

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LETICIA ADEJANI LAIBIDA

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E ESTRUTURAL DA PROTEÍNA TUZINA E DE
DUAS LIPASES DE *Trypanosoma cruzi*.**

CURITIBA

2016

LETICIA ADEJANI LAIBIDA

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E ESTRUTURAL DA PROTEÍNA TUZINA E DE
DUAS LIPASES DE *Trypanosoma cruzi*.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências – Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Wanderson Duarte Da Rocha.
Coorientador: Dr. Stenio Perdigão Fragoso (ICC/Fiocruz).

CURITIBA

2016

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Laibida, Leticia Adejani

Caracterização funcional e estrutural da proteína tuzina e de duas lipases de *Trypanosoma cruzi*. / Leticia Adejani Laibida. – Curitiba, 2016. 151 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Wanderson Duarte da Rocha

Coorientador: Stenio Perdigão Fragoso

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. *Trypanosoma cruzi* 2. Lipase I. Título II. Rocha, Wanderson Duarte da III. Fragoso, Stenio Perdigão IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

CDD (20. ed.) 574.192

TERMO DE APROVAÇÃO


LETÍCIA ADEJANI LAIBIDA

Caracterização estrutural e funcional da proteína tuzina e de duas lipases de
Trypanosoma cruzi

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. Wanderson Duarte da Rocha – Orientador
Departamento de Bioquímica, UFPR



Prof.ª Dr.ª Maria Berenice R. Steffens
Departamento de Bioquímica, UFPR



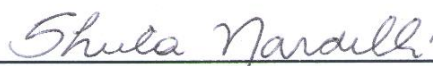
Prof.ª Dr.ª Daniela Fiori Gradia
Departamento de Genética, UFPR



Prof. Dr. Jaime Paba Martinez
Departamento de Bioquímica, UFPR



Prof.ª Dr.ª Iriane Eger
Departamento de Biologia Geral, UEPG



Dr.ª Sheila Cristina Nardelli
ICC/FIOCRUZ-PR

Curitiba, 22 de setembro de 2016.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Maria Lúcia Ganzert Laibida (*in memoriam*), pelo maior exemplo de mulher que uma filha poderia ter.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Wanderson Duarte da Rocha, pela dedicação e amizade constantes e por ser aos meus olhos um exemplo de pesquisador.

Ao Dr. Stenio Perdigão Fragoso, do Instituto Carlos Chagas (ICC) Curitiba por dar-me novamente a oportunidade de trabalhar em seu laboratório e também pela boa vontade em ajudar no desenvolvimento desta tese.

Ao meu namorado, David Ribas Santos, por todo suporte e compreensão dados a mim ao longo destes anos. A vida é mais fácil com você!

Ao meu pai, Albary Laibida, e ao meu irmão, Albary Laibida Jr., pelo apoio incondicional a tudo que tenho me aventurado em fazer.

À irmã que a vida me deu e que eu aceitei com a maior satisfação do mundo: Ana Paula Gregorczyk Kikuti. Você é “mara”!

À minha segunda família: os integrantes do laboratório GFP! Dra. Monica “Monicats” Marcolino, Ma. Normanda Melo, Ma. Laiane Lemos, Ma. Lara Demeu, Me. Lisandro Pacheco e Melisa Wyllie. Obrigada pela amizade e por aquele ombro amigo tão confortável nas horas difíceis. Tem sido uma honra trabalhar com vocês!

Aos meus queridos amigos *nerds*: Alessandra “A Destruidora” Biz e André “Deco” Valgrande, Fernanda Farias, Maura e Bruno Guérrios; Francine Motter e Anelize Finkler. Obrigada pelos ótimos “papos *nerds*” que tivemos ao longo destes anos!

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Tripanossomatídeos: Dra. Monica “Moniquê” Alcântara, Lívia Pereira, Bruna Lange, Dra. Adriana “Didi” Umaki, Dra. Gisele Picchi, Kamille Schimidt, Vanessa Zulkievicz, Sidney Zulkievicz Júnior, Ma. Cláudia “Claudiê” Moreira e Jaqueline Rosa. Muito obrigada por este tempo em que passamos juntos!

Aos integrantes do ICC: Dr. Maurílio Soares, Ma. Priscila Hiraiwa, Dr. Michel Batista, Me. Cassiano Martins, Vanessa Martins, Silvio e Nilson Fidêncio, por toda ajuda e paciência a mim prestados.

À Dra. Maria Laura Belauzarán, da Universidade de Buenos Aires, Argentina, por ceder o anticorpo anti-fosfolipase A₁ usado nesta tese.

Aos professores Fábio de Oliveira Pedrosa e Emanuel Maltempi de Souza e aos técnicos, Valter de Baura e Rose Prado, do Instituto Nacional de Fixação Biológica de Nitrogênio, por todo suporte técnico-científico prestado.

Às professoras Maria Berenice Reynaud Steffens e Maria Eliane Merlin Rocha, pelas ótimas sugestões durante a correção da versão preliminar desta tese.

À Pós-Graduação em Ciências: Bioquímica, pela oportunidade de me aprofundar na área que sempre quis estudar.

À CAPES (Comissão de Aperfeiçoamento de Ensino Superior), pela bolsa institucional.

“Nada na vida deve ser temido, mas sim compreendido. Este é o momento em que devemos compreender mais, para que sintamos menos medo. ”

Marie Sklodowska Curie

RESUMO

O primeiro genoma publicado de *Trypanosoma cruzi*, o agente causal da doença de Chagas, foi do clone CL Brener, em 2005, e depois de mais de dez anos, por volta de 50% de seus genes ainda têm função desconhecida. Dentre eles, os genes de tuzina e de duas lipases foram parcialmente caracterizados neste trabalho. Tuzina é uma proteína de baixa expressão presente em *T. cruzi*, e com domínio de ligação a ATP. Seus genes alternam-se em blocos com os de amastinas, uma família de proteínas de superfície associada à virulência neste organismo. Análises *in silico* conduzidas neste trabalho mostraram que tuzinas de *T. cruzi* são mais conservadas com as de *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma grayi* (> 80% de identidade). No entanto, menor conservação é observada em *Leishmania* spp. (< 50%). Neste parasito, a divergência de sequências sugere o agrupamento em famílias, as quais podem exercer funções distintas neste gênero. Além da tuzina de 51 kDa descrita inicialmente, nossas análises *in silico* apontaram a presença de isoforma maior com 75 kDa (Tuzina-75) em *T. cruzi*, com cerca de 70% de identidade com a tuzina de *T. brucei* (74 kDa). Diferentes tentativas de superexpressão apontaram que os níveis de Tuzina-75 devem ser tão baixos quanto os de Tuzina-51, o que dificultou sua caracterização. Dados de localização subcelular de Tuzina-51 fusionada à etiqueta de FLAG apresentaram aspecto difuso por todo parasito, no entanto, a proteína fusionada estava presente tanto na fração citoplasmática, quanto na de membrana deste organismo. A fim de fornecer indícios da função de TcTuzina-51, a coimunoprecipitação de Tuzina-51 em fusão à FLAG seguida de espectrometria MS/MS foi realizada. Nessa abordagem, foram identificadas proteínas associadas ao sistema arcaico de translocação através da membrana mitocondrial externa (ATOM), e também uma proteína associada à translocação no retículo endoplasmático (RE). Estes resultados sugerem que tuzina esteja associada à translocação de proteínas nestas organelas, embora seu mecanismo ainda seja desconhecido. Quanto às lipases também estudadas aqui, uma delas foi identificada como uma fosfolipase do tipo A₁ (TcPLA₁), possivelmente secretada devido à presença de peptídeo sinal de endereçamento para RE. Fosfolipases já foram descritas como fatores de virulência em alguns microrganismos. A expressão de TcPLA₁ foi maior em amastigotas da cepa G, a forma evolutiva mais infectiva desta cepa, sugerindo relação com sua virulência. Já a segunda lipase (TcLip2) possui um domínio FYVE de ligação ao zinco e a lipídeos de membrana, podendo estar associada à formação de endossomos primários ou a lisossomos. Tomados em conjunto, estes dados reforçam a importância para a caracterização destas proteínas, uma vez que o complexo ATOM foi descrito recentemente em *T. brucei*, e parece muito divergente de outros eucariotos, o que os torna potenciais alvos de drogas. Por conseguinte, a biogênese endossomal em *T. cruzi* ainda não foi completamente caracterizada e talvez TcLip2 pode estar envolvida nesse processo. Finalmente, o conhecimento da função destas proteínas poderá fornecer maiores evidências sobre a biologia celular e molecular deste protozoário, e, conseqüentemente, sobre a virulência de *T. cruzi* e seu papel na doença de Chagas.

Palavras chave: ATOM. Lipases. Translocon. *Trypanosoma cruzi*. Tuzina.

ABSTRACT

The first genome published for *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease, was for the CL Brener clone, in 2005, and over than ten years after, about 50% of its genes still have unknown function. Among them, tuzin and two lipases were partially characterized in this study. Tuzin is a low expression protein from *T. cruzi*, which contains a domain for ATP binding. Tuzin genes alternate in a cluster with amastins', a surface protein family associated with the virulence in this organism. *In silico* analysis carried on this study showed that tuzin from *T. cruzi* has higher conservation when compared to *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma grayi* (> 80% identity). However, lower conservation was observed in *Leishmania* spp. (< 50%). In this parasite, the sequence divergence of tuzin suggests its grouping into families, which could play different roles in this genre. In addition to 51 kDa tuzin previously described, our *in silico* analysis indicated the existence of an isoform in *T. cruzi* with 75 kDa (Tuzin-75), with about 70% identity to *T. brucei* (74 kDa). Different attempts for overexpression of this isoform led the conclusion that Tuzin-75 expression levels should be as low as Tuzin-51's, thus, hampering its characterization. Subcellular location data of Tuzin-51 fused to FLAG epitope showed scattered location over the parasite's body, however, the fused protein was identified in both subcellular fractions, cytoplasm and membrane. In order to provide TcTuzina-51 function indications, co-immunoprecipitation of Tuzin-51 fused to FLAG followed by MS/MS spectrometry was performed. In this approach, we have identified proteins associated with the mitochondrial archaic translocase of the outer membrane (ATOM) and with the endoplasmic reticulum (ER) translocon. These results suggest a possible correlation with tuzin to protein translocation in these organelles, although its mechanism remains unknown. For the lipases also studied here, one of them was identified as a phospholipase A₁ (TcPLA₁), possibly secreted due to a signal peptide targeting to the ER. Phospholipases were already described as virulence factors in some microorganisms. TcPLA1 expression was higher in amastigote cells from *T. cruzi* G strain, the most infective form for this strain, which suggests correlation with its virulence. In the last protein studied, the lipase TcLip2, we have found a FYVE domain for lipid membranes and zinc binding, which indicates association to early endosomes or lysosomes formation. Taken together, these data reinforce the importance for these proteins characterization, once the ATOM complex was recently described in *T. brucei* and seems to be very divergent from other eukaryotes, making this complex a putative target for new drugs. Additionally, the early endosome biogenesis in *T. cruzi* was not characterized yet, and maybe TcLip2 should be involved in this process. Finally, revealing these proteins functions may contribute to the further evidence for the molecular and cellular biology of *T. cruzi*, and, consequently, for the virulence of this protozoa and its role in Chagas disease.

Key words: ATOM. Lipase. Translocon. *Trypanosoma cruzi*. Tuzin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 –	CICLO BIOLÓGICO DO <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
FIGURA 2 –	AS PRINCIPAIS ESTRUTURAS CELULARES DA FORMA EPIMASTIGOTA DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
FIGURA 3 –	EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS.....	29
FIGURA 4 –	FERRAMENTAS DE MANIPULAÇÃO GÊNICA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS.....	35
FIGURA 5 –	O COMPLEXO DE TRANSLOCASE EXTERNA DE ANIMAIS, FUNGOS E DE <i>Trypanosoma brucei</i>	41
FIGURA 6 –	REPRESENTAÇÃO DO MOTIVO CONSERVADO DA FAMÍLIA DE A/B HIDROLASE.....	43
FIGURA 7 –	REPRESENTAÇÃO DA HIDRÓLISE DE FOSFOLIPÍDIOS POR DIFERENTES LIPASES.....	44
FIGURA 8 –	ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO GENE DE TUZINA EM <i>Trypanosoma cruzi</i> (CLONE CL BRENER).....	83
FIGURA 9 –	ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS SEQUÊNCIAS DE DIFERENTES ESPÉCIES E CEPAS DE TRIPANOSSOMATÍDEOS.....	85
FIGURA 10 –	REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DE TUZINA.....	87
FIGURA 11 –	MAPA DE POLIPYRIMIDINAS DE TUZINA.....	88
FIGURA 12 –	EXPRESSÃO DE TUZINAS EM EPIMASTIGOTAS DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	89
FIGURA 13 –	EXPRESSÃO DE TUZINAS EM <i>Trypanosoma cruzi</i> (CEPA Y).....	91
FIGURA 14 –	VETORES USADOS PARA A EXPRESSÃO DE TUZINA E VARIANTES EM FUSÃO À GFP.....	92
FIGURA 15 –	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TUZINA E VARIANTES EM FUSÃO A GFP.....	93
FIGURA 16 –	ALINHAMENTO ENTRE A TUZINA DE <i>Trypanosoma brucei</i> E A TUZINA-75 DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	94
FIGURA 17 –	TESTE DE REATIVIDADE DO SORO ANTI-TUZINA CONTRA EXTRATOS DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	96

FIGURA 18 –	TESTE DE COMPETIÇÃO DO SORO ANTI-TUZINA.....	97
FIGURA 19 –	VETOR DE EXPRESSÃO DE TUZINA FUSIONADA À ETIQUETA DE 3XFLAG.....	98
FIGURA 20	LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE TUZINA EM <i>Trypanosoma cruzi</i> (CEPA G)	99
FIGURA 21 –	FRACIONAMENTO SUBCELULAR DE TUZINA EM <i>Trypanosoma cruzi</i>	100
FIGURA 22 –	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE TUZINA EM <i>Trypanosoma cruzi</i>	101
FIGURA 23 –	CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>Trypanosoma cruzi</i> EXPRESSANDO TUZINA::3XFLAG.....	102
FIGURA 24 –	VETORES CRIADOS PARA A VALIDAÇÃO DA CO-IP DE TUZINA.....	109
FIGURA 25 –	COEXPRESSÃO DE TUZINA COM ATOM69 E p601.30.....	110
FIGURA 26 –	COLOCALIZAÇÃO DE TUZINA COM ATOM69 E p601.30.....	111
FIGURA 27 –	ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DAS LIPASES DE <i>T. cruzi</i> (CLONE CL BRENER).....	113
FIGURA 28 –	ALINHAMENTO ENTRE AS DUAS CÓPIAS DE TcLip2 DE <i>T. cruzi</i> (CLONE CL BRENER).....	114
FIGURA 29 –	PREDIÇÃO DE PEPTÍDEO SINAL PARA TcPLA1 E TcLip2.....	115
FIGURA 30 –	MODELAGEM MOLECULAR DA PROTEÍNA TcPLA ₁	116
FIGURA 31 –	MODELAGEM MOLECULAR DA PROTEÍNA TcLip2.....	118
FIGURA 32 –	DESENHO ESQUEMÁTICO DAS PROTEÍNAS TcPLA ₁ E TcLip2	120
FIGURA 33 –	EXPRESSÃO DE TcPLA ₁ E TcLip2 EM <i>Trypanosoma cruzi</i> (CEPA Y).....	122
FIGURA 34 –	IMUNODETECÇÃO DE PLA ₁ NO CICLO DE VIDA DE <i>Trypanosoma cruzi</i> (CEPA G).....	123
FIGURA 35 –	VETORES UTILIZADOS PARA A EXPRESSÃO ECTÓPICA DE TcPLA1 E DE TcLip2 EM <i>Trypanosoma cruzi</i>	124
FIGURA 36 –	EXPRESSÃO ECTÓPICA DE TcPLA ₁ E DE TcLip2.....	125
FIGURA 37 –	LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE TcPLA ₁ E TcLip2 EM FUSÃO À GFP.....	127

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – MICRORGANISMOS E SUAS CARACTERÍSTICAS.....	50
QUADRO 2 – PLASMÍDEOS USADOS E SUAS CARACTERÍSTICAS.....	51
QUADRO 3 – ANTIBIÓTICOS E SUAS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS.....	53
QUADRO 4 – COMPOSIÇÃO DOS REAGENTES E TAMPÕES	55
QUADRO 5 – LISTA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES	58

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	PROTEÍNAS	PARCEIRAS	IDENTIFICADAS	NA	
	IMUNOPRECIPITAÇÃO	DE TUZINA 51	FUSIONADA	A	
	3XFLAG -CORRIDA	TESTE.....			103
TABELA 2 –	PROTEÍNAS	PARCEIRAS	IDENTIFICADAS	NA	
	IMUNOPRECIPITAÇÃO	DE TUZINA 51	FUSIONADA	A	
	3XFLAG – RÉPLICA	1.....			105
TABELA 3 –	PROTEÍNAS	PARCEIRAS	IDENTIFICADAS	NA	
	IMUNOPRECIPITAÇÃO	DE TUZINA 51	FUSIONADA	A	
	3XFLAG – RÉPLICA	2.....			106

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

3' UTR	– Região 3' não traduzida
5' UTR	– Região 5' não traduzida
AE	– Amastigota axênica
APS	– Persulfato de amônio
ATOM	– Sistema arcaico de translocação da membrana externa (do inglês, <i>archaic translocase of outer membrane</i>)
ATP	– Adenosina trifosfato
BLAST	– Ferramenta de busca de alinhamento local básico (do inglês, <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
bp	– Pares de base (do inglês, <i>base pairs</i>)
BSA	– Albumina de soro bovino (do inglês, <i>bovine serum albumin</i>)
CAT	– Cloranfenicol acetil transferase (do inglês, <i>chloramphenicol acetyl transferase</i>)
CDD	– Banco de dados de domínios conservados (do inglês, <i>Conserved Domain Database</i>)
CTP	– Citosina trifosfato
Da	– Dalton
DAPI	– 4',6-diamidino-2-Fenilindol
DEPC	– Dietil pirocarbonato
DIC	– Contraste interfacial diferencial (do inglês, <i>differential interfacial contrast</i>)
dNTP	– Deoxinucleotídeo trifosfato
DO	– Absorbância
DTU	– Unidade discreta de tipagem (do inglês, <i>discrete typing unit</i>)
EDTA	– Ácido etilendiaminotetracético (do inglês, <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
FACS	– Separação de células ativadas por fluorescência (do inglês <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>)
GFP	– Proteína verde fluorescente
gGAPDH	– Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase glicossomal
GP	– Glicoproteína

GPI	– Glicosilfosfatidilinositol
GST	– Glutathione S-transferase (do inglês, <i>glutathione S-transferase</i>)
HEPES	– Ácido (4-(hidroxietil) -1-piperazinaetanosulfônico
Higro/Hig	– Higromicina
HRP	– Peroxidase de raiz forte (do inglês, <i>horseradish peroxidase</i>)
IGS	– Espaçador intergênico (do inglês, <i>intergenic spacer</i>)
Inter-CDS	– Região intercodificadora (do inglês, <i>inter-coding sequence</i>)
IPTG	– Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
kb	– Quilobases
kDa	– Quilodalton
LA	– Luria-Bertani ágar
LB	– Luria-Bertani
LIT	– Infuso de fígado e triptose (do inglês, <i>liver infusion tryptose</i>)
MASP	– Proteína de superfície associada à mucina (do inglês, <i>mucin-associated surface protein</i>)
MET	– Microscopia eletrônica de transmissão
MOPS	– Ácido 3- (N-morfolino) propanossulfônico
mRNA:	– RNA mensageiro
NCBI	– Centro Nacional de Informação Biotecnológica (do inglês, <i>National Center for Biotechnological Information</i>)
Neo	– Neomicina
PAM	– Motor associado à translocase de pré-sequências (do inglês, <i>presequence translocase-associated motor</i>)
PCR	– Reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>)
PFGE	– Gel de eletroforese em campo pulsado (do inglês, <i>pulsed field gel electrophoresis</i>)
PGKA	– Fosfoglicerato quinase A
PGKB	– Fosfoglicerato quinase B
pl	– Ponto isoelétrico
PMSF	– Fenilmetano sulfonil fluoreto
Poli(A)	– Poliadenina
Poli(Y)	– Polipirimidina

POMP	– Proteína do proteoma de membrana externa de mitocôndria (do inglês, <i>protein of outer membrane proteome</i>)
PTU	– Unidade de transcrição policistrônica (do inglês, <i>polycistronic transcription unit</i>)
RE	– Retículo endoplasmático
RPKM	– Leituras por quilobases por milhão (do inglês, <i>reads per kilobases per million</i>)
rRNA	– RNA ribossômico
SAM	– Maquinaria de endereçamento e montagem (do inglês, <i>sorting and assembly machinery</i>)
SDS	– Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	– Gel de eletroforese em poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio (do inglês, <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SFB	– Soro fetal bovino
SL	– <i>spliced leader</i>
SPR	– Receptor de peptídeo sinal (do inglês, <i>signal peptide receptor</i>)
SUMO	– <i>Small ubiquitin-like modifier</i>
TA	– Temperatura ambiente
TAU	– Urina artificial de triatomíneo (do inglês, <i>triatomine artificial urine</i>)
TCT	– Tripomastigota derivada de cultura de tecido
TEMED	– N, N, N', N'-Tetrametiletilenodiamina
TIM	– Translocase da membrana interna (do inglês, <i>translocase of inner membrane</i>)
TM	– Tripomastigota metacíclica
TOM	– Translocase da membrana externa (do inglês, <i>translocase of outer membrane</i>)
TRAP	Proteína associada ao translocon (do inglês, <i>translocon-associated protein</i>)
Tris	– Tris(hidroximetil)aminometano
TSS	– Sítio de início de transcrição (do inglês, <i>transcription start site</i>)
UTR	– Região não traduzida (do inglês, <i>untranslated region</i>)
X-Gal	– 5-Bromo-4-cloro-indolil- β -D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> E A DOENÇA DE CHAGAS.	22
2.2. ESTRUTURA CELULAR DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
2.3. VARIABILIDADE GENÉTICA EM <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
2.4. EXPRESSÃO GÊNICA EM <i>Trypanosoma cruzi</i>	28
2.4.1. Ferramentas para a manipulação da expressão gênica.	31
2.5. A PROTEÍNA TUZINA.	38
2.6. A MITOCÔNDRIA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS.	40
2.6.1. Sistema arcaico de translocação da membrana externa (ATOM).	40
2.7. LIPASES COMO FATOR DE VIRULÊNCIA EM <i>Trypanosoma cruzi</i>	42
3. JUSTIFICATIVA	46
4. OBJETIVOS	47
4.1. OBJETIVO GERAL	47
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
5. MATERIAL E MÉTODOS	48
5.1. ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	48
5.1.1. Conservação e análise estrutural.	48
5.1.2. Construção do mapa de polipirimidinas.	49
5.1.3. Construção das árvores filogenéticas.	49
5.2. MICRORGANISMOS E PLASMÍDEOS.	49
5.3. ANTIBIÓTICOS.	53
5.4. MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO	53
5.5. REAGENTES.	55
5.6. CLONAGEM DAS SEQUÊNCIAS DE DNA PARA CONSTRUÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO.	56

5.6.1. Extração do DNA genômico de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	56
5.6.2. Amplificação do DNA por PCR.	57
5.6.3. Digestão dos amplicons e dos vetores para clonagem clássica.	59
5.6.4. Reações de recombinação para a clonagem pelo sistema Gateway®.	60
5.6.5. Construção dos vetores de expressão em <i>T. cruzi</i> .	60
5.6.6. Preparação de células de <i>Escherichia coli</i> quimiocompetentes.	62
5.6.7. Transformação bacteriana e seleção dos clones.	63
5.6.8. Estoque em glicerol das células de <i>Escherichia coli</i> .	63
5.6.9. Extração do DNA plasmidial.	64
5.6.10. Eletroforese de DNA em gel de agarose.	64
5.6.11. Sequenciamento dos clones.	64
5.7. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE TUZINA RECOMBINANTE.	65
5.7.1. Indução das células contendo o vetor pGEX-Tuzina.	65
5.7.2. Purificação com resina de Glutathione-Sepharose.	65
5.8. PRODUÇÃO DE SORO ANTI-TUZINA EM CAMUNDONGOS.	66
5.8.1. Animais.	66
5.8.2. Imunização.	66
5.8.3. Processamento da amostra.	67
5.9. TRANSFEÇÃO E ANÁLISE DE EXPRESSÃO EM <i>Trypanosoma cruzi</i> .	67
5.9.1. Contagem das células em câmara de Neubauer.	67
5.9.2. Transfecção em <i>Trypanosoma cruzi</i> .	68
5.9.3. Seleção dos protozoários transfectados.	68
5.9.4. Análise de fluorescência por FACS	69
5.9.5. Diferenciação de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	69
5.9.5.1. Metaciclogênese <i>in vitro</i> e purificação de tripomastigotas metacíclicos axênicas.	69
5.9.5.2. Obtenção de tripomastigotas em cultura de tecido.	70

5.9.5.3. Obtenção de amastigotas axênicas.....	71
5.9.6. Extração de proteínas e análise por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	71
5.9.7. Coloração com nitrato de prata.....	72
5.9.8. <i>Western blot</i>	72
5.9.9. Eletroforese de DNA em campo pulsado (PFGE) e transferência em membrana de nitrocelulose.....	73
5.9.10. <i>Northern blot</i>	74
5.9.10.1. Tratamento dos materiais e soluções para eliminação de RNase.....	74
5.9.10.2. Extração de RNA de <i>Trypanosoma cruzi</i>	75
5.9.10.3. Eletroforese em gel de agarose desnaturante e transferência em membranas de nitrocelulose.....	75
5.9.11. Marcação de sondas radioativas e ensaios de hibridação.	76
5.10. LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR.....	76
5.10.1. Fracionamento subcelular.	76
5.10.2. Imunofluorescência e microscopia confocal	77
5.10.3. Microscopia eletrônica de transmissão.....	78
5.10.3.1. Processamento dos blocos de <i>Lowicryl Monostep</i>	78
5.10.3.2. Imunolocalização em cortes ultrafinos.....	79
5.11. CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	79
5.12. COIMUNOPRECIPITAÇÃO DE TUZINA FUSIONADA À FLAG.	80
5.12.1. Lise dos parasitos e incubação com resina acoplada com anti-FLAG.	80
5.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	81
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
6.1. TUZINA.....	82
6.1.1. Organização genômica e conservação.....	82
6.1.2. Padrão de expressão de tuzina	89
6.1.2.1. Análise da expressão de tuzina por genética reversa.	90

6.1.2.2. Análise da expressão de tuzina utilizando soro anti-tuzina	95
6.1.3. Localização celular e provável função de tuzina.....	98
6.1.4. Crescimento da população superexpressando tuzina em fusão à FLAG.	101
6.1.5. Identificação de proteínas interatoras de tuzina.	102
6.2. LIPASES.....	112
6.2.1. Organização genômica e estrutura proteica	112
6.2.2. Expressão de TcPLA ₁ e de TcLip2 em <i>Trypanosoma cruzi</i>	121
6.2.3. Análise funcional de TcPLA ₁ e de TcLip2 em <i>Trypanosoma cruzi</i>	124
7. CONCLUSÃO.....	129
REFERÊNCIAS	130
APÊNDICE 1 – CONSERVAÇÃO ENTRE TUZINAS DE TRIPANOSSOMATÍDEOS.....	144
APÊNDICE 2 – INTEGRAÇÃO DO VETOR pTREX-GFPn NO GENOMA DE EPIMASTIGOTAS DE <i>T. cruzi</i>, CEPA G.....	147
APÊNDICE 3 – ENRIQUECIMENTO DE GO-TERM PARA CO-IP DE TUZINA	148
ANEXO 1 – TRANS-SPLICING DIFERENCIAL DE UM DOS GENES DE TUZINA EM <i>Trypanosoma cruzi</i> Dm28c	151

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é uma doença parasitária transmitida pelo protozoário tripanossomatídeo *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909). Atualmente, estima-se que de 6 a 7 milhões de pessoas ao redor do mundo estejam acometidas por esta doença, a maior parte na América Latina, onde ela é endêmica (WHO, 2016). Apesar dos avanços nas ferramentas de manipulação da expressão gênica nesse organismo (BURLE-CALDAS et al., 2015; DAROCHA et al., 2004; KANGUSSU-MARCOLINO et al., 2014; MA et al., 2012; PENG et al., 2015; TAYLOR; KELLY, 2006), os dados funcionais ainda não cobrem a maior parte dos genes de *T. cruzi*. Consequentemente, ainda é pequeno o conhecimento dos genes envolvidos na patogênese de Chagas, e que podem ser usados no desenvolvimento de novas terapias ou vacinas.

Mesmo após 10 anos da anotação do primeiro genoma do clone CL Brener de *T. cruzi* (EL-SAYED et al., 2005), aproximadamente 50% dos genes anotados no genoma codificam proteínas hipotéticas ou não caracterizadas. Este trabalho dedica-se a estudar três destas proteínas ainda não caracterizadas: tuzina e duas lipases. A proteína tuzina é expressa em baixas quantidades, de função desconhecida e que não possui análogos em humanos. No genoma de *T. cruzi* e de *Leishmania* sp., os genes de tuzina, bem como alguns pseudogenes, estão organizados em um bloco em parceria com genes de δ -amastina, uma proteína de superfície diferencialmente expressa em *T. cruzi* e mais abundante na forma amastigota deste organismo (JACKSON, 2010; KANGUSSU-MARCOLINO et al., 2013; ROCHETTE et al., 2005; TEIXEIRA et al., 1995). Assim como a amastina, a tuzina também é mais expressa em amastigotas, porém com abundância relativa de seu transcrito cerca de 80 vezes menor do que ela. (TEIXEIRA et al., 1999; TEIXEIRA et al., 1995). Já foi sugerido que o gene de tuzina seja apenas um resquício evolutivo que serviria de sítio de poliadenilação para os genes de δ -amastina. No entanto, esta hipótese é pouco provável, uma vez que já foi demonstrado que o soro de pacientes chagásicos pode reconhecer a proteína tuzina recombinante (TEIXEIRA et al., 1999), significando que tuzina é expressa por *T. cruzi* e que ela é imunogênica. Por fim, existe uma região de tuzina (aminoácidos 194-201) que possui alta similaridade com a região consenso de ligação de GTP/ATP, sugerindo potencial ação (TEIXEIRA et al., 1999).

Enquanto que para tuzina ainda não se conhece sua função exata, para as lipases, a outra classe de proteína também estudada nesta tese, seu papel na virulência de certos organismos já foi extensivamente estudado (HAMBREY; MELLORS; TIZARD, 1981; OPPERDOES; VAN ROY, 1982; RICHMOND; SMITH, 2007). Dentre as lipases mais estudadas, estão as fosfolipases, enzimas que catalisam a clivagem de fosfolipídeos em diferentes pontos desta molécula, formando produtos tóxicos às células hospedeiras (BOS et al., 2005). Alguns estudos correlacionam a alta expressão de fosfolipases com a virulência de algumas espécies de tripanossomatídeos e algumas cepas de *T. cruzi* (BELAUNZARÁN et al., 2007; BELAUNZARÁN et al., 2013). Em análises realizadas pelo nosso grupo de pesquisa, do transcriptoma da cepa G de *T. cruzi* (Wanderson Da Rocha, dados não publicados) identificamos o aumento da expressão de uma fosfolipase do tipo A₁ (TcPLA₁) e de outra lipase ainda não caracterizada (TcLip2), as quais parecem sofrer regulação diferencial de seu transcrito ao longo do ciclo de vida desta cepa, sendo maior na forma amastigota extracelular. Esta forma é mais infectiva na cepa G, em comparação com a amastigota extracelular de CL Brener (CRUZ et al., 2012), e pela conhecida associação de fosfolipases à virulência de tripanossomatídeos, seria possível que a fosfolipase A₁ fosse um dos fatores que aumentam virulência da amastigota extracelular da cepa G.

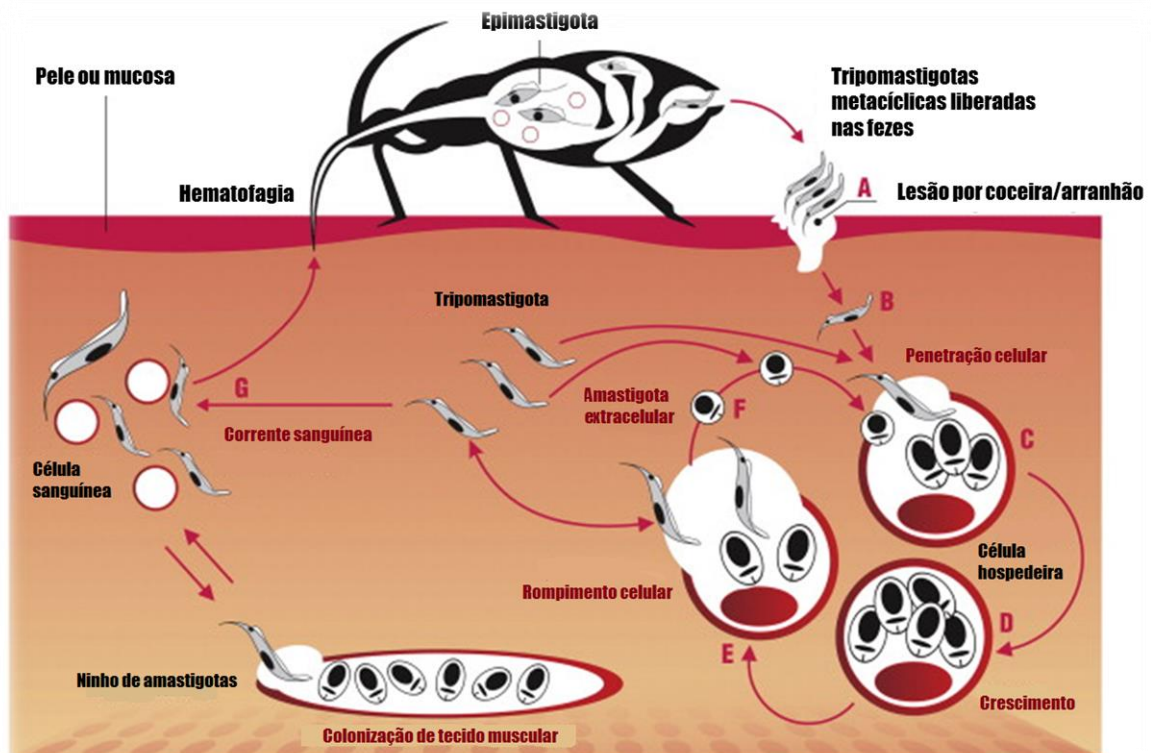
Diante do exposto, este trabalho dedica-se à caracterização funcional e estrutural destas três proteínas através de ferramentas de análise *in silico* e de genética reversa. Os resultados aqui mostrados sugerem a participação de tuzina na translocação de proteínas à mitocôndria, além dos domínios estruturais característicos de lipases em TcLip2 e TcPLA₁. Estas duas últimas proteínas apresentam aumento dos níveis de transcritos nos momentos que antecedem a infecção por *T. cruzi*. Por fim, estes dados contribuem para um maior conhecimento a respeito da biologia celular e virulência por parte deste protozoário.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Trypanosoma cruzi* E A DOENÇA DE CHAGAS.

O protozoário *Trypanosoma cruzi* pertence à família Trypanosomatidae, parte da ordem Kinetoplastida, do supergrupo Excavata, assim recentemente classificado (ADL et al., 2012). Esta família compreende protozoários flagelados com uma região altamente condensada de DNA mitocondrial, chamada cinetoplasto (SOUZA, 2009). O *Trypanosoma cruzi* apresenta características intrigantes sobre sua biologia celular e molecular [revisado por DOCAMPO et al. (2005) e LOPES et al. (2010)], além de ser o agente causal da doença de Chagas, uma enfermidade endêmica na América Latina e que já se disseminou para outros países do globo (COURA; VIÑAS, 2010; TANOWITZ; WEISS; MONTGOMERY, 2011). Estima-se que 6 a 7 milhões de pessoas estejam infectadas por este parasito ao redor do mundo e que o custo de seu tratamento seja substancial: 7,19 bilhões de dólares por ano e 188,80 bilhões durante toda a vida do indivíduo (KALIL-FILHO, 2015; WHO, 2016).

A doença de Chagas foi primeiramente descrita pelo médico brasileiro Carlos Chagas, em 1909 (CHAGAS, 1909). Seu estudo é considerado singular na medicina, uma vez que nele um único cientista foi capaz de descrever o ciclo de transmissão do microrganismo, bem como as manifestações clínicas da fase aguda do primeiro caso registrado no Brasil (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). A transmissão de *T. cruzi* dá-se, principalmente, pelas fezes de insetos hematófagos triatomíneos, popularmente conhecidos como barbeiro. São diversas as espécies capazes de transmitir este protozoário, sendo as mais importantes: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* (ZELEDÓN; RABINOVICH, 1981). Outros casos de transmissão são pela transfusão sanguínea e pela doação de órgãos (via principal em países que não possuem em seu território o inseto vetor), pela transmissão congênita e, mais raramente, pela contaminação de alimentos com as fezes do barbeiro e por acidentes laboratoriais (ANGHEBEN et al., 2015; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

FIGURA 1 – CICLO BIOLÓGICO DO *Trypanosoma cruzi*.

FONTE: Adaptado de Lima et al. (2010).

LEGENDA: As formas epimastigotas no intestino médio do inseto triatomíneo diferenciam-se nas formas tripomastigotas metacíclicas, as quais são liberadas nas fezes durante o repasto sanguíneo. Através da coceira, ou pela mucosa (A), a forma infectiva penetra nas células vizinhas do hospedeiro vertebrado (B). Parasitos internalizados residem algumas horas no vacúolo parasitóforo, do qual escapam para o citoplasma e diferenciam-se nas formas replicativas amastigota (C). As amastigotas diferenciam-se novamente em tripomastigotas metacíclicas (D), as quais rompem a célula infectada e podem disseminar a infecção (F) ou podem infectar outro inseto vetor (G). Alternativamente, amastigotas que são prematuramente liberadas das células infectadas, ou que derivam da diferenciação extracelular de tripomastigotas, podem também invadir outras células e manter o ciclo de infecção (E, F).

O inseto vetor adquire o parasito no momento da hematofagia, quando as formas tripomastigotas sanguíneas no hospedeiro mamífero estão circulantes (Figura 1). No intestino médio do inseto, as formas tripomastigotas sanguíneas diferenciam-se em epimastigota, a forma replicativa neste organismo. Estas formas movem-se à porção final do intestino, onde diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicas. Esta forma não replicativa e bastante móvel é a forma infectiva para o hospedeiro vertebrado, sendo liberada nas fezes do vetor. Após o repasto sanguíneo, as formas metacíclicas penetram a pele ou mucosa lesionadas depois de o hospedeiro mamífero coçar o local da picada, ou a mucosa oral/intestinal, no caso da ingestão por via oral. Uma vez na corrente sanguínea, elas infectam diferentes tipos de células nucleadas,

sendo internalizadas e mantidas no vacúolo parasitóforo. As formas metacíclicas escapam deste vacúolo através da secreção de enzimas líticas (TcTox e *trans*-sialidases), que dissolvem a membrana do vacúolo, permitindo que o parasito chegue ao citoplasma (ANDREWS et al., 1987). Neste momento, diferencia-se nas formas amastigotas, as formas replicativas no hospedeiro vertebrado. Momentos antes de romper a célula infectada, as formas amastigotas diferenciam-se para as formas não replicativas tripomastigotas sanguíneas, as quais promovem a ruptura celular.

Uma vez no tecido sanguíneo, estas formas podem reinfectar outras células ou serem passadas novamente para o inseto triatomíneo durante o repasto sanguíneo (BERN, 2015; LIMA et al., 2010; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Pelas diversas alterações morfológicas que este protozoário sofre, seu ciclo biológico é complexo e bastante adaptado a ambos os hospedeiros, vertebrado e invertebrado.

Durante a passagem das formas tripomastigotas pela corrente sanguínea (parasitemia), observam-se os sintomas da forma aguda da doença de Chagas. O período de incubação é de 1 a 2 semanas (SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012). Os sintomas desta fase da doença são em geral suaves, e incluem febre, mal-estar, hepatoesplenomegalia e linfocitose atípica. Em casos raros, é possível observar um nódulo na pele (chagoma) ou um edema palpebral indolor, conhecido como sinal de Romana. Ambos os sinais sugerem o local de penetração do parasito. Na maioria das vezes, a fase aguda pode ser indetectável, e em raríssimos casos ela se manifesta com sintomas severos, como meningoencefalite e miocardite, que podem ser fatais (BERN; MARTIN; GILMAN, 2011).

Em pacientes que sobrevivem à fase aguda, a resposta imune celular passa a controlar a replicação de *T. cruzi*, os sintomas desaparecem e a parasitemia reduz dentro de 4 a 8 semanas (RASSI; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012). Neste ponto inicia-se a fase crônica da doença de Chagas, marcada por parasitemia negativa e sorologia positiva para *T. cruzi*. A maioria dos pacientes apresentam a forma indeterminada da doença pela vida toda, enquanto que de 20 a 30% destes pacientes podem desenvolver, dentro de anos ou décadas, complicações com evidências clínicas como cardiomiopatia, gastropatia ou ambas. Reativação da doença na fase crônica pode ocorrer em pacientes imunodeprimidos decorrentes de infecção pelo vírus do HIV ou por transplante de órgãos (BERN, 2015; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

O tratamento medicamentoso atual para a doença de Chagas consiste principalmente em dois nitrocompostos: benzonidazol e nifurtimox. Ambos são mais eficazes na fase aguda da doença, embora o retardo na progressão da fase crônica para cardiomiopatia tenha sido observado (VIOTTI et al., 2014). Benzonidazol é o agente tripanocida de escolha, devido a sua maior eficácia e tolerabilidade por parte dos pacientes em relação ao nifurtimox (BERN, 2015). Ambos, no entanto, causam reações adversas, tais como exantema, fotossensibilidade, supressão da medula óssea neuropatia e reações gastrointestinais (náusea, dores abdominais e vômito). Entretanto, 30% dos pacientes que utilizam nifurtimox podem experimentar sintomas neurológicos que variam de convulsões à psicose, a qual pode continuar mesmo com o cessar do tratamento (BERN; MARTIN; GILMAN, 2011). Já foi estabelecido que o mecanismo de ação destes medicamentos reside na produção de radicais livres decorrentes do metabolismo do grupo nitro destes compostos. Estes radicais livres são responsáveis por danificar macromoléculas do protozoário, como o DNA, impedindo sua replicação. Eles também estão associados ao surgimento das lesões às células do hospedeiro e a consequente toxicidade destes fármacos (CASTRO; DE MECCA; BARTEL, 2006)

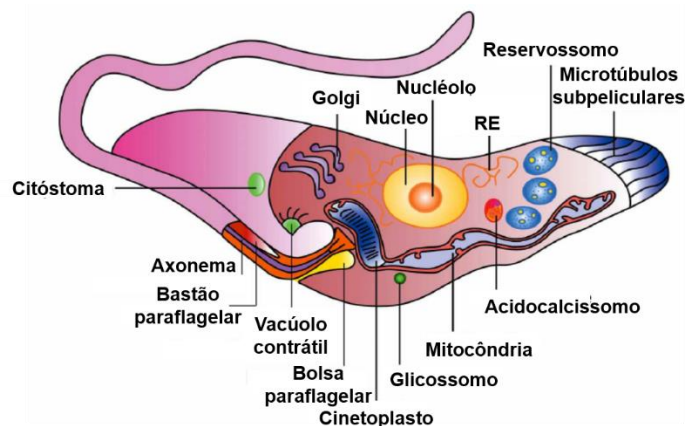
2.2. ESTRUTURA CELULAR DE *Trypanosoma cruzi*.

Além da importância médica de *T. cruzi*, este protozoário também se destaca por suas características celulares e bioquímicas singulares. Algumas delas foram primeiramente observadas nos tripanossomatídeos e posteriormente atribuídas a outros eucariotos, embora algumas conservem sua peculiaridade nos tripanossomatídeos (DOCAMPO et al., 2005; LOPES et al., 2010). Dentre algumas delas, estão as proteínas de superfície ancoradas à GPI (glicosilfosfatidilinositol), presente em protozoários, fungos e animais (MAYOR; RIEZMAN, 2004); os microtúbulos subpeliculares, os quais estão conectados entre si e com a membrana plasmática e dão forma a protozoários cinetoplastídeos e apicomplexos (STEINBÜCHEL et al.; 2014), os acidocalcissomos, organelas acídicas que atuam na reserva de cátions e fosfato, presentes em tripanossomatídeos, apicomplexa, algas e humanos (DOCAMPO et al., 2005). Uma vez que os tripanossomatídeos são organismos ancestrais, com linhagens que antecedem aquelas de animais, plantas e inclusive fungos (DONELSON; GARDNER; EL-SAYED, 1999), algumas

características justificam o interesse no extenso estudo destes protozoários, como a presença de bactérias endossimbiontes e sua relação com a evolução das organelas (MOTTA et al., 2010), e também a presença de uma única mitocôndria e a especialização do seu sistema de transporte de proteínas (MANI et al., 2015). Em conjunto, estes estudos buscam um entendimento maior da evolução de microrganismos unicelulares a seres multicelulares de alta complexidade.

Dentre as características próprias da biologia celular dos tripanossomatídeos, estão a estrutura peculiar do flagelo e a presença de uma invaginação na membrana responsável pela endocitose (bolsa flagelar) (LANDFEAR; IGNATUSHCHENKO, 2001); o vacúolo contrátil, importante na osmorregulação de *T. cruzi* durante seu ciclo de vida, os reservossomos, os quais são a principal organela de estoque de lipídios e proteínas endocitadas; o glicossomo, uma organela que comporta parte da via glicolítica e é importante em sua regulação; e uma única mitocôndria ramificada por toda célula com uma estrutura proeminente denominada cinetoplasto (Figura 2). Além disso, os tripanossomatídeos possuem tripanotiona como substituto da glutatona em reações que envolvem a proteção ao estresse oxidativo. A tripanotiona consiste de duas moléculas de glutatona reduzidas ligadas a uma de espermidina (DOCAMPO et al., 2005; IRIGOÍN et al., 2008; LOPES et al., 2010). Por fim, os mecanismos de expressão gênica e de transporte de proteínas mitocondriais são particulares e serão descritos em seções próprias.

FIGURA 2 – AS PRINCIPAIS ESTRUTURAS CELULARES DA FORMA EPIMASTIGOTA DE *Trypanosoma cruzi*.



FONTE: Adaptado de Lopes et al. (2010).

NOTA: RE = retículo endoplasmático

2.3. VARIABILIDADE GENÉTICA EM *Trypanosoma cruzi*.

As manifestações da doença de Chagas e sua suscetibilidade ao tratamento dependem de diversos fatores, sendo provavelmente um deles a variedade genética do *T. cruzi* (ZINGALES, 2011). A ampla variedade genética de cepas de *T. cruzi* é dividida em subgrupos denominados DTUs. As DTUs são um conjunto de isolados geneticamente semelhantes, identificados por marcadores moleculares ou imunológicos comuns (TIBAYRENC, 1998; ZINGALES et al., 2009). Zingales e colegas (2009) propuseram um novo consenso para as seis DTUs de *T. cruzi*, renomeando os antigos grupos TcI, TcIIa, TcIIb, TcIIc, TcII d e TcII e (BRISSE et al., 2000) para TcI a TcVI, e atualmente esta classificação é a mais citada pelos pesquisadores que estudam *T. cruzi*. As cepas dos grupos I e II estão relacionadas, respectivamente, ao ciclo silvestre e ao ciclo domiciliar da doença de Chagas e são tidas como as únicas geneticamente puras. Os grupos V e VI são formados por cepas híbridas, as quais surgiram por diferentes eventos de trocas genéticas entre as cepas dos grupos II e III, enquanto que os grupos III e IV podem ter sido produto de mosaicismos entre os grupos I e II (BARNABÉ et al., 2016). Um sétimo grupo foi adicionado, nomeado provisoriamente de TcBat (MARCILI et al., 2009), aguardando sua locação em um dos grupos (possivelmente TcI), ou a criação de uma nova DTU (VII).

Recentemente, Barnabé et al. contrariaram esta classificação, tendo como justificativa a ausência de estudos que classifiquem diversas DTUs sobre diversas áreas endêmicas e com tratamento estatístico mais rigoroso. Portanto, eles propuseram novamente a reclassificação das DTUs, desta vez baseada em marcadores genéticos mitocondriais (cicloxigenase II e citocromo b), ao contrário dos marcadores cromossômicos usados até então (BARNABÉ et al., 2016). Como consequência, as cepas de *T. cruzi* foram agrupadas em apenas três clades (mtTcI, mtTcII e mtTcIII). Nelas, as cepas da atual DTU TcI pertencem à mtTcI, as de TcII pertencem à mtTcII e aquelas dos grupos TcIII a TcVI são todas agrupadas à mtTcIII, esta última formando um grupo menos polimórfico que as demais, no qual não é possível diferenciar as características híbridas das cepas pertencentes às DTUs TcIII e TcIV. As clades mtTcI e mtTcII são muito distantes, enquanto que mtTcIII está posicionada no intermédio de ambas. Embora esta classificação usando marcadores mitocondriais seja mais robusta do que aquela usando marcadores cromossômicos, ela

não é adequada para detectar eventos como introgressão mitocondrial, heterozigose e composição alélica, para os quais ainda seriam adequados os marcadores nucleares (BARNABÉ *et al.*, 2016). Portanto, dificilmente a classificação clássica em DTUs será completamente substituída pelas clades mitocondriais.

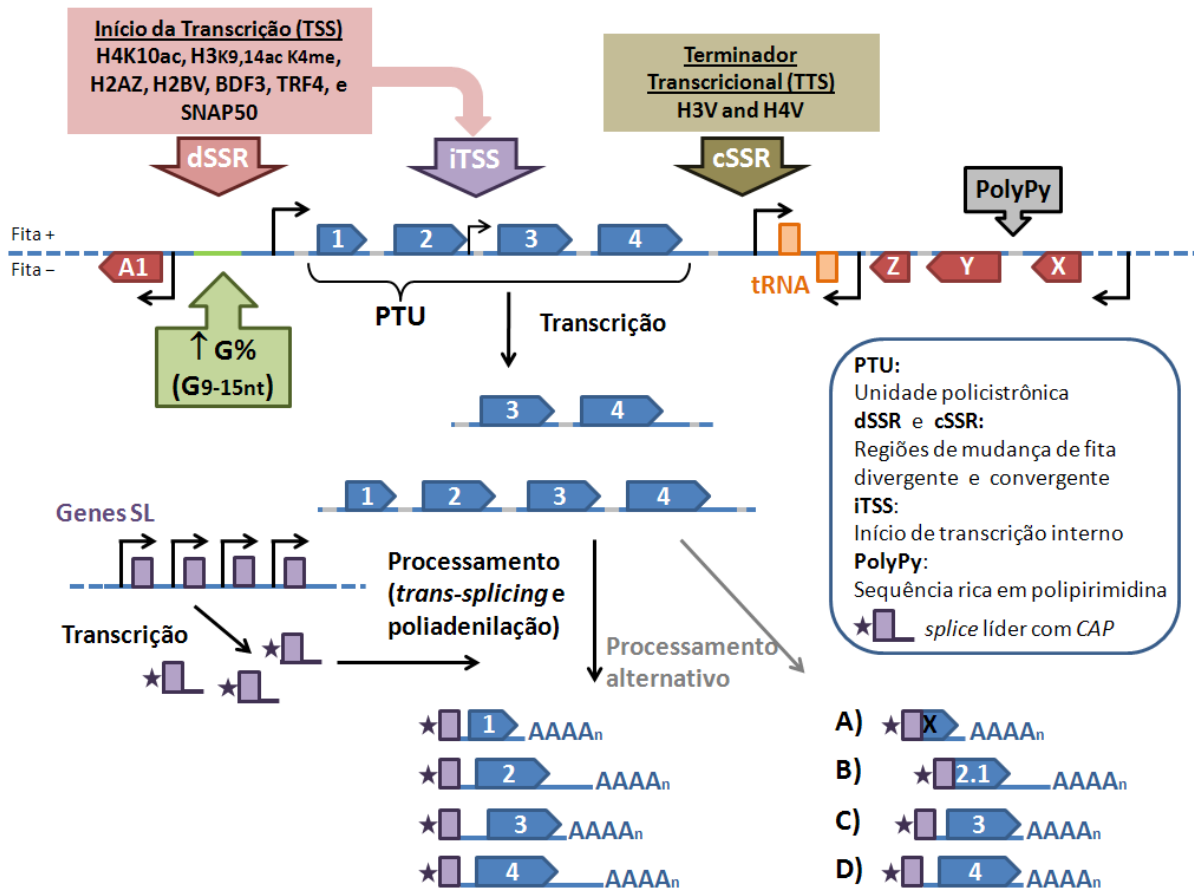
O primeiro genoma de *T. cruzi* sequenciado foi o do clone CL Brener (grupo VI/mtTcIII), publicado em 2005. Embora a montagem não tenha sido completa, devido à natureza híbrida desta cepa e ao caráter repetitivo das sequências no genoma, informações importantes sobre o *T. cruzi* foram descobertas, principalmente aquelas sobre proteínas glicosiladas de superfície. Essas proteínas estão potencialmente envolvidas no escape à resposta imunológica do hospedeiro, constituindo alvos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos contra a doença de Chagas (EL-SAYED *et al.*, 2005). O genoma comparativo do clone Sylvio X10/1 (grupo I/mtTcI), em relação ao genoma de referência de CL Brener foi publicado anos depois, e a maior diferença encontrada entre ambas foi o número de genes de famílias multigênicas que codificam importantes proteínas de superfície (mucinas, MASP, GP63, entre outras) (FRANZÉN *et al.*, 2011). Para CL Brener, essas famílias multigênicas são significativamente maiores (mais de 50% da diferença de tamanho dos genomas, em megabases). Sabe-se que as cepas de ambos os grupos I e VI são infectivas ao homem, embora as do grupo VI sejam menos recorrentes. Logo, ainda não se sabe se essa diferença fenotípica reside na quantidade expressa destas proteínas, muito mais do que sua mera presença no genoma.

2.4. EXPRESSÃO GÊNICA EM *Trypanosoma cruzi*.

O *T. cruzi*, assim como demais tripanossomatídeos, é um organismo eucariótico ancestral que apresenta características peculiares na expressão de seus genes, as quais despertam o interesse no estudo do seu mecanismo. A transcrição ocorre em unidades policistrônicas (PTU); o mRNA é processado principalmente por *trans-splicing* e alguns genes codificadores de proteínas são transcritos pela RNA polimerase I (DONELSON; GARDNER; EL-SAYED, 1999). O único promotor de RNA polimerase II caracterizado até o momento é o que codifica para o *spliced leader* (SL), apesar de outras PTUs apresentarem transcrição por esta polimerase, como mostram ensaios de sensibilidade a α -amanitina. Finalmente, a existência de modificações de histonas e de proteínas modificadoras da cromatina sugerem um importante

mecanismo de regulação epigenética por esses microrganismos (Figura 3) (EKANAYAK; SABATINI, 2011; ELIAS; FARIA, 2009; MARTÍNEZ-CALVILLO et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2012).

FIGURA 3 – EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS.



FONTE: Adaptado de Teixeira et al. (2012).

LEGENDA: Longos conjuntos de genes não relacionados são organizados por unidades policistrônicas (PTU), as quais são separadas por regiões de alteração de fita convergente e divergente. Sítios de início de transcrição (TSS) de RNA Pol II são geralmente encontrados a montante do primeiro gene da PTU ou como uma TSS interna (iTSS). Diversos tipos de histonas e alguns fatores de transcrição estão associados às TSS e com menor frequência nas iTSS. Os RNA policistrônicos são individualizados em mRNAs monocistrônicos após a adição do *Spliced leader* com CAP, através de uma reação de *trans-splicing* acoplada à poliadenilação. Estas reações são guiadas por regiões de polipirimidina que estão presentes em cada região intercodificadora. mRNAs maduros são transportados para o citoplasma, onde a estabilidade e eficiência de tradução são amplamente dependentes de elementos *cis-acting*, presentes nas regiões não traduzidas (UTR). RNAs policistrônicos podem sofrer processamento alternativo que pode resultar em mudanças do códon AUG inicial, alterando então a tradução da proteína (A), ou a marcação/função (B). O processamento alternativo e a poliadenilação também podem resultar em inclusão ou exclusão de elementos regulatórios presentes nas 5' UTRs (C) ou 3' UTRs (D).

O genoma é organizado em extensas unidades de transcrição policistrônica, como primeiramente mostrado para o cromossomo 1 de *L. major* (MYLER et al., 1999) (Figura 3). Todos os genes de uma PTU são transcritos em um longo mRNA imaturo, de forma divergente ou convergente, sendo que cada cromossomo possui no mínimo duas PTUs. Ao contrário do que se observa em *operons* de procariotos e de nematódeos, os genes de uma PTU não estão correlacionados entre si (CAMPBELL; THOMAS; STURM, 2003). Entre as PTUs encontram-se genes codificados pela RNA polimerase III, incluindo os de tRNAs, os quais parecem ser distribuídos de forma específica e em determinados cromossomos (IVENS, 2005; PADILLA-MEJÍA et al., 2009). Diferentemente dos outros eucariotos, a presença de íntrons no genoma é rara, sendo descrita até o momento para dois genes apenas: poli(A) polimerase e para o tRNA de tirosina (MAIR et al., 2000; TAN et al., 2002; PADILLA-MEJÍA et al., 2009).

A transcrição de uma unidade policistrônica gera mRNAs igualmente policistrônicos, ou seja, um único RNA contém todos os transcritos dessa PTU (Figura 3). Esses mRNAs são posteriormente processados aos respectivos mRNAs monocistrônicos, através de reações de *trans-splicing* e de poliadenilação (ULLU; MATTHEW; TSCHUDI, 1993). O *trans-splicing* adiciona uma pequena sequência de RNA (cerca de 40 nt), chamada de *spliced leader* (SL) ou miniexon, à extremidade 5'UTR do RNA policistrônico. Sua inserção é determinada pelos nucleotídeos AG, o sítio acceptor do SL. A poliadenilação adiciona uma sequência de adeninas à extremidade 3' UTR, em uma região rica em pirimidinas. Essa região encontra-se cerca de 18 a 24 pares de base anteriores ao sítio acceptor do SL do gene seguinte, variando entre as espécies (CAMPOS et al., 2008). A poliadenilação é precedida pelo *trans-splicing* e determinada pela posição do sítio acceptor do SL do gene adjacente. Ambas as reações são relacionadas e ocorrem paralelamente à transcrição (LeBOWITZ et al., 1993; ULLU; MATTHEW; TSCHUDI et al., 1993).

Embora vários mRNAs sejam produzidos a partir de um mRNA policistrônico, as taxas de expressão não serão necessariamente uniformes. Estes mRNAs poderão sofrer controle da expressão em níveis pós-transcricionais. Elementos regulatórios presentes na região 3' UTR atuam como sítio de ligação de proteínas, as quais promovem estabilização ou desestabilização do transcrito, dependendo do estágio de vida do parasito (ARAÚJO; TEIXEIRA, 2011; DE GAUDENZI et al., 2003). Por exemplo, o mRNA de amastina, uma glicoproteína de superfície do *T. cruzi*, é 50 vezes mais abundante nas formas amastigotas do que em epimastigotas (TEIXEIRA et al.,

1994). Especula-se que um complexo de proteínas em maior quantidade nas formas amastigotas liga-se a uma sequência regulatória de cerca de 200 pares de base neste mRNA. Esse complexo é responsável pela estabilização do mRNA de amastina nas formas amastigotas (COUGHLIN et al., 2000). Os níveis de RNA mensageiro de mucina, uma glicoproteína de superfície, são regulados em *T. cruzi* de maneira estágio específica através de um elemento regulatório rico em AU, presente na região 3' não traduzida de seu gene. O RNA mensageiro de mucina é por essa razão mais abundante na forma epimastigota deste protozoário (DI NOIA et al., 2000). De maneira análoga, o mRNA da fosfoglicerato quinase B (PGKB) de *T. brucei* também possui um elemento regulatório rico em AU que promove a estabilização deste mRNA na forma procíclica, mas não na forma sanguínea do protozoário (QUIJADA et al., 2002). Por esses fenômenos, e pela ausência de promotores caracterizados de RNA Polimerase II e de seus fatores de regulação, diz-se que a regulação da transcrição nos tripanossomatídeos é principalmente a nível pós transcricional. Por conseguinte, esses microrganismos são capazes de alterar a expressão gênica de forma rápida, em decorrência das mudanças ambientais entre o hospedeiro inseto e o mamífero (TEIXEIRA; DAROCHA, 2003).

2.4.1. Ferramentas para a manipulação da expressão gênica.

A descoberta dos elementos necessários para a transcrição gênica nos tripanossomatídeos surgiu de experimentos de transfecção com vetores contendo fragmentos que continham esses elementos em potencial (ARAÚJO; TEIXEIRA, 2011; BELLOFATTO; CROSS, 1989; LABAN; WIRTH, 1989). No decorrer dos anos, as técnicas foram aprimoradas, fornecendo uma visão profunda da biologia molecular desses protozoários, através da expressão de proteínas para ensaios de localização celular e testes bioquímicos, da construção de protozoários nocautes para o estudo da função gênica e também através da introdução de marcas genéticas para o estudo da regulação da expressão gênica. Nesse contexto, as técnicas de transfecções nestes protozoários são amplamente utilizadas para alcançar tais objetivos (revisado por BURLE-CALDAS et al., 2015; TEIXEIRA; 1998; TEIXEIRA; DAROCHA, 2003;).

As transfecções podem ocorrer de duas maneiras: transiente ou estável. Na primeira, o vetor permanece na forma episomal sua expressão é avaliada em algumas horas após a transfecção, no entanto a taxa de expressão cai após curto

período de tempo, como alguns dias. Nas transfeções estáveis, o vetor pode recombinar-se com o genoma do parasito ou permanecer epissomal, podendo ser mantido estável pela manutenção de pressões seletivas. Neste caso, a expressão do gene exógeno leva mais tempo para ser evidenciada, mas permanece por período mais longo de tempo, até alguns meses após a transfeção (TEIXEIRA, 1998).

As primeiras transfeções em tripanossomatídeos se iniciaram na década de 1980, utilizando-se sequências de *Trypanosoma cruzi*, *Leptomonas*, *Leishmania* e genes repórteres bacterianos (cloranfenicol acetil transferase, ou CAT) (BELLOFATTO; CROSS, 1989; LABAN; WIRTH, 1989; LU; BUCK, 1991). Nesses ensaios, regiões intercodificadoras dos genes de α -tubulina e do minixon flanqueavam o gene repórter de CAT. Esses fragmentos continham as sequências necessárias para a adição do SL e da cauda poli(A), garantindo desta maneira a expressão do gene exógeno. Deleções de parte desses fragmentos e inversão da orientação nos vetores forneceram o conhecimento da orientação e das sequências necessárias para o processamento dos mRNAs (BELLOFATTO; CROSS, 1989; LABAN; WIRTH, 1989). Nesses experimentos, os parasitos transfectados com estes vetores apresentaram certa estabilidade, com a expressão transiente de CAT variando de 20h a 100h após a transfeção.

Kelly et al. (1992) construíram o vetor de expressão estável pTEX para *T. cruzi* e *Leishmania*. Ele contém as sequências intercodificadoras de gGAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase glicossomal) flanqueando o gene repórter (CAT) e o marcador de resistência a neomicina, garantindo dessa maneira a trans-splicing e a poliadenilação correta desses genes. Esse vetor foi posteriormente modificado com a introdução do promotor do *locus* de rRNA no lugar da 3' UTR de gGAPDH do gene repórter, resultando no pRIBOTEX (MARTÍNEZ-CALVILLO; LÓPEZ; HERNÁNDEZ, 1997). Este vetor apresentou atividade de CAT maior e tempo de seleção menor em comparação com o vetor parental, além de permitir a integração no genoma do *T. cruzi*, ao contrário do pTEX. O pRIBOTEX foi em seguida aperfeiçoado através da inserção da região HX1 a jusante do promotor ribossomal, resultando no vetor de expressão estável pTRES-n (VAZQUEZ; LEVIN, 1999). A região HX1 é parte do gene TcP2 β , uma proteína ribossomal de *T. cruzi*, e funciona como potente região para *trans-splicing*. Com essa modificação, o pTRES apresentou atividade de CAT ainda maior que a do pRIBOTEX. Finalmente, DaRocha et al. (2004) inseriram parte do gene de β -tubulina anterior ao promotor ribossomal do pTRES-n,

criando o vetor pROCKNeo. O gene de β -tubulina contém sítio único da endonuclease *NotI*, que após digestão com essa enzima permite a integração do vetor no locus de β -tubulina, facilitando a recombinação homóloga deste vetor no genoma de *T. cruzi*.

Todos esses vetores, assim como os de *T. cruzi*, contêm regiões intercodificadoras flanqueando os genes repórteres e os marcadores de seleção, as quais possuem as sequências necessárias para o *trans-splicing* e a poliadenilação adequados dos mRNAs transcritos. Regiões intercodificadoras de genes constitutivamente expressos são as mais utilizadas, como as de α -/ β -tubulina, GAPDH ou actina. A escolha desses genes reside no fato de que, como são de expressão constitutiva, os níveis de mRNA permanecerão constantes ao longo do ciclo de vida dos protozoários (DAROCHA et al., 2004). A inserção de uma região promotora (como a do rRNA, a mais utilizada), possibilita o aumento da expressão do gene de interesse, no entanto, ela não é totalmente necessária, como observado no vetor pTEX (KELLY et al., 1992),

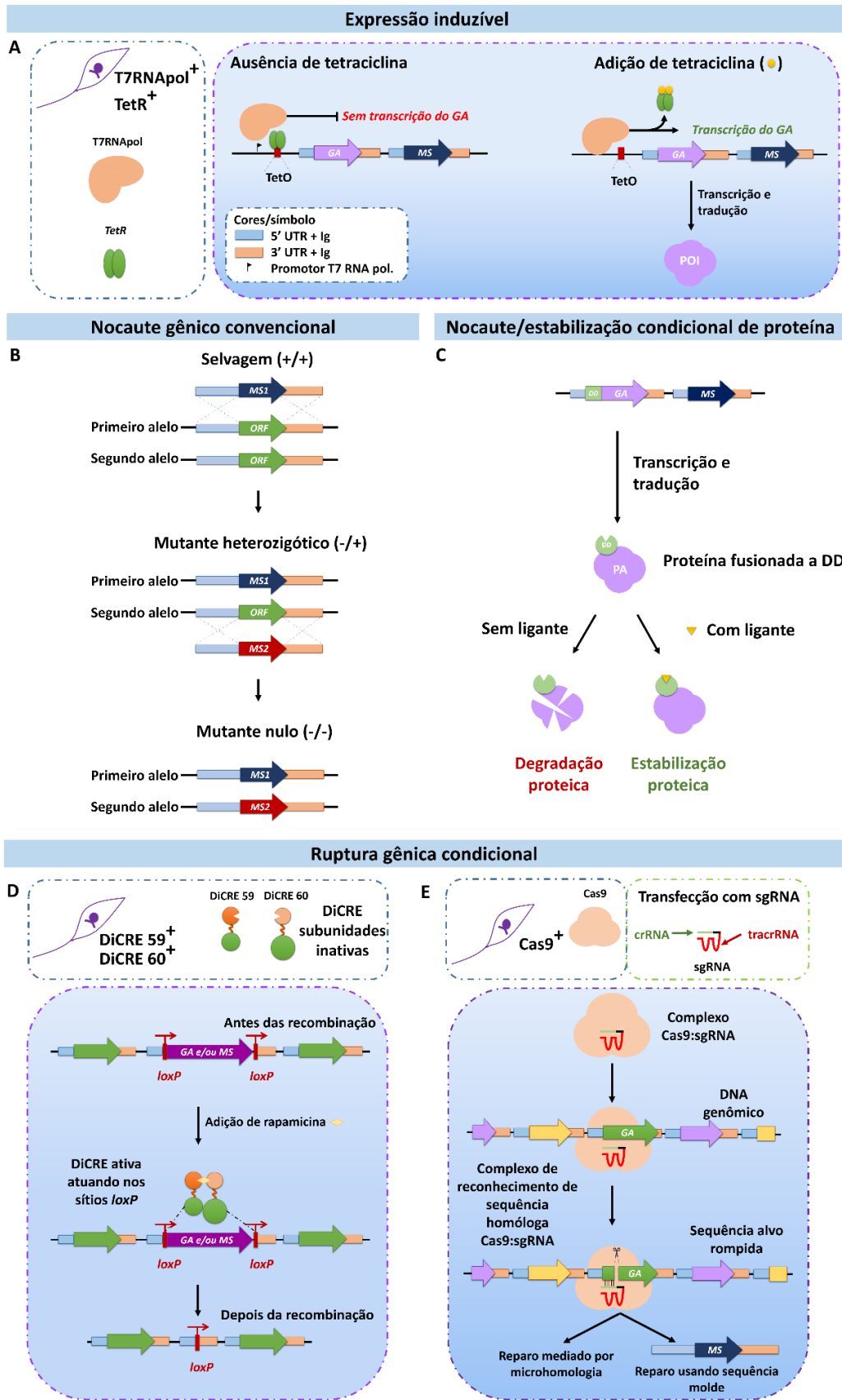
A plataforma Gateway[®], patenteada pela empresa Invitrogen (Estados Unidos), compreende um sistema de clonagem bastante rápido e eficiente. Essa plataforma se baseia na capacidade de recombinação do bacteriófago lambda. A ligação dos fragmentos ocorre em uma reação *in vitro*, mediada por sequências de recombinação sítio específicas (HARTLEY, TEMPLE; BRASCH, 2000). Com base na plataforma Gateway[®], Batista et al. (2010) desenvolveram um vetor para *T. cruzi* flexível o suficiente para a clonagem em grande escala de diversos elementos, como promotores marcadores de seleção ou regiões intercodificadoras. O vetor contém os sítios de recombinação usado por essa plataforma, que garantem a mudança de elementos de maneira rápida e eficiente, além de possuir variantes que adicionam diferentes etiquetas na região N-terminal, tais como proteínas fluorescentes e caudas de poli-histidina. O vetor resultante é útil para ensaios de localização, colocalização e expressão proteica, além de permitir a modificação de seus elementos de forma bastante fácil.

Uma nova geração de vetores tem sido construída, com o objetivo de obter sistemas de expressão regulada de genes que apresentam alta toxicidade quando superexpressos. Sob esta proposta, os sistemas com expressão induzível são um exemplo, como naquele controlado pelo repressor procariótico de tetraciclina, uma proteína sensível a este antibiótico e que atua na resistência de *E. coli* a tetraciclina. No sistema de expressão regulada, uma linhagem celular é construída coexpressando

a T7 RNA polimerase e o repressor de tetraciclina (TetR) (Figura 4A). O promotor de T7 RNA polimerase está sujeito ao controle do operador de tetraciclina (TetO), uma sequência no DNA que permite a ligação do repressor na ausência deste antibiótico. Dessa forma, ocorre a superexpressão do gene de interesse pela T7 RNA polimerase de maneira regulada pelo repressor de tetraciclina, em resposta aos níveis desse antibiótico adicionado ao meio de cultura (GOSSSEN; BUJARD, 1992). Utilizando esta metodologia, Wirtz et al. (1999) desenvolveram uma linhagem de *T. brucei* (29:13) expressando o repressor de tetraciclina e a T7 RNA polimerase. Segundo os autores, os transfectantes foram rapidamente selecionados e o sistema é adequado para a expressão de genes tóxicos. Contudo, apesar das modificações efetuadas, uma baixa expressão do gene de interesse ocorre na presença do repressor (vazamento). Tentativas de superexpressar o repressor de tetraciclina para reduzir este vazamento, mostraram-se tóxicas às células de *T. brucei*. Esse sistema também foi desenvolvido para *T. cruzi* (DAROCHA et al., 2004) a fim de testar a maquinaria de RNAi deste organismo, através da expressão regulada de dsRNA para diversos genes. O sistema de expressão é funcional, porém o dsRNA produzido não é processado por esse protozoário, devido a inexistência de um ou mais componentes da via de RNAi.

A criação dos vetores com sequências regulatórias específicas de tripanossomatídeos permitiu o surgimento de uma variedade de técnicas usadas no estudo de sua função gênica (Revisado por BURLE-CALDAS et al., 2015). Dentre estas estratégias, existe o nocaute gênico através da recombinação homóloga de marcadores de seleção (Figura 4B), os quais substituem os alelos do gene alvo por estes marcadores que permitem a seleção das células nocaute heterozigóticas. Esta é uma estratégia poderosa, pois anula-se a expressão do gene alvo permitindo a análise do fenótipo da ausência deste gene. Apesar de ser amplamente utilizada, esta técnica torna-se inviável no caso de genes multicópias devido ao tempo consumido e à escassez de marcadores de seleção. Além disso, a eficiência da recombinação depende diretamente da quebra do DNA de dupla fita no loco correto do cromossomo, a qual pode ser reduzida devido aos mecanismos de reparo de DNA (GLOVER; HORN, 2009; LI; HEYER, 2008).

FIGURA 4 – FERRAMENTAS DE MANIPULAÇÃO GÊNICA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS.



FONTE: Adaptado de Burle-Caldas et al. (2015).

LEGENDA: (A) Sistema induzível de expressão por T7-TetR. É necessária uma linhagem coexpressando a RNA polimerase do fago T7 e o repressor bacteriano de tetraciclina (TetR). Nela, a expressão do gene alvo (GA) ocorre por meio na T7 RNA polimerase somente na presença de tetraciclina, pois este fármaco retira o repressor ligado ao operador de tetraciclina (TetO). (B) A deleção de um gene de cópia única ocorre pela troca sucessiva de cada alelo deste gene por dois marcadores de seleção (MS1 e MS2) distintos. Além das regiões intergênicas do gene alvo, que permitem a troca gênica, é comum adicionar aos marcadores as 5' e 3' UTRs juntamente com a região intergênica (UTR + Ig) de genes de expressão constitutiva para garantir expressão contínua do marcador de seleção. (C) A expressão de um GA pode ser regulada a nível pós-traducional fusionando-o a um domínio desestabilizador (DD) da proteína ligante de rapamicina ou da dihidrofolato redutase. Na presença do respectivo ligante, ele se liga ao DD, estabilizando a proteína alvo (PA). Este sistema pode funcionar como nocaute condicional através da fusão do DD ao GA por recombinação homóloga. (D) Deleção condicional de um GA pelo sistema de recombinação com DiCRE recombinase. Em uma linhagem celular expressando as formas dimerizáveis de DiCRE (dois polipeptídeos de CRE fusionados a sequências de ligação a rapamicina), a cópia endógena do GA deve ser modificada para conter os sítios de recombinação de *loxP*. Depois da adição de rapamicina, as subunidades se unem e permitem a atividade de recombinase de CRE. Esta deleção específica possibilita a remoção de MS flanqueados por sítios *loxP*. (E) Edição do genoma usando o sistema CRISPR-Cas9. A edição é obtida pela transfecção estável ou transiente da endonucleases Cas9 (proteína 9 associada a CRISPR) e do RNA guia simples fita (sgRNA) fusionado a tracrRNA (RNA *trans* ativador de CRISPR). O sgRNA atua como guia para Cas9 identificar o GA e induzir quebras em sua dupla fita (DSB). Em *T. cruzi*, estas quebras podem ser reparadas por microhomologia ou pela integração de um cassete contendo o MS para destruir o GA.

O nocaute condicional a nível proteico também já foi estudado em *T. cruzi*. Nesta técnica, Ma, Weiss e Huang (2012; 2015) construíram vetores pTREX contendo um domínio desestabilizador no gene repórter GFP, o qual poderia ser oriundo da dihidrofolato redutase (DDD) ou da proteína ligante de rapamicina (ddFKBP). O primeiro confere estabilidade à proteína fusionada na presença do ligante trimetoprim-lactato (TMP-lactato), enquanto que para o último a estabilidade é conferida pelo ligante sintético Shield-1. Na presença de seus respectivos ligantes, a proteína com o domínio desestabilizador tem sua meia vida aumentada, enquanto que na ausência dos ligantes, esta mesma proteína é rapidamente degradada, reproduzindo o fenótipo de nocaute condicional de proteínas (Figura 4C). Utilizando-se da expressão da α -toxina de *T. gondii* em epimastigotas de *T. cruzi*, fusionada tanto a DDD quanto a ddFKBP (MA; WEISS; HUANG, 2015), o estudo demonstrou que o domínio DDD foi mais eficaz na estabilização e desestabilização desta toxina, pois sua toxicidade era observada somente na presença de TMP-lactato. Para ddFKBP, em contrapartida, observou-se o efeito tóxico de α -toxina mesmo na ausência de Shield-1, sugerindo que ddFKBP não promove a completa degradação da proteína alvo. Com esta estratégia, foi possível a criação de um parasito atenuado com potencial uso em vacinas, pois quando as células transgênicas foram inoculadas em camundongos, estes animais não apresentaram parasitemia ou parasitismo tecidual durante a

administração do respectivo ligante, sugerindo a instauração de forte proteção imune contra os parasitos transgênicos.

Outra estratégia que permite a manipulação gênica é a da recombinase CRE do bacteriófago P1, a qual remove genes que estejam flanqueados pelos sítios de recombinação *loxP* (DALE; OW, 1991) (Figura 4D). Esta técnica mostrou-se eficaz em *T. brucei* e *T. gondii* com eficiências de 50 e 90%, respectivamente (ANDENMATTEN et al., 2013; SCAHILL et al., 2008). Contudo, nestes estudos não havia a possibilidade de rastrear-se as alterações com base no antes e depois da recombinação. Para tal, a técnica de coexpressão das formas dimerizáveis inativas foi desenvolvida para contornar este problema (JULLIEN et al., 2003). Neste cenário, a adição de um ligante (rapamicina) promove a junção de ambas as subunidades, tornando a recombinase CRE ativa de maneira induzível. Este sistema já foi testado em *T. cruzi*, com eficiência entre 45-75% de remoção do marcador de seleção, com a vantagem de não ser necessária a modificação prévia da população alvo (KANGUSSU-MARCOLINO et al., 2014).

Para o caso de genes multicópia em que sua deleção por recombinação homóloga não se aplica, novas estratégias tendem a surgir. Uma delas é o uso do sistema CRISPR-Cas9, o qual é um sofisticado mecanismo de defesa empregado por bactérias contra infecções virais (Figura 4E). Neste sistema, um RNA não codificador guia (sgRNA) liga-se a regiões complementares do DNA e direciona a nuclease Cas9 a promover a quebra da fita dupla de DNA. Neste momento, o sistema de reparo pode substituir o gene alvo por um molde adequado constituído do marcador de seleção (RAN et al., 2013). Este sistema tem sido empregado em diferentes organismos, e recentemente foi adaptado para *T. cruzi* (LANDER et al.; 2015; PENG et al., 2015). Com a expressão de Cas9 de maneira estável e a transfecção de sgRNA ou sua coexpressão estável, foi possível observar a redução da expressão do gene marcador GFP (50 a 60% dos parasitos), bem como outros genes endógenos (α -tubulina, β -galactofuranosil glicosiltransferase e as proteínas que codificam para a formação do bastão paraflagelar-PFR1 e 2). Embora a expressão estável de Cas9 mostrou-se tóxica no estudo de Peng et al. (2015), no estudo de Lander e colegas (2015), por outro lado, essa toxicidade não foi observada, provavelmente devido à cepa de *T. cruzi* usada, as quais podem apresentar distintos níveis de expressão ou diferentes suscetibilidades em relação à ação de Cas9. Em resumo, o uso de CRISPR-Cas9 para a edição do genoma de *T. cruzi* representa um grande avanço no estudo da

função gênica deste organismo, e que pode preencher a ausência de RNAi neste protozoário.

2.5. A PROTEÍNA TUZINA.

Durante o *screening* diferencial de uma biblioteca de DNA complementar (cDNA) obtida da forma amastigota de *T. cruzi*, Teixeira et al. identificaram uma nova família de proteínas de superfície, denominadas amastinas (TEIXEIRA et al. 1994). No genoma de *T. cruzi*, bem como no de *Leishmania major*, uma das classes de proteínas amastinas está organizada em um bloco com várias cópias deste gene, alternando com outro gene multicópia denominado tuzina (ROCHETTE et al., 2005; TEIXEIRA et al., 1995). Esse gene codifica para uma proteína de cerca de 450 aminoácidos, com um possível domínio transmembrana, além de um domínio de *P-loop* nucleotídeo hidrolase, sugerindo uma potencial atividade de GTP/ATPase. A proteína recombinante expressa em *Escherichia coli* é capaz de reagir com soro de pacientes chagásicos, demonstrando que tuzina é uma proteína imunogênica (TEIXEIRA; KIRCHHOFF; DONELSON, 1995; TEIXEIRA; KIRCHHOFF; DONELSON, 1999). Em um estudo recente, o gene de tuzina de *L. major* cepa Friedlin mostrou-se como melhor candidato para vacina de DNA contra leishmaniose visceral, identificado através de ensaio *high-throughput* envolvendo cerca de 8.000 genes (LAKSHMI; WANG; MADHUBALA, 2014).

O genoma do clone CL Brener de *T. cruzi* possui quatro genes de tuzina, cujos produtos possuem 447 aminoácidos, o mesmo tamanho descrito para a tuzina da cepa Tulahuén de *T. cruzi* (TEIXEIRA, KIRCHHOFF; DONELSON, 1995). Alguns pseudogenes de tamanhos variados também estão anotados no genoma. Suas localizações, tanto dos genes como dos pseudogenes, são nos cromossomos 26 e 34, sendo que neste último as tuzinas estão em alternância com genes de amastina (ASLETT et al., 2009; *TriTrypDB: The Kinetoplastid Genomics Resource*, 2016). Apesar de amastina e tuzina fazerem parte da mesma unidade policistrônica no pré-mRNA, os níveis do mRNA de tuzina e de amastina não são os mesmos. O transcrito de amastina é 68 vezes mais abundante na forma amastigota comparado com a forma epimastigota, enquanto que o de tuzina é apenas 3,5 vezes maior. Portanto, ambas as proteínas sofrem regulação pós-transcricional por mecanismos distintos (COUGHLIN et al., 2000; TEIXEIRA; KIRCHHOFF; DONELSON, 1995). No caso da

tuzina, o processo de adição do *spliced leader*, em conjunto com uma ORF de 22 códonos que antecede a metionina inicial da tuzina, é o potencial responsável pelos baixos níveis do transcrito de tuzina, seja por processamento incorreto do mRNA ou por pequeno início de tradução (TEIXEIRA; KIRCHHOFF; DONELSON, 1999).

As proteínas tuzinas são bastante conservadas entre *T. cruzi* e *T. brucei* (identidade > 80%). Em e *Leishmania* spp., no entanto, a identidade é no máximo de 50%. No genoma destes organismos, os genes que flanqueiam aqueles de tuzina/amastina codificam algumas proteínas hipotéticas, além de alguns genes de função variada, como a cadeia pesada de miosina e algumas proteínas quinases e fosfotransferases (*TriTrypDB: The Kinetoplastid Genomics Resource*, 2016). As amastinas aparecem em diferentes posições genômicas e em quatro subclasses distintas: α -; β -; γ -; e δ -amastinas (JACKSON, 2010). Os genes de tuzina estão associados somente às δ -amastinas nestes organismos, exceto em *T. brucei*, no qual a tuzina não está associada a nenhum gene de amastina (*TriTrypDB: The Kinetoplastid Genomics Resource*, 2016). Embora a associação entre tuzina e amastina tenha persistido durante a diversificação das δ -amastinas (JACKSON, 2010), não há dados experimentais suficientes que demonstrem correlação funcional entre estas duas proteínas. Além disso, os genes de tuzina em *T. brucei* não estão associados às amastinas em seu genoma, sugerindo que a função de tuzina independe da de δ -amastina, ou que ambas as proteínas atuem em conjunto apenas na forma amastigota de *T. cruzi*, uma vez que *T. brucei* não possui amastigotas em seu ciclo biológico.

São escassos os estudos a respeito de tuzina e de sua função. No entanto, é possível inferir que esta proteína possa ter alguma função mitocondrial, uma vez que peptídeos atribuídos a ela foram identificados no fosfoproteoma de *Trypanosoma brucei* (URBANIÁK et al., 2013) e no proteoma de mitocôndria deste protozoário (PANIGRAHI et al., 2009). No entanto, são necessários estudos de interação e localização com proteínas mitocondriais para confirmar sua funcionalidade junto a essa organela.

2.6. A MITOCÔNDRIA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS.

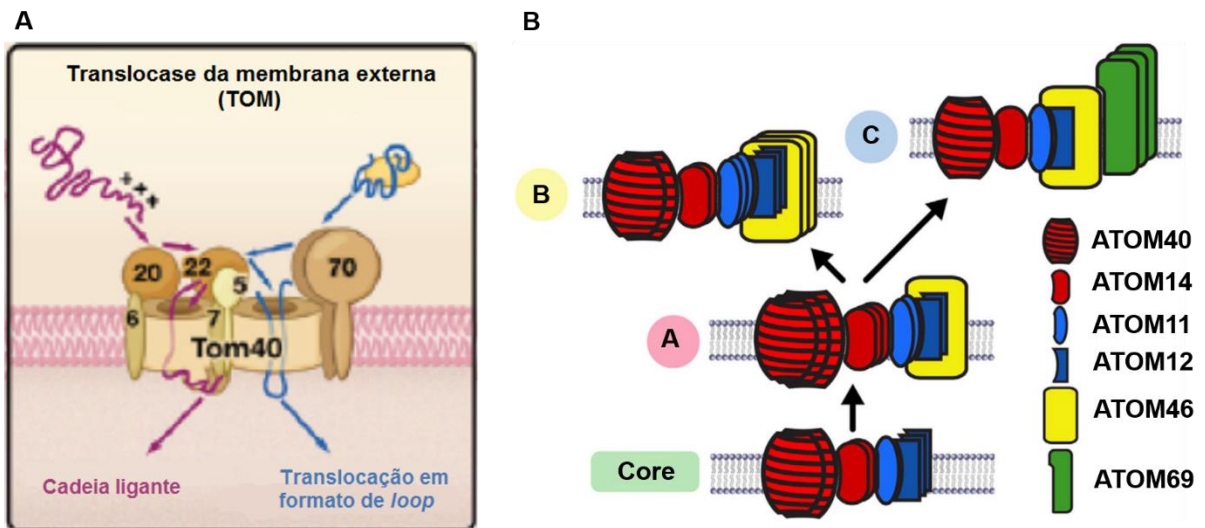
Nas células eucarióticas, a mitocôndria é a organela responsável por vários processos metabólicos, tais quais a produção energética via fosforilação oxidativa, a síntese de metabólitos chave e também atua como reserva de fatores que amplificam a apoptose, além da produção de espécies reativas de oxigênio (GONÇALVES et al., 2011; SOUZA, 2009). Em eucariotos multicelulares, o número de mitocôndrias em uma célula pode variar, mas em geral é consideravelmente grande. No caso dos tripanossomas, esta organela é certamente peculiar. Existe apenas uma mitocôndria por célula, a qual se ramifica pelo corpo do protozoário, formando uma dilatação na região que contém o DNA mitocondrial – o cinetoplasto (Figura 2) (DOCAMPO; SOUZA; MIRANDA, 2005). Seu volume apresenta alterações ao longo do ciclo de vida do protozoário como resposta à disponibilidade de nutrientes no hospedeiro. As formas epimastigotas apresentam a mitocôndria mais dilatada devido à baixa disponibilidade de glucose no inseto, enquanto que nas tripomastigotas sanguíneas esta organela apresenta-se menos volumosa, uma vez que a alta presença de glucose no hospedeiro vertebrado desloca o metabolismo para a via glicolítica (BILLINGSLEY, 1988; SILBER et al., 2009). Sendo de origem endossimbiótica, a mitocôndria desenvolveu um sistema de transporte de macromoléculas que permitiu sua adaptação à célula hospedeira e total conversão em uma organela – o sistema ATOM, descrito a seguir.

2.6.1. Sistema arcaico de translocação da membrana externa (ATOM).

A maioria das proteínas mitocondriais são sintetizadas no citosol e transportadas para esta organela por um sistema de transporte que está presente em todos os eucariotos. Uma vez que o genoma do endossimbionte ancestral integrou-se quase que totalmente ao núcleo da célula hospedeira, as proteínas mitocondriais codificadas pelo núcleo precisam de um sinal de endereçamento reconhecido pelo sistema de transporte mitocondrial, para serem internalizadas por esta organela e exercer sua função (LITHGOW; SCHNEIDER, 2010; MOKRANJAC; NEUPERT, 2009; SCHMIDT; PFANNER; MEISINGER, 2010). Estas proteínas são reconhecidas por quatro complexos de translocases: (i) translocase da membrana externa (complexo TOM), (ii) translocase de membrana interna (complexo TIM), (iii) maquinaria de

endereçamento e montagem (SAM) e (iv) motor associado à translocase de pré-sequências (PAM). Enquanto as duas primeiras efetuam o transporte de proteínas pela membrana externa e interna da mitocôndria, respectivamente, SAM direciona as proteínas com estrutura de barril- β para a membrana externa, enquanto que PAM direciona demais pré-proteínas para a matriz mitocondrial (HILDENBEUTEL et al., 2008; PERRY et al., 2008). De maneira resumida, estas translocases, juntamente com chaperonas citosólicas, reconhecem as sequências de endereçamento de proteínas e as auxiliam no seu desenovelamento, translocação, inserção na membrana e renovelamento para exercer suas funções na mitocôndria (MOKRANJAC; NEUPERT, 2009; PERRY et al., 2008).

FIGURA 5 – O COMPLEXO DE TRANSLOCASE EXTERNA DE ANIMAIS, FUNGOS E DE *Trypanosoma brucei*.



FONTE: Adaptado de Chacinska et al. (2009) e Mani et al. (2015).

LEGENDA: (A) Arquitetura da translocase da membrana externa em animais e fungos. O complexo é formado por sete proteínas: Tom20; Tom22 e Tom70 são receptores que reconhecem as proteínas precursoras e as transferem para a proteína formadora de poro, Tom40. Tom5, Tom6 e Tom7 estão envolvidas na montagem e dinâmica do complexo TOM. Em roxo, estão as precursoras reconhecidas por sinal na região N-terminal, enquanto que em azul, estão as precursoras reconhecidas por regiões hidrofóbicas internas. (B) Arquitetura da translocase de membrana externa em *T. brucei*, e o proposto mecanismo de montagem de suas subunidades. ATOM40 é a primeira subunidade a se inserir na membrana e atua como poro do sistema, enquanto que ATOM46 e ATOM69 são os receptores das proteínas precursoras. ATOM11, 12 e 14 estabilizam a formação do complexo. ATOM69 é a última a se unir no complexo.

Todas as proteínas importadas para a mitocôndria precisam passar pelo complexo TOM, uma vez que é ele que está situado na membrana externa, em contato direto com o citoplasma. Em animais e fungos, sua estrutura é semelhante e TOM é

formado em seu *core* pelas proteínas integrais de membrana Tom40, Tom22, Tom5, Tom6 e Tom7. Também associadas, mas de maneira mais frouxa, estão as proteínas com único domínio transmembrana Tom70 e Tom22 (Figura 5). Tom40 é o poro em formato de barril- β e Tom20 funciona como organizadora do complexo e também como receptor. As subunidades menores Tom5 a 7 funcionam como reguladoras da montagem do complexo. Tom70 e Tom22 atuam no reconhecimento das proteínas a serem importadas (CHACINSKA et al., 2009; PERRY et al., 2008).

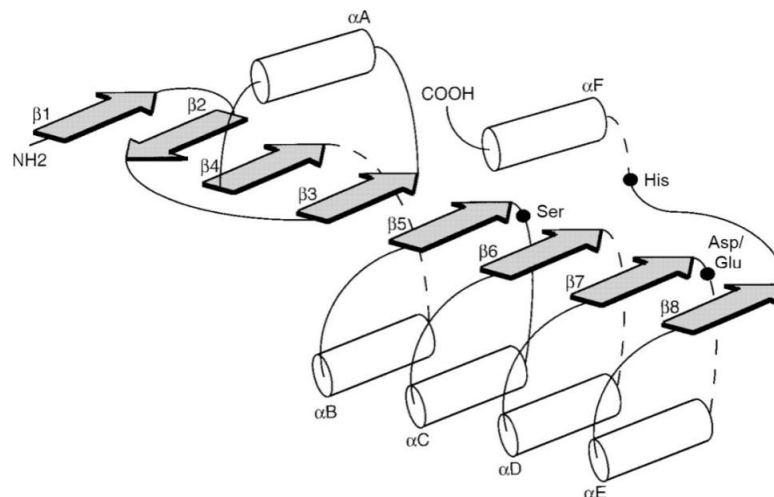
Em *T. brucei*, este complexo foi recentemente caracterizado e denominado ATOM (translocase arcaica de membrana externa), pois seu *core* assemelha-se mais com o sistema de translocase das membranas bacterianas do que com aquele aqui comentado para animais e fungos. A proteína em formato de barril- β , a ATOM40 (40 kDa), está mais próxima evolutivamente da superfamília Omp85 bacteriana do que de Tom40. As demais proteínas caracterizadas apresentam semelhanças na arquitetura do complexo e função, embora não sejam idênticas às análogas de mamíferos. O *core* é formado por ATOM40 associado a uma proteína menor, ATOM14 (14 kDa), que teria função similar à de Tom22 em estabilizar o poro e de regular a translocação das pré-proteínas. Outras proteínas menores estão associadas ao *core*: ATOM12 e 11 como estabilizadores da montagem, em função semelhante a Tom5 e 6. ATOM11 parece dar suporte à associação do *core* com as subunidades receptoras ATOM46 e ATOM69, em ação semelhante a Tom 6. ATOM46 e 69 parecem ser responsáveis pelo reconhecimento das sequências endereçadoras, assim como Tom70 e Tom20. A divergência deste complexo em relação ao dos demais eucariotos mostra que o sistema de translocação em *T. brucei* parece ter sido herdado do organismo ancestral de todos os eucariotos. Além do mais, pode ser um novo alvo para o desenvolvimento de fármacos antiparasitários (MANI et al., 2015; PUSNIK et al., 2011).

2.7. LIPASES COMO FATOR DE VIRULÊNCIA EM *Trypanosoma cruzi*

A família das lipases (EC 3.1.1.3) compreende diversas enzimas responsáveis pelo metabolismo lipídico, tendo como substratos ácidos graxos de cadeias com comprimentos variáveis, fosfolípidios e ésteres de colesterol (revisado por WONG; SCHOTZ, 2002). Estas enzimas, por sua vez, estão agrupadas na família das α/β hidrolases (EC 3), cujos membros são responsáveis pela hidrólise de ligações tipo éster. A estrutura conservada desta família é um motivo de folhas- β e α -hélices

intercaladas (Figura 6), no qual se encontra a tríade catalítica (His-Ser-Asp/Glu) e a sequência de pentapeptídeo Gly-X-Ser-X-Gly, sendo X qualquer aminoácido (revisado por JAEGER, DIJKSTRA; REETZ, 1994). Neste pentapeptídeo, também denominado domínio de lipase (BELAUNZARÁN et al., 2013), encontra-se o aminoácido serina, o nucleófilo da tríade catalítica. Toda a estrutura tridimensional do domínio de lipase se assemelha a um braço dobrado, sendo então denominado *nucleophilic elbow*, ou “cotovelo nucleofílico”, no qual a posição do “cotovelo” é ocupada pelo nucleófilo serina. Por fim, algumas lipases também apresentam uma estrutura hidrofóbica chamada *lid* ou “tampa”, que recobre o sítio catalítico e “abre-se” por ativação interfacial no momento da catálise, permitindo que o substrato acesse o sítio ativo (revisado por JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO DO MOTIVO CONSERVADO DA FAMÍLIA DE α/β HIDROLASE.



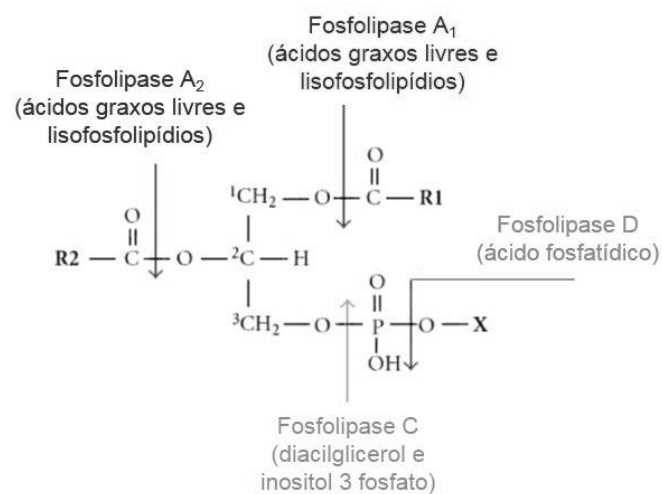
FONTE: JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999.

LEGENDA: As folhas β (1-8) estão indicadas pelas setas e as α -hélices (A-F) estão indicadas pelos cilindros. As posições dos aminoácidos da tríade catalítica (Ser-His-Asp/Glu) estão indicadas pelas esferas pretas.

A maioria dos estudos publicados sobre lipases em tripanossomatídeos se referem às fosfolipases, principalmente da classe A_1 (EC 3.1.1.32), as quais promovem a hidrólise de uma das cadeias de acil dos fosfolipídios, na posição *sn-1* (Figura 7). Já foi descrito que a atividade hemolítica de espécies patogênicas (*T. brucei* e *T. congolense*, por exemplo) é devido à ação de uma fosfolipase A_1 cálcio dependente (HAMBREY; MELLORS; TIZARD, 1981). Ademais, a expressão desta enzima é maior na forma sanguínea (presente no hospedeiro mamífero) em relação à

forma procíclica (presente no inseto), sugerindo papel na adaptação ao hospedeiro mamífero (OPPERDOES; VAN ROY, 1982). Ao longo dos anos, as fosfolipases de *T. brucei* foram extensivamente estudadas (HAMBREY; MELLORS; TIZARD, 1981; HAMBREY, TIZARD; MELLORS, 1980; RICHMOND; SMITH, 2007; TIZARD et al. 1977; TIZARD et al.; 1978), demonstrando que existe correlação de sua expressão com a patogenicidade deste organismo. Alguns estudos mostram que os níveis de fosfolipases de *T. brucei* são 1000 vezes superior ao de outros organismos patogênicos, como *Escherichia coli*, ao passo que em *T. lewisi*, um tripanossoma não patogênico de ratos, os níveis de fosfolipases permanecem baixos (SAGE et al., 1981). A fosfolipase A₁ de *T. brucei*, assim como do patógeno *T. congolense*, tem sua atividade aumentada durante o processo autolítico, provocando o acúmulo de ácidos graxos livres e de lisofosfolocolina, a qual é posteriormente degradada em mais ácidos graxos livres e em glicerolfosfolocolina. O excesso de ácidos graxos livres exerce efeito citotóxico, devido às suas propriedades detergentes, podendo contribuir para a imunossupressão e para distúrbios de órgãos linfoides, observados nas tripanossomíases africanas (COLLEY et al., 1973; TIZARD et al.; 1978). Em contrapartida, estes efeitos não foram observados em *T. lewisi*, possivelmente devido à baixa atividade de fosfolipase A1 mesmo em condições prolongadas de autólise (TIZARD et al.; 1978).

FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO DA HIDRÓLISE DE FOSFOLIPÍDIOS POR DIFERENTES LIPASES.



FONTE: Adaptado de Belaunzarán et al., 2013.

LEGENDA: Os possíveis produtos das fosfolipases A1, A2, C e D são mostrados, assim como as posições onde ocorre o ataque nucleofílico, *sn-1*, *sn-2*, antes do grupo fosfato e após, respectivamente.

Em *T. cruzi*, a correlação entre atividade de fosfolipases e patogenicidade também já foi descrita. Durante a infecção por este tripanossomatídeo, já foi observada a inflamação tecidual ao redor de ninhos de amastigotas em degeneração, sugerindo a possibilidade da secreção de enzimas parasitárias com atividade lipolítica. Os subprodutos da degradação de fosfolipídios poderiam ser um dos responsáveis por este processo inflamatório (SNIJDER; DIJKSTRA, 2000), uma vez que ácidos graxos livres e lisofosfolipídios, produtos de degradação de fosfolipases, exercem efeito tóxico à cultura de células, quando liberados de tripomastigotas mortas (BOS et al., 2005). Adicionalmente, foi demonstrado que a fosfolipase A1 de *T. cruzi* modifica o perfil lipídico de células Vero infectadas com tripomastigotas metacíclicos, liberando lipídios mensageiros que ativam a proteína quinase C da célula de mamífero. Assim, a fosfolipase A₁ de *T. cruzi* pode exercer papel crítico nos eventos que antecedem a invasão ao hospedeiro mamífero (BELAUNZARÁN et al., 2007). Por fim, este mesmo grupo de pesquisa demonstrou recentemente que existem diferenças de expressão e de atividade desta enzima em duas cepas de *T. cruzi*: RA (letal em mamíferos) e K98 (não-letal). Na cepa letal RA, a fosfolipase A₁ é mais expressa nas formas infectivas do hospedeiro mamífero (tripomastigota e amastigota) nos picos de parasitemia em camundongos, enquanto que na cepa não letal esta enzima é expressa, porém sua atividade é diminuída, provavelmente devido à ação de anticorpos anti-fosfolipase em diferentes níveis plasmáticos, os quais poderiam modular a atividade desta enzima. Esta observação foi confirmada através do bloqueio da invasão em células Vero na presença destes anticorpos. Estes dados colocam a fosfolipase A1 de *T. cruzi* como um fator de virulência deste organismo (BELAUNZARÁN et al., 2013).

3. JUSTIFICATIVA

A proteína tuzina é uma proteína rara que está presente apenas em tripanossomatídeos, em múltiplas cópias que se intercalam com as do gene de δ -amastina. Assim como amastina, tuzina duplicou-se no genoma ao longo da evolução nestes organismos, sugerindo papel em sua biologia, ainda a ser determinado. Um dos trabalhos mais recentes de tuzina sugere seu uso promissor como vacina de DNA contra leishmaniose visceral (LAKSHMI et al., 2014). Aliado ao fato de que esta proteína é imunogênica e não existe homóloga em humanos, seu estudo pode fornecer maior conhecimento sobre a biologia intrigante deste organismo. Por essa razão, um dos objetivos deste trabalho é a caracterização da proteína tuzina neste organismo.

Quanto às lipases, a análise ainda em andamento do transcriptoma das formas epimastigota, tripomastigota e amastigota da cepa G de *T. cruzi* (Wanderson Da Rocha, dados não publicados), mostrou a alteração do padrão de expressão de duas lipases (TcPLA₁ e TcLip2). Os transcritos destes genes eram mais abundantes nas formas replicativas epimastigota e amastigota para TcPLA₁, enquanto que para TcLip2 os transcritos tinham seus níveis mais elevados ao longo do ciclo de vida, sendo maior na forma amastigota. Sabe-se que existe tropismo de *T. cruzi* por células hospedeiras com metabolismo lipídico pronunciado (CARADONNA et al., 2013), e que fosfolipases podem estar associadas à interação célula-célula favorecendo a invasão celular (revisado por BELAUNZARÁN et al., 2011). Na cepa G de *T. cruzi*, já foi descrito a diferença de virulência desta cepa no seu ciclo de vida, sendo que as amastigotas são mais infectivas que as formas tripomastigotas (CRUZ et al., 2012; YOSHIDA, 2006), o que acompanha o padrão de expressão de TcPLA₁ e de Lip2. O aumento da expressão destas duas lipases na forma amastigota sugere que essas proteínas possam ser moléculas atuantes neste processo, justificando seu estudo na virulência desta cepa de *T. cruzi*.

A determinação da função destas três proteínas pode fornecer maiores evidências sobre a biologia celular e molecular de *T. cruzi*, o protozoário causador de uma doença infecciosa negligenciada e de grande impacto econômico mundial.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar funcional e estruturalmente a proteína tuzina e duas lipases de *Trypanosoma cruzi*.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a análise *in silico* dos genes de tuzina, TcPLA₁ e TcLip2 de tripanossomatídeos, quanto a sua estrutura e conservação;
- Avaliar o perfil de expressão de tuzina selvagem com anticorpo anti-tuzina, e tuzina ectópica com anticorpo anti-etiquetas;
- Estabelecer a possível função de tuzina através de dados de localização subcelular e da identificação de proteínas interatoras de tuzina.
- Avaliar o perfil de expressão de TcPLA₁ e de TcLip2 selvagem e das proteínas fusionadas às etiquetas, durante o ciclo de vida da cepa G.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. ANÁLISES *IN SILICO*.

5.1.1. Conservação e análise estrutural.

As sequências para os genes de tuzina foram adquiridas do banco de dados TriTrypDB (*TriTrypDB: The Kinetoplastid Genomics Resource*, 2016). Para as lipases TcPLA₁ e TcLip2, os genes foram obtidos do transcriptoma parcial da cepa G de *T. cruzi* (Wanderson da Rocha, dados não publicados). A identificação de domínios conservados para tuzina, TcLip2 e TcPLA₁ foi realizada por BLASTp (<<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>); pelo banco de dados de domínio conservados (CDD) e por SMART (<<http://smart.embl-heidelberg.de/>>) (LETUNIC; DOERKS; BORK, 2012; MARCHLER-BAUER et al., 2015). A identidade entre as sequências foi obtida através do alinhamento entre elas usando *Clustal Omega* (<<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>>0). Para a identificação de peptídeo sinal nas sequências de proteína, o sítio SignalP 4.1 Server foi usado (<<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>>) (PETERSEN et al., 2011).

O gráfico de conservação dos aminoácidos foi realizado pelo sítio WebLogo (<<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>>), a partir de sequências de aminoácidos alinhadas em *Clustal Omega*. Foram excluídas as sequências de pseudogenes e os organismos usados foram *C. fasciculata* cepa Cf-CI, *L. major* cepa Friedlin, *L. tarentolae* Parrot-Tarll, *T. brucei* (cepas Lister 427 e TREU927), *T. brucei gambiense* cepa DAL972, *T. cruzi* (clones CL Brener, Dm28c e Sylvio X 10/1), *T. cruzi marinkellei* cepa B7, *T. congolense* IL3000, *T. evansi* cepa STIB 805, *T. grayi* ANR4 e *T. rangeli* SC58.

Para a modelagem molecular destas proteínas, o sítio Phyre2 (Protein Homology/analogY Recognition Engine) (KELLEY; STERNBERG, 2009) produziu o molde tridimensional de TcLip1 TcLip2, o qual foi analisado pelo software PyMol® v1.7.4.5 (*Educational Product*, Schrodinger, LLC)

5.1.2. Construção do mapa de polipirimidinas.

A sequência genômica correspondente a um dos blocos de tuzina/amastina (cromossomo 34, alelo Esmeraldo) foi selecionada desde o início do gene correspondente a uma proteína hipotética conservada (TcCLB.507485.110), até o códon de parada do gene de Tuzina-51 (TcCLB.507485.120). Os nucleotídeos púricos (A e G) da sequência foram substituídos pelo número zero, enquanto que os pirimídicos (T e C), foram substituídos por 1. A sequência resultante foi separada em quadros (*frames*) de 10 nucleotídeos, e o somatório dos valores (0 ou 1) atribuído a estes nucleotídeos foi usado para a formação do gráfico de conteúdo de polipirimidinas.

5.1.3. Construção das árvores filogenéticas.

Todas as sequências para os genes de tuzina, δ -amastina e proteína hipotética foram adquiridas do banco de dados TriTrypDB. Os organismos que originaram as sequências foram *C. fasciculata* cepa Cf-CI, *L. major* cepa Friedlin, *L. tarentolae* Parrot-Tarll, *T. brucei* (cepas Lister 427 e TREU927), *T. brucei gambiense* cepa DAL972, *T. cruzi* (clones CL Brener, Dm28c, Sylvio X 10/1), *T. cruzi marinkellei* cepa B7, *T. congolense* IL3000, *T. evansi* cepa STIB 805, *T. grayi* ANR4 e *T. rangeli* SC58.

Foram excluídos os genes anotados como pseudogenes, ou que possuíam códons de parada ao longo da sequência. Para genes cujas cópias com mais de 95% de identidade, apenas um representante foi utilizado na montagem da árvore, para fins didáticos. As sequências foram organizadas em arquivos tipo fasta, e a árvore para cada gene foi montada utilizando o software SeaView 4.5.4 (GOUY; GUINDON; GASCUEL, 2010), com alinhamento por MUSCLE e filogenia por máxima parcimônia (PhyML) com matriz de substituição Blosum62 e com 1000 réplicas não paramétricas de *bootstrap*.

5.2. MICRORGANISMOS E PLASMÍDEOS.

Os microrganismos e plasmídeos utilizados estão nomeados no Quadro 1 e 2.

QUADRO 1 – MICRORGANISMOS E SUAS CARACTERÍSTICAS.

MICRORGANISMO	GENÓTIPO	RESISTÊNCIA	UTILIDADE	REFERÊNCIA
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻)</i> λ(DE3 [<i>lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i>]) [<i>malB</i> ⁺] _{K-12} (λ ^S).	—	Expressão de proteínas recombinantes.	STUDIER; MOFFATT, 1986.
<i>E. coli</i> Survivor™ 2 T1 ^R	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 ara</i> Δ139 Δ(<i>ara-leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG tonA::P_{ycr}-ccdA</i> .	Estreptomicina.	Propagação de vetores da plataforma Gateway® que carregam o cassete com o gene tóxico <i>ccdB</i> .	Invitrogen.
<i>E. coli</i> TOP 10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 nupG recA1 ara</i> Δ139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galE15 galK16 rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> λ ⁻ .	Estreptomicina.	Propagação de vetores diversos que não possuem o gene <i>ccdB</i> , produtos de ligação e de recombinação.	Invitrogen.
<i>T. cruzi</i> cepa G, formas epimastigota tripomastigota metacíclica, tripomastigota derivada de cultura de tecido e amastigota axênica	Forma selvagem.	Não documentada.	—	YOSHIDA, 2006.
<i>T. cruzi</i> cepa Y, forma epimastigota.	Forma selvagem.	Não documentada.	—	ATCC 50832.
<i>T. cruzi</i> clone Sylvio X 10/1, forma epimastigota	Forma selvagem.	Não documentada.	—	ATCC 507209.

Os plasmídeos e vetores usados estão listados no quadro 2. O vetor pGEX-Tuzina foi gentilmente cedido pela Profa. Dra. Maria Santuza Teixeira, do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). O vetor pTREN-Ama40::GFP foi gentilmente cedido pela Dra. Monica M. Kangussu-Marcolino.

QUADRO 2 – PLASMÍDEOS E SUAS CARACTERÍSTICAS.

continua

PLASMÍDEOS	CARACTERÍSTICA	RESISTÊNCIA	REFERÊNCIA
pDEST®17	Vetor de expressão procariótico, compatível com sistema Gateway®. Cassete <i>ccdB</i> com resistência a cloranfenicol, sítios de recombinação <i>attR1</i> e <i>attR2</i> , promotor T7, cauda de 6 histidinas N-terminal.	Ampicilina.	Invitrogen.
pDONR®/Zeo	Vetor intermediário de clonagem do sistema Gateway®. Cassete <i>ccdB</i> com resistência a cloranfenicol, sítios de recombinação <i>attP1</i> e <i>attP2</i> .	Zeocina.	Invitrogen.
pDONR®221	Vetor intermediário de clonagem do sistema Gateway®. Cassete <i>ccdB</i> com resistência a cloranfenicol, sítios de recombinação <i>attP1</i> e <i>attP2</i> .	Canamicina.	Invitrogen.
pENTRY-ATOM40	Vetor intermediário para recombinação. Contém gene de ATOM40 flanqueado pelos sítios de recombinação <i>attL1</i> e <i>attL2</i> .	Canamicina.	A autora (2016).
pENTRY-ATOM69	Vetor intermediário para recombinação. Contém gene de ATOM40 flanqueado pelos sítios de recombinação <i>attL1</i> e <i>attL2</i> .	Canamicina.	A autora (2016).
pENTRY-IC-Tuzina	Vetor intermediário para recombinação. Contém gene de ATOM40 flanqueado pelos sítios de recombinação <i>attL1</i> e <i>attL2</i> .	Zeocina.	Wanderson da Rocha, dados não publicados.
pENTRY-p601.30	Vetor intermediário para recombinação. Contém gene de ATOM40 flanqueado pelos sítios de recombinação <i>attL1</i> e <i>attL2</i> .	Canamicina.	A autora (2016).
pENTRY-Tuzina-51	Vetor intermediário para recombinação. Contém gene de ATOM40 flanqueado pelos sítios de recombinação <i>attL1</i> e <i>attL2</i> .	Canamicina.	A autora (2016).
pGEM – ATOM40	Gene de ATOM40 clonado no vetor pGEM-T Easy.	Ampicilina.	A autora (2016).
pGEM –T Easy	Vetor comercial linearizado, com timinas livres para aumentar a capacidade de clonagem de produtos de PCR.	Ampicilina.	Promega.
pGEM-Tuzina-51	Gene de tuzina que codifica proteína de 51 kDa clonada no vetor pGEM-T Easy.	Ampicilina.	A autora (2016).
pGEX-Tuzina	Gene de tuzina que codifica proteína de 51 kDa clonada no vetor de expressão em bactérias pGEX-4T1. Adiciona GST N-terminal.	Ampicilina.	TEIXEIRA et al., 1999.

QUADRO 2 – PLASMÍDEOS E SUAS CARACTERÍSTICAS.

continuação

PLASMÍDEOS	CARACTERÍSTICA	RESISTÊNCIA	REFERÊNCIA
pTcDEST-GFPn	Vetor pTREX-GFPn compatível com a plataforma Gateway®. Cassete <i>ccdB</i> com resistência a cloranfenicol, sítios de recombinação <i>attR1</i> e <i>attR2</i> .	Ampicilina, Neomicina.	Wanderson DaRocha, dados não publicados.
pTcDEST-IC-Tuz::GFP	Vetor de expressão eucariótico, compatível com o sistema Gateway®. Sítios de recombinação <i>attB1</i> e <i>attB2</i> . Carrega o gene de tuzina com sua região 5' UTR nativa, fusionados à GFP.	Ampicilina, Neomicina.	A autora (2016).
pTcHig-3xHA	Vetor de expressão eucariótico, compatível com o sistema Gateway®. Cassete de <i>ccdB</i> e resistência a cloranfenicol. Sítios de recombinação <i>attR1</i> e <i>attR2</i> . Possui promotor de rRNA 18S, regiões regulatórias 5' UTR de ubiquitina e regulatórias 3' UTR de ATP sintase subunidade F ₁ e de uma proteína hipotética. Etiqueta de 3xHA C-terminal.	Ampicilina, Higromicina.	Monica Alcântara, manuscrito em preparação.
pTcHig-ATOM40::3xHA	Gene de ATOM40 de <i>T. cruzi</i> recombinado no vetor pTcHig-3xHA. Sítios de recombinação <i>attB1</i> e <i>attB2</i> .	Ampicilina, Higromicina.	A autora (2016).
pTcHig-ATOM69::3xHA	Gene de ATOM69 de <i>T. cruzi</i> recombinado no vetor pTcHig-3xHA. Sítios de recombinação <i>attB1</i> e <i>attB2</i> .	Ampicilina, Higromicina.	A autora (2016)
pTcHig-p601.30::3xHA	Gene de ATOM40 de <i>T. cruzi</i> recombinado no vetor pTcHig-3xHA. Sítios de recombinação <i>attB1</i> e <i>attB2</i> .	Ampicilina, Higromicina.	A autora (2016)
pTcNeo-3xFLAG	Vetor de expressão eucariótico, compatível com o sistema Gateway®. Mesma arquitetura do vetor pTcHig-3xHA. Etiqueta de 3xFLAG C-terminal.	Ampicilina, Neomicina.	Monica Alcântara, manuscrito em preparação.
pTcNeo-Tuzina-51::3xFLAG	Gene de tuzina, cujo produto possui 51 kDa, recombinado no vetor pTcNeo-3xFLAG.	Ampicilina, Neomicina.	A autora (2016).
pTREX-GFPn	Vetor pTREX-GFPn com a resistência a neomicina modificada para a de higromicina.	Ampicilina, Higromicina.	Wanderson DaRocha, dados não publicados.
pTREX-GFPn	Vetor de expressão em <i>T. cruzi</i> , modificado de pRIBOTEX, com adição de região 5'UTR do gene TcP2β de <i>T. cruzi</i> . Gene repórter de GFP C-terminal.	Ampicilina, Neomicina.	MARTÍNEZ-CALVILLO et al. (1997); VAZQUEZ; LEVIN (1999).
pTREXh-Ama40::GFP	Vetor modificado de pTREXn-Ama40::GFP, com a substituição do gene de resistência a neomicina pelo de resistência a higromicina.	Ampicilina, Higromicina.	A autora (2016).
pTREXh-ATOM40::GFP	Vetor modificado de pTREXh-Ama40::GFP, com a substituição do gene de amastina 40 pelo de ATOM, em fusão à GFP.	Ampicilina, Higromicina.	A autora (2016).

QUADRO 2 – PLASMÍDEOS E SUAS CARACTERÍSTICAS.

conclusão

PLASMÍDEO	CARACTERÍSTICA	RESISTÊNCIA	REFERÊNCIA
pTREXn-Ama40::GFP	Vetor modificado de pTREX-GFPn, como gene de amastina 40 clonado em fusão a GFP.	Ampicilina, Neomicina.	KANGUSSU-MARCOLINO et al., 2013.
pTREX-TcLip2::GFP	Vetor pTREX-GFPn com o gene de TcGLip2 fusionado a GFP C-terminal.	Ampicilina, Neomicina.	A autora (2016).
pTREX-PLA ₁ ::GFP	Vetor pTREX-GFPn com o gene de TcGLip2 fusionado a GFP C-terminal.	Ampicilina, Neomicina.	A autora (2016).
pTREX-Tuzina-51::GFP	Vetor pTREX com tuzina de 51 kDa fusionada à GFP.	Ampicilina, Neomicina.	A autora (2016).
pTREX-Tuzina-75::GFP	Vetor pTREX com tuzina de 75 kDa fusionada à GFP.	Ampicilina, Neomicina.	A autora (2016).

5.3. ANTIBIÓTICOS.

Os antibióticos foram preparados seguindo instruções de Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989) ou recomendações dos fabricantes. Suas concentrações estoque e final estão descritas no Quadro 3.

QUADRO 3 – ANTIBIÓTICOS E SUAS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS.

ANTIBIÓTICO	CONCENTRAÇÃO ESTOQUE (mg/mL)	CONCENTRAÇÃO FINAL (µg/mL)	MICROORGANISMO OU LINHAGEM CELULAR
Ampicilina	250	100	<i>Escherichia coli</i> .
Canamicina	25	25	<i>Escherichia coli</i> .
Estreptomicina	10	100	<i>Trypanosoma cruzi</i> , células LLC-MK2.
G418 (análogo à neomicina)	50	100 a 500	<i>Trypanosoma cruzi</i> .
Higromicina	50	100 a 2000	<i>Trypanosoma cruzi</i> .
Penicilina	10.000 UI/mL	100 UI	<i>Trypanosoma cruzi</i> ; células LLC-MK2.
Zeocina	50	50	<i>Escherichia coli</i> .

5.4. MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Para o cultivo de *E. coli* foram usados os meios LB (triptona 1%; extrato de levedura 0,5% e NaCl 1%) e LB ágar (meio LB suplementado com 15 g/L de ágar). O meio LB também foi usado para o preparo de células de *E. coli* competentes e na sua recuperação após a transformação. As bactérias foram cultivadas em estufa a 37 °C (±1 °C) por no mínimo 12 horas, ou por período menor de tempo, seguindo protocolo

específico. Para as células cultivadas com o antibiótico zeocina, o meio usado foi o LB de baixo sal (triptona 1%; extrato de levedura 0,5% e NaCl 0,5%, pH 7,5 e suplementado com 15 g/L de ágar quando necessário). Os meios usados para *E. coli* foram esterilizados por autoclavagem. Para a expressão e purificação de tuzina recombinante, o meio utilizado foi o 2xYT (triptona 1,6%; extrato de levedura 1% e NaCl 1%, pH 7,0).

Para o cultivo de epimastigotas de *T. cruzi*, o meio usado foi o meio LIT completo (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 e 10% de SFB inativado) acrescido de penicilina/estreptomicina (Quadro 3) Antes da adição dos antibióticos, o meio foi esterilizado por filtração a vácuo (aparato Millipore) em membrana de 0,22 µm. Os parasitos foram cultivados em estufa a 28 °C (±1 °C) até atingirem 10⁷ epimastigotas/mL e mantidos através de diluições de 100 vezes em novo meio de cultura.

Para a diferenciação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas em meio axênico, os meios de cultivo usados foram TAU (NaCl 190 mM; KCl 17 mM; MgCl₂ 2 mM; CaCl₂ 2 mM, tampão fosfato pH 6,0 e NaHCO₃ 0,6 mM) e TAU 3AAG (meio TAU suplementado com glicose 10 mM; L-prolina 10 mM; glutamato de sódio 50 mM e aspartato de sódio 2 mM). Ambos foram esterilizados da mesma maneira do meio LIT, adicionando-se também penicilina e estreptomicina após a filtração. Para a diferenciação das formas tripomastigotas de cultura de tecido em amastigotas axênicas, o meio usado foi o LIT ácido feito da mesma maneira que o LIT comum, no entanto o pH foi acidificado com HCl 5 M até o pH de 5,8 (CRUZ et al., 2012).

Para a linhagem de células de mamífero LLC-MK2 (células epiteliais de rim de *Macaca mulata* Rhesus, ATCC CCL-7) ela foi cultivada em meio RPMI 1640 (Gibco, com a adição de NaHCO₃ 0,2%; HEPES 0,48%; pH 7,4 ajustado com NaOH). O meio foi esterilizado como descrito para o meio LIT e também suplementado com penicilina e estreptomicina e 5% de soro fetal bovino (RPMI completo). O cultivo foi realizado com atmosfera úmida e 5% de CO₂ a 37 °C. As passagens foram feitas após as células atingirem confluência mínima de 80%. O meio de cultura foi retirado e as células foram removidas com tripsina previamente aquecida a 37 °C. A cultura foi incubada por 5 min a 37 °C e o desprendimento celular foi observado por microscopia de luz em microscópio invertido. Adicionou-se 3 volumes de meio RPMI completo à tripsina para parar a reação e o sobrenadante. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 200 x

g por 5 min e as células foram ressuspensas em meio RPMI completo para serem então inoculadas às garrafas de 75 cm² de superfície.

5.5. REAGENTES.

A composição dos reagentes e tampões utilizados está no quadro a seguir:

QUADRO 4 - COMPOSIÇÃO DOS REAGENTES E TAMPÕES.

continua

REAGENTE	COMPOSIÇÃO
Azul de Coomassie (coloração de proteína)	Azul de Coomassie R-250 0,3% (p/v); metanol 45%; ácido acético glacial 10%.
Clorofórmio:álcool isoamílico (24:1)	24 partes de clorofórmio e 1 parte de álcool isoamílico.
Fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1).	25 partes de fenol saturado; 24 partes de clorofórmio e 1 parte de álcool isoamílico.
PBS 1x	NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na ₂ HPO ₄ 4,3 mM e KH ₂ PO ₄ 1,5 mM; pH = 7,4.
Ponceau S	Ponceau S 0,1% (p/v); ácido acético 5%.
PBSG	Fosfatos 10 mM pH 8,0; NaCl 150 mM; glucose 1,0%.
PSG	NaCl 65 mM; Na ₂ HPO ₄ 75 mM pH 8,0; glucose 1,5%.
Solução de bloqueio para imunofluorescência	PBS 1x; BSA 4%.
Solução de bloqueio para MET	BSA 1,5%, Tween 20 0,01% em PBS.
Solução de bloqueio para <i>Western Blot</i>	PBS 1x; Tween 100 a 0,05% e leite em pó desnatado 5%.
Solução de coloração com nitrato de prata	Nitrato de prata 0,25% (p/v); formaldeído 0,015% (v/v); água ultrapura.
Solução de Denhardt 5x	Ficoll 40 0,5% (p/v); polivinilpirrolidona 0,5% (p/v); BSA 0,5% (p/v).
Solução de depuração para PFGE	HCl 125 mM.
Solução de desnaturação para PFGE	NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M.
Tampão de extração para EM	TFA 3%; acetonitrila 30%.
Solução de finalização para coloração por nitrato de prata	EDTA 50 mM, água ultrapura.
Solução de lavagem para <i>Western blot</i>	PBS 1x; Tween 20 0,05%.
Solução de lavagem para hibridação com sonda radioativa	SSC 2x; SDS 0,1%.
Solução de lise para IP 10x	NP-40 10% (v/v), sacarose 2 M em tampão TKM.
Solução de lise para PFGE	Sarkosyl 1%; EDTA 500 mM pH 8,0, proteinase K 1 mg/mL.
Solução de neutralização para PFGE	Tris-HCl 0,5 M; NaCl 0,5 M.
Solução de pré-hibridação	SSC 5 X; solução de Denhardt 5 X, SDS 1% (p/v); DNA de esperma de salmão desnaturado por calor 100 µg/mL.
Solução fixadora para MET	Glutaraldeído 0,1%; paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,2 M pH 7,2.

QUADRO 4 - COMPOSIÇÃO DOS REAGENTES E TAMPÕES.

conclusão

REAGENTE	COMPOSIÇÃO
Solução fixadora para coloração por nitrato de prata	Ácido acético 10% (v/v); etanol 40% (v/v), água ultrapura
SSC 10x	NaCl 1,5 M e citrato de sódio 0,15 M pH 7,0
Tampão de alquilação para EM	Iodoacetamida 55 mM; bicarbonato de amônio 50 mM.
Tampão de amostra para DNA 1x	Ficoll 400 2,5%; azul de bromofenol 0,025% e xileno cianol FF 0,025%.
Tampão de amostra para proteína 1x	Tris-HCl 10 mM pH 6,8; SDS 0,25%; β-mercaptoetanol 0,62%; glicerol 10% e azul de bromofenol 0,005%.
Tampão de eletroforese para gel desnaturante	Tris-HCl 25 mM; glicina 192 mM e SDS 0,1%.
Tampão de eletroporação	120 mM KCl; 0,15 mM CaCl ₂ ; 10 mM K ₂ HPO ₄ ; 25 mM Hepes; 2 mM EDTA pH 8,0; e 5 mM MgCl ₂ .
Tampão de eluição com glutatona	TrisHCl 50 mM pH 8,0; glutatona reduzida 10 mM.
Tampão de eluição para Co-IP	Glicina 100 mM pH 3,5.
Tampão de descoloração para azul de Coomassie para EM	Bicarbonato de amônio 25 mM; etanol 50% (v/v).
Tampão de digestão para EM	Tripsina 12,5 ng/μL, bicarbonato de amônio 50 mM.
Tampão de fracionamento	HEPES 20 mM; KCl 10 mM; MgCl ₂ 1,5 mM; sacarose 250 mM; DTT 1 mM e PMSF 0,1 mM.
Tampão de lavagem de Co-IP	NP-40 0,1% em tampão TKM.
Tampão de lise para purificação	PBS 1 x; EDTA 1 mM pH 8,0; PMSF 1 mM.
Tampão de lise/digestão para extração de DNA	NaCl 100 mM; Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 25 mM pH 8,0; SDS 0,5%; proteinase K 100 μg/mL.
Tampão de redução para EM	DTT 10 mM; bicarbonato de amônio 50 mM.
Tampão MOPS/EDTA 1x	MOPS 20 mM; acetato de sódio 2 mM e EDTA 1 mM; pH 7,0.
Tampão de transferência para <i>Western blot</i>	Tris-HCl 25 mM; glicina 192 mM e metanol 20%.
Tampão TKM	Tris-HCl pH 8,0 20 mM; KCl 50 mM; MgCl ₂ 10 mM.
TBE 1X	Tris-HCl 89 mM; ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM.
TE	Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM.
Tripsina	Tripsina 0,5% (p/v); EDTA 1 mM; PBS 1x.

5.6. CLONAGEM DAS SEQUÊNCIAS DE DNA PARA CONSTRUÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO.

5.6.1. Extração do DNA genômico de *Trypanosoma cruzi*.

O DNA genômico de *T. cruzi* foi extraído de 5×10^7 células em fase exponencial de crescimento, utilizando tampão de lise/digestão, a noite toda a 37 °C. O lisado foi submetido a uma extração de igual volume com fenol:clorofórmio:álcool

isoamílico (25:24:1), homogeneizando por 10 min, e outra de igual volume com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A fase aquosa foi separada por centrifugação a 14.000 rpm (*Eppendorf Centrifuge 5415C*) por 5 min, removida e tratada com 1 volume de isopropanol. O DNA foi sedimentado por centrifugação a 14.000 rpm (*Eppendorf Centrifuge 5415c*) por 20 min em TA. O sedimento foi lavado com 1 mL de etanol 70% (v/v), a 37 °C e solubilizado em 100 µL de TE contendo 20 µg/mL RNase A. A integridade do DNA obtido foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1% e o DNA quantificado por espectrofotometria em aparelho NanoDrop® (Thermoscientific).

5.6.2. Amplificação do DNA por PCR.

Os iniciadores para amplificação dos fragmentos usados para a construção dos vetores de expressão em *T. cruzi* foram desenhados usando os sítios *Primer BLAST* do NCBI (<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>>) e *IDT Oligo Design and Analysis Tools* (<<http://www.idtdna.com/SciTools/>>), a partir de sequências do genoma de *T. cruzi* clone CL Brener, disponível no banco de dados TriTrypDB (*TriTrypDB: The Kinetoplastid Genomics Resource*, 2016). Para iniciadores destinados à clonagem por Gateway®, a adição dos sítios de recombinação, *attB1* e *attB2*, foi feita de acordo com instruções do fabricante (Invitrogen). Aproximadamente 100 ng de DNA genômico purificado ou 10 ng de plasmídeo purificado foram amplificados em reação contendo dNTP 0,2 mM; MgCl₂ 1,5 mM; tampão de *Taq* DNA polimerase 1x (Invitrogen); 0,5 µM dos pares de iniciadores (Quadro 5) e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) em reação final de 100 µL. As condições da reação foram: desnaturação a 92 °C por 2 min. (1 ciclo); desnaturação a 92 °C por 45 seg; anelamento a 57 °C por 45 seg. e extensão a 72 °C com o tempo de 1 min para kb de DNA a ser amplificado (34 ciclos) e por fim 1 ciclo de 10 min. a 72 °C. Os produtos de PCR foram purificados com o kit *Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) e mantidos a - 20 °C.

QUADRO 5 - LISTA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES.

INICIADOR	SEQUÊNCIA (5'→3')	MODIFICAÇÃO
ATOM40 <i>attB1</i> For	<u>AAAGCAGCCTCCACCAT</u> GTTGATGGAATGGCTTCGAG	Parte do sítio <i>attB1</i>
ATOM40 <i>attB2</i> Rev	<u>GAAAGCTGGGTGGATYCACGCGGTGAAGACAAGTCCATGC</u>	Parte do sítio <i>attB2</i>
ATOM40 For <i>BglII</i>	TTTT <u>AGATCTGCGCGGTGAAGACAAGTCCATG</u>	Sítio para <i>BglII</i>
ATOM40 Rev <i>XbaI</i>	AAAAT <u>TCTAGA</u> ATGTTGATGGAATGGCTTCGAG	Sítio para <i>XbaI</i>
ATOM69 <i>attB1</i> For	<u>AAAGCAGCCTCCACCAT</u> GA CT AGTGA CT GCAGCGTTG	Parte do sítio <i>attB1</i>
ATOM69 <i>attB2</i> Rev	<u>GAAAGCTGGGTGGATY</u> CAGAACTGCATGGGTGGTGGATGGA	Parte do sítio <i>attB2</i>
G1	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTCCACCATG</u>	Sítio <i>attB1</i>
G2	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGGATCCA</u>	Sítio <i>attB2</i>
ICTuzina <i>attB1</i> For	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTCCGC</u> CGTGACACACCTCTGCTGTAG	Sítio <i>attB1</i>
ICTuzina <i>attB2</i> Rev	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCCTG</u> CCAACAGCAAGCCGCTGTGTG	Sítio <i>attB2</i>
TcCLB.507601.30 <i>attB1</i> For	<u>AAAGCAGCCTCCACCAT</u> GATGCTTGATAGCGGTGCTG	Parte do sítio <i>attB1</i>
TcCLB.507601.30 <i>attB2</i> Rev	<u>GAAAGCTGGGTGGATYCACGCTGTGGAGGTGATGTAC</u>	Parte do sítio <i>attB2</i>
TcLip2 <i>BamHI</i> Rev	ATGGATG <u>CCTAGGGCCAACAGCAAGCCGCT</u>	Sítio para <i>BamHI</i>
TcLip2 <i>XbaI</i> Rev	GCAT <u>TCTAGA</u> ATGCCGCCAACAAAAGGAGGGAAG	Sítio para <i>XbaI</i>
TcPLA ₁ <i>BamHI</i> For	ATGGATG <u>CCTAGGGCCAACAGCAAGCCGCT</u>	Sítio para <i>BamHI</i>
TcPLA ₁ <i>XbaI</i> Rev	TGCG <u>TCTAGAGATGATCACTCTGTCTGAAG</u>	Sítio para <i>XbaI</i>
Tuzina For <i>BglII</i>	TGCG <u>TCTAGAGATGATCACTCTGTCTGAAG</u>	Sítio para <i>BglII</i>
Tuzina Rev <i>XbaI</i>	ATGGATG <u>AGATCTGCCAACAGCAAGCCGCT</u>	Sítio para <i>XbaI</i>
Tuzina-51 <i>attB1</i> For	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCATG</u> ATCACTCTGTCTGAAGCCGT	Sítio <i>attB1</i>
Tuzina-51 <i>attB2</i> Rev	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCCTG</u> CCAACAGCAAGCCGCTGTGTG	Sítio <i>attB2</i>

NOTA: O destaque na terceira coluna se refere aos sítios para digestão por endonucleases ou ao sítio de recombinação adicionados aos oligonucleotídeos iniciadores. Y = qualquer uma das bases pirimídicas C ou T.

Para os vetores destinados à expressão dos genes de validação da Co-IP (ATOM40, ATOM69 e da proteína não caracterizada TcCLB.507601.30, abreviada como p601.30), as reações de amplificação foram realizadas em duas etapas. A primeira continha todos os elementos descritos acima neste tópico, com os iniciadores específicos para estes genes e com parte do sítio de recombinação de *attB* (Quadro 5), em volume final de 50 µL. As condições de reação foram semelhantes às descritas nesta seção, exceto que o número de ciclos foi de 15. Após esta primeira etapa, o volume de cada reação foi aumentado para 100 µL, ajustando as concentrações

destes reagentes para este volume, exceto DNA molde e os iniciadores da primeira reação, os quais não foram readicionados. Contudo, um novo par de iniciadores foi inserido, G1 e G2, na concentração final de 0,5 μM . A segunda etapa da reação, que visava concluir a síntese dos sítios de recombinação nos amplicons, ocorreu nas mesmas condições da primeira etapa, a exceção da temperatura de anelamento que foi aumentada para 59 °C, e o número de ciclos, que subiu para 20, totalizando 35 ciclos de amplificação. A reação foi purificada por excisão do gel de agarose com o kit *Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare). A quantidade de DNA purificado foi estimada por espectrofotometria em aparelho NanoDrop® (Thermoscientific).

5.6.3. Digestão dos amplicons e dos vetores para clonagem clássica.

Os produtos de PCR purificados foram submetidos à digestão por endonucleases utilizando as enzimas mostradas no Quadro 5. A reação foi realizada com todo o produto de PCR purificado, 1 unidade de enzima, BSA 1X (NEB) e o tampão recomendado pelo fabricante da enzima (Invitrogen, Promega, NEB ou Fermentas), a 37 °C por no mínimo 4 horas. As enzimas foram inativadas a 72 °C por 20 min. e o DNA foi purificado com o kit *Illustra® GFX® PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare). As digestões foram feitas em sequência, purificando a reação de um sistema enzimático para só então realizar a próxima reação.

Para os genes de tuzina e de ATOM40, os produtos de PCR foram purificados e ligados ao vetor comercial pGEM-T Easy de acordo com as recomendações do fabricante (Promega), em reação final de 15 μL . O produto de cada reação foi transformado em células de *E. coli* TOP10 para propagação plasmidial e seleção dos clones pelo *screening* de colônias azuis e brancas, em meio LB ágar suplementado com 40 $\mu\text{g/mL}$ de X-Gal e 0,5 mM de IPTG. Depois de confirmada a identidade dos clones, estes vetores foram digeridos com as respectivas enzimas para a obter-se os genes de tuzina e de ATOM40. Depois de purificados, estes genes foram então clonados no vetor de expressão em *T. cruzi*.

Vinte microgramas de cada vetor foram digeridos com as enzimas apropriadas (Quadro 5), de acordo com as especificações dos fabricantes. As digestões foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose 1% e o DNA foi purificado por excisão do gel de agarose 1%. A purificação foi feita com o kit *Illustra™ GFX™ PCR DNA and*

Gel Band Purification Kit (GE Healthcare). As moléculas de DNA plasmidial foram submetidas a etapas sequenciais de digestão e purificação. O vetor foi digerido com uma das enzimas por vez, e purificado por excisão do gel de agarose após cada digestão.

5.6.4. Reações de recombinação para a clonagem pelo sistema Gateway®.

Os produtos de PCR purificados contendo os sítios de recombinação *attB1* e *attB2* foram recombinados aos vetores intermediários pDONR® 221 ou pDONR®/Zeo, como especificado adiante, nas seguintes condições: 50 fmol do amplicon purificado, 150 fmol do vetor pDONR®, 1 µL do mix de recombinases BP Clonase®, solução tampão TE pH 8,0 em quantidade suficiente para 10 µL de reação. Esta foi incubada a 25 °C por 16 horas. A reação foi inativada a 37 °C com 2 µg de Proteinase K (Invitrogen) por 10 min. Metade desta reação foi transformada em células de *E. coli* TOP10 e, após seleção, o DNA plasmidial dos transformantes foi extraído e purificado, obtendo assim o produto da reação de BP clonase, o vetor intermediário pENTRY. Este foi submetido à última reação de recombinação: 150 ng de pENTRY, 150 ng do vetor de expressão pTcDEST, 1 µL do mix de recombinases LR Clonase®, solução tampão TE pH 8,0 em quantidade suficiente para 10 µL de reação. Esta novamente foi incubada a 25 °C por 16 horas, inativada com Proteinase K e transformada em *E. coli* TOP10 para a obtenção dos vetores de expressão para os genes de interesse. Tanto os vetores pENTRY e pDEST recombinados com seus respectivos genes (Quadro 2) foram tiveram sua identidade confirmada por digestão com endonucleases e por sequenciamento de DNA.

5.6.5. Construção dos vetores de expressão em *T. cruzi*.

O vetor pTREX-Tuzina-51::GFP foi construído digerindo-se pTREX-Ama40::GFP com as enzimas *Bam*HI e *Xba*I, resultando em pTREX apenas com GFP. Em seguida, o gene de Tuzina-51 foi amplificado por PCR a partir do vetor pGEX-Tuzina com oligonucleotídeos iniciadores contendo sítios para as enzimas *Xba*I e *Bgl*II e subclonado no plasmídeo pGEM-T Easy, criando o vetor intermediário pGEM-Tuzina. Depois da digestão deste vetor com *Xba*I e *Bgl*II, o inserto purificado foi ligado ao DNA linearizado de pTREX-GFP (*Xba*I-*Bam*HI). Os clones selecionados foram

confirmados por digestão com as enzimas *XbaI* e *SaI* e por sequenciamento de DNA (Macrogen, Coreia do Sul).

O plasmídeo pTREX-IC-Tuz::GFP foi construído através da modificação do vetor pTREXn-GFP para um de destino da plataforma Gateway® (Invitrogen, Estados Unidos). Para tal, o cassete contendo os sítios de recombinação *attR1*, *attR2* e o gene *ccdB* foi amplificado por PCR a partir do vetor pDEST17 e clonado em pTREXn-GFP. O resultado foi o vetor de destino pTcDEST-GFPn (Wanderson DaRocha, dados não publicados). Em seguida, a região desde o códon de parada da proteína hipotética (TcCLB.507485.110) até o códon de parada de Tuzina-51 (TcCLB.507485.120) foi amplificada com os iniciadores IC-Tuzina *attB1* For e IC-Tuzina *attB2* Rev. O produto da amplificação foi recombinado ao pDONR®/Zeo, criando o vetor de entrada pENTRY-IC-Tuzina. Este foi recombinado com o vetor de destino pTcDEST-GFP, resultando finalmente no plasmídeo pTcDEST-IC-Tuz::GFP. A identidade dos clones foi confirmada por digestão com *BsrGI* e por sequenciamento de DNA.

O vetor pTREX-Tuzina-75::GFP foi criado a partir de pTcDEST-IC-Tuzina e de pTREX-GFPn (Quadro 5). Primeiramente, pTREX-GFPn foi digerido com a enzima *EcoRI* para retirar o gene de GFP, gerando o vetor linearizado pTREXn (*EcoRI-EcoRI*). Em paralelo, pTcDEST-IC-Tuzina também foi digerido com a enzima *EcoRI*, liberando o fragmento Tuzina-75::GFP (*EcoRI-EcoRI*). Neste fragmento, o sítio de recombinação *attB2* entre os genes de tuzina e de GFP, retirado do vetor original, permaneceu na construção, embora sem função. O inserto purificado Tuzina-75::GFP (*EcoRI-EcoRI*) foi ligado a pTREXn (*EcoRI-EcoRI*) também purificado, originando o produto final pTREX-Tuzina-75::GFP. A orientação correta foi confirmada por digestão com a enzima *XhoI* e por sequenciamento de DNA.

O vetor pTREXh-ATOM40::GFP foi gerado a partir dos plasmídeos pGEM-ATOM40, pTREX-GFPn e pTREXn-Ama40::GFP. pGEM-ATOM40 foi originado da ligação do produto de PCR purificado de ATOM40 com os iniciadores ATOM40 For *BglII* e ATOM40 Rev *XbaI*, adicionando os sítios de *BglII* e de *XbaI* nas extremidades deste gene. Em paralelo, os vetores pTREXn-Ama40::GFP foram digeridos separadamente com as enzimas *XhoI* e *NheI* para efetuar as trocas entre os genes de resistência a neomicina e a higromicina. Os produtos destas duas reações foram o vetor linearizado pTREXn-Ama40::GFP (*XhoI-NheI*, sem IgGAPDH 5'::NeoR::IgGAPDH 3') e o inserto IgGAPDH 5'::HigroR::IgGAPDH 3' (*XhoI-NheI*), os quais foram ligados entre si originando pTREXh-Ama40::GFP. Este último foi digerido

com as enzimas *Xba*I e *Bam*HI para excluir o gene de amastina e liberar o vetor linearizado pTREX-GFP (*Xba*I-*Bam*HI). Este foi finalmente ligado ao gene de ATOM40 (*Bgl*II-*Xba*I), retirado previamente de pGEM-ATOM40 por digestão com *Bgl*II e *Xba*I. O produto desta ligação foi pTREXh-ATOM40::GFP.

Os vetores pTcNeo-Tuzina-51::3xFLAG, pTcHig-ATOM40::3xHA, pTcHig-ATOM69::3xHA e pTcHig-p601.30::3xHA foram construídos usando a plataforma Gateway®. Os genes de tuzina, ATOM40, ATOM69 e p601.30 foram amplificados por PCR com seus respectivos pares de iniciadores, os quais continham parte dos sítios de recombinação *att*B1 e *att*B2 (Quadro 5). Estes sítios foram completados por uma segunda reação de PCR com os iniciadores G1 e G2. Os amplicons purificados foram recombinados com pDONR®221, gerando seus respectivos vetores de entrada (Quadro 3). O vetor de entrada pENTRY-Tuzina-51 foi recombinado com o vetor de destino pTcNeo-3xFLAG, gerando o vetor de expressão pTcNeo-Tuzina-51::3xFLAG. Os plasmídeos pENTRY-ATOM40/ATOM69/p601.30 foram recombinados com o pTcHig-3xHA, originando pTcHig-ATOM40::3xHA; pTcHig-ATOM69::3xHA e pTcHig-p601.30::3xHA. Tanto os vetores de entrada e de destino tiveram suas identidades confirmadas por digestão com endonucleases e por sequenciamento de DNA.

Para os vetores de expressão das lipases, s amplicons purificados de TcPLA₁ e de TcLip2 foram ligados ao vetor pTREX-GFP linearizado com as enzimas *Xba*I e *Bam*HI, originando, respectivamente, os vetores pTREX-PLA₁::GFP e pTREX-Lip2::GFP.

5.6.6. Preparação de células de *Escherichia coli* quimiocompetentes.

O preparo das células foi adaptado de Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). As células de *E. coli* foram cultivadas a partir do estoque em glicerol 50% em meio LB ágar com os antibióticos adequados (Quadro 4), ou sem antibiótico, como no caso de BL21 (DE3). Uma colônia foi selecionada e inoculada em meio LB sem ou com antibiótico específico e cultivada a 37 °C por cerca de 16 h sob agitação constante (180 rpm). Este pré-inóculo foi diluído 100 vezes em 200 mL de meio LB sem antibiótico e cultivado nas mesmas condições do pré-inóculo, porém até a cultura atingir a DO₆₀₀ entre 0,4 e 0,6. A cultura foi mantida imersa em gelo por 30 min. e centrifugada a 6.000 x *g* por 10 min., a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi suspenso em 100 mL de tampão CaCl₂ 100 mM e HEPES pH 7,4, gelado

e estéril. A suspensão permaneceu sob gelo por 40 min. Após este período, ela foi novamente centrifugada a 6.000 x g por 10 min., a 4 °C e o sedimento foi concentrado gentilmente em 3,7 mL de tampão CaCl₂ 100 mM, HEPES pH 7,4 e glicerol 10% (v/v). A suspensão foi dividida em alíquotas de 100 µL em tubos de microcentrífuga tipo *ependorf* previamente resfriados em gelo seco e estocadas a -80 °C por tempo indeterminado.

5.6.7. Transformação bacteriana e seleção dos clones.

Alíquotas 100 µL de bactérias *E. coli* preparadas como descrito na seção anterior foram misturadas com o produto de ligação, recombinação ou plasmídeo. A mistura foi mantida em banho de gelo por 30 min. e transformada por choque térmico a 42 °C por 1 min. e 30 seg, seguidas de banho de gelo por 3 min. A este material foram adicionados 1 mL de meio LB sendo incubado por 1 hora a 37 °C com agitação de 180 rpm. Em seguida, 200 µL da cultura transformada foram plaqueados em meio LA suplementado com o antibiótico adequado ao DNA em transformação (Quadro 3). No caso do pGEM-T *Easy*, o meio foi suplementado ainda com 0,5 µM de IPTG e 40 µg/mL de X-gal e as placas incubadas por 16 horas a 37 °C. Os clones foram selecionados para PCR de colônia, utilizando os iniciadores do inserto ou do vetor e uma colônia em cada reação. Os vetores que não continham os insertos foram usados como DNA molde na reação de controle positivo. O controle negativo continha todos os componentes da reação, exceto o DNA molde. Após as reações de PCR, o DNA das colônias que tiveram os insertos amplificados foi posteriormente extraído (seção 5.6.9). A ligação dos insertos foi confirmada adicionalmente através de digestão por endonucleases.

5.6.8. Estoque em glicerol das células de *Escherichia coli*.

Um mL da cultura crescida por 16 horas de cada clone selecionado foi centrifugado a 14.000 rpm por 30 seg. (*Eppendorf Centrifuge 5415 C*). O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspense em 1 mL de solução de glicerol 50% gelada (aproximadamente 4 °C). As células foram mantidas a -20 °C.

5.6.9. Extração do DNA plasmidial.

As colônias foram inoculadas em LB suplementado com o antibiótico de seleção e crescidas sob agitação constante (180 rpm) por 16 horas. O DNA plasmidial foi extraído pelo método de lise alcalina (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989), precipitado com 2 volumes de etanol absoluto, lavado com etanol 70%, o etanol foi evaporado completamente e o DNA foi solubilizado em 30 µL de água ultrapura.

No caso do DNA para transfecção, este foi extraído por maxiprep, utilizando-se o kit *High Speed Plasmid Maxiprep Kit* (Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante. As células foram crescidas em 500 mL de meio LB. Em ambos os casos, a qualidade do DNA foi determinada por eletroforese de agarose 1% e quantificado por espectrofotometria no aparelho NanoDrop® (Thermoscientific). Alternativamente, o kit de miniprep *QIAprep Miniprep Spin Kit* (Qiagen) foi usado a obtenção de DNA para transfecção com alta pureza.

5.6.10. Eletroforese de DNA em gel de agarose.

As amostras de DNA foram misturadas ao tampão de amostra de DNA e aplicadas em gel de agarose de 1% e TBE 1x (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989), utilizando como marcador molecular *1kb Gene Ruler* (Thermo Fischer Scientific), ou *1 kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen). A corrida eletroforética procedeu a 80 V por aproximadamente 1 hora. O gel foi corado em solução de brometo de etídeo a 0,05%, visualizado sob luz ultravioleta em transluminador (*UVP BioImaging Systems EPI Chemi Darkroom*), e fotodocumentado.

5.6.11. Sequenciamento dos clones.

Os clones obtidos das construções e os iniciadores foram enviados à empresa Macrogen (Seul, Coreia do Sul). Foram selecionados até 3 clones de cada construção realizada, os quais tiveram seus DNAs preparados com o kit de miniprep *QIAprep Miniprep Spin Kit* (Qiagen). Usaram-se os oligonucleotídeos iniciadores universais M13 For e M13 Rev, ou aqueles usados para a amplificação dos genes, tanto senso quanto antissenso. O método de sequenciamento usado foi o *Single Extension*. Os

resultados foram analisados pelo alinhamento com as sequências teóricas usando o programa *Clustal Omega* (SIEVERS; HIGGINS, 2014).

5.7. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE TUZINA RECOMBINANTE.

5.7.1. Indução das células contendo o vetor pGEX-Tuzina.

As células de *E. coli* BL21(DE3) foram transformadas com o vetor pGEX-Tuzina e 10 colônias transformantes foram aleatoriamente selecionadas para o pré-inóculo em meio LB ampicilina, incubado a 37 °C por 16 h a 220 rpm. O pré-inóculo foi diluído 50X em meio 2XYT com ampicilina e as células foram incubadas a 37 °C e sob agitação de 220 rpm até atingirem DO₆₀₀ de 0,3 a 0,4. Neste momento, a cultura foi induzida com 0,5 mM de IPTG a 16 °C por 6 horas, sob agitação de 220 rpm. Alíquotas da cultura antes da indução e após o período de indução foram coletadas para o controle da expressão de tuzina em fusão à etiqueta de GST. Após este período, as células foram coletadas por centrifugação a 5.000 x g por 5 min a 4 °C e lavadas duas vezes em PBS 1x gelado. Para a produção de anticorpos anti-tuzina, 2,5 litros de indução foram usados no total. O sedimento foi mantido a -20 °C até o dia seguinte para prosseguir-se com a lise e purificação.

5.7.2. Purificação com resina de Glutathione-Sepharose.

Todo o procedimento foi realizado com a amostra e reagentes no gelo, exceto quando indicado. O sedimento bacteriano foi gentilmente suspenso em tampão de lise para purificação (Quadro 4), concentrando-o 20 vezes. O sedimento foi lisado em microfluidificador a 80 psi com banho de gelo, passando-se a amostra pelo sistema por 10 vezes consecutivas, ou até a suspensão torna-se mais límpida. O sobrenadante foi coletado após centrifugação a 20.000 por 40 min, a 4 °C e incubado por 2 horas em TA sob agitação constante, com 0,2 mL de leite da resina de Glutathione-Sepharose 4B *Fast Flow* (GE *Healthcare*) para cada 500 mL de cultura induzida, previamente preparada seguindo instruções do fabricante. Após a incubação, a resina foi coletada por centrifugação em baixa rotação (1.000 x g por 1 min 4 °C) e o sobrenadante (fração não ligada) foi conservado a -20 °C com glicerol 10%. A resina foi lavada 6 vezes com um excesso de 500 vezes de tampão de lise

para purificação e coletada por centrifugação em baixa rotação. A fusão de tuzina a GST (GST::Tuzina) foi eluída com tampão de eluição (Quadro 4), agitando-se a suspensão por 10 min em TA. Três frações de 0,5 mL foram coletadas por centrifugação em baixa rotação. Alíquotas das frações não ligadas, da primeira e última lavagens e das eluições foram coletadas para análise da eficiência de purificação por SDS-PAGE seguido de coloração com *Coomassie Brilliant Blue*.

As eluições foram dializadas e concentradas em Amicon Ultra (Millipore), com *cut off* de 50 kDa. As frações foram centrifugadas a 14.000 $\times g$ por 15 min a 4 °C e lavadas uma vez com PBS 1x gelado, nas mesmas condições de centrifugação. Cada fração da proteína concentrada foi eluída com a adição de 20 μ L de PBS 1x gelado, invertendo-se a coluna no tubo coletor e centrifugando-a a 1.500 $\times g$ por 2 min. A concentração de proteína foi estimada por espectrofotometria em aparelho NanoDrop® (Thermoscientific). O conjunto de proteínas purificadas foi conservado em frações a -20 °C até o momento da inoculação nos camundongos.

5.8. PRODUÇÃO DE SORO ANTI-TUZINA EM CAMUNDONGOS.

5.8.1. Animais.

Os animais usados para a produção do soro anti-tuzina foram camundongos machos BALB/c com cerca de 2 meses de idade, no total de quatro animais. Eles foram acondicionados no Biotério do ICC (Instituto Carlos Chagas, Tecpar, *Campus* CIC -Curitiba) em gaiola com maravalha, água e ração à vontade, em sala não climatizada. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) da Fiocruz, Rio de Janeiro, sob o código LW-15/13.

5.8.2. Imunização.

O soro pré-imune foi coletado uma semana antes do início das imunizações, pela sangria da extremidade distal da cauda, obtendo-se entre 50 e 100 μ L de sangue total. A amostra foi processada como descrito no tópico seguinte. A proteína purificada tuzina em fusão a GST foi diluída na concentração final de 250 μ g/mL em PBS 1 x com a suspensão do adjuvante a base de hidróxido de alumínio Alu-Gel-S (SERVA *Eletrophoresis*) a 40% (v/v). O total de 1 mL desta diluição foi preparado para cada

imunização, sendo o suficiente para uma aplicação em quatro animais. A suspensão foi mantida sob agitação por 6 horas em TA antes de ser injetada pela via intraperitoneal, no camundongo devidamente imobilizado. Cinquenta microgramas de proteína foram inoculados em cada animal, no total de quatro imunizações, com intervalos de duas semanas cada. Uma semana após a terceira imunização, uma amostra de sangue da cauda foi coletada para testar a reatividade do soro à proteína purificada por *Western blot*. Uma semana após a última imunização, os animais foram anestesiados com Quetamina 100 mg/kg e Xilazina 20 mg/kg intraperitoneal e, durante a sedação, o sangue da punção cardíaca foi coletado. Após a exsanguinação do animal, ele foi eutanasiado ainda sedado por deslocamento cervical.

5.8.3. Processamento da amostra.

O sangue coletado tanto pela cauda (teste) quanto pela punção cardíaca (o soro, propriamente dito) foi coagulado a 37 °C por 1h e centrifugado a 1 900 x g por 7 min, a 4 °C para a separação do soro das células sanguíneas. O soro da punção cardíaca foi dividido em alíquotas de 50 µL e conservadas a -80 °C. Alíquotas de uso foram acondicionadas a 4 °C.

5.9. TRANSFEÇÃO E ANÁLISE DE EXPRESSÃO EM *Trypanosoma cruzi*.

5.9.1. Contagem das células em câmara de Neubauer.

Os protozoários foram diluídos de 10 a 50x em PBS 1x, dependendo da turvação da cultura. Dez µL da diluição foram usados para preencher ambos os compartimentos da câmara de Neubauer. Todos os protozoários do quadrante central foram contados. Cada contagem foi feita em duplicata, considerando-se somente os valores cujo desvio máximo era de 15% entre as contagens. O valor final (células/mL) multiplicando-se o valor médio pelo fator de diluição e pela ordem de grandeza da câmara ($1,0 \times 10^4$).

5.9.2. Transfecção em *Trypanosoma cruzi*.

O experimento de transfecção em epimastigotas foi realizado de acordo com DaRocha et al. (2004) As epimastigotas das cepas G e Y e do clone Sylvio X 10/1 (densidade de $1,0 \times 10^7$ a $3,0 \times 10^7$ células/mL) foram coletados e centrifugados por 5 min a $3.000 \times g$, a 4°C . O meio foi descartado e as células foram lavadas uma vez com tampão de eletroporação gelado e centrifugados. As células foram ressuspensas no tampão de eletroporação na concentração de $1,0 \times 10^8$ células/mL. De 5 a 50 μg de DNA circular foram adicionados à 400 μL da suspensão de células (equivalente a $4,0 \times 10^7$ células), transfectadas por eletroporação (Bio-RAD *Gene Pulser Xcell*) nas seguintes condições: 2 pulsos com intervalo de 10 segundos, a 450 V e 500 μF em cubetas de 0,2 cm de espessura. O controle negativo (*mock*) foi eletroporado nas mesmas condições, porém sem DNA. As células foram imediatamente inoculadas em 5 mL de LIT incompleto e recuperados a 28°C por 4 horas. Para os vetores de expressão de lipase, o procedimento foi alterado na etapa da recuperação, na qual a adição do antibiótico G418 foi feita diretamente sobre a cultura recuperada 24 horas após a transfecção, sem diluí-la. A seleção prosseguiu normalmente mantendo-se as diluições e o aumento das concentrações de antibiótico.

5.9.3. Seleção dos protozoários transfectados.

No dia seguinte à recuperação, os transfectantes foram diluídos 5 x em meio LIT completo, contendo os antibióticos de seleção G418 ou higromicina. As células foram cultivadas a 28°C até atingirem aproximadamente 10^7 protozoários/mL. A concentração dos antibióticos aumentou gradativamente (de 300 a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para G418 e de 300 a 2.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para higromicina), assim como a diluição das culturas, até o máximo de 20 x. Para o caso da cotransfecção dos vetores com resistência à higromicina em células que já eram resistentes à G418, somente a concentração de higromicina foi elevada, mantendo a de G418 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As células foram acompanhadas pela visualização em microscópio de luz invertido. O período de seleção foi finalizado quando não foi mais possível observar células vivas no controle negativo.

Após a seleção, a presença do DNA ectópico foi confirmada por extração de DNA genômico dos transfectantes seguida de PCR, com os iniciadores que

flanqueavam a região 5' do gene ectópico e a região 3' da etiqueta ou gene repórter. O DNA genômico das células selvagens foi usado como controle negativo da reação.

5.9.4. Análise de fluorescência por FACS

Em torno de 2×10^6 de epimastigotas de *T. cruzi* cepas G e Y e clone Sylvio X, 10/1, selvagens ou transfectadas e em fase log de crescimento, foram diluídas em 1 mL de PBS 1 x para análise de fluorescência. As células foram analisadas pelo citômetro de fluxo *FACSCalibur* (*Becton Dickinson*) ou *BD Accury C6 Plus* (*Becton Dickinson*), como indicado na seção de Resultados e Discussão. Os parasitos selvagens e aqueles que expressavam GFP foram usados para estabelecer valores de corte para os parâmetros analisados, como não fluorescente e fluorescente, respectivamente. A fluorescência foi quantificada em filtro FL1-H (emissão de 515 a 545 nm), no total de 10.000 eventos. Os dados gerados pela citometria de fluxo para o equipamento *FACSCalibur* foram analisados pelo programa Cyflogic versão 1.2.1 (<<http://www.cyflogic.com/index.php?link1=1&link2=4>>), e no programa *Accury C6 Plus* (*Becton Dickinson*).

5.9.5. Diferenciação de *Trypanosoma cruzi*.

Para a obtenção das demais formas evolutivas de *T. cruzi* selvagem da cepa G as epimastigotas foram diferenciadas de acordo com metodologias previamente descritas, com detalhadas nos tópicos a seguir.

5.9.5.1. Metaciclogênese *in vitro* e purificação de tripomastigotas metacíclicos axênicos.

As formas epimastigotas foram diferenciadas em tripomastigotas metacíclicas (metaciclogênese) em meio axênico, como descrito por Contreras et al. (1985), com algumas modificações. As células de cepa G foram inoculadas em 100 mL de meio LIT completo na densidade de $0,2 \times 10^7$ epimastigotas/mL e envelhecidas por 5 dias a 28 °C, até atingirem densidade aproximada de 5×10^7 epimastigotas/mL. Todo o volume da cultura foi centrifugado a $3.000 \times g$ por 5 min a 25 °C para a retirada do meio LIT. O sedimento foi lavado duas vezes em meio TAU e novamente centrifugado.

O sedimento de epimastigotas foi ressuspensão em meio TAU a 5×10^8 células/mL para o estresse nutricional a 28 °C por 2 horas, em tubo tipo falcon de 50 mL de capacidade. Após este tempo, 2 mL desta suspensão foram inoculados em 100 mL de meio TAU 3AAG ($1,0 \times 10^6$ células/mL), em garrafas de cultivo sem filtro com área de 300 cm². Foram preparadas 5 garrafas de 100 mL no total, as quais foram incubadas a 28 °C por 7 dias.

Após este período, os tripomastigotas metacíclicos (TM) foram purificados em condições estéreis do sobrenadante usando-se resina DEAE-celulose (Sigma-Aldrich) estéril. TMs foram coletados por centrifugação a 7.000 x g por 10 min, a 25 °C e o sedimento foi lavado duas vezes em tampão PSG estéril, e ressuspensão em 1 mL deste tampão. A suspensão foi adicionada à coluna estéril de DEAE-celulose previamente equilibrada com tampão PSG. O eluato, que continha as TM purificadas, foi coletado em tubos de microcentrífuga. As frações tiveram sua pureza e rendimento de TM avaliadas em contagem na câmara de Neubauer (aprox. 100% de pureza e 10% de rendimento para cepa G). A maior parte de TM purificado foi destinado ao extrato de proteína total para SDS-PAGE, enquanto que a outra parcela foi usada na infecção de células de mamífero para a diferenciação das demais formas de vida de *T. cruzi*.

5.9.5.2. Obtenção de tripomastigotas em cultura de tecido.

As formas TM de cepa G purificadas em PSG foram incubadas às células LLC-MK2, na proporção de 10 TM para 1 célula, como descrito por Cruz et al. (2012). As células LLC-MK2 foram inoculadas em meio RPMI completo 24 horas antes da infecção, em garrafas de 75 cm² de superfície. As células infectadas foram incubadas a 37 °C e com atmosfera de 5% de CO₂ por 2 horas, quando as células aderidas foram lavadas com PBS para remover os parasitos que não infectaram. O meio RPMI completo foi novamente adicionado e a infecção continuou até a liberação das formas tripomastigotas derivadas de cultura de tecido (TCT). O andamento da infecção foi acompanhado por microscopia de luz em microscópio invertido. Após 17 dias de infecção, o sobrenadante da cultura foi coletado lentamente e centrifugado em baixa rotação (350 x g por 3 min, a 22°C) para descartar células LLC-MK2 que se desprenderam da parede da garrafa. O sobrenadante com as formas TCT teve sua pureza e rendimento avaliados por contagem em câmara de Neubauer (aprox. 100% de pureza e rendimento de $2,0 \times 10^7$ TCT/mL). A maior parte destas células foi

destinada ao extrato de proteínas total para SDS-PAGE, enquanto que o restante foi destinado à diferenciação para as formas amastigotas axênicas.

5.9.5.3. Obtenção de amastigotas axênicas.

As formas TCT puras de cepa G foram diferenciadas em meio LIT ácido (pH 5,8) sem soro fetal bovino, como descritas anteriormente (CRUZ et al., 2012). As TCTs foram coletadas do sobrenadante por centrifugação a $5.000 \times g$ por 10 min, a 22°C e ressuspensas em LIT ácido na densidade de 4×10^7 TCTs/mL. Estas células foram inoculadas em duas garrafas de 25 cm^2 de área com 10 mL de LIT ácido cada, na densidade de $0,4 \times 10^7$ TCTs/mL. As células diferenciaram-se em amastigotas axênicas (AA) a 37°C com atmosfera de CO_2 , por 12 a 16 horas. O sobrenadante foi coletado e a pureza e rendimento foram determinados por contagem na câmara de Neubauer (aprox. 90 % de pureza e 2,7 AA/mL de rendimento). As AA foram então coletadas por centrifugação a $5.000 \times g$ por 10 min, a 22°C . e o extrato total proteico foi preparado com tampão de amostra para proteína (Quadro 4).

5.9.6. Extração de proteínas e análise por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Os extratos de proteína das formas epimastigotas, TM, TCT e AE foram preparados nas seguintes concentrações finais de parasitos: $2,0 \times 10^5$ epi/ μL ; $1,0 \times 10^6$ TM/ μL ; $4,0 \times 10^5$ TCT/ μL ; e $4,0 \times 10^5$ AA/ μL para a cepa G. As células foram suspensas em tampão de amostra para SDS-PAGE em quantidade suficiente para render as densidades supracitadas. As amostras foram aquecidas a 100°C por 5 min e resfriadas em gelo logo em seguida. Para quebrar o DNA genômico e reduzir a viscosidade das amostras, elas foram passadas por 10 vezes consecutivas em seringa hipodérmica com agulha de calibre 24G.

Os extratos de proteínas total foram separados em géis de poliacrilamida 12% (33%/0,9% acrilamida/bisacrilamida) preparados em Tris-HCl 400 mM pH 8,8; contendo 3,3% de acrilamida; 0,09% de bisacrilamida; 0,1% de SDS; 0,075% de APS e 0,07% de TEMED. O marcador de massa molecular foi adicionado de acordo com as recomendações do fabricante, como indicado na legenda das figuras em

Resultados e Discussão. A corrida prosseguiu em tampão de eletroforese para SDS-PAGE a 30 mA/gel até o desaparecimento do corante azul de bromofenol. As amostras preparadas foram aplicadas em quantidades empíricas, tendo como base a normalização com anticorpo anti- α -tubulina.

Os géis preparados foram analisados de três maneiras distintas: coloração com azul de Coomassie, nitrato de prata ou transferência para *Western blot*. A coloração com azul de Coomassie foi feita por 2 horas sob agitação e descorado *overnight* com água destilada. Os outros dois métodos serão descritos nos tópicos a seguir.

5.9.7. Coloração com nitrato de prata.

A técnica foi adaptada de Chevallet, Luche e Rabilloud (2006). Antes do início do procedimento, as vasilhas nas quais os géis seriam tratados com as soluções reagentes foram lavados com detergente comum e enxaguados exaustivamente, com uma última lavagem com água ultrapura. Os géis de SDS-PAGE foram fixados em solução fixadora seguida da solução de sensibilização (Quadro 4) por meia hora cada, sob agitação constante. Os géis foram então lavados 3 vezes com água ultrapura, por 5 min sob agitação. Em seguida, foram incubados com a solução de coloração por 20 min, em agitação. Depois desta etapa, os géis foram lavados brevemente com água ultrapura, por 2 vezes de 1 min, sob agitação. Em seguida, a solução de revelação foi adicionada, e a reação ocorreu de 10 a 30 min em agitação, até o surgimento de todas as bandas. Neste momento, a solução de revelação foi descartada e a de finalização foi adicionada, por um período de 10 min sob agitação. Esta solução foi finalmente descartada e os géis corados foram conservados imersos em água ultrapura até serem fotodocumentados em transluminador L-Pix (Loccus Biotecnologia).

5.9.8. *Western blot*.

Após a separação das proteínas por SDS-PAGE, elas foram transferidas para membranas de nitrocelulose *Hybond-ECL* (GE Healthcare) a 80 V por 2 horas (no gelo) ou a 50 V por 16 horas (4 °C) em tampão de transferência utilizando o sistema de transferência úmida (*Mini-PROTEAN Tetra Eletrophoresis System*, Bio-Rad®).

Depois da transferência, as membranas foram coradas com Ponceau S até o surgimento das bandas proteicas. As membranas foram lavadas brevemente em água destilada e incubadas na solução de bloqueio por 1 hora em TA ou por 16 horas a 4 °C. As membranas foram então incubadas com os seguintes anticorpos primários diluídos na solução de bloqueio: anti-FLAG M2 monoclonal de camundongo (Sigma-Aldrich) diluído 1:1.000 ou 1:2.000, como indicado em Resultados e Discussão; anti-HA monoclonal de camundongo (Sigma-Aldrich) diluído 1:500; anti-GST policlonal de coelho (Sigma-Aldrich) diluído 1:10.000; soro anti-tuzina de camundongo diluído 1:500 ou 1:1000, como indicado; soro anti-PLA₁ produzido em camundongo (BELAUNZARÁN et al., 2013); soro anti-GAPDH de camundongo (Stenio Fragoso, comunicação pessoal) diluído 1:10.000; soro anti- α -tubulina 1:10.000 (Diana Bahia, comunicação pessoal) e soro anti-GP 35/50 10D8 (YOSHIDA, 2006). Os anticorpos primários foram incubados por 1 hora em TA sob agitação constante. Em seguida, elas foram lavadas 3 vezes de 5 min com PBS Tween 20 a 0,05% e incubadas por 1 hora em TA com um dos seguintes anticorpos secundários: anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase diluído 1:10.000 (Thermo Fischer Scientific®), anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (Thermo Fischer Scientific®), anti-IgG de camundongo conjugado ao fluoróforo IRDye® 680RD (Li-Cor) diluído 1:4.000. As membranas foram lavadas 3 vezes de 5 min com PBS Tween 20 a 0,05% e reveladas, no caso das imunodeteccões com peroxidase, com o kit *ECL™ Western Blotting Systems* (GE Healthcare), por quimioluminescência em filme radiográfico *Amersham Hyperfilm ECL* (GE Healthcare) ou por transluminador *L-Pix Chemi Express* (Loccus Biotecnologia). Para a revelação por fluorescência de infravermelho, as membranas com o fluoróforo foram abrigadas da luz e reveladas pelo equipamento *Odissey Scanner* (Li-Cor), no canal de 700 nm com 5 a 25% da potência do laser de infravermelho.

5.9.9. Eletroforese de DNA em campo pulsado (PFGE) e transferência em membrana de nitrocelulose.

Para a separação de bandas cromossômicas de *T. cruzi*, a PFGE foi realizada de acordo com Cano et al. (1995) e Souza et al. (2011), com algumas modificações. Os epimastigotas foram imobilizadas em blocos de agarose *low melting* 1% em PBSG, na concentração de $1,0 \times 10^7$ células/bloco. Os parasitos imobilizados foram digeridos em solução de lise por 48 horas a 37 °C, depois coletados e lavados em EDTA 500

mM e conservados a 4 °C nesta mesma solução até o momento do uso. A separação cromossomal foi realizada com o posicionamento dos blocos de *T. cruzi* e do marcador (*CHEF DNA Size Marker - Hansenula wingei chromosomes*, Bio-RAD®) em gel de agarose 1,2% em TBE 0,5 X, no sistema *Gene Navigator System (Amersham Pharmacia Biotech)* com arranjo hexagonal de eletrodos. A corrida eletroforética procedeu em TBE 0,5x por 135 h a 100 V e com temperatura controlada a 10 °C. As condições do campo pulsado foram ajustadas para o total de 6 fases de pulsos homogêneos (N/S; E/W) com interpolação, nas seguintes condições: fase 1 = tempo do pulso de 90 seg e 30 h de corrida; fase 2 = tempo de 200 seg e 30 h de corrida; fase 3 = tempo de 350 seg e 25 h de corrida, fase 4 = tempo de 500 seg e 25 h de corrida, fase 5 = tempo de 800 seg e 25 h de corrida e fase 6 com tempo de pulso de 800 seg até o término da corrida. O gel foi em seguida corado em solução de brometo de etídeo 0,05%, fotodocumentado com as dimensões determinadas e preparado para transferência do DNA em membrana de nitrocelulose *Hybond-N+ (GE Healthcare)*. Para tal, o gel foi brevemente lavado em água ultrapura e tratado com a solução de desnaturação por 30 min também sob agitação. Após este período, o gel foi lavado rapidamente em água ultrapura e tratado com a solução de neutralização por 20 min., sob agitação leve e constante. Após esses procedimentos, o DNA do gel foi transferido para membrana por capilaridade ascendente em solução de SSC 10x. durante 15 horas. Em seguida, a membrana foi exposta à luz ultravioleta em transluminador para efetuar o *crosslink* do DNA à membrana. Ela foi então submetida à hibridação com sondas radiomarcadas (item 5.9.11) ou mantidas a -20°C até o momento do uso.

5.9.10. *Northern blot.*

5.9.10.1. Tratamento dos materiais e soluções para eliminação de RNase.

Os reagentes e materiais foram descontaminados segundo Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). A vidraria foi lavada com água destilada e etanol 70% v/v, secadas e aquecidas a 150°C por 8 horas. Materiais de plástico, que não podiam ser aquecidos como os aparatos de eletroforese, foram lavados com água destilada e etanol 70%, secados e submersos em solução de H₂O₂ 3% por 10 min. Após este período, estes materiais foram lavados com água ultrapura e secos em temperatura ambiente.

As soluções foram tratadas com 0,1% de DEPC por 1 hora a 37 °C. Para eliminar o DEPC, as soluções foram autoclavadas por 15 min. a 120 °C e 1 atm de pressão. No caso de soluções que não podiam ser autoclavadas, seus componentes passaram por este tratamento em separado para só então a solução final ser preparada.

5.9.10.2. Extração de RNA de *Trypanosoma cruzi*.

O RNA total de epimastigotas de *T. cruzi* foi extraído de 5×10^8 parasitos em fase exponencial de crescimento. As células foram centrifugadas a $5.000 \times g$ por 10 min a 4 ° e lavadas duas vezes com PBS 1x gelado. O RNA total foi extraído utilizando-se o kit *RNAspin Mini RNA Isolation Kit (Qiagen)*, seguindo recomendações do fabricante. No final da purificação, alíquotas de 3 μ L foram separadas para quantificação em *Nanodrop™* (Thermo Fischer Scientific) e avaliação da qualidade do RNA por eletroforese em gel de agarose desnaturante. As amostras foram estocadas a – 80 °C até o momento do uso.

5.9.10.3. Eletroforese em gel de agarose desnaturante e transferência em membranas de nitrocelulose.

As amostras de RNA foram preparadas adicionando-se 3 μ L formamida seguido de desnaturação a 65 °C por 10 min. Elas foram então separadas por eletroforese em gel de agarose 1,2% contendo 2% de formaldeído. A corrida procedeu em tampão MOPS/EDTA 1 X por 1 hora a 80 V, para o gel da análise da qualidade da extração do RNA, ou por 1 h 40 min a 80 V, para o gel de transferência para *Northern blot*. Os géis foram revelados em solução de brometo de etídeo 0,05% preparada em água tratada com DEPC (item 5.9.10.1). Após 10 min, os géis foram lavados brevemente com água isenta de RNase e em seguida visualizados sob luz ultravioleta em transluminador (*UVP BioImaging Systems EPI Chemi Darkroom*), para serem então fotodocumentados. Os géis preparados foram então tratados com solução e NaOH 50 mM isenta de RNase por 4 min sob agitação constante. O gel foi preparado para transferência em membranas de nitrocelulose *Hybond-N+* (*GE Healthcare*) por capilaridade ascendente em solução de SSC 10x. A transferência ocorreu por 15 horas. Em seguida, as membranas foram expostas à luz ultravioleta por 3 min em

transluminador para efetuar o *crosslink* do RNA às membranas. Elas foram então submetidas à hibridação com sondas radiomarcadas (item 5.9.11) ou mantidas a -20°C até o momento do uso.

5.9.11. Marcação de sondas radioativas e ensaios de hibridação.

O fragmento do gene de tuzina foi obtido por reação de PCR com os iniciadores Tuzina For *Bgl*II e Tuzina Rev *Xba*I a partir do vetor pGEX-Tuzina (Quadros 2 e 5). O amplicon foi purificado por excisão do gel de agarose (item 5.6.10) para eliminar a contaminação com plasmidial. Em reação de 50 µL, cerca de 80 ng desses fragmentos foram radioativamente marcados com 50µCi de [α -P³²] dCTP, utilizando 5 µL da solução de hexanucleotídeos randômicos como iniciadores, 10 µL do tampão da reação contendo os demais dNTPs não marcados e 2 unidades de Klenow (fragmento maior de DNA polimerase I), disponível no *kit Megaprime DNA labelling System (GE Healthcare)*. Após 1 hora de marcação, as reações foram bloqueadas com 25 mM de EDTA pH 8,0.

Após a obtenção das sondas, as membranas de nitrocelulose (itens 5.9.9 e 5.10.3) foram submetidas à pré-hibridação em aproximadamente 20 mL de solução de pré-hibridação em frascos apropriados e mantidos a 65 °C por 3 horas. Após prévia desnaturação por fervura a 5 min com 200 mM de NaOH, as sondas marcadas foram adicionadas à solução de pré-hibridação. A reação prosseguiu a 65 °C em forno giratório por aproximadamente 18 horas (CHURCH; GILBERT, 1984). Após hibridação, as membranas foram lavadas duas vezes com solução de lavagem a 65 °C. Após a lavagem, as membranas foram seladas com filme plástico e expostas em cassete com filme *Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare)*, e reveladas em sala escura com solução reveladora e fixadora (Kodak) em diferentes tempos de exposição por um período de 1 a 2 meses.

5.10. LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR.

5.10.1. Fracionamento subcelular.

As epimastigotas de *T. cruzi* foram lisadas e fracionadas segundo Cox e Emili (2006) e Kangussu-Marcolino et al. (2013). Cerca de 10⁹ epimastigotas em fase log

foram coletadas por centrifugação a 3.000 x g por 5 min, a 4 °C e lavadas 2 vezes em PBS 1 x gelado. O sedimento foi ressuspense em tampão de fracionamento suplementado com inibidor de protease em pastilha (*cOmplete mini EDTA free*, Roche) e as células foram lisadas com 10 ciclos de gelo em nitrogênio líquido e degelo em banho-maria a 37 °C. O lisado foi centrifugado em baixa rotação (2.000 x g por 10 min) para remover células não lisadas. Uma alíquota do lisado foi separado para ser quantificado e analisado por SDS-PAGE. O sobrenadante foi fracionado por ultracentrifugação a 100.000 x g por 1 hora, a 4 °C. O sobrenadante foi coletado (fração solúvel) e o sedimento (fração insolúvel) foi ressuspense no mesmo volume de tampão na qual a fração citoplasmática foi obtida. A quantidade de proteínas totais das frações foi determinada por ensaio de Bradford de acordo com recomendações do fabricante (Sigma-Aldrich). Igual volume das frações solúvel e insolúvel equivalente à 10 µg de proteína total do lisado foram analisadas em SDS-PAGE a 12% com posterior transferência em membrana de nitrocelulose *Hybond-ECL* (GE Healthcare) (itens 5.9.6 e 5.9.8).

5.10.2. Imunofluorescência e microscopia confocal

Em torno de 2×10^6 epimastigotas de *T. cruzi* foram lavados em PBS e fixados em paraformaldeído 4% por cinco minutos. As células aderiram às lamínulas a 37 °C sem poli-lisina e depois foram permeabilizadas com Triton-X 100 0,01% em PBS por 5 min, lavadas com PBS e bloqueadas por 1 hora a 4 °C em solução de bloqueio para imunofluorescência. As lamínulas com as células foram lavadas novamente com PBS e incubadas com anticorpo primário anti-FLAG M2 produzido em camundongo (Sigma-Aldrich) 1:2.000 ou o anticorpo anti-HA produzido em coelho (Invitrogen) 1:500, diluídos em solução de bloqueio por 1 h a 37 °C. As lamínulas foram mais uma vez lavadas e incubadas com anticorpo anti-camundongo conjugado com fluoróforo Alexa Flúor-568/546 1:500 e/ou anticorpo anti-coelho conjugado com fluoróforo Alexa Flúor-488 1:500 (Invitrogen), juntamente com DAPI 1 µg/mL, por 1 h a 37 °C. As lamínulas com as células foram lavadas, secadas e montadas em lâminas com Fluoromount (Sigma-Aldrich), e mantidas 4 °C até o momento da análise. As lâminas foram analisadas por microscópio confocal Nikon A1 Plus (Nikon, Japão), nos filtros para DAPI (450/405,8 nm), FITC (525/488 nm) e Alexa-568/546 (595/561,8), com

aumento ocular de 1000 x e zoom dinâmico de 1,9 x. As imagens foram posteriormente processadas pelo software *Nis-Elements* (Nikon, Japão).

Para a microscopia de GFP, em torno de 2×10^6 epimastigotas de *T. cruzi* foram lavados em PBS e fixados em paraformaldeído 2% por 3 minutos. As células foram lavadas com PBS 1x e centrifugadas a 2.000 xg por 5 min, em TA e concentradas em 50 μ L de Fluoromount® (Sigma-Aldrich) com DAPI 10 μ g/mL. As células foram montadas em lâminas/lamínulas e seladas com esmalte. As lâminas foram analisadas por microscópio confocal Nikon A1 Plus (Nikon, Japão), nos filtros para DAPI (450/405,8 nm) e FITC (525/488 nm).

5.10.3. Microscopia eletrônica de transmissão.

5.10.3.1. Processamento dos blocos de *Lowicryl Monostep*.

A quantidade total de 7×10^7 epimastigotas em fase log (transfectadas e selvagens - controle negativo), foi coletada por centrifugação a 10.000 x g por 1 min e lavadas 1 vez em PBS. O sedimento foi ressuspense na solução de fixação e incubado em TA por 1 hora. As células fixadas foram lavadas 2 vezes em tampão fosfato 100 mM e sedimentadas a 10.000 x g por 1 min. As células sedimentadas foram gradativamente desidratadas nas seguintes condições: etanol 30% a 4 °C por 30 min; etanol 70% a -20 °C por 1 hora; etanol 90% a -20 °C por 1 hora e etanol absoluto a -20 °C por 1 hora. A troca das soluções foi realizada após etapas de centrifugação a 10.000 x g por 2 min, sem a ressuspensão do sedimento em nenhum momento da técnica. A infiltração da resina *Lowicryl Monostep* (*Electrom Microscopy Sciences*) foi feita pela adição de solução da resina com etanol absoluto (1:1) ao sedimento e incubada a -20 °C por 16 horas, seguida da troca do sobrenadante por resina pura e incubada a -20 °C por 16 horas. Os sedimentos foram então recortados homogeneamente com lâmina tipo bisturi e cada fração foi colocada em tubo tipo eppendorf de 600 μ L devidamente identificado. Sobre eles foi adicionada a resina pura e os blocos foram polimerizados a 20 °C por 72 horas, sob luz ultravioleta.

5.10.3.2. Imunolocalização em cortes ultrafinos.

Os blocos de *Lowicryl* polimerizados foram piramidados manualmente com bisturi, e os cortes ultrafinos foram realizados em ultramicrótomo EM UC7 (*Leica Microsystems*). Cada corte foi secado sobre uma grade de níquel de 3 mm de diâmetro. Foram preparados cortes suficientes para a incubação de transfectado e selvagem com os anticorpos primário e secundário e secundário somente (controle negativo). Os cortes foram reidratados com PBS pH 7,2 e em seguida incubados com NH_4Cl 50 mM por 30 min em TA, lavados brevemente e gentilmente em PBS e bloqueadas com solução de bloqueio por 1 hora em TA. As grades foram novamente lavadas e incubadas com o anticorpo anti-FLAG M2 (Sigma-Aldrich) diluído 1:20 na solução de bloqueio e incubado por 1 hora em TA. As grades foram novamente lavadas e incubadas com o anticorpo secundário anti-camundongo conjugado a ouro coloidal de 15 nm de diâmetro. Após lavados, os cortes foram contrastados com citrato de chumbo e uranila, lavados e secos em TA. As grades contendo os cortes foram analisadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão JOEL, modelo JEM 1400Plus. As imagens foram analisadas pelo próprio *software* de captura do equipamento.

5.11. CURVA DE CRESCIMENTO DE *Trypanosoma cruzi*.

As epimastigotas de *T. cruzi* cepa G selvagens e transfectadas (pTcNeo-Tuzina-51::3xFLAG) foram inoculadas a $0,2 \times 10^7$ células/mL em meio LIT sem antibiótico de seleção, e as culturas foram crescidas a 28 °C até a densidade de $2,0 \times 10^7$ células/mL. As células foram diluídas e cultivadas uma segunda vez nas mesmas condições. No terceiro inóculo, iniciou-se a curva de crescimento. Para tal, as células das culturas do inóculo anterior foram contadas e diluídas a $0,5 \times 10^6$ epi./mL, considerando este como o dia zero da curva de crescimento. A contagem procedeu em câmara de Neubauer (item 5.9.1) em triplicata nos dias 0; 1; 2; 3; 5; 7; 9 e 10. O total de 3 réplicas biológicas foi realizado, todas elas com método de duplo cego.

5.12. COIMUNOPRECIPITAÇÃO DE TUZINA FUSIONADA À FLAG.

5.12.1. Lise dos parasitos e incubação com resina acoplada com anti-FLAG.

Cerca de $1,0 \times 10^9$ epimastigotas, tanto da cepa G selvagem (controle negativo) quanto da cepa G transfectada com Tuzina-51::3xFLAG, foram coletadas por centrifugação a $3.000 \times g$ por 5 min a 4°C e lavadas 2 vezes em PBS 1 x. O sedimento foi ressuspensionado em 900 μL de tampão TKM (Quadro 4) contendo inibidor de protease (*cOmplete mini EDTA free*, Roche) e lisado com 100 μL da solução de lise 10 x, por 15 min em gelo, em volume total de 1 mL. O lisado foi centrifugado a $20.000 \times g$ por 20 min, a 4°C para remover células não lisadas e restos celulares. O sobrenadante coletado foi clarificado com 100 μL de leite de resina de agarose a 4°C por 30 min. O lisado clarificado foi recuperado por centrifugação a $1000 \times g$ por 1 min, a 4°C , e incubado a 40 μL da suspensão de resina de agarose covalentemente ligada ao anticorpo monoclonal anti-FLAG M2 (*Anti-FLAG M2 Affinity Gel*, Sigma-Aldrich) por 16 horas a 4°C sob agitação constante. A resina de agarose foi recuperada por centrifugação a $1000 \times g$ por 1 min e lavada em seguida com tampão de lavagem por 6 vezes. A fusão de Tuzina-51 a FLAG junto das prováveis proteínas parceiras foram eluídas com tampão de eluição complementada com 100 mM de Tris-HCl pH 8,0 para neutralizar a solução eluída. A quantidade de proteínas total foi determinada por Qubit, como descrito pelo fabricante (Invitrogen). Parte das amostras eluídas (1 μg) foi avaliada por SDS-PAGE e coloração com prata, como descrito nos itens 5.9.6 e 5.9.7. O restante das amostras (de 5 a 15 μg de proteína total) foi concentrada por centrifugação a vácuo e em seguida imobilizada em gel de SDS-PAGE corado com azul de Coomassie para análise por espectrometria de massas MS/MS.

5.12.2. Preparação da amostra para espectrometria de massas MS/MS.

As amostras imobilizadas em gel foram cortadas com lâmina de bisturi em padrão de quadrados de aproximadamente 1 x 1 mm. O tratamento das amostras foi realizada de acordo com modificações a partir de Marchini et al. (2014). Os fragmentos de gel foram descorados com tampão de descoloração a 25°C por 16 horas, desidratados com etanol absoluto e o solvente foi evaporado por centrifugação a vácuo (*SPD SpeedVac Concentrator*, Thermo Fischer Scientific). As pontes

dissulfetos das proteínas foram reduzidas com tampão de redução (Quadro 4) a 56 °C por 1 hora, alquiladas em tampão de alquilação a 25 °C por 45 min, e digeridas com tripsina em tampão de digestão a 37 °C por 18 h. A reação de digestão foi interrompida pela adição de TFA 0,5% e os peptídeos do gel foram extraídos duas vezes com solução de extração, seguido de duas extrações com acetonitrila 100%, a 25 °C por 10 min cada. A solução de peptídeos foi concentrada até 20% de seu volume inicial e dessalinizada com StageTip C18 (Thermo Fischer Scientific). Os peptídeos purificados foram analisados por espectrometria de massas MS/MS em aparelho tipo Orbitrap (Thermo Fischer Scientific), como descrito por Marchini et al. (2014). Os espectros de MS/MS foram analisados usando o programa MaxQuant (COX; MANN, 2008).

O experimento foi realizado com uma amostra teste (uma única corrida no espectrômetro de massas a partir de uma réplica biológica) e depois com duas réplicas biológicas, com corridas em triplicata. A linha de corte escolhida foi a mudança de 1,5 vezes em relação às proteínas identificadas no selvagem para a corrida teste e ao menos 3,0 vezes para aquelas identificadas nas duas réplicas. A busca de informações sobre os peptídeos identificados foi feita na base de dados TriTrypDB, bem como o enriquecimento por *Gene Ontology* (GO).

5.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA.

Todas as análises foram realizadas pelo *software* GraphPad Prism 7.01 (GraphPad Inc.). Para a curva de crescimento, o teste estatístico usado foi o teste *t* bicaudal não pareado. Para a análise dos dados em RPKM do transcriptoma realizado por Li et al. (2016), o teste usado foi ANOVA de um fator (*one way*), seguido de teste de Tuckey para comparação de médias. Foi considerado como estatisticamente significativo quando o nível de significância era inferior a 5% ($P < 0,05$).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

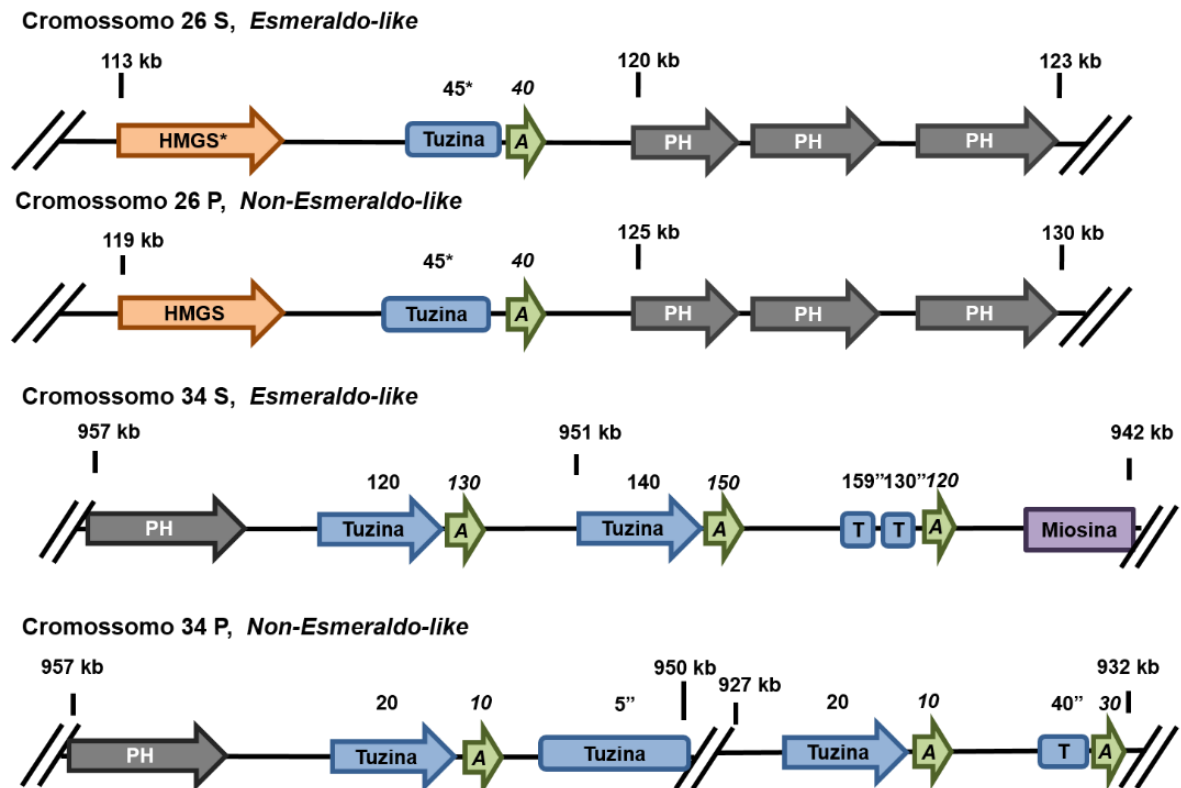
6.1. TUZINA.

6.1.1. Organização genômica e conservação.

No genoma de *Trypanosoma cruzi* clone CL Brener existem dez cópias de segmentos genômicos referentes a prováveis genes de tuzina, sendo que 4 cópias codificam uma proteína de 447 aminoácidos (aprox. 51 kDa, pI 9,01) (EL-SAYED et al., 2005; TEIXEIRA et al., 1999). Estes segmentos estão distribuídos parte no cromossomo 34 deste organismo, quatro no cromossomo referente ao haplótipo *Esmeraldo-like*, e quatro no cromossomo *non-Esmeraldo-like* (*TriTrypDB: The Kinetoplastid Genomics Resource*, 2016). Como já descrito anteriormente (JACKSON, 2010; TEIXEIRA et al., 1995), tuzina organiza-se em um bloco com genes de δ -amastinas (Figura 8). Metade destes genes são fragmentos, sem a região central ou 5'. Dois deles podem constituir-se na verdade em um único gene (TcCLB.507485.159 e TcCLB.507739.130, cromossomo 34, alelo Esmeraldo), uma vez que suas sequências não se sobrepõem entre si e TcTuz.159 é altamente conservado na região 5' de tuzina, enquanto que TcTuz.130 é mais conservado com a região central.

Adicionalmente aos segmentos do cromossomo 34, existem outras duas sequências no cromossomo 26, uma para cada haplótipo, que são pseudogenes e estão associadas aos genes de proto- δ -amastina (JACKSON, 2010). Estes pseudogenes são fragmentos do gene de tuzina que contém um ou mais códon de parada prematuros ao longo da sequência. Para outros clones de *T. cruzi* e de subespécies contendo dados de anotações (Dm28c; Sylvio X 10/1 e *T. cruzi marinkellei*), o bloco de tuzina/amastina encontra-se flanqueado por genes que codificam proteínas hipotéticas ou estão anotados em *contigs* que ainda não foram atribuídos a algum cromossomo.

FIGURA 8 – ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO GENE DE TUZINA EM *Trypanosoma cruzi* (CLONE CL BRENER).

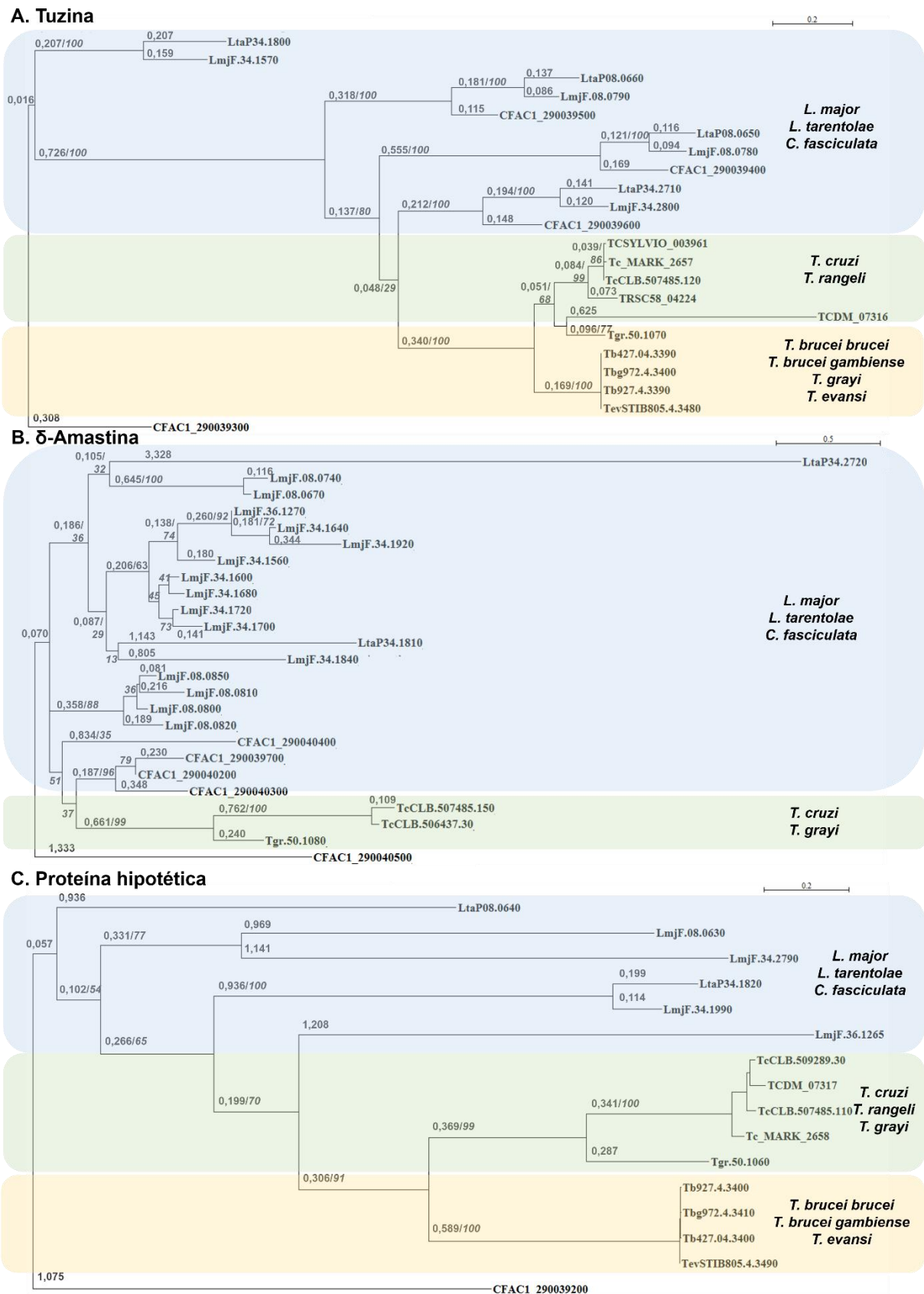


FONTE: Adaptado de *TriTrypDB: The Kinetoplastid Genomics Resource* (2016).

LEGENDA: Os genes de tuzina e seus pseudogenes estão distribuídos ao longo dos cromossomos 26 e 34, juntamente com genes de δ -amastinas. Os números acima indicam os últimos números do ID no banco de dados TriTrypDB para cada cromossomo. Pseudogenes são representados por caixas e pelo símbolo *, e os fragmentos de genes, por ". Genes são representados por setas. Números em itálico referem-se aos genes de amastina, assim como a capitulação normal refere-se aos genes de tuzina. A = amastina; HMGS = 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintase; PH = proteína hipotética; T = tuzina.

Esta organização de tuzina junto de amastina está presente em diversas espécies de *Leishmania* e em *T. cruzi*, exceto em *T. brucei*, no qual a δ -amastina está ausente (JACKSON, 2010). A fim de avaliar o grau de divergência das tuzinas em diferentes tripanossomatídeos (*T. cruzi*, *T. brucei*, *T. evansi*, *T. rangeli* e *Leishmania* sp) e comparar com o padrão das amastinas presentes no mesmo cluster foi realizada análise filogenética dos genes de tuzina e de δ -amastina presentes no banco de dados TriTrypDB (Figura 9). Por último, uma árvore filogenética foi construída com as proteínas hipotéticas que localizam-se a montante do cluster de tuzina/amastina. Estas proteínas foram escolhidas por também estarem presentes e de maneira conservada nos tripanossomatídeos analisados. Como pode ser visto na Figura 9A, tuzinas de diferentes cepas e subespécie de *T. cruzi* estão mais próximas entre si, enquanto que nas espécies de *Leishmania* analisadas as diferentes tuzinas identificadas agrupam-se de acordo com o tipo de tuzina, além pela espécie. Este padrão acompanha aquele para análise com δ -amastinas (Figura 9B), ou seja, os agrupamentos de tuzinas seguem o padrão de conservação das amastinas. Esses dados mostram que a diversidade de tuzinas em *Leishmania* acompanha a diversidade de δ -amastinas. A similaridade entre as tuzinas de *T. cruzi* e de *T. brucei* é maior que 80%, enquanto que para *Leishmania* spp. e *C. fasciculata* este valor não ultrapassa 50%, mostrando uma maior divergência das tuzinas de *T. cruzi* em comparação com *Leishmania*. A julgar pelo aspecto da árvore filogenética para GAPDH, conforme publicado anteriormente (JACKSON, 2010; HAMILTON et al., 2009) e para a proteína hipotética (Figura 9C), esta última também apresentou padrão semelhante às tuzinas. Em resumo, parece que a expansão das δ -amastinas de *Leishmania* resultando em diversidade dos membros dessa família descrita por Jackson (2010) também ocorreu com tuzinas. Contudo é prematuro especular qualquer associação funcional entre essas proteínas.

FIGURA 9 – ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS SEQUÊNCIAS DE DIFERENTES ESPÉCIES E CEPAS DE TRIPANOSSOMATÍDEOS.

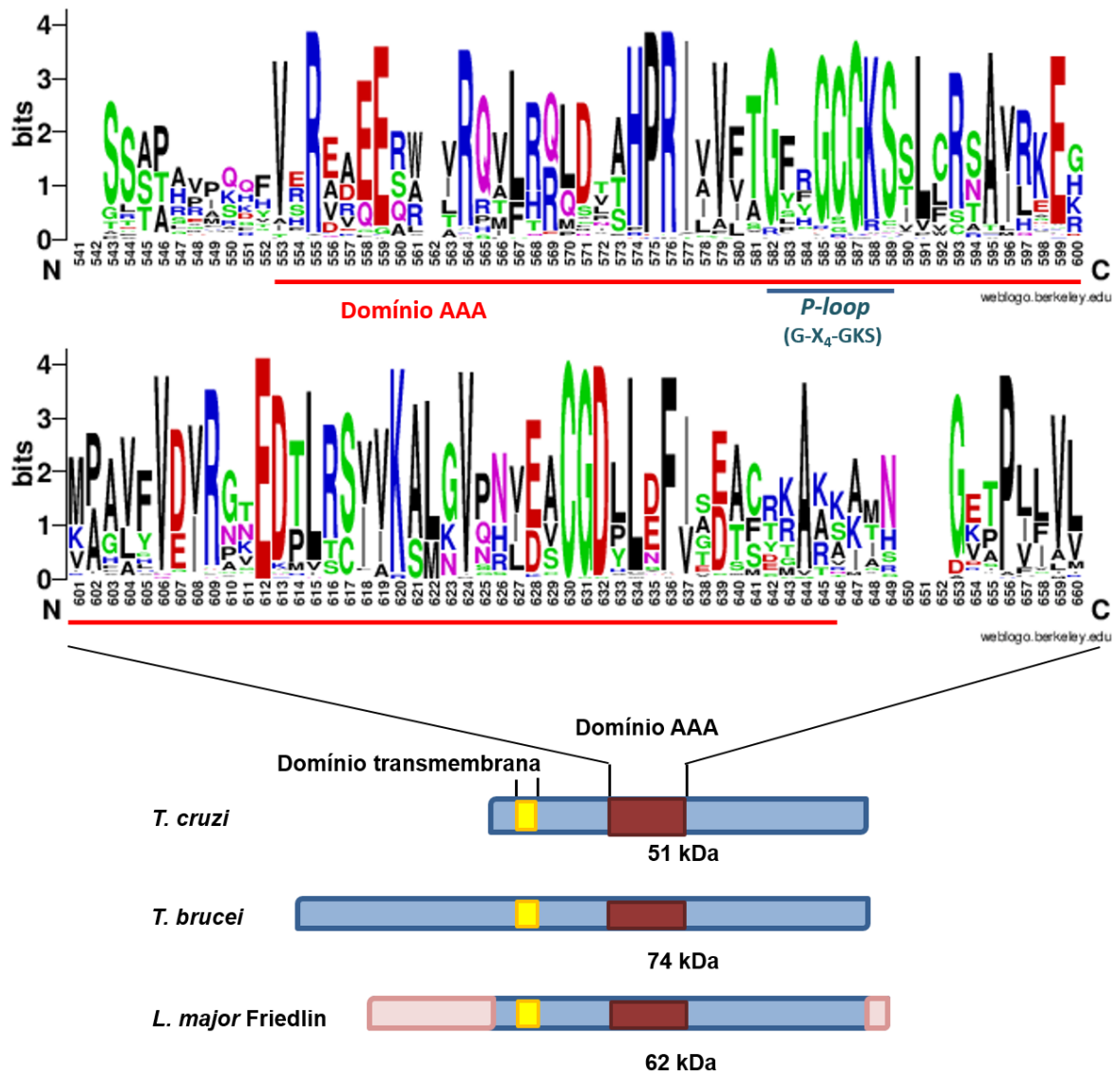


Dos escassos dados da literatura publicada até o momento sobre tuzina, alguns autores afirmam que, devido à presença de um região transmembrana central predita, esta proteína esteja localizada em alguma membrana (JACKSON, 2010; LAKSHMI et al., 2014; TEIXEIRA et al., 1999) e que possui provável atividade de ATPase/GTPase (TEIXEIRA et al., 1999). Por isso, submetemos as sequências de tuzina encontradas no banco de dados TriTrypDB a análises de reconhecimento de domínio conservados e de homologia com outros organismos. Foi encontrado uma região hidrofóbica, sugerindo uma região transmembrana ou apenas um *core* hidrofóbico. Além de um domínio provisório identificado apenas como “tuzina”, encontramos também uma região referente à família AAA+ (ATPases associadas à várias funções celulares), sugerindo a atividade de hidrólise de nucleotídeos. Nas anotações para o gene de tuzina no banco de dados TriTrypDB, encontramos uma região contendo um motivo de *P-loop* hidrolase também presente para as tuzinas de *T. brucei*, *T. cruzi* e de *Leishmania* spp. Existe conservação para este domínio, também chamado de *Walker A* e formado por G-X₄-GKS, sendo que X representa qualquer aminoácido e K (lisina) é o aminoácido essencial na ligação ao ATP/GTP (Figura 10). Contudo, não conseguimos localizar com precisão a posição do motivo *Walker B*, necessário para a ligação do íon de magnésio e localizado tipicamente logo a jusante de *Walker A*. *Walker B* é formado pela sequência hhhhDE, sendo que h representa qualquer aminoácido hidrofóbico, D (aspartato) é responsável por coordenar o íon de magnésio e E (glutamato), ativa a molécula de água para a hidrólise de ATP/GTP (HANSON; WHITEHEART, 2005). É possível que o motivo *Walker B* de tuzina seja pouco conservado nesta proteína.

Além dos domínios transmembrana e de AAA, as regiões com maior identidade de tuzina entre os tripanossomatídeos aparentam ser a região central e C-terminal desta proteína (Apêndice 1). Essas regiões são coerentes com a estrutura primária de tuzina de 51 kDa, sugerindo que esta arquitetura seja a mais comum entre os tripanossomatídeos. Igualmente interessante, a região N-terminal é a menos conservada. Isso pode ser visto nas tuzinas de *Leishmania* sp e de *T. brucei*, as quais são bastante divergentes nesta região em comparação com *T. cruzi*. Considerando que peptídeos sinais são comumente encontrados na porção N-terminal, é provável que em *Leishmania* sp. e *Crithidia* tuzina apresente um padrão de localização celular distinto com funções conseqüentemente diferentes de TcTuzina. Essa hipótese é reforçada pelos ramos divergentes ocupados pelas tuzinas de *L. braziliensis*; *L.*

tarentolae e *C. fasciculata* (Figura 9), sugerindo que nestes organismos em especial, tuzina possa ter formado subfamílias com alguma função especializada específica destes protozoários.

FIGURA 10 – REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DE TUZINA.

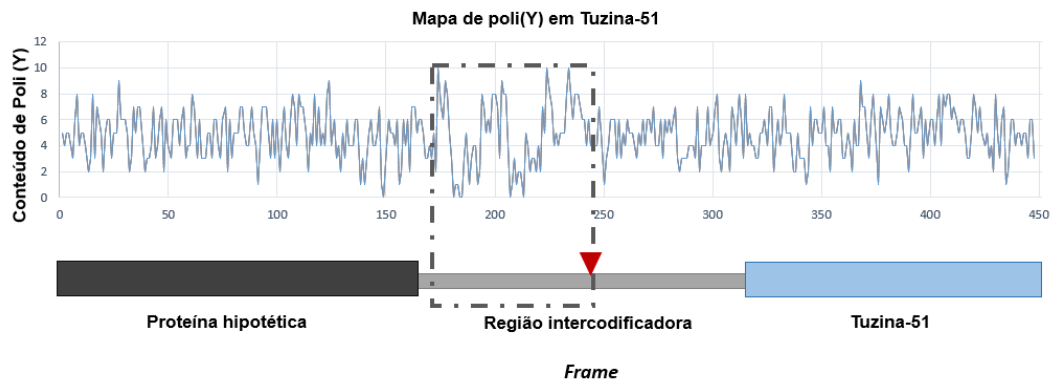


LEGENDA: *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major* apresentam estrutura semelhante no domínio transmembrana e no domínio AAA, o qual contém o motivo *P-loop* de nucleotídeo hidrolase, ou *Walker A* (diagrama inferior). A tuzina de *T. brucei* possui uma extensão na região N-terminal da proteína. A de *L. major* possui menor identidade na região N-terminal. O detalhe acima, representa o alinhamento em gráfico, mostrando a conservação entre várias espécies e cepas de tripanossomatídeos, para o domínio AAA.

As tuzinas de *T. cruzi*, *T. brucei* e de *Leishmania* compartilham semelhança estrutural em termos de domínios, no entanto, suas massas moleculares não são semelhantes. Enquanto as TcTuzinas possuem em torno de 50 kDa, a única tuzina de *T. brucei* é uma proteína maior, com 74 kDa. Para *Leishmania* spp., o repertório de

tuzinas é ainda mais diverso, com variação de 30 a 75 kDa na massa molecular. Contudo, em *T. cruzi* clone CL Brener, para a primeira tuzina do cluster (TcCLB.507485.120, cromossomo 34, alelo Esmeraldo), possui um códon de início alternativo localizado a 696 nucleotídeos do códon predito, em uma região que originalmente compreenderia a porção intercodificadora a montante do gene. Conseqüentemente, uma proteína de 75 kDa seria produzida, referida aqui como Tuzina-75, além da proteína de 51 kDa (Tuzina-51). Para avaliar a possibilidade de que haja mais códons de início a montante de Tuzina-51, foi construído um mapa de polipirimidinas (poliY) de toda a região genômica desde o códon inicial da proteína hipotética (TcCLB.507485.110, cromossomo 34, alelo Esmeraldo) até o códon de parada do gene de Tuzina-51 (TcCLB.507485.120) (Figura 11). Foi observado que existe uma frequência maior de poliY (timinas e citosinas) entre as regiões que correspondem ao fim da codificadora da proteína hipotética até cerca de 800 nucleotídeos a montante do gene de Tuzina-51. O fim desta região corresponde a um dos códons de início que encontramos para a Tuzina-75. Estas análises são corroboradas pelos resultados de mapeamento de leituras de RNAseq contendo a sequência de *spliced leader* no genoma do clone Dm28c de *T. cruzi* (DAS NEVES, 2015). Nesta análise, um possível sítio alternativo de *trans-splicing* foi identificado a montante do sítio usual de Tuzina-51, que é compatível com a presença de uma ORF mais longa (TcTuzina-75), sugerindo a expressão de ambos os transcritos (Figura 10 e Anexo 1).

FIGURA 11 – MAPA DE POLIPIRIMIDINA DE TUZINA.



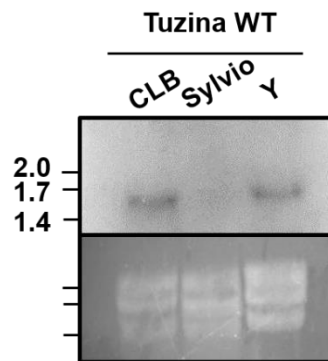
LEGENDA: A região pontilhada representa a posição no genoma de *T. cruzi* onde a frequência de polipirimidinas é maior (eixo y). O local no genoma é representado no eixo x. O triângulo invertido mostra a posição de um possível códon de início que codificaria a Tuzina-75.

Esta versão de tuzina com 75 kDa se assemelha à tuzina de *T. brucei* (74 kDa), com 70,6% de identidade. Estes dados indicam a possibilidade desta versão de 75 kDa ser expressa em *T. cruzi*. Para isso, a abordagem molecular da expressão de tuzina foi realizada, como discutida nos tópicos a seguir.

6.1.2. Padrão de expressão de tuzina

Uma vez que nossas análises *in silico* apontaram para a existência de uma nova versão de tuzina, decidimos testar se haveria um transcrito de tuzina compatível com a versão de maior massa molecular. Através de análise por *Northern blot* em diferentes cepas e com longa exposição, apenas um transcrito foi identificado, correspondente à Tuzina-51 na cepa Y e no clone CL Brener, mas não no clone Sylvio X 10/1 (Figura 12). É possível que a expressão de tuzina em Sylvio X 10/1 esteja abaixo do limite de detecção.

FIGURA 12 – EXPRESSÃO DE TUZINA EM EPIMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi*.



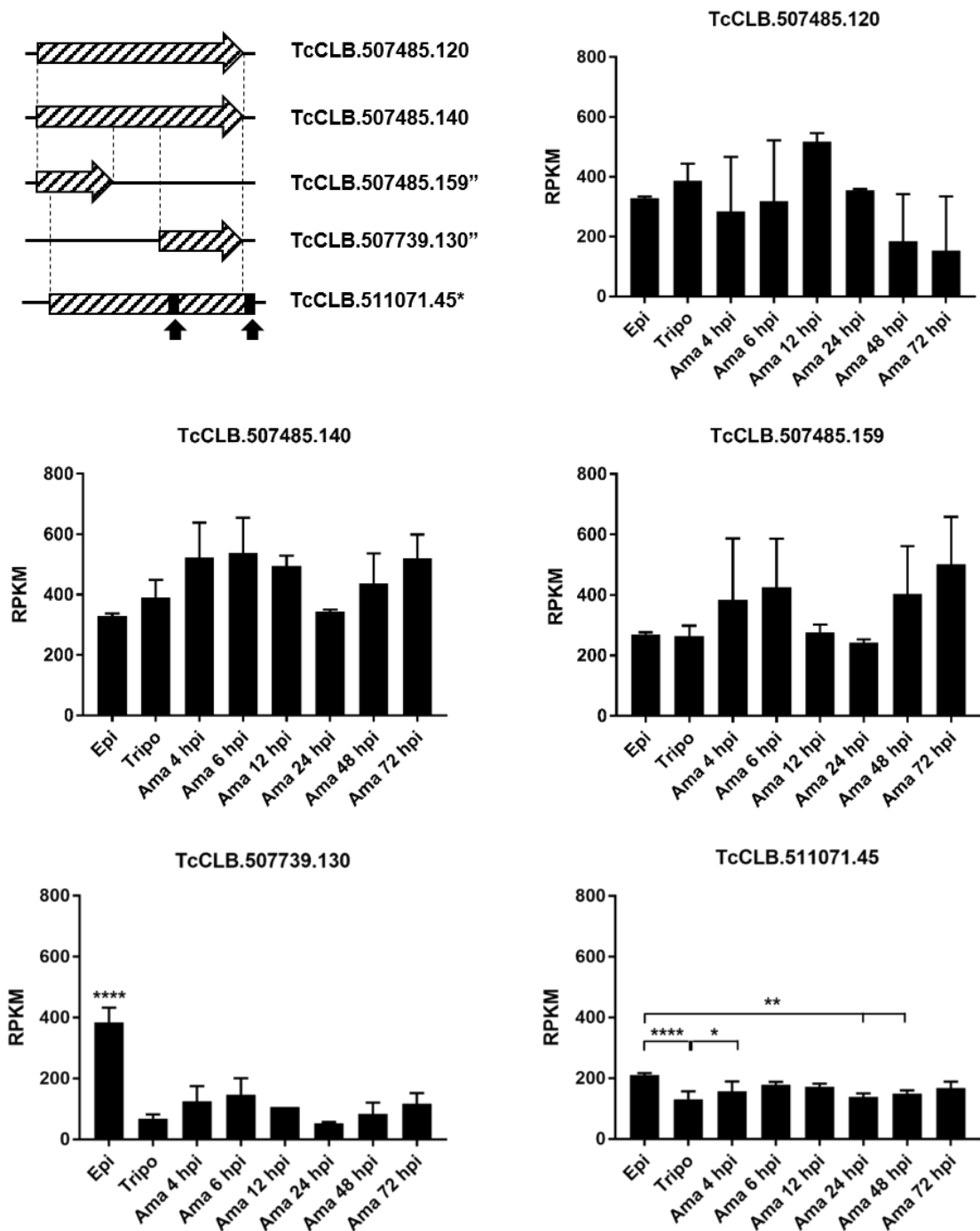
LEGENDA: Análise de *Northern blot* dos transcritos de tuzina nas formas selvagens dos clones CL Brener (CLB), Sylvio X 10/1 e da cepa Y. No painel de cima é mostrada a hibridação com sonda radiomarcada com [α - P^{32}] -dCTP. No painel inferior é mostrado a foto do gel de agarose desnaturante corado com brometo de etídeo na posição referente aos RNAs ribossômicos. WT = selvagem.

Recentemente, Li et al. (2016) publicaram um estudo do transcriptoma por mRNA-Seq da cepa Y de *T. cruzi*, durante a infecção em células de fibroblastos humanos. A partir dos dados brutos deste trabalho (*raw counts*), foi possível determinar os valores de RPKM (leituras por quilobases por milhão), permitindo a visualização do perfil de expressão de tuzina nesta cepa ao longo de seu ciclo de vida. Como pode ser visto, a expressão de uma das variantes de tuzina é maior na forma

epimastigota (TcCLB.507739.130, figura 13). Para as demais versões dos genes, não houve diferença de abundância do transcrito ao longo do ciclo de vida. Parte destes dados estão de acordo com aquele mostrado na figura 12, em que os transcritos nos epimastigotas da cepa Y foram detectados. O padrão de expressão difere daquele observado para a cepa Tulauén (TEIXEIRA; KIRCHHOFF; DONELSON, 1995), na qual tuzina também é expressa em amastigotas. É possível que exista diferença de expressão de tuzina entre as cepas Y e Tulauén. É importante salientar que, devido à maneira pela qual os transcritos foram mapeados neste trabalho (LI et al., 2016), não foi possível determinar qual deles pertence à Tuzina-75. Por fim, um dado interessante foi que um dos genes identificados está anotado como um pseudogene no genoma de CL Brener. É provável que na cepa Y, cujo genoma sequenciado ainda não está disponível, este gene não seja um pseudogene e que seja transcrito em quantidades menores do que as demais versões.

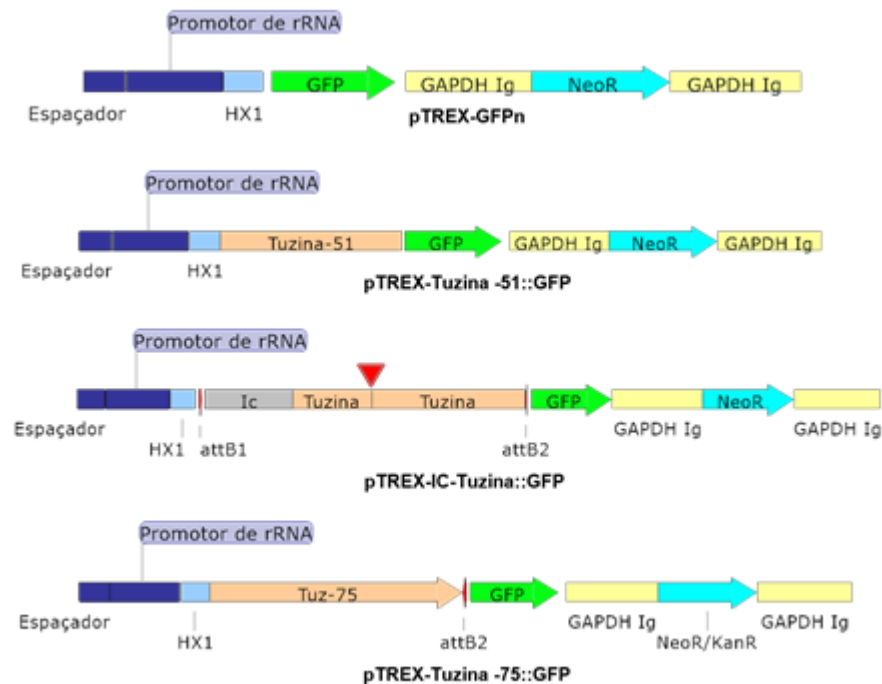
6.1.2.1. Análise da expressão de tuzina por genética reversa.

Uma vez que a detecção de tuzina ocorreu apenas com exposições mais longas do filme ao radionuclídeo (Figura 12), procuramos aumentar a expressão deste gene e de suas variantes utilizando o vetor pTREX. Este vetor contém o promotor de rRNA aumentando a expressão do transgene, juntamente com HX1 e gGAPDH como acceptor de *splicing* e de poliadenilação, respectivamente (MARTÍNEZ-CALVILLO et al., 1997; VAZQUEZ; LEVIN, 1999). Para isso, Tuzina-51; Tuzina-75 e a região intercodificadora (IC) de Tuzina-51 foram fusionadas a GFP em vetor pTREX e transfectados em epimastigotas das cepas Y e G, e no clone Sylvio X 10/1 (Figura 14). Análises de citometria de fluxo dos parasitos resistentes mostrou que somente a expressão da construção de Tuzina-51::GFP foi detectada, ao contrário das construções contendo a intercodificadora selvagem (IC-Tuzina::GFP) e Tuzina-75::GFP (Figura 15). Sabe-se que a região 5' UTR de Tuzina-51 não é uma potente acceptora de SL (TEIXEIRA et al., 1999), e por essa razão previmos que mesmo com a presença de HX1 (5'UTR), a polipirimidina presente na intercodificadora de Tuzina-75 serviria como sequência direcionadora do processamento do 5'UTR, por estar mais próxima da região codificadora de tuzina. Cabe ressaltar que as transfecções estáveis com a construção Tuzina-75::GFP em Y e Sylvio X 10/1 não geraram populações resistentes a G418, sugerindo uma possível instabilidade destas construções.

FIGURA 13 – EXPRESSÃO DE TUZINA EM *Trypanosoma cruzi* (CEPA Y).

LEGENDA: Acima à esquerda é mostrado o esquema da conservação das cópias de tuzina entre os genes cuja expressão foi quantificada por Li et al. (2016). As setas escuras mostram as regiões sem conservação com nenhum dos genes de tuzina neste alelo. O símbolo * e o retângulo representam pseudogenes, enquanto que o símbolo “ se refere a fragmentos gênicos. Os níveis de transcritos foram expressos em RPKM para as formas evolutivas epimastigotas (epi), tripomastigotas (tripo) e amastigotas (ama), isoladas 4, 6, 12 e 24 horas pós-infecção (hpi) em células de fibroblasto humano. São representados os valores de P somente para os dados com significância estatística ($P < 0,05$), determinados por ANOVA de um fator, seguido de teste de Tuckey. * = $P \leq 0,05$; ** = $P \leq 0,01$; *** = $P \leq 0,001$; **** = $P \leq 0,0001$. Dados brutos provenientes de Li et al. (2016).

FIGURA 14 - VETORES USADOS PARA A EXPRESSÃO DE TUZINA E VARIANTES EM FUSÃO À GFP.

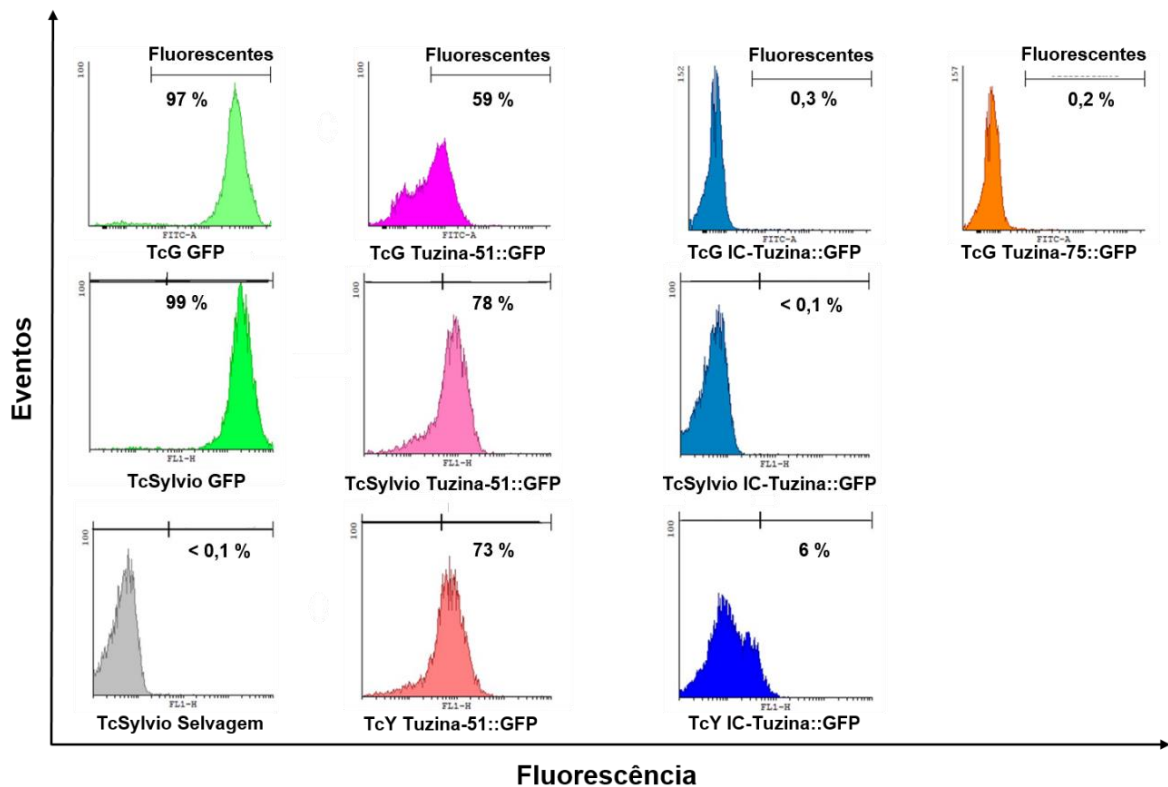


LEGENDA: Vetores usados para a expressão de tuzina e suas variantes. Eles estão representados nas formas linear para fins didáticos. O triângulo invertido em pTREX-IC-Tuzina::GFP mostra o ATG para a tuzina de 51 kDa.

A expressão que Tuzina-51::GFP possui fluorescência significativamente pequena quando comparada a GFP somente (Figura 15). Considerando que esta construção não possuía as pequenas ORFs que sabidamente reduzem sua expressão (TEIXEIRA et al., 1999), é provável que ambas as tuzinas sofram regulação negativa a nível traducional, e que em Tuzina-75::GFP esta regulação seja mais pronunciada a ponto de permanecer indetectável pelas técnicas aqui utilizadas. Outra possibilidade, seria sua expressão em apenas outras formas do parasito, que não a epimastigota. Apesar de nossos dados experimentais não mostrarem a expressão da versão maior de tuzina, Das Neves (2015) (Anexo 1) identificou um sítio acceptor de SL em *T. cruzi* Dm28c, semelhante ao predito para CL Brener. Além disso, este autor aponta alta frequência de adição de SL para Tuzina-51 em detrimento de Tuzina-75, resultado de maior estabilidade do transcrito, ou maior número de cópias dos genes de Tuzina-51. Análises adicionais seriam necessárias para elucidação desse processo, tais quais o uso de anticorpos tuzina específicos e PCR em tempo real. Como conclusão, é pouco provável que os dados *in silico* aqui apresentados sejam

artefatos encontrados no genoma de CL Brener. Logo, nossas evidências suportam a existência de uma versão maior de tuzina com 75 kDa em *T. cruzi*, com expressão fortemente regulada.

FIGURA 15 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TUZINA E VARIANTES EM FUSÃO À GFP EM FORMAS EPIMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi*.



LEGENDA: Citometria de fluxo das populações selvagens (controle negativo), transfectadas com vetores de tuzina e variações com GFP (controle positivo), como esquematizados na Figura 14. Um total de 10.000 eventos foi analisado, como descrito em Material e Métodos.

A tuzina de *T. brucei* é maior do que a tuzina presente em *T. cruzi*. Ela possui 74 kDa, tamanho próximo ao predito para a tuzina de 75 kDa (Figura 10). Devido a essa semelhança entre a massa molecular das duas proteínas, realizamos o alinhamento das sequências de aminoácidos entre a tuzina de *T. brucei* (Tb927Tuz) e a predita para a Tuzina-75 de *T. cruzi* (TcTuz75) (Figura 16). Observamos que as duas proteínas são conservadas em toda sua extensão, inclusive na região N-terminal de TcTuzina-75. Analisamos a possibilidade de TbTuzina ter sido anotada incorretamente, e se ela expressaria na realidade uma versão com tamanho semelhante à de TcTuzina-51. Essa hipótese mostrou-se pouco provável, pois uma sequência de peptídeo na região que codificaria a metionina análoga a de TcTuzina-51 foi identificada no fosfoproteoma deste organismo, além de outro na região N-

Outra informação interessante identificada no alinhamento mostrado na Figura 16, é que alguns peptídeos identificados no fosfoproteoma de *T. brucei* são conservados em TcTuzina, com especial atenção aos aminoácidos serina e treonina, os quais são alvo de fosforilação. Assim, é possível que TcTuzina seja regulada/modificada por fosforilação nestas regiões.

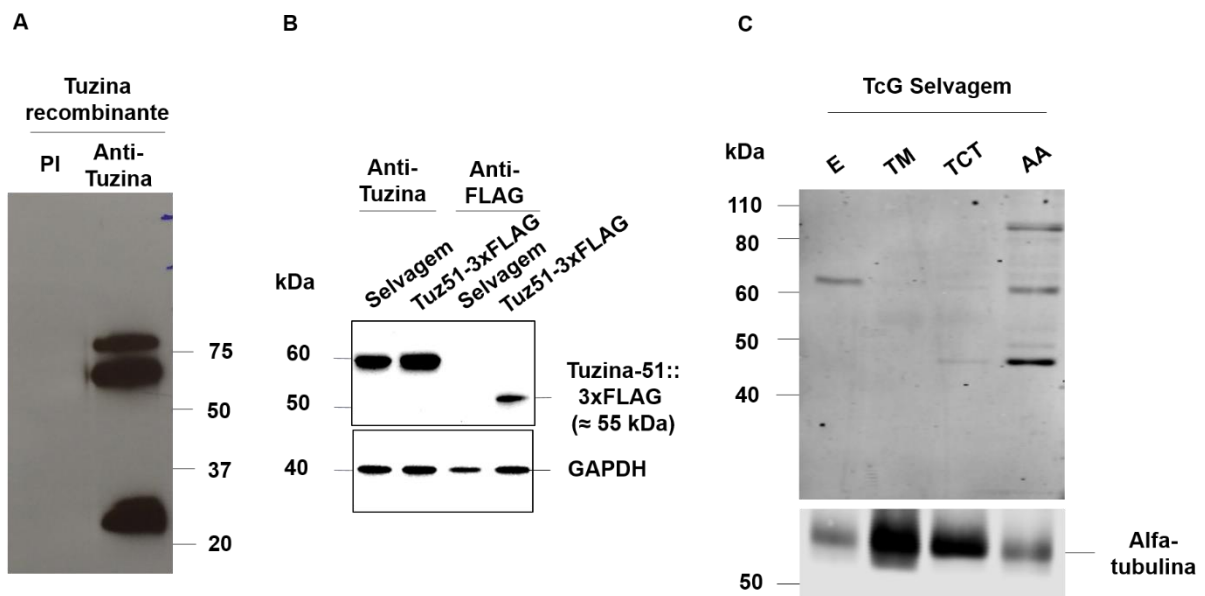
6.1.2.2. Análise da expressão de tuzina utilizando soro anti-tuzina

Afim de detectar a expressão de tuzina em extratos totais de parasitos selvagens, o soro contra esta proteína foi produzido em camundongos BALB/c inoculados com a proteína recombinante em fusão à GST (GST-Tuzina), purificada de *E. coli*. Antes de utilizá-lo, fizemos testes contra a proteína purificada, em extratos de proteína total tanto de *T. cruzi*, quanto de *E. coli*. O soro apresentou reatividade contra a proteína purificada, e uma única banda acima de 50 kDa no extrato de *T. cruzi* cepa G selvagem. Como esperado, o soro pré-imune não apresentou reatividade em nenhuma das amostras (Figura 17A). Apesar de reativo contra tuzina purificada, o soro anti-tuzina não reconheceu a proteína fusionada à 3xFLAG (Figura 17B) no extrato do parasito transfectado. Além disso, neste experimento pudemos observar que a banda correspondente à tuzina selvagem se apresentava maior do que a fusão Tuzina::3xFLAG (55,5 kDa), sendo que o oposto deveria ser visto. Testando o soro anti-tuzina contra o extrato de outras formas de *T. cruzi* (ciclo de vida), observamos a alteração do padrão anteriormente evidenciado em epimastigotas, com o surgimento de múltiplas bandas de massas moleculares variadas (Figura 17C). É interessante mencionar que a proteína de 60 kDa não foi identificada no extrato de TCT, sugerindo regulação diferencial ao longo do ciclo de vida. Diante desses resultados nos extratos de *T. cruzi*, aventamos a possibilidade de reação inespecífica do soro obtido.

Para avaliar a especificidade deste soro, testamos sua reação contra extratos totais de *E. coli* expressando a fusão de tuzina a GST, em paralelo de incubação com competidor, neste caso, o lisado e *E. coli* cultivada nas mesmas condições da população expressora de GST-Tuzina. O soro reagiu inespecificamente com as proteínas bacterianas, em especial uma proteína em torno de 60 kDa, massa molecular semelhante àquela observada no extrato de *T. cruzi* (Figura 18A). Neste ensaio, não pudemos observar a tuzina recombinante, apenas quando as amostras foram incubadas com o soro anti-tuzina acrescido do competidor (Figura 18B). Desse

modo, confirmamos a existência de anticorpos anti-tuzina neste soro, mesmo que com menor titulação em relação às demais proteínas de *E. coli*. O mesmo ensaio de competição foi realizado nos extratos de *T. cruzi* selvagem e expressando Tuzina-51::3xFLAG (Figura 18C). Houve uma redução de intensidade da banda próxima de 60 kDa, e aquela referente a tuzina fusionada a FLAG não foi observada.

FIGURA 17 – TESTE DE REATIVIDADE DO SORO ANTI-TUZINA CONTRA EXTRATOS DE *Trypanosoma cruzi*.

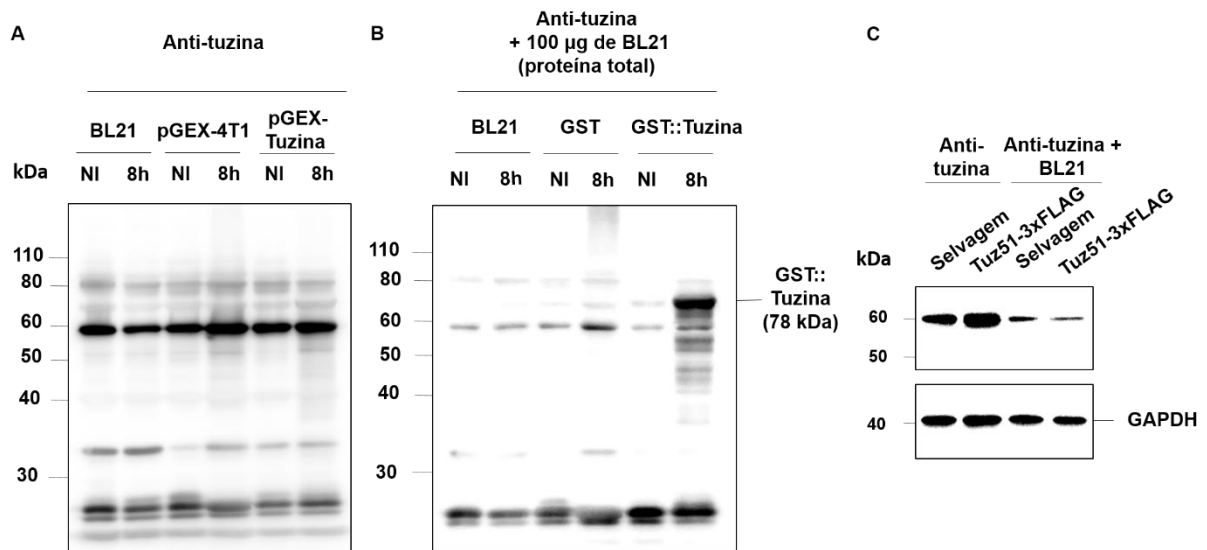


LEGENDA: Em A, o soro obtido da punção cardíaca foi testado contra 1 µg proteína recombinante purificada, na diluição de 1:1000. O soro pré-imune (PI), também foi testado nas mesmas condições para descartar reações inespecíficas. (B) O soro anti-tuzina foi testado contra os extratos de epimastigotas selvagens e de transfectantes expressando tuzina com 3xFLAG, em comparação com anticorpos anti-FLAG, ambos na diluição de 1:1000. O soro anti-GAPDH foi usado como normalizador. (C) O soro anti-tuzina foi usado em extratos totais de *T. cruzi* selvagem. Anti-tubulina foi usado como normalizador. As reações de *Western blot* foram reveladas por quimioluminescência com captura em filme (A) ou digital (B), ou por fluorescência (C), como descrito em Material e Métodos. E = epimastigota, TM = tripomastigota metacíclico, TCT = tripomastigota derivado de cultura de tecido; AA = amastigota axênica. Os números na lateral indicam a massa molecular, em kDa, com marcador comercial Bio-Rad (A) e Novex Sharp (Invitrogen) (B e C)

Teixeira et al. (1999) já haviam tentado identificar tuzina utilizando anticorpos anti-peptídeo em extratos em *T. cruzi* sem sucesso. De maneira semelhante, o soro que produzimos contra a proteína recombinante parece não identificar tuzina endógena ou superexpressa em extratos de cepa G. É possível que isso tenha ocorrido não apenas pela baixa avidéz dos anticorpos à tuzina, mas também pela baixa expressão desta proteína, como já descrito anteriormente. É provável que a banda de 60 kDa seja produto da reação inespecífica do soro. Para confirmarmos esta

hipótese, repetiremos a produção do soro alterando o método de purificação da proteína recombinante para o de extração do gel de SDS-PAGE seguido de eletroeluição. A identificação da proteína purificada por espectrometria de massas também será realizada.

FIGURA 18 – TESTE DE COMPETIÇÃO DO SORO ANTI-TUZINA.



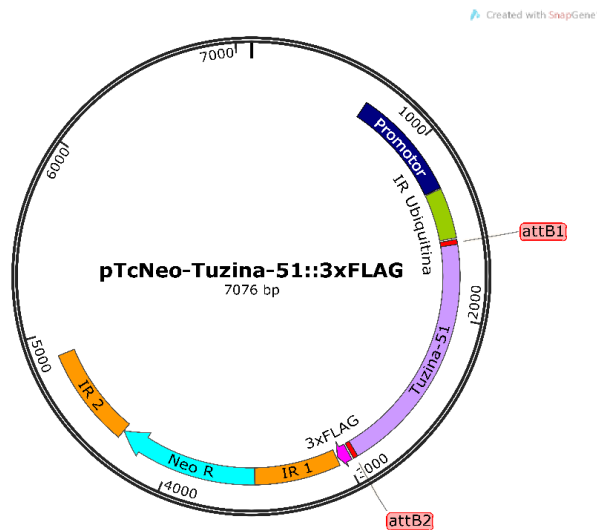
LEGENDA: (A) O soro de anti-tuzina (1:1000) foi testado em extratos de proteína total de *E. coli* não induzida (NI) e induzida por 8 h, como descrito em Material e Métodos. (B). O soro de anti-tuzina (1:1000) foi incubado com 100 μ g de proteína total de *E. coli* BL21, como descrito em Material e Métodos, e testado contra o extrato total bacteriano induzido por 8 h e não induzido (NI). (C). Os extratos totais de epimastigotas de *T. cruzi* selvagem e superexpressando tuzina com 3xFLAG foram incubados nas mesmas condições de (B). O *Western blot* foi revelado por quimioluminescência com captura digital (Material e Métodos). BL21 = extrato total de *E. coli* usado como controle negativo, nas duas situações; GST = extrato de *E. coli* transformada com o vetor pGEX-4T1, o qual expressa GST somente; GST::Tuzina = extrato de *E. coli* contendo o vetor pGEX-Tuzina, expressando tuzina em fusão a GST.

Em virtude da inespecificidade do soro e sua incapacidade em reconhecer a tuzina nos extratos de *T. cruzi*, este soro não era adequado para os experimentos de coimunoprecipitação, imunolocalização e para a análise da expressão de tuzina. Por isso, realizamos estes experimentos com parasitos expressando de forma ectópica tuzina fusionada com etiquetas ou genes repórteres passíveis de serem identificados por técnicas convencionais.

6.1.3. Localização celular e provável função de tuzina.

A presença de um possível domínio transmembrana na estrutura de tuzina nos levantou a questão se essa proteína poderia estar associada à alguma organela ou à membrana citoplasmática, informação que poderia nos guiar para a possível função de tuzina. Por isso, fizemos a imunolocalização desta proteína, fusionada à etiqueta de 3xFLAG (Figura 19), em epimastigotas da cepa G de *T. cruzi*. Optamos por esta construção porque a fusão de tuzina a GFP, clonada no vetor pTREX, estava apresentando perda da fluorescência, o que dificultou as análises posteriores (dados não mostrados). É importante mencionar que devido à baixa expressão observada para a fusão com GFP, averiguamos se o vetor pTREX era capaz de integrar no genoma de *T. cruzi*, pois o evento de integração é um passo importante para a expressão estável de genes ectópicos. Para tal, realizamos a eletroforese em campo pulsado (PFGE) de epimastigotas transfectantes de pTREX-GFPn (Apêndice 2) e confirmamos a integração deste vetor no loco do rRNA, assim como previamente descrito (LORENZI; VAZQUEZ; LEVIN, 2003). Logo, a baixa expressão de tuzina em fusão a GFP se deve possivelmente às características regulatórias da proteína e/ou à natureza da etiqueta de GFP. A última é uma proteína de 27 kDa, em comparação aos 5 kDa da etiqueta de 3XFLAG. Logo, a maior massa molecular da etiqueta de GFP pode ter interferido com a estrutura de tuzina, levando à redução de sua expressão.

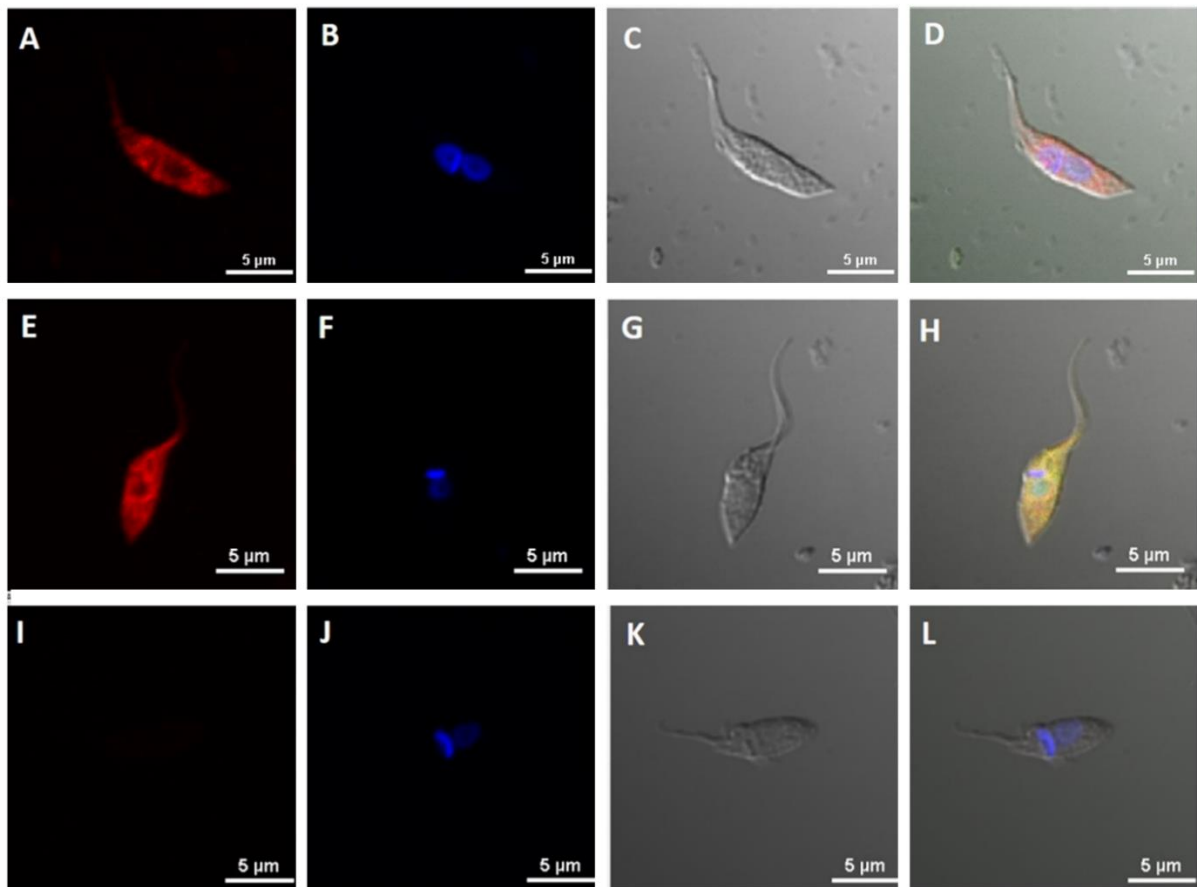
FIGURA 19 - VETOR DE EXPRESSÃO DE TUZINA FUSIONADA À ETIQUETA DE 3XFLAG.



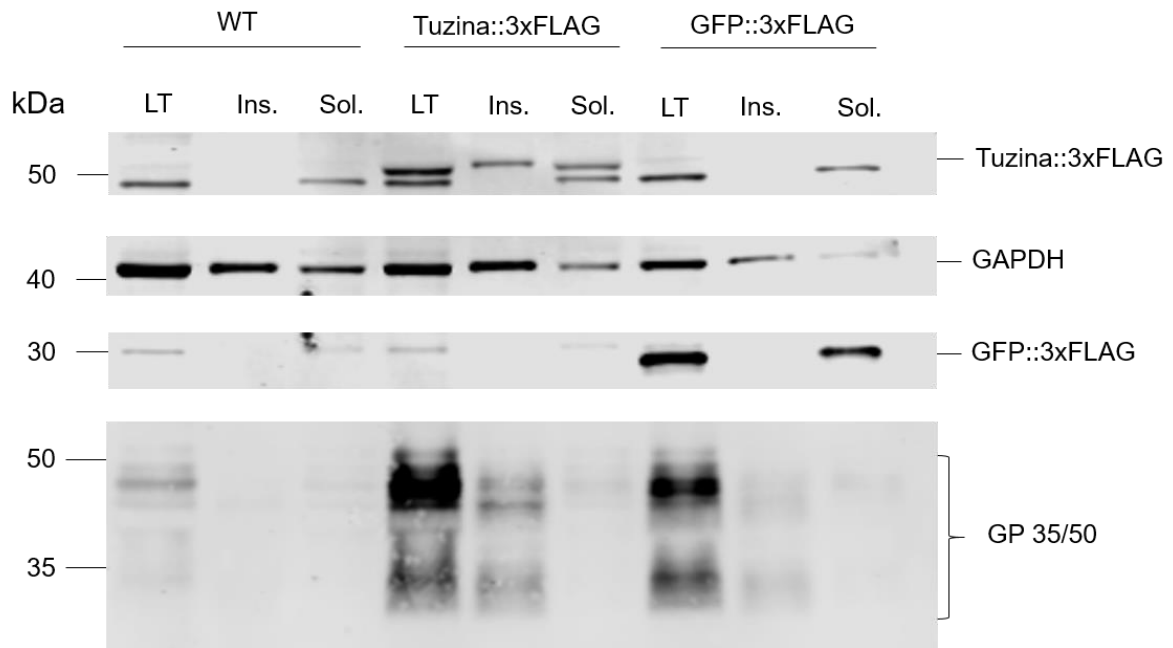
LEGENDA: Os sítios *attB* são utilizados para recombinação pelo sistema Gateway®. A etiqueta 3xFLAG se refere a 3 epitopos de FLAG em sequência.

A localização de Tuzina-51::3xFLAG sugere marcação difusa, semelhante à GFP::3xFLAG (Figura 20), distribuída por toda extensão do parasito. Para identificar se Tuzina-51 estaria totalmente citoplasmática, como apontou a localização por imunofluorescência, realizamos o fracionamento subcelular em duas porções: solúvel (citoplasmática) e insolúvel (de membrana plasmática e organelas) (Figura 21). Identificamos que a Tuzina-51 está presente em ambas as frações, com maior intensidade na fração insolúvel. Esse dado sugere que esta proteína esteja associada diretamente à alguma organela ou à membrana, ou à proteína que esteja associada a ela.

FIGURA 20 – LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE TUZINA EM *Trypanosoma cruzi* (CEPA G).



LEGENDA: Imunolocalização contra 3xFLAG em epimastigotas de *T. cruzi* expressando Tuzina-51::3xFLAG (A-D) e GFP::3xFLAG (E-H). Epimastigotas selvagens foram usados como controle negativo (I-L). Os quadros A, E e I mostram a marcação de anti-FLAG com Alexa-Fluor-568; B; F e J mostra o núcleo e cinetoplasto corados com DAPI; C, G e K mostram o contraste interfacial diferencial (DIC); D, H e L mostram a sobreposição das imagens com Alexa-Fluor-568, DAPI e DIC.

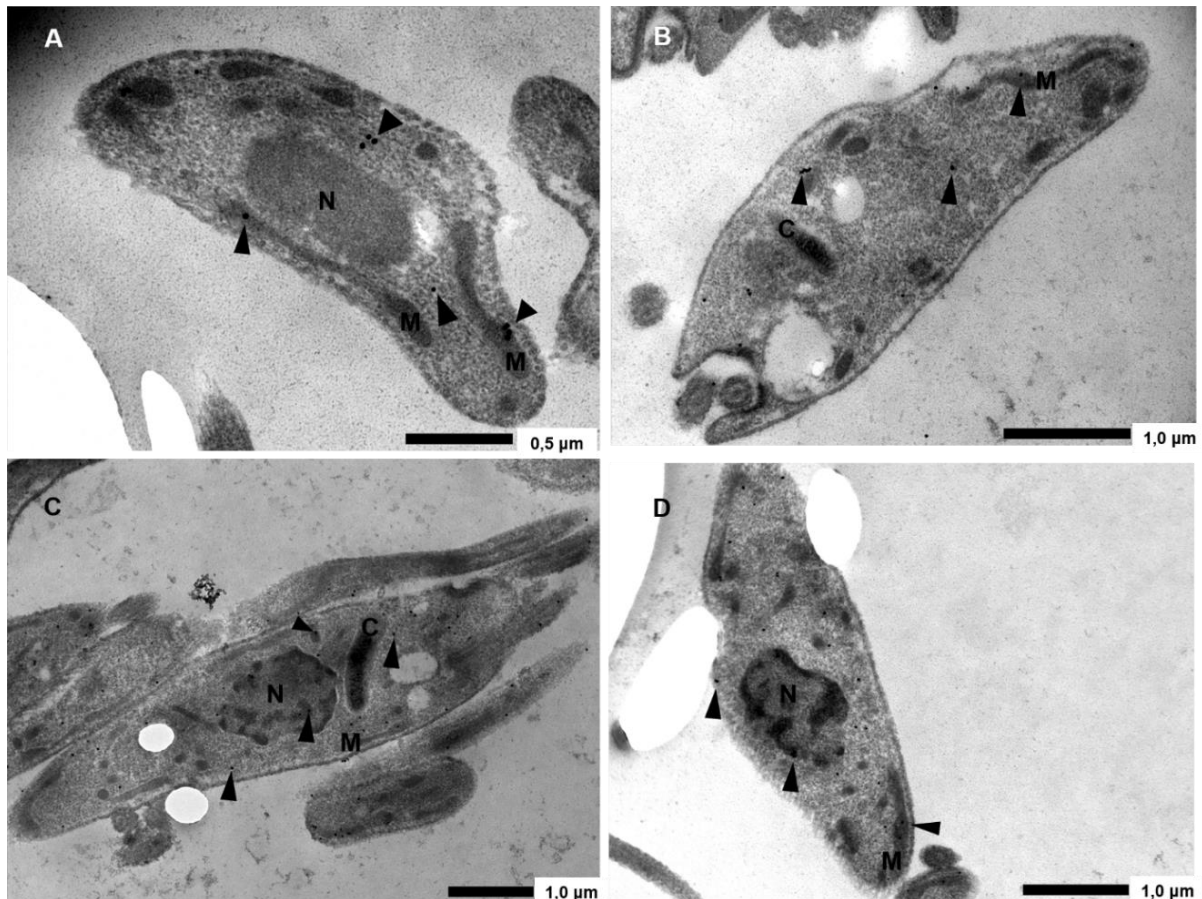
FIGURA 21 – FRACIONAMENTO SUBCELULAR DE TUZINA EM *Trypanosoma cruzi*.

LEGENDA: As células de epimastigotas expressando tuzina foram lisadas (LT) e fracionadas nas porções insolúvel (Ins.) e solúvel (Sol.). As fusões de tuzina e GFP a FLAG foram identificadas com anticorpos anti-FLAG (1:2000). A proteína citoplasmática GFP serviu como controle da fração solúvel, enquanto que a proteína de membrana GP 35/50 serviu como controle da fração insolúvel, identificada com anti-GP35/50 (1:1000). GAPDH, identificada com soro anti-GAPDH, marca nas duas frações por haver a isoforma glicossomal e a citoplasmática. WT = selvagem. A marcação extra (WT, Tuzina::3xFLAG e GFP::3xFLAG) que aparece na membrana incubada com anti-FLAG se deve à reação inespecífica deste anticorpo.

Os dados de fracionamento indicaram que tuzina pode estar associada à alguma organela ou à membrana plasmática, o que pode ser reforçado pela evidência de sequência transmembrana em análises *in silico*. Já foi destacado anteriormente que esta organela pode ser a mitocôndria, uma vez que tuzina de *T. brucei* foi identificada em seu proteoma mitocondrial (PANIGRAHI et al., 2009). Por essa razão, tentamos colocalizar tuzina em fusão a FLAG com algum marcador para esta organela, como os corantes MitoTracker (Thermo Fischer Scientific) e Rodamina 123 (Sigma-Aldrich), mas não obtivemos resultado satisfatório. Por isso, buscamos identificar a localização subcelular de tuzina com outras técnicas, como a microscopia eletrônica de transmissão (MET). Conseguimos identificar a marcação em uma organela que se assemelha à mitocôndria (Figura 22A a D), no entanto a marcação tem poucos pontos concentrados nesta organela, além de marcar regiões do citoplasma (Figura 22A a D), núcleo e cinetoplasto (Figura 22C e D). Com esse padrão de marcação e através da MET, não podemos afirmar com exatidão se tuzina se

localiza na mitocôndria ou em alguma organela, devido ao aspecto difuso da marcação.

FIGURA 22 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE TUZINA EM *Trypanosoma cruzi*.

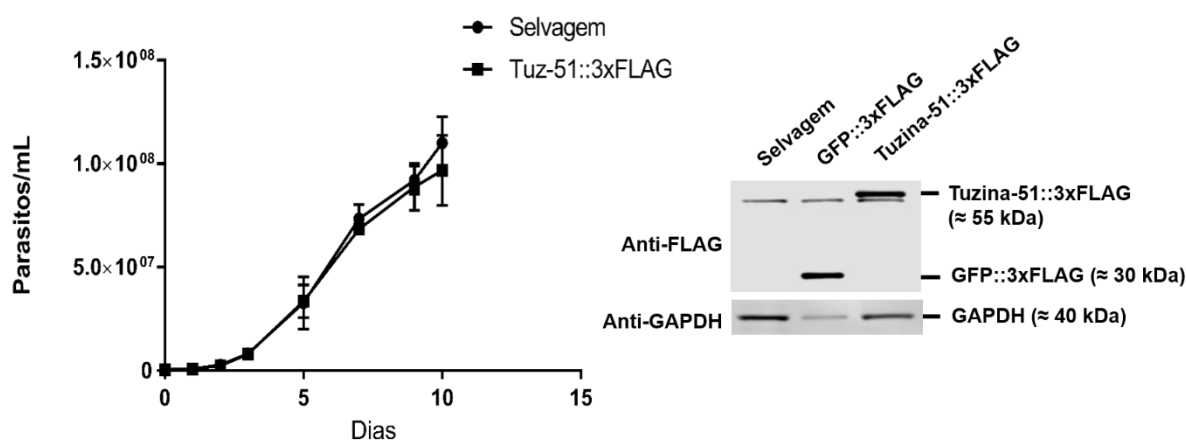


LEGENDA: Cortes de epimastigotas expressando tuzina em fusão a FLAG imobilizados em resina Lowcryl e marcada com ouro coloidal de 15 nm, como descrito em Material e Métodos. As setas mostram a marcação com ouro coloidal para o anticorpo anti-FLAG. C = cinetoplasto; M = mitocôndria e N = núcleo.

6.1.4. Crescimento da população superexpressando tuzina em fusão à FLAG.

Buscando identificar as possíveis funções de tuzina, avaliamos se sua superexpressão em *T. cruzi* produziria alguma alteração fenotípica neste organismo. Determinamos a taxa de crescimento de epimastigotas em comparação com as células selvagens ao longo de dez dias, e não observamos diferença entre elas (Figura 23). Portanto, a expressão de tuzina fusionada à FLAG não altera de maneira significativa o crescimento da população transfectada.

FIGURA 23 – CURVA DE CRESCIMENTO DE *Trypanosoma cruzi* SUPEREXPRESSANDO TUZINA::3XFLAG.



LEGENDA: As células epimastigotas selvagem (controle) e transfectantes expressando Tuzina-51::3xFLAG foram contadas em câmara de Neubauer por 10 dias, como descrito em Material e Métodos. Dados de três experimentos independentes. A análise estatística usada foi o teste *t* não pareado. Não houve diferença estatística entre a população selvagem e transfectante ($P > 0,05$). A foto à direita mostra a expressão de Tuzina em fusão à FLAG na população usada na curva de crescimento. GFP::3xFLAG foi usado como controle positivo, enquanto que a população selvagem, foi o controle negativo. O painel de cima mostra a reação para o anticorpo anti-FLAG, enquanto que o de baixo, para o normalizador anti-GAPDH. A banda extra logo abaixo de tuzina é produto de uma reação inespecífica do anticorpo anti-FLAG.

6.1.5. Identificação de proteínas interatoras de tuzina.

A fim de fornecer indícios quanto à função de tuzina, foram realizados ensaios de coimunoprecipitação para identificar possíveis proteínas que interajam com tuzina. Para isto, parasitos expressando Tuzina-51::3xFLAG foram utilizados em ensaios de Co-IP com anticorpo anti-FLAG imobilizado covalentemente a *beads* de agarose (seção 5.12). Em um ensaio preliminar (corrida teste) foram identificadas 17 proteínas com enriquecimento superior a 3 vezes. Uma vez que desconhecíamos a natureza das proteínas que podem interagir com tuzina, selecionamos aquelas cuja intensidade foi superior a 1,5 vezes, em relação aos parasitos selvagens (Tabela 1).

Identificamos que 80% destas proteínas possuem ortólogos em *T. brucei* que foram previamente identificados nos proteomas de mitocôndria total e de membrana externa de mitocôndria, juntamente com retículo endoplasmático (NIEMANN et al., 2013; PANIGRAHI et al., 2009). A maioria destas proteínas fazem parte do sistema de translocase mitocondrial (ATOM – translocase arcaica de membrana externa – e POMP – proteína presente no proteoma externo - de função desconhecida), além de algumas proteínas associadas ao metabolismo lipídico, de tradução e de metilação de

arginina. Esses dados dão mais ênfase a hipótese de que tuzina esteja associada de alguma maneira à mitocôndria, corroborando dados anteriores de proteoma mitocondrial (PANIGRAHI et al., 2009).

TABELA 1 – PROTEÍNAS PARCEIRAS IDENTIFICADAS NA IMUNOPRECIPITAÇÃO DE TUZINA 51 FUSIONADA A 3XFLAG - CORRIDA TESTE.

continua

ID	DESCRIÇÃO	FC	PEPTÍDEOS ÚNICOS		COBERTURA (%)	
			TUZ-51: :3xFLAG	WT	TUZ-51: :3xFLAG	WT
TcCLB.509289.20	Tuzina	∞	15	0	37,8	0
TcCLB.506885.340	ATOM40	∞	6	0	26,9	0
TcCLB.506691.80	Proteína contendo domínio ubiquitina-like	∞	6	0	12,1	0
TcCLB.511555.40	CPSF 30 kDa/proteína de ligação com domínio efetor NS1/domínio dedo de zinco	∞	3	0	20,3	0
TcCLB.507601.30	Proteína não caracterizada	∞	3	0	11,2	0
TcCLB.508041.30	Proteína ribossomal 40S S15A	∞	2	0	16,6	0
TcCLB.509913.10	3-metilcrotonil-CoA carboxilase, subunidade alfa	∞	2	1	1,2	1,2
TcCLB.503971.10	Proteína não caracterizada, superfamília 2OG-Fe(II) oxigenase	∞	2	0	5,2	0
TcCLB.506155.30	Proteína tipo cinesina	∞	2	0	3,1	0
TcCLB.509569.44	ATOM12/ POMP40	∞	2	0	25	0
TcCLB.508647.110	ATOM14/ POMP14	∞	2	0	14,9	0
TcCLB.506945.250	Proteína de função desconhecida (DUF773)	∞	2	1	4,8	0
TcCLB.506357.50	Proteína não caracterizada	∞	2	0	6,6	0

NOTA: A coluna FC (*fold change*) se refere à razão de intensidade dos peptídeos encontrados em Tuzina-51::3xFLAG e dos mesmos encontrados no selvagem (Tuz-51::3xFLAG/selvagem). Por essa razão, as proteínas cujo *fold change* foi classificado com ∞, foi devido à baixa intensidade destes peptídeos no selvagem, considerada como zero. A cobertura se refere à porcentagem de combinação de sequências dos peptídeos identificados em relação à massa molecular da respectiva proteína.

TABELA 1 – PROTEÍNAS PARCEIRAS IDENTIFICADAS NA IMUNOPRECIPITAÇÃO DE TUZINA 51 FUSIONADA A 3XFLAG - CORRIDA TESTE.

conclusão

IDENTIFICAÇÃO	DESCRIÇÃO	FC	PEPTÍDEOS ÚNICOS		COBERTURA (%)	
			TUZ-51: :3xFLAG	WT	TUZ-51: :3xFLAG	WT
TcCLB.506147.80	POMP6	∞	2	0	17,3	0
TcCLB.508153.280	Proteína ribossomal L13	∞	2	0	13,8	0
TcCLB.504057.90	Proteína com domínio P-loop hidrolase	6,8	2	1	10,3	10,3
TcCLB.508659.9	Proteína não caracterizada	3,15	2	1	22,4	22,4
TcCLB.511803.40	ATOM69/POMP9	2,79	4	1	7	3,4
TcCLB.508909.20	Guanosina monofosfato desidrogenase	2,64	4	1	8,6	6,5
TcCLB.508989.90	eif4g5	2,50	4	1	4,9	3,9
TcCLB.510507.20	3-cetoacil-CoA tiolase	2,49	2	1	8	8
TcCLB.508731.9	Proteína não caracterizada	2,38	6	1	14	14
TcCLB.506211.70	ZC3H39	2,21	4	1	22,1	22,1
TcCLB.508593.110	Arginina metiltransferase (PRMT1)	2,20	2	1	7,4	7,4
TcCLB.510945.70	Aspartato aminotransferase	1,83	9	2	27,8	27,8
TcCLB.511821.179	Cinesina	1,72	2	1	18,1	18,1
TcCLB.511109.130	Ribonucleoproteína H/F nuclear homogênea	1,68	4	2	13,8	11,6
TcCLB.507093.300	Proteína não caracterizada SCD6.10	1,64	5	2	40,7	26,4
TcCLB.505183.30	Enzima málica	1,61	2	0	17	17
TcCLB.506777.110	Proteína contendo domínio GRIP	1,55	2	1	4,8	4,8
TcCLB.511333.4	CAP5.5/ cisteína peptidase	1,53	6	2	12,1	10,6

O teste inicial nos direcionou para a validação dos dados de coimunoprecipitação, discutidos no tópico a seguir. Em paralelo, realizamos as réplicas da coimunoprecipitação nas mesmas condições do teste, para identificarmos com maior acurácia as possíveis proteínas parceiras. Desta vez, utilizamos um *cut off*, mais estrigente, considerando as proteínas com intensidade maior que 3 vezes em relação ao selvagem (MANI et al., 2015). Destas réplicas, ATOM40, ATOM69 e tuzina foram novamente identificadas (Tabela 2). Outras proteínas que não haviam sido identificadas surgiram nestas réplicas: POMP25, uma proteína do proteoma de membrana externa de mitocôndria e de função desconhecida; ATOM46, uma subunidade do complexo ATOM, assim como ATOM40 e ATOM69; uma proteína tipo ubiquitina ligase envolvida na ubiquitinação de proteínas; e uma proteína hipotética, semelhante à subunidade beta da proteína associada ao translocon do retículo endoplasmático, com ortólogos em *T. grayi*, *L. panamensis*, e *L. brasiliensis*. O enriquecimento destas amostras para *GO-Term* (Apêndice 3) sugere forte correlação das proteínas identificadas com complexos de membrana, em especial a membrana mitocondrial, com enriquecimento superior a 400 vezes para o *GO-Term* de maior enriquecimento (complexo de translocase mitocondrial).

TABELA 2 – PROTEÍNAS PARCEIRAS IDENTIFICADAS NA IMUNOPRECIPITAÇÃO DE TUZINA 51 FUSIONADA A 3XFLAG – RÉPLICA 1.

IDENTIFICAÇÃO	DESCRIÇÃO	FC	PEPTÍDEOS ÚNICOS		COBERTURA (%)	
			TUZ-51: :3xFLAG	WT	TUZ-51: :3xFLAG	WT
TcCLB.506885.340	ATOM40	15,9	13	6	44	24,6
TcCLB.511803.40	ATOM69	3,4	9	6	20,7	12,1
TcCLB.509289.20	Tuzina	1,8	1	1	47,7	45,2
TcCLB.504431.30	POMP25	4,0	6	3	21,3	8,5
TcCLB.508813.60	ATOM46	3,5	7	7	17,9	17,9
TcCLB.508971.50	Ubiquitina-ligase <i>like</i>	4,0	30	19	9,8	6,9
TcCLB.509167.80	Proteína hipotética, TRAP beta	3,5	5	4	35,5	29,6

NOTA: A coluna *fold change* se refere à razão de intensidade dos peptídeos encontrados em Tuzina-51::3xFLAG e dos mesmos encontrados no selvagem (Tuz-51::3xFLAG/selvagem). A cobertura se refere à porcentagem de combinação de sequências dos peptídeos identificados em relação à massa molecular da respectiva proteína. R1 = réplica 1; R2 = réplica 2. Resultado de dois experimentos independentes.

TABELA 3 – PROTEÍNAS PARCEIRAS IDENTIFICADAS NA IMUNOPRECIPITAÇÃO DE TUZINA 51 FUSIONADA A 3XFLAG – RÉPLICA 2.

IDENTIFICAÇÃO	DESCRIÇÃO	FC	PEPTÍDEOS ÚNICOS		COBERTURA (%)	
			TUZ-51: :3xFLAG	WT	TUZ-51: :3xFLAG	WT
TcCLB.506885.340	ATOM40	31,4	13	10	44	33,7
TcCLB.511803.40	ATOM69	9,8	12	11	26,5	24,8
TcCLB.509289.20	Tuzina	9,8	1	1	47,2	43,2
TcCLB.504431.30	POMP25	5,0	6	4	21,3	15,6
TcCLB.508813.60	ATOM46	4,4	8	9	22,7	25,1
TcCLB.508971.50	Ubiquitina-ligase <i>like</i>	4,1	33	31	11,4	10,6
TcCLB.509167.80	Proteína hipotética, TRAP beta	3,3	4	4	28,1	28,1

Nos dados de coimunoprecipitação identificamos algumas proteínas mitocondriais, tanto na corrida teste quanto nas réplicas biológicas, o que está de acordo com o descrito na literatura quanto aos dados de proteoma mitocondrial. Destas proteínas identificadas, POMP é uma denominação genérica para proteínas encontradas no proteoma de membrana externa de mitocôndria e com função ainda desconhecida, porém são exclusivas de tripanossomatídeos e algumas delas (POMP6, POMP14 e POMP22) são essenciais para a forma sanguínea de *T. brucei*. É possível que elas atuem como fatores adjuvantes da translocação (NIEMANN et al., 2013). ATOM40 e ATOM69 são parte do complexo de translocase da membrana externa da mitocôndria (ATOM). Estas proteínas formam um complexo de aproximadamente 700 kDa, e algumas delas são específicas dos tripanossomatídeos e necessárias para a manutenção da morfologia mitocondrial em *T. brucei* e também para o importe de proteínas a partir do citosol (MANI et al., 2015; NIEMANN et al., 2013; PUSNIK et al., 2012). A possibilidade de tuzina estar associada ao complexo ATOM é bastante intrigante, pois este é singular nos tripanossomatídeos, e tuzina é exclusiva desta família de protozoários. Por essa razão, é válido assumir que esta proteína seja também acessória à translocação de proteínas mitocondriais. Mas para estabelecermos este papel, é necessário validar os dados da coimunoprecipitação *in vivo*, através da coexpressão de cada proteína parceira com tuzina, em epimastigotas de *T. cruzi*.

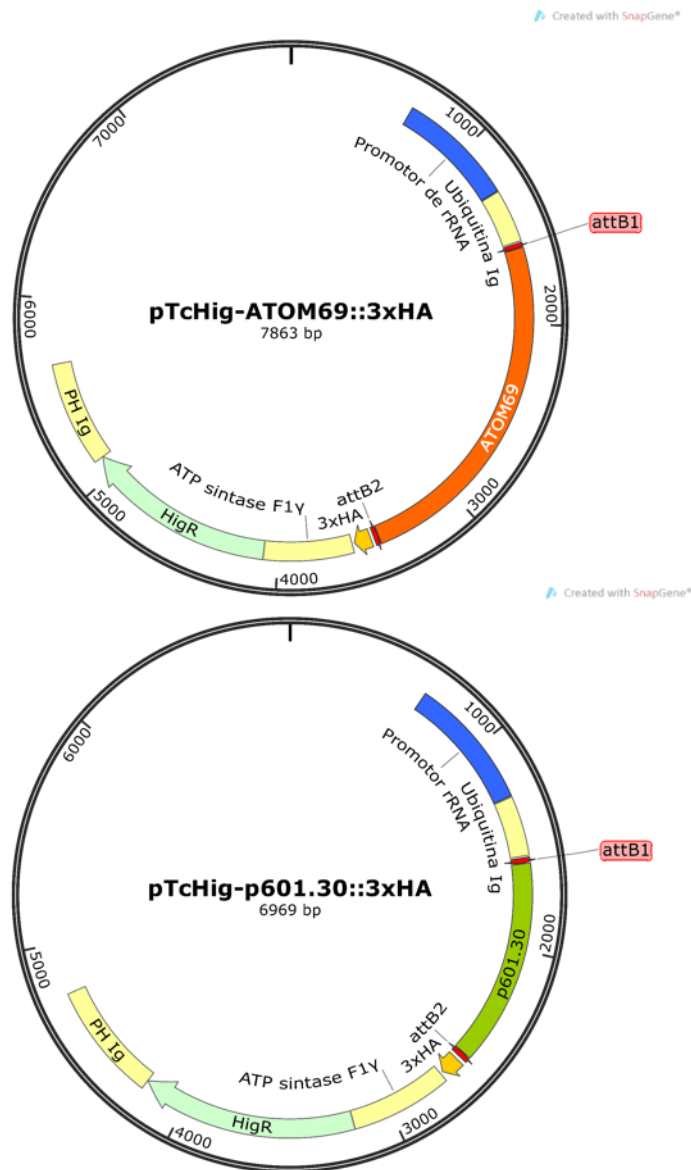
Uma das proteínas identificadas nas réplicas de nossa coimunoprecipitação foi uma proteína hipotética com homologia à subunidade beta associada ao translocon (TRAP beta) do retículo endoplasmático (RE). Esta subunidade é parte de um complexo que auxilia o translocon do RE a internalizar os peptídeos endereçados a esta organela. Em mamíferos, TRAP é substrato específico, sendo um estimulante para a translocação de proteínas com peptídeos sinais pouco eficientes para iniciar a translocação (FONS; BOGERT; HEDGE, 2003). O processo de transporte para o RE ocorre de duas maneiras: (i) acoplada à tradução proteica e mediada pelo receptor de peptídeo sinal (SPR), o qual reconhece uma sequência primária no peptídeo nascente e permite sua translocação enquanto ainda é sintetizado pelo ribossomo e (ii) após a tradução, no qual a proteína a ser translocada é assessorada pelas chaperonas DNAJ/K e pela proteína BiP, presente no lúmen do RE (BRODSKY; SCHEKMAN, 1993; PLATH; RAPOPORT, 2000). Em alguns eucariotos, o primeiro processo é o mais usado, enquanto que *T. brucei* usa ambos de maneira indistinta, com certa preferência pelo segundo mecanismo para as proteínas ancoradas a GPI. Este dado é importante no caso deste protozoário, uma vez que a maioria das suas proteínas de membrana são ancoradas a GPI, em especial proteínas necessárias para a sobrevivência no hospedeiro vertebrado (GOLDSHMIDT et al., 2008). Seria possível que tuzina, além de associar-se ao complexo ATOM, pudesse auxiliar na translocação de proteínas para o RE. Proteínas da família AAA + estão envolvidas em atividades celulares que promovem alteração da conformação ou remodelamento de proteínas alvo, essenciais durante a translocação de proteínas (revisado por HANSON; WHITEHEART, 2005). No entanto, o RE também está envolvido no envio de proteínas de membrana marcadas para degradação por ubiquitinação (MACGURN; HSU; EMR, 2012). Até o momento, não dispomos de dados que confirmem a relação de tuzina com o translocon do RE como sendo acessório ou um caminho de degradação como de tantas outras proteínas.

Por fim, identificamos uma proteína homóloga à ubiquitina ligase tipo E3, da superfamília HECTc. Esta enzima transfere a molécula de ubiquitina da enzima ubiquitina-conjugase (E2) à proteína alvo, podendo adicionar uma molécula, ou uma cadeia de ubiquitinas. Esta modificação pós-traducional pode alterar a função proteica ou simplesmente destiná-la à degradação (*turn over*) (LEUNG et al., 2011; LOWRIE; GIFFIN; VENTULLO, 1993; SCHEURING et al., 2012; ZOLTNER et al., 2015). Esta enzima poderia modificar tuzina diretamente, endereçando-a para degradação, ou

agiria sobre uma ou mais proteínas coeluídas no experimento. Ubiquitina ligases também podem adicionar uma proteína semelhante à ubiquitina, abreviada como *SUMO* (*small ubiquitin-like modifier*), de 12 kDa, a qual é capaz de modular a atividade, alterar a estabilidade e a localização da proteína alvo através da alteração de sua conformação. Contudo, não detectamos alteração da migração de tuzina fusionada a FLAG (Figuras 21 e 23), tornando esta hipótese pouco provável. Além disso, a proteína TRAP beta, cuja ortóloga foi identificada na coimunoprecipitação, já foi identificada no proteoma de SUMOilação em *T. cruzi* (BAYONA et al., 2011; *TriTrypDB: The Kinetoplastid Genomics Resource*, 2016). Portanto, seria mais provável que esta ubiquitina ligase atue sobre TRAP beta, e não tuzina.

A coimunoprecipitação foi útil para fornecer evidências das prováveis proteínas parceiras de tuzina. É válido mencionar que as condições técnicas do experimento podem aumentar ou diminuir a interação de proteínas, já que não sabemos quais as condições celulares exatas que favorecem esta interação. Por isso, estas proteínas precisam ter suas interações testadas *in vivo*. Com base nisso, escolhemos três proteínas a partir da coimunoprecipitação teste com os maiores valores de *fold change* em relação ao selvagem (Tabela 1), uma vez que ainda não tínhamos o resultado das réplicas biológicas. Por isso, as selecionadas para os testes *in vivo* foram ATOM40, ATOM69, e uma proteína hipotética ortóloga de metiltransferases modificadoras de tRNAs em outros tripanossomatídeos, com possível localização mitocondrial. Aqui a chamamos de p601.30. ATOM69 foi selecionada pois é a última subunidade a se unir ao complexo ATOM, enquanto ATOM40 é a primeira a montar este complexo. Desta maneira, poderíamos identificar a interação usando proteínas com topologias diferentes. A proteína p601.30, no entanto, não foi recuperada nas réplicas realizadas, sugerindo que no teste ela tenha sido apenas um artefato. Mesmo assim, procedemos com sua utilização na validação, pois seria útil como controle negativo.

FIGURA 24 – VETORES CRIADOS PARA A VALIDAÇÃO DA CO-IP DE TUZINA.

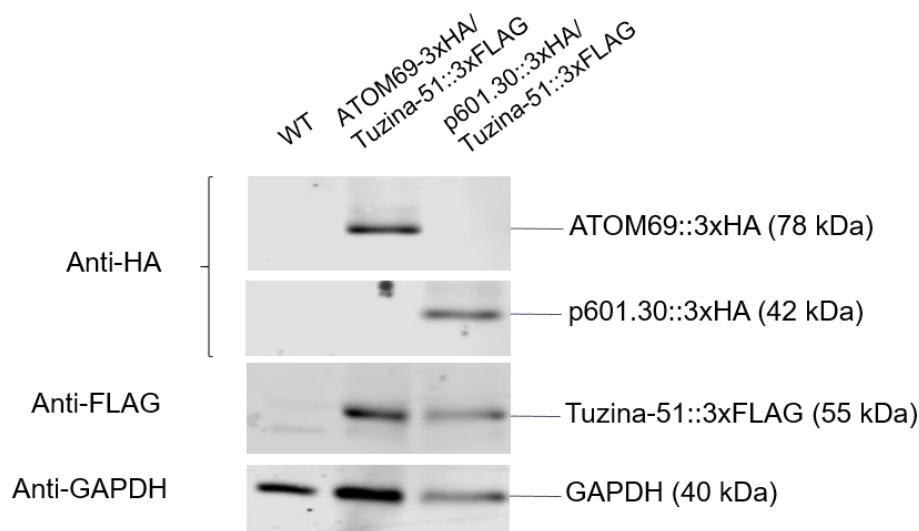


LEGENDA: Acima, está o vetor de expressão para ATOM69 e abaixo, para p601.30. Ambos os vetores possuem as mesmas sequências regulatórias de pTcNeo-Tuzina-51::3xFLAG, com a diferença da etiqueta de três epitopos de HA e da resistência a higromicina (Hig).

Construímos novos vetores de expressão em *T. cruzi*, desta vez fusionando os genes da validação à etiqueta de três epitopos de HA (3xHA), e o marcador de seleção que confere resistência à higromicina (Higro^R) (Figura 24). ATOM40 foi também fusionada à GFP, no vetor pTREX-higro. Estes vetores foram transfectados na população expressando Tuzina-51::3xFLAG, com resistência a neomicina. Todavia, conseguimos a seleção apenas das populações coexpressando p601.30 e

ATOM69 em fusão à HA, e por essa razão procedemos com a validação da coimunoprecipitação com estas proteínas.

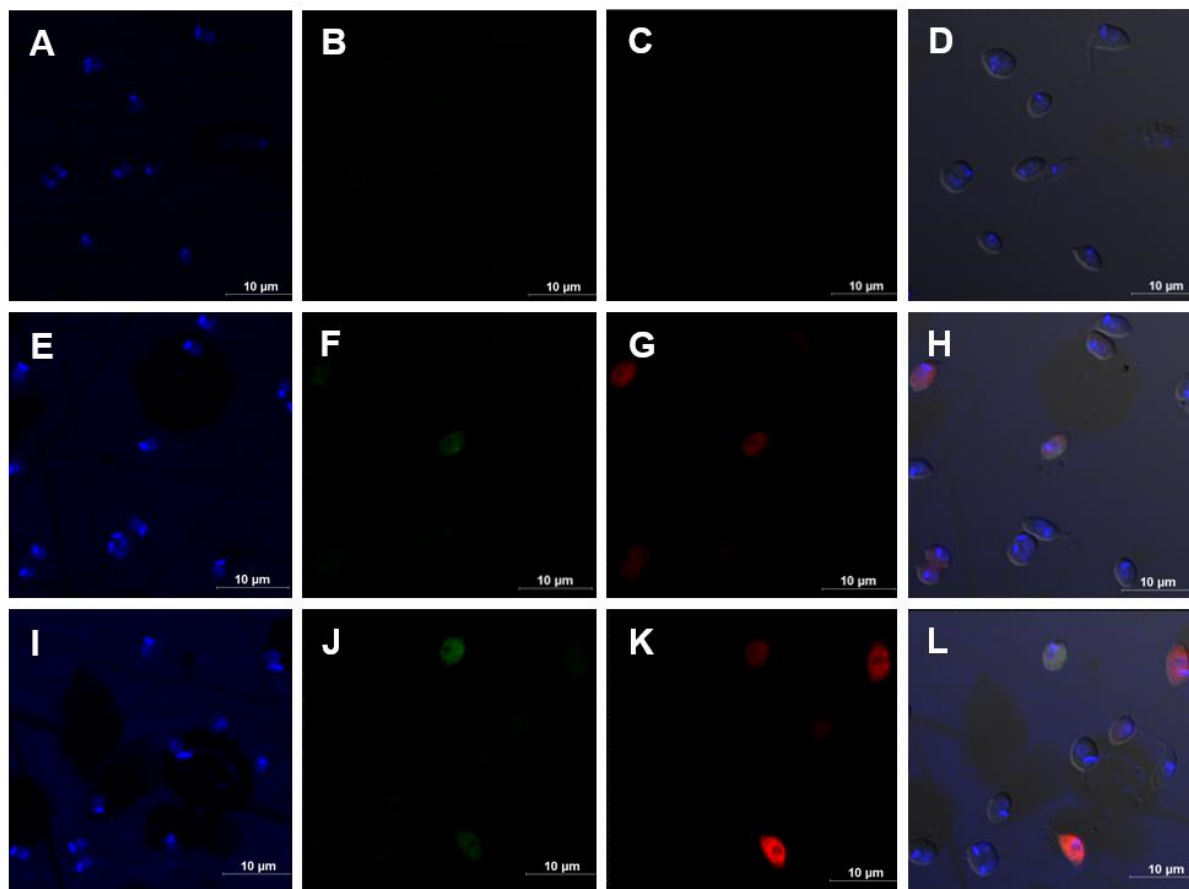
FIGURA 25 – COEXPRESSIONÃO DE TUZINA COM ATOM69 E p601.30.



LEGENDA: As populações cotransfectadas expressando ATOM69::3xHA/Tuzina-51::3xFLAG e p601.30::3xHA/Tuzina-51::3xFLAG foram avaliadas para confirmar a coexpressão de tuzina com estas duas proteínas. *Western blot* revelado por fluorescência, como descrito em Material e Métodos. Os valores entre parênteses representam a massa molecular das proteínas fusionadas ou selvagem, no caso do GAPDH.

Depois de confirmada a coexpressão de Tuzina-51::3xFLAG/ATOM69::3xHA e Tuzina-51::3xFLAG/p601.30::3xHA (Figura 25), procedemos com a colocalização destas proteínas em *T. cruzi*, através de imunofluorescência contra as etiquetas destas proteínas (Figura 26). Neste experimento não detectamos a interação de p601.30 com tuzina, como já era esperado. A colocalização também não foi vista para ATOM69. Em ambos os casos, os parasitos coexpressando os pares de proteínas não apresentaram a morfologia normal esperado para um epimastigota e ATOM69 não tinha o padrão mitocondrial anteriormente observado em *T. brucei* (MANI et al., 2015). É possível que a expressão ectópica de tuzina e a possível parceira esteja alterando a fisiologia destes parasitos, e isto pode ter interferido na colocalização destas proteínas. Portanto, para confirmarmos a interação de tuzina com as proteínas do complexo ATOM, faremos a coimunoprecipitação inversa, desta vez tendo como alvo a proteína parceira, e identificando tuzina entre as proteínas eluídas.

FIGURA 26 – COLOCALIZAÇÃO DE TUZINA COM ATOM69 E p601.30.



LEGENDA: Epimastigotas de *T. cruzi* selvagem (A-D); expressando ATOM69::3xHA/Tuzina-51::3xFLAG (E-H) e p601.30/Tuzina-51::3xFLAG (I-L) foram fixadas e marcadas com o corante DAPI (A, E e I), e incubadas com os anticorpos anti-HA (B, F, J) e anti-FLAG (C, G e K), e os secundários Alexa-488 (verde) e Alexa-548 (vermelho), respectivamente. Os quadros D, H e L mostram a sobreposição dos filtros azul, verde e vermelho.

Diante dos dados aqui discutidos, tuzina pode estar associada à mitocôndria dos tripanossomatídeos. O complexo ATOM foi caracterizado muito recentemente nestes protozoários, usando como modelo *T. brucei* (MANI et al., 2015) e ainda não foi estudado em *T. cruzi*. Este sistema de translocação parece ser herança do endossimbionte que originou as células eucarióticas e possui estruturação única para a família destes protozoários. Tuzina também está presente apenas em tripanossomatídeos e é coerente assumir que ela faça parte deste complexo singular. Por essa razão, estas interações ainda devem ser investigadas, pois estes resultados forneceriam mais informações sobre este complexo que devido à sua divergência dos outros eucariotos, pode atuar como potencial alvo para o desenvolvimento de fármacos.

6.2. LIPASES

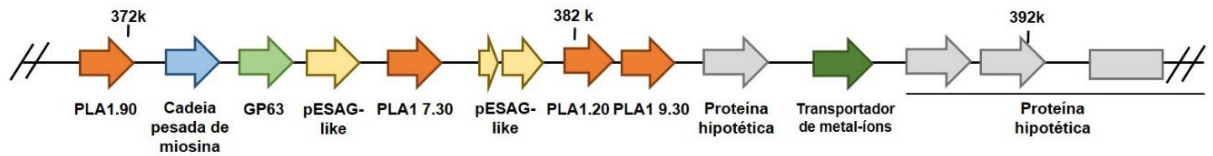
6.2.1. Organização genômica e estrutura proteica

Uma vez que dispúnhamos das sequências em nucleotídeos dos transcritos de TcLip1 e de TcLip2, oriundos do transcriptoma em andamento da cepa G, procuramos obter maiores informações sobre estes genes e seus produtos. Para isso, fizemos a análise de BLAST destas sequências contra o genoma de referência do clone CL Brener (*TriTrypDB: The Kinetoplastid Genomics Resource*, 2016). Obtivemos assim, lipases classe 3 de tripanossomatídeos (sete genes com identidade >80% e *E value* = 0⁰). TcLip1, possui alta homologia (91% de identidade e *E value* = 0⁰) com uma fosfolipase do tipo A₁ (PLA₁), indicando que esta enzima possa ser também uma fosfolipase, a qual possui substratos e atividades mais específicas, como já revisado anteriormente. Essa PLA₁ já foi parcialmente caracterizada por Belaunzarán et al. (2013) como um fator de virulência de *T. cruzi*, envolvida na invasão celular. Por essa razão, a lipase TcLip1 será referida como TcPLA₁ deste ponto em diante.

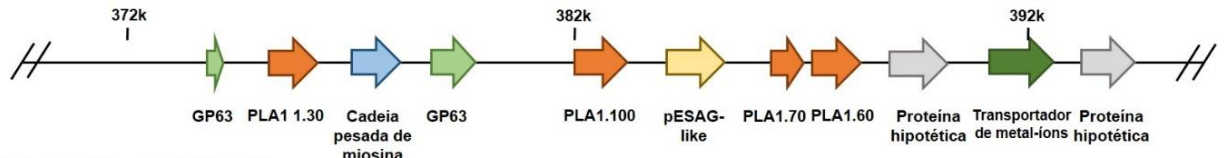
Realizando-se a busca por outros genes homólogos a TcPLA₁ e TcLip2 no banco de dados do TriTrypDB, encontramos outros genes de lipases em *T. cruzi* clone CL Brener: 9 genes para TcPLA₁, todos presentes no cromossomo 31 e 3 genes para Lip2, distribuídos no cromossomo 40 (Figura 27). Embora estes dados refiram-se ao genoma de CL Brener, é provável que os genes de lipase também sejam multicópia na cepa G, o que dificultaria a estratégia clássica de nocaute. Para TcPLA₁, no entanto, outra estratégia poderia ser aplicada, a qual utiliza o sistema CRISPR-Cas9, recentemente adaptada para *T. cruzi* (Revisado por BURLE-CALDAS et al. 2015; PENG et al., 2015).

FIGURA 27 – ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DAS LIPASES DE *T. cruzi* (CLONE CL BRENER).

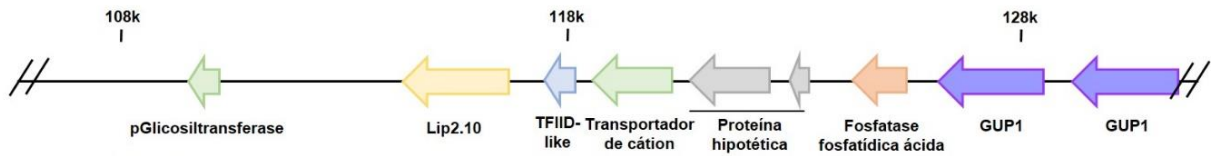
Cromossomo 31, Esmeraldo-like



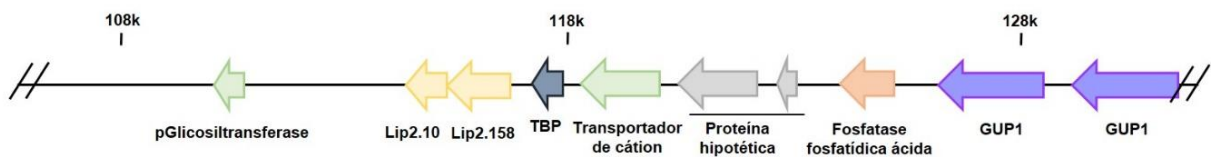
Cromossomo 31, Non Esmeraldo-like



Cromossomo 40, Esmeraldo-like



Cromossomo 40, Non Esmeraldo-like



LEGENDA: Os genes de lipases são referidos pelos números finais de identificação dos genes. p = pseudogene, ESAG = *expression-site associated gene*, GUP1 = proteína de captação de glicerol, TBP = *TATA-box binding protein*, TFIID = fator de início da transcrição.

A conservação entre as cópias de TcPLA₁ é maior que 80%, principalmente na região central, onde se encontra o domínio de lipase. Entre as cópias de TcLip2, ela é maior que 90%. É possível que os genes de TcLip2, TcCLB.511299.10 e TcCLB.503809.158, sejam, na verdade, o mesmo gene, como pode ser observado no alinhamento mostrado na Figura 28. Para comprovar esta hipótese, as técnicas de PFGE (item 5.9.9) e de *Southern blot* (*Southern*; Mitchell (1971)) serão aplicadas para identificar a quantidade de cópias deste gene. Se comprovada a existência de uma cópia para TcLip2, para se obter população nocaute para o estudo da função gênica, a técnica de nocaute por homologia pode ser utilizada, além da técnica de CRISPR-Cas9 (item 2.4.1).

FIGURA 28 – ALINHAMENTO ENTRE AS DUAS CÓPIAS DE TcLip2 DE *T. cruzi* (CLONE CL BRENER).

TcCLB.506483.10	MSQSQWERKIQVREYHYHTHTQPQWSDAAPLVSREFVALTRTCALCRRKKEVCKRCVCFNC	60
TcCLB.503809.158*	MSQSRWERKIQVREYHYHTHTQPQWSDATPLVSREFVALTRTCALCRRKKEVCKRCVCFNC	60
	*******_*****	
TcCLB.506483.10	QKTMGIRRHHCRCWKQAVCPDCRERMRYVHMLSEPMKVCNSCALPYGIATLSRCNEHNHL	120
TcCLB.503809.158*	QKTMGIRRHHCRCWKQAVCPDCRERMRYVHMLSEPMKVCNSCALPYGIATLSRCNEHNHL	120
	*****_**_**	
TcCLB.506483.10	LWGLYVLQRATEMPKVCIVPSCSTLTYSVCFNCGLPTTTTRLHEERLVRLDAKELAKVA	180
TcCLB.503809.158*	LWGLYVLQRATEMPKVCIVPSCSTLTYSVCFNCGLPTTTTRLHEERLVRLDAKELAKVA	180
	*****_*****	
TcCLB.506483.10	DSVKYLEANEFVSRCAAVDKYAAEEVENLFRVLFPRFQEVRAFPPTLNSLVEAQDLLLSVI	240
TcCLB.503809.158*	DSVKYLEANEFVSRCAAVDKYAAEEVENLFRVLFPRFQEVRAFPPTLNSLVEAQDLLLSVI	240

TcCLB.506483.10	SSTVAYEYGNFPSLTMSLSDVPYSRLLKLI RTS PRYSVFEAPGKVKFVSPFGTHDYRTFN	300
TcCLB.503809.158*	SSTVAYEYGNFPSLTMSLSDVPYSRLLKLI RTS PRYSVFEAPGKVKFVSPFGTHDYRTFN	300

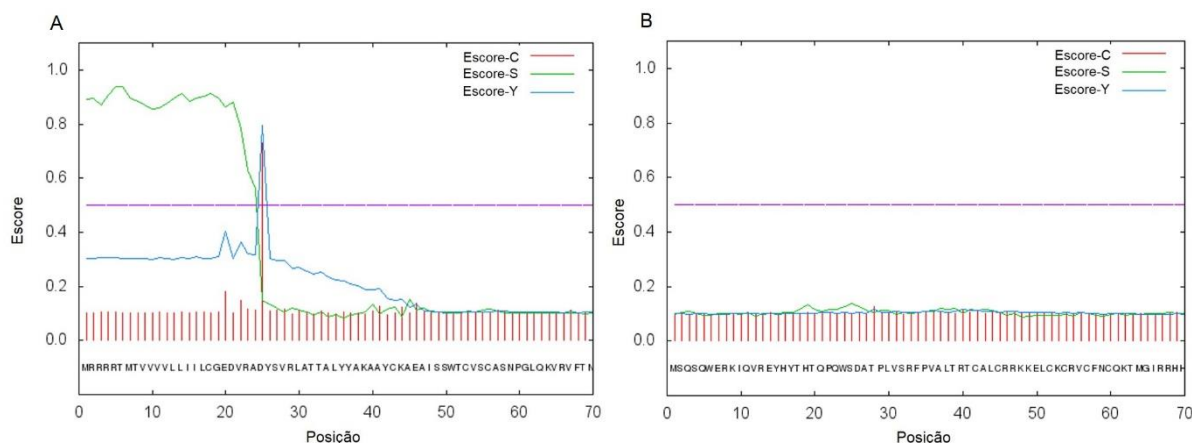
TcCLB.506483.10	VNMRCGRIKQQVWSRLVDGLAGSSDTSAEFRQLCGGVRLIWEARVHQGFAHEAEESTQOI	360
TcCLB.503809.158*	VNMRCGRIKQQVWSRLVDGW---- <u>DTSAEFRQLCGGLRLIWEARVHQGFAHEAEESTQOI</u>	356
	*****_*****	
TcCLB.506483.10	<u>EQLVNDVRQNGYRLVLSGHSLGGAVAQLVAIRMLRAHPGILKDKLKCISIGAPLVGNYQL</u>	420
TcCLB.503809.158*	<u>EQLVNDVRQNGYRLVLSGHSLGGAVAQLVAIRMLRAYPGILKDKLKCISIGAPLVGNHQL</u>	416
	*****_*****	
TcCLB.506483.10	<u>AQCVERCGWRSNFHHLVYRSDIIPRLLCVDQMARDLADQFIQSILGLPSSLQRWFKSNSN</u>	480
TcCLB.503809.158*	<u>AQCVERCGWRSNFHHLVYRSDIIPRLLCVDQMARDLADQFIQSILGLPSSLQRWFKSNSN</u>	476

TcCLB.506483.10	<u>ANEGPMKAMDAMDTQIKEGEDSVEGEKTPSPPTTEHRVHRMYACFGRYHFLNHGGVNYFST</u>	540
TcCLB.503809.158*	<u>ANEGPMKAMDAMDTQIKEGEDSVEGEKTPPPTTEHRVHRMYACFGRYHFLNHGGVNYFST</u>	536

TcCLB.506483.10	DDSEVAFHRLKEGCGSDNNLLDHSISSYNRAVFLQLCFQ	579
TcCLB.503809.158*	<u>DDSEVAFHRLKEGCGSDNNLLDHSISSYNRAVFLQLCFQ</u>	575

NOTA: O alinhamento foi realizado pelo sítio Clustal Omega, utilizando o gene TcCLB.506483.10 (haplótipo Esmeraldo-like) e a junção dos dois genes do haplótipo Non Esmeraldo-like (TcCLB.503809.158 e TcCLB.511299.10), representada pelo *. A região sublinhada representa o gene TcCLB.511299.10 apenas).

O transcrito de TcPLA₁ da cepa G teoricamente codifica uma proteína com 342 aminoácidos (aproximadamente 38 kDa), com pI de 6,41. Esta proteína possui também um peptídeo sinal entre os aminoácidos 1 a 24 que possivelmente a direciona para alguma via secretória (Figuras 29A e B). O transcrito de TcLip2 codifica uma proteína maior e mais básica (579 aminoácidos - 66 kDa - e pI = 8,84). TcPLA₁ possui a região de *lid*, enquanto que para TcLip2 essa região não foi encontrada nas análises do CDD.

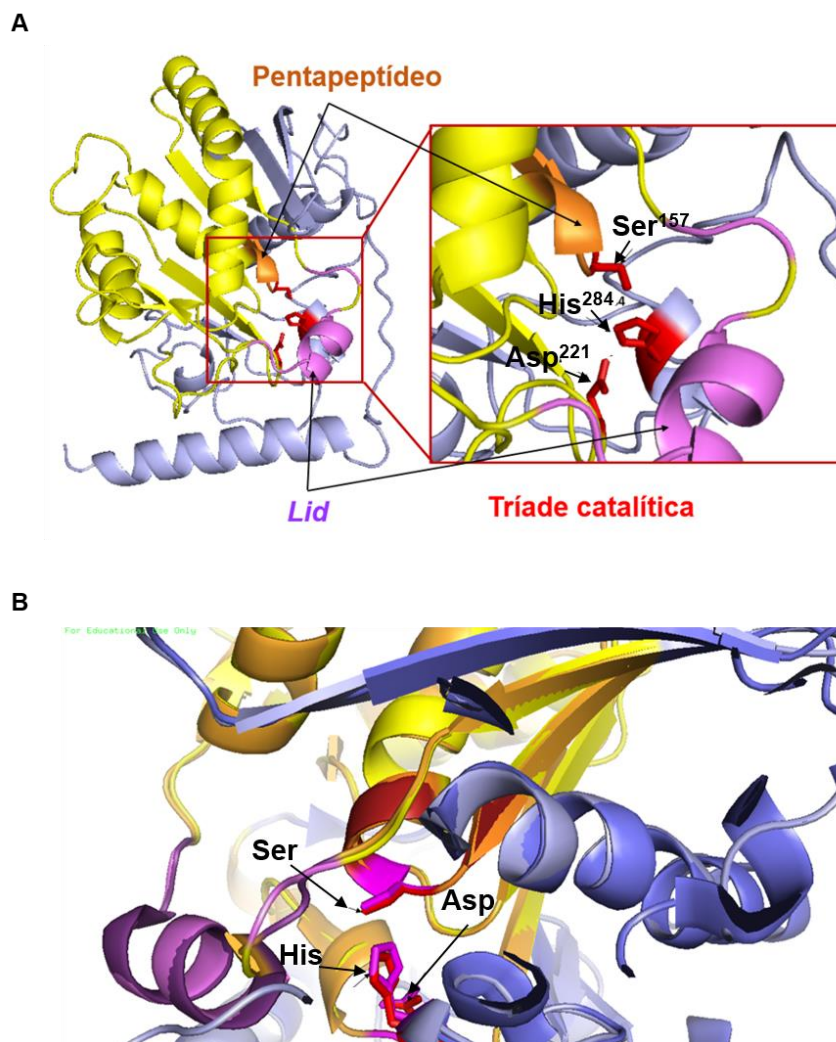
FIGURA 29 – PREDIÇÃO DE PEPTÍDEO SINAL PARA TcPLA₁ E TcLip2.

LEGENDA: (A). TcPLA₁. (B). TcLip2. A predição foi realizada pelo sítio SignalP 4.1 Server. No eixo y, o escore indica a intensidade dos demais escores (C, S e Y). O eixo x mostra a posição em aminoácidos da proteína. O escore-C, em vermelho, mostra a posição de clivagem do peptídeo sinal, sendo maior no aminoácido posterior ao ponto de clivagem. O escore-S, em verde, distingue os aminoácidos pertencentes ao peptídeo sinal daqueles que são parte do peptídeo maduro, sendo maior na região do peptídeo sinal. O escore-Y, é uma média geométrica entre os escores-C e S, resultando na determinação de um sítio de clivagem mais preciso. A linha horizontal em 0,5 representa o *cut-off* para este método. A posição de clivagem encontra-se entre os aminoácodos Ala²⁴ e Asp²⁵ para TcPLA₁ (A), enquanto que para TcLip2 (B) não foi detectado peptídeo sinal.

As sequências primárias de TcPLA₁ e TcLip2 possuem ambas o domínio de lipase com a sequência conservada do pentapeptídeo G-X-S-X-G. Apenas os aminoácidos serina e aspartato foram identificados como parte da tríade catalítica, através do alinhamento de sequências entre lipases de outros organismos, como realizado via CDD. Para identificar este último aminoácido da tríade, realizamos a modelagem molecular de TcPLA₁ e de TcLip2 para cada uma destas proteínas. Cada molde foi desenhado com base na estrutura de outra proteína com similaridade de sequência às lipases de *T. cruzi*, mas que já possui sua estrutura resolvida experimentalmente. Para TcPLA₁, a proteína molde com maior similaridade foi a lipase externa de *Gibberella zeae* (GzELip), com 17% de identidade, 52% de cobertura e 100% de confiabilidade. A sobreposição das estruturas na região catalítica foi praticamente completa, revelando que os aminoácidos que fazem parte dela são Serina¹⁵⁷; Aspartato²²¹; Histidina²⁸⁴, o último aminoácido da tríade catalítica que não conseguimos identificar através do CDD (Figura 30A e B). A tríade catalítica completa e a estrutura desta região são coerentes com a atividade de lipase. De fato, esta lipase já foi caracterizada em outras cepas de *T. cruzi* (BELAUNZARÁN et al., 2007; BELAUNZARÁN et al., 2013). Ela é secretada pelo parasito, como mostram dados de atividade desta enzima contra fosfatidilcolina utilizando o sobrenadante das

culturas de *T. cruzi*, mas também pode estar ligada à membrana deste parasito. Estes dados são coerentes com a presença de peptídeo sinal nesta proteína. É atribuído a PLA₁ papel na infecção de *T. cruzi*, mais especificamente durante eventos que antecedem à invasão de formas tripomastigotas sanguíneas às células hospedeiras. Por essa razão o estudo funcional de TcPLA₁ da cepa G pode revelar mais fatores responsáveis pela virulência de algumas das formas desta cepa de *T. cruzi*.

FIGURA 30 – MODELAGEM MOLECULAR DA PROTEÍNA TcPLA₁.

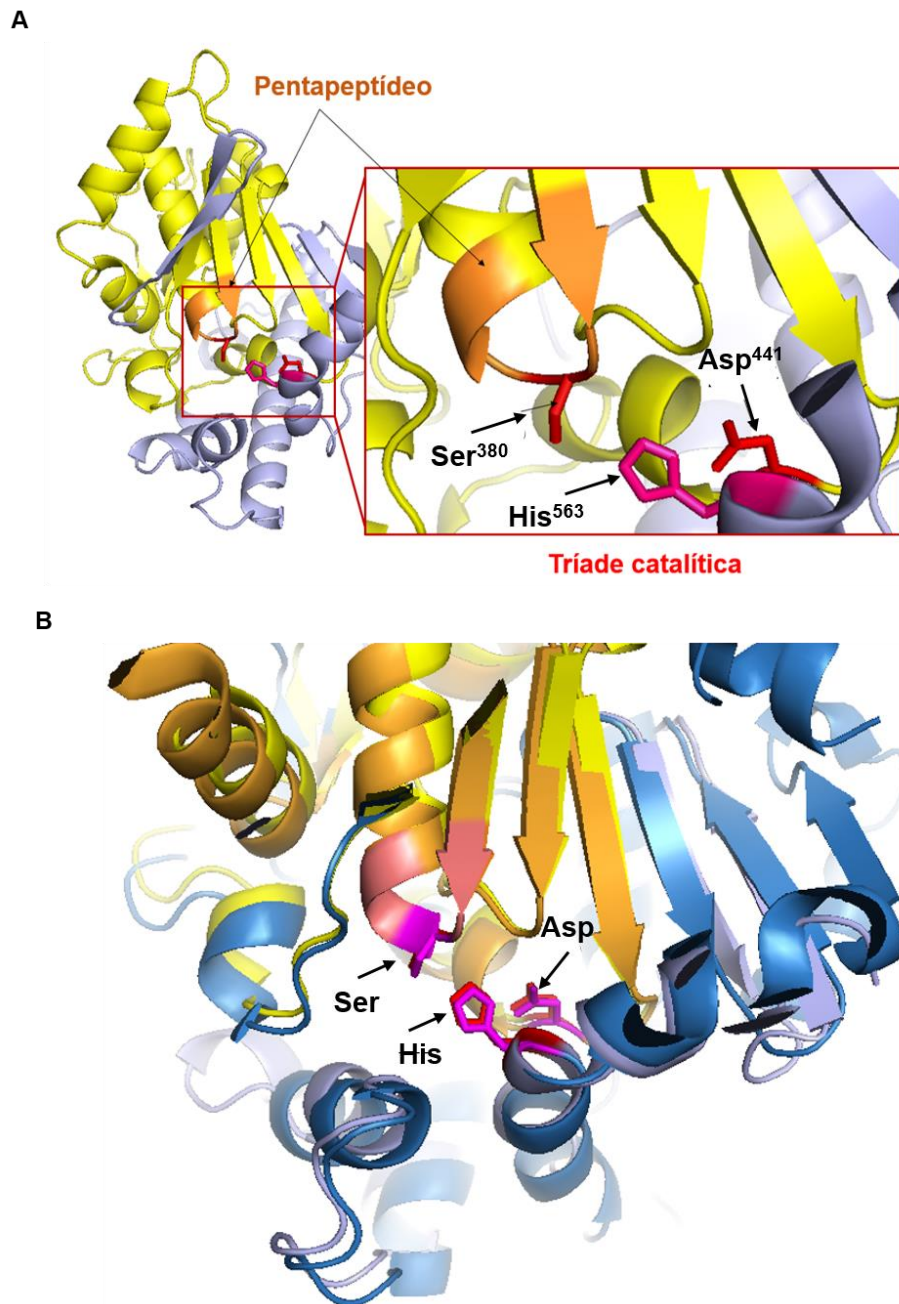


LEGENDA: O molde tridimensional para a proteína TcPLA₁ e TcLip2 foram obtidos dos sítios Phyre2 e analisados pelo software PyMOL v. 1.3. (A) Molde tridimensional da proteína TcPLA₁. Em amarelo é representado o domínio de lipase; em laranja, o pentapeptídeo Gly-X-Ser-X-Gly; em vermelho, os aminoácidos da tríade catalítica; e em roxo, a região correspondente à *lid*. O detalhe mostra o provável sítio catalítico desta enzima. (B) Alinhamento entre as estruturas 3D de TcPLA₁ e de uma das cadeias de GzELip, mostrando a sobreposição das duas estruturas na região do domínio de lipase. Em vermelho, estão os aminoácidos da tríade catalítica de TcPLA₁, em roxo, aqueles da tríade de GzELip.

Para TcLip2, o melhor molde produzido foi a partir da proteína EDS1, a qual possui um domínio de lipase e está envolvida na imunidade de plantas (Falk et al., 1999). A cadeia A de EDS1 possui 19% de identidade com TcLip2, e o molde produzido com 49% de cobertura e 100% de confiabilidade, o que corresponde ao domínio de lipase. Analisando a estrutura 3D do molde de TcLip2 (Figura 31), identificamos uma possível histidina (His⁵⁶³), baseada em sua distância relativamente pequena entre os outros dois aminoácidos da tríade. Para confirmarmos este aminoácido como parte da tríade, o alinhamento entre as estruturas de TcLip2 e da cadeia A de EDS1 mostrou a sobreposição da His⁵⁶³ de TcLip2 com a His³¹⁷ de EDS1, indicando que esta é a provável histidina parte da tríade catalítica de TcLip2.

Como já observado nas análises do CDD, a região correspondente a *lid* não foi encontrada no molde tridimensional de TcLip2. É possível que ela seja pouco conservada ou muito pequena, como a lipase pancreática de cobaia, GPL-RP2, a qual possui *lid* de cinco aminoácidos (CARRIÈRE et al., 1997). A região de *lid*, ou 'tampa', é uma estrutura móvel em formato de *loop* que mantém o sítio ativo da enzima isolado do ambiente aquoso. Através do contato com a superfície lipídeo/água, esta tampa se abre, um fenômeno conhecido como ativação interfacial, expondo o sítio ativo da enzima às interações hidrofóbicas do substrato, com consequente aumento da atividade catalítica (JAEGER et al., 1994). No entanto, a ativação interfacial não é uma característica necessária para se definir uma lipase verdadeira, uma vez que algumas destas enzimas não apresentam ativação interfacial (revisado por VERGER, 1997). A lipase GPL-RP2, por exemplo, não sofre este tipo de ativação e mesmo assim é capaz de hidrolisar tanto fosfolipídeos como outros lipídeos (CARRIÈRE et al., 1997). Na verdade, a atividade específica desta enzima perante o aumento da concentração de substratos difere das lipases que apresentam a ativação pela interface lipídeo-água. Para GPL-RP2, esta atividade é maior com substratos monoméricos, ou seja, antes de se formar a emulsão, enquanto que para lipases que sofrem a ativação interfacial, sua atividade é bastante lenta nesta etapa, aumentando apenas após a formação da emulsão (a interface lipídeo/água). Logo, GPL-RP2 é uma lipase verdadeira, e é possível que o sítio catalítico esteja sempre exposto em virtude do tamanho reduzido da *lid* (VERGER, 1997).

FIGURA 31 – MODELAGEM MOLECULAR DA PROTEÍNA TcLip2.



LEGENDA: O molde tridimensional para as proteínas TcLip2 foram obtidos dos sítios Phyre2 e analisados pelo software PyMOL v. 1.3. (A) Molde tridimensional da proteína TcLip2. Em amarelo é representado o domínio de lipase; em laranja, o pentapeptídeo Gly-X-Ser-X-Gly; em vermelho, os aminoácidos da tríade catalítica; e em roxo, a região correspondente à *lid*. O detalhe mostra o provável sítio catalítico desta enzima. (B): alinhamento entre as estruturas 3D de TcLip2 e de uma das cadeias de AtEDS1, mostrando a sobreposição das duas estruturas na região do domínio de lipase.

Com base nas informações discutidas anteriormente, a ausência de *lid* em TcLip2 não indica a ausência da atividade catalítica nesta proteína. Na realidade, a estruturação da *lid* é um dos elementos responsáveis pela especificidade de substrato,

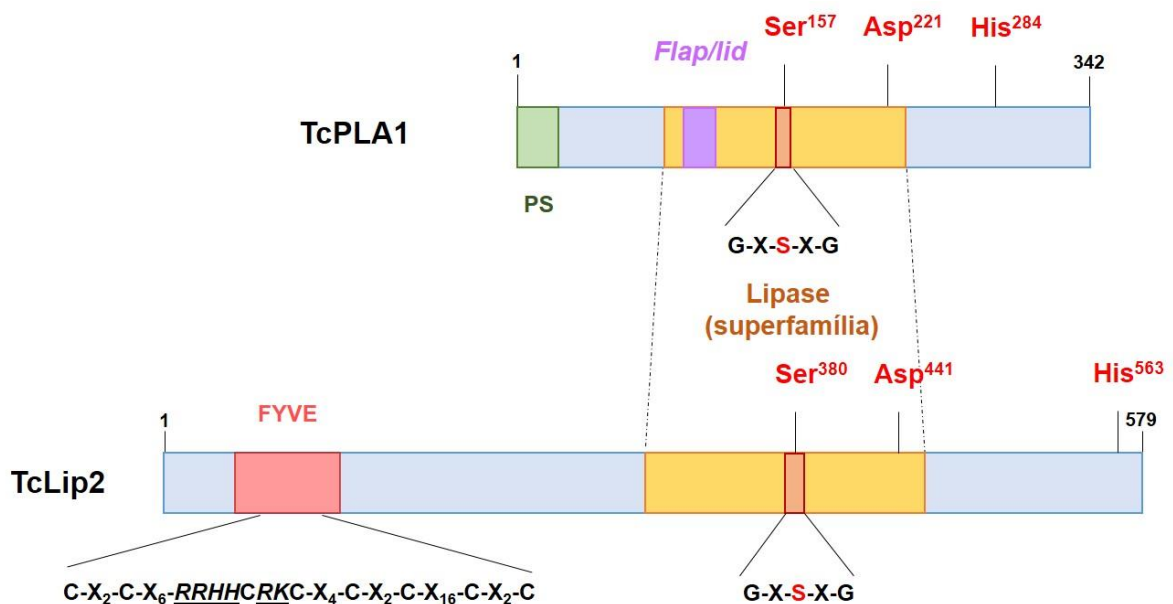
como já evidenciado para algumas lipases pancreáticas. A atividade de fosfolipase de GPL-RP2 foi perdida quando sua *lid* foi substituída por aquela da lipase pancreática humana (HPL), a qual hidrolisa outros lipídeos que não fosfolipídeos. Curiosamente, esta quimera de GPL-RP2(+*lid* HPL) não adquiriu a capacidade de ativação interfacial de HPL, indicando que outros elementos estruturais, além da *lid*, são necessários para a ocorrência deste fenômeno (CARRIÈRE et al., 1997). Outro exemplo são as isoformas humanas da lipase de triglicerídeos pancreática, PNLIP e PNLIRP2. A primeira hidrolisa apenas triglicerídeos neutros, enquanto que a última cliva tanto polares quanto neutros. A alteração das regiões de *lid* e de uma das folhas β próximas ao sítio catalítico ($\beta 5$, Figura 6, seção de Revisão Bibliográfica) mostraram que estas estruturas, e possivelmente a região N-terminal destas enzimas, estão envolvidas na especificidade de substrato destas isoformas (XIAO; LOWE, 2015). Em resumo, a possível ausência de *lid* em TcLip2 não indica a falta de atividade desta enzima, mas sim uma provável seletividade de substrato por parte dela. A identificação destes substratos, bem como se esta enzima sofre ou não ativação interfacial, serão obtidas com a análise cinética desta enzima quando purificada.

Adicionalmente, TcLip2 possui um domínio FYVE de ligação a Zn, rico em cisteínas e aminoácidos carregados positivamente (Arg e His). Seu nome origina-se das proteínas Fab1p, YOTB, Vac1p e EEA1, nas quais ele foi originalmente encontrado (FRITZIUS et al., 2006). Este domínio liga-se ao fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P) na membrana interna das células, e está presente em proteínas com diversas funções, como vias de tráfico celular e formação de endossomos; vesículas e lisossomos. Algumas destas proteínas estão envolvidas em vias de sinalização, como ativação de Akt quinase serina/treonina, envolvida em processos celulares como apoptose e promoção do ciclo celular em outros eucariotos, ou a proteína TbFRP, uma GTPase possivelmente envolvida com o sinal endossomal de proteína G (ADUNG'A; FIELD, 2013; FRITZIUS et al., 2006; GUETTA et al., 2010; JENSEN et al., 2001; STENMARK; AASLAND, 1999; STENMARK; AASLAND; DRISCOLL, 2002). A razão da existência deste domínio em uma lipase de *T. cruzi* é desconhecido, pois não encontramos estudos sobre lipases com esta arquitetura em tripanossomatídeos. Em *Arabidopsis thaliana*, uma planta herbácea, existe uma proteína com domínios FYVE e de lipase do tipo SGNH, uma família bastante diferente das α/β hidrolases e que possui função desconhecida.

Embora não tenhamos encontrado lipases com arquitetura semelhante a TcLip2 e com função conhecida, o domínio FYVE sugere direcionar esta proteína para determinada região da membrana celular, tais quais endossomos, onde ela exerceria sua atividade lipolítica. A endocitose em *T. cruzi* ainda não foi completamente caracterizada, e o envolvimento de TcLip2 forneceria mais dados sobre esta via. Outra possibilidade seria que TcLip2 estaria localizada na membrana em condições basais, e, após sinais celulares específicos, ela seria direcionada para seu real local de atividade. Para determinarmos seu local de ação, a expressão em *T. cruzi* desta proteína fusionada a alguma etiqueta nos forneceria mais evidências quanto a esse processo. A deleção do domínio FYVE seria útil na elucidação de sua participação na função de TcLip2.

A figura 32 mostra a estrutura simplificada de TcPLA₁ e de TcLip2, com base nas análises *in silico* aqui apresentadas.

FIGURA 32 – DESENHO ESQUEMÁTICO DAS PROTEÍNAS TcPLA₁ E TcLip2.

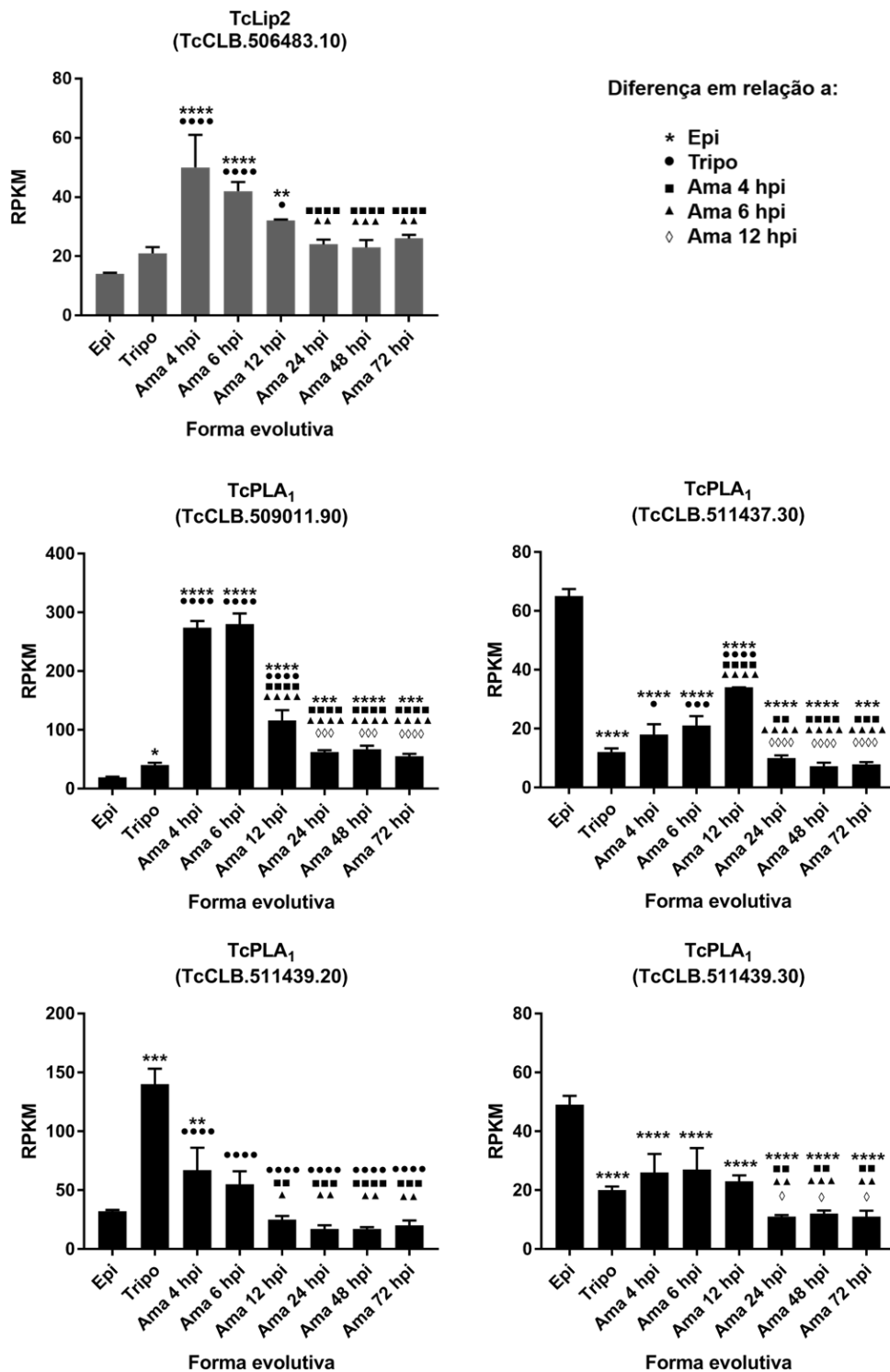


LEGENDA: Em amarelo é mostrado o domínio de lipase; em laranja, o pentapeptídeo G-X-S-X-G em destaque; em roxo, a região da *flap/lid*; em vermelho, o domínio FYVE. Neste último, são destacados os aminoácidos cisteína de ligação ao zinco e os aminoácidos arginina e histidina, de ligação ao fosfatidilinositol-3-fosfato. A posição dos prováveis aminoácidos da tríade catalítica é mostrada.

6.2.2. Expressão de TcPLA₁ e de TcLip2 em *Trypanosoma cruzi*

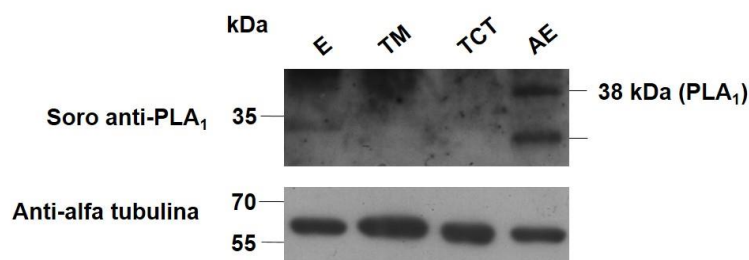
Os dados de transcriptoma da cepa G (DAROCHA, dados não publicados) apontam que PLA₁ é mais expressa nas formas epimastigota e amastigota extracelular desta cepa, enquanto que TcLip2 aumenta sua expressão ao longo do ciclo de vida. Pela análise dos dados de Li et al. (2016), observamos o padrão de expressão destas duas lipases durante o processo de infecção pela cepa Y (Figura 33). Em TcLip2, a expressão é maior nas primeiras horas da infecção (4 e 6 h), decaindo após 72 h. Para PLA₁, os níveis dos transcritos de uma de suas variantes (TcCLB.509011.90) também é maior nesta fase do ciclo de vida (RPKM > 200), enquanto que outras mostram aumento na fase epimastigota (TcCLB.511437.30 e TcCLB511439.30), com menor intensidade se comparado com TcCLB.509011.90 (RPKM < 80). Por fim, um dos genes de PLA₁ (TcCLB.511439.20) foi o único com expressão aumentada na forma tripomastigota (RPKM próximo de 150). Com base nestes dados, ambas as lipases parecem ser diferencialmente expressas, em especial TcPLA₁, cujos níveis são maiores nas formas infectivas da cepa Y. Padrão semelhante foi relatado para a cepa argentina RA (BELAUNZARÁN et al., 2013), cuja expressão de fosfolipases é um dos fatores de virulência desta cepa. Contudo, a análise dos dados de mapeamento dos mRNAs da cepa Y no genoma referência (CL Brener) realizado por Li et al (2016) precisa ser tomado com cautela devido a prováveis problemas associados as condições de mapeamento e variabilidade genética destes parasitos.

Para detectar a expressão de TcPLA₁ ao nível proteico ao longo do ciclo de vida da cepa G, utilizamos o soro específico contra esta enzima (BELAUNZARÁN et al., 2013) nos extratos celulares das formas epimastigotas (E), tripomastigota metacíclica (TM), tripomastigota derivada de cultura de tecido (TCT) e amastigota axênica (AA). Identificamos uma banda correspondente a massa molecular de PLA₁ (38 kDa) apenas no extrato de AA (Figura 34), o que parcialmente acompanha a tendência de expressão vista nos dados do transcriptoma. Quanto à forma epimastigota, não identificamos PLA₁, apenas um artefato abaixo de 35 kDa. Como tivemos que realizar uma longa exposição do filme radiográfico para detectar o sinal em amastigota, é provável que em epimastigota os níveis proteicos sejam ainda menores para serem detectados por esta técnica.

FIGURA 33 – EXPRESSÃO DE TcPLA₁ E TcLip2 EM *Trypanosoma cruzi* (CEPA Y).

LEGENDA: Os níveis de transcritos foram expressos em RPKM para as formas evolutivas epimastigotas (epi), tripomastigotas (tripo) e amastigotas (ama), isoladas 4, 6, 12 e 24 horas pós-infecção (hpi) em células de fibroblasto humano. São representados os valores de P somente para os dados com significância estatística ($P < 0,05$), determinados por ANOVA de um fator, seguido de teste de Tuckey. Um símbolo = $P \leq 0,05$; dois símbolos = $P \leq 0,01$; três símbolos = $P \leq 0,001$; quatro símbolos = $P \leq 0,0001$. Dados brutos provenientes de Li et al. (2016).

FIGURA 34 – IMUNODETEECÇÃO DE PLA₁ NO CICLO DE VIDA DE *Trypanosoma cruzi* (CEPA G).



NOTA: Os extratos celulares de epimastigota (E), tripomastigota metacíclica (TM), tripomastigota derivada de cultura de tecido (TCT) e amastigota axênica (AA) foram submetidos à detecção por soro anti-PLA₁ por quimioluminescência em filme radiográfico. O tempo de exposição foi de 20 min. O anticorpo anti-alfa tubulina foi usado como normalizador. Resultado de um único experimento.

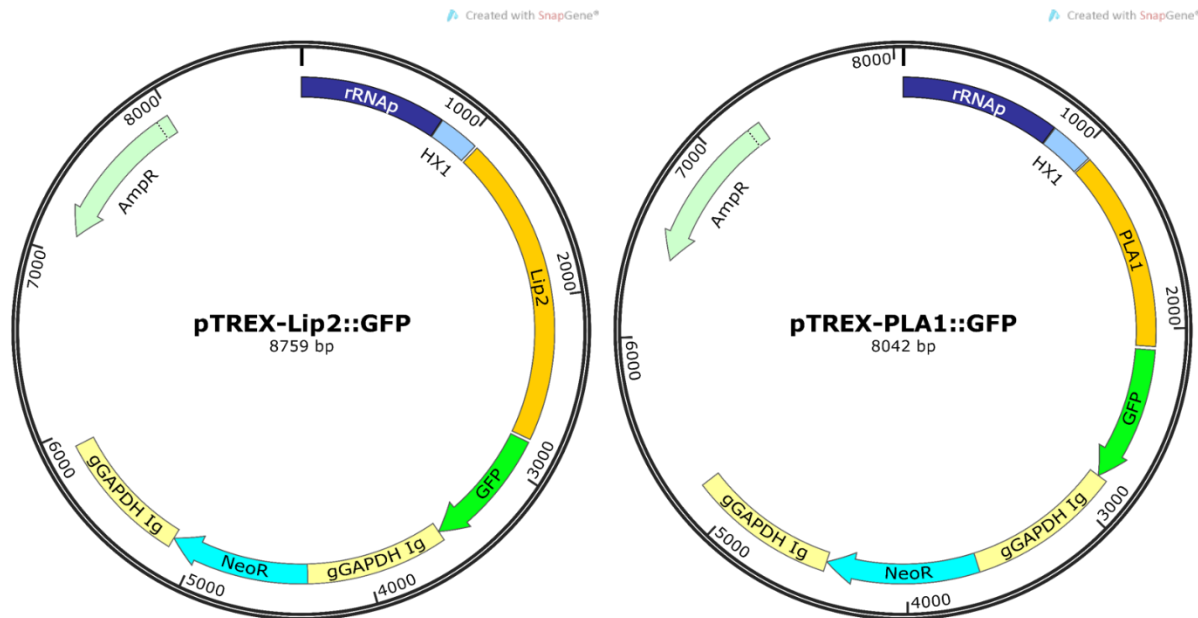
Sabe-se que a AA da cepa G é mais infectiva que a TCT (CRUZ et al., 2012), e que diversos trabalhos científicos correlacionam à alta expressão de PLA₁ ao aumento da virulência de alguns tripanossomatídeos (revisado por BELAUNZARÁN et al., 2011). Nestes estudos, é mostrado que as fosfolipases alteram o perfil lipídico da célula hospedeiro com a produção de segundos mensageiros lipídicos e concomitante ativação de proteína quinase C. Esta quinase, por sua vez, já foi relacionada como um dos mecanismos chave para aumento da invasão de formas infectivas de *T. cruzi*, como por exemplo as TCTs (VILLALTA et al., 1999; YOSHIDA, 2006). Portanto, é possível que a PLA₁ seja um provável fator de virulência para a AA da cepa G de *T. cruzi*, aumentando o potencial invasivo desta cepa por mecanismos semelhantes aos citados acima. Com base nesta hipótese, o estudo desta proteína na cepa G em comparação com outras cepas com perfil distinto de infecção será útil na elucidação de seu papel com fator de virulência.

Para o estudo da função de TcPLA₁, bem como da função de TcLip2, prosseguimos com a clonagem e expressão ectópica destes genes em fusão ao gene repórter de GFP, nas epimastigotas de *T. cruzi*. Essa abordagem foi escolhida por não ainda dispormos de soro específico anti-TcLip2 ou de quantidades suficientes de anti-TcPLA₁.

6.2.3. Análise funcional de TcPLA₁ e de TcLip2 em *Trypanosoma cruzi*

A fim de expressar as duas lipases em nosso modelo de estudo, as epimastigotas de *T. cruzi*, construímos os vetores de expressão ectópica semelhante ao descrito para tuzina. Utilizando as sequências regulatórias de *T. cruzi*, fusionamos as sequências íntegras tanto de TcPLA₁ quanto de TcLip2, em fusão à GFP (Figura 35). Tentamos construir vetores com a etiqueta de 3xFLAG, como feito para tuzina, mas não obtivemos sucesso na clonagem. Por isso, procedemos apenas com a fusão à GFP.

FIGURA 35 – VETORES UTILIZADOS PARA A EXPRESSÃO ECTÓPICA DE TcPLA₁ E DE TcLip2 EM *Trypanosoma cruzi*.

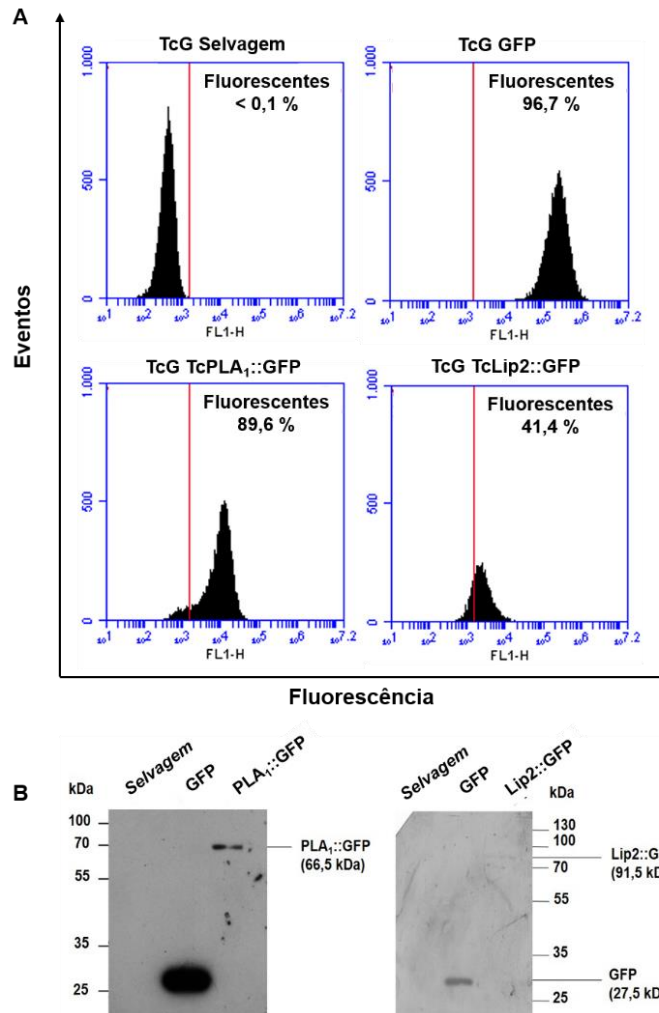


NOTA: Em ambos os vetores são mostradas as enzimas utilizadas para a identificação do vetor após a clonagem. O desenho dos vetores foi feito pelo software SnapGene Viewer v. 2.5 (GSL Biotech LLC). Alguns sítios reconhecidos por endonucleases são mostrados.

Após a transfecção e seleção destes vetores em epimastigotas de cepa G, os transfectantes foram selecionados e a expressão das proteínas fusionadas foi analisada por citometria de fluxo e por *Western blot* (Figura 36A e B). Ambas estão expressando suas respectivas fusões. A expressão de TcLip2 foi a menor de todas as populações analisadas, com menos de 50% de parasitos fluorescentes. Este dado foi observado também na imunodeteção da fusão de TcLip2 a GFP (Figura 36B), na

qual apenas uma reação muito fraca foi detectada. É provável que Lip2 seja uma proteína de baixa expressão e que sofre algum tipo de controle negativo pós traducional.

FIGURA 36 – EXPRESSÃO ECTÓPICA DE TcPLA₁ E DE TcLip2.

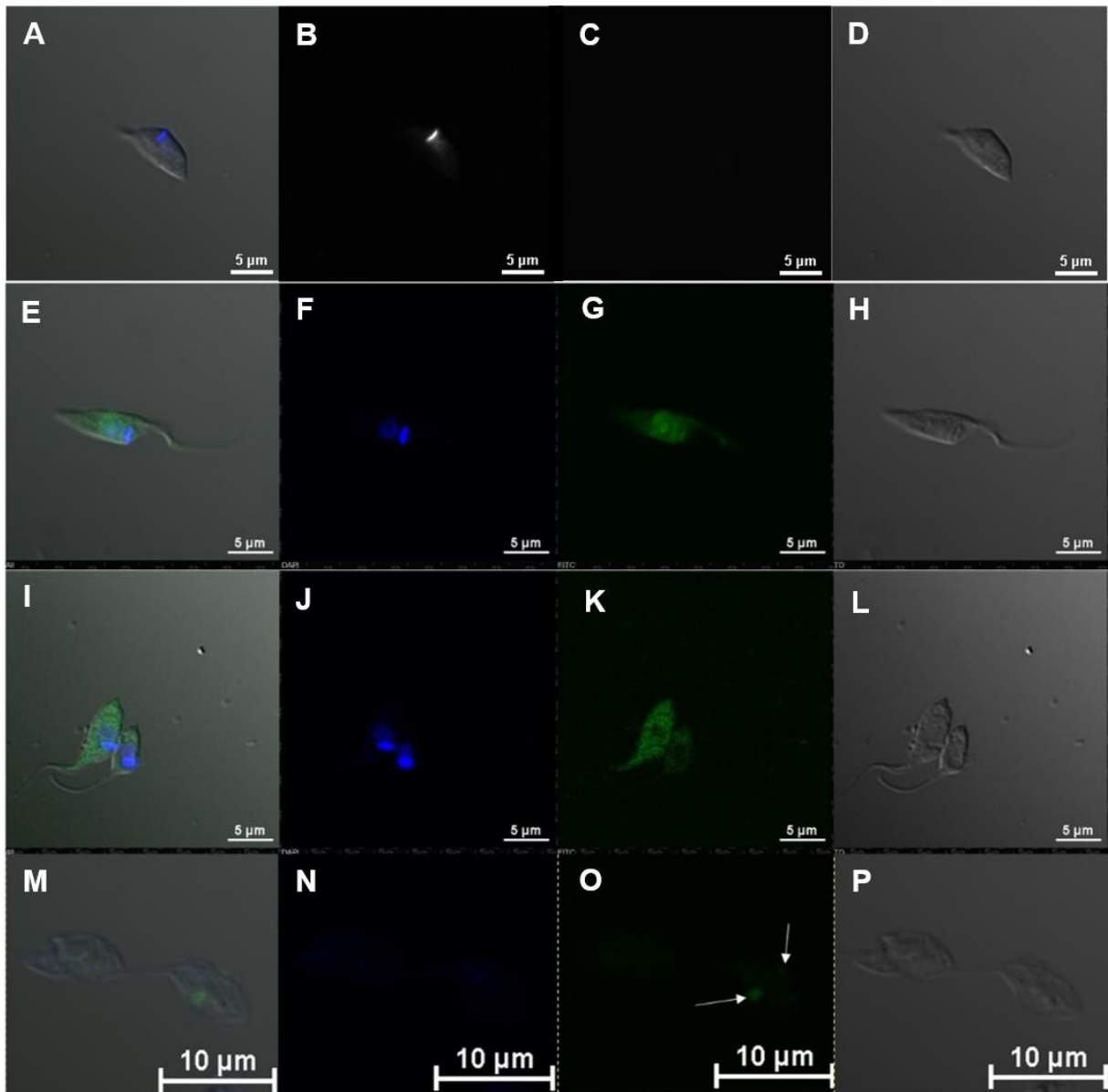


LEGENDA: Epimastigotas de cepa G expressando as fusões de PLA₁ e de Lip2 a GFP e GFP somente foram preparadas análise por citometria de fluxo em filtro FL1-H, com 10.000 eventos (BD Accuri® C6 Plus) (A) e para imunodeteccção por quimioluminescência com revelação em filme radiográfico, utilizando anticorpo anti-GFP (B). A cepa selvagem foi usada como controle negativo, e células expressando GFP, como controle positivo. Os resultados em B foram realizados em dias diferentes. As duas fotos de *Western blot* não estão em escala.

A localização subcelular de ambas estas lipases foi realizada por microscopia confocal. PLA₁ está aparentemente distribuída pelo corpo do parasito (Figura 37I a L), em um perfil citoplasmático semelhante ao do transfectado controle (GFP) (Figura 37I a H). Belaunzarán et al. (2013) identificaram que uma PLA₁ de *T. cruzi* das cepas RA; K98 e Cvd é liberada no sobrenadante da cultura destas células, e é ativa na

promoção da infecção por uma destas cepas. Nossas análises de bioinformática mostram que a PLA₁ da cepa G de *T. cruzi* possui um peptídeo sinal que pode destinar esta enzima para uma via secretória. Contudo, os dados de microscopia mostram que esta proteína ainda se encontra intracelularmente. Este resultado não exclui a possibilidade de que esta fosfolipase também seja secretada. Para confirmar esta hipótese, realizaremos a detecção da PLA₁ fusionada a GFP no sobrenadante da cultura. Outra abordagem a ser testada, será a troca da etiqueta de GFP pela de FLAG para, dessa forma, descartar a possibilidade de interferência da equiqueta na localização celular.

A localização de Lip2::GFP se assemelha a um ponto citoplasmático em algumas células (Figura 37M a P). Esta localização pode ser um artefato, talvez gerado pela expressão ectópica desta fusão, uma vez que estas células não apresentam morfologia característica. Apesar da localização da proteína TcLip2 fusionada a GFP ter se mostrado inconclusiva, o domínio FYVE, característico de proteínas que se ligam aos endossomos, está presente nesta lipase em questão (STENMARK; AASLAND, 1999; JENSSEN et al., 2001). Nos tripanossomatídeos, as organelas com atividade mais próxima daquela dos endossomos são os reservossomos. A via de endocitose não está completamente elucidada nos tripanossomatídeos, e a formação de endossomos ainda não é bem compreendida nestes protozoários (DE FIGUEIREDO; SOARES, 2000). Considerando a estrutura primária de Lip2 e sua possível localização, é possível que esta lipase esteja envolvida na endocitose em *T. cruzi*. A colocalização de Lip2 com marcadores de reservossomos, como por exemplo, a proteína cruzipaína, pode auxiliar-nos na confirmação desta hipótese. Adicionalmente, um teste de ligação da proteína Lip2 purificada à uma série de lipídios distintos pode identificar a especificidade por algum deles, em especial fosfatidilinositol trifosfato (PI3P), alvo da ligação pelo domínio FYVE (GETTA et al., 2010).

FIGURA 37 – LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE TcPLA₁ E TcLip2 EM FUSÃO A GFP.

LEGENDA: Epimastigotas de *T. cruzi* cepa G em fase log de crescimento foram fixadas em paraformaldeído coradas com DAPI e analisadas por microscopia confocal em filtro FITC (Nikon A1 plus). (A-D) As células selvagens foram usadas como controle negativo, enquanto GFP foi usada como controle positivo (E-H). (I-L) Localização subcelular de TcPLA₁ e (M-P) de TcLip2. As fotos A; E; I e M mostram a sobreposição de todas as imagens; B; F; J e N mostram o núcleo e cinetoplasto corados com DAPI; C; G; K e O mostram GFP e as proteínas fusionadas a ela. Por fim, os quadros D; H; L e P mostram DIC para cada uma das populações.

Como discutido anteriormente, lipases são apontadas como fatores de virulência em diferentes microrganismos. Além da sua participação no evento de invasão (BELAUNZARÁN et al., 2007), o crescimento das formas amastigotas no hospedeiro mamífero depende da alteração de seu metabolismo para a síntese de lipídeos entre outras biomoléculas, as quais podem ser utilizadas pelas amastigotas para a produção de energia, uma vez que elas aumentam a capacidade de captação e oxidação de ácidos graxos (ATWOOD et al., 2005; LI et al., 2016). As lipases aqui estudadas podem de alguma forma contribuir com esse processo metabólico. A persistência seletiva de *T. cruzi* em células dos tecidos muscular e adiposo, cuja produção de energia é direcionada pelo metabolismo de ácidos graxos, mostra grande adaptabilidade deste parasito à célula hospedeira, e, conseqüentemente, uma vantagem evolutiva no escape do sistema imune do hospedeiro (CARADONNA et al., 2013).

7. CONCLUSÃO

Tuzina é um gene multicópia que possui um domínio de *P-loop* nucleotídeo hidrolase, com provável atividade de ligação à ATP/GTP. Um provável códon alternativo foi identificado à montante do primeiro gene de tuzina em um dos blocos de amastina/tuzina, sugerindo a expressão de uma outra variante de tuzina de maior massa molecular, com expressão fortemente regulada. O fracionamento subcelular de tuzina sugere que ela está tanto no citoplasma celular, como associada à alguma organela. Os dados de coimunoprecipitação indicam que tuzina pode estar associada a um complexo de translocação externo da mitocôndria (ATOM). Considerando toda a singularidade desta organela nos tripanossomatídeos e de seu sistema de translocação externo, é possível que a tuzina, uma proteína também exclusiva desta família de protozoários, faça parte deste sistema ou seja transportado por ele. Sua função nestes processos ainda precisa ser determinada. Para tal, a interação com as prováveis proteínas parceiras precisa ser testada por métodos distintos, como a coimunoprecipitação inversa, SDS-PAGE bidimensional em gel nativo (MANI *et al*, 2015), FRET (CLEGG; 2009) e BioID (ROUX; KIM; BURKE, 2013).

A análise da de estrutura *in silico* das lipases TcPLA₁ e de TcLip2 revelou um domínio conservado de lipase, da família das α/β hidrolases. Para TcPLA₁, um peptídeo sinal que seria responsável por excretar esta proteína para o meio extracelular ou para a membrana foi encontrado. A localização da fusão desta proteína a GFP mostrou perfil citoplasmático, o que sugere que esta proteína ainda se mantenha, ao menos em parte, citoplasmática nas células epimastigotas. Para TcLip2, um domínio FYVE de interação com fosfatidilinositol foi identificado, indicando possível participação na formação de organelas como endossomos e lisossomos. Para determinar o papel destas lipases no perfil de virulência da cepa G, populações superexpressoras e nocaute serão avaliadas quanto à sua capacidade infectiva em comparação com a selvagem.

REFERÊNCIAS

- ADL, S. M.; SIMPSON, A. G. B.; LANE, C. E.; et al. The revised classification of eukaryotes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 429–493, 2012.
- ADUNG'A, V. O.; FIELD, M. C. TbFRP, a novel FYVE-domain containing phosphoinositide-binding Ras-like GTPase from trypanosomes. **Experimental Parasitology**, v. 133, n. 3, p. 255–64, 2013.
- ANDENMATTEN, N.; EGARTER, S.; JACKSON, A. J.; et al. Conditional genome engineering in *Toxoplasma gondii* uncovers alternative invasion mechanisms. **Nature Methods**, v. 10, n. 2, p. 125–7, 2013. Europe PMC Funders.
- ANDREWS, N. W.; HONG, K. S.; ROBBINS, E. S.; NUSSENZWEIG, V. Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 64, n. 3, p. 474–84, 1987.
- ANGHEBEN, A.; BOIX, L.; BUONFRATE, D.; et al. Chagas disease and transfusion medicine: A perspective from non-endemic countries. **Blood Transfusion**, v. 13, n. 4, p. 540–550, 2015.
- ARAÚJO, P. R.; TEIXEIRA, S. M. Regulatory elements involved in the post-transcriptional control of stage-specific gene expression in *Trypanosoma cruzi*: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 3, p. 257–66, 2011.
- ASLETT, M.; AURRECOECHEA, C.; BERRIMAN, M.; et al. TriTrypDB: A functional genomic resource for the Trypanosomatidae. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. SUPPL.1, p. 457–462, 2009.
- ATWOOD, J. A.; WEATHERLY, D. B.; MINNING, T. A.; et al. The *Trypanosoma cruzi* proteome. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 473–476, 2005.
- BARNABÉ, C.; MOBAREC, H. I.; JURADO, M. R.; CORTEZ, J. A.; BRENIÈRE, S. F. Reconsideration of the seven discrete typing units within the species *Trypanosoma cruzi*, a new proposal of three reliable mitochondrial clades. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 39, p. 176–186, 2016.
- BATISTA, M.; MARCHINI, F. K.; CELEDON, P. A. F.; et al. A high-throughput cloning system for reverse genetics in *Trypanosoma cruzi*. **BMC Microbiology**, v. 259, n. 10, p. 1–12, 2010.
- BAYONA, J. C.; NAKAYASU, E. S.; LAVERRIÈRE, M.; et al. SUMOylation pathway in *Trypanosoma cruzi*: functional characterization and proteomic analysis of target proteins. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 10, p. M110.007369, 2011.
- BELAUNZARÁN, M. L.; LAMMEL, E. M.; DE ISOLA, E. L. D. Phospholipases a in trypanosomatids. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1-10, 2011.

BELAUNZARÁN, M. L.; WAINSELBAUM, M. J.; LAMMEL, E. M.; et al. Phospholipase A1 from *Trypanosoma cruzi* infective stages generates lipid messengers that activate host cell protein kinase c. **Parasitology**, v. 134, p. 491–502, 2007.

BELAUNZARÁN, M. L.; WILKOWSKY, S. E.; LAMMEL, E. M.; et al. Phospholipase A1: A novel virulence factor in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 187, n. 2, p. 77–86, 2013.

BELLOFATTO, V.; CROSS, G. A. Expression of a bacterial gene in a trypanosomatid protozoan. **Science**, v. 244, n. 4909, p. 1167–9, 1989.

BERN, C. Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 5, p. 456–466, 2015.

BERN, C.; MARTIN, D. L.; GILMAN, R. H. Acute and congenital Chagas disease. **Advances in Parasitology**, v. 75, p. 19–47, 2011.

BILLINGSLEY, P. F. Morphometric analysis of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera:Reduviidae) midgut cells during blood digestion. **Tissue & Cell**, v. 20, n. 2, p. 291–301, 1988.

BOS, M. P.; TEFSSEN, B.; VOET, P.; et al. Function of neisserial outer membrane phospholipase a in autolysis and assessment of its vaccine potential. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 4, p. 2222–31, 2005.

BRISSE, S.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 1, p. 35–44, 2000.

BRODSKY, J. L.; SCHEKMAN, R. A Sec63p-BiP complex from yeast is required for protein translocation in a reconstituted proteoliposome. **Journal of Cell Biology**, v. 123, n. 6, p. 1355–1363, 1993.

BURLE-CALDAS, G. DE A.; GRAZIELLE-SILVA, V.; LAIBIDA, L. A.; DAROCHA, W. D.; TEIXEIRA, S. M. R. Expanding the tool box for genetic manipulation of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 203, n. 1–2, p. 25–33, 2015.

CAMPBELL, D. A.; THOMAS, S.; STURM, N. R. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? **Microbes and Infection**, v. 5, n. 13, p. 1231–40, 2003.

CAMPOS, P. C.; BARTHOLOMEU, D. C.; DAROCHA, W. D.; CERQUEIRA, G. C.; TEIXEIRA, S. M. R. Sequences involved in mRNA processing in *Trypanosoma cruzi*. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 12, p. 1383–1389, 2008.

CANO, M. I.; GRUBER, A.; VAZQUEZ, M.; et al. Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* Genome Project. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 71, n. 2, p. 273–278, 1995.

CARADONNA, K. L.; ENGEL, J. C.; JACOBI, D.; LEE, C. H.; BURLEIGH, B. A. Host metabolism regulates intracellular growth of trypanosoma cruzi. **Cell Host and Microbe**, v. 13, n. 1, p. 108–117, 2013.

CARRIÈRE, F.; THIRSTRUP, K.; HJORTH, S.; et al. Pancreatic lipase structure-function relationships by domain exchange. **Biochemistry**, v. 36, n. 1, p. 239–248, 1997.

CASTRO, J. A.; DE MECCA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Human & Experimental Toxicology**, v. 25, n. 8, p. 471–9, 2006.

CHACINSKA, A.; KOEHLER, C. M.; MILENKOVIC, D.; LITHGOW, T.; PFANNER, N. Importing Mitochondrial Proteins: Machineries and Mechanisms. **Cell**, v. 138, n. 4, p. 628–644, 2009.

CHAGAS, C. Nova tripanomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homen. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159–218, 1909.

CHEVALLET, M.; LUCHE, S.; RABILLOUD, T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. **Nature Protocols**, v. 1, n. 4, p. 1252–1258, 2006.

CHURCH, G. M.; GILBERT, W. Genomic sequencing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 7, p. 1991–5, 1984.

CLEGG, R. M. Chapter 1 Förster resonance energy transfer—FRET what is it, why do it, and how it's done. **Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology**. v. 33, p.1–57, 2009.

COLLEY, C. M.; ZWAAL, R. F. A.; ROELOFSEN, B.; VAN DEENEN, L. L. M. Lytic and non-lytic degradation of phospholipids in mammalian erythrocytes by pure phospholipases. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 307, n. 1, p. 74–82, 1973.

CONTRERAS, V. T.; SALLES, J. M.; THOMAS, N.; MOREL, C. M.; GOLDENBERG, S. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 16, n. 3, p. 315–327, 1985.

COUGHLIN, B. C.; TEIXEIRA, S. M. R.; KIRCHHOFF, L. V.; DONELSON, J. E. Amastin mRNA Abundance in *Trypanosoma cruzi* Is Controlled by a 3' cis-Element and an Untranslated Amastin mRNA Abundance in *Trypanosoma cruzi* Is Controlled by a 3'-Untranslated Region Position-dependent cis-Element and an Untranslated Region-binding Prot. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 16, p. 12051–12060, 2000.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. S6-7, 2010.

COX, B.; EMILI, A. Tissue subcellular fractionation and protein extraction for use in mass-spectrometry-based proteomics. **Nature Protocols**, v. 1, n. 4, p. 1872–8, 2006.

COX, J.; MANN, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 12, p. 1367–72, 2008.

CRUZ, M. C.; SOUZA-MELO, N.; DA SILVA, C. V.; et al. Trypanosoma cruzi: Role of δ -Amastin on Extracellular Amastigote Cell Invasion and Differentiation. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.

DALE, E. C.; OW, D. W. Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. December, p. 10558–10562, 1991.

DAROCHA, W. D.; OTSU, K.; TEIXEIRA, S. M. R.; DONELSON, J. E. Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in Trypanosoma cruzi. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 133, n. 2, p. 175–186, 2004.

DAROCHA, W. D.; SILVA, R. A.; BARTHOLOMEU, D. C.; et al. Expression of exogenous genes in Trypanosoma cruzi: Improving vectors and electroporation protocols. **Parasitology Research**, v. 92, n. 2, p. 113–120, 2004.

DOCAMPO, R.; DE SOUZA, W.; MIRANDA, K.; ROHLOFF, P.; MORENO, S. N. J. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. **Nature Reviews - Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 251–61, 2005.

DONELSON, J. E.; GARDNER, M. J.; EL-SAYED, N. M. More surprises from Kinetoplastida. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. March, p. 2579–2581, 1999.

EKANAYAK, D.; SABATINI, R. Epigenetic regulation of polymerase ii transcription initiation in trypanosoma cruzi: Modulation of nucleosome abundance, histone modification, and polymerase occupancy by o-linked thymine DNA glucosylation. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 11, p. 1465–1472, 2011.

EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BARTHOLOMEU, D. C.; et al. The genome sequence of Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 409–15, 2005.

ELIAS, M. C.; FARIA, M. Are there epigenetic controls in trypanosoma cruzi. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1178, p. 285–290, 2009.

FALK, A.; FEYS, B. J.; FROST, L. N.; et al. EDS1, an essential component of R gene-mediated disease resistance in Arabidopsis has homology to eukaryotic lipases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 6, p. 3292–3297, 1999.

DE FIGUEIREDO, R. C.; SOARES, M. J. Low temperature blocks fluid-phase pinocytosis and receptor-mediated endocytosis in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, v. 86, n. 5, p. 413–8, 2000.

FONS, R. D.; BOGERT, B. A.; HEGDE, R. S. Substrate-specific function of the translocon-associated protein complex during translocation across the ER membrane. **Journal of Cell Biology**, v. 160, n. 4, p. 529–539, 2003. Rockefeller Univ Press.

FRANZÉN, O.; OCHAYA, S.; SHERWOOD, E.; et al. Shotgun sequencing analysis of *Trypanosoma cruzi* i Sylvio X10/1 and comparison with *T. cruzi* VI CL Brener. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 3, p. 1–9, 2011.

FRITZIUS, T.; BURKARD, G.; HAAS, E.; et al. A WD-FYVE protein binds to the kinases Akt and PKCzeta/lambda. **The Biochemical Journal**, v. 399, n. 1, p. 9–20, 2006.

DE GAUDENZI, J. G.; D'ORSO, I.; FRASCH, A. C. C. RNA recognition motif-type RNA-binding proteins in *Trypanosoma cruzi* form a family involved in the interaction with specific transcripts in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 21, p. 18884–18894, 2003.

GLOVER, L.; HORN, D. Site-specific DNA double-strand breaks greatly increase stable transformation efficiency in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 166, n. 2, p. 194–197, 2009.

GOLDSHMIDT, H.; SHEINER, L.; BÜTIKOFER, P.; et al. Role of protein translocation pathways across the endoplasmic reticulum in *Trypanosoma brucei*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 46, p. 32085–32098, 2008.

GONÇALVES, R. L. S.; MENNA BARRETO, R. F. S.; POLYCARPO, C. R.; et al. A comparative assessment of mitochondrial function in epimastigotes and bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 43, n. 6, p. 651–661, 2011.

GOSSEN, M.; BUJARD, H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 12, p. 5547–51, 1992.

GOUY, M.; GUINDON, S.; GASCUEL, O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. **Molecular Biology and Evolution**, v. 27, n. 2, p. 221–4, 2010.

GUETTA, D.; LANGOU, K.; GRUNWALD, D.; KLEIN, G.; AUBRY, L. FYVE-dependent endosomal targeting of an arrestin-related protein in amoeba. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, p. 1–13, 2010.

HAMBREY, P. N.; MELLORS, A.; TIZARD, I. R. The phospholipases of pathogenic and non-pathogenic *Trypanosoma* species. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 2, n. 3–4, p. 177–86, 1981.

HAMBREY, P. N.; TIZARD, I. R.; MELLORS, A. Accumulation of phospholipase A1 in tissue fluid of rabbits infected with *Trypanosoma brucei*. **Tropenmedizin und Parasitologie**, v. 31, n. 4, p. 439–443, 1980.

HAMILTON, P. B.; ADAMS, E. R.; NJIOKOU, F.; et al. Phylogenetic analysis reveals the presence of the *Trypanosoma cruzi* clade in African terrestrial mammals. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 1, p. 81–86, 2009.

HANSON, P. I.; WHITEHEART, S. W. AAA+ proteins: have engine, will work. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 7, p. 519–529, 2005. Nature Publishing Group.

HARTLEY, J. L.; TEMPLE, G. F.; BRASCH, M. A. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. **Genome Research**, v. 10, n. 11, p. 1788–1795, 2000.

HILDENBEUTEL, M.; HABIB, S. J.; HERRMANN, J. M.; RAPAPORT, D. New insights into the mechanism of precursor protein insertion into the mitochondrial membranes. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 268, p. 147–90, 2008.

IRIGOÍN, F.; CIBILS, L.; COMINI, M. A.; et al. Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, n. 6, p. 733–742, 2008.

IVENS, A. C. The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania major*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 436–442, 2005.

JACKSON, A. P. The evolution of amastin surface glycoproteins in trypanosomatid parasites. **Molecular Biology and Evolution**, v. 27, n. 1, p. 33–45, 2010.

JAEGER, K. E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; et al. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, n. 1, p. 29–63, 1994.

JENSEN, R. B.; LA COUR, T.; ALBRETHSEN, J.; NIELSEN, M.; SKRIVER, K. FIVE zinc-finger proteins in the plant model *Arabidopsis thaliana*: identification of PtdIns3P-binding residues by comparison of classic and variant FIVE domains. **The Biochemical journal**, v. 359, n. Pt 1, p. 165–173, 2001.

JULLIEN, N. Regulation of Cre recombinase by ligand-induced complementation of inactive fragments. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 21, p. 131e–131, 2003.

KALIL-FILHO, R. Globalization of Chagas Disease Burden and New Treatment Perspectives. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 66, n. 10, p. 1190–1192, 2015.

KANGUSSU-MARCOLINO, M. M.; CUNHA, A. P.; AVILA, A. R.; HERMAN, J. P.; DAROCHA, W. D. Conditional removal of selectable markers in *Trypanosoma cruzi* using a site-specific recombination tool: proof of concept. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 198, n. 2, p. 71–74, 2014.

KANGUSSU-MARCOLINO, M. M.; DE PAIVA, R. M. C.; ARAÚJO, P. R.; et al. Distinct genomic organization, mRNA expression and cellular localization of members of two amastin sub-families present in *Trypanosoma cruzi*. **BMC Microbiology**, v. 13, p. 10, 2013.

KELLEY, L. A.; STERNBERG, M. J. E. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. **Nature Protocols**, v. 4, n. 3, p. 363–71, 2009.

KELLY, J. M.; WARD, H. M.; MILES, M. A.; KENDALL, G. A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. **Nucleic Acids Research**, v. 20, n. 15, p. 3963–3969, 1992.

LABAN, A.; WIRTH, D. F. Transfection of *Leishmania enriettii* and expression of chloramphenicol acetyltransferase gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 23, p. 9119–23, 1989.

LAKSHMI, B. S.; WANG, R.; MADHUBALA, R. *Leishmania* genome analysis and high-throughput immunological screening identifies tuzin as a novel vaccine candidate against visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 32, n. 30, p. 3816–3822, 2014.

LANDER, N.; LI, Z.-H.; NIYOGI, S.; DOCAMPO, R. CRISPR/Cas9-Induced Disruption of Paraflagellar Rod Protein 1 and 2 Genes in *Trypanosoma cruzi* Reveals Their Role in Flagellar Attachment. **mBio**, v. 6, n. 4, p. e01012, 2015.

LANDFEAR, S. M.; IGNATUSHCHENKO, M. The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 115, n. 1, p. 1–17, 2001.

LEBOWITZ, J. H.; SMITH, H. Q.; RUSCHE, L.; BEVERLEY, S. M. Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. **Genes and Development**, v. 7, n. 6, p. 996–1007, 1993.

LETUNIC, I.; DOERKS, T.; BORK, P. SMART 7: Recent updates to the protein domain annotation resource. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. D302-5, 2012.

LEUNG, K. F.; RILEY, F. S.; CARRINGTON, M.; FIELD, M. C. Ubiquitylation and developmental regulation of invariant surface protein expression in trypanosomes. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 7, p. 916–31, 2011.

LI, X.; HEYER, W.-D. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. **Cell Research**, v. 18, n. 1, p. 99–113, 2008.

LI, Y.; SHAH-SIMPSON, S.; OKRAH, K.; et al. Transcriptome Remodeling in *Trypanosoma cruzi* and Human Cells during Intracellular Infection. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 4, p. e1005511, 2016.

LIMA, F. M.; OLIVEIRA, P.; MORTARA, R. A.; SILVEIRA, J. F.; BAHIA, D. The challenge of Chagas' disease: Has the human pathogen, *Trypanosoma cruzi*, learned how to modulate signaling events to subvert host cells? **New**

Biotechnology, v. 27, n. 6, p. 837–843, 2010.

LIMA, S.; GUO, M. S.; CHABA, R.; GROSS, C. A.; SAUER, R. T. Dual Molecular Signals Mediate the Bacterial Response to Outer-Membrane Stress. **Science**, v. 340, n. 6134, p. 837–841, 2013.

LITHGOW, T.; SCHNEIDER, A. Evolution of macromolecular import pathways in mitochondria, hydrogenosomes and mitosomes. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 365, n. 1541, p. 799–817, 2010.

LOPES, A. H.; SOUTO-PADRÓN, T. .; DIAS, F. A. .; et al. Trypanosomatids: Odd Organisms, Devastating Diseases. **The Open Parasitology Journal**, v. 4, n. 1, p. 30–59, 2010.

LORENZI, H. A.; VAZQUEZ, M. P.; LEVIN, M. J. Integration of expression vectors into the ribosomal locus of *Trypanosoma cruzi*. **Gene**, v. 310, n. 1–2, p. 91–99, 2003.

LOWRIE JR, D. J.; GIFFIN, B. F.; VENTULLO, R. M. The ubiquitin-ligase system in *Trypanosoma brucei brucei*. **American Journal of Medical Hygiene**, v. 49, n. 5, p. 545–551, 1993.

LU, H. Y.; BUCK, G. A. Expression of an exogenous gene in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 44, n. 1, p. 109–114, 1991.

MA, Y. F.; WEISS, L. M.; HUANG, H. A method for rapid regulation of protein expression in *Trypanosoma cruzi*. **International Journal for Parasitology**, v. 42, n. 1, p. 33–37, 2012.

MA, Y.; WEISS, L. M.; HUANG, H. Inducible suicide vector systems for *Trypanosoma cruzi*. **Microbes and Infection**, v. 17, n. 6, p. 440–450, 2015.

MACGURN, J. A.; HSU, P.-C.; EMR, S. D. Ubiquitin and membrane protein turnover: from cradle to grave. **Annual Review of Biochemistry**, v. 81, p. 231–59, 2012.

MAIR, G.; SHI, H.; LI, H.; et al. A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. **RNA**, v. 6, n. 2, p. 163–9, 2000.

MANI, J.; DESY, S.; NIEMANN, M.; et al. Mitochondrial protein import receptors in Kinetoplastids reveal convergent evolution over large phylogenetic distances. **Nature Communications**, v. 6, p. 6646, 2015.

MARCHINI, F. K.; DE GODOY, L. M. F.; BATISTA, M.; KUGERATSKI, F. G.; KRIEGER, M. A. Towards the phosphoproteome of trypanosomatids. **Sub-Cellular Biochemistry**, v. 74, p. 351–78, 2014.

MARCHLER-BAUER, A.; DERBYSHIRE, M. K.; GONZALES, N. R.; et al. CDD: NCBI's conserved domain database. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D222–D226, 2015.

MARCILI, A.; LIMA, L.; CAVAZZANA, M.; et al. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. **Parasitology**, v. 136, n. 6, p. 641–55, 2009.

MARTÍNEZ-CALVILLO, S.; LÓPEZ, I.; HERNÁNDEZ, R. pRIBOTEX expression vector: A pTEX derivative for a rapid selection of *Trypanosoma cruzi* transfectants. **Gene**, v. 199, n. 1–2, p. 71–76, 1997.

MARTÍNEZ-CALVILLO, S.; VIZUET-DE-RUEDA, J. C.; FLORENCIO-MARTÍNEZ, L. E.; MANNING-CELA, R. G.; FIGUEROA-ANGULO, E. E. Gene expression in trypanosomatid parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 1-15, 2010.

MAYOR, S.; RIEZMAN, H. Sorting GPI-anchored proteins. **Nature Reviews - Molecular Cell Biology**, v. 5, n. February, p. 110–120, 2004.

MOKRANJAC, D.; NEUPERT, W. Thirty years of protein translocation into mitochondria: Unexpectedly complex and still puzzling. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1793, n. 1, p. 33–41, 2009.

MOTTA, M. C. M.; CATTAPRETA, C. M. C.; SCHENKMAN, S.; et al. The bacterium endosymbiont of *Crithidia deanei* undergoes coordinated division with the host cell nucleus. **PLoS ONE**, v. 5, n. 8, p. e12415, 2010.

MYLER, P. J.; AUDLEMAN, L.; DEVOS, T.; et al. *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 6, p. 2902–2906, 1999.

DAS NEVES, Johnny William Lima. **Análise Bioinformática da Diversidade Genômica das Diferentes Linhagens de *Trypanosoma cruzi* com Ênfase nos Mecanismos de Regulação da Expressão Gênica**, 2015. 127 f. Dissertação (Biotecnologia) - Instituto Carlos Chagas, Curitiba, 2015.

NIEMANN, M.; WIESE, S.; MANI, J.; et al. Mitochondrial outer membrane proteome of *Trypanosoma brucei* reveals novel factors required to maintain mitochondrial morphology. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 12, n. 2, p. 515–28, 2013.

DI NOIA, J. M.; D'ORSO, I.; SÁNCHEZ, D. O.; FRASCH, A. C. C. AU-rich elements in the 3'-untranslated region of a new mucin-type gene family of *Trypanosoma cruzi* confers mRNA instability and modulates translation efficiency. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 14, p. 10218–10227, 2000.

OPPERDOES, F. R.; VAN ROY, J. The phospholipases of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms and cultured procyclics. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 5, n. 5, p. 309–19, 1982.

PADILLA-MEJÍA, N. E.; FLORENCIO-MARTÍNEZ, L. E.; FIGUEROA-ANGULO, E. E.; et al. Gene organization and sequence analyses of transfer RNA genes in

Trypanosomatid parasites. **BMC Genomics**, v. 10, p. 232, 2009.

PANIGRAHI, A. K.; OGATA, Y.; ZÍKOVÁ, A.; et al. A comprehensive analysis of trypanosoma brucei mitochondrial proteome. **Proteomics**, v. 9, n. 2, p. 434–450, 2009.

PENG, D.; KURUP, S. P.; YAO, P. Y.; MINNING, T. A.; TARLETON, R. L. CRISPR-Cas9-Mediated Single-Gene and Gene Family Disruption in Trypanosoma cruzi. **mBio**, v. 6, n. 1, p. 1–11, 2015.

PERRY, A. J.; RIMMER, K. A.; MERTENS, H. D. T.; et al. Structure, topology and function of the translocase of the outer membrane of mitochondria. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 265–74, 2008.

PETERSEN, T. N.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v. 8, n. 10, p. 785–786, 2011.

PLATH, K.; RAPOPORT, T. A. Spontaneous release of cytosolic proteins from posttranslational substrates before their transport into the endoplasmic reticulum. **Journal of Cell Biology**, v. 151, n. 1, p. 167–178, 2000.

PUSNIK, M.; MANI, J.; SCHMIDT, O.; et al. An essential novel component of the noncanonical mitochondrial outer membrane protein import system of trypanosomatids. **Molecular Biology of the Cell**, v. 23, n. 17, p. 3420–8, 2012.

PUSNIK, M.; SCHMIDT, O.; PERRY, A. J.; et al. Mitochondrial preprotein translocase of trypanosomatids has a bacterial origin. **Current Biology**, v. 21, n. 20, p. 1738–1743, 2011.

QUIJADA, L.; GUERRA-GIRALDEZ, C.; DROZDZ, M.; et al. Expression of the human RNA-binding protein HuR in Trypanosoma brucei increases the abundance of mRNAs containing AU-rich regulatory elements. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 20, p. 4414–24, 2002.

RAN, F. A.; HSU, P. D.; WRIGHT, J.; et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. **Nature Protocols**, v. 8, n. 11, p. 2281–308, 2013. NIH Public Access.

RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 275–291, 2012.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010.

RICHMOND, G. S.; SMITH, T. K. The role and characterization of phospholipase A1 in mediating lysophosphatidylcholine synthesis in Trypanosoma brucei. **The Biochemical Journal**, v. 405, n. 2, p. 319–29, 2007.

- ROCHETTE, A.; MCNICOLL, F.; GIRARD, J.; et al. Characterization and developmental gene regulation of a large gene family encoding amastin surface proteins in *Leishmania* spp. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 140, n. 2, p. 205–220, 2005.
- ROUX, K. J.; KIM, D. I.; BURKE, B. BioID: A screen for protein-protein interactions. **Current Protocols in Protein Science**, v. 74, n. SUPPL.74, p. Unit 19.23., 2013.
- SAGE, L.; HAMBREY, P. N.; WERCHOLA, G. M.; MELLORS, A.; TIZARD, I. R. Lysophospholipase 1 in *Trypanosoma brucei*. **Tropenmedizin und Parasitologie**, v. 32, n. 4, p. 215–20, 1981.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SCAHILL, M. D.; PASTAR, I.; CROSS, G. A. M. CRE recombinase-based positive-negative selection systems for genetic manipulation in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 157, n. 1, p. 73–82, 2008.
- SCHEURING, D.; KÜNZL, F.; VIOTTI, C.; et al. Ubiquitin initiates sorting of Golgi and plasma membrane proteins into the vacuolar degradation pathway. **BMC Plant Biology**, v. 12, p. 164, 2012.
- SCHMIDT, O.; PFANNER, N.; MEISINGER, C. Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. **Nature Reviews - Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 9, p. 655–67, 2010.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of Chagas disease. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 54, n. 6, p. 845–52, 2012.
- SIEVERS, F.; HIGGINS, D. G. Clustal omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. **Methods in Molecular Biology**, v. 1079, p. 105–116, 2014.
- SILBER, A. M.; TONELLI, R. R.; LOPES, C. G.; et al. Glucose uptake in the mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 168, n. 1, p. 102–8, 2009.
- SNIJDER, H.; DIJKSTRA, B. Bacterial phospholipase A: structure and function of an integral membrane phospholipase. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1488, n. 1, p. 91–101, 2000.
- SOUTHERN, E. M.; MITCHELL, A. R. Chromatography of Nucleic Acid Digests on Thin Layers of Cellulose Impregnated with Polyethyleneimine. **The Biochemical Journal**, v. 123, n. 4, p. 613–617, 1971.
- SOUZA, R. T.; LIMA, F. M.; BARROS, R. M.; et al. Genome size, karyotype polymorphism and chromosomal evolution in *Trypanosoma cruzi*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. e23042, 2011.

SOUZA, W. DE. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. May, p. 89–100, 2009.

STEINBÜCHEL, A.; SANTOS, A. R. DOS; DE SOUZA, A. S.; AL., E. **Structures and Organelles in Pathogenic Protists**. 2014.

STENMARK, H.; AASLAND, R. FYVE-finger proteins – effectors of an inositol lipid. **Journal of Cell Science**, v. 4183, p. 4175–4183, 1999.

STENMARK, H.; AASLAND, R.; DRISCOLL, P. C. The phosphatidylinositol 3-phosphate-binding FYVE finger. **FEBS Letters**, v. 513, n. 1, p. 77–84, 2002.

STUDIER, F. W.; MOFFATT, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. **Journal of Molecular Biology**, v. 189, n. 1, p. 113–130, 1986.

TAN, T. H. P.; PACH, R.; CRAUSAZ, A.; IVENS, A.; SCHNEIDER, A. tRNAs in *Trypanosoma brucei*: genomic organization, expression, and mitochondrial import. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 11, p. 3707–17, 2002.

TANOWITZ, H. B.; WEISS, L. M.; MONTGOMERY, S. P. Chagas disease has now gone global. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 4, p. 4–5, 2011.

TAYLOR, M. C.; KELLY, J. M. pTcINDEX: a stable tetracycline-regulated expression vector for *Trypanosoma cruzi*. **BMC Biotechnology**, v. 6, p. 32, 2006.

TEIXEIRA, S. M. Control of gene expression in Trypanosomatidae. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 1503–16, 1998.

TEIXEIRA, S. M.; KIRCHHOFF, L. V.; DONELSON, J. E. *Trypanosoma cruzi*: suppression of tuzin gene expression by its 5'-UTR and spliced leader addition site. **Experimental Parasitology**, v. 93, n. 3, p. 143–151, 1999.

TEIXEIRA, S. M.; DE PAIVA, R. M. C.; KANGUSSU-MARCOLINO, M. M.; DAROCHA, W. D. Trypanosomatid comparative genomics: Contributions to the study of parasite biology and different parasitic diseases. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 1, p. 1–17, 2012.

TEIXEIRA, S. M. R.; DAROCHA, W. D. Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 148–58, 2003.

TEIXEIRA, S. M. R.; KIRCHHOFF, L. V.; DONELSON, J. E. Post-transcriptional Elements Regulating Expression of mRNAs from the Amastin / Tuzin Gene Cluster of *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 38, p. 22586–22594, 1995.

TEIXEIRA, S. M. R.; RUSSELL, D. G.; KIRCHHOFF, L. V.; DONELSON, J. E. A differentially expressed gene family encoding “amastin,” a surface protein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n.

32, p. 20509–16, 1994.

TIBAYRENC, M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 1, p. 85–104, 1998.

TIZARD, I.; NIELSEN, K. H.; SEED, J. R.; HALL, J. E. Biologically active products from African Trypanosomes. **Microbiological Reviews**, v. 42, n. 4, p. 664–81, 1978.

TIZARD, I. R.; NIELSEN, K.; MELLORS, A.; ASSOKU, R. K. Free fatty acids, lysophospholipases, and the pathogenesis of African trypanosomiasis. **Lancet**, v. 2, n. 8028, p. 91, 1977.

TriTrypDB : The Kinetoplastid Genomics Resource. Disponível em: <<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>>. Acesso em: 23/5/2016.

ULLU, E.; MATTHEWS, K. R.; TSCHUDI, C. Temporal order of RNA-processing reactions in trypanosomes: rapid trans splicing precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts. **Molecular and Cellular Biology**, v. 13, n. 1, p. 720–725, 1993.

URBANIÁK, M. D.; MARTIN, D. M. A.; FERGUSON, M. A. J. Global quantitative SILAC phosphoproteomics reveals differential phosphorylation is widespread between the procyclic and bloodstream form lifecycle stages of *Trypanosoma brucei*. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 5, p. 2233–2244, 2013.

VAZQUEZ, M. P.; LEVIN, M. J. Functional analysis of the intergenic regions of TcP2Beta gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. **Gene**, v. 239, n. 2, p. 217–225, 1999.

VERGER, R. “Interfacial activation” of lipases: Facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 32–38, 1997.

VILLALTA, F.; ZHANG, Y.; BIBB, K. E.; et al. Signal transduction in human macrophages by gp83 ligand of *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote gp83 ligand up-regulates trypanosome entry through protein kinase C activation. **Molecular Cell Biology Research Communications**, v. 2, n. 1, p. 64–70, 1999.

VIOTTI, R.; ALARCÓN DE NOYA, B.; ARAUJO-JORGE, T.; et al. Towards a paradigm shift in the treatment of chronic Chagas disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 635–9, 2014.

WHO. WHO | Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 26/2/2016.

WIRTZ, E.; LEAL, S.; OCHATT, C.; CROSS, G. A. M. A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 99, n. 1, p. 89–101, 1999.

WONG, H.; SCHOTZ, M. C. The lipase gene family. **Journal of Lipid Research**, v. 43, n. 7, p. 993–999, 2002.

XIAO, X.; LOWE, M. E. The β 5-loop and lid domain contribute to the substrate specificity of pancreatic lipase-related protein 2 (PNLIPRP2). **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 48, p. 28847–28856, 2015.

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 1, p. 87–111, 2006.

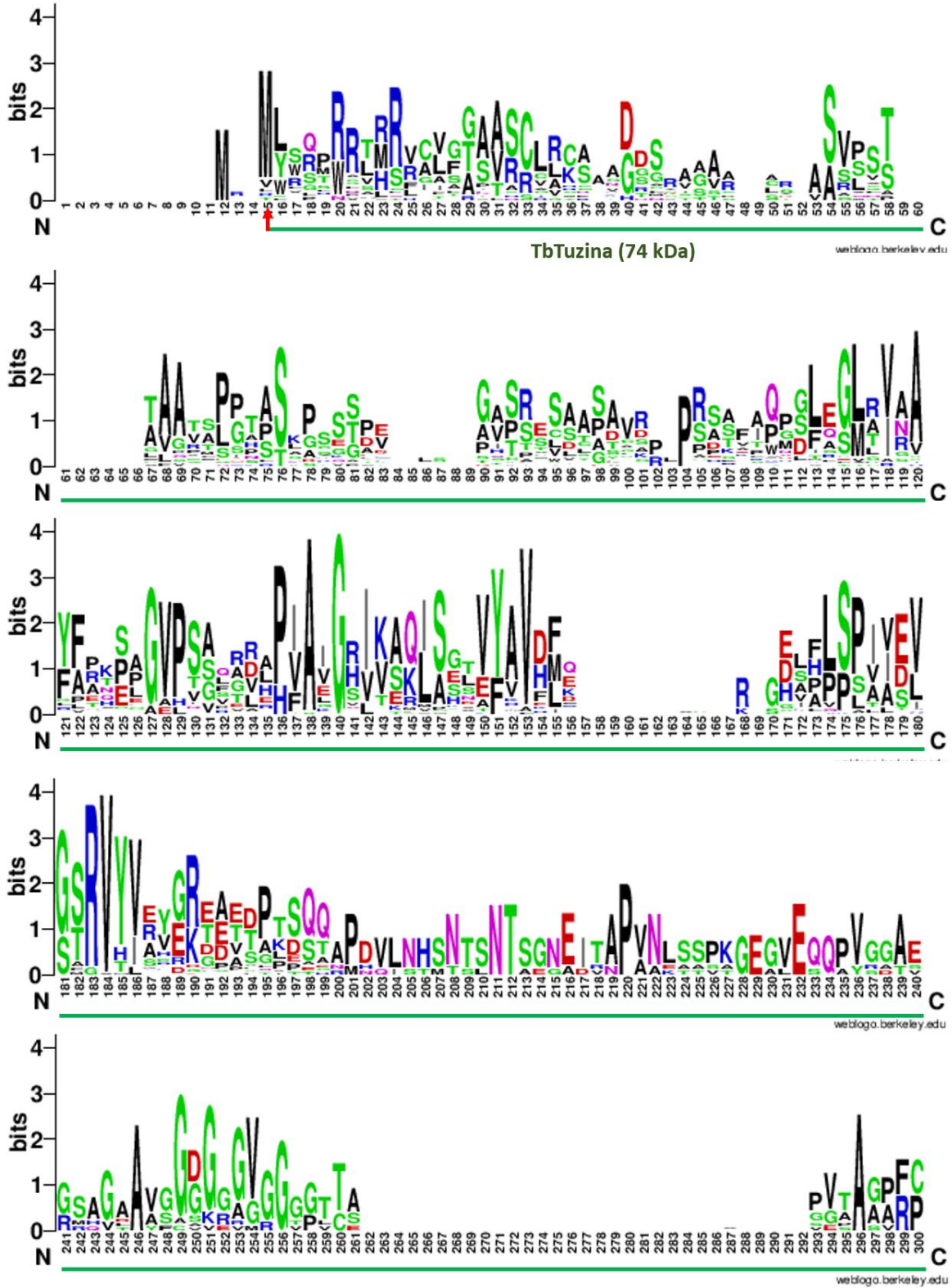
ZELEDÓN, R.; RABINOVICH, J. E. Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. **Annual Review of Entomology**, v. 26, p. 101–33, 1981.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R. S.; et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051–1054, 2009.

ZOLTNER, M.; LEUNG, K. F.; ALSFORD, S.; HORN, D.; FIELD, M. C. Modulation of the Surface Proteome through Multiple Ubiquitylation Pathways in African Trypanosomes. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 10, p. e1005236, 2015.

APÊNDICE 1 – CONSERVAÇÃO ENTRE TUZINAS DE TRIPANOSSOMATÍDEOS

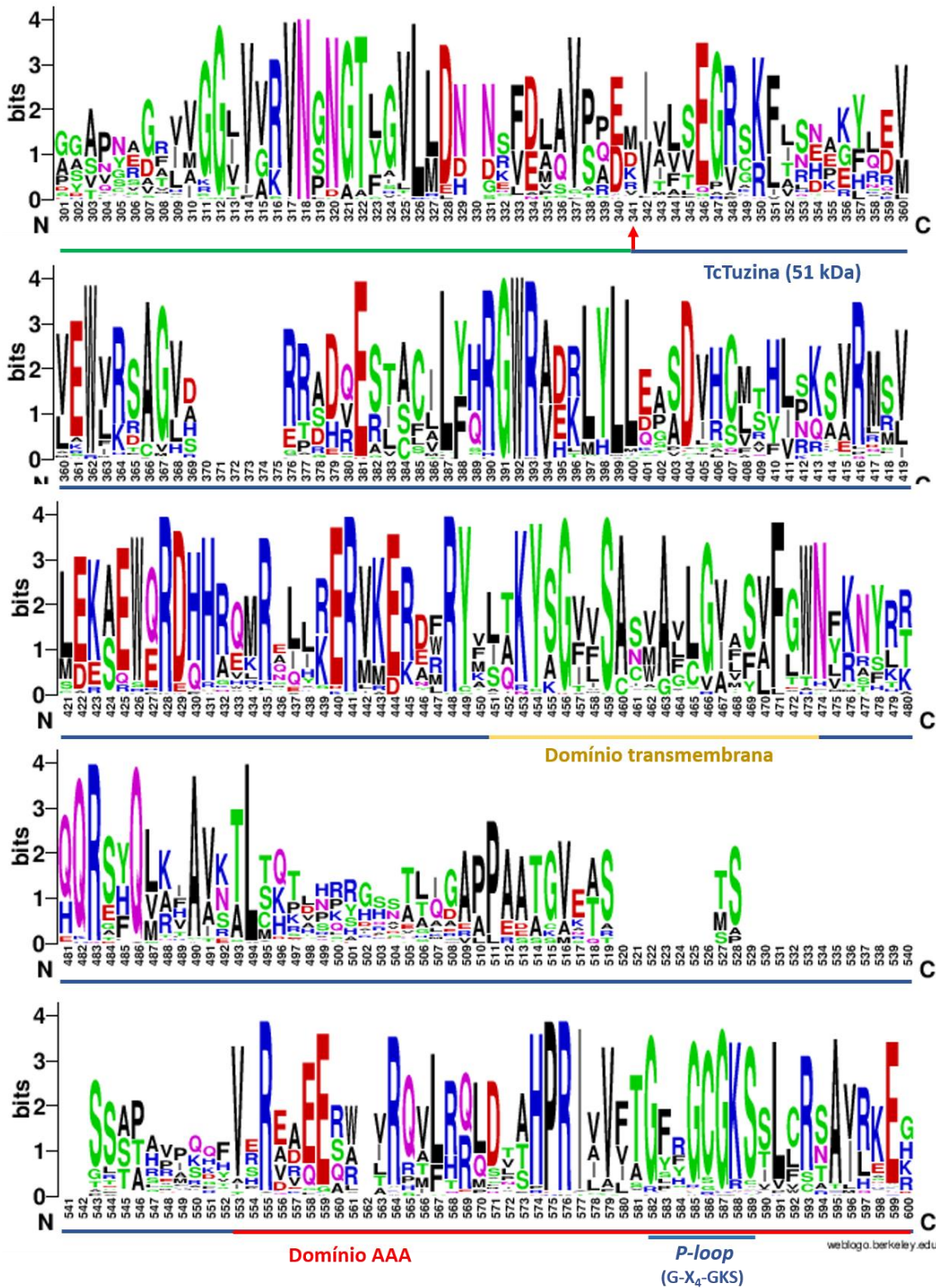
continua



LEGENDA: As seqüências de tuzinas de diversos tripanossomatídeos foram alinhadas e o logo para a conservação entre os aminoácidos foi criado como descrito em Material e Métodos (item 5.1.1). Em verde está a região pertencente à tuzina de *T. brucei* e em azul, a de *T. cruzi*. As setas vermelhas mostram a metionina inicial de TbTuzina e de TcTuzina-51. As regiões correspondentes aos domínios transmembrana, AAA e P-loop também são mostrados.

APÊNDICE 1 – CONSERVAÇÃO ENTRE TUZINAS DE TRIPANOSSOMATÍDEOS

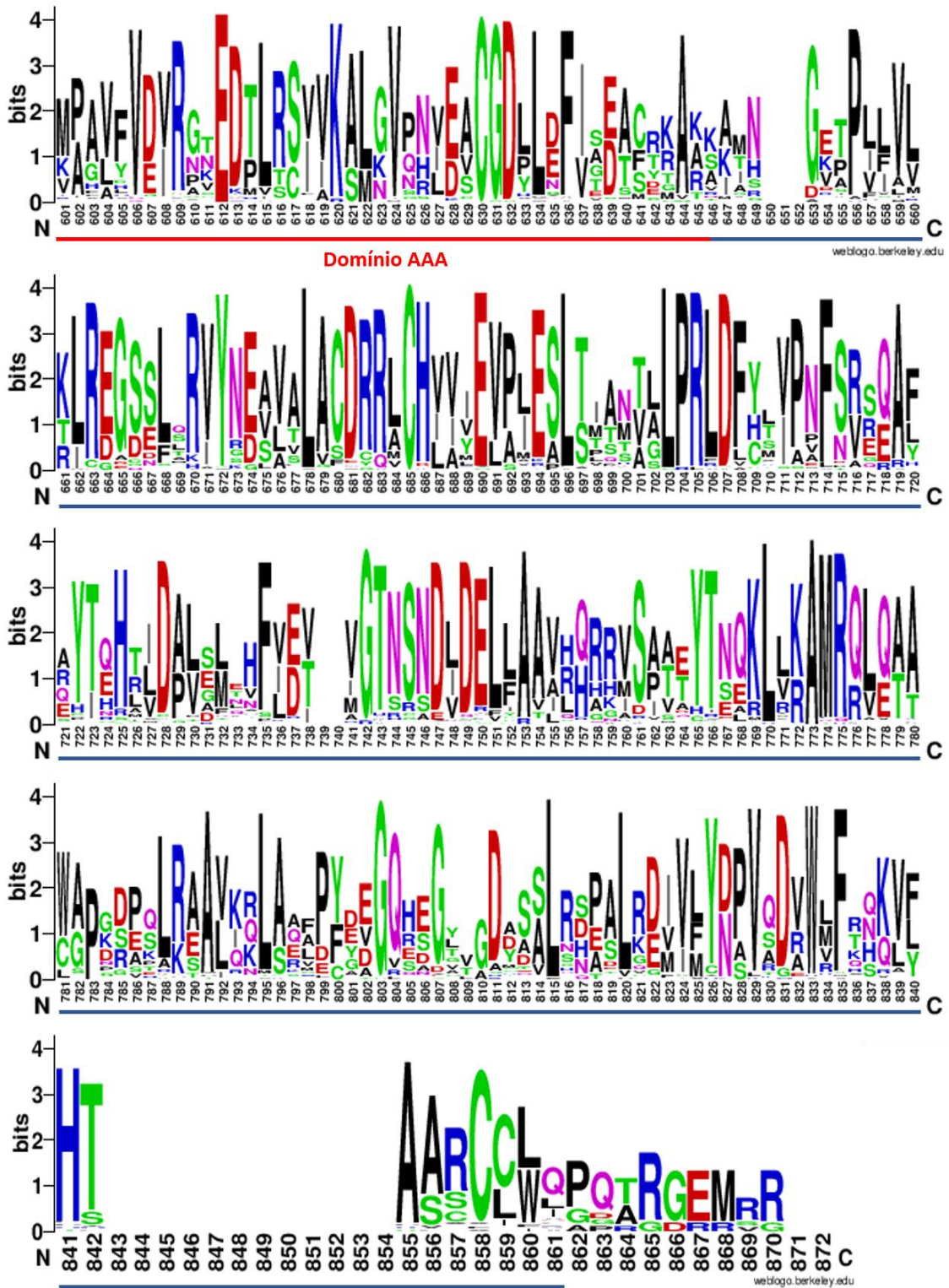
continua



LEGENDA: As seqüências de tuzinas de diversos tripanossomatídeos foram alinhadas e o logo para a conservação entre os aminoácidos foi criado como descrito em Material e Métodos (item 5.1.1). Em verde está a região pertencente à tuzina de *T. brucei* e em azul, a de *T. cruzi*. As setas vermelhas mostram a metionina inicial de TbTuzina e de TcTuzina-51. As regiões correspondentes aos domínios transmembrana, AAA e P-loop também são mostrados.

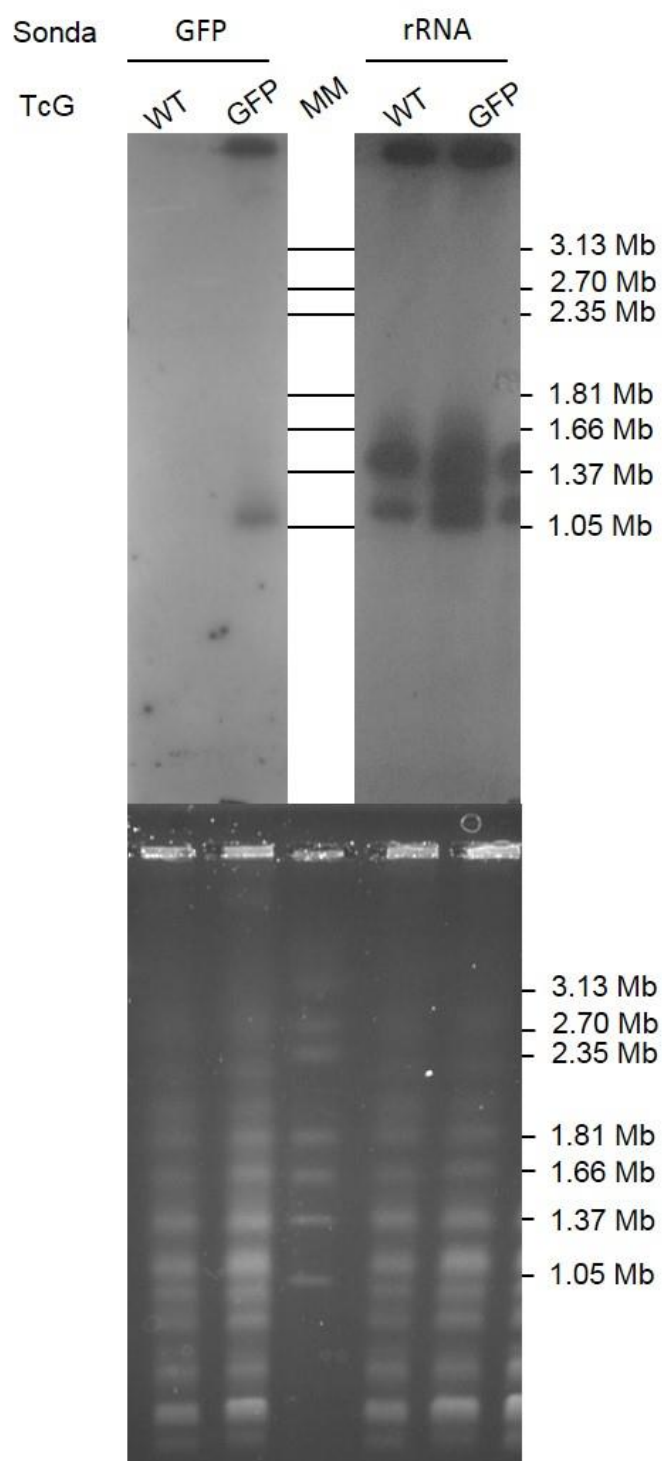
APÊNDICE 1 – CONSERVAÇÃO ENTRE TUZINAS DE TRIPANOSSOMATÍDEOS

conclusão



LEGENDA: As seqüências de tuzinias de diversos tripanossomatídeos foram alinhadas e o logo para a conservação entre os aminoácidos foi criado como descrito em Material e Métodos (item 5.1.1). Em verde está a região pertencente à tuzina de *T. brucei* e em azul, a de *T. cruzi*. As setas vermelhas mostram a metionina inicial de TbTuzina e de TcTuzina-51. As regiões correspondentes aos domínios transmembrana, AAA e P-loop também são mostrados.

APÊNDICE 2 – INTEGRAÇÃO DO VETOR pTREX-GFP_n NO GENOMA DE EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi*, CEPA G



LEGENDA: PFGE realizada em gel de agarose 1,2% (painel inferior), como descrito em Material e Métodos. O DNA foi transferido do gel para a membrana de nitrocelulose e marcado com as sondas contendo α -dCT[P]³² para o gene de GFP e de rRNA (painel superior). MM = marcador molecular com cromossomos de *Hansenula wingei* (CHEF DNA Size Marker, Bio Rad).

APÊNDICE 3 – ENRIQUECIMENTO DE *GO-TERM* PARA CO-IP DE TUZINA

continua

GO ID	GO-TERM	GENES BKG	GENES AMOSTRA	% DE GENES BKG	ENRIQUECIMENTO	ODD'S RATIO	P-VALUE	BENJAMINI	BONFERRONI
GO:0005742	Complexo da membrana externa da mitocôndria	6	2	33.3	436.0	1306.0	1.09e-5	4.50e-5	3.05e-4
GO:0044455	Parte da membrana externa da mitocôndria	24	2	8.3	109.0	325.0	1.26e-4	2.94e-4	3.53e-3
GO:0031968	Membrana externa de organela	53	3	5.7	74.04	∞	2.75e-6	3.85e-5	7.70e-5
GO:0005741	Membrana externa da mitocôndria	53	3	5.7	74.04	∞	2.75e-6	3.85e-5	7.70e-5
GO:0019867	Membrana externa	62	3	4.8	63.29	∞	4.33e-6	4.04e-5	1.21e-4
GO:0031966	Membrana mitocondrial	75	3	4.0	52.32	∞	7.54e-6	4.50e-5	2.11e-4
GO:0005740	Envelope mitocondrial	81	3	3.7	48.44	∞	9.45e-6	4.50e-5	2.65e-4
GO:0031967	Envelope organelar	86	3	3.5	45.63	∞	1.13e-5	4.50e-5	3.15e-4
GO:0031975	Envelope	95	3	3.2	41.31	∞	1.51e-5	5.28e-5	4.22e-4
GO:0031090	Membrana organelar	129	3	2.3	30.42	∞	3.71e-5	1.16e-4	1.04e-3
GO:0044429	Parte mitocondrial	141	3	2.1	27.83	∞	4.83e-5	1.35e-4	1.35e-3

LEGENDA: Os IDs dos genes identificados na imunoprecipitação foram analisados quanto ao perfil funcional atribuído a estes genes, através do banco de dados TriTrypDB pelo algoritmo de *GO-Term Enrichment*. A coluna *GO-Term* mostra a possível função atribuída aquele gene. **Genes BKG** (*background*) corresponde a quantidade de genes no banco de dados que possui o referido *GO-Term*. **Genes amostra** se refere a quantidade de genes presente na Co-IP de tuzina que possui o referido *GO-Term*. A **porcentagem de genes no background** refere-se à representatividade dos genes na amostra em relação ao que estavam no *background*. O **enriquecimento** é a razão entre a porcentagem de genes na amostra em relação ao *background*. **Odd's ratio** é a razão de possibilidades decorrente do teste exato de Fisher. *P-value* = valor de *p* para o teste exato de Fisher. **Benjamini** é o índice de falsas descobertas de Benjamini-Hochberg. **Bonferroni** é o valor de *p* ajustado por este método.

APÊNDICE 3 – ENRIQUECIMENTO DE *GO-TERM* PARA CO-IP DE TUZINA

continuação

GO ID	GO-TERM	GENES BKG	GENES AMOSTRA	% DE GENES BKG	ENRIQUECIMENTO	ODD'S RATIO	P-VALUE	BENJAMINI	BONFERRONI
GO:0005739	Mitocôndria	193	3	1.6	20.33	∞	1.23e-4	2.94e-4	3.43e-3
GO:0044446	Parte intracelular de organela	332	3	0.9	11.82	∞	6.16e-4	1.30e-3	1.72e-2
GO:0044422	Parte organelar	338	3	0.9	11.61	∞	6.50e-4	1.30e-3	1.82e-2
GO:0044425	Parte de membrana	248	2	0.8	10.55	29.65	1.16e-2	1.48e-2	3.25e-1
GO:0043234	Complexo de proteína	255	2	0.8	10.26	28.78	1.22e-2	1.49e-2	3.43e-1
GO:0043231	Organela ligada à membrana intracelular	566	3	0.5	6.93	∞	3.03e-3	5.30e-3	8.48e-2
GO:0043227	Organela ligada à membrana	566	3	0.5	6.93	∞	3.03e-3	5.30e-3	8.48e-2
GO:0016020	Membrana	602	3	0.5	6.52	∞	3.64e-3	6.00e-3	1.02e-1
GO:0044444	Parte citoplasmática	638	3	0.5	6.15	∞	4.33e-3	6.74e-3	1.21e-1

LEGENDA: Os IDs dos genes identificados na imunoprecipitação foram analisados quanto ao perfil funcional atribuído a estes genes, através do banco de dados TriTrypDB pelo algoritmo de *GO-Term Enrichment*. A coluna **GO-Term** mostra a possível função atribuída aquele gene. **Genes BKG** (*background*) corresponde a quantidade de genes no banco de dados que possui o referido *GO-Term*. **Genes amostra** se refere a quantidade de genes presente na Co-IP de tuzina que possui o referido *GO-Term*. A **porcentagem de genes no background** refere-se à representatividade dos genes na amostra em relação ao que estavam no *background*. O **enriquecimento** é a razão entre a porcentagem de genes na amostra em relação ao *background*. **Odd's ratio** é a razão de possibilidades decorrente do teste exato de Fisher. **P-value** = valor de *p* para o teste exato de Fisher. **Benjamini** é o índice de falsas descobertas de Benjamini-Hochberg. **Bonferroni** é o valor de *p* ajustado por este método.

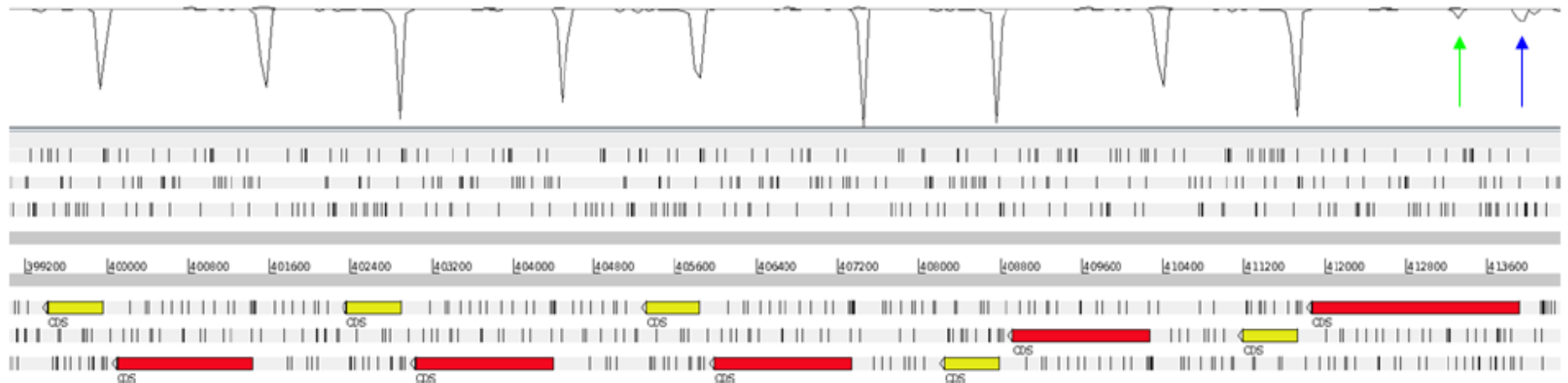
APÊNDICE 3 – ENRIQUECIMENTO DE *GO-TERM* PARA CO-IP DE TUZINA

conclusão

GO ID	GO-TERM	GENES BKG	GENES AMOSTRA	% DE GENES BKG	ENRIQUECIMENTO	ODD'S RATIO	P-VALUE	BENJAMINI	BONFERRONI
GO:0032991	Complexo macromolecular	407	2	0.5	6.43	17.28	3.02e-2	3.02e-2	8.46e-1
GO:0005737	Citoplasma	753	3	0.4	5.21	∞	7.11e-3	9.86e-3	1.99e-1
GO:0043226	Organela	763	3	0.4	5.14	∞	7.40e-3	9.86e-3	2.07e-1
GO:0043229	Organela intracelular	763	3	0.4	5.14	∞	7.40e-3	9.86e-3	2.07e-1
GO:0044424	Parte intracelular	1006	3	0.3	3.90	∞	1.69e-2	1.97e-2	4.74e-1
GO:0005622	Transporte intracelular	1143	3	0.3	3.43	∞	2.48e-2	2.78e-2	6.95e-1
GO:0044464	Parte celular	1174	3	0.3	3.34	∞	2.69e-2	2.79e-2	7.53e-1
GO:0005623	Célula	1174	3	0.3	3.34	∞	2.69e-2	2.79e-2	7.53e-1

LEGENDA: Os IDs dos genes identificados na imunoprecipitação foram analisados quanto ao perfil funcional atribuído a estes genes, através do banco de dados TriTrypDB pelo algoritmo de *GO-Term Enrichment*. A coluna **GO-Term** mostra a possível função atribuída aquele gene. **Genes BKG** (*background*) corresponde a quantidade de genes no banco de dados que possui o referido *GO-Term*. **Genes amostra** se refere a quantidade de genes presente na Co-IP de tuzina que possui o referido *GO-Term*. A **porcentagem de genes no background** refere-se à representatividade dos genes na amostra em relação ao que estavam no *background*. O **enriquecimento** é a razão entre a porcentagem de genes na amostra em relação ao *background*. **Odd's ratio** é a razão de possibilidades decorrente do teste exato de Fisher. **P-value** = valor de *p* para o teste exato de Fisher. **Benjamini** é o índice de falsas descobertas de Benjamini-Hochberg. **Bonferroni** é o valor de *p* ajustado por este método.

ANEXO 1 – TRANS-SPLICING DIFERENCIAL DE UM DOS GENES DE TUZINA EM *Trypanosoma cruzi* Dm28c



FONTE: DAS NEVES, 2015

LEGENDA: Representação de um dos *clusters* de tuzina/amastina, no clone Dm28c. Em vermelho estão os genes de tuzina, e em amarelo, os de amastinas. O gráfico acima representa as regiões do *cluster* nas quais ocorre a adição de *spliced leader* (SL), como determinado por sequenciamento de RNA mensageiro com oligonucleotídeos iniciadores randômicos e para SL. A seta verde mostra a adição de SL usual para o primeiro gene de tuzina do *cluster* (à direita), enquanto que a seta azul mostra um sítio de adição à montante do usual, codificando um transcrito maior.