aminoácido precedente (ligação Xaa-Pro). Apesar da maioria das ligações peptídicas serem encontradas na conformação *trans* e as proteínas manterem este estado energeticamente favorecido, há uma significativa minoria (5 - 7% de proteínas) que se modificam para a conformação *cis* com o auxílio dessas enzimas (BELL *et al.*, 2006; KANG *et al.*, 2008). Além de influenciar a conformação das proteínas, esta isomerização na extremidade N-terminal da prolina é essencial para o envelhecimento da proteína nascente e está relacionada com outros aspectos importantes como interação protéica, tráfego, localização e atividade (BARIK, 2006).

Os membros da família das FKBP existam em todos os organismos desde archebacterias até primatas e já foram identificadas proteínas de 12 a 135 kDa. Os membros dessa família com baixo peso molecular apresentam apenas o domínio de ligação à FK506 (FKBP – FK506 *Binding Protein*) e à rapamicina, enquanto aqueles com pesos moleculares maiores possuem outros domínios e motivos de ligação como tetratricopeptideo (TPR), domínio de ligação à calmodulina, transmembrana (TM), sinal de localização nuclear (NLS), EF *Hand* e *leucina zipper* (GALAT, 2000; KANG *et al.*, 2008). O domínio FKBP apresenta 108 aminoácidos e é responsável tanto pela atividade de PPIase quanto de ligação à FK506 (KANG *et al.*, 2008). Muitas FKBP possuem localização intracelular específica como citoplasma, núcleo e retículo endoplasmático (BARIK, 2006).

BRASSEUR *et al.* (2009) identificaram quatro FKBP de *Trypanosoma brucei* (FKBP11, FKBP12, FKBP21 e FKBP47), as quais foram silenciadas através de RNAi. Apenas a proteína TbFKBP12 é essencial para a sobrevivência do parasita. A supressão dessa proteína bloqueia a citocinese impedindo o processo de mitose. Além disso, afeta severamente a motilidade flagelar. Recentemente, BRASSEUR *et al.* 2013 caracterizaram a FKBP12 de *T. brucei*. Neste trabalho eles descrevem a localização da proteína como sendo de interação ao citoesqueleto, presente especificamente na bolsa flagelar do

parasita. Sendo assim, a proteína FKBP12 de *T. brucei* está envolvida em processos estágio-específicos de diferenciação do parasita devido à sua interação com proteínas do citoesqueleto.



**Figura 08. Mecanismo de ligação FKBP12-rapamicina.** A porção amino terminal do alvo da rapamicina (TOR) contém repetições HEAT em *tandem* ( $\alpha$ -hélices anti-paralelas encontradas na huntingtina, fator de alongamento 3, PP2A e TOR), que são importantes para as interações proteína-proteína. Os domínios FAT e FATC modulam a atividade do domínio quinase; FRB é o domínio e local de encaixe do complexo FKBP12-rapamicina.

Fonte: BENJAMIN *et al.*, 2011 (com modificações).

#### 1.4 ENVOLVIMENTO DE TOR EM EVENTOS CELULARES

TOR tem sido apontado como um importante regulador do tamanho celular e do controle do início da tradução. Células de *Drosophila* contendo o gene *dTOR* não funcional são aproximadamente quatro vezes menores que as selvagens (GAO *et al.*, 2002; OLDHAM *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2000). Resultado parecido é visto em células de mamíferos tratadas com rapamicina, em que seu tamanho se reduz sensivelmente (FINGAR *et al.*, 2002; INOKI *et*

*al.*, 2003). Mediando tais eventos, a quinase S6K tem sido descrita como o principal alvo de TOR na regulação do tamanho celular. Moscas da fruta cuja enzima S6K apresenta atividade deficiente são menores quando comparadas com as selvagens, inclusive no tamanho das células (MONTAGNE *et al.*, 1999). Da mesma forma, camundongos nocautes para o gene S6K1 têm seu corpo cerca de 20% menor que os selvagens (SHIMA *et al.*, 1998). Fenótipo similar foi visto em camundongos tratados com rapamicina e em *Drosophila* com mutação no gene *dTOR* (HENTGES *et al.*, 1999; BODINE *et al.*, 2001). No entanto, a superexpressão induzida de S6K em *Drosophila* nocautes para *dTOR* foi capaz de recuperar a atividade deste gene (ZHANG *et al.*, 2000). Esses dados colocam S6K como um dos principais alvos de TOR em sua atividade de regulação do tamanho celular.

Atuando nos eventos que iniciam a tradução, TOR fosforila S6K, ativando a fosforilação do polipeptídeo ribossomal S6 (PROUD, 2002). Isso leva ao aumento da tradução de certos tipos de mRNA que codificam proteínas ribossomais e outros reguladores da tradução (MEYUHAS, 2000), elevando assim a capacidade de tradução da célula como um todo.

Outra função da proteína S6K está em fosforilar eIF4B, e este por sua vez, presente no complexo de pré-início de tradução, ativa a helicase eIF4A facilitando o processo de tradução de mRNAs que tem a 5'UTR com muitas estruturas secundárias (MA *et al.*, 2009).

Experimentos realizados usando rapamicina indicam que S6K é um dos principais alvos de TOR. Células cuja superexpressão de mTOR, resistente à rapamicina, foi induzida continuam apresentando ativação da quinase S6K, mesmo na presença de rapamicina (BROWN *et al.*, 1995). Já quando ocorria a regulação negativa de mTOR via siRNA, verificava-se que a ativação de S6K era reprimida (KIM *et al.*, 2002). De maneira análoga, o uso da rapamicina também bloqueou a ativação de S6K, mesmo que os sinais de estímulo ao crescimento celular viessem de outras fontes como insulina (PRICE *et al.*, 1992) ou soro (CHUNG *et al.*, 1992).

A regulação da tradução e o crescimento celular também são dependentes do estado de fosforilação da proteína 4EBP1. Quando hipofosforilada 4EBP1 atua como um repressor da tradução, pois sua afinidade pelo fator de início de tradução eIF4E aumenta, impedindo que este reconheça

e se ligue ao CAP na extremidade 5' dos mRNAs dando início à tradução (GINGRAS *et al.*, 1999; HAGHIGHAT *et al.*, 1995; LIN *et al.*, 1995; WULLSCHLEGER *et al.*, 2006; MA *et al.*, 2009). Entretanto, o aumento da fosforilação de 4EBP1 por mTOR, diminui a afinidade desta proteína pelo fator eIF4E, permitindo a ligação deste com o fator eIF4G e a montagem do complexo ativo de início de tradução eIF4F (LIN *et al.*, 1994; PAUSE *et al.*, 1994). O tratamento com rapamicina demonstrou que a hiperfosforilação de 4EBP1 era reduzida, prevenindo parcialmente sua dissociação de eIF4E (BERETTA *et al.*, 1996; GRAVES *et al.*, 1995; LIN *et al.*, 1995). Em seguida, foi mostrado que a superexpressão de mTOR insensível à rapamicina resultava na hiperfosforilação de 4EBP1 mesmo em presença de rapamicina (BRUNN *et al.*, 1997).

Os eventos de crescimento celular e de início de tradução de mRNA estão diretamente ligados à produção e disponibilidade de ribossomos. Para controlar a geração desses ribossomos, mamíferos e leveduras contam com componentes da via TOR atuando em vários níveis, como transcrição, processamento de RNA e tradução. A inibição da via TOR tanto por rapamicina, como por estresse nutricional, resulta em regulação negativa da transcrição de genes codificadores de proteínas ribossomais (CARDENAS *et al.*, 1999; HARDWICK *et al.*, 1999; POWERS *et al.*, 1999), tRNA e rRNA (POWERS *et al.*, 1999; ZARAGOZA, 1998). Conforme já mencionado, S6K participa do início da tradução de proteínas ribossomais sem, no entanto, que esse mecanismo seja exclusivo dessa quinase. Células de camundongos nocaute para os genes S6K1 e S6K2 continuam a apresentar fosforilação do polipeptídeo ribossomal S6 e tradução de mRNA para proteínas ribossomais, em resposta a mitógenos e de maneira rapamicina dependente (PENDE *et al.*, 2004). Um ponto adicional de controle bem estabelecido de TOR em leveduras e mamíferos, se dá na transcrição de genes para RNAs ribossomais, que têm sua atividade rapidamente inibida por estresse nutricional ou rapamicina (LEICHT *et al.*, 1996; MAHAJAN, 1994; POWERS *et al.*, 1999; ZARAGOZA *et al.*, 1998). Isso ocorre devido à condensação da cromatina na região de DNA ribossomal causada por desacetilação de histonas, que resulta em redução do espaço nucleolar (TSANG *et al.*, 2003). Além disso, foi visto que a RNA polimerase I é deslocada do nucléolo, contribuindo para a inibição da

transcrição dos genes ribossomais e revelando que TOR controla a biogênese dos ribossomos através de vários mecanismos que são dependentes da cromatina.

Outros dados mostram que TOR, através de S6K e PP2A, também controla a atividade de um fator de iniciação associado à RNA polimerase I (RNAPol I – responsável pela transcrição dos genes ribossomais) chamado TIF-IA (MAYER *et al.*, 2004). O emprego de rapamicina promoveu a diminuição da fosforilação em certa região desta molécula e aumentou em outra. Como resultado, TIF-IA acabou sendo dissociada do complexo da RNAPol I e translocada para o citoplasma, suprimindo assim a atividade da polimerase. Outra forma de TOR regular a transcrição de genes ribossomais é através da fosforilação, por meio de S6K1, do fator de transcrição UBF (*upstream binding factor*). Quando fosforilado, UBF torna-se capaz de se ligar a SL-1 (*basal rDNA transcription factor*) que resulta no aumento da transcrição de DNA ribossomal e na biogênese dos ribossomos.

A via TOR está intimamente envolvida no fenômeno celular da autofagia, definido pela degradação de componentes citoplasmáticos através de tráfego de membranas intracelulares (ABELIOVICH e KLIONSKY, 2001; KLIONSKY e OHSUMI, 1999) com o objetivo de gerar nutrientes e é ativado em condições de estresse nutricional e escassez de fatores de crescimento. Foi visto que o tratamento com rapamicina induz a autofagia, colocando TOR como participante (NODA e OHSUMI 1998), tanto em mamíferos quanto em leveduras (MATSUURA *et al.*, 1997). Inserida no processo, encontra-se a Apg1, uma quinase essencial na ativação da autofagia através da associação e formação de um complexo com Apg13, sob condições desfavoráveis ao crescimento celular. Ela é regulada negativamente por TOR em levedura, ou seja, se as condições são favoráveis, TOR aumenta a fosforilação de Apg13 prevenindo sua associação a Apg1, com conseqüente inibição da autofagia (BLOMMAART *et al.*, 1995; KAMADA *et al.*, 2000; SHIGEMITSU *et al.*, 1999).

TOR atua ainda sobre proteínas participantes de mecanismos que regulam a concentração de aminoácidos na célula. Uma delas é a Npr1 (*Ser/Thr nitrogen permease reactivator kinase*) que em condições de abundância de nutrientes é fosforilada por TOR e inativada. Na falta de nutrientes, é desfosforilada e ativada, o que leva à ativação de uma proteína

denominada Gap1 (*general aminoacid permease*). Por outro lado, o efeito oposto, ou seja, desativação é induzido às permeases Hp1 (*histidine permease*) e a Tat2 (*tryptophan permease*) sob a mesma situação de estresse nutricional, em que as atividades de tais enzimas são inibidas em consequência do aumento em sua ubiquitinação e degradação (BECK *et al.*, 1999; SCHIMIDT *et al.*, 1998).

### 1.5 A VIA TOR NO *Trypanosoma cruzi*

Apesar da via TOR ainda não ter sido demonstrada no *T. cruzi*, em *Trypanosoma brucei* apenas um grupo identificou os genes TbTOR1 e TbTOR2, bem como os ortólogos de membros dos complexos TORC1 e TORC2, a saber, KOG1/Raptor e Avo3/Rictor, respectivamente. A princípio, seus papéis continuam os mesmos que em levedura, com TORC1 controlando o crescimento e o ciclo celular e TORC2 a polarização da célula e a citocinese. Foi visto também que 152 nM de rapamicina é capaz de inibir o crescimento de tripomastigotas sanguíneos em 50% (BARQUILLA *et al.*, 2008). Entretanto, o dado mais interessante é que ao contrário de levedura e demais eucariotos, rapamicina parece agir apenas sobre TORC2, sem efeito em TORC1 (BARQUILLA *et al.*, 2008). Em outro trabalho, ensaios de depleção da proteína TbTOR2 faz com que o parasita tenha os processos de citocinese, polarização celular e endocitose comprometidos (BARQUILLA e NAVARRO, 2009).

Outra quinase, com alto grau de similaridade com as quinases da via TOR de outros organismos como mamíferos e leveduras foi identificada no genoma de *T. brucei*. Essa quinase denominada de TbTOR-like1 é a única com o domínio PDZ (domínio exclusivo de tripanossomatídeos) e foi caracterizada e funcionalmente descrita como envolvida no controle dos níveis de fosfato e manutenção dos acidocalcisomos (DE JESUS *et al.*, 2010).

Recentemente (DIGIROLAMO *et al.*, 2012) identificou *in silico* possíveis genes com envolvimento na via TOR em *T. cruzi*. Por meio deste tipo de análise e identificação *in silico* nosso grupo também demonstrou a existência de genes que compõem a via TOR neste parasita, entretanto, a via TOR não foi caracterizada em *T. cruzi*.



Portanto, afim de se iniciar a caracterização dessa via em *T. cruzi*, nosso grupo propôs o estudo dos genes e proteínas envolvidas com a via TOR. O envolvimento nesse projeto teve início durante a minha iniciação científica (2009) em colaboração com o Dr Lauro Manhães, que na época estava começando a desenvolver seu pós-doutorado no ICC nessa linha de pesquisa. Os dados iniciais de análise do potencial de membrana da mitocôndria, mudanças na ultra-estrutura do parasita sob efeito da rapamicina e de morte celular foram obtidos anteriormente ao meu envolvimento no projeto e demonstram a existência da via TOR em *T. cruzi* bem como o seu envolvimento em alguns eventos celulares importantes.

A fim de verificar o efeito da rapamicina sobre o crescimento e desenvolvimento do *T. cruzi*, parasitas epimastigotas em fase exponencial de crescimento foram incubados em meio suplementado com diferentes concentrações de SFB e tratados com doses crescentes de rapamicina. Para cada ponto analisado, testes de viabilidade em citômetro de fluxo, usando iodeto de propídio como corante vital foram feitos e o índice de mortalidade de cada cultura foi calculado descontando o número de células mortas do número total de células, previamente determinado por contagem em câmara de Neubauer. De acordo com a Figura 09, observa-se que ao cultivar epimastigotas em meio LIT com 10% de SFB, as maiores concentrações de rapamicina provocaram um efeito citostático, diminuindo a concentração de parasitas em aproximadamente 10 e 2 vezes para os tratamentos com 20 e 12 µg/mL de rapamicina, respectivamente, após o terceiro dia. As demais concentrações, a saber, 1, 3 e 6 µg/mL não causaram efeito na proliferação, se comparado com a condição controle, em que foi usado apenas DMSO.

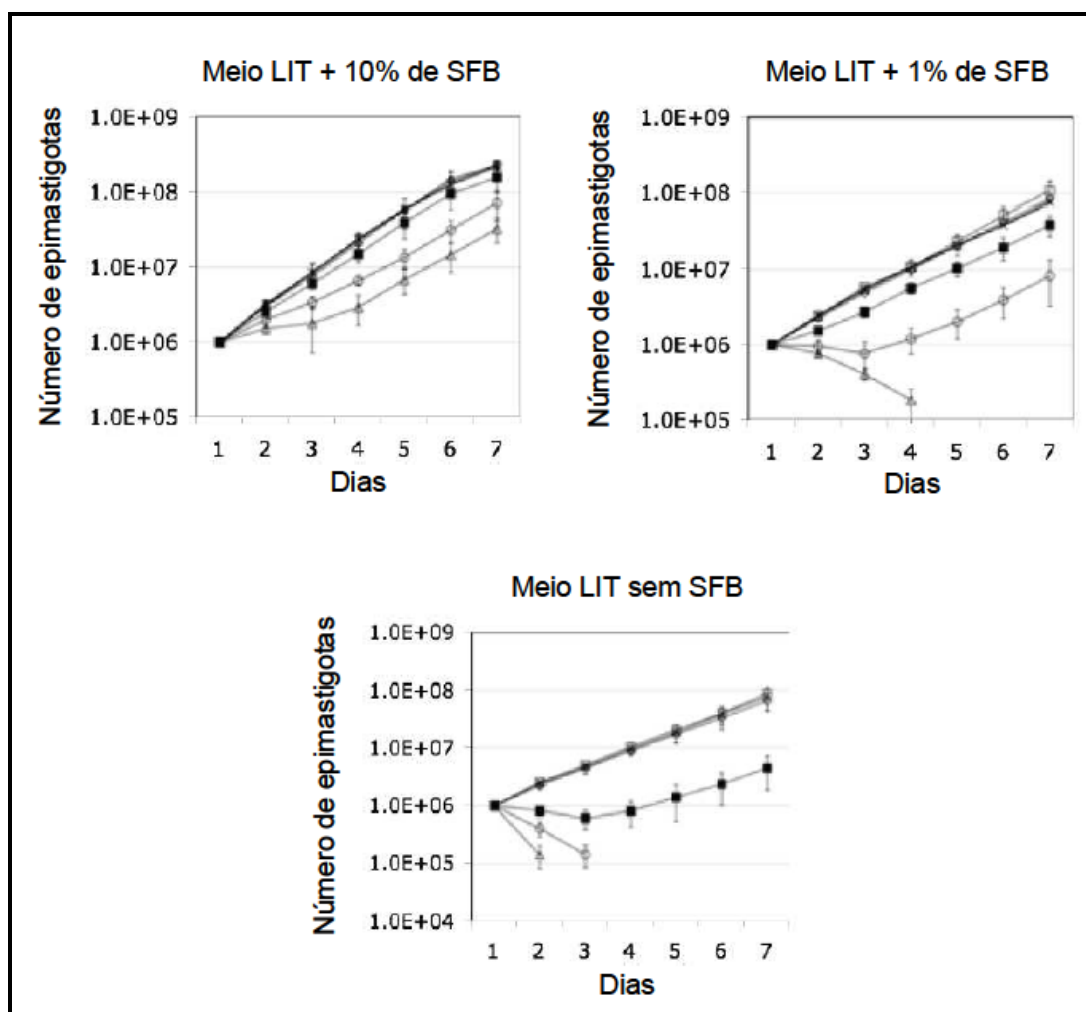
Vale ressaltar que a viabilidade das células em todos os tratamentos estava bem próxima a das células da cultura controle. Assim, para verificar se este efeito era devido a fator(es) presente(s) no SFB que estariam protegendo o parasita dos efeitos do tratamento com rapamicina, foram feitos novos testes diminuindo a concentração de SFB a 1% e até mesmo removendo-o completamente do meio LIT. Com 1% de SFB em meio LIT, observou-se que as células se tornavam mais sensíveis às doses maiores de rapamicina, onde 20 µg/mL induzia efeitos citotóxicos, enquanto 12 e 6 µg/mL retardavam o crescimento em 10 e 2 vezes, respectivamente, se comparadas às demais

condições. Em meio LIT desprovido de SFB o efeito citotóxico das duas maiores doses de rapamicina foram evidentes. Já a dose de 6 µg/mL retardou o crescimento em aproximadamente 10 vezes, se comparado aos outros tratamentos. Percebe-se assim que fatores presentes no SFB protegem epimastigotas dos efeitos da rapamicina, que podem variar de citostáticos a citotóxicos dependendo da dose de rapamicina e da suplementação com SFB. Interessante também foi notar que mesmo desprovido completamente de SFB, epimastigotas conseguiram alcançar, em tempo um pouco maior, uma concentração celular semelhante à de culturas contendo 1 e 10% de SFB. Assim, deste ponto em diante, os ensaios com rapamicina foram feitos utilizando as formas epimastigotas cultivadas em meio LIT sem SFB.

A fim de saber se a rapamicina estava induzindo mudanças no potencial da membrana mitocondrial, epimastigotas foram tratados com 20 µg/mL de rapamicina por 6 h, em seguida incubados por 30 minutos com rodamina 123 (r123) e por fim analisados por microscopia de fluorescência. A ligação de rodamina 123 à membrana mitocondrial se mostrou afetada pelo tratamento com 20 µg/mL de rapamicina por 6 h (Anexo I C e D), se comparado com culturas controle (Anexo I A e B) ou incubadas com baixas concentrações de rapamicina (dado não mostrado).

Formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento foram incubadas por até 48 h com diferentes concentrações de rapamicina e preparadas para microscopia eletrônica de transmissão para avaliação da ultraestrutura celular. Um controle, sem o tratamento com rapamicina também foi preparado, em que se observam formas características de epimastigota, como corpo alongado, flagelo emergindo da bolsa flagelar, mitocôndria única e ramificada e o cinetoplasto (Anexo II A). O tratamento com 3 µg/mL rapamicina induziu o surgimento de diversos vacúolos no citoplasma após 24 h (Anexo II B), com os reservosomas aparentemente se fundindo e sendo internalizados nesses vacúolos (Anexo II C), mas com a ultraestrutura mitocondrial inicialmente intacta (Anexo II D). Entretanto, após 48 h, porções da membrana dupla mitocondrial foram visualizadas no interior desses vacúolos, sugerindo mais fortemente a ocorrência de autofagia (Anexo II E). Incubações com 20 µg/mL de rapamicina por até 24 h revelaram um inchaço proeminente da mitocôndria com desaparecimento de material eletrondenso da matriz (Anexo II

G). Tal característica já era vista em estágios iniciais, com 3 h de incubação (Anexo II F). Apesar disso, algumas células exibiam cinetoplasto com arranjo normal do kDNA (Anexo II F e G).

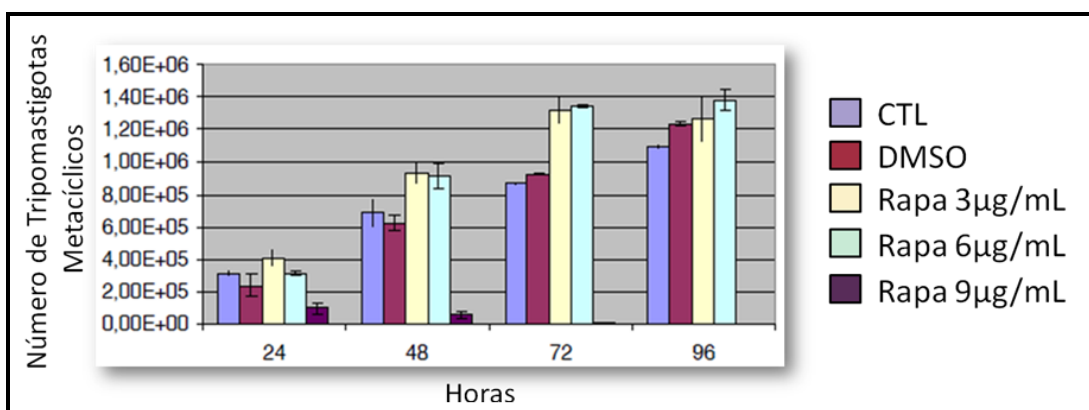


**Figura 09. Efeito da Rapamicina na proliferação e sobrevivência de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* cultivados em meio LIT suplementado com diferentes concentrações de SFB.** Legendas: (□) DMSO; (X) Rapamicina 1 µg/mL; (◇) Rapamicina 3 µg/mL; (■) Rapamicina 6 µg/mL; (○) Rapamicina 12 µg/mL; (Δ) 20 µg/mL.

Fonte: MANHÃES *et al.*, em preparação.

Culturas de epimastigotas tratadas com diferentes concentrações de rapamicina apresentaram alterações morfológicas e presença de formas tripomastigotas metacíclicas, sugerindo que o tratamento com a droga poderia mimetizar um ambiente escasso em nutrientes. Portanto, decidiu-se verificar o efeito deste composto no processo de metaciclogênese *in vitro*. Como descrito anteriormente, a diferenciação das formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas é disparada por um estresse nutricional, seguido de incubação em

meio TAU3AAG, composto apenas de sais, glicose e dos aminoácidos glutamato, prolina, e aspartato, portanto um meio pobre em nutrientes (BONALDO *et.al.*, 1988). Assim, foi verificado que células incubadas com 3 ou 6 µg/mL de rapamicina apresentavam um aumento de aproximadamente 50% na concentração de tripomastigotas metacíclicos, especialmente nos tempos 48 e 72 h, atingindo neste ponto o número máximo de tripomastigotas metacíclicos por mL de cultura (Figura 10). Com 96 h de incubação, a concentração celular de tripomastigotas metacíclicos das culturas controles se aproximava das tratadas com rapamicina. Entretanto, a dose de 9 µg/mL de rapamicina promoveu a morte dos parasitas em grande parte da população já nas primeiras 24 h de diferenciação, sugerindo ser uma dose capaz de mimetizar uma condição de privação de nutrientes além da ideal para a dinâmica da metaciclogênese (Figura 10).



**Figura 10. Efeito da rapamicina sobre a metaciclogênese do *T. cruzi* realizada em meio TAU3AAG por até 96 h, indicando aumento significativo (avaliado por teste *t* de Student,  $p < 0,05$ ) de aproximadamente 50% no número de tripomastigotas metacíclicos nos pontos 48 e 72 h, para o tratamento com 3 e 6 µg/mL de rapamicina.**

Fonte: MANHÃES *et al.*, em preparação.

Devido ao fato de a via TOR atuar como um sensor nutricional em diversos eucariotos e estar envolvida em processos celulares importantes, e, sabendo-se da importância do estresse nutricional no disparo da diferenciação do *T. cruzi* (CONTRERAS *et al.*, 1985; BONALDO *et al.*, 1988), decidimos investigar o papel desta via durante o processo de diferenciação (metaciclogênese) do parasita, evento que ao ser mais bem entendido poderá fornecer subsídios para novas abordagens no combate a doença de Chagas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar o papel da via TOR no processo de metaciclo gênese do *T. cruzi*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Buscar em bancos de dados de *T. cruzi* genes *TOR1*, *TOR2*, *TOR-like1*, *TOR-like2*, *Raptor*, *AVO3*, *Raptor-like* e *FKBP12* que estejam relacionados à via TOR em outros organismos, utilizando as ferramentas convencionais de bioinformática.
- Clonar, expressar e produzir anticorpos contra as proteínas TOR1, TOR2, TOR-like1, TOR-like2, Raptor, AVO3, Raptor-like e FKBP12.
- Verificar a presença das proteínas nos diferentes estágios do ciclo de vida do parasita.
- Determinar a localização celular das proteínas de interesse clonadas.
- Caracterizar proteínas associadas às proteínas da via TOR em parasitas tratados e não tratados com rapamicina, bem como em parasitas submetidos a estresse nutricional através de ensaios de imunoprecipitação, cromatografia de gel filtração e *pull down*, seguidos de espectrometria de massas.
- Construção de vetores para nocaute gênico e expressão de proteínas da via TOR em *T. cruzi*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 PROCEDÊNCIA DOS REAGENTES E MATERIAIS

**Amersham-Pharmacia Biotech:** dNTPs; Hybond C; Hybond N; kit ECL de *western blotting*; anticorpo anti-Histidina; radioisótopo  $\alpha$ -[P32]-dCTP (10  $\mu$ Ci/ $\mu$ l; 3.000 Ci/mmol); kit comercial para marcação por *Nick Translation*; colunas de Sephadex G-50 (ProbeQuant).

**Appligene:** Proteinase K.

**BioAgency:** cubetas de eletroporação estéreis com *gap* de 0,2 cm.

**BioRad:** azul de bromofenol; xilenocianol.

**Cult-lab:** soro fetal bovino.

**Difco:** extrato de levedura; infuso de fígado; triptose.

**Dupont:** tela intensificadora para revelação em filmes de raios-x (Dupont Cronex Lightining Plus).

**Gibco:** gentamicina; RPMI-1600; solução de aminoácidos (MEM *nonessential aminoacids*).

**Invitrogen:** DTT; EDTA; RNA *ladder*; RNase OUT<sup>TM</sup>; acrilamida; anticorpos secundários ALEXA 488; bis-acrilamida; BP clonase II<sup>TM</sup>; LR clonase<sup>TM</sup>; DAPI; sacarose; Taq DNA polimerase; Dynabeads® Protein A; fenol; TRIS; IPTG; agarose; X-Gal; marcador de massa molecular Bench Mark;  $\lambda$  DNA/*HindIII*; 1 kb Plus DNA Ladder; Platinum Taq DNA polimerase high fidelity.

**Merck:** acetato de sódio; ácido acético; ácido bórico; ácido clorídrico; álcool isoamílico; citrato de sódio; cloreto de cálcio; cloreto de lítio; cloreto de magnésio; cloreto de potássio; cloreto de sódio; clorofórmio; etanol absoluto; fosfato de potássio monobásico; fosfato dibásico de sódio; glicose; hidróxido de sódio; maltose; SDS; sulfato de amônia; sulfato de magnésio.

**Microbiológica:** hemina.

**Millipore:** filtro 0,22  $\mu$ m.

**New England Biolabs:** endonucleases de restrição.

**Promega:** reagentes para revelação com fosfatase alcalina (NBT e BCIP); anti-IgG de camundongo e coelho conjugado com peroxidase; pGEM-T Easy vector.

**Qiagen:** QIAprep® *spin Miniprep kit*, QIAprep® *spin Midiprep kit*, QIAquick® *Gel extraction kit*.

**Sigma:** monoclonal ANTI-FLAG® M2 produzido em camundongo; ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel; 3x FLAG® peptide; β-mercaptoetanol; ácido L-aspartico; ácido L-glutâmico; ampicilina; brometo de etídeo; BSA; cicloheximida; coquetel de inibidores de protease; DEAE26 celulose; DEPC; DMSO; DNA de esperma de salmão; ficoll; formaldeído; formamida; heparina; hepes; L-prolina; NP-40; RNA *sample buffer*.

**Serva Electrophoresis:** Alu-Gel S.

**TPP:** garrafas para cultivo de células.

**USB:** MOPS; sacarose.

### 3.2 SOLUÇÕES E TAMPÕES

**AP Buffer (tampão reação para fosfatase alcalina):** Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM.

**Brometo de Etídio:** solução 5,0 µg/mL.

**Fenol-clorofórmio-álcool isoamílico:** Fenol saturado 25 partes, clorofórmio 24 partes, álcool isoamílico 1 parte, Tris-HCl 100 mM pH 8,0 10 partes.

**Mix de dNTP:** dATP, dCTP, dGTP e dTTP (Amersham Biosciences) foram misturados e diluídos em Tris-HCl 10 mM pH 7,5 para obter uma solução estoque com concentração final de 2,5 mM de cada nucleotídeo. Mantido em congelador – 20 °C.

**Solução de bloqueio para Western blot:** PBS (KCl 2,7 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, NaHPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 4,3 mM; NaCl 137 mM), Tween 20 0,05%, leite em pó desnatado 5%.

**Solução de cloreto de cálcio para o preparo de bactérias cálcio competentes:** CaCl<sub>2</sub> 100 mM tamponada com HEPES 10 mM pH 7,0.

**Solução de descoloração para SDS-PAGE;** Metanol 30%, ácido acético 10%, H<sub>2</sub>O 60%.

**Solução de Ponceau S:** Ponceau S (Sigma P-3504) 0,5%, ácido acético glacial 1%.

**Solução para coloração de géis de proteínas SDS-PAGE:** Azul de comassie R-250 0,1% em metanol/ácido acético v/v (45%:10%), H<sub>2</sub>O 45%.

**Solução PBS-TWEEN 20:** PBS contendo Tween 20 na concentração de 0,05%.

**Solução TBE para eletroforese de DNA (Tris-ácido bórico-EDTA):** Tris-Base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM pH 8,0.

**Solução TE (Tris-EDTA):** Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM.

**SSC 20x:** Citrato de sódio 0,3 M pH 7,5, NaCl 3 M.

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

**Tampão de eletroporação de *T. cruzi*:** NaCl 140 mM, HEPES ácido 25 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,74 mM pH 7,5.

**TF (Tampão de amostra para DNA – Ficoll 10x):** Ficoll 25%, azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%.

**TG (Tampão de amostra para DNA – Glicerol 6x):** Azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%, glicerol 30%.

**Tampão de purificação de proteínas:** Triton X-100 2%, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, NaCl 0,5 M, Tris-HCl pH 8,0 10 mM, ureia 2 M.

**Tampão de sonicação de proteínas:** NaCl 500 mM, Triton X-100 2%, Tris-HCl pH 8,0 20 mM.

**Tampão de sonicação para proteína solúvel:** NaCl 500 mM, glicerol 10%, Tris-HCl pH 8,0 20 mM.

**Tampão de solubilização de proteínas:** NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, Tris-HCl 10 mM, uréia pH 8,0 8 M.

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

**Tampão PBS estoque (10x *Phosphate-buffered saline*):** KCl 2,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, NaHPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 4,3 mM, NaCl 137 mM.

**Tampão para SDS-PAGE:** Tris-HCl 0,037 M pH 8,4, glicina 192 mM pH 8,4, SDS 0,1%.

**Tampão TKM:** Tris-HCl 10 mM pH 7,4, MgCl<sub>2</sub> 10 mM e KCl 300 mM.

**Tampão TKM-P:** Tris-HCl 10 mM pH 7,4, MgCl<sub>2</sub> 2 mM e KCl 500 mM.



### 3.3 MEIOS DE CULTIVO

**Meio LB (Luria-Bertani):** Bacto-triptona 10 g/L, NaCl 5 g/L, extrato de levedura 5 g/L, LB-ágar: adição de 1,5% de Ágar-ágar.

**Meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*):** extrato de levedura 15 g/L; fosfato dibásico de sódio 11,56 g/L; glicose 2,2 g/L; hemina 0,02 g/L; infuso de fígado 5 g/L; KCl 0,4 g/L; NaCl 4,4 g/L; soro fetal bovino 10 % (v/v) e triptose 5 g/L. pH 7,2 ajustado com HCl.

**Meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) sem soro fetal bovino (s/SFB):** extrato de levedura 15 g/L; fosfato dibásico de sódio 11,56 g/L; glicose 2,2 g/L; hemina 0,02 g/L; infuso de fígado 5 g/L; KCl 0,4 g/L; NaCl 4,4 g/L e triptose 5 g/L. pH 7,2 ajustado com HCl.

**Meio TAU (*Triatomine Artificial Urine*):** CaCl<sub>2</sub> 2 mM; KCl 17 mM; MgCl<sub>2</sub> 2 mM; NaCl 190 mM; tampão fosfato pH 6,0 8 Mm.

**Meio TAU3AAG:** TAU suplementado com: ácido L-aspártico 2 mM, ácido L-glutâmico 50 mM, L-prolina 10 mM e glicose 10 mM.

### 3.4 ORGANISMOS MODELO

#### 3.4.1 *Escherichia coli*

**Genótipo BL21(DE3):** {pLysSTM {F<sup>-</sup>-ompThsdSB (rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>)Gal dcm (DE3) pLysS (Cm<sup>R</sup>)}.

**Genótipo DH5α<sup>TM</sup>:** {F<sup>-</sup>- recA1 endA1 hsdR17 (rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>) supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1}.

#### 3.4.2 *Trypanosoma cruzi*

Neste trabalho foram utilizadas formas epimastigotas, epimastigotas sob estresse nutricional, tripomastigotas metacíclicos, tripomastigotas e amastigotas do clone Dm28c (*Didelphis marsupialis*) de *T. cruzi* (CONTRERAS *et al.*, 1988; GOLDENBERG *et al.*, 1984). A diferenciação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos foi feita por meio da metaciclogênese *in vitro*,

descrita por CONTRERAS e colaboradores (1985) com algumas modificações, a serem descritas no item 3.5.3.

### 3.5 CULTIVO DE *T. cruzi*

#### 3.5.1 EPIMASTIGOTAS EM FASE LOGARÍTMICA DE CRESCIMENTO

Os epimastigotas (clone Dm28c) são armazenados em N<sub>2</sub> líquido e a cada seis meses um novo clone é descongelado e cultivado. Os epimastigotas são mantidos através de repiques realizados semanalmente em 100 mL de meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*), suplementado com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino), na concentração aproximada de  $6 \times 10^4$  parasitas/mL, a 28 °C. Ao fim de sete dias as células encontram-se em fase estacionária de crescimento. Para obter epimastigotas em fase exponencial de crescimento, foram feitos inóculos na concentração de  $10^6$  parasitas/mL em 100 mL de LIT. Após três dias de crescimento a 28 °C a cultura alcançou uma concentração de  $3 \times 10^7$  parasitas/mL. Outro repique nestas mesmas condições foi feito antes de utilizar os epimastigotas em fase de crescimento exponencial, designados “Epi 3 dias”.

#### 3.5 2 EPIMASTIGOTAS SOB ESTRESSE NUTRICIONAL

Formas epimastigotas provenientes de uma cultura ao final da fase logarítmica de crescimento, com densidade celular de aproximadamente  $5 \times 10^7$  células/mL, foram submetidos à centrifugação a uma velocidade de 7000 x g por 5 minutos a 4 °C. As células foram suspensas em meio TAU na concentração final de  $5 \times 10^8$  células/mL e incubadas a 28 °C por duas horas (CONTRERAS *et al.*, 1985).

### 3.5.3 DIFERENCIAÇÃO EM TRIPOMASTIGOTAS METACÍCLICOS

As formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* foram obtidas *in vitro*, sob condições quimicamente definidas de acordo com protocolo descrito por Contreras *et al.* (1985a,b) e Bonaldo *et al.* (1988). Os parasitas em fase estacionária de crescimento foram coletados por centrifugação (8.000 x *g* por 10 minutos a 4 °C) e incubados em TAU (5 x 10<sup>8</sup> células/mL) por 2 h a 28 °C. Decorrido esse período de estresse nutricional, 2 mL desta cultura foram transferidos para garrafas de cultivo celular contendo 200 mL de meio TAU suplementado de glicose e os aminoácidos prolina, glutamato e aspartato de sódio (TAU3AAG) atingindo uma concentração final de 5 x 10<sup>6</sup> parasitas/mL. Após 96 h de incubação as formas tripomastigotas metacíclicas foram recolhidas do sobrenadante do meio de cultura e purificadas por cromatografia em DEAE-51 celulose (CONTRERAS *et al.*, 1985).

### 3.6 OBTENÇÃO DE DNA DE *Trypanosoma cruzi*

A extração e purificação do DNA foram realizadas conforme descrito por MEDINA-ACOSTA e CROSS (1993). Aproximadamente 1 x 10<sup>7</sup> epimastigotas mantidos em crescimento exponencial (item 3.5.1) foram coletados por centrifugação a 8.000 x *g* por 10 minutos a 4 °C, lavados em PBS e suspensos em 350 µL de tampão TELT. Após 5 minutos de incubação em temperatura ambiente foi adicionado o mesmo volume de fenol/clorofórmio e o material foi centrifugado a 13.000 x *g* por 10 minutos. A fase aquosa foi recolhida e o DNA foi precipitado com o dobro do volume (2V) de etanol absoluto e coletado por centrifugação a 13.000 x *g* por 10 minutos. O DNA presente no sedimento foi lavado com etanol 70%, seco e em seguida suspenso em tampão TE contendo 20 µg/mL de RNase.

### 3.7 OBTENÇÃO DE EXTRATO PROTÉICO DE *Trypanosoma cruzi*

As formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT até a densidade de  $1 \times 10^7$  células/mL e coletadas por centrifugação (8.000 x g, 10 minutos a 4 °C), lavados duas vezes em PBS pH 7,2. Após as lavagens os parasitas foram suspensos em PBS (contendo solução de inibidores de proteases) e lisados em tampão de amostra para proteína para uma densidade de  $1 \times 10^6$  células/ $\mu$ L. Os extratos foram fervidos a 95 °C por 5 minutos e armazenados a – 80 °C.

### 3.8 TRANSFEÇÃO DE *T. cruzi* POR ELETROPORAÇÃO E SELEÇÃO DE PARASITAS

A inserção de DNA exógeno pode servir para vários tipos de estudos. Os parasitas podem ser transfectados quer seja com intuito de nocautear o gene em estudo e, portanto, estudar sua função pela ausência do gene, quer seja pelo estudo de superexpressão do produto gênico ou de proteínas fusionadas para conferir alguma característica única. Os vetores utilizados nesse trabalho serão abordados posteriormente.

Em cada transfecção foi utilizado um total de  $5 \times 10^8$  epimastigotas em fase logarítmica de crescimento. Os parasitas foram coletados e centrifugados a 7.000 x g por 5 minutos, lavados 2 vezes com PBS estéril e suspensos em 1 mL de tampão de eletroporação para *T. cruzi*. Em seguida 400  $\mu$ L dessa solução foram coletados e transferidos para uma cubeta de eletroporação de 0,2 mm. Cerca de 50  $\mu$ g de DNA exógeno foi misturado a essas células, que permaneceram em gelo por 10 minutos. A mistura foi submetida a 2 pulsos de eletroporação de 450 V e 500  $\mu$ F, no eletroporador GenePulser® Apparatus (Bio-Rad). Como controle de transfecção, uma alíquota de parasitas foi eletroporada na ausência de DNA exógeno. Em seguida, as células foram transferidas para garrafas de cultura de 25 cm<sup>3</sup>, contendo 10 mL de meio LIT e incubadas a 28 °C por 24 h. A seleção dos parasitas ocorreu a partir da adição de 500  $\mu$ g/mL do antibiótico G418. O gene que confere resistência ao antibiótico utilizado está presente nos vetores inseridos no parasita. Após cerca

de 4 a 5 dias, a cultura foi diluída na proporção 1:5 de meio LIT contendo 500 µg/mL de G418. Essas culturas foram cultivadas com passagens regulares até que a cultura controle não fosse mais viável (inibição total do crescimento), o que levou cerca de 30 a 40 dias.

### 3.9 PREPARAÇÃO DE BACTÉRIAS CÁLCIO-COMPETENTES

Para o preparo de bactérias cálcio-competentes, foi utilizado o método de CaCl<sub>2</sub> descrito em Sambrook e colaboradores (2001). Uma colônia de *E. coli* da cepa desejada foi inoculada em 5 mL de meio LB contendo antibiótico apropriado [50 µg/mL de canamicina, no caso de *E. coli* BI21 (DE3)]. A cultura foi incubada a 37 °C por 18 horas sob agitação constante de 220 rpm. Um volume de 1 mL desta cultura foi transferido para 100 mL de meio LB. As células foram incubadas a 37 °C sob as mesmas condições de agitação até alcançarem a fase de crescimento exponencial (D.O.600 de 0,6).

A cultura foi centrifugada a 4.000 x g por 5 minutos a 4 °C e as células foram suspensas em 50 mL (metade do volume original) de solução gelada de CaCl<sub>2</sub> 100 mM tamponada com HEPES 10 mM pH 7,0 e mantidas no gelo durante 30 minutos.

A suspensão foi submetida à centrifugação nas mesmas condições anteriores, as células foram suspensas em 2 mL (1/50 do volume da cultura original) da solução anterior acrescida de 10% de glicerol, mantidas no gelo seco por 2 h e em seguida aliqüotadas e armazenadas a – 80 °C.

### 3.10 TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS CÁLCIO-COMPETENTES

Reações de recombinação ou ligação foram incubadas com 100 µL da suspensão de *E. coli* cálcio-competentes por 30 minutos no gelo. Após esse período, as células foram submetidas ao choque térmico pela incubação a 42 °C por 2 minutos, seguido de incubação de 2 minutos no gelo e posterior adição de 1 mL de meio LB para incubação sob agitação constante de 220 rpm a 37 °C por uma hora.

Alíquotas de 100  $\mu$ L e 900  $\mu$ L foram espalhadas em meio LB-ágar adicionado de antibiótico (meio seletivo) de acordo com a resistência conferida pelo vetor utilizado na transformação de bactérias, e incubadas a 37 °C por 18 h. As colônias crescidas nessas condições foram analisadas por PCR de colônia, conforme descrito no item a seguir. No caso de clonagem em pGEM, o meio LB-ágar foi adicionado de 100  $\mu$ g/mL de ampicilina, 0,04 mg/mL de X-gal e 0,4 mM de IPTG. Neste caso, a seleção dos clones positivos foi feita pela análise da cor das colônias, devido a presença ou ausência da expressão da enzima  $\beta$ -galactosidase. Esta, cuja expressão é induzida por IPTG, degrada o substrato X-Gal produzindo um substrato azul. Caso o fragmento seja incorporado ao vetor, a enzima  $\beta$ -galactosidase não é expressa e as colônias permanecem brancas, facilitando a identificação dos clones positivos, que posteriormente foram sequenciados.

### 3.11 PCR DE COLÔNIA

Após o crescimento em meio seletivo, cada colônia foi coletada e misturada em 10  $\mu$ L de água deionizada, sendo utilizado 1  $\mu$ L dessa suspensão para cada 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  $\mu$ L. As amostras foram incubadas inicialmente com um *holding* de 94 °C por 10 minutos seguidos de 35 ciclos de amplificação. As temperaturas e tempo de anelamento e extensão foram padronizados para cada caso devido às características dos iniciadores e tamanho do fragmento amplificado.

### 3.12 CLONAGEM E EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM SISTEMA HETERÓLOGO

#### 3.12.1 DESENHO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES

As sequências dos genes previamente descritos (IDs encontram-se no Quadro 01) foram analisadas e oligonucleotídeos iniciadores específicos para

cada gene foram desenhados com auxílio do programa Primer-Select (Lasergene, DNASTar) e estão listados no Quadro 01.

| Gene        | ID (Trytrip)           | Iniciador | Sequência                        | Amplicon (bp) |
|-------------|------------------------|-----------|----------------------------------|---------------|
| TOR1        | Tc00.1047053508231.30  | F1        | 5'TCCCCATCTTCAATGAACTCCATT3'     | 716           |
|             |                        | R1        | 5'CCTAGGCACCATGCTGCAAGTC3'       | 1016          |
|             |                        | F2        | 5'TCATCTCAGCATCCGATATCTCCGTTTC3' |               |
|             |                        | R2        | 5'CCTAATTCTGACGAATCTCGAGACGCTC3' |               |
| TOR2        | Tc00.1047053510689.40  | F1        | 5'TCATGTCTACATCGTCTGGGAGGG3'     | 854           |
|             |                        | R1        | 5'CCTACCGCACAAATTCGGAGTTCG3'     | 926           |
|             |                        | F2        | 5'TCCGTTGTGCGCTGAGTGAACTTC3'     |               |
|             |                        | R2        | 5'CCTATAGTGAACGCCTGCAACTCC3'     |               |
| TOR-like1   | Tc00.1047053508257.230 | F1        | 5'TCATGACGGATGCAGCGGAGCCT3'      | 1029          |
|             |                        | R1        | 5'CCTAAACCACCGCAACGCTTTCCTCC3'   | 1205          |
|             |                        | F2        | 5'TCCACATGACAGAACGCTATCCCTC3'    |               |
|             |                        | R2        | 5'CCTAAAGTTACGTCTTAGGACGGACTG3'  |               |
| TOR-like2   | Tc00.1047053506475.14  | F1        | 5'TCGACAATCTTCAGGATTCAAAGCGG3'   | 1064          |
|             |                        | R1        | 5'CCTAATGATCCATCAATGGTGCCAGAG3'  | 1034          |
|             |                        | F2        | 5'TCTTAAGCGAAGACCTTGACCTC3'      |               |
|             |                        | R2        | 5'CCTACGCAATTCGGAATTTTCACA3'     |               |
| Raptor      | Tc00.1047053506925.30  | F1        | 5'TCATAAATCAAGGCACGGAAGAATT3'    | 641           |
|             |                        | R1        | 5'CCTATTTTTCCATCTGCACACGGC3'     | 575           |
|             |                        | F2        | 5'TCTTGAATGCAGTACCAATCCGA3'      |               |
|             |                        | R2        | 5'CCTAACCAGTCCATTATCCTCCGC3'     |               |
| AVO3        | Tc00.1047053510517.70  | F1        | 5'TCTTTTCAAAGCACGTGTCAGGTA3'     | 677           |
|             |                        | R1        | 5'CCTACGCCTGACTCTTCGTTTGG3'      | 854           |
|             |                        | F2        | 5'TCATGGAGAGTGAGGTAATTCGCC3'     |               |
|             |                        | R2        | 5'CCTAACGCTTATGCAGACCTGGAACG3'   |               |
| FKBP12      | Tc00.1047053508323.84  | F         | 5'TCATGCCGGCGAATGACTGC3'         | 339           |
|             |                        | R         | 5'CCTAAGCAACGTCCAGTAGTGTCACCTC3' |               |
| Raptor-like | Tc00.1047053508999.269 | F         | 5'TCATGACTTCCGAGGAGGAACCG3'      | 1104          |
|             |                        | R         | 5'CCTAAAGGATATCAGACGGCAGTTTGG3'  |               |

**Quadro 01. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores para cada gene selecionado bem como o tamanho esperado do amplicon (bp).**

### 3.12.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Os genes *TOR1*, *TOR2*, *TOR-like1*, *TOR-like2*, *Raptor*, *AVO3*, *Raptor-like* e *FKBP12* foram amplificados através da técnica de PCR, utilizando enzimas comerciais. As concentrações dos reagentes e condições de amplificação foram estabelecidas de acordo com as recomendações do fabricante da enzima, sujeitas a alterações na temperatura de anelamento para obtenção de melhores resultados. O Quadro 02 mostra a concentração ótima de cada reagente para cada enzima utilizada.

| Componente        | Concentração Estoque          | Concentração Final  |                             |
|-------------------|-------------------------------|---------------------|-----------------------------|
|                   |                               | Taq DNA Polimerase® | Platinum® Taq High Fidelity |
| Tampão            | 10x                           | 1x                  | 1x                          |
| MgCl <sub>2</sub> | 50 mM                         | 1,5 mM              | X                           |
| MgSO <sub>4</sub> | 50 mM                         | X                   | 2,0 mM                      |
| dNTP              | 10 mM                         | 0,3 mM              | 0,3 mM                      |
| Primers           | 10 pmol/μL                    | 1 pmol/μL           | 1 pmol/μL                   |
| Taq               | 5 U/μL                        | 0,05 U/μL           | 0,1 U/μL                    |
| DNA               | Quantidade e fontes variáveis |                     |                             |

**Quadro 02. Concentrações dos reagentes utilizados nas reações de PCR.**

A amplificação dos genes por PCR a partir de DNA genômico foi realizada utilizando 100 ng de DNA genômico de *T. cruzi* em uma reação com volume final de 50 μL com a enzima Platinum® Taq High Fidelity DNA. A ciclagem consistiu de um passo inicial de 2 minutos a 94 °C, seguido por 30 ciclos de 15 segundos a 94 °C, 30 segundos em temperatura de anelamento ótima para cada gene (ver Quadro 03) e 2 minutos a 68 °C.

| Gene        | Iniciador | Temperatura de anelamento (°C) |
|-------------|-----------|--------------------------------|
| TOR1        | F1        | 55                             |
|             | R1        |                                |
| TOR2        | F2        | 55                             |
|             | R2        |                                |
| TOR-like1   | F1        | 55                             |
|             | R1        |                                |
| TOR-like2   | F2        | 55                             |
|             | R2        |                                |
| Raptor      | F1        | 55                             |
|             | R1        |                                |
| AVO3        | F2        | 55                             |
|             | R2        |                                |
| FKBP12      | F         | 55                             |
| Raptor-like | R         | 57                             |
|             | F         |                                |

**Quadro 03. Temperaturas ideais de anelamento para amplificação dos genes por PCR.**



### 3.12.3 ELETROFORESE DE DNA

As amostras de DNA dos diversos experimentos realizados foram diluídas em TF ou TG e aplicadas em gel de agarose 1%.

Cubas de eletroforese horizontal de diversos tamanhos foram utilizadas para corrida de géis de agarose. As corridas foram feitas imersas em tampão TBE, a 100 V por aproximadamente 1 h. Após a corrida, os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados em câmera Kodak Digital Science, com o programa apropriado.

### 3.12.4 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

Os produtos de PCR foram purificados por precipitação com PEG (30% PEG 8000, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, Gateway/Invitrogen). Ao volume de reação de PCR foram adicionados 4 volumes de tampão TE e 2 volumes de PEG. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas por 15 minutos a 14.000 x g. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento obtido contendo o DNA purificado foi incubado a 70 °C durante 15 minutos. O DNA seco foi reidratado em 10 µL de água ultra-pura, quantificado por meio do equipamento NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific) e estocado a – 20 °C para posterior uso.

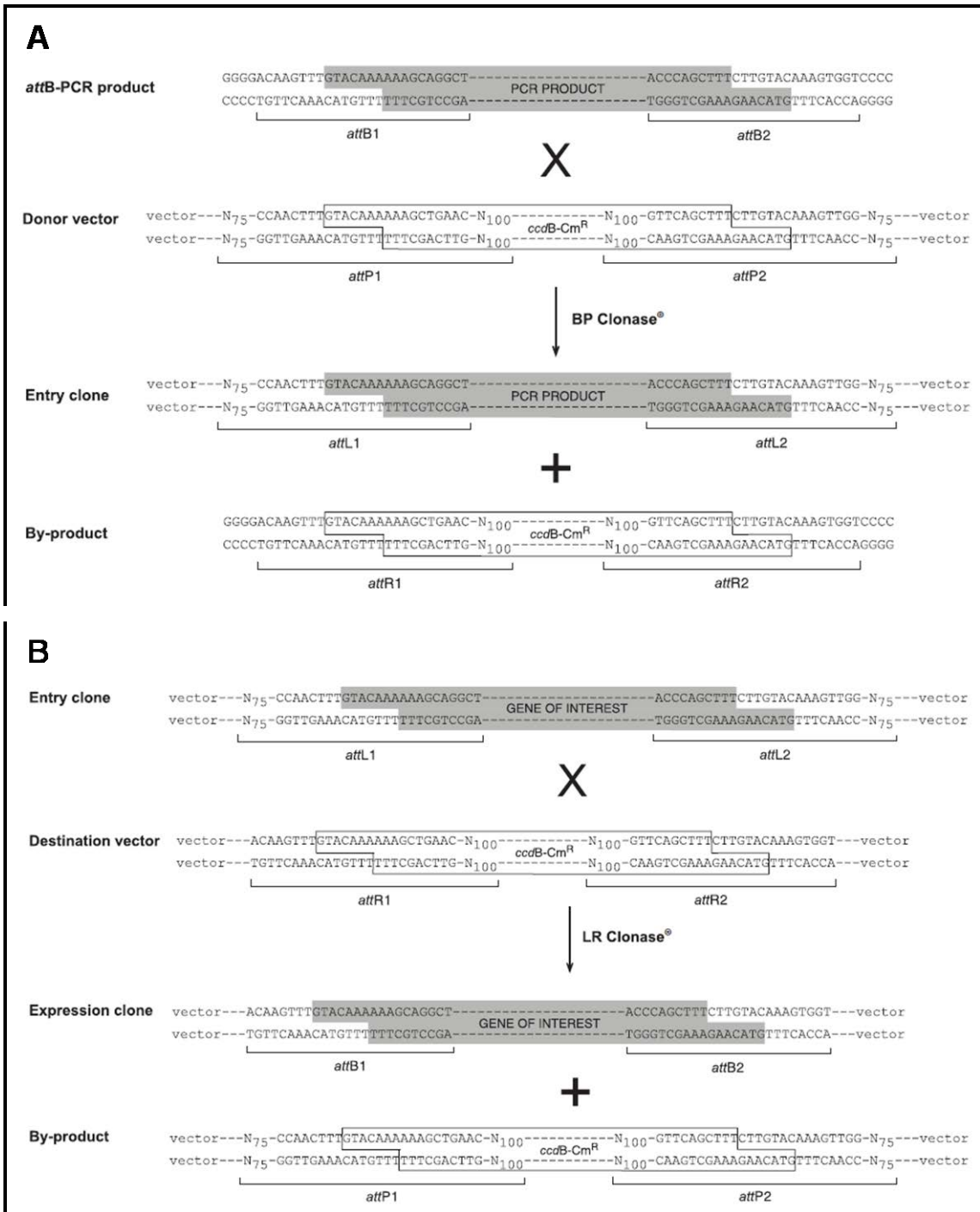
### 3.12.5 PLATAFORMA GATEWAY® DE CLONAGEM

O sistema comercial de clonagem Gateway® (Invitrogen) é baseado em recombinação utilizando sequencias sítio específicas do bacteriófago *lambda*, que permitem uma grande versatilidade e rapidez de clonagem, uma vez que não utilizam enzimas de restrição, ligases, passos de subclonagem ou de triagem de colônias. O produto de PCR pode ser diretamente inserido no vetor de entrada (pDONR™221) a partir de sítios *attB* (*attachment*) presentes no início do oligonucleotídeo iniciador que não hibridizam com o gene a ser clonado. Tais sítios são recombinados a sítios *attP* (presentes no vetor de entrada) por meio da enzima BP Clonase II™, gerando sítios *attL*, no vetor contendo o inserto clonado, e *attR* no subproduto da reação que contém o

gene *ccdB*. Tal gene previne o crescimento de bactérias que possam ter recebido o vetor sem o inserto. O sítio *attL* do vetor de entrada pode ser utilizado para recombinação com sítio *attR* em diversos vetores de destino (pDEST<sup>TM</sup>17, pDEST<sup>TM</sup>15, entre outros) pela ação da enzima LR Clonase II<sup>TM</sup>. O vetor de destino pode ser utilizado para expressão heteróloga em bactérias, por exemplo, como é o caso do pDEST<sup>TM</sup>17, que fusiona uma cauda de seis histidinas à proteína. Essa plataforma e suas reações direcionais podem ser melhor visualizadas na Figura 11.

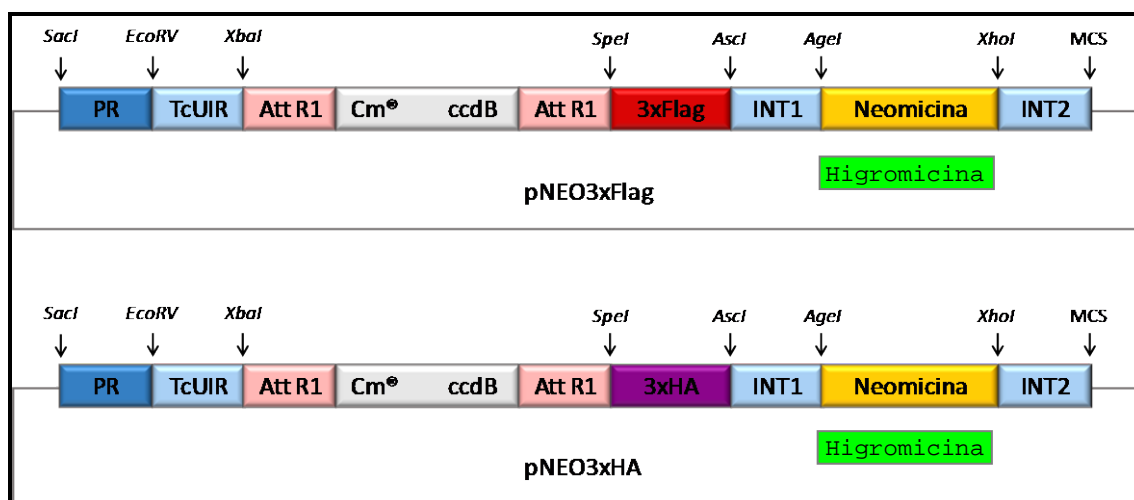
Vetores de destino específicos para utilização em *T. cruzi* da plataforma Gateway® foram confeccionados em nosso instituto (GONÇALVES *et al.*, em preparação). Tais vetores possuem características específicas que tornam possível a inserção correta de DNA exógeno tanto episossomal como integrado ao genoma do parasita. Esta metodologia será detalhada posteriormente. Além de possuírem promotores ribossomais de tripanossomatídeos (promotores de polimerase I), tais vetores devem ser flanqueados por regiões intergênicas que permitam tanto a adição do mini-éxon quanto à cauda de poliadenilação. Geralmente essas regiões intergênicas provêm de genes constitutivamente expressos como gliceraldeído-3-fosfato (GAPDH), actina ou  $\alpha$ -tubulina. As etiquetas de fusão disponíveis que permitem diversos tipos de estudos funcionais em nosso instituto e o desenho esquemático desses vetores de destino podem ser visualizados na Figura 12.

Neste trabalho o vetor pTcFLAG (etiqueta FLAG para auxiliar na imunoprecipitação de complexos) foi utilizado para clonagem das porções 3' dos genes *TOR1*, *TOR2*, *TOR-like1*, *TOR-like2*, *Raptor* e *AVO3*.



**Figura 11. Recombinações entre os vetores da plataforma Gateway®.** A) Diagrama esquemático mostrando a recombinação entre os sítios *attB* e *attP*, para a inserção do produto de PCR no vetor de entrada. B) Diagrama esquemático mostrando a recombinação entre os sítios *attL* e *attR*, para a obtenção do clone de expressão.

Fonte: Manual Gateway® Technology – Invitrogen.



**Figura 12. Desenho esquemático dos vetores de destino da plataforma Gateway® disponíveis no Instituto Carlos Chagas.** Os elementos mostrados são: Resistência à Neomicina (NEO) ou à Higromicina (HIGRO), região intergênica de ubiquitina de *T. cruzi* (TcUIR), sítios *att* para a recombinação do sistema Gateway® (*attR1* e *attR2*), gene de resistência ao cloranfenicol (Cm<sup>R</sup>), gene para seleção negativa durante a clonagem (*ccdB*), etiquetas de fusão (3xFLAG, 3xHA) e promotor ribossomal (PR).

Fonte: GONÇALVES, 2013.

### 3.12.6 OBTENÇÃO DE CLONES EM VETOR DE ENTRADA

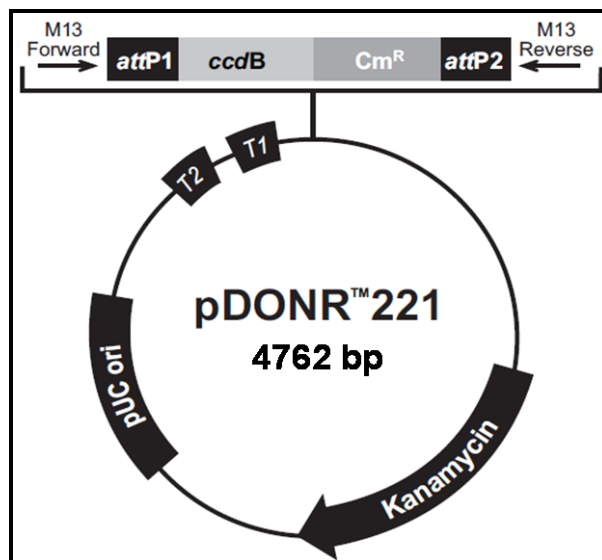
A inserção dos produtos de PCR amplificados em vetor de entrada foi feito de acordo com o manual do fabricante (o vetor escolhido foi o pDONR<sup>TM</sup>221, que possui resistência a canamicina e o mapa desse vetor está ilustrado na Figura 13). Cerca de 150 ng de pDONR<sup>TM</sup>221 foram misturados a 50 fmol de produto de PCR contendo os sítios *attB* em uma solução com volume final de 10 µL em tampão TE e 1 µL de enzima BP Clonase<sup>TM</sup> II foi adicionada. A reação foi incubada a 16 °C durante 16 h e em seguida, a enzima da reação foi desnaturada pela ação de 2 µg de Proteinase K (37 °C por 10 minutos).

As reações de recombinação foram utilizadas para a transformação de bactérias *E. coli* DH5α, como previamente descrito, com intuito de amplificar o vetor de entrada contendo o inserto. A presença do inserto foi confirmada a partir de PCR de colônia, como descrito no item 3.11.

Após a confirmação, as colônias específicas para cada gene foram escolhidas para serem inoculadas em 2 mL de meio líquido adicionado de 50

µg/mL de canamicina, incubadas a 37 °C sob agitação constante durante 16 h, para purificação do vetor.

A purificação do plasmídeo foi feita a partir do método de lise alcalina, com auxílio do Kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen), conforme orientação do fabricante.



**Figura 13. Mapa do vetor de entrada pDONR™221 (Invitrogen).** pUC ori: origem de replicação de alta cópia. attP1/attP2: sequência de 200 bp presente no pDNOR para recombinação com sítio attB presente no produto PCR. ccdB: gene que permite seleção negativa do pDNOR, interferindo na DNA girase de *E. coli*, que é substituído após recombinação com o sítio attB do produto de PCR. Kanamycin: gene de resistência à 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.

### 3.12.7 OBTENÇÃO DOS CLONES EM VETOR DE DESTINO

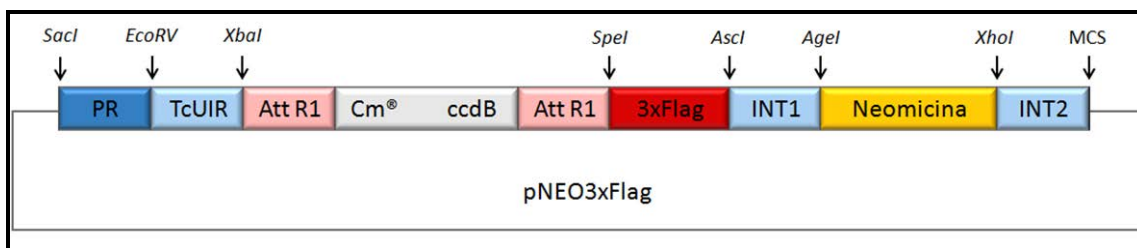
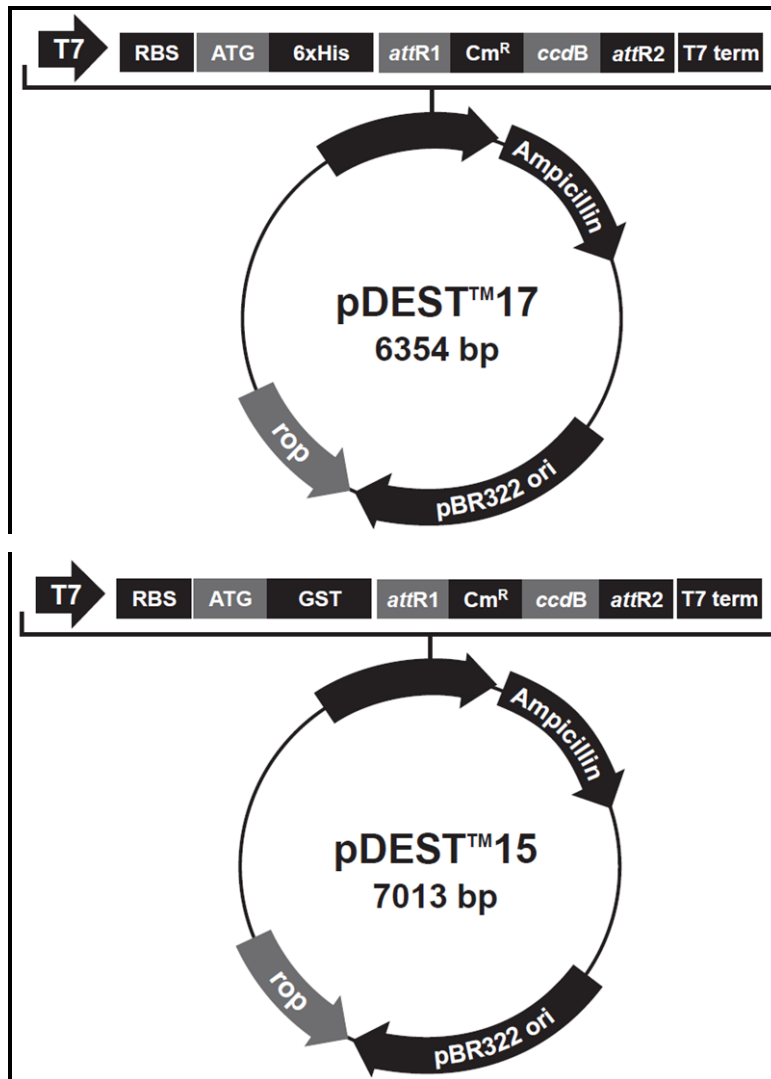
Os vetores de destino escolhidos possuem resistência à ampicilina e estão listados a seguir: pDEST™17 (Cauda de histidinas fusionada à proteína, visando a purificação, inoculação e produção de anticorpos), pDEST™15 (Cauda de GST fusionada à proteína, visando aumentar a solubilidade da proteína) e pTcFLAG (Cauda de FLAG fusionada à proteína visando a transfecção tanto episomal como integrada ao genoma do *T. cruzi* para

produção da proteína na célula e posterior realização de ensaios de caracterização da proteína de estudo). Os mapas desses vetores estão ilustrados na Figura 14.

A reação LR de recombinação foi feita de acordo com o manual do fabricante: 150 ng de vetor de destino foram misturados a 150 ng de vetor de entrada contendo o gene de interesse (pDONR<sup>TM</sup>221) em 10 µL de volume final de tampão TE e 1 µL da enzima LR Clonase<sup>TM</sup> II foi adicionado. A reação foi incubada a 16 °C durante 16 h e em seguida, a enzima foi desnaturada pela ação de 2 µg de Proteinase K.

As reações de recombinação foram utilizadas para a transformação de bactérias *E. coli* DH5α, como previamente descrito, e a presença do inserto foi confirmada a partir de PCR de colônia. As colônias específicas para cada gene foram escolhidas para serem inoculadas em meio líquido adicionado de 100 µg/mL de ampicilina, incubadas a 37 °C sob agitação constante durante 16 h, para purificação do vetor.

A purificação do plasmídeo foi feita a partir do método de lise alcalina, com auxílio do Kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen), conforme orientação do fabricante. O plasmídeo purificado foi sequenciado e após a confirmação da clonagem, este clone foi utilizado para transformação de *E. coli* da cepa BL21 (DE3) cálcio-competente, apropriada para a expressão de genes produzindo proteínas recombinantes através de indução por IPTG.



**Figura 14.** Mapa do vetor pDEST™17 e pDEST™15 (Invitrogen) de expressão de genes em bactérias e do vetor pTcFLAG de transfecção e expressão de proteínas em *T. cruzi*. T7: Promotor de T7 RNA Polimerase. RBS: Região de ligação ao ribossomo. ATG: Códon de início. 6xHis: Etiqueta de histidinas N-terminal. GST: Etiqueta de GST N-terminal. Sítios *attR* (*attR1* e *attR2*): região de recombinação LR com vetor de entrada pDNOR. CmR : gene de resistência ao cloranfenicol. *Ampicilin*: gene de resistência à ampicilina. *ccdB*: gene que permite seleção negativa do pDEST™17 e pDEST™15. T7 term: região de término da transcrição. NEO: resistência à Neomicina. *TcUIR*: região intergênica de ubiquitina de *T. cruzi*. 3xFLAG: etiqueta de fusão. PR: promotor ribossomal.  
 FONTE: Catálogo Gateway® Technology Invitrogen.

### 3.12.8 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Uma colônia de *E. coli* da cepa BL21 (DE3) transformada com o clone do gene de estudo foi inoculada em 2 mL de meio LB adicionado de 100 µg/mL de ampicilina e incubada a 37 °C sob agitação constante de 220 rpm durante 18 h. Após o período de incubação, 200 µL desta cultura foram transferidos para 2 mL de meio LB adicionado de 100 µg/mL de ampicilina. As células foram incubadas a 37 °C sob as mesmas condições de agitação até atingir a D.O.600 de 0,6. Nesta etapa, 1 mM de IPTG foi adicionado à cultura e a incubação prosseguiu por mais 3 h nas mesmas condições. Para o controle da indução de expressão do gene de estudo, uma cultura foi mantida nas mesmas condições, mas sem adição de IPTG (cultura não induzida). Células destas culturas foram sedimentadas a 6.000 x g por 10 minutos a 4 °C, lavadas com PBS e suspensas em tampão de amostra para proteínas.

Para a análise de solubilidade da proteína recombinante, células da cultura induzida foram sedimentadas a 6.000 x g por 10 minutos a 4 °C, lavadas com PBS e suspensas em tampão de sonicação. As células foram lisadas por sonicação através de 5 ciclos de potência 5 por 15 segundos (Homogenizador 4710 - Cole Parmer) com intervalos de 2 minutos de incubação no gelo seguido de centrifugação a 6.000 x g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante (fração de proteínas solúveis) e o sedimento (fração de proteínas insolúveis) foram separados e adicionados de tampão de amostra para proteínas. Todos os extratos proteicos foram desnaturados por aquecimento a 95 °C por 5 minutos. Este protocolo permitiu verificar em gel desnaturante (SDS-PAGE) a indução e a solubilidade do peptídeo recombinante.

A indução da expressão de proteínas recombinantes em larga escala foi realizada de acordo com o protocolo descrito anteriormente, com modificações proporcionais para o volume final de 200 mL, seguido de indução por 1 mM de IPTG. Após o período de indução, as células foram submetidas à centrifugação a 6.000 x g por 10 minutos a 4 °C, o sedimento foi lavado com PBS e suspenso em 5 mL de tampão de sonicação. A lise das células foi realizada por sonicação através de 5 ciclos de potência 9 por 15 segundos, seguido de



centrifugação a 6.000 x *g* por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi suspenso em tampão de purificação.

Após sucessivas lavagens com tampão de purificação, o material foi submetido à centrifugação a 6.000 x *g* por 10 minutos e o sedimento suspenso em tampão de solubilização de proteínas. Estes procedimentos de lavagens foram realizados para otimizar o enriquecimento da proteína recombinante na fração insolúvel. A eficiência do protocolo foi analisada através de eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE).

Após as etapas de enriquecimento, as proteínas insolúveis foram purificadas através de gel preparativo de poliacrilamida (SDS-PAGE) de 15 cm de largura por 10 cm de altura. Nas frações enriquecidas com a proteína insolúvel foi adicionado tampão de amostra de proteínas em volume final de 5 mL e aplicadas em um único canal. A eletroforese foi realizada a 20 mA por 16h. Após este período, o gel foi incubado em solução de KCl 100 mM gelada e a banda correspondente à proteína recombinante foi retirada e eletroeluída por 2 h a 60V em tampão para SDS-PAGE.

### 3.12.9 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES SOLÚVEIS

Bactérias *E. coli* da linhagem BL21 (DE3) pLysS foram transformadas com 2 µL do plasmídeo de destino (pDEST<sup>TM</sup>15 contendo o gene de estudo) purificado. Após o crescimento em meio seletivo e confirmação por PCR as colônias que apresentavam o inserto em questão foram inoculadas em 25 mL de meio LB, e incubadas por 16 h a 37 °C sob agitação constante. Após esta etapa de incubação, a cultura foi diluída na proporção de 1:10 em volume final de 200 mL, incubada nas mesmas condições e monitorada até atingir D.O.600 entre 0,4 e 0,6. Antes da indução da proteína recombinante solúvel, as bactérias sofreram choque térmico (em gelo por 10 minutos) e estresse pela adição de etanol a uma concentração final de 3 % (em gelo por 1 h). Este protocolo foi realizado para aumentar a produção de chaperonas capazes de dobrar com mais eficiência as proteínas recombinantes. Após esta etapa, a cultura foi mantida a 37 °C por 30 minutos sob agitação constante, e

adicionada de IPTG a uma concentração final de 0,5 mM para induzir a expressão da proteína. A cultura foi mantida sob agitação de 200 rpm a 25 °C por 16 h. Após esse período, as bactérias foram sedimentadas por centrifugação a 5.000 x g por 5 minutos a 4 °C. O sedimento bacteriano foi suspenso em tampão de sonicação para proteína solúvel e sonicado em banho de gelo por 4 ciclos de 15 segundos com intervalos de 1 minuto em potência 9 (Homogeneizador 4710, ColeParmer). O lisado foi centrifugado a 10.000 x g por 15 minutos a 4 °C para a separação das frações solúvel (sobrenadante) e insolúvel (sedimento). A fração insolúvel foi então ressuspendida em tampão de solubilização de proteínas. Alíquotas das frações solúvel, insolúvel e controle não-induzido foram analisadas em gel SDS-PAGE. A concentração de proteína foi quantificada por comparação a uma curva de concentrações crescentes de BSA.

A fração solúvel (adicionada de inibidores de proteases) foi purificada a partir da resina de Glutathione Sepharose® 4B (Amersham-Biosciences), que liga especificamente à proteína GST fusionada à proteína de interesse. O volume de 400 µL de resina foram empacotados em uma coluna cromatográfica, lavados 3 vezes com PBS e incubados com a fração solúvel da proteína de estudo por 2 h a 4 °C. Após essa incubação, a coluna foi aberta e o sobrenadante (fração não ligada) foi recolhido para posterior análise. A resina foi então lavada com 3 volumes de PBS (30 mL), coletando-se as 3 frações iniciais de 1 mL (Lavado 1, 2 e 3). O restante do volume de lavagem foi descartado. Em seguida, a proteína solúvel foi eluída com 500 µL de solução de Glutathione reduzida pH 7,5 (30 mg de Glutathione reduzida em 10 mL de Tris-HCl 50 mM pH 8,0) e estocada a – 80 °C para posterior uso. Esse passo de eluição pode ser repetido quantas vezes forem necessárias para recuperar o máximo de proteína fusionada à GST.

### 3.13 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS

#### 3.13.1 SDS-PAGE

O protocolo de eletroforese desnaturante em géis de poliacrilamida foi feito conforme descrito por LAEMMLI (1970). Os géis foram corados com azul de coomassie ou por coloração de prata, dependendo da sensibilidade de detecção necessária.

#### 3.13.2 COLORAÇÃO POR PRATA

A coloração por prata seguiu quatro passos principais: (1) fixação do gel com uma solução de fixação (etanol 50%; ácido acético glacial 12% e 50 µL de formaldeído 37% em 100 mL) por 30 minutos; (2) sensibilização do gel com solução de sensibilização (0,02% de tiosulfato de sódio em 100 mL) por 2 minutos; (3) coloração do gel com solução de prata (0,2% de nitrato de prata acrescido de 50 µL de formaldeído 37% em 100 mL) por 30 minutos. O gel foi lavado 3 vezes de 5 minutos em água mili-Q para tirar o excesso de prata e (4) revelado em solução de revelação (3% de carbonato de sódio acrescido de 2 mL de solução de sensibilização e 75 µL de formaldeído 37% em 100 mL) por tempo variado, até que as bandas aparecessem. A solução de parada utilizada foi a mesma de fixação, porém sem a adição de formaldeído 37%.

### 3.14 CLONAGEM DOS GENES DE INTERESSE PARA INTEGRAÇÃO NO GENOMA OU NA FORMA EPISSOMAL VISANDO A EXPRESSÃO DE PROTEÍNA FUSIONADA A FLAG C-TERMINAL EM *T. cruzi*

Para a obtenção de proteínas fusionadas à etiqueta FLAG, foram realizadas clonagens dos genes de interesse na forma epissomal, bem como integrados no genoma do *T. cruzi*. Esta metodologia permite integrar uma etiqueta na porção C-terminal da proteína de interesse facilitando os ensaios de imunolocalização bem como de imunoprecipitação das proteínas alvo, pois

dispensa a produção de anticorpos específicos contra cada proteína, uma vez que anticorpos contra FLAG estão disponíveis comercialmente.

Porções finais C-terminal das proteínas TOR1, TOR2, TOR-like1, TOR-like2, Raptor e AVO3, e a proteína FKBP12 inteira (sem os códons de parada), foram fusionadas a FLAG C-terminal em vetor pTcFLAG que permite a recombinação com o inserto clonado em vetor pDONR™221, conforme o fabricante (Invitrogen- Catálogos 12535-019 e 12535-027), citado no item 3.12.6.

Entretanto, como o objetivo dessa metodologia, além da expressão episomal (feita apenas para a proteína FKBP12), é a expressão de proteínas fusionadas à etiqueta cujos genes foram integrados no genoma de *T. cruzi*, os genes TOR1, TOR2, TOR-like1, TOR-like2, Raptor e AVO3 também tiveram suas regiões intergênicas 3' clonadas. Essa clonagem ocorreu de maneira clássica, ou seja, através da digestão com enzimas específicas e posterior ligação do inserto ao vetor pTcFLAG. O Quadro 04 mostra a sequência dos iniciadores utilizados para cada porção final do gene, bem como para suas respectivas regiões intergênicas 3'.

| Gene                  | Iniciador | Sequência                              | Amplicon (bp) |
|-----------------------|-----------|--|---------------|
| TOR1                  | F1        | 5'GCGTTTTGCGCGAGGAGGGTAGCA3'           | 456           |
| Intergênica TOR1      | R1        | 5'CCCAAAATGGGCACCAACCCGAGA3'           | 475           |
|                       | F2        | 5'GCGCAGATCTCCAAGAGGGCCAAAAGGTGAGAAG3' |               |
| Intergênica TOR1      | R2        | 5'GCGCAAGCTTTTGTGAGTGACGGTGGGTTCT3'    |               |
|                       |           |  |               |
| TOR2                  | F1        | 5'GCCGTACGATTGCAGAGACGGCCA3'           | 462           |
| Intergênica TOR2      | R1        | 5'CCCAAAACGGGTACCAACCCAGACC3'          | 469           |
|                       | F2        | 5'GCGCAGATCTTGTTCATGGTTTGTGCCGCTATC3'  |               |
| Intergênica TOR2      | R2        | 5'GCGCAAGCTTGCCGTGACGAGCGACTGTTTCAT3'  |               |
|                       |           |  |               |
| TOR-like1             | F1        | 5'GCGTACGTGAATTTGTGCGTGTGC3'           | 396           |
| Intergênica TOR-like1 | R1        | 5'CCCAAGATGGGGCCCAACCGGTGA3'           | 420           |
|                       | F2        | 5'GCGCAGATCTGAATCCCGACGTGAGAGGCAGAG3'  |               |
| Intergênica TOR-like1 | R2        | 5'GCGCAAGCTTGAAACAGCCTCATGACGACAAAA3'  |               |
|                       |           |  |               |
| TOR-like2             | F1        | 5'GCAACGTGAGATGCAGGATTCTGT3'           | 380           |
| Intergênica TOR-like2 | R1        | 5'CAAGAAGAGACGAAGTGCCGTGTC3'           | 428           |
|                       | F2        | 5'GCGCAGATCTTGAGACCATCCATTCCGCCTTAC3'  |               |
| Intergênica TOR-like2 | R2        | 5'GCGCAAGCTTCGCGTGTGGCCTCATCAATCAG3'   |               |
|                       |           |  |               |
| Raptor                | F1        | 5'GCGCACTGACGTTTGCCACGGCAAC3'          | 351           |
| Intergênica Raptor    | R1        | 5'CTGCATGTAAAATATCCTCCCTC3'            | 196           |
|                       | F2        | 5'GCGCAGATCTGATGGGGTGCCGAGAGGAC3'      |               |
| Intergênica Raptor    | R2        | 5'GCGCAAGCTTCCAACGTTTTCCGCAGTTTCTC3'   |               |
|                       |           |  |               |
| AVO3                  | F1        | 5'GCATCTACAGGCAAGAGTGCTCTGG3'          | 363           |
| Intergênica AVO3      | R1        | 5'CGTTCAGCCGTGTGGGGGAAGGAA3'           | 427           |
|                       | F2        | 5'GCGCAGATCTGTGGCGAAAGGAGAGAGAAGGG3'   |               |
| Intergênica AVO3      | R2        | 5'GCGCAAGCTTCAGACATTCTCGCACTGGCTCAT3'  |               |
|                       |           |  |               |
| FKBP12                | F         | 5'GCATGCCGGCGAATGACTGCGTACT3'          | 336           |
|                       | R         | 5'CAGCAACGTCCAGTAGTGTACCT3'            |               |

**Quadro 04. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores para cada gene selecionado bem como o tamanho esperado do amplicon (bp).**

As regiões intergênicas foram amplificadas por PCR, tendo como molde 100 ng de DNA genômico de *T. cruzi* através de enzima *Taq* DNA polimerase. As reações foram realizadas em volume final de 20  $\mu$ L, contendo tampão de reação com  $MgCl_2$  1,5 mM, 200  $\mu$ M de cada dNTP, 10 pmol de cada iniciador F e R e *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) 2,5 U. Para a ciclagem da reação de PCR foi padronizado o tempo de extensão de 72 °C por 1 minuto para cada 1 Kb do fragmento a ser amplificado.

Após a amplificação, os produtos amplificados foram clonados em vetor pGEM®-TEasy (Promega) conforme instruções do fabricante. A clonagem TA, como é chamada, utiliza-se da atividade terminal transferase de algumas DNA polimerases como é o caso da *Taq* DNA polimerase que adiciona uma adenosina a cada extremidade 3' de um produto de PCR. Essa abordagem permite a clonagem de tal produto em um vetor de clonagem linearizado que possua extremidades complementares 3'-T não pareadas.

Dessa forma, com um passo extra de extensão ao final da ciclagem (10 minutos a 72 °C ou 68 °C) de uma PCR comum é possível obter produtos de PCR contendo tais extremidades que permitem uma rápida clonagem para o vetor pGEM®-TEasy (Promega).

Na clonagem em pGEM®-TEasy (Promega), o meio sólido em que a bactéria transformada é cultivada deve conter antibiótico apropriado (ampicilina), X-Gal e IPTG. Isto porque a seleção dos clones positivos é feita por meio da avaliação da expressão da enzima  $\beta$ -galactosidase, que, quando induzida por IPTG, degrada o substrato X-Gal produzindo um subproduto azul. Como o sítio de clonagem múltipla está presente dentro do gene da enzima, caso o inserto seja incorporado com sucesso ao vetor, a enzima  $\beta$ -galactosidase não é mais expressa funcionalmente e as colônias permanecem brancas. Isso facilita a identificação dos clones recombinantes, que posteriormente devem ser confirmados por PCR de colônia.

O mapa do vetor fornecido pelo fabricante pode ser visualizado na Figura 15.

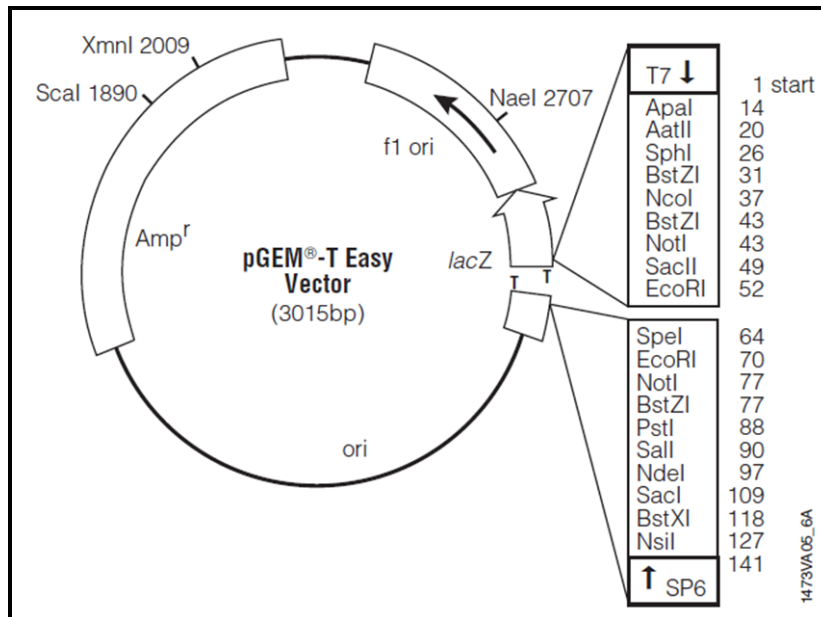


Figura 15. Mapa do vetor pGEM®-TEasy utilizado nas clonagens (Promega).

Após a obtenção dos clones, os plasmídeos foram purificados pelo sistema *Spin Miniprep Kit®* (QIAGEN), estes foram sequenciados e utilizados para as reações de digestão, com exceção do plasmídeo pTcFLAG:FKBP12 que logo após sua purificação foi transfectado como já descrito no item 3.8.

Com os insertos clonados em vetor pGEM®-TEasy (Promega) seguiu-se para a digestão com 5 U das enzimas *BglII* e *HindIII* (New England Biolabs) em tampão NEB2 e volume final de 50  $\mu$ L. A incubação ocorreu a 37 °C por 16 h e a purificação do DNA digerido com solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. O mesmo procedimento foi feito com o vetor pTcFLAG com as porções 3' dos genes de estudo já recombinados via Gateway®, como já descrito no item 3.12.6.

Para a reação de ligação, foi utilizada a proporção de 1:5 em pmol de vetor e inserto digeridos, respectivamente, adicionado de 1 U de T4 DNA ligase (USB), 1  $\mu$ L de tampão 10X da T4DNA ligase em volume final de 10  $\mu$ L. A incubação foi realizada por 16 horas a 16 °C e esta reação foi utilizada para transformar bactérias DH5 $\alpha$  cálcio-competentes, conforme item 3.10.

A verificação da clonagem foi realizada através do método de PCR de colônia como descrito no item 3.11, e os plasmídeos contendo as sequências de interesse foram posteriormente purificados.

Para a transfecção de *T. cruzi*, foi realizada uma nova digestão utilizando 10 U da enzima *HindIII* (New England Biolabs) em tampão NEB2 e volume final de 100 µL. A incubação ocorreu a 37 °C por 16 h e a purificação do DNA digerido com solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. Com o DNA digerido purificado, foi então realizada a transfecção como já descrito no item 3.8.

### 3.15 ENSAIOS IMUNOLÓGICOS

#### 3.15.1 OBTENÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ATRAVÉS DE INOCULAÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE EM COELHOS E CAMUNDONGOS

As proteínas recombinantes purificadas foram utilizadas para produção de antisoro específico em camundongos e coelhos.

Os camundongos, provenientes do biotério do ICC, foram manipulados segundo os princípios do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1999). O Instituto Carlos Chagas possui autorização do CTNBio para realização desse projeto.

O soro pré-imune foi coletado uma semana antes do início das imunizações. A primeira imunização foi feita intra-peritonealmente com 25 µg de proteína diluída em 1 volume de adjuvante completo de Freund. Foram realizadas no total 4 imunizações em intervalos regulares de 10 dias cada, sendo que a partir da segunda imunização foi utilizado 1 volume do adjuvante incompleto de Freund misturado às doses de antígeno. A coleta do soro foi feita 10 dias após a quarta imunização. Os animais foram sedados com 0,2 mg de cetamina e 2 mg de xilasina e o sangue foi coletado por punção cardíaca. O sangue foi incubado por 15 minutos a 37 °C, centrifugado por 5 minutos a 5.000 x g e o soro coletado foi aliquotado e estocado a – 20 °C.

Para a produção dos antisoros em coelhos foram utilizados 100 µg de proteína por coelho a cada inoculação e foram produzidos pela empresa Célula B Desenvolvimento de Anticorpos, no Centro de Biotecnologia- da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

### 3.15.2 PURIFICAÇÃO DOS ANTISSOROS POLICLONAIS

Os antissoros foram purificados por meio da incubação simultânea de proteína recombinante previamente transferida para a membrana de nitrocelulose com o antissoro a ser purificado. Após 16 h de incubação a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e a membrana foi lavada 3 vezes com PBS-Tween 20 0,1%. Os anticorpos específicos ligados à proteína recombinante foram eluídos com 200 µL de glicina 0,2 M pH 2,5 por 2 minutos sob leve agitação. O sobrenadante foi coletado, neutralizado pela adição de tampão Tris-HCl 1 M pH 9,5 (~20 µL), aliquotados e estocados a – 20 °C.

### 3.15.3 ENSAIO DE *WESTERN BLOT* (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979)

O ensaio de *Western blot* foi utilizado para verificar a especificidade dos anticorpos em relação às proteínas alvos presentes em extratos proteicos de *T. cruzi*. Há duas maneiras de realizar este ensaio, diferindo praticamente no método de detecção, sendo a quimioluminescência considerada a detecção mais sensível.

### 3.15.4 ENSAIO DE *WESTERN BLOT* COM REVELAÇÃO POR FOSFATASE ALCALINA

Proteínas de gel SDS-PAGE foram transferidas para a membrana de nitrocelulose através de corrente elétrica de 20 V por 16 h a 4 °C em tampão de transferência para *Western blot*. A membrana foi corada com solução de *Ponceau S* para verificar a eficiência da transferência das proteínas, posteriormente descorada em água bidestilada e incubada em solução de bloqueio por 1 h sob leve agitação em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado o anticorpo primário purificado, em diferentes diluições e a membrana incubada por 1 h a 37 °C sob leve agitação. Para verificar a indução de proteína recombinante fusionada à etiqueta N-terminal de histidina, foi utilizado anticorpo monoclonal anti-histidina (Gibco) na diluição de 1:3000 (v/v).



A membrana foi lavada três vezes por 5 minutos com PBS-Tween 0,1% e incubada por 1 h a 37 °C sob leve agitação com anticorpos anti-IgG de coelho ou camundongo (Promega) conjugados com a enzima fosfatase alcalina na diluição de 1:7500 (v/v) em PBS-Tween 0,1% e após o período de incubação, foi novamente lavada com PBS-Tween 0,1%.

A reação imunoenzimática foi revelada com 50 mg/mL de NBT e 50 mg/mL de BCIP em tampão da fosfatase alcalina - AP *Buffer*.

### 3.15.5 ENSAIO DE *WESTERN BLOT* COM REVELAÇÃO POR PEROXIDASE (QUIMIOLUMINESCÊNCIA)

Este ensaio possui algumas diferenças em relação ao anterior: o anticorpo secundário é conjugado com enzima peroxidase e a revelação é através de filmes de raio-X.

Após a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose e incubação com o anticorpo primário, como citado no item anterior, foram realizadas 3 lavagens de 15 minutos com solução PBS/Tween 0,1%, seguido de incubação com o anticorpo secundário, anti-IgG de coelho ou camundongo conjugado à peroxidase (Amersham Biosciences) na diluição de 1:8000 (v/v) por 1 h a 37 °C.

O produto da reação enzimática foi detectado por quimioluminescência, através do kit ECL *Western blotting* (Amersham Biosciences) seguindo as instruções do fabricante. A exposição foi feita em filme Kodak durante 1 minuto e a revelação foi obtida na ausência de luz, em solução de revelação seguido de lavagem por 2 minutos em água e 2 minutos em solução de fixação. Os tempos de revelação foram padronizados para cada experimento.

### 3.15.6 IMUNOLOCALIZAÇÃO CELULAR POR MICROSCOPIA ÓTICA DE FLUORESCÊNCIA E CONFOCAL

Para visualizar a localização da proteína endógena foi utilizado o protocolo de imunofluorescência indireta como descrito por HOLETZ *et al.*, 2007 com algumas modificações descritas a seguir.

As lamínulas foram incubadas com poli-L-lisina durante 20 minutos a 37 °C graus e lavadas com PBS. Os parasitas em diferentes estágios de diferenciação e parasitas transfectantes foram lavados, suspensos em PBS numa concentração final de  $10^6$  células/poço e adicionados às lamínulas e incubados por 20 minutos em temperatura ambiente. Após esta etapa, o excesso de PBS contendo os parasitas foi retirado. Os parasitas aderidos foram fixados com paraformaldeído 4% em PBS por 5 minutos. Após a etapa de fixação dos parasitas, foi adicionada uma solução de Triton X-100 0,1% durante 90 segundos para a permeabilização destes. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas por imersão em PBS e bloqueadas com PBS contendo BSA 1% por 16 h a 4 °C em câmara úmida.

Após o período de bloqueio, as lamínulas foram lavadas e incubadas por 1 h a 37 °C com anticorpo específico para a proteína FKBP12, produzido em coelho, diluído 1:250 (v/v) e para o anticorpo que reconhece FLAG 1:1000 (v/v). Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas por 1 h a 37 °C com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho ou camundongo conjugado com Alexa 488 (Invitrogen) diluído 1:400 (v/v). Para a coloração do núcleo celular as lamínulas foram incubadas com 10 µg/mL de DAPI em PBS em temperatura ambiente por 5 minutos e lavadas com PBS. Foi adicionado n-propil-galato ou VectaShield como meio de montagem à superfície de lâminas de vidro e em seguida as lamínulas foram vertidas e seladas.

As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência (Nikon), as imagens foram capturadas com câmera CoolSnap (Media Cybernetics) e analisadas com o programa Image Pro-Plus v. 4.5.1.22 (Media Cybernetics).

Imagens tridimensionais (séries Z) foram adquiridas em um microscópio confocal Leica TCS SP2 AOBS equipado com objetiva 63x/HCX 1.4 PL Apo lbdBL de imersão em óleo. O diafragma foi ajustado para 1,00 *airy* e a fluorescência emitida por DAPI e Alexa 488 foi adquirida por dois fóton-multiplicadores (PMTs) de forma independente e sequencial. Para detecção de cromatina pelo sinal de DAPI, foi utilizado um laser diodo de 405 nm e a emissão foi adquirida em 415-485 nm.

A fim de melhorar a razão sinal/ruído, cada “fatia ótica” da série Z foi composta pela média de 16 *frames* (função *frame average*) de 512x512 pixels cada. As imagens foram adquiridas em 8 bits, com *voxels* de 58x58x122 nm

(simplicemente, o *voxel* é um pixel com 3 dimensões – X, Y e Z). Após a aquisição, imagens 2D e 3D foram montadas e tratadas com o software ImageJ (ABRAMOFF; MAGELHAES; RAM, 2004) para a remoção do ruído (função *rolling ball radius* ajustada em 50) e para realce do contraste.

A metodologia de expressão de proteínas fusionadas a FLAG tanto em nível epissomal como genômico, descrita no item 3.14 foi uma abordagem paralela, que teve como objetivo a localização de proteínas em *T. cruzi* através de ensaio de imunofluorescência indireta bem como a detecção de parceiros funcionais através de ensaio de imunoprecipitação de complexos que será descrito posteriormente.

Uma porção final do gene de TOR1 foi fusionada a FLAG N-terminal em vetor pTcFLAG bem como suas regiões intergênicas. Essa construção permite a integração da etiqueta no genoma do parasita, facilitando assim a localização subcelular da proteína pela utilização de anticorpo comercial contra a etiqueta. No caso desse gene, o anticorpo primário utilizado foi o monoclonal ANTI-FLAG® M2 produzido em camundongo que reconhece o epítipo FLAG.

### 3.15.7 ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO

Devido à localização da proteína FKBP12 ser nuclear, foi necessária a obtenção de um extrato enriquecido com a fração nuclear para os ensaios de imunoprecipitação, *pull down* e cromatografia de gel filtração da proteína FKBP12 endógena. Portanto, optou-se em realizar a lise dos parasitas pelo método de cavitação. Para isso a lise de  $1 \times 10^9$  parasitas nas formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento cultivadas em meio LIT, epimastigotas sob estresse nutricional, epimastigotas em fase logarítmica de crescimento cultivadas em meio LIT sem SFB e epimastigotas cultivadas em meio LIT sem SFB sob tratamento com rapamicina (5,0 µg/mL por 2h e 24 h; 10 µg/mL por 2 h e 24 h), foi realizada em tampão hipotônico (10 mM HEPES pH 7,4, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>) sob 1.500 psi em bomba de cavitação por 30 minutos. O material foi centrifugado a 4.000 x g por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o sedimento suspenso em 100 µL de tampão hipotônico. Em seguida, foram adicionados 50 µL de tampão baixo sal (20 mM

HEPES pH 7,4, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM KCl, 0,2 mM EDTA, 25% glicerol, 0,2 mM PMSF, 0,5 mM DTT) e após 50 µL de tampão alto sal (20mM HEPES pH 7,4, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,4 M KCl, 0,2 mM EDTA, 25% glicerol, 0,2 mM PMSF, 0,5 mM DTT). A lise do núcleo é feita a 4 °C por 2 h. O material é centrifugado a 20.000 x g por 20 minutos e o sobrenadante (extrato nuclear) é utilizado para os ensaios seguintes.

A imunoprecipitação visa o isolamento das proteínas associadas à proteína de interesse. Nesses experimentos o anticorpo específico contra a proteína em estudo é imobilizado em partículas magnéticas não porosas (Dynabeads® Protein A), através da interação com proteína A presente nas partículas. Após a lavagem das partículas com PBS e bloqueio com PBS-BSA 1,0 mg/mL por 10 minutos, o anticorpo foi adicionado e a mistura partícula/anticorpo foi incubada por 2 h em temperatura ambiente. Após essa etapa, foram realizadas 3 lavagens para retirar o excesso de anticorpo não ligado. Essas lavagens foram feitas utilizando um tampão isotônico (10 mM HEPES pH 7,4, 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>). Em seguida, as partículas contendo o anticorpo foram incubadas com 2 mg/mL de extrato nuclear a 4°C por 16 h. Após essa etapa, novas lavagens (5x) foram feitas utilizando o tampão isotônico descrito anteriormente, e o complexo proteico ligado ao anticorpo foi eluído com 0,2 M Glicina pH 2,5 e a fração obtida foi neutralizada com 1 M Tris-HCl pH 9,5.

Outro extrato celular de culturas de células de *T. cruzi* transfectadas com as construções contendo TOR1:FLAG (para inserção no genoma) e FKBP12:FLAG (para expressão epissomal), foi obtido de maneira diferente ao já descrito, uma vez que a proteína TOR1:FLAG apresentou outro padrão de localização subcelular (citoplasmático) e a proteína FBP12:FLAG apresentou uma superexpressão quando comparada à proteína endógena, ocorrendo um acúmulo da mesma no núcleo e no citoplasma. Portanto, a fim de evitar perda de possíveis interações, optou-se por uma lise total da célula já utilizada e descrita na literatura (DOSTALOVA *et al.*, 2013).

Para isso, a lise de formas epimastigotas transfectantes em fase logarítmica de crescimento (1,0 x 10<sup>9</sup> células) cultivadas em meio LIT, foi feita em 891 µL de tampão de lise (150 mM de sacarose, 20 mM L-glutamato de potássio, 20 mM Tris-HCl 1 M pH 7,7, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM DTT e Inibidores

de protease) no gelo por 10 minutos. Após esse período de incubação foi adicionado 10 µL de NP-40 10% e novamente incubado em gelo por 2 minutos. Em seguida, 100 µL de tampão de extração (3 mM KCl, 20 mM Tris-HCl 1 M pH 7,4) foi adicionado. O material foi então centrifugado a 20.000 x g a 4 °C por 15 minutos e o sobrenadante foi então utilizado no ensaio de imunoprecipitação. A incubação desse sobrenadante com a matriz de gel contendo o anticorpo anti-FLAG (ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel) foi realizada a 4 °C por 16 h. Logo após, foram feitas 5 lavagens com o tampão (150 mM KCl, 20 mM Tris-HCl 1 M pH 7,4 e 3 mM MgCl<sub>2</sub>). Os complexos foram eluídos por competição adicionando-se 3 µL do peptídeo 3x FLAG (5,0 µg/µL). As frações foram analisadas quanto à quantidade de proteínas e à presença das proteínas TOR e FKBP12, através de gel SDS-PAGE corado com prata e *Western blot*, respectivamente. Os complexos proteicos que contém a proteína FKBP12 e TOR1 obtidos por ensaios de imunoprecipitação foram analisados por espectrometria de massas após reações de redução, alquilação e digestão segundo protocolo já definido.

A quantidade de proteína obtida em cada ensaio (~3,5 µg/mL) foi reduzida com ditioneitol 1 mM por 30 minutos, alquiladas com iodoacetamida (IAA) 5,5 mM durante 20 minutos ao abrigo da luz e, em seguida, adicionou-se 4 volumes de 20 mM de bicarbonato de amônio. A digestão foi realizada durante 16 h, com tripsina (Promega) a uma razão de protease/proteína de 1/50. Peptídeos trípticos foram purificados usando colunas de RP-C18 StageTip feitas antes da análise MS (RAPPILBER *et al.*, 2003). A amostra foi analisada em triplicata técnica.

Digestões trípticas foram submetidas à cromatografia líquida de fase reversa (RP), acoplada à espectrometria de massas de alta resolução. Os experimentos foram realizados com um Easy- nLC 1000 (Thermo Scientific, EUA), conectado ao espectrômetro de massa LTQ Orbitrap XL ETD (espectrometria de massa RPT02H PDTIS / Instituto Carlos Chagas - Fiocruz Paraná), equipado com uma fonte iônica nanoeletrospray (S/T Phoenix). A separação cromatográfica dos peptídeos ocorreu em um capilar de sílica fundido de 15 centímetros (75 µm de diâmetro interno) empacotada com resina de fase reversa ReproSilPur-C18-AQ 3 µm (Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch - Entringen, Alemanha).

Os peptídeos foram injetados na coluna com um fluxo de 250 nL/minutos e, subsequentemente, eluídos com 5 a 40% de acetonitrilo em 0,1% de ácido fórmico em um gradiente de 120 minutos. O espectrômetro de massas foi operado no modo dependente de dados para alternar automaticamente entre aquisição MS e MS/MS (MS2). Um perfil completo dos espectros MS (de 350-1.650 gama m/z) foram adquiridos no analisador Orbitrap com resolução  $R = 60.000$  em m/z 400 (após a acumulação de um valor-alvo de 1.000.000 no ion *trap* linear). Os dez íons mais intensos foram sequencialmente isolados e fragmentados no ion *trap* linear usando a dissociação induzida por colisão em um valor-alvo de 10.000. Ex-íons alvos selecionados para o MS/MS foram excluídos dinamicamente durante 90 segundos. O tempo total do ciclo foi de aproximadamente 3 segundos. As condições gerais de espectrometria de massa foram: spray de tensão, de 2,4 kV; temperatura no tubo de transferência de íon de 100 °C; pressão de gás de colisão e 1,3 mTorr; energia de colisão normalizada usando de banda larga no modo de ativação de 35% para MS2. O limiar de seleção de íons foi 250 contagens para MS2. Uma ativação  $q = 0,25$  e tempo de ativação de 30 mili-segundos foi aplicado em aquisições MS2. A opção de *lock mass* foi ativado em todas as análises completas para melhorar a precisão das massa de íons precursores (OLSEN *et al.*, 2006).

A lista de coleta dos picos, identificação de proteínas, quantificação e validação foram realizadas utilizando a plataforma MaxQuant (versão 1.4.1.2) (COX e MANN, 2008). A busca em base de dados de espectros de fragmentos de massa foi realizada utilizando o algoritmo Andrômeda (COX *et al.*, 2011), que está integrado no ambiente MaxQuant. A identificação de proteínas foi baseada nas sequências de proteínas na base de dados de *T. cruzi* (contíguos Esmeraldo-like, não Esmeraldo-like, e não atribuídos, presentes na versão 6 de 11 de setembro de 2013 disponível em TriTrypDB (ASLETT *et al.*, 2010). A abordagem de “Decoy” foi utilizada para medir o erro de identificação, através da inversão da sequência de cada sequências regulares a estes bancos de dados foram adicionados contaminantes freqüentemente observados (tripsina suína, *Achromobacter lyticus* lisil endopeptidase e queratinas de humanos) e suas seqüências invertidas. Os parâmetros de identificação foram, tolerância de MS de 7 ppm, uma tolerância de MS/MS de 0,5 Da, tripsinização completa, permitindo até duas perdas de clivagem. A metilação carboxi-amido da cisteína

foi definida como uma alteração fixa e a oxidação de metioninas e acetilação N-terminal (proteína) foram autorizados como modificações variáveis. Para a validação das identificações, foram necessários um mínimo de seis aminoácidos por comprimento do peptídeo e dois peptídeos por proteína. Além disso, um limiar de taxa de detecção falsa (FDR) de 0,01 foi aplicado em ambos os níveis de peptídeos e proteínas.

A análise da expressão foi realizada por meio de pacote R Limma, que utiliza modelos lineares para a avaliação da expressão diferencial. Após análise, os valores de p foram ajustados pelo método de Benjamini-Hochberg (BH) para controlar o FDR.

Inicialmente cada condição experimental foi comparada com seus controles específicos (partículas e pré-imune). Somente as proteínas presentes em maior intensidade no imune, comparando com os controles, foram selecionadas para a próxima etapa. A segunda etapa se deu com a comparação de uma imunoprecipitação de outra proteína (nas mesmas condições de preparo de extrato, mas que não identificou a proteína de interesse). Nesta segunda etapa, somente proteínas mais intensas na imunoprecipitação da proteína FKBP12 foram selecionadas.

### 3.16 PULL DOWN DOS COMPLEXOS PROTÉICOS CONTENDO A PROTEÍNA FKBP12

Para os ensaios de *pull down* 10 µg da fração solúvel da proteína FKBP12 fusionada à proteína GST e a proteína solúvel GST (utilizada como controle) foram imobilizadas na matriz de Glutathione Sepharose® 4B (Amersham-Biosciences). Em seguida essa matriz foi lavada (3x) com tampão isotônico para retirada do excesso de proteína solúvel não ligada. Logo após, o conjunto matriz e proteína solúvel foi incubado com o extrato nuclear, obtido da mesma forma como já descrito anteriormente, a 4 °C por 16 h. Novas lavagens (3x) foram feitas utilizando o tampão isotônico e o complexo foi eluído pela adição de solução contendo glutathione reduzida. As frações foram analisadas em gel SDS-PAGE corado com prata. Os complexos proteicos que continham a proteína FKBP12 obtidos por ensaios de *pull down* foram analisados por

espectrometria de massas (LTQ Orbitrap XL ETD) após reações de redução, alquilação e digestão segundo protocolo já definido e citado anteriormente.

### 3.17 CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRAÇÃO E TROCA IÔNICA

O isolamento do complexo proteico contendo a proteína FKBP12 através de cromatografia foi realizado em 2 etapas. A primeira foi realizada através da passagem do extrato nuclear em uma coluna de filtração em gel (*Superdex*<sup>®</sup> 200 10/300 GL GE Healthcare Life Sciences). As frações obtidas foram submetidas a ensaio de *Western blot* para a identificação da proteína alvo. Essa etapa cromatográfica tem como objetivo separar os componentes da amostra por tamanho. As frações contendo a proteína alvo foram submetidas a uma segunda etapa de isolamento cromatográfico para identificar as proteínas que realmente se associam a FKBP12. Para isso uma coluna contendo uma resina de troca iônica foi utilizada (*Mono Q*<sup>®</sup> 5/50 GL GE Healthcare Life Sciences). As frações devidamente homogeneizadas foram adicionadas à coluna, interagem com a resina e são eluídas à medida que o gradiente de sal aumenta. A resina de troca iônica é composta por uma parte rígida ou imóvel que é formada pela cadeia carbônica do polímero e os grupos funcionais positivamente ou negativamente carregados ligados à cadeia carbônica. As cargas de tais grupos funcionais fixos são equilibradas por um número equivalente de íons de carga de sinal contrário. Estes últimos se movimentam livremente pelos poros da resina e são chamados de íons móveis e são eles que permutam com os íons em solução promovendo tanto a interação quanto a liberação, isso dependendo da concentração dos íons nos tampões utilizados. As frações obtidas foram submetidas à análise por *Western blot* e em gel SDS-PAGE corado com prata. Os complexos proteicos que continham a proteína FKBP12 obtidos por ensaios cromatográficos foram analisados por espectrometria de massas (LTQ Orbitrap XL ETD) após reações de redução, alquilação e digestão segundo protocolo já definido e citado anteriormente.

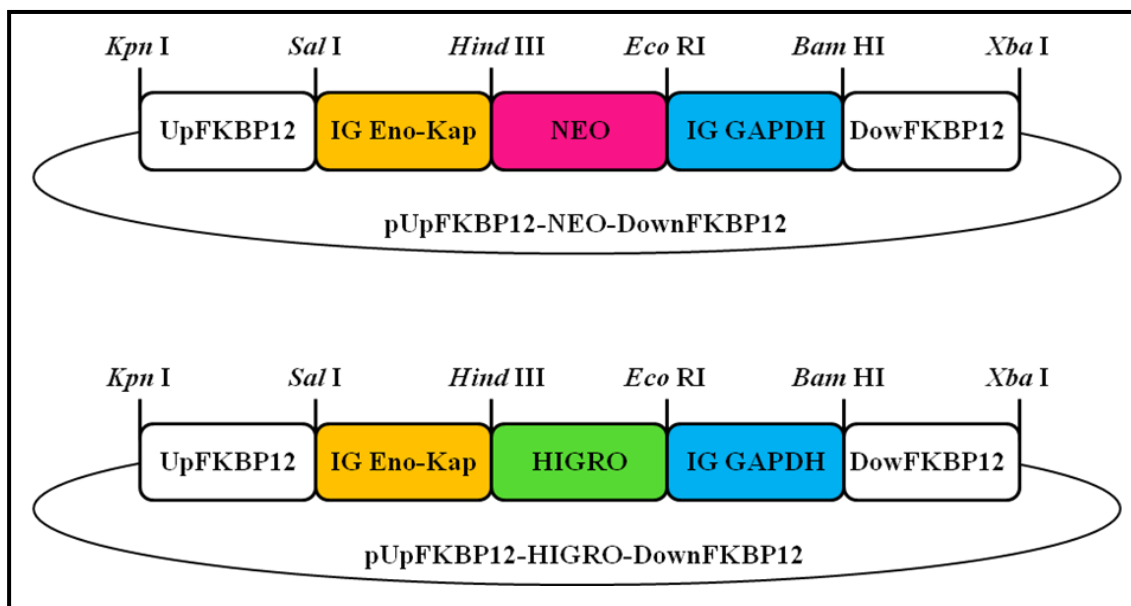


### 3.18 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE PROTEÍNAS POR ABORDAGENS DE GENÉTICA REVERSA

#### 3.18.1 NOCAUTE GÊNICO EM *T. cruzi*

O silenciamento de genes por nocaute mediado por recombinação homóloga é uma metodologia de genética reversa que vem sendo utilizada para estudar a função de genes em *T. cruzi* (MACRAE *et al.*, 2006), mas a viabilidade da metodologia depende da estrutura e função do gene. A organização do gene *FKBP12* foi o primeiro item a ser avaliado e foi verificado, através de *Southern blot*, que este gene possui cópia única no genoma de *T. cruzi*.

Para a clonagem das regiões intergênicas, foram utilizados vetores pBlueScript já contendo gene *npt*, que codifica a enzima neomicina fosfotransferase e confere resistência ao antibiótico neomicina - G418 (NEO), e gene *hph*, que codifica a enzima higromicina fosfotransferase que confere resistência ao antibiótico higromicina B (HIGRO). Estes vetores foram construídos no ICC e denominados de pNEO2 e pHIGRO2. Estes genes de resistência foram então flanqueados por regiões intergênicas do gene de *FKBP12* a jusante (*downstream* - DOW) e a montante (*upstream* - UPS). O esquema dos vetores utilizados para as clonagens das regiões intergênicas e da construção a ser obtida para a estratégia de nocaute podem ser observados na Figura 16.



**Figura 16. Vetores utilizados para o nocaute do gene FKBP12 de *T. cruzi*.** Nesta figura é observada a inserção do gene *neo* (A) e *higro* (B) e das sequências intergênicas entre os genes *Enolase-Kap-3* e a intergênica entre as duas cópias de *GAPDH* de *T. cruzi*, com os respectivos sítios para cada enzima de restrição, no vetor de clonagem pBluescript II KS.

Os oligonucleotídeos foram desenhados para amplificar as regiões intergênicas *upstream* e *downstream* do gene FKBP12. A estes iniciadores foram adicionados sítios de enzimas de restrição apropriados na extremidade 5' para permitir que os produtos de PCR fossem coesivos com os vetores após a digestão de ambos com as mesmas enzimas. Estes oligonucleotídeos iniciadores estão mostrados no Quadro 05.

As regiões intergênicas foram amplificadas por PCR, tendo como molde 100 ng de DNA genômico de *T. cruzi* através de enzima *Taq* DNA polimerase. As reações foram realizadas em volume final de 20  $\mu$ L, contendo tampão de reação com  $MgCl_2$  1,5 mM, 200  $\mu$ M de cada dNTP, 10 pmol de cada iniciador F e R e *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) 2,5 U. Para a ciclagem da reação de PCR foi padronizado o tempo de extensão de 72  $^{\circ}$ C por 1 minuto para cada 1 Kb do fragmento a ser amplificado.

| Iniciador                                   | Sequência  | Enzima de restrição   | Amplicon (bp) |
|---|--|-----------------------|---------------|
| 63 KO UP F<br>63 KO UP R                    | 5'GGG <b>GGTACC</b> CACCTAGATGAAAATAACAATGCG3'<br>5'GGG <b>GTCGAC</b> CAAAAAAGGAGTGAGGGAATCT3'   | KpnI<br>Sall          | 429/423       |
| 63 KO DOW F<br>63 KO DOW R1<br>63 KO DOW R2 | 5'GCGC <b>GGATCC</b> GGAGGAGCGACAGGAGAGAGGAGA3'<br>5'GGGC <b>TCTAGAT</b> CGTGCAATTATCCTGAAGTTTTTTCC3'<br>5'GGGC <b>TCTAGA</b> AACCATACGTTTCTTTTCTTCCTTTGCC3' | BamHI<br>XbaI<br>XbaI | 302/231       |

**Quadro 05. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados.** *UP*: iniciadores da região intergênica *upstream* do gene FKBP12. *DOW*: iniciadores da região intergênica *downstream* do gene KBP12. *Forward* (F). *Reverse* (R). Os sítios de restrição estão em destacados em vermelho e as respectivas enzimas de restrição correspondentes estão indicadas.

As clonagens foram realizadas por etapas (detalhadas nos itens a seguir). Após a finalização das construções, os plasmídeos foram utilizados como molde para amplificação dos fragmentos. Após a obtenção de maior quantidade de DNA foi possível a purificação do fragmento de interesse através de excisão de gel 0,8% seguido de eletroeluição a 20 mV durante 4 horas. A transfecção e seleção dos parasitas mutantes foram realizadas conforme item 3.8.

### 3.18.2 CLONAGEM DE REGIÃO *UPSTREAM* do gene FKBP12

Para a amplificação da região *upstream* por PCR foram utilizados os iniciadores 63 KO UP F e 63 KO UP R (Quadro 05), com a ciclagem de: *holding* de 94 °C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto. O produto de PCR foi ligado ao vetor pGEM®-TEasy (Promega) como já descrito anteriormente, transformado em *E. coli* DH5α cálcio-competente, confirmado por PCR de colônia e purificado com o auxílio do kit QIAprep® *spin Midiprep*. Cerca de 5 µg do vetor purificado foi digerido com 10 U de enzima *KpnI* (New England Biolabs) na solução de tampão NEB1 contendo BSA numa concentração final de 100 µg/mL em volume final de 100 µL. A reação foi incubada a 37 °C por 16 horas e a purificação do DNA digerido foi feita com a solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. Após a purificação uma nova digestão foi feita, dessa vez com 10 U da enzima *SaI* no tampão NEB3 em volume final de 100 µL. A reação foi incubada a 37 °C por 16 horas e a purificação do DNA digerido foi feita com a solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. O mesmo procedimento foi

realizado com o vetor de destino (pNEO2). Essa amostra de DNA foi submetida e eletroforese em gel de agarose 0,8% como já descrito no item 3.12.3 e a banda referente à região *upstream* foi excisada do gel e purificada com o auxílio do kit QIAquick® *Gel extraction kit* da QIAGEN.

Para a reação de ligação, foi utilizada a proporção de 1:5 em pmol de vetor e inserto digeridos, respectivamente, adicionado de 1 U de T4 DNA ligase (USB), 1 µL de tampão 10X da T4DNA ligase em volume final de 10 µL. A incubação foi realizada por 16 h a 16°C e esta reação foi utilizada para transformar bactérias DH5α cálcio-competentes, conforme item 3.10.

A verificação da clonagem foi realizada através do método de PCR de colônia e os possíveis plasmídeos recombinantes foram posteriormente purificados utilizando o sistema Qiaprep® *Spin Miniprep Kit* (QIAGEN) conforme as recomendações do fabricante.

### 3.18.3 CLONAGEM DE REGIÃO *DOWNSTREAM* do gene FKBP12

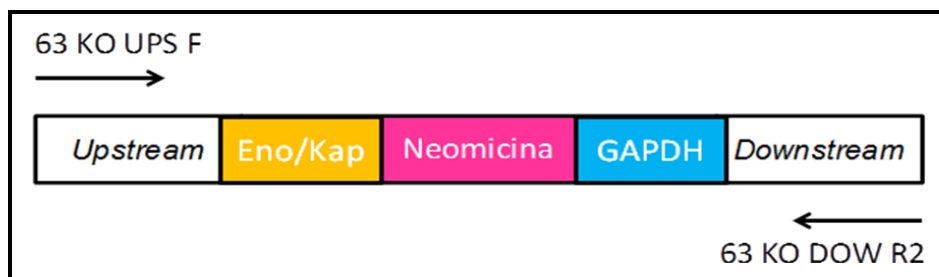
Para a reação de amplificação da região intergênica *downstream* de FKBP12 a ser clonada em vetor pNEO2 já com a região *upstream* clonada foram utilizados os iniciadores 63 KO DOW F e 63 KO DOW R2 (Quadro 05), com a ciclagem de: *holding* de 94 °C por 3 minutos seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. O produto de PCR foi então ligado ao vetor pGEM®-TEasy (Promega) como já descrito anteriormente, transformado em *E. coli* DH5α cálcio-competente, confirmado por PCR de colônia e purificado com o auxílio do kit QIAprep® *spin Midiprep*. Cerca de 5 µg do vetor purificado foi digerido com 10 U de enzima *Bam*HI e 10 U de enzima *Xba*I (New England Biolabs) na solução de tampão NEB3 contendo BSA numa concentração final de 100 µg/mL em volume final de 100 µL. A reação foi incubada a 37 °C por 16 h e a purificação do DNA digerido foi feita com a solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. O mesmo procedimento foi realizado com o vetor de destino (pNEO2 já com a região *upstream* clonada). Essa amostra de DNA foi submetida e eletroforese em gel de agarose 0,8% como já descrito no item 3.12.3 e a banda referente à região

*downstream* foi excisada do gel e purificada com o auxílio do kit QIAquick® *Gel extraction kit* da QIAGEN.

Para a reação de ligação, foi utilizada a proporção de 1:5 em pmol de vetor e inserto digeridos, respectivamente, adicionado de 1 U de T4 DNA ligase (USB), 1 µL de tampão 10X da T4DNA ligase em volume final de 10 µL. A incubação foi realizada por 16 h a 16 °C e esta reação foi utilizada para transformar bactérias DH5α cálcio-competentes, conforme item 3.10.

A verificação da clonagem foi realizada através do método de PCR de colônia e os possíveis plasmídeos recombinantes foram posteriormente purificados utilizando o sistema Qiaprep® *Spin Miniprep Kit* (QIAGEN) conforme as recomendações do fabricante.

Para a obtenção de quantidade suficiente de DNA para realizar a transfecção de *T. cruzi*, foi realizada uma reação de PCR de maior volume, obedecendo proporcionalmente às concentrações e utilizando os iniciadores 63 KO UPS F e 63 KO DOW R2, com a ciclagem de: *holding* de 94 °C por 3 minutos seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72°C por 3 minutos, para a obtenção do fragmento de DNA conforme esquematizado na Figura 17.



**Figura 17. Ilustração da construção do gene de resistência flanqueado pelas regiões intergênicas.** Após ambas as clonagens, o gene de resistência torna-se flanqueado pelas regiões intergênicas. As setas indicam a direção dos oligonucleotídeos iniciadores para amplificação do fragmento a ser utilizado para a transfecção de *T. cruzi*, para o nocaute do 1º alelo do gene FKBP12.

Essa amostra de DNA foi submetida e eletroforese em gel de agarose 0,8% como já descrito no item 3.12.3 e a banda referente ao cassete (fragmento com o gene de resistência flanqueado pelas regiões intergênicas do gene FKBP12 de *T. cruzi*) foi excisada do gel e purificada com o auxílio do kit

QIAquick® Gel extraction da QIAGEN e logo em seguida transfectada em *T. cruzi* conforme item 3.8. O cassete para deleção do 2° alelo ainda está em processo de construção.

### 3.19 ENSAIOS DE SEDIMENTAÇÃO EM GRADIENTE DE SACAROSE

Os ensaios de sedimentação foram feitos a partir de centrifugação de extratos citoplasmáticos em gradientes de densidade de sacarose segundo o protocolo de BRECHT & PARSONS (1998), com algumas modificações. O extrato citoplasmático de  $2,0 \times 10^9$  parasitas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento foi obtido tanto em condições de estabilização de polissomos (com incubação prévia das células com 100 µg/mL de cicloheximida a 28 °C por 10 minutos) quanto em condições de dissociação de polissomos (com incubação das células com 2 mM de puomicina a 28°C por 1 h. As células foram centrifugadas a 7.000 x g a 4 °C por 5 minutos e lavadas 2 vezes com tampão TKM (para cicloheximida, suplementado com 10 µg/mL de cicloheximida) ou TKM-P (para puomicina). Após descartar o sobrenadante, as células foram suspensas em 900 µL de TKM (suplementado com 100 µg/mL de cicloheximida) ou TKM-P, 10 µg/mL de heparina, 10 µM de E-64 e 1 mM de PMSF. A suspensão foi transferida para novo tubo contendo 100 µL de tampão de lise (tampão TKM acrescido de 10% de NP-40 e 2 M de sacarose ou TKM-P acrescido de 10% de NP-40 e 2 M de sacarose) e homogeneizada por pipetagem. O lisado foi então centrifugado a 16.000 x g a 4 °C por 5 minutos e o sobrenadante (500 µL, equivalentes a  $1,0 \times 10^9$  células) foi adicionado no topo do gradiente de sacarose linear (15% - 55%) preparado em tampão TKM ou TKM-P acrescidos dos inibidores já mencionados. O gradiente foi então centrifugado a 39.000 rpm a 4 °C por 2 h em ultra centrífuga Hitachi com rotor SW40. Após a centrifugação 500 µL de cada fração foram coletados utilizando o equipamento ISCO. Este equipamento destina-se à coleta e quantificação de frações de gradientes de densidade e fornece um perfil de absorbância contínuo (filtro 256 nm) à medida que as frações são coletadas. O fracionamento é obtido com a introdução de uma solução pesada (sacarose 62%) que é injetada perfurando-se a base do tubo que contém o gradiente

previamente centrifugado. As frações foram divididas em 4 grupos principais; Fração Leve (FL), Fração Não-Polissomal (NP), Fração Polissomal Leve (PL) e Fração Polissomal Pesada (PP), aplicadas em gel SDS-PAGE (50 µL de cada fração), submetidas à eletroforese e analisadas por *Western blot* com antissoro para a proteína ribossomal S6 (rpS6) de *T. cruzi* na diluição de 1:2000. Esse antissoro foi produzido sob as mesmas condições já citadas anteriormente no item 3.15.1.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 IDENTIFICAÇÃO, CLONAGEM E EXPRESSÃO DE GENES SEJAM RELACIONADOS À VIA TOR EM *Trypanosoma cruzi*

Com base em genes da via TOR descritos em *Trypanosoma brucei* (BARQUILLA, *et al.*, 2008), foram feitas pesquisas nos bancos de dados GeneDB ([www.genedb.org](http://www.genedb.org)) na tentativa de localizar seus respectivos ortólogos em *T. cruzi*. Os genes de *T. brucei*, com os respectivos ortólogos encontrados em *T. cruzi* são mostrados no Quadro 06 e a porcentagem de identidade das proteínas da via entre diferentes organismos é mostrado no Quadro 07.

| ID ( <i>T. cruzi</i> ) | Nome do gene | Tamanho gene (pb) | Tamanho da proteína (kDa) |
|------------------------|--------------|-------------------|---------------------------|
| Tc00.1047053508231.30  | TOR1         | 7299              | 273                       |
| Tc00.1047053510689.40  | TOR2         | 7305              | 274                       |
| Tc00.1047053508257.230 | TOR-like1    | 7779              | 293                       |
| Tc00.1047053506475.14  | TOR-like2    | 5694              | 210                       |
| Tc00.1047053506925.30  | Raptor       | 3894              | 144                       |
| Tc00.1047053510517.70  | AVO3         | 4146              | 154                       |
| Tc00.1047053508323.84  | FKBP12       | 339               | 12,2                      |
| Tc00.1047053508999.269 | Raptor-like  | 1104              | 40,4                      |

**Quadro 06. Genes de *T. cruzi* ortólogos aos genes de *T. brucei* descritos como componentes da via TOR com algumas de suas características.**

FONTE: GeneDB.



| Organismo              | <i>T. cruzi</i> |      |           |           |        |      |        |             |
|------------------------|-----------------|------|-----------|-----------|--------|------|--------|-------------|
|                        | TOR1            | TOR2 | TOR-like1 | TOR-like2 | Raptor | AVO3 | FKBP12 | Raptor-like |
| <i>H. sapiens</i>      | 41%             | 40%  | 37%       | 34%       | 40%    | 21%  | 49%    | 26%         |
| <i>D. melanogaster</i> | 29%             | 27%  | 31%       | 29%       | 37%    | 32%  | 52%    | 25%         |
| <i>S. cerevisiae</i>   | 28%             | 26%  | 65%       | 25%       | 35%    | 21%  | 52%    | 28%         |
| <i>L. major</i>        | 52%             | 56%  | 51%       | 64%       | 49%    | 44%  | 79%    | 41%         |
| <i>T. brucei</i>       | 63%             | 64%  | 63%       | 56%       | 56%    | 54%  | 91%    | 39%         |

**Quadro 07. Porcentagem de similaridade de proteínas da via TOR de *T. cruzi* com seus ortólogos de diversos organismos.**

FONTE: Blast NCBI.

Devido à presença de regiões conservadas entre membros da família TOR, o que poderia causar reação cruzada dos anticorpos a serem produzidos, duas regiões de cada gene foram definidas, tomando-se o cuidado de que elas não fossem similares a nenhuma outra região escolhida dentre todas analisadas, à exceção dos genes FKBP12 (Tb927.7.3420)/Tc00.1047053508323.84 *peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative* e Raptor-like (Tb927.1.2190)/ Tc00.1047053508999.269 *hypothetical protein, conserved*, em que o gene inteiro foi usado. A plataforma de clonagem escolhida para a construção dos vetores de expressão foi o sistema Gateway®. Após seleção, confirmação e purificação dos clones contendo os plasmídeos corretos, estes foram usados para transformar *E. coli* BL21(pLysS) a fim de expressar as proteínas de interesse e purificá-las a partir de corpúsculos de inclusão. Em seguida, foram realizados ensaios de *Western blot* para confirmar a obtenção das proteínas.

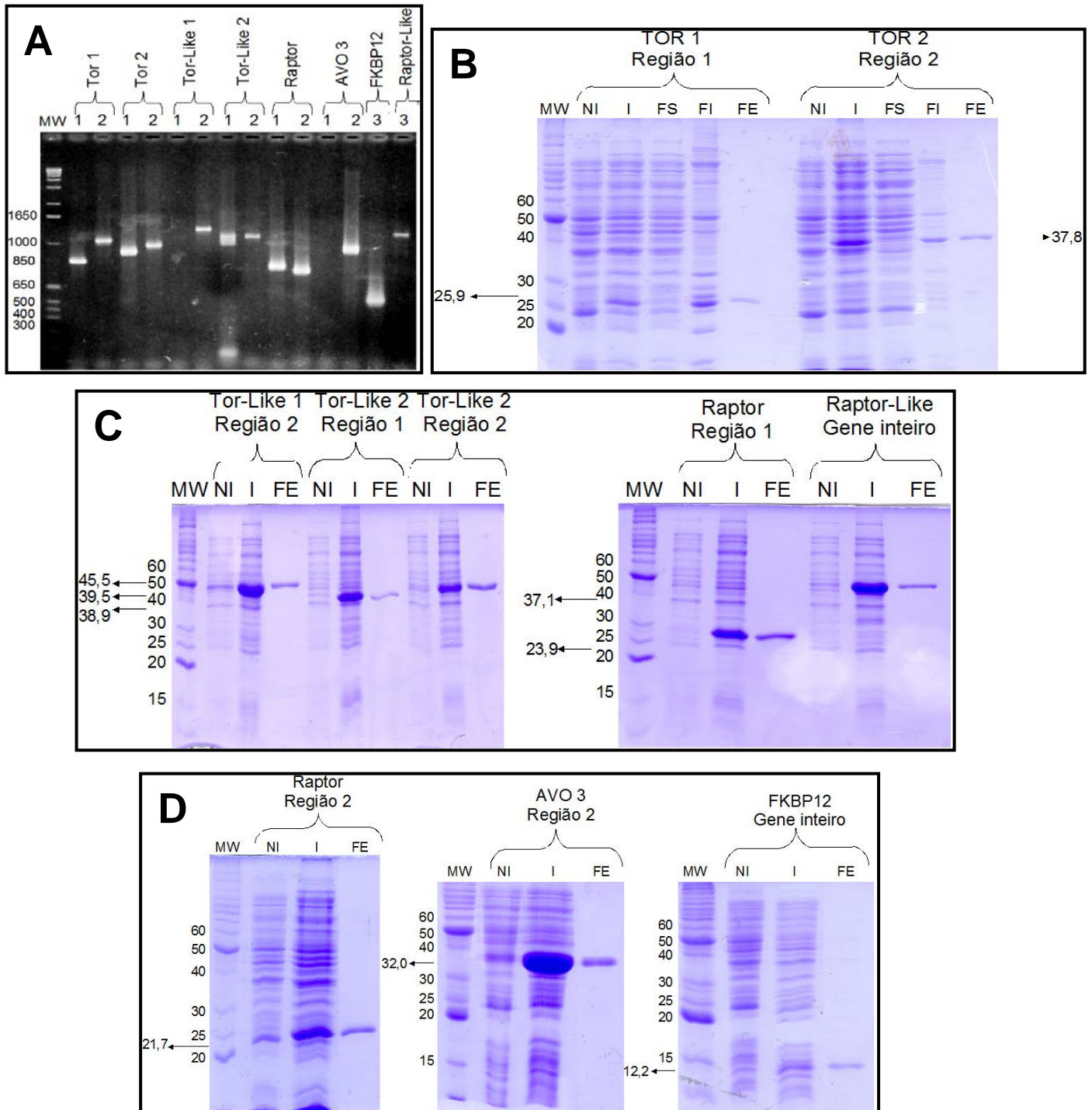
De todos os fragmentos selecionados nos genes de interesse, dois não foram amplificados por PCR: ambos referentes à região 1 dos genes TOR-like1 e AVO3 (Figura 18 A) Todos os genes restantes tiveram suas regiões clonadas com sucesso, os peptídeos foram expressos e purificados. No momento de induzir a expressão dos peptídeos, quatro deles não mostraram resultados satisfatórios, a saber: TOR1 e TOR2, (ambas as regiões de cada gene).

Contudo, mesmo com pequena indução das proteínas TOR1 e TOR2, prosseguiu-se para a etapa de purificação. Nesse experimento somente uma

região de cada gene foi utilizada: TOR1 (região 1) e TOR2 (região 2) (Figura 18 B). A utilização de maiores volumes de meio de cultivo para indução e purificação dessas proteínas foi adotada.

As amostras bem-sucedidas para expressão e purificação foram: TOR-like1 (segunda região); TOR-like2 (ambas as regiões); Raptor (ambas as regiões); AVO3 (segunda região); FKBP12 (todo o gene); e Raptor-like (todo o gene) (Figura 18 C e D).

A obtenção dos peptídeos purificados foi verificada através de *Western blot* com anticorpo contra a cauda de histidina presente nas proteínas recombinantes.



**Figura 18. Amplificação dos genes e expressão das proteínas envolvidas na via TOR de *Trypanosoma cruzi*.** (A) Amplificação por PCR das regiões selecionadas dos genes de *T. cruzi*. MW, padrão de massa molecular (1 kb); 1, amplificado da região 1; 2, amplificado da região 2; 3, amplificado do gene inteiro. (B), (C) e (D) SDS-PAGE (13%) das etapas de expressão em *E. coli* BL21 pLysS e purificação por eletroeluição de regiões de genes de *T. cruzi*. LEGENDA: MW, marcador de massa molecular (kDa); NI, fração Não-induzida; I, fração Induzida; FS, fração Solúvel; FI, fração Insolúvel; FE, fração Eletroeluída.

## 4.2 OBTENÇÃO DOS ANTICORPOS POLICLONAIS PARA AS PROTEÍNAS DA VIA TOR

Camundongos e coelhos foram imunizados com os peptídeos e proteínas purificadas, a fim de obter anticorpos policlonais. Após o período de imunização o camundongo ou coelho foi submetido à punção cardíaca para retirada do soro e posterior análise. A especificidade dos anticorpos obtidos foi verificada por *Western blot* contra extrato de epimastigotas de *T. cruzi*. Apenas os anticorpos para as proteínas FKBP12, Raptor-like e AVO3 reconheceram uma banda de peso molecular equivalente às proteínas de interesse, porém o que demonstrou maior especificidade após sua purificação foi o anticorpo contra a proteína FKBP12 de *T. cruzi*. A Figura 19 mostra o resultado para as reações com os anticorpos para as proteínas AVO3, Raptor, Raptor-like e TOR1 em três diferentes estágios do ciclo de vida do *T. cruzi*. Os resultados para o anticorpo contra a proteína Raptor-like mostram que o mesmo pode detectar a proteína Raptor. Isso se deve ao fato da grande similaridade entre essas duas proteínas. As setas correspondem às bandas das proteínas AVO3, Raptor, Raptor-like e TOR1. Foi ainda utilizado o anticorpo contra a proteína TOR1 cedido gentilmente pela Dr<sup>a</sup> Diana Bahia, porém esse anticorpo também se mostrou inespecífico. Os antissoros para as demais proteínas de estudo não reconheceram as respectivas proteínas em extrato de *T. cruzi*.

Portanto os resultados mostrados neste trabalho focam nos ensaios utilizando o anticorpo para a proteína FKBP12 (Figura 20), já que, segundo a literatura esta proteína tem papel fundamental na inibição da via TOR pela rapamicina em outros organismos.

Como alternativa para a baixa especificidade dos anticorpos produzidos para as proteínas TOR1, TOR2, TOR-like1, TOR-like2, Raptor e AVO3, optou-se pela inserção de uma etiqueta na extremidade 3' de cada gene de interesse, permitindo a expressão constitutiva das proteínas fusionadas a esta etiqueta, Esses resultados são mostrados nos próximos itens.

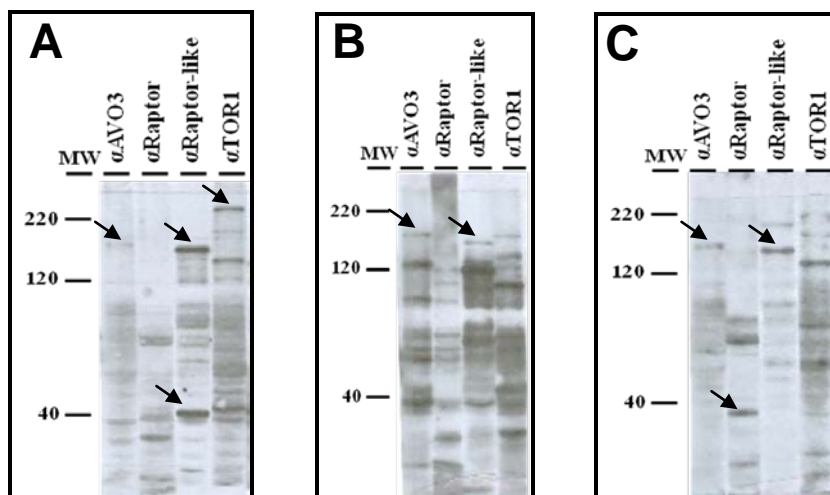


Figura 19. *Western blot* das proteínas Raptor, Raptor-like, AVO3 e TOR1 (anticorpo anti-TOR1 policlonal gentilmente cedido pela Dr<sup>a</sup> Diana Bahia) de *T. cruzi*. (A) Epimastigotas. (B) Tripomastigotas metacíclicos. (C) Amastigotas.

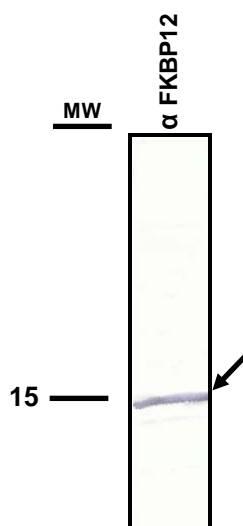


Figura 20. *Western blot* da proteína FKBP12 de *T. cruzi*.

#### 4.3 CONSTRUÇÃO DE VETORES PARA INTEGRAÇÃO DE UMA ETIQUETA NA PORÇÃO C-TERMINAL DE PROTEÍNAS DE INTERESSE, NO CONTEXTO GENÔMICO DO *T. cruzi*

A construção de vetores para a integração de uma etiqueta (FLAG) na porção 3' dos genes de interesse, foi utilizada como uma estratégia para a detecção das proteínas da via TOR, já que não tivemos êxito na produção de anticorpos específicos para as mesmas. A utilização de anticorpo comercial

contra a etiqueta facilitará os ensaios de imunolocalização e imunoprecipitação para as demais proteína da via TOR.

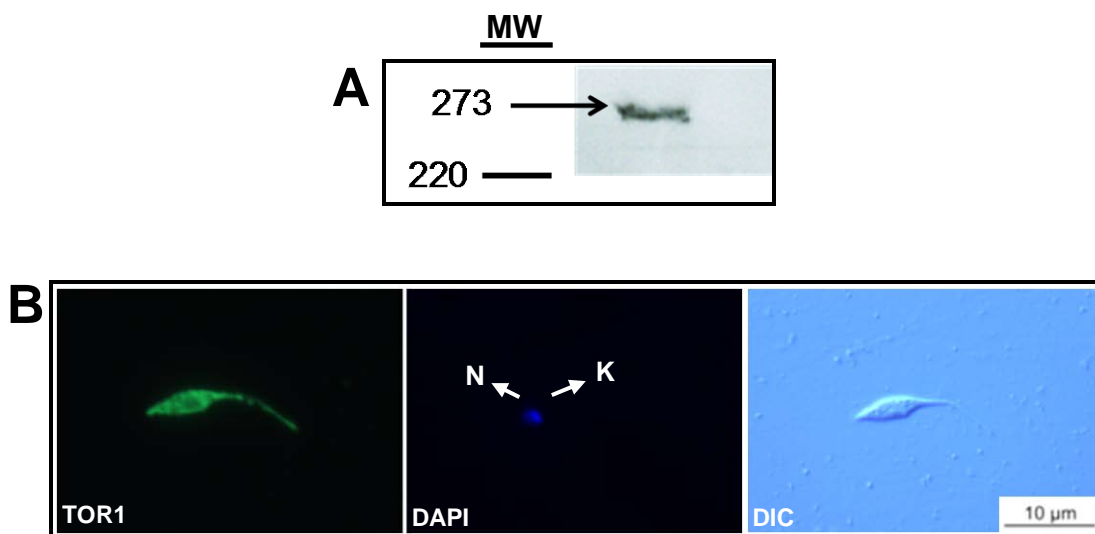
Porções gênicas referentes à região C-terminal bem como as regiões intergênicas *downstream* dos genes foram clonadas em vetores construídos no Instituto, como descrito no item 3.14 e em seguida transfectados no parasita para ocorrer a integração no genoma. Os parasitas selecionados com a etiqueta fusionada a umas das cópias do gene foram submetidos aos ensaios que permitiram verificar se houve ou não a integração no locus correto bem como a expressão da proteína fusionada a etiqueta 3xFLAG.

As porções 3' dos genes e suas respectivas regiões intergênicas *downstream* foram clonadas com sucesso, com exceção do gene TOR-like2. O restante das construções, após confirmação por PCR de colônia de ambas as regiões clonadas, foi digerido como descrito no item 3.14 e transfectado.

Os parasitas foram selecionados, e testados afim de verificar a expressão da proteína fusionada ao *tag*. Para isso, um extrato proteico das linhagens transfectantes foi feito como descrito no item 3.7 e submetido a eletroforese em gel SDS-PAGE (item 3.13.1) e posterior análise por *Western blot* (item 3.15.3). Paralelamente foi realizado ensaios de imunolocalização para verificar o padrão de localização subcelular da proteína fusionada.

De todas as linhagens transfectadas apenas os parasitas contendo a inserção do *tag* no gene TOR1 foi verificada. Isso se deu através da visualização da expressão da proteína fusionada ao *tag* em filme de Raio-X após corrida eletroforética e ensaio de *Western blot* com o anticorpo ANTI-FLAG® M2 (Figura 21 A). Além destes ensaios citados, foi também verificada a localização citoplasmática da proteína por ensaio de imunofluorescência indireta, como descrito no item 3.15.6 (Figura 21 B).

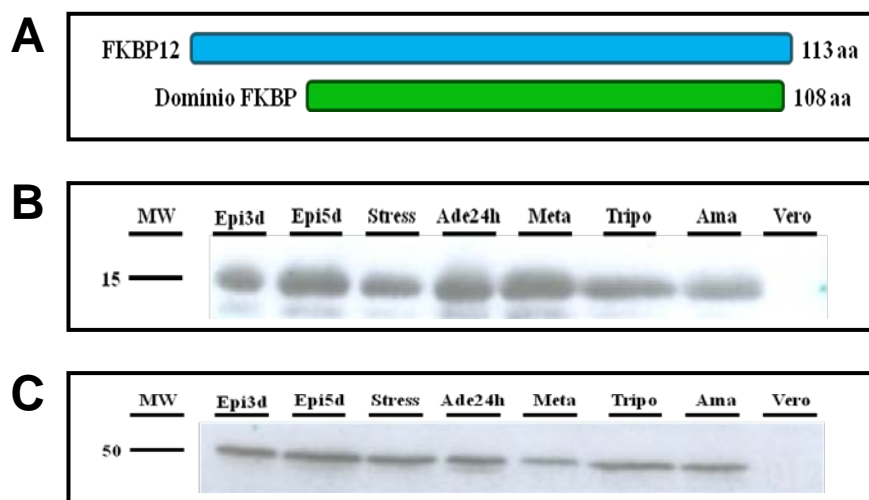
Um ensaio de imunoprecipitação, com parasitas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento cultivados em meio LIT, contendo a etiqueta na porção C-terminal da proteína TOR1 foi realizado como descrito no item 3.15.7. Essa amostra ainda será sequenciada e novas condições serão testadas para se verificar a dinâmica do complexo contendo a proteína TOR1 bem como a sua composição proteica.



**Figura 21. Western blot e imunolocalização da proteína TOR1:FLAG.** **A)** *Western blot* da proteína TOR1:FLAG de *T. cruzi* utilizando o anticorpo ANTI-FLAG® M2 (Sigma). O peso molecular das proteínas é indicado em kDa. **B)** Imunolocalização da proteína TOR1:FLAG em formas epimastigotas de *T. cruzi*. Para os ensaios de imunolocalização o anticorpo primário, ANTI-FLAG® M2 (Sigma), foi diluído 1:400 enquanto que anticorpo secundário foi diluído 1:400. O cinetoplasto (K) e núcleo (N) estão marcados com DAPI em azul. Barra = 10µm.

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA FKBP12 DURANTE O CICLO DE VIDA DO *T. cruzi*

A proteína FKBP12 (12,2 kDa) de *T. cruzi* apresenta 113 aminoácidos, sendo que destes, 108 representam o domínio FKBP (Figura 22 A). Além disso, ela apresenta expressão constitutiva durante o ciclo de vida desse parasita. Como controle da expressão, foi utilizado o anticorpo contra actina, gentilmente cedido pela doutoranda Lígia Kalb, já que essa proteína também possui expressão constitutiva durante o ciclo de vida do *T. cruzi* (Figura 22 B e C). A proteína FKBP12 de *T. cruzi* apresenta um grau de similaridade de 91% com a proteína FKBP12 de *T. brucei*.



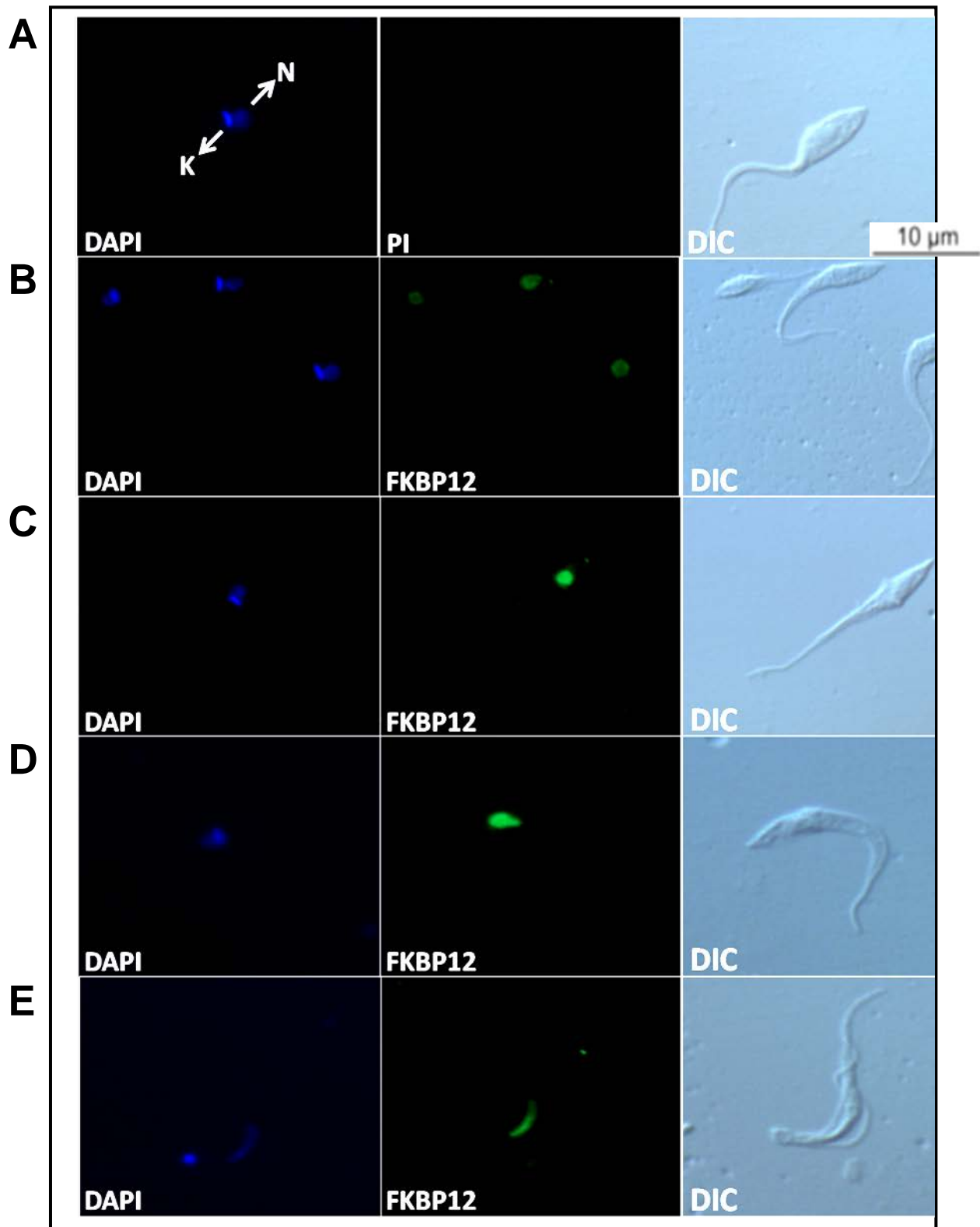
**Figura 22. Caracterização da proteína FKBP12 de *T. cruzi*.** (A) Tc00.1047053511825.63 *peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative*. (B) Expressão da proteína FKBP12 durante o ciclo de vida do *T. cruzi*. O anticorpo foi diluído 1:250. (C) Expressão da proteína actina durante o ciclo de vida do *T. cruzi*. O antissoro foi diluído 1:500. O peso molecular das proteínas é indicado em kDa.

#### 4.5 LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DA PROTEÍNA FKBP12 DURANTE O CICLO DE VIDA DO *T. cruzi* EM PARASITAS CULTIVADOS NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE RAPAMICINA

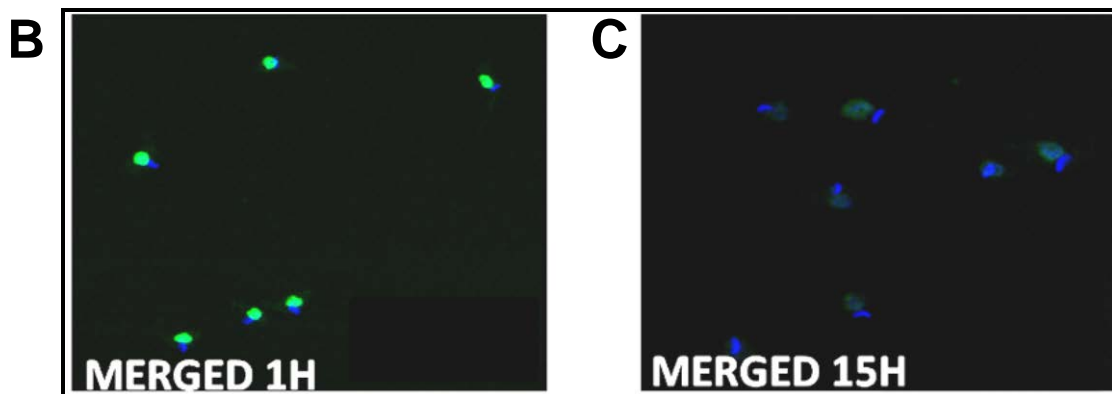
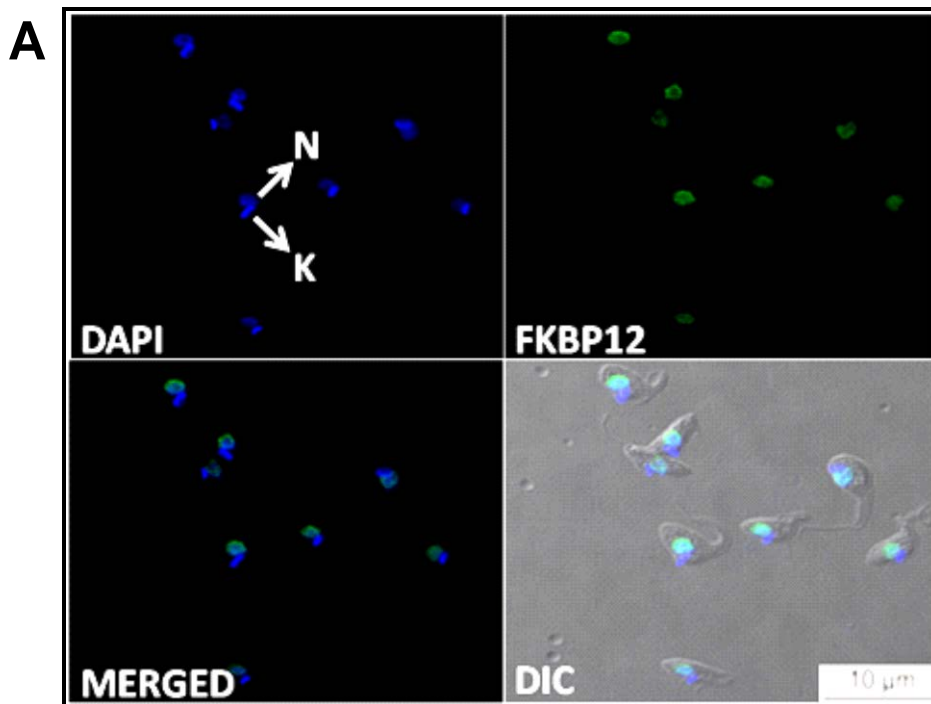
Com o anticorpo específico, foi possível realizar os ensaios de imunolocalização da proteína FKBP12 de *T. cruzi*. Os experimentos foram realizados conforme metodologia já descrita no item 3.15.6. A marcação ao longo da metaciclogênese foi avaliada. O padrão nuclear de localização para todas as formas pode ser visto na Figura 23.

Após a determinação da localização da proteína FKBP12 de *T. cruzi*, nos diferentes estágios do ciclo de vida do parasita, procurou-se investigar se sob efeito da rapamicina, o padrão de localização da proteína poderia sofrer alguma mudança. Para isso, epimastigotas em fase logarítmica de cultivo em meio LIT e na ausência de soro fetal bovino, foram submetidos ao tratamento com rapamicina na dose de  $IC_{50}=10\mu\text{g/mL}$  por diferentes tempos. Conforme mostrado na Figura 24, a localização da proteína não sofre mudança, permanecendo no núcleo.





**Figura 23. Imunolocalização da proteína FKBP12 de *T. cruzi*.** (A) Epimastigotas tratados com soro pré-imune. (B) Epimastigotas em fase exponencial de crescimento. (C) Epimastigotas sob estresse nutricional. (D) Epimastigotas em diferenciação aderidos ao substrato. (E) Tripomastigotas metacíclicos. Para os ensaios de imunolocalização o anticorpo primário foi diluído 1:50 enquanto que anticorpo secundário foi diluído 1:400. O cinetoplasto (K) e núcleo (N) estão marcados com DAPI em azul. Barra=10µm.

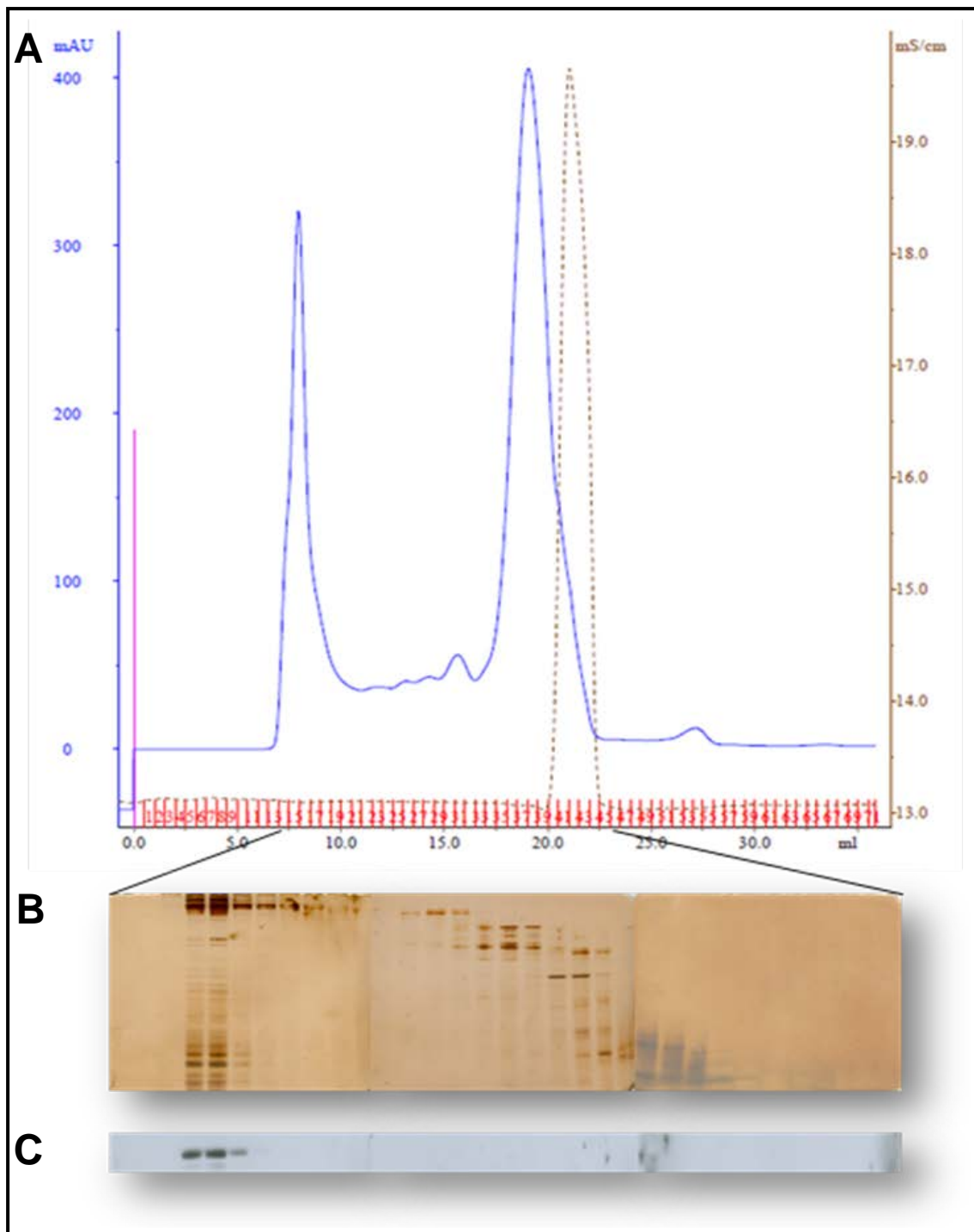


**Figura 24. Imunolocalização da proteína FKBP12 em parasitas tratados com rapamicina.** **(A)** Controle: Epimastigotas cultivados em meio LIT na ausência de soro fetal bovino. **(B)** Epimastigotas cultivados em meio LIT na ausência de soro fetal bovino tratados com rapamicina por 1 hora. **(C)** Epimastigotas cultivados em meio LIT na ausência de soro fetal bovino tratados com rapamicina por 15 horas. Para os ensaios de imunolocalização o anticorpo primário foi diluído 1:50 enquanto o anticorpo secundário foi diluído 1:400. O cinetoplasto (K) e núcleo (N) estão marcados com DAPI em azul. A concentração da droga utilizada foi a IC50=10 µg/mL. Barra = 10µm.

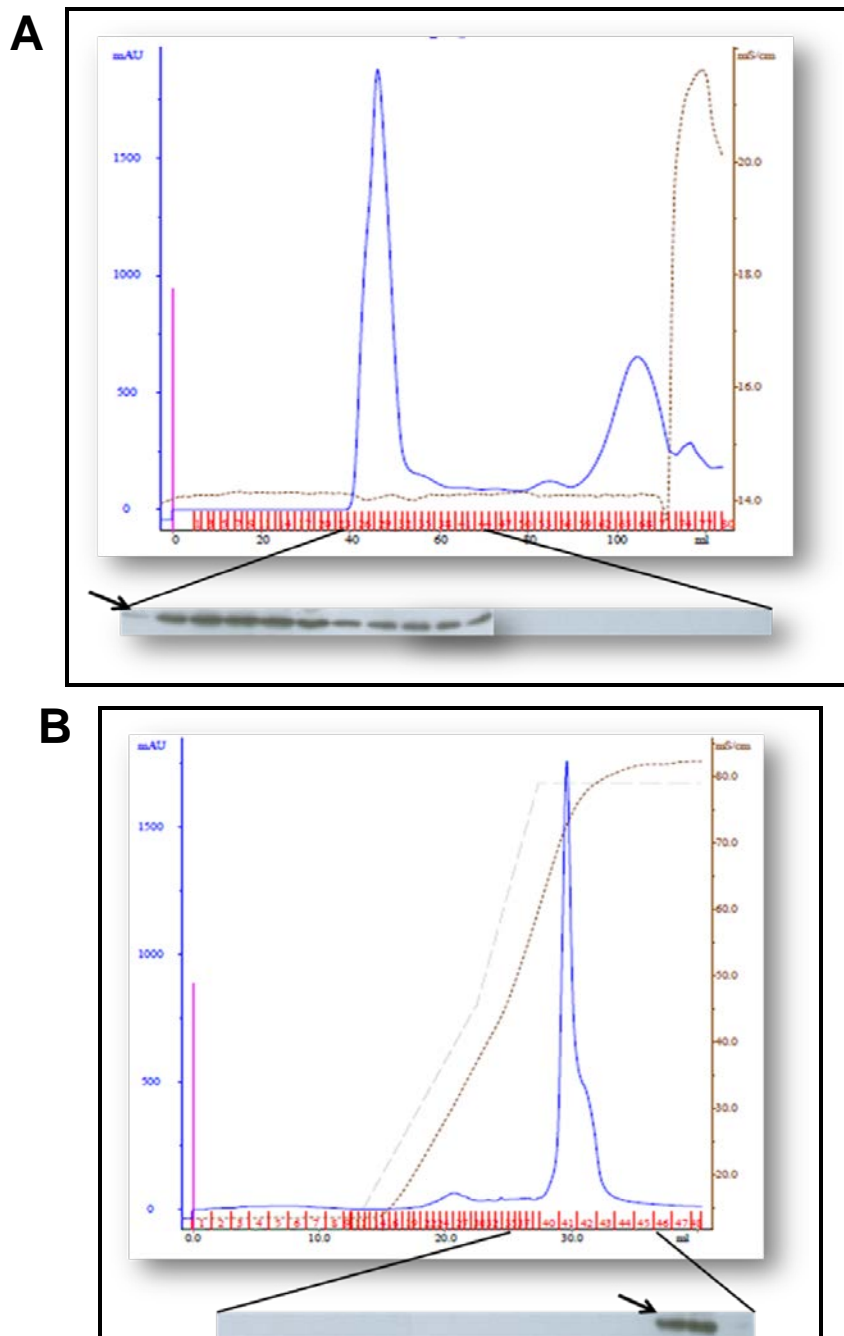
#### 4.6 ISOLAMENTO DO COMPLEXO PROTEICO NATIVO CONTENDO A PROTEÍNA FKBP12 DE *T. cruzi* POR CROMATOGRAFIA

Uma das abordagens adotadas para identificar proteínas presentes no complexo proteico que contém a proteína FKBP12 foi de submeter o extrato nuclear obtido às duas etapas de cromatografia, como descrito no item 3.17. A primeira etapa, de gel filtração, consiste em separar os complexos proteicos presentes no núcleo por diferença de tamanho. Após análise de detecção da proteína FKBP12 por *Western blot*, as frações contendo esta proteína provenientes dessa primeira etapa seguem para a segunda etapa cromatográfica. Essa etapa seguinte isola os complexos pela força iônica. Assim, utiliza-se uma resina carregada negativamente e através de um gradiente crescente de sal, os complexos vão sendo eluídos da coluna de acordo com a troca de ligação entre os complexos proteicos e o íons presentes no tampão utilizado como eluente. Após ensaio de *Western blot*, as frações contendo a proteína FKBP12 seguem para análise no espectrômetro de massas.

Foi realizado um ensaio preliminar utilizando formas epimastigotas crescidas em meio LIT e a proteína FKBP12 de *T. cruzi* pôde ser detectada associada a complexos pesados após a cromatografia de gel filtração (Figura 25). Porém, após a segunda etapa cromatográfica, a mesma proteína não foi detectada. Portanto novas abordagens foram empregadas para o isolamento do complexo através das duas etapas de cromatografia. Para isso, um volume maior de cultivo foi adotado (5L). Esse volume foi processado para obtenção do extrato nuclear e após as duas etapas cromatográficas, descritas no item 3.17 foi possível detectar a proteína por ensaio de *Western blot* (Figura 26). As frações contendo a proteína FKBP12 associada a outras proteínas foram processadas e analisadas no espectrômetro de massas. Nesta análise, não foi identificada a proteína FKBP12, como seria o esperado, porém demonstrou-se através da cromatografia de gel filtração, que ela está associada em complexos proteicos de alto peso molecular, pois há detecção da proteína nas primeiras frações eluídas.



**Figura 25.** Purificação do complexo contendo a proteína FKBP12 de *T. cruzi* através de cromatografia de gel filtração. **(A)** Cromatograma. **(B)** SDS-PAGE (15%) das frações eluídas de 13 a 45 e coradas com prata. **(C)** Detecção de FKBP12 por *Western blot* das frações eluídas de 13 a 45.



**Figura 26. Purificação do complexo contendo a proteína FKBP12 de *T. cruzi* através de cromatografia. (A) Cromatograma da etapa de gel filtração e detecção de FKBP12 por *western blot* das frações eluídas de 23 a 33. (B) Cromatograma da etapa de troca iônica e detecção de FKBP12 por *Western blot* das frações eluídas de 43 a 45.**

Novos ensaios utilizando essa técnica de cromatografia serão realizados já que se pretende analisar possíveis mudanças na composição do complexo contendo a proteína FKBP12 em resposta ao tratamento com a rapamicina e também quando o parasita é submetido a estresse nutricional.

Com isso, esperamos obter um panorama da dinâmica do complexo proteico que contém a proteína FKBP12, bem como verificar se as proteínas da via TOR estão presentes neste complexo quando o parasita é submetido ao tratamento com rapamicina.

#### 4.7 CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS À FKBP12 DE *T. cruzi* POR ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO

A imunoprecipitação pode ser utilizada para isolar os complexos ribonucleoprotéicos por meio de um anticorpo específico para determinada proteína. Os anticorpos ficam imobilizados em uma resina e capturam a proteína alvo juntamente com outras moléculas associadas (RNAs, proteínas, por exemplo).

Como a proteína FKBP12 possui localização nuclear, para os ensaios de imunoprecipitação utilizou-se um extrato nuclear, obtido conforme descrito anteriormente no item 3.15.7. A detecção da proteína durante as etapas de obtenção desse extrato nuclear são mostradas na Figura 27 A. A fração correspondente ao sobrenadante pós lise por tampões baixo e alto sal foi dosada e utilizada para os ensaios.

A imunoprecipitação dos complexos ribonucleoprotéicos associados à proteína FKBP12 de *T. cruzi* utilizando formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento foi realizada com sucesso como mostra a Figura 27 B. A fração obtida após eluição da resina foi dosada e submetida ao tratamento de redução, alquilação e digestão para análise no espectrômetro de massas como descrito no item 3.15.7. A análise nos mostrou novamente a especificidade do anticorpo em reconhecer a proteína alvo bem como das possíveis proteínas associadas. Novos ensaios foram realizados a fim de se confirmar as interações juntamente com os controles. Além disso, a imunoprecipitação utilizando formas epimastigotas cultivadas em meio LIT na

ausência de soro fetal bovino, tratadas ou não com rapamicina (5 µg/mL e 10 µg/mL por 2 e 24 h) e sob estresse nutricional de 2 h também foram realizadas.



**Figura 27. Imunoprecipitação da proteína FKBP12 de *T. cruzi*.** (A) Fracionamento para obtenção do extrato nuclear. LEGENDA: MW, marcador de massa molecular; SC, sobrenadante pós lise por cavitação; PC, sedimento pós lise por cavitação; SA/B, sobrenadante pós lise do sedimento obtido após a cavitação; PA/B, sedimento pós lise com tampões de baixo e alto sal. (B) Imunoprecipitação. LEGENDA: MW, marcador de massa molecular; FT, *flow through*; L, Lavado (3x); E, Eluído. A massa das proteínas é indicada em kDa.

Cada condição de imunoprecipitação de complexos, contendo a proteína FKBP12 de *T. cruzi*, após as análises de bioinformática, gerou uma lista de proteínas parceiras, que pode ser visualizada nos Quadros 08, 09, 10, 11, 12, 13 e 14. Critérios específicos escritos no item 3.15.7, além de valores específicos de FDR, foram utilizados na seleção das possíveis parceiras para cada experimento, afim de se facilitar o entendimento e posterior conclusão. Na listagem estão as 50 primeiras proteínas identificadas com base nos critérios de seleção.

| <b>TcCLB.511825.63</b> | <b>peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative</b>                             | <b>1183</b>     | <b>15.11</b> | <b>1.64E-04</b> | <b>5.85E-02</b> |
|------------------------|--|-----------------|--------------|-----------------|-----------------|
| <b>IDS</b>             | <b>DESCRIÇÃO</b>   | <b>EPI PROT</b> | <b>FC</b>    | <b>P VALUE</b>  | <b>FDR</b>      |
| TcCLB.507809.110       | hypothetical protein, conserved mitochondrial RNA binding protein, putative      | 1191            | 12,81        | 6,29E-04        | 1,12E-01        |
| TcCLB.509895.20        | hypothetical protein, conserved  | 883             | 9,54         | 4,53E-03        | 5,38E-01        |
| TcCLB.508153.540       | translation initiation factor eIF2B subunit-like protein, putative               | 2374            | 7,92         | 3,43E-02        | 8,70E-01        |
| TcCLB.509835.20        | glucose-6-phosphate isomerase, glycosomal, putative                              | 2266            | 7,47         | 4,45E-02        | 8,70E-01        |
| TcCLB.510889.221       | immunodominant antigen, putative,tc40 antigen-like, putative                     | 94              | 7,06         | 6,32E-02        | 8,70E-01        |
| TcCLB.508865.30        | paraflagellar rod component par4, putative                                       | 1037            | 7,03         | 6,37E-02        | 8,70E-01        |
| TcCLB.510353.30        | hypothetical protein   | 595             | 6,94         | 6,57E-02        | 8,70E-01        |
| TcCLB.507927.100       | serine/threonine protein phosphatase, putative                                   | 1234            | 6,80         | 6,88E-02        | 8,70E-01        |
| TcCLB.506863.80        | hypothetical protein   | 2545            | 6,78         | 6,91E-02        | 8,70E-01        |
| TcCLB.509733.60        | acetylmithine deacetylase-like, putative   | 2160            | 6,76         | 6,94E-02        | 8,70E-01        |
| TcCLB.508971.40        | TPR-repeat protein, putative   | 524             | 6,76         | 7,06E-02        | 8,70E-01        |
| TcCLB.511627.100       | electron-transfer-flavoprotein, alpha polypeptide, putative                      | 2140            | 6,70         | 7,09E-02        | 8,70E-01        |
| TcCLB.511693.90        | calpain-like cysteine peptidase, putative  | 583             | 6,56         | 7,43E-02        | 8,70E-01        |
| TcCLB.508675.29        | cleavage and polyadenylation specificity factor, putative                        | 36              | 6,45         | 7,48E-02        | 8,70E-01        |
| TcCLB.511003.221       | protein mkt1, putative   | 2264            | 6,52         | 7,53E-02        | 8,70E-01        |
| TcCLB.506945.70        | ruvB-like DNA helicase, putative,ATP-dependent DNA helicase, putative            | 638             | 6,51         | 7,58E-02        | 8,70E-01        |
| TcCLB.510877.60        | hypothetical protein, conserved  | 519             | 6,44         | 7,93E-02        | 8,70E-01        |
| TcCLB.508461.370       | hypothetical protein, conserved  | 1045            | 6,33         | 8,01E-02        | 8,70E-01        |
| TcCLB.506677.30        | hypothetical protein, conserved  | 1594            | 6,26         | 8,29E-02        | 8,70E-01        |
| TcCLB.511627.110       | heat shock protein DNAJ, putative  | 216             | 6,30         | 8,47E-02        | 8,70E-01        |
| TcCLB.511189.70        | hypothetical protein, conserved  | 2582            | 6,15         | 8,53E-02        | 8,70E-01        |
| TcCLB.511277.10        | RNA polymerase subunit, putative,DNA-directed RNA polymerase I subunit, putative | 2586            | 6,35         | 8,60E-02        | 8,70E-01        |
| TcCLB.508257.260       | gamma-adaptin 1, putative,AP-1 adapter complex gamma subunit, putative           | 2114            | 6,11         | 8,64E-02        | 8,70E-01        |
| TcCLB.511729.50        | hypothetical protein, conserved  | 2082            | 6,48         | 8,77E-02        | 8,70E-01        |
| TcCLB.510565.179       | hypothetical protein, conserved  | 2279            | 6,26         | 8,82E-02        | 8,70E-01        |



| IDS              | DESCRIÇÃO  | EPI<br>PROT | FC   | P VALUE  | FDR      |
|------------------|--|-------------|------|----------|----------|
| TcCLB.510345.50  | hypothetical protein,<br>conserved                           | 2574        | 5,96 | 9,14E-02 | 8,70E-01 |
| TcCLB.511725.240 | hypothetical protein,<br>conserved                           | 2591        | 5,93 | 9,20E-02 | 8,70E-01 |
| TcCLB.506317.10  | hypothetical protein,<br>conserved                           | 942         | 5,92 | 9,33E-02 | 8,70E-01 |
| TcCLB.508637.90  | phosphoglucomutase   | 452         | 5,31 | 1,16E-01 | 8,70E-01 |
| TcCLB.506773.44  | cytochrome b5,<br>putative                                   | 612         | 6,25 | 1,24E-01 | 8,70E-01 |
| TcCLB.507629.20  | hypothetical protein,<br>conserved                           | 1031        | 5,37 | 1,42E-01 | 8,70E-01 |
| TcCLB.509837.10  | hypothetical protein,<br>conserved                           | 618         | 4,90 | 1,66E-01 | 8,70E-01 |
| TcCLB.508693.80  | ruvB-like DNA helicase,<br>putative                          | 556         | 4,79 | 1,90E-01 | 8,70E-01 |
| TcCLB.508707.310 | leucine rich repeat<br>protein, putative                     | 48          | 4,45 | 2,46E-01 | 8,70E-01 |
| TcCLB.459199.10  | retrotransposon hot<br>spot (RHS) protein,<br>putative       | 1009        | 4,19 | 2,55E-01 | 8,70E-01 |
| TcCLB.508441.20  | glycosomal<br>phosphoenolpyruvate<br>carboxykinase, putative | 28          | 3,97 | 2,85E-01 | 8,70E-01 |
| TcCLB.506239.30  | lectin, putative (AG38)                                      | 1081        | 4,07 | 2,87E-01 | 8,70E-01 |
| TcCLB.506625.100 | hypothetical protein,<br>conserved                           | 609         | 3,91 | 2,88E-01 | 8,70E-01 |
| TcCLB.510575.200 | chaperone DNAJ<br>protein, putative                          | 972         | 4,10 | 2,90E-01 | 8,70E-01 |
| TcCLB.510689.10  | coatomer alpha subunit<br>(pseudogene), putative             | 765         | 3,82 | 2,92E-01 | 8,70E-01 |
| TcCLB.508965.100 | hypothetical protein,<br>conserved                           | 1881        | 4,30 | 2,99E-01 | 8,70E-01 |
| TcCLB.508461.80  | prostaglandin F2alpha<br>synthase (TcPGFS)                   | 5           | 3,80 | 3,04E-01 | 8,70E-01 |
| TcCLB.508897.110 | macrophage infectivity<br>potentiator, precursor,<br>(MIP)   | 1899        | 3,66 | 3,06E-01 | 8,70E-01 |
| TcCLB.511531.9   | chaperone DNAJ<br>protein, putative                          | 2137        | 3,49 | 3,09E-01 | 8,70E-01 |
| TcCLB.510143.5   | hypothetical protein,<br>conserved                           | 1140        | 3,72 | 3,09E-01 | 8,70E-01 |
| TcCLB.510339.14  | hypothetical protein,<br>conserved                           | 2573        | 4,05 | 3,11E-01 | 8,70E-01 |
| TcCLB.510429.24  | hypothetical protein,<br>conserved                           | 361         | 4,02 | 3,11E-01 | 8,70E-01 |
| TcCLB.506989.309 | hypothetical protein,<br>conserved                           | 1041        | 3,55 | 3,12E-01 | 8,70E-01 |
| TcCLB.508649.20  | hypothetical protein,<br>conserved                           | 994         | 3,53 | 3,24E-01 | 8,70E-01 |
| TcCLB.511287.49  | aldo-keto reductase<br>(AKR)                                 | 25          | 3,51 | 3,26E-01 | 8,70E-01 |

**Quadro 08.** Lista de proteínas associadas à FKBP12, de formas epimastigotas de *T. cruzi* cultivadas em meio LIT, obtidas por imunoprecipitação. As 50 primeiras proteínas foram selecionadas utilizando um FDR < 1,0.

| <b>TcCLB.511825.63</b> | <b>peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative</b>   | <b>1183</b>         | <b>16,81</b> | <b>5,95E-07</b> | <b>6,06E-05</b> |
|------------------------|--|---------------------|--------------|-----------------|-----------------|
| <b>IDS</b>             | <b>DESCRIÇÃO</b>   | <b>EPI<br/>PROT</b> | <b>FC</b>    | <b>P VALUE</b>  | <b>FDR</b>      |
| TcCLB.507809.110       | hypothetical protein, conserved  | 1191                | 13,95        | 1,50E-06        | 6,06E-05        |
| TcCLB.508865.30        | immunodominant antigen, putative,tc40 antigen-like,<br>putative  | 1037                | 13,03        | 1,97E-06        | 6,06E-05        |
| TcCLB.511431.30        | hypothetical protein, conserved  | 2245                | 11,66        | 3,61E-06        | 6,06E-05        |
| TcCLB.504125.60        | MCAK-like kinesin, putative  | 996                 | 13,25        | 3,56E-06        | 6,06E-05        |
| TcCLB.507093.300       | hypothetical protein SCD6.10   | 248                 | 13,03        | 3,70E-06        | 6,06E-05        |
| TcCLB.506435.410       | uracil phosphoribosyltransferase, putative   | 554                 | 13,73        | 1,70E-06        | 6,06E-05        |
| TcCLB.511285.120       | ATP-dependent RNA helicase, putative   | 202                 | 13,79        | 1,72E-06        | 6,06E-05        |
| TcCLB.509247.30        | hypothetical protein, conserved  | 327                 | 12,18        | 5,00E-06        | 6,06E-05        |
| TcCLB.507555.80        | retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative   | 380                 | 11,96        | 3,93E-06        | 6,06E-05        |
| TcCLB.506659.20        | mitochondrial DNA polymerase I protein C, putative   | 1750                | 11,55        | 4,14E-06        | 6,06E-05        |
| TcCLB.511801.60        | mitochondrial DEAD box protein, putative   | 1776                | 11,48        | 3,97E-06        | 6,06E-05        |
| TcCLB.510861.40        | hypothetical protein, conserved  | 491                 | 10,91        | 6,00E-06        | 6,06E-05        |
| TcCLB.509599.150       | serine/threonine protein kinase, putative  | 1053                | 11,37        | 5,95E-06        | 6,06E-05        |
| TcCLB.506235.20        | guide RNA associated protein, GAP1, putative   | 366                 | 11,14        | 4,59E-06        | 6,06E-05        |
| TcCLB.508461.270       | rab7 GTP binding protein, putative   | 459                 | 11,58        | 3,75E-06        | 6,06E-05        |
| TcCLB.503399.20        | hydrolase, alpha/beta fold family, putative  | 623                 | 13,28        | 3,44E-06        | 6,06E-05        |
| TcCLB.511727.160       | hypothetical protein, conserved  | 600                 | 12,94        | 2,41E-06        | 6,06E-05        |
| TcCLB.511573.58        | nucleolar protein, putative  | 531                 | 12,55        | 2,78E-06        | 6,06E-05        |
| TcCLB.509917.19        | retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative   | 474                 | 13,02        | 3,12E-06        | 6,06E-05        |
| TcCLB.508699.20        | guanine-nucleotide-exchange-factor, putative,translation<br>initiation factor EIF-2B subunit, putative | 2395                | 12,74        | 2,21E-06        | 6,06E-05        |
| TcCLB.506127.110       | eukaryotic peptide chain release factor subunit 1, putative  | 639                 | 13,08        | 2,04E-06        | 6,06E-05        |
| TcCLB.509213.40        | hypothetical protein, conserved  | 657                 | 14,31        | 1,71E-06        | 6,06E-05        |
| TcCLB.506587.40        | ATP-dependent RNA helicase FAL1, putative  | 1079                | 11,62        | 3,67E-06        | 6,06E-05        |
| TcCLB.509167.140       | hypothetical protein, conserved  | 453                 | 13,72        | 1,54E-06        | 6,06E-05        |
| TcCLB.503823.130       | hypothetical protein, conserved  | 2500                | 11,82        | 3,44E-06        | 6,06E-05        |

| IDS              | DESCRIÇÃO  | EPI<br>PROT | FC    | P VALUE  | FDR      |
|------------------|--|-------------|-------|----------|----------|
| TcCLB.509167.150 | homoserine kinase, putative  | 422         | 11,91 | 3,65E-06 | 6,06E-05 |
| TcCLB.510609.20  | hypothetical protein, conserved  | 440         | 13,10 | 2,49E-06 | 6,06E-05 |
| TcCLB.507023.170 | hypothetical protein, conserved  | 1353        | 12,04 | 3,66E-06 | 6,06E-05 |
| TcCLB.506211.70  | RNA-binding protein, putative  | 587         | 13,67 | 1,66E-06 | 6,06E-05 |
| TcCLB.509229.80  | mitochondrial processing peptidase alpha subunit, putative, metallo-peptidase, Clan ME, Family M16, putative | 549         | 11,33 | 6,26E-06 | 6,06E-05 |
| TcCLB.506625.70  | RNA-binding protein, putative  | 889         | 13,74 | 1,75E-06 | 6,06E-05 |
| TcCLB.511303.90  | hypothetical protein, conserved  | 2211        | 12,26 | 2,73E-06 | 6,06E-05 |
| TcCLB.509941.110 | condensin subunit 1, putative  | 2570        | 10,93 | 5,91E-06 | 6,06E-05 |
| TcCLB.506825.60  | hypothetical protein, conserved  | 2544        | 10,62 | 5,72E-06 | 6,06E-05 |
| TcCLB.510303.290 | acyl-CoA dehydrogenase, putative   | 621         | 13,18 | 3,16E-06 | 6,06E-05 |
| TcCLB.507927.20  | mitochondrial oligo_U binding protein TBRGG1, putative   | 354         | 11,61 | 4,08E-06 | 6,06E-05 |
| TcCLB.507513.20  | hypothetical protein, conserved  | 2428        | 11,91 | 4,47E-06 | 6,06E-05 |
| TcCLB.506235.10  | translation initiation factor IF-2, putative   | 1046        | 11,45 | 4,96E-06 | 6,06E-05 |
| TcCLB.506755.260 | mitochondrial RNA-binding protein 2, putative  | 192         | 11,01 | 5,09E-06 | 6,06E-05 |
| TcCLB.509243.30  | hypothetical protein, conserved  | 297         | 11,93 | 5,85E-06 | 6,06E-05 |
| TcCLB.509109.120 | protein tyrosine phosphatase, putative   | 490         | 11,81 | 3,38E-06 | 6,06E-05 |
| TcCLB.509539.50  | small GTP-binding protein, putative  | 345         | 11,30 | 5,34E-06 | 6,06E-05 |
| TcCLB.504105.20  | eukaryotic translation initiation factor 5, putative   | 566         | 12,77 | 2,57E-06 | 6,06E-05 |
| TcCLB.511421.200 | hypothetical protein, conserved  | 468         | 12,04 | 6,15E-06 | 6,06E-05 |
| TcCLB.508547.110 | ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative  | 1449        | 11,74 | 4,49E-06 | 6,06E-05 |
| TcCLB.508045.100 | mitochondrial DNA primase, putative (PRI1)   | 1629        | 12,44 | 2,94E-06 | 6,06E-05 |
| TcCLB.506649.80  | RNA-binding protein, putative  | 454         | 12,73 | 2,52E-06 | 6,06E-05 |
| TcCLB.506301.30  | hypothetical protein, conserved  | 1190        | 10,37 | 6,28E-06 | 6,06E-05 |
| TcCLB.509109.30  | hypothetical protein, conserved  | 581         | 10,94 | 5,42E-06 | 6,06E-05 |
| TcCLB.510635.50  | zinc-binding phosphatase, putative   | 2579        | 11,84 | 4,23E-06 | 6,06E-05 |

**Quadro 09. Lista de proteínas associadas à FKBP12, de formas epimastigotas de *T. cruzi* cultivadas em meio LIT sem SFB, obtidas por imunoprecipitação. As 50 primeiras proteínas foram selecionadas utilizando um FDR  $\leq$  0,01.**

| <b>TcCLB.511825.63</b> | <b>peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative</b>   | <b>1183</b>         | <b>9,11</b> | <b>8,46E-02</b> | <b>3,67E-01</b> |
|------------------------|--|---------------------|-------------|-----------------|-----------------|
| <b>IDS</b>             | <b>DESCRIÇÃO</b>   | <b>EPI<br/>PROT</b> | <b>FC</b>   | <b>P VALUE</b>  | <b>FDR</b>      |
| TcCLB.507809.110       | hypothetical protein, conserved  | 1191                | 9,04        | 8,47E-02        | 3,67E-01        |
| TcCLB.508865.30        | immunodominant antigen, putative,tc40 antigen-like,<br>putative  | 1037                | 8,44        | 8,51E-02        | 3,67E-01        |
| TcCLB.511431.30        | hypothetical protein, conserved  | 2245                | 7,75        | 8,64E-02        | 3,67E-01        |
| TcCLB.504125.60        | MCAK-like kinesin, putative  | 996                 | 8,10        | 8,52E-02        | 3,67E-01        |
| TcCLB.507093.300       | hypothetical protein SCD6.10   | 248                 | 8,23        | 8,50E-02        | 3,67E-01        |
| TcCLB.506435.410       | uracil phosphoribosyltransferase, putative   | 554                 | 8,54        | 8,48E-02        | 3,67E-01        |
| TcCLB.511285.120       | ATP-dependent RNA helicase, putative   | 202                 | 8,23        | 8,51E-02        | 3,67E-01        |
| TcCLB.509247.30        | hypothetical protein, conserved  | 327                 | 7,78        | 8,54E-02        | 3,67E-01        |
| TcCLB.507555.80        | retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative   | 380                 | 6,96        | 8,62E-02        | 3,67E-01        |
| TcCLB.506659.20        | mitochondrial DNA polymerase I protein C, putative   | 1750                | 6,98        | 8,70E-02        | 3,67E-01        |
| TcCLB.511801.60        | mitochondrial DEAD box protein, putative   | 1776                | 6,18        | 8,70E-02        | 3,67E-01        |
| TcCLB.510861.40        | hypothetical protein, conserved  | 491                 | 5,94        | 8,75E-02        | 3,67E-01        |
| TcCLB.509599.150       | serine/threonine protein kinase, putative  | 1053                | 6,13        | 8,76E-02        | 3,67E-01        |
| TcCLB.506235.20        | guide RNA associated protein, GAP1, putative   | 366                 | 5,49        | 8,83E-02        | 3,67E-01        |
| TcCLB.508461.270       | rab7 GTP binding protein, putative   | 459                 | 5,40        | 8,86E-02        | 3,67E-01        |
| TcCLB.503399.20        | hydrolase, alpha/beta fold family, putative  | 623                 | 6,28        | 8,92E-02        | 3,67E-01        |
| TcCLB.508699.20        | guanine-nucleotide-exchange-factor, putative,translation<br>initiation factor EIF-2B subunit, putative | 2395                | 8,17        | 8,51E-02        | 3,67E-01        |
| TcCLB.506127.110       | eukaryotic peptide chain release factor subunit 1, putative  | 639                 | 7,37        | 8,57E-02        | 3,67E-01        |
| TcCLB.509213.40        | hypothetical protein, conserved  | 657                 | 7,97        | 8,60E-02        | 3,67E-01        |
| TcCLB.506587.40        | ATP-dependent RNA helicase FAL1, putative  | 1079                | 6,55        | 8,66E-02        | 3,67E-01        |
| TcCLB.509167.140       | hypothetical protein, conserved  | 453                 | 6,84        | 8,66E-02        | 3,67E-01        |
| TcCLB.503823.130       | hypothetical protein, conserved  | 2500                | 6,47        | 8,66E-02        | 3,67E-01        |
| TcCLB.509167.150       | homoserine kinase, putative  | 422                 | 6,94        | 8,72E-02        | 3,67E-01        |
| TcCLB.506211.70        | RNA-binding protein, putative  | 587                 | 8,28        | 8,50E-02        | 3,67E-01        |
| TcCLB.506625.70        | RNA-binding protein, putative  | 889                 | 8,55        | 8,59E-02        | 3,67E-01        |

| IDS              | DESCRIÇÃO   | EPI<br>PROT | FC   | P VALUE  | FDR      |
|------------------|---|-------------|------|----------|----------|
| TcCLB.509941.110 | condensin subunit 1, putative   | 2570        | 5,65 | 8,84E-02 | 3,67E-01 |
| TcCLB.510303.290 | acyl-CoA dehydrogenase, putative  | 621         | 8,29 | 8,53E-02 | 3,67E-01 |
| TcCLB.507513.20  | hypothetical protein, conserved   | 2428        | 7,70 | 8,54E-02 | 3,67E-01 |
| TcCLB.506755.260 | mitochondrial RNA-binding protein 2, putative   | 192         | 6,47 | 8,72E-02 | 3,67E-01 |
| TcCLB.509243.30  | hypothetical protein, conserved   | 297         | 7,65 | 8,55E-02 | 3,67E-01 |
| TcCLB.504105.20  | eukaryotic translation initiation factor 5, putative  | 566         | 8,20 | 8,76E-02 | 3,67E-01 |
| TcCLB.511421.200 | hypothetical protein, conserved   | 468         | 5,59 | 9,01E-02 | 3,67E-01 |
| TcCLB.508547.110 | ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative   | 1449        | 6,52 | 8,70E-02 | 3,67E-01 |
| TcCLB.508045.100 | mitochondrial DNA primase, putative (PRI1)  | 1629        | 7,15 | 8,59E-02 | 3,67E-01 |
| TcCLB.506649.80  | RNA-binding protein, putative   | 454         | 7,18 | 8,64E-02 | 3,67E-01 |
| TcCLB.506301.30  | hypothetical protein, conserved   | 1190        | 5,92 | 8,76E-02 | 3,67E-01 |
| TcCLB.509109.30  | hypothetical protein, conserved   | 581         | 5,46 | 9,00E-02 | 3,67E-01 |
| TcCLB.507503.70  | retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene), putative  | 269         | 6,80 | 8,69E-02 | 3,67E-01 |
| TcCLB.511761.60  | hypothetical protein, conserved   | 438         | 6,53 | 8,66E-02 | 3,67E-01 |
| TcCLB.506945.70  | protein mkt1, putative  | 638         | 7,06 | 8,62E-02 | 3,67E-01 |
| TcCLB.510947.30  | hypothetical protein, conserved   | 225         | 5,20 | 8,91E-02 | 3,67E-01 |
| TcCLB.507007.99  | mitochondrial carrier protein (pseudogene), putative, mitochondrial carrier protein, putative, frameshift | 339         | 6,69 | 8,65E-02 | 3,67E-01 |
| TcCLB.511333.4   | cytoskeleton-associated protein CAP5.5, putative  | 598         | 6,24 | 8,72E-02 | 3,67E-01 |
| TcCLB.503955.70  | eukaryotic translation initiation factor 2 beta subunit, putative   | 828         | 6,10 | 8,72E-02 | 3,67E-01 |
| TcCLB.508993.10  | cytidine triphosphate synthase, putative  | 1213        | 7,84 | 8,55E-02 | 3,67E-01 |
| TcCLB.510351.90  | dihydrolipoamide branched chain transacylase, putative  | 540         | 8,10 | 8,51E-02 | 3,67E-01 |
| TcCLB.509551.30  | mitochondrial phosphate transporter, putative   | 180         | 7,10 | 8,60E-02 | 3,67E-01 |
| TcCLB.510443.40  | hypothetical protein, conserved   | 2577        | 7,02 | 8,64E-02 | 3,67E-01 |
| TcCLB.504003.60  | chaperonin/T-complex protein 1 gamma subunit, putative  | 158         | 6,70 | 8,64E-02 | 3,67E-01 |
| TcCLB.510173.40  | MRB1-associated protein, putative, guide RNA binding protein, putative                                    | 1572        | 6,36 | 9,18E-02 | 3,67E-01 |

**Quadro 10. Lista de proteínas associadas à FKBP12 de formas epimastigotas de *T. cruzi* cultivadas em meio LIT sem SFB e tratadas com rapamicina (5,0 µg/mL por 2 h) obtidas por imunoprecipitação. As 50 primeiras proteínas foram selecionadas utilizando um FDR < 1,0.**

| TcCLB.511825.63  | peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative                 | 1183        | 9,90  | 9,02E-04 | 1,20E-02 |
|------------------|---|-------------|-------|----------|----------|
| IDS              | DESCRIÇÃO   | EPI<br>PROT | FC    | P VALUE  | FDR      |
| TcCLB.508865.30  | immunodominant antigen, putative, tc40 antigen-like, putative | 1037        | 12,95 | 2,90E-04 | 1,12E-02 |
| TcCLB.507093.300 | hypothetical protein SCD6.10                                  | 248         | 11,32 | 5,85E-04 | 1,12E-02 |
| TcCLB.509213.40  | hypothetical protein, conserved                               | 657         | 11,84 | 4,69E-04 | 1,12E-02 |
| TcCLB.509167.140 | hypothetical protein, conserved                               | 453         | 11,71 | 4,98E-04 | 1,12E-02 |
| TcCLB.506625.70  | RNA-binding protein, putative                                 | 889         | 12,37 | 2,63E-04 | 1,12E-02 |
| TcCLB.508993.10  | cytidine triphosphate synthase, putative                      | 1213        | 11,69 | 5,16E-04 | 1,12E-02 |
| TcCLB.509551.64  | small nuclear ribonucleoprotein Sm-F, putative                | 580         | 11,08 | 5,18E-04 | 1,12E-02 |
| TcCLB.511529.259 | hypothetical protein, conserved                               | 2426        | 11,18 | 5,16E-04 | 1,12E-02 |
| TcCLB.506659.10  | immunodominant antigen, putative, tc40 antigen-like, putative | 2229        | 10,84 | 6,21E-04 | 1,12E-02 |
| TcCLB.507809.110 | hypothetical protein, conserved                               | 1191        | 11,45 | 7,37E-04 | 1,19E-02 |
| TcCLB.509247.30  | hypothetical protein, conserved                               | 327         | 10,27 | 9,69E-04 | 1,20E-02 |
| TcCLB.506357.130 | hypothetical protein, conserved                               | 1134        | 9,87  | 9,37E-04 | 1,20E-02 |
| TcCLB.509671.110 | hypothetical protein, conserved                               | 870         | 10,51 | 1,03E-03 | 1,20E-02 |
| TcCLB.506211.70  | RNA-binding protein, putative                                 | 587         | 10,19 | 1,14E-03 | 1,23E-02 |
| TcCLB.511285.120 | ATP-dependent RNA helicase, putative                          | 202         | 10,10 | 1,24E-03 | 1,26E-02 |
| TcCLB.507555.80  | retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative              | 380         | 8,89  | 1,70E-03 | 1,62E-02 |

**Quadro 11. Lista de proteínas associadas à FKBP12 de formas epimastigotas de *T. cruzi* cultivadas em meio LIT sem SFB e tratadas com rapamicina (5,0 µg/mL por 24 h) obtidas por imunoprecipitação.** Todas as proteínas foram selecionadas utilizando um FDR ≤ 0,1.

| <b>TcCLB.511825.63</b> | <b>peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative</b>  | <b>1183</b>         | <b>15,67</b> | <b>4,29E-07</b> | <b>1,85E-05</b> |
|------------------------|---|---------------------|--------------|-----------------|-----------------|
| <b>IDS</b>             | <b>DESCRIÇÃO</b>  | <b>EPI<br/>PROT</b> | <b>FC</b>    | <b>P VALUE</b>  | <b>FDR</b>      |
| TcCLB.508865.30        | immunodominant antigen, putative,tc40 antigen-like,<br>putative   | 1037                | 16,25        | 3,84E-07        | 1,85E-05        |
| TcCLB.507093.300       | hypothetical protein SCD6.10  | 248                 | 13,93        | 1,46E-06        | 1,85E-05        |
| TcCLB.509213.40        | hypothetical protein, conserved   | 657                 | 15,30        | 5,66E-07        | 1,85E-05        |
| TcCLB.508993.10        | cytidine triphosphate synthase, putative  | 1213                | 13,89        | 1,49E-06        | 1,85E-05        |
| TcCLB.507809.110       | hypothetical protein, conserved   | 1191                | 15,59        | 4,70E-07        | 1,85E-05        |
| TcCLB.509247.30        | hypothetical protein, conserved   | 327                 | 13,72        | 8,81E-07        | 1,85E-05        |
| TcCLB.506211.70        | RNA-binding protein, putative   | 587                 | 14,09        | 1,26E-06        | 1,85E-05        |
| TcCLB.511285.120       | ATP-dependent RNA helicase, putative  | 202                 | 14,63        | 7,86E-07        | 1,85E-05        |
| TcCLB.507555.80        | retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative<br>mitochondrial processing peptidase alpha subunit,<br>putative,metallo-peptidase, Clan ME, Family M16,<br>putative | 380                 | 14,54        | 8,98E-07        | 1,85E-05        |
| TcCLB.509229.80        |   | 549                 | 13,18        | 1,16E-06        | 1,85E-05        |
| TcCLB.511865.60        | hypothetical protein, conserved   | 797                 | 13,74        | 8,31E-07        | 1,85E-05        |
| TcCLB.506659.20        | mitochondrial DNA polymerase I protein C, putative  | 1750                | 13,21        | 1,01E-06        | 1,85E-05        |
| TcCLB.509599.150       | serine/threonine protein kinase, putative   | 1053                | 13,92        | 7,94E-07        | 1,85E-05        |
| TcCLB.508257.150       | small nuclear ribonucleoprotein SmD3, putative<br>coatmer delta subunit, putative,delta-COP,<br>putative,delta-coat protein, putative                                 | 1175                | 13,33        | 1,17E-06        | 1,85E-05        |
| TcCLB.511217.140       |   | 923                 | 12,80        | 1,21E-06        | 1,85E-05        |
| TcCLB.511573.58        | nucleolar protein, putative   | 531                 | 13,01        | 1,56E-06        | 1,85E-05        |
| TcCLB.505919.80        | retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative  | 981                 | 13,38        | 1,36E-06        | 1,85E-05        |
| TcCLB.509913.10        | 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase, putative  | 2489                | 12,76        | 1,20E-06        | 1,85E-05        |
| TcCLB.504125.60        | MCAK-like kinesin, putative   | 996                 | 14,38        | 8,34E-07        | 1,85E-05        |
| TcCLB.506235.20        | guide RNA associated protein, GAP1, putative  | 366                 | 13,30        | 1,03E-06        | 1,85E-05        |
| TcCLB.508699.20        | guanine-nucleotide-exchange-factor, putative,translation<br>initiation factor EIF-2B subunit, putative  | 2395                | 14,38        | 7,70E-07        | 1,85E-05        |
| TcCLB.506945.70        | protein mkt1, putative  | 638                 | 12,79        | 1,37E-06        | 1,85E-05        |
| TcCLB.510443.40        | hypothetical protein, conserved   | 2577                | 12,34        | 1,53E-06        | 1,85E-05        |
| TcCLB.508153.400       | serine/threonine protein kinase, putative,protein kinase,<br>putative   | 432                 | 15,32        | 5,89E-07        | 1,85E-05        |
| TcCLB.509103.10        | hypothetical protein, conserved   | 1425                | 13,42        | 1,43E-06        | 1,85E-05        |

| IDS               | DESCRIÇÃO  | EPI PROT | FC    | P VALUE  | FDR      |
|-------------------|--|----------|-------|----------|----------|
| TcCLB.509733.100  | translation elongation factor 1-beta, putative               | 187      | 13,20 | 1,14E-06 | 1,85E-05 |
| TcCLB.508799.1703 | methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta subunit, putative       | 1270     | 13,48 | 1,36E-06 | 1,85E-05 |
| TcCLB.508321.40   | hypothetical protein, conserved                              | 1891     | 13,11 | 1,21E-06 | 1,85E-05 |
| TcCLB.506677.30   | hypothetical protein, conserved                              | 1594     | 14,79 | 6,07E-07 | 1,85E-05 |
| TcCLB.506317.10   | hypothetical protein, conserved                              | 942      | 13,46 | 1,04E-06 | 1,85E-05 |
| TcCLB.511071.171  | 60S ribosomal protein L12, putative                          | 373      | 13,43 | 9,19E-07 | 1,85E-05 |
| TcCLB.504839.50   | nucleosome assembly protein-like protein, putative           | 573      | 13,28 | 9,58E-07 | 1,85E-05 |
| TcCLB.507019.120  | hypothetical protein, conserved                              | 2013     | 12,64 | 1,58E-06 | 1,85E-05 |
| TcCLB.507949.4    | cytidine triphosphate synthase, putative                     | 1464     | 14,00 | 7,94E-07 | 1,85E-05 |
| TcCLB.507021.110  | hypothetical protein, conserved                              | 1734     | 13,77 | 8,22E-07 | 1,85E-05 |
| TcCLB.506009.10   | hypothetical protein, conserved                              | 1077     | 12,81 | 1,56E-06 | 1,85E-05 |
| TcCLB.508325.160  | retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative             | 629      | 13,13 | 1,09E-06 | 1,85E-05 |
| TcCLB.509917.19   | retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative             | 474      | 13,73 | 1,23E-06 | 1,85E-05 |
| TcCLB.510609.20   | hypothetical protein, conserved                              | 440      | 13,66 | 1,56E-06 | 1,85E-05 |
| TcCLB.511303.90   | hypothetical protein, conserved                              | 2211     | 12,57 | 1,51E-06 | 1,85E-05 |
| TcCLB.510083.30   | retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene), putative | 646      | 13,55 | 8,92E-07 | 1,85E-05 |
| TcCLB.507063.90   | mitochondrial DNA polymerase beta, putative                  | 125      | 12,22 | 1,51E-06 | 1,85E-05 |
| TcCLB.509729.20   | hypothetical protein, conserved                              | 2568     | 14,11 | 8,07E-07 | 1,85E-05 |
| TcCLB.511837.29   | iron-sulfur cluster assembly protein, putative               | 2050     | 13,85 | 9,67E-07 | 1,85E-05 |
| TcCLB.507033.20   | histone H3 variant, putative                                 | 1123     | 13,23 | 1,60E-06 | 1,85E-05 |
| TcCLB.503749.5    | pyrroline-5-carboxylate synthetase-like protein, putative    | 448      | 12,24 | 1,53E-06 | 1,85E-05 |
| TcCLB.506863.80   | serine/threonine protein phosphatase, putative               | 2545     | 13,25 | 1,04E-06 | 1,85E-05 |
| TcCLB.506443.150  | retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative             | 617      | 14,74 | 6,94E-07 | 1,85E-05 |
| TcCLB.511323.40   | histone H2A, putative  | 538      | 15,55 | 4,93E-07 | 1,85E-05 |
| TcCLB.510257.10   | hypothetical protein, conserved                              | 2527     | 13,49 | 1,03E-06 | 1,85E-05 |

**Quadro 12.** Lista de proteínas associadas à FKBP12 de formas epimastigotas de *T. cruzi* cultivadas em meio LIT sem SFB e tratadas com rapamicina (10,0 µg/mL por 2 h) obtidas por imunoprecipitação. As 50 primeiras proteínas foram selecionadas utilizando um FDR ≤ 0,01.



| <b>TcCLB.511825.63</b> | <b>peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative</b>   | <b>1183</b>         | <b>14,56</b> | <b>4,60E-07</b> | <b>2,02E-05</b> |
|------------------------|--|---------------------|--------------|-----------------|-----------------|
| <b>IDS</b>             | <b>DESCRIÇÃO</b>   | <b>EPI<br/>PROT</b> | <b>FC</b>    | <b>P VALUE</b>  | <b>FDR</b>      |
| TcCLB.508865.30        | immunodominant antigen, putative,tc40 antigen-like,<br>putative  | 1037                | 15,66        | 4,30E-07        | 2,02E-05        |
| TcCLB.507093.300       | hypothetical protein SCD6.10   | 248                 | 13,21        | 1,59E-06        | 2,02E-05        |
| TcCLB.507809.110       | hypothetical protein, conserved  | 1191                | 14,83        | 5,98E-07        | 2,02E-05        |
| TcCLB.509247.30        | hypothetical protein, conserved  | 327                 | 13,10        | 1,43E-06        | 2,02E-05        |
| TcCLB.511285.120       | ATP-dependent RNA helicase, putative   | 202                 | 14,22        | 7,89E-07        | 2,02E-05        |
| TcCLB.507555.80        | retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative   | 380                 | 14,28        | 8,56E-07        | 2,02E-05        |
| TcCLB.511865.60        | hypothetical protein, conserved  | 797                 | 13,20        | 9,74E-07        | 2,02E-05        |
| TcCLB.506659.20        | mitochondrial DNA polymerase I protein C, putative   | 1750                | 12,16        | 1,93E-06        | 2,02E-05        |
| TcCLB.509599.150       | serine/threonine protein kinase, putative  | 1053                | 13,45        | 8,74E-07        | 2,02E-05        |
| TcCLB.508257.150       | small nuclear ribonucleoprotein SmD3, putative<br>coatomer delta subunit, putative,delta-COP,<br>putative,delta-coat protein, putative | 1175                | 12,41        | 1,36E-06        | 2,02E-05        |
| TcCLB.511217.140       |  | 923                 | 12,25        | 1,66E-06        | 2,02E-05        |
| TcCLB.511573.58        | nucleolar protein, putative  | 531                 | 12,39        | 1,55E-06        | 2,02E-05        |
| TcCLB.505919.80        | retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative   | 981                 | 12,93        | 1,04E-06        | 2,02E-05        |
| TcCLB.509913.10        | 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase, putative   | 2489                | 12,18        | 1,40E-06        | 2,02E-05        |
| TcCLB.504125.60        | MCAK-like kinesin, putative  | 996                 | 13,94        | 7,18E-07        | 2,02E-05        |
| TcCLB.510861.40        | hypothetical protein, conserved  | 491                 | 11,00        | 1,81E-06        | 2,02E-05        |
| TcCLB.506235.20        | guide RNA associated protein, GAP1, putative   | 366                 | 12,98        | 8,80E-07        | 2,02E-05        |
| TcCLB.508153.400       | serine/threonine protein kinase, putative,protein kinase,<br>putative  | 432                 | 14,96        | 5,54E-07        | 2,02E-05        |
| TcCLB.509103.10        | hypothetical protein, conserved  | 1425                | 12,53        | 1,95E-06        | 2,02E-05        |
| TcCLB.508321.40        | hypothetical protein, conserved  | 1891                | 12,34        | 1,17E-06        | 2,02E-05        |
| TcCLB.506677.30        | hypothetical protein, conserved  | 1594                | 14,41        | 5,17E-07        | 2,02E-05        |
| TcCLB.506317.10        | hypothetical protein, conserved  | 942                 | 13,17        | 1,32E-06        | 2,02E-05        |
| TcCLB.511071.171       | 60S ribosomal protein L12, putative  | 373                 | 12,22        | 1,29E-06        | 2,02E-05        |
| TcCLB.510125.10        | pumilio/PUF RNA binding protein 6, putative (PUF6)   | 1033                | 12,35        | 1,22E-06        | 2,02E-05        |
| TcCLB.507019.120       | hypothetical protein, conserved  | 2013                | 12,00        | 1,68E-06        | 2,02E-05        |

| IDS              | DESCRIÇÃO   | EPI PROT | FC    | P VALUE  | FDR      |
|------------------|---|----------|-------|----------|----------|
| TcCLB.507949.4   | cytidine triphosphate synthase, putative  | 1464     | 14,12 | 8,34E-07 | 2,02E-05 |
| TcCLB.507021.110 | hypothetical protein, conserved   | 1734     | 13,38 | 8,29E-07 | 2,02E-05 |
| TcCLB.506009.10  | hypothetical protein, conserved   | 1077     | 12,62 | 1,01E-06 | 2,02E-05 |
| TcCLB.509917.19  | retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative                                  | 474      | 13,08 | 8,59E-07 | 2,02E-05 |
| TcCLB.508461.270 | rab7 GTP binding protein, putative  | 459      | 12,25 | 1,79E-06 | 2,02E-05 |
| TcCLB.510083.30  | retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene), putative                      | 646      | 13,26 | 1,11E-06 | 2,02E-05 |
| TcCLB.507063.90  | mitochondrial DNA polymerase beta, putative                                       | 125      | 11,52 | 1,65E-06 | 2,02E-05 |
| TcCLB.509729.20  | hypothetical protein, conserved   | 2568     | 13,63 | 6,30E-07 | 2,02E-05 |
| TcCLB.511837.29  | iron-sulfur cluster assembly protein, putative                                    | 2050     | 13,63 | 9,37E-07 | 2,02E-05 |
| TcCLB.507033.20  | histone H3 variant, putative  | 1123     | 12,96 | 1,00E-06 | 2,02E-05 |
| TcCLB.506863.80  | serine/threonine protein phosphatase, putative                                    | 2545     | 12,97 | 1,58E-06 | 2,02E-05 |
| TcCLB.506443.150 | retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative                                  | 617      | 14,48 | 6,28E-07 | 2,02E-05 |
| TcCLB.511323.40  | histone H2A, putative   | 538      | 14,60 | 6,50E-07 | 2,02E-05 |
| TcCLB.510257.10  | hypothetical protein, conserved   | 2527     | 12,95 | 8,62E-07 | 2,02E-05 |
| TcCLB.507765.130 | hypothetical protein, conserved   | 2099     | 12,60 | 9,78E-07 | 2,02E-05 |
| TcCLB.511233.20  | 60S ribosomal protein L34, putative   | 360      | 12,99 | 1,00E-06 | 2,02E-05 |
| TcCLB.510519.30  | mitochondrial structure specific endonuclease I (SSE-1), putative                 | 1300     | 11,96 | 1,29E-06 | 2,02E-05 |
| TcCLB.506247.40  | hypothetical protein, conserved   | 2406     | 12,43 | 1,37E-06 | 2,02E-05 |
| TcCLB.427303.10  | 5'-3' exonuclease XRNA (pseudogene), putative, exoribonuclease 1, putative (XRNA) | 2528     | 12,33 | 1,48E-06 | 2,02E-05 |
| TcCLB.510445.50  | S-adenosylmethionine synthetase, putative (METK1)                                 | 211      | 11,50 | 1,66E-06 | 2,02E-05 |
| TcCLB.511431.30  | hypothetical protein, conserved   | 2245     | 11,58 | 1,85E-06 | 2,02E-05 |
| TcCLB.503399.20  | hydrolase, alpha/beta fold family, putative                                       | 623      | 11,62 | 1,94E-06 | 2,02E-05 |
| TcCLB.506479.130 | cytidine triphosphate synthase, putative  | 1845     | 12,68 | 1,50E-06 | 2,02E-05 |
| TcCLB.511431.10  | protein kinase, putative  | 1504     | 11,34 | 1,77E-06 | 2,02E-05 |
| TcCLB.507589.14  | tryptophanyl-tRNA synthetase, putative  | 2299     | 12,86 | 9,10E-07 | 2,02E-05 |

**Quadro 13.** Lista de proteínas associadas à FKBP12 de formas epimastigotas de *T. cruzi* cultivadas em meio LIT sem SFB e tratadas com rapamicina (10,0 µg/mL por 24 h) obtidas por imunoprecipitação. As 50 primeiras proteínas foram selecionadas utilizando um FDR ≤ 0,01.

| <b>TcCLB.511825.63</b> | <b>peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative</b>   | <b>857</b>          | <b>11,93</b> | <b>1,02E-08</b> | <b>5,21E-07</b> |
|------------------------|--|---------------------|--------------|-----------------|-----------------|
| <b>IDS</b>             | <b>DESCRIÇÃO</b>   | <b>EPI<br/>PROT</b> | <b>FC</b>    | <b>P VALUE</b>  | <b>FDR</b>      |
| TcCLB.507809.110       | hypothetical protein, conserved  | 781                 | 12,16        | 5,73E-09        | 5,21E-07        |
| TcCLB.508865.30        | immunodominant antigen, putative,tc40 antigen-like, putative   | 751                 | 10,74        | 1,65E-08        | 5,21E-07        |
| TcCLB.507831.60        | heat shock protein 110, putative   | 54                  | 8,90         | 2,95E-08        | 5,21E-07        |
| TcCLB.509261.30        | 3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor, putative   | 199                 | 11,04        | 3,23E-08        | 5,21E-07        |
| TcCLB.507093.229       | U-rich RNA-binding protein UBP-2   | 122                 | 9,60         | 3,42E-08        | 5,21E-07        |
| TcCLB.506755.260       | mitochondrial RNA-binding protein 2, putative  | 177                 | 11,59        | 6,49E-09        | 5,21E-07        |
| TcCLB.511071.171       | 60S ribosomal protein L12, putative  | 318                 | 12,46        | 1,25E-08        | 5,21E-07        |
| TcCLB.504125.60        | MCAK-like kinesin, putative  | 710                 | 10,54        | 1,53E-08        | 5,21E-07        |
| TcCLB.510659.210       | chaperone DNAJ protein, putative   | 910                 | 11,89        | 1,07E-08        | 5,21E-07        |
| TcCLB.511277.60        | alcohol dehydrogenase, putative  | 31                  | 10,27        | 2,21E-08        | 5,21E-07        |
| TcCLB.509825.14        | 40S ribosomal protein SA, putative   | 95                  | 10,64        | 1,30E-08        | 5,21E-07        |
| TcCLB.510663.70        | 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating, putative  | 148                 | 10,74        | 1,94E-08        | 5,21E-07        |
| TcCLB.511903.110       | 40S ribosomal protein S8, putative   | 168                 | 10,91        | 1,80E-08        | 5,21E-07        |
| TcCLB.508355.330       | hypothetical protein, conserved  | 216                 | 11,38        | 7,14E-09        | 5,21E-07        |
| TcCLB.508737.100       | ATP-dependent Clp protease subunit, heat shock protein 78, putative (HSP78)  | 247                 | 10,14        | 3,41E-08        | 5,21E-07        |
| TcCLB.509767.170       | hypothetical protein, conserved  | 254                 | 10,69        | 1,45E-08        | 5,21E-07        |
| TcCLB.511233.20        | 60S ribosomal protein L34, putative  | 283                 | 12,46        | 4,65E-09        | 5,21E-07        |
| TcCLB.506821.20        | ATP-dependent Clp protease subunit, heat shock protein 104 (HSP104), putative,atp-dependent chaperone,ATP-dependent Clp protease subunit, heat shock protein 100 (pseudogene), putative,serine peptidase (pseudogene), putative (HSP100) | 301                 | 11,58        | 6,83E-09        | 5,21E-07        |
| TcCLB.511903.130       | 60S ribosomal protein L26, putative  | 324                 | 10,62        | 1,99E-08        | 5,21E-07        |
| TcCLB.510609.20        | hypothetical protein, conserved  | 370                 | 10,41        | 1,83E-08        | 5,21E-07        |
| TcCLB.508153.730       | eukaryotic initiation factor 2a, putative  | 388                 | 11,43        | 1,17E-08        | 5,21E-07        |
| TcCLB.506559.470       | ribosomal protein l35a, putative   | 399                 | 11,89        | 1,04E-08        | 5,21E-07        |
| TcCLB.509353.60        | calmodulin, putative   | 445                 | 9,26         | 1,93E-08        | 5,21E-07        |
| TcCLB.509229.80        | mitochondrial processing peptidase alpha subunit, putative,metallo-peptidase, Clan ME, Family M16, putative  | 450                 | 9,57         | 1,68E-08        | 5,21E-07        |
| TcCLB.506435.410       | uracil phosphoribosyltransferase, putative   | 476                 | 9,57         | 3,17E-08        | 5,21E-07        |

|                  |   |      |       |          |          |
|------------------|---|------|-------|----------|----------|
| TcCLB.505843.24  | succinate dehydrogenase, putative                       | 484  | 8,69  | 3,06E-08 | 5,21E-07 |
| TcCLB.511805.15  | ribosomal protein S29, putative                         | 487  | 11,98 | 6,51E-09 | 5,21E-07 |
| TcCLB.507671.30  | 25 kDa translation elongation factor 1-beta (EF-1-beta) | 493  | 9,01  | 3,25E-08 | 5,21E-07 |
| TcCLB.511727.160 | hypothetical protein, conserved                         | 497  | 10,14 | 1,77E-08 | 5,21E-07 |
| TcCLB.506443.150 | retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative        | 535  | 10,65 | 2,32E-08 | 5,21E-07 |
| TcCLB.509213.40  | hypothetical protein, conserved                         | 536  | 11,62 | 3,30E-08 | 5,21E-07 |
| TcCLB.507765.60  | 40S ribosomal protein S21, putative                     | 566  | 11,59 | 2,91E-08 | 5,21E-07 |
| TcCLB.509761.10  | hypothetical protein, conserved                         | 578  | 10,17 | 1,85E-08 | 5,21E-07 |
| TcCLB.509505.10  | protein disulfide isomerase, putative                   | 605  | 9,03  | 2,84E-08 | 5,21E-07 |
| TcCLB.506625.70  | RNA-binding protein, putative                           | 670  | 8,76  | 3,02E-08 | 5,21E-07 |
| TcCLB.511217.145 | ribosomal protein L39, putative                         | 791  | 10,46 | 1,68E-08 | 5,21E-07 |
| TcCLB.509793.40  | kinetoplast-associated protein (TcKAP4)                 | 809  | 10,09 | 1,27E-08 | 5,21E-07 |
| TcCLB.508993.10  | cytidine triphosphate synthase, putative                | 822  | 10,46 | 1,15E-08 | 5,21E-07 |
| TcCLB.503975.40  | hypothetical protein, conserved                         | 832  | 10,33 | 2,64E-08 | 5,21E-07 |
| TcCLB.506503.150 | histone H3 variant, putative                            | 841  | 11,10 | 3,06E-08 | 5,21E-07 |
| TcCLB.509289.30  | hypothetical protein, conserved                         | 847  | 9,41  | 2,06E-08 | 5,21E-07 |
| TcCLB.504131.110 | hypothetical protein, conserved                         | 869  | 10,62 | 2,16E-08 | 5,21E-07 |
| TcCLB.507209.10  | small nuclear ribonucleoprotein protein, putative       | 884  | 10,32 | 1,68E-08 | 5,21E-07 |
| TcCLB.506127.90  | hypothetical protein, conserved                         | 960  | 10,66 | 3,25E-08 | 5,21E-07 |
| TcCLB.508045.100 | mitochondrial DNA primase, putative (PRI1)              | 991  | 9,16  | 2,86E-08 | 5,21E-07 |
| TcCLB.506789.230 | hypothetical protein, conserved                         | 1009 | 11,19 | 1,14E-08 | 5,21E-07 |
| TcCLB.510741.20  | hypothetical protein, conserved                         | 1048 | 9,45  | 3,11E-08 | 5,21E-07 |
| TcCLB.506481.20  | hypothetical protein, conserved                         | 1071 | 10,49 | 3,46E-08 | 5,21E-07 |
| TcCLB.510149.140 | RNA-binding protein, putative                           | 1074 | 11,00 | 2,96E-08 | 5,21E-07 |
| TcCLB.509937.30  | phosphatidylserine synthase, putative                   | 1077 | 12,43 | 4,86E-09 | 5,21E-07 |

**Quadro 14.** Lista de proteínas associadas à FKBP12 de formas epimastigotas de *T. cruzi* sob estresse nutricional de 2 h, obtidas por imunoprecipitação. As 50 primeiras proteínas foram selecionadas utilizando um FDR  $\leq 0,01$ .

De acordo com os quadros expostos anteriormente, observa-se pouca diferença no conteúdo proteico dos complexos que contém a proteína FKBP12 quando os parasitas são submetidos às diferentes condições. Portanto, para verificar as proteínas específicas de cada grupo experimental, novas análises foram feitas e o resultado pode ser observado nos Quadros 15, 16, 17 e 18.

| <b>TcCLB.511825.63</b> | <b>peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative</b>   | <b>857</b>          | <b>15.11</b> | <b>1.64E-04</b> | <b>5.85E-02</b> |
|------------------------|--|---------------------|--------------|-----------------|-----------------|
| <b>IDS</b>             | <b>DESCRIÇÃO</b>   | <b>EPI<br/>PROT</b> | <b>FC</b>    | <b>P VALUE</b>  | <b>FDR</b>      |
| TcCLB.509733.60        | hypothetical protein   | 2160                | 6,76         | 6,94E-02        | 8,70E-01        |
| TcCLB.511627.100       | TPR-repeat protein, putative   | 2140                | 6,70         | 7,09E-02        | 8,70E-01        |
| TcCLB.508461.370       | hypothetical protein, conserved  | 1045                | 6,33         | 8,01E-02        | 8,70E-01        |
| TcCLB.508257.260       | gamma-adaptin 1, putative, AP-1 adapter complex<br>gamma subunit, putative   | 2114                | 6,11         | 8,64E-02        | 8,70E-01        |
| TcCLB.511729.50        | hypothetical protein, conserved  | 2082                | 6,48         | 8,77E-02        | 8,70E-01        |
| TcCLB.509837.10        | hypothetical protein, conserved  | 618                 | 4,90         | 1,66E-01        | 8,70E-01        |
| TcCLB.508897.110       | macrophage infectivity potentiator, precursor,<br>putative, PPLase, putative, rotamase, putative, peptidyl-<br>prolylcis-trans isomerase, putative (MIP) | 1899                | 3,66         | 3,06E-01        | 8,70E-01        |
| TcCLB.511531.9         | chaperone DNAJ protein, putative   | 2137                | 3,49         | 3,09E-01        | 8,70E-01        |
| TcCLB.510339.14        | hypothetical protein, conserved  | 2573                | 4,05         | 3,11E-01        | 8,70E-01        |
| TcCLB.511287.49        | aldo-keto reductase (AKR)  | 25                  | 3,51         | 3,26E-01        | 8,70E-01        |
| TcCLB.507221.70        | hypothetical protein, conserved  | 2077                | 4,66         | 3,29E-01        | 8,70E-01        |
| TcCLB.510431.330       | hypothetical protein, conserved  | 2576                | 3,51         | 3,32E-01        | 8,70E-01        |
| TcCLB.509569.100       | nucleoside phosphorylase, putative   | 67                  | 3,42         | 3,33E-01        | 8,70E-01        |
| TcCLB.507017.110       | hypothetical protein, conserved  | 1096                | 3,31         | 3,42E-01        | 8,70E-01        |
| TcCLB.510187.530       | hypothetical protein, conserved  | 1441                | 3,30         | 3,43E-01        | 8,70E-01        |
| TcCLB.420719.9         | protein kinase, putative   | 1663                | 3,34         | 3,44E-01        | 8,70E-01        |
| TcCLB.507767.10        | succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain, putative   | 1912                | 3,11         | 3,61E-01        | 8,70E-01        |
| TcCLB.506221.70        | hypothetical protein, conserved  | 973                 | 3,04         | 3,68E-01        | 8,70E-01        |
| TcCLB.511071.100       | hypothetical protein, conserved  | 758                 | 3,01         | 3,71E-01        | 8,70E-01        |
| TcCLB.506579.20        | hypothetical protein, conserved  | 1666                | 3,17         | 3,73E-01        | 8,70E-01        |
| TcCLB.504769.70        | hypothetical protein, conserved  | 1438                | 2,97         | 3,76E-01        | 8,70E-01        |
| TcCLB.503849.60        | NADH-dependent fumarate reductase, putative  | 1150                | 2,97         | 3,76E-01        | 8,70E-01        |

| IDS              | DESCRIÇÃO   | EPI<br>PROT | FC   | P VALUE  | FDR      |
|------------------|---|-------------|------|----------|----------|
| TcCLB.503697.9   | proteasome regulatory non-ATPase subunit 11, putative   | 2116        | 3,44 | 3,80E-01 | 8,70E-01 |
| TcCLB.511003.190 | hypothetical protein, conserved   | 301         | 2,74 | 4,02E-01 | 8,70E-01 |
| TcCLB.511049.40  | leucyl-tRNA synthetase, putative  | 223         | 2,69 | 4,07E-01 | 8,70E-01 |
| TcCLB.510065.30  | translationally controlled tumor protein (TCTP), putative   | 259         | 2,57 | 4,22E-01 | 8,70E-01 |
| TcCLB.508153.340 | 6-phospho-1-fructokinase, putative  | 469         | 2,81 | 4,26E-01 | 8,70E-01 |
| TcCLB.503931.30  | hypothetical protein  | 2531        | 3,07 | 4,36E-01 | 8,70E-01 |
| TcCLB.508461.380 | calmodulin, putative, calcium-binding EF hand protein, putative   | 388         | 2,92 | 4,37E-01 | 8,70E-01 |
| TcCLB.453445.10  | hypothetical protein, conserved   | 946         | 2,44 | 4,40E-01 | 8,70E-01 |
| TcCLB.511443.10  | calpain-like cysteine peptidase (pseudogene), putative, calpain-like cysteine peptidase, putative, frameshift             | 551         | 3,12 | 4,46E-01 | 8,70E-01 |
| TcCLB.506885.400 | 40 kDa cyclophilin, putative, PPIase, putative, rotamase, putative, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative (CYP40) | 343         | 2,39 | 4,47E-01 | 8,70E-01 |
| TcCLB.508851.50  | hypothetical protein, conserved   | 819         | 2,36 | 4,52E-01 | 8,70E-01 |
| TcCLB.508299.30  | hypothetical protein  | 2148        | 2,52 | 4,52E-01 | 8,70E-01 |
| TcCLB.510719.160 | 60S ribosomal protein L22, putative   | 642         | 2,58 | 4,60E-01 | 8,76E-01 |
| TcCLB.511019.90  | iron superoxide dismutase, putative   | 92          | 2,06 | 4,99E-01 | 9,01E-01 |
| TcCLB.510687.120 | snoRNP protein GAR1, putative   | 1400        | 2,66 | 5,10E-01 | 9,16E-01 |

**Quadro 15. Lista de proteínas específicas associadas à FKBP12, de formas epimastigotas de *T. cruzi* cultivadas em meio LIT, obtidas por imunoprecipitação.** O critério utilizado para obtenção das proteínas específicas dessa condição foi um FDR < 1,0 e a ausência das mesmas nos outros experimentos.

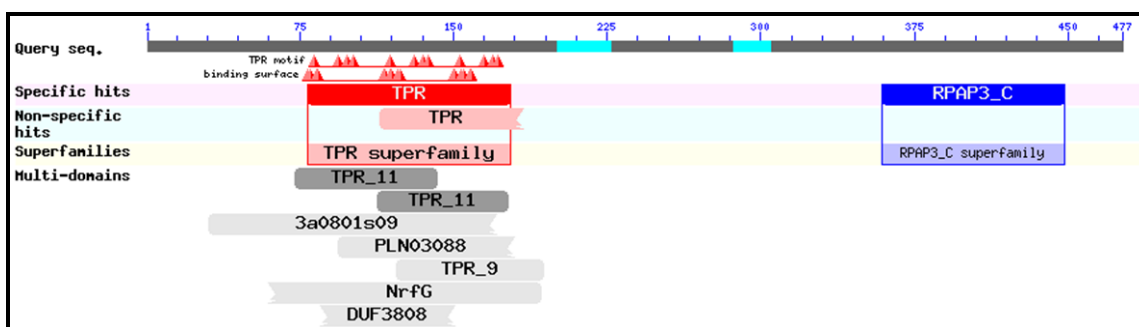
As proteínas específicas de cada condição, identificadas na imunoprecipitação da proteína FKBP12 foram analisadas com ferramentas *online* de predição de parceiros chamada STRING 9.1 (FRANCESCHINI *et al.*, 2013) e procura de domínios conservados CONSERVED DOMAINS (MARCHLER-BAUER *et al.*, 2011). Com a ajuda desses programas, é possível fazer correlações, com base na sequência proteica, de parceiros funcionais, porém descritos em outros organismos. De modo geral, são ferramentas que atestam a probabilidade de pertencerem a um mesmo complexo.

Na maioria das análises no programa STRING 9.1, foram utilizadas sequências homólogas de *T. brucei*, uma vez que não há dados nesse programa para *T. cruzi*.

Dentre as proteínas presentes no complexo que contém a proteína FKBP12, somente nas formas epimastigotas de *T. cruzi* cultivadas em meio LIT destacam-se:

➤ TcCLB.511627.100 – TPR-repeat protein, putative:

Proteínas com esse domínio TPR (tetratricopeptídeo) são descritas em diversos organismos eucariotes. Possuem domínios com funções de interação proteína-proteína e chaperona além de estarem envolvidas nos processos do ciclo celular, transcrição e transporte de complexos protéicos. É proposto ainda que o domínio TPR interaja com o domínio WD40 e, em alguns casos, o domínio TPR ajuda na formação de complexos multi-protéicos, dentre eles os que possuem Ser/Thr Fosfatase 5C. Outro domínio relevante é o RPAP3\_C, que é encontrado preferencialmente em proteínas de associação à RNA-polimerase II. Essas proteínas ligam-se por sua vez em outra família de proteínas (Monad) que possuem função de regulação da apoptose. A Figura 28 mostra os domínios conservados na sequência da proteína em questão.



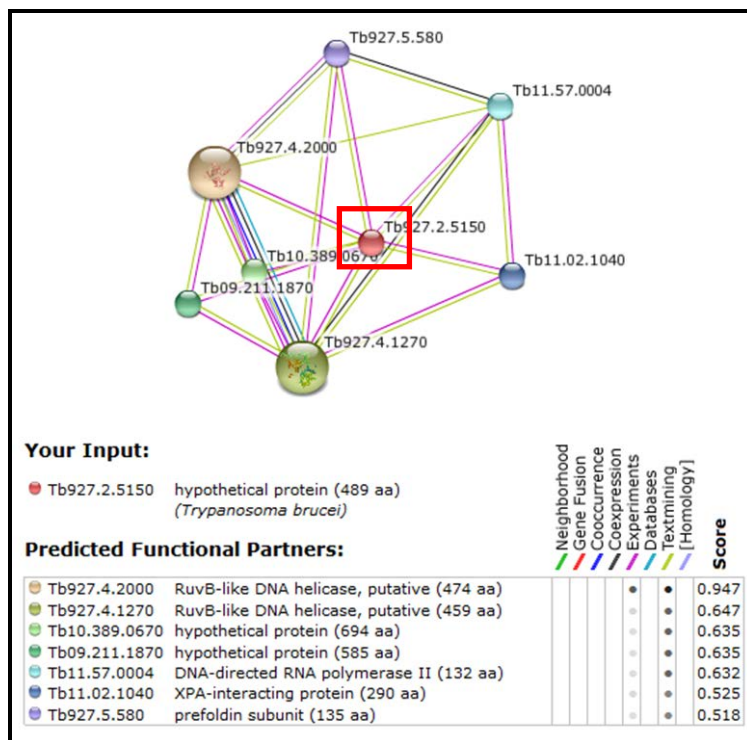
**Figura 28. Domínios conservados encontrados na proteína TPR de *T. cruzi*.** Destaque para os domínios TPR e RPAP3\_C.

Fonte: Conserved Domains (NCBI).

A Figura 29 mostra a rede de interação dos possíveis parceiros dessa proteína em *T. brucei* (Tb927.2.5150 – descrita como hipotética) preditos com o programa STRING 9.1. De acordo com o programa existem algumas proteínas já descritas como possíveis parceiros da proteína TPR.

Em leveduras, essa proteína chamada de TAH1 é dita como cofator da proteína HSP90, modulando a atividade de chaperona. Além disso, juntamente com as proteínas RUVB-like DNA helicases e uma proteína hipotética, formam o complexo R2TP, que por sua vez é altamente conservado desde leveduras à mamíferos e que atua na montagem da RNA polimerase II e para garantir a

estabilidade das fosfatidilinositol 3 quinases (JIMÉNEZ *et al.*, 2012). Há ainda a relação das proteínas RUVB-like DNA helicases, associadas com algumas ATPases, como fosfatidilinositol 3 quases (PIKK), incluindo as quinases da via TOR. A formação desse complexo com atividade de chaperona na regulação dessas quinases é proposto em resposta a diversos estímulos (IZUMI *et al.*, 2012).



**Figura 29. Rede de interação da proteína Tb927.2.5150.**

Fonte: STRING 9.1.

➤ TcCLB.509837.10 – hypothetical protein, conserved:

A Figura 30 mostra a rede de interação dos possíveis parceiros da proteína TcCLB.509837.10 homóloga à de *T. brucei* (Tb11.1380 ( – descrita como hipotética) preditos com o programa STRING 9.1.

A proteína Tb10.389.1210 descrita como quinesina, em outros organismos é observada como um importante regulador, através da sua interação com os receptores IP3R (receptores de Inositol 1,4,5-trifosfato), da liberação de íons de Ca<sup>+2</sup> do retículo endoplasmático. O Ca<sup>+2</sup> citosólico pode atuar em vários processos desde a proliferação celular, diferenciação e apoptose (ZHANG *et al.*, 2011).



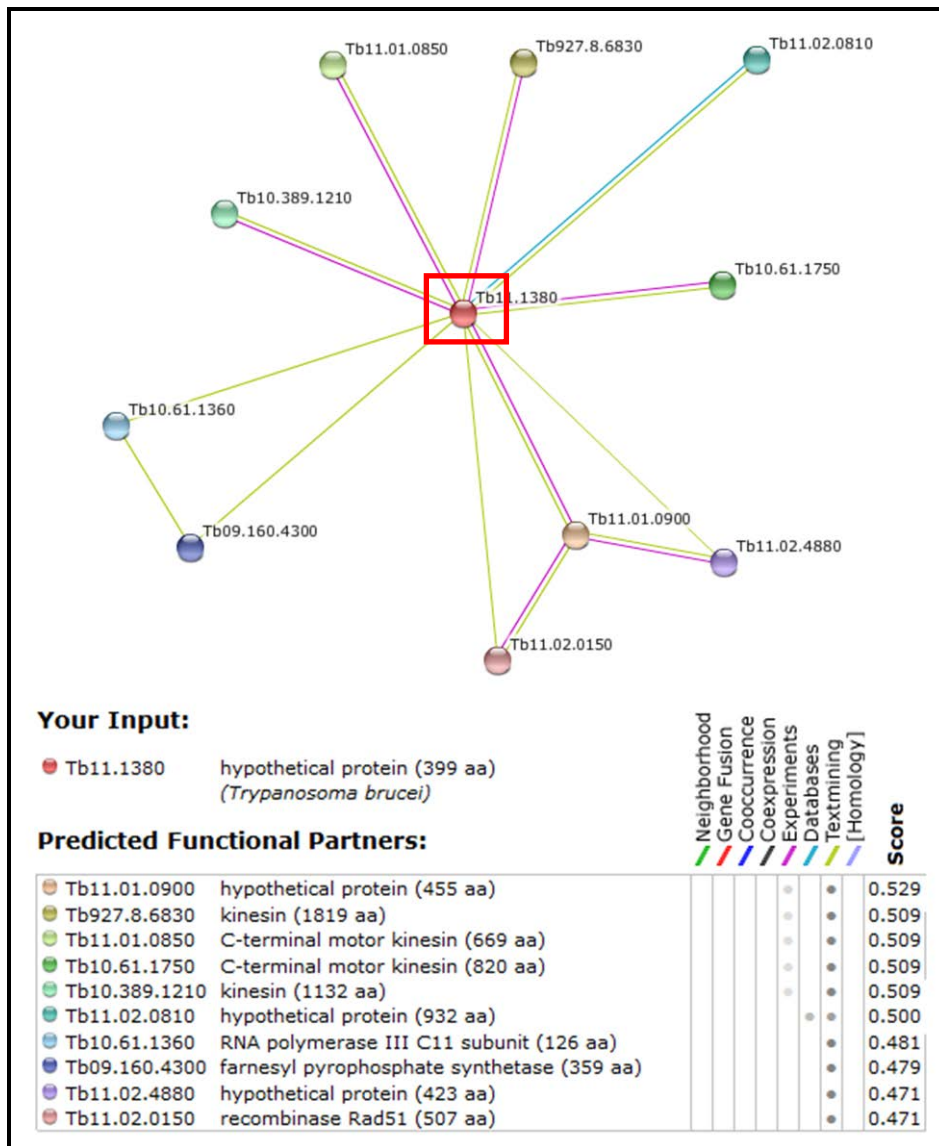


Figura 30. Rede de interação da proteína Tb11.1380.

Fonte: STRING 9.1.

➤ TcCLB.510339.14 – hypothetical protein, conserved:

A fosforilação de proteínas é uma das mais importantes modificações pós-traducionais que regulam diversos processos de sinalização em todos os organismos vivos. Na célula, fosfatases e proteínas quinases desempenham um papel antagonista dinâmico, controlar o estado de fosforilação de tirosina (Tyr), serina (Ser) e cadeias de treonina (Thr) laterais de proteínas. A fosforilação reversível modula a função da proteína, através de mudanças conformacionais, o que influencia a formação de complexos de proteínas, alteração da atividade enzimática, alterações na estabilidade da proteína e localização subcelular. Estas alterações moleculares afetam cascatas de

sinalização que regulam o ciclo celular, diferenciação, interação célula-célula e célula-substrato, a motilidade celular, resposta imune, atividades dos canais de íons e transportadores, a transcrição, tradução do mRNA e o metabolismo básico. Além destes processos, em parasitas unicelulares, como *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania spp.*, vias de sinalização adicionais que evoluíram para permitir a sobrevivência do parasita no meio ambiente em mudança do vetor para o organismo hospedeiro também são afetadas (SZÖÖR, 2010).

A Figura 31 mostra a rede de interação dos possíveis parceiros da proteína hipotética Tb09.v1.0350 de *T. brucei* (TcCLB.510339.14), preditos com o programa STRING 9.1. Nessa figura é possível visualizar a interação da proteína com outras fosfatases que como descrito anteriormente, possuem um papel importante nas vias de sinalização de tripanossomatídeos.

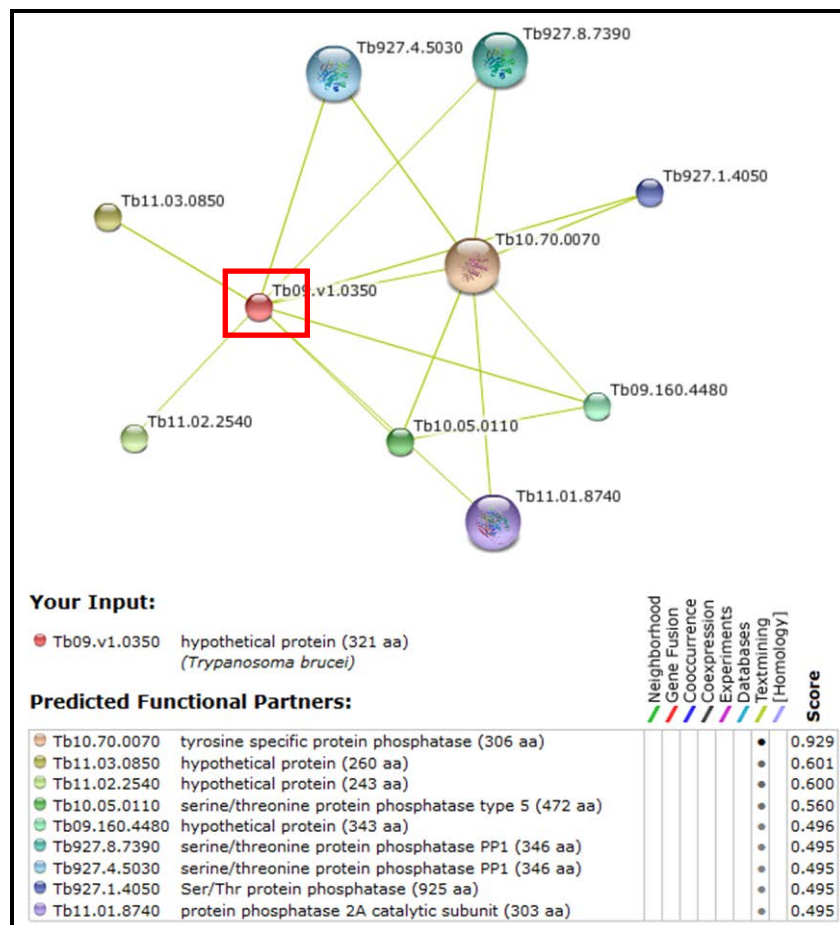


Figura 31. Rede de interação da proteína Tb09.v1.0350.

Fonte: STRING 9.1.

➤ TcCLB.503931.30 – hypothetical protein:

De acordo com o programa STRING 9.1, essa proteína de *T. cruzi* possui uma homóloga em *Strongylocentrotus purpuratus* (XP\_001189793 - similar to dpy-30-like protein). Na Figura 32, podemos visualizar a rede de interação da proteína de *S. purpuratus* com possíveis fatores epigenéticos, envolvidos na metilação de histonas.

Comentários recentes na literatura descrevem um papel fundamental para as marcas de metilação em histonas como determinantes do potencial de transcrição durante o processo de diferenciação celular, programação epigenética a longo prazo, homeostase celular e patogênese. A atividade das enzimas no processo de metilação de histonas é dinâmico, altamente específico e varia de acordo com as proteínas co-reguladora, incluindo receptores nucleares, que interagem com o complexo (ANDERSON *et al.*, 2012).

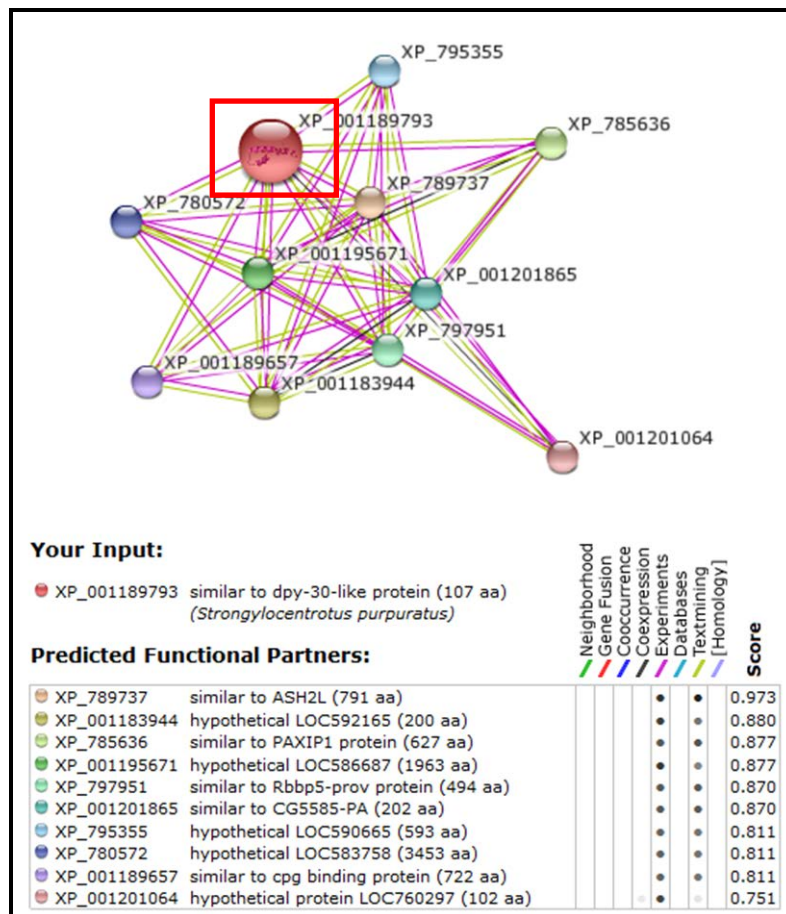


Figura 32. Rede de interação da proteína XP\_001189793.

Fonte: STRING 9.1.

Poteínas de ligação de FK506 (FKBPs) são receptores intracelulares para FK506 e rapamicina, imunossupressores recentemente utilizados como fármacos anticancerígenos. No citoplasma, FKBP e estas drogas modulam vias de transdução de sinal. No entanto, pesquisas recentes revelam novas funções de FKBP no núcleo, que incluem a regulação dos fatores de transcrição, a atividade de histona chaperona, e modificações da estrutura da cromatina. Essas atividades são conhecidas por afetar a expressão gênica, reparo do DNA e replicação de DNA (YAO *et al.*, 2011). As possíveis funções das FKBP nucleares podem ser observadas na Figura 33.

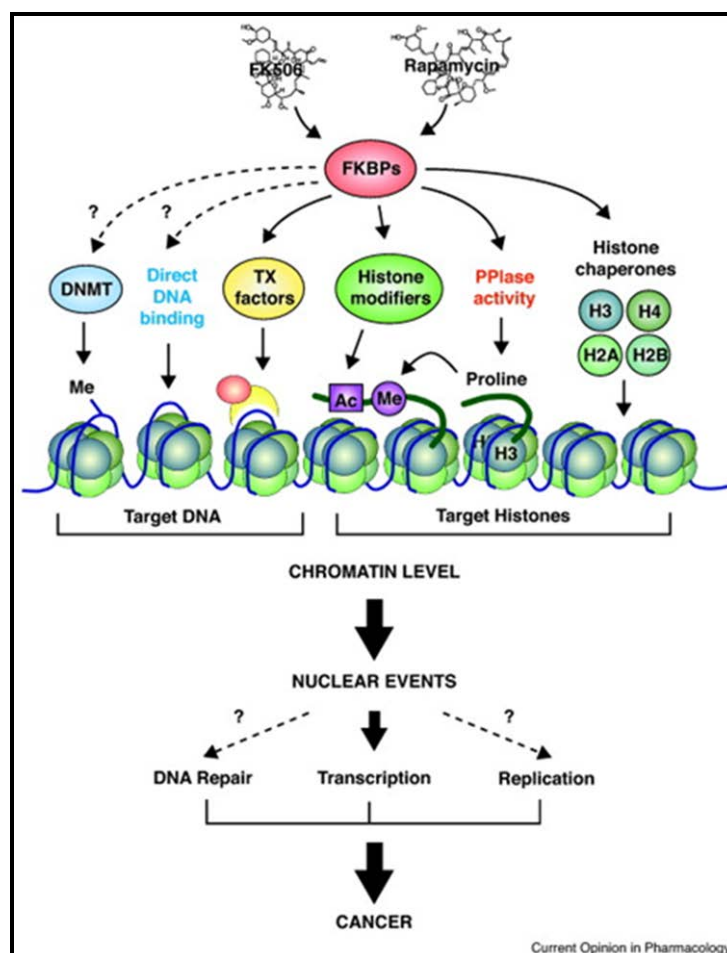


Figura 33. Eventos nucleares envolvendo a família das FKBP.

Fonte: YAO *et al.*, 2011.

| TcCLB.511825.63  | peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative  | 857         | 16,81 | 5,95E-07 | 6,06E-05 |
|------------------|--|-------------|-------|----------|----------|
| IDS              | DESCRIÇÃO  | EPI<br>PROT | FC    | P VALUE  | FDR      |
| TcCLB.506945.200 | mago nashi-like protein, putative  | 1636        | 11,55 | 3,82E-06 | 6,06E-05 |
| TcCLB.508041.10  | S-phase kinase-associated protein, putative, Skp1 family protein, putative, cyclin A/CDK2-associated protein, putative | 522         | 10,73 | 5,33E-06 | 6,06E-05 |
| TcCLB.509859.40  | cytosolic leucyl aminopeptidase, putative, metallo-peptidase, Clan MF, Family M17, putative                            | 785         | 11,18 | 5,52E-06 | 6,06E-05 |
| TcCLB.503405.10  | glutamine synthetase, putative   | 2520        | 10,61 | 6,13E-06 | 6,06E-05 |
| TcCLB.510737.110 | replication factor C, subunit 3, putative  | 2581        | 10,31 | 6,59E-06 | 6,11E-05 |
| TcCLB.511573.40  | mitogen-activated protein kinase, putative   | 934         | 10,81 | 9,13E-06 | 7,41E-05 |
| TcCLB.511261.160 | pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit, putative  | 680         | 10,95 | 9,26E-06 | 7,41E-05 |
| TcCLB.508919.140 | hypothetical protein, conserved  | 371         | 9,98  | 9,33E-06 | 7,41E-05 |
| TcCLB.508543.170 | hypothetical protein, conserved  | 2557        | 9,74  | 1,06E-05 | 7,91E-05 |
| TcCLB.510691.10  | 1,2-Dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase, putative   | 795         | 10,82 | 1,08E-05 | 7,91E-05 |
| TcCLB.509213.120 | peptidase M20/M25/M40, putative  | 57          | 9,46  | 1,10E-05 | 7,91E-05 |
| TcCLB.511807.280 | hypothetical protein, conserved  | 389         | 9,84  | 1,12E-05 | 7,93E-05 |
| TcCLB.509161.120 | hypothetical protein, conserved  | 2562        | 9,81  | 1,29E-05 | 8,63E-05 |
| TcCLB.475169.10  | DNA-directed RNA polymerase II subunit 2 (pseudogene), putative  | 1333        | 9,03  | 1,72E-05 | 1,09E-04 |
| TcCLB.508355.10  | hypothetical protein, conserved  | 1814        | 9,63  | 1,81E-05 | 1,14E-04 |
| TcCLB.504153.310 | heat shock protein, putative   | 77          | 10,06 | 2,02E-05 | 1,25E-04 |
| TcCLB.511803.40  | hypothetical protein, conserved  | 513         | 10,35 | 2,15E-05 | 1,31E-04 |
| TcCLB.507641.120 | ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative  | 2550        | 9,00  | 2,35E-05 | 1,41E-04 |
| TcCLB.509671.10  | hypothetical protein, conserved  | 2433        | 9,59  | 2,39E-05 | 1,42E-04 |
| TcCLB.507681.20  | succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain, putative   | 51          | 10,71 | 3,25E-05 | 1,88E-04 |
| TcCLB.506195.290 | hypothetical protein, conserved  | 268         | 10,01 | 6,60E-05 | 3,70E-04 |
| TcCLB.504077.30  | hypothetical protein, conserved  | 879         | 12,01 | 9,58E-05 | 5,29E-04 |
| TcCLB.503981.80  | hypothetical protein, conserved  | 2231        | 9,55  | 1,02E-04 | 5,57E-04 |

**Quadro 16.** Lista de proteínas específicas associadas à FKBP12, de formas epimastigotas de *T. cruzi* cultivadas em meio LIT sem SFB, obtidas por imunoprecipitação. Os critérios utilizados para obtenção das proteínas específicas dessa condição foram um FDR  $\leq 0,01$  e a ausência das mesmas nos outros experimentos.

Das proteínas presentes no complexo que contém a proteína FKBP12, somente nas formas epimastigotas de *T. cruzi* cultivadas em meio LIT sem SFB, destacam-se:

➤ TcCLB.506945.200 – mago nashi-like protein, putative:

Essas proteínas estão descritas como participantes em vias de *splicing* alternativo. Na Figura 34 é possível visualizar a interação da proteína Tb927.6.4950 (homóloga à TcCLB.506945.200) bem como sua interação com vários fatores de processamento quanto de estabilização do RNA (MICHELLE *et al.*, 2012).

Muitos desses complexos multiprotéicos envolvem proteínas que possuem atividade enzimática. As FKBP's nucleares podem então agir sob diversas proteínas que necessitem de remodelamento bem como de possíveis processamentos enzimáticos que estruturam e mantenham o complexo funcional (MICHELLE *et al.*, 2012).

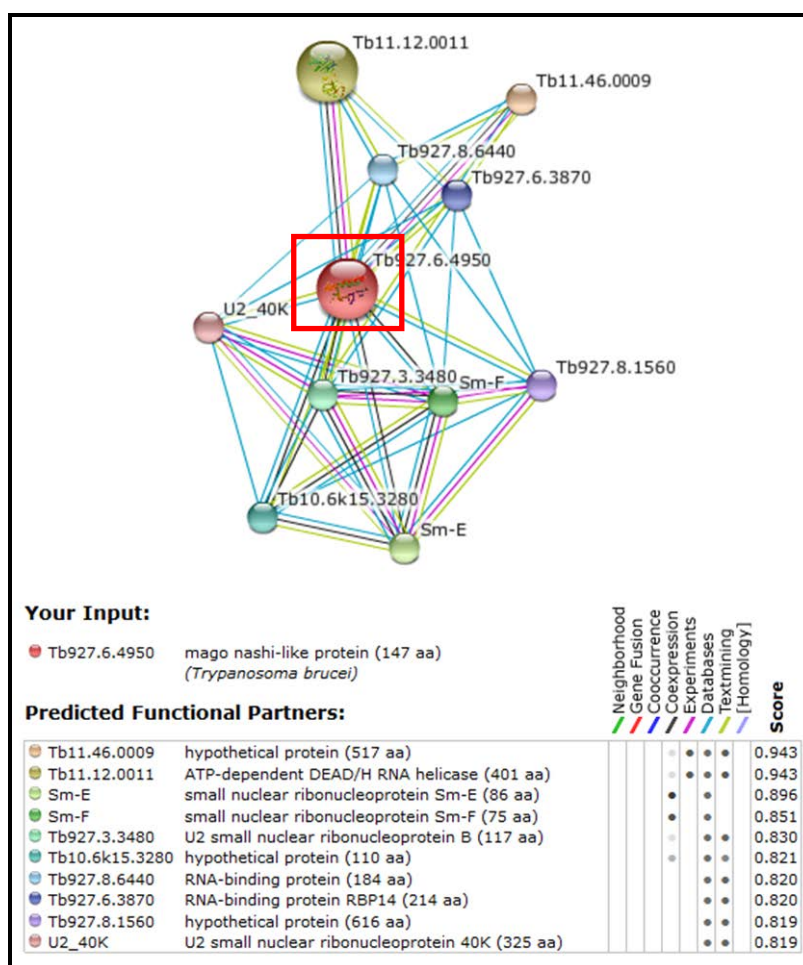


Figura 34. Rede de interação da proteína Tb927.6.4950.

Fonte: STRING 9.1.

- TcCLB.508041.10 – S-phase kinase-associated protein, putative, Skp1 family protein, putative, cyclin A/CDK2-associated protein, putative:

Essa proteína de *T. brucei*, também conhecida como SKP1 em mamíferos possui um importante papel de regulação na via de sinalização de TOR.

Dados na literatura apontam um novo regulador (DEPTOR), que atua como inibidor de ambos os complexos TOR de mamíferos (ZHAO *et al.*, 2012).

Em contrapartida, existem proteínas pertencentes à família E3 ubiquitina ligase que são recrutadas afim de manter o complexo TOR ativo pela degradação via proteassomo de DEPTOR (ZHAO *et al.*, 2012).

A Figura 35 mostra a rede de interação entre a proteína Tb11.02.3990 que é homóloga à TcCLB.508041.10. Essa proteína de *T. cruzi* portanto, pode possuir esse mesmo papel de reguladora de DEPTOR.

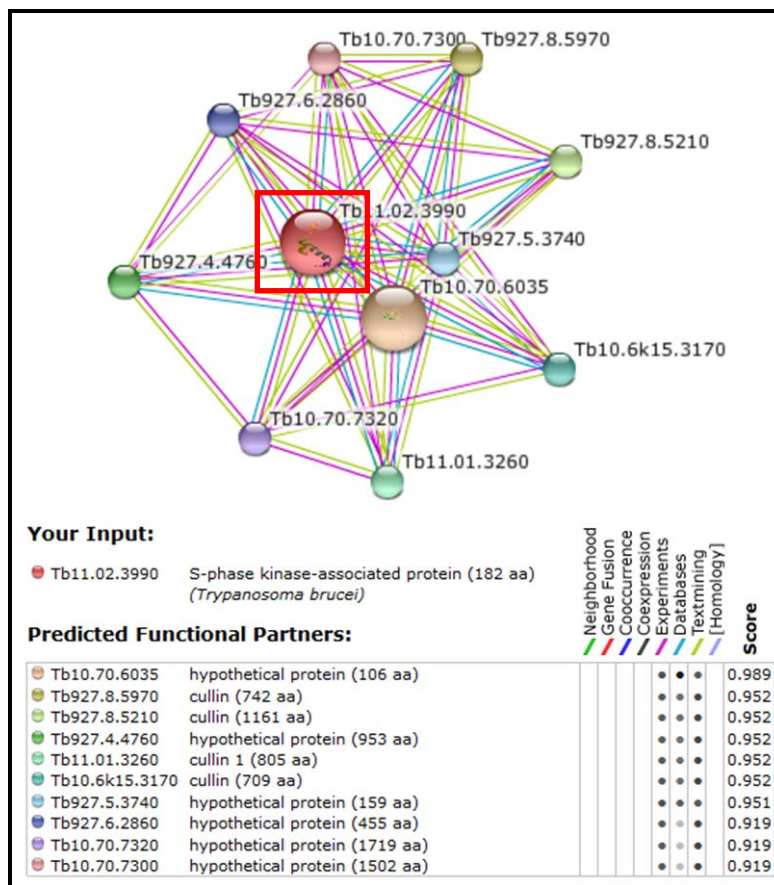


Figura 35. Rede de interação da proteína Tb11.02.3990.

Fonte: STRING 9.1.

| TcCLB.511825.63  | peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative   | 857         | 14,56 | 4,60E-07 | 2,02E-05 |
|------------------|---|-------------|-------|----------|----------|
| IDS              | DESCRIÇÃO   | EPI<br>PROT | FC    | P VALUE  | FDR      |
| TcCLB.506443.150 | retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative                                      | 617         | 14,48 | 6,28E-07 | 2,02E-05 |
| TcCLB.511323.40  | histone H2A, putative   | 538         | 14,60 | 6,50E-07 | 2,02E-05 |
| TcCLB.510257.10  | hypothetical protein, conserved   | 2527        | 12,95 | 8,62E-07 | 2,02E-05 |
| TcCLB.507765.130 | hypothetical protein, conserved   | 2099        | 12,60 | 9,78E-07 | 2,02E-05 |
| TcCLB.511233.20  | 60S ribosomal protein L34, putative   | 360         | 12,99 | 1,00E-06 | 2,02E-05 |
| TcCLB.510519.30  | mitochondrial structure specific endonuclease I (SSE-1), putative                     | 1300        | 11,96 | 1,29E-06 | 2,02E-05 |
| TcCLB.506247.40  | hypothetical protein, conserved   | 2406        | 12,43 | 1,37E-06 | 2,02E-05 |
| TcCLB.427303.10  | 5'-3' exonuclease XRNA (pseudogene), putative,exoribonuclease 1, putative (XRNA)      | 2528        | 12,33 | 1,48E-06 | 2,02E-05 |
| TcCLB.511431.10  | protein kinase, putative  | 1504        | 11,34 | 1,77E-06 | 2,02E-05 |
| TcCLB.511023.10  | pyrroline-5-carboxylate synthetase-like protein, putative                             | 1894        | 11,67 | 1,76E-06 | 2,02E-05 |
| TcCLB.510305.70  | hypothetical protein, conserved   | 2572        | 11,85 | 1,49E-06 | 2,02E-05 |
| TcCLB.508917.30  | kinesin, putative   | 2405        | 11,18 | 1,87E-06 | 2,02E-05 |
| TcCLB.510997.50  | ATP-dependent DEAD/H RNA helicase (pseudogene), putative                              | 2510        | 13,58 | 2,26E-06 | 2,10E-05 |
| TcCLB.506989.100 | RNA-binding protein (pseudogene), putative, RNA-binding protein, putative, frameshift | 2143        | 12,52 | 2,73E-06 | 2,10E-05 |
| TcCLB.509725.100 | hypothetical protein, conserved (pseudogene)  | 2566        | 13,44 | 2,88E-06 | 2,10E-05 |
| TcCLB.506481.20  | hypothetical protein, conserved   | 2081        | 12,37 | 3,16E-06 | 2,14E-05 |
| TcCLB.506445.20  | hypothetical protein, conserved   | 1418        | 11,14 | 3,34E-06 | 2,19E-05 |
| TcCLB.511145.50  | vacuolar ATP synthase, putative   | 1043        | 11,74 | 3,68E-06 | 2,26E-05 |
| TcCLB.509281.20  | trans-sialidase, Group II, putative   | 2070        | 10,07 | 4,20E-06 | 2,46E-05 |
| TcCLB.506325.40  | retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene), putative                          | 867         | 12,31 | 4,25E-06 | 2,47E-05 |
| TcCLB.507881.20  | retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative                                      | 671         | 13,19 | 1,23E-05 | 5,67E-05 |
| TcCLB.503893.150 | hypothetical protein, conserved   | 2484        | 11,62 | 1,36E-05 | 6,17E-05 |

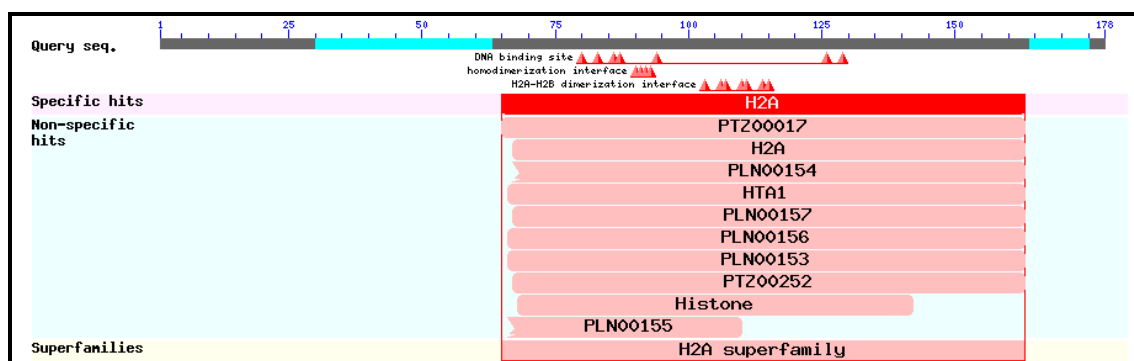
**Quadro 17. Lista de proteínas específicas associadas à FKBP12, de formas epimastigotas de *T. cruzi* cultivadas em meio LIT sem SFB e tratadas com rapamicina (10,0 µg/mL por 24 h), obtidas por imunoprecipitação.** Os critérios utilizados para obtenção das proteínas específicas dessa condição foram um FDR ≤ 0,01 e a ausência das mesmas nos outros experimentos.



Das proteínas presentes no complexo que contém a proteína FKBP12, somente nas formas epimastigotas de *T. cruzi* cultivadas em meio LIT sem SFB e tratadas com rapamicina 10 µg/mL por 24h, destacam-se:

➤ TcCLB.511323.40 – histone H2A, putative:

As histonas, de uma maneira geral estão envolvidas na formação do nucleossomo. Essa estrutura por sua vez tem a função de estabilizar e condensar a cromatina para assegurar a sua integridade bem como de regular a ligação de proteínas específicas à cromatina (TORO & GALANTI, 1990; TORO *et al.*, 1992, 1993; HECKER *et al.*, 1994; revisto em ELIAS, NARDELLI & SCHENKMAN, 2009). Portanto, proteínas com esse domínio (Figura 36) são de grande importância na célula eucariótica.

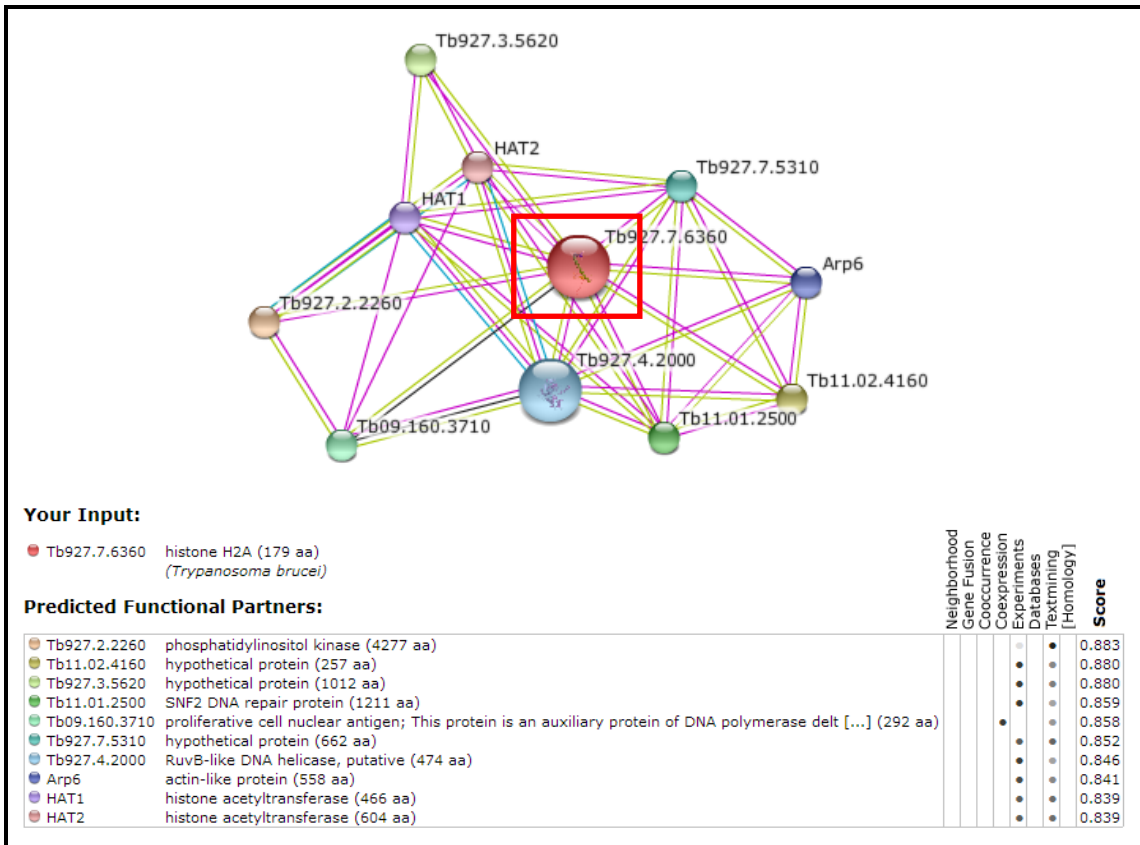


**Figura 36. Domínios conservados encontrados na proteína Histona H2A de *T. cruzi*.** Destaque para o domínio H2A.

Fonte: Conserved Domains (NCBI).

Na Figura 37 é possível visualizar a rede de interação envolvendo a proteína Tb927.7.6360 de *T. brucei* (homóloga à TcCLB.511323.40). Nessa rede identifica-se a presença de proteínas envolvidas na modificação do complexo do nucleossomo bem como de proteínas envolvidas na manutenção do DNA em resposta à um dano na cromatina. Esse papel é desempenhado por algumas quinases, que por sua auto fosforilação, ativam uma cascata de sinalização que culmina em um *checkpoint* do ciclo celular e consequentemente reparo da região afeta (IZUMI, 2012).

Como citado anteriormente, muitas FKBP nucleares podem atuar junto à cromatina ou à proteínas de ligação ao DNA, desempenhando funções específicas em resposta a diversos estímulos.

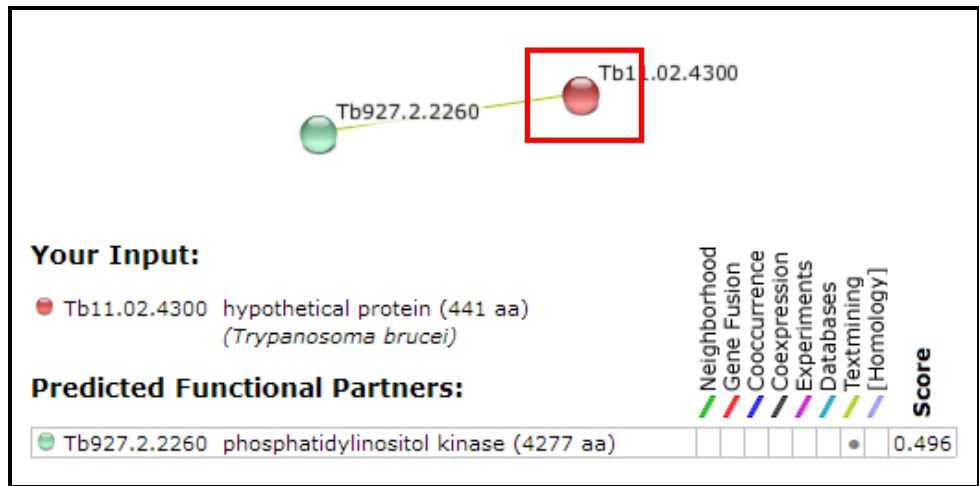


**Figura 37. Rede de interação da proteína Tb927.7.6360.**

Fonte: STRING 9.1.

➤ TcCLB.507765.130 – hypothetical protein, conserved:

A rede de interação proposta para a proteína Tb11.02.4300 de *T. brucei* (homóloga à TcCLB.507765.130) pode ser visualizada na Figura 38. A proteína apresenta uma interação direta com outra já visualizada na rede de interação descrita anteriormente. Nela, proteínas quinases com um papel em resposta ao dano causado à cromatina, desencadeiam uma cascata de sinalização com função específica em reparar a região afetada. Nesses eventos nucleares é possível verificar a interação de FKBP's nucleares.



**Figura 38. Rede de interação da proteína Tb11.02.4300.**

Fonte: STRING 9.1.

➤ TcCLB.511431.10 – protein kinase, putative:

A proteína TcCLB.511431.10 possui uma homóloga em *L. major* (LinJ20.0980) que possui uma rede de interação predita através do uso da ferramenta STRING 9.1 visualizada na Figura 39. Essa proteína quinase de *L. major* interage com várias proteínas hipotéticas, porém existe uma interação com a subunidade maior da RNA polimerase II.

Essa RNA polimerase II em mamíferos possui um domínio C-terminal (CTD) que é uma região conservada de heptapeptídeos repetidos que funcionam como uma plataforma para ligação de diferentes complexos de proteínas envolvidas na transcrição, processamento de RNA, exportação e remodelação da cromatina. As repetições CTD estão sujeitas a ondas sequenciais de modificações pós-traducionais durante fases específicas do ciclo de transcrição. Essas modificações são desde fosforilações em resíduos específicos até glicosilação (ZHANG, 2012).

A presença dessa quinase nesse ensaio de imunoprecipitação sugere que a mesma faça parte desse processo de sinalização, envolvendo também a modificação de histonas. Além disso, a transcrição é um evento importante numa célula eucariótica, onde outros processos como o de transporte e processamento do transcrito possuem proteínas representantes que também foram identificadas no ensaio. Esse é o caso da exonuclease 5´- 3´ XRNA e da ATP-dependente RNA Helicase (Sub2 em mamíferos).

A possível atuação das FKBP's em complexos multi-protêicos como os descritos aqui são de grande relevância e fazem dessas proteínas parceiros importantes nas funções desempenhadas pelos mesmos.

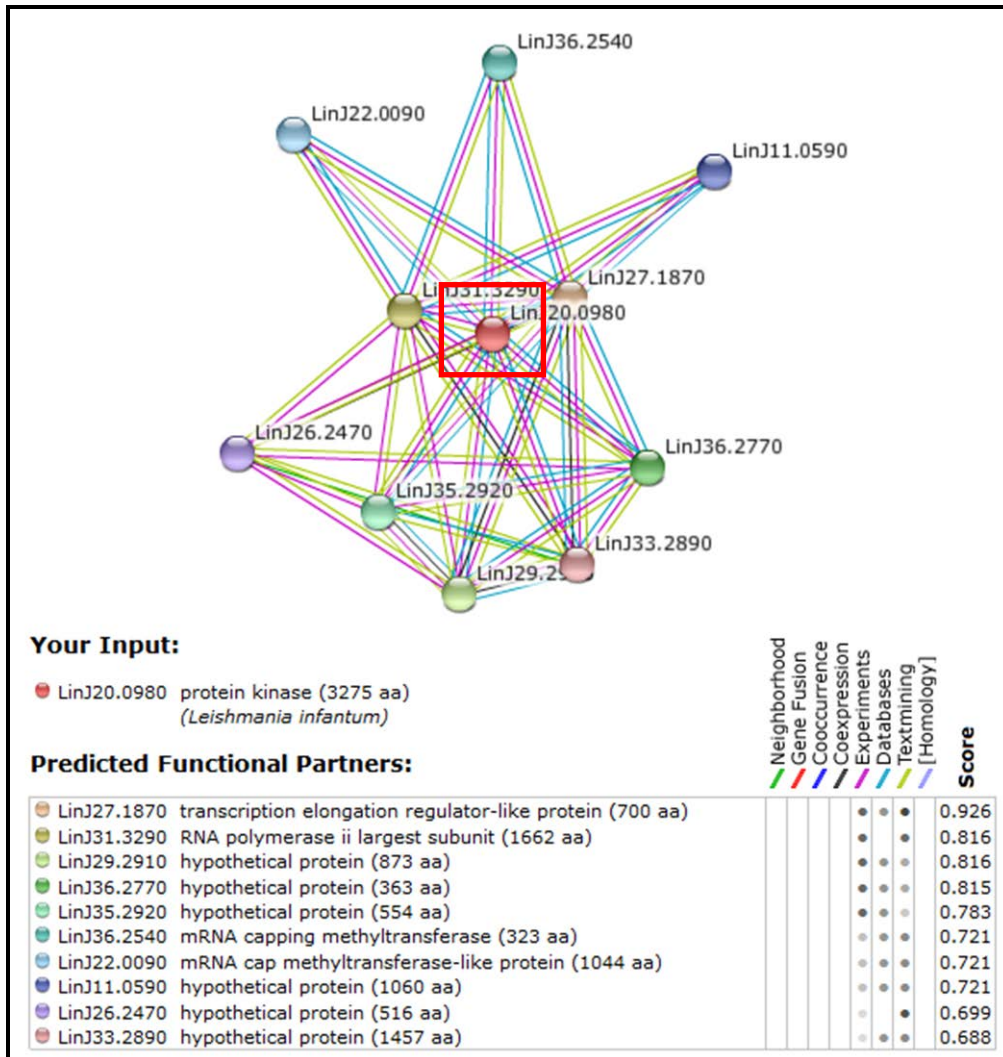


Figura 39. Rede de interação da proteína LinJ20.0980.

Fonte: STRING 9.1.

| <b>TcCLB.511825.63</b> | <b>peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative</b>                  | <b>857</b>          | <b>11.93</b> | <b>1.02E-08</b> | <b>5.21E-07</b> |
|------------------------|---|---------------------|--------------|-----------------|-----------------|
| <b>IDS</b>             | <b>DESCRIÇÃO</b>  | <b>EPI<br/>PROT</b> | <b>FC</b>    | <b>P VALUE</b>  | <b>FDR</b>      |
| TcCLB.511903.130       | 60S ribosomal protein L26, putative                                   | 324                 | 10,62        | 1,99E-08        | 5,21E-07        |
| TcCLB.511217.145       | ribosomal protein L39, putative                                       | 791                 | 10,46        | 1,68E-08        | 5,21E-07        |
| TcCLB.509937.30        | phosphatidylserine synthase, putative                                 | 1077                | 12,43        | 4,86E-09        | 5,21E-07        |
| TcCLB.508175.146       | 60S ribosomal protein L23a, putative                                  | 1213                | 9,58         | 1,92E-08        | 5,21E-07        |
| TcCLB.511011.10        | retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative                      | 714                 | 7,92         | 4,83E-08        | 5,96E-07        |
| TcCLB.507669.190       | hypothetical protein, conserved                                       | 712                 | 7,91         | 6,29E-08        | 7,07E-07        |
| TcCLB.508351.10        | fructose-1,6-bisphosphatase, cytosolic, putative                      | 503                 | 7,21         | 7,11E-08        | 7,26E-07        |
| TcCLB.505843.10        | glutamate dehydrogenase, putative                                     | 346                 | 7,52         | 7,90E-08        | 7,88E-07        |
| TcCLB.509721.60        | poly(ADP-ribose) polymerase, putative                                 | 1228                | 8,72         | 9,24E-08        | 8,45E-07        |
| TcCLB.507091.50        | aspartate carbamoyltransferase, putative                              | 299                 | 7,50         | 1,32E-07        | 1,01E-06        |
| TcCLB.506337.140       | hypothetical protein, conserved                                       | 1192                | 6,77         | 1,31E-07        | 1,01E-06        |
| TcCLB.506933.60        | mitochondrial RNA binding protein, putative                           | 315                 | 6,15         | 1,64E-07        | 1,12E-06        |
| TcCLB.507049.199       | pumilio protein, putative   | 993                 | 5,96         | 1,68E-07        | 1,12E-06        |
| TcCLB.510287.30        | proteasome beta 2 subunit, putative                                   | 575                 | 5,96         | 2,43E-07        | 1,41E-06        |
| TcCLB.509569.140       | hypothetical protein, conserved                                       | 986                 | 5,69         | 2,55E-07        | 1,46E-06        |
| TcCLB.509787.10        | retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative                      | 844                 | 7,24         | 2,58E-07        | 1,47E-06        |
| TcCLB.511237.110       | cyclophilin, putative   | 425                 | 6,70         | 2,97E-07        | 1,62E-06        |
| TcCLB.508707.200       | nucleoside diphosphate kinase (NDPK1)                                 | 41                  | 6,89         | 3,42E-07        | 1,78E-06        |
| TcCLB.504827.40        | beta-adaptin 3, putative, AP-3 adapter complex beta subunit, putative | 1079                | 5,66         | 3,58E-07        | 1,83E-06        |
| TcCLB.509053.170       | DREV methyltransferase, putative                                      | 1054                | 7,27         | 3,76E-07        | 1,89E-06        |
| TcCLB.510731.20        | hypothetical protein, conserved                                       | 423                 | 5,59         | 4,14E-07        | 1,99E-06        |
| TcCLB.507629.30        | hypothetical protein, conserved                                       | 905                 | 7,31         | 4,20E-07        | 2,00E-06        |
| TcCLB.507093.44        | dynein light chain, putative  | 921                 | 6,16         | 4,87E-07        | 2,21E-06        |
| TcCLB.507049.50        | ABC transporter, putative   | 1017                | 5,82         | 6,12E-07        | 2,64E-06        |
| TcCLB.508153.750       | hypothetical protein, conserved                                       | 885                 | 7,02         | 6,60E-07        | 2,78E-06        |
| TcCLB.504717.20        | hypothetical protein, conserved                                       | 821                 | 7,30         | 6,80E-07        | 2,83E-06        |
| TcCLB.510689.50        | cell differentiation protein, putative                                | 814                 | 6,72         | 7,04E-07        | 2,90E-06        |
| TcCLB.503823.90        | hypothetical protein, conserved                                       | 1034                | 5,19         | 7,20E-07        | 2,95E-06        |
| TcCLB.507099.140       | endomembrane protein, putative  | 932                 | 5,41         | 8,98E-07        | 3,50E-06        |
| TcCLB.510901.150       | proteasome regulatory non-ATPase subunit 2, putative                  | 502                 | 8,27         | 1,06E-06        | 3,95E-06        |
| TcCLB.506677.10        | ubiquitin-like protein, putative                                      | 355                 | 5,64         | 1,14E-06        | 4,19E-06        |

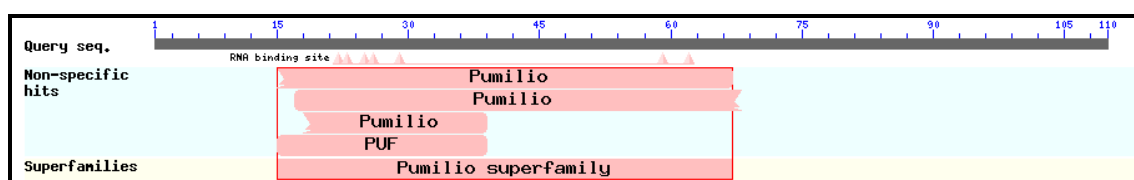
| IDS              | DESCRIÇÃO   | EPI<br>PROT | FC   | P VALUE  | FDR      |
|------------------|---|-------------|------|----------|----------|
| TcCLB.511285.30  | hypothetical protein, conserved   | 422         | 5,69 | 1,36E-06 | 4,75E-06 |
| TcCLB.506725.20  | hypothetical protein, conserved   | 719         | 7,17 | 1,41E-06 | 4,87E-06 |
| TcCLB.511285.80  | hypothetical protein  | 1046        | 6,95 | 1,63E-06 | 5,49E-06 |
| TcCLB.508027.110 | pyroglutamyl-peptidase I (PGP), putative, cysteine peptidase, Clan CF, family C15, putative | 862         | 5,42 | 1,96E-06 | 6,41E-06 |
| TcCLB.509967.30  | aspartyl-tRNA synthetase, putative  | 1153        | 8,32 | 2,17E-06 | 7,02E-06 |
| TcCLB.508269.40  | hypothetical protein, conserved   | 420         | 5,07 | 2,47E-06 | 7,90E-06 |
| TcCLB.511391.220 | hypothetical protein, conserved   | 1133        | 4,73 | 2,69E-06 | 8,43E-06 |
| TcCLB.511407.20  | hypothetical protein, conserved   | 1256        | 8,16 | 2,97E-06 | 9,22E-06 |
| TcCLB.506789.160 | hypothetical protein, conserved   | 849         | 5,16 | 3,02E-06 | 9,33E-06 |
| TcCLB.506577.120 | sterol C-24 reductase, putative   | 447         | 4,28 | 3,59E-06 | 1,09E-05 |
| TcCLB.509571.50  | hypothetical protein, conserved   | 599         | 6,15 | 3,63E-06 | 1,10E-05 |
| TcCLB.511759.30  | hypothetical protein, conserved   | 650         | 5,18 | 6,08E-06 | 1,74E-05 |
| TcCLB.510407.40  | hypothetical protein, conserved   | 1114        | 5,86 | 1,05E-05 | 2,84E-05 |
| TcCLB.509247.50  | methionyl-tRNA synthetase, putative   | 490         | 7,47 | 1,24E-05 | 3,27E-05 |
| TcCLB.506927.20  | hypothetical protein, conserved   | 780         | 4,36 | 1,27E-05 | 3,35E-05 |
| TcCLB.508857.80  | hypothetical protein, conserved   | 1115        | 4,23 | 1,27E-05 | 3,35E-05 |
| TcCLB.509979.30  | hypothetical protein, conserved   | 792         | 6,47 | 1,91E-05 | 4,89E-05 |
| TcCLB.506459.290 | elongation factor 1-gamma (EF-1-gamma, pseudogene), putative                                | 698         | 6,80 | 2,01E-05 | 5,10E-05 |
| TcCLB.510507.20  | 3-ketoacyl-CoA thiolase, putative   | 96          | 5,01 | 3,13E-05 | 7,66E-05 |
| TcCLB.511869.9   | dynein heavy chain, putative  | 746         | 6,27 | 3,37E-05 | 8,20E-05 |
| TcCLB.509879.20  | hypothetical protein, conserved   | 1166        | 9,76 | 4,60E-05 | 1,10E-04 |
| TcCLB.509831.36  | mitochondrial RNA binding protein 1, putative   | 266         | 3,33 | 5,48E-05 | 1,28E-04 |
| TcCLB.507063.150 | hypothetical protein, conserved   | 635         | 7,09 | 7,01E-05 | 1,61E-04 |
| TcCLB.510353.10  | major vault protein, putative   | 360         | 6,75 | 1,22E-04 | 2,74E-04 |
| TcCLB.511277.175 | ribosomal protein S27, putative   | 150         | 3,22 | 1,90E-04 | 4,10E-04 |
| TcCLB.509011.40  | calreticulin, putative  | 99          | 5,51 | 2,57E-04 | 5,39E-04 |
| TcCLB.506679.250 | ribosomal protein L24, putative   | 483         | 5,84 | 3,34E-04 | 6,82E-04 |
| TcCLB.506297.270 | 60S ribosomal protein L28, putative   | 198         | 4,26 | 5,67E-04 | 1,12E-03 |
| TcCLB.509445.39  | glutamate dehydrogenase, putative   | 325         | 7,03 | 7,06E-04 | 1,35E-03 |
| TcCLB.510293.54  | hypothetical protein, conserved   | 580         | 8,00 | 1,28E-03 | 2,33E-03 |
| TcCLB.510945.70  | aspartate aminotransferase, mitochondrial, putative   | 78          | 5,31 | 2,80E-03 | 4,78E-03 |
| TcCLB.511293.50  | kinesin, putative   | 871         | 3,00 | 3,27E-03 | 5,49E-03 |

**Quadro 18. Lista de proteínas específicas associadas à FKBP12, de formas epimastigotas de *T. cruzi* sob estresse nutricional por 2 h, obtidas por imunoprecipitação.** Os critérios utilizados para obtenção das proteínas específicas dessa condição foram um FDR  $\leq 0,01$  e a ausência das mesmas nos outros experimentos.

Das proteínas presentes no complexo que contém a proteína FKB12, somente nas formas epimastigotas de *T. cruzi* submetidas a estresse nutricional, destacam-se:

➤ TcCLB.507049.199 – pumilio protein, putative:

Algumas proteínas com esse domínio (Figura 40) podem funcionar como repressores traducionais por ligação à sequência 3' UTR de mRNAs alvos. Outras proteínas que contêm os domínios PUF também são proteínas de ligação ao RNA. A proteína PUF1 (JSN1) de levedura por exemplo, parece conter um único motivo de ligação à RNA (RRM). Proteínas com domínio PUF repetido podem ainda funcionar de forma assimétrica e serem responsáveis pela regulação de proteínas envolvidas no transporte e diferenciação celular (KRAMER, 2011).

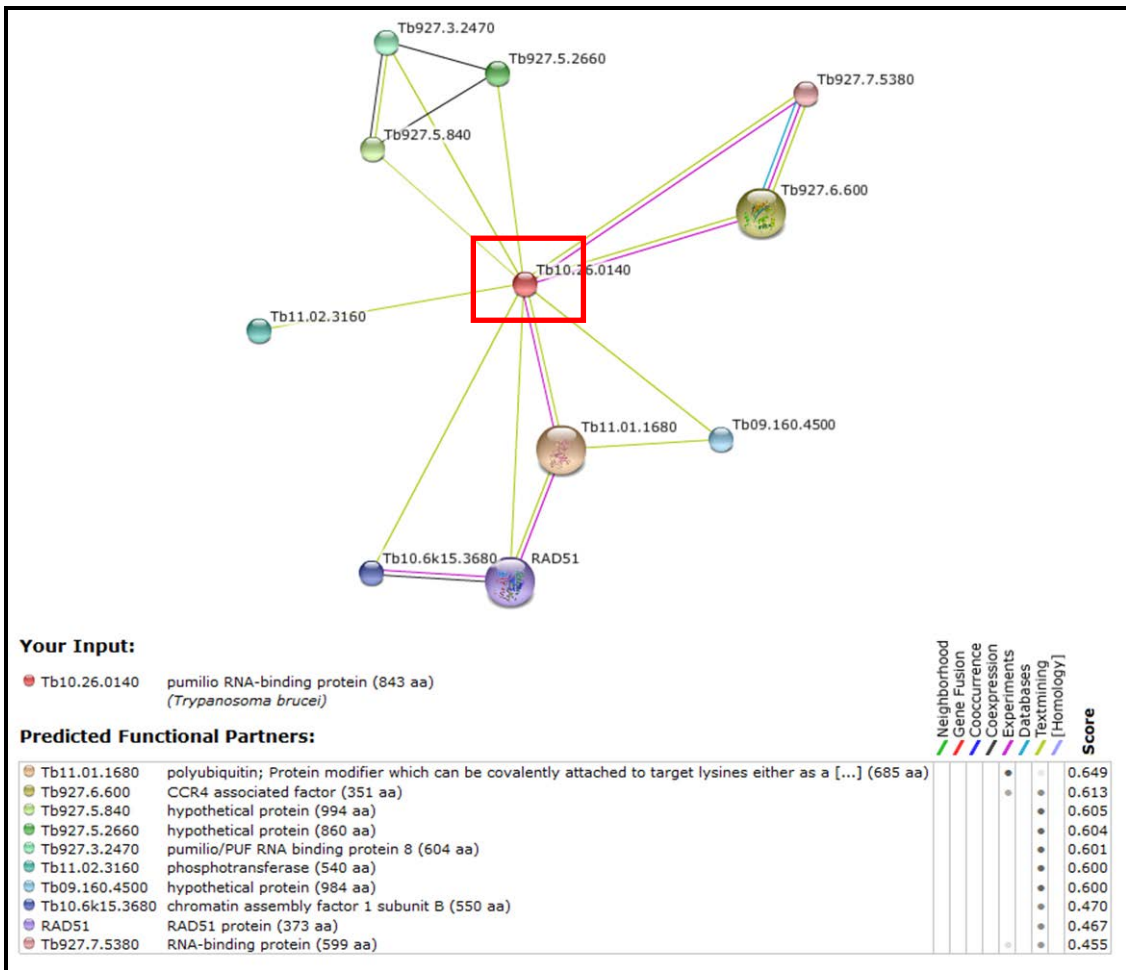


**Figura 40. Domínios conservados encontrados na proteína Pumilio de *T. cruzi*.** Destaque para o domínio Pumilio.

Fonte: Conserved Domains (NCBI).

Essa proteína de *T. cruzi* possui uma proteína homóloga em *T. brucei* (Tb10.26.0140). Essa proteína por sua vez interage com outras proteínas de ligação ao RNA. A rede de interação, predita pela ferramenta STRING 9.1, pode ser visualizada na Figura 41.

Entre as proteínas encontradas na rede de interação estão outras proteínas com domínio Pumilio e proteínas de ligação ao RNA que atuam como estabilizantes do transcrito ou na sinalização do transporte ou degradação do mesmo. Complexos proteicos com essas funções necessitam constantemente de um suporte que permita o seu remodelamento. Muitas FKBP's nucleares possuem a atividade de chaperonas além de atividades enzimáticas que garantem que o complexo ao qual pertencem exerça sua total funcionalidade.



**Figura 41. Rede de interação da proteína Tb10.26.0140.**

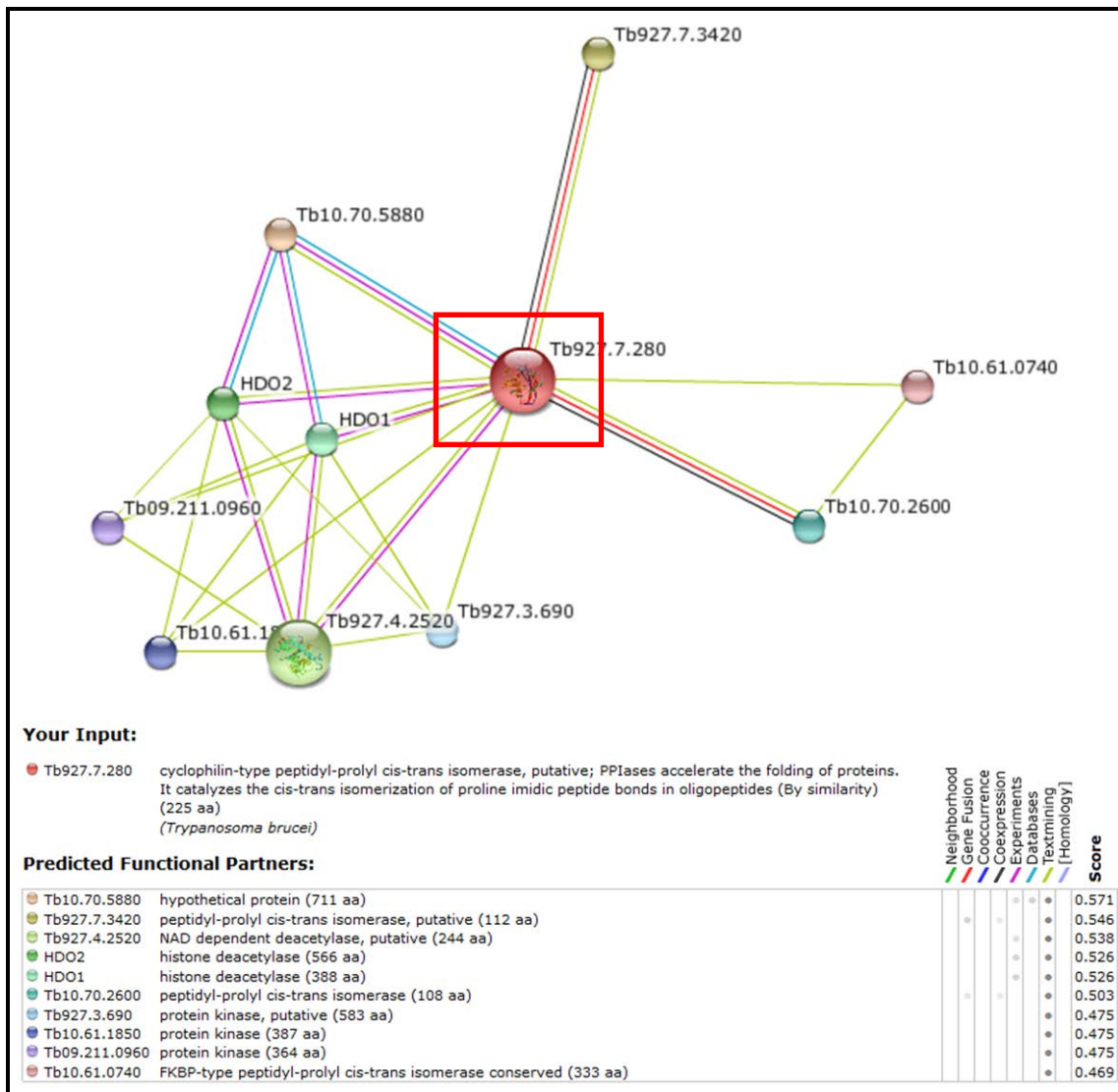
Fonte: STRING 9.1.

➤ TcCLB.511237.110 – cyclophilin, putative:

A Figura 42 mostra a rede de interação da proteína Tb927.7.280 de *T. brucei* (homóloga à TcCLB.511237.110). Nesta rede é possível identificar a interação entre a proteína alvo (Ciclofilina) e a proteína Tb927.7.3420 (FKBP12). A associação destas duas proteínas em uma situação de estresse nutricional pode vir a caracterizar uma função específica em resposta à um evento, já que as duas proteínas são responsáveis pelas mesmas funções.

Em *S. cerevisiae*, a ciclofilina específica (Cpr1) está envolvida em dois complexos distintos de histonas-desacetilases que garantem que os eventos de transcrição ocorram na passagem da divisão mitótica para meiótica (WANG, 2005). Proteínas envolvidas com essa função também podem ser vistas na rede de interação.





**Figura 42. Rede de interação da proteína Tb927.7.280.**

Fonte: STRING 9.1.

➤ TcCLB.510689.50 – cell differentiation protein, putative:

Essa proteína alvo de interação com a proteína FKBP12, mostrou ter uma homóloga em *T. brucei* (Tb927.4.410). Essa proteína de *T. brucei* por sua vez possui uma rede de interação (Figura 43) com vários componentes do complexo CCR4-NOT. Esse complexo é uma maquinaria multifuncional e altamente conservada que controla o metabolismo de mRNA. Seus componentes foram descritos em diversos aspectos do controle do metabolismo de mRNA e da expressão de proteínas, incluindo início da transcrição, alongação de tradução, degradação de mRNA, ubiquitinação e modificação proteica (BARTLAM & YAMAMOTO, 2010).

Essa proteína (TcCLB.510689.50) em leveduras (Caf40) é descrita como componente essencial no complexo CCR4-NOT e de ligação a outros componentes como Caf1 (YI, 2012).

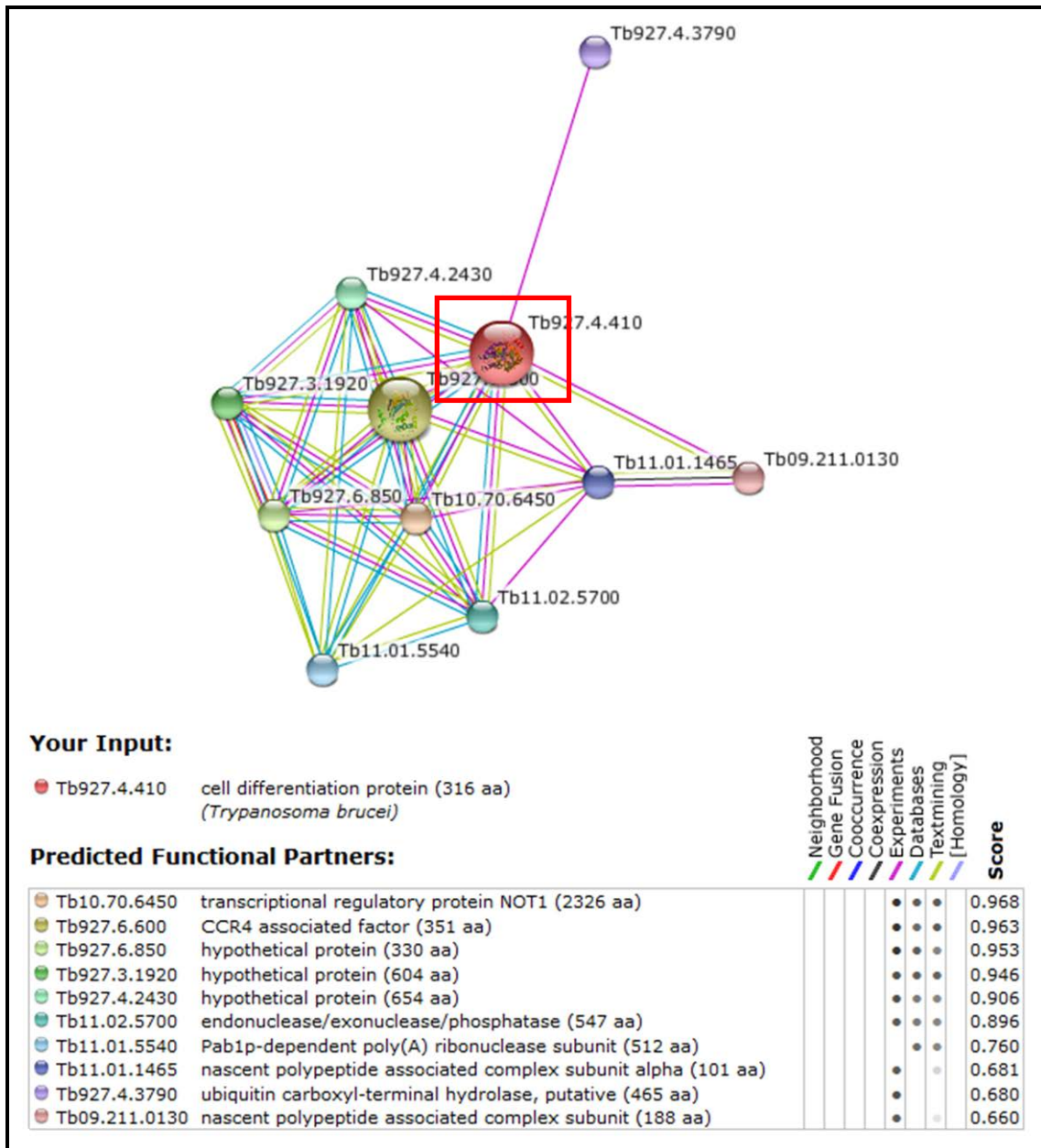
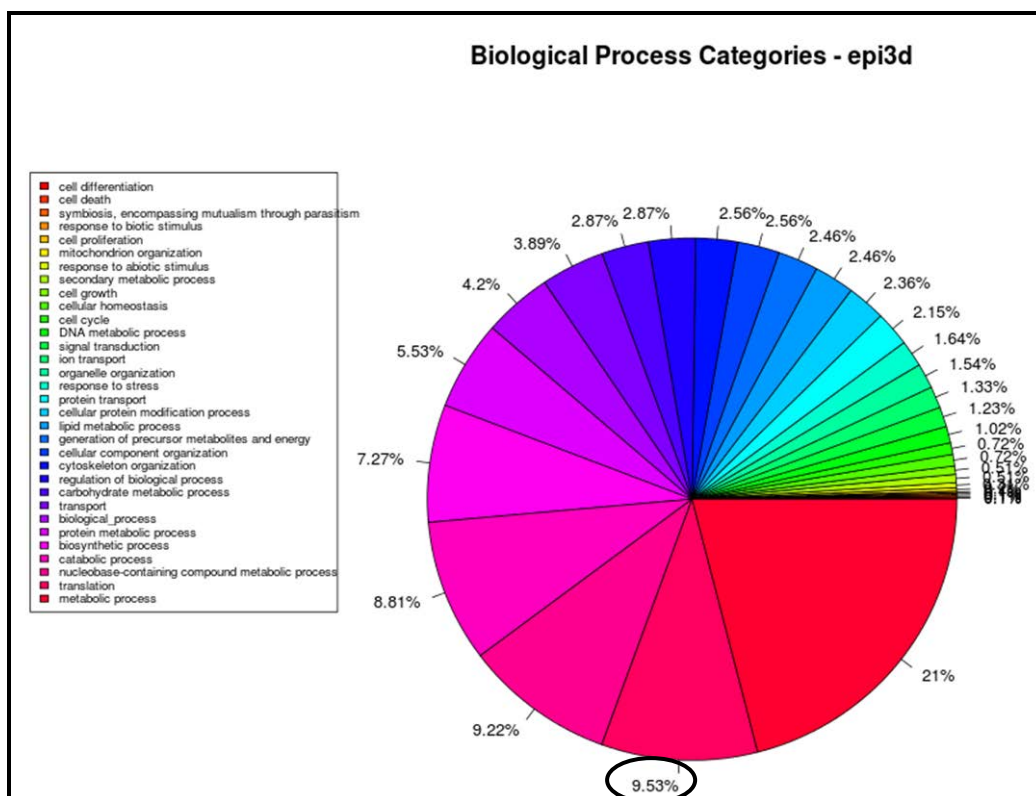


Figura 43. Rede de interação da proteína Tb927.4.410.

Fonte: STRING 9.1.

As listas gênicas foram também submetidas ao *pipeline* completo de anotação funcional disponibilizado através do *software* Blast2GO (CONESA *et al.*, 2005). A análise de anotação funcional consiste em realizar BLASTs contra o banco de dados Refseq do NCBI (21 de Janeiro de 2014) seguido de atribuição de categorias GO e domínios proteicos pelo banco Interpro (HUNTER *et al.*, 2011). Foi realizada também a busca por vias metabólicas cujos genes façam parte, através do banco de dados KEGG (KANEHISA *et al.*, 2006). De um modo geral, quando analisamos o perfil de proteínas identificadas no experimento de proteômica para cada condição, classificadas de acordo com o processo biológico que estão inseridas, não percebemos muitas diferenças. Entretanto, proteínas envolvidas no processo de tradução estão bem menos representadas nos experimentos envolvendo o tratamento com rapamicina (5 µg/mL). As Figuras 44, 45, 46, 47 e 48 mostram a diferença de proteínas identificadas envolvidas na tradução entre as quatro principais condições utilizadas no experimento de imunoprecipitação. As porcentagens referentes à essa diminuição estão circuladas nos gráficos.



**Figura 44.** Classificação de acordo com o processo biológico das proteínas identificadas na imunoprecipitação de epimastigotas em fase logarítmica de crescimento cultivados em meio LIT.

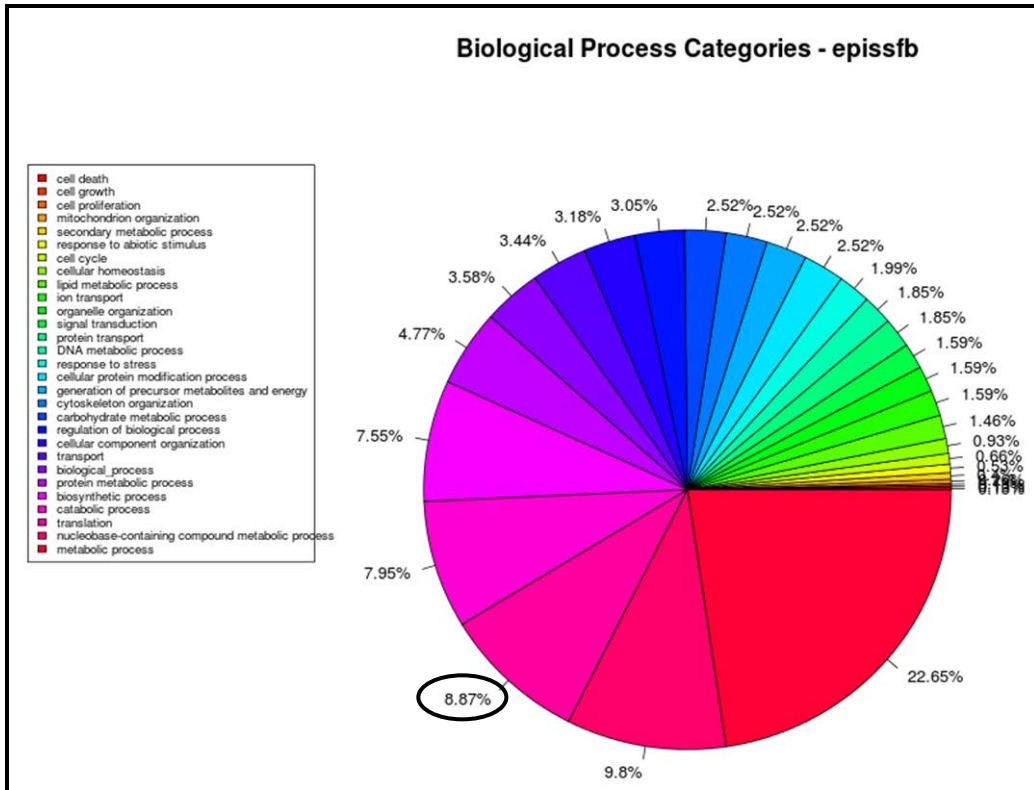


Figura 45. Classificação de acordo com o processo biológico das proteínas identificadas na imunoprecipitação de epimastigotas cultivados em meio LIT sem SFB.

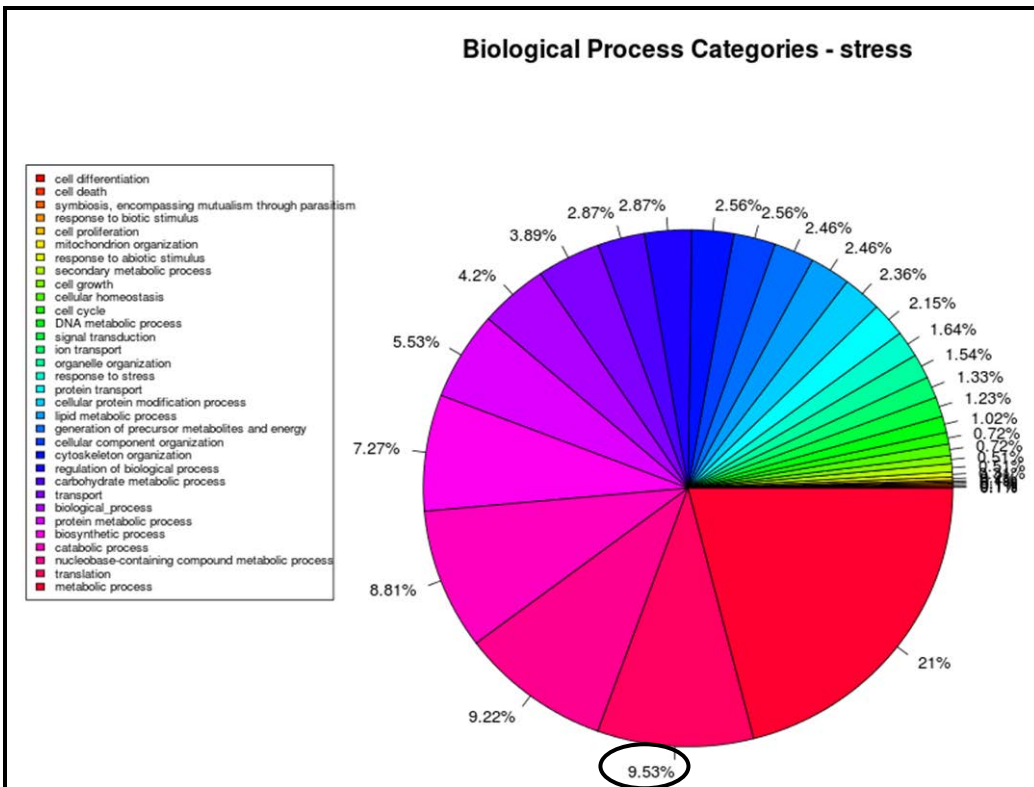


Figura 46. Classificação de acordo com o processo biológico das proteínas identificadas na imunoprecipitação de epimastigotas sob estresse nutricional de 2h.

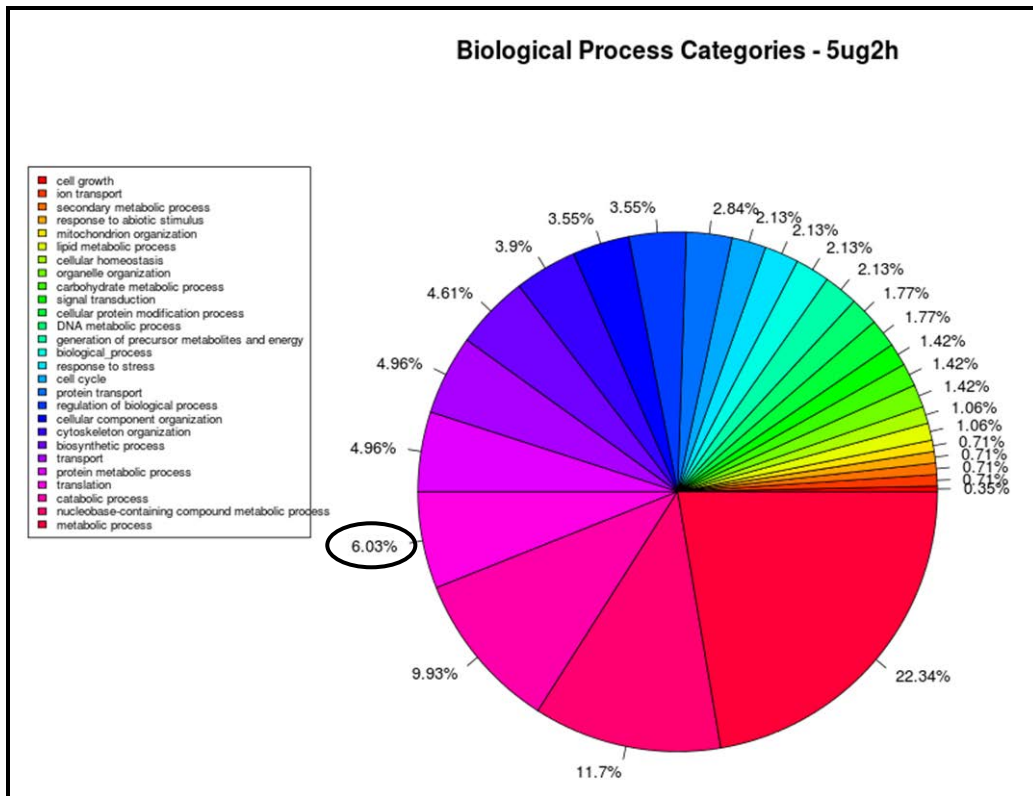


Figura 47. Classificação de acordo com o processo biológico das proteínas identificadas na imunoprecipitação de epimastigotas cultivados em meio LIT sem SFB e sob tratamento com rapamicina (5 µg/mL por 2h).

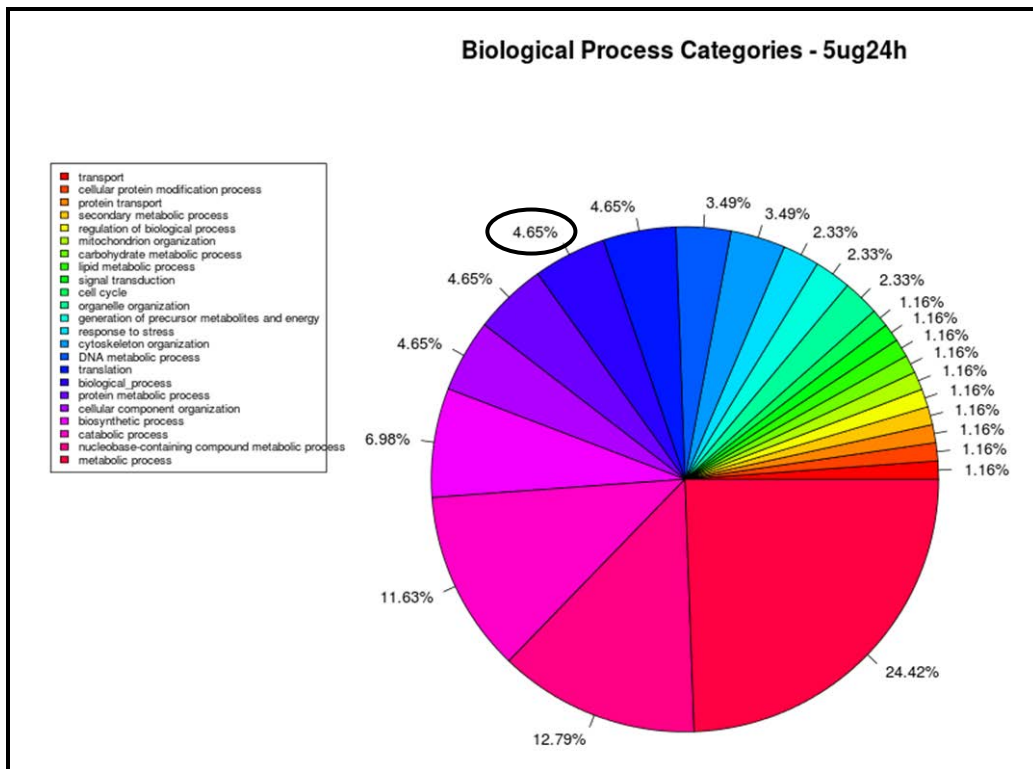


Figura 48. Classificação de acordo com o processo biológico das proteínas identificadas na imunoprecipitação de epimastigotas cultivados em meio LIT sem SFB e sob tratamento com rapamicina (5 µg/mL por 24h).

É possível também notar que essa diminuição de proteínas identificadas envolvidas com a tradução chega ser de duas vezes quando comparamos a situação normal (Epi3d) com uma de tratamento com rapamicina (5µg/mL) por 24h.

Em outra situação, quando observamos de um modo geral, a classificação por função molecular das proteínas identificadas nas quatro diferentes condições, percebemos que não há também variações. As principais funções são: atividade de transferase, ligação à DNA, atividade de hidrolase, ligação à RNA, ligação à proteínas e atividade de peptidase. As Figuras 49, 50, 51, 52 e 53 mostram a semelhança entre as cinco condições utilizadas no experimento de imunoprecipitação.

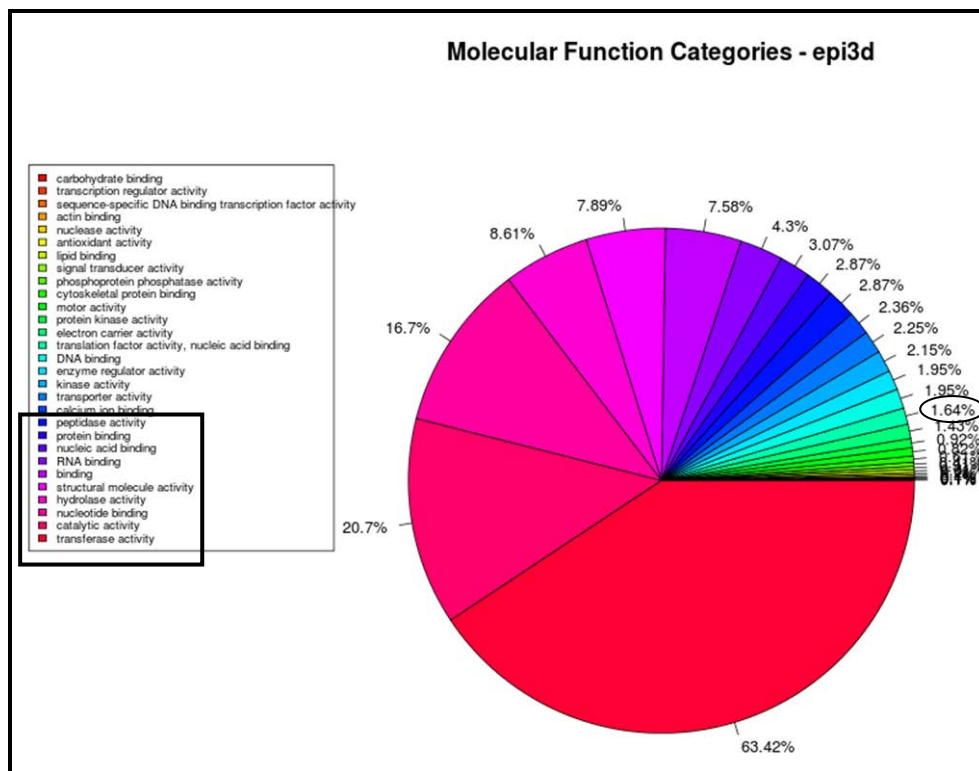


Figura 49. Classificação de acordo com a função molecular das proteínas identificadas na imunoprecipitação de epimastigotas em fase logarítmica de crescimento cultivados em meio LIT.

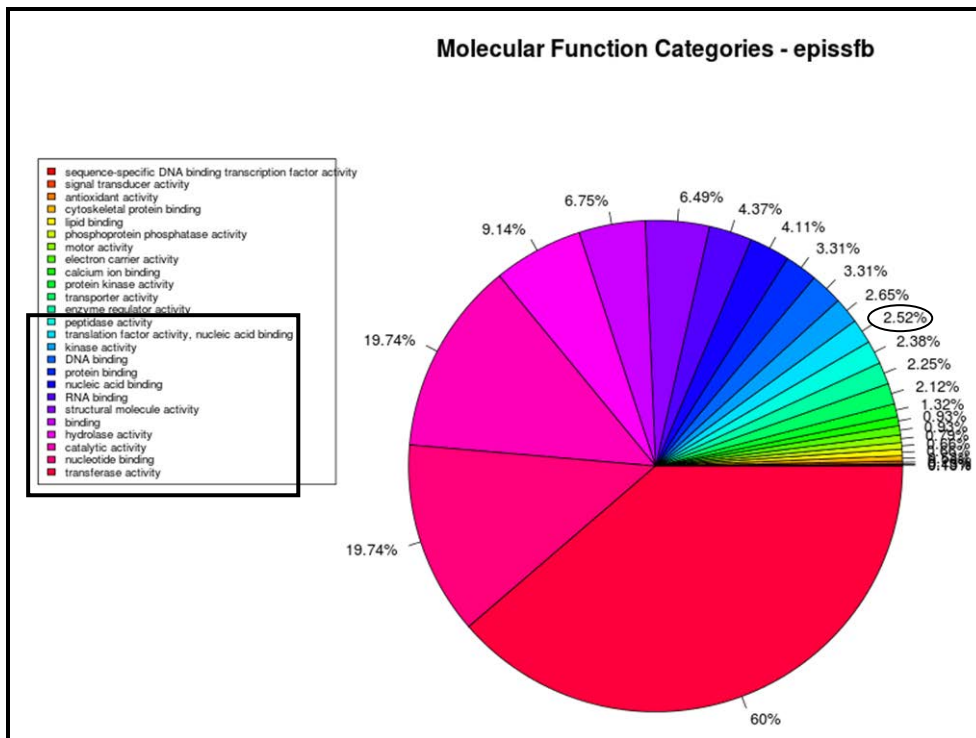


Figura 50. Classificação de acordo com a função molecular das proteínas identificadas na imunoprecipitação de epimastigotas cultivados em meio LIT sem SFB.

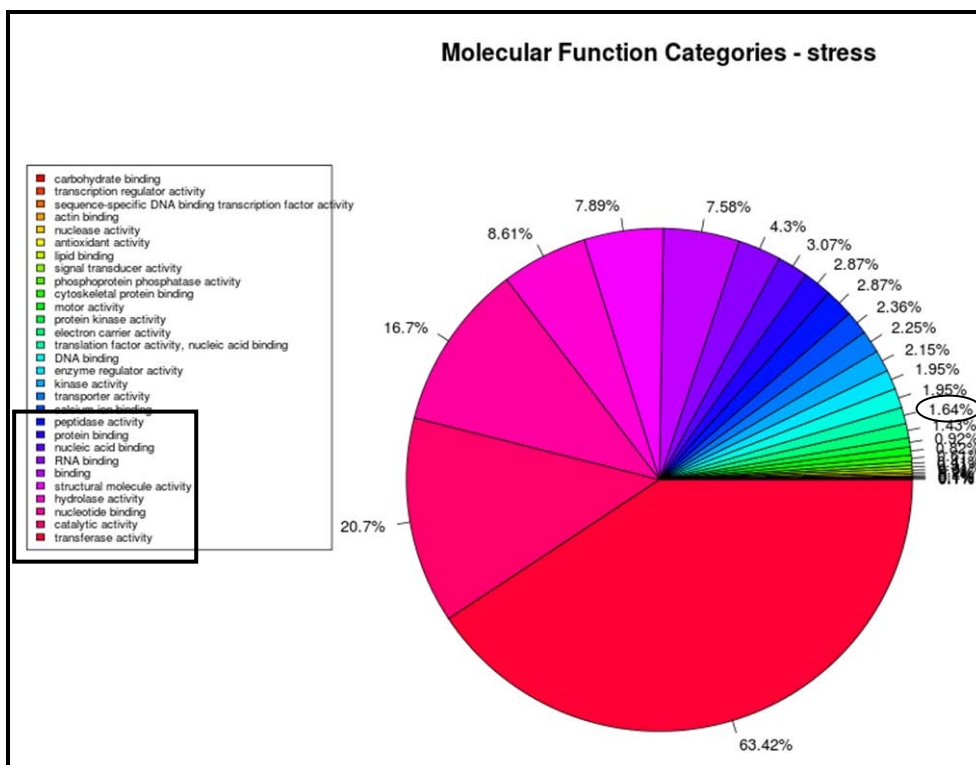


Figura 51. Classificação de acordo com a função molecular das proteínas identificadas na imunoprecipitação de epimastigotas sob estresse nutricional de 2h.

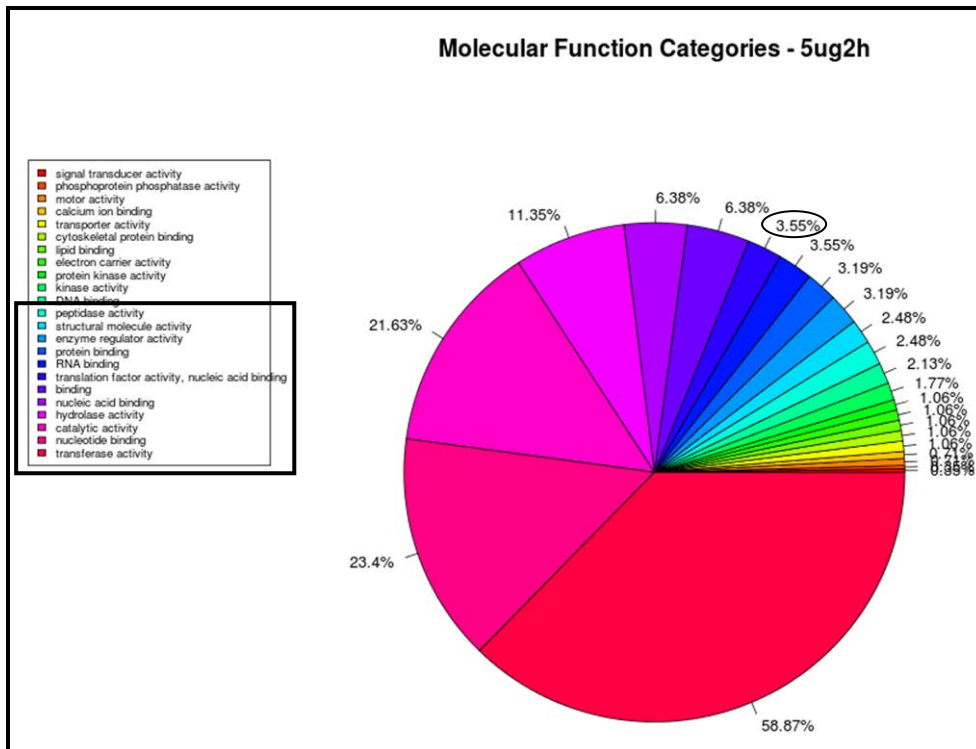


Figura 52. Classificação de acordo com a função molecular das proteínas identificadas na imunoprecipitação de epimastigotas cultivados em meio LIT sem SFB e sob tratamento com rapamicina (5 µg/mL por 2 h).

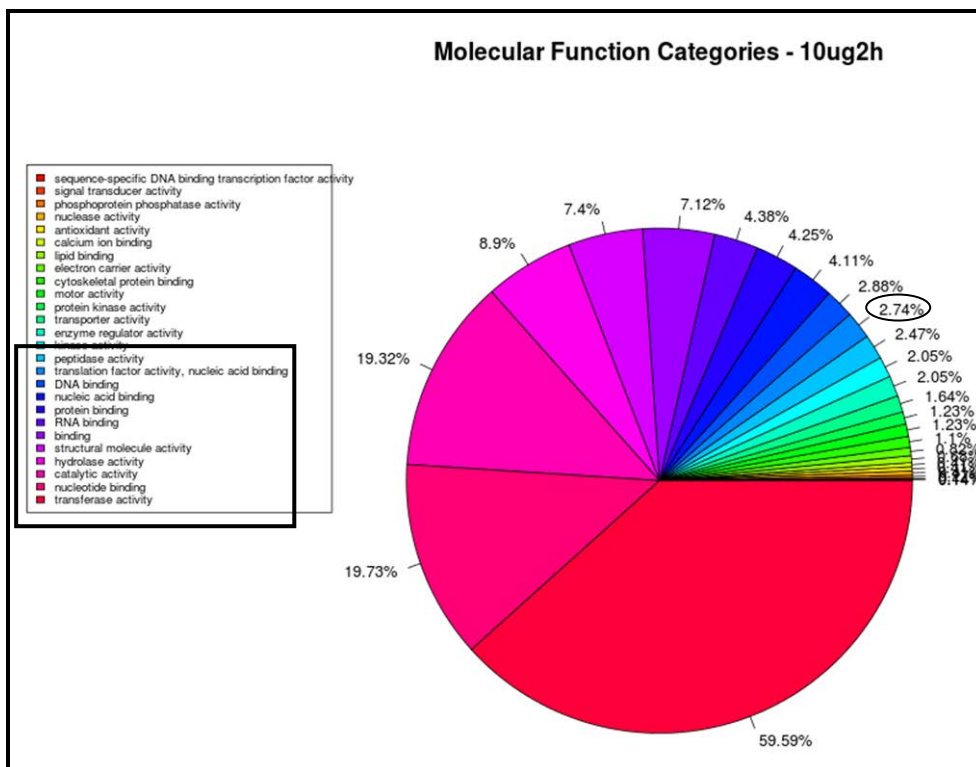


Figura 53. Classificação de acordo com a função molecular das proteínas identificadas na imunoprecipitação de epimastigotas cultivados em meio LIT sem SFB e sob tratamento com rapamicina (10 µg/mL por 2 h).



A diferença nessa classificação por função molecular das proteínas identificadas por imunoprecipitação em todas as condições testadas está no aumento de proteínas com função de ativadoras dos fatores de tradução.

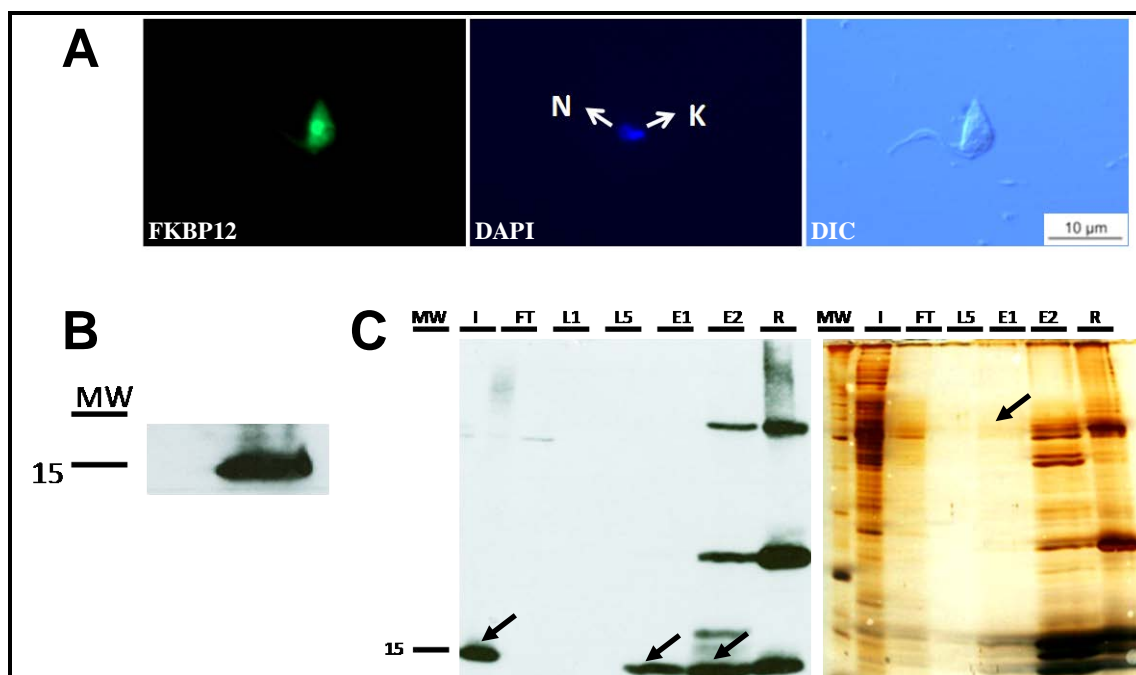
#### 4.8 CONSTRUÇÃO DE VETORES PARA EXPRESSÃO EPISSOMAL DA PROTEÍNA FKBP12 DE *T. cruzi* FUSIONADA À ETIQUETA FLAG C-TERMINAL

Vetores de destino específicos da plataforma Gateway® foram confeccionados em nosso instituto (BATISTA *et al.*, 2010 e GONÇALVES *et al.*, em preparação) para utilização em *T. cruzi*. Alguns desses vetores foram utilizados neste trabalho como estratégia de confirmação dos resultados de imunolocalização bem como os de interação proteína-proteína obtidos por imunoprecipitação.

Com base no exposto, utilizou-se dessa abordagem para expressão da proteína FKBP12 de forma epissomal. A sequência do gene foi então amplificada, clonada em vetor de entrada da plataforma Gateway® e depois recombinada em vetores de destino que inserem etiquetas diferentes à porção C-terminal da proteína epissomal, sendo elas FLAG, HA e Ty, como descrito nos itens 3.12.5, 3.12.6, 3.12.7 e 3.14.

Os parasitas transfectantes que apresentaram o mesmo padrão de localização da proteína FKBP12 endógena (Figuras 24 e 25) foram aqueles que apresentavam a proteína FKBP12 epissomal fusionada à etiqueta FLAG (pTcFKBP12:FLAG) (Figura 54 A). Além disso, um extrato proteico total foi obtido das formas transfectantes e um ensaio de *Western blot* foi realizado utilizando anticorpo específico contra a etiqueta FLAG confirmando novamente a expressão da proteína fusionada à etiqueta (Figura 54 B). A seguir, foi realizado o ensaio de imunoprecipitação utilizando extrato proteico dos transfectantes e o anticorpo anti-FLAG, como descrito no item 3.15.7. No ensaio de *Western blot* (Figura 54 C), quando as proteínas associadas à proteína FKBP12 epissomal foram eluídas tanto com o peptídeo FLAG, quanto com glicina, pode-se observar a presença da proteína endógena fusionada ao *tag* (banda indicada com seta) e de outras proteínas através da visualização do

gel corado com prata. A amostra obtida após eluição com peptídeo FLAG foi processada para ensaio de espectrometria de massas como descrito no item 3.15.7, porém ainda não foi sequenciado. O resultado desse sequenciamento validará os obtidos através de imunoprecipitação com o anticorpo específico contra a proteína FKBP12, promovendo uma maior confiabilidade em descrever os complexos em que essa proteína está presente.

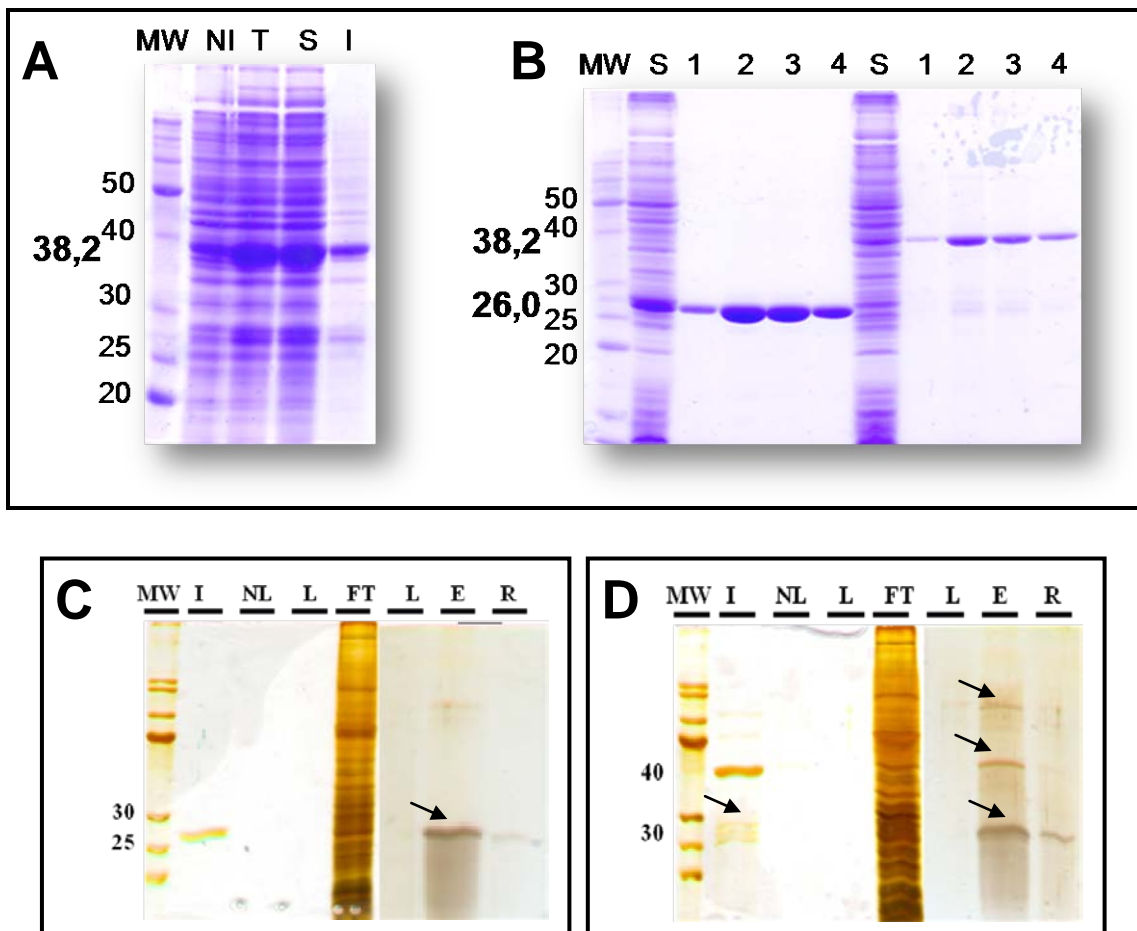


**Figura 54. Caracterização da proteína FKBP12:FLAG em *T. cruzi*.** **A)** Imunolocalização da proteína FKBP12:FLAG em formas epimastigotas de *T. cruzi*. Para os ensaios de imunolocalização o anticorpo primário, ANTI-FLAG® M2 (Sigma), foi diluído 1:400 enquanto que anticorpo secundário foi diluído 1:400. O cinetoplasto (K) e núcleo (N) estão marcados com DAPI em azul. Barra = 10µm. **B)** *Western blot* da proteína FKBP12:FLAG de *T. cruzi* utilizando o anticorpo ANTI-FLAG® M2 (Sigma). **C)** *Western blot* e SDS-PAGE corado com prata das etapas de imunoprecipitação utilizando extrato total. LEGENDA: MW, marcador de massa molecular; I, *Input*; FT, *Flow through*; L1, Lavado (1x); L5, Lavado (5x); E1, Eluição com o peptídeo FLAG (5,0 µg/µL); E2, Eluição com Glicina 0,2 M pH 2,5; R, Resina. A massa das proteínas é indicada em kDa.

#### 4.9 PULL DOWN

Para os ensaios de *pull down* utilizou-se o mesmo extrato nuclear obtido pela metodologia já descrita. Essa técnica também consiste na captura das proteínas que se associam à proteína FKBP12, através da associação direta das mesmas com a FKBP12 imobilizada em resina Glutathione Sepharose® 4B (Amersham-Biosciences). Para isso, a proteína solúvel é expressa, purificada e imobilizada em uma matriz que servirá de suporte para ocorrerem as interações entre as proteínas do complexo e em seguida suas identificações. Essas etapas foram descritas no item 3.12.9.

A proteína FKBP12 de *T. cruzi* na sua forma solúvel foi obtida através de indução do gene clonado em vetor de expressão pDEST15™ da plataforma Gateway®. Esse vetor adiciona à proteína de interesse uma cauda GST, que facilita o processo de enovelamento da proteína bem como a sua purificação. A indução ocorreu sob 0,1 mM de IPTG, a 16 °C, *overnight* (Figura 55 A). Após sua purificação (Figura 55 B), 10 µg da proteína foi imobilizada na resina e submetida ao ensaio de *pull down* com extrato nuclear obtido em uma etapa anterior descrita no item 3.15.7. A proteína GST foi expressa e purificada (Figura 55 B), e submetida ao ensaio de *pull down* como controle negativo de interação. O resultado desse experimento pode ser visto na Figura 55 C e D onde nas frações eluídas representadas por (E) é possível visualizar as bandas referentes às proteínas solúveis. É possível também identificar-se na fração eluída na Figura 55 D uma banda que é referente a uma possível degradação sofrida pela proteína FKBP12 fusionada à GST. As bandas acima sugerem possíveis associações com outras proteínas. Os eluídos foram analisados no espectrômetro de massas. Após a análise constatou-se que não houve a formação do complexo nativo, pois somente as proteínas recombinantes solúveis foram detectadas. Portanto, novas padronizações serão realizadas com diferentes concentrações da proteína solúvel bem como de obtenção da proteína solúvel fusionada à outras etiquetas menores, que podem interferir menos no processo de enovelamento proteico.



**Figura 55. Expressão, purificação e ensaio de *pull down* da proteína FKBP12 de *T. cruzi*.**  
**A)** SDS-PAGE (13%) das etapas de expressão da proteína FKBP12:GST na sua forma solúvel.  
**B)** SDS-PAGE (13%) das etapas de purificação da proteína FKBP12:GST e GST solúveis. **C)** Controle. *Pull down* da proteína GST utilizando extrato nuclear. **D)** *Pull down* da proteína FKBP12 utilizando extrato nuclear. LEGENDA: MW, marcador de massa molecular; I, *Input* de proteína solúvel; NI, fração Não-induzida; T, fração Total; S, fração Solúvel; 1, 2, 3, 4, frações purificadas; NL, Não ligado; L, Lavado (3x); FT, *Flow through*; L, Lavado (3x); E, Eluído; R, Resina. A massa das proteínas é indicada em kDa.

#### 4.10 CONSTRUÇÃO DE VETORES PARA NOCAUTE GÊNICO DA PROTEÍNA FKBP12 DE *T. cruzi*

As técnicas que permitem a remoção de um gene e sua substituição por genes repórteres, através do processo de recombinação, têm sido usadas com sucesso para verificação da função gênica em tripanosomatídeos (SWINDLE & TAIT, 1996). O nocaute gênico consiste na inserção de marcadores genéticos

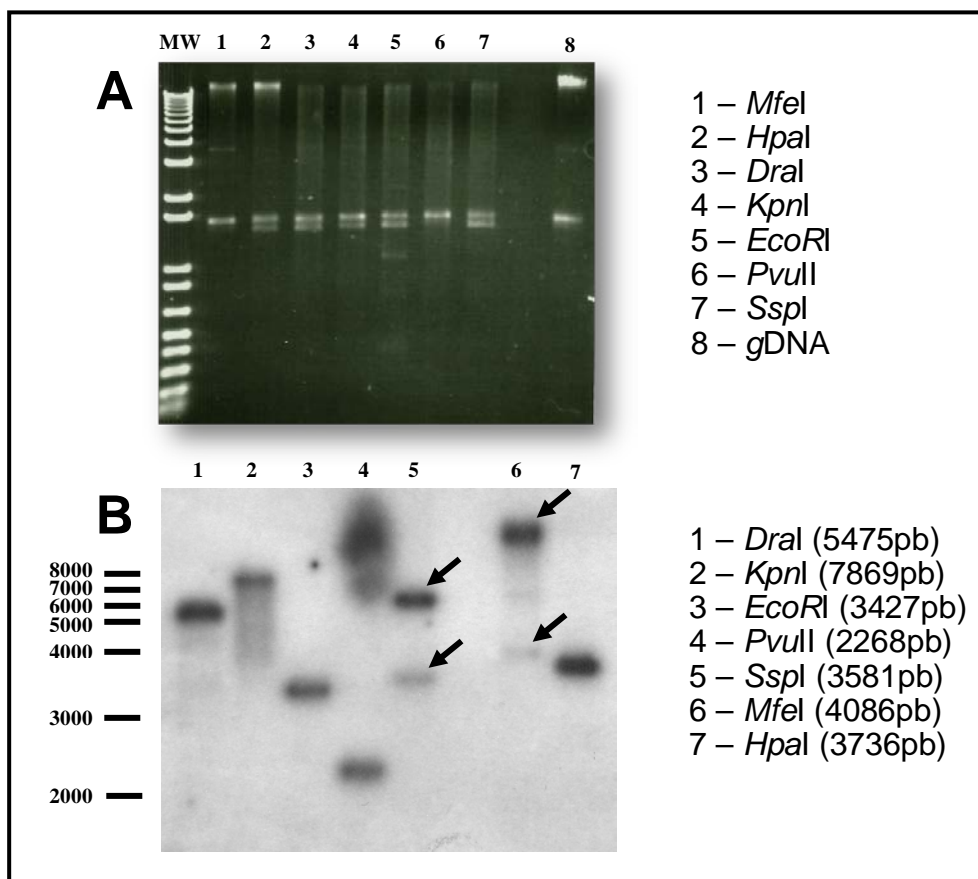
de seleção (gene codificando resistência a neomicina ou higromicina, entre outros), flanqueados por sequências pertencentes ao locus cromossômico de interesse. Através do processo de recombinação homóloga, o marcador pode então substituir o gene que se quer estudar. Desse modo, é possível analisar a função de determinado gene, através das alterações (decorrentes de sua ausência) na fisiologia do parasita. No presente estudo, os genes repórteres que codificam resistência aos antibióticos Neomicina (G418) e Higromicina serão flanqueados por sequências a montante e a jusante da região codificante do gene FKBP12 de *T. cruzi*, como mostrado na Figura 16. As construções serão usadas para transfectar *T. cruzi* e gerar mutantes para o gene FKBP12, a fim de se estudar o efeito que a ausência do gene causa no metabolismo do parasita bem como de sua resposta ao tratamento com rapamicina.

As regiões a montante (*upstream*) e a jusante (*downstream*) do gene FKBP12 de *T. cruzi*, respectivamente denominadas de UpFKBP12 (350 pb) e DownFKBP12 (400 pb), foram amplificadas por PCR, usando os iniciadores específicos. Cada região foi amplificada obedecendo a disposição dos sítios de clonagem que flanqueiam os genes NEO e HIGRO nos vetores pNEO2 e pHIGRO2. As etapas de clonagem para as regiões inergênicas no vetor pNEO2 foram realizadas como descrito nos itens 3.18.1, 3.18.2 e 3.18.3. Após confirmação da clonagem, o fragmento de interesse contendo as regiões a montante e a jusante, bem como o gene de resistência (Figura 15), foi amplificado por PCR utilizando iniciadores específicos e o produto de PCR foi purificado como descrito no item 3.18.3. O fragmento de interesse foi transfectado nas formas epimastigotas como descrito anteriormente.

A população de *T. cruzi* mutante para o gene FKBP12 ( $\Delta fkbp12::neo$ ), resistente ao antibiótico Neomicina já foi obtida por seleção porém ainda não foi confirmada. Portanto o DNA desta população será extraído para análise por PCR e *Southern blot*, a fim de confirmar a eficiência do nocaute do primeiro alelo.

Paralelamente à construção dos vetores para o nocaute, foi realizado um ensaio de *Southern blot* (Figura 56 A e B) para verificar se o gene é mesmo de cópia única. Apesar do padrão de marcação nas digestões para a enzima *Sspl* e *Mfel* não serem específicos, é possível afirmar que o gene é de cópia única, uma vez que para a digestão com a enzima *Sspl* é possível ter ocorrido uma

digestão preferencial, o que acarretou no acúmulo de um dos possíveis fragmentos gerados, enquanto que a digestão com a enzima *Mfel* pode não ter sido eficiente, havendo assim uma maior marcação na região referente ao material não digerido. O tamanho esperado dos fragmentos obtidos após a digestão com as enzimas específicas é mostrado ao lado da Figura 56 B.



**Figura 56. Ensaio de *Southern blot* para verificar o número de cópias do gene de FKBP12 de *T. cruzi*. A) Gel de Agarose 1% corado com Brometo de Etídeo. B) Filme contendo o padrão de marcação com a sonda radioativa.**

#### 4.11 ENSAIOS DE SEDIMENTAÇÃO EM GRADIENTE DE SACAROSE

Um dos alvos do complexo mTOR descrito na literatura e já abordado nesse trabalho é a proteína ribossomal S6. Essa proteína está intimamente relacionada com a taxa de tradução em organismos eucariontes.

A quinase S6K é descrita como alvo direto de mTOR, e uma vez fosforilada pelo complexo inicia uma cascata de sinalização que termina por

fosforilar a proteína ribossomal S6. A proteína rpS6 fosforilada se torna ativa, favorecendo a interação das duas subunidades ribossomais e posterior início da tradução.

Após verificar a sensibilidade do *T. cruzi* à rapamicina, de observar um aumento na taxa de diferenciação de parasitas tratados com a droga e de identificar os genes da via TOR neste parasita, nosso grupo decidiu investigar se o tratamento com rapamicina estaria interferindo no processo de tradução, como já foi demonstrado em mamíferos.

Para isso, um experimento de marcação metabólica (S35) (Anexo III) foi realizado, com diferentes concentrações de rapamicina e tempos de tratamento. Foram feitos alguns controles como epimastigotas crescidos em LIT com 10% de SFB (CTL positivo), epimastigotas nessas condições tratados com cicloheximida (CTL negativo) e epimastigotas crescidos em LIT sem SFB + DMSO, pois é o meio de diluição da rapamicina. Além disso, foram feitos ensaios sem o uso de TCA (ácido tricloro acético) para mostrar que metionina não incorporada, mas presente pode levar a conclusões erradas. Quando se faz o tratamento com TCA e lavagens posteriores com etanol e acetona, resta apenas a metionina incorporada às proteínas que acabaram de ser produzidas, sendo mais um controle técnico do experimento.

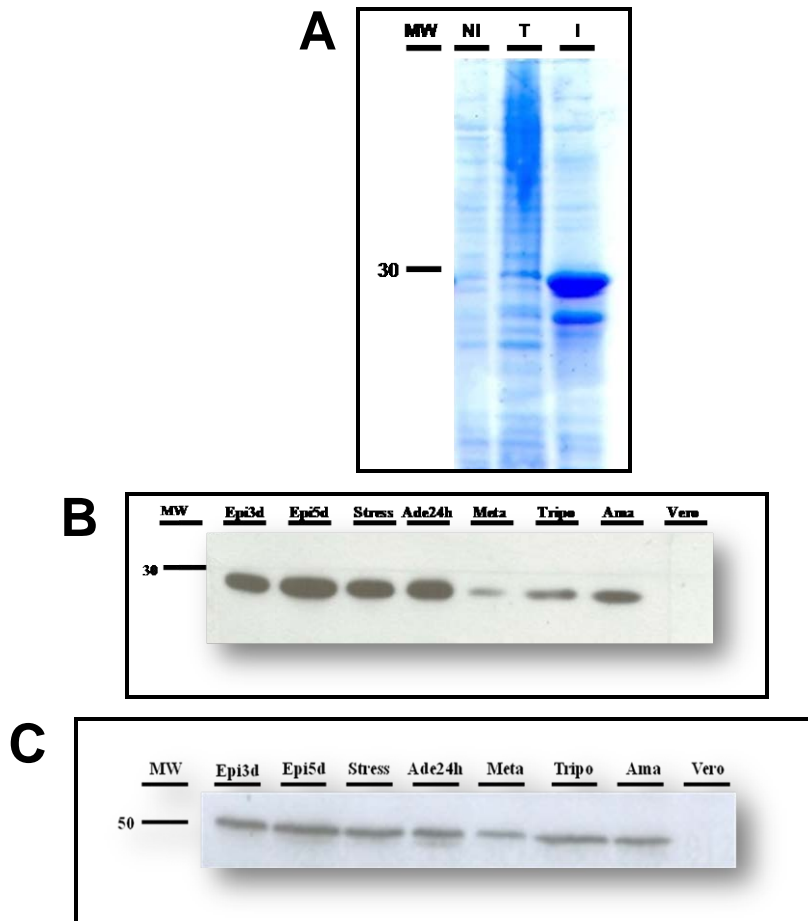
Se compararmos os dados dentro do mesmo experimento, veremos que os controles, tanto positivo quanto negativo funcionaram bem. Que o efeito de diminuição da tradução não se dá por causa do DMSO. Que 5 µg/mL de rapamicina já causa uma diminuição significativa na tradução desde as primeiras horas de incubação e que se mantém até 24 h. Doses de 15 e 20 µg/mL da droga reduzem a tradução a níveis do controle negativo já com 6 horas de incubação (Anexo III). Os ensaios de viabilidade mostraram que os epimastigotas diminuíram a tradução pelo efeito da droga e não porque estavam mortos (MANHÃES *et al.*, em preparação).

Portanto, para corroborar esses dados, este trabalho também se propôs a investigar se a diminuição da taxa de tradução está ligada ao fato de que a proteína rpS6 não está sendo fosforilada devido à inibição do complexo TOR pela rapamicina. Para isso foi desenvolvido um anticorpo específico contra a proteína rpS6 e posteriormente verificada a presença desta proteína nas frações obtidas após a sedimentação de extratos proteicos, submetidos ao

tratamento com rapamicina e parasitas sob estresse nutricional, em gradientes de sacarose.

O plasmídeo com a sequência gênica de rpS6 (Tc00.1047053510769.49 40S ribosomal protein S6, putative) foi cedido gentilmente pelo Dr<sup>o</sup> Henrique Preti. A sequência de rpS6 estava clonada em vetor de entrada da plataforma Gateway®. Posteriormente foi realizada nova recombinação em vetor de destino como descrito no item 3.12.7. Em seguida, após a confirmação da clonagem por PCR de colônia, foi feita a transformação em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS e indução da proteína, como descrito nos itens 3.10 e 3.12.8 respectivamente. A proteína recombinante foi então purificada, após confirmação da expressão por ensaios de *western blot*, inoculada e o soro contendo os anticorpos foi processado como descrito no item 3.15.2. A Figura 57 A mostra a expressão da proteína recombinante na fração insolúvel e a Figura 57 B o padrão de expressão de rpS6 durante o ciclo de vida do *T. cruzi*. Como controle foi utilizado o antissoro da Actina (Figura 57 C).



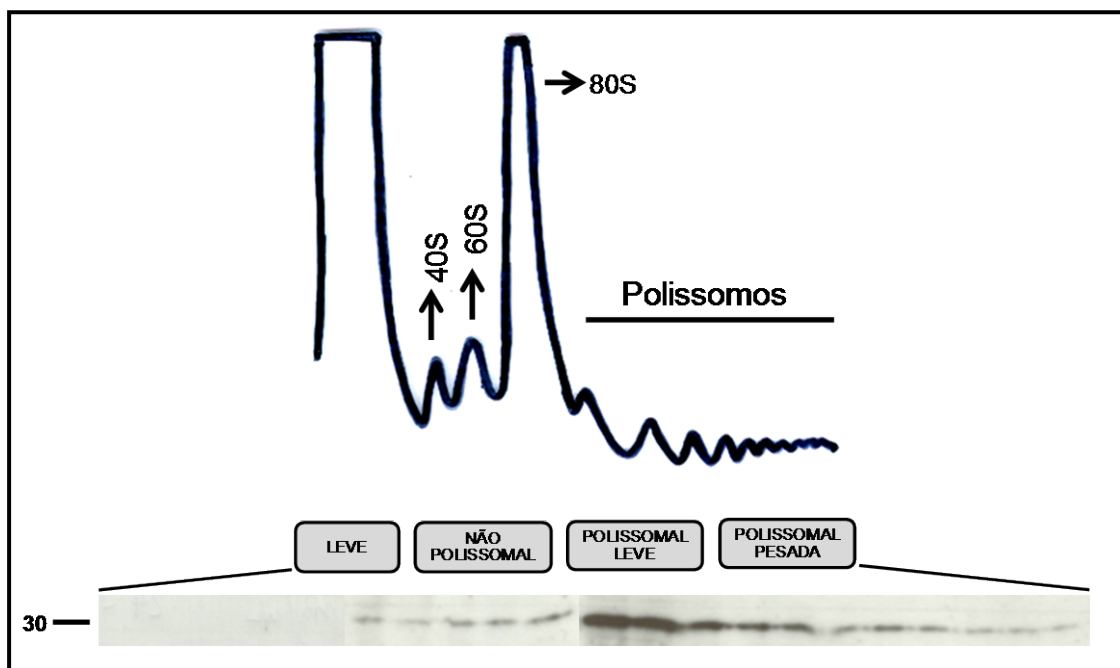


**Figura 57. Caracterização da proteína rpS6 de *T. cruzi*.** (A) SDS-PAGE da etapa de purificação da proteína Tc00.1047053510769.49 40S ribosomal protein S6, putative. (B) SDS-PAGE das etapas de expressão da proteína rpS6 durante o ciclo de vida do *T. cruzi*. O antissoro foi diluído 1:2000. (C) Expressão da proteína actina durante o ciclo de vida do *T. cruzi*. O antissoro foi diluído 1:500. LEGENDA: MW, marcador de massa molecular; NI, fração Não-induzida; T, fração Total; I, fração Insolúvel. A massa das proteínas é indicada em kDa.

Antes de investigar o perfil de sedimentação da proteína rpS6 em condições de tratamento com rapamicina e sob estresse nutricional, que podem ser eventos em que o complexo TOR esteja inibido e consequentemente toda a cascata de sinalização inativa, analisamos a distribuição da proteína rpS6 em gradientes de sacarose (15-55%) como descrito no item 3.17.

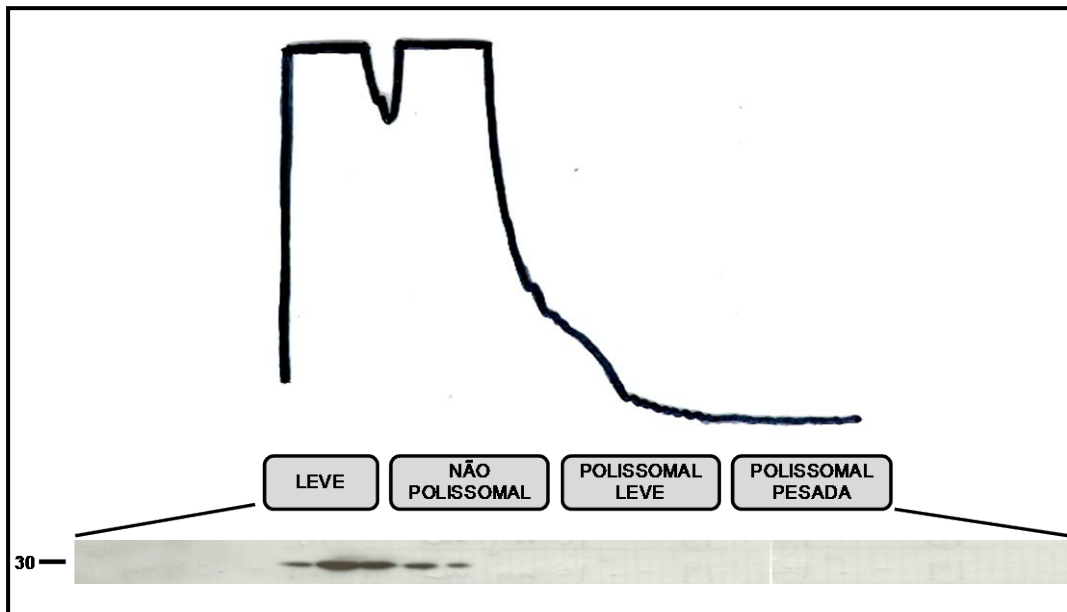
Extratos de formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento foram tratados com cicloheximida e puomicina e adicionados em gradientes de sacarose (15 - 55%). A presença da proteína rpS6 nas frações coletadas foram analisadas por *Western blot*. Um perfil de sedimentação típico de polissomos (tradução ativa) foi obtido com o tratamento dos parasitas com

cicloheximida, droga que inibe a atividade peptidil transferase da subunidade 60S, bloqueando a tradução pela estabilização do complexo mRNA-ribossomo. Como esperado, a proteína rpS6 está presente em todas as frações do gradiente (Figura 58).



**Figura 58. Perfil de sedimentação da proteína rpS6 de epimastigotas em fase logarítmica de crescimento, tratadas com cicloheximida.** As posições das subunidades 40S e 60S, bem como o monômero 80S e polissomos estão indicados. Todas as frações do gradiente foram analisadas por *Western blot* com o soro contra a proteína rpS6.

Nos ensaios de dissociação de polissomos, o extrato foi tratado com puromicina, um análogo de tRNA que aborta a síntese protéica, desestabilizando o complexo mRNA-ribossomo. O perfil de dissociação foi obtido com êxito (Figura 59) e a proteína rpS6 foi detectada apenas nas frações com baixa densidade. Cabe aqui mencionarmos que as frações tratadas com puromicina não possuem polissomos, ou seja, as frações denominadas polissomal leve e polissomal pesada possuem esse nome apenas para fins comparativos com as frações equivalente de cicloheximida.



**Figura 59. Perfil de sedimentação da proteína rpS6 de epimastigotas em fase logarítmica de crescimento, tratadas com puromicina.** Todas as frações do gradiente foram analisadas por *Western blot* com o soro contra a proteína rpS6.

Os resultados aqui obtidos corroboram os dados da literatura que demonstram que rpS6 está presente em complexos pesados. Entretanto essa associação é dependente de polissomos, ou seja, de tradução ativa, pois o tratamento com puromicina mostrou que a proteína rpS6 não está associada aos polissomos.

Como descrito anteriormente, a atividade da proteína rpS6 é regulada por sua fosforilação. Uma das vias responsáveis por sua ativação resultando na sua fosforilação é a via TOR. Portanto, o nível de fosforilação da proteína rpS6 foi analisado de forma indireta, através de *Western blot* das frações obtidas em um gradiente de sacarose de parasitas cultivado em meio LIT sem soro fetal bovino, parasitas cultivados em meio LIT sem soro fetal bovino e tratados com rapamicina (10 µg/mL por 2 h) e epimastigotas sob estresse nutricional de 2h. Os resultados podem ser vistos na Figura 60.

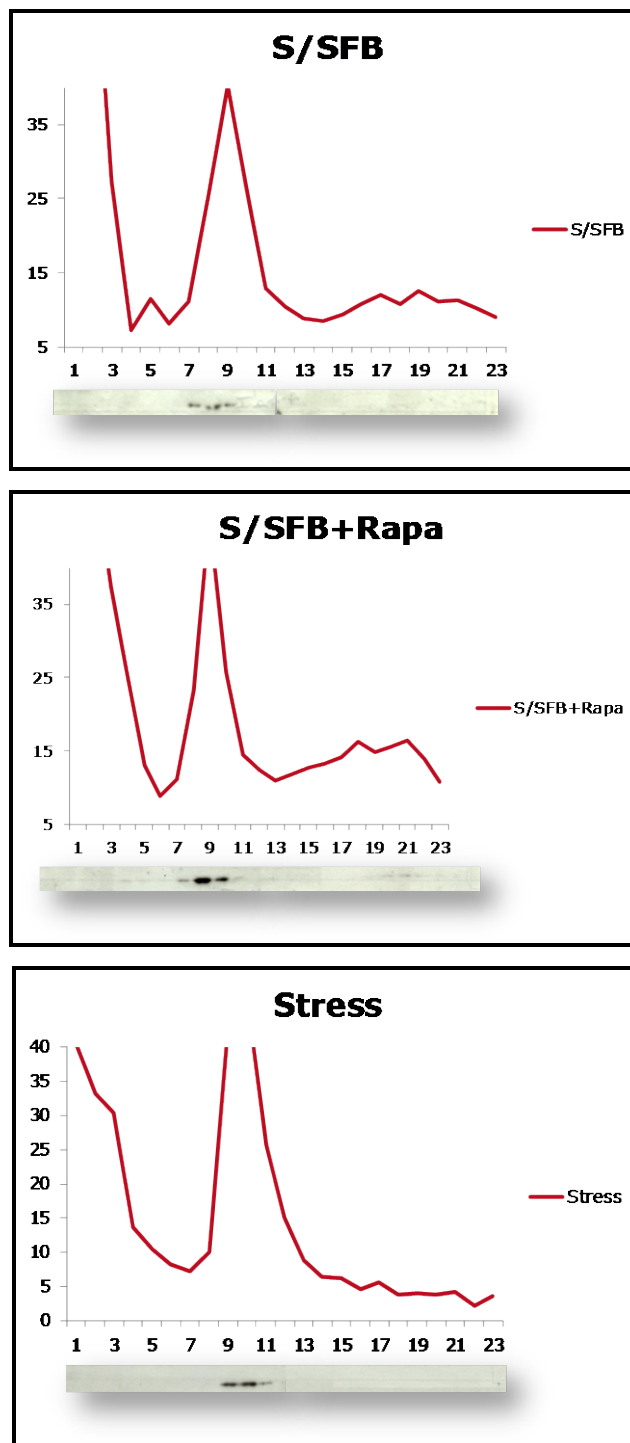
Os dados mostram que o perfil de sedimentação da proteína rpS6 em situações de estresse e tratamento com rapamicina possuem um deslocamento para as frações mais leves do gradiente devido à uma possível dissociação dos ribossomos das frações polissomais pesadas. Essa dissociação pode estar

relacionada com a inibição da via TOR, resultando no bloqueio da cascata de sinalização e conseqüentemente a não fosforilação da proteína rpS6.

É visível também que a proteína rpS6 acumulou-se nas frações leves no experimento de gradiente de epimastigotas cultivados em meio LIT sem soro fetal bovino, porém o sinal de detecção nessa condição é mais fraco quando comparado ao sinal nas outras condições. Com isso, é válido ressaltar que a fosforilação da proteína rpS6 pode estar sendo regulada em resposta à estresse ou tratamento com droga pois um acúmulo maior da proteína nas frações leves dos gradientes de epimastigotas tratados com rapamicina e sob estresse nutricional pode ser visualizado.

Essa relação entre parasitas tratados com rapamicina e sob estresse nutricional corroboram os dados de que a via TOR, um importante sensor nutricional, está intimamente relacionada com o processo de diferenciação. Dados anteriores deste trabalho evidenciaram que o tratamento com a droga pode causar um aumento do número de parasitas diferenciados obtidos no processo de metaciclogênese *in vitro*, uma situação em que a via TOR pode estar inibida e a taxa de tradução diminuída.

Entretanto, tratam-se de dados preliminares e uma maior investigação deve ser realizada. Experimentos de fosfoproteoma associados ao gradiente de sedimentação em gradiente de sacarose podem ser utilizados como ferramentas para melhor caracterizar essa condição de alteração no processo de tradução.



**Figura 60. Perfil de sedimentação da proteína rpS6.** A) Epimastigotas cultivados em meio LIT sem soro fetal bovino. B) Epimastigotas cultivados em meio LIT sem soro fetal bovino e tratados com rapamicina (10 µg/mL por 2 h). C) Epimastigotas sob estresse nutricional de 2 h. Todas as frações do gradiente foram analisadas por *Western blot* com o soro contra a proteína rpS6.

## 5. DISCUSSÃO

Genes homólogos de proteínas constituintes da via TOR têm sido descritos em diversos organismos como mamíferos (BROWN *et al.*, 1994), *Drosophila* (OLDHAM *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2000), *Caenorhabditis elegans* (LONG *et al.*, 2002), *Cryptococcus neoformans* (CRUZ *et al.*, 1999) e *Arabidopsis thaliana* (MENAND *et al.*, 2002), sugerindo que esta quinase se apresenta conservada evolutivamente. Através das respostas celulares induzidas pela rapamicina, vários alvos de TOR foram identificados em mamíferos, fornecendo um panorama dos diferentes processos em que ela está envolvida.

A quinase TOR de mamíferos, mTOR, pertence à subfamília das proteínas quinases relacionadas com PI3K que desempenha um papel central na regulação de diversos processos celulares, incluindo crescimento celular, apoptose, e metabolismo das células (SABATINI *et al.*, 2006). mTOR consiste de dois subcomplexos distintos, denominados mTOR complexo 1 (mTORC1) e 2 (mTORC2), que tem pequenas diferenças nas composições de subunidade, e funções fisiológicas (SABATINI *et al.*, 2006).

Sabe-se que mTORC1 ativa a síntese de proteínas, o transporte de nutrientes, a síntese lipídica, o crescimento celular, e outros processos, em resposta a vários estresses, incluindo fatores de crescimento, baixo consumo de energia e nutrientes. Além disso, funcionando como um sensor de nutrientes e de energia, mTORC1 regula negativamente a autofagia, um processo que é necessário para a sobrevivência de células sob a condição de fome (ZONCU *et al.*, 2011). Mais especificamente, sob condições desfavoráveis de nutrientes (estado de baixa energia), incluindo soro ou baixa concentração de glicose, a atividade quinase de mTORC1 é mantida baixa, e o metabolismo celular e crescimento são, portanto, contidos em níveis basais. Quando as células são deslocadas para um ambiente mais favorável (estado de alta energia), a sinalização mTORC1 é ativada para estimular o metabolismo celular e o crescimento celular (ZONCU *et al.*, 2011; SENGUPTA *et al.*, 2010). O complexo mTORC1 exerce suas funções reguladoras em parte através da fosforilação de alvos a jusante, como duas proteínas alvo bem caracterizados S6K (p70 S6 ribossômica quinase)

e 4E-BP1 (uma proteína de ligação ao fator de início de tradução eucariótico eIF4E). No entanto, as funções do complexo mTORC2 estão envolvidas com a ativação de Akt e SGK1 quinase, fosforilando o motivo hidrofóbico de Akt na Ser473 e SGK1 (soro/glicocorticóide quinase regulada 1) na Ser422, levando à ativação completa de Akt e SGK1 quinase (ZONCU *et al.*, 2011). Além disso, mTORC2 medeia a organização do citoesqueleto de actina, desempenhando assim um papel crítico na motilidade de células tumorais, invasão e metástase (ZHOU *et al.*, 2010). No entanto, dado o papel fundamental das quinases mTOR em controlar o destino da célula, permanece em grande parte desconhecido como a ativação da atividade quinase mTOR é regulada *in vivo*.

Muitos inibidores de mTOR têm sido desenvolvidos e estão sendo testados em ensaios clínicos no combate a vários tipos de câncer humano (BENJAMIN *et al.*, 2011). No entanto, os resultados obtidos nestes ensaios para alguns destes inibidores não foram favoráveis devido, em parte, aos mecanismos regulatórios complexos envolvidos com a sinalização da via mTOR. Assim, uma melhor compreensão de como a atividade de mTOR é regulada pela rede de sinalização na fisiologia normal bem como em várias condições, fornecerá idéias sobre uma melhor intervenção clínica com inibidores de mTOR. O grupo liderado pelo Dr. David Sabatini encontrou, recentemente, um inibidor de mTOR denominado DEPTOR, que é superexpresso em células de mieloma múltiplo e necessário para a sua sobrevivência (PETERSON *et al.*, 2009). Mais recentemente, outros dois grupos relataram independentemente que a estabilidade de DEPTOR é governada por SCF <sup>$\beta$ -TRCP</sup> (proteína contendo repetições de  $\beta$ -transducina), uma ubiquitina ligase E3 (DUAN *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2012).

Em 2008, o grupo do Dr. Miguel Navarro caracterizou duas quinases envolvidas na via TOR de *Trypanosoma brucei* (TbTOR1 e TbTOR2), bem como as proteínas participantes em cada tipo de complexo. As funções clássicas dessas proteínas quinases, bem como dos complexos que participam, foram descritas e um novo modelo de estudo dessa via surgiu (BARQUILLA *et al.*, 2008). No estudo desse grupo, os resultados obtidos mostraram que TbTOR1 controla positivamente o crescimento das células em tripanossomatídeos através da sinalização feita pelo complexo TORC1. Foi demonstrado também que as funções básicas desse complexo são conservadas em *T. brucei* e que

as células com baixos níveis da proteína TbTOR1 fazem com que haja marcação nucleolar de RNA pol I, inibição da síntese protéica e redução do tamanho celular, como mostrado em outros organismos. Já TbTOR2 parece agir exclusivamente por meio de sinalização TORC2. Células com baixo nível proteico de TbTOR2 não são capazes de separar corretamente suas organelas durante a citocinese e portanto, resultando em células arredondadas, com agregados nucleares e múltiplas organelas. O RNAi de TbTOR2/TbAVO3 produz um fenótipo de alargamento da bolsa flagelar resultando na alteração de processos endocíticos feitos por esse parasita. Portanto, assim como em leveduras e mamíferos, os resultados sugerem fortemente que TbTOR2 controla a organização do citoesqueleto de actina e a endocitose através da sinalização de TORC2 (BARQUILLA *et al.*, 2008).

Em um estudo mais recente, o mesmo grupo descreveu uma nova TOR quinase, chamada TOR4, que regula negativamente a diferenciação da forma infectante proliferativa (*slender bloodstream form*) para a forma sanguínea não replicativa (*stumpy bloodstream form*). O ciclo de vida do *Trypanosoma brucei* é complexo e oferece um excelente sistema modelo para entender as vias de sinalização que regulam o desenvolvimento. Em contraste com a perda de função de TOR1 onde observa-se redução da capacidade de proliferação celular a inativação de TOR4 promove um estado quiescente irreversível do parasita. TOR4 governa uma via de sinalização distinta daquelas controladas pelos complexos TOR convencionais, TORC1 TORC2. A depleção de TOR4 induz todas as características bem conhecidas da fase estacionária de desenvolvimento de tripanossomas, incluindo a expressão de DAP (proteínas associadas à diferenciação), proteínas de superfície e sub-regulação da transcrição do gene da VSG (variante da glicoproteína de superfície) (SALDIVIA *et al.*, 2013). TOR4 quinase forma um complexo estrutural e funcionalmente distinto chamado TORC4, associação de TOR4 com LST8 (letal sec13 proteína 8) e outros fatores que provavelmente servem como suporte para esta quinase.

A pesquisa em tripanossomatídeos, protozoários parasitas que divergiram cedo da árvore eucariótica durante a evolução, pode ajudar a descobrir novas funções de quinases TOR.



Assim, nosso objetivo foi investigar a existência da via TOR em *T. cruzi* por meio da identificação *in silico* de genes relacionados, bem como, estudar o envolvimento dos componentes da via TOR em fenômenos como crescimento celular e diferenciação celular (metaciclologênese), já que tais eventos estão diretamente ligados à disponibilidade de nutrientes e fatores de crescimento. Os resultados obtidos até agora apontam a existência de via TOR em *T. cruzi*. Entretanto, o grau de semelhança que essa via teria com a de outros organismos mais estudados permanece a ser determinado. Este estudo mostra que as principais quinases da via estão presentes no genoma do parasita, sendo elas: TOR1, TOR2, TOR-like1 e TOR-like2. Através de inserção de uma etiqueta na porção 3' do gene das principais proteínas envolvidas na formação dos complexos TORC1 e TORC2 será possível descrever a função destas proteínas de maneira mais sólida e robusta. Até o momento, apenas para o gene de TOR1 essa metodologia foi aplicada com sucesso. Os parasitas transfectantes foram submetidos à análise por espectrometria de massas e os resultados nos darão indícios das associações que essa quinase faz com outras proteínas, inclusive com as descritas em outros organismos. Futuramente, pretendemos avaliar a dinâmica de interação dessa proteína em resposta ao estresse nutricional e ao tratamento com a droga rapamicina.

Como descrito nos resultados, embora tendo usado várias estratégias para a obtenção de anticorpos contra as proteínas da via TOR em *T. cruzi*, apenas o anticorpo policlonal obtido contra a proteína FKBP12 foi específico. Sendo assim, a proteína FKBP12 de *T. cruzi* se tornou objeto do nosso estudo, uma vez que é necessária a interação desta proteína com a rapamicina para que essa droga possa inibir os efeitos das quinases TOR sobre diversos alvos.

O domínio FKBP apresenta 108 aminoácidos e é responsável tanto pela atividade de PPlase quanto de ligação à FK506 (KANG *et al.*, 2008). As proteínas FKBP51 e FKBP52 de humano apresentam dois domínios FKBP em tandem; o domínio N-terminal possui a atividade de PPlase e pode se ligar às drogas FK506 e rapamicina, enquanto o domínio C-terminal é responsável pela interação com outras proteínas como a chaperona HSP90 e receptores esteróides. Há fortes evidências que a interação da FKBP52 com os receptores esteróides requer o domínio TPR (DAVIES e SÁNCHEZ, 2005). O domínio de interação proteína - proteína (TPR) auxilia na modulação da atividade das

proteínas e serve como sítio de ligação para chaperonas, como Hsp90 (DAVIES e SÁNCHEZ, 2005; BARIK, 2006; KANG *et al*, 2008).

O fato das FKBP se ligarem a diferentes proteínas na célula cria um amplo espectro de alvos celulares para as drogas FK506 e rapamicina. As FKBP localizadas em diferentes compartimentos celulares podem estar sob o controle dessas drogas que influenciam processos de crescimento e proliferação celular (GALAT, 2008).

O complexo formado entre FKBP e a droga reforça a estabilidade da proteína, sendo mais resistente à clivagem proteolítica, e cria uma superfície para a ligação com a calcineurina e a quinase TOR. Estudos revelaram que na ausência de FK506, a FKBP12 liga-se a alvos celulares, tais como os receptores rianodina (RyRs), os quais são um dos principais canais de liberação de  $Ca^{+2}$  no retículo sarcoplasmático de células do miocárdio, músculo estriado. A ligação das FKBP com FK506 ou rapamicina provoca um vazamento de  $Ca^{+2}$  em células endoteliais isoladas e induz a liberação de  $Ca^{+2}$  intracelular que pode contribuir para a patogênese da disfunção endotelial e hipertensão (KANG *et al*, 2008).

Estudos recentes têm demonstrado o papel das FKBP na regeneração nervosa. Nos neurônios, os níveis de FKBP12 e FKBP52 estão elevados e um aumento da FKBP12 é verificado nas áreas de patologia em doenças neurodegenerativas. Esses estudos podem fornecer importantes pistas terapêuticas para o tratamento de doenças neurodegenerativas que atualmente afetam o envelhecimento da população humana, tais como Alzheimer e Parkinson (revisto por BARIK, 2006).

O genoma de *E. coli* apresenta quatro FKBP cujas massas variam de 16 a 29 kDa (GALAT, 2000). A extremidade N-terminal da EcFKBP29 exibe atividade de chaperona enquanto a extremidade C-terminal apresenta atividade de PPIase e se liga à FK506 (BARIK, 2006). O domínio FKBP de EcFKBP16 é altamente hidrofóbico sugerindo que esta proteína esteja associada à membrana (GALAT, 2000).

O número de proteínas da família FKBP presente em *Arabidopsis thaliana* é muito maior em comparação a outros organismos. Enquanto *S. cerevisiae* possui quatro FKBP, *Caenorhabditis elegans* oito e *Homo sapiens* 11, *A. thaliana* apresenta 23 FKBP. Dentre as 23 proteínas, sete contêm um

domínio FKBP flanqueado por um domínio N-terminal de ligação ao ribossomo e um C-terminal de ligação a chaperona (GEISLER e BAILLY, 2007). As outras proteínas podem conter de três a quatro domínios FKBP's seguidos de domínios TPR's e de ligação a calmodulina (BREIMAN e CAMUS, 2002).

Em *T. brucei*, Brasseur e colaboradores (2009) identificaram quatro FKBP's (FKBP11, FKBP12, FKBP21 e FKBP47) e por ensaios de interferência de RNA, mostraram que apenas a proteína TbFKBP12 era essencial ao parasita. Mais recentemente, o mesmo grupo demonstrou que esta proteína localiza-se exclusivamente na bolsa flagelar e está envolvida no processo de diferenciação do parasita, através da interação com proteínas do citoesqueleto (BRASSEUR *et al.*, 2012).

O sequenciamento do genoma de *T. cruzi* (EL-SAYED *ET AL.*, 2005) permitiu que se identificasse o número de genes codificadores de PPlases deste organismo. *T. cruzi* tem 14 genes codificadores de ciclofilinas, 5 genes codificadores de FKPB's e 2 genes que codificam parvulinas. Além dos domínios de PPlase que todas possuem, duas delas possuem um domínio TPR, uma apresenta um domínio WD40, e uma um domínio RRM; os dois primeiros domínios envolvidos com interações proteína-proteína e o último interação com RNA.

POTENZA *et al.*, (2006) descreveram a família das ciclofilinas de *T. cruzi* e identificaram algumas delas por espectrometria de massas. As duas parvulinas de *T. cruzi* estão sendo estudadas pelo grupo de Esteban (ERBEN *et al.*, 2007). Até o presente não há relatos na literatura sobre a caracterização da família das FKBP's em dois tripanossomatídeos de relevância para a saúde humana (*T. cruzi* e *L. major*).

Muitas FKBP's possuem localização intracelular determinada, como citoplasma, núcleo e retículo endoplasmático (BARIK, 2006). A proteína FKBP35 de *Plasmodium falciparum*, por exemplo, é expressa predominantemente no citosol de eritrócitos durante todo o ciclo de vida, enquanto nas formas trofozoíto e esquizonte foi observada significativa quantidade da proteína no núcleo (MONAGHAN e BELL, 2005). A FKBP12 de *S. cerevisiae* é encontrada no citoplasma e a FKBP60 no núcleo (DOLINSKI, 1997).

Uma pesquisa de proteínas de levedura que interagem com FKBP12 no sistema de duplo híbrido identificou a enzima Aspartoquinase (AK) como uma parceira de ligação de FKBP12 (ARÉVOLO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2004). AK catalisa a primeira reação na conversão de ácido aspártico no aminoácido homoserina, um ponto de ramificação na síntese de treonina e metionina. Estudos de Alarcon e Heitman (ALARCON *et al.*, 1997) sugerem que FKBP12 influencia na inibição do *feedback* de AK por treonina, o principal ponto de controle da via de aspartato (ARÉVOLO-RODRÍGUEZ *et al.*, 1999; MARTIN-RENDON *et al.*, 1993). Portanto resultados indicam que FKBP12 é um componente fundamental que norteia o fluxo metabólico através da cascata biossintética de homoserina. No mapa metabólico de glicina, serina e treonina (ANEXO IV) é possível ver uma quinase (TcCLB.509167.150), identificada como parceira de FKBP12 através de imunoprecipitação, como participante dessa via de síntese de treonina.

Mais recentemente, identificou-se em leveduras a associação da proteína FPR1 (FKBP12 em mamíferos) com a proteína Hmo1, também conservada em humanos (DOLINSKI *et al.*, 1999). Hmo1 é uma proteína nuclear que funciona como estabilizante da estrutura da cromatina e de manutenção de plasmídeo (LU *et al.*, 1996) e como fator de uma RNA polimerase I (GADAL *et al.*, 2002).

Mediante o exposto, fica evidente que as proteínas da família FKBP apresentam funções variadas e estão envolvidas em diversos processos celulares dependendo de sua localização e interação com diferentes parceiros funcionais. Baseados nestas informações, procuramos neste trabalho, submeter o parasita *T. cruzi* ao tratamento com diferentes concentrações da droga rapamicina e ao estresse nutricional, buscando identificar proteínas associadas que pudessem indicar uma possível função da FKBP12 e sua interação com a via TOR neste parasita.

A imunolocalização da proteína FKBP12 de *T. cruzi* demonstrou que ela está presente no núcleo em todas as etapas do ciclo de vida (Figura 23) e que o tratamento com rapamicina não altera a sua localização (Figura 24).

Através dos experimentos de cromatografia de gel filtração foi possível demonstrar que esta proteína está presente em complexos proteicos de alto peso molecular (Figura 25). Os dados de espectrometria de massas dos

complexos proteicos que contém a proteína FKBP12, obtidos por ensaios de imunoprecipitação, apontam algumas possíveis associações com proteínas de interação ao DNA, como histonas, proteínas envolvidas na manutenção do cromossomo e da sua segregação, eventos que são importantes e necessitam de enzimas com a atividade de transferases. Os dados ainda mostram a associação dessa proteína com outras pertencentes à processos de ligação e estabilização do mRNA, bem como do seu transporte. A associação da proteína FKBP12 com proteínas ribossomais também foi observada, pois o fato da proteína estar presente em complexos de alto peso molecular e dos dados de proteômica mostrarem a presença de várias proteínas ribossomais, sugerem uma possível participação desta proteína na biossíntese das subunidades ribossomais no núcleo.

Entretanto, não observamos uma associação direta da proteína FKBP12 com as proteínas da via TOR após o tratamento com rapamicina, nem tampouco quando o parasita foi submetido a estresse nutricional. Isso pode ser justificado pelo emprego de uma metodologia de lise muito estridente. Possivelmente as ligações e interações entre a FKBP12 e as quinases da via TOR seja muito dinâmica, fato que é visualizado com outras proteínas de ligação ao mRNA. O uso de fixadores pode ser uma saída para o congelamento do complexo proteico e posterior isolamento através de imunoprecipitação. Além disso, nas análises de ontologia gênica (GO), pouca diferença foi encontrada entre os parceiros funcionais de FKBP12 em respeito a função molecular, envolvimento em processos biológicos e localização celular, nas diferentes condições. A maior diferença foi observada na condição de tratamento com rapamicina (5 µg/mL), com a classificação de acordo com o processo biológico, onde a principal alteração é a diminuição de proteínas identificadas envolvidas com a tradução.

Embora a associação direta com os componentes da via TOR não tenha sido caracterizada, observamos que a proteína FKBP12 interage com a proteína quinase (TcCLB.506007.40) que por sua vez inibe o complexo TSC1/TSC2 que está envolvido na regulação do complexo TOR. O mapa metabólico pode ser visto no Anexo V.

A via TOR vem sendo apontada como uma das principais vias de regulação do início da tradução bem como um importante regulador do

tamanho celular. Células de *Drosophila* contendo o gene dTOR não funcional são aproximadamente quatro vezes menores que as selvagens (GAO *et al.*, 2002; OLDHAM *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2000). Resultado parecido é visto em células de mamíferos tratadas com rapamicina, em que seu tamanho se reduz sensivelmente (FINGAR *et al.*, 2002; INOKI *et al.*, 2003). Mediando tais eventos, a quinase S6K tem sido descrita como o principal alvo de TOR na regulação do tamanho celular.

Experimentos prévios do nosso grupo demonstraram que parasitas tratados com rapamicina e parasitas submetidos a estresse nutricional apresentavam uma diminuição global da tradução quando comparados a parasitas não tratados (Anexo III - marcação metabólica). Assim, paralelamente aos experimentos de caracterização da proteína FKBP12 e seu possível envolvimento com a via TOR em *T. cruzi*, procuramos investigar se a fosforilação da proteína ribossomal S6 (rpS6), outro alvo bem caracterizado desta via em vários eucariotos, também poderia estar sendo modulada em decorrência do tratamento com rapamicina, buscando mais evidências da presença da via TOR neste parasita.

Em vários organismos onde a via já é bem caracterizada, como é o caso de mamíferos, leveduras e mais recentemente *T. brucei*, a fosforilação do complexo protéico citoplasmático contendo a proteína TOR1 (TORC1) em resposta a vários estímulos ambientais, culmina na fosforilação da rpS6, uma etapa importante para montagem do ribossomo 80S e conseqüentemente para que o processo de tradução seja efetivo (MEYUHAS *et al.*, 2009).

RpS6 é um componente da subunidade 40S e é a maior fosfoproteína do ribossomo, contendo cinco resíduos de serina que são fosforilados. Ribossomos contendo alto grau de fosforilação de rpS6 têm uma vantagem no isolamento em polissomas, embora a fosforilação de RpS6 por si só não seja suficiente para formação do polissomo (MEYUHAS *et al.*, 2000). A fosforilação de rpS6 está correlacionada fortemente com o aumento da tradução na célula, particularmente de mensageiros TOP (que contêm uma região 5' oligopirimidina terminal). TOP mRNAs codificam pró-proteínas envolvidas no crescimento celular, progressão do ciclo celular e maquinaria de tradução, incluindo todas as proteínas ribossomais e os fatores de alongamento.

No entanto, trabalhos recentes questionaram o papel da fosforilação de rpS6 na tradução dos mensageiros TOP em questão (PENDE, *et al.*, 2004; RUVINSKY, *et al.*, 2005; STOLOVICH *et al.*, 2002), uma vez que o bloqueio da fosforilação de rpS6 não conduz a uma redução dos mensageiros TOP. Até o momento o papel da fosforilação de rpS6 permanece desconhecido, e uma compreensão da função de rpS6 está longe de terminar. RpS6 podem ter papéis distintos daquelas como parte estrutural do ribossoma, como mostrado em células mutantes para rpS6 de *Drosophila* que desenvolveram tumores melanóticos nas glândulas linfáticas (LAMBERTSSON, 1998), e RpS6 é encontrado em uma forma livre, fosforilável no núcleo de células de mamíferos.

Nosso trabalho demonstrou que o tratamento dos parasitas com rapamicina e o estresse nutricional causam uma redução significativa dos polissomos e o deslocamento da proteína rpS6 das frações pesadas para as frações mais leves do gradiente de sacarose (Figura 59), indicando uma possível inibição da via TOR e conseqüentemente uma redução da fosforilação de rpS6 e da tradução.

Esses dados ainda precisam ser melhor avaliados, mas a correlação com o experimento de marcação metabólica corrobora os dados obtidos no experimento de isolamento de polissomos. Uma situação também essencial que precisa ser melhor estudada é a relação entre a diminuição da taxa de tradução e o desencadeamento do processo de diferenciação do parasita. Esses dois processos podem estar ligados devido à uma possível inibição da via TOR, reprimindo a cascata de fosforilação que tem como alvo a proteína ribossomal rpS6 causando uma alteração fisiológica e conseqüentemente a reprogramação genética do parasita.

Além disso, foi mostrado que mesmo estando em meio propício ao crescimento, epimastigotas tratados com doses medianas de rapamicina (próximos do IC<sub>50</sub>) tem seu crescimento reduzido e diferenciação para tripomastigota metacíclico estimulada. Esses dados conectam os efeitos da rapamicina à disponibilidade nutricional percebida pelo *T. cruzi*, que em outros organismos têm na via TOR um dos principais representantes de sensor nutricional.

## 6. CONCLUSÕES

- ✓ Foi confirmada, através de análises *in silico*, a presença dos genes da via TOR em *Trypanosoma cruzi*.
- ✓ Foi mostrado que mesmo estando em meio propício ao crescimento, epimastigotas tratados com doses medianas de rapamicina (próximos do IC<sub>50</sub>) tem seu desenvolvimento retardado e diferenciação para tripomastigota metacíclico estimulada, com fortes indícios de ocorrência de autofagia, conforme as imagens de ultra-estrutura sugerem.
- ✓ A proteína TOR1 de *Trypanosoma cruzi* foi identificada e localizada no citoplasma do parasita através de fusão C-terminal ao tag FLAG a nível genômico.
- ✓ A proteína FKBP12 de *Trypanosoma cruzi* foi identificada, não é regulada durante o ciclo de vida e está presente no núcleo do parasita.
- ✓ Não há mudança da localização da proteína FKBP12 de *Trypanosoma cruzi* em resposta ao tratamento com rapamicina (IC<sub>50</sub>=10 µg/mL).
- ✓ A proteína FKBP12 de *Trypanosoma cruzi* está presente em complexos de alto peso molecular.
- ✓ Ensaios de imunoprecipitação seguido de espectrometria de massas de epimastigotas em fase logarítmica de crescimento cultivados em meio LIT, epimastigotas cultivados em meio LIT sem SFB, epimastigotas sob estresse nutricional de 2 h e epimastigotas sob tratamento com rapamicina (5 µg/mL e 10 µg/mL) por 2 e 24 h, evidenciaram a presença de proteínas de interação ao DNA, como histonas, proteínas envolvidas na manutenção do cromossomo e da sua segregação, eventos que são importantes e necessitam de enzimas com a atividade de transferases. Os dados ainda mostram a associação dessa proteína com outras pertencentes à processos de ligação e estabilização do mRNA, bem como do seu transporte. A associação da proteína FKBP12 com proteínas ribossomais também foi observada.
- ✓ A proteína rpS6 de *Trypanosoma cruzi* foi identificada e é regulada durante o ciclo de vida do parasita.
- ✓ Foi evidenciado que as condições de estresse nutricional por 2 h e tratamento com rapamicina (10 µg/mL por 2 h) causam uma redução



significativa dos polissomos e o deslocamento da proteína rpS6 das frações pesadas para as frações mais leves do gradiente de sacarose, indicando uma possível inibição da via TOR e conseqüentemente uma redução da fosforilação de rpS6 e da tradução.

## 7. PERSPECTIVAS

Os resultados aqui obtidos abrem várias perspectivas para o estudo da via TOR em *T. cruzi*, uma vez que ainda gera perguntas: será que existem complexos distintos de TOR? Qual a composição proteica desses complexos? Se existirem complexos distintos de TOR, qual deles é sensível à rapamicina? A proteína FKBP12 está relacionada com a inibição da via TOR por rapamicina? A via TOR está envolvida na cascata de sinalização que culmina na fosforilação da proteína rpS6 como em outros eucariotos? A via TOR está diretamente ligada ao processo de diferenciação de *T. cruzi*?

Dessa maneira, algumas perspectivas parecem interessantes na busca de tais respostas como:

- ✓ Obtenção de linhagens transfectantes para os genes TOR2, TOR-like1, TOR-like2, Raptor e AVO3 fusionados à etiqueta C-terminal FLAG em nível genômico.
- ✓ Localização das proteínas TOR2, TOR-like1, TOR-like2, Raptor e AVO3 no parasita.
- ✓ Ensaios de imunoprecipitação em condições de estresse nutricional e sob tratamento com rapamicina e posterior análise em espectrometria de massas do conteúdo proteico em que os principais componentes da via TOR estão presentes.
- ✓ Nocaute das principais quinases da via TOR (TOR1 e TOR2) e avaliação das mudanças morfológicas e fisiológicas do parasita.
- ✓ Validação dos dados de proteômica envolvendo a proteína FKBP12 de *T. cruzi* utilizando o transfectante desenvolvido neste trabalho.
- ✓ Confirmação do nocaute do primeiro alelo do gene para a proteína FKBP12 de *T. cruzi* e realização do nocaute do segundo alelo.
- ✓ Análise de modificações pós-traducionais (fosforilação) por espectrometria de massas da proteína rpS6 após isolamento das frações leves do gradiente de sacarose nas condições de estresse nutricional e sob tratamento com rapamicina.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELIOVICH, H., KLIONSKY, D. J. **Autophagy in yeast: mechanistic insights and physiological function.** Microbiol. Mol. Biol. Rev. 65:463-479, 2001.

ABRAHAM, R. T., AND WIEDERRECHT, G. J. **Immunopharmacology of rapamycin.** Annu. Rev. Immunol. 14:483–510, 1996.

ALARCON, C. M., HEITMAN, J. **FKBP12 physically and functionally interacts with aspartokinase in *Saccharomyces cerevisiae*.** Mol. Cell Biol. 17: 5968-5975, 1997.

ALBUQUERQUE-CUNHA, J. M., GONZALEZ, M. S., GARCIA, E. S., MELLO, C. B., AZAMBUJA, P., ALMEIDA, J. C., DE SOUZA, W., NOGUEIRA, N. F. **Cytochemical characterization of microvillar and perimicrovillar membranes in the posterior midgut epithelium of *Rhodnius prolixus*.** Arthropod. Struct. Dev. Jun 12, 2008.

ALMEIDA-DE-FARIA, M.; FREYMÜLLER, E.; COLLI, W.; ALVES, M. J. M. ***Trypanosoma cruzi*: Characterization of an intracellular epimastigote-like Form.** Exp. Parasitology, 92:263–274, 1999.

ALVES, C. R., ALBUQUERQUE-CUNHA, J. M., MELLO, C. B., GARCIA, E. S., NOGUEIRA, N. F., BOURGUINGNON, S. C., DE SOUZA W., AZAMBUJA, P., GONZALEZ, M. S. ***Trypanosoma cruzi*: attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*.** Exp Parasitol. 116(1):44-52, 2007.

ANDERSON A. M., CARTER K. W., ANDERSON D., WISE M. J. **Coexpression of Nuclear Receptors and Histone Methylation Modifying Genes in the Testis: Implications for Endocrine Disruptor Modes of Action.** PLoS One. 2012; 7(4): e34158.

ARÉVOLO-RODRIGUEZ, M., CALDÉRON, I. L., HOLMBERG, S. **Mutations that cause threonine sensitivity identify catalytic and regulatory regions of the aspartate kinase of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Yeast*. 15:1331-1345, 1999.

ARÉVOLO-RODRIGUEZ, M., PAN, X., BOEKE, J. D., HEITMAN, J. **FKBP12 controls aspartate pathway flux in *Saccharomyces cerevisiae* to prevent toxic intermediate accumulation.** *Eukaryot Cell*. 3:1287-1296, 2004.

AVILA, A. R.; YAMADA-OGATTA, S. F.; DA SILVA MONTEIRO, V.; KRIEGER, M. A.; NAKAMURA, C. V.; DE SOUZA, W.; GOLDENBERG, S. **Cloning and characterization of the metacyclogenin gene, which is specifically expressed during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis.** *Mol. Biochem. Parasitol.*, 117(2), 169-77, 2001.

AYMERICH, S.; GOLDENBERG, S. **The karyotype of *Trypanosoma cruzi* Dm28c: comparison with other *T. cruzi* strains and trypanosomatids.** *Exp. Parasitol.*, 69, 107-115, 1989.

AZPIAZU, I., SALTIEL, A. R., DEPAOLI-ROACH, A. A., AND LAWRENCE, J. C. **Regulation of both glycogen synthase and PHAS-I by insulin in rat skeletal muscle involves mitogen-activated protein kinase-independent and rapamycin-sensitive pathways.** *J. Biol. Chem.* 271:5033–5039, 1996.

BARBET, N. C., SCHNEIDER, U., HELLIWELL, S. B., STANSFIELD, I., TUIITE, M. F., AND HALL, M. N. **TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast.** *Mol. Biol. Cell* 7:25–42, 1996.

BARIK, S. **Imunophilins: for the love of proteins.** *Cell Mol Life Sci*, v. 63, p. 2889-2900, 2006.

BARQUILLA, A., CRESPO, J. L., AND NAVARRO, M. **Rapamycin inhibits trypanosome cell growth by preventing TOR complex 2 formation.** *PNAS* 105 (38):14579-14584, 2008.

BARQUILLA, A., NAVARRO, M. **Trypanosome TOR complex 2 functions in cytokinesis.** Cell Cycle. 8:697-699, 2009.

BECK, T., SCHMIDT, A., AND HALL, M. N. **Starvation induces vacuolar targeting and degradation of the tryptophan permease in yeast.** J. Cell Biol. 146:1227–1238, 1999.

BEGUM, N., AND RAGOLIA, L. **cAMP counter-regulates insulin-mediated protein phosphatase-2A inactivation in rat skeletal muscle cells.** J. Biol. Chem. 271:31166–31171, 1996.

BELL, A.; MONAGHAN, P.; PAGE, A. P. **Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases (immunophilins) and their roles in parasite biochemistry, host-parasite interaction and antiparasitic drug action.** Int J Parasitol 36, 261-276, 2006.

BENJAMIN, D., COLOMBI, M., MORONI, C., HALL, M. N. **Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors.** Nature reviews Drug Discovery. 10:868-880, 2011.

BERETTA, L., GINGRAS, A. C., SVITKIN, Y. V., HALL, M. N., AND SONENBERG, N. **Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits capdependent initiation of translation.** EMBO J. 15:658–664, 1996.

BEUGNET, A., WANG, X., AND PROUD, C. G. **Target of rapamycin (TOR)-signaling and RAIP motifs play distinct roles in the mammalian. TOR dependent phosphorylation of initiation factor 4E-binding protein 1.** J. Biol. Chem. 278:40717–40722, 2003.

BLACKBURN, E. H.; CHALLONER, P. B. **Identification of a telomeric DNA sequence in *Trypanosoma brucei*.** Cell, 36(2), 447-57, 1984.

BLOMMAART, E. F., LUIKEN, J. J., BLOMMAART, P. J., VAN WOERKOM, G. M., AND MEIJER, A. J. **Phosphorylation of ribosomal protein S6 is**

**inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes.** J. Biol. Chem. 270:2320–2326, 1995.

**BRASSEUR, A. Study of the TOR pathway components: characterization of TbFKBP12, a protein from the PPlases family (isomerases) involved in flagellum homeostasis in *Trypanosoma brucei*.** 233 f. Tese (Doutorado em Ciências) Université Libre de Bruxelles, Bruxelles, 2009.

**BRASSEUR A., ROTUREAU B., VERMEERSCH M., BLISNICK T., SALMON D., BASTIN P., PAYS E., VANHAMME L., PÉREZ-MORGA D. *Trypanosoma brucei* FKBP12 differentially controls motility and cytokinesis in procyclic and bloodstream forms.** Eucarioty cell. 12(2); 168-181, 2013.

**BODINE, S. C., STITT, T. N., GONZALEZ, M., KLINE, W. O., STOVER, G. L., BAUERLEIN, R., ZLOTCHENKO, E., SERIMGEOUR, A., LAWRENCE, J. C., GLASS, D. J., AND YANCOPOULOS, G. D. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo.** Nat. Cell Biol. 3:1014–1019, 2001.

**BREIMAN, A.; CAMUS, I. The involvement of mammalian and plant FK506-binding proteins (FKBPs) in development.** Transgenic Research, v. 11, p. 321–335, 2002.

**BONALDO, M. C., SOUTO-PADRON, T., DE SOUZA, W., GOLDENBERG, S. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation.** J Cell Biol. 106(4):1349-58, 1988.

**BOOTHROYD, J.C.; GROSS, G.A. Transcripts coding variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* have a short, identical exon at their 5´end.** Gene. v. 20, p. 281-289. 1982.

**BORST, P. Discontinuous transcription and antigenic variation in trypanosomes.** Annu Ver Biochem., 55, 701-32, 1986.

BREIMAN, A.; CAMUS, I. **The involvement of mammalian and plant FK506-binding proteins (FKBPs) in development.** Transgenic Research. 11:321–335, 2002.

BRISSE, S.; HENRIKSSON, J.; BARNABE, C.; DOUZERY, E. J.; BERKVEN, D.; SERRANO, M.; DE CARVALHO, M. R.; BUCK, G. A.; DUJARDIN, J. C.; TIBAYRENC, M. **Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype.** Infect. Genet. Evol. 2:173-83, 2003.

BROWN, E. J., ALBERS, M. W., SHIN, T. B., ICHIKAWA, K., KEITH, C. T., LANE, W. S., AND SCHREIBER, S. L. **A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycinreceptor complex.** Nature. 369:756–758, 1994.

BROWN, E. J., BEAL, P. A., KEITH, C. T., CHEN, J., SHIN, T. B., AND SCHREIBER, S. L. **Control of p70 s6 kinase by kinase activity of FRAP in vivo.** Nature. 377:441–446, 1995.

BRUNN, G. J., HUDSON, C. C., SEKULIC, A., WILLIAMS, J. M., HOSOI H., HOUGHTON P. J., LAWRENCE, JR., J. C., AND ABRAHAM, R. T. **Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin.** Science. 277:99–101, 1997.

BURNETT, P. E., BARROW, R. K., COHEN, N. A., SYNDER, S. H., AND SABATINI, D. M. **AFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95:1432–1437, 1998.

BURTNER, C. R., KENNEDY, B. K. **Progeria syndromes and ageing: what is the connection?** Nature reviews. Molecular Cell Biology. 11:567-578, 2010.

CAMPBELL, D.A.; THOMAS, S.; STURM, N.R. **Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal?** Microbes and Infection. 5:1231–1240. 2003.

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

CARDENAS, M. E., CUTLER, N. S., LORENZ, M. C., DI COMO, C. J., AND HEITMAN, J. **The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients.** Genes Dev. 13:3271–3279, 1999.

CARO, F., BERCOVICH, N., ATORRASAGASTI, C., LEVIN, M.J., VÁZQUEZ, M.P. ***Trypanosoma cruzi*: analysis of the complete PUF RNA-binding protein family.** Exp Parasitol. 113:112-124, 2006.

CHAGAS, C. **Nova tripanosomiase humana. Estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.g.,n.sp., agente etiológico de nova entidade morbida no homem.** Mem. Inst. Oswaldo cruz 1:159-218, 1909.

CHEN, C.Y.; SHYU, A.B. **AU-rich elements: Characterization and importance in mRNA degradation.** Trends Biochem. Sci. v. 20, p. 465–470. 1995.

CHOI, J. H., ADAMES, N. R., CHAN, T. F., ZENG, C., COOPER, J. A., AND ZHENG, X. F. **TOR signaling regulates microtubule structure and function.** Curr. Biol. 10:861–864,2000.

CHOI, J. H., BERTRAM, P. G., DRENAN, R., CARVALHO, J., ZHOU, H. H., AND ZHENG, X. F. **The FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) is a CLIP-170 kinase.** EMBO Rep. 3:988–994, 2002.

CHUNG, J., KUO, C. J., CRABTREE, G. R., AND BLENIS, J. **Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases.** Cell 69:1227–1236, 1992.



CLAYTON, C.E. **Life without transcriptional control? From fly to human and back again.** EMBO J. v. 21, p. 1881-1888. 2002.

CLAYTON, C., SHAPIRA, M. **Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias.** Mol. Biochem. Parasitol. 156: 93-101, 2007.

CONTRERAS, V. T., NAVARRO, M. C., DE LIMA, A. R., ARTEAGA, R., DURAN, F., ASKUE, J., FRANCO, Y. **Production of amastigotes from metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*.** Mem Inst Oswaldo Cruz 97:1213-20, 2002.

CONTRERAS, V. T., SALLES, J. M., THOMAS, N., MOREL, C. M., GOLDENBERG, S. **In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions.** Mol Biochem Parasitol. 16:315-27, 1985.

CRUZ, M. C., CAVALLO, L. M., GORLACH, J. M., COX, G., PERFECT, J. R., CARDENAS, M. E., AND HEITMAN, J. **Rapamycin antifungal action is mediated via conserved complexes with FKBP12 and TOR kinase homologs in *Cryptococcus neoformans*.** Mol. Cell. Biol. 19:4101–4112, 1999.

DAVIES, T. H., SÁNCHEZ, E. R. **FKBP52.** Int. J. Biochem. Cell Biol. 37:42-47, 2005.

DE GAUDENZI, J. G.; FRASCH A.C.; CLAYTON, C. **RNA-binding domain proteins in kinetoplastids: a comparative analysis.** Eukaryotic Cell. 4: 2106-2114, 2005.

DE JESUS, T. C., TONELLI, R. R., NARDELLI, S. C., DA SILVA AUGUSTO, L., MOTTA, M. C., GIRARD-DIAS, W., MIRANDA, K., ULRICH, P., JIMENEZ, V., BARQUILLA, A., NAVARRO, M., DOCAMPO, R., SCHENKMAN, S. **Target of rapamycin (TOR)-like 1 kinase is involved in the control of polyphosphate**

**levels and acidocalcisome maintenance in *Trypanosoma brucei*.** J. Biol. Chem. 285:24131–24140, 2010.

DE LANGE, T., KOOTER, J. M., MICHELS, P. A., BORST, P. **Telomere conversion in trypanosomes.** Nucleic Acids Res. 11: 8149-65, 1983.

DE LANGE, T., BERKVEN, T.M., VEERMAN, H.J., FRASCH, A.C., BARRY, J.D., BORST, P. **Comparison of the genes coding for the common 5' terminal sequence of messenger RNAs in three trypanosome species.** Nucleic Acids Res. 12: 4431-4443, 1984.

DIGIROLAMO, F. A., MIRANDA, M. R., BOUVIER, L. A., CÁMARA, M. M., CÁNEPA, G. E., PEREIRA, C. A. **The mammalian TOR pathway is present in *Trypanosoma cruzi*. In silico reconstruction and possible functions.** Medicina. 72: 221-226, 2012.

D'ORSO, I., DEGAUDENZI, J.G., FRASCH, A.C. **RNA-binding proteins and mRNA turnover in trypanosomes.** TRENDS in Parasitology. v. 19, p.151-155. 2003.

DOLINSKI, K. J., HEITMAN, J. **Hmo1p, a high mobility group 1/2 homolog , genetically and physically interacts with the yeast FKBP12 prolyl isomerase.** Genetics. 151:935-944, 1999.

DOLINSKI, K. J., MUIR, S., CARDENAS, M., HEITMAN, J. **All cyclophilins and FK506 binding proteins are, individually and collectively, dispensable for viability in *Saccharomyces cerevisiae*.** Proc Natl Acad Sci USA. 94:13093–13098, 1997.

DOSSIN, F.M., SCHENKMAN, S. **Actively Transcribing RNA Polymerase II Concentrates on Spliced Leader Genes in the Nucleus of *Trypanosoma cruzi*.** Eukaryotic Cell. 4: 960-970, 2005.

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

DUAN, S., SKAAR, J. R., KUCHAY, S., TOSCHI, A., KANAREK, N., BEN-NERIAH, Y., PAGANO, M. **mTOR generates an auto-amplification loop by triggering the  $\beta$ TrCP- and CK1 $\alpha$ -dependent degradation of DEPTOR.** *Mol. Cell.* 44:317-324, 2011.

DUMAS, M. **Sleeping sickness, a reemerging sickness.** *Bull. Acad. Natl. Med.*, 184, 1867-1885. 2000.

EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BARTHOLOMEU, D. C.; NILSSON, D.; AGGARWAL, G.; TRAN, A. N.; GHEDIN, E.; WORTHEY, E. A.; DELCHER, A. L.; BLANDIN, G.; WESTENBERGER, S. J.; CALER, E.; CERQUEIRA, G. C.; BRANCHE, C.; HAAS, B.; ANUPAMA, A.; ARNER, E.; ASLUND, L.; ATTIPOE, P.; BONTEMPI, E.; BRINGAUD, F.; BURTON, P.; CADAG, E.; CAMPBELL, D. A.; CARRINGTON, M.; CRABTREE, J.; DARBAN, H.; DA SILVEIRA, J. F.; DE JONG, P.; EDWARDS, K.; ENGLUND, P. T.; FAZELINA, G.; FELDBLYUM, T.; FERELLA, M.; FRASCH, A. C.; GULL, K.; HORN, D.; HOU, L.; HUANG, Y.; KINDLUND, E.; KLINGBEIL, M.; KLUGE, S.; KOO, H.; LACERDA, D.; LEVIN, M. J.; LORENZI, H.; LOUIE, T.; MACHADO, C. R.; MCCULLOCH, R.; MCKENNA, A.; MIZUNO, Y.; MOTTRAM, J. C.; NELSON, S.; OCHAYA, S.; OSOEGAWA, K.; PAI, G.; PARSONS, M.; PENTONY, M.; PETTERSSON, U.; POP, M.; RAMIREZ, J. L.; RINTA, J.; ROBERTSON, L.; SALZBERG, S. L.; SANCHEZ, D. O.; SEYLER, A.; SHARMA, R.; SHETTY, J.; SIMPSON, A. J.; SISK, E.; TAMMI, M. T.; TARLETON, R.; TEIXEIRA, S.; VAN AKEN, S.; VOGT, C.; WARD, P. N.; WICKSTEAD, B.; WORTMAN, J.; WHITE, O.; FRASER, C. M.; STUART, K. D.; ANDERSSON, B. **The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease.** *Science*, 309 (5733), 409-415, 2005.

ERBEN, E. D., DAUM, S., TÉLLEZ-IÑÓN, M. T. **The *Trypanosoma cruzi* PIN1 gene encodes a parvulin peptidyl-prolyl cis/trans isomerase able to replace the essential ESS1 in *Saccharomyces cerevisiae*.** Mol Biochem Parasitol. 153:186-193, 2007.

FAUCHER, J. F., BALTZ, T., PETRY, K. G. **Detection of an “epimastigote-like” intracellular stage of *Trypanosoma cruzi*.** Parasitology Research, 81, 441–443, 1995.

FERNANDES, O.; SOUTO, R. P.; CASTRO, J. A.; PEREIRA, J. B.; FERNANDES, N. C.; JUNQUEIRA, A. C.; NAIFF, R. D.; BARRETT, T. B.; DEGRAVE, W; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D. A.; COURA, J. R. **Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from human and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequence.** Am. J. Trop. Med. Hyg., 58, 807-811, 1998.

FINGAR, D. C., SALAMA, S., TSOU, C., HARLOW, E., AND BLENIS, J. **Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E.** Genes Dev. 16:1472–1487, 2002.

GADAL, O., LABARRE, S., BOSCHIERO, C., THURIAUX, P. **Hmo1 , an HMG-box protein, belongs to the yeast ribosomal DNA transcription system.** EMBO J. 21:5498-5507, 2002.

GALAT, A. **Sequence diversification of the FK506-binding proteins in several different genomes.** Eur. J. Biochem, v. 267, p. 4945-4959, 2000.

GALAT, A. **Functional Drift of Sequence Attributes in the FK506-Binding Proteins (FKBPs).** J. Chem. Inf. Model. 48:1118–1130, 2008.

GAO, X., ZHANG, Y., ARRAZOLA, P., HINO, O., KOBAYASHI, T., YEUNG, R. S., RU, B., AND PAN, D. **Tsc tumour suppressor proteins antagonize amino-acid-TOR signalling.** Nat. Cell Biol. 4:699–704, 2002.

GAUNT, M. W., YEO, M., FRAME, I. A., STOTHARD, J. R., CARRASCO, H. J., TAYLOR, M. C., MENA, S. S., VEAZEY, P., MILES, G. A., ACOSTA, N., DE ARIAS, A. R., MILES, M. A. **Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes.** Nature. 421:936-939, 2003.

GEISLER, M., BAILLY, A. **Tête-à-tête: the function of FKBP in plant development.** Trends in Plant Science. 12: 465-473, 2007.

GIBSON, W. C., MILES, M. A. **The karyotype and ploidy of *Trypanosoma cruzi*.** EMBO J. 5:1299-1305, 1986.

GINGRAS, A. C., RAUGHT, B., AND SONENBERG, N. **eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation.** Annu. Rev. Biochem. 68:913–963, 1999.

GLISOVIC; T.; BACHORIK, J.L.; YONG, J.; DREYFUSS, G. **RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation.** FEBS Lett. v.14, p.1977-86. 2008.

GONZALES-PERDOMO, M.; ROMERO, P.; GOLDENBERG, S. **Cyclic AMP and adenylate cyclase activators stimulate *Trypanosoma cruzi* differentiation.** Exp. Parasitol, 66, 205-212, 1988.

GONZALEZ, M. S., HAMED, A., ALBUQUERQUE-CUNHA, J. M., NOGUEIRA, N. F., DE SOUZA, W., RATCLIFFE, N. A., AZAMBUJA, P., GARCIA, E. S., MELLO, C. B. **Antiserum against perimicrovillar membranes and midgut tissue reduces the development of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector, *Rhodnius prolixus*.** Exp. Parasit. 114(4):297-304, 2006.

GRAVES, L. M., BORNFELDT, K. E., ARGAST, G. M., KREBS, E. G., KONG, X., LIN, T. A., AND LAWRENCE, JR. J. C. **cAMP- and rapamycin-sensitive regulation of the association of eukaryotic initiation factor 4E and the translational regulator PHAS-I in aortic smooth muscle cells.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7222–7226, 1995.

HAGHIGHAT, A., MADER, S., PAUSE, A., AND SONENBERG, N. **Repression of capdependent translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E.** EMBO J. 14:5701–5709, 1995.

HAILE, S.; PAPADOPOULOU, B. **Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa.** Current Opinion in Microbiology. v. 10, p. 569–577. 2007.

HARA, K., MARUKI, Y., LONG, X., YOSHINO, K., OSHIRO, N., HIDAYAT, S., TOKUNAGA, C., AVRUCH, J., AND YONEZAWA K. **Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action.** Cell 110:177–189, 2002.

HARDWICK, J. S., KURUVILLA, F. G., TONG, J. K., SHAMJI, A. F., AND SCHREIBER, S. L. **Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:14866–14870, 1999.

HARTMAN, M. E., VILLELA-BACH, M., CHEN, J., AND FREUND, G. G. **Frapdependent serine phosphorylation of IRS-1 inhibits IRS-1 tyrosine phosphorylation.** Biochem. Biophys. Res. Commun. 280:776–781, 2001.

HARUTA, T., UNO, T., KAWAHARA, J., TAKANO, A., EGAWA, K., SHARMA, P. M., OLEFSKY, J. M., AND KOBAYASHI, M. **A rapamycin-sensitive pathway down-regulates insulin signaling via phosphorylation and proteasomal degradation of insulin receptor substrate-1.** Mol. Endocrinol. 14:783–794, 2000.

HENRIKSSON, J.; PETTERSON, U.; SOLARI, A. ***Trypanosoma cruzi*: correlation between karyotype variability and isoenzyme classification.** Exp. Parasitol., 77, 334-348, 1993.

HENRIKSSON, J.; PORCEL, B.; RYDAKER, M.; RUIZ, A.; SABAJ, V.; GALANTI, N.; CAZZULO, J. J.; FRASCH, A. C. C.; PETTERSSON, U. **Chromosome specific markers reveal conserved linkage groups in spite of extensive chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi*.** Mol. Biochem. Parasitol., 73, 63-74, 1995.

HENTGES, K., THOMPSON, K., AND PETERSON, A. **The flat-top gene is required for the expansion and regionalization of the telencephalic primordium.** Development 126:1601–1609, 1999.

HUANG, S., LIU, L. N., HOSOI, H., DILLING, M. B., SHIKATA, T., AND HOUGHTON, P. J. **p53/p21 (CIP1) cooperate in enforcing rapamycin-induced G(1) arrest and determine the cellular response to rapamycin.** Cancer Res. 61:3373–3381, 2001.

HUDSON, C. C., LIU, M., CHIANG, G. G., OTTERNESS, D. M., LOOMIS, D. C., KAPER, F., GIACCIA, A. J., AND ABRAHAM, R. T. **Regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  expression and function by the mammalian target of rapamycin.** Mol. Cell. Biol. 22:7004–7014, 2002.

HUFFMAN, T. A., MOTHE-SATNEY, I., AND LAWRENCE, JR. J. C. **Insulin stimulated phosphorylation of lipin mediated by the mammalian target of rapamycin.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:1047–1052, 2002.

HUG, M.; HOTZ, H.R.; HARTMANN, C.; CLAYTON, C. **Hierarchies of RNA processing signals in a trypanosome surface antigen mRNA precursor.** Mol. Cell. Biol. v. 14, p. 7428-7435. 1994.

ILYIN, G. P., GLAISE, D., GILOT, D., BAFFET, G., AND GUGUEN-GUILLOUZO, C. **Regulation and role of p21 and p27 cyclin-dependent kinase inhibitors during hepatocyte differentiation and growth.** Am. J. Physiol. 285:G115–G127, 2003.

INOKI, K., ZHU, T., AND GUAN, K. L. **TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival.** Cell 115:577–590, 2003.

INOKI, K., ZHU, T., AND GUAN, K. L. **Signaling by Target of Rapamycin Proteins in Cell Growth Control.** Microbiology and Molecular Biology Reviews. 69:79-100, 2005.

IZUMI N., YAMASHITA A., OHNO S. **Integrated regulation of PIKK-mediated stress responses by AAA+ proteins RUVBL1 and RUVBL2.** Nucleus. 2012 January 1; 3(1): 29–43.

ISOTANI, S., HARA, K., TOKUNAGA, C., INOUE, H., AVRUCH, J., AND YONEZAWA, K. **Immunopurified mammalian target of rapamycin phosphorylates and activates p70 S6 kinase alpha in vitro.** J. Biol. Chem. 274:34493–34498, 1999.

JIMÉNEZ B., UGWU F., ZHAO R, ORTÍ L., MAKHNEVYCH T., PINEDA-LUCENA A., HOURY W. A. **Structure of minimal tetratricopeptide repeat domain protein Tah1 reveals mechanism of its interaction with Pih1 and Hsp90.** J Biol Chem. 2012 February 17; 287(8): 5698–5709.

JOHNSON, P.J.; KOOTER, J.M.; BORST, P. **Inactivation of transcription by UV irradiation of *T. brucei* provides evidence for a multicistronic transcription unit including a VSG gene.** Cell. v. 51, n. 2, p. :273-81. 1987.

JUNQUEIRA, A. C.; DEGRAVE, W.; BRANDÃO, A. **Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations.** Trends Parasitol., 21, 270-272, 2005

KAMADA, Y., FUNAKOSHI, T., SHINTANI, T., NAGANO, K., OHSUMI, M., AND OHSUMI, Y. **Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex.** J. Cell Biol. 150:1507–1513, 2000.



KANG, C.B.; YE, H.; DHE-PAGANON, S.; YOON, H. S. **FKBP Family Proteins: immunophilins with Versatile Biological Functions.** Neurosignals, v. 16, p.318–325, 2008

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.

KIM, D. H., SARBASSOV, D. D., ALI, S. M., KING, J. E., LATEK, R. R., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P., AND SABATINI, D. M. **mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery.** Cell 110:163–175, 2002.

KIM, D. H., SARBASSOV DOS, D., ALI, S. M., LATEK, R. R., GUNTUR, K. V., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P., AND SABATINI, D. M. **GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR.** Mol. Cell 11:895–904, 2003.

KLEFFMANN, T.; SCHMIDT, J.; SCHAUB, G. A. **Attachment of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes to hydrophobic substrates and use of this property to separate stages and promote metacyclogenesis.** J. Eukaryot. Microbiol., 45(5), 548-555, 1998.

KLIONSKY, D. J., AND OHSUMI, Y. **Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm.** Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 15:1–32, 1999.

KOOY, R. F.; ASHALL, F.; VAN DER PLOEG, M.; OVERDULVE, J. P. **On the DNA content of *Trypanosoma cruzi*.** Mol. Biochem. Parasitol., 36, 73-76, 1989

KOZMA, S. C., AND THOMAS, G. **Regulation of cell size in growth, development and human disease: PI3K, PKB and S6K.** Bioessays 24:65–71, 2002.

KUNZ, J., HENRIQUEZ, R., SCHNEIDER, U., DEUTER-REINHARD, M., MOVVA, N. R., AND HALL, M. N. **Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression.** *Cell* 73:585–596, 1993.

LAMBERTSSON, A. **The minute genes in *Drosophila* and their molecular functions.** *Adv. Genet.* 38:69-134, 1998.

LAUFER, G.; SCHAAF, G.; BOLLGONN, S.; GÜNZL, A. ***In vitro* analysis of  $\alpha$ -amanitin-resistant transcription from the rRNA, procyclic acidic repetitive protein and variant surface glycoprotein gene promoters in *Trypanosoma brucei*.** *Mol. Cell Biol.* v. 19, p. 5466-73. 1999.

LEBOWITZ, J.H.; SMITH, H.Q.; RUSCHE, L.; BEVERLEY, S.M. **Coupling of poly(A) site selection and *trans* splicing in *Leishmania*.** *Genes and Development.* v. 7, p. 996-1007. 1993.

LEICHT, M., SIMM, A., BERTSCH, G., AND HOPPE, J. **Okadaic acid induces cellular hypertrophy in AKR-2B fibroblasts: involvement of the p70S6 kinase in the onset of protein and rRNA synthesis.** *Cell Growth Differ.* 7:1199–1209, 1996.

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

LIN, T. A., KONG, X., HAYSTEAD, T. A., PAUSE, A., BELSHAM, G., SONENBERG, N., AND LAWRENCE, JR. J. C. **PHAS-I as a link between mitogen-activated protein kinase and translation initiation.** *Science* 266:653–656, 1994.

LIN, T. A., KONG, X., SALTIEL, A. R., BLACKSHEAR, P. J., AND LAWRENCE JR., J. C. **Control of PHAS-I by insulin in 3T3-L1 adipocytes. Synthesis, degradation, and phosphorylation by a rapamycin-sensitive and mitogen-activated protein kinase-independent pathway.** J. Biol. Chem. 270:18531–18538, 1995.

LOEWITH, R., JACINTO, E., WULLSCHLEGER, S., LORBERG, A., CRESPO, J. L., BONENFANT, D., OPPLIGER, W., JENOE, P., AND HALL, M. N. **Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control.** Mol. Cell 10:457–468, 2002.

LONG, X., SPYCHER, C., HAN, Z. S., ROSE, A. M., MULLER, F., AND AVRUCH, J. **TOR deficiency in *C. elegans* causes developmental arrest and intestinal atrophy by inhibition of mRNA translation.** Curr. Biol. 12:1448–1461, 2002.

LU, K. P., HANES, S. D., HUNTER, T. **A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis.** Nature. 38880: 544-547, 1996.

LUKES, J., GUILBRIDE, D. L., VOTYPKA, J., ZIKOVA, A., BENNE, R., ENGLUND, P. T. **Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure.** Euk. Cell., 1, 495-502, 2002.

MA, X. M., BLENIS, J. **Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control.** Nature reviews. Molecular cell biology. Volume 10. 307-318, 2009.

MACEDO, A. M.; MARTINS, S. M.; CHIARI, E.; PENA, S. D. J. **DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones.** Mol. Biochem. Parasitol., 55, 147-154, 1992.

MACHADO, C. A.; AYALA, F. J. **Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*.** Proc. Natl. Acad. Sci., 98(13), 7396-7401, 2001.

MAHAJAN, P. B. **Modulation of transcription of rRNA genes by rapamycin.** Int. J. Immunopharmacol. 16:711–721, 1994.

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. 163-9. 2000.

MARTIN-RENDON, E., FARFÁN, M. J., RAMOS, C., CALDERON, I. L. **Isolation of a mutant allele that deregulates the threonine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*.** Curr. Genet. 24:465-471, 1993.

MATSUURA, A., TSUKADA, M., WADA, Y., AND OHSUMI, Y. **Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*.** Gene 192:245–250, 1997.

MATTHEWS, K.R.; TSCHUDI, C.; ULLU, E. **A common pyrimidine-rich motif governs *trans-splicing* and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes.** Genes and Development. v. 8, p. 491-501. 1994.

MAYER, C., ZHAO, J., YUAN, X., AND GRUMMT, I. **mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability.** Genes Dev. 18:423–434, 2004.

McDANIEL, J. P.; DVORAK, J. A. **Identification, isolation, and characterization of naturally occurring *Trypanosoma cruzi* variants.** Mol. Biochem. Parasitol., 57, 213-222, 1993.

MENAND, B., DESNOS, T., NUSSAUME, L., BERGER, F., BOUCHEZ, D., MEYER C., AND ROBAGLIA, C. **Expression and disruption of the *Arabidopsis* TOR (target of rapamycin) gene.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:6422–6427, 2002.

MEYUHAS, O. **Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level.** Eur. J. Biochem. 267:6321–6330, 2000.

MEYUHAS O., DREAZEN A. **Ribosomal protein S6 kinase from TOP mRNAs to cell size.** 2009.

MICHELLE L., CLOUTIER A., TOUTANT J., SHKRETA L., THIBAUT P., DURAND M., GARNEAU D., GENDRON D., LAPOINTE E., COUTURE S., LE HIR H., KLINCK R., ELELA S. A., PRINOS P., CHABOT B. **Proteins associated with the exon junction complex also control the alternative splicing of apoptotic regulators.** Moll Cell Biol. 2012. 32(5): 954-967.

MICHELS, P. A., BRINGAUD, F., HERMAN, M., HANNAERT, V. **Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids.** Biochim. Biophys. Acta. 2006, 1763(12): 1463-1477.

MILES, M. A. **The epidemiology of South American typanosomiasis - Biochemical and immunological approaches and their relevance to control.** Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 77, 5-23., 1983.

MONTAGNE, J., STEWART, M. J., STOCKER, H., HAFEN, E., KOZMA, S. C., AND THOMAS, G. **Drosophila S6 kinase: a regulator of cell size.** Science 285:2126–2129, 1999.

MOREL, C. M.; CHIARI, E.; CAMARGO, E. P.; MATTEI, D. M.; ROMANHA, A. J.; SIMPSON, L. **Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles.** Proc. Natl. Acad. Sci., 77, 6810-6814, 1980.

MONAGHAN, P.; BELL, A. **A *Plasmodium falciparum* FK506-binding protein (FKBP) with peptidyl–prolyl *cis–trans* isomerase and chaperone activities.** Molecular & Biochemical Parasitology, v. 139, p. 185–195, 2005.

NELSON, R. G.; PARSONS, M.; BARR, P.J.; STUART, K.; SELKIRK, M.; AGABIAN, N. **Sequences homologous to the variant antigen mRNA spliced leader are located in tandem repeats and variable orphans in *Trypanosoma brucei*.** Cell. v. 34, p. 901-909. 1983.

NITZ, N.; GOMES, C.; ROSA, A. C.; D'SOUZA-AULT, M. R.; MORENO, F.; LAURIA-PIRES, L; NASCIMENTO, R. J.; TEIXEIRA, A. R. L. **Heritable integration of kDNA minicircle sequences from *Trypanosoma cruzi* into the avian genome: Insights into human Chagas disease.** Cell, 118, 175-186, 2004.

NODA, T., AND OHSUMI, Y. **Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast.** J. Biol. Chem. 273:3963–3966, 1998.

NOZAKI, T.; CROSS, G.A.M. **Effects of 3'untranslated and intergenic regions on gene expression in *Trypanosoma cruzi*.** Mol. Biochem. Parasitol. v. 75, p. 55-67. 1995.

OLDHAM, S., AND HAFEN, E. **Insulin/IGF and target of rapamycin signaling: a TOR de force in growth control.** Trends Cell Biol. 13:79–85, 2003.

OLDHAM, S., MONTAGNE, J., RADIMERSKI, T., THOMAS, G., AND HAFEN, E. **Genetic and biochemical characterization of dTOR, the *Drosophila* homolog of the target of rapamycin.** Genes Dev. 14:2689–2694, 2000.

PAREKH, D., ZIEGLER, W., YONEZAWA, K., HARA, K., AND PARKER, P. J. **Mammalian TOR controls one of two kinase pathways acting upon nPKCdelta and nPKCepsilon.** J. Biol. Chem. 274:34758–34764, 1999.

PAUSE, A., BELSHAM, G. J., GINGRAS, A. C., DONZE, O., LIN, T. A., LAWRENCE, JR. J. C., AND SONENBERG, N. **Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function.** Nature 371:762–767, 1994.

PENDE, M., UM, S. H., MIEULET, V., STICKER, M., GOSS, V. L., MESTAN, J., MUELLER, M., FUMAGALLI, S., KOZMA, S. C., AND THOMAS, G. **S6K1(-/-)/S6K2(-/-) mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway.** Mol. Cell. Biol. 24:3112–3124, 2004.

PETERSON, R. T., DESAI, B. N., HARDWICK, J. S., AND SCHREIBER, S. L. **Protein phosphatase 2A interacts with the 70-kDa S6 kinase and is activated by inhibition of FKBP12-rapamycin-associated protein.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:4438–4442, 1999.

PETERSON, T. R., LAPLANTE, M., THOREEN, C. C., SANCAK, Y., KANG, S. A., KUEHL, W. M., GRAY, N. S., SABATINI, D. M. **DEPTOR is a mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival.** Cell. 137:873-886, 2009.

POTENZA, M.; GALAT, A.; MINNING, T. A.; RUIZ, A. M.; DURAN, R.; TARLETON, R. L.; MARÍN, M.; FICHERA, L. E.; BÚA, L. **Analysis of the *Trypanosoma cruzi* cyclophilin gene family and identification of Cyclosporin A binding proteins.** Parasitology, v. 32, p. 867-882, 2006.

POWERS, T., AND WALTER, P. **Regulation of ribosome biogenesis by the rapamycinsensitive TOR-signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*.** Mol. Biol. Cell 10:987–1000, 1999.

PRICE, D. J., GROVE, J. R., CALVO, V., AVRUCH, J., AND BIERER, B. E. **Rapamycininduced inhibition of the 70-kilodalton S6 protein kinase.** Science 257:973–977, 1992.

PROUD, C. G. **Regulation of mammalian translation factors by nutrients.** Eur. J. Biochem. 269:5338–5349, 2002.

RAHFELD, J.U.; RUCKNAGEL, K.P.; SCHELBERT, B.; LUDWIG, B.; HACKER, J.; MANN, K.; FISCHER, G. **Confirmation of the existence of a third family among peptidyl-prolyl cis/trans isomerases. Amino acid sequence and recombinant production of parvulin.** FEBS Lett, v. 352(2), p. 180-184, 1994.

REDPATH, N. T., FOULSTONE, E. J., AND PROUD, C. G. **Regulation of translation elongation factor-2 by insulin via a rapamycin-sensitive signaling pathway.** EMBO J. 15:2291–2297, 1996.

RUVINSKY, I, SHARON, N., LERER, T., COHEN, H., STOLOVICH-RAIN, M., NIR, T., DOR, Y., ZISMAN, P., MEYUHAS, O. **Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis.** Genes Dev. 19:2199-2211, 2005.

SALDIVIA, M., BARQUILLA, A., BART, J. M., DIAZ-GONZÁLEZ, R., HALL, M. N., NAVARRO, M. **Target of rapamycin (TOR) kinase in *Trypanosoma brucei*: an extended family.** Biochem. Soc. Trans. 41:934-938, 2013.

SARBASSOV DOS, D., ALI, S. M., KIM, D. H., GUERTIN, D. A., LATEK, R. R., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P., AND SABATINI, D. M. **Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptorindependent pathway that regulates the cytoskeleton.** Curr. Biol. 14:1296–1302, 2004.

SCHMIDT, A., AND HALL, M. N. **Signaling to the actin cytoskeleton.** Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 14:305–338, 1998.

SCHMIDT, A., BECK, T., KOLLER, A., KUNZ, J., AND HALL, M. N. **The TOR nutrient signalling pathway phosphorylates NPR1 and inhibits turnover of the tryptophan permease.** EMBO J. 17:6924–6931, 1998.

SCHMIDT, A., BICKLE, M., BECK, T., AND HALL, M. N. **The yeast phosphatidylinositol kinase homolog TOR2 activates RHO1 and RHO2 via the exchange factor ROM2.** Cell 88:531–542, 1997.



SCHMIDT, A., KUNZ, J., AND HALL, M. N. **TOR2 is required for organization of the actin cytoskeleton in yeast.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:13780–13785, 1996.

SENGUPTA, S., PETERSON, T. R., SABATINI, D. M. **Regulation of the TOR Complex 1 Pathway by Nutrients, Growth Factors, and Stress.** Molecular Cell. 40:310-322, 2010.

SHIGEMITSU, K., TSUJISHITA, Y., HARA, K., NANAHOSE, M., AVRUCH, J., AND YONEZAWA, K. **Regulation of translational effectors by amino acid and mammalian target of rapamycin signaling pathways. Possible involvement of autophagy in cultured hepatoma cells.** J. Biol. Chem. 274:1058–1065, 1999.

SHIKANAI-YASUDA, M. A., MARCONDES, C. B., GUEDES, L.A., SIQUEIRA, G. S., BARONE, A.A., DIAS, J. C. P., AMATO NETO, V., TOLEZANO, J. E., PERES, B. A., ARRUDA JR, E. R., LOPES, M. A., SHIROMA, M., CHAPADEIRO, E. **Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 33:355-361, 1991.

SHIMA, H., PENDE, M., CHEN, Y., FUMAGALLI, S., THOMAS, G., AND KOZMA, S. C. **Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase.** EMBO J. 17:6649–6659, 1998.

SIMÕES-BARBOSA, A.; BARROS, A. M.; NITZ, N.; ARGANARAZ, E. R.; TEIXEIRA, A. R. L. **Integration of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircle sequence in the host genome may be associated with autoimmune serum factors in Chagas disease patients.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 94, 249-252, 1999.

SIMPSON, A. G. B.; GILL, E. E.; CALLAHAN, H. A.; LITAKER, R. W.; ROGER, A. J. **Early evolution within kinetoplastids (Euglenozoa), and the late emergence of trypanosomatids.** *Protist* .155, 407-422, 2004.

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

STOLOVICH, M, TANG, H., HORNSTEIN, E., LEVY, G., COHEN, R., BAE, S. S., BIRNBAUM, M. J., MEYUHAS, O. **Transduction of growth or mitogenic signals into translational activation of TOP mRNAs is fully reliant on the phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathway but requires neither S6K1 nor rpS6 phosphorylation.** *Mol. Cell Biol.* 22:8101-8113, 2002.

SZÖÖR B. **Trypanosomatid protein phosphatases.** *Mol Biochem Parasitol.* 2010. 173(2): 53–63.

TAKANO, A., USUI, I., HARUTA, T., KAWAHARA, J., UNO, T., IWATA, M., AND KOBAYASHI, M. **Mammalian target of rapamycin pathway regulates insulin signaling via subcellular redistribution of insulin receptor substrate 1 and integrates nutritional signals and metabolic signals of insulin.** *Mol. Cell. Biol.* 21:5050–5062, 2001.

TEIXEIRA, A. R. L.; LACAVAL, Z.; SANTANA, J. M.; LUNA, H. **Insertion of *Trypanosoma cruzi* DNA in the genome of mammal host cell through infection.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 24, 55-58, 1991.

TEIXEIRA, D. E., BENCHIMOL, M., CREPALDI, P. H., DE SOUZA, W. **Atlas didático: Ciclo de Vida do *Trypanosoma cruzi*.** 1ª Edição. Editora Atlas, 2011.

TEIXEIRA, S.M.R. **Control of gene expression in Trypanosomatidae.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* v. 31, p. 1503-1516. 1998.

TEIXEIRA, S.M.; DAROCHA, W.D. **Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae.** Genet. Mol. Res. v. 2, n. 1, p. 148-58. 2003.

THOMPSON, C.; DVORAK, J. A. **Quantitation of total DNA per cell in an exponentially growing population using the diphenylamine reaction and flow cytometry.** Analytical Biochem., 177, 353-357, 1989.

TREINS, C., GIORGETTI-PERALDI, S., MURDACA, J., SEMENZA, G. L., AND VAN OBBERGHEN, E. **Insulin stimulates hypoxia-inducible factor 1 through a phosphatidylinositol 3-kinase/target of rapamycin-dependent signaling pathway.** J. Biol. Chem. 277:27975–27981, 2002.

TSANG, C. K., BERTRAM, P. G., AI, W., DRENAN, R., AND ZHENG, X. F. **Chromatinmediated regulation of nucleolar structure and RNA Pol I localization by TOR.** EMBO J. 22:6045–6056, 2003.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. **The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited.** International Journal for Parasitology, 31, 472-481, 2001.

USUI, I., HARUTA, T., IWATA, M., TAKANO, A., UNO, T., KAWAHARA, J., UENO, E., SASAOKA, T., AND KOBAYASHI, M. **Retinoblastoma protein phosphorylation via PI 3-kinase and mTOR pathway regulates adipocyte differentiation.** Biochem. Biophys. Res. Commun. 275:115–120, 2000.

VAN DER PLOEG, L.H.T.; LIU, A.Y.C.; MICHELS, P.A.M.; DE LANGE, T.; BORST, P.; MAJUMDER, H.K.; WEBER, H.; VEENEMANT, G.H.; VAN BOOMT, G.H. **RNA *splicing* is required to make the messenger RNA for a variant surface antigen in trypanosomes.** Nucleic Acids Research. v. 10, p. 3591-3604. 1982.

VAN DER PLOEG, L. H.; SCHWARTZ, D. C.; CANTOR, C. R.; BORST, P. **Antigenic variation in *Trypanosoma brucei* analyzed by electrophoretic separation of chromosomesized DNA molecules.** Cell, 37(1), 77-84, 1984a.

VAN DER PLOEG, L. H.; LIU, A. Y.; BORST, P. **Structure of the growing telomeres of Trypanosomes.** *Cell*, 36(2), 459-68, 1984b.

VAN DER PLOEG, L. H.; CORNELISSEN, A. W.; BARRY, J. D.; BORST, P. **Chromosomes of kinetoplastida.** *EMBO J.*, 3(13), 3109-15, 1984c.

VANHAMME, L.; PAYS, E. **Control of gene expression in trypanosomes.** *Microbiol. Rev.* v. 59, n. 2, p. 223-40. 1995.

WAGNER, W.; SO, M. **Genomic variation of *Trypanosoma cruzi*: Involvement of multicopy genes.** *Infect. Immun.*, 58, 3217-3224, 1990.

WESTENBERGER, S. J.; BARNABE, C.; CAMPBELL, D. A.; STURM, N. R. **Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*.** *Genetics*, 171(2), 527-543, 2005.

WILLIAMS, R. O.; YOUNG, J. R.; MAJIWA, P. A. **Genomic environment of *T. brucei* VSG genes: presence of a minichromosome.** *Nature*, 299(5882), 417-21, 1982.

WULLSCHLEGER, S., LOEWITH, R., HALL, M. N. **TOR signaling in growth and metabolism.** *Cell*. 124(3):471-484, 2006.

YAO Y. L., LIANG Y. C., HUANG H. H., YANG W. M. **FKBPs in chromatin modification and cancer.** V. 11, cap. 4, 2011, Pg. 301–307.

YOKOGAMI, K., WAKISAKA, S., AVRUCH, J., AND REEVES, S. A. **Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR.** *Curr. Biol.* 10:47–50, 2000.

ZARAGOZA, D., GHAVIDEL, A., HEITMAN, J., AND SCHULTZ, M. C. **Rapamycin induces the G0 program of transcriptional repression in yeast by interfering with the TOR signaling pathway.** *Mol. Cell. Biol.* 18:4463–4470, 1998.

ZELEDON, R. **Infection of the insect host by *Trypanosoma cruzi***. In "**Atlas of Chaga's Disease Vectors in the Americas**". Editora Fiocruz, 1, 271-287, 1997.

ZHANG, H., STALLOCK, J. P., NG, J. C., REINHARD, C., AND NEUFELD, T. P. **Regulation of cellular growth by the *Drosophila* target of rapamycin dTOR**. *Genes Dev.* 14:2712–2724, 2000.

ZHANG S., FRITZ N., IBARRA C., UHLÉN P. **Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Subtype-Specific Regulation of Calcium Oscillations**. *Neurochem Res.* 2011. 36(7): 1175–1185.

ZHAO Y., SUN Y. **Targeting the mTOR-DEPTOR pathway by CRL E3 ubiquitin ligases: therapeutic application**. *Neoplasia.* 2012. 14(5): 360-367.

ZINGALES, B.; PEREIRA, M. E.; OLIVEIRA, R. P.; ALMEIDA, K.; UMEZAWA, E. S.; SOUTO, R. P.; VARGAS, N.; CANO, M. I.; DA SILVEIRA, J. F.; NEHME, N. S.; MOREL, C. M.; BRENER, A.; MACEDO, A. ***Trypanosoma cruzi* genome project: biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener**. *Acta Trop.*, 68(2), 159-173, 1997.

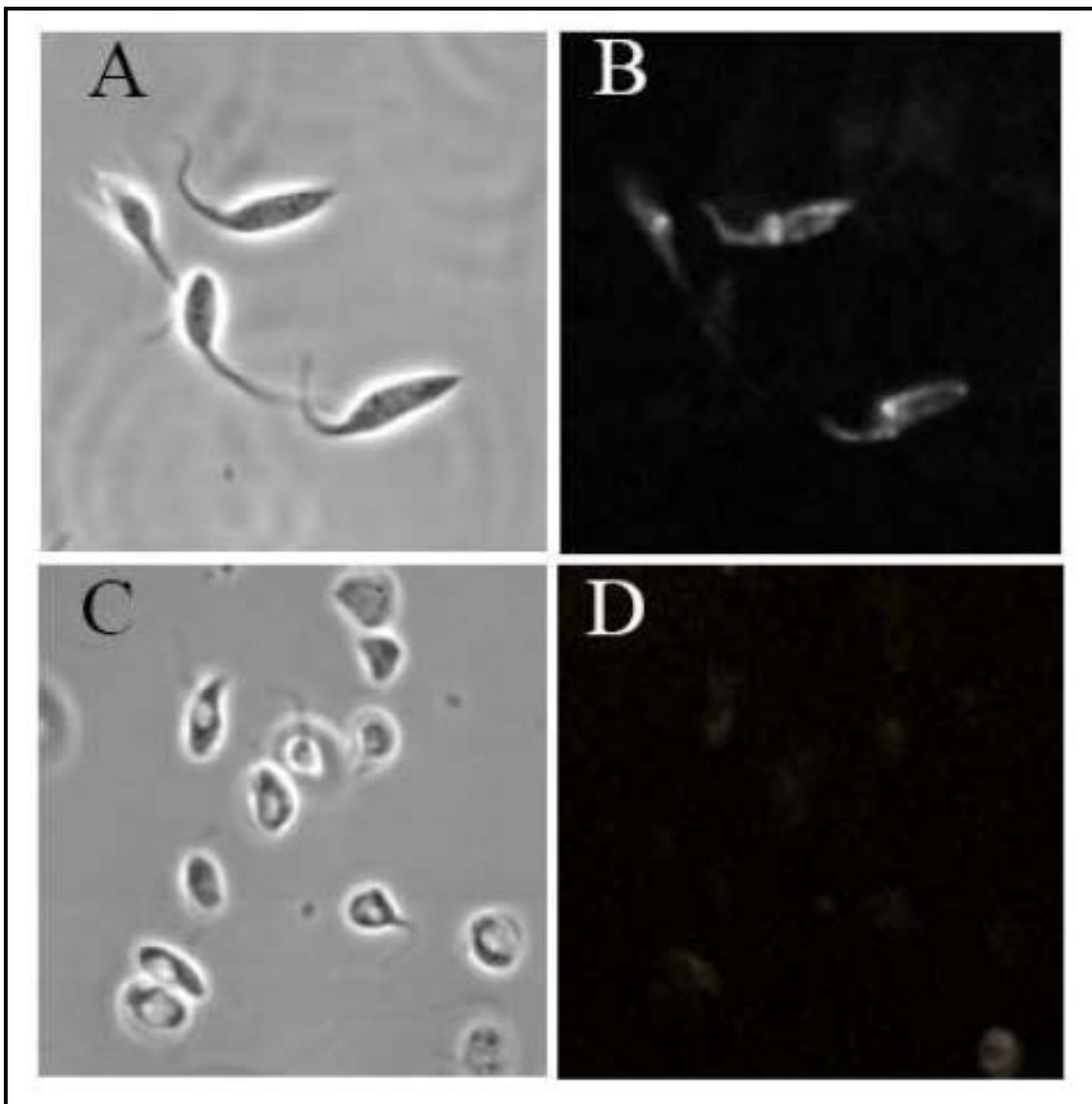
ZINGALES, B.; SOUTO, R. P.; MANGIA, R. H.; LISBOA, C. V.; CAMPBELL, D. A.; COURA, J. R.; JANSEN, A.; FERNANDES, O. **Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences**. *Inter. J. Parasitol.*, 28, 105-112, 1998.

ZONCU, R., BAR-PELED, L., EFEYAN, A., WANG, S., SANCAK, Y., SABATINI, D. M. **mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase**. *Science.* 334:678-683, 2011.

## **ANEXOS**

## ANEXO I

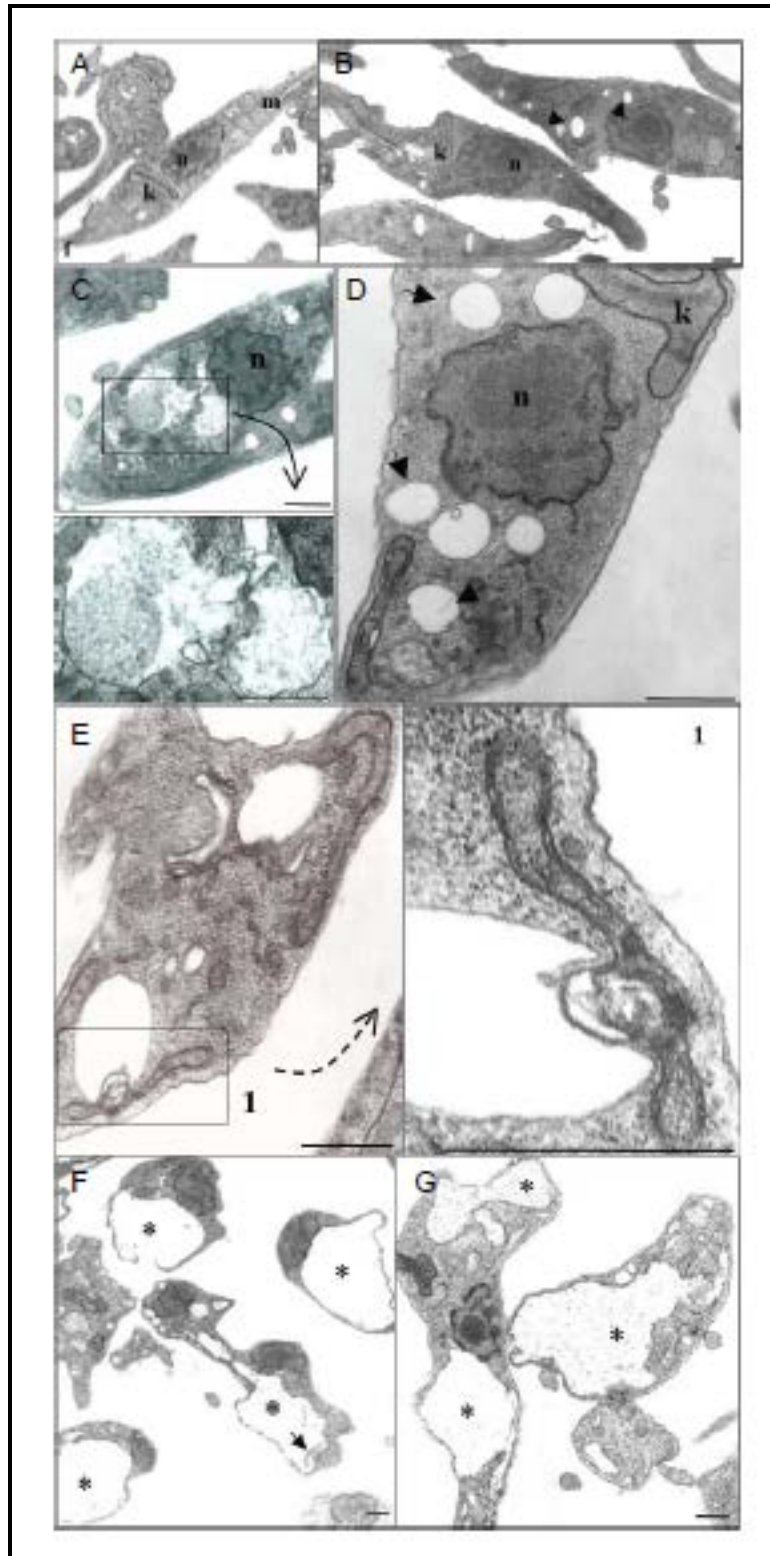
Efeito da rapamicina sobre o potencial de membrana da mitocôndria após 6h de tratamento, indicado pela ligação do corante fluorescente rodamina123. (A e B) Epimastigotas incubados com DMSO (controle) e analisados por microscopia de contraste de fase e confocal a *laser*, respectivamente. (C e D) Epimastigotas incubados com 20  $\mu\text{g/mL}$  de rapamicina. Aumento de 1000 vezes.



## ANEXO II

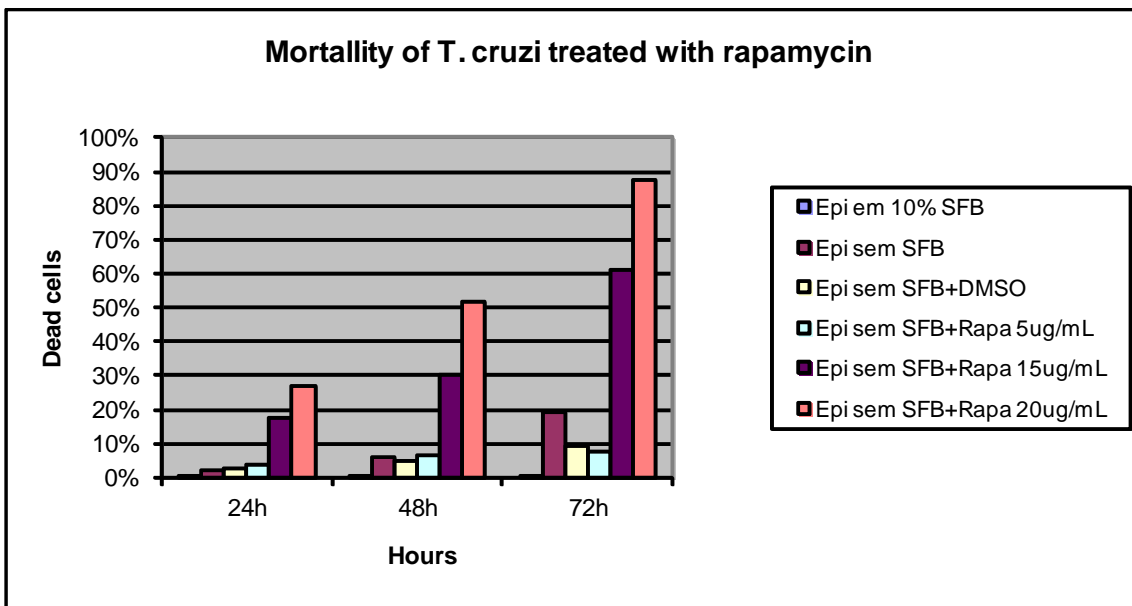
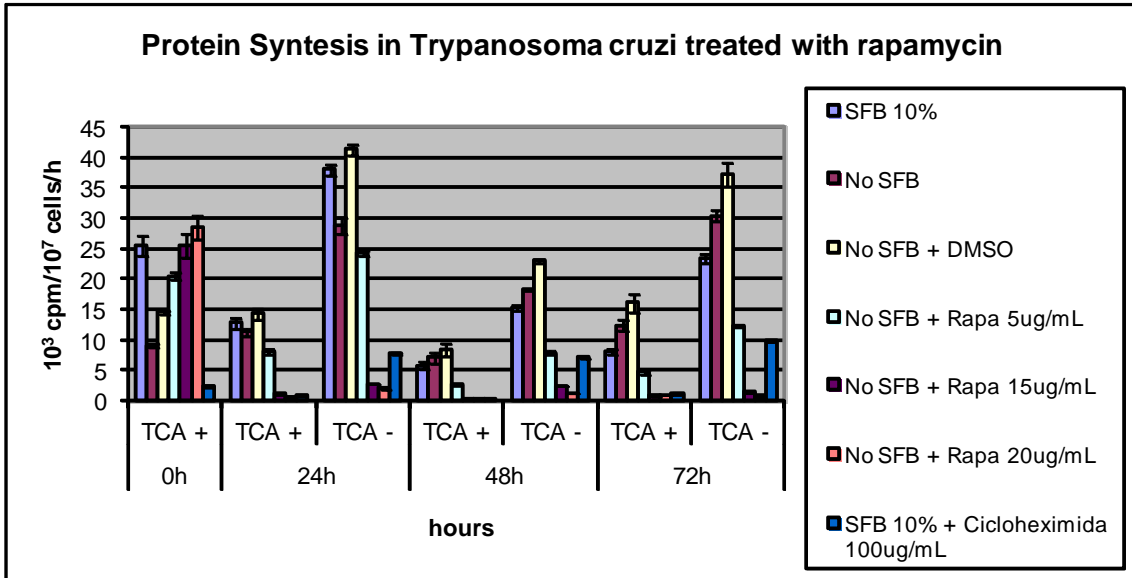
Microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* tratados com rapamicina. (A) Epimastigotas controle, cultivados por 24h exibindo núcleo (n), cinetoplasto (k), mitocôndria (m) e flagelo (f). (B-D) Epimastigotas tratados com 3 µg/ml de rapamicina por 24h, mostrando vacuolização do citoplasma (seta) com degradação dos reservosomos (C) e preservação da mitocôndria (D). (E) Epimastigotas tratados com 3 µg/mL de rapamicina por 48h, mostrando o início de absorção da mitocôndria por um vacúolo. (F e G) Epimastigotas tratados com 20 µg/mL de rapamicina por 3h e 24h, respectivamente, exibindo inchaço da mitocôndria e desaparecimento de material eletrondenso da matriz mitocondrial (\*), além de arranjo normal do cinetoplasto (seta). Barra = 0,5µm.





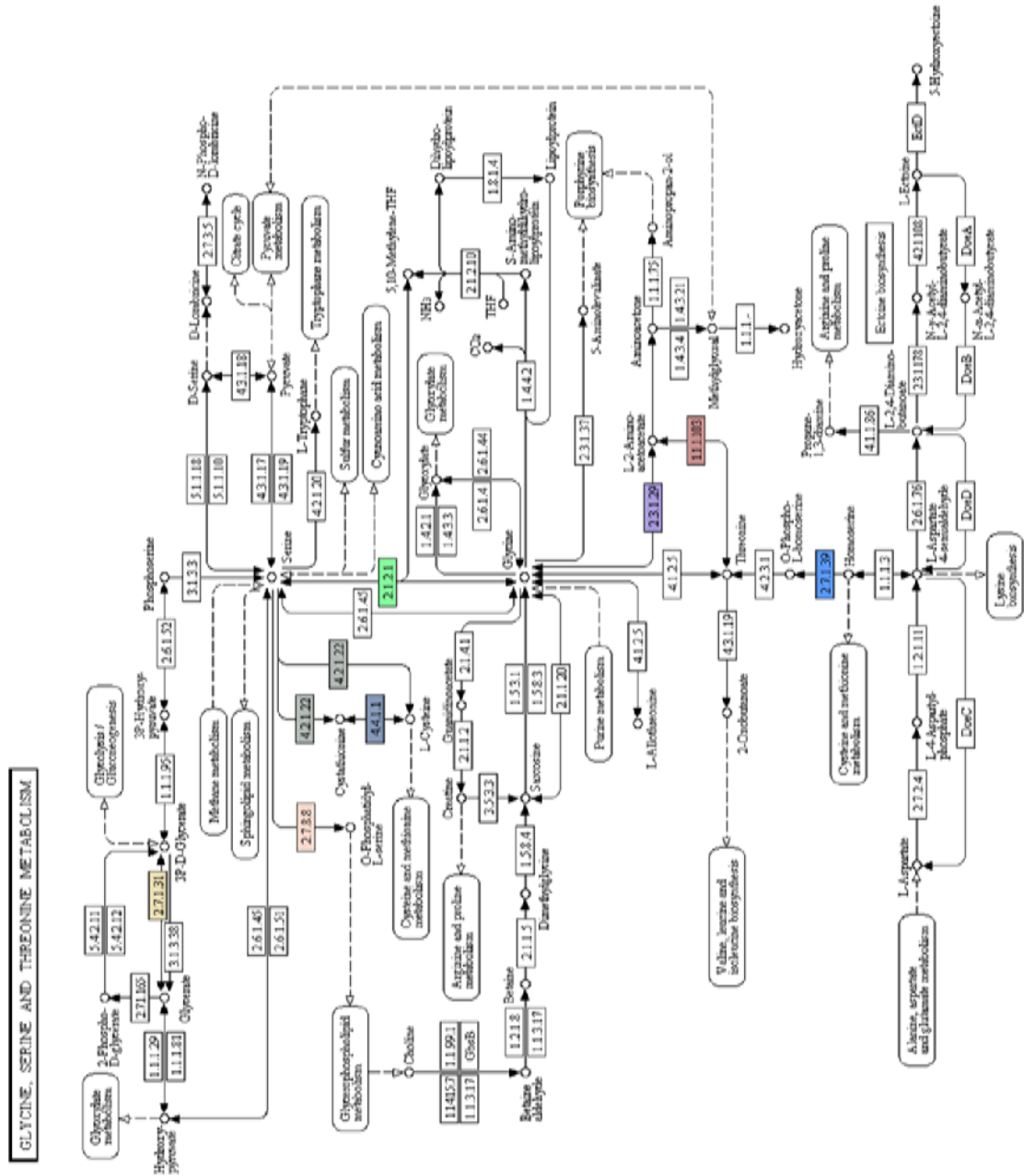
ANEXO III

Gráficos das leituras do experimento de Marcação Metabólica.



# ANEXO IV

## Via Metabólica de biossíntese de Glicina, Serina e Treonina.



ANEXO V

Via metabólica de sinalização por mTOR.

