

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MONICA VISNIESKI ALCANTARA

**CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA TcZC3H31 DE *Trypanosoma cruzi*,
UMA CCCH ZINC FINGER ESSENCIAL PARA A METACICLOGÊNESE**

**CURITIBA
2014**

MONICA VISNIESKI ALCANTARA

**CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA TcZC3H31 DE *Trypanosoma cruzi*,
UMA CCCH ZINC FINGER ESSENCIAL PARA A METACICLOGÊNESE**

Tese apresentada ao Curso de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Dr. Stenio Perdigão Fragoso

Co-orientadora: Dra. Gisele Fernanda Assine Picchi.

**CURITIBA
2014**

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Alcantara, Monica Visnieski

Caracterização da proteína TcZC3H31 de *Trypanosoma cruzi*, uma CCCH zinc finger essencial para a metaciclogênese. / Monica Visnieski Alcantara. – Curitiba, 2014.

117f. : il. ; 30cm.

Orientador: Stenio Perdigão Fragoso

Co-orientadora: Gisele Fernanda Assine Picchi

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Proteínas. I. Título II. Fragoso, Stenio Perdigão. III. Picchi, Gisele Fernanda Assine. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 574.87

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

ATA DA TRECENTÉSIMA SEXAGÉSIMA QUARTA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

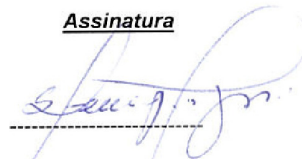
Aos dez dias do mês de Junho de dois mil e quatorze, às 14h00min, nas dependências do Setor de Ciências Biológicas, reuniu-se a banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, composta pelos Profs: Drs. Maria Carolina Quartim Barbosa Elias-Sabbaga (Instituto Butantan), Wanderson Duarte da Rocha (UFPR), Adriana Frohlich Mercadante (UFPR), Olga Meiri Chaim (UFPR), e Stênio Perdigão Fragoso (Orientador e presidente da banca examinadora do ICC), com a finalidade de julgar a Tese da candidata **Monica Visnieski Alcantara**, intitulada: "Caracterização da proteína TCZC3H31 de *trypanosoma cruzi*, uma CCCH ZINC FINGER essencial para metaciclo gênese", para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular. A candidata teve em torno de 45 (quarenta e cinco) minutos para a apresentação e cada examinador, teve um tempo máximo de arguição de 30 (trinta) minutos, seguido de mais 30 (trinta) minutos para resposta da candidata ou de 60 (sessenta) minutos, quando houve diálogo na arguição. O desenvolvimento dos trabalhos seguiu o roteiro de sessão de defesa, estabelecido pela coordenação do Programa, com abertura, condução e encerramento da sessão solene de defesa feito pelo orientador, Dr. Stênio Perdigão Fragoso. Após analisar a tese e arguida a candidata, os membros da banca examinadora deliberaram pela "Aprovada", habilitando-a ao título de Doutora em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Biologia Celular e Molecular. A emissão do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Examinador/Afiliação

Parecer

Assinatura


Prof. Dr. Stênio Perdigão Fragoso
Orientador e presidente da banca
Instituto Carlos Chaves - ICC

Aprovada 

Profa. Dra. Maria Carolina Quartim B. Elias-Sabbaga
Instituto Butantan/SP

Aprovada 

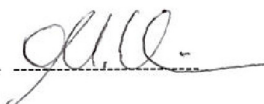
Prof. Dr. Wanderson Duarte da Rocha
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Aprovada 

Profa. Dra. Adriana Frohlich Mercadante
Universidade Federal do Paraná - UFPR

APROVADA 

Profa. Dra. Olga Meiri Chaim
Universidade Federal do Paraná - UFPR

APROVADA 

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Stenio Fragoso, pela oportunidade de trabalhar no Lab 2, pelo projeto com as CCCH *zinc fingers*, por estar sempre presente, pelas segundas chances em momentos de dúvidas e pela amizade.

À minha co-orientadora, Gisele, pelos socorros em momentos de desespero, pela objetividade durante meus devaneios e pelo apoio quando tudo parecia dar errado.

Ao Dr. Christian Macagnan Probst pelas análises de RNA-Seq.

Aos meus queridos amigos do Lab 2: Dani, Alda, Vanessa, Rô, Felipe e àqueles que já não estão mais lá (Lari, Aleatório, Maurício, etc.), pelos momentos de risadas e discussões produtivas. À Didi, pelos conselhos valiosos, pelas palavras de apoio, pelos gestos de amizade naqueles momentos mais complicados (obrigada pelo chocolate, pela ida ao supermercado, etc.), pela disponibilidade a ir a festas e pela companhia em experimentos over night. Ao Fernando, por ter vivido junto os momentos mais difíceis dessa trajetória, dividindo os problemas, buscando soluções e sempre ajudando com os camundongos. À Flavinha por ter estado junto, assim como o Fernando, nos momentos mais complicados, pela amizade, pelas centenas de histórias que só a Flavinha sabe contar e por ter cantado comigo músicas que só eram legais pra nós duas. À Cláudia que, mesmo há menos tempo no lab, já conquistou todo mundo com o alto astral e com quem eu sempre aprendo tanta coisa da vida, com quem eu divido opiniões, crenças, etc.

Aos colegas dos demais laboratórios, Lab REG e Laboratório de Biologia Celular por terem, de um jeito ou de outro, participado do processo. Especialmente ao Haruo, pela disponibilidade em ajudar e por dividir protocolos.

Ao Giovany, pela ajuda com os animais. Aos colegas do preparo, pela disponibilidade e por terem viabilizado a realização de experimentos que seriam difíceis sem eles. Principalmente à Vanessa, minha querida amiga, que viabilizou todas as minhas metaciclogêneses (até me ajudou com a purificação daquelas quase 500 garrafas, abrindo mão dos seus finais de semana!).

À turma das fogueiras: Vanessa (de novo), Mari, Sharoline, Hálisson, Pá, Daisy, por terem tornado o processo muito mais digno, por terem me ajudado a me socializar (hauahuaahua) entre os experimentos de sábado, domingo e feriado e pelas risadas fáceis.

À minha família, que mesmo estando longe sempre se faz presente nos meus valores e na certeza que se tudo der errado eu tenho sempre pra onde correr.

E principalmente ao meu marido, namorado há dez anos, meu melhor amigo e, além de tudo, companheiro de bancada. Por ter participado de TODO o processo, sem exceção. Por estar do meu lado em momentos de incerteza, por ter me visto em meus piores momentos e, ainda assim, escolher ficar. Pelas sugestões e ajuda nos experimentos (também purificou aquelas 500 garrafas comigo, me ensinou a preparar as amostras pro RNAseq, fez análises bioinformáticas e citometrias). Por sempre me ensinar tanta coisa. Por de vez em quando me surpreender com algum gesto inesperado. Por ser essa pessoa linda, que eu admiro tanto! Te amo demais!

*"... Que é ser?
É ter um corpo, um jeito, um nome?
Tenho os três. E sou?
Tenho de mudar quando crescer? Usar outro nome,
corpo e jeito?
Ou a gente só principia a ser quando cresce?
É terrível, ser? Dói? É bom? É triste?
...
Sou obrigado a? Posso escolher?
Não dá para entender. Não vou ser.
Vou crescer assim mesmo. Sem ser Esquecer."*

(Carlos Drummond de Andrade)

RESUMO

O protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente causador da Doença de Chagas, possui características incomuns em relação à organização e expressão gênicas, tais como genes arranjados em *policistrons*, transcritos processados por uma reação de *trans splicing*, ausência promotores clássicos da RNA Polimerase II e poucos fatores de transcrição codificados em seu genoma. Essas características sugerem que a regulação diferencial da expressão gênica, que permitem um ciclo de vida complexo, é controlada por mecanismos pós-transcricionais, principalmente através de elementos em *cis* presentes, em geral, nas regiões não traduzidas (UTRs) dos mRNAs e de proteínas ligadoras de RNA (fatores em *trans*). As proteínas CCCH *zinc finger*, caracterizadas por possuírem três resíduos de cisteína e um de histidina que coordenam um íon zinco na sequência C-X_{7/8}-C-X₅-C-X₃-H, estão entre as proteínas ligadoras de RNA que promovem o controle do processamento, estabilidade, distribuição e tradução dos mRNAs. O objetivo do presente trabalho foi estudar o papel que proteína TcZC3H31 (a qual possui três domínios CCCH *zinc finger*) desempenha durante o ciclo de vida do *T. cruzi*, usando técnicas como nocaute gênico, superexpressão e ribonômica. Essa proteína é expressa quase que exclusivamente nas formas epimastigota e tripomastigota metacíclico. Durante a divisão celular (G2, mitose e citocinese) de epimastigotas foram observadas estruturas com alta concentração dessa proteína, as quais não são observadas nos parasitas em na fase G1 do ciclo celular. Foram obtidos parasitas nocautes para esse gene, os quais foram incapazes de se diferenciar de epimastigota para a forma tripomastigota metacíclico, enquanto parasitas superexpressando TcZC3H31 se diferenciam com maior eficiência do que os parasitas selvagens, sugerindo que essa proteína é essencial para a diferenciação do *T. cruzi*. Ensaio de imunoprecipitação de RNA seguida de sequenciamento (experimentos de ribonômica) permitiram a identificação de mRNAs alvos dessa proteína. A maioria dos genes identificados nessa análise codificam proteíno-quinases. O padrão de expressão de alguns RNAs alvos foi avaliado por PCR quantitativa ao longo do ciclo de vida e nos parasitas mutantes obtidos. Através dessas análises foi possível identificar um grupo de 5 genes para os quais padrão de expressão acompanha ao da proteína TcZC3H31, ou seja, seus mRNAs estão aumentados quando a proteína está superexpressa e diminuídos quando a proteína está ausente (nocaute gênico).

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. CCCH *zinc fingers*. Regulação da expressão gênica. Regulação pós-transcricional. Metaciclogênese.

ABSTRACT

The protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* is the causative agent of chagas disease and presents unusual gene expression and organization features. For example, genes are arranged in *policistrons*, transcripts are processed through a *trans splicing* reaction, and their genome lacks the classic RNA Polymerase II promoters and encodes only a few transcription factors. Those features suggest that the differential regulation of gene expression, required for the complexity of their life cycle, is controlled at the post-transcriptional level, mainly through *cis* control elements, which are generally present in the untranslated regions (UTRs) of mRNAs and *trans*-acting factors, such as RNA-binding proteins (RBPs). The CCCH *zinc finger* proteins are characterized by the presence of three cysteine and one histidine residues that coordinate the zinc ion in the motif C-X_{7/8}-C-X₅-C-X₃-H. They are RNA binding proteins that control mRNA processing, stability, distribution and translation. The aim of the present work was to examine the role that the TcZC3H31 (a three CCCH *zinc finger* motifs-containing protein) plays during the life cycle of *T. cruzi*. TcZC3H31 is almost exclusively expressed in the epimastigote and metacyclic trypomastigote forms. During cell division (G2, mitose and cytokinesis phases) TcZC3H31 was concentrated in structures, which were not observed in the G1 phase. *T. cruzi* null mutant for *TcZC3H31* gene is not able to undergo differentiation to metacyclic trypomastigote forms, whereas TcZC3H31-superepressing parasites differentiate more efficiently than wild type counterpart. These data suggest that TcZC3H31 protein is essential for *T. cruzi* differentiation. RNA immunoprecipitation followed by sequencing (ribonomic assays) identified the TcZC3H31 mRNA targets. Most of them encode for protein kinases. The expression pattern of some targets through the life cycle and in the mutant parasites was measured by quantitative PCR. This analysis enabled the identification of a 5 genes group which showed an expression pattern similar to the expression of TcZC3H31 protein, with an increase of these mRNAs in response to the protein overexpression and a decrease in the protein absence (gene knockout).

Key words: *Trypanosoma cruzi*. CCCH *zinc fingers*. Gene expression regulation. Posttranscriptional regulation. Metacyclogenesis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ESTRUTURA CELULAR DE <i>T. CRUZI</i> EPIMASTIGOTA.....	15
FIGURA 2: REPRESENTAÇÕES DE DOMÍNIOS CCCH <i>ZINC FINGER</i>	23
FIGURA 3: MAPA DO POSICIONAMENTO DO GENE ZC3H31 NO GENOMA DO <i>T. CRUZI</i> EM RELAÇÃO ÀS SUAS REGIÕES INTERGÊNICAS.....	37
FIGURA 4: VETOR PARA EXPRESSÃO EM <i>T. CRUZI</i> P3XFLAG.	46
FIGURA 5: DESENHO ESQUEMÁTICO DOS PLASMÍDEOS PNEO2 E PHYG2.	51
FIGURA 6: MAPA DO CASSETE UPS-NEO-DOWN.....	52
FIGURA 7: MAPA DO CASSETE UPS-HIGRO-DOWN.....	53
FIGURA 8: DESENHO ESQUEMÁTICO DA PROTEÍNA TCZC3H31.....	63
FIGURA 9: PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA 6-HIS-TCZC3H31 EM RESINA DE NI-NTA AGAROSE, A PARTIR DE CORPÚSCULOS DE INCLUSÃO.....	64
FIGURA 10: IMMUNOBLOT COM SORO DE CAMUNDONGO IMUNIZADOS COM A PROTEÍNA 6-HIS-ZC3H31.	64
FIGURA 11: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TCZC3H31 NAS DIFERENTES FORMAS DO CICLO DE VIDA DO <i>T. CRUZI</i> POR <i>IMMUNOLOT</i>	65
FIGURA 12: DETECÇÃO DE TCZC3H31 POR IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	66
FIGURA 13: IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA DETECTAR A PROTEÍNA TCZC3H31 EM EPIMASTIGOTAS EM FASE EXPONENCIAL DE CRESCIMENTO. ..	67
FIGURA 14: IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA DETECTAR A PROTEÍNA ZC3H31 EM EPIMASTIGOTAS SINCRONIZADOS.	68
FIGURA 15: EXPERIMENTO DE FISH COM EPIMASTIGOTAS SINCRONIZADOS. ..	69
FIGURA 16: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DE FUSÃO TCZC3H31-FLAG EM FORMAS EPIMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i>	70
FIGURA 17: IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA DETECTAR A PROTEÍNA FLAG-ZC3H31.....	71

FIGURA 18: DIAGRAMA DAS ETAPAS DE NOCAUTE DO GENE <i>TCZC3H31</i> POR RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA, USANDO OS CASSETES NEO E HIGRO.	72
FIGURA 19: OBTENÇÃO DE <i>T. CRUZI</i> MUTANTE PARA O GENE <i>TCZC3H31</i>	73
FIGURA 20: CURVAS DE CRESCIMENTO DE <i>T. CRUZI</i> EM MEIO LIT.....	74
FIGURA 21: METACICLOGÊNESE DA POPULAÇÃO DE <i>T. CRUZI</i> QUE SUPEREXPRESSA A PROTEÍNA <i>TCZC3H31</i> E DE <i>T. CRUZI</i> MUTANTE PARA O GENE <i>TCZC3H31</i> (KO).....	75
FIGURA 22: DIFERENÇAS MORFOLÓGICAS ENTRE PARASITAS SELVAGENS (WT) E NOCAUTES (KO).	78
FIGURA 23: IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA DETECTAR A PROTEÍNA <i>TCZC3H31</i> DURANTE A O PROCESSO DE METACICLOGÊNESE.....	80
FIGURA 24: IMMUNOBLOT DA IMUNOPRECIPITAÇÃO DE <i>TCZC3H31</i>	81
FIGURA 25: <i>HEAT MAP</i> DEMONSTRATIVO DOS PADRÕES DE EXPRESSÃO DOS MRNAS-ALVOS DE <i>TCZC3H31</i> AVALIADOS POR QPCR.....	86
FIGURA 26: GRUPOS DE GENES COM PADRÃO DE EXPRESSÃO OPOSTO.	87
FIGURA 27: PRINCIPAIS TERMOS ENCONTRADOS NA ANÁLISE DE GO (GENE ONTOLOGY).....	88

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: PRIMERS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS DE QPCR.....	61
TABELA 2: NÚMERO DE SEQUÊNCIAS GERADAS NO SEQUENCIAMENTO.....	82
TABELA 3: NÚMERO DE GENES IDENTIFICADOS COMO SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES ENTRE AS AMOSTRAS DO CONTROLE NEGATIVO E DO IMUNOPRECIPITADO COM ANTI-ZC3H31	82
TABELA 4: GENES SELECIONADOS PARA AS ANÁLISES POR PCR QUANTITATIVA	84

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	13
1.1.1. Doença de Chagas	13
1.1.2. Ciclo de Vida.....	14
1.1.3. Organização celular	15
1.1.4. Organização do genoma do <i>T. cruzi</i>	18
1.1.5. Regulação da expressão gênica.....	20
1.1.6. Proteínas CCCH <i>zinc finger</i> em Tripanosomatídeos	24
2. OBJETIVOS	30
2.1. OBJETIVO GERAL.....	30
2.1.1. Objetivos específicos	30
3. JUSTIFICATIVAS.....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1. PREPARAÇÃO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> CÁLCIO-COMPETENTE.....	33
4.2. TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS CÁLCIO-COMPETENTES.....	33
4.3. SELEÇÃO DE CLONES RECOMBINANTES.....	34
4.3.1. Técnica de análise de clones por palitagem (<i>toothpick</i>)	34
4.3.2. Técnica de PCR de colônia.....	34
4.4. PREPARAÇÃO DE PLASMÍDEO EM PEQUENA ESCALA (MINIPREP)	35
4.5. PURIFICAÇÃO DE DNA UTILIZANDO FENOL/CLOROFÓRMIO	35
4.6. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA SEPARADO EM GEL DE AGAROSE...35	
4.7. EXTRAÇÃO DO DNA DE <i>T. CRUZI</i>	36
4.8. OBTENÇÃO DA PROTEÍNA CCCH <i>ZINC FINGER</i> TCZC3H31 RECOMBINANTE	36
4.8.1. Clonagem do gene <i>TcZC3H31</i> em pET28a	36
4.8.2. Expressão da proteína TcZC3H31 em <i>E. coli</i>	37
4.8.3. Purificação da proteína TcZC3H31 recombinante	38
4.9. IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS COM A PROTEÍNA TCZC3H31 RECOMBINANTE	39
4.10. CULTIVO DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	39
4.10.1. Cultivo de formas epimastigotas	40
4.10.2. Obtenção de tripomastigotas metacíclicos: Metaciclogênese.....	40
4.10.3. Tripomastigotas de cultura de células.....	41
4.10.4. Amastigotas	41
4.10.5. Tratamento com hidroxauréia (sincronização do ciclo celular).....	41
4.11. ENSAIOS DE <i>IMMUNOBLOT</i>	42
4.12. IMUNOFLUORESCÊNCIA	43

4.13. FISH (<i>FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION</i>) E ANÁLISE DE CO-LOCALIZAÇÃO COM TCZC3H31	44
4.14. IMUNOPRECIPITAÇÃO	45
4.15. SUPEREXPRESSÃO DE TCZC3H31 E GFP EM <i>T. CRUZI</i>	46
4.15.1. Amplificação e clonagem do gene <i>TcZC3H31</i> no vetor pNEO3xFlag para superexpressão da proteína.....	46
4.15.2. Transfecção por eletroporação	48
4.15.3. Seleção dos transfectantes.....	49
4.16. OBTENÇÃO DO NOCAUTE DO GENE <i>TCZC3H31</i>	50
4.16.2. Transfecção por Eletroporação e seleção dos mutantes	53
4.17. EXTRAÇÃO DE RNA	54
4.18. AMPLIFICAÇÃO DE RNA MENSAGEIRO	54
4.19. RNA-SEQ	55
4.19.1. Preparo das bibliotecas.....	55
4.19.2. Preparo das <i>beads</i> para seqüenciamento	56
4.20. PCR QUANTITATIVA.....	59
4.20.1. Obtenção do cDNA	59
4.20.2. Reação de qPCR (PCR quantitativa).....	59
5. RESULTADOS	62
5.1. OBTENÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS PARA A PROTEÍNA TCZC3H31.....	63
5.2. CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA TCZC3H31 EM <i>T. CRUZI</i>	65
5.3. OBTENÇÃO DE PARASITAS MUTANTES.....	70
5.3.1. Superexpressão da proteína <i>TcZC3H31</i> em <i>T. cruzi</i>	70
5.3.2. Obtenção de mutantes de <i>T. cruzi</i> para o gene <i>TcZC3H31</i>	71
5.3.3. Caracterização biológica de <i>T. cruzi</i> que superexpressa a proteína <i>TcZC3H31</i> e de <i>T. cruzi</i> mutante para o gene <i>TcZC3H31</i> (KO).....	74
5.4. VERIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA TCZC3H31 NOS ESTÁGIOS INTERMEDIÁRIOS DE DIFERENCIAÇÃO.....	78
5.5. IDENTIFICAÇÃO DE RNAs-ALVOS.....	80
5.5.1. Análises por PCR quantitativa	85
5.5.2. Análise de GO (<i>Gene Ontology</i>)	87
6. DISCUSSÕES	89
7. CONCLUSÕES	97
8. REFERÊNCIAS	98
ANEXO.....	104

1. INTRODUÇÃO

1.1. *TRYPANOSOMA CRUZI*

1.1.1. Doença de Chagas

O protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas, pertence à família Trypanosomatidae (ordem Kinetoplastida), à qual também pertencem os protozoários causadores da doença do sono, *Trypanosoma brucei*, e da leishmaniose, *Leishmania spp.* Juntas, essas doenças são as mais importantes doenças tropicais negligenciadas, e afetam aproximadamente 22 milhões de pessoas ao redor do mundo (RODRIGUES; GODINHO; DE SOUZA, 2014).

Atualmente, a doença de Chagas é considerada endêmica em 21 países principalmente ao longo da América Latina e partes da América do Norte (México e sul dos EUA). Estimativas atuais indicam que 12 milhões de pessoas estão infectadas com o *T. cruzi*. O número de casos em países desenvolvidos não-endêmicos (como Austrália, Canadá, Japão, Espanha, e EUA) aumentou significativamente, tornando a Doença de Chagas um importante problema de saúde pública de interesse global (RODRIGUES; GODINHO; DE SOUZA, 2014).

Triatoma infestans, *Rhodnius prolixus*, e *Triatoma dimidiata* são as três espécies de vetores mais importantes na transmissão do *T. cruzi* para o humano. Estes insetos, também chamados de triatomíneos, pertencentes à ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae, são responsáveis pela grande maioria dos casos da doença registrados. Entretanto, existem mecanismos não vetoriais de transmissão, como pela transfusão sanguínea e transmissão congênita. A doença também pode ser contraída pela ingestão de comida ou líquido contaminado com *T. cruzi* e por acidentes em laboratórios que manipulam parasitas vivos (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

A fase inicial de infecção com *T. cruzi*, chamada fase aguda, dura 4 a 8 semanas e é normalmente assintomática, mas pode apresentar sintomas como

febre, edema subcutâneo, disfunção cardíaca, etc. Entre 5 a 10% dos casos sintomáticos resultam em morte. O tratamento com uma droga anti-parasítica durante esta fase, como o benzonidazol, pode curar a infecção e prevenir a manifestação crônica da doença. Entre os pacientes com a forma crônica, 60 a 70% nunca desenvolve a doença clinicamente aparente, por isso chamada de forma crônica indeterminada da doença de Chagas. Já 30 a 40% dos pacientes desenvolve a forma crônica determinada da doença, de 10 a 30 anos após a infecção, com quadros clínicos incluindo distúrbios cardíacos (megacárdio) e digestivos (megaesôfago e megacólon) (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

1.1.2. Ciclo de Vida

O Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* é composto por estágios que alternam entre o hospedeiro triatomíneo e o hospedeiro mamífero. Na corrente sanguínea do hospedeiro mamífero a forma encontrada é chamada de tripomastigota. Durante o repasto sanguíneo, o triatomíneo ingere os tripomastigotas, que são encaminhados para o estômago do inseto. Ocorre então uma diferenciação desses parasitas para a forma esferomastigota. Essa se diferencia em epimastigota, uma das formas replicativas do parasita. Epimastigotas alongados aderem às células epiteliais do intestino e à cutícula cerosa do reto através de seus longos flagelos para dar início à diferenciação chamada metaciclogênese, que resulta em formas infectivas chamadas tripomastigotas metacíclicas (DE SOUZA, 2002; RODRIGUES; GODINHO; DE SOUZA, 2014; TYLER & ENGMAN, 2001). Essas formas se desprendem do intestino e são excretadas pelo inseto juntamente com suas fezes e podem infectar o hospedeiro mamífero. Nesse estágio os tripomastigotas metacíclicos podem interagir com diferentes tipos celulares através de glicoconjugados na superfície do parasita e vários receptores presentes em células como fibroblastos, macrófagos e células epiteliais. Essa interação leva à sua internalização pela célula hospedeira. Dentro dessas células ocorre a formação do compartimento endocítico chamado vacúolo parasitóforo. Nesse ambiente ácido o longo

tripomastigota metacíclico se diferencia na forma amastigota, outra forma replicativa, a qual é ovoide e possui um flagelo curto. A membrana do parasitóforo então é rompida e os amastigotas são liberados no citoplasma e se transformam em tripomastigotas, que são liberados no ambiente extracelular onde podem infectar outras células ou alcançar a corrente sanguínea (DE SOUZA, 2002; RODRIGUES; GODINHO; DE SOUZA, 2014; TYLER & ENGMAN, 2001).

1.1.3. Organização celular

O *Trypanosoma cruzi* possui as mesmas organelas principais encontradas em outras células eucarióticas, entretanto ele também possui organelas ausentes em outros organismos e apresenta características encontradas exclusivamente em tripanossomatídeos (Figura 1: Estrutura Celular de *T. cruzi* epimastigota..

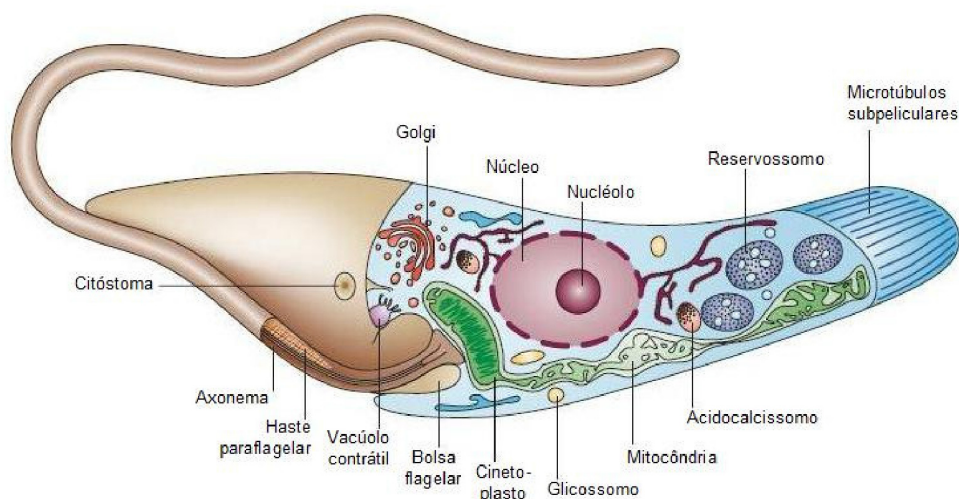


Figura 1: Estrutura Celular de *T. cruzi* epimastigota.

Modificado de (DOCAMPO *et al.*, 2005). Cores meramente ilustrativas.

A superfície celular dos tripanossomatídeos é composta, principalmente, pela membrana plasmática e pelos microtúbulos subpelículares. Pequenos filamentos conectam fortemente os microtúbulos subpelículares, os quais se apresentam espaçados de forma regular, entre si e com a membrana plasmática (DE SOUZA; SANT'ANNA; CUNHA-E-SILVA, 2009). A membrana plasmática do *T. cruzi* epimastigota consiste de quatro domínios: o corpo celular, o flagelo, a

bolsa flagelar e o citóstoma (estrutura exclusiva do subgênero *Schizotrypanum*, o qual inclui o *T. cruzi*, o *T. vespertilionis* e o *T. dionisii*). Foi estabelecido que a endocitose em *T. cruzi* ocorre apenas na forma epimastigota e em regiões definidas: na bolsa flagelar e no citóstoma. A bolsa flagelar é uma grande invaginação da membrana plasmática que está em contato direto com a membrana do flagelo e é a única área na qual os microtúbulos subpeliculares estão ausentes. O complexo citóstoma é uma invaginação de membrana acoplada com alguns microtúbulos especiais que penetram profundamente na célula, podendo alcançar a região do núcleo (DE SOUZA; SANT'ANNA; CUNHA-E-SILVA, 2009).

O flagelo consiste de um axonema 9+2 canônico, o qual é conectado a uma rede de filamentos arranjados paralelamente ao axonema, chamada de haste paraflagelar (PFR), a qual é essencial para a motilidade e viabilidade de alguns estágios do desenvolvimento. O flagelo se origina no corpo basal, que possui nove trios de microtúbulos, e atravessa a bolsa flagelar. Associa-se fortemente ao corpo celular através da zona de ligação flagelar (FAZ), um complexo sistema de conexões de membrana, filamentos e microtúbulos especializados (RODRIGUES; GODINHO; DE SOUZA, 2014).

Nos tripanosomatídeos uma única mitocôndria é encontrada, com uma matriz densa e dispersa e com cristas tubulares finas distribuídas irregularmente. Dependendo do ambiente e das fontes nutricionais disponíveis, a mitocôndria pode preencher um grande espaço do volume celular. O DNA mitocondrial é encontrado em uma estrutura incomum chamada cinetoplasto, o qual se localiza dentro da matriz mitocondrial, perpendicular ao eixo do flagelo. Nas formas epimastigotas e amastigotas de *T. cruzi* o cinetoplasto forma uma estrutura em barra, enquanto nas formas tripomastigotas apresenta-se arredondado. O kDNA dos tripanosomatídeos é formado por dois tipos de moléculas circulares, os maxicírculos e os minicírculos, os quais são concatenados para formar uma rede única. Os maxicírculos são estruturalmente e funcionalmente análogos ao DNA mitocondrial de eucariotos superiores, codificando rRNAs e subunidades de complexos da cadeia respiratória. Os minicírculos codificam RNAs guias que

modificam os transcritos dos maxicírculos, num processo conhecido como edição de RNA (DE SOUZA; ATTIAS; RODRIGUES, 2009).

Os reservosomos são organelas encontradas exclusivamente no subgênero *Schizotrypanum*. Cada epimastigota possui vários reservosomos, principalmente na região posterior da célula. Possuem uma única membrana, de forma geralmente globular, mas podem apresentar-se assimétricos. Sua principal função é estocar macromoléculas ingeridas no processo de endocitose, mas também concentram hidrolases lisosomais, como a cruzipaina e a serino carboxipeptidase. Portanto são sítios de degradação e regulação proteica, com papel importante nos processos de digestão, autofagia e reciclagem. O pH no interior dessas organelas é 6.0, mantido pela atividade próton-ATPases (DE SOUZA; SANT'ANNA; CUNHA-E-SILVA, 2009).

Os glicosomos são organelas esféricas, com uma membrana única e uma densa matriz granular. O número e volume ocupado pelos glicosomos no citoplasma variam de acordo com a espécie e com o estágio do desenvolvimento do Kinetoplastídeo. Estão envolvidos em diversas funções similares às dos peroxisomos de eucariotos superiores, como a β -oxidação de ácidos graxos, alongamento de cadeias de ácidos graxos, metabolismo de carboidratos, biosíntese de lipídios, via de salvamento de purinas, biosíntese de pirimidinas, metabolismo de espécies reativas de oxigênio, etc (RODRIGUES; GODINHO; DE SOUZA, 2014).

Os acidocalcisomos são organelas ácidas e densas com alta concentração de fósforo em forma de pirofosfato e polifosfato (polyP), cálcio e outros cátions. As principais funções dessas organelas são a estocagem de vários cátions e fósforo, o metabolismo do pirofosfato e de polifosfato, a regulação da homeostase de cálcio, a manutenção do pH intracelular e a osmoregulação, colaborando com o vacúolo contrátil. Diferentes bombas e canais são encontrados em sua membrana única, como Ca^{2+} -ATPase, V- H^{+} -ATPase, trocadores $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$, trocadores $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$, canais de cloro e aquaporinas. Além disso, são encontradas em sua matriz eletrondensa enzimas envolvidas no metabolismo de pirofosfato e polifosfato. São distribuídos geralmente de forma randômica, mas estão

preferencialmente localizados próximos à periferia celular e variam em termos de proporção ao corpo celular dependendo da espécie e do estágio do desenvolvimento. Em alguns momentos aparecem em contato com os microtúbulos subpeliculares, com a mitocôndria, com o núcleo, com os corpos lipídicos e com o vacúolo contrátil (RODRIGUES; GODINHO; DE SOUZA, 2014).

Parasitas da família Trypanosomatidae possuem um vacúolo contrátil (CV) associado à bolsa flagelar. Nessas organelas estão presentes diversas proteínas envolvidas em muitos processos celulares, como metabolismo de proteínas e aminoácidos, metabolismo energético, organização e estrutura celular, transporte de proteínas e tráfico intracelular, etc. A presença do vacúolo contrátil é essencial para a sobrevivência e rápida adaptação a diferenças na pressão osmótica, contribuindo para a regulação do volume celular em condições de *stress* hiposmótico, além de regular a homeostase de Ca^{2+} e atuar no transporte de proteínas através da membrana plasmática (RODRIGUES; GODINHO; DE SOUZA, 2014).

1.1.4. Organização do genoma do *T. cruzi*

O genoma diplóide do *T. cruzi* tem um tamanho estimado entre 106,4Mb e 110,7Mb e está organizado em 41 cromossomos (EL-SAYED, M. S. & YOUNESIAN, 2005; WEATHERLY; BOEHLKE; TARLETON, 2009). Pelo menos 50% do genoma é composto por sequências repetitivas, contendo grandes famílias gênicas de proteínas de superfície, retrotransposons e repetições subteloméricas. Há um alto grau de sintenia entre as espécies de tripanosomatídeos, ou seja, existe conservação na ordem dos genes (EL-SAYED, N. M. et al., 2005).

O genoma haploide contém aproximadamente 12000 genes geralmente arranjados em longas aglomerações de dezenas a centenas de genes na mesma fita de DNA, organização essa também observada em outros tripanosomatídeos (EL-SAYED, M. S. & YOUNESIAN, 2005). A transcrição de genes codificadores de

proteínas, apesar de os mesmos não possuírem necessariamente qualquer relação funcional, é policistrônica, iniciada pela RNA polimerase II de forma bidirecional dentro das regiões divergentes de troca de fita (SSRs – *strand switch regions*) e finalizada onde as regiões de troca de fita se convergem, locais que geralmente contêm genes para tRNA, rRNA, e/ou snRNA, os quais são transcritos pela RNA polimerase III (IVENS et al., 2005). Foi demonstrado que os sítios de início de transcrição são caracterizados por nucleossomos contendo as variantes de histona H2AZ, H2BV e H4K10ac (Histona H4 acetilada), os quais são menos estáveis que os nucleossomos canônicos e, por isso, facilitam o acesso da RNA polimerase II a esses sítios (SIEGEL et al., 2009). A única sequência promotora de RNA polimerase II caracterizada até o momento em tripanosomatídeos é a que dirige a expressão do SL RNA (*spliced-leader RNA*). Ao contrário da maioria dos eucariotos, nos quais cada gene possui seu próprio promotor, os sítios de início de transcrição em tripanosomatídeos parecem ser regiões ricas em G e C que devem direcionar a transcrição bidirecional de forma constitutiva (MARTINEZ-CALVILLO et al., 2010).

O domínio C-terminal (CTD) da subunidade maior da RNA polimerase II de tripanosomatídeos não possui a repetição de heptapeptídeos característica da RNA polimerase II da maioria dos eucariotos, a qual é fosforilada em aminoácidos específicos e possui um importante papel na regulação do início, do alongamento e do término da transcrição. Além disso, poucos fatores gerais de transcrição foram identificados em tripanosomatídeos. Enquanto alguns possuem alta identidade de sequência com seus ortólogos em levedura e vertebrados, outros apresentam um baixo grau de similaridade (MARTINEZ-CALVILLO et al., 2010).

Os mecanismos de processamento do pré-mRNA de tripanosomatídeos também apresentam algumas diferenças em relação à maioria dos eucariotos. Apesar de possuírem a maquinaria de *cis-splicing*, apenas dois genes de *T. brucei* possuem um íntron de *cis-splicing* convencional: o gene codificante da poli(A) polimerase e o gene de uma RNA helicase hipotética. Outra diferença é a presença de trans-splicing, um mecanismo utilizado para gerar mRNAs individualizados a partir dos transcritos policistrônicos. Como resultado desse

processamento, todos os mRNAs dos tripanosomatídeos carregam uma sequência comum de 39 nucleotídeos chamada de spliced leader (SL). Essa sequência é derivada de um pequeno RNA, o SL RNA, o qual constitui uma snRNP (pequena ribonucleoproteína nuclear) que aparentemente substitui a U1snRNP, reconhecendo o pré-mRNA através do pareamento com o sítio de splicing 5' e agindo como um éxon (PREUSSER; JAE; BINDEREIF, 2012). Ao contrário da estrutura em laço observada no cis-splicing, nesta reação de transesterificação forma-se uma estrutura intermediária em Y (LIANG et al., 2003).

O SL RNA possui em sua extremidade 5' um cap modificado, chamado cap4, o qual é hipermetilado. As metilações ocorrem nas riboses dos quatro primeiros nucleotídeos e nas bases do primeiro e quarto nucleotídeos (PREUSSER; JAE; BINDEREIF, 2012). A poliadenilação ocorre concomitantemente ao *trans-splicing*. Os pré-mRNAs em tandem (que compõem o policístron) são espaçados por uma região intergênica; a poliadenilação 3' do primeiro gene ocorre após o segundo gene receber o SL RNA capeado, e assim sucessivamente, resultando em mRNAs maduros e individualizados (PALENCHAR & BELLOFATTO, 2006).

1.1.5. Regulação da expressão gênica

Aparentemente a transcrição de todos os genes codificadores de proteínas pela RNA polimerase II de tripanosomatídeos ocorre em níveis similares. Entretanto, sabe-se que mesmo genes adjacentes, de um mesmo policístron, podem apresentar diferentes níveis de expressão e até mesmo padrões de regulação relacionados ao desenvolvimento. Isso, aliado ao fato de que o controle da transcrição guiado por promotores está ausente para a grande maioria dos genes dos tripanosomatídeos, implica que os principais mecanismos que contribuem para a regulação da expressão gênica ao longo do complexo ciclo de vida dos tripanosomatídeos devem estar relacionados à eficiência na maturação do pré-mRNA, ao controle da meia-vida do mRNA, à eficiência na tradução e à meia vida da proteína. Portanto, a regulação de genes individuais parece ser um

mecanismo combinatorial baseado na interação de fatores atuantes em *trans* (fatores externos às moléculas de mRNA) com elementos em *cis* (sequências dentro das moléculas de mRNA) em cada mRNA (DE GAUDENZI *et al.*, 2011; KRAMER & CARRINGTON, 2010).

Alguns fatores regulatórios em *cis* foram encontrados em tripanosomatídeos. Diferentes elementos desestabilizadores ricos em U foram encontrados nas regiões 3'UTR (*Untranslated regions*) de diversos transcritos regulados durante o desenvolvimentos nos TriTryps. Em *T. brucei* foram encontrados elementos ricos em AU em mRNAs específicos de procíclicos. Elementos maiores (100-500 nucleotídeos) também foram descritos, como o elemento regulatório de 450 nucleotídeos responsável pela expressão do mRNA de amastina especificamente nas formas amastigotas em *Leishmania spp* (DE GAUDENZI *et al.*, 2011).

Os fatores em *trans* são nomeados de acordo com o tipo de domínios estruturais envolvidos na ligação ao RNA: proteínas contendo domínio RRM, proteínas CCCH *zinc finger* e proteínas PUF. Outros domínios como o KH (K homology domain), o motivo rico em arginina e glicina (RGG) ou o domínio de choque frio (CSD) ainda não foram bem caracterizados (KRAMER & CARRINGTON, 2010).

1.1.5.1. Motivos de ligação a RNA presentes em proteínas ligadoras de RNA

O Motivo de Reconhecimento de RNA (RRM) é o motivo de ligação a RNA mais abundante em eucariotos. Ele consiste de aproximadamente 90 aminoácidos com uma topologia $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$. As folhas- β formam o principal elemento de ligação ao RNA. Os Kinetoplastídeos possuem aproximadamente 75 proteínas contendo o domínio RRM. Poucas delas (entre 13 e 21) apresentam ortólogos reconhecíveis em outros eucariotos, incluindo as proteínas ligadoras de poli(A), os fatores de iniciação EIF3B e o fator de *splicing* U2AF35. Cinco dessas proteínas únicas de kinetoplastídeos foram caracterizadas e têm um papel na regulação da

estabilidade do mRNA: 3 proteínas com um único domínio RRM (UBP1, UBP2, RBP3), uma com dois domínios (DRBD3/PTB1) e uma com quatro domínios RRM (DRBD4/PTB2) (KRAMER & CARRINGTON, 2010). O primeiro fator em *trans* identificado em kinetoplastídeos foi a TcUBP1 (*T. cruzi* uridine binding protein 1). TcUBP1 liga-se às AREs do mRNA da proteína TcSMUG (small mucins) *in vitro*, atuando como um fator de desestabilização (D'ORSO & FRASCH, 2001).

As proteínas Puf, assim nomeadas devido às proteínas Pumilio (*D. melanogaster*) e Fem-3-binding factor (*Caenorhabditis elegans*) que são os membros fundadores desta família, regulam a expressão do mRNA ligando-se a sequências específicas nas 3' UTRs e recrutando proteínas que mediam a repressão da tradução do mRNA ou sua degradação. Ao contrário de outras proteínas ligadoras de RNA, a sequência de reconhecimento do RNA pelas proteínas Puf pode ser predita devido a essa ligação ser dependente das cadeias laterais dos aminoácidos presentes nesses motivos e, em alguns casos, permitem a manipulação da sequência dessas proteínas para alterar a preferência pela sequência alvo. Em *T. cruzi* 10 proteínas Puf foram analisadas e agrupadas de acordo com a preferência com a qual elas se ligam a sítios previamente descritos: os elementos *nanos response* de 32pb (NRE) presentes nas 3' UTR de mRNAs regulados por Pufs de *Drosophila*. O Grupo1 (do qual fazem parte TcPUF1 e TcPUF2) é composto por proteínas com capacidade de ligação à sequência NRE inteira. O Grupo2 (com as proteínas TcPUFs3-6 e TcPUF9) contém proteínas com capacidade de ligação a pelo menos um motivo conservado dentro da sequência NRE, enquanto as proteínas do Grupo3 (TcPUFs7-8, TcPUF10) são as mais diversas e improváveis de se ligarem ao NRE. Interações da TcPUF1 e TcPUF6 com NRE foram confirmadas experimentalmente. Em *T. brucei* foram identificadas TbPUF1/TbPUF6, TbPUF9 e TbPUF7 (KRAMER & CARRINGTON, 2010).

As proteínas CCCH *zinc finger* são caracterizadas pelo domínio contendo três resíduos de cisteína e um resíduo de histidina coordenando um íon zinco, geralmente numa sequência Cys-X₈-Cys-X₅-Cys-X₃-His (X representa qualquer aminoácido) (Figura 2: Representações de domínios CCCH *zinc finger*.. O RNA é reconhecido pelos módulos CCCH *zinc finger* através de combinações entre

pontes de hidrogênio e interações de empilhamento com as bases, como observado para outras proteínas ligadoras de RNA. Entretanto, o reconhecimento específico da sequência de RNA parece ser mediado principalmente pela cadeia principal polipeptídica, ao contrário de outras proteínas ligadoras de RNA cujo reconhecimento é realizado pelas cadeias laterais de aminoácidos. As interações específicas com o RNA são formadas em conjunto pelos elementos da estrutura secundária, pela coordenação do íon zinco, pelas pontes de hidrogênio entre a cadeia lateral e a cadeia principal e pelas pontes de hidrogênio dentro da própria cadeia principal (HALL, 2005).

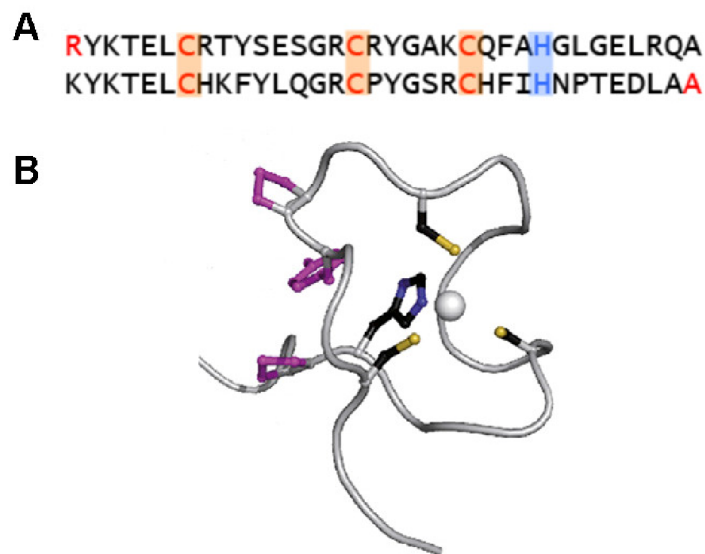


Figura 2: Representações de domínios CCCH zinc finger.

A: Composição aminoacídica dos dois domínios CCCH *zinc finger* presentes na proteína TTP. Em laranja estão destacadas as cisteínas e em azul a histidina que coodenam o íon Zn^{2+} (LEE & MICHEL). **B:** Estrutura obtida por NMR (*nuclear magnetic resonance spectroscopy*) do domínio CCCH *zinc finger* número 2 da proteína Nab2p, a qual possui 7 domínios domínios CCCH *zinc finger* e é uma ligadora de caudas poli-A de mRNAs. Em amarelo estão indicadas as cisteínas. Em azul está indicado o anel imidazólico da histidina. A esfera central indica o íon Zn^{2+} (MARTINEZ-LUMBRERAS *et al.*, 2013).

A proteína TTP (Tristetraprolina) foi o primeiro membro descrito dessa família. Essa proteína de mamíferos contém dois domínios CCCH *zinc finger* em tandem e liga-se ao mRNA do TNF (Tumor Necrosis Factor Alpha) em uma região contendo o motivo UUAUUUAUU em sua 3'UTR, causando a sua desestabilização através de um mecanismo de ação dependente do recrutamento de fatores de adenilação de decapeamento pela TTP (BROOKS & BLACKSHEAR, 2013).

Outro membro dessa família é a proteína Regnase1, também conhecida como ZC3H12, a qual possui um único domínio CCCH *zinc finger*. Sua expressão é induzida por ligantes de receptores TLR (Toll-like receptors), interleucina 1 β e MCP-1. Possui ação desestabilizadora sobre mRNAs de interleucinas, desempenhando um papel importante na regulação da resposta inflamatória em mamíferos (UEHATA & AKIRA, 2013).

Proteínas com domínios CCCH *zinc finger* em tandem (TZF) de plantas foram descritas como reguladoras de diversos eventos como germinação (AtTZF4), tolerância a sal (AtSZF1, AtSZF2 e GhZFP1), controle da senescência (OsDOS) e até mesmo resistência a patógenos (GhZFP1), demonstrando a importância e diversidade de ação dessas proteínas (POMERANZ; FINER; JANG, 2011).

1.1.6. Proteínas CCCH *zinc finger* em Tripanosomatídeos

Recentemente, através de uma análise *in silico* dos genomas disponíveis dos protozoários Kinetoplastídeos *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania major*, foi possível estimar o número de proteínas CCCH *zinc finger*: 48 em *Trypanosoma brucei*, 51 em *Trypanosoma cruzi* e 54 em *Leishmania major* (KRAMER; KIMBLIN; CARRINGTON, 2010). A mesma análise também possibilitou conhecer a fração de proteínas com mais de um motivo CCCH, Outros dados interessantes são que a proteína hipotética ortóloga de Mex67 e uma proteína 3' exorribonuclease específica de *Leishmania* possuem um motivo CCCH que não é encontrado em suas ortólogas em outros eucariotos. Kinetoplastídeos também possuem apenas um pouco mais de proteínas CCCH em comparação com outros protozoários, embora esse número seja bem maior que em levedura. Além disso, a vasta maioria de CCCHs são únicas de kinetoplastídeos ou de um subgrupo interno (KRAMER; KIMBLIN; CARRINGTON, 2010).

Em 2001 as duas primeiras proteínas da família CCCH *zinc finger*, cada uma com menos de 140 aminoácidos de comprimento, foram identificadas em *Trypanosoma brucei*: TbZFP1 e TbZFP2 (HENDRIKS et al., 2001). O mRNA de

TbZFP1 é expresso em níveis baixos nas formas sanguíneas de *T. brucei*, mas sua expressão é enriquecida durante a diferenciação e mantida na forma procíclica (HENDRIKS et al., 2001). Um trabalho subsequente demonstrou que o silenciamento do gene TbZFP1 das formas sanguíneas compromete o reposicionamento do genoma mitocondrial, um evento específico no programa de diferenciação rigidamente regulado. Apesar disso, outros eventos que ocorrem antes e depois desse evento, como a troca dos antígenos de superfície, permaneceram intactos (HENDRIKS & MATTHEWS, 2005).

Em *Trypanosoma cruzi* a ortóloga dessa proteína, chamada TcZFP1, reconhece ribopolímeros ricos em C *in vitro*. O gene TcZFP1 é diferencialmente expresso ao longo da metaciclologênese, sugerindo seu envolvimento na modulação estágio-específica de vias de regulação de mRNA envolvidos na diferenciação das formas infectivas do parasita (MORKING et al., 2004).

Quando a expressão da proteína TbZFP2 é drasticamente diminuída nas formas sanguíneas de *T. brucei* por RNA de interferência ocorre uma inibição do crescimento dessas formas (HENDRIKS et al., 2001). Quando ocorre o oposto, ou seja, sua expressão é aumentada pela inserção de uma cópia ectópica desse gene, há um remodelamento do citoesqueleto da forma procíclica do *Trypanosoma* similar a eventos morfogênicos de diferenciação. Esse fenótipo, nomeado "nozzle", envolve a extensão polar de microtúbulos ao final posterior da célula (posterior ao cinetoplasto) (HENDRIKS et al., 2001).

A proteína TcZFP2 foi caracterizada como uma reguladora pós-transcricional da diferenciação em *Trypanosoma cruzi*. Foi detectada em formas amastigotas celulares derivadas de cultura e em formas tripomastigotas, mas quantidades menores foram detectadas em formas tripomastigotas metacíclicas. Através de imunoprecipitação de RNA seguida de análise de microarranjo, mRNAs alvos de TcZFP2 foram identificados. Esses RNAs têm sua expressão aumentada em tripomastigota metacíclicos. A maior parte dos genes identificados são de proteínas mitocondriais codificadas no núcleo, proteínas motores e proteínas envolvidas no transporte de RNA. Foi demonstrado também que TcZFP2 liga-se a sequências ricas em A *in vitro* (MORKING et al., 2012).

Em 2006 foi identificado um quadro de leitura aberto (ORF) codificando para uma proteína com 130 aminoácidos contendo um domínio CCCH voltado para sua região C-terminal e um domínio WW de interação protéica em sua região N-terminal (PATEROU et al., 2006). A predita proteína, chamada TbZFP3, também possui 3 cópias intactas do motivo de ligação a RNA RGG posicionado centralmente entre os domínios WW e CCCH. A expressão ectópica dessa proteína fusionada a uma etiqueta Ty (TbZFP3-Ty), em procíclicos, produziu células alongadas que lembravam o fenótipo “*nozzle*” previamente observado após a expressão ectópica de TbZFP2. Esse fenótipo não é observado quando há superexpressão da proteína com o domínio WW ou CCCH ausente ou com o domínio CCCH modificado para CCAH indicando que as modificações morfológicas observadas são dependentes de ambos os domínios intactos (PATEROU et al., 2006). Foi também demonstrado que essa proteína associa-se a frações polissomais em *T. brucei* procíclico, sugerindo um papel como reguladora da tradução nessas formas, mas esta associação não ocorre nas formas sanguíneas. Além disso, foram mostrados indícios de que essa proteína interage com as proteínas TbZFP1 e TbZFP2 (PATEROU et al., 2006).

Um importante evento da diferenciação do *T. brucei* envolve a troca dos antígenos de superfície VSGs (variant surface glycoproteins), específicas da forma sanguínea, pelas chamadas proteínas prociclinas. A proteína TbZFP3 associa-se de forma sequência-específica com os mRNAs das prociclinas GPEET e EP1. A associação com o mRNA da EP1 é através de sua região 3'UTR, interação essa dependente da integridade de duas regiões bem caracterizadas: o ‘*Loop II*’ (responsável pelo controle negativo da expressão dessa proteína) e a região ‘*16mer stem loop*’ (responsável pelo controle positivo) do mRNA de EP1. A proteína TbZFP3 deve competir com um regulador negativo que se liga ao Loop II, já que a sua superexpressão resulta em um aumento da expressão de EP1. Ao mesmo tempo, essa superexpressão causa uma diminuição nos níveis do mRNA da GPEET. Esse foi o primeiro trabalho demonstrando a regulação de proteínas de superfície por fatores reguladores associados a mRNAs (WALRAD, P. et al., 2009).

Foi realizada uma análise global subsequente dos transcritos associados ao complexo TbZFP3mRNP, identificados através de imunoprecipitação de RNA. Alguns desses transcritos tiveram sua expressão avaliada, através de sequenciamento e de PCR quantitativa, em *T. brucei* com a expressão da proteína TbZFP3 aumentada de forma ectópica. Esse exame revelou um aumento na abundância dos mesmos através do mecanismo de estabilização do mRNA, mecanismo esse dependente da integridade do domínio CCCH *zinc finger* (WALRAD, P. B. et al., 2012). Uma análise por bioinformática das sequências 3'-UTR dos transcritos selecionados revelou um enriquecimento de motivos que distinguem as 3'-UTRs de EP1 e GPEET (as quais são alvos da TbZFP3) de EP2 e EP3 (não são reguladas pela TbZFP3), confirmando que a interação com os primeiros era de forma sequência-específica. Além disso, essas análises sugerem a existência de um possível *regulon* (WALRAD, P. B. et al., 2012).

Outra proteína CCCH *zinc finger* recentemente caracterizada em *Trypanosoma brucei* é a ZC3H18, com 41kDa e dois domínios CCCH. É uma proteína presente em outros Trypanosomas e em *Leishmania*, cuja região N-terminal até o segundo domínio *zinc finger* é bastante conservada dentro de Kinetoplastidae, enquanto a região C-terminal é mais divergente (BENZ et al., 2011). O silenciamento gênico de ZC3H18 por RNAi causou um atraso de 4-8h no aparecimento do mRNA e da proteína EP, causando um atraso na transformação da forma sanguínea para a procíclica (BENZ et al., 2011).

A proteína TbZC3H20 de *Trypanosoma brucei* é estabilizadora de dois transcritos regulados ao longo do desenvolvimento, os quais codificam uma proteína carreadora mitocondrial (MCP12) e uma trans-sialidase (TS-like E). TbZC3H20 é demonstrada como uma proteína de ligação a RNA que está enriquecida na forma procíclica de *T. brucei* e foi a primeira proteína dessa família descrita como moduladora da abundância de mRNA em Trypanosomas estabilizando ao invés de desestabilizar mRNAs alvos (LING; TROTTER; HENDRIKS, 2011).

Em *T. brucei* também foi analisada a relevância funcional de duas CCCH *zinc fingers*, TbZC3H12 e TbZC3H13. Ambas possuem apenas um CCCH.

TbZC3H12 é conservada em todos os genomas dos parasitas Kinetoplastida sequenciados até o momento, enquanto ZC3H13 está presente em todos os Trypanosomas salivares (*T. brucei*, *T. congolense* e *T. vivax*). RNAi contra ZC3H13 causou um defeito brando no crescimento de Trypanosomas na forma sanguínea, mas não causou efeito na competitividade das formas procíclicas em diferenciação (OUNA et al., 2012). Por outro lado, a expressão de versões de ambas as proteínas com etiqueta parece ser tóxica para a forma procíclica. O parceiro potencial de interação mais interessante de ZC3H12 é a exorribonuclease XRNA, equivalente à Xrn1 de levedura e humana, importante na degradação de mRNA e que pode ser encontrada em corpos de processamento (*Processing bodies* ou *P-bodies*). Já a proteína TbZC3H13 contendo uma etiqueta TAP foi copurificada com uma proteína hipotética com domínio SET e com várias proteínas ribossomais (OUNA et al., 2012).

Em 2013 Droll e colaboradores descreveram uma CCCH *zinc finger* de *T. brucei*, com 364 aminoácidos e peso molecular de 39,6kDa, chamada ZC3H11. Essa proteína é capaz de se ligar a vários mRNAs de proteínas de choque térmico, é essencial para as formas sanguíneas e para a recuperação das formas procíclicas após choque térmico. Ela se liga a motivos AUU das regiões não traduzidas de seus mRNAs alvos. A diminuição dessa proteína em formas sanguíneas causa a diminuição dos níveis de RNAs de proteínas de choque térmico (DROLL et al., 2013).

Portanto, as proteínas CCCH *zinc finger* estão associadas a diversos eventos celulares de tripanosomatídeos, desde eventos morfológicos de diferenciação celular até a regulação da resposta a *stress* térmico. O objetivo do presente estudo é caracterizar outra CCCH *zinc finger* de *Trypanosoma cruzi*, a TcZC3H31. O gene que codifica para essa proteína (ID: Tc00.1047053506009.10) foi inicialmente identificado através de uma análise do genoma do *T. cruzi* com o banco de dados Pfam (www.pfam.sanger.ac.uk), que agrupa proteínas por famílias. Numa análise inicial foram identificados 13 genes hipotéticos que codificam para proteínas CCCH *zinc fingers*, dentre eles o *TcZC3H31*. Neste trabalho foi demonstrado que esta proteína, a qual possui três domínios CCCH, é

expressa mais significativamente nas formas epimastigota e tripomastigota metacíclica de *T. cruzi*. Também foram obtidas linhagens mutantes de *T. cruzi*, com o gene *TcZC3H31* deletado ou superexpressando o mesmo. A linhagem nocaute do gene é incapaz de completar a diferenciação de epimastigota para tripomastigota metacíclico (metaciclogênese), enquanto a linhagem com superexpressão do gene se diferencia em número mais significativo em comparação com as linhagens controle (selvagem e superexpressando a proteína GFP). Portanto, esta proteína demonstrou-se essencial para a metaciclogênese de *T. cruzi*.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar a proteína TcZC3H31, contendo domínios CCCH *zinc finger*, e avaliar seu papel na definição de padrões de expressão gênica em *Trypanosoma cruzi*.

2.1.1. Objetivos específicos

Analisar a expressão da proteína TcZC3H31 em diferentes formas evolutivas do *T. cruzi*, através de ensaios de *immunoblot* e imunofluorescência, a partir de antisoros produzidos contra a proteína recombinante.

Avaliar o efeito da deleção do gene TcZC3H31 para o metabolismo do parasita, através de técnicas de nocaute gênico por recombinação homóloga.

Avaliar o efeito da superexpressão do gene TcZC3H31 para o metabolismo do parasita, através da inserção de uma cópia ectópica do mesmo.

Identificar os mRNAs alvos aos quais essa proteína se liga, através de experimentos de ribonômica.

Avaliar os perfis de expressão dos mRNAs alvos identificados ao longo do ciclo de vida do parasita e nos parasitas mutantes.

3. JUSTIFICATIVAS

O *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas, pertence à família Trypanosomatidae (ordem Kinetoplastida), à qual também pertencem os protozoários causadores da doença do sono, *Trypanosoma brucei*, e da leishmaniose, *Leishmania* spp. Possui um complexo ciclo de vida, com formas celulares que alternam entre o hospedeiro invertebrado (vetor) e vertebrado. No hospedeiro triatomíneo a forma replicativa é chamada epimastigota e a forma infectiva tripomastigota metacíclico. No hospedeiro mamífero a forma replicativa chama-se amastigota e a infectiva tripomastigota sanguíneo. Os genes desses protozoários são arranjados em policistrons que são co-transcritos pela RNA polimerase II. Os transcritos são subsequentemente processados por uma reação de *trans splicing* na região 5', para a adição do '*spliced leader*', e para a poliadenilação na região 3', resultando em mRNAs maduros e independentes (CLAYTON, 2002). O início da transcrição parece não ser regulado, já que promotores clássicos da RNA Polimerase II estão ausentes e poucos fatores de transcrição são codificados em seus genomas (PALENCHAR & BELLOFATTO, 2006). Essas características sugerem que a regulação diferencial da expressão gênica nos tripanosomatídeos é controlada por mecanismos pós-transcricionais. Portanto para se entender as vias de regulação que controlam as alterações ocorridas nos processos de diferenciação é necessário conhecer os elementos reguladores em *cis* (dentro das moléculas de mRNAs) e os elementos em *trans* (externos ao mRNA), compostos em sua maior parte por proteínas ligadoras de RNA (RBPs). Desse grupo fazem parte as proteínas da família CCCH *zinc finger*, caracterizadas por possuírem três resíduos de cisteína e um de histidina que coordenam um íon zinco na sequência C-X7/8-C-X5-C-X3-H com atividade de ligação a RNA (HALL, 2005). Apesar de ser estimado a existência de 51 genes dessa família no genoma do *T. cruzi*, (KRAMER; KIMBLIN; CARRINGTON, 2010) as únicas proteínas CCCH *zinc finger* até o momento descritas nesse protozoário são as proteínas TcZFP1 e TcZFP2. O objetivo desse trabalho, portanto, é caracterizar uma proteína dessa família, a TcZC3H31, avaliar seu papel como

reguladora da expressão gênica de *Trypanosoma cruzi* e identificar os eventos celulares dos quais ela participa.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. PREPARAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* CÁLCIO-COMPETENTE

As cepas de *E. coli* DH5 α (Invitrogen) e BL21(DE3)STAR (Novagen) cálcio-competentes foram preparadas de acordo com protocolos pré-estabelecidos (SAMBROOK & RUSSELL, 2006). Essas cepas bacterianas foram cultivadas em 10 mL de meio LB (triptona 10 mg/ml, extrato de levedura 5 mg/ml, NaCl 10 mg/ml) por 16 horas a 37 °C com agitação constante (pré-inóculo). Após esse tempo, 1 mL do pré-inóculo foi inoculado em 100 mL de meio LB que foi então incubado a 37 °C, com agitação constante (160 rpm), até que a cultura atingisse a fase exponencial de crescimento ($DO_{600nm} = 0,6$). Em seguida a cultura foi resfriada no gelo por 15 min. As células foram coletadas por centrifugação a 8.000 x *g* por 6 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em uma solução gelada de CaCl₂ 100 mM/HEPES 10 mM pH 7,0, em um volume final correspondente a metade do volume da cultura original. As células foram novamente coletadas por centrifugação, nas mesmas condições anteriores, ressuspensoas gentilmente na solução anterior (acrescida de glicerol 10%) (1/50 do volume da cultura original) e mantidas no gelo por 2 h sendo, em seguida, armazenadas a -70 °C.

4.2. TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS CÁLCIO-COMPETENTES

Plasmídeos provenientes de mini-preparações ou de reações de ligação foram misturados com 100 μ L da suspensão de *E. coli* cálcio-competente, por 30 min em gelo. Após esse período, as suspensões bacterianas foram submetidas a choque térmico a 42 °C por 1 min e imediatamente colocadas em gelo por 2 min, seguida da adição de 1 mL de meio LB, com incubação sob agitação constante a 37 °C por 1 h. Alíquotas de 50 μ L a 200 μ L foram espalhadas em placas contendo meio LB sólido (LB contendo Ágar 1,7%), acrescido do antibiótico de seleção, e incubadas à 37 °C por 18 h.

4.3. SELEÇÃO DE CLONES RECOMBINANTES

4.3.1. Técnica de análise de clones por palitagem (*toothpick*)

As colônias foram coletadas com o auxílio de palitos de dente (*toothpick*) estéreis e transferidas para o fundo de tubos de micro-centrífuga e para a superfície do meio LB sólido (com o antibiótico de seleção do plasmídeo) para a obtenção de uma réplica das colônias analisadas (placa-mãe). A cada um dos tubos foram acrescentados 15 μ L do tampão de lise (NaOH 50 mM, Glicerol 5%, SDS 0,5%, EDTA 5 mM e azul de bromofenol 0,025 %). Os tubos foram incubados em banho-maria a 65 °C por 10 min. As amostras então foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%, usando o plasmídeo nativo (sem inserto) como controle. Posteriormente, o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 μ g/mL) por aproximadamente 20 min, lavado com água e analisado sob luz ultravioleta (310 nm). Os géis foram fotografados no sistema de fotodocumentação L-Pix (Loccus Biotecnologia).

4.3.2. Técnica de PCR de colônia

As colônias bacterianas a serem testadas foram transferidas para tubos de PCR, contendo os reagentes da PCR (dNTPs 200 μ M, $MgCl_2$ 1,5 mM, tampão Taq DNA polimerase 1x, 2,5 U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen)) e os primers (10 pmol de cada) que hibridizam com regiões que flanqueiam o inserto de DNA clonado a ser verificado, em um volume total de 10 μ L. As amostras foram incubadas a 94 °C por 3 min e submetidas a 20 ciclos de PCR com as mesmas etapas utilizadas para amplificar os fragmentos de interesse (ver item “Clonagem dos genes de interesse em pET28a”). Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1%. Posteriormente, o gel foi corado com brometo de etídeo

(0,5 µg/mL) por aproximadamente 20 min, lavado com água e analisado sob luz ultravioleta. Os géis foram fotografados no sistema de fotodocumentação L-Pix.

4.4. PREPARAÇÃO DE PLASMÍDEO EM PEQUENA ESCALA (MINIPREP)

Os clones recombinantes foram cultivados em 5 mL de meio LB, contendo o antibiótico apropriado, durante 18 h. As culturas foram então centrifugadas a 12.000 x g por 1 min a temperatura ambiente e os plasmídeos recombinantes purificados com o sistema de minipreparação de plasmídeo (Miniprep Qiagen Kit) (QIAGEN), de acordo com as recomendações do fabricante.

4.5. PURIFICAÇÃO DE DNA UTILIZANDO FENOL/CLOROFÓRMIO

Ao material a ser purificado foi adicionado o mesmo volume de fenol:álcool isoamílico:clorofórmio (25:24:1). Após agitação até a formação de uma emulsão, a amostra foi submetida a centrifugação a 5.000 x g por 2 min. A fase aquosa foi cuidadosamente recolhida e depositada em um novo tubo de micro-centrífuga. A esse material foi adicionado acetato de sódio pH 6,0 na concentração final de 0,3 M. Após homogeneização, foram acrescentados 2 a 3 volumes de etanol absoluto. O material foi precipitado por 16 h a -20 °C ou por 20 min em gelo seco. A amostra foi centrifugada por 30 min, 10.000 x g, a 4 °C. O sedimento foi lavado com 1 mL de etanol 70%, centrifugado novamente por 15 min a 10.000 x g, a 4°C. Depois de seco, o DNA era ressuscitado em água ultrapura ou TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM).

4.6. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA SEPARADO EM GEL DE AGAROSE

O material a ser purificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1%, o qual foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por aproximadamente 20 min, lavado com água e analisado sob luz ultravioleta. Os fragmentos de interesse foram removidos do gel e transferidos para um tubo de microcentrífuga.

A purificação do material foi então realizada pelo sistema QIAquick (QIAGEN), de acordo com as recomendações do fabricante.

4.7. EXTRAÇÃO DO DNA DE *T. CRUZI*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* Dm28c (5×10^7 células), cultivadas em meio LIT até a fase exponencial (3 a 4 dias) foram coletadas por centrifugação a $4.000 \times g$ por 10 min a 4°C , lavadas em PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 4,3 mM e KH_2PO_4 1,5 mM) e ressuspendidas em 500 μL de tampão TELT (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 62,5 mM pH 9,0, LiCl 2,5 M e Triton X-100 4%). O material foi incubado por 5 min a temperatura ambiente e o DNA foi extraído com o mesmo volume de fenol/clorofórmio. Após centrifugação a $13.000 \times g$ por 5 min, a fase aquosa foi recolhida e o DNA foi precipitado com o dobro do volume de etanol absoluto e coletado por centrifugação a $13.000 \times g$ por 10 min. O DNA presente no sedimento foi lavado com etanol 70%, seco e em seguida foi hidratado em tampão TE contendo RNase 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

4.8. OBTENÇÃO DA PROTEÍNA CCCH ZINC FINGER TCZC3H31 RECOMBINANTE

4.8.1. Clonagem do gene *TcZC3H31* em pET28a

A amplificação do gene *TcZC3H31* foi feita por reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) a partir de DNA genômico de *T. cruzi* Dm28c com os primers ZPFGF (5'-AAAAGGATCCCCGCGAAGTATTCAGCAGCC) e ZFPGR (5'-AGGGTCTGACTTACTCTTCTCCGTGG) (Figura 3: Mapa do posicionamento do gene *ZC3H31* no genoma do *T. cruzi* em relação às suas regiões intergênicas.), sob as seguintes condições: 100 ng de DNA total de *T. cruzi*, 10 pmol de cada primer, dNTPs 200 μM , MgCl_2 1,5 mM, tampão Taq DNA polimerase 1x, 2,5 U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen). A reação de PCR foi processada no termociclador modelo

9700 (Applied Biosystems) com a desnaturação do material por 5 min a 94 °C, seguida de 35 ciclos constando de desnaturação a 94°C por 30 s, hibridização dos primers a 58 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 1,5 min. O material amplificado foi purificado com fenol/clorofórmio e digerido com as enzimas de restrição BamHI (Biolabs) e Sall (Biolabs), de acordo com as recomendações do fabricante. O material foi novamente purificado e inserido no vetor pET28a, na proporção de 3 pmol do inserto para cada 1 pmol de vetor, o qual também foi previamente digerido com as respectivas enzimas de restrição. A ligação foi feita na presença da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) em um volume final de 10 µL a 16 °C por 18 h, de acordo com procedimento padrão (Sambrook et al, 1986) . O produto da ligação foi usado para transformar *E. coli* DH5α cálcio-competente. Os clones recombinantes foram selecionados em meio LB contendo kanamicina (30 µg/mL) (meio LB/Kan). A análise dos clones recombinantes foi realizada através da técnica de palitagem e de PCR de colônia (itens 4.3.1 e 4.3.2). Os clones positivos (Pet28a/ZC3H31) foram inoculados em meio LB/Kan para a obtenção dos plasmídeos, os quais foram submetidos a sequenciamento de DNA.

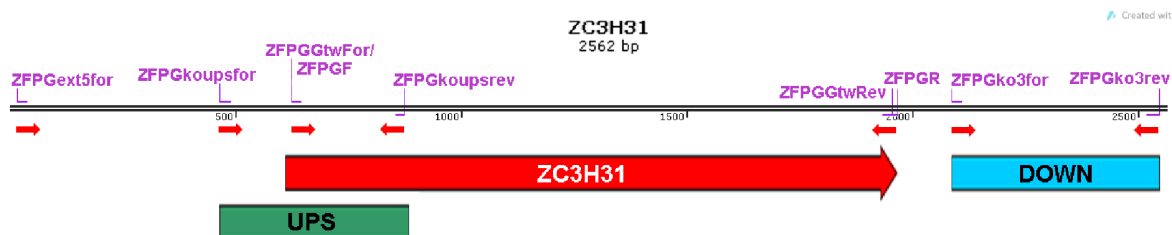


Figura 3: Mapa do posicionamento do gene ZC3H31 no genoma do *T. cruzi* em relação às suas regiões intergênicas.

O gene ZC3H31 é representado pela grande seta vermelha. As regiões **UPS** (verde) e **DOWN** (azul) correspondem às regiões clonadas para a obtenção dos cassetes para nocaute gênico (métodos detalhados a seguir). As pequenas flechas vermelhas indicam a posição e direção de amplificação dos *primers* cujos nomes estão representados acima na figura em roxo.

4.8.2. Expressão da proteína TcZC3H31 em *E. coli*

Plasmídeos recombinantes Pet28a/ZC3H31 (100 ng) foram usados para transformar *E. coli* cepa BL21(DE3)STAR cálcio-competente. As células transformadas foram selecionadas em placas com meio LB/Kan. Clones

recombinantes (5) foram inoculados em 2 mL de meio LB/Kan e cultivados durante 16 h a 37 °C (pré-inóculo). Os pré-inóculos foram diluídos na proporção de 1:10 em 4 mL de meio LB/Kan. As culturas foram mantidas com agitação constante a 37 °C para crescimento até fase exponencial. A expressão da proteína recombinante foi obtida após a adição de IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo) 1 mM às culturas, as quais foram incubadas por um período adicional de 3 h (mini-expressão) nas mesmas condições anteriores. As bactérias foram coletadas por centrifugação a 5.000 x g por 5 min e lisadas em tampão de amostra para SDS-PAGE (Tris-HCl 62 mM pH 6.8, SDS 2%, glicerol 40%, azul de bromofenol 0,2% e β -Mercaptoetanol 4 mM). Os extratos proteicos foram submetidos a SDS-PAGE (poliacrilamida 10%) e corado com azul de Coomassie para verificação dos clones de alta expressão da proteína recombinante.

Os clones com alta taxa de expressão da proteína de interesse foram então cultivados em 500 mL em meio LB/Kan (expressão em larga escala) e submetidos à indução com IPTG 1 mM por 3 h a 37 °C.

4.8.3. Purificação da proteína TcZC3H31 recombinante

Após a indução com IPTG, as bactérias foram coletadas por centrifugação a 10.000 x g por 15 min a 4 °C e ressuspensas em tampão de lise para condições nativas de purificação (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, PMSF 1 mM) acrescido de lisozima (100 μ g/mL) e submetidas à lise por sonicação (8 ciclos de 5 segundos, amplitude de 40%). O lisado resultante foi centrifugado a 16.000 x g por 15 min a 4 °C. O sedimento (corpúsculos de inclusão) foi então ressuspensado em tampão de lise nativa, acrescido de SDS (dodecil sulfato de sódio) 1%, e submetido a 8 ciclos de sonicação (5 segundos, amplitude 40%), seguidos da centrifugação a 16.000 x g por 30 min a 4 °C. Essa etapa foi repetida por mais uma vez para a obtenção de corpúsculos de inclusão com menor teor de proteínas contaminantes. Os corpúsculos foram solubilizados em tampão de uréia (tampão fosfato 20 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, uréia 8 M e PMSF 1 mM), através de agitação por 10 min a temperatura ambiente. A solução foi então centrifugada a

16.000 x g por 15 min e o sobrenadante foi filtrado em membrana de PVDF (fluoreto de polivinilideno) 0,45 µm. O filtrado foi então incubado com resina de Ni-NTA Agarose (Qiagen), previamente equilibrada com o tampão de uréia, por 1 h a 20 °C com agitação suave. A matriz foi lavada com o mesmo tampão (20 volumes) acrescido de imidazol 40 mM. A proteína ligada na resina foi eluída com tampão de eluição (tampão de uréia/ imidazol 500 mM). As frações eluídas foram analisadas por SDS-PAGE e posteriormente submetidas à diálise contra 6 L de PBS a 4 °C. O material dialisado foi então centrifugado a 16.000 x g por 30 min a 4 °C para obter a proteína recombinante precipitada, cuja concentração foi estimada através da comparação com concentrações conhecidas de BSA (albumina sérica bovina) em SDS-PAGE.

4.9. IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS COM A PROTEÍNA TCZC3H31 RECOMBINANTE

Camundongos da linhagem Swiss foram inoculados, pela via intraperitoneal, com 20-50 µg da proteína recombinante previamente diluída em solução salina e misturada com o adjuvante Alu-Gel-S (SERVA), de acordo com as recomendações do fabricante. As inoculações (3 a 5) ocorreram em intervalos de 14 dias. Esses procedimentos foram realizados em conformidade com o Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Certificado N° 523.

4.10. CULTIVO DO *TRYPANOSOMA CRUZI*

Neste trabalho, foi utilizado o clone Dm28c de *T. cruzi* (CONTRERAS et al., 1988).

4.10.1. Cultivo de formas epimastigotas

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT (infuso de fígado 0,5%, NaCl 75,3 mM, KCl 5,4 mM, glicose 10 mM, bacto-triptose 0,5%, Na₂HPO₄ 56,4 mM, hemina 0,0025%, extrato de levedura 15 g/L, soro fetal bovino 10%) a 28 °C com passagens a cada três dias e inóculo de 1 x 10⁶ células/mL. Quando necessário, as formas epimastigotas foram coletadas por centrifugação (2.000 x g) no terceiro dia de cultivo, quando se encontravam na fase logarítmica de crescimento (densidade celular de 1 x 10⁷ células/mL).

4.10.2. Obtenção de tripomastigotas metacíclicos: Metaciclogênese

As formas metacíclicas foram obtidas através do processo de diferenciação *in vitro* (BONALDO et al., 1988). Formas epimastigotas em final de fase logarítmica de crescimento (aproximadamente 5 dias de cultivo, com densidade celular 5-7 x 10⁷ células/mL) foram coletadas por centrifugação a 7.000 x g, por 10 min, a temperatura ambiente. As células foram então ressuspensas em meio TAU (NaCl 190 mM, KCl 17 mM, MgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 2 mM e tampão fosfato 8 mM pH 6,0) com densidade final de 5 x 10⁸ células/mL e mantidas a 28 °C por 2 h. Após este período, correspondente ao estresse nutricional, as células eram transferidas para meio TAU3AAG (meio TAU suplementado com L-prolina 10 mM, glutamato sódico 50 mM, aspartato sódico 2 mM e glicose 10 mM) para uma densidade final de 5 x 10⁶ células/mL. As formas tripomastigotas metacíclicas foram obtidas após três dias de cultivo em TAU3AAG.

Formas tripomastigotas metacíclicas foram coletadas por centrifugação a 7.000 x g, por 10 min, a temperatura ambiente. Os parasitas foram ressuspensos em tampão PSG (Na₂HPO₄ 47,47 mM, NaH₂PO₄ 2,5 mM, NaCl 36,76 mM, e glicose 55,5 mM) e purificados por passagem em coluna de DEAE-celulose equilibrada com o mesmo tampão. Nesse processo, os tripomastigotas metacíclicos não se ligam à resina, enquanto os parasitas em estágios intermediários de diferenciação permanecem ligados à mesma.

4.10.3. Tripomastigotas de cultura de células

Células Vero (ATCC® Número: CRL-2783™) foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino (GIBCO), penicilina 100 UI/ml, streptomicina 10 µg/ml e glutamina 2 mM a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Estas células (50% – 70% de confluência) foram infectadas com formas tripomastigotas metacíclicas na razão de 150 parasitas para 1 célula. Após 24 h, os parasitas livres no sobrenadante foram removidos por lavagem com RPMI suplementado e novo meio de cultura foi adicionado. Após 96 h de infecção as formas tripomastigotas foram coletadas por centrifugação a 5.000 x g por 5 min.

4.10.4. Amastigotas

Amastigotas extracelulares foram obtidos através de amastigogênese in vitro como descrito (HERNANDEZ-OSORIO et al., 2010). Basicamente, tripomastigotas derivados de células Vero foram incubados em meio DMEM com alta concentração de glicose (hgDMEM) em pH ácido (pH 5,0), na densidade de 5 x 10⁶ células/mL, a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Após 24 h, praticamente 100% dos parasitas mostravam morfologia característica de amastigota.

4.10.5. Tratamento com hidroxiuréia (sincronização do ciclo celular)

Formas epimastigotas de *T. cruzi* Dm28c (em fase exponencial de crescimento) foram inoculadas em 10 mL de LIT (5 x 10⁶ parasitas/mL) contendo hidroxiuréia (HU) 20 mM. Os parasitas foram cultivados em meio LIT+HU por 24 h. Após esse tempo, as células foram lavadas três vezes com PBS estéril para remover a HU e inoculadas em 10 ml de LIT. As células foram então coletadas em diferentes tempos após a inoculação (9 h, 10 h, 11 h e 12 h) e processadas para a análise através de ensaios de imunofluorescência e de FISH (descritos abaixo).

4.11. ENSAIOS DE *IMMUNOBLOT*

Extratos proteicos de *T. cruzi* foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (12 a 15% de poliacrilamida) com SDS (SDS-PAGE). Após a corrida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond C, Amersham Biosciences) em tampão de Western blot (glicina 39 mM, Tris base 48 mM, SDS 0,037% e metanol 20%) por 16 h a 20 volts. Após a transferência, a membrana foi corada com solução de Ponceau S (Ponceau S 0,1% (p/v) em ácido acético 5% (v/v)) e descoradas suavemente com água bidestilada para a identificação das bandas do marcador de massa molecular. A membrana foi então bloqueada durante 1 h em solução de TBST (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05%) com 10% de leite em pó desnatado (TBST-leite). Após o bloqueio, a membrana foi incubada com os soros policlonais ou anticorpos monoclonais em TBST-leite por aproximadamente 1 h a 37°C. A membrana foram lavadas 5 vezes com TBST. Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Sigma) na diluição 1:10.000 em TBST-leite por 1 h a temperatura ambiente. A membrana foi lavada 5 vezes com TBST, e a reação de revelação se deu pela adição de tampão para fosfatase-alcalina (Tris-HCl 100 mM pH 9,0, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1mM) acrescido do substrato BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) e de NBT (nitro blue tetrazolium) (Promega). Para o caso de revelação por quimioluminescência, a membrana foi incubada com o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com enzima peroxidase (Pierce – Thermo Scientific), por 1h na diluição de 1:6.000 em TBST-leite a temperatura ambiente. A membrana foi submetida a mais cinco lavagens com TBST e a reação era evidenciada utilizando substrato quimioluminescente (West Pico, Pierce – Thermo Scientific) sobre a membrana, a qual era exposta a um filme para raios-X (Hyperfilm ECL, GE).

4.12. IMUNOFLOURESCÊNCIA

Os parasitas foram coletados por centrifugação (4.000 x g, 2 min), lavados duas vezes em PBS e fixados com paraformaldeído 4% em PBS. Em seguida, os parasitas foram depositados sobre lâminas de vidro previamente tratadas com poli-L-lisina 0,01% diluída em PBS. As células foram permeabilizadas com Triton X-100 0,1% por 5 min à temperatura ambiente e incubadas a 28°C durante 1 h em solução de bloqueio (PBS + 4% de BSA). Após o bloqueio, os parasitas foram incubados à temperatura ambiente por 1 h com os antisoros ou anticorpos monoclonais para as proteínas de interesse em diversas diluições em solução de bloqueio. As lâminas foram então lavadas 5 vezes em PBS. Em seguida, os parasitas foram incubados com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo ou anti-IgG de coelho conjugados ao fluoróforo Alexa Flúor 488 ou ao fluoróforo Alexa Flúor 594 (Invitrogen) diluídos 1:600 em solução de bloqueio, à temperatura ambiente por 1 h. As lâminas foram lavadas 5 vezes com PBS e posteriormente incubadas com o corante Hoechst 33342 (Invitrogen) a 2 µg/µL em PBS por 5 min. Após cinco lavagens com PBS, as lâminas foram montadas em N-propil-galato. As lâminas foram então observadas em um sistema Leica AF6000 de microscopia de deconvolução epifluorescente equipado com um microscópio automatizado (DMI6000B), uma câmara digital DFC350 FX (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) e uma lente objetiva de imersão em óleo com aumento de 100x. Imagens foram adquiridas no modo XYZ, e as pilhas de fotos (stacks) foram obtidas em intervalos de 0.2 µm formando projeções no eixo Z de 5 µm (26 stacks). As imagens individuais foram tratadas por deconvolução usando o método Blind do programa Leica LAS AF6000 software, version 3.1.0, de maneira a gerar projeções 3D das células. As imagens obtidas foram posteriormente processadas com auxílio do programa Adobe Photoshop 7.0.1.

4.13. FISH (*FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION*) E ANÁLISE DE CO-LOCALIZAÇÃO COM TCZC3H31

Formas epimastigotas (1×10^7 células), sincronizadas com HU, foram coletadas por centrifugação a $2.000 \times g$ por 5 min e lavadas duas vezes com 1 mL de PBS. Após as lavagens, os parasitas foram fixados em suspensão com paraformaldeído 4% em PBS durante 20 min. Os parasitas fixados foram novamente lavados duas vezes com 1 mL de PBS. Os parasitas foram aderidos em lâminas de vidro previamente tratadas com poli-L-lisina 0,01% diluída em PBS. Após as lavagens, as lâminas foram tratadas com solução de HCl 0,2 M, livre de RNases, por 10 min, seguida de três lavagens com PBS (livre de RNase). As células foram incubadas com solução de pré-hibridização (Formamida 35%; BSA 0,02%; NaCl 300 mM; Citrato trisódico 30 mM; tRNA 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fervido; DNA de esperma de salmão 1 mg/mL; RNaseOUT (Invitrogen) 40 U/mL) a 37 °C por 30 min em câmara úmida.

Como controle negativo do experimento, parasitas fixados foram incubados com a enzima RNase A (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), diluída no tampão pré-hibridização sem adição do inibidor de RNase, RNaseOUT.

Após a pré-hibridização, os parasitas foram incubados com a sonda oligo-dT, conjugada com digoxigenina, diluída na solução de pré-hibridização (6 ng/ μL), a 37 °C por 16 h em câmara úmida. As lâminas foram lavadas nas seguintes condições: 2 lavagens com tampão SSC1 (NaCl 300 mM e citrato trisódico 30 mM) por 5 min; 2 lavagens com tampão SSC2 (NaCl 150mM e Citrato trisódico 15 mM) por 5min e 2 lavagens com tampão PBS por 5 min.

As lâminas então foram processadas para a reação de imunofluorescência onde foram incubadas com PBS/BSA 4% por 1 h. seguido da incubação com os anticorpos primários anti-digoxigenina (anti-DIG, SIGMA), produzido em cabra, diluído 1:300 em PBS/BSA, e anti-ZC3H31, produzido em camundongo, diluído 1:50 em PBS/BSA, por 1h a temperatura ambiente. As lâminas foram então lavadas 5 vezes com PBS e, em seguida, os parasitas foram incubados com os anticorpos secundários anti-IgG-de cabra (Alexa 488, produzido em coelho) e anti-

IgG de camundongo (Alexa 555, produzido em coelho), diluídos em PBS-BSA 4%, por 1 h a temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas com PBS e o DNA foi marcado por 5 min pela adição do corante Hoechst 33342 (Invitrogen) a 2 µg/µL em PBS. Após cinco lavagens com PBS, as lâminas foram montadas em N-propilgalato. As lâminas foram então observadas em um sistema Leica AF6000 de microscopia de deconvolução epifluorescente equipado com um microscópio automatizado (DMI6000B), uma câmara digital DFC350 FX (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) e uma lente objetiva de imersão em óleo com aumento de 100x. Imagens foram adquiridas no modo XYZ, e as pilhas de fotos (stacks) foram obtidas em intervalos de 0.2 µm formando projeções no eixo Z de 5 µm (26 stacks). As imagens individuais foram tratadas por deconvolução usando o método Blind do programa Leica LAS AF6000 software, version 3.1.0, de maneira a gerar projeções 3D das células. As imagens obtidas foram posteriormente processadas com auxílio do programa Adobe Photoshop 7.0.1.

4.14. IMUNOPRECIPITAÇÃO

Formas epimastigotas, totalizando 3×10^9 células, foram lavadas duas vezes com PBS e lisados com 1 mL de tampão de lise (KCl 150 mM; Tris-HCl 25 mM pH 7,4; MgCl₂ 10 mM; DTT 0,5 mM; NP40 0,5%; RNase OUT 100 u/mL e coquetel de inibidores de protease (ROCHE). O extrato foi então submetido a duas centrifugações a 20.000 x g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e incubado com 50 µL de beads magnéticas revestidas com proteína G (Invitrogen), pré-equilibrada em tampão de lise, por 30 min a 4 °C, sob agitação (etapa chamada de clareamento). O sobrenadante foi novamente coletado e dividido em dois volumes iguais, os quais foram incubados com soro imune anti-ZC3H31 ou soro pré-imune na diluição de 1:20 por 2 h a 4 °C, sob agitação. Após esse tempo, 25 µL de beads magnéticas revestidas com proteína G, pré-equilibradas no mesmo tampão de lise, foram adicionadas aos extratos pré-incubados com os soros e incubados por 30 min a 4 °C, sob agitação suave. As beads foram submetidas a 5 lavagens com tampão de lise e foram eluídas com tampão de

amostra, para análise por imunoblot, ou com tampão RLT (kit RNeasy Qiagen) para extração de RNA.

4.15. SUPEREXPRESSÃO DE TCZC3H31 E GFP EM *T. CRUZI*

4.15.1. Amplificação e clonagem do gene *TcZC3H31* no vetor pNEO3xFlag para superexpressão da proteína

O gene *TcZC3H31* foi clonado no vetor pNEO3xFLAG, construído no nosso laboratório a partir do vetor pTcGW-ProtCcarboxi (BATISTA et al., 2010), que utiliza o sistema Gateway de clonagem (Invitrogen). Os vetores foram construídos utilizando-se como base o pBluescript II (Stratagene, San Diego, USA) onde foram inseridas três sequências que codificam para regiões intergênicas (IR) de *T. cruzi*. A primeira, *TcUIR*, é a região intergênica do locus de ubiquitina/calmodulina, escolhida por ser pequena, participar em vários processos celulares estar presente em todas as formas do ciclo de vida do *T. cruzi* (BATISTA et al., 2010). As outras duas regiões intergênicas ITR1 e ITR2 foram selecionadas a partir de genes de cópia única no genoma e que possuem um nível de expressão constitutivo nos estágios epimastigota e tripomastigota metacíclicos avaliados por dados de proteômica e RNAseq (Comunicação pessoal Michel Batista). Além disso, esse vetor confere à região C-terminal da proteína recombinante, resultante da clonagem neste vetor, três etiquetas FLAG (sequência DYKDDDDK) em tandem (Figura 4: Vetor para expressão em *T. cruzi* p3XFLAG).

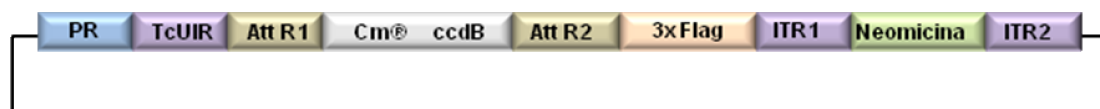


Figura 4: Vetor para expressão em *T. cruzi* p3XFLAG.

PR: promotor ribossomal. **TcUIR, ITR1 e ITR2:** regiões intergênicas. **AttR1 e AttR2:** regiões para recombinação. **Cm®:** resistência a cloranfenicol. **ccdB:** gene para seleção negativa durante a clonagem. **3xFLAG:** três etiquetas de Flag (DYKDDDDK). **Neomicina:** gene de resistência a neomicina.

O gene TcZC3H31 foi amplificado utilizando os primers específicos ZFPGGtwFor (5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCCCGCGAAGTATTCAGCAGCCC) e ZFPGGtwRev (5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGTGGTACATGGCGTACGGGTTG), os quais possuem os sítios attB (Figura 3: Mapa do posicionamento do gene ZC3H31 no genoma do *T. cruzi* em relação às suas regiões intergênicas.). As condições desta reação de PCR foram as seguintes: 100 ng de DNA genômico de *T. cruzi*, 10 pmol de cada primer, 200 µM de cada dNTP, MgSO₄ 2 mM, tampão Taq DNA polimerase 1x High Fidelity, 1U de Platinum Taq DNA polimerase high fidelity (Invitrogen). A reação de PCR foi processada no termociclador modelo 9700 (Applied Biosystems, EUA) com a desnaturação do material por 5 min a 94 °C, seguida de 35 ciclos constando de desnaturação a 94 °C por 30 s, hibridização dos primers a 58 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 1,5 min. Foram obtidos também produtos da amplificação do gene GFP (Green Fluorescent Protein) com os primers GFPF (5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGTGAGCAAGGGCGAGG) e GFPR (5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCATCTGAGTACTTGTACAGCTC) a partir do vetor pEGFP-C3 (BD Biosciences Clontech), utilizado como DNA molde (10 ng por reação), nas mesmas condições utilizadas para o gene TcZC3H31, para a obtenção de vetores de expressão da proteína Flag-GFP em *T. cruzi* (controle negativo dos parasitas com superexpressão). Os produtos das amplificações foram purificados utilizando o protocolo de extração e purificação de DNA a partir de gel de agarose (item 4.6).

Os genes amplificados foram clonados no vetor de entrada pDONR™221 (Invitrogen). A reação foi feita com 150 ng dos produtos de PCR, contendo os sítios attB, 150 ng do plasmídeo pDONR™221, 1 µL de BP Clonase™ enzyme mix e TE para um volume final de 10 µL e com incubação a 25° C por 16 h. Foi então adicionado 1 µL de proteinase K (2 mg/mL) com incubação por 10 min a 37

°C. Os clones em pDONR™221 foram transformados em células cálcio-competentes *E. coli* DH5 α , conforme protocolo de transformação de células cálcio-competentes. Após transformação, a cultura foi semeada em placa de LB/Kan (kanamicina 25 μ g/mL) e incubada a 37 °C durante 16 h.

Para verificar a presença de clones com os insertos de interesse, foi feita a técnica da palitagem. As colônias selecionadas foram inoculadas em 5 mL de meio LB/Kan e incubadas por 16 h a 37 °C com agitação (190 rpm). A purificação dos plasmídeos foi realizada com o kit QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen) conforme orientações do fabricante.

Após esta etapa, foi necessário transferir os insertos para o vetor de destino pNEO3xFlag. A troca de insertos entre os vetores de entrada e destino, denominada de reação LR, foi realizada conforme orientações do fabricante (Gateway LR clonase enzyme mix) e células cálcio-competentes foram transformadas com os produtos das recombinações, conforme descrito anteriormente, semeadas em placas de LB/Amp e incubadas a 37 °C durante 16 h.

A verificação de clones positivos foi realizada através da técnica da palitagem. As colônias selecionadas foram inoculadas em 5 mL de meio LB/Amp, e incubada a 37 °C por 16 h com agitação (190 rpm). A purificação dos plasmídeos foi realizada com o kit QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen) conforme orientações do fabricante. O plasmídeo contendo o gene TcZC3H31 foi denominado de pNEO-ZC3H31-3xFLAG, enquanto aquele contendo o gene GFP foi denominado de pNEO-GFP-3XFLAG.

4.15.2. Transfecção por eletroporação

A transfecção das formas epimastigotas de *T. cruzi* foi feita pela técnica de eletroporação, usando o equipamento genepulser® II apparatus (Bio-Rad) e cubetas estéreis de eletroporação gene pulser/micro pulser® 0,2 cm (Bio-Rad). Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT até uma densidade celular de 3×10^7 células/ml. Um volume de cultura correspondendo a 1

$\times 10^9$ parasitas foi centrifugado ($4.000 \times g$, $4^\circ C$). O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em tampão de eletroporação estéril (NaCl 140 mM, HEPES 25 mM pH 7,5, Na_2HPO_4 0,74 mM) e submetidas a centrifugação nas condições acima. O sedimento celular foi ressuspendido em 2 ml de tampão de eletroporação. Em cubetas de eletroporação, previamente resfriadas a $4^\circ C$, foram misturados 400 μL (2×10^8 células) da suspensão dos parasitas e 50 μL (10-20 μg) do plasmídeo para superexpressão (pNEO-ZC3H31-3XFLAG ou pNEO-GFP-3XFLAG). Em paralelo, parasitas foram submetidos às mesmas condições, mas na ausência de DNA (controle negativo da transfecção).

As cubetas foram então mantidas em gelo por 10 min. Em seguida, os parasitas foram transfectados com dois pulsos sequenciais de 500 μF e 450 volts. Após o esse procedimento, as cubetas foram mantidas em gelo por mais 5 min. A suspensão de parasitas transfectados foi então inoculada em 10 mL de meio LIT suplementado com 10.000 U de penicilina e estreptomicina a 10 $\mu g/mL$.

4.15.3. Seleção dos transfectantes

O gene para a enzima neomicina fosfotransferase foi utilizado como marcador de seleção dos parasitas carregando os plasmídeos para a superexpressão pNEO_ZC3H31_3XFLAG e pNEO_GFP_3XFLAG. Para tanto, o antibiótico G418 foi adicionado às culturas após 24 h da transfecção, na concentração final de 500 $\mu g/mL$. Entre 3 e 4 dias após a transfecção, foi realizada a primeira passagem (2,5 mL da cultura original em 7,5 mL de meio LIT com G418 500 $\mu g/mL$). A partir desse ponto, foram feitas passagens semanais na proporção de 1/10, até que não fosse observado crescimento nas duas últimas passagens da cultura do controle negativo da transfecção.

A expressão das proteínas ZC3H31-FLAG e GFP-FLAG foi analisada através de imunoblot e imunofluorescência.

4.16. OBTENÇÃO DO NOCAUTE DO GENE *TCZC3H31*

4.16.1.1. Amplificação das regiões intergênicas

Foram utilizados os primers ZFPGkousfor (5'-GGCGGTACCGTGCGTCTGTTGCTGTACTTGTGCTC) e ZFPGkousrev (5'-TTCCGTCGACGCGAGGGTTCGGAAGAACACGG) para amplificar a região à montante do gene *TcZC3H31* (fragmento resultante chamado UPS). Já os primers ZFPGko3for (5'-AAGGGATCCCGTGTATGGCCCTGGGTGTGTGTG) e ZFPGko3rev (5'-TTCTCTAGATTTTTTTTTTCCCCTCCCTCTTTTCTCTGC) foram empregados para a amplificação da região à jusante deste mesmo gene (fragmento resultante chamado DOWN). Para cada reação de PCR foi utilizado 100 ng de DNA total de *T. cruzi*, 10 pmol de cada primer, 200 µM de cada dNTP, MgCl₂ 1,5 mM, tampão Taq DNA polimerase 1x, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen). A reação de PCR foi processada no termociclador modelo 9700 (Applied Biosystems, EUA) com a desnaturação do material por 5 min a 94°C, seguida de 35 ciclos constando de desnaturação a 94 °C por 30 s, hibridização dos primers a 58 °C por 30s e extensão a 72 °C por 30 s. O material amplificado foi purificado através do protocolo de gel-extração.

4.16.1.2. Clonagem no vetor pNEO2

O vetor pNEO2 (Figura 5: Desenho esquemático dos plasmídeos pNEO2 e pHYG2.), construído no nosso laboratório, foi digerido com as enzimas KpnI e Sall para a clonagem do fragmento UPS de *TcZC3H31*, também digerido com as mesmas enzimas. Vetor e inserto, numa proporção de 3 pmol do inserto para cada 1pmol de vetor, foram submetidos a reação de ligação com 1 µL da enzima T4 DNA ligase (1 u/µL) (Invitrogen), T4 DNA ligase buffer 1x, em um volume final de 10 µL a 16 °C por 18 h. *E. coli* DH5α foi transformada com o produto da ligação. As bactérias foram semeadas em em LB/Amp (100 µg/mL) e os clones obtidos

foram analisados pela técnica de palitagem para a verificação daqueles contendo o inserto. Um dos clones positivos foi escolhido para purificar os plasmídeos recombinantes. O plasmídeo recombinante resultante foi então digerido com as enzimas BamHI e XbaI para a inserção do fragmento DOWN, também digerido com as mesmas enzimas, através da reação de ligação. Os clones recombinantes obtidos após a transformação do produto de ligação foram selecionados pela técnica da palitagem. Um dos clones positivos foi cultivado para a purificação do plasmídeo recombinante, que foi denominado de pNEO2ΔZC3H31.

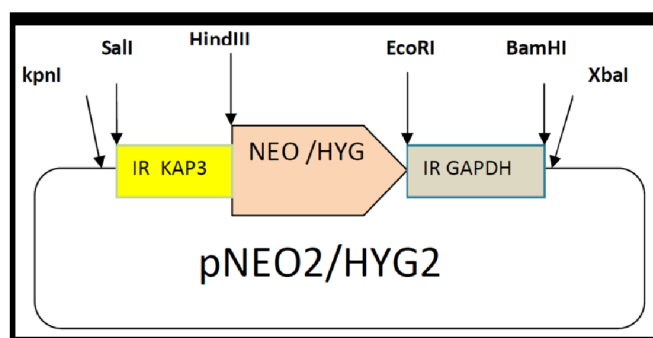


Figura 5: Desenho esquemático dos plasmídeos pNEO2 e pHYG2.

IR KAP3: região intergênica do gene de Enolase. **IR GAPDH:** região intergênica do gene de GAPDH. **NEO/HYG:** genes de resistência neomicina fosfotransferase ou higromicina fosfotransferase.

4.16.1.3. Amplificação do cassete UPS-NEO-DOWN

O cassete UPS-NEO-DOWN refere-se ao fragmento amplificado a partir do plasmídeo recombinante pNEO2ΔZC3H31 usando os primers ZFPGkousfor e ZFPGko3rev (Figura 6: Mapa do cassete UPS-NEO-DOWN.). Foram feitas reações individuais de PCR de 50 µL, totalizando 1 a 2 mL. Para cada reação (50 µL) foram utilizados: 2 ng do plasmídeo pNEO2ΔZC3H31, 10 pmol de cada oligonucleotídeo, 200 µM de cada dNTP, MgCl₂ 1,5 mM, tampão Taq DNA polimerase, 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen). A reação de PCR foi processada no termociclador modelo 9700 (Applied Biosystems, EUA) com a desnaturação do material por 5 min a 94 °C, seguida de 35 ciclos constando de desnaturação a 94 °C por 30 s, hibridização dos primers a 58 °C por 30 s e

extensão a 72 °C por 3 min. Os produtos resultantes da reação de PCR foram purificados com fenol/clorofórmio para a transfecção do *T. cruzi*.

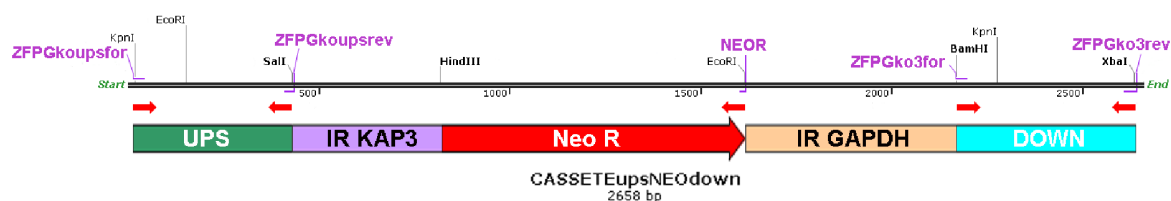


Figura 6: Mapa do cassete UPS-NEO-DOWN.

A grande seta vermelha indica o gene de resistência a neomicina (**Neo R**), a região intergênica do gene KAP3 está indicada em roxo e a região intergênica do gene GAPDH está indicada em rosa claro, todos provenientes do vetor pNEO2 (Figura 5: Desenho esquemático dos plasmídeos pNEO2 e pHYG2.). A região **UPS** do gene ZC3H31 está indicada em verde e a região **DOWN** está indicada em azul (Figura 3: Mapa do posicionamento do gene ZC3H31 no genoma do *T. cruzi* em relação às suas regiões intergênicas.). As pequenas setas vermelhas indicam a posição e direção de anelamento dos *primers* cujos nomes estão representados acima na figura em roxo. Sítios de enzimas de restrição estão indicados acima em preto.

4.16.1.4. Amplificação do cassete UPS-HIGRO-DOWN

Os plasmídeos pHIGRO2 (figura 5) e pNEO2 Δ ZC3H31 foram digeridos com as enzimas Sall e XbaI. Os produtos das digestões foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% para purificação dos fragmentos por gel-extração (item 1.6). A digestão do plasmídeo pHIGRO2 com Sall e XbaI gera 2 fragmentos (xxx pb e xxx pb), dos quais o menor, correspondente ao gene HIGRO mais as regiões intergênicas IR_KAP3 e IR_GAPDH foi purificado do gel. Já para o plasmídeo pNEO2 Δ ZC3H31, o fragmento purificado foi o maior (xxx pb), correspondente ao plasmídeo contendo apenas as regiões UPS e DOWN do gene TcZC3H31. Esses fragmentos purificados foram unidos por reação de ligação. O produto da ligação foi transformado em *E. coli* DH5 α , os clones recombinantes foram analisados pela técnica de palitagem. Um dos clones positivos foi cultivado para a purificação do plasmídeo recombinante, que foi denominado de pHIGRO2 Δ ZC3H31. O cassete UPS-HIGRO-DOWN (Figura 7) foi então amplificado a partir do plasmídeo recombinante pHIGRO2 Δ ZC3H31 usando os mesmos primers ZFPgkouspsfor e ZFPgko3rev e nas mesmas condições do

cassete UPS-NEO-DOWN. Os produtos de PCR foram também purificados com fenol/clorofórmio para a transfecção do *T. cruzi*.

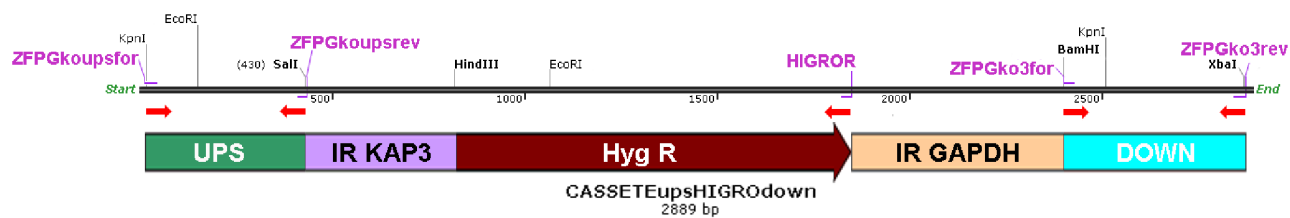


Figura 7: Mapa do cassete UPS-HIGRO-DOWN.

A grande seta bordô indica o gene de resistência a higromicina (**Hyg R**), a região intergênica do gene KAP3 está indicada em roxo e a região intergênica do gene GAPDH está indicada em rosa claro, todos provenientes do vetor pHYG2 (Figura 5). A região **UPS** do gene TcZC3H31 está indicada em verde e a região **DOWN** está indicada em azul (ver Figura 3). As pequenas flechas vermelhas indicam a posição e direção de anelamento dos *primers*, cujos nomes estão representados acima na figura em roxo. Sítios de enzimas de restrição estão indicados acima em preto.

4.16.2. Transfecção por Eletroporação e seleção dos mutantes

A transfecção das formas epimastigotas de *T. cruzi* foi feita de acordo com o item 4.15.2. Os parasitas foram transfectados inicialmente com o cassete UPS-NEO-DOWN (20 µg) e selecionados para resistência ao antibiótico G418, conforme descrito no item 4.15.3.

O DNA genômico dos parasitas resistentes a G418 foi extraído (4.7) para a verificação da correta integração do cassete de seleção no locus do gene de TcZC3H31. Para isso foram realizadas reações de PCR com os primers ZFPGext5for (5'-CAGCCCGTTGCTGCTTCTCGTTTG) e NEOR (5'-AGAGCCGCGGTCAGAAGAACTCGTCAA), conforme descrito no item 4.16.1.4 (Figura 3 e Figura 6). O primer ZFPGext5for se encontra a 595 pb a montante do início da região codante do gene TcZC3H31 (Figura 3) e, portanto, não está presente nos cassetes UPS-NEO-DOWN e UPS-HIGRO-DOWN.

Após verificação da incorporação correta do cassete de seleção, e consequente deleção de um dos alelos do gene, ocorreu nova transfecção desses mutantes, desta vez com o cassete UPS-HIGRO-DOWN (20 µg). A transfecção ocorreu como descrito anteriormente. A população transfectada foi selecionada

para a resistência aos antibióticos G418 (500 µg/mL) e Higromicina B (500 µg/mL), até que não fosse observado mais o crescimento da cultura do controle negativo (parasitas resistentes apenas a G418), conforme descrito no item 1.15.3. Após seleção, o DNA genômico destas culturas também foi extraído (item 1.7) e submetido a reações de PCR para verificação da inserção dos dois cassetes de seleção (reações de PCR com as combinações de primers ZFPGext5for + NEOR e ZFPGext5for + HIGROR (5'-GGGTGAATTCTATTCCTTTGCCCTCGGACGAGTGCTG) (Figura 3, Figura 6 e Figura 7) e conseqüente deleção de ambos os alelos do gene. Também foram realizados ensaios de immunoblot (item 4.11) e PCR quantitativa (qPCR) (item 4.20) para confirmar o nocaute gênico.

4.17. EXTRAÇÃO DE RNA

Amostras de RNA obtido a partir de imunoprecipitação ou de extrato total celular foram isoladas através do kit RNeasy (Qiagen). A purificação foi realizada segundo instruções do fabricante utilizando o protocolo "Animal Cells I" com o passo adicional de tratamento com DNase na própria coluna (RNase-free DNase set – Qiagen).

4.18. AMPLIFICAÇÃO DE RNA MENSAGEIRO

RNA total de *T. cruzi* foi amplificado usando os reagentes *MessageAmp™ II aRNA Amplification Kit* (Ambion®) usando um protocolo modificado para o segundo ciclo de amplificação (Second Round Amplification), no qual foi utilizado um *primer* complementar ao mini-exon (ou *spliced leader*) de *T. cruzi* para a posterior amplificação de RNA (aRNA) (PROBST & KESSLER, em preparação). A primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir 100 ng de RNA total com *random primers*, numa reação com a enzima *ArrayScript* por 2 h a 42 °C. A seguir, as moléculas de mRNA restantes foram degradadas com a enzima RNase

H e a segunda fita de cDNA foi sintetizada, por 2 h a 16 °C, usando um *primer* específico para o mini-exon de *T. cruzi* contendo um promotor de T7 RNA polimerase na sua extremidade 5'. Após a purificação do cDNA, procedeu-se a amplificação do RNA (aRNA) utilizando-se a enzima T7 RNA polimerase numa reação de transcrição *in vitro*. O aRNA resultante foi purificado e utilizado para as análises de RNA-Seq.

4.19. RNA-SEQ

4.19.1. Preparo das bibliotecas

O preparo das amostras foi realizado segundo o protocolo do *SOLiD*[®] *Total RNAseq Kit* (Life technologies[™]).

O RNA (0,1 a 1 µg) foi fragmentado com a enzima RNase III e foi purificado usando o *RiboMinus Concentration Module* (Invitrogen). A qualidade do RNA purificado foi verificada usando o equipamento Agilent[®] Bioanalyzer[™], de acordo com as indicações do fabricante. Foi então realizada a hibridização e ligação dos adaptadores em ambas as extremidades dos fragmentos de RNA usando os componentes do *kit SOLiD*[™] *Total RNA-seq*, o *SOLiD*[™] *Adaptor Mix*. Após a ligação dos adaptadores, foi realizada a transcrição reversa, com os componentes do mesmo *kit* com a enzima *ArrayScript*[™] *Reverse Transcriptase*. Após o término da reação de transcrição reversa, o material foi purificado com o *kit MinElute PCR Purification* (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

O material resultante da transcrição reversa foi separado em gel de poliacrilamida desnaturante usando o sistema Novex (Invitrogen). O gel foi corado com SYBR Gold (Invitrogen) e seguiu-se a seleção dos fragmentos de 100-200 bases através da excisão da banda do gel com o tamanho adequado. A banda do gel foi subdividida em 4 fatias longitudinais, a partir das quais foi realizada a amplificação do cDNA contendo primers do *kit SOLiD*[™] *RNA Barcoding* e a *AmpliTaQ*[®] *DNA Polymerase* do *kit SOLiD*[™] *Total RNA-seq*. Finalmente, o material amplificado foi purificado com o *kit PureLink*[™] *PCR Micro* (Invitrogen) e sua

concentração e qualidade final foram analisadas com os equipamentos Qubit[®] (Life technologies[™]) e Agilent[®] Bioanalyzer[™].

4.19.2. Preparo das *beads* para seqüenciamento

Para a utilização do sistema SOLiD[®] para o sequenciamento as bibliotecas de DNA foram amplificadas em *beads* P1 (*kit* E80) durante a PCR de emulsão (ePCR), seguida do enriquecimento das *beads* molde, utilizando o sistema SOLiD[®] EZ Bead[™].

A emulsão foi preparada de acordo com o guia *SOLiD[®] EZ Bead[™] Emulsifier User Guide* (Applied Biosystems). Inicialmente foi preparada a solução oleosa da emulsão, o *Oil Master Mix*. Paralelamente, *Emulsifier E80 - P1 Beads* foram submetidas à lavagem com a solução *Emulsifier E80 - BB* e depois ressuspendidas em 1X TEX Buffer. Também foi preparada uma solução contendo o *Aqueous Master Mix* juntamente com o *P1 reagent*, o *P2 reagent* e a biblioteca molde (seção anterior). A solução oleosa (*Oil Master Mix*), a resina (*Emulsifier E80 - P1 Beads*) e a solução aquosa (contendo a biblioteca) foram então misturadas e submetidas à emulsificação no equipamento SOLiD EZ Bead Emulsifier.

A emulsão resultante foi então coletada e transferida para o pacote SOLiD[®] EZ Bead[™] Amplifier E-Large Pouch (E80) previamente equilibrado com o *Oil Master Mix*. O pacote foi então inserido no equipamento SOLiD[®] EZ Bead[™] Amplifier no qual ocorria a ePCR. Esses procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo *SOLiD[®] EZ Bead[™] Amplifier User Guide* (Applied Biosystems).

Em seguida, a emulsão foi transferida do pacote para o equipamento SOLiD[®] EZ Bead[™] Enricher, onde a emulsão foi desfeita e as *beads* contendo o DNA molde foram enriquecidas com o SOLiD[®] EZ Bead[™] Enricher Buffer Kit. A extremidade 3' do DNA, presente nas *beads* enriquecidas, foi modificado através da adição do nucleotídeo dUTP, usando a enzima terminal transferase.

4.19.2.1. Deposição das beads e sequenciamento

O preparo das lâminas e sequenciamento foi realizado segundo o protocolo Applied Biosystems SOLiD™ 4 System Instrument Operation Guide. Antes do sequenciamento das amostras, a qualidade das *beads* foi analisada através do procedimento *workflow analysis* (WFA) para um total de 15 milhões de *beads* por amostra múltipla. A partir dos resultados do WFA, seguiu-se o seqüenciamento propriamente dito. Aproximadamente 72 milhões de *beads* foram lavadas com tampão de deposição e depositadas em cada um dos poços de uma câmara de deposição de 4 quadrantes. As *beads* foram deixadas aderir na lâmina por 1,5 horas a 37 °C e finalmente a lâmina foi instalada no aparelho SOLiD™ 3 System. As reações de seqüenciamento foram realizadas segundo protocolo SOLiD Multiplex. Primeiramente foi realizado o seqüenciamento dos Barcodes através de um ciclo de ligação para cada um dos cinco primers de seqüenciamento, resultado em um tag de cinco bases para cada barcode. A seguir foi realizado o seqüenciamento dos fragmentos através de dez ciclos de ligação para cada um dos cinco primers de sequenciamento, resultando em *reads* de 50 bases para cada *bead* molde.

O lançamento das corridas, bem como o processamento das reações de sequenciamento para a geração, obtenção e controle dos dados foi realizado através do programa *SOLiD™ Instrument Control Software* (ICS).

4.19.2.2. Análise dos dados de RNA-Seq

As leituras de 50 bases geradas pelo seqüenciamento na plataforma SOLiD foram alinhados ao genoma de *T. cruzi* CL Brener usando a ferramenta *SOLiD™ WT Analysis Pipeline*, permitindo até 2 erros de pareamento de bases. As seqüências foram alinhadas nos dois haplótipos do parasita e foram consideradas as leituras de alinhamento múltiplos em até 10 posições distintas no genoma. Para quantificação dos níveis de expressão (número de seqüências alinhadas por gene), *reads* com alinhamentos múltiplos foram aleatoriamente atribuídos a um único gene. Como o genoma de *T. cruzi* CL Brener apresenta dois

haplótipos distintos, a maioria dos genes possuiu duas cópias anotadas (alelos), o que torna a análise de expressão diferencial redundante. Além disso, famílias gênicas multicópias tornam o alinhamento dos *reads* mais complexo. De forma a diminuir tal redundância, os genes de *T. cruzi* foram agrupados baseados em homologia das sequências protéicas preditas usando a ferramenta OrthoMCL (Ortholog Groups of Protein Sequences) (LI; STOECKERT; ROOS, 2003). Tais grupos de homólogos foram nomeados como Super Genes (SG). Os genes (IDs) contidos em cada SG, bem como detalhes das sequências e padrões de expressão no ciclo de vida de *T. cruzi*, podem ser visualizados na página da web <http://omics.icc.fiocruz.br/welcome>. A contagem final de *reads* alinhados por SG foi obtida após a soma das contagens obtidas para cada membro de um SG. Este valor foi utilizado para as análises de expressão diferencial. Os SG compõem apenas genes codificadores de proteínas, de forma que automaticamente são excluídos das análises genes referentes a RNA não codificador (ncRNA).

Os dados de contagens de *reads* por SG foram normalizados e analisados para expressão diferencial no pacote edgeR (ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2010) do programa R, considerando diferentes níveis de confiabilidade estatística (false Discovery rate, FDR). Além disso, foi usado o valor de alteração absoluta (fold-change) como critério biológico para seleção de genes diferencialmente expressos.

Os genes identificados como diferencialmente expressos foram analisados por agrupamento hierárquico, utilizando distância Euclidiana no programa Cluster (EISEN et al., 1998), sendo que as imagens geradas foram visualizadas no programa JavaTreeView.

Para análise do enriquecimento de termos de ontologia gênica (gene ontology, GO), os SG diferencialmente expressos foram analisados na ferramenta Blast2GO (CONESA et al., 2005). Para determinação dos termos de GO enriquecidos foi usado o teste exato de Fisher, considerando como limiar estatístico FDR de 5%, sendo considerados apenas os termos sobre-representados.

4.20. PCR QUANTITATIVA

4.20.1. Obtenção do cDNA

Amostras de RNA total (2 µg) de *T. cruzi* clone Dm28c selvagem e mutante para o gene TcZC3H31 foram purificadas de acordo com o item XXX. Foram analisadas amostras de RNA obtidas a partir das quatro formas do ciclo de vida (epimastigotas, tripomastigotas metacíclicas, amastigotas e tripomastigotas obtidos de infecção em células Vero). O RNA foi misturado com dNTPs 0,75 mM e *random primers* 3,75 µM e desnaturado a 65 °C por 5 min e resfriado imediatamente no gelo por 5 min. O RNA foi então utilizado para a síntese da primeira fita de cDNA pela transcriptase reversa SuperScript III (Life Technologies), de acordo com as recomendações do fabricante. . Ao final da síntese do cDNA, o material foi aquecido a 70°C por 15 min e o volume de reação foi completado para 180 µL pela adição de água ultrapura.

4.20.2. Reação de qPCR (PCR quantitativa)

Os experimentos de PCR quantitativa foram realizados com o objetivo de analisar a expressão diferencial dos RNAs alvos da proteína TcZC3H31, identificados a partir de imunoprecipitação de RNA (experimento de ribonômica, detalhado acima). As reações de qPCR foram realizadas com SYBR[®] Select Master Mix 1X (Life Technologies), 10 pmol de cada primer (Tabela 2) e 2 µL de cDNA (o qual foi diluído para um volume final de 2 mL com água ultra pura), diluídos em água ultrapura para um volume final de 20 µL em placas de 96 poços (Applied, Biosystems). As amostras foram processadas no termociclador 7500 *Real Time PCR System*, (Life Technologies) sob as seguintes condições: incubação a 50 °C por 2 min, ativação da AmpliTaq[®] DNA Polymerase (presente no mix) a 95 °C por 2 min, seguido de 40 ciclos com desnaturação a 95 °C por 15 seg e extensão a 60 °C por 1 min. As análises das corridas foram feitas com o

7500 Software v2.0.6. As amostras foram quantificadas através da realização de uma curva-padrão, contendo diversas concentrações de cDNA purificado. Os valores obtidos foram então normalizados pelas médias obtidas na amplificação dos genes normalizadores (IDs e primers indicados em negrito na Tabela 2). O tratamento estatístico foi realizado com o programa GraphPad Prism[®].

TABELA 1 – PRIMERS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS DE qPCR

GENES (IDs)	PRIMERS FORWARD		PRIMERS REVERSE	
	NOME	SEQUÊNCIA (5'-3')	NOME	SEQUÊNCIA (5'-3')
TcCLB.504013.110	SG0658F	ACTGCACGCTTCATGTGATG	SG0658R	TCAAAATAGCCCCATGCAG
TcCLB.511807.130	SG7739F	TGAGCGTTTTCTGCGTAACG	SG7739R	AGCAACATACGCCGTTCTTG
TcCLB.507099.80	SG6968F	ACGCATGAAGGAAGCAATGC	SG6968R	TTGCGATGATGAACCATGCG
TcCLB.511807.80	SG4806F	TGCATGCTTTTCCGTGTTGG	SG4806R	AATGCAGCCACATCATCGAG
TcCLB.504881.50	SG5890F	TGCGCAAGATGTACAGCAAC	SG5890R	TGGTGCCCAAGAAAGCAAAG
TcCLB.510155.110	SG2137F	TTTGCCGTTTATGCCATGCG	SG2137R	ATTCCAAGTCCAAGCGAAC
TcCLB.511825.180	SG1130F	ACGTGTTTTGGCGTACGTTG	SG1130R	AATTGGGCGCTTCTGCAATC
TcCLB.508231.30	SG1097F	ATGCAGCCGGTGAATGTG	SG1097R	ACCACAGGCAAAACGTTGTC
TcCLB.508503.60	SG6128F	TCTTCGCTTTCCATGCCAAG	SG6128R	TCACCGCGTTTTTCAATGGC
TcCLB.506859.204	SG1486F	AAAACCTCCGTGCTGCTGTG	SG1486R	AAAGCACCACCTTCGAAAGC
TcCLB.511907.240	SG2277F	ATTCGCCATGTTGTGTTGCC	SG2277R	AACGGGCGTCTGAATTTGTC
TcCLB.511277.200	SG8750F	TGCCATAAACGCTCTTCACG	SG8750R	TGCTTGGAGTTGTTGATGCC
TcCLB.503885.100	SG6276F	ATTTTCGTCACGCACACCAC	SG6276R	AAAAAGAGTGGGCTCAACG
TcCLB.503893.150	SG0995F	ATGAAACACAGGGCCAACG	SG0995R	TCCACGCGAATTTTGCATG
TcCLB.508909.170	SG0664F	TTTCCAATTCGCCAAAGGC	SG0664R	AATTCGGCCTGCGAAATG
TcCLB.508899.20	SG2647F	TTTTTGAACGGCCCGATGC	SG2647R	TTGCAACAAGAAGCGGTGTC
TcCLB.509803.40	SG0997F	TTGAAGCCCGGAAAATGCAC	SG0997R	TGCGTGCAAGTCAGAAATGC
TcCLB.511145.30	SG3004F	AGTTAAACGAACCGCTGGTG	SG3004R	AGCGCCAAGTACGTTTTTC
TcCLB.511727.250	SG7813F	ATGCCTTGCTTATGCGTTG	SG7813R	AAATGCGGCAAAACCATCC
TcCLB.504179.50	SG4707F	ATGCGTTTGTACACACGAG	SG4707R	TCCAAAAGCAACACAGTGG
TcCLB.510901.200	SG8274F	TGCAGTGCAATGCCGAATTC	SG8274R	CACATTGCGCAAAACAGTCC
TcCLB.506525.70	SG2103F	ATGTGTATACGCGGCGTTTG	SG2103R	AATTCACAGTGGTGGCAAG
TcCLB.506925.170	SG7218F	TCCCCTTGCAGCAAAACAATG	SG7218R	AAGCGCCCGTCTCAAAATTG
TcCLB.509733.90	SG3606F	TTAGCTCATGCGCCTGTTTG	SG3606R	TTTTACCGTCTGCACATGC
TcCLB.509991.9	SG1711F	AATTGGTGGTGGTGCCTTTG	SG1711R	AAACGCTTCATCGCCAAACG
TcCLB.510667.30	SG3580F	TGCGCCTCTTCTGAAATTG	SG3580R	ATGCGGACTTTGGTCAATGC
TcCLB.508461.300	SG8202F	ATGCAATTTTGGGCGAGGTC	SG8202R	TGCGCGTTTGCAAAATAGGG
TcCLB.511725.270	SG7872F	AAACTCGGAGAAGGCAATGC	SG7872R	TTGCTTTTTCCCGTTGCTG
TcCLB.503617.20	SG8520F	GCGCTTTTTCAATGGCTTGC	SG8520R	TCGTGCTGCCGTTCAAAAAG
TcCLB.503613.10	SG5063F	TGGCGTTTCGGAGGTTTTTG	SG5063R	AACAGCATGGTGCCTTTTGC
TcCLB.511545.80	SG6900F	AGCATCAACGTCGTGTTTGG	SG6900R	AAAGGCGGGGAACAAAAGG
TcCLB.509153.80	SG1747F	AACAGGCGGCTGTTTTCTTC	SG1747R	TTTTGGCACCGCTATTTGC
TcCLB.503685.10	SG2227F	AAAGACGTTTTGCGCGTTGTG	SG2227R	TGTGAGGCATGCCAATTAGC
TcCLB.506519.60	SG3190F	TTTTGGAAGTGCAGGAAAGG	SG3190R	AAACCGCTGCGAAGTAAAGC
TcCLB.507021.20	SG3665F	ATCTTGCAGGATCAAAAGC	SG3665R	TGGTGACGCTGCAAAATACAC
TcCLB.506503.80	SG2138F	TTGTTGGCAGCATGTGAAGC	SG2138R	TTTTGCAGGGCTCCATTTG
TcCLB.506367.60	SG3724F	TGTTTTGGGATGCGCATGAG	SG3724R	AGCTGCACACAAAAGCAC
Tc00.1047053506009.10 (TcZC3H31)	ZFPgPCR1F	TTTGACGTTGGGTTACAGTC	ZFPgPCR1R	AATGGGCACAGTGTTCATC
Tc00.1047053506009.10 (TcZC3H31)	ZFPgPCR2F	ACTGTGCCCATTTTGAACC	ZFPgPCR2R	TCCCCACAATCGAGTTAACAG
TcCLB.411235.9 (alpha tubulin)	alpTubF	CCATCCCCACAGGTGTCAA	alpTubR	AAGCATCGCCGCAACATC
TcCLB.509003.70 (beta tubulin)	betaTubF	GCGTGAGATTGTGTGCGT	betaTubR	CGCCCTGGTATGTTCTGT
Tc00.1047053511029.10 (enolase)	enoIF	TTGAATGGGATGGAGACGG	enoIR	TAAGTGGTGGGGTCCGGTGG
Tc00.1047053511461.14 (GAPDH)	GAPDH_F	AAACGGAGGACGAGGTTGTT	GAPDH_R	CCAGGAGCCAGCAATGTTT
Tc00.1047053510127.79 (actina)	actin_F	TGTCTGTGACAACGGCTCTG	actin_R	TCATCGCTTGCTCGTTCTTT
TcCLB.508647.200 (TI)	TI_F	TTCACGGGGGAAGTCTCTCT	TI_R	CACCTTTTCCGCAACGATTT
Tc00.1047053504507.5 (TR)	TR_F	TCAGAGCGGAATGGAAGAAA	TR_R	GCCCAGGAAAACTCCAGAC
TcCLB.509683.117 (proteína S4)	S4_F	ATCATCCGCAATCGTCTGAA	S4_R	TACCGTCCACGCACACAAG

*Os primers indicados em negrito foram utilizados para a amplificação dos genes normalizadores das reações.

5. RESULTADOS

O gene TcCLB.506009.10 (1.356 pb) (www.tritrypdb.org) que codifica a proteína TcZC3H31 foi inicialmente identificado através de uma busca por proteínas com o domínio CCCH *zinc finger* em *Trypanosoma cruzi* utilizando o banco de dados Pfam (www.pfam.sanger.ac.uk), o qual agrupa proteínas em famílias. Embora não exista nomenclatura definida para essas proteínas em tripanosomatídeos, seguiu-se aquela descrita por Kramer e colaboradores (2010), que se baseia na ortologia com proteínas CCCH *zinc finger* de *L. major* e *T. brucei*. A identidade da TcZC3H31 com os ortólogos de *L. major* (Lmj36.0730) e *T. brucei* (Tb927.10.5150) é de 33% e 43%, respectivamente. Em 2010, Kramer e colaboradores, através de uma análise *in silico*, mostraram que a sequência deste gene codifica para uma proteína contendo três domínios CCCH *zinc finger* (Figura 8A), com base no padrão de conservação dos resíduos de aminoácidos dos motivos *zinc finger* CCCH convencionais (C-X₇-C-X₅-C-X₃-H e C-X₈-C-X₅-C-X₃-H), identificados em proteínas codificadas no genoma de *T. cruzi* CL Brener (Figura 8B) (KRAMER; KIMBLIN; CARRINGTON, 2010).

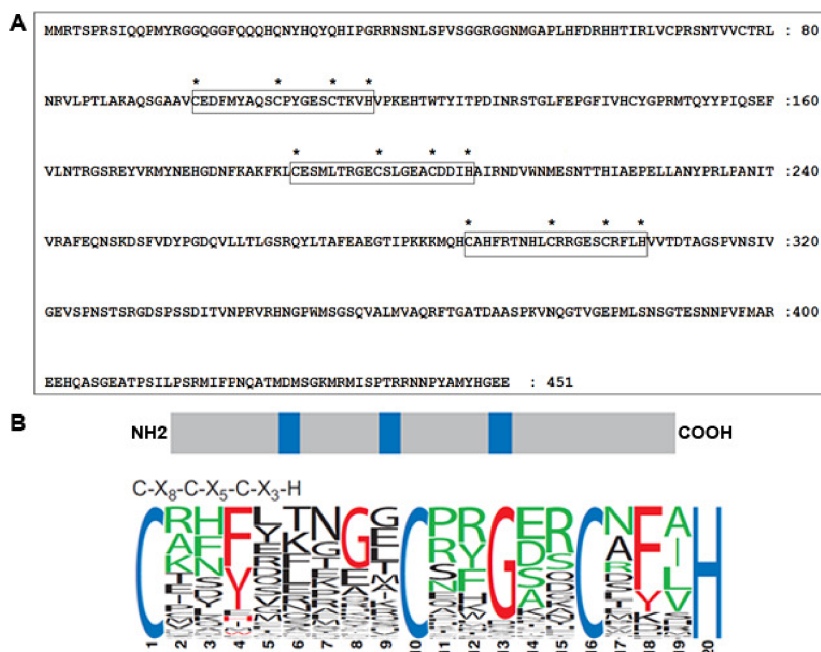


Figura 8: Desenho esquemático da proteína TcZC3H31.

A: sequência de aminoácidos da proteína TcZC3H31. Os três motivos C-X₈C-X₅C-X₃-H presentes na proteína estão mostrados dentro de retângulos. Os resíduos de aminoácidos característicos do domínio CCCH estão indicados por asteriscos. **B:** estrutura bidimensional da proteína, com os domínios CCCH *zinc finger* representados em azul. Abaixo é representado o logo dos Motivos CCCH (C-X₈-C-X₅-C-X₃-H) presentes nessa proteína. O tamanho das letras é proporcional ao grau de conservação do respectivo resíduo de aminoácido dentro deste motivo. Figura adaptada (KRAMER; KIMBLIN; CARRINGTON, 2010).

5.1. OBTENÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS PARA A PROTEÍNA TCZC3H31

Após clonagem do gene correspondente à proteína TcZC3H31 no vetor pET28a e subsequente sequenciamento para verificação da integridade do inserto, a proteína recombinante foi obtida através de expressão em sistema bacteriano, usando a cepa de *E. coli* BL21(DE3)STAR. As bactérias, após a indução com IPTG, foram lisadas e os corpúsculos de inclusão, fração onde se concentrava a maior parte da proteína expressa, foram utilizados para a purificação da proteína 6-His-TcZC3H31 (item 4.8.3 de Materiais e Métodos). Pode-se observar na Figura 9 que a proteína foi purificada satisfatoriamente, e

foram obtidas frações eluídas com altas concentrações da mesma, a qual apresenta-se como uma banda dupla (seta vermelha), e com poucos contaminantes, permitindo a sua utilização na imunização de animais.

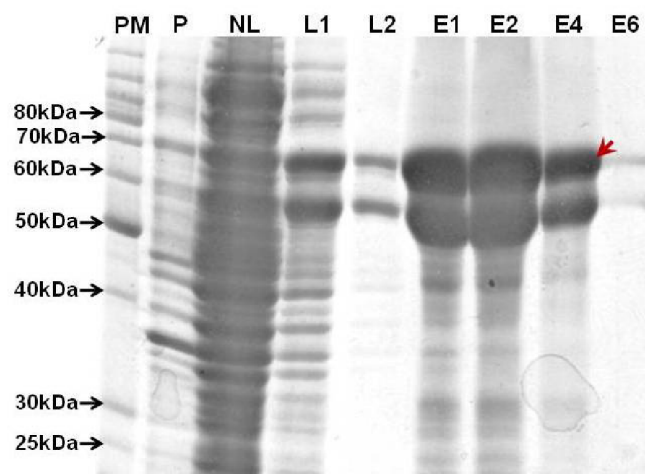


Figura 9: Purificação da proteína 6-His-TcZC3H31 em resina de Ni-NTA agarose, a partir de corpúsculos de inclusão.

Os corpúsculos de inclusão foram solubilizados em ureia 8 M (P). O material solubilizado em ureia foi então aplicado em coluna contendo resina Ni-NTA. Amostras referentes ao material não ligado à resina (NL), as lavagens (L1 e L2) e eluições (E1 a E6) foram analisadas em SDS-PAGE 10%. PM: marcador de massa molecular Benchmark (Invitrogen).

Foram imunizados camundongos da linhagem *Swiss*. Os soros obtidos após a terceira imunização foram testados na diluição 1:250 com extratos de *T. cruzi* epimastigota e de metacíclicos num ensaio de *immunoblot*. A Figura 10 apresenta um dos antisoros obtidos que reconheceu uma banda de peso molecular correspondente ao esperado (aproximadamente 60kDa). A proteína foi detectada em extrato de epimastigotas e em extrato de metacíclicos.



Figura 10: Immunoblot com soro de camundongo imunizados com a proteína 6-His-ZC3H31.

Extratos de *T. cruzi* epimastigota (**E**) e tripomastigotas metacíclico (**M**) submetidos a SDS-PAGE seguido de eletrotransferência para membrana de nitrocelulose. As membranas obtidas foram submetidas a testes com os soro anti-ZC3H31 na diluição de 1:250. A proteína TcZC3H31 está presente nos extratos de epimastigotas e de metacíclicos.

5.2. CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA TCZC3H31 EM *T. CRUZI*

Devido aos resultados obtidos acima, foram realizados testes para verificar a expressão da proteína em diferentes estágios do ciclo de vida do *T. cruzi*. Para isso, foram realizados ensaios de *immunoblot*, utilizando extratos de das formas epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos, amastigotas e tripomastigotas provenientes de infecção em células Vero. A proteína TcZC3H31 foi detectada nos extratos de epimastigotas e de tripomastigostas metacíclicos, confirmando o resultado obtido na Figura 10, mas foi fracamente detectada nos extratos das formas amastigota e de tripomastigota de cultivo celular (Figura 11). Portanto, TcZCH31 é uma proteína CCCH *zinc finger* expressa mais intensamente durante as fases do ciclo de vida do protozoário no hospedeiro invertebrado.

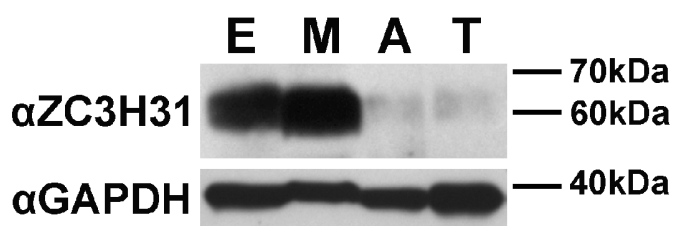


Figura 11: Análise da expressão de TcZC3H31 nas diferentes formas do ciclo de vida do *T. cruzi* por *immunoblot*.

Extrato de parasitas em diferentes estágios do ciclo de vida foram submetidos a SDS-PAGE seguido de eletrotransferência para membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada com antisoro anti-TcZC3H31 (α ZC3H31), na diluição de 1:100, ou com soro anti-GAPDH (α GAPDH) na diluição 1:10.000. A proteína foi detectada por quimioluminescência. **E**: extrato de epimastigotas. **M**: extrato de tripomastigotas metacíclicos. **A**: extrato de amastigotas. **T**: extrato de tripomastigotas de cultivo celular. Quantidade dos extratos normalizada pela quantidade de proteína (GAPDH).

Após analisar em quais formas a proteína TcZC3H31 é expressa, a próxima etapa foi determinar a localização celular dessa proteína por ensaio de imunofluorescência, usando o antisoro anti-TcZC3H31. Essa análise mostrou que

tanto na forma epimastigota quanto na forma tripomastigota metacíclica, a proteína TcZC3H31 é expressa de forma dispersa no citoplasma (Figura 12). Entretanto, em parasitas epimastigotas em divisão celular (mitose) a proteína está concentrada em pontos próximos ao núcleo.

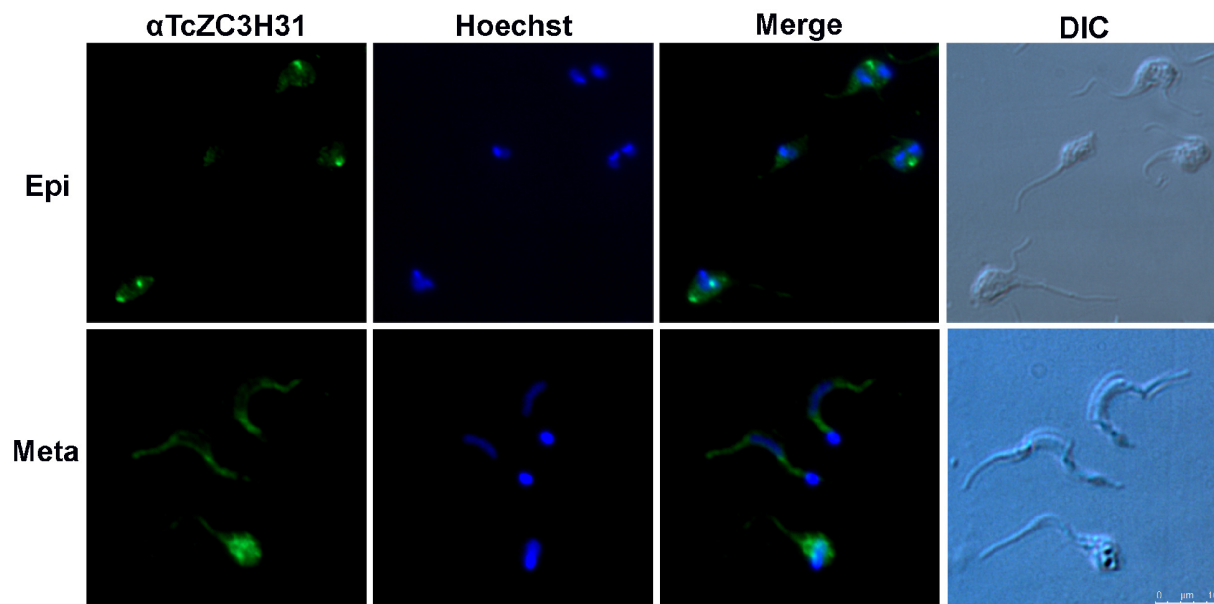


Figura 12: Detecção de TcZC3H31 por imunofluorescência.

Epimastigotas (**Epi**) em fase exponencial de crescimento e parasitas provenientes do sobrenadante da metaciclogênese (**Meta**) foram incubados com anticorpo anti-TcZC3H31 (α TcZC3H31, diluição 1:50) e com corante **Hoechst** para visualização do DNA nuclear e mitocondrial. **Merge**: sobreposição entre α TcZC3H31 e Hoechst. **DIC**: microscopia por contraste interferencial diferencial.

A Figura 13 mostra uma visão mais ampla de uma imunofluorescência com anti-TcZC3H31 em epimastigotas em fase exponencial de crescimento. No início da divisão celular, quando se inicia a protusão do novo flagelo, TcZC3H31 concentra-se no local aparentemente de onde eclode o novo flagelo (parasita indicados com o número "1" na Figura 13). Quando o novo flagelo e a citocinese já estão mais evidentes, TcZC3H31 apresenta-se concentrada em dois pontos, sendo um anterior ao cinetoplasto e outro imediatamente atrás do núcleo (parasitas indicados com o número "2" na Figura 13). Em fases mais avançadas da citocinese, observa-se somente um ponto na região posterior da célula (parasitas indicados com o número "3" na Figura 13).

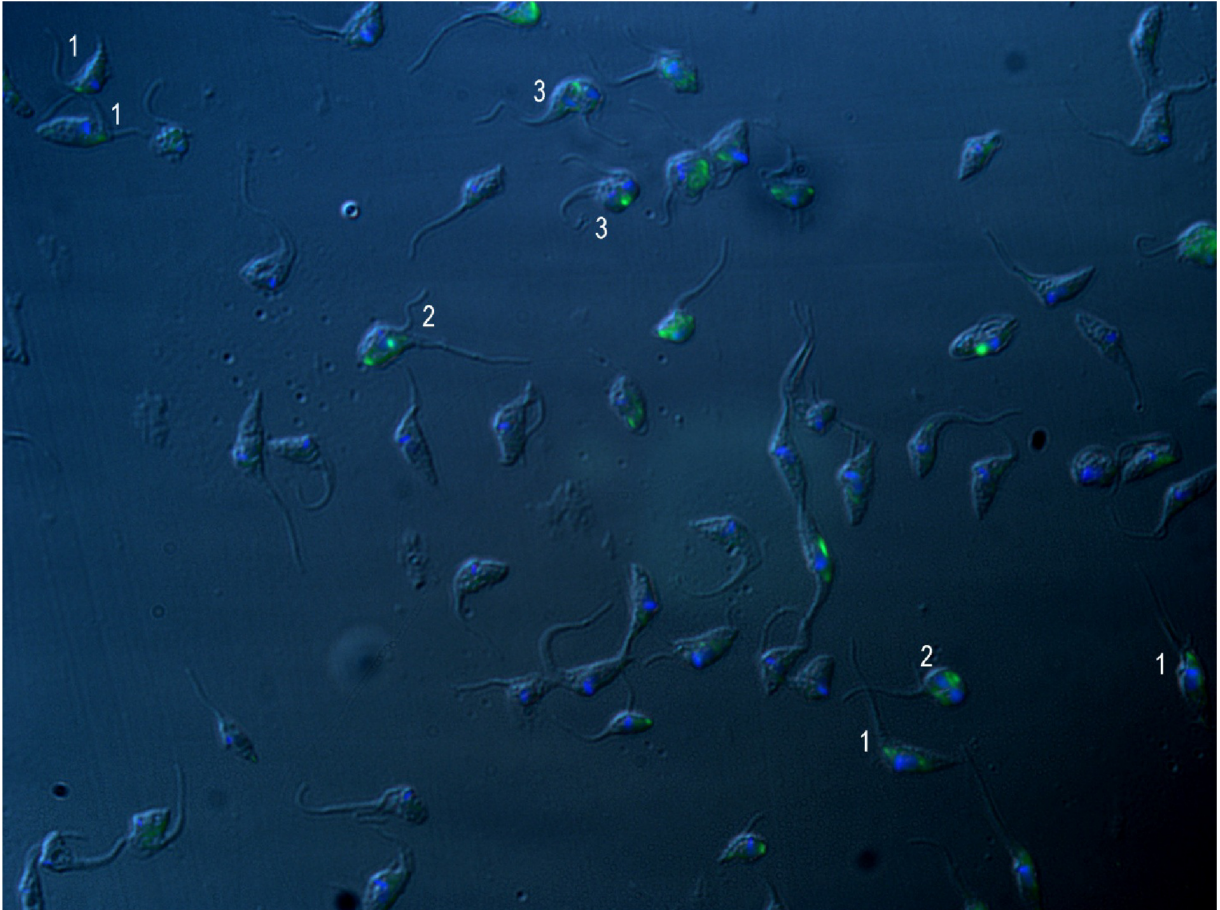


Figura 13: Imunofluorescência para detectar a proteína TcZC3H31 em epimastigotas em fase exponencial de crescimento.

Epimastigotas com três dias de cultura foram incubados com anticorpo anti-ZC3H31 (diluição 1:50) e com Hoechst para visualização do DNA nuclear e mitocondrial. A imagem mostra uma sobreposição dos 3 canais. Parasitas indicados com o número "1" estão no início da protusão de um novo flagelo; parasitas indicados com "2" já estão em fases mais avançadas da divisão, enquanto os indicados com "3" estão em fases finais da citocinese (detalhes no texto).

Para confirmar se as estruturas encontradas acima estão relacionadas com a divisão celular foram realizados experimentos de sincronização do ciclo celular com Hidroxiuréia (HU), a qual inibe a síntese de nucleotídeos trifosfatos, consequentemente inibindo a divisão celular. Após 24h de tratamento com esse composto, as células são lavadas e retornam ao meio LIT, portanto retomando a divisão celular. Os pontos escolhidos para a realização de imunofluorescência foram 9h e 10h após o retorno ao meio LIT, pontos em que a divisão do núcleo já se iniciou. Na Figura 14 é possível observar que as células no ponto de 9h

apresentam a marcação da proteína TcZC3H31 na região anterior da célula, numa estrutura próxima ao flagelo que já está duplicado. No ponto de 10h outra marcação, na região posterior da célula, próxima ao núcleo, surge em conjunto com a marcação observada no ponto de 9h. Essas estruturas observadas somente nos parasitas em divisão, detalhe confirmado pela presença de uma duplicação no flagelo, aparentemente não correspondem a nenhuma organela descrita até o momento.

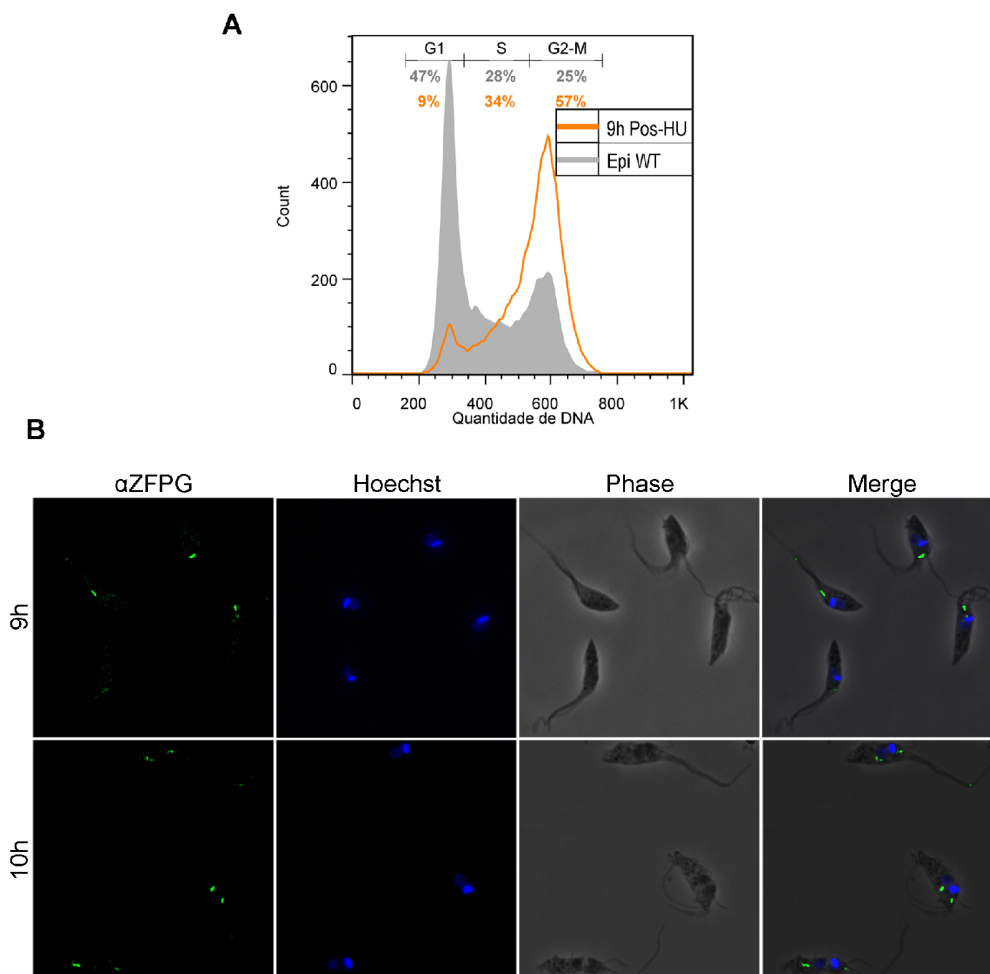


Figura 14: Imunofluorescência para detectar a proteína ZC3H31 em epimastigotas sincronizados.

A: Epimastigotas foram tratados com hidroxiuréia por 24h, lavados e após 9h de cultivo em LIT foram fixados, permeabilizados, corados com iodeto de propídeo (previamente tratados com RNase) e analisados por citometria de fluxo. Nesse ponto analisado mais de 50% das células estão em G2 ou mitose (**G2-M**). **B:** Epimastigotas foram tratados com hidroxiuréia por 24h, lavados e após 9h e 10h de cultivo em LIT foram incubados com anticorpo anti-ZC3H31 (α ZC3H31, diluição 1:50) e com **Hoechst** para visualização do DNA nuclear e mitocondrial. No ponto de 9h se observa apenas uma marcação na

região posterior das células, enquanto no ponto de 10h há uma estrutura adicional na região posterior ao núcleo. Imagens submetidas à deconvolução.

Para verificar se a proteína TcZC3H31 concentrada de forma pontual na fase de divisão celular se localiza com essas grânulos de mRNAs ainda não descritos, um experimento de FISH foi realizado. Sondas de Oligos-dTs, marcadas com digoxigenina, foram hibridizadas com parasitas obtidos 11h depois do tratamento de 24h com hidroxiuréia. O anticorpo anti-digoxigenina foi então incubado em conjunto com o anticorpo anti-TcZC3H31 para verificar se haveria co-localização entre a estrutura observada na figura anterior e a marcação dos mRNAs. Na Figura 15 é possível verificar que a co-localização não é significativa. De fato, a marcação do mRNA é mais fraca onde a estrutura com alta marcação da TcZC3H31 é observada. Portanto, não é possível afirmar que essa estrutura represente um grânulo de mRNA.

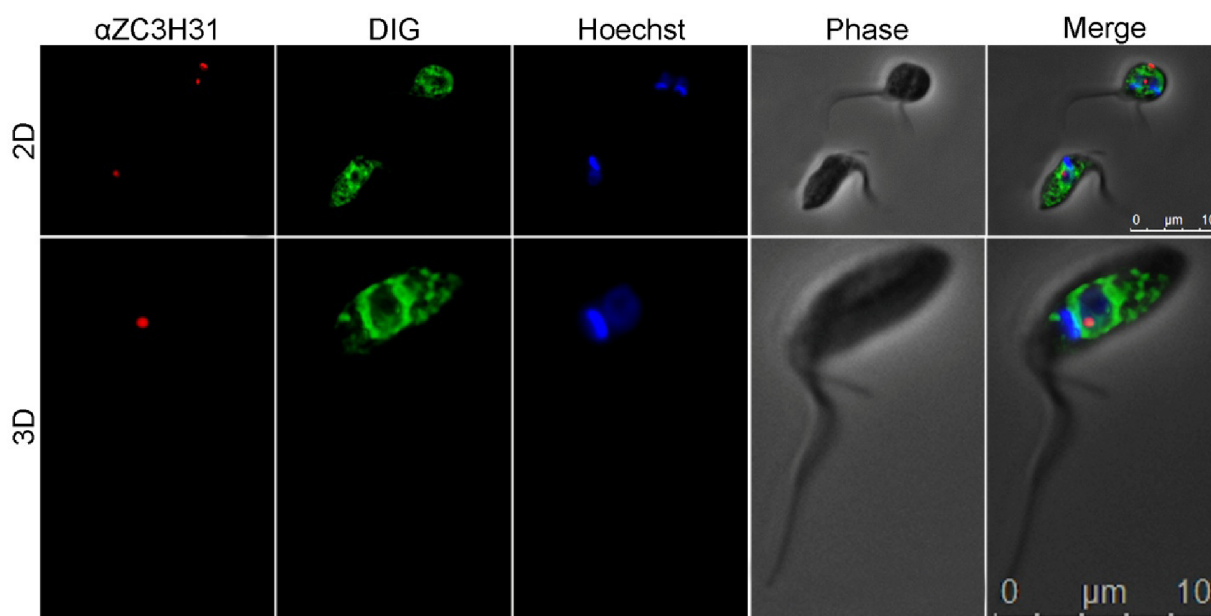


Figura 15: Experimento de FISH com epimastigotas sincronizados.

Epimastigotas foram tratados com hidroxiuréia por 24h, lavados e após 11h de cultivo em LIT foram incubados com sondas de oligo-dTs (conjugados com digoxigenina). Foram então incubados os anticorpos primários anti-TcZC3H31 (**αZC3H31**, diluição 1:50) e anti-DIG (**DIG**), os anticorpos secundários e o **Hoechst** para visualização do DNA nuclear e mitocondrial. É possível verificar que não há co-localização entre os mRNAs e a proteína TcZC3H31 nesses parasitas em início de divisão. Imagens submetidas à deconvolução. **2D**: imagens bidimensionais. **3D**: imagens submetidas a montagem tridimensional.

5.3. OBTENÇÃO DE PARASITAS MUTANTES

5.3.1. Superexpressão da proteína TcZC3H31 em *T. cruzi*

Formas epimastigotas foram transfectadas com o plasmídeo pNEO3XFLAG contendo o gene *TcZC3H31* (PNEO-ZC3H31-3xFLAG). A expressão da proteína FLAG-TcZC3H31 foi analisada por ensaio de *immunoblot*. Os resultados mostram que a expressão da proteína FLAG-TcZC3H31 foi significativamente maior quando comparada à proteína nativa através de ensaios de *immunoblot* (Figura 16), a qual foi confirmada tanto pela reatividade do anticorpo específico para a proteína TcZC3H31 (anti-TcZC3H31) quanto pelo anticorpo monoclonal específico para as etiquetas FLAG (anti-FLAG).



Figura 16: Análise da expressão da proteína de fusão TcZC3H31-FLAG em formas epimastigotas de *T. cruzi*.

Ensaio de *immunoblot* com extratos de epimastigotas selvagens (WT) e contendo o vetor pNEO-ZC3H31-3xFLAG (FZ) foram realizados com os soros anti-TcZC3H31 (αZC3H31), anti-GAPDH (αGAPDH) e o anticorpo monoclonal anti-FLAG (αFLAG). No painel da esquerda é possível observar que há uma maior reatividade do anticorpo anti-TcZC3H31 com o extrato dos parasitas transfectantes (FZ) em comparação com o dos parasitas selvagens (WT), o que é confirmado pela reatividade equivalente do anticorpo anti-GAPDH, utilizado como normalizador da reação, em ambos os extratos. No painel da direita é possível observar que há expressão da proteína de fusão devido à reatividade do anticorpo anti-FLAG com o extrato dos parasitas transfectantes (FZ), enquanto o mesmo não reage com o extrato dos parasitas selvagem (WT).

A expressão da proteína Flag-ZC3H31 também foi verificada através de ensaios de imunofluorescência utilizando-se o anticorpo monoclonal anti-FLAG. É possível verificar (Figura 17) que a proteína de fusão acumula-se ao redor do núcleo dos parasitas nos quais ela é superexpressa. Além disso, a expressão não ocorre de forma homogênea na população de parasitas, ou seja, enquanto alguns

parasitas apresentam uma forte marcação, outros apresentam uma marcação mais branda. Esse padrão está de acordo com o esperado para uma expressão do tipo ectópica.

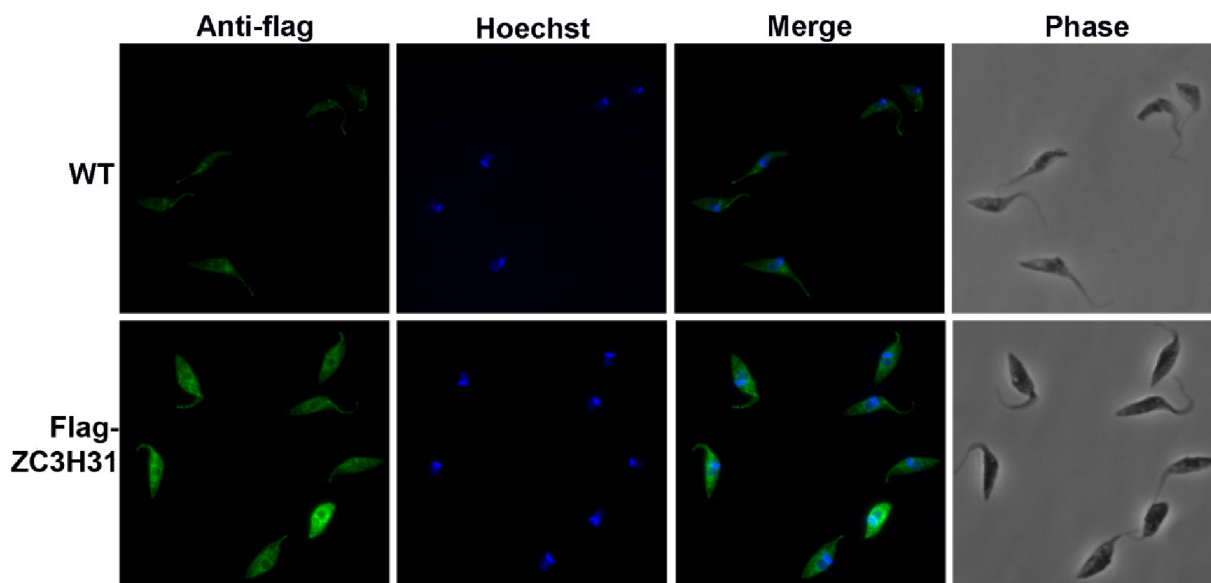


Figura 17: Imunofluorescência para detectar a proteína Flag-ZC3H31.

Epimastigotas selvagens (WT) ou expressando a proteína **FLAG-TcZC3H31** foram incubados com anticorpo monoclonal **Anti-flag** e com corante **Hoechst**.

5.3.2. Obtenção de mutantes de *T. cruzi* para o gene *TcZC3H31*

Parasitas nocautes para o gene *TcZC3H31* foram obtidos através de recombinação homóloga entre as regiões UPS e DOWN (Figura 18 e item 4.16.1.1 de Materiais e Métodos) presentes no cromossomo do *T. cruzi* e as mesmas regiões presentes nos cassetes UPS-NEO-DOWN e UPS-HIGRO-DOWN, os quais foram transfectados nesses parasitas. Conseqüentemente, a região correspondente ao gene *TcZC3H31* contida entre as regiões UPS e DOWN foi substituída pelo cassete contendo a resistência aos antibióticos G418 (neomicina) e Higromicina (Figura 18). A seleção de parasitas com ambos os alelos deste gene nocauteados se deu, portanto, através do cultivo em meio seletivo contendo as drogas G418 e Higromicina.

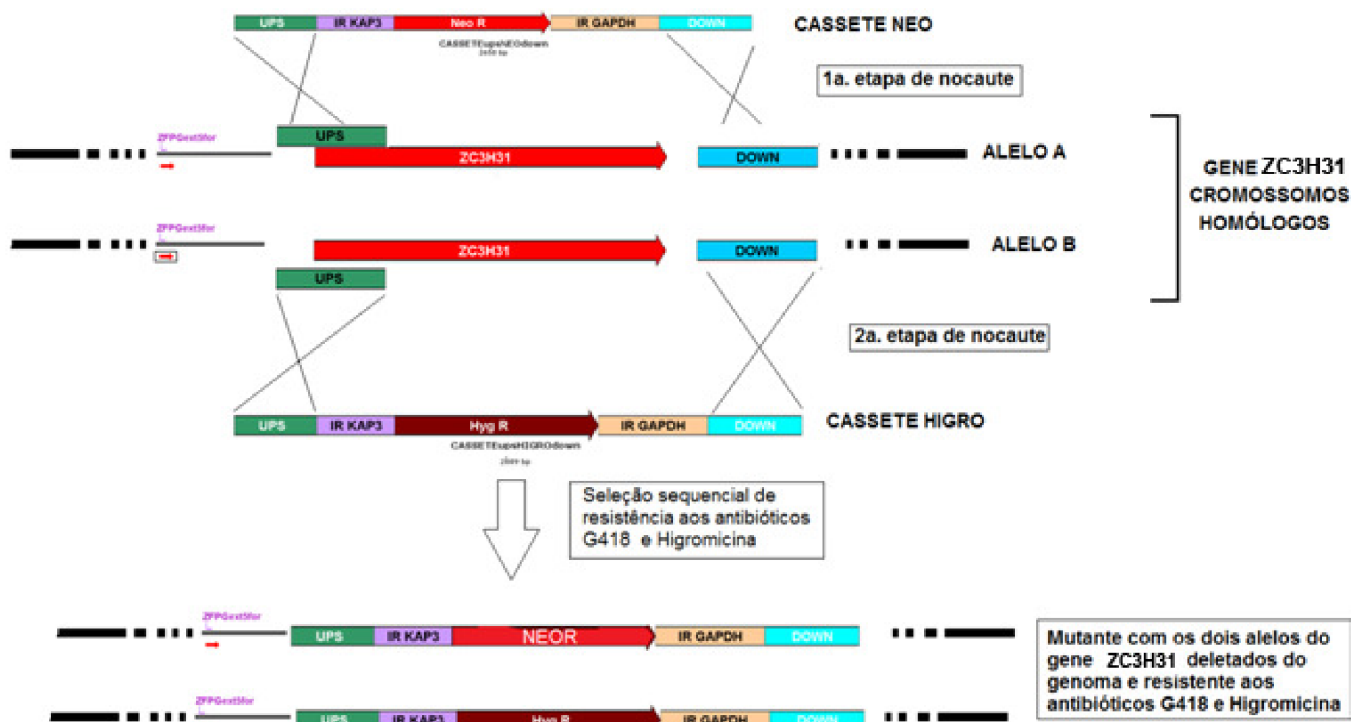


Figura 18: Diagrama das etapas de nocaute do gene *TcZC3H31* por recombinação homóloga, usando os cassetes NEO e HIGRO.

A posição do *prímer* externo à construção (*prímer* ZFPGext5for) é indicada pela seta vermelha menor.

DNA da população mutante para o gene *TcZC3H31* (*T. cruzi*^{*TcZC3H31::neo/TcZC3H31::higro*}) foi purificado e utilizado em reações de PCR para comprovar a correta inserção dos cassetes NEO e HIGRO no locus gênico em estudo. Na Figura 19 é possível verificar que a obtenção do nocaute ocorreu de forma satisfatória. Nessa estratégia de PCR utilizamos a combinação de *primers* reversos que hibridizam com os genes de resistência (nomeados NEOR e HIGROR) com um *prímer* que hibridiza em uma região a montante do gene *TcZC3H31* e que é externo aos cassetes NEO e HIGRO utilizados (*prímer* ZFPGext5for). Portanto, a amplificação do DNA genômico dos parasitas mutantes por PCR com o *prímer* ZFPGext5for em conjunto com *primers* que anelam nos respectivos genes de resistência Neo e Higo, somente seria positiva se houver a correta integração dos cassetes na região desejada do cromossomo. De fato podemos observar na Figura 19A a presença de uma banda de tamanho esperado

de 2024 pb na reação de PCR com os primers ZFPGext5for + NEOR (Figura 19A, canaleta 1) e uma banda de tamanho esperado de 2272 pb na reação de PCR com os primers ZFPGext5for + HIGROR (Figura 19A, canaleta 2). Na Figura 19B verifica-se o resultado da triplicata da reação de qPCR (PCR quantitativa), com primers específicos para o gene *TcZC3H31* (primers nomeados ZFPgPCR1F e ZFPgPCR1R), a partir dos mRNAs obtidos da população selvagem (WT) e da população mutante (KO); é possível ver claramente que, enquanto existe a expressão do mRNA de *TcZC3H31* nos parasitas selvagens, nos parasitas KO essa expressão é nula. O mesmo acontece quando se analisa a expressão da proteína TcZC3H31 (Figura 19C): apesar de se verificar a mesma quantidade da proteína GAPDH em ambas as canaletas, a qual é utilizada como normalizadora dessa reação, a proteína TcZC3H31 está ausente nos mutantes e presente nos parasitas selvagens.

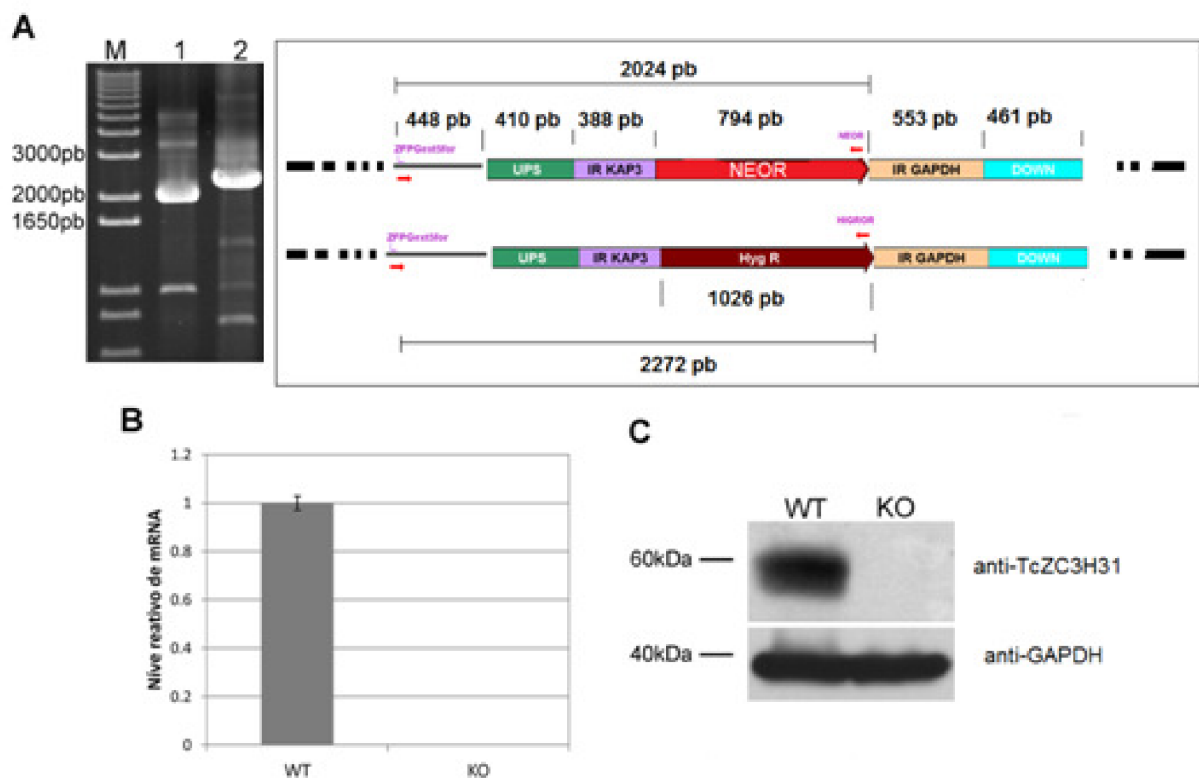


Figura 19: Obtenção de *T. cruzi* mutante para o gene *TcZC3H31*.

A: gel de agarose com resultado de PCRs com DNA genômico do *T. cruzi* mutante (*TcZC3H31::neo/TcZC3H31::higo*) amplificado com os primers ZFPGextF+NEOR (1) e ZFPGextF+HIGROR (2). À direita estão representados esquemas dos produtos de PCR. **B:** qPCR com primers específicos para o gene *TcZC3H31* e mRNAs da

população selvagem (**WT**) e população nocaute (**KO**). **C:** *Immunoblot* com extratos de epimastigotas nocautes (**KO**) e selvagens (**WT**) e anticorpos anti-TcZC3H31 (**α ZC3H31**) e anti-GAPDH (**α GAPDH**).

5.3.3. Caracterização biológica de *T. cruzi* que superexpressa a proteína TcZC3H31 e de *T. cruzi* mutante para o gene *TcZC3H31* (KO)

Formas epimastigotas de *T. cruzi* superexpressando a proteína TcZC3H31-FLAG e parasitas KO foram comparados aos parasitas selvagens e a parasitas expressando a proteína de fusão GFP-FLAG quanto à taxa de crescimento em cultivo com meio LIT (inóculo inicial de 1×10^6 células/mL). As contagens das células foram realizadas a cada 24 h, durante um período de 7 dias, e a partir das contagens foram construídas curvas de crescimento, as quais estão representadas na Figura 20. Podemos observar que não houve diferenças significativas entre as curvas de crescimento dos parasitas selvagens (WT) e dos parasitas mutantes (KO). Também não foram observadas diferenças entre as curvas dos parasitas expressando GFP-FLAG ou superexpressando TcZC3H31-FLAG.

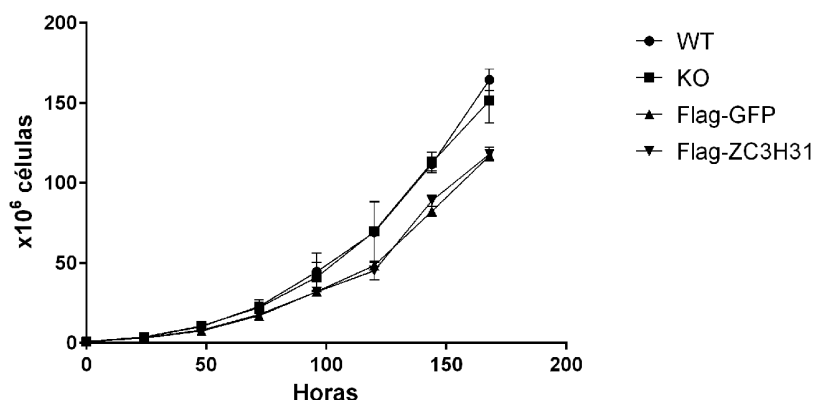


Figura 20: Curvas de crescimento de *T. cruzi* em meio LIT.

O crescimento dos parasitas selvagens (**WT**) foi comparado com o dos parasitas nocautes (**KO**), dos parasitas expressando **Flag-GFP** e dos parasitas superexpressando **Flag-ZC3H31**. As curva de crescimento e o tratamento estatístico foram realizadas pelo programa GraphPad Prism 6.

Como observado pelas curvas de crescimento, a deleção ou superexpressão do gene não afetam a proliferação dos parasitas. Portanto, esse

dado sugere que a proteína TcZC3H31 não é uma proteína essencial para a fase replicativa do *T. cruzi*.

Os mutantes foram também analisados quanto à capacidade de diferenciação a partir de epimastigotas para tripomastigotas metacíclicas (metaciclogênese) (detalhes em Materiais e Métodos, (item 4.10.2). Foram realizadas contagens diferenciais em câmara de Neubauer, a partir do sobrenadante da metaciclogênese, a cada 24 h após a incubação das células em meio TAU3AAG, durante um período de 3 dias (72 h). A partir dessas contagens foram construídos curva com a contagem do número de metacíclicos ao longo dos três dias (Figura 21A), bem como a porcentagem de metacíclicos obtidos no 3º dia de metaciclogênese (Figura 21B).

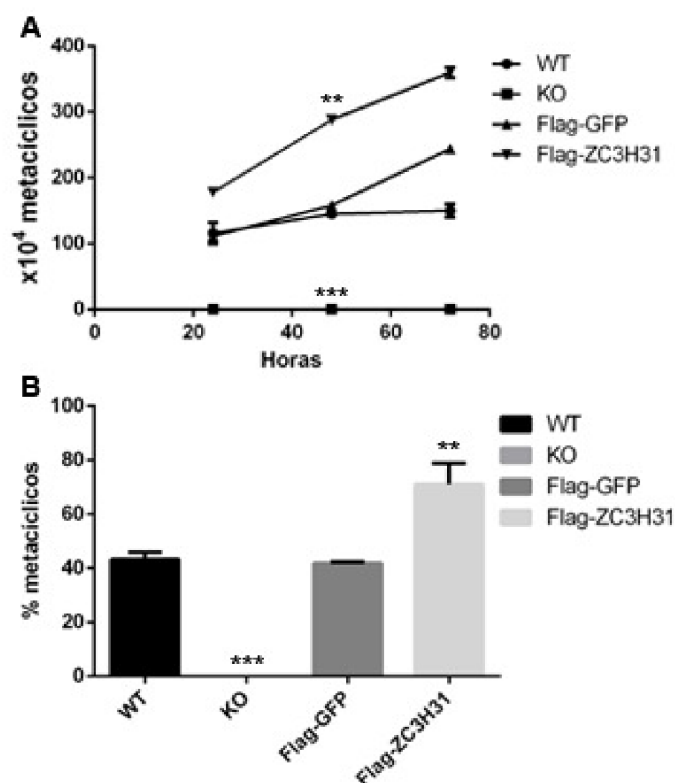


Figura 21: Metaciclogênese da população de *T. cruzi* que superexpressa a proteína TcZC3H31 e de *T. cruzi* mutante para o gene *TcZC3H31* (KO).

WT: parasitas selvagens. **KO:** parasitas nocautes. **Flag-GFP:** parasitas expressando a proteína de fusão Flag-GFP. **Flag-ZC3H31:** parasitas expressando a proteína de fusão FLAG-TcZC3H31. **A:** Curva representativa das contagens de formas tripomastigotas metacíclicas ao longo dos 3 dias de metaciclogênese. **B:** gráfico contendo as porcentagens de tripomastigotas metacíclicas obtidos no terceiro dia de metaciclogênese. O tratamento estatístico foi realizado pelo programa GraphPad Prism

6. Para a comparação entre as curvas em **A** foi realizado o teste t pareado. Para a comparação entre as porcentagens de **B** e entre todos os pontos de **A** foi realizado o teste t não-pareado. Os asteriscos indicam quando houve diferença significativa em relação aos controles (**WT** e **Flag-GFP**). **: $p < 0,005$. ***: $p < 0,001$. Como observado, não houve aparecimento de formas tripomastigotas metacíclicas na população **KO**, enquanto na população superexpressando **Flag-TcZC3H31** houve um aumento significativo na quantidade de metacíclicos em relação aos controles.

Como verificado na Figura 21B, os parasitas KO são incapazes de se diferenciarem para tripomastigotas metacíclicos. A confirmação desse dado foi realizada através do tratamento dos parasitas, presentes no sobrenadante do terceiro dia de metaciclogênese, com soro humano fresco (SHF). É fato estabelecido que somente as formas epimastigotas são suscetíveis ao ataque pelo sistema imune inato, as quais são totalmente lisadas pelo sistema complemento. Portanto, quando tratadas com SHF, o qual contém as proteínas da via do complemento, as formas epimastigotas são lisadas enquanto as formas tripomastigotas metacíclicas sobrevivem. A exposição dos parasitas KO, mantidos em meio TAU3AAG, ao SHF por 15 minutos levou à completa lise dos parasitas presentes no sobrenadante do meio, enquanto que no grupo controle (WT) aproximadamente 50% dos parasitas presentes no sobrenadante do meio TAU3AAG sobreviveram à lise pelo complemento. Esses dados demonstram que a ausência de alterações morfológicas é acompanhada da ausência de proteínas de superfície específicas de tripomastigotas metacíclicos, as quais conferem resistência à lise por complemento.

Além disso, a Figura 21B mostra que os parasitas que superexpressam a proteína TcZC3H31-FLAG possuem uma maior capacidade de diferenciação para tripomastigotas metacíclicos em comparação com os parasitas controle (WT e GFP-FLAG). Essa capacidade também foi observada nas culturas de parasitas em fase estacionária de crescimento (culturas com mais de 7 dias), as quais possuíam um número muito maior de tripomastigotas metacíclicos quando comparadas com as culturas controles cultivadas sob as mesmas condições (dados não mostrados). Esses resultados sugerem que a proteína TcZC3H31 é essencial para a metaciclogênese.

Foi analisada também, através de microscopia óptica e fluorescência, a morfologia dos parasitas nocautes no terceiro dia de metaciclogênese. Os parasitas nocautes e selvagens foram submetidos à metaciclogênese sobre lamínulas de microscopia. No terceiro dia, os parasitas presentes no sobrenadante do meio TAU3AAG foram coletados e, assim como os parasitas aderidos em lamínula, foram submetidos a processamento para visualização de DNA nuclear e do cinetoplasto (kDNA) (tratamento com Hoechst). Na Figura 22 é possível visualizar as diferenças morfológicas entre os parasitas nocautes e selvagens presentes no sobrenadante do meio TAU3AAG: enquanto entre os parasitas selvagens há muitos tripomastigotas metacíclicos, distinguíveis pelo corpo celular alongado, membrana ondulante e núcleo alongado mais distante do cinetoplasto, essa forma celular não é observada entre os parasitas nocautes. Além disso, a densidade celular é maior no sobrenadante dos parasitas selvagens. Houve diferenças também entre os parasitas aderidos: através de contagens dos parasitas aderidos em lamínula foi possível perceber que a densidade celular de formas aderidas na população KO foi maior que a da população WT.

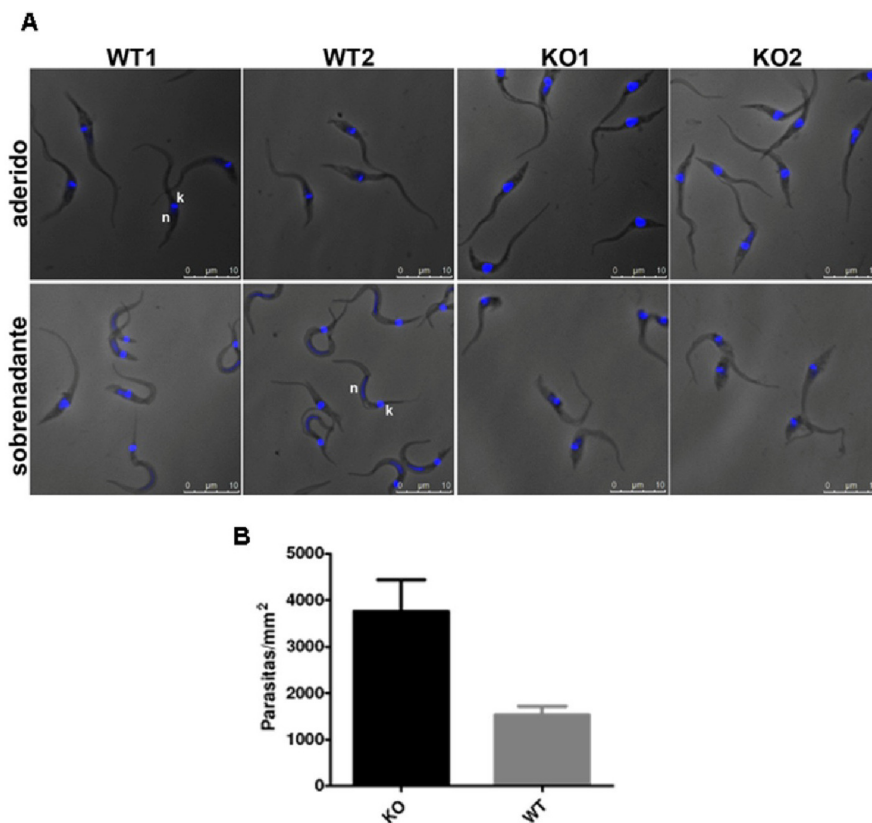


Figura 22: Diferenças morfológicas entre parasitas selvagens (WT) e nocautes (KO).

Formas epimastigotas foram mantidas em placas de 24 poços, em meio TAU3AAG para se diferenciarem em tripomastigotas metacíclicos. Lamínulas de microscópio foram previamente colocadas no fundo dos poços, de tal modo que os parasitas pudessem se aderir a esse substrato. **A:** Parasitas aderidos a laminúla (**Aderido**) e parasitas do sobrenadante do meio TAU3AAG (**Sobrenadante**) foram analisados por microscopia (contraste de fase após coloração com o corante Hoechst) após o terceiro dia de metaciclogênese. **WT1 e 2:** parasitas selvagens. **KO1 e 2:** parasitas nocautes. A imagem foi construída pela sobreposição entre contraste de fase e fluorescência. O núcleo (**n**) e cinetoplasto (**k**) de alguns parasitas estão indicados na figura. Não foram observados tripomastigotas metacíclicos no sobrenadante da metaciclogênese da população KO. **B:** contagem dos parasitas aderidos em laminúla a partir de 5 campos (imagens da microscopia). Há um maior número de parasitas nocautes (**KO**) aderidos em comparação com os parasitas selvagens (teste t, $p = 0,0164$).

5.4. VERIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA TCZC3H31 NOS ESTÁGIOS INTERMEDIÁRIOS DE DIFERENCIAÇÃO

Devido aos resultados anteriores, a expressão dessa proteína foi verificada por imunofluorescência durante a metaciclogênese, para se obter pistas sobre o papel da mesma nos estágios intermediários de diferenciação

(epimastigotas 5 dias, epimastigotas sob *stress* nutricional e epimastigotas aderidos). Na Figura 23 é possível verificar que em epimastigotas com 5 dias de cultivo (fim da fase exponencial de crescimento) há uma heterogeneidade na marcação da proteína dentro da população, com alguns parasitas expressando mais que outros. Além disso, o padrão de expressão parece ser granular. Alguns parasitas em divisão também são observados com a mesma marcação dos parasitas sincronizados. Nos parasitas estressados a mesma heterogeneidade da população é observada. Entretanto, a população de parasitas aderidos apresenta grande homogeneidade, com todas as células observadas apresentando um padrão de expressão granular concentrado principalmente na região posterior dos parasitas. Esses resultados indicam um papel importante da proteína durante a fase de adesão, fase essa essencial para a completa diferenciação em tripomastigotas metacíclicos.

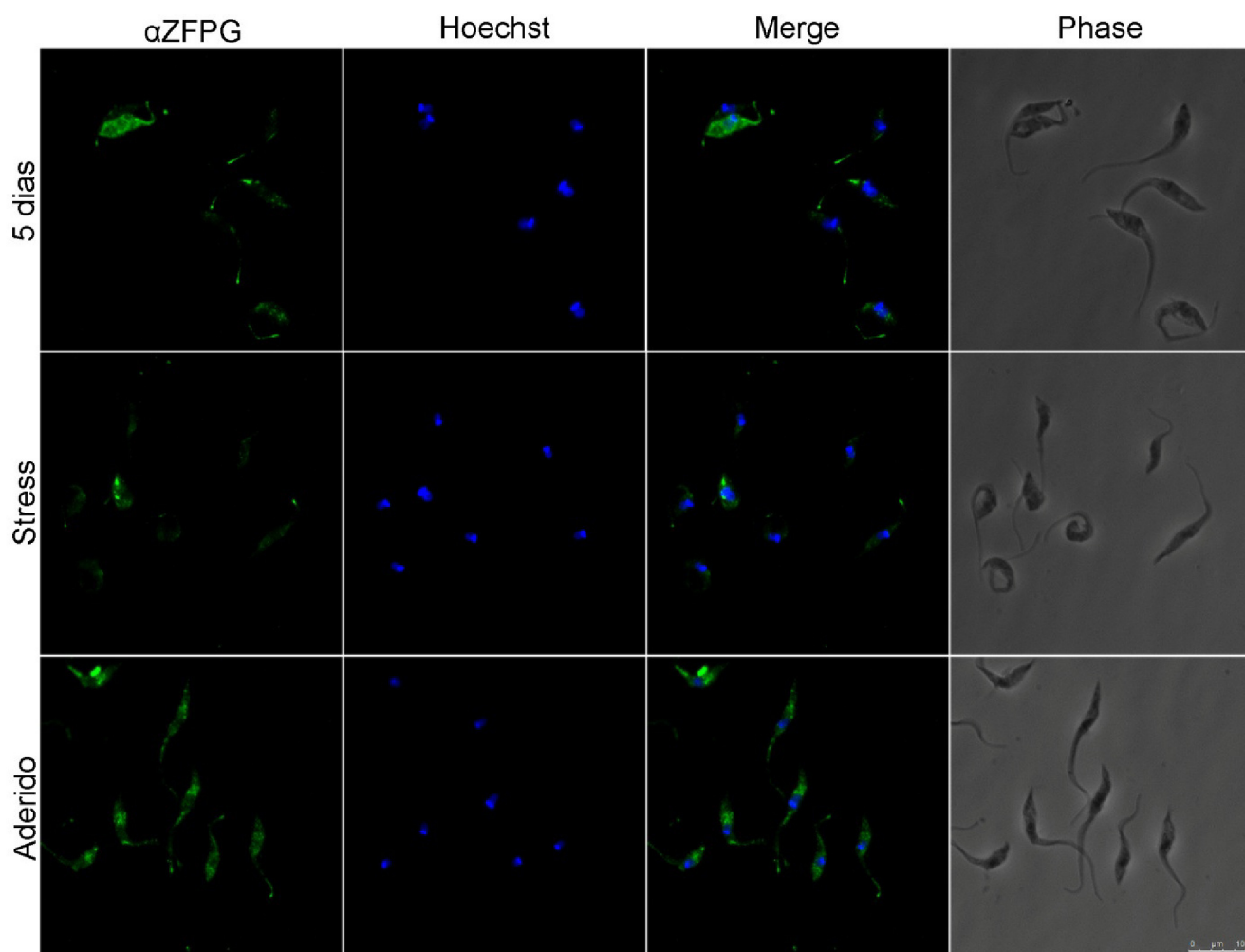


Figura 23: Imunofluorescência para detectar a proteína TcZC3H31 durante a o processo de metaciclogênese.

Epimastigotas há 5 dias em cultura (**5 dias**), sob *stress* nutricional (**Stress**) e há 24h aderidos (**Aderido**) foram fixados, permeabilizados, bloqueados e incubados com anticorpo anti-ZC3H31 (α ZFPG, diluição 1:50) e com **Hoechst** para visualização do DNA nuclear e mitocondrial. **Merge**: sobreposição entre α ZFPG e Hoechst.

5.5. IDENTIFICAÇÃO DE RNAs-ALVOS

Foi realizado experimento de imunoprecipitação de RNA para identificar possíveis mRNAs alvos da proteína TcZC3H31. Para isso, parasitas epimastigotas foram lisados e o extrato citoplasmático foi incubado com *beads* magnéticas de proteína G (clareamento). O sobrenadante foi coletado, incubado com antisoro anti-TcZC3H31 ou soro pré-imune e, novamente, incubado com *beads* magnéticas

de proteína G para capturar os anticorpos e os complexos ligados a eles. As *beads* coletadas dessas incubações sofreram dois procedimentos diferentes. O primeiro foi a eluição do material ligado às *beads* com tampão de amostra para análise em SDS-PAGE. A Análise do material das diferentes amostras por *immunoblot* mostrou que a proteína TcZC3H31 foi encontrada apenas na fração imunoprecipitada com o antisoro anti-TcZC3H31 (Figura 24).

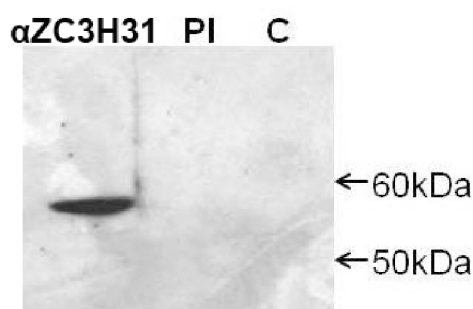


Figura 24: Immunoblot da imunoprecipitação de TcZC3H31.

Extrato citoplasmático de formas epimastigotas de *T. cruzi* (3×10^9 células) foi incubado com resina magnética de proteína G por 30min a 4°C (clareamento). O sobrenadante foi coletado e dividido em dois volumes iguais, os quais foram incubados com soro anti-TcZC3H31 (α ZC3H31) ou soro pré-imune (PI), ambos na diluição 1:20, por 2 h a 4 °C. Em seguida, ambos foram incubados por 30 min a 4 °C com *beads* magnéticas de proteína G. As *beads* coletadas após incubação com o extrato (clareamento - C), com o antisoro anti-ZC3H31 (α ZC3H31) e com o soro pré-imune (PI) foram submetidas a lavagens e eluição com tampão de amostra para SDS-PAGE. As amostras foram submetidas à SDS-PAGE 12%, seguida de eletrotransferência para membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada com antisoro anti-TcZC3H31, seguida de incubação com proteína A conjugada a peroxidase (HRP). Como esperado, a proteína TcZC3H31 foi detectada apenas no material imunoprecipitado com antisoro anti-TcZC3H31.

Após a verificação de que a proteína TcZC3H31 foi imunoprecipitada de forma satisfatória, as *beads* magnéticas foram submetidas ao segundo tipo de procedimento, que consistia na eluição com tampão para extração dos RNAs complexados ao material que foi imunoprecipitado (tampão RLT, *kit* RNeasy – Qiagen). O RNA obtido foi submetido à transcrição *in vitro* para amplificação de mRNAs (obtenção de aRNA - RNA amplificado). O aRNA então foi submetido a preparação para o sequenciamento na plataforma SOLID. Após a corrida, as sequências obtidas foram alinhadas com o genoma do *T. cruzi*. O número de sequências (*Reads*) geradas e mapeadas a partir de cada amostra está detalhado na Tabela 2.

TABELA 2 - NÚMERO DE SEQUÊNCIAS GERADAS NO SEQUENCIAMENTO

Amostra	Gerados	Mapeados	%
Clear1	6,102,096	2,565,203	42.0%
Clear2	4,997,907	2,015,763	40.3%
Clear3	5,235,066	2,134,286	40.8%
PI1	4,185,570	1,723,289	41.2%
PI2	5,018,604	2,095,768	41.8%
PI3	4,895,565	1,931,102	39.4%
ZC3H31A	4,824,782	1,832,787	38.0%
ZC3H31B	4,249,097	1,497,032	35.2%
ZC3H31C	3,939,577	1,276,547	32.4%

Clear1-3: amostras de clareamento (controle negativo). **PI1-3:** amostras da imunoprecipitação com soro pré-imune (controle negativo). **ZC3H31A-C:** amostras da imunoprecipitação com soro anti-ZC3H31. **Gerados:** número total de sequências (*reads*) geradas a partir do sequenciamento. **Mapeados:** número de sequências (*reads*) alinhadas com o genoma do *T. cruzi*. **%:** porcentagem de sequências mapeadas em relação ao número total.

Foram então realizadas análises estatísticas para identificar os mRNAs que se ligaram especificamente ao material imunoprecipitado com o anticorpo anti-TcZC3H31 em comparação com os controles negativos (clareamento e soro pré-imune). Para isso foi utilizado o pacote edgeR do programa R. Foram considerados diferentes níveis de confiabilidade estatística (false discovery rate, FDR). A Tabela 3 contém o número total de sequências consideradas significativamente diferentes quando são comparados os controles negativos com o imunoprecipitado com anti-TcZC3H31.

TABELA 3 - NÚMERO DE GENES IDENTIFICADOS COMO SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES ENTRE AS AMOSTRAS DO CONTROLE NEGATIVO E DO IMUNOPRECIPITADO COM ANTI-ZC3H31

	FDR 10%		FDR 5%		FDR 1%		FDR 0.1%		FDR 0.01%	
	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N
clear x ZC3H31	705	530	469	327	210	126	60	34	24	10
PI x ZC3H31	437	376	279	238	79	74	23	28	11	9

Clear x ZC3H31: comparação entre as amostras do clareamento e as amostras do material precipitado com anti-ZC3H31. **PI x ZC3H31:** comparação entre as amostras do material precipitado com o pré-imune e as amostras do material precipitado com anti-ZC3H31. **FDR:** nível de confiabilidade estatística (false Discovery rate). **P:** genes aumentados no precipitado com anti-ZC3H31 (positivos). **N:** genes diminuídos no precipitado com anti-ZC3H31 (negativos).

Para análises posteriores foram considerados apenas os genes positivos (aumentados no imunoprecipitado com anti-ZC3H31 em relação a ambos os controles negativos) e com FDR menor que 5%. Sob esses critérios foram obtidos 279 genes (Anexo – Tabela 1), os quais foram utilizados para as análises *in silico* subsequentes (*Gene Ontology*).

Dentre os 279 genes obtidos, alguns foram selecionados para as análises de PCR quantitativa. Os critérios utilizados para essa seleção foram o grau de reprodutibilidade do resultado (homogeneidade entre as réplicas), número de sequências obtidas no sequenciamento (*reads*) para cada gene, o grau de alteração absoluta (*Fold Change*) em comparação com os controles, número de cópias do respectivo gene no genoma de *T. cruzi* (foram aceitos genes com até duas cópias) e a identificação de algum domínio conhecido na proteína codificada pelo gene. A Tabela 4 contém os 34 genes selecionados e os respectivos domínios identificados pelo banco de dados Pfam.

TABELA 4 - GENES SELECIONADOS PARA AS ANÁLISES POR PCR QUANTITATIVA

SUPERGENE	IDs	DOMÍNIOS/FUNÇÃO
SG0658	TcCLB.504013.110	serine/threonine-protein phosphatase 2A, catalytic subunit, putative
	TcCLB.508585.29	domínio calcineurene-like phosphoesterase (METALLOPHOS)
	TcCLB.510879.10	
SG7739	TcCLB.511807.130	Zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type (and similar)
SG6968	TcCLB.507099.80	ABC transporter, putative
SG4806	TcCLB.511807.80	mRNA cap methyltransferase-like protein, putative
	TcCLB.508095.20	
SG5890	TcCLB.504881.50	ABC transporter, putative
	TcCLB.510045.20	
SG2137	TcCLB.510155.110	RNA binding (domínio RRM1) - RBP32
	TcCLB.511585.120	
SG1130	TcCLB.511825.180	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase
	TcCLB.506861.10	
	TcCLB.508323.199	
SG1097	TcCLB.508231.30	target of rapamycin (TOR) kinase 1, putative
	TcCLB.508549.30	domínios: Phosphatidylinositol 3- and 4-kinase
	TcCLB.508551.10	FAT domain, FATC domain, Rapamycin binding domain
SG1486	TcCLB.506859.204	Zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type (and similar) - ZC3H20
	TcCLB.503567.9	
SG2277	TcCLB.511907.240	Protein kinase domain
	TcCLB.506801.120	Leucine Rich Repeat
SG8750	TcCLB.511277.200	RNA binding (domínio RRM1) - RBP12
SG6276	TcCLB.503885.100	Cyclin
	TcCLB.511903.300	
SG0995	TcCLB.503893.150	Beta-helix e domínio NosD
	TcCLB.508505.40	
	TcCLB.508507.9	
SG0664	TcCLB.508909.170	EF hand7 domain
	TcCLB.510057.4	
	TcCLB.503967.4	
SG2647	TcCLB.508899.20	Ankyrin repeat
	TcCLB.511365.50	SPRY domain
SG0997	TcCLB.509803.40	5-oxoprolinase, putative
	TcCLB.511273.59	Hydantoinase B/oxoprolinase
	TcCLB.508889.4	
SG3004	TcCLB.511145.30	DUF
	TcCLB.504069.40	ATP syntase B chain precursor - mitochondrial
SG7813	TcCLB.511727.250	RIC1
SG2103	TcCLB.506525.70	WD domain, G-beta repeat
	TcCLB.511283.80	
SG7218	TcCLB.506925.170	Cyclin, N-terminal domain
SG3606	TcCLB.509733.90	Chorein-N (N-terminal region of Chorein, a TM vesicular sorter)
	TcCLB.509599.20	
SG1711	TcCLB.509991.9	Protein kinase domain
	TcCLB.511431.10	PX domain, tRNA synthetase domain
SG3580	TcCLB.510667.30	ALMT (aluminium activated malate transporter)
	TcCLB.507009.130	FUSC2 (fusaric acid resistance protein like)
SG8202	TcCLB.508461.300	MIZ/SP-RING zinc finger
SG7872	TcCLB.511725.270	WD domain, G-beta repeat
SG8520	TcCLB.503617.20	kinetoplast DNA-associated protein, putative
SG5063	TcCLB.503613.10	Protein kinase domain
	TcCLB.511165.80	
SG6900	TcCLB.511545.80	Transmembrane amino acid transporter protein
	TcCLB.509153.80	EF hand1 domain
SG1747	TcCLB.510305.9	
	TcCLB.503685.10	serine/threonine protein kinase, putative,protein kinase, putative
SG2227	TcCLB.509999.110	
	TcCLB.506519.60	Protein kinase domain
SG3190	TcCLB.508909.90	
	TcCLB.507021.20	ESAG8-associated protein, putative
SG3665	TcCLB.511753.60	PSP1 C-terminal conserved region
	TcCLB.506503.80	Kinesin motor domain
SG2138	TcCLB.511293.60	
	TcCLB.506367.60	vacuolar protein sorting protein 16, putative
SG3724	TcCLB.508355.200	

5.5.1. Análises por PCR quantitativa

As reações de qPCR (PCR quantitativa) foram realizadas para analisar os RNAs-alvos da proteína TcZC3H31 quanto à sua expressão ao longo do ciclo de vida dos parasitas e em parasitas epimastigotas em condições de superexpressão (Flag-TcZC3H31) ou ausência (nocaute) da proteína (análises estatísticas demonstradas no Anexo – Tabela 2). Foi construído um mapa de *clusterização* (*heat map*) a partir dos resultados obtidos, o qual agrupa genes com padrões de expressão semelhantes (Figura 25). Quando se verifica o nível de expressão desses mRNAs nos parasitas nocautes e nos parasitas com superexpressão da proteína, em comparação com os parasitas controles, não é possível verificar uma correlação direta entre a ausência/superexpressão da proteína com estabilização/desestabilização dos mRNAs analisados, já que existem grupos que aumentam a expressão (vermelho) nos parasitas superexpressando Flag-ZC3H31 e diminuem a expressão (verde) nos parasitas nocautes, grupos que se comportam de maneira oposta e há genes que não apresentam nenhuma correlação entre os padrões de expressão e a superexpressão/ausência da proteína. Não há também uma correlação clara do padrão e expressão desses mRNAs ao longo do ciclo de vida.

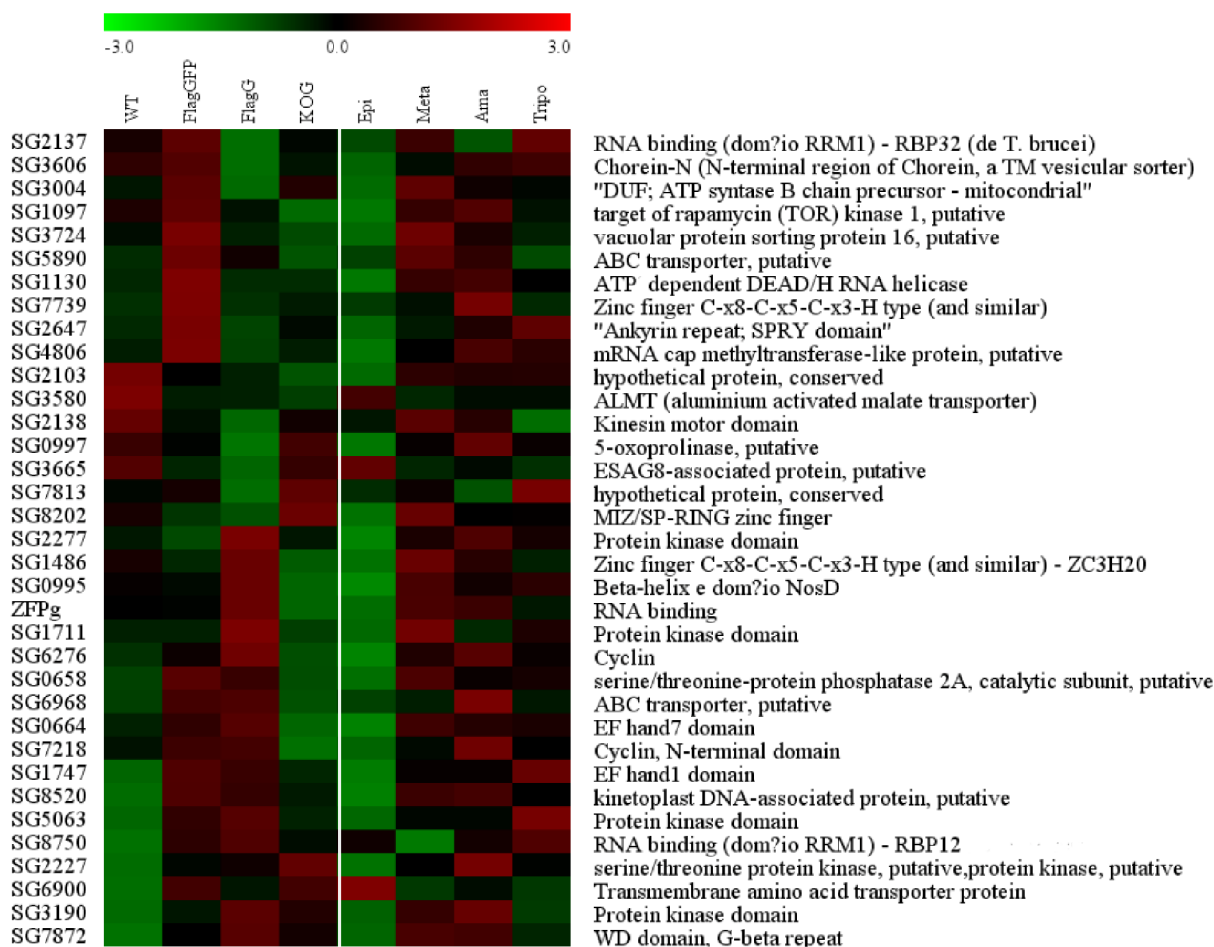


Figura 25: Heat map demonstrativo dos padrões de expressão dos mRNAs-alvos de TcZC3H31 avaliados por qPCR.

Vermelho: expressão aumentada. **Verde:** expressão diminuída. **WT:** RNAs de parasitas epimastigotas selvagens. **FlagGFP:** RNAs dos parasitas controles expressando a proteína de fusão Flag-GFP. **FlagG:** mRNAs de parasitas epimastigotas superexpressando a proteína Flag-ZC3H31. **KOG:** RNAs de parasitas epimastigotas nocautes para TcZC3H31. **Epi:** mRNAs de parasitas epimastigotas selvagens. **Meta:** RNAs de parasitas tripomastigotas metacíclicos. **Ama:** mRNAs de parasitas amastigotas. **Tripo:** mRNAs de parasitas tripomastigotas de cultivo celular. À esquerda estão correlacionados os nomes dos respectivos supergenes e, à direita, suas funções/domínios. A proteína TcZC3H31 está indicada à esquerda como **ZFPg**.

Uma análise mais detalhada permite identificar dois grupos de genes com padrões de expressão distintos, um grupo cujo padrão de expressão acompanha ao da proteína TcZC3H31 (superexpressão como TcZC3H31-FLAG ou ausência de expressão nos parasitas KO) (Figura 26A) e outro que se comporta de forma oposta (Figura 26B). No primeiro caso (Figura 26A) a correlação é mais clara, já que o padrão de expressão desses genes também é semelhante quando se

analisa o ciclo de vida. Deste grupo fazem parte o gene da CCCH *zinc finger TcZC3H20*, um gene de ciclina e dois genes de proteíno-kinases.

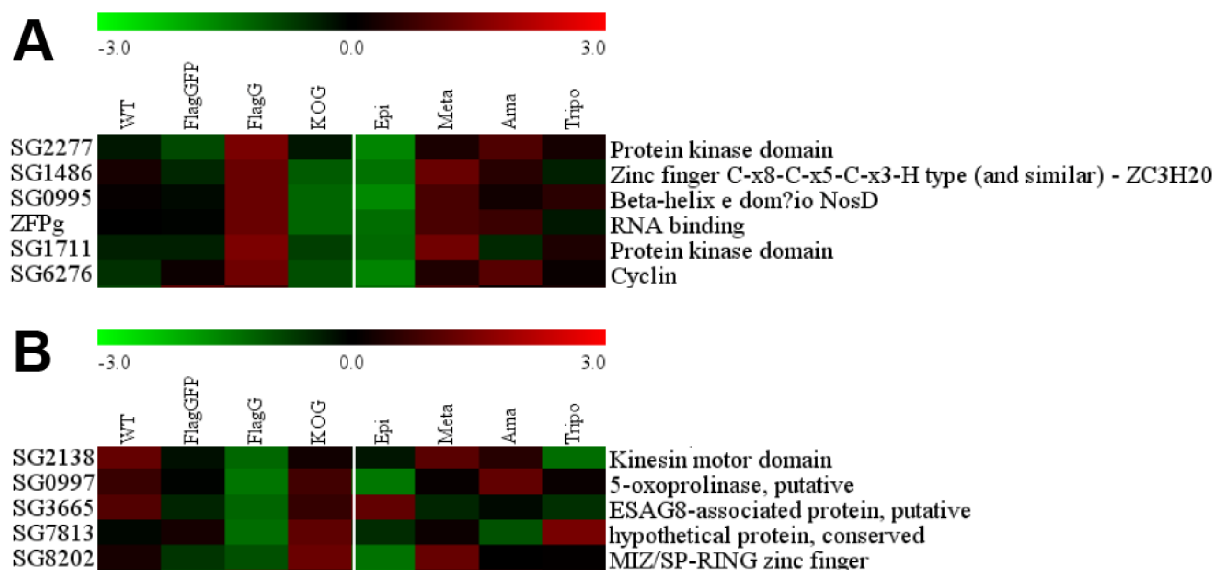


Figura 26: Grupos de genes com padrão de expressão oposto.

À partir da Figura 25 foram destacados dois grupos de genes com padrão de expressão distintos.

WT: parasitas epimastigotas selvagens. **FlagGFP:** parasitas epimastigotas controle expressando a proteína de fusão Flag-GFP. **FlagG:** parasitas epimastigotas superexpressando a proteína Flag-ZC3H31. **KOG:** parasitas epimastigotas nocautes para *TcZC3H31*. **Epi:** parasitas epimastigotas selvagens. **Meta:** parasitas tripomastigotas metacíclicos selvagens. **Ama:** parasitas amastigotas selvagens. **Tripo:** parasitas tripomastigotas de cultivo celular selvagens. À esquerda estão correlacionados os nomes dos respectivos supergenes e, à direita, suas funções/domínios. **A:** genes que acompanham o padrão de expressão do gene *TcZC3H31* (indicado como ZFPg). Quando a proteína está superexpressa (**FlagG**), esses genes têm a expressão aumentada (**vermelho**) e quando a proteína é nocauteada (**KOG**) os mesmos têm a expressão diminuída (**verde**). Esses genes também seguem o mesmo padrão no ciclo de vida. **B:** genes com padrão de expressão oposto ao gene *TcZC3H31*. Não é possível verificar um padrão desses genes no ciclo de vida.

5.5.2. Análise de GO (*Gene Ontology*)

Foi realizada uma análise *in silico*, com os 279 genes obtidos na primeira análise, para verificar o enriquecimento de termos de ontologia gênica (gene ontology). Essa análise permite verificar quais os tipos de genes (funções, domínios, etc.) estão enriquecidos entre os RNAs alvos da proteína *TcZC3H31* quando comparados com o genoma do *T. cruzi*. A Figura 27 representa o resultado dessa análise (resultados estatísticos detalhados no Anexo, Tabela 3),

na qual se verificou que os principais termos encontrados são fosforilação (*protein phosphorylation*), ligação a ATP (*ATP binding*), atividade de serina/treonina quinase (*protein serine/threonine kinase activity*), portanto todos relacionados à sinalização dependente de fosforilação ou ATP.

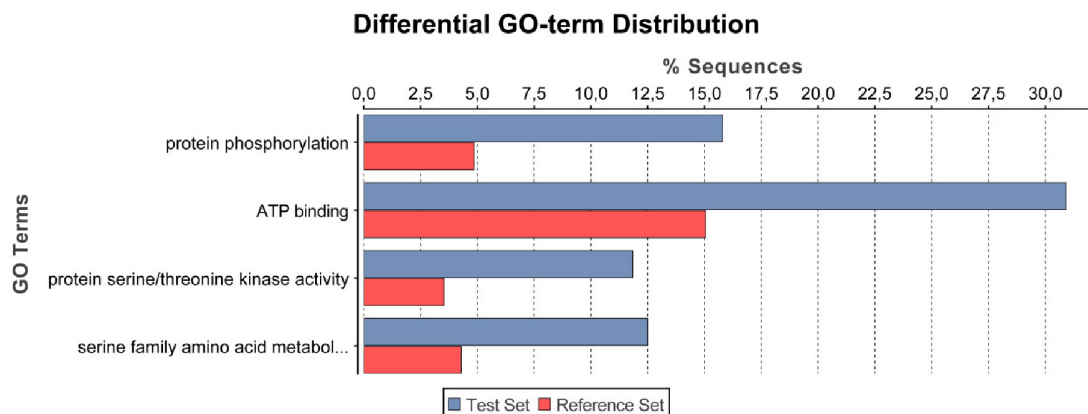


Figura 27: Principais termos encontrados na análise de GO (gene ontology).

Os termos relacionados no eixo x são os que apresentaram diferenças significativas na comparação entre os RNAs alvos da proteína TcZC3H31 (**Test Set**, azul) e o genoma do *T. cruzi* (**Reference Set**, vermelho). O eixo y indica a frequência com que os termos aparecem (em relação ao total de genes).

6. DISCUSSÕES

Quando analisamos a expressão da proteína TcZC3H31, através de ensaios de *immunoblot* com extratos provenientes de diferentes formas do ciclo de vida do *T. cruzi*, constatamos que sua expressão é mais significativa nas formas epimastigota e tripomastigota metacíclico em comparação com as formas amastigota e tripomastigota de cultivo de células Vero.

O padrão de expressão intracelular, avaliado através de ensaios de imunofluorescência, em populações epimastigotas em fase exponencial de crescimento é disperso pelo citoplasma na maioria das células. Em alguns parasitas, nos quais a divisão celular iniciou-se, são observados pontos de expressão concentrada próximos ao flagelo e ao núcleo. A correlação entre esse padrão de expressão e a divisão celular foi investigada pelo experimento de sincronização celular com hidroxauréia (HU). Essa droga impede a conversão de ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos, através de sua ação inibitória sobre a enzima ribonucleotídeo redutase (YOUNG et al., 1967). Portanto, seu efeito é a inibição da síntese de DNA (fase S), e as células tratadas ficam detidas na transição entre a fase G1 e a fase S. Ao resgatá-las desse tratamento as células voltam ao ciclo celular de forma bastante sincronizada, retomando a fase S. A primeira avaliação da expressão da proteína ocorreu 9 h após a sincronização. Nesse momento as células apresentam um núcleo, um cinetoplasto e é possível observar o surgimento de um segundo flagelo, na base do qual se localiza uma estrutura única arredondada com marcação específica para a proteína TcZC3H31. Este momento corresponde à fase G2, já que o segundo flagelo surge apenas depois que a fase S termina (ELIAS et al., 2007). Dez horas após o tratamento é possível observar o surgimento de uma segunda marcação próxima à primeira. No ponto de 11 h, é possível verificar células nas quais as duas estruturas observadas próximas anteriormente separam-se, com uma delas permanecendo associada à base do flagelo e a outra próxima ao núcleo. Nesse momento já são observadas algumas células com um núcleo e dois cinetoplastos e células com a mitose concluída, ou seja, com dois núcleos e dois cinetoplastos (ELIAS et al.,

2007). No ponto de 12 h, no qual a citocinese já se iniciou para várias células, é possível verificar que, além de algumas células apresentando os padrões de expressão dos pontos anteriores, as células em citocinese apresentam marcação também dupla, ambas concentradas próximas da região onde se observa a invaginação da membrana plasmática, uma na região anterior da célula e a outra próxima no final posterior (ver Figura 14, 2D). Em pontos posteriores (a partir de 15h, dados não mostrados) já são observadas células concluindo a divisão, com a citocinese quase finalizada. Nestas células a forte marcação da TcZC3H31 desaparece. Portanto o padrão observado não corresponde a uma organela fixa, mas a uma estrutura dinâmica, que se duplica e se move ao longo da célula durante a divisão celular (fases G2, mitose e citocinese).

No ponto de 12h também foi analisado o padrão de localização de mRNAs, através de experimento de FISH com marcação de caudas poliA (sondas de oligo-dT), e sua possível associação com as marcações da proteína TcZC3H31. O objetivo desse experimento era verificar se a estrutura observada corresponderia a algum tipo de grânulo de mRNA ainda não descrito. Já se sabe, por exemplo, que em situações de *stress* nutricional há um rearranjo no padrão de localização de mRNAs no citoplasma dos trypanosomas, os quais agregam-se em grânulos, que podem ser visualizados através da marcação das caudas poliA dos mRNAs (ALVES et al., 2013; CASSOLA; DE GAUDENZI; FRASCH, 2007). Entretanto, não houve co-localização significativa entre a marcação da proteína TcZC3H31 e a dos mRNAs. De fato, foi observado em algumas células que as estruturas correspondentes à proteína TcZC3H31 apresentam marcação mais fraca com a sonda oligo-dT em comparação com o restante da célula. A forte marcação para essa sonda é observada ao redor do núcleo e no contorno da estrutura da TcZC3H31. Embora essa marcação não seja específica para RNAs alvos da proteína em questão, esse resultado indica que não há uma agregação de mRNAs nesse local. Há duas possibilidades para explicar esse fenômeno: a proteína não está associada a RNAs nessas estruturas ou os RNAs presentes nessas estruturas não possuem cauda poliA. No primeiro caso, a proteína TcZC3H31 poderia ser carregada a essas estruturas para ser regulada. No

segundo caso, a estrutura contendo a proteína TcZC3H31 seria regulatória da estabilidade de mRNAs, os quais poderiam ter perdido suas caudas poliA antes da realocação para esses grânulos. Já foi descrito que alguns RNAs, antes de serem translocados para *P-bodies*, sofrem deadenilação. Esse seria um primeiro sinal para a degradação desses RNAs, que ocorre dentro desses grânulos pela ação de complexos de decapeamento (DCPs) e de exoribonuclease 5'-3' (XRN1) (ANDERSON & KEDERSHA, 2009; BALAGOPAL & PARKER, 2009; CASSOLA). Ainda são necessários experimentos adicionais para verificar essas possibilidades, como a avaliação da localização de alguns dos RNAs alvos da proteína através de ensaios de FISH utilizando-se sondas complementares às suas sequências. Também são necessários experimentos de microscopia eletrônica (imunocitoquímica) para desvendar a quais estruturas está relacionado o padrão de expressão da proteína TcZC3H31 durante a divisão celular. Quanto à importância da proteína TcZC3H31 para a divisão celular (fase S, G2, mitose e citocinese) pode-se concluir que a mesma não é essencial para esse processo, já que a população de parasitas nocautes é viável e sua curva de crescimento é semelhante à dos parasitas selvagens.

Como citado anteriormente, a proteína TcZC3H31 tem uma expressão mais significativa nos estágios do ciclo de vida que ocorrem no hospedeiro invertebrado (estágios epimastigota e tripomastigota metacíclico). No hospedeiro invertebrado triatomíneo as formas epimastigotas replicam-se no estômago do inseto e ao longo do trato digestivo. Na região posterior do intestino, os epimastigotas aderem à cutícula retal e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, num processo chamado metaciclogênese, os quais são liberados nas fezes do inseto durante o repasto sanguíneo no hospedeiro mamífero. A metaciclogênese pode ser reproduzida *in vitro*, através de uma cultura axênica submetida a condições quimicamente definidas. Inicialmente os parasitas epimastigotas são submetidos a *stress* nutricional causado pelo meio TAU (triatomine artificial urine) e então são transferidos para o meio TAU suplementado com glicose e prolina (meio TAU 3AAG) (CONTRERAS et al., 1985). Assim como na metaciclogênese *in vivo*, foi observado que a adesão das células ao substrato

(garrafa de cultura ou epitélio do triatomíneo) é necessária para a diferenciação na metaciclogênese *in vitro* (BONALDO et al., 1988). Além disso, a idade e densidade da cultura celular afetam a porcentagem de células que completarão a diferenciação (CONTRERAS et al., 1985). Sabe-se também que em culturas em fase estacionária de crescimento os epimastigotas podem sofrer diferenciação para tripomastigotas metacíclicos em consequência do *stress* causado pela escassez de fontes de energia (HERNANDEZ et al., 2012).

A proteína TcZC3H31 foi demonstrada nesse trabalho como essencial para a diferenciação durante a metaciclogênese *in vitro*, pois os parasitas sem o gene *TcZC3H31* são incapazes de completar a diferenciação. Esse fato foi observado através de contagens diferenciais no processo de metaciclogênese, de microscopia óptica e de tratamento com soro humano fresco (SHF), o qual causa a lise de todos os parasitas presentes no sobrenadante da metaciclogênese dos nocautes. Foi observado também que há uma maior densidade de células aderidas e poucas células no sobrenadante da metaciclogênese desses parasitas, mesmo após 72 h, período no qual se obtém a maior porcentagem de tripomastigotas metacíclicos no sobrenadante da cultura selvagem e, por consequência, há uma menor quantidade de parasitas aderidos. Entretanto, não foram observadas diferenças morfológicas entre os parasitas selvagens e nocautes nos estágios iniciais do processo de diferenciação (parasitas estressados e parasitas aderidos).

Além disso, populações com superexpressão da proteína de fusão Flag-ZC3H31 possuem uma maior capacidade de diferenciação para tripomastigotas metacíclicos, já que, em comparação com os parasitas controle (selvagens e expressando a proteína de fusão Flag-GFP), uma porcentagem maior de parasitas conclui a diferenciação para tripomastigotas metacíclicos, seja em experimentos de metaciclogênese *in vitro* ou em culturas em fase estacionária de crescimento. Esse dado é outro indicativo da importância dessa proteína CCCH *zinc finger* para a transformação da forma replicativa em infectiva. Entretanto, é importante considerar que o aumento da expressão da proteína, como um evento isolado, não é capaz de induzir a diferenciação, já que formas epimastigotas Flag-

TcZC3H31 em fase exponencial de crescimento comportam-se como os parasitas controle (Flag-GFP), sem comprometimento da proliferação e sem diferenciação para tripomastigota metacíclicos. A porcentagem de diferenciação aumentada, portanto, é consequência de dois eventos: do aumento da expressão da proteína e do *stress* nutricional.

Com o intuito de investigar a função da proteína TcZC3H31 durante a diferenciação o seu padrão de expressão foi investigado, através de ensaios de imunofluorescência, em fases intermediárias da metaciclogênese. Foram analisadas formas epimastigotas com 5 dias de cultura (final da fase exponencial), após *stress* nutricional e aderidos (24 h do início da metaciclogênese). É possível verificar que em formas epimastigotas (5 dias) e em parasitas estressados há uma grande heterogeneidade no padrão de expressão: alguns parasitas apresentam forte marcação, com um padrão de acumulação ao redor do núcleo, enquanto outros são marcados fracamente. Os parasitas aderidos, por sua vez, possuem um padrão mais homogêneo, com forte marcação de grânulos que se acumulam próximos à região posterior do núcleo. São necessárias investigações adicionais para revelar se se tratam de grânulos de RNAs. Tais resultados demonstram a importância da proteína durante a fase de adesão ao substrato e o seu provável papel como proteína reguladora da expressão gênica.

Além disso, esses resultados podem ser indícios do motivo pelo qual a metaciclogênese *in vitro* é um processo não sincronizado. Quando se analisa a população de parasitas durante esses experimentos é possível verificar no sobrenadante das culturas em TAU3AAG, formas epimastigotas (algumas das quais ainda não aderiram ao substrato e outras que serão incapazes de se diferenciar) e formas tripomastigotas metacíclicas; com relação aos parasitas aderidos também se observa uma variedade: os parasitas aderidos nos primeiros dias de metaciclogênese são os mais provavelmente comprometidos com a diferenciação, enquanto os parasitas ainda aderidos às 72 h de metaciclogênese são mais passivos de não completar a diferenciação. É possível que a velocidade com que as células se diferenciam seja uma consequência do quanto expressam a proteína TcZC3H31, ou seja, as células que têm sua expressão aumentada já

com 5 dias de cultura se diferenciam mais rapidamente que as células com expressão aumentada somente após o *stress* nutricional. Por outro lado, as células que não completam a diferenciação provavelmente são incapazes de aumentar os níveis de TcZC3H31 intracelular, mesmo após o *stress*. Os eventos que causam o aumento da expressão e os eventos subsequentes ainda necessitam ser investigados.

Pouco ainda se sabe sobre as cascatas de sinalização e a regulação da expressão de genes responsáveis pela diferenciação. Parasitas contendo deleção monoalélica do gene *TcCRT* (*Trypanosoma cruzi calreticulín*) possuem capacidade diminuída de replicação dentro do inseto vetor e de diferenciação após indução com homogeneizado de intestino de triatomíneo. Essa proteína é uma chaperona presente principalmente no retículo endoplasmático, translocada a área flagelar onde interage com componentes da via do complemento, inibindo a ativação dessa via, além de possuir um papel importante na diferenciação para tripomastigota metacíclicos (SANCHEZ VALDEZ et al., 2013).

Em análises de proteômica quantitativa durante a metaciclogênese de *T. cruzi* foram identificadas algumas proteínas com expressão diferencial durante esse processo. Os principais grupos identificados, através de análise de GO, foram proteínas de citoesqueleto e de organização do citoesqueleto, proteínas motores, proteínas relacionadas ao flagelo, proteínas ligadoras de Ca^{2+} , proteínas relacionadas ao metabolismo energético, proteínas ribossomais e proteínas ligadoras de ácidos nucleicos (DE GODOY et al., 2012).

Gonzales-Perdomo e colaboradores demonstraram que a adição de análogos de AMP cíclico (cAMP) e de ativadores da adenilato ciclase ao meio de diferenciação, durante a metaciclogênese, ativa a transformação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos. Além disso, inibidores da fosfodiesterase de cAMP foram estimuladores da diferenciação enquanto ativadores dessa enzima inibiram o processo de metaciclogênese (GONZALES-PERDOMO; ROMERO; GOLDENBERG, 1988).

Foi demonstrado também que o fator de iniciação da tradução eIF2 α de *T. cruzi* é fosforilada no resíduo Thr¹⁶⁹ (treonina) e que há um aumento da

fosforilação após o *stress* nutricional. Entretanto, os níveis de fosforilação diminuem após a recuperação das células por 2 h em TAU3AAG. Esses efeitos são acompanhados de uma diminuição na incorporação de [³⁵S]-metionina e da abolição das frações polissomais, os quais significam uma drástica diminuição na tradução. Em parasitas superexpressando a proteína com o resíduo de treonina substituído para alanina (não sofre fosforilação) a mudança no perfil polissomal após o *stress* nutricional não é tão drástica e, conseqüentemente, a taxa de tradução não diminui como nos parasitas selvagens. Esses parasitas mutantes possuem uma menor capacidade de diferenciação para tripomastigotas metacíclicos quando comparados com parasitas superexpressando a proteína eIF2 α (sem a mutação) e com parasitas selvagens. Portanto, a fosforilação de eIF2 α é um evento de grande importância para a diferenciação (TONELLI et al., 2011).

Foram identificados alguns RNAs alvos co-imunoprecipitados com a proteína TcZC3H31 a partir de epimastigotas de 3 dias de cultura. Esses RNAs foram analisados quanto ao padrão de expressão nos 4 estágios principais do ciclo de vida e em parasitas epimastigotas mutantes (nocautes e FLAG-TcZC3H31). Não há como correlacionar, a partir dos resultados obtidos, a proteína a uma função de desestabilizadora ou estabilizadora de mRNAs, devido à diversidade de padrões obtida a partir desta análise. Entretanto há um grupo de genes cujo padrão de expressão segue o do próprio gene *TcZC3H31*, o que indica um papel de estabilização de alguns RNAs-alvos. Dentre esses genes fazem parte uma ciclina, duas proteíno-quinases e a CCCH *zinc finger* TcZC3H20.

A proteína ZC3H20 de *Trypanosoma brucei* (TbZC3H20), como já citado na Introdução, foi a primeira CCCH *zinc finger* descrita como estabilizadora de RNAs. Essa proteína é enriquecida nas formas procíclicas em comparação com as formas sanguíneas desses parasitas, e é requerida para o crescimento normal das formas replicativas (procíclicas) (LING; TROTTER; HENDRIKS, 2011). Ainda não há descrições sobre os padrões de expressão desta proteína em *T. cruzi*.

Os RNAs alvos identificados foram analisados quanto aos termos de ontologia gênica (GO). Os principais termos enriquecidos entre estes RNAs foram

fosforilação proteica e ligação a ATP. Esses resultados demonstram que a proteína TcZC3H31 é uma importante reguladora de cascatas de sinalização dependentes de proteíno-kinases.

A sinalização do cAMP e a fosforilação de eIF2 α são dependentes de cascatas de sinalização de proteíno-kinases. Portanto, existe a possibilidade de o mecanismo de ação da proteína TcZC3H31 como reguladora da metaciclogênese ser através dessas cascatas. Experimentos adicionais são necessários para a verificação dessa hipótese.

7. CONCLUSÕES

A proteína TcZC3H31 é expressa com maior intensidade nas fases epimastigota e tripomastigota metacíclico quando comparada às fases amastigota e tripomastigota de cultivo celular do *T. cruzi*, portanto é expressa preferencialmente nas fases do hospedeiro vetor.

Durante a fase G1 do ciclo celular dos epimastigotas essa proteína é expressa de forma dispersa no citoplasma, mas durante as fases G2, mitose e citocinese são encontradas estruturas nas quais a proteína é concentrada, que são dinâmicas e mudam de posição durante o processo de divisão celular.

Parasitas nocautes para o gene *TcZC3H31* são incapazes de se diferenciarem para tripomastigotas metacíclicos, enquanto parasitas superexpressando Flag-TcZC3H31 possuem maior capacidade de diferenciação. Portanto essa proteína é essencial para a metaciclogênese.

Foi avaliada o padrão de expressão da proteína em formas intermediárias de diferenciação. As populações de epimastigotas com 5 dias de cultura e estressados apresentam heterogeneidade nesse padrão, com células com alta expressão e células com baixa expressão. A população de epimastigotas aderidos apresenta um padrão mais homogêneo, com marcação granular e concentrada na região posterior das células. Esses padrões devem refletir a função dessa proteína durante essas fases.

Foram identificados, através de experimentos de ribonômica, mRNAs alvos da proteína TcZC3H31, os quais tiveram seus padrões de expressão analisados, através de PCR quantitativa, ao longo do ciclo de vida do *T. cruzi* e nos parasitas mutantes (nocautes e Flag-TcZC3H31). A maioria dos genes identificados são proteíno-quinases. Entretanto não foi possível identificar uma correlação direta entre presença/ausência da proteína e estabilização/desestabilização dos mRNAs alvos.

8. REFERÊNCIAS

ALVES, L. R.; GUERRA-SLOMPO, E. P.; DE OLIVEIRA, A. V.; MALGARIN, J. S.; GOLDENBERG, S.; DALLAGIOVANNA, B. mRNA localization mechanisms in *Trypanosoma cruzi*. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e81375, 2013.

ANDERSON, P.; KEDERSHA, N. RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 10, n. 6, p. 430-6, 2009.

BALAGOPAL, V.; PARKER, R. Polysomes, P bodies and stress granules: states and fates of eukaryotic mRNAs. **Curr Opin Cell Biol**, v. 21, n. 3, p. 403-8, 2009.

BATISTA, M.; MARCHINI, F. K.; CELEDON, P. A.; FRAGOSO, S. P.; PROBST, C. M.; PRETI, H.; OZAKI, L. S.; BUCK, G. A.; GOLDENBERG, S.; KRIEGER, M. A. A high-throughput cloning system for reverse genetics in *Trypanosoma cruzi*. **BMC Microbiol**, v. 10, p. 259, 2010.

BENZ, C.; MULINDWA, J.; OUNA, B.; CLAYTON, C. The *Trypanosoma brucei* zinc finger protein ZC3H18 is involved in differentiation. **Mol Biochem Parasitol**, v. 177, n. 2, p. 148-51, 2011.

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

BROOKS, S. A.; BLACKSHEAR, P. J. Tristetraprolin (TTP): interactions with mRNA and proteins, and current thoughts on mechanisms of action. **Biochim Biophys Acta**, v. 1829, n. 6-7, p. 666-79, 2013.

CASSOLA, A. RNA Granules Living a Post-transcriptional Life: the Trypanosomes' Case. **Curr Chem Biol**, v. 5, n. 2, p. 108-117,

CASSOLA, A.; DE GAUDENZI, J. G.; FRASCH, A. C. Recruitment of mRNAs to cytoplasmic ribonucleoprotein granules in trypanosomes. **Mol Microbiol**, v. 65, n. 3, p. 655-70, 2007.

CLAYTON, C. E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. **EMBO J**, v. 21, n. 8, p. 1881-8, 2002.

CONESA, A.; GOTZ, S.; GARCIA-GOMEZ, J. M.; TEROL, J.; TALON, M.; ROBLES, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21, n. 18, p. 3674-6, 2005.

CONTRERAS, V. T.; ARAUJO-JORGE, T. C.; BONALDO, M. C.; THOMAZ, N.; BARBOSA, H. S.; MEIRELLES MDE, N.; GOLDENBERG, S. Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 1, p. 123-33, 1988.

CONTRERAS, V. T.; SALLES, J. M.; THOMAS, N.; MOREL, C. M.; GOLDENBERG, S. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Mol Biochem Parasitol**, v. 16, n. 3, p. 315-27, 1985.

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

DE GAUDENZI, J. G.; NOE, G.; CAMPO, V. A.; FRASCH, A. C.; CASSOLA, A. Gene expression regulation in trypanosomatids. **Essays Biochem**, v. 51, p. 31-46, 2011.

DE GODOY, L. M.; MARCHINI, F. K.; PAVONI, D. P.; RAMPAZZO RDE, C.; PROBST, C. M.; GOLDENBERG, S.; KRIEGER, M. A. Quantitative proteomics of *Trypanosoma cruzi* during metacyclogenesis. **Proteomics**, v. 12, n. 17, p. 2694-703, 2012.

DE SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Curr Pharm Des**, v. 8, n. 4, p. 269-85, 2002.

DE SOUZA, W.; ATTIAS, M.; RODRIGUES, J. C. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). **Int J Biochem Cell Biol**, v. 41, n. 10, p. 2069-80, 2009.

DE SOUZA, W.; SANT'ANNA, C.; CUNHA-E-SILVA, N. L. Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa. **Prog Histochem Cytochem**, v. 44, n. 2, p. 67-124, 2009.

DOCAMPO, R.; DE SOUZA, W.; MIRANDA, K.; ROHLOFF, P.; MORENO, S. N. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 3, p. 251-61, 2005.

DROLL, D.; MINIA, I.; FADDA, A.; SINGH, A.; STEWART, M.; QUEIROZ, R.; CLAYTON, C. Post-transcriptional regulation of the trypanosome heat shock response by a *zinc finger* protein. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 4, p. e1003286, 2013.

EISEN, M. B.; SPELLMAN, P. T.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 25, p. 14863-8, 1998.

EL-SAYED, M. S.; YOUNESIAN, A. Lipid profiles are influenced by arm cranking exercise and training in individuals with spinal cord injury. **Spinal Cord**, v. 43, n. 5, p. 299-305, 2005.

EL-SAYED, N. M. *et al.* Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 404-9, 2005.

ELIAS, M. C.; DA CUNHA, J. P.; DE FARIA, F. P.; MORTARA, R. A.; FREYMULLER, E.; SCHENKMAN, S. Morphological events during the *Trypanosoma cruzi* cell cycle. **Protist**, v. 158, n. 2, p. 147-57, 2007.

GONZALES-PERDOMO, M.; ROMERO, P.; GOLDENBERG, S. Cyclic AMP and adenylate cyclase activators stimulate *Trypanosoma cruzi* differentiation. **Exp Parasitol**, v. 66, n. 2, p. 205-12, 1988.

HALL, T. M. Multiple modes of RNA recognition by *zinc finger* proteins. **Curr Opin Struct Biol**, v. 15, n. 3, p. 367-73, 2005.

HENDRIKS, E. F.; MATTHEWS, K. R. Disruption of the developmental programme of *Trypanosoma brucei* by genetic ablation of TbZFP1, a differentiation-enriched CCCH protein. **Mol Microbiol**, v. 57, n. 3, p. 706-16, 2005.

HENDRIKS, E. F.; ROBINSON, D. R.; HINKINS, M.; MATTHEWS, K. R. A novel CCCH protein which modulates differentiation of *Trypanosoma brucei* to its procyclic form. **EMBO J**, v. 20, n. 23, p. 6700-11, 2001.

HERNANDEZ-OSORIO, L. A.; MARQUEZ-DUENAS, C.; FLORENCIO-MARTINEZ, L. E.; BALLESTEROS-RODEA, G.; MARTINEZ-CALVILLO, S.; MANNING-CELA, R. G. Improved method for in vitro secondary amastigogenesis of *Trypanosoma cruzi*: morphometrical and molecular analysis of intermediate developmental forms. **J Biomed Biotechnol**, v. 2010, p. 283842, 2010.

HERNANDEZ, R.; CEVALLOS, A. M.; NEPOMUCENO-MEJIA, T.; LOPEZ-VILLASENOR, I. Stationary phase in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes as a preadaptive stage for metacyclogenesis. **Parasitol Res**, v. 111, n. 2, p. 509-14, 2012.

IVENS, A. C. *et al.* The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 436-42, 2005.

KRAMER, S.; CARRINGTON, M. Trans-acting proteins regulating mRNA maturation, stability and translation in trypanosomatids. **Trends Parasitol**, v. 27, n. 1, p. 23-30, 2010.

KRAMER, S.; KIMBLIN, N. C.; CARRINGTON, M. Genome-wide in silico screen for CCCH-type *zinc finger* proteins of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major*. **BMC Genomics**, v. 11, p. 283, 2010.

LEE, S. J.; MICHEL, S. L. Structural metal sites in nonclassical *zinc finger* proteins involved in transcriptional and translational regulation. **Acc Chem Res**, v. 47, n. 8, p. 2643-50,

LI, L.; STOECKERT, C. J., JR.; ROOS, D. S. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. **Genome Res**, v. 13, n. 9, p. 2178-89, 2003.

LIANG, X. H.; HARITAN, A.; ULIEL, S.; MICHAELI, S. trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. **Eukaryot Cell**, v. 2, n. 5, p. 830-40, 2003.

LING, A. S.; TROTTER, J. R.; HENDRIKS, E. F. A *zinc finger* protein, TbZC3H20, stabilizes two developmentally regulated mRNAs in trypanosomes. **J Biol Chem**, v. 286, n. 23, p. 20152-62, 2011.

MARTINEZ-CALVILLO, S.; VIZUET-DE-RUEDA, J. C.; FLORENCIO-MARTINEZ, L. E.; MANNING-CELA, R. G.; FIGUEROA-ANGULO, E. E. Gene expression in trypanosomatid parasites. **J Biomed Biotechnol**, v. 2010, p. 525241, 2010.

MARTINEZ-LUMBRERAS, S.; SANTIVERI, C. M.; MIRASSOU, Y.; ZORRILLA, S.; PEREZ-CANADILLAS, J. M. Two singular types of CCCH tandem *zinc finger* in Nab2p contribute to polyadenosine RNA recognition. **Structure**, v. 21, n. 10, p. 1800-11, 2013.

MORKING, P. A.; DALLAGIOVANNA, B. M.; FOTI, L.; GARAT, B.; PICCHI, G. F.; UMAKI, A. C.; PROBST, C. M.; KRIEGER, M. A.; GOLDENBERG, S.; FRAGOSO, S. P. TcZFP1: a CCCH *zinc finger* protein of *Trypanosoma cruzi* that binds poly-C oligoribonucleotides in vitro. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 319, n. 1, p. 169-77, 2004.

MORKING, P. A.; RAMPAZZO RDE, C.; WALRAD, P.; PROBST, C. M.; SOARES, M. J.; GRADIA, D. F.; PAVONI, D. P.; KRIEGER, M. A.; MATTHEWS, K.; GOLDENBERG, S.; FRAGOSO, S. P.; DALLAGIOVANNA, B. The *zinc finger* protein TcZFP2 binds target mRNAs enriched during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 6, p. 790-9, 2012.

OUNA, B. A.; STEWART, M.; HELBIG, C.; CLAYTON, C. The *Trypanosoma brucei* CCCH *zinc finger* proteins ZC3H12 and ZC3H13. **Mol Biochem Parasitol**, v. 183, n. 2, p. 184-8, 2012.

PALENCHAR, J. B.; BELLOFATTO, V. Gene transcription in trypanosomes. **Mol Biochem Parasitol**, v. 146, n. 2, p. 135-41, 2006.

PATEROU, A.; WALRAD, P.; CRADDY, P.; FENN, K.; MATTHEWS, K. Identification and stage-specific association with the translational apparatus of TbZFP3, a CCCH protein that promotes trypanosome life-cycle development. **J Biol Chem**, v. 281, n. 51, p. 39002-13, 2006.

POMERANZ, M.; FINER, J.; JANG, J. C. Putative molecular mechanisms underlying tandem CCCH *zinc finger* protein mediated plant growth, stress, and gene expression responses. **Plant Signal Behav**, v. 6, n. 5, p. 647-51, 2011.

PREUSSER, C.; JAE, N.; BINDEREIF, A. mRNA splicing in trypanosomes. **Int J Med Microbiol**, v. 302, n. 4-5, p. 221-4, 2012.

RASSI, A., JR.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-402, 2010.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139-40, 2010.

RODRIGUES, J. C.; GODINHO, J. L.; DE SOUZA, W. Biology of human pathogenic trypanosomatids: epidemiology, lifecycle and ultrastructure. **Subcell Biochem**, v. 74, p. 1-42, 2014.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Storage of bacterial cultures growing in liquid media. **CSH Protoc**, v. 2006, n. 1, 2006.

SANCHEZ VALDEZ, F. J.; PEREZ BRANDAN, C.; ZAGO, M. P.; LABRIOLA, C.; FERREIRA, A.; BASOMBRIO, M. A. *Trypanosoma cruzi* carrying a monoallelic deletion of the calreticulin (TcCRT) gene are susceptible to complement mediated killing and defective in their metacyclogenesis. **Mol Immunol**, v. 53, n. 3, p. 198-205, 2013.

SIEGEL, T. N.; HEKSTRA, D. R.; KEMP, L. E.; FIGUEIREDO, L. M.; LOWELL, J. E.; FENYO, D.; WANG, X.; DEWELL, S.; CROSS, G. A. Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*. **Genes Dev**, v. 23, n. 9, p. 1063-76, 2009.

TONELLI, R. R.; AUGUSTO LDA, S.; CASTILHO, B. A.; SCHENKMAN, S. Protein synthesis attenuation by phosphorylation of eIF2alpha is required for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* into infective forms. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27904, 2011.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **Int J Parasitol**, v. 31, n. 5-6, p. 472-81, 2001.

UEHATA, T.; AKIRA, S. mRNA degradation by the endoribonuclease Regnase-1/ZC3H12a/MCPIP-1. **Biochim Biophys Acta**, v. 1829, n. 6-7, p. 708-13, 2013.

WALRAD, P.; PATEROU, A.; ACOSTA-SERRANO, A.; MATTHEWS, K. R. Differential trypanosome surface coat regulation by a CCCH protein that co-associates with procyclin mRNA cis-elements. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 2, p. e1000317, 2009.

WALRAD, P. B.; CAPEWELL, P.; FENN, K.; MATTHEWS, K. R. The post-transcriptional trans-acting regulator, TbZFP3, co-ordinates transmission-stage enriched mRNAs in *Trypanosoma brucei*. **Nucleic Acids Res**, v. 40, n. 7, p. 2869-83, 2012.

WEATHERLY, D. B.; BOEHLKE, C.; TARLETON, R. L. Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi* genome. **BMC Genomics**, v. 10, p. 255, 2009.

YOUNG, C. W.; SCHOCHETMAN, G.; HODAS, S.; BALIS, M. E. Inhibition of DNA synthesis by hydroxyurea: structure-activity relationships. **Cancer Res**, v. 27, n. 3, p. 535-40, 1967.

ANEXO

Tabela 1: Genes identificados como parceiros de TcZC3H31 nos experimentos de ribonômica. Para cada Super Gene (SG) é indicado o gene (ID) de maior tamanho dentro do grupo. LogFC representa o logaritmo (base 2) da razão de expressão coparando o número de reads detectados na imunoprecipitação com anti-TcZC3H31 em comparação com soro pré-imune. Pvalue e FDR são os níveis de significância estatística do programa edgeR. Os genes estão ordenaods de acordo com significância estatística.

SuperGene	ID	Descrição	Log FC	Pvalue	FDR
SG1066	TcCLB.510433.10	hypothetical protein	1.78	1.06E-11	9.44E-08
SG0235	TcCLB.504703.20	hypothetical protein, conserved	2.43	5.76E-11	2.57E-07
SG6866	TcCLB.508765.50	mucin TcMUCI (pseudogene), putative	1.47	8.85E-10	1.97E-06
SG0658	TcCLB.504013.110	serine/threonine-protein phosphatase 2A, catalytic subunit, putative	1.22	2.41E-09	3.85E-06
SG8469	TcCLB.506559.540	hypothetical protein, conserved	1.7	9.32E-09	1.04E-05
SG4773	TcCLB.503415.30	hypothetical protein, conserved	1.39	1.67E-08	1.65E-05
SG5098	TcCLB.508799.200	hypothetical protein, conserved	1.17	4.70E-08	3.50E-05
SG7739	TcCLB.511807.130	hypothetical protein, conserved	1.11	4.06E-08	3.50E-05
SG6968	TcCLB.507099.80	ABC transporter, putative	1.56	1.41E-07	7.42E-05
SG3803	TcCLB.506865.70	hypothetical protein, conserved	1.53	1.37E-07	7.42E-05
SG7231	TcCLB.508987.30	protein kinase, putative	1.07	1.78E-07	8.71E-05
SG8504	TcCLB.510329.260	hypothetical protein, conserved	1.51	2.88E-07	1.17E-04
SG4817	TcCLB.506617.50	hypothetical protein	1.19	3.45E-07	1.28E-04
SG0284	TcCLB.511807.100	hypothetical protein, conserved	0.96	6.45E-07	2.06E-04
SG6322	TcCLB.507993.230	hypothetical protein, conserved (pseudogene)	1.16	7.83E-07	2.41E-04
SG8086	TcCLB.506721.50	hypothetical protein	2.35	1.01E-06	3.02E-04
SG4806	TcCLB.511807.80	methyltransferase, putative,mRNA cap methyltransferase-like protein, putative	0.91	1.06E-06	3.06E-04
SG1903	TcCLB.510835.10	hypothetical protein, conserved	1.65	2.26E-06	5.31E-04
SG5890	TcCLB.510045.20	ABC transporter, putative	1.1	2.20E-06	5.31E-04
SG8063	TcCLB.509295.90	hypothetical protein	1.31	2.23E-06	5.31E-04
SG1537	TcCLB.508693.150	hypothetical protein, conserved	1.44	3.40E-06	6.92E-04
SG2137	TcCLB.510155.110	hypothetical protein, conserved	1.02	4.59E-06	8.38E-04
SG2706	TcCLB.511801.60	mitochondrial DEAD box protein, putative	1.56	4.78E-06	8.53E-04
SG0937	TcCLB.506459.260	hypothetical protein, conserved	1.76	5.94E-06	1.02E-03
SG1077	TcCLB.508239.30	neurobeachin/beige-like protein, putative	1.66	6.87E-06	1.14E-03
SG5620	TcCLB.508065.50	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase-like protein, putative	1.1	8.63E-06	1.33E-03
SG1130	TcCLB.511825.180	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative	0.93	8.58E-06	1.33E-03
SG0709	TcCLB.507993.300	hypothetical protein, conserved	0.99	9.59E-06	1.43E-03
SG5072	TcCLB.507831.40	hypothetical protein, conserved	1.7	1.04E-05	1.49E-03

SG4368	TcCLB.506367.50	hypothetical protein, conserved	1.07	1.11E-05	1.57E-03
SG1680	TcCLB.508515.110	hypothetical protein, conserved	1.1	1.17E-05	1.63E-03
SG5345	TcCLB.507317.20	hypothetical protein	1.09	1.23E-05	1.69E-03
SG0731	TcCLB.506559.559	antigenic protein, putative	1.13	1.31E-05	1.76E-03
SG4314	TcCLB.511467.50	hypothetical protein, conserved	1.08	1.35E-05	1.76E-03
SG3640	TcCLB.510323.20	hypothetical protein, conserved	0.93	1.36E-05	1.76E-03
SG7354	TcCLB.509585.10	dynein heavy chain, putative	1.55	1.38E-05	1.76E-03
SG7005	TcCLB.511421.150	hypothetical protein, conserved	0.93	1.35E-05	1.76E-03
SG6939	TcCLB.506925.310	hypothetical protein, conserved	0.93	1.60E-05	1.96E-03
SG6459	TcCLB.508891.50	hypothetical protein	1.29	1.76E-05	2.13E-03
SG1097	TcCLB.508231.30	target of rapamycin (TOR) kinase 1, putative	1.18	1.82E-05	2.14E-03
SG6128	TcCLB.510565.70	protein kinase, putative	1.01	1.90E-05	2.21E-03
SG2337	TcCLB.506673.60	beta-adaptin 3, putative, AP-3 adapter complex beta subunit, putative	1.21	2.01E-05	2.30E-03
SG3766	TcCLB.508879.30	dynein heavy chain, putative	1.3	2.06E-05	2.32E-03
SG8582	TcCLB.507053.200	hypothetical protein, conserved	1.22	2.29E-05	2.50E-03
SG3463	TcCLB.509979.51	zinc carboxypeptidase, putative	1.34	2.25E-05	2.50E-03
SG1865	TcCLB.503905.40	hypothetical protein, conserved	0.83	2.62E-05	2.69E-03
SG3172	TcCLB.510943.190	myosin heavy chain MYA2-related, putative	1.28	3.53E-05	3.42E-03
SG4864	TcCLB.507467.70	diacylglycerol acyltransferase, putative	1.21	3.49E-05	3.42E-03
SG5655	TcCLB.508231.60	ubiquitin-protein ligase, putative	1.71	3.65E-05	3.50E-03
SG0446	TcCLB.506905.59	SNF2 DNA repair protein, putative	1.07	4.14E-05	3.66E-03
SG2515	TcCLB.505977.13	protein kinase, putative	1.1	4.87E-05	4.26E-03
SG1486	TcCLB.503567.9	hypothetical protein, conserved	0.92	5.38E-05	4.53E-03
SG4948	TcCLB.510723.20	hypothetical protein	0.9	5.60E-05	4.67E-03
SG4012	TcCLB.508153.870	hypothetical protein, conserved	1.25	6.01E-05	4.81E-03
SG2277	TcCLB.511907.240	protein kinase, putative	0.84	6.09E-05	4.81E-03
SG8201	TcCLB.504123.30	map kinase, putative	1.09	6.06E-05	4.81E-03
SG3600	TcCLB.510531.100	hypothetical protein, conserved	0.96	6.37E-05	4.90E-03
SG8750	TcCLB.511277.200	RNA-binding protein, putative	0.76	6.28E-05	4.90E-03
SG4978	TcCLB.511249.30	hypothetical protein, conserved	1.1	6.31E-05	4.90E-03
SG0972	TcCLB.506885.390	AMP deaminase, putative	0.77	7.60E-05	5.65E-03
SG6157	TcCLB.509741.30	hypothetical protein, conserved	0.91	7.78E-05	5.74E-03
SG0603	TcCLB.509647.190	hypothetical protein, conserved	0.92	8.42E-05	6.11E-03
SG6276	TcCLB.503885.100	hypothetical protein, conserved	0.76	9.12E-05	6.51E-03
SG5425	TcCLB.510877.190	hypothetical protein, conserved	0.76	9.21E-05	6.52E-03
SG4007	TcCLB.506905.40	ABC transporter, putative	1.3	1.02E-04	6.93E-03
SG7339	TcCLB.507099.70	hypothetical protein, conserved	0.8	1.02E-04	6.93E-03
SG1058	TcCLB.511717.50	hypothetical protein, conserved	0.91	1.04E-04	7.00E-03
SG5271	TcCLB.506777.30	hypothetical protein, conserved	0.95	1.06E-04	7.06E-03

SG4266	TcCLB.507849.60	hypothetical protein, conserved	0.9	1.12E-04	7.28E-03
SG2847	TcCLB.508723.10	hypothetical protein, conserved	1.4	1.21E-04	7.80E-03
SG8112	TcCLB.509693.20	hypothetical protein, conserved (pseudogene)	1.35	1.25E-04	8.05E-03
SG1262	TcCLB.509979.130	hypothetical protein, conserved	0.92	1.27E-04	8.08E-03
SG3900	TcCLB.510339.70	hypothetical protein, conserved	1.06	1.29E-04	8.14E-03
SG0259	TcCLB.507723.60	hypothetical protein	1.25	1.38E-04	8.64E-03
SG0686	TcCLB.508881.70	DNA ligase, putative, mitochondrial DNA ligase homolog, putative	0.7	1.55E-04	9.56E-03
SG2183	TcCLB.506685.10	hypothetical protein, conserved	1.25	1.58E-04	9.65E-03
SG0664	TcCLB.508909.170	hypothetical protein, conserved	0.96	1.70E-04	9.90E-03
SG2418	TcCLB.509591.60	phospholipid-transporting ATPase 1-like protein, putative	0.92	1.69E-04	9.90E-03
SG0995	TcCLB.503893.150	hypothetical protein, conserved	0.87	1.70E-04	9.90E-03
SG2647	TcCLB.508899.20	hypothetical protein, conserved	0.89	1.83E-04	1.02E-02
SG6197	TcCLB.508461.60	synaptojanin (N-terminal domain), putative, inositol/phosphatidylinositol phosphatase, putative	0.83	1.83E-04	1.02E-02
SG0997	TcCLB.509803.40	5-oxoprolinase, putative	0.86	1.84E-04	1.02E-02
SG0433	TcCLB.506947.10	hypothetical protein, conserved	0.76	1.83E-04	1.02E-02
SG6472	TcCLB.507807.30	hypothetical protein	0.71	1.89E-04	1.02E-02
SG1007	TcCLB.508901.10	hypothetical protein, conserved	1.36	1.86E-04	1.02E-02
SG5148	TcCLB.511267.24	hypothetical protein, conserved	0.95	1.89E-04	1.02E-02
SG0430	TcCLB.503989.50	hypothetical protein, conserved	1.26	1.96E-04	1.04E-02
SG7813	TcCLB.511727.250	hypothetical protein, conserved	0.91	1.96E-04	1.04E-02
SG3004	TcCLB.504069.40	hypothetical protein, conserved	0.74	1.94E-04	1.04E-02
SG3336	TcCLB.506853.10	hypothetical protein, conserved	0.84	2.08E-04	1.08E-02
SG4707	TcCLB.507823.20	hypothetical protein	0.93	2.19E-04	1.12E-02
SG6057	TcCLB.509695.50	katanin, putative	0.82	2.25E-04	1.13E-02
SG8274	TcCLB.510901.200	protein kinase, putative	0.76	2.25E-04	1.13E-02
SG0612	TcCLB.507627.9	kinesin, putative	1.06	2.28E-04	1.14E-02
SG8197	TcCLB.508445.10	rab11B GTPase, putative	0.8	2.34E-04	1.16E-02
SG3904	TcCLB.506633.30	hypothetical protein, conserved	0.87	2.41E-04	1.19E-02
SG0585	TcCLB.511649.70	structural maintenance of chromosome 3 protein, putative	0.88	2.43E-04	1.19E-02
SG2103	TcCLB.506525.70	hypothetical protein, conserved	1.04	2.45E-04	1.19E-02
SG0616	TcCLB.506401.350	hypothetical protein, conserved	1.51	2.57E-04	1.24E-02
SG1603	TcCLB.506287.170	hypothetical protein, conserved	0.89	2.61E-04	1.25E-02
SG0748	TcCLB.508909.200	hypothetical protein	0.8	2.67E-04	1.27E-02
SG1143	TcCLB.510029.30	hypothetical protein, conserved	1.11	2.69E-04	1.28E-02
SG1444	TcCLB.503697.40	hypothetical protein	0.63	2.71E-04	1.28E-02
SG3633	TcCLB.503559.70	cystinosin, putative	0.81	2.75E-04	1.28E-02

SG7218	TcCLB.506925.170	hypothetical protein, conserved	0.85	2.99E-04	1.35E-02
SG2869	TcCLB.506127.120	hypothetical protein, conserved	0.86	3.03E-04	1.35E-02
SG4865	TcCLB.508795.19	protein kinase, putative	0.91	3.03E-04	1.35E-02
SG1340	TcCLB.503847.20	myosin heavy chain, putative	0.7	3.08E-04	1.35E-02
SG2147	TcCLB.506529.490	hypothetical protein, conserved	0.86	3.13E-04	1.36E-02
SG8665	TcCLB.510187.510	hypothetical protein, conserved	1.35	3.24E-04	1.39E-02
SG7603	TcCLB.506925.90	hypothetical protein, conserved	1.08	3.23E-04	1.39E-02
SG7348	TcCLB.507099.110	hypothetical protein, conserved	0.8	3.34E-04	1.41E-02
SG8418	TcCLB.507053.209	dynein heavy chain, putative	0.94	3.35E-04	1.41E-02
SG0359	TcCLB.504443.10	ubiquitin hydrolase, putative,cysteine peptidase, Clan CA, family C19, putative	0.9	3.40E-04	1.43E-02
SG7406	TcCLB.506945.350	serine/threonine protein kinase, putative	0.76	3.42E-04	1.43E-02
SG3606	TcCLB.509733.90	hypothetical protein, conserved	1	3.50E-04	1.45E-02
SG7217	TcCLB.508307.110	hypothetical protein, conserved	0.82	3.64E-04	1.49E-02
SG3796	TcCLB.506753.50	hypothetical protein, conserved	0.8	3.72E-04	1.50E-02
SG3501	TcCLB.507867.80	hypothetical protein, conserved	0.87	3.72E-04	1.50E-02
SG4281	TcCLB.507515.20	hypothetical protein, conserved	0.96	3.68E-04	1.50E-02
SG2097	TcCLB.509805.160	hypothetical protein, conserved	0.74	3.81E-04	1.50E-02
SG3584	TcCLB.509605.30	Protein kinase domain, putative	1.79	3.79E-04	1.50E-02
SG1711	TcCLB.509991.9	protein kinase, putative	0.99	4.02E-04	1.55E-02
SG3580	TcCLB.507009.130	hypothetical protein, conserved	0.81	4.07E-04	1.56E-02
SG4289	TcCLB.511577.86	N-acetyltransferase, putative	0.8	4.17E-04	1.58E-02
SG2852	TcCLB.509801.20	hypothetical protein, conserved	1.02	4.26E-04	1.59E-02
SG8202	TcCLB.508461.300	hypothetical protein, conserved	0.87	4.28E-04	1.59E-02
SG7369	TcCLB.507257.50	hypothetical protein, conserved	0.76	4.35E-04	1.61E-02
SG2939	TcCLB.508175.133	hypothetical protein, conserved (pseudogene)	1.74	4.46E-04	1.63E-02
SG5905	TcCLB.505943.50	hypothetical protein, conserved	1	4.45E-04	1.63E-02
SG6833	TcCLB.511215.20	hypothetical protein	1.09	4.51E-04	1.63E-02
SG0557	TcCLB.510771.9	hypothetical protein, conserved	1.11	4.51E-04	1.63E-02
SG1075	TcCLB.511467.20	hypothetical protein, conserved	0.8	4.65E-04	1.67E-02
SG6553	TcCLB.509795.50	hypothetical protein, conserved	0.96	4.77E-04	1.70E-02
SG2047	TcCLB.511277.110	citrate synthase, putative	0.8	4.90E-04	1.74E-02
SG1178	TcCLB.510347.20	hypothetical protein, conserved	0.72	4.93E-04	1.74E-02
SG2510	TcCLB.506559.20	hypothetical protein, conserved	0.72	4.97E-04	1.74E-02
SG7738	TcCLB.511807.150	hypothetical protein, conserved	0.8	5.35E-04	1.82E-02
SG4263	TcCLB.510409.10	protein kinase, putative	0.95	5.48E-04	1.86E-02
SG6345	TcCLB.509913.30	hypothetical protein, conserved	0.85	5.49E-04	1.86E-02
SG7872	TcCLB.511725.270	hypothetical protein, conserved	0.68	5.57E-04	1.86E-02
SG7377	TcCLB.506925.330	hypothetical protein, conserved	0.67	5.55E-04	1.86E-02
SG5100	TcCLB.510861.94	hypothetical protein, conserved	0.87	5.61E-04	1.86E-02
SG2982	TcCLB.507547.80	protein kinase, putative	0.7	5.66E-04	1.87E-02

SG6325	TcCLB.511277.520	protein kinase (pseudogene), putative, glycogen synthase kinase, frameshift	0.96	5.80E-04	1.88E-02
SG4401	TcCLB.511249.100	hypothetical protein, conserved	1.55	5.91E-04	1.90E-02
SG1211	TcCLB.508811.10	hypothetical protein	0.81	6.07E-04	1.94E-02
SG6029	TcCLB.503715.40	protein kinase, putative	0.89	6.08E-04	1.94E-02
SG8520	TcCLB.503617.20	kinetoplast DNA-associated protein, putative	1.01	6.29E-04	1.98E-02
SG0979	TcCLB.508051.30	protein kinase, putative	0.65	6.57E-04	2.04E-02
SG5008	TcCLB.510989.10	fatty acid elongase, putative	0.95	6.65E-04	2.05E-02
SG0435	TcCLB.510007.30	RNA-binding protein, putative	2.09	6.73E-04	2.06E-02
SG5202	TcCLB.503919.50	hypothetical protein, conserved	0.82	6.71E-04	2.06E-02
SG0600	TcCLB.511269.60	vacuolar protein sorting complex subunit, putative	0.83	6.70E-04	2.06E-02
SG4960	TcCLB.511907.110	fatty acid transporter protein-like, putative	0.63	6.80E-04	2.07E-02
SG5063	TcCLB.511165.80	protein kinase, putative	0.66	6.86E-04	2.08E-02
SG1258	TcCLB.510571.20	leucine-rich repeat protein 1 (LRRP1), putative	0.97	7.02E-04	2.10E-02
SG3890	TcCLB.508153.550	hypothetical protein, conserved	0.75	7.05E-04	2.10E-02
SG4940	TcCLB.504069.110	hypothetical protein, conserved	0.92	7.00E-04	2.10E-02
SG2544	TcCLB.510431.70	hypothetical protein, conserved	0.85	7.17E-04	2.13E-02
SG0946	TcCLB.509539.40	hypothetical protein, conserved	0.71	7.42E-04	2.20E-02
SG0893	TcCLB.507715.70	hypothetical protein, conserved	1.19	7.64E-04	2.25E-02
SG1189	TcCLB.506829.90	hypothetical protein, conserved	1.02	8.04E-04	2.34E-02
SG7891	TcCLB.510187.460	hypothetical protein	1.05	8.14E-04	2.36E-02
SG0945	TcCLB.511555.110	hypothetical protein, conserved	0.8	8.25E-04	2.37E-02
SG2472	TcCLB.510517.70	hypothetical protein, conserved	0.81	8.60E-04	2.45E-02
SG6900	TcCLB.511545.80	amino acid transporter, putative, amino acid permease, putative	0.73	8.84E-04	2.50E-02
SG0695	TcCLB.507975.70	retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene), putative	0.7	8.89E-04	2.50E-02
SG6500	TcCLB.509997.60	hypothetical protein, conserved	0.69	9.03E-04	2.53E-02
SG6552	TcCLB.506657.88	hypothetical protein, conserved	1.04	9.09E-04	2.53E-02
SG4202	TcCLB.506797.40	hypothetical protein, conserved	0.64	9.08E-04	2.53E-02
SG2441	TcCLB.510431.80	hypothetical protein, conserved	1.16	9.21E-04	2.55E-02
SG1747	TcCLB.509153.80	hypothetical protein, conserved	0.71	9.32E-04	2.57E-02
SG6830	TcCLB.506925.250	hypothetical protein, conserved (pseudogene)	0.82	9.62E-04	2.62E-02
SG0030	TcCLB.508325.150	glycine dehydrogenase (pseudogene), putative	0.72	9.66E-04	2.62E-02
SG5619	TcCLB.508965.70	hypothetical protein, conserved	0.85	9.76E-04	2.63E-02
SG2227	TcCLB.509999.110	serine/threonine protein kinase, putative, protein kinase, putative	0.69	1.02E-03	2.71E-02
SG2365	TcCLB.509179.30	hypothetical protein, conserved	1.05	1.03E-03	2.72E-02

SG1238	TcCLB.511727.14	hypothetical protein, conserved	0.66	1.04E-03	2.73E-02
SG2016	TcCLB.511649.80	myosin heavy chain, putative	0.71	1.04E-03	2.74E-02
SG3646	TcCLB.507993.120	calcium-dependent lipid binding protein, putative, synaptotagmin, putative	0.78	1.05E-03	2.74E-02
SG7671	TcCLB.511003.80	hypothetical protein, conserved	1.06	1.06E-03	2.76E-02
SG2798	TcCLB.511179.140	hypothetical protein, conserved	0.83	1.07E-03	2.77E-02
SG3880	TcCLB.508443.50	hypothetical protein, conserved	0.81	1.08E-03	2.79E-02
SG0455	TcCLB.509823.4	hypothetical protein, conserved	0.81	1.09E-03	2.80E-02
SG4026	TcCLB.508089.20	UDP-glucuronosyl and UDP-glucosyl transferase, putative	0.94	1.09E-03	2.80E-02
SG5513	TcCLB.506975.66	hypothetical protein, conserved	1.24	1.11E-03	2.82E-02
SG1960	TcCLB.507735.20	hypothetical protein, conserved	1.04	1.12E-03	2.82E-02
SG5658	TcCLB.509331.150	permease-like protein, putative	1.2	1.12E-03	2.82E-02
SG1319	TcCLB.508895.50	RNA-binding protein, putative	0.62	1.13E-03	2.82E-02
SG0938	TcCLB.507649.20	hypothetical protein, conserved	1.04	1.16E-03	2.87E-02
SG3190	TcCLB.506519.60	Protein kinase domain, putative	0.7	1.15E-03	2.87E-02
SG1966	TcCLB.506177.60	hypothetical protein	0.94	1.24E-03	3.02E-02
SG7636	TcCLB.510689.40	phosphatidylinositol 3-kinase (tor2), putative	1.1	1.24E-03	3.02E-02
SG6384	TcCLB.509023.150	integral membrane transport protein, putative, drug resistance protein, putative	0.84	1.25E-03	3.03E-02
SG2980	TcCLB.508817.110	hypothetical protein, conserved	0.83	1.26E-03	3.05E-02
SG0434	TcCLB.509891.70	hypothetical protein, conserved (pseudogene)	1	1.30E-03	3.11E-02
SG3834	TcCLB.511039.6	hypothetical protein, conserved	0.57	1.30E-03	3.11E-02
SG3782	TcCLB.506211.180	protein kinase, putative	0.75	1.30E-03	3.11E-02
SG6193	TcCLB.506883.120	hypothetical protein, conserved	0.65	1.36E-03	3.21E-02
SG5382	TcCLB.510253.20	hypothetical protein, conserved	0.84	1.36E-03	3.21E-02
SG8459	TcCLB.511283.290	hypothetical protein, conserved	0.86	1.36E-03	3.21E-02
SG7683	TcCLB.508257.160	hypothetical protein, conserved	0.72	1.40E-03	3.26E-02
SG5850	TcCLB.509429.250	ubiquitin hydrolase, putative, cysteine peptidase, Clan CA, family C19, putative	1.01	1.43E-03	3.30E-02
SG3665	TcCLB.507021.20	ESAG8-associated protein, putative	0.71	1.46E-03	3.32E-02
SG4232	TcCLB.508317.30	hypothetical protein	0.7	1.46E-03	3.32E-02
SG1649	TcCLB.511827.80	hypothetical protein, conserved	0.77	1.49E-03	3.36E-02
SG3148	TcCLB.510105.40	cullin-like protein, putative	0.94	1.52E-03	3.41E-02
SG2618	TcCLB.504035.110	hypothetical protein	0.71	1.51E-03	3.41E-02
SG2557	TcCLB.511051.80	DNA/RNA non-specific endonuclease protein-like, putative	0.9	1.53E-03	3.43E-02
SG6399	TcCLB.507765.120	hypothetical protein, conserved	0.8	1.57E-03	3.49E-02
SG2854	TcCLB.506357.150	hypothetical protein, conserved	0.64	1.61E-03	3.55E-02
SG5830	TcCLB.504035.90	translation initiation factor IF-2,	0.87	1.62E-03	3.55E-02

		putative			
SG2602	TcCLB.503493.40	hypothetical protein, conserved	0.73	1.62E-03	3.55E-02
SG5304	TcCLB.510357.10	DnaJ chaperone protein, putative	0.6	1.62E-03	3.55E-02
SG7446	TcCLB.511421.80	hypothetical protein, conserved (pseudogene)	1.01	1.62E-03	3.55E-02
SG4489	TcCLB.507683.40	protein kinase, putative	1.26	1.66E-03	3.59E-02
SG4804	TcCLB.506739.130	protein phosphatase 1 catalitic subunit, putative	0.58	1.67E-03	3.59E-02
SG3181	TcCLB.508859.90	phosphatidylinositol 3-kinase 2, putative	0.79	1.70E-03	3.59E-02
SG8530	TcCLB.511727.30	hypothetical protein, conserved	0.73	1.69E-03	3.59E-02
SG2291	TcCLB.511127.50	hypothetical protein, conserved	0.87	1.68E-03	3.59E-02
SG6844	TcCLB.506885.110	hypothetical protein, conserved	0.67	1.70E-03	3.59E-02
SG2374	TcCLB.508241.30	hypothetical protein, conserved	0.7	1.70E-03	3.59E-02
SG8275	TcCLB.510901.230	hypothetical protein, conserved	0.71	1.70E-03	3.59E-02
SG4062	TcCLB.506405.100	hypothetical protein, conserved	0.69	1.69E-03	3.59E-02
SG6599	TcCLB.511817.20	hypothetical protein, conserved	0.58	1.78E-03	3.72E-02
SG2583	TcCLB.506211.120	hypothetical protein, conserved	0.81	1.82E-03	3.80E-02
SG7573	TcCLB.504153.90	dynein heavy chain (pseudogene), putative	1.16	1.84E-03	3.81E-02
SG1080	TcCLB.506009.10	hypothetical protein, conserved	0.67	1.84E-03	3.81E-02
SG2632	TcCLB.508307.20	hypothetical protein, conserved	0.75	1.84E-03	3.81E-02
SG5064	TcCLB.508207.250	mitotic cyclin, putative	0.78	1.88E-03	3.88E-02
SG8124	TcCLB.511003.160	hypothetical protein, conserved	0.85	1.89E-03	3.88E-02
SG4781	TcCLB.511071.20	hypothetical protein, conserved	0.67	1.91E-03	3.92E-02
SG3812	TcCLB.503593.40	hypothetical protein	0.6	1.99E-03	4.02E-02
SG1718	TcCLB.509331.160	hypothetical protein, conserved	0.68	1.98E-03	4.02E-02
SG1072	TcCLB.511309.20	hydrolase-like protein, putative	0.98	1.99E-03	4.02E-02
SG1950	TcCLB.506773.120	hypothetical protein, conserved	0.94	2.02E-03	4.06E-02
SG3457	TcCLB.506775.110	hypothetical protein, conserved	0.73	2.04E-03	4.07E-02
SG1737	TcCLB.508895.40	hypothetical protein, conserved	0.79	2.05E-03	4.08E-02
SG1884	TcCLB.503965.39	hypothetical protein, conserved	0.74	2.05E-03	4.08E-02
SG4329	TcCLB.507771.60	hypothetical protein, conserved	0.59	2.06E-03	4.08E-02
SG7472	TcCLB.506945.340	hypothetical protein, conserved	0.86	2.07E-03	4.08E-02
SG6879	TcCLB.506635.139	kasal-type serpin (pseudogene), putative,serine protease inhibitor (pseudogene), putative	0.95	2.08E-03	4.08E-02
SG0058	TcCLB.508023.120	hypothetical protein, conserved (pseudogene)	0.84	2.14E-03	4.18E-02
SG0251	TcCLB.510581.9	receptor-type adenylate cyclase, putative	0.68	2.15E-03	4.19E-02
SG8300	TcCLB.511277.280	hypothetical protein, conserved	0.62	2.17E-03	4.22E-02
SG6431	TcCLB.509599.164	hypothetical protein, conserved	0.72	2.22E-03	4.28E-02
SG4409	TcCLB.510001.20	hypothetical protein, conserved	0.67	2.22E-03	4.28E-02
SG0822	TcCLB.509569.10	hypothetical protein, conserved	1.13	2.23E-03	4.29E-02
SG7592	TcCLB.504057.145	hypothetical protein, conserved	0.65	2.24E-03	4.29E-02

SG2953	TcCLB.511269.70	calpain-like cysteine peptidase, putative, cysteine peptidase, Clan CA, family C2, putative	0.93	2.25E-03	4.29E-02
SG0286	TcCLB.507711.200	hypothetical protein, conserved	0.67	2.28E-03	4.34E-02
SG3332	TcCLB.508257.170	dynein heavy chain, putative	0.78	2.32E-03	4.40E-02
SG4033	TcCLB.509641.40	hypothetical protein, conserved	0.73	2.33E-03	4.40E-02
SG6394	TcCLB.507041.120	variant-surface-glycoprotein phospholipase C, putative, vsg lipase, putative, glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase C, putative	0.59	2.35E-03	4.40E-02
SG3040	TcCLB.506265.20	hypothetical protein, conserved	0.98	2.32E-03	4.40E-02
SG3376	TcCLB.506701.29	hypothetical protein, conserved	0.82	2.34E-03	4.40E-02
SG2089	TcCLB.510759.190	hypothetical protein, conserved	0.98	2.42E-03	4.50E-02
SG3499	TcCLB.511685.50	hypothetical protein, conserved	0.89	2.44E-03	4.51E-02
SG3216	TcCLB.506859.249	hypothetical protein, conserved	0.71	2.48E-03	4.54E-02
SG6227	TcCLB.508239.20	hypothetical protein, conserved	0.57	2.47E-03	4.54E-02
SG5949	TcCLB.508355.420	cation transporter protein, putative	1.28	2.49E-03	4.54E-02
SG1103	TcCLB.508139.155	protein kinase (pseudogene), putative	1.3	2.48E-03	4.54E-02
SG5325	TcCLB.503463.20	hypothetical protein, conserved	0.71	2.49E-03	4.54E-02
SG4657	TcCLB.510259.24	hypothetical protein, conserved	0.74	2.50E-03	4.55E-02
SG0947	TcCLB.510645.9	protein kinase, putative	0.63	2.53E-03	4.57E-02
SG2138	TcCLB.506503.80	kinesin, putative	0.65	2.52E-03	4.57E-02
SG1989	TcCLB.506563.190	calpain-like cysteine peptidase, putative	0.69	2.54E-03	4.58E-02
SG8828	TcCLB.507025.50	RNA-binding protein, putative	0.73	2.56E-03	4.60E-02
SG7503	TcCLB.506625.80	cAMP-specific phosphodiesterase, putative	1.02	2.56E-03	4.60E-02
SG1508	TcCLB.420369.40	hypothetical protein, conserved	0.69	2.58E-03	4.62E-02
SG3006	TcCLB.509105.50	hypothetical protein	0.64	2.66E-03	4.73E-02
SG6627	TcCLB.511809.110	hypothetical protein, conserved	0.68	2.68E-03	4.77E-02
SG3143	TcCLB.509977.100	hypothetical protein, conserved	0.84	2.70E-03	4.79E-02
SG3029	TcCLB.511837.90	protein kinase, putative	0.61	2.72E-03	4.81E-02
SG4344	TcCLB.511261.120	pumilio/PUF RNA binding protein 2, putative	0.83	2.81E-03	4.92E-02
SG4942	TcCLB.510045.30	protein kinase, putative	0.72	2.82E-03	4.94E-02
SG3724	TcCLB.508355.200	vacuolar protein sorting protein 16, putative	0.63	2.83E-03	4.94E-02
SG4032	TcCLB.510877.170	hypothetical protein, conserved	0.8	2.89E-03	5.00E-02

Tabela 2: Análises estatísticas das PCRs quantitativas. Para cada um dos 35 genes analisados foi feita uma comparação dos níveis de expressão normalizados através de um teste-t, sendo que o valor de P resultante está apresentado na tabela. Duas comparações foram realizadas: parasitas controle (WT) contra parasitas nocaute de TcZC3H31 (KO) e parasitas expressando TcZC3H31-Flag (TcZC3H31Flag) contra parasitas expressando GFP-Flag (GlagGFP). Os SuperGenes estão ordenados de acordo com a significância estatística na comparação WTxKO.

	WTxKO	Tc3H31FlagxFlagGFP
ZFPg2	2.21E-05	0.2924
SG3190	0.0021	0.0328
SG2103	0.0038	0.7520
SG1711	0.0038	0.0126
SG2227	0.0188	0.7428
SG0995	0.0236	0.0099
SG6900	0.0358	0.3026
SG7218	0.0373	0.9315
SG1097	0.0652	0.0684
SG7813	0.1174	0.0062
SG7739	0.1890	0.2394
SG7872	0.2057	0.1706
SG8750	0.2111	0.7544
SG1486	0.2222	0.0223
SG3580	0.2552	0.8808
SG0664	0.2776	0.3244
SG2138	0.3588	0.1255
SG3606	0.3672	0.2558
SG8520	0.4115	0.8155
SG3004	0.4422	0.0077
SG3724	0.4726	0.0916
SG5890	0.4891	0.5428
SG8202	0.5718	0.5358
SG1747	0.5740	0.8231
SG6276	0.5841	0.0030
SG5063	0.5900	0.8332
SG2137	0.6478	0.2558
SG2647	0.7205	0.3393
SG3665	0.7747	0.3783
SG0658	0.8543	0.5245
SG0997	0.9365	0.3562
SG6968	0.9456	0.9753
SG1130	0.9700	0.0586
SG2277	0.9932	0.0650
SG4806	0.9983	0.0140

Tabela 3: Termos de ontologia gênica significativamente sobre-representados nos parceiros de TcZC3H31 (Tabela 1) em comparação com todo o genoma de *T. cruzi*. Cada termo identificado é seguido de sua descrição, significância estatística e lista dos genes detectados para cada termo. Para cada grupo de genes ou SuperGene (SG) é demonstrado o maior gene (ID) nele contido.

GO:0006468 P	protein phosphorylation	FDR 2,1E-3; 24 membros
SG	ID	Descrição
SG3782	TcCLB.506211.180	protein kinase, putative
SG2227	TcCLB.509999.110	serine/threonine protein kinase, putative,protein kinase, putative
SG1711	TcCLB.509991.9	protein kinase, putative
SG6325	TcCLB.511277.520	protein kinase (pseudogene), putative,glycogen synthase kinase, frameshift
SG2982	TcCLB.507547.80	protein kinase, putative
SG8274	TcCLB.510901.200	protein kinase, putative
SG6276	TcCLB.503885.100	hypothetical protein, conserved
SG8201	TcCLB.504123.30	map kinase, putative
SG4942	TcCLB.510045.30	protein kinase, putative
SG5064	TcCLB.508207.250	mitotic cyclin, putative
SG2618	TcCLB.504035.110	hypothetical protein
SG0947	TcCLB.510645.9	protein kinase, putative
SG3584	TcCLB.509605.30	Protein kinase domain, putative
SG2277	TcCLB.511907.240	protein kinase, putative
SG4263	TcCLB.510409.10	protein kinase, putative
SG7231	TcCLB.508987.30	protein kinase, putative
SG6029	TcCLB.503715.40	protein kinase, putative
SG3190	TcCLB.506519.60	Protein kinase domain, putative
SG5063	TcCLB.511165.80	protein kinase, putative
SG3029	TcCLB.511837.90	protein kinase, putative
SG7406	TcCLB.506945.350	serine/threonine protein kinase, putative
SG6128	TcCLB.510565.70	protein kinase, putative
SG0979	TcCLB.508051.30	protein kinase, putative
SG4489	TcCLB.507683.40	protein kinase, putative
GO:0005524 F	ATP binding	FDR 2,1E-3; 47 membros
SG	ID	Descrição
SG1097	TcCLB.508231.30	target of rapamycin (TOR) kinase 1, putative
SG4773	TcCLB.503415.30	hypothetical protein, conserved
SG6968	TcCLB.507099.80	ABC transporter, putative
SG3332	TcCLB.508257.170	dynein heavy chain, putative
SG3766	TcCLB.508879.30	dynein heavy chain, putative
SG3782	TcCLB.506211.180	protein kinase, putative

SG2869	TcCLB.506127.120	hypothetical protein, conserved
SG2227	TcCLB.509999.110	serine/threonine protein kinase, putative,protein kinase, putative
SG3181	TcCLB.508859.90	phosphatidylinositol 3-kinase 2, putative
SG1711	TcCLB.509991.9	protein kinase, putative
SG6325	TcCLB.511277.520	protein kinase (pseudogene), putative,glycogen synthase kinase, frameshift
SG0446	TcCLB.506905.59	SNF2 DNA repair protein, putative
SG7354	TcCLB.509585.10	dynein heavy chain, putative
SG5620	TcCLB.508065.50	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase-like protein, putative
SG2982	TcCLB.507547.80	protein kinase, putative
SG4007	TcCLB.506905.40	ABC transporter, putative
SG8274	TcCLB.510901.200	protein kinase, putative
SG8201	TcCLB.504123.30	map kinase, putative
SG4942	TcCLB.510045.30	protein kinase, putative
SG2618	TcCLB.504035.110	hypothetical protein
SG2016	TcCLB.511649.80	myosin heavy chain, putative
SG5890	TcCLB.510045.20	ABC transporter, putative
SG2706	TcCLB.511801.60	mitochondrial DEAD box protein, putative
SG0585	TcCLB.511649.70	structural maintenance of chromosome 3 protein, putative
SG2138	TcCLB.506503.80	kinesin, putative
SG0947	TcCLB.510645.9	protein kinase, putative
SG3172	TcCLB.510943.190	myosin heavy chain MYA2-related, putative
SG3584	TcCLB.509605.30	Protein kinase domain, putative
SG2277	TcCLB.511907.240	protein kinase, putative
SG4263	TcCLB.510409.10	protein kinase, putative
SG7231	TcCLB.508987.30	protein kinase, putative
SG7636	TcCLB.510689.40	phosphatidylinositol 3-kinase (tor2), putative
SG6029	TcCLB.503715.40	protein kinase, putative
SG1340	TcCLB.503847.20	myosin heavy chain, putative
SG2418	TcCLB.509591.60	phospholipid-transporting ATPase 1-like protein, putative
SG1178	TcCLB.510347.20	hypothetical protein, conserved
SG3190	TcCLB.506519.60	Protein kinase domain, putative
SG5063	TcCLB.511165.80	protein kinase, putative
SG0686	TcCLB.508881.70	DNA ligase, putative,mitochondrial DNA ligase homolog, putative
SG3029	TcCLB.511837.90	protein kinase, putative
SG7446	TcCLB.511421.80	hypothetical protein, conserved (pseudogene)
SG7406	TcCLB.506945.350	serine/threonine protein kinase, putative
SG6128	TcCLB.510565.70	protein kinase, putative

SG0979	TcCLB.508051.30	protein kinase, putative
SG1130	TcCLB.511825.180	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative
SG4489	TcCLB.507683.40	protein kinase, putative
SG6057	TcCLB.509695.50	katanin, putative

GO:0004674 | F protein serine/threonine kinase activity FDR 6,7E-3; 18 membros

SG	ID	Descrição
SG3782	TcCLB.506211.180	protein kinase, putative
SG2227	TcCLB.509999.110	serine/threonine protein kinase, putative,protein kinase, putative
SG1711	TcCLB.509991.9	protein kinase, putative
SG6325	TcCLB.511277.520	protein kinase (pseudogene), putative,glycogen synthase kinase, frameshift
SG2982	TcCLB.507547.80	protein kinase, putative
SG8274	TcCLB.510901.200	protein kinase, putative
SG8201	TcCLB.504123.30	map kinase, putative
SG0947	TcCLB.510645.9	protein kinase, putative
SG3584	TcCLB.509605.30	Protein kinase domain, putative
SG2277	TcCLB.511907.240	protein kinase, putative
SG4263	TcCLB.510409.10	protein kinase, putative
SG7231	TcCLB.508987.30	protein kinase, putative
SG6029	TcCLB.503715.40	protein kinase, putative
SG5063	TcCLB.511165.80	protein kinase, putative
SG3029	TcCLB.511837.90	protein kinase, putative
SG7406	TcCLB.506945.350	serine/threonine protein kinase, putative
SG6128	TcCLB.510565.70	protein kinase, putative
SG4489	TcCLB.507683.40	protein kinase, putative

GO:0009069 | P serine family amino acid metabolic process FDR 1,5E-2; 19 membros

SG	ID	Descrição
SG0030	TcCLB.508325.150	glycine dehydrogenase (pseudogene), putative
SG3782	TcCLB.506211.180	protein kinase, putative
SG2227	TcCLB.509999.110	serine/threonine protein kinase, putative,protein kinase, putative
SG1711	TcCLB.509991.9	protein kinase, putative
SG6325	TcCLB.511277.520	protein kinase (pseudogene), putative,glycogen synthase kinase, frameshift
SG2982	TcCLB.507547.80	protein kinase, putative
SG8274	TcCLB.510901.200	protein kinase, putative
SG8201	TcCLB.504123.30	map kinase, putative
SG0947	TcCLB.510645.9	protein kinase, putative

SG3584	TcCLB.509605.30	Protein kinase domain, putative
SG2277	TcCLB.511907.240	protein kinase, putative
SG4263	TcCLB.510409.10	protein kinase, putative
SG7231	TcCLB.508987.30	protein kinase, putative
SG6029	TcCLB.503715.40	protein kinase, putative
SG5063	TcCLB.511165.80	protein kinase, putative
SG3029	TcCLB.511837.90	protein kinase, putative
SG7406	TcCLB.506945.350	serine/threonine protein kinase, putative
SG6128	TcCLB.510565.70	protein kinase, putative
SG4489	TcCLB.507683.40	protein kinase, putative
