

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

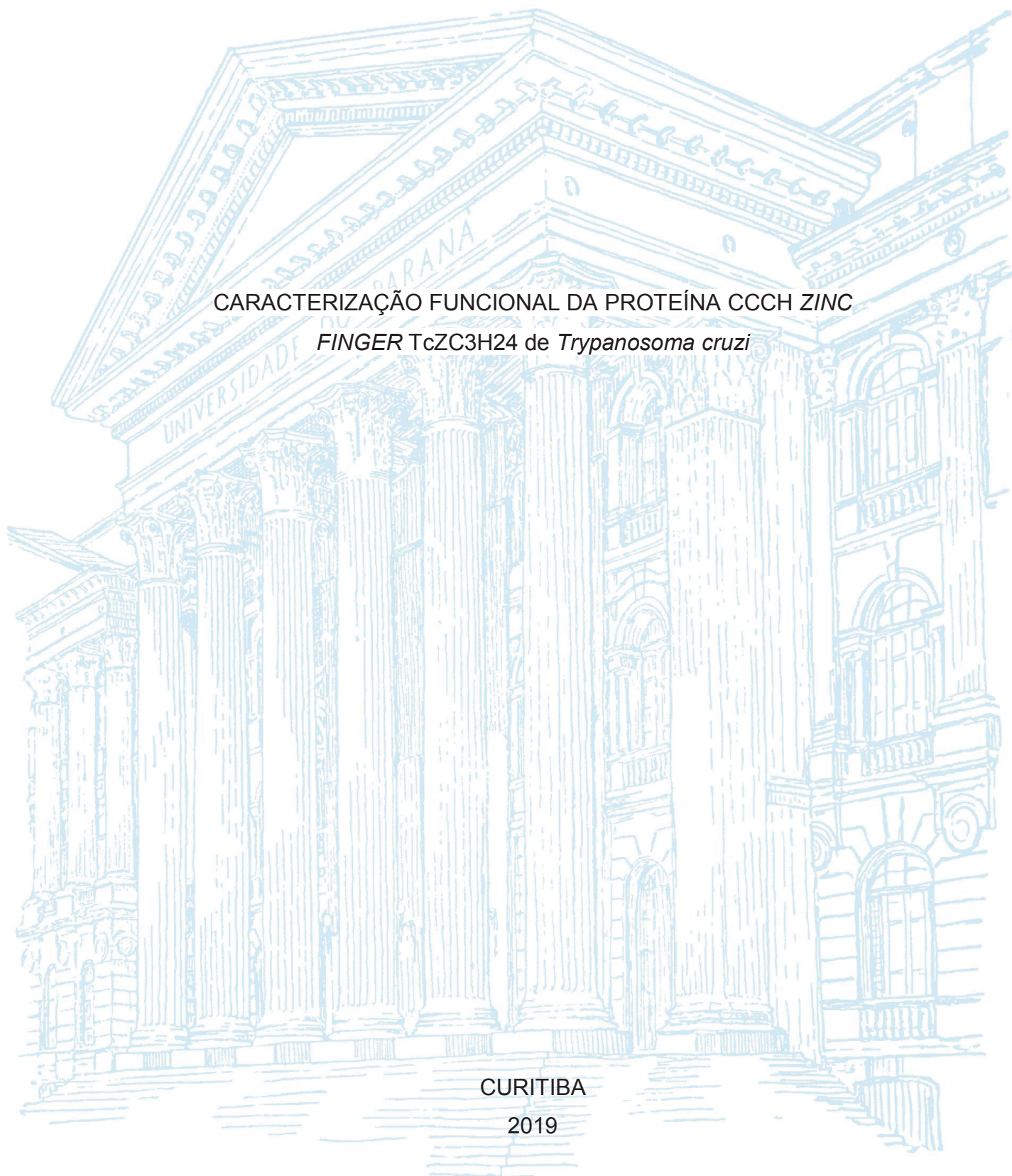
KAMILLE SCHMITT PEREIRA

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA PROTEÍNA CCCH ZINC

FINGER TcZC3H24 de Trypanosoma cruzi

CURITIBA

2019



KAMILLE SCHMITT PEREIRA

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA PROTEÍNA CCCH ZINC
FINGER TcZC3H24 de Trypanosoma cruzi

Tese apresentada como requisito parcial a obtenção do título de Doutor em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, realizada no Instituto Carlos Chagas/Fiocruz Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Krieger
Coorientador: Prof. Dr. Stenio Perdigão Fragoso

CURITIBA

2019

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

P436c

Pereira, Kamille Schmitt

Caracterização funcional da proteína CCCH Zinc Finger TcZC3H24 de *Trypanosoma cruzi* [recurso eletrônico] / Kamille Schmitt Pereira. – Curitiba, 2019.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2019.

Orientador: Marco Aurélio Krieger – Coorientador: Stenio Perdigão Fragoso.

1. Proteínas. 2. Zinc-finger, proteína. 3. Zinco. 4. Regulação da expressão gênica. 5. *Trypanosoma cruzi*. I. Universidade Federal do Paraná. II. Krieger, Marco Aurélio. III. Fragoso, Stenio Perdigão. IV. Título.

CDD: 572.636

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA - 40001016036P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **KAMILLE SCHMITT PEREIRA** intitulada: **Caracterização funcional da proteína CCCH Zinc Finger TcZC3H24 de *Trypanosoma cruzi***, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 12 de Abril de 2019.

MARCO AURÉLIO KRIEGER
Presidente da Banca Examinadora

CHRISTIAN MACAGNAN PROBST
Avaliador Externo (ICC)

SHEILA CRISTINA NARDELLI
Avaliador Externo (ICC)

GISELE FERNANDA ASSINE PICCHI
Avaliador Externo (ICC)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar na escrita desta tese e por me abençoar mais do que mereço.

Aos meus pais, Martha e José Roberto, pelo amor incondicional. Esta tese só existe porque vocês investiram em mim. Pai, tudo que sou devo a você, obrigada! Mãe, você é a mulher mais forte e guerreira que eu conheço, a tua história de vida é uma inspiração e me encoraja a ser uma pessoa melhor a cada dia. Obrigada pelos seus sábios conselhos e pelas inúmeras palavras de conforto.

À minha família, que de alguma maneira sempre me ajudou e acolheu. Maninha, Izabelle Schmitt P. Mignoni, obrigada simplesmente por você ser a melhor irmã do mundo!

Ao Rogério Marianni, obrigado por estar comigo neste tempo tão difícil e turbulento, por me ajudar e incentivar. Por ser tão paciente e compreensivo, por me esperar horas no carro (sem reclamar) enquanto eu terminava de repicar algumas culturas no laboratório. Eu te amo!

Ao Dr. Carlos Ricardo Soccol por ter idealizado o curso no qual me formei e pela oportunidade de ingressar nesta mesma Pós-Graduação. Orgulho de ser sua aluna!

À Dra. Vanete Thomaz Soccol pelo apoio e auxílio nesta trajetória. Obrigada pelos ensinamentos. Eternamente grata a você e ao Dr. Carlos Ricardo Soccol.

Ao Dr. Marco Aurélio Krieger pela confiança e pela disponibilidade em ser meu orientador. De coração, muito obrigada pelo seu auxílio.

Ao Dr. Stenio Perdigão Fragoso pelos ensinamentos e oportunidade de trabalhar no Laboratório de Biologia Molecular e Sistêmica de Tripanossomatídeos.

Ao Dr. Júlio César de Carvalho, agradeço toda ajuda em questões burocráticas.

Aos amigos e colegas do Laboratório: Anna, Bárbara, Bruna, Dr. Augusto, Dra. Claudia, Dra. Daniela, Dra. Gisele, Dra. Letícia, Dra. Mônica, Dra. Priscila, Jaqueline, Junior, Matheus, Rafael, Renzo e Vinícius. Obrigada pela amizade, parceria e pelo tempo que passamos juntos. Bruna Lange, obrigada por formar comigo uma dupla incrível, amizade pra vida toda! Gisele Picchi, obrigada pela sua ajuda no lab.

Ao Dr. Cassiano Martin Batista, Cassi, obrigado pelos ensinamentos sobre metaciclogênese. Eu ainda não consigo contar metacíclicos tão rápido quanto você!

À Luz Helena Villamizar Silva, pela amizade, companheirismo e por transmitir seu conhecimento sobre ensaios de infecção *in vitro* de tripanossomatídeos.

À Dra. Lia Carolina Soares Medeiros Kuczera tanto pelo auxílio com a técnica CRISPR/Cas9 quanto pelos materiais fornecidos. Gratidão!

À Dra. Letusa Albrecht por fornecer os camundongos.

Ao Dr. Giovanni Mazzarotto, Tânia Schepainski, Erick Rossi e Livia Pereira, pela ajuda com os animais. Giovanni, obrigado pelo auxílio e discussões sobre inoculação em camundongos. Livia, obrigada pela sua amizade e espero que você tenha cantado para os camundongos, rs!

Ao Me. Rodrigo Netto e Dra. Priscila Hiraiwa pelo auxílio nas análises de Citometria de Fluxo.

À Vanessa e Junior Zulkievicz pelo agradável tempo no laboratório e imensa ajuda no preparo de materiais.

À Sibelli Tanjoni e Vanessa Sane pelo auxílio no preparo de materiais e pelo socorro quando precisava de algo urgente.

Aos membros da banca, Dr. Alexandre Haruo Inoue, Dr. Christian Probst, Dra. Gisele Assine Picchi e Dra. Sheila Nardeli.

À Marta Helena Szadkoski, pela sua imensa ajuda em questões burocráticas.

À CAPES (Comissão de Aperfeiçoamento de Ensino Superior), pelo auxílio financeiro.

*“O conhecimento e a sabedoria caminham juntos,
buscá-los é um ato sublime”*

(Martha Schmitt Pereira)

RESUMO

O *Trypanosoma cruzi*, protozoário causador da doença de Chagas, possui um ciclo de vida complexo, cujo controle de seus eventos celulares operam essencialmente em nível pós-transcricional. Esta regulação gênica compreende diversos fatores regulatórios desconhecidos que atuam principalmente na modulação da estabilidade de mRNAs, seu transporte e acessibilidade à maquinaria traducional. Esta atividade reguladora compreende a interação de fatores em *trans*, compostos principalmente por proteínas de ligação ao RNA, a elementos regulatórios em *cis* presentes nas moléculas dos mRNAs. Entre as proteínas de ligação ao RNA, estão as proteínas com motivo CCCH *Zinc Finger*, pouco compreendidas em *T. cruzi*. Com o objetivo de caracterizar uma proteína CCCH, nomeada TcZC3H24, foram utilizadas abordagens de genética reversa, empregando-se vetores de expressão ectópica, cassetes tradicionais de *knockout* e a ferramenta CRISPR/Cas9. O gene *TcZC3H24* codifica uma proteína de 28,7 Kda, o qual possui em sua fração carboxi terminal um domínio C-X₈-C-X₅-C-X₃-H. Esta proteína é expressa em todos os estágios de desenvolvimento do parasita e possui um perfil granular irregularmente distribuída no citoplasma nas formas epimastigota, tripomastigota metacíclico, amastigota e tripomastigota sanguíneo. A superexpressão de TcZC3H24 não alterou o crescimento celular e a capacidade de diferenciação *in vitro* das formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos. O *knockout* nulo de TcZC3H24 não perturbou o crescimento dos parasitas, porém acelerou o processo de diferenciação *in vitro* para as formas parasitárias infectantes humanas, além de resultar no aumento da taxa de tripomastigotas metacíclicos no sobrenadante do meio de cultivo. A complementação dos mutantes nulos reverteu o fenótipo observado, sugerindo a função de TcZC3H24 na regulação negativa da metaciclogênese, fato que viabiliza um melhor entendimento da via de regulação gênica estágio-específica do *T. cruzi*.

Palavras-chave: CCCH *Zinc Finger*. Metaciclogênese. Regulação da expressão gênica. *Trypanosoma cruzi*.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi, a protozoan that causes Chagas disease, has a complex life cycle whose control of its cellular events essentially operates at the post-transcriptional level. The gene regulation comprises several unknown regulatory factors that act mainly on the modulation of mRNAs stability, their transport and accessibility to the translation machinery. This regulatory activity involves the interaction of trans factors, composed mainly by RNA binding proteins, to cis-regulatory elements present in mRNA molecules. Among the RNA binding proteins, we can mention CCCH *Zinc Finger* proteins, which are poorly understood in *T. cruzi*. In order to characterize a CCCH protein named TcZC3H24 we used reverse genetics techniques employing ectopic expression vectors, traditional knockout cassettes and the CRISPR/Cas9 system. The TcZC3H24 gene encodes an 28,7 Kda protein, which has in its carboxy terminal a C-X₈-C-X₅-C-X₃-H domain. This protein is expressed at all parasite's stages and it is irregularly distributed in the cytoplasm of epimastigote, metacyclic, amastigote and trypomastigote forms in a granular pattern. TcZC3H24 overexpression did not disturbed cell growth and in vitro differentiation of epimastigotes into metacyclics forms. The null knockout of TcZC3H24 did not disturbed parasite growth but it accelerated in vitro differentiation into the human-infective metacyclic form and increased the rate of metacyclic in cell culture supernatant. Complementing null mutants reversed the observed phenotype, suggesting the role of TcZC3H24 in metacyclogenesis negative regulation. This fact allows better understanding of stage-specific gene regulation in *T. cruzi*.

Key words: CCCH *Zinc Finger*. Metacyclogenesis. Gene expression regulation. *Trypanosoma cruzi*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	CICLO DE TRANSMISSÃO DO <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
FIGURA 2 –	<i>TRANS-SPLICING</i> EM TRIPANOSSOMATÍDEOS	27
FIGURA 3 –	REPRESENTAÇÃO DO <i>TRANS-SPLICING</i> ALTERNATIVO	28
FIGURA 4 –	<i>REGULONS</i> PÓS-TRANSCRICIONAIS	32
FIGURA 5 –	MOTIVO <i>ZINC FINGER C2H2</i>	41
FIGURA 6 –	PROTEÍNAS CCCH EM TRIPANOSSOMATÍDEOS	43
FIGURA 7 –	<i>KNOCKOUT</i> CONVENCIONAL POR CASSETES DE RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA	49
FIGURA 8 –	MECANISMO DE AÇÃO DA MAQUINARIA DE RNAi	50
FIGURA 9 –	SISTEMA DE EXPRESSÃO INDUZIDO POR TETRACICLINA	51
FIGURA 10 –	SISTEMA CRISPR/Cas9	52
FIGURA 11 –	MAPA DO VETOR DE ENTRADA pDONR™221	79
FIGURA 12 –	MAPA DOS VETORES pDEST™15 e pDEST™17	80
FIGURA 13 –	DESENHO ESQUEMÁTICO DA LOCALIZAÇÃO DAS REGIÕES 5'CDS E 3'CDS NO GENE <i>TcZC3H24</i>	85
FIGURA 14 –	MAPA DOS VETORES pTc2KO-neo e pTc2KO-hyg	86
FIGURA 15 –	MAPA DOS VETORES pTc2KO-ZC3H24-neo E pTc2KO-ZC3H24-hyg	88
FIGURA 16 –	CASSETES PARA NOCAUTE POR RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA PARA O GENE <i>TcZC3H24</i>	89
FIGURA 17 –	MAPA DOS VETORES DE EXPRESSÃO EM <i>T. cruzi</i> QUE CONFEREM RESISTENCIA A NEOMICINA	95
FIGURA 18 –	MAPA DOS VETORES DE EXPRESSÃO EM <i>T. cruzi</i> QUE CONFEREM RESISTENCIA A BLASTICIDINA	97
FIGURA 19 –	MAPA DOS VETORES EM <i>T. cruzi</i> QUE CONFEREM A EXPRESSÃO DE <i>TcZC3H24</i>	99
FIGURA 20 –	ALINHAMENTO DA PROTEÍNA <i>TcZC3H24</i> PARA AS TRÊS ANOTAÇÕES DEPOSITAS NO BANCO DE DADOS GENBANK PARA A CEPA <i>Trypanosoma cruzi</i> Dm28c	102
FIGURA 21 –	SEQUÊNCIA AMINOACÍDICA DE <i>TcZC3H24</i>	104
FIGURA 22 –	ALINHAMENTO DOS ORTÓLOGOS DE <i>ZC3H24</i> PARA <i>T. cruzi</i> , <i>T. brucei</i> e <i>L. major</i>	105

FIGURA 23 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO LOCUS GÊNICO DE <i>ZC3H24</i> EM <i>T. cruzi</i> , <i>T. brucei</i> E <i>L. major</i>	106
FIGURA 24 – VETORES DE EXPRESSÃO EM <i>E. coli</i> pDEST15-ZC3H24 e pDEST17-ZC3H24	109
FIGURA 25 – CÓDONS RAROS DA PROTEÍNA TcZC3H24 PARA EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM <i>E. coli</i>	111
FIGURA 26 – PROTEÍNA RECOMBINANTE TcZC3H24 PURIFICADA	114
FIGURA 27 – ESPECIFICIDADE E REATIVIDADE DOS ANTISSOROS DE TcZC3H24	115
FIGURA 28 – EXPRESSÃO DE TcZC3H24 NAS DIFERENTES FORMAS DE <i>T. cruzi</i> AO LONGO DO CICLO DE VIDA	117
FIGURA 29 – TRANSCRIPTOMA DE TcZC3H24 AO LONGO DO CICLO DE VIDA DE <i>T. cruzi</i> CL Brener Esmeraldo-like	118
FIGURA 30 – CORRELAÇÃO DO PROTEOMA COM O TRANSCRIPTOMA E O TRANSLATOMA PARA OS ESTÁGIOS EPIMASTIGOTA E TRIPOMASTIGOTA METACÍCLICO DE <i>T. cruzi</i>	119
FIGURA 31 – IMUNOLOCALIZAÇÃO DE TcZC3H24 EM <i>T. cruzi</i>	120
FIGURA 32 – IMUNODETECÇÃO DAS SUPEREXPRESSÕES DE TcZC3H24.....	123
FIGURA 33 – METACICLOGÊNESE DAS SUPEREXPRESSÕES DE TcZC3H24.....	124
FIGURA 34 – PROLIFERAÇÃO CELULAR DAS SUPEREXPRESSÕES DE TcZC3H24.....	125
FIGURA 35 – REPRESENTAÇÃO DO NOCAUTE GÊNICO DE <i>TcZC3H24</i> POR RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA PELA TRANSFEÇÃO DE CASSETES CONTENDO GENES REPÓRTERES.....	128
FIGURA 36 – DIAGRAMA REPRESENTATIVO DA INTEGRAÇÃO DOS CASSETES DE RECOMBINAÇÃO NO LOCUS DO GENE <i>TcZC3H24</i>	130
FIGURA 37 – PERFIS ELETROFORÉTICOS PARA VERIFICAÇÃO DA INTEGRAÇÃO DOS CASSETES NO LOCUS DO GENE <i>TcZC3H24</i>	130
FIGURA 38 – PERFIS ELETROFORÉTICOS PARA ANÁLISE DA PRESENÇA DO GENE <i>TcZC3H24</i>	131

FIGURA 39 – LOCUS GÊNICO DE <i>TcZC3H24</i> APÓS EDIÇÃO GÊNICA POR CRISPR/Cas9	133
FIGURA 40 – DIAGRAMA REPRESENTATIVO DA RECOMBINAÇÃO POR CRISPR/Cas9 EM UM ALELO DO LOCUS GÊNICO DE <i>TcZC3H24</i> ...	134
FIGURA 41 – PERFIS ELETROFORÉTICOS PARA ANÁLISE DA RECOMBINAÇÃO POR CRISPR/Cas9 NO LOCUS GÊNICO DE <i>TcZC3H24</i>	135
FIGURA 42 – EXPRESSÃO DE <i>TcZC3H24</i> NOS MUTANTES NULOS.....	136
FIGURA 43 – PROLIFERAÇÃO CELULAR DOS MUTANTES NULOS DE <i>TcZC3H24</i>	137
FIGURA 44 – METACICLOGÊNESE DOS MUTANTES NULOS DE <i>TcZC3H24</i>	137
FIGURA 45 – CURVA DE TRIPOMASTIGOTAS METACICLÍCOS PARA OS MUTANTES NULOS DE <i>TcZC3H24</i>	139
FIGURA 46 – IMUNODETECÇÃO DE <i>TcZC3H24</i> NOS MUTANTES NULOS COMPLEMENTADOS.....	142
FIGURA 47 – METACICLOGÊNESE DOS MUTANTES NULOS COMPLEMENTADOS.....	143
FIGURA 48 – PROLIFERAÇÃO CELULAR DOS MUTANTES NULOS COMPLEMENTADOS.....	143
FIGURA 49 – CONSERVAÇÃO DO MOTIVO C-X ₈ -C-X ₅ -C-X ₃ -H EM <i>T. cruzi</i>	145
FIGURA 50 – PREDIÇÃO DA ESTRUTURA TERCIÁRIA DE <i>TcZC3H24</i>	146
FIGURA 51 – MODELAGEM MOLECULAR DA PROTEÍNA <i>TcZC3H24</i>	147
FIGURA 52 – DESORDEM E INTERAÇÃO PROTEICA DE <i>TcZC3H24</i>	148 148

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	ANTIBIÓTICOS E SUAS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS	60
TABELA 2 –	LINHAGENS DE <i>Escherichia coli</i>	61
TABELA 3 –	VETORES UTILIZADOS E DESENVOLVIDOS	62
TABELA 4 –	INICIADORES UTILIZADOS PARA AS AMPLIFICAÇÕES E CLONAGENS REFERENTES AO GENE <i>TcZC3H24</i>	63
TABELA 5 –	SOLUÇÕES E VOLUMES DE PREPARO PARA GEL SDS-PAGE..	75
TABELA 6 –	LIMITES DE EFICIÊNCIA DA SEPARAÇÃO DE DNA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AGAROSE	75
TABELA 7 –	ANTICORPOS PRIMÁRIOS UTILIZADOS EM IMUNODETECÇÃO POR WESTERN BLOT	77
TABELA 8 –	ANTICORPOS SECUNDÁRIOS UTILIZADOS EM IMUNODETECÇÃO POR WESTERN BLOT	77
TABELA 9 –	ANTICORPOS PRIMÁRIOS UTILIZADOS EM IMUNOLOCALIZAÇÃO POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	78
TABELA 10 –	ANTICORPOS SECUNDÁRIOS UTILIZADOS EM IMUNOLOCALIZAÇÃO POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	78
TABELA 11 –	INICIADORES E SEQUÊNCIA UTILIZADOS PARA AS AMPLIFICAÇÕES E CLONAGENS RESULTANTES NO NOCAUTE POR CRISPR/Cas9	91
TABELA 12 –	DESCRIÇÃO DOS VETORES DE DESTINO UTILIZADOS NA EXPRESSÃO DE <i>TcZC3H24</i> EM <i>T. cruzi</i>	94
TABELA 13 –	DESCRIÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO EM <i>T. cruzi</i>	98
TABELA 14 –	DADOS DA PROTEÍNA <i>TcZC3H24</i> PARA AS TRÊS ANOTAÇÕES DEPOSITAS NO BANCO DE DADOS GENBANK PARA A CEPA <i>Trypanosoma cruzi</i> Dm28c	102
TABELA 15 –	ORTÓLOGOS E PARÁLOGOS PARA <i>TcZC3H24</i>	107
TABELA 16 –	CARACTERÍSTICAS DAS CEPAS DE <i>E. coli</i> USADAS NA EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE <i>TcZC3H24</i>	110

TABELA 17 – ANÁLISE DA SOLUBILIDADE DE TcZC3H24 QUANDO EXPRESSA EM SISTEMA BACTERIANO	113
TABELA 18 – CARACTERÍSTICAS DAS PROTEÍNAS DE EXPRESSÃO ECTÓPICA DE TcZC3H24	123
TABELA 19 – DESCRIÇÃO DOS MUTANTES NULOS COMPLEMENTADOS....	142

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	–	Porcentagem
°C	–	Graus Célsius
µg	–	Micrograma
µL	–	Microlitro
µM	–	Micromolar
3' UTR	–	Região 3' não traduzida
3'SS	–	Sítio acceptor de <i>splice</i> 3'
5' UTR	–	Região 5' não traduzida
5'SS	–	Sítio de <i>splice</i> 5'
AIDS	–	Síndrome da imunodeficiência adquirida (do inglês: <i>acquired immunodeficiency syndrome</i>)
AMA	–	Amastigota
APS	–	Persulfato de amônio
BLAST	–	Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local (do inglês: <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
bp	–	Pares de base (do inglês: <i>base pairs</i>)
BP	–	Ponto de reconhecimento (do inglês: <i>branch point</i>)
BSA	–	Albumina sérica bovina (do inglês: <i>bovine serum albumin</i>)
CRISPR	–	Grupos de repetições palindrômicas curtas regularmente espaçadas (do inglês: <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeat</i>)
Da	–	Dalton
DAPI	–	4',6-diamidino-2-Fenilindol
DEPC	–	Dietil pirocarbonato
DIC	–	Contraste por interferência diferencial (do inglês, <i>differential interfacial contrast</i>)
Dm	–	<i>Didelphis marsupialis</i>
DMEM	–	Meio modificado Dulbecco Eagle (do inglês: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DNA	–	Ácido desoxirribonucleico (do inglês: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	–	Deoxinucleotídeo trifosfato
DO	–	Densidade óptica (absorbância)

dsRNA	– RNA de fita dupla (do inglês: <i>double strand</i> RNA)
DTT	– Ditionotritol
DTU	– Unidade discreta de tipagem (do inglês, <i>discrete typing unit</i>)
E-64	– L-transepoxisuccinil-leucilamido-(4-guanidino)butano
EDTA	– Ácido etilenodiaminotetracético (do inglês, <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EPI	– Epimastigota
FACS	– Separação de células ativadas por fluorescência (do inglês <i>fluorescence activated cell sorting</i>)
g	– Aceleração da gravidade
GAPDH	– Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GFP	– Proteína verde fluorescente (do inglês: <i>green fluorescent protein</i>)
gRNA	– RNA guia (do inglês: <i>guide RNA</i>)
fmol	– Femtomol
GST	– Glutathione S-transferase (do inglês, <i>glutathione S-transferase</i>)
HEPES	– Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico (do inglês: <i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>)
HIGRO	– Higromicina
IBMP	– Instituto de Biologia Molecular do Paraná
ICC:	– Instituto Carlos Chagas
IDR	– Regiões intrinsecamente desordenadas (do inglês: <i>intrinsically disordered regions</i>)
IPTG	– Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
kb	– Quilobase
kDa	– QuiloDalton
kDNA	– DNA do cinetoplasto
kg	– Quilograma
LB	– Meio Luria-Bertani
LIT	– Infusão de fígado e triptose (do inglês, <i>liver infusion tryptose</i>)
M	– Molar
Mb	– Megabase
META	– Tripomastigota metacíclico
mg	– Miligrama

mL	–	Mililitro
mM	–	Milimolar
MOI	–	Multiplicidade de infecção (do inglês: <i>multiplicity of infection</i>)
mRNA	–	RNA mensageiro
NCBI	–	Centro Nacional de Informação Biotecnológica (do inglês, <i>National Center for Biotechnological Information</i>)
NEO	–	Neomicina
nm	–	Nanômetro
ORF	–	Região de leitura aberta (do inglês: <i>open reading frame</i>)
PAM	–	Motivo adjacente ao protoespaçador (do inglês: <i>protospacer adjacent motif</i>)
PARP	–	Proteína repetitiva ácida procíclica (do inglês: <i>procyclic acidic repetitive protein</i>)
PBS	–	Tampão fosfato-salino (do inglês: <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	–	Reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>)
pH	–	Potencial hidrogeniônico
PMSF	–	Fenilmetano sulfonil fluoreto
pré-mRNA	–	RNA mensageiro primário
pré-rRNA	–	RNA ribossomal primário
pmol	–	Picomol
RBP	–	Proteína de ligação ao RNA (do inglês: <i>RNA binding protein</i>)
RNA	–	Ácido ribonucleico (do inglês: <i>ribonucleic acid</i>)
RNA Pol I	–	RNA Polimerase I
RNA Pol II	–	RNA Polimerase II
RNA Pol III	–	RNA Polimerase III
RNAi	–	RNA de interferência
RNase	–	Ribonuclease
RNP	–	Ribonucleoproteína
rpm	–	Rotações por minuto
RPMI	–	Meio do Instituto Roswell Park Memorial (do inglês: <i>Roswell Park Memorial Institute médium</i>)
rRNA	–	RNA ribossômico
SDS	–	Dodecil sulfato de sódio (do inglês: <i>sodium dodecyl sulfate</i>)

SDS-PAGE	– Gel de eletroforese em poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio (do inglês: <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SL	– Sequência líder (do inglês: <i>spliced líder</i>)
snRNA	– Pequeno RNA nuclear (do inglês: <i>small nuclear RNA</i>)
ssRNA	– RNA de fita simples (do inglês: <i>single strand RNA</i>)
SSRs	– Regiões de troca de fita (do inglês: <i>strand-switch regions</i>)
TAU	– Meio artificial triatomíneo (do inglês: <i>triatomine artificial urine</i>)
TEMED	– N, N, N', N'-Tetrametiletilenodiamina
tetO	– Operador de tetraciclina
TetR	– Repressor de tetraciclina
TRIPO	– Tripomastigota sanguíneo
Tris	– Tris(hidroximetil)aminometano
tRNA	– RNA transportador
Tween-20	– Monolaurato de polioxietileno 20 sorbitana
UTR	– Região não traduzida (do inglês, <i>untranslated region</i>)
V	– Volts
VERO	– Linhagem celular proveniente de rim de macaco verde africano (<i>Chlorocebus aethiops</i>)
WHO	– Organização da Nações Unidas (do inglês: <i>World Health Organization</i>)
Yn	– Trato de polipirimidinas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	<i>Trypanosoma cruzi</i> E A DOENÇA DE CHAGAS.....	21
1.2	ORGANIZAÇÃO DO GENOMA	24
1.3	EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS	25
1.3.1	Regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos.....	29
1.4	PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO RNA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS	33
1.4.1	Proteínas com motivo RRM	34
1.4.2	Proteínas com motivo PUF	37
1.4.3	Proteínas com motivo ALBA	38
1.4.4	Proteínas com motivo <i>Zinc Finger</i>	40
1.4.4.1	Proteínas <i>Zinc Finger</i> CCCH.....	42
1.5	PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO RNA E GENÉTICA REVERSA.....	47
2	JUSTIFICATIVA	54
3	OBJETIVOS	56
3.1	OBJETIVO GERAL	56
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	56
4	MATERIAIS E MÉTODOS	57
4.1	REAGENTES	57
4.2	SOLUÇÕES.....	58
4.3	MEIOS DE CULTURA	59
4.4	ANTIBIÓTICOS	60
4.5	LINHAGENS CELULARES.....	60
4.5.1	<i>Escherichia coli</i>	60
4.5.2	<i>Trypanosoma cruzi</i>	61
4.5.3	Célula de mamífero.....	61
4.6	VETORES.....	61
4.7	OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES	62
4.8	ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	63
4.9	PREPARO, MANIPULAÇÃO E ANÁLISE EM BACTÉRIAS	64
4.9.1	Preparação de bactérias cálcio-competentes.....	64
4.9.2	Transformação de bactérias cálcio-competentes	65

4.9.3	Seleção de clones recombinantes.....	65
4.9.3.1	Preparo da Placa Mãe (<i>Master Plate</i>).....	65
4.9.3.2	Técnica de análise de clones por palitagem (<i>toothpick</i>)	66
4.9.3.3	PCR de colônia	66
4.9.4	Preparação de plasmídeo em pequena escala (Miniprep).....	66
4.9.5	Estoque em glicerol de células de <i>Escherichia coli</i>	67
4.10	CULTIVO E MANIPULAÇÃO DE CÉLULAS VERO.....	67
4.11	CULTIVO, MANIPULAÇÃO E ANÁLISES EM <i>T. cruzi</i>	68
4.11.1	Epimastigotas em fase logarítmica de crescimento	68
4.11.2	Epimastigotas sob estresse nutricional	68
4.11.3	Obtenção de tripomastigotas metacíclicos (metaciclogênese).....	68
4.11.4	Obtenção de amastigotas intracelular (amastigogênese)	69
4.11.5	Infecção em células VERO e obtenção de tripomastigotas sanguíneos	70
4.11.6	Obtenção de extrato proteico de <i>T. cruzi</i>	70
4.11.7	Obtenção de DNA genômico de <i>T. cruzi</i>	71
4.11.8	Transfecção de <i>T. cruzi</i> por eletroporação e seleção de parasitas	71
4.11.8.1	Transfecção conduzida em eletroporador GenePulser® II (BioRad).....	71
4.11.8.2	Transfecção conduzida em eletroporador Amaxa Nucleofector 2b (Lonza)	72
4.11.9	Criopreservação de <i>T. cruzi</i>	73
4.11.10	Análise de proliferação celular	73
4.11.11	Quantificação da metaciclogênese.....	73
4.12	TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR	74
4.12.1	Purificação de DNA por fenol-clorofórmio.....	74
4.12.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)	74
4.12.3	Eletroforese em gel de agarose	75
4.12.4	Amplificação de DNA por PCR	76
4.12.5	Imunodeteção de proteína por Western Blot.....	76
4.12.6	Imunolocalização por imunofluorescência indireta	77
4.13	CLONAGEM E EXPRESSÃO DE TcZC3H24 EM SISTEMA HETERÓLOGO.....	77
4.13.1	Obtenção do clone em vetor de entrada.....	78
4.13.2	Obtenção do clone em vetor de destino	80
4.13.3	Expressão e purificação de TcZC3H24 recombinante.....	81

4.13.3.1	Expressão de TcZC3H24 recombinante em sistema heterólogo	81
4.13.3.2	Ensaio de solubilidade.....	82
4.13.3.3	Purificação de TcZC3H24 recombinante	83
4.14	OBTENÇÃO DO SORO ANTI-TcZC3H24.....	83
4.14.1	Animais.....	83
4.14.2	Imunização.....	84
4.14.3	Processamento da amostra.....	84
4.15	NOCAUTE DE <i>TcZC3H24</i> POR CASSETES CLÁSSICOS.....	84
4.15.1	Amplificações das regiões do gene <i>TcZC3H24</i>	84
4.15.2	Obtenção dos vetores pTc2KO-ZC3H24-neo e pTc2KO-ZC3H24-hyg	85
4.15.3	Amplificação dos cassetes 5'CDS-NEO-3'CDS e 5'CDS-HYGRO-3'CDS	88
4.15.4	Transfecção dos cassetes 5'CDS-NEO-3'CDS e 5'CDS-HYGRO-3'CDS	89
4.15.5	<i>Single Cell Sorting</i>	90
4.16	NOCAUTE DO GENE TcZC3H24 PELA TÉCNICA CRISPR/Cas9.....	91
4.16.1	Obtenção do RNA guia.....	91
4.16.2	Transfecção do gRNA em <i>T. cruzi</i>	92
4.16.3	Triagem dos transfectantes	93
4.17	OBTENÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO EM <i>T. cruzi</i>	93
4.17.1	Construção de vetores de expressão com gene de resistência a blasticidina-S	95
4.17.2	Obtenção dos clones em vetor de entrada.....	97
4.17.3	Obtenção dos clones em vetores de destino.....	98
4.18	COMPLEMENTAÇÃO E SUPEREXPRESSÃO DE TcZC3H24 EM <i>T.cruzi</i>	98
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	101
5.1	ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	101
5.1.1	Proteína TcZC3H24	103
5.1.2	Organização genômica e conservação	105
5.2	OBTENÇÃO DO SORO ANTI-TcZC3H24.....	107
5.3	CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA TcZC3H24 EM <i>T.cruzi</i>	116
5.4	SUPEREXPRESSÃO DE TcZC3H24.....	122
5.5	NOCAUTE GÊNICO	127
5.6	RESGATE DO FENÓTIPO SELVAGEM POR COMPLEMENTAÇÃO	141
5.7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	144
6	CONCLUSÃO	150

REFERÊNCIAS.....	151
-------------------------	------------

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Trypanosoma cruzi* E A DOENÇA DE CHAGAS

A tripanossomíase americana foi denominada doença de Chagas em homenagem a seu descobridor Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, médico sanitarista que em 1909 anunciou a descoberta desta doença parasitária em animais e humanos, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. (Chagas, 1909).

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado e heteroxênico do filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastida, pertencente à família Trypanosomatidae, gênero *Trypanosoma* e subgênero *Schizotrypanum* (De Lana e De Menezes Machado, 2017).

A Organização das Nações Unidas (*World Health Organization*, WHO) estima que oito milhões de pessoas estejam infectadas pelo *T. cruzi* em todo o mundo, a maioria na América Latina, onde a doença é endêmica em 21 países e constitui um grave problema de saúde pública, causando mais de 10 mil mortes anuais (WHO, 2018).

A doença de Chagas é uma das principais causas de problemas cardíacos e mortes cardiovasculares em áreas endêmicas, constituindo-se uma doença negligenciada para a qual não existem vacinas eficazes e os atuais tratamentos medicamentosos (Benzonidazol e Nifurtimox) são tóxicos, apresentam baixa tolerância e requerem um longo tempo de administração (Cunha-Neto e Chevillard, 2014; Patterson e Wyllie, 2014).

A transmissão vetorial constitui-se a principal causa da doença, embora a infecção oral pelo *T. cruzi* represente atualmente uma rota de transmissão crescente no Brasil, principalmente na região amazônica e está associada ao consumo de açaí e de cana de açúcar contaminados (Nóbrega et al., 2009; Bastos et al., 2010).

Apesar dos esforços realizados nas últimas décadas a fim de reduzir a incidência desta doença em países endêmicos, houve um aumento da detecção de *T. cruzi* na Europa, Estados Unidos, Austrália e Japão, fato explicado pela mobilidade entre a população latino americana e esses países (Muñoz et al., 2009; Schmunis e Yadon, 2010; Albajar-Viñas e Jannin, 2011). Nestes casos, a transmissão do parasita dá-se principalmente por via congênita (Buekens et al., 2008; Brutus et al., 2009), transplantes de órgãos (Nowicki et al. 2006) e transfusão sanguínea (Leiby et al., 1999; Flores-Chavez et al., 2008). A probabilidade de transmissão vetorial nestes países é baixa e poucos casos de doença de Chagas autóctones foram documentados (Dorn et al., 2007; Garcia et al., 2015).

O curso clínico da doença geralmente compreende uma fase aguda e uma fase crônica. Durante a fase aguda há uma alta parasitemia, sendo a maioria dos casos assintomáticos. Alguns sintomas incluem febre, mal-estar, dores musculares, sudorese, hepatomegalia, esplenomegalia, insuficiência cardíaca devido a miocardite, efusão do pericárdio, meningoencefalite, linfadenopatia, inflamação no local da inoculação (chagoma) e ocasionalmente edema palpebral (sinal de Romaña), sendo a duração desta fase de 4 a 8 semanas (Teixeira et al., 1978; Velasco e Morillo, 2018).

O diagnóstico é estabelecido em poucos pacientes, possivelmente devido a sintomas leves, e o curso clínico normalmente conduz à recuperação espontânea, sendo que aproximadamente 10% dos pacientes sintomáticos evoluem para as formas graves da doença (Marin-Neto et al., 2007; Marin-Neto e Rassi, 2009; Py, 2011). A fase crônica mantém-se por 10 a 30 anos, caracterizada pela ausência de sintomatologia clínica, seguida de sintomas digestivos, cardíacos ou neurológicos em cerca de 20% a 30% dos pacientes infectados (Henao-Martínez et al., 2012).

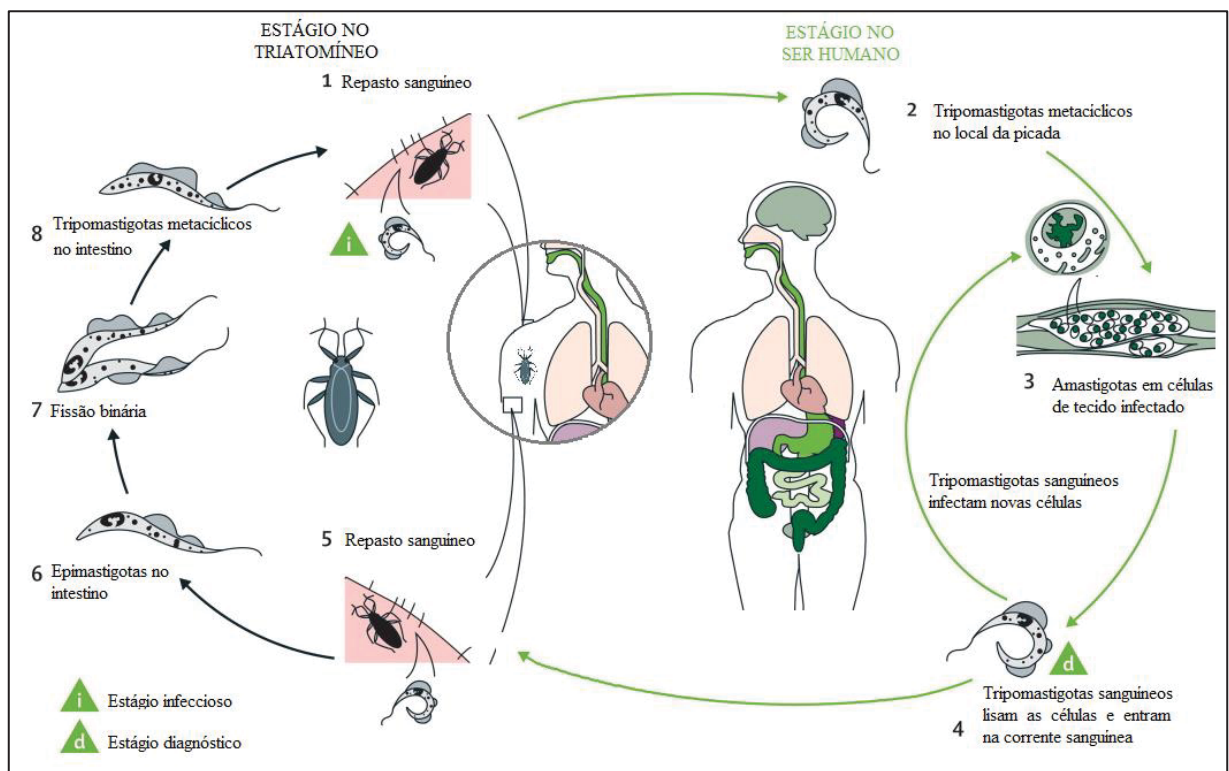
Pacientes imunossuprimidos, portadores de AIDS ou após transplante de órgãos, podem apresentar reativação da doença, com níveis de parasitemia tão elevados quanto os observados na infecção aguda (Marchiori et al., 2007; DiazGranados et al., 2009). Nestes casos a meningoencefalite é a manifestação mais comum e a taxa de mortalidade pode alcançar a 100% (Almeida et al., 2011).

O *Trypanosoma cruzi* é digenético, cujo complexo ciclo de vida compreende pelo menos quatro estágios distintos de desenvolvimento, os quais envolvem um hospedeiro intermediário invertebrado, bem como um hospedeiro definitivo mamífero, conferindo adaptação a cerca de quarenta espécies de insetos triatomíneos e mais de mil espécies de mamíferos (Teixeira et al., 2009). Entre os vetores invertebrados, insetos hematófagos hemípteros da família Reduviidae e subfamília Triatominae, destacam-se as espécies *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis* e *Panstrongylus megistus* na América do Sul; *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* nos países Andinos e partes da América Central; *Triatoma dimidiata* e *Triatoma barberi* no México (Rassi et al., 2012).

O vetor ingere formas tripomastigotas sanguíneas do hospedeiro mamífero que transformam-se em epimastigotas no trato digestivo do triatomíneo algumas horas após a ingestão do parasita, os quais se multiplicam por fissão binária na porção anterior do intestino, atingem a porção posterior (reto) e fixam-se a sua parede, diferenciando-se em formas tripomastigotas metacíclicas, processo denominado metaciclogênese (Kleffmann et al., 1998; Kollien e Schaub, 2000). No momento do repasto sanguíneo, as formas tripomastigotas

metacíclicas são eliminadas juntamente as fezes do inseto e atingem a corrente sanguínea do mamífero através da mucosa ou por lesão, seja preexistente ou resultante da picada. Uma vez no hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas metacíclicos invadem o sistema reticuloendotelial e células conectivas e se diferenciam em amastigotas, as quais se replicam por fissão binária e diferenciam-se em tripomastigotas sanguíneos, que lisam as células e são liberados na corrente sanguínea. Estes invadem os tecidos adjacentes e se espalham através dos vasos linfáticos e da corrente sanguínea, iniciando outros ciclos de multiplicação intracelular. O ciclo de transmissão reinicia-se quando os tripomastigotas sanguíneos circulantes são ingeridos juntamente ao sangue pelos vetores (De Souza, 1984; Rassi et al., 2012), conforme sumarizado na Figura 1.

FIGURA 1 – CICLO DE TRANSMISSÃO DO *Trypanosoma cruzi*



NOTA: Representação esquemática do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*, apresentando os estágios no vetor triatomíneo (epimastigota e tripomastigota metacíclico) e no homem/mamífero (amastigota e tripomastigota sanguíneo).

FONTE: Modificado de Centers for Disease Control and Prevention – CDC (2018).

1.2 ORGANIZAÇÃO DO GENOMA

Os tripanossomatídeos possuem dois genomas distintos, um nuclear e um mitocondrial denominado de cinetoplasto (kDNA) (Brenner, 1973). O DNA mitocondrial alberga uma complexa rede de moléculas circulares que diferem em tamanho e função, denominadas de minicírculos e maxicírculos, sendo que os minicírculos possuem tamanho entre 0,5 e 2,9 kb e os maxicírculos entre 20 e 40 kb (Shapiro e Englund, 1995).

Os maxicírculos transcrevem produtos gênicos mitocondriais típicos, tais como RNA ribossômico e enzimas da cadeia respiratória (ATPase e citocromoxidase), enquanto os minicírculos codificam moléculas de RNAs guias (gRNAs) necessárias para a editoração do RNA mitocondrial (Lukes et al., 2002).

A sequência dos genomas de *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma cruzi* foram publicadas em 2005, representando um marco no estudo da biologia dos tripanossomatídeos (Ivens et al., 2005; Berriman et al., 2005; El-Sayed et al., 2005a). No entanto, o genoma de *T. cruzi* foi publicado incompleto devido à natureza repetitiva de seu genoma e ao fato da cepa de referência CL Brener constituir-se um híbrido heterozigoto de duas linhagens distintas (El-Sayed et al., 2005a).

O genoma diplóide do *Trypanosoma cruzi* CL Brener possui um tamanho estimado entre 106,4 Mb e 110,7 Mb, organizado em 41 pares de cromossomos variando em tamanho de 78 kb a 2,4 Mb, o qual contém 22.570 genes que codificam proteínas, dos quais 12.570 representam pares alélicos, sendo o genoma haplóide constituído de 12.000 genes (El-Sayed et al., 2005a; Weatherly et al., 2009).

Pelo menos 50% do genoma possui sequências repetitivas, consistindo principalmente de retrotransposons, repetições subteloméricas e genes de grandes famílias de moléculas de superfície, que incluem a superfamília das trans-sialidases, mucinas, proteínas de superfície associadas à mucina (MASPs) e a protease de superfície GP63 (El-Sayed et al., 2005a).

Embora as espécies de tripanossomatídeos tenham divergido há cerca de 200 a 500 milhões de anos, seus genomas são altamente sintênicos, ou seja, há conservação na ordem dos genes. Contudo, apesar desta conservação, existem diferenças consideráveis que refletem as distintas fisiopatologias e estratégias de sobrevivência de cada organismo e as adaptações a pressões seletivas específicas destas espécies (El-Sayed et al., 2005b).

Tripanossomatídeos apresentam genes com grandes domínios de repetições em tandem, sendo que estes genes em *T. cruzi* não compartilham características como similaridade de sequência ou localização celular predita pela presença de uma sequência sinal ou domínio

transmembrana (Goto et al., 2008). Assim, sugerem-se que os domínios repetitivos nestas proteínas atuam como imunomoduladores, encontrando-se respostas de anticorpos a estas proteínas na doença de Chagas (Ibañez et al., 1988; Burns et al., 1992; Gruber e Zingales, 1993; Buscaglia et al., 1999).

Algumas proteínas que possuem repetições em tandem caracterizadas em *T. cruzi* incluem membros da família trans-sialidase (Parodi et al., 1992; Leguizamon et al., 1994), proteína flagelar FRA e proteína citoplasmática CRA (Lafaille et al., 1989), proteínas ribossômicas (Pais et al., 2008), proteína de superfície tripomastigota B13 (Gruber e Zingales, 1993) e amastina (Teixeira et al., 1994), as quais não parecem compartilhar características funcionais e bioquímicas (Goto et al., 2008).

1.3 EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS

Os tripanossomatídeos possuem um mecanismo de transcrição e processamento de mRNAs distinto de outros eucariotos. A maioria de seus genes que codificam proteínas são transcritos em grandes unidades de transcrição policistrônica, onde dezenas a centenas de genes não relacionados funcionalmente em sua maioria, são dispostos em longos agrupamentos unidirecionais na mesma cadeia polipeptídica e separados por pequenas regiões intergênicas ricas em tratos de pirimidinas (Johnson et al., 1987; Tschudi e Ullu, 1988; Liang et al., 2003).

Estes clusters são co-transcritos pela RNA Polimerase II (RNA Pol II) e produzem transcritos policistrônicos primários (pré-mRNAs), os quais são clivados por *trans-splicing* e por poliadenilação a fim de gerar mRNAs funcionais monocistrônicos, que podem ser exportados do núcleo e serem traduzidos eficientemente. (Muhich e Boothroyd, 1988; Agabian, 1990; Ullu et al., 1993; Hug et al., 1994; Matthews et al., 1994).

Estes genes são majoritariamente desprovidos de íntrons, sendo descritos poucos casos de *cis-splicing*, a exemplo do gene que codifica a poli-A polimerase (Mair et al., 2000).

A transcrição pela RNA Pol II inicia-se a uma taxa constante bidirecionalmente em regiões de troca de fita (*strand-switch regions*, SSRs) divergentes, marcadas pela presença de variantes de histonas e histonas modificadas, finalizando-se em regiões de troca de fita convergentes, as quais freqüentemente possuem genes codificadores para tRNA, rRNA e/ou snRNA (Martínez-Calvillo et al., 2003; Martínez-Calvillo et al., 2004; Siegel et al., 2009; Anderson et al., 2013).

O *trans-splicing* envolve a adição de uma sequência conservada de 39 nucleotídeos, denominada *spliced líder* ou miniéxon, o qual é transferido da região 5' do *spliced leader* RNA (SL RNA) à extremidade 5' de cada transcrito primário (Agabian, 1990; Nilsen, 1992).

O miniéxon contém uma estrutura cap modificada por sete metilações nomeada cap 4, composta de 2'-O-metilações na ribose dos primeiros quatro nucleotídeos (AACU) e metilações adicionais sobre as bases do primeiro (m_2^6A) e quarto nucleotídeos (m^3U), constituindo a complexa estrutura 7-metil-guanosina-ppp- $N^6,N^6,2'$ -O-tri-metil-adenosina-p-2'-O-metil-adenosina-p'-2'-O-metil-citosina-p- $N^3,2'$ -O-di-metil-uridina (Laird et al., 1985; Freistadt et al., 1988; Bangs et al., 1992).

Concomitantemente a reação de *trans-splicing* ocorre a poliadenilação na extremidade 3' do transcrito primário (LeBowitz et al., 1993; Vassella et al., 1994) e ambas as reações requerem elementos de sequências específicas, tais como o trato de polipirimidinas (Yn), o *branch point* (BP), o sítio de splice 5' (5'SS) geralmente definido pelo dinucleotídeo GT e o sítio acceptor de splice 3' (3'SS) geralmente definido pelo dinucleotídeo AG (Huang e Van der Ploeg, 1991; Siegel et al., 2005).

O comprimento, composição e localização do trato de polipirimidinas influencia a eficiência do *trans-splicing* (Huang e Van der Ploeg, 1991; Matthews et al., 1994; Siegel et al., 2005) e mutações neste sítio afetam a poliadenilação a montante (Matthews et al., 1994; Schürch et al., 1994).

Não há evidências de uma sequência sinal clássica para a adição da cauda poli-A em tripanossomatídeos, tais como os sinais de poliadenilação (AAUAAA) presentes em eucariotos superiores, porém, estudos sugerem que esta reação ocorre em uma região de 100 a 400 nucleotídeos, contendo resíduos de adenosina, a montante do sítio acceptor de splice 3' (Hug et al., 1994; Vanhamme e Pays, 1995; Benz et al., 2005).

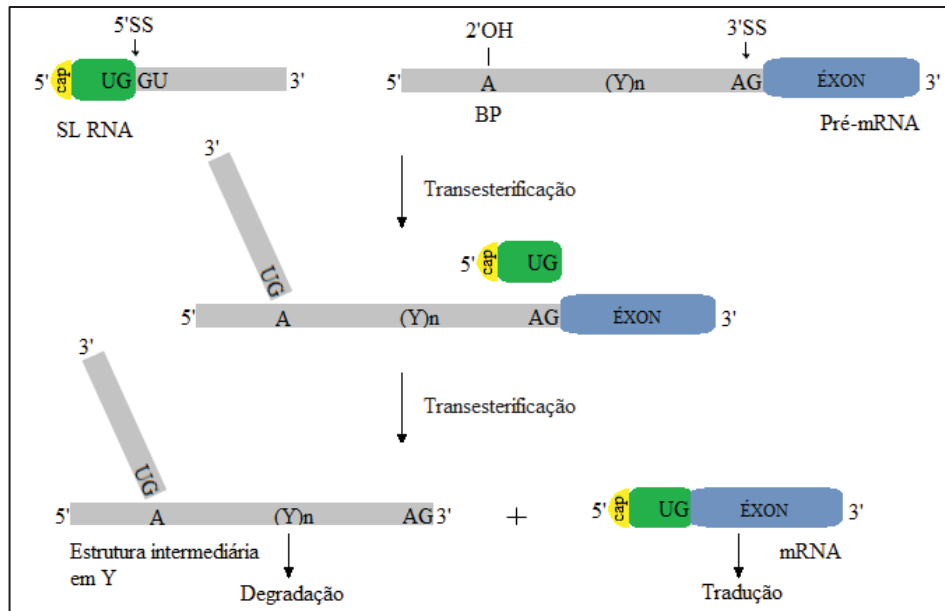
No entanto, para a maioria dos genes de *T. cruzi*, o sítio acceptor de *splice* 3' localiza-se a cerca de 18 nucleotídeos a jusante do trato de polipirimidinas, enquanto o sítio de poliadenilação usualmente localiza-se a 40 nucleotídeos a montante do trato de polipirimidinas (Campos et al., 2008).

A Figura 2 apresenta uma representação esquemática do mecanismo de *trans-splicing* em tripanossomatídeos.

Um estudo em *T. cruzi* apontou que alguns sítios de *trans-splicing* e poliadenilação podem ser “mascarados” durante o processamento dos transcritos primários, processo no qual a proteína TcDRBD4 pode estar envolvida. Consequentemente, mRNAs dicistrônicos ou monocistrônicos com longas regiões 3'UTR são gerados, os quais podem ser processados

posteriormente pelos mecanismos usuais de *trans-splicing* e poliadenilação ou serem estocados e processados em mRNAs maduros quando requeridos pela célula (Jager et al., 2007).

FIGURA 2 - *TRANS-SPLICING* EM TRIPANOSSOMATÍDEOS



NOTA: Representação esquemática do mecanismo de *trans-splicing*.

Os éxons estão representados em caixa azul e o miniéxon derivado do SL RNA em caixa verde (com destaque para o cap 4 representado em amarelo). As regiões não traduzidas são representadas em caixas cinzas. É indicado o sítio de *splice* 5' (5'SS), o sítio aceptor de *splice* 3' (3'SS), a adenosina (A) do *branch point* (BP) situada a montante do trato de polipirimidina (Yn).

O *trans-splicing* envolve duas reações de transesterificação. Na primeira, ocorre um ataque nucleofílico do grupo 2'-OH de um resíduo conservado de adenosina do *branch point* ao átomo de fósforo do sítio de *splice* 5'. Esta reação resulta no miniéxon livre e na região não traduzida do SL RNA ligada por uma ligação fosfodiéster 2'-5' a extremidade 5' do mRNA em uma estrutura em forma de Y.

Na segunda reação ocorre o ataque nucleofílico no sítio aceptor de *splice* 3' do mRNA pela extremidade livre 3'OH da região 5' do miniéxon, resultando na ligação do miniéxon a extremidade 5' do mRNA e liberação da região não traduzida na forma de uma estrutura em Y, o qual será degradado.

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

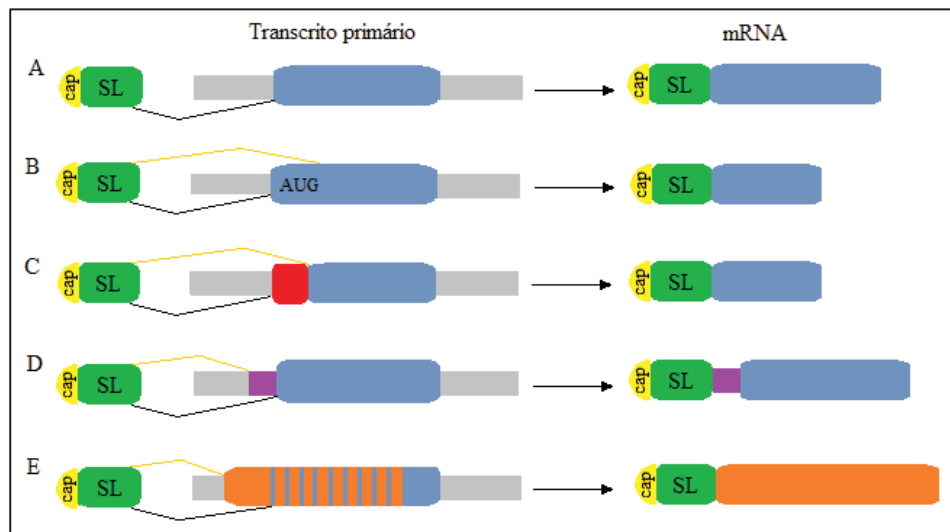
Análises de transcriptoma em larga escala mostraram que os tripanossomatídeos possuem de um a três sítios de *trans-splice* e sítios de poliadenilação dispersos, permitindo tanto o *trans-splicing* quanto a poliadenilação de forma alternativa (Kolev et al., 2010; Nilsson et al., 2010; Siegel et al., 2010; Siegel et al., 2011).

O *trans-splicing* alternativo pode implicar na não tradução do transcrito devido a excisão do códon de início (AUG) a jusante do sítio aceptor de *splice* 3' alternativo, no truncamento da ORF original devido a exclusão ou inclusão de sinais de localização celular, na

inclusão ou exclusão de elementos regulatórios na ORF e na criação de uma região codante alternativa (Nilsson et al., 2010; Michaeli, 2011) (Figura 3).

A poliadenilação alternativa pode alterar o comprimento das regiões 3'UTR e 5'UTR, modificando importantes elementos regulatórios no mRNA maduro (Siegel et al., 2010).

FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO DO *TRANS-SPLICING* ALTERNATIVO



NOTA: Representação esquemática dos padrões de pré-mRNAs e os diferentes mRNAs maduros após processamento por *trans-splicing* e *trans-splicing* alternativo. Os éxons são representados em caixas azul e laranja, o miniéxon derivado do SL RNA em caixa verde (com destaque para o cap 4 representado em amarelo). As regiões não traduzidas são representadas em caixas cinzas e as regiões contendo os sinais regulatórios e de direcionamento celular são mostradas em caixas roxa e vermelho.

Em (A) é mostrado o processamento do transcrito por *trans-splicing* e em (B),(C),(D) e (E) por *trans-splicing* alternativo, evidenciando-se em (B) a exclusão do códon de início (AUG), em (C) a exclusão do sinal de direcionamento celular, em (D) a inclusão de elementos regulatórios e em (E) o uso de um quadro de leitura aberto alternativo.

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

Os tripanossomatídeos possuem cópias altamente conservadas das três RNA polimerases de eucariotos. A RNA polimerase I (RNA Pol I) transcreve os blocos gênicos dos pré-RNAs ribossomais (pré-rRNAs) 18S, 5,8S e 28S (Lee e Van der Ploeg, 1997). Além disso, em *T. brucei* a RNA Pol I transcreve os mRNAs que codificam a glicoproteína variante de superfície (VSG) presente na forma sanguínea do parasita e as prociclinas (EPs e GPEETs) da forma procíclica (Günzl et al., 2003). A RNA polimerase II (RNA Pol II) transcreve a maior parte dos genes que codificam proteínas e snRNAs que estão envolvidos no processamento de pré-mRNAs em mRNAs maduros (Das et al., 2008). A RNA polimerase III (RNA Pol III) transcreve pequenos RNAs essenciais, tais como tRNAs, 5s rRNA, snoRNAs e alguns snRNAs (Das et al., 2008).

Embora promotores para as RNA polimerases I e III estejam definidos (Bell e David Barry, 1995; Laufer et al., 1999), os únicos promotores da RNA Pol II caracterizados são os que transcrevem os genes do *spliced leader* RNA, não sendo identificados sítios de terminação de transcrição (Gilinger e Bellofatto, 2001; Campbell et al., 2003).

No entanto, sugere-se que modificações na cromatina desempenham um importante papel no direcionamento da RNA POL II para seus sítios de início e término da transcrição, sendo estes locais marcados por variantes de histonas e histonas modificadas (Siegel et al., 2009). Em *T. cruzi*, as histonas acetiladas H3/H4 e a histona metilada H3K4m3 foram associadas a regiões de troca de fita divergentes, sendo correlacionadas com os sítios de início de transcrição (Respuela et al., 2008).

1.3.1 Regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos

A organização genômica não usual dos tripanossomatídeos em unidades policistrônicas com posterior processamento por *trans-splicing* e a ausência de sequências promotoras típicas para a transcrição de genes que codificam proteínas indicam que a regulação da expressão gênica ocorra principalmente por mecanismos pós-transcricionais, os quais incluem o processamento e a degradação de mRNAs, a eficiência da tradução, o processamento, modificação e estabilidade de proteínas (Clayton e Shapira, 2007).

A regulação pós-transcricional nos tripanossomatídeos influencia o *splicing*, transporte, estabilidade, localização e tradução de mRNAs, os quais são mediados principalmente pelo reconhecimento de elementos em *cis* presentes majoritariamente nas regiões 3'UTR dos mRNAs e por fatores regulatórios em *trans*, normalmente proteínas, metabólitos ou RNAs (Ouellette e Papadopoulos, 2009; Araújo et al., 2011).

Entre os fatores em *trans*, destacam-se as proteínas de ligação ao RNA (RBP) que reconhecem sequências específicas nas regiões não traduzidas dos mRNAs, associando-se a elas e formando um complexo de ribonucleoproteínas (RNPs), o qual interage com diversas proteínas efetoras (Glisovic et al., 2008).

Estas regiões não traduzidas são responsáveis por mecanismos que regulam de modo positivo ou negativo os níveis de mRNA ao longo do ciclo de vida do parasita, atuando na estabilização ou desestabilização destes mRNA, definindo o tempo de vida, localização celular, processamento e a taxa no qual um mRNA específico é traduzido (Berberof et al., 1995; Keene, 2001; Lunde et al., 2007).

Entre as sequências de reconhecimento estão os elementos ricos em adenina e uracila (*AU-rich elements*, ARES) (Barreau et al., 2005), adenina e guanina (*AG-rich elements*, AG) (Guerra-Slomp et al., 2012), guanina (*G-rich element*, G) (D'Orso e Frasch, 2001a), uracila (*U-rich element*, U) (Mayho et al., 2006), citosina (*C-rich element*, C) (Mörking et al., 2004), adenina (*A-rich element*, A) (Mörking et al., 2012), além de motivos específicos, como a sequência UUGUACC, reconhecida pela TbPUF9 em *T. brucei* (Archer et al., 2009).

Entre outros motivos, podem-se evidenciar o elemento GRE (*glycerol-responsive element*), encontrado na região 3'UTR dos mRNAs da prociclina GPEET (Vassella et al., 2000; Vassella et al., 2004) e os motivos nos quais interagem grande parte das proteínas com domínio PUF, sequências de 32 nucleotídeos denominadas NREs (*Nanos response elements*) e a sequência específica UGUR contida no fragmento NRE (Wang et al., 2018).

Em *T. cruzi*, TcPUF1 e TcPUF2 ligam-se as sequências NREs, enquanto TcPUF3, TcPUF4, TcPUF5, TcPUF6 e TcPUF9 interagem com a sequência UGUR na região 3' UTR de seus mRNAs alvos (Caro et al., 2006).

Em *T. cruzi*, TcUBP-1 associa-se a sequências ricas em guanina e uracila (GU) e também a sequência de 44 nucleotídeos rica em elementos adenina e uracila (AU) presente nos transcritos de mucina TcSMUG, estabilizando-os na forma epimastigota e desestabilizando-os na forma tripomastigota metacíclica (D'Orso e Frasch, 2001a). Outros exemplos incluem a proteína TcRBP40 que reconhece um elemento rico em adenina e guanina (AG) na região 3'UTR de seus mRNAs alvos, os quais codificam principalmente proteínas transmembranares (Dallagiovanna et al., 2005) e TcRBP19 que está envolvido na regulação negativa de seus próprios transcritos, associando-se à região 3'UTR de seus mRNAs na forma epimastigota (Pérez-Díaz et al., 2013).

Os complexos de ribonucleoproteína são estruturas dinâmicas que podem ser rapidamente remodeladas em resposta a alterações ambientais ou durante a diferenciação, sendo que uma ribonucleoproteína pode possuir diferentes funções biológicas dependendo de quais proteínas estejam associadas a este complexo (Keene, 2007; Tenenbaum et al., 2011).

Em *T. brucei*, TbDRBD3 associa-se a um complexo ribonucleico que compreende as proteínas de ligação poli (A) PABP1/PABP2 e pelo menos 20 proteínas ribossomais distintas, porém sob estresse nutricional ou tratamento com arsenito a proteína PABP2 é dissociada deste complexo, permanecendo a proteína PABP1 associada a ele (Fernández-Moya et al., 2012).

Em *T. cruzi*, TcZC3H39 liga-se ao motivo conservado rico em adenina (A) na região 3'UTR de seus mRNAs alvos, formando um complexo ribonucleoproteico que se altera em condições de estresse. Em epimastigotas, a composição do complexo que compreende

TcZC3H39 inclui várias proteínas relacionadas a tradução, tais como proteínas ribossomais, além da RNA helicase dependente de ATP e proteínas de ligação ao RNA. Em epimastigotas submetidos a estresse nutricional, os mRNAs ligados a TcZC3H39 codificam proteínas associadas as mitocôndrias, como subunidades do complexo citocromo C oxidase (COX) e proteínas ribossômicas (Alves et al., 2014).

As RBPs podem interferir na ligação de proteínas pertencentes as vias de degradação ou tradução de mRNAs (Manful et al., 2011; Fadda et al., 2013; Kramer et al., 2013). Se uma RBP recruta a exonuclease XRNA ou o complexo CAF1/NOT, o mRNA pertencente ao ribocomplexo desta RBP será degradado via 5' → 3' e desadenilado com posterior degradação, respectivamente. Contrariamente, se a interação ocorrer com PABP, esta protegerá seus mRNAs da degradação e poderá associar-se a fatores de tradução.

Diferentes elementos em *cis* podem estar presentes na mesma região não traduzida do mRNA. A região 3'UTR do mRNA que codifica a mucina TcSMUG de *T. cruzi* possui uma sequência rica em adenina e uracila (AU) e outra rica em guanina (G), sendo que a primeira está envolvida na desestabilização seletiva de seus mRNAs em tripomastigotas metacíclicos e a segunda regula positivamente a abundância de seus mRNAs em epimastigotas (Di Noia et al., 2000; D'Orso e Frasch, 2001b).

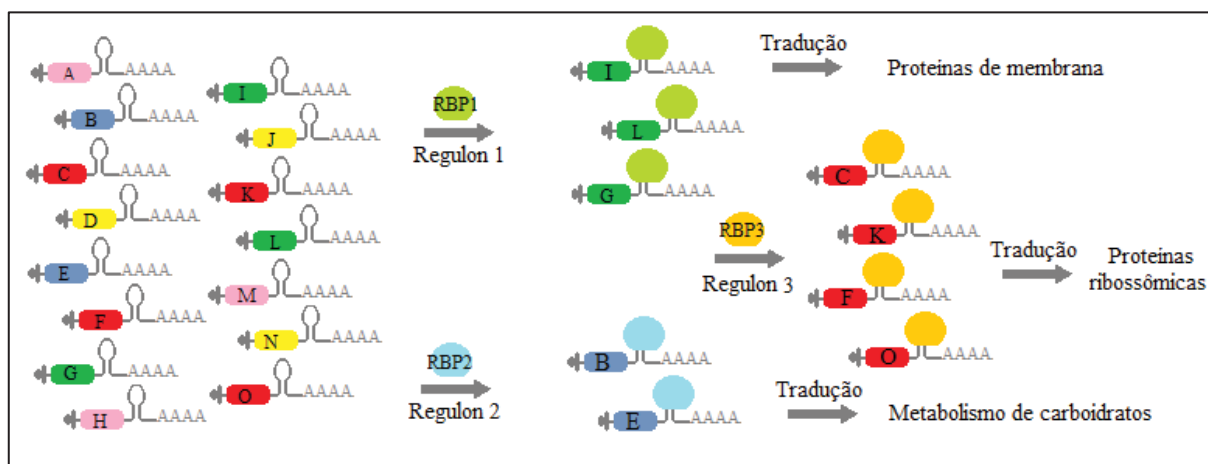
Ainda, uma RBP pode atuar na formação de distintos complexos de ribonucleoproteínas em diferentes estágios de desenvolvimento, sendo exemplificado pela TcUBP1 de *T. cruzi*. Esta RBP é expressa em todos os estágios do ciclo de vida do parasita, porém interage com o mRNA de TcSMUG apenas na forma epimastigota, estabilizando-o. Quando o complexo de ribonucleoproteínas que contém o mRNA de TcSMUG está associado a TcUBP1, TcUBP2 e TcPABP1, esta interação resulta na correta expressão dos genes de mucina. Por outro lado, TcUBP1 e TcPABP1 associam-se ao mRNA de amastina tanto nas formas epimastigotas quanto em tripomastigotas metacíclicos (De Gaudenzi et al., 2003).

Queiroz et al. (2009), em uma análise do transcriptoma de *T. brucei* em diferentes estágios de diferenciação, identificaram grupos funcionais com padrões de regulação que sugerem a formação de “*regulons*” pós-transcricionais nos quais mRNAs que codificam funções em uma determinada via ou componentes codificantes de complexos proteicos mostraram-se regulados de modo semelhante (Queiroz et al., 2009).

A teoria dos “*regulons*” ou “*operons*” pós-transcricionais, largamente descrita para diversos eucariotos (Tenenbaum et al., 2000; Hieronymus e Silver, 2003; Gerber et al., 2004; Chen et al., 2012), é um mecanismo no qual múltiplos mRNAs que codificam proteínas relacionadas funcionalmente são corregulados principalmente por RBPs, embora também por

RNAs não codificantes ou metabólitos, formando complexos de ribonucleoproteínas, os quais permitem que as células respondam rapidamente a alterações ambientais, regulando sua sobrevivência, adaptação ao estresse, homeostase e diferenciação (Keene e Tenenbaum, 2002; Keene e Lager, 2005; Keene, 2007) (Figura 4).

FIGURA 4 - *REGULONS* PÓS-TRANSCRICIONAIS



NOTA: O diagrama esquemático mostra a organização espacial de elementos em *cis* contidos na região 3'UTR de diversos mRNAs. Cada transcrito é representado por letras (A-O) que indicam diferentes genes. Cores em comum em cada mRNA simbolizam transcritos que codificam proteínas relacionadas funcionalmente. Com a finalidade de simplificação apenas um elemento em cada mRNA foi representado. São mostradas três proteínas de ligação ao RNA (RBP1-3) que reconhecem motivos na região 3'UTR dos mRNAs, regulam sua estabilidade e tradução, garantindo a expressão coregulada de um conjunto de proteínas que funcionam nas mesmas vias metabólicas.

FONTE: Adaptado de De Gaudenzi et al. (2013).

Li et al. (2012) sugeriu a presença de “*regulons*” pós-transcricionais em *T. cruzi* ao identificar um elemento em *cis* de 43 nucleotídeos rico em uracila (U) na região 3'-UTR de inúmeros mRNAs regulados positivamente em amastigotas intracelular, os quais incluem mais de 900 mRNAs de grandes famílias gênicas, tais como trans-sialidase, proteína associada a mucina (MASP), mucina, protease de superfície GP63 e proteína quinase, bem como genes de cópia única que são predominantemente detectados no estágio amastigota (Li et al., 2012).

Evidenciando o modelo dos “*regulons*”, em *T. cruzi* TcUBP1 liga-se aos mRNAs que codificam proteínas envolvidas no metabolismo e TcRBP3 a transcritos codificadores de proteínas ribossômicas (Noé et al., 2008). TcZC3H39 regula positivamente os níveis de transcrição de mRNAs que codificam proteínas associadas à tradução em epimastigotas e diminui seus níveis de forma drástica durante o processo de diferenciação para tripomastigotas metacíclicos (Alves et al., 2014).

Em *T. brucei*, TbDRBD3 estabiliza um conjunto de mRNAs que codificam proteínas de membrana durante o desenvolvimento do parasita (Estévez, 2008) e permanece ligado aos

seus transcritos alvos após estresse nutricional ou tratamento com arsenito (Fernández-Moya et al., 2012). TbPUF9 regula mRNAs de proteínas envolvidas no processo replicativo ao longo do ciclo celular, estabilizando seus transcritos alvos durante a fase S do ciclo celular (Archer et al., 2009) e TbRBP42 liga-se à região codificadora de muitos mRNAs envolvidos no metabolismo energético celular (Das et al., 2012).

1.4 PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO RNA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS

As proteínas de ligação ao RNA são efetoras e reguladoras do processo de controle da expressão gênica pós-transcricional, coordenando a estabilidade, maturação e *turnover* dos mRNAs. Como já mencionado, estas RBPs associam-se aos mRNAs e formam um complexo ribonucleoproteico, o qual pode compreender diversas proteínas parceiras, que definem a maturação, modificação, transporte e degradação do mRNA (Dreyfuss et al., 2002). A composição e disposição dos componentes do complexo ribonucleoproteico é única para cada mRNA e o mesmo é remodelado durante o curso da maturação do RNA em sua forma funcional (Varani e Nagai, 1998; Glisovic et al., 2008).

As proteínas de ligação ao RNA podem possuir mais de um alvo ao qual elas regulam, assim, grupos distintos de mRNAs podem interagir com várias proteínas de ligação ao RNA e diferentes RBPs podem competir pelo mesmo mRNA alvo (Buckley e Eberwine, 2009; Ascano et al., 2012).

As RBPs associam-se a sequências nos mRNAs via combinações modulares de um conjunto limitado de domínios de ligação ao RNA estruturalmente definidos, entre os quais incluem o motivo de reconhecimento de RNA (*RNA recognition motif*, RRM), domínio de homologia K (KH) (tipo I e II), RGG boxes (Arg-Gly-Gly), domínio ALBA (*Acetylation Lowers Binding Affinit*), domínio Sm, DEAD/DEAH box, dedo de zinco (*Zinc Finger*), domínio de ligação ao RNA de fita dupla (*double stranded RNA-binding domain*, dsRBD), domínio *cold-shock*, domínio PUF (Pumilio/FBF) e Piwi/Argonaute/Zwille (PAZ) (Glisovic et al., 2008). Contudo, existem diversos estudos que identificam proteínas de ligação ao RNA não clássicas, ou seja, onde o motivo clássico de reconhecimento ao RNA está ausente (Scherrer et al., 2010; Tsvetanova et al., 2010; Klass et al., 2013; Kwon et al., 2013).

Muitas RBPs possuem uma ou mais cópias do mesmo domínio, enquanto outras possuem dois ou mais domínios distintos, possibilitando vários arranjos estruturais a fim de expandir o repertório funcional dessas proteína (Lunde et al., 2007).

A correta montagem dos complexos ribonucleoproteicos é crítica para o desenvolvimento e manutenção de todas as células e organismos, e mutações nos genes que codificam RBPs normalmente implicam em desregulação celular (Kapeli et al., 2017; Neelamraju et al., 2018).

Nos tripanossomatídeos as RBPs melhores caracterizadas pertencem ao domínio RRM, PUF, ALBA e *Zinc Finger*, envolvidas em diversos processos moleculares, tais como diferenciação celular, desenvolvimento, processamento de rRNA, ciclo celular e resposta ao choque térmico (De Gaudenzi et al., 2005; Lueong et al., 2016).

1.4.1 Proteínas com motivo RRM

O motivo de reconhecimento de RNA (*RNA recognition motif*, RRM), também designado como domínio de ligação ao RNA (*RNA-binding domain*, RBD) ou domínio ribonucleoproteico (*ribonucleoprotein domain*, RNP) é um dos domínios mais abundantes em eucariotos (Cléry et al., 2008).

Este domínio possui cerca de 90 resíduos de aminoácidos cuja sequência compreende dois motivos conservados denominados RNP-1 e RNP-2. O primeiro consiste de um octapeptídeo formado pela sequência K/R-G-F/Y-G/A-F/Y-V/I/L-X-F/Y e o segundo um hexapeptídeo definido como I/V/L-F/Y-I/V/L-X-N-L, onde X é qualquer aminoácido. Sua estrutura consiste de quatro folhas β antiparalelas e duas α -hélices, de topologia $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ (Nagai et al., 1990).

As frações amino e carboxi-terminais das proteínas que contêm o motivo RRM possuem, em geral, domínios auxiliares ricos em glicina e carregados de resíduos como glutamina e lisina envolvidos nas interações proteína-proteína (Dreyfuss et al., 2002).

As proteínas deste domínio estão envolvidas principalmente na interação com RNA de fita simples, porém interagem com DNA e proteínas (Maris et al., 2005).

Para a ligação ao RNA são necessários quatro resíduos, as posições 1, 3 e 5 no RNP-1 e a posição 2 no RNP-2. Assim, as cadeias laterais carregadas e aromáticas desses resíduos são expostas ao solvente e interagem com o RNA através de interações de empilhamento e uma ponte de sal (Maris et al., 2005).

Há 139, 75 e 80 genes que codificam proteínas com o motivo RRM no genoma de *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major*, respectivamente. Destes, alguns genes estão presentes em duas ou mais cópias em *T. brucei* ou *L. major* como consequência de duplicações em série, dois genes

são únicos de *T. cruzi*, três são exclusivos de *L. major* e sete são encontrados em *T. cruzi* e *T. brucei*, porém não em *L. major* (De Gaudenzi et al., 2005).

Estas proteínas estão envolvidas em diversos processos, entre os quais, o envolvimento no processo de *splicing*, representado pelo fator auxiliar de *splicing* U2AF, heterodímero que se liga ao trato de polipirimidinas e ao sítio acceptor de *splice* do pré-mRNA formando parte do spliceossomo (Vazquez et al., 2009); o processamento de rRNAs, exemplificado pela proteína TcNRBD1 que está associada a diferentes etapas do processo de tradução, tanto regulando mRNAs que codificam proteínas ribossômicas quanto participando da montagem dos ribossomos em *T. cruzi* (Oliveira et al., 2016); na tradução, ilustrada pela PABP1 em *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major* (Batista et al., 1994; Hotchkiss et al., 1999; Bates et al., 2000) que se ligam às caudas poli (A) dos mRNAs e atuam na estabilidade destes e na regulação da tradução; na regulação do *turnover* de mRNAs, onde pode-se citar a proteína TbDRBD3, que liga-se a um subconjunto de mRNAs que codificam proteínas de membrana, promovendo a estabilização destes transcritos (Estévez, 2008).

Entre as RBPs de tripanossomatídeos, o domínio RRM constitui-se o mais estudado, podendo-se destacar inúmeras proteínas.

A proteína TcUBP1 de *T. cruzi* foi o primeiro fator em *trans* identificado em tripanossomatídeos implicado na regulação da expressão gênica mediada por elementos em *cis* na região 3'UTR de mRNAs, a qual reconhece tanto elementos ricos em adenina e uracila (AU) no mRNA de TcSMUG quanto sequências ricas em guanina e uracila (GU) (D'Orso e Frasch, 2001a). TcUBP1 forma um complexo ribonucleoproteico juntamente a proteína de ligação poli(A) e TcUBP2, reconhecendo motivos ricos em uracila (U) (D'Orso e Frasch, 2002). Verificou-se que TcUBP1 associa-se aos mRNAs que codificam mucina, amastina, proteases (cruzipaina e GP63) e membros da família das trans-sialidases, enquanto tcRBP3 associa-se a proteínas ribossomais (Noé et al., 2008). TcUBP1, TcUBP2, TcRBP3, TcRBP4 e TcRBP5a são proteínas essencialmente citoplasmáticas, sendo que sob estresse nutricional TcUBP1 e TcUBP2 localizam-se em grânulos citoplasmáticos enquanto TcRBP3, TcRBP4 e TcRBP5a colocalizam-se parcialmente com estes grânulos. No entanto, TcRBP6b é encontrado tanto no núcleo quanto no citoplasma e localizado em grânulos sob estresse nutricional (Cassola et al., 2007). Posteriormente, TcUBP1 e TcUBP2 foram encontrados em baixos níveis no núcleo e sob estresse com arsenito acumularam-se no núcleo juntamente com seus mRNAs alvos (Cassola e Frasch, 2009). A expressão ectópica de TcUBP1 em epimastigotas cultivados em meio LIT e em fase final logarítmica de crescimento promoveu a diferenciação espontânea destes parasitas para tripomastigotas metacíclicos e acelerou este processo sob as condições de

diferenciação *in vitro*. Estes tripomastigotas metacíclicos mostraram-se infectivos e se diferenciaram em amastigotas no citoplasma da célula hospedeira. Ensaios de *tethering* concluíram que TcUBP1 atua na repressão de múltiplos RNAs alvos (Romaniuk et al., 2018).

Em *T. cruzi*, TcRBP19 é uma proteína de baixa expressão diferencialmente expressa durante o ciclo de vida do parasita, detectada apenas na fase amastigota e localizada no citoplasma em um padrão difuso. Sua expressão ectópica acarretou na diminuição do número de células de mamíferos infectadas, sugerindo que TcRBP19 pode estar envolvida na progressão do ciclo de vida do parasita (Pérez-Díaz et al., 2007; Pérez-Díaz et al., 2012).

TcRBP40 liga-se aos mRNAs que codificam principalmente proteínas com domínio transmembrana, é distribuída no citoplasma de forma granular em tripomastigotas metacíclicos e amastigotas, porém em epimastigotas é dispersa no citoplasma e concentrada nos reservosomos (Guerra-Slompo et al., 2012).

TcRBP9, uma proteína citoplasmática tanto em epimastigotas em fase de crescimento exponencial quanto submetidos a estresse nutricional, é expressa durante o curso da metaciclogênese, porém ausente em tripomastigotas metacíclicos. Em epimastigotas, TcRBP9 associa-se aos mRNAs que codificam principalmente proteínas do metabolismo de RNA, destacando-se TcZC3H39, TcUBP1, TcUBP2, TcNRBD1, TcDRBD3, TcALBA3 e TcALBA4. Porém, TcRBP9 em parasitas sob estresse nutricional associa-se a proteínas de ligação ao RNA e proteínas envolvidas na regulação da tradução, tais como fatores de início da tradução (eIF4E5, eIF4G5, eIF4G1 e IF4G4). Em grânulos de estresse induzidos por estresse oxidativo, foi identificado a proteína PABP1 e a subunidade ribossômica 40S nos mRNAs associados a TcRBP9. Ainda, resultados de RNAseq mostraram que TcRBP9 está associada ao seu próprio transcrito, bem como aos mRNAs que codificam RBPs (RBP5, RBP6 e RBP10) e a proteínas envolvidas em processos metabólicos (Wippel et al., 2018).

Em *T. brucei*, o silenciamento de TbPTB1 (DRBD3) e TbPTB2 (DRBD4) por RNAi indicou que estas proteínas regulam um conjunto diferente de mRNAs, tanto estabilizando-os quanto desestabilizando-os. Ambas as proteínas são essenciais para o *trans-splicing* de genes contendo tratos de polipirimidina ricos em citosina (Stern et al., 2009). TbUBP2 e TbUBP1 estão envolvidos na estabilização dos mRNAs de CFB1 e CFB2 e de uma família de genes de proteína transmembrana (Hartmann et al., 2007; Hartmann e Clayton, 2008).

A superexpressão de TbRBP6 em uma cultura de parasitas procíclicos não infectivos resultou no aparecimento de epimastigotas, formas presentes no vetor, e de metacíclicos, formas infecciosas no mamífero (Kolev et al., 2012), enquanto a superexpressão de TbRBP10 bloqueou a diferenciação *in vitro* das formas sanguíneas para as formas procíclicas (Wurst et al., 2012) e

converteu as formas procíclicas em sanguíneas (Mugo et al., 2017). A expressão ectópica de TbRBP6 contendo uma mutação pontual (Q109K) gerou pasasitas metacíclicos sem passar pelo estágio intermediário epimastigota e permitiu maior diferenciação *in vitro* para as formas sanguíneas, as quais expressaram a glicoproteína de superfície VSG-2 (Shi et al., 2018).

TbRBP10 liga-se aos seus mRNAs alvos, que incluem a prociclina EP2, enzimas do metabolismo energético, proteínas quinases e proteínas de ligação ao RNA estágio-específicas, degradando-os (Mugo e Clayton, 2017).

A superexpressão de TbRBP7 em células pleomórficas na forma sanguínea promoveu a parada prematura do ciclo celular e aumentou a capacidade de diferenciação para formas procíclicas (Mony et al., 2014).

TbRBP33 é uma proteína nuclear e seu silenciamento por RNAi resultou no aumento de RNAs derivados de regiões normalmente silenciadas, como regiões de troca de fita, retroposons e seqüências repetitivas, mostrando-se envolvida na regulação do silenciamento gênico (Fernández-Moya et al., 2014).

Em *L. braziliensis*, a proteína LbRBP42 é distribuída no citoplasma de formas promastigotas cultivados a 26°C e concentrada ao redor do núcleo quando submetida a choque térmico, associando-se *in vitro* a um elemento rico em adenina e uracila (AU) presente na região 3'UTR do mRNA da proteína de choque térmico HSP70-II (Nocua et al., 2017).

1.4.2 Proteínas com motivo PUF

As proteínas da família PUF, cuja sigla origina-se das proteínas **P**Umilio de *Drosophila* e **Fem-3-binding factor** (FBF) de *Caenorhabditis elegans*, os primeiros homólogos estudados, possuem oito cópias em série de um motivo contendo cerca de 36 aminoácidos e tipicamente apresentam seqüências repetidas nas regiões amino e carboxi terminais (Macdonald, 1992; Zamore et al., 1997; Zhang et al., 1997).

O núcleo do domínio PUF consiste em oito repetições helicoidais em série, sendo cada repetição composta por três α -hélices (H1, H2 e H3), que interage com a seqüência de RNA reconhecida pela proteína usualmente contendo o trinucleotídeo UGU (Edwards et al., 2001; Wang et al., 2001).

O genoma de *T. cruzi* e *T. brucei* codificam dez proteínas com domínio PUF (Caro et al., 2006). Estas mesmas proteínas estão presentes no genoma de *L. major*, *L. infantum* e *L. brasiliensis*; porém, PUF9 está ausente em *L. brasiliensis* e possui duas isoformas em *L. major* e *L. infantum*. Ainda, as proteínas com motivo PUF mostraram-se alvos de resposta humoral na

infecção por *L. infantum*, representando alvos para sorodiagnóstico e reagentes vacinais (Folgueira et al., 2010).

Entre as proteínas desta família está TbFUP1 em *T. brucei*, que interage com a proteína reguladora ESAG8, controlando a estabilidade de seus mRNAs e cuja superexpressão afeta a virulência do parasita, impedindo-o de infectar a célula hospedeira (Hoek et al., 2002). Ainda, TbPUF1 associa-se preferencialmente aos mRNAs de retrotransposons e não está associado aos polissomos (Luu et al., 2006).

Em *T. brucei*, TbPUF9 estabiliza seus transcritos alvos na fase S, logo após a replicação do DNA, e sua função está relacionada a replicação celular. Ainda, o silenciamento de TbPUF9 por RNAi resultou em células com flagelos, núcleos ou cinetoplastos extras (Archer et al., 2009). TbPUF7 interage com a ciclofilina nuclear 1 (NCP1) e possui um papel na maturação do rRNA nas formas procíclicas (Droll et al., 2010). TbPUF7 e TbPUF10 interagem com NRG1 (*Nucleolar Regulator of GPEET 1*) e estão envolvidas na regulação do mRNA que codifica a proteína de superfície de prociclina GPEET (Schumann Burkard et al., 2013).

Em *T. cruzi*, a superexpressão de TcPUF6 resultou na regulação negativa dos mRNAs associados a esta proteína. Em formas epimastigotas TcPUF6 interage e colocaliza-se com a helicase TcDHH1, sugerindo que os mRNAs alvos associados a este complexo ribonucleoproteico sejam degradados. Ainda, foi demonstrado que os transcritos associados a TcPUF6 são regulados positivamente em tripomastigota metacíclicos, forma na qual a helicase TcDHH1 não colocaliza com TcPUF6, demonstrando que TcPUF6 regula a meia vida de seus transcritos alvos de forma diferencial ao longo do ciclo de vida do parasita (Dallagiovanna et al., 2005; Dallagiovanna et al., 2008).

1.4.3 Proteínas com motivo ALBA

As proteínas da família Alba (*Acetylation Lowers Binding Affinity*) consistem de moléculas que se ligam ao DNA e ao RNA e são amplamente distribuídas tanto em arqueobactérias quanto em eucariotos. Seu acrônimo refere-se a acetilação da lisina (Lys) 16 e sua desacetilação pela SIR2, embora este resíduo não seja conservado nas proteínas com domínio Alba em tripanossomatídeos (Bell, 2002; Mani et al., 2011).

O domínio Alba é pequeno, altamente básico e estruturalmente engloba quatro folhas β e duas α -hélices, com topologia $\beta\alpha\beta\alpha\beta\beta$, apresentando semelhança estrutural significativa com as frações N-terminal do domínio da DNase I e carboxi-terminal do fator 3 de iniciação da tradução bacteriana (IF3-C) (Aravind et al., 2003; Goyal et al., 2016).

O genoma de *T. brucei* codifica quatro proteínas com domínio Alba (TbAlba1, TbAlba2, TbAlba3 e TbAlba4), as quais são constitutivamente expressas na forma sanguínea e nos estágios iniciais e finais da forma procíclica.

TbAlba3 interage com eIF4E4; TbAlba2 e TbAlba3 são fosforiladas e associam-se com polissomos, enquanto TbAlba1 e TbAlba2 reconhecem elementos reguladores presentes no mRNA da prociclina GPEET (Nett et al., 2009; Mani et al., 2011). As proteínas TbAlba3 e TbAlba4 em parasitas submetidos a estresse nutricional localizam-se em grânulos citoplasmáticos e apresentam colocalização com a proteína DHH1 e colocalização parcial com a RNA Poli (A+). A depleção de TbAlba3 por RNAi em células procíclicas implicou em um fenótipo alongado denominado “*nozzle*”, resultado da polimerização ativa de microtúbulos na extremidade posterior e a migração do núcleo para a fração posterior da célula, enquanto a superexpressão desta proteína acarretou em diâmetro celular reduzido e impediu ou desacelerou a migração do núcleo para a extremidade posterior, reduzindo a infecção do parasita nas glândulas salivares da mosca tsé-tsé. Estas quatro proteínas interagem entre si e TbAlba3 aparenta ser o cerne deste complexo, sendo a função destas proteínas implicadas no processo de diferenciação celular (Mani et al., 2011; Subota et al., 2011).

Em *T. cruzi*, cujo genoma codifica quatro proteínas com domínio Alba (TcAlba1, TcAlba2, TcAlba30, TcAlba40), TcAlba30 está presente em níveis semelhantes em todos os estágios de desenvolvimento do parasita, interage com elementos regulatórios presentes na região 3' dos mRNAs de beta-amastina e promoveu uma regulação negativa dos mRNAs de beta-amastina em epimastigotas quando superexpressa, sendo que a atuação de TcALBA30 pode dar-se tanto pela desestabilização dos mRNAs de beta-amastina em epimastigotas quanto por modificações pós-traducionais, tais como acetilação, a fim de regular a expressão diferencial de beta-amastina (Pérez-Díaz et al., 2017).

O genoma de *Leshmania* codifica duas proteínas com domínio Alba (Alba1 e Alba3), as quais são conservadas em todas as espécies deste parasita (Da Costa et al., 2017).

Em *L. infantum*, LiAlba1 e LiAlba3 colocalizam-se predominantemente no citoplasma na forma promastigota, translocam-se para o nucléolo e o flagelo durante a diferenciação de promastigota em amastigota e retornam ao citoplasma quando esta diferenciação é completa. Além disso, parasitas submetidos a choque térmico, um dos principais sinais da diferenciação em amastigotas, desencadeia a relocação de LiAlba1 e LiAlba3 para o nucléolo e o flagelo. LiAlba1 e LiAlba3 interagem com várias proteínas na fração flagelar, entre elas, proteínas envolvidas no metabolismo e função mitocondrial, metabolismo e tradução de RNA, dobramento e degradação de proteínas (Dupé et al., 2015). O *knockout* duplo de LiAlba20 (renomeado para

LiAlba3) em *L. infantum* resultou na desestabilização dos mRNAs de amastinas, principalmente na forma amastigota. Mostrou-se que LiAlba13 (renomeado para LiAlba1) e LiAlba20 (LiAlba3) interagem com os mRNAs de delta-amastina, porém LiAlba13 não afetou a estabilidade destes mRNAs (Dupé et al., 2014).

Em *L. amazonensis*, LaAlba3 tem sua expressão diminuída significativamente durante o cultivo de promastigotas *in vitro* por longos períodos e esta baixa expressão correlaciona-se a uma perda de infectividade em camundongos (Magalhães et al., 2014). Ainda, estudos proteômicos indicaram que a Alba3 é superexpressa em *L. braziliensis* e *L. infantum* cultivados na presença de gentamicina e antimônio (Daneshvar et al., 2012; Matrangolo et al., 2013).

1.4.4 Proteínas com motivo *Zinc Finger*

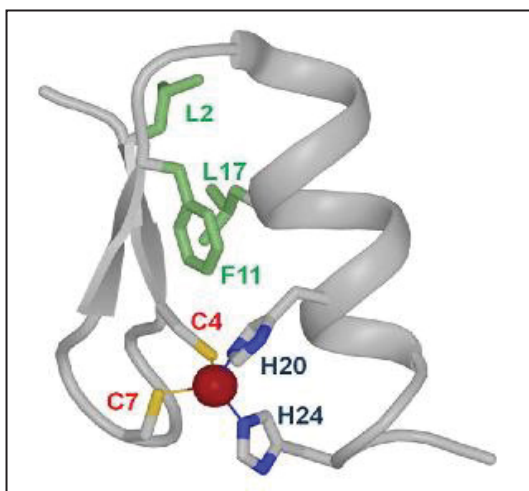
O motivo *Zinc Finger* constitui-se de pequenas e compactas subunidades proteicas contendo cadeias peptídicas estruturadas que se dobram em torno de um íon zinco quelado, o qual permite sua interação com proteínas, lipídeos, DNA e RNA (Laity et al., 2001; Isalan, 2013).

Este motivo compreende mais de 20 classes estruturalmente distintas, com diversas arquiteturas, modos de ligação a metal, funções e reatividade (Krishna, 2003).

Sua estrutura é formada pela coordenação de um íon zinco a resíduos de cisteína e histidina, embora outros aminoácidos tenham sido encontrados, tais como ácido aspártico e glutâmico. Assim, forma-se uma estrutura estável, cuja estabilidade depende de muitos fatores, incluindo ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas (Maynard e Covell, 2001; Lee e Lim, 2011; Quintal et al., 2011).

O motivo clássico e mais comum, denominado C2H2 ou CCHH, possui a sequência consenso (F/Y)-X-C-X₂₋₅-C-X₃-(F/Y)-X₅-Ψ-X₂-H-X₃₋₄-H, onde X corresponde a qualquer aminoácido e Ψ a qualquer resíduo hidrofóbico, possuindo duas folhas β antiparalelas e uma α-hélice (topologia ββα), conforme observado pela Figura 5 (Wolfe et al., 2000).

FIGURA 5 - MOTIVO ZINC FINGER C2H2



NOTA: Estrutura do motivo C2H2, representada pelo fator de transcrição TFIIIA de *Xenopus laevis*, primeira proteína com o domínio *Zinc Finger* identificada. A cor verde denota resíduos responsáveis pela formação do núcleo hidrofóbico na maioria das *Zinc Fingers* C2H2 (L17, F11 e L2). Amarelo e azul indicam a coordenação dos resíduos de cisteína e histidina ao íon zinco (esfera central).
FONTE: Kluska et al. (2018).

Diversas proteínas com domínio *Zinc Finger* foram descritas em tripanossomatídeos, dentre elas, os motivos CCHH, CCHC e CCCH estão entre os mais estudados.

Em *T. cruzi*, a proteína TcC2-L1Tc contém dois motivos C2H2 e possui atividade chaperona em ácidos nucleicos (Heras et al., 2005).

Em *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. major*, as proteínas ortólogas MP81, MP63 e MP42 possuem dois motivos C2H2 e compõem o editossoma, complexo responsável pela edição de mRNAs mitocondrial (Worthey et al., 2003).

Em *L. major*, a proteína LmHEXBP (*hexamer-binding protein*) apresenta nove motivos C-X₂-C-X₄-H-X₄-C e embora associe-se a oligodesoxinucleotídeos derivados da região 5'UTR do gene GP63 *in vitro*, esta proteína mostrou-se não essencial para a expressão eficiente de GP63 em promastigotas. Ainda, o *knockout* nulo de LmHEXBP permitiu a formação de lesão em camundongos infectados por promastigotas (Webb e McMaster, 1993; Webb e McMaster, 1994).

Em *T. cruzi*, a proteína PZFP1 de 191 aminoácidos possui sete motivos C-X₂-C-X₄-H-X₄-C e localiza-se principalmente no citoplasma e núcleo. Esta interage especificamente com uma proteína rica em serina-arginina (TcSR), o que sugere seu papel no processamento de pré-

mRNA (Espinosa et al., 2003). TcZFP8, uma proteína nuclear, possui oito motivos C-X₂-C-X₄-H-X₄-C e provavelmente está envolvida na expressão gênica (Ericsson et al., 2006).

Em *T. brucei*, a proteína TbCPSF30 contendo sete motivos *Zinc Finger*, sendo dois motivos C-X₂-C-X₄-H-X₄-C, um motivo C-X₈-C-X₄-C-X₃-H e quatro motivos C-X₇-C-X₄-C-X₃-H é essencial as formas procíclicas e sanguíneas. A depleção de TbCPSF30 por RNAi resultou em morte celular devido ao processamento aberrante de RNAs policistrônicos de α/β -tubulina, demonstrando-se essencial ao processo de *trans-splicing* e poliadenilação (Hendriks et al., 2003).

Um estudo no qual foi gerado um ORFeoma em pequena escala de *T. brucei* e identificados os principais reguladores da expressão gênica para este parasita na forma sanguínea, foi demonstrado que as proteínas com motivo CCCH, TbZC3H6, TbZC3H11, TbZC3H12, TbZC3H18, TbZC3H34, TbZC3H37, TbZC3H38, TbZC3H44 e TbZC3H45 regulam positivamente seus mRNAs alvo, enquanto TbZC3H5, TbZC3H8, TbZC3H13, TbZC3H14, TbZC3H22, TbZC3H30, TbZC3H39, TbZC3H40, TbZC3H46 e TbZC3H48 agem como repressores. Ainda, foi demonstrado que ZC3H5 e ZC3H15 interagem com o complexo de deadenilação CAF1/NOT1 (Lueong et al., 2016).

As proteínas com motivo CCCH tem sido alvo de muitos estudos principalmente em *T. brucei*, isto porque os tripanossomatídeos detêm um maior número destas proteínas em relação a outros eucariotos, além da maior parte destas proteínas serem exclusivas destes protistas (Kramer et al., 2010a).

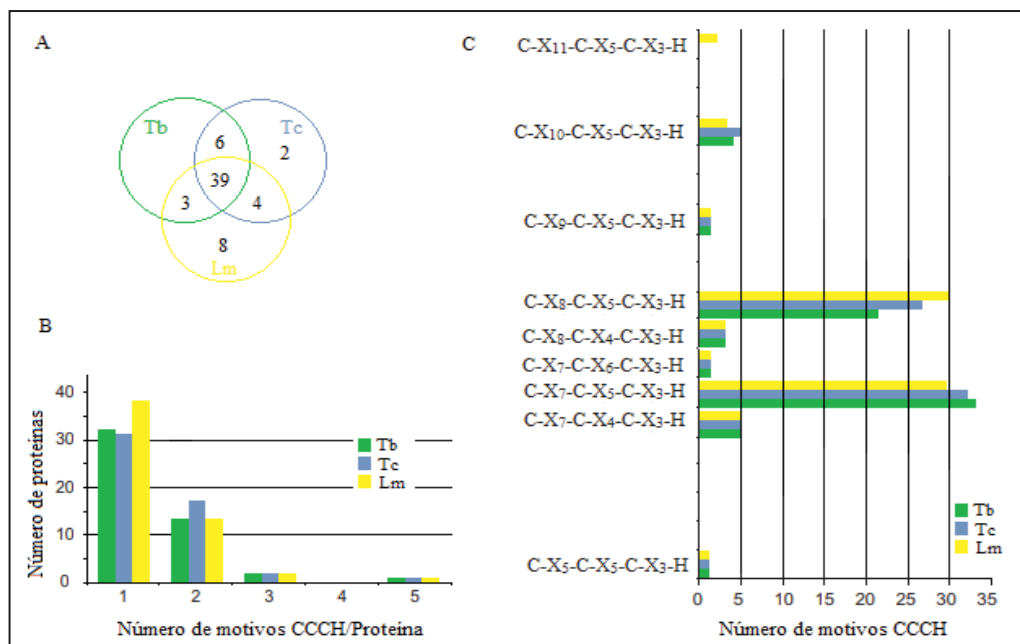
Estas proteínas, definidas como C-X₄₋₁₅-C-X₄₋₆-C-X₃-H, estão envolvidas em vários aspectos do metabolismo de RNA (Kramer et al., 2010a).

1.4.4.1 Proteínas *Zinc Finger* CCCH

Uma análise *in silico* do genoma de *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. major* revelou que há 48, 51 e 54 genes que codificam proteínas com motivo CCCH, respectivamente, nestes organismos. Destas proteínas, os motivos comumente encontrados são C-X₇-C-X₅-C-X₃-H e C-X₈-C-X₅-C-X₃-H, denominados motivos convencionais, sendo que aproximadamente 20% se constituem de motivos não convencionais, onde C-X₁₀-C-X₅-C-X₃-H é o mais abundante. Ainda, cerca de um terço das proteínas CCCH apresentam outros domínios, os quais incluem um domínio citidina-desaminase, um domínio helicase, um domínio DNAJ, um domínio exonuclease, um domínio HECT, outros domínios *Zinc Finger* e um domínio U-box (Kramer et al., 2010a).

A Figura 6 apresenta uma estatística do número de proteínas presente em cada tripanossomatídeo e do número de motivos por proteínas e por classes.

FIGURA 6 - PROTEÍNAS CCCH EM TRIPANOSSOMATÍDEOS



NOTA: Proteínas CCCH em tripanossomatídeos, onde Tb corresponde a *T. brucei*, Tc corresponde a *T. cruzi* e Lm corresponde a *L. major*. A) Número de proteínas CCCH presentes em *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major* ou no respectivo subconjunto. (B) Número de proteínas com 1, 2, 3 ou 5 motivos CCCH. C) Número de motivos CCCH por classe.

FONTE: Adaptado de Kramer et al. (2010a).

A maioria destas proteínas são exclusivas de tripanossomatídeos, embora existam ortólogos em outros organismos, como o fator de *splicing* U2AF35 (Vázquez et al., 2003), o fator de especificidade de clivagem e poliadenilação CPSF30 (Hendriks et al., 2003) e a proteína do complexo de poliadenilação FIP1 (Fator de interação com PAP) (Bercovich et al., 2009).

Estas proteínas não compartilham semelhanças com proteínas de eucariotos e algumas detêm similaridades que são restritas ao domínio conservado, sendo exceções o fator de exportação nuclear Mex67 ortólogo de *S. cerevisiae* e uma 3' exoribonuclease específica de *Leishmania*, similar a 3' exoribonuclease de outros eucariotos. Estas duas proteínas possuem um motivo CCCH em tripanossomatídeos, estando ausente este domínio nas ortólogas de eucariotos (Kramer et al., 2010a).

Hendriks et al. (2001) identificaram as primeiras proteínas com motivo CCCH nestes protistas, TbZFP1 e TbZFP2 em *T. brucei*. A primeira, uma pequena proteína de 101 aminoácidos e um motivo C-X₈-C-X₅-C-X₃-H, a segunda, uma proteína de 134 aminoácidos,

um motivo C-X₈-C-X₅-C-X₃-H e um domínio WW. TbZFP1 é expressa em baixos níveis na forma sanguínea, transientemente enriquecida durante a diferenciação para as formas procíclicas e mantém seus níveis na forma procíclica. TbZFP2 inibiu o processo de diferenciação para as formas procíclicas quando silenciado por RNAi e sua expressão ectópica resultou na reestruturação morfológica e reposicionamento do cinetoplasto, acarretando um fenótipo alongado denominado ‘*nozzle*’, o qual envolve a extensão polarizada de microtúbulos na extremidade posterior da célula (Hendriks et al., 2001).

Um trabalho posterior revelou que a expressão ectópica de TbZFP1 em parasitas procíclicos, forma celular na qual a proteína é normalmente expressa, não apresenta fenótipo alterado em relação ao parasita selvagem. Entretanto, em células na forma sanguínea, tanto a proteína endógena quanto a superexpressa não foram detectáveis, indicando que os níveis de TbZFP1 são estritamente regulados durante o ciclo de vida. Ainda, mutantes nulos de TbZFP1 comprometeram o reposicionamento do cinetoplasto sem necessariamente impedir o processo de diferenciação, embora os parasitas que segregaram seu genoma mitocondrial apresentaram defeitos no ciclo celular. Deste modo, enquanto TbZFP2 está relacionada ao controle de eventos iniciais na diferenciação, TbZFP1 aparentemente age tardiamente no processo de diferenciação, permitindo ao parasita completar a troca estágio-específica de antígenos (prociclinas) na superfície celular (Hendriks e Matthews, 2005).

Uma terceira proteína da família C-X₈-C-X₅-C-X₃-H foi caracterizada em *T. brucei*, TbZFP3, a qual interage com TbZFP1 e TbZFP2 *in vivo*. TbZFP3 possui três motivos RGG posicionados centralmente entre um motivo *Zinc Finger* CCCH e um domínio WW. Esta proteína, assim como TbZFP2, é expressa igualmente nas formas sanguínea e procíclica, exibindo uma expressão uniforme ao longo da diferenciação e sua expressão ectópica resultou no fenótipo observado para a superexpressão de TbZFP2. Visto que TbZFP3 é enriquecida nas frações polissomais na forma procíclica e ausente nas formas sanguíneas, esta foi associada a regulação estágio-específica da tradução (Paterou et al., 2006). TbZFP3 associa-se a região 3'UTR dos mRNAs que codificam as prociclinas GPEET e EP1, porém não interage com as prociclinas EP2 e EP3. A superexpressão desta proteína não alterou os níveis de mRNAs de prociclina, contudo houve um aumento nos níveis de EP1 e uma diminuição de GPEET, enquanto o silenciamento por RNAi resultou na diminuição dos mRNAs de todas as isoformas da prociclina (Walrad et al., 2009).

Uma análise global dos transcritos associados a TbZFP3 demonstrou que esta proteína associa-se a um subconjunto de mRNAs enriquecidos na forma sanguínea (formas *stumpy*), os quais são modulados pelos níveis de TbZFP3 e esta regulação é mediada por sequências nas

regiões 3'UTRs dos mRNA alvos, fornecendo evidência para um mecanismo de “*regulon*” pós-transcricional (Walrad et al., 2012).

Em *T. brucei*, a proteína TbZC3H18 de 41 kDa possui dois domínios CCCH e não é essencial nas formas sanguíneas, porém o silenciamento de TbZC3H18 por RNAi resultou no atraso da diferenciação das formas sanguíneas para as formas procíclicas (Benz et al., 2011). A proteína TbZC3H20 de 43 kDa contém dois motivos C-X₇-C-X₅-C-X₃-H e é enriquecida na forma procíclica. Em parasitas na forma procíclica, TbZC3H20 é necessária para o crescimento e estabiliza os mRNAs que codificam a proteína transportadora mitocondrial MCP12 e a trans-sialidase TS-like E (Ling et al., 2011). TbZC3H12 e TbZC3H13 são proteínas com identidade de 50% nos primeiros 49 resíduos de aminoácidos, são citoplasmáticas, fosforiladas e possuem uma sequência imediatamente anterior ao motivo C-X₈-C-X₅-C-X₃-H que se assemelha ao consenso (RYTKEL) da proteína Tis11, sendo KYRTTL para TbZC3H12 e KYKTSL para TbZC3H13. TbZC3H12 não é necessária ao crescimento normal de parasitas na forma sanguínea e a superexpressão de TbZC3H13 inibe o crescimento de parasitas procíclicos (Ouna et al., 2012).

A proteína TbZC3H11 de 39,6 kDa possui um motivo C-X₈-C-X₅-C-X₃-H, o qual é precedido pela sequência consenso RYKTKL da proteína Tis11. TbZC3H11 atua na regulação pós transcricional de mRNAs que codificam chaperonas, ligando-se especificamente aos elementos ricos em adenina e uracila (AU) presentes nas regiões 3'UTR destes mRNAs, os quais são indispensáveis para a resposta ao estresse. A fração N-terminal desta proteína associa-se as repetições UAU nas regiões 3'UTRs dos mRNAs alvos enquanto o domínio C-terminal possui atividade estabilizadora. TbZC3H11 é essencial para as formas sanguíneas do parasita e necessária para a recuperação das formas procíclicas após um choque térmico. Nas formas procíclicas, a depleção de TbZC3H11 por RNAi impediu a síntese das chaperonas TbHSP70 e TbHSP83, além de desestabilizar diversos mRNAs após o choque térmico, prejudicando gravemente a capacidade de recuperação destes parasitas (Droll et al., 2013). A estabilização dos transcritos alvos de TbZC3H11 durante o choque térmico dá-se através da interação com TbMKT1, TbPBP1 e outras proteínas regulatórias. Assim, propôs-se um mecanismo que consiste na interação da fração N-terminal de TbZC3H11 com as proteínas TbMKT1 e TbPBP1, que recrutarão TbLSM12, PABP1 ou PABP2. Assim, PABP1/2 irá se ligar a cauda poli (A) do mRNA e ao fator de início de tradução eIF4G, estabilizando os mRNAs alvos (Singh et al., 2014). Em condições normais de cultivo, a proteína TbZC3H11 é muito instável e pouco de seu mRNA é traduzido, porém, após a célula ser submetida a estresse, este mRNA move-se para a fração pesada dos polissomos e é traduzido, além de sua estabilidade ser aumentada. Constatou-

se que a região 3'UTR deste mRNA é suficiente para a supressão da tradução, indicando que um fator em *trans* é liberado desta região após o estresse. Evidenciou-se que a isoforma 2 da proteína caseína quinase 1 pode fosforilar TbZC3H11 e que esta fosforilação pode promover sua degradação. Deste modo, o aumento do nível de TbZC3H11 após estresse ocorre devido a alterações na síntese de proteínas, fosforilação e estabilidade (Minia e Clayton, 2016).

TbZC3H32 é uma proteína citosólica de 72 kDa com três motivos *Zinc Finger*, sendo eles, C-X₇-C-X₅-C-X₃-H, C-X₉-C-X₅-C-X₃-H e C-X₇-C-X₄-C-X₄-H. Esta proteína é mais abundante na forma sanguínea do que nas formas procíclicas e seu silenciamento por RNAi inibiu o crescimento da forma sanguínea. Ensaios de *tethering* de TbZC3H32 a um mRNA repórter suprimiu sua tradução e resultou na degradação dos mRNAs, atividade dependente das frações amino e carboxi-terminais e independente do domínio central *Zinc Finger*. Deste modo, TbZC3H32 desempenha uma função no metabolismo basal de mRNAs na forma sanguínea (Klein et al., 2017).

A proteína TbZC3H30 de 60 kDa possui em sua fração amino terminal os motivos C-X₇-C-X₄-C-X₃-H e C-X₇-C-X₅-C-X₃-H, sendo não essencial para o crescimento e proliferação de parasitas nas formas sanguínea e procíclica sob condições normais de cultivo. Porém, formas sanguíneas duplo *knockout* para TbZC3H30 apresentaram deficiência na capacidade de recuperação após choque térmico ou tratamento com DTT. Da mesma forma, parasitas nas formas procíclicas *knockout* para TbZC3H30 mostraram-se mais suscetíveis a arsenito, calor, etanol e estresse nutricional. O transcriptoma das formas procíclicas no qual TbZC3H30 foi depletado mostrou-se semelhante as células em que TbZC3H30 foi complementado, assim, esta proteína deve atuar na tradução ou localização de mRNAs em vez de influenciar a abundância destes. Deste modo, sugeriu-se que TbZC3H30 está envolvido na proteção do mRNA após estresse (Chakraborty e Clayton, 2018)

Em *T. cruzi*, a proteína TcZFP1, ortóloga a TbZFP1, associa-se *in vitro* a ribopolímeros ricos em citosina (C) e é diferencialmente expressa durante a metaciclogênese, podendo estar envolvida na modulação estágio-específica de vias de decaimento de mRNAs e acessibilidade de transcritos à maquinaria de tradução, mecanismos envolvidos na diferenciação das formas infectivas do parasita (Mörking et al., 2004).

TcZFP2, proteína citoplasmática de 20 kDa ortóloga a TbZFP2, exibe expressão reduzida na forma tripomastigota metacíclica e associa-se *in vitro* a ribopolímeros ricos em adenina (A). A maioria dos mRNAs associados a esta proteína são regulados positivamente em tripomastigotas metacíclicos, os quais codificam principalmente proteínas hipotéticas, proteínas nucleares mitocondriais, proteínas motoras e proteínas envolvidas no transporte de

RNA. TcZFP2 mostrou-se, inclusive, associado a seu próprio transcrito, desempenhando um papel no processo de diferenciação a tripomastigotas metacíclicos (Mörking et al., 2012).

Em *T. cruzi* na forma epimastigota, TcZC3H39 encontra-se disperso no citoplasma e associa-se a diversas proteínas ribossomais (proteínas S23, S29 e S30 da subunidade 40S) e a proteína eucariótica de alongamento e fator de liberação de peptídeo 1. Em células epimastigotas submetidas a estresse nutricional, a proteína apresenta-se na forma de grânulos e parcialmente colocaliza-se com TcDHH1, ligando-se a transcritos que codificam proteínas associadas a mitocôndrias, como subunidades do complexo citocromo C oxidase (COX) e proteínas ribossomais. Deste modo, TcZC3H39 parece atuar como *operons* pós-transcricionais, visto que associa mRNAs que codificam proteínas relacionadas a vias similares, estando envolvida nas respostas do estresse parasitário e na regulação da expressão gênica durante o processo de diferenciação (Alves et al., 2014).

Dentre as treze proteínas identificadas em *T. cruzi* que compreendem o motivo C-X₈-C-X₅-C-X₃-H, TcZC3H31 é a única que possui três motivos C-X₈-C-X₅-C-X₃-H. O *knockout* duplo desta proteína impossibilitou a diferenciação tanto *in vitro* quanto *in vivo* das formas epimastigotas para tripomastigotas metacíclicas, sendo que as formas epimastigotas recuperadas das excretas dos triatomíneos infectados apresentaram morfologia atípica, sugerindo que o processo de diferenciação foi detido em um ponto intermediário entre as formas replicativas e infectantes. Ainda, a superexpressão de TcZC3H31 implicou em uma diferenciação mais eficiente para tripomastigotas metacíclicos, indicando que TcZC3H31 atua como um regulador positivo da metaciclogênese (Alcantara et al., 2018).

1.5 PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO RNA E GENÉTICA REVERSA

O estudo das proteínas de ligação ao RNA e suas funções na regulação da expressão gênica deu-se apenas após o desenvolvimento da metodologia de transfecção de DNA. Anteriormente, a função dos genes dos tripanossomatídeos eram inferidas a partir da homologia com genes de outros organismos ou expressos em sistemas heterólogos. Deste modo, esta metodologia permitiu analisar a função dos genes nos próprios organismos, criar *knockout* nulos, complementar mutantes, superexpressar proteínas e alterar funções essenciais nestes parasitas (Clayton, 1999).

Diversas proteínas de ligação ao RNA foram caracterizadas em tripanossomatídeos, principalmente em *T. brucei*, cujo avanço na elucidação destas proteínas deu-se sobretudo pela

utilização da maquinaria de RNA de interferência associado ao sistema de expressão induzido, maquinaria ausente em *T. cruzi* (Darocha et al., 2004a)

Para que ocorra a expressão de um gene em tripanossomatídeos, este precisa ser flanqueado por regiões intergênicas que garantam o *trans-splicing* e a poliadenilação adequados dos mRNAs transcritos, deste modo, os vetores de expressão utilizados nestes parasitas apresentam sinais para adição do *splice leader* a montante da região codante e sinais para poliadenilação inseridos a jusante da mesma (De Assis Burle-Caldas et al., 2015).

Os experimentos iniciais de transfecção foram em grande parte empíricos, realizados sem as informações sobre as sequências necessárias para a expressão gênica nestes organismos (Laban e Wirth, 1989). Porém, após os ensaios inaugurais de transfecção, muitos dos elementos envolvidos no processo de expressão gênica foram identificados, possibilitando o desenvolvimento de vetores com melhores níveis de expressão (Cross et al., 1990; Lu e Buck, 1991), podendo-se destacar em *T. cruzi* os vetores pTEX (Kelly et al., 1992), pRIBOTEX (Martínez-Calvillo et al., 1997), pTREX (Vazquez e Levin, 1999) e pROCK (DaRocha et al., 2004b).

Foram analisados os efeitos das regiões não traduzidas e das regiões intergênicas de genes estágio-específico e constitutivos a fim de identificar a influência dessas sequências não-codificantes na expressão dos vetores, destacando-se as regiões do gene Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (Kelly et al., 1992; Kelly et al., 1994), actina e aldolase (Wirtz et al., 1994; Wirtz et al., 1999), ubiquitina (Wen et al., 2001) e α -tubulina (Bellofatto e Cross, 1989).

Além disso, a expressão gênica foi intensificada com o emprego de promotores, a exemplo dos promotores ribossomais (rRNA) (Dietrich et al., 1993; Tyler-Cross et al., 1995; Figueroa-Angulo et al., 2006) e do gene que codifica a proteína *procyclic acidic repetitive protein* (PARP) em *T. brucei* (Brown et al., 1992; Janz e Clayton, 1994; Biebinger et al., 1997).

A inserção de etiquetas ao produto expresso por estes vetores possibilitou a localização celular de proteínas, contornando a necessidade de gerar anticorpos específicos contra a proteína alvo (Tibbetts et al., 1995). Ainda, etiquetas que expressam fluoróforos permitiram a identificação e localização de proteínas sem a necessidade de substratos exógenos para geração de cores (Wilkinson et al., 2002; Macêdo et al., 2006).

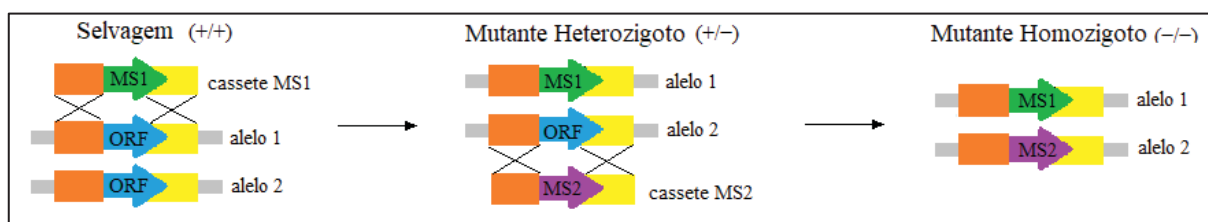
Foram construídos vetores contendo cassetes de expressão flanqueado por sequências que permitem sua integração por recombinação homóloga no genoma do parasita (DaRocha et al., 2004b) e vetores flexíveis baseado na tecnologia *Gateway*[®] que permitem a substituição de vários elementos, tais como promotores, etiquetas de fusão, regiões intergênicas ou marcadores

de resistência, viabilizando a localização, purificação e expressão proteica em larga escala (Batista et al., 2010; Kugeratski et al., 2015).

Os diversos vetores desenvolvidos para tripanossomatídeos e a integração de material genético por recombinação homóloga permitiu a geração de linhagens de parasitas com alterações em seu genoma, tais como deleção de genes e inserção de etiquetas de fusão. Deste modo, através da transfecção sequencial de cassetes contendo diferentes marcadores de resistência a antibiótico flanqueados por sequências do alelo alvo foi possível o *knockout* de genes não essenciais (Clayton, 1999) (Figura 7).

Ainda, sinais de *splice* e poliadenilação derivados de genes constitutivos foram inseridos nos vetores de *knockout* de modo a flanquear o gene de resistência a fim de melhorar sua expressão. Entretanto, a deleção de genes multicópias é inviável devido à escassez de marcadores de seleção, além do tempo dispendido (Xu et al., 2009).

FIGURA 7- *KNOCKOUT* CONVENCIONAL POR CASSETES DE RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA

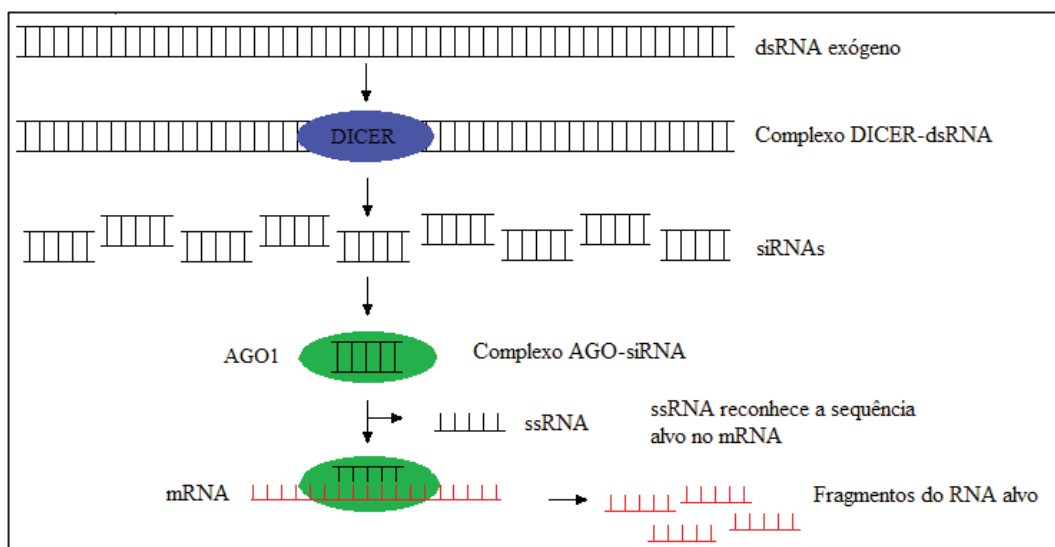


NOTA: Representação de um *knockout* gênico (gene de cópia única) convencional. Pelo fato do genoma dos tripanossomatídeos ser diploide são necessárias duas transfecções independentes de cassetes contendo marcadores de seleção (MS1 e MS2) distintos flanqueados por regiões de recombinação homólogas, as quais permitirão a troca gênica em cada alelo.

FONTE: Modificado de De Assis Burle-Caldas et al. (2015).

RNA de interferência (RNAi) é uma ferramenta que permitiu a redução da expressão (*Knockdowns*) de diversos genes, um mecanismo guiado por RNA de fita dupla (dsRNA) contendo sequências derivadas de um gene alvo, responsável pelo silenciamento gênico pós-transcricional que desencadeia a degradação de transcritos homólogos, bloqueando assim a tradução ou dificultando a transcrição de genes específicos (Ngo et al., 1998; Fire et al., 1998; Hammond et al., 2000) (Figura 8).

FIGURA 8 - MECANISMO DE AÇÃO DA MAQUINARIA DE RNAi



NOTA: O mecanismo de ação da maquinaria de RNAi em *T. brucei* tem início quando RNAs de fita dupla são clivados em pequenos RNAs de interferência (siRNAs) por uma ribonuclease (RNaseIII) denominada Dicer. Estes siRNAs associam-se a uma proteína contendo o domínio RNase-H que pertence à família Argonauta (AGO1), formando um complexo denominado RISC (*RNA-inducing silencing complex*). A fita dupla da cadeia de siRNA é posteriormente separada, resultando em RNAs de fita simples (ssRNA), os quais agem como fitas guias juntamente a proteína AGO1 e reconhecem seus alvos através de interações de pares de bases, acarretando a clivagem endonucleolítica e subsequente degradação do RNA alvo.

FONTE: Modificado de Balaña-Fouce e Reguera (2007).

Esta técnica é particularmente adequada para silenciar a expressão gênica onde os tradicionais *knockouts* gênicos são dispendiosos, como em múltiplas cópias do mesmo gene, ou para estudo de genes essenciais, onde a técnica convencional de *knockout* é impossível. Porém, como já mencionado, *T. cruzi* não possui a maquinaria de RNAi endógena (Darocho et al., 2004a), sendo a mesma encontrada em diversos tripanossomatídeos, incluindo *T. brucei*. (Ullu et al., 2002), *T. congolense* (Inoue et al., 2002) e *Leishmania braziliensis* (Lye et al., 2010; Atayde et al., 2012).

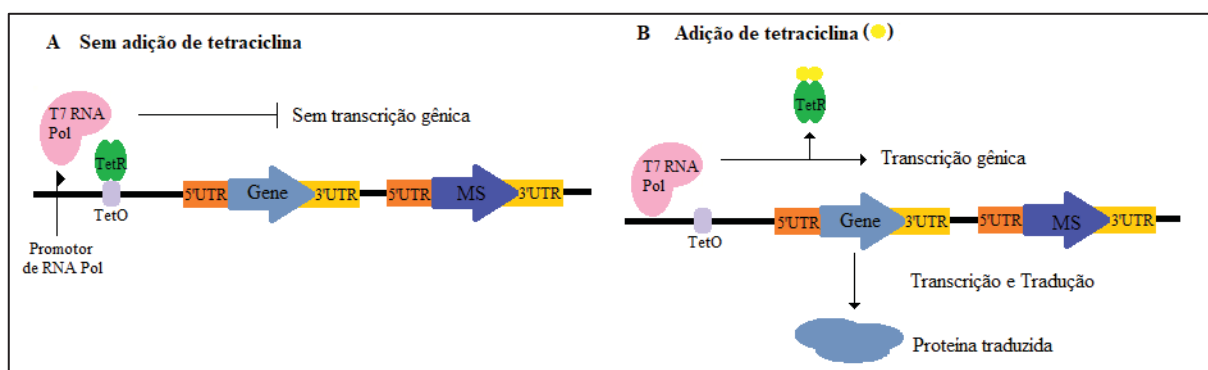
Para que haja uma expressão estável de dsRNAs é necessário que um vetor apropriado seja inserido no genoma do parasita. Além do mais, a integração de construções sob o controle do sistema de indução por tetraciclina permitiu controlar o nível de expressão do gene alvo apenas alterando as concentrações de tetraciclina adicionada ao meio (Sunter et al., 2012).

Desde o primeiro experimento de RNAi em tripanossomatídeos, onde o gene da α -tubulina foi silenciado em *T. brucei*, resultando em células multinucleadas e arredondadas (Ngo et al., 1998), inúmeros genes de tripanossomatídeos foram caracterizados funcionalmente (Bastin et al., 2000; Bakshi e Shapiro, 2004; Gourguechon et al., 2007; Shah et al., 2011; Banerjee e Rachubinski, 2017) e possíveis alvos de drogas antiparasitárias foram pesquisadas

(Valenciano et al., 2016; Jensen et al., 2016). Além do mais, foi criada a primeira biblioteca de RNAi (Morris et al., 2002) e desenvolvido um software (RNAit) que facilitou o desenho de construções de RNAi para tripanossomas (Redmond et al., 2003). Estes fatos permitiram o estudo da função de genes em larga escala, como o *screening* da função de 210 genes codificados pelo cromossomo 1 em *T. brucei* (Subramaniam et al., 2006) e a análise de 37 genes de *T. brucei* contendo o motivo de reconhecimento de RNA (RRM) (Wurst et al., 2009).

Com a finalidade de melhorar o controle da manipulação genética nestes parasitas foi desenvolvido um sistema de expressão controlado baseado na ligação do repressor de tetraciclina (TetR) a um operador de tetraciclina (tetO) de modo a impedir a transcrição na ausência de tetraciclina (Wirtz e Clayton, 1995; Wirtz et al., 1998), permitindo o estudo de proteínas tóxicas se constitutivamente expressas e possibilitando a geração de *knockout* condicional de genes essenciais (Taylor e Kelly, 2006) (Figura 9).

FIGURA 9 - SISTEMA DE EXPRESSÃO INDUZIDO POR TETRACICLINA



NOTA: O sistema de expressão controlado requer uma linhagem celular que coexpresse a T7 RNA polimerase (T7 RNA Pol) e o repressor de tetraciclina (TetR). A expressão do gene de interesse contendo as sequências 5' e 3' para o processamento de mRNA é dirigida por um promotor de T7 RNA Pol contendo três operadores de tetraciclina (TetO). TetR liga-se ao TetO e impede a transcrição gênica. A adição de tetraciclina exógena libera o repressor de tetraciclina e permite a transcrição do gene.

FONTE: Modificado de De Assis Burle-Caldas et al. (2015).

Linhagens celulares que expressam estávelmente a T7 RNA polimerase (T7 RNA Pol) e a proteína repressora de tetraciclina (TetR) foram desenvolvidas em *T. brucei* (Wirtz et al., 1999), em *T. cruzi* (Wen et al., 2001; Darocha et al., 2004a; Taylor e Kelly, 2006) e em *Leishmania* (Yao et al., 2007; Kraeva et al., 2014).

Embora este sistema tenha apresentado vazamento de expressão na ausência de tetraciclina (Piacenza et al., 2007; Laverrière et al., 2012), foi eficientemente utilizado para silenciamento gênico utilizando-se maquinaria de RNA de interferência em *T. brucei* (Wang

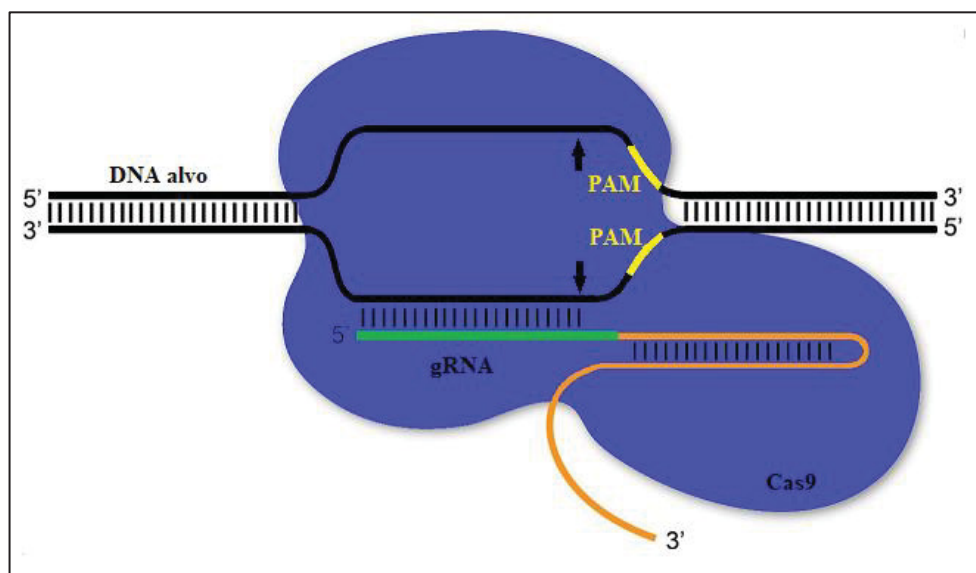
et al., 2000; Drozd et al., 2002; Yang et al., 2009), além da superexpressão de proteínas (Ulbert et al., 2002).

O sistema CRISPR/Cas9 tem se destacado na edição do genoma dos tripanossomatídeos devido à sua versatilidade, rapidez, especificidade e eficiência, bem como a capacidade de se obter múltiplas alterações por célula em um único organismo, possibilitando a modificação de membros de famílias multigênicas (Peng et al., 2015; Grzybek et al., 2018).

CRISPR, acrônimo para Grupos de Repetições Palindrômicas Curtas Regularmente Espaçadas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*), foi primeiramente observado em *Escherichia coli* e pertence ao sistema imune adaptativo de bactérias e arqueobactérias, atuando na proteção de material genético exógeno (Ishino et al., 1987; Koonin e Makarova, 2009; Van der Oost et al., 2009; Deveau et al., 2010).

O sistema CRISPR/Cas9 consiste na associação de um pequeno RNA não codante (RNA guia, gRNA) à endonuclease Cas9 (*CRISPR associated protein 9*), formando um complexo ribonucleoproteico que direciona a clivagem de uma dupla fita de DNA em uma posição precisa (Doudna e Charpentier, 2014) (Figura 10).

FIGURA 10 - SISTEMA CRISPR/Cas9



NOTA: O complexo ribonucleoproteico composto pela nuclease Cas9 (em azul) e o gRNA (em verde a sequência complementar ao DNA alvo e em laranja a sequência *scaffold*) reconhece a sequência de DNA alvo e a sequência PAM (em amarelo), clivando o DNA (setas pretas) com precisão em ambas as fitas.

FONTE: Adaptado de Redman et al. (2016).

O gRNA consiste em uma sequência quimérica contendo um RNA sintético composto pela sequência *scaffold* de 96 nucleotídeos necessária para a ligação à endonuclease Cas9 e uma

sequência de 20 nucleotídeos complementar ao DNA alvo, que define o locus gênico a ser modificado (Van der Oost et al., 2014).

A ligação da endonuclease Cas9 ao locus gênico alvo é mediada pela sequência contida no gRNA e por uma sequência presente no DNA alvo denominada motivo adjacente protoespaçador (*Protospacer Adjacent Motif*, PAM). Assim, a clivagem ocorrerá na posição de quatro nucleotídeos a montante da sequência PAM e mediada pelo pareamento por complementariedade dos 20 nucleotídeos que compõem o RNA guia (Sander e Joung, 2014).

A endonuclease Cas9 ou o complexo Cas9-gRNA podem ser gerados endogenamente através da expressão estável ou transiente em organismos transfectados e triados por marcadores de seleção, ou alternativamente, podem ser gerados *ex vivo* e entregues as células por transfecção (Soares Medeiros et al., 2017).

Em *T. cruzi* o reparo da dupla fita após a excisão pode ser mediado por micro-homologia (MMEJ) ou por recombinação homóloga quando um DNA doador (*Donor DNA*) é fornecido a célula (Peng et al., 2015; Rico et al., 2018).

Assim, objetivando caracterizar TcZC3H24 em *T. cruzi*, uma proteína com motivo CCCH, este estudo dispôs-se da utilização de vetores de expressão ectópica, cassetes tradicionais de *knockout* e da ferramenta CRISPR/Cas9.

2 JUSTIFICATIVA

Trypanosoma cruzi é um protozoário flagelado causador da doença de Chagas, uma doença tropical negligenciada que acomete cerca de 8 milhões de pessoas no mundo, constituindo-se um importante problema de saúde pública na América Latina (Dumonteil e Herrera, 2017; WHO, 2018).

O ciclo de vida deste parasita é complexo, o qual envolve um vetor hematófago e um hospedeiro vertebrado, compreendendo diferentes formas de vida com características únicas, podendo-se destacar pelo menos quatro estágios de desenvolvimento, sendo amastigota e tripomastigota sanguíneo em mamíferos e epimastigota e tripomastigota metacíclico no inseto triatomíneo (Chagas, 1909).

Cada estágio é caracterizado por uma morfologia celular distinta e por alterações no metabolismo e na expressão gênica (Brener, 1973; Adroher et al., 1988; Krieger et al., 1999).

A expressão gênica, a qual é amplamente regulada em nível pós-transcricional, compreende grandes aglomerados de genes em uma mesma orientação transcricional que são constitutivamente expressos como precursores de RNA policistrônico e são processados em moléculas individuais através de reações de *trans-splicing* e poliadenilação (Clayton e Shapira, 2007; Günzl, 2010; Martínez-Calvillo et al., 2010; Araújo e Teixeira, 2011; Michaeli, 2011). Nesta regulação pós-transcricional, os RNAs mensageiros são regulados em todas as fases do ciclo de vida do parasita e os mecanismos que dirigem sua expressão operam na maturação, transporte, estabilidade, função, localização celular e em diversas etapas de tradução através da associação a proteínas de ligação ao RNA, formando complexos de ribonucleoproteínas, as quais definem o destino destas moléculas de mRNA (Varani e Nagai, 1998; Glisovic et al., 2008; Mittal et al., 2011; Gerstberger et al., 2013).

Deste modo, as proteínas de ligação ao RNA são essenciais no controle da expressão gênica, cuja atividade reguladora é devido à interação entre sequências específicas na molécula de mRNA (elementos *cis*) e fatores regulatórios da RBP (fatores *trans*), sendo que a associação entre as proteínas de ligação ao RNA e seus alvos é tipicamente mediada por domínios de ligação ao RNA, entre os quais se destacam nos tripanossomatídeos os motivos RRM, PUF, ALBA e *Zinc Finger* (D'Orso et al., 2003; Glisovic et al., 2008; Oliveira et al., 2017).

Em *T. cruzi* há 51 proteínas com o domínio *Zinc Finger* CCCH, caracterizadas por conter três resíduos de cisteína e um resíduo de histidina coordenando um íon zinco, normalmente em uma sequência C-X₄₋₁₅-C-X₄₋₆-C-X₃-H, onde X corresponde a qualquer aminoácido (Kramer et al., 2010a).

Destas proteínas, apenas TcZFP1 (Mörking et al., 2004), TcZFP2 (Mörking et al., 2012), TcZC3H31 (Alcantara et al., 2018) e TcZC3H39 (Alves et al., 2014) foram estudadas até o momento em *T. cruzi*.

Assim, este trabalho objetiva caracterizar o gene que codifica a proteína de ligação ao RNA TcZC3H24, pertencente ao domínio clássico C-X₈-C-X₅-C-X₃-H, e avaliar seu papel no controle e regulação da expressão gênica em *Trypanosoma cruzi*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a proteína TcZC3H24 e avaliar sua funcionalidade nos mecanismos de expressão gênica em *Trypanosoma cruzi*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o perfil de expressão e localização subcelular da proteína TcZC3H24 ao longo do ciclo de vida do parasita por ensaios imunológicos, a partir do antissoro produzido para a proteína recombinante.
- Verificar alterações fenotípicas na deleção do gene *TcZC3H24* por meio de técnicas de nocaute gênico.
- Avaliar o efeito da superexpressão do gene *TcZC3H24* em *T. cruzi* através da inserção de uma cópia ectópica do mesmo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

Amersham Bioscience: dNTPs.

BioRad: agarose; azul de bromofenol; azul de Comassie R-250; xileno cianol.

Difco: ágar-agar; bacto-triptona; extrato de levedura; infusão de fígado; triptose.

Gibco: meio DMEM low glucose; meio RPMI 1640; penicilina-estreptomicina.

Invitrogen: soro fetal bovino; acrilamida; anticorpo anti-HA de coelho; anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase; anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase; anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com fluoróforo Alexa Fluor-488; anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com fluoróforo Alexa Fluor-488; bis-acrilamida; BP Clonase™ enzyme mix; EDTA; LR Clonase™ enzyme mix; Hoechst 33258; pDEST™15; pDEST™17; pDONR® 221; ProLong™ Gold Antifade Mountant; Proteinase K; RNase A; Taq DNA polimerase; T4 DNA ligase.

Merck: acetato de sódio; acetato de potássio; ácido acético; ácido bórico; ácido clorídrico; álcool isoamílico; cloreto de cálcio; cloreto de magnésio; cloreto de potássio; cloreto de sódio; clorofórmio; EDTA; etanol; fenol; formaldeído; fosfato de potássio monobásico; fosfato dibásico de sódio; fosfato dibásico de sódio heptahidratado; fosfato monossódico monoidratado; glicose; hidróxido de sódio; metanol; SDS; Tris-base.

New England Biolabs: endonucleases de restrição (*Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Sal*I, *Spe*I, *Xba*I, *Xho*I); Phusion DNA polimerase.

Roche: protease inhibitor cocktail EDTA-free; tripsina.

Serva Eletrophoresis: Alu-Gel-S.

Sigma-Aldrich: hemina; anticorpo anti-GST policlonal de coelho; anticorpo anti-HA monoclonal de camundongo; ácido L-aspartico; ácido L-glutâmico; ampicilina; blasticidina; bicarbonato de sódio; β-mercaptoetanol; brometo de etídeo; BSA; canamicina; cloranfenicol; coquetel de inibidores de protease; DEAE26 celulose; DEPC; E-64; ficoll; HEPES; IPTG; L-prolina; neomicina (G418); PMSF; poli-L-lisina; Ponceau S; triton X-100; tween 20.

Syntec: quetamina; xilazina.

USB: persulfato de amônio.

Thermo Scientific: TEMED.

Vetec: glicerol; glicina.

4.2 SOLUÇÕES

Clorofórmio:álcool isoamílico (24:1): clorofórmio 24 partes; álcool isoamílico 1 parte; saturado em água e equilibrado em Tris-HCl 100 mM pH 8,0.

Fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1): fenol saturado 25 partes; clorofórmio 24 partes; álcool isoamílico 1 parte; saturado em água e equilibrado em Tris-HCl 100 mM pH 8,0.

Mix de dNTPs: dATP 2,5 mM; dCTP 2,5 mM; dGTP 2,5 mM; dTTP 2,5 mM em Tris-HCl 10 mM pH 7,5.

Solução de acrilamida estoque: acrilamida 33%; bisacrilamida 0,9%.

Solução de bloqueio para imunofluorescência: albumina sérica bovina (BSA) 1% em PBS.

Solução de bloqueio para *Western Blot*: tampão TBS-T 0,1%; leite em pó desnatado 5% (Molico, Nestle).

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

Solução de cloreto de cálcio para bactérias cálcio competentes: CaCl₂ 100 mM em HEPES 10 mM pH 7,0.

Solução de coloração para SDS-PAGE (azul de Comassie): azul de Comassie R-250 0,1% em metanol/ácido acético v/v (45%:10%); H₂O 45%.

Solução de congelamento para *T. cruzi*: meio LIT 60%, Soro fetal bovino 40% e Glicerol 10%.

Solução de descoloração para SDS-PAGE: metanol 30%; ácido acético 10%.

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

Solução de tripsinização: tripsina 0,05 % (m/v), EDTA 0,02 % (m/v) em PBS pH 8,0.

Solução P1: Tris-HCl 25 mM pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0.

Solução P2: SDS 1%; NaOH 0,2 M.

Solução P3: Acetato de potássio 3M, ajustado para pH 4,8 com ácido acético glacial.

Solução TBE para eletroforese de DNA (Tris-Ácido Bórico-EDTA): Tris-base 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM pH 8,0.

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

Tampão de amostra de formaldeído 2X: formaldeído 95%; EDTA 18mM; SDS 0.025%; xileno cianol 0,005%; azul de bromofenol 0,005%.

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

Tampão de amostra para DNA 10X: Ficoll 25%; azul de bromofenol 0,25%; xileno cianol 0,25%.

Tampão de diálise: NaCl 150 mM; ureia 4M; Tris-HCl 50 mM pH 8,0.

Tampão de eletroforese para SDS-PAGE 5X: Tris 0,037M; glicina 0,3M pH 8,4; SDS 0,1%.

Tampão de eletroporação GP (GenePulser): NaCl 140 mM; HEPES ácido 25 mM; Na₂HPO₄ 0,74 mM, pH 7,5.

Tampão de eletroporação Tb-BSF: KCl 5 mM; CaCl₂ 0,15 mM; Na₂HPO₄ 90 mM; HEPES 50 mM, pH 7,3.

Tampão de lavagem: Na₂PO₄ 100 mM; NaCl 500 mM; Triton X-100 2%; ureia 2M; PMSF 1 mM.

Tampão de transferência para Western Blot: Tris-base 25 mM; glicina 192 mM; metanol 20%.

Tampão PBS: KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 1,5 mM; NaHPO₄.7H₂O 4,3 mM; NaCl 137 mM.

Solução de lise para *toothpick*: NaOH 60 mM; glicerol 6%; SDS 0,6%; EDTA 6 mM; azul de bromofenol 0,026%.

Tampão PSG: Na₂HPO₄ 47,46 mM; NaCl 36,32 mM; NaH₂PO₄.H₂O 2,5 mM; glicose 55,5 mM.

Tampão TBS -T 0,1%: Tween 20 0,1% em TBS.

Tampão TBS: Tris-HCl 20 mM pH 8,0; NaCl 150 mM.

4.3 MEIOS DE CULTURA

Meio LB (Luria-Bertani): bacto-triptona 10 g/L; NaCl 5,0 g/L; extrato de levedura 5,0 g/L.

Meio LB-Ágar: bacto-triptona 10 g/L; NaCl 5,0 g/L; extrato de levedura 5,0 g/L; 1,5% de agar-ágar.

Meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) - Infusão de fígado e triptose: infusão de fígado 5,0 g/L; NaCl 4,40 g/L; KCl 0,40 g/L; glicose 2,20 g/L; triptose 5,0 g/L; fosfato dibásico de sódio 11,55 g/L; extrato de levedura 16,0 g/L; hemina 0,02 g/L; soro fetal bovino 10%; penicilina 10.000 U; pH 7,2.

Meio TAU (Triatomine Artificial Urine) – Urina Artificial de Triatomíneo: NaCl 190,0 mM; KCl 17,0 mM; CaCl₂ 2,0 mM; MgCl₂ 2,0 mM; tampão fosfato pH 6,0 8,0 mM.

Meio TAU 3AAG pH 6,0 mM: meio TAU suplementado com glicose 10,0 mM; ácido L-aspartico 2,0 mM; ácido L-glutâmico 50,0 mM; L-prolina 10,0 mM.

Meio RPMI 1640 Gibco completo: Meio RPMI 1640 Gibco (Cat. N° 31800-014) suplementado com NaHCO₃ 0,2%; HEPES 0,48%; soro fetal bovino 10%; penicilina 100UI/mL; estreptomicina 10 µg/mL; pH 7,4.

Meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) low glucose - Meio Eagle Dulbecco Modificado de baixa glucose: meio DMEM low glucose Gibco (Cat. N° 31600-026) suplementado com NaHCO₃ 0,2%; HEPES 0,48%; soro fetal bovino 10%; penicilina 100UI/mL; estreptomicina 10 µg/mL; pH 7,4.

4.4 ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos foram preparados e estocados de acordo com as recomendações dos fabricantes. Suas concentrações estão descritas na Tabela 1.

TABELA 1 - ANTIBIÓTICOS E SUAS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS

Antibiótico	Concentração estoque (mg/mL)	Concentração final (µg/mL)	Microrganismo ou linhagem celular
Ampicilina	25	100	<i>Escherichia coli</i>
Blasticidina	10	10	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Canamicina	25	25	<i>Escherichia coli</i>
Cloranfenicol	34	34	<i>Escherichia coli</i>
Estreptomicina	10	100	<i>Trypanosoma cruzi</i> Células VERO
Higromicina	50	100 a 500	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Neomicina (G418)	50	100 a 500	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Penicilina	10.000 UI/mL	100 UI	<i>Trypanosoma cruzi</i> Células VERO
Tetraciclina	10	100	<i>Escherichia coli</i>

FONTE: A autora (2019).

4.5 LINHAGENS CELULARES

4.5.1 *Escherichia coli*

As linhagens de *Escherichia coli* utilizadas na propagação de vetores e expressão de proteína recombinante estão discriminadas na Tabela 2.

TABELA 2 - LINHAGENS DE *Escherichia coli*

<i>E. coli</i>	Genótipo	Resistência	Referência
BL21 (DE3)	F- ompT hsdSB (rBmB-) gal dcm (DE3)	-	Invitrogen
BL21 (DE3)pLysS	F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm (DE3) pLysS (CamR)	Cloranfenicol	Invitrogen
BL21 (DE3) Star™	F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm rne131 (DE3)	-	Invitrogen
Rosetta-gami™ 2(DE3)	$\Delta(ara-leu)7697 \Delta lacX74 \Delta phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F'[lac^+ lacI^q pro] gor522::Tn10 trxB pRARE2 (Cam^R, Str^R, Tet^R).$	Estreptomicina Tetraciclina Cloranfenicol	Invitrogen
<i>E. coli</i> TOP 10	F-mcrA $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \Phi80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1 araD139 \Delta(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG$	Estreptomicina	Invitrogen
NiCo21 (DE3)	can::CBD fhuA2 [lon] ompT gal (lambda DE3) [dcm] arnA::CBD slyD::CBD glmS6Ala delta hsdS lambda DE3 = lambda sBamHIo delta EcoRI-B int:: (lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 delta nin5	-	New England Biolabs

FONTE: A autora (2019).

4.5.2 *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi Dm28c (Contreras et al., 1985a). Originalmente isolado em 1984 do gambá comum (*Didelphis marsupialis*) na cidade de Carabobo, Venezuela; pertencente ao grupo *T. cruzi* I (DTU I), o qual é associado com o ciclo selvagem de transmissão e a mamíferos arbóreos (Contreras et al., 1985a; Contreras et al., 1988; Zingales et al., 2009).

4.5.3 Célula de mamífero

Células VERO (ATCC® CCL81™): Linhagem de células epiteliais renais extraídas do macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*).

4.6 VETORES

Os vetores utilizados e desenvolvidos neste trabalho encontram-se listados na Tabela 3.

TABELA 3 - VETORES UTILIZADOS E DESENVOLVIDOS

Vetor	Resistência	Referência
pDEST [®] 15	Ampicilina	Invitrogen
pDEST [®] 17	Ampicilina	Invitrogen
pDEST15-ZC3H24	Ampicilina	A autora (2019)
pDEST17-ZC3H24	Ampicilina	A autora (2019)
pDONR [®] 221	Canamicina	Invitrogen
pENTRY-ZC3H24	Canamicina	A autora (2019)
pENTRY-ZC3H24-Δstop	Canamicina	A autora (2019)
pENTRY-ZC3H24-A	Canamicina	A autora (2019)
pTc_ZC3H24-bsd	Blasticidina	A autora (2019)
pTc2KO-hyg	Higromicina B	Souza et al., 2010
pTc2KO-neo	Neomicina (G418)	Souza et al., 2010
pTc2KO-ZC3H24-hyg	Higromicina B	A autora (2019)
pTc2KO-ZC3H24-neo	Neomicina (G418)	A autora (2019)
pTc3xHA_CO_2-bsd	Blasticidina	A autora (2019)
pTc3xHA_CO_2-neo	Neomicina (G418)	Modificado de Kugeratski et al. (2015)
pTc3xHA_NH_2-bsd	Blasticidina	A autora (2019)
pTc3xHA_NH_2-neo	Neomicina (G418)	Modificado de Kugeratski et al. (2015)
pTc3xHA_ZC3H24_NH-bsd	Blasticidina	A autora (2019)
pTc3xHA_ZC3H24Δstop_CO-bsd	Blasticidina	A autora (2019)
pTcGFP_CO_2-neo	Neomicina (G418)	Modificado de Kugeratski et al. (2015)
pTcGFP_NH_2-neo	Neomicina (G418)	Modificado de Kugeratski et al. (2015)
pTcGFP_ZC3H24_NH-neo	Blasticidina	A autora (2019)
pTcGFP_ZC3H24Δstop_CO-neo	Blasticidina	A autora (2019)
pUC57-DSB	Neomicina (G418)	Modificado de GenScript

FONTE: A autora (2019).

4.7 OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES

Os iniciadores (*primers*) para amplificação dos fragmentos utilizados nas construções dos vetores de nocaute e de expressão em *T. cruzi* foram desenhados com auxílio do software SnapGene (GSL Biotech), a partir de sequências do genoma de *T. cruzi* Dm28c disponível no banco de dados TriTrypDB (*TriTrypDB: The Kinetoplastid Genomics Resource*, 2016).

Para os iniciadores destinados à clonagem pela plataforma Gateway[®] (Invitrogen), foram adicionados os sítios de recombinação *attB1* e *attB2* de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen).

Os *primers* foram analisados quanto a formação de grampos (*hairpin*) e dímeros com auxílio da ferramenta OligoAnalyzer disponibilizada online pela Integrated DNA Technologies - IDT (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>).

A sequência dos iniciadores utilizados para as amplificações e clonagens estão discriminadas na Tabela 4.

TABELA 4 - INICIADORES UTILIZADOS PARA AS AMPLIFICAÇÕES E CLONAGENS REFERENTES AO GENE *TcZC3H24*

Nome do iniciador	Sítio	Sequência (5'- 3')
HYP1_GWT_F	Recombinação Gateway	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT CATGTCGCTTTCATTTATCGAGTCAGG
HYP1_GWT_R2	Recombinação Gateway	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC TTACCAGATGCTGTCCTCAGGC
ZC3H24_UPS_F	KpnI	CCCGGTACCGACTTCTACTTTGCGATGAATGG CCACT
ZC3H24_UPS_R	Sall	GTT GTCGACACGGAACCTGTCG
ZC3H24_DOWN_F	BamHI	CCCGGATCCCGTCTTGGGTGCACCGATAATTC CT
ZC3H24_DOWN_R	XbaI	CCCTCTAGAAAAATTGTTGGGGAGCTGCTCCA C
ZC3H24_Ext_F	-	CTCGTAGCTTGGAGTGACGGC
ZC3H24_Ext_R	-	ACCCGTCAATGCACCGGC
ZC3H24_GTW2A_F	Recombinação Gateway	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT CATGGACTTCTACTTTGCGATGAATGG
ZC3H24_GTW1A_F	Recombinação Gateway	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT CATGGCATCCGTCGCTGGAGG
ZC3H24_GTW_R1	Recombinação Gateway	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC ATAAAATTGTTGGGGAGCTGCTCC
ZC3H24_GTW_R2	Recombinação Gateway	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC TTAATAAAATTGTTGGGGAGCTGCTCC
STOPNOT_R	-	GCGGCCGCCTATCTATCTA
BLAST_SpeI_F	SpeI	TTT ACTAGT GTATGGCCAAGCCTTTGTCTCAA GAAGA
BLAST_XhoI_R	XhoI	CCCT CGAGT TAGCCCTCCCACACATAA
Neo_R	-	GGGGGAATTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGC GATAGAA
Neo_Out_F	-	GGTGGAAAATGGCCGCTTTT
Higro_R	-	GGGTGAATTCTATTCCTTTGCCCTCGGACGAGT GCTG
Higro_Out_F	-	ACTGTCGGGCGTACACAAAT

NOTA: As sequências destacadas em negrito referem-se aos sítios para clivagem enzimática ou para recombinação pela plataforma Gateway (Invitrogen).

FONTE: A autora (2019).

4.8 ANÁLISES *IN SILICO*

Para a busca da sequência nucleotídica e aminoácídica da proteína codificada pelo gene *TcZC3H24* foi utilizado o banco de dados TritypDB (<http://tritypdb.org>), uma base de dados integrada referente ao genoma da família Trypanosomatidae (Aslett et al., 2009) e o banco de dados GenBank (Benson et al., 2013) do National Center of Biotechnology Information - NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

A identificação de motivos proteicos foi realizada através do software HMMER versão 3.2.1 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/hmmscan>) (Finn et al., 2015), utilizando modelos ocultos de Markov (Hidden Markov Models - HMM) disponíveis no banco de dados

do Pfam (Finn et al., 2014), CATH-Gene3D (Sillitoe et al., 2015), PIRSF (Wu et al., 2004), Superfamily (Oates et al., 2015) e TIGRFAM (Haft et al., 2013).

Para a busca de regiões de similaridade entre sequências biológicas utilizaram-se os programas FASTA (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/>) (Pearson e Lipman, 1988; Pearson, 1990; Pearson, 1991; McWilliam et al., 2013; Li et al., 2015) e BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

O alinhamento das sequências múltiplas e a identidade entre as sequências foi realizado por meio do programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (Sievers et al., 2011). As sequências alinhadas foram visualizadas e editadas utilizando o software JalView Versão 2 (Waterhouse et al., 2009).

Para análises de pares de sequências que requereram um melhor alinhamento global foi utilizado o programa EMBOSS Needle (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) e para um melhor alinhamento local o programa EMBOSS Water (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/) (Rice et al., 2000).

As proteínas ortólogas foram identificadas com auxílio dos softwares OrthoMCL (<http://orthomcl.org/orthomcl/>) (Chen et al., 2006) e OrthoDB versão 9.1 (<https://www.orthodb.org/>) (Zdobnov et al., 2017).

4.9 PREPARO, MANIPULAÇÃO E ANÁLISE EM BACTÉRIAS

4.9.1 Preparação de bactérias cálcio-competentes

O preparo de células cálcio-competentes foi realizado pelo método do cloreto de cálcio descrito por Sambrook et al. (1989).

As cepas das bactérias, a partir do estoque em glicerol, foram semeadas em estrias por esgotamento em placa de Petri contendo meio LB-ágar acrescido do antibiótico de resistência.

Foi realizado um pré-inóculo semeando-se uma colônia bacteriana em 5 mL de meio LB acrescido do antibiótico de resistência, mantido em estufa bacteriológica por 18 horas a 37°C sob agitação constante de 200 rpm.

Decorrido 18 horas, um inóculo de 100 mL foi preparado diluindo-se o pré-inóculo na proporção 1:100. Este inóculo foi incubado a 37°C sob agitação constante de 200 rpm e permaneceu em estufa bacteriológica até que a leitura de sua densidade óptica atingisse a fase exponencial de crescimento, ou seja, quando o leitor espectrofotométrico indicasse uma densidade óptica (DO_{600nm}) entre 0,4 e 0,6 em comprimento de onda de 600 nm.

Em seguida, a cultura foi mantida em gelo por 15 minutos e centrifugada a 4000 g por 10 minutos a 4°C. O sedimento bacteriano foi ressuscitado em 50 mL de solução de cloreto de cálcio 100 mM gelado (4°C), tamponada com HEPES 10 mM pH 7,0.

A suspensão bacteriana permaneceu em banho de gelo durante 30 minutos e foi novamente centrifugada a 4°C, 4000 g por 10 minutos. As células foram ressuscitadas em 2 mL da solução anterior de cloreto de cálcio com adição de 10% de glicerol, foram aliquoteadas em volume aproximado de 100 µL em tubos cônicos tipo *Eppendorf* de 1,5 mL e armazenadas a temperatura de -70°C.

4.9.2 Transformação de bactérias cálcio-competentes

DNA exógeno, proveniente de minipreparações de plasmídeos, reações de ligação ou recombinações, foi inserido em bactérias cálcio-competentes tanto para a amplificação dos próprios plasmídeos quanto para expressão heteróloga da proteína recombinante TcZC3H24.

Os plasmídeos foram incubados em 100 µL de uma suspensão de *E. coli* cálcio-competente durante 30 minutos em gelo, sendo em seguida submetidos a um choque térmico de 42°C por 2 minutos, retornando ao gelo por mais 2 minutos. Imediatamente, foi adicionado 1 mL de meio LB nas células transformadas e as mesmas foram incubadas por uma hora a 37°C sob agitação constante de 200 rpm.

Com a finalidade de obter colônias isoladas, alíquotas de 50 µL e 200 µL foram semeadas em placas de Petri contendo meio LB-ágar acrescido do antibiótico de seleção e incubadas a 37°C por 18 horas.

4.9.3 Seleção de clones recombinantes

A análise e seleção de clones recombinantes foram executados pela técnica de palitagem (*toothpick*) (item 4.9.3.2) e por PCR de colônia (item 4.9.3.3).

4.9.3.1 Preparo da Placa Mãe (*Master Plate*)

Colônias provenientes de bactérias transformadas foram selecionadas aleatoriamente e transferidas, com auxílio de palitos de madeira estéreis, para uma placa de Petri contendo meio LB-ágar acrescido do antibiótico de seleção e numericamente dividida de modo que

apenas um clone pudesse se propagar em cada divisão da placa. Esta placa (placa mãe) foi mantida em estufa bacteriológica a 37°C por 18 horas.

4.9.3.2 Técnica de análise de clones por palitagem (*toothpick*)

Clones recombinantes foram analisados por meio da técnica descrita por Barnes (1977), com algumas alterações.

Os clones provenientes da placa mãe foram transferidos com auxílio de palitos de madeira estéreis para o fundo de cada poço de uma placa de PCR de 96 poços, numerada conforme identificado na placa mãe.

Em cada poço foi adicionado 20 µL de solução de lise, seguido por incubação a 65°C por 10 minutos. O lisado foi submetido à eletroforese em gel de agarose (item 4.12.3), corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por aproximadamente 15 minutos e lavado em água bidestilada. O DNA foi analisado em transiluminador de luz ultravioleta (UV) e fotografado no sistema de fotodocumentação L-PIX (Loccus Biotecnologia).

4.9.3.3 PCR de colônia

Os clones provenientes da placa mãe foram diluídos em 30 µL de água ultrapura e lisados a 100°C durante 5 minutos. Em seguida, foram submetidos a uma centrifugação de 10000 g por 30 segundos. Deste sobrenadante, 1 µL foi retirado para a reação de amplificação por PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores que flanqueiam o fragmento de DNA analisado.

As amostras foram aquecidas a 94°C por 4 minutos e submetidas aos ciclos específicos de desnaturação, anelamento dos iniciadores e extensão do fragmento gênico. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose (item 4.12.3) e corados com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por aproximadamente 15 minutos, sendo em seguida analisado em transiluminador de luz ultravioleta (UV) e fotografado pelo fotodocumentador L-PIX (Loccus Biotecnologia).

4.9.4 Preparação de plasmídeo em pequena escala (Miniprep)

A extração de DNA plasmidial em pequena escala foi obtida pelo método da lise alcalina, com algumas modificações, de acordo com Birnboim e Doly (1978).

Uma colônia bacteriana foi incubada em 5 mL de meio LB suplementado com o antibiótico de seleção, sob agitação constante de 200 rpm, 37°C por 18 horas.

A cultura foi centrifugada a 12.000 g por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o sedimento bacteriano ressuspendido em 100 µL de tampão P1 acrescido de 10 µg/mL de RNase A. Em seguida as células foram lisadas com adição de 200 µL de tampão P2 e misturadas por inversão.

Para a precipitação do DNA cromossomal, das proteínas e debris celulares foi adicionado 150 µL de solução P3 gelada (4°C). Esta solução foi purificada por fenol-clorofórmio e precipitada com etanol (item 4.12.1). O DNA plasmidial foi seco e reidratado em 50 µL de tampão TE acrescido de 10 µg/mL de RNase A.

Alternativamente, o QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) foi empregado para obtenção de DNA plasmidial mais puro, utilizado de acordo com o protocolo do fabricante.

O DNA purificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose (item 4.12.3) e quantificado por espectrofotometria no aparelho NanoDrop® (Thermoscientific).

4.9.5 Estoque em glicerol de células de *Escherichia coli*

Uma colônia bacteriana foi incubada em 2 mL de meio LB suplementado com o antibiótico de seleção, em estufa bacteriológica a 37°C sob agitação constante de 200 rpm, por 18 horas. A cultura foi centrifugada a 14.000 g por 30 segundos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 1 mL de solução de glicerol 50% mantido em banho de gelo. As células foram aliquoteadas em criotubos e mantidas a -70°C.

4.10 CULTIVO E MANIPULAÇÃO DE CÉLULAS VERO

Células da linhagem VERO foram mantidas em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO₂ a 37°C, acondicionadas em garrafas de cultivo celular de 25 cm² (Corning) contendo 4 mL de meio de cultura RPMI 1640 completo.

As passagens foram feitas semanalmente, após as células atingirem confluência mínima de 80%. Para isso, o meio de cultura foi retirado e as células lavadas duas vezes com PBS, seguindo com a adição de 1 mL de tripsina previamente aquecida a 37°C.

A cultura contendo tripsina foi incubada por 5 minutos a 37°C e o desprendimento celular foi observado por microscopia de luz em microscópio invertido.

A reação foi interrompida com a adição de 3 mL de meio RPMI 1640 completo, com posterior homogeneização para ruptura de grumos celulares. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 800 g por 10 minutos, 4°C. As células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 completo e quantificadas no contador celular Z2™ Coulter Counter® Analyzer (Beckman Coulter).

As células destinadas a manutenção da linhagem em cultura eram semeadas com um inóculo de $0,9 \times 10^6$ células em garrafas de cultura de 25 cm² contendo 4 mL de meio RPMI 1640 completo. Aquelas destinadas a infecção por *T. cruzi* eram semeadas com um inóculo de $1,3 \times 10^6$ células em garrafas de cultivo de 75 cm² (Corning) contendo 8 mL de meio DMEM.

4.11 CULTIVO, MANIPULAÇÃO E ANÁLISES EM *T. cruzi*

4.11.1 Epimastigotas em fase logarítmica de crescimento

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT (Camargo, 1964), acondicionadas em garrafas de cultivo celular de 25 cm² (Corning) e mantidos em estufa a 28°C, com repiques de 1×10^6 parasitas a cada três dias.

As formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento foram obtidas após 3 dias de cultivo, onde a densidade celular é de aproximadamente 3×10^7 células/mL, condições estabelecidas de acordo com a curva de crescimento em meio LIT a 28°C (Camargo, 1964).

4.11.2 Epimastigotas sob estresse nutricional

Formas epimastigotas provenientes de uma cultura ao final da fase logarítmica de crescimento, isto é, no quinto dia de cultivo, com uma densidade celular de aproximadamente 5×10^7 células/mL, foram coletadas por centrifugação a uma velocidade de 3000 g por 10 minutos a 4°C.

As células foram lavadas em PBS e submetidas a estresse nutricional, sendo mantidas em meio TAU na concentração de 5×10^8 células/mL, durante duas horas a 28°C (Contreras et al., 1985a; Contreras et al., 1985b).

4.11.3 Obtenção de tripomastigotas metacíclicos (metaciclogênese)

Formas tripomastigotas metacíclicas foram obtidas através do processo de diferenciação *in vitro* descrito por Bonaldo et al. (1988).

Para isso, epimastigotas submetidos a estresse nutricional foram inoculados na proporção 1:100 em meio TAU 3AAG, ou seja, em uma concentração final de 5×10^6 células/mL. Estes parasitas foram incubados a 28°C e sem agitação, permanecendo acondicionados em garrafas de cultivo celular (Corning) na posição horizontal. Deste modo, as formas epimastigotas aderem-se ao substrato e diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos, os quais permanecem livres no sobrenadante da cultura. Decorridos 96 horas pode-se observar que 80 a 90% dos parasitas encontrados no sobrenadante são tripomastigotas metacíclicos (Bonaldo et al., 1988).

Para a purificação das formas metacíclicas, prosseguiu-se conforme descrito por De Sousa (1983).

O sobrenadante da cultura foi centrifugado a 10.000 g por 10 minutos a 4°C, ressuspenso em solução de PSG pH 8,0 e purificado por cromatografia de troca iônica em coluna de resina DEAE celulose (Sigma) equilibrada em tampão PSG pH 8,0.

Nesta purificação, as formas tripomastigostas metacíclicas atravessam a coluna enquanto as formas epimastigotas permanecem retidas.

4.11.4 Obtenção de amastigotas intracelular (amastigogênese)

Para a amastigogênese derivada de infecção *in vitro*, culturas de células VERO com densidade de $1,3 \times 10^6$ células foram infectadas com $1,3 \times 10^8$ tripomastigostas metacíclicos derivados do processo de diferenciação *in vitro* (Bonaldo et al., 1988) em meio DMEM. A infecção foi acondicionada em garrafas de cultivo celular de 75 cm² (Corning) com 8 mL de meio DMEM e mantidas em estufa com atmosfera úmida, 5% de CO₂ a 37°C.

Após 4 horas de interação célula hospedeira-parasita, procedeu-se a lavagem da monocamada celular com PBS previamente aquecido a 37°C, objetivando a retirada dos parasitas que se mantiveram no sobrenadante, sendo novamente incubados nas condições anteriores.

Após 48 horas de infecção, período correspondente ao pico de replicação dos amastigotas intracelulares, as células foram lavadas três vezes com PBS a fim de eliminar a contaminação com parasitas extracelulares, prosseguindo-se assim com o isolamento dos amastigotas.

Os amastigotas intracelulares foram isolados das células hospedeiras de acordo com o protocolo estabelecido por Batista et al. (2015). Assim, após 48 horas do início da infecção, as células foram lavadas duas vezes com PBS e tripsinizadas a 37°C por 5 minutos. Após o desprendimento celular, adicionou-se soro fetal bovino inativado frio na razão 1:1.

As células infectadas em suspensão foram transferidas para uma câmara de ruptura celular (4639 cell disruption vessel, Parr Instrument Company) e lisadas por descompressão de nitrogênio (cavitação), utilizando uma pressão de 180 psi por 5 minutos.

As células procedentes da lise celular foram centrifugadas a 800 g por 10 minutos. Deste modo, as células VERO intactas foram removidas e os amastigotas intracelulares recuperados no sobrenadante. Os debris celulares foram removidos através de uma nova centrifugação a 2000 g por 5 minutos, permanecendo no sobrenadante apenas os amastigotas intracelulares.

4.11.5 Infecção em células VERO e obtenção de tripomastigotas sanguíneos

Culturas de células VERO foram infectadas com tripomastigotas metacíclicos diferenciados *in vitro* (Bonaldo et al., 1988) com um MOI de 1:100, ou seja, $1,3 \times 10^6$ células VERO foram infectadas com $1,3 \times 10^8$ tripomastigotas metacíclicos, acondicionados em garrafas de cultivo celular de 75 cm² (Corning) com 8 mL de meio DMEM e mantidos em estufa com atmosfera úmida, 5% de CO₂ a 37°C. Após 24 horas do início da infecção, as células foram lavadas com PBS aquecido a 37°C e mantidas nas condições anteriores.

A partir do sexto dia após a infecção iniciaram-se as eclosões dos tripomastigotas sanguíneos, os quais foram coletados do sobrenadante e centrifugados a 3000 g por 10 minutos.

Os parasitas liberados entre o sexto e o décimo dia após a infecção foram recolhidos diariamente do sobrenadante, sendo estes novamente utilizados para infecção em células VERO com um MOI de 1:10 ou congelados e armazenados a -70°C.

4.11.6 Obtenção de extrato proteico de *T. cruzi*

As formas epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos, amastigotas e tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi* foram cultivados conforme descrito nos itens 4.11.1, 4.11.2, 4.11.3, 4.11.4 e 4.11.5.

As células foram coletadas por centrifugação com velocidade de 3000 g por 10 minutos a 4°C e lavadas duas vezes em tampão PBS.

Os parasitas foram ressuspensos em PBS contendo tampão de amostra 1X, PMSF 1mM, E-64 10 µM ou coquetel de inibidores de protease (Roche), seguindo com desnaturação por aquecimento a 100°C por 10 minutos e armazenados a -20°C.

4.11.7 Obtenção de DNA genômico de *T. cruzi*

O DNA de *T. cruzi* foi extraído conforme descrito por Medina-Acosta e Cross (1993). Aproximadamente 5×10^7 epimastigotas mantidos em meio LIT até a fase exponencial (3-4 dias) foram coletados por centrifugação a 3000 g durante 10 minutos, 4°C. O sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas em PBS e ressuspensas em 350 µL de tampão TELT.

O material foi incubado por 5 minutos a temperatura ambiente e o DNA foi extraído por fenol-clorofórmio e precipitado com etanol (item 4.12.1).

Este foi seco e ressuspendido em tampão TE contendo RNase A (10 µg/mL).

A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (item 4.12.3) e quantificado por espectrofotometria em aparelho NanoDrop® (Thermoscientific).

4.11.8 Transfecção de *T. cruzi* por eletroporação e seleção de parasitas

As transfecções foram realizadas por dois protocolos distintos de eletroporação.

A primeira, conduzida em eletroporador GenePulser® II (BioRad), utilizada nas transfecções que resultou no nocaute do gene *TcZC3H24* por cassetes clássicos de recombinação homóloga, baseado no procedimento descrito por Lu e Buck (1991) e Souza et al. (2010).

A segunda, conduzida em eletroporador Amaxa Nucleofector 2b (Lonza), descrito por Pacheco-Lugo et al. (2017), empregada nas transfecções que resultaram na obtenção do nocaute do gene *TcZC3H24* pela técnica de CRISPR/Cas9, na complementação do mutante nulo *TcZC3H24* e nas superexpressões de *TcZC3H24* em *T. cruzi*.

Optou-se por alterar o protocolo de eletroporação visto que este último resulta na transfecção mais eficaz e rápida das formas epimastigotas de *T. cruzi* comparado a eletroporação convencional conduzida pelo dispositivo GenePulser® II (Bio-Rad), além de reduzir de modo significativo a quantidade de DNA e células utilizados (Pacheco-Lugo et al., 2017).

4.11.8.1 Transfecção conduzida em eletroporador GenePulser® II (BioRad)

Para cada transfecção foram coletadas 1×10^8 células na forma epimastigota de *T. cruzi* em fase logarítmica de crescimento e centrifugadas a 3000 g por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o sedimento celular foi lavado duas vezes com PBS.

Novamente as células foram sedimentadas por centrifugação a 3000 g por 10 minutos e ressuspensas em 400 µL de tampão de eletroporação GP.

A esta suspensão celular foi adicionado cerca de 25 µg de cassete para recombinação homóloga, totalizando um volume final de 450 µL. Esta suspensão foi homogeneizada e transferida a cubetas estéreis de eletroporação Gene Pulser® 0,2 cm gap (Bio-Rad) previamente deixadas em gelo. Para o controle negativo, foi adicionado à suspensão celular apenas 50 µL de tampão de eletroporação GP.

Cada cubeta foi mantida em gelo por 10 minutos. Em seguida, os parasitas foram transfectados com dois pulsos sequenciais de 500 µF e 450 volts utilizando o equipamento GenePulser® II (Bio-Rad). Após eletroporação, cada cubeta foi mantida em gelo por mais 5 minutos e a suspensão de parasitas transfectados foi inoculada em 10 mL de meio LIT suplementado com penicilina (10.000 UI) e estreptomicina (10 µg/mL), acondicionados em garrafa de cultivo celular de 25 cm² (Corning) e mantidos a 28°C em estufa BOD.

Decorrido 24 horas da transfecção, foi adicionado a cada cultura transfectante o(s) antibiótico(s) de resistência. As culturas foram mantidas com subsequentes passagens até completa ausência de proliferação celular na cultura controle.

4.11.8.2 Transfecção conduzida em eletroporador Amaxa Nucleofector 2b (Lonza)

Para cada transfecção, 1×10^7 células na forma epimastigota de *T. cruzi* em fase logarítmica de crescimento foram coletadas por centrifugação a 3000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi lavado duas vezes com PBS. As células foram novamente centrifugadas a 3000 g por 10 minutos e ressuspensas em 70 µL de tampão de eletroporação Tb-BSF. A esta suspensão celular foi adicionado cerca de 10 µg de DNA a ser transfectado, totalizando um volume final de 100 µL. Esta suspensão foi homogeneizada e transferida a cubetas estéreis de eletroporação Gene Pulser® 0,2 cm gap (Bio-Rad). Para o controle negativo, foi adicionado à suspensão celular apenas 30 µL de tampão de eletroporação Tb-BSF.

As amostras foram transfectadas utilizando o eletroporador Amaxa Nucleofector 2b (Lonza). Para tanto, foi selecionado o programa U-033 do eletroporador e após pulso único os parasitas transfectantes foram transferidos para uma garrafa de cultivo celular de 25 cm² (Corning) contendo 4 mL de meio LIT suplementado com penicilina (10.000 UI) e estreptomicina (10 µg/mL), sendo mantidos a 28°C em estufa BOD. Decorrido 24 horas da transfecção, foi adicionado a cada cultura transfectante o(s) antibiótico(s) de resistência. As

culturas foram mantidas com subseqüentes passagens até completa ausência de proliferação celular na cultura controle.

4.11.9 Criopreservação de *T. cruzi*

Formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento e tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi* foram sedimentados por centrifugação a 3.000 g por 10 minutos e homogeneizados na concentração de 2×10^8 parasitas/mL em solução de congelamento, previamente mantida em gelo.

Os parasitas foram aliqüotados em tubos de criopreservação, cerca de 500 µL por tubo, e mantidos durante duas horas a -20°C, sendo em seguida armazenados a temperatura de -70°C.

4.11.10 Análise de proliferação celular

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas conforme item 4.11.1 e repicadas a cada três dias com inóculo de 1×10^6 parasitas/mL, durante pelo menos três passagens consecutivas.

Os parasitas foram quantificados em contador celular Z2™ Coulter Counter® Analyzer (Beckman Coulter) diariamente durante seis dias, sendo considerado o primeiro repique de 1×10^6 parasitas/mL como dia zero.

Durante as contagens, as culturas foram cultivadas em meio LIT sem a adição de antibióticos de seleção.

As contagens foram realizadas em triplicatas técnicas e biológicas. Os dados foram analisados por Two-Way Anova com pós teste de Bonferroni, utilizando o software GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software Inc.).

Foi considerado estatisticamente significativo o nível de significância inferior a 5% ($P < 0,05$).

4.11.11 Quantificação da metaciclogênese

Formas tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* foram obtidos conforme descrito no item 4.11.3.

Para a contagem de metacíclicos, os parasitas foram retirados do sobrenadante do meio TAU3AAG e contados em câmara de Neubauer.

As contagens foram realizadas em triplicatas técnicas e biológicas. Os dados foram analisados por teste t não pareado utilizando o software GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software Inc.).

Foi considerado estatisticamente significativo o nível de significância inferior a 5% ($P < 0,05$).

4.12 TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

4.12.1 Purificação de DNA por fenol-clorofórmio

Adicionou-se 1 volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) a cada volume de material a ser purificado. A solução foi homogeneizada por inversão e centrifugada por 5 minutos a 13000 g.

A fase aquosa foi coletada e o DNA extraído novamente com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) na proporção 1:1, objetivando a obtenção de uma amostra mais pura. Novamente foi centrifugado a 13000 g por 5 minutos e sua fase aquosa coletada.

Para a precipitação do material genético foi adicionado 2 volumes de etanol absoluto e 10% de acetato de sódio 3M pH 5,2. Para amostras que exigiam um rendimento maior do produto purificado, o mesmo foi mantido a -20°C por 18°C.

A amostra foi centrifugada por 20 minutos a 4°C em velocidade de 13000 g, o sedimento lavado com 1 mL de etanol 70% e novamente centrifugado a 13000 g por 5 minutos.

O DNA foi seco e reidratado em 50 µL de tampão TE.

A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (item 4.12.3).

4.12.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

O protocolo de eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida foi executado conforme descrito por Laemmli (1970), realizado em gel vertical com tampão de eletroforese para SDS-PAGE, em amperagem constante de 30 mA.

O gel foi analisado em solução de coloração para SDS-PAGE (azul de Coomassie) ou transferido para membrana de nitrocelulose *Hybond-ECL* (GE Healthcare).

A solução de coloração para SDS-PAGE foi feita sob agitação por 2 horas e descorada em solução de descoloração para SDS-PAGE. Os volumes das soluções utilizadas para montagem do gel de corrida e de empilhamento estão descritos na Tabela 5.

TABELA 5 - SOLUÇÕES E VOLUMES DE PREPARO PARA GEL SDS-PAGE

Solução/Reagente	Gel de empilhamento	Gel de corrida	
	5%	10%	13%
Acrilamida, estoque (33/0,9%)	0,7 ml	2,95 ml	3,8 ml
Tris-HCl 2,5 M pH 8,8 (concentração final 400 mM)	-	1,6 ml	1,6 ml
Tris-HCl 1M pH 6,8 (concentração final 120 mM)	0,6 ml	-	-
H ₂ O ultra pura	3,7 ml	5,5 ml	4,6 ml
SDS 10% (concentração final 0,1%)	50 µl	100 µl	100 µl
Persulfato de amônio 10% (concentração final 0,075%)	35 µl	70 µl	70 µl
TEMED (concentração final 0,07%)	7 µl	7 µl	7 µl

FONTE: Adaptado de Laemmli (1970).

4.12.3 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese de DNA foi executada conforme descrito por Sambrook et al. (1989), realizada em gel de agarose horizontal, sob diferença de potencial constante de 100V, em tampão TBE 1X, sendo as amostras diluídas em tampão TA 1X.

Após o término da eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por aproximadamente 15 minutos e lavado com água bidestilada, sendo analisado em transiluminador de luz ultravioleta (UV) L-PIX (Loccus biotecnologia).

A concentração de agarose variou de acordo com a faixa de tamanho das moléculas de DNA que se desejou separar. As relações entre concentração de agarose e resolução de moléculas lineares de DNA são apresentadas na Tabela 6.

TABELA 6 - LIMITES DE EFICIÊNCIA DA SEPARAÇÃO DE DNA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AGAROSE

Concentração de agarose no gel (%)	Limites de eficiência (Kb)
0,3	60 – 5,0
0,6	20 – 1,0
0,7	10 – 0,8
0,9	7 – 0,5
1,2	6 – 0,4
1,5	4 – 0,2
2,0	3 – 0,1

FONTE: Adaptado de Sambrook et al. (1989).

A eletroforese de RNA foi realizada em gel de agarose não desnaturante, procedendo-se conforme o protocolo para eletroforese de DNA em gel de agarose horizontal, porém com pequenas modificações.

As amostras foram incubadas a 75°C por 10 minutos e diluídas em tampão de amostra de formaldeído 1X. As soluções empregadas foram feitas em água DEPC.

4.12.4 Amplificação de DNA por PCR

As amplificações de DNA por PCR foram realizadas em reações que continham aproximadamente 100 ng de DNA genômico de *T. cruzi* ou 10 ng de plasmídeo.

Cada reação continha 10 pmol de cada *oligonucleotídeo iniciador*, 200µM de cada dNTP, MgCl₂ 1,5 mM, tampão Taq DNA polimerase 1X, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), em volume total de 50 µL.

Estas foram processadas no termociclador ProFlex PCR System (Applied Biosystems), com a desnaturação do material por 5 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos que compreendia uma desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridização dos *primers* de 55°C a 58°C por 30 segundos e extensão a 72°C com o tempo de 1 minuto para kb de DNA a ser amplificado, finalizando com 1 ciclo de 7 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram purificados e mantidos a - 20 °C.

4.12.5 Imunodeteção de proteína por Western Blot

As proteínas foram separadas por SDS-PAGE (item 4.12.2) e transferidas, de acordo com o protocolo estabelecido por Towbin et al. (1979), para uma membrana de nitrocelulose (*Hybond-ECL*, *GE Healthcare*) por 2 horas a 60 V ou por 18 horas a 25 V (4°C) em tampão de transferência, utilizando o sistema de transferência úmida.

A membrana foi corada com Ponceau S até o surgimento de bandas proteicas, sendo em seguida lavada em água destilada e incubada em solução de bloqueio por 1 hora em temperatura ambiente ou por 18 horas a 4°C.

Seguiu-se com a incubação do anticorpo primário (Tabela 7) diluído em solução de bloqueio e incubado por 1 hora em temperatura ambiente com agitação constante. Em seguida, a membrana foi lavada com tampão TBS-T 0,1% por 3 vezes de 10 minutos.

O anticorpo secundário (Tabela 8) diluído em solução de bloqueio foi incubado durante 1 hora com agitação constante em temperatura ambiente, seguido de 3 lavagens com tampão TBS-T 0,1% por 10 minutos.

A imunodeteção com peroxidase na membrana foi revelada com o kit *SuperSignal West Pico* (Thermo Scientific) em fotodocumentador de quimioluminescência L-Pix Chemi Express (Loccus Biotecnologia).

TABELA 7 - ANTICORPOS PRIMÁRIOS UTILIZADOS EM IMUNODETECÇÃO POR WESTERN BLOT

Anticorpo	Diluição	Referencia
anti-TcGAPDH, produzido em camundongo	1:10.000	Produzido <i>in house</i>
anti-GFP, produzido em camundongo	1:500	Produzido <i>in house</i>
anti-GST, produzido em coelho	1:10.000	Sigma-Aldrich
anti-HA (monoclonal)	1:1000	Invitrogen
anti-HIS (monoclonal)	1:3000	Sigma-Aldrich
anti-TcSub2, produzido em coelho	1:600	Produzido <i>in house</i>
anti-TcZC3H24, produzido em camundongo	1:50	Produzido <i>in house</i>

FONTE: A autora (2019).

TABELA 8 - ANTICORPOS SECUNDÁRIOS UTILIZADOS EM IMUNODETECÇÃO POR WESTERN BLOT

Anticorpo	Diluição	Referencia
anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase	1:10.000	Invitrogen
anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase	1:4000	Invitrogen

FONTE: A autora (2019).

4.12.6 Imunolocalização por imunofluorescência indireta

Os parasitas foram coletados e lavados duas vezes em tampão PBS. Estes foram fixados em paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M pH 7,0 por 30 minutos e depositados em lâminas previamente tratadas com poli-L-lisina (1 µg/mL). Após a permanência dos parasitas sobre a lâmina por 20 minutos, estes foram lavados com PBS por 3 vezes durante 5 minutos. Prosseguiu-se com a permeabilização pela adição de Triton-X 100 0,1% em PBS por 5 minutos e nova lavagem com PBS.

Em seguida, as lâminas foram incubadas em câmara úmida com solução de bloqueio durante 1h a temperatura ambiente ou durante 18 horas a 4°C, sendo novamente lavadas com PBS.

Os parasitas foram incubados com anticorpo primário (Tabela 9) diluído em solução de bloqueio por 1 hora, com subsequente lavagem em PBS. Prosseguiu-se com a incubação do anticorpo secundário (Tabela 10) diluído em solução de bloqueio por 1 hora juntamente com o corante de DNA Hoechst 33258 na concentração de 1 µg/mL, por 1 h a 37°C.

As lâminas foram lavadas com PBS por 3 vezes durante 5 minutos e uma vez com água bidestilada por 2 minutos, foram secas e montadas com o reagente ProLong™ Gold Antifade (Invitrogen), mantidas em -20°C até o momento da análise.

O controle negativo procedeu-se conforme acima citado, porém a lâmina foi incubada apenas com solução de bloqueio na ausência do anticorpo primário.

As lâminas foram analisadas por microscópio óptico invertido de fluorescência DMI 6000 B (Leica Microsystems) com aumento ocular de 1000x, câmera Leica DFC300FX e processadas pelo software *Leica Application Suite* software Versão 3.1.0 (Leica Microsystems).

TABELA 9 - ANTICORPOS PRIMÁRIOS UTILIZADOS EM IMUNOLOCALIZAÇÃO POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Anticorpo	Diluição	Referencia
anti-HA, produzido em coelho	1:500	Sigma-Aldrich
anti-TcZC3H24, produzido em camundongo	1:30	Produzido <i>in house</i>

FONTE: A autora (2019).

TABELA 10 - ANTICORPOS SECUNDÁRIOS UTILIZADOS EM IMUNOLOCALIZAÇÃO POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Anticorpo	Diluição	Referencia
anti-IgG de camundongo conjugado com fluoróforo Alexa Flúor-488	1:500	Invitrogen
anti-IgG de coelho conjugado com fluoróforo Alexa Flúor-488	1:500	Invitrogen

FONTE: A autora (2019).

4.13 CLONAGEM E EXPRESSÃO DE TcZC3H24 EM SISTEMA HETERÓLOGO

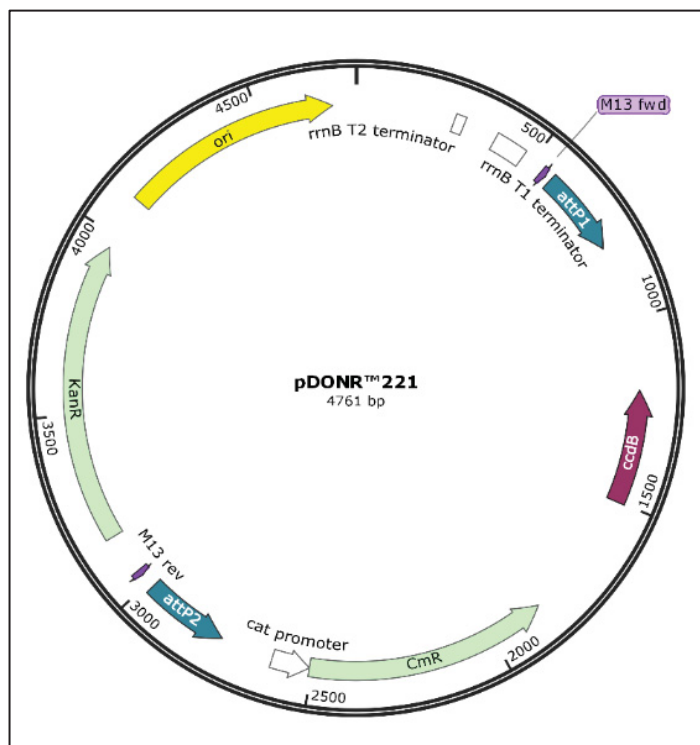
A obtenção do vetor de expressão para a proteína TcZC3H24 em *E. coli* foi obtido utilizando a plataforma Gateway® de clonagem (Invitrogen).

4.13.1 Obtenção do clone em vetor de entrada

A partir de DNA genômico de *T. cruzi* foi realizado uma PCR (item 4.12.4) com os oligonucleotídeos iniciadores ZC3H24_GTW2A_F e ZC3H24_GTW_R2 (Tabela 4). O produto desta PCR foi purificado com o QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) e quantificado por espectrofotometria com uso do equipamento NanoDrop® (Thermo Scientific).

Este produto de PCR, contendo os sítios de recombinação *attB1* e *attB2*, foi recombinado no vetor de entrada pDONR[®] 221 (Figura 11), de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen).

FIGURA 11 - MAPA DO VETOR DE ENTRADA pDONR[™] 221



NOTA: ori: origem de replicação de alta cópia, *attP1/attP2*: sequência de 200 bp para recombinação com sítio *attB*, *ccdB*: gene que permite seleção negativa do pDONR, *KanR*: gene de resistência a canamicina, *CmR*: gene de resistência ao cloranfenicol. T1/T2: terminadores de transcrição, M13 *Forward* e *Reverse*: Oligonucleotídeos iniciadores do vetor utilizados para sequenciamento.

FONTE: SnapGene (GSL Biotech).

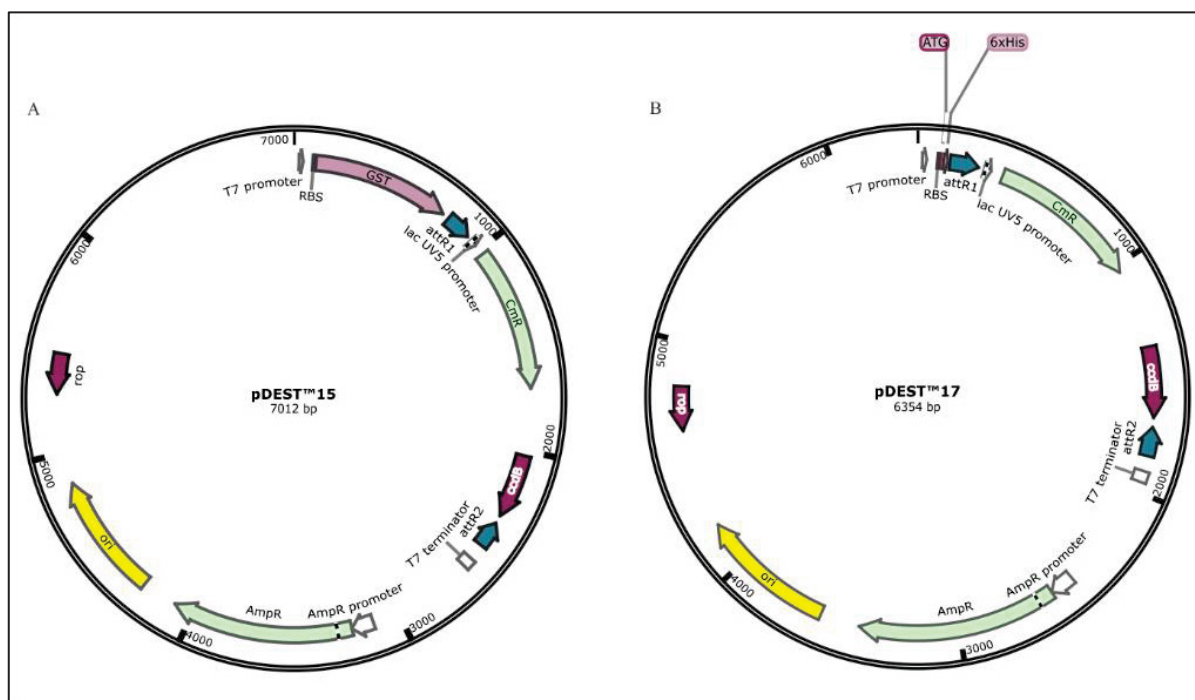
Assim, foram utilizados 50 fmol do amplicon purificado, 150 fmol do vetor pDONR[®] 221, 1 µL do mix de recombinases BP Clonase II[™], solução tampão TE pH 8,0 em volume final de 10 µL. Esta reação foi incubada a 25°C por 18 horas e inativada a 37°C com 2 µg de Proteinase K (Invitrogen) por 10 minutos.

Esta reação foi transformada em células competentes de *E. coli* TOP10 (item 4.9.2). A presença do inserto no vetor de entrada foi confirmada por PCR de colônia (item 4.9.3.3) e um clone foi amplificado por minipreparação de plasmídeo (item 4.9.4), obtendo-se o vetor de entrada intermediário pENTRY-ZC3H24-A.

4.13.2 Obtenção do clone em vetor de destino

O vetor de entrada pENTRY-ZC3H24-A foi submetido a reações de recombinação com os vetores de destino pDESTTM15 e pDESTTM17 (Figura 12).

FIGURA 12 - MAPA DOS VETORES pDESTTM15 e pDESTTM17



NOTA: Em (A) o vetor pDESTTM15, possuindo a etiqueta GST, em (B) o vetor pDESTTM17, com ATG: Códon de início (ATG) e etiqueta de histidinas (6xHis).

LEGENDA: T7: Promotor de T7 RNA Polimerase, RBS: Região de ligação ao ribossomo, Sítios *attR* (*attR1* e *attR2*): região de recombinação, *CcdB*: gene de resistência ao cloranfenicol, *AmpR*: gene de resistência à ampicilina, *ccdB*: gene que permite seleção negativa do vetor, T7 terminator: região de término da transcrição.

FONTE: SnapGene (GSL Biotech).

Cada reação de recombinação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen): 150 ng do vetor de entrada pENTRY-ZC3H24-A, 150 ng do vetor de destino, 1 µL do mix de recombinases LR Clonase IITM, solução tampão TE pH 8,0 em volume final de 10 µL. Cada reação foi incubada a 25°C por 18 horas e inativada a 37°C com 2 µg de Proteinase K (Invitrogen) por 10 minutos, sendo transformadas em células competentes de *E. coli* TOP10 (item 4.9.2). Um clone de cada célula transformada foi amplificado por minipreparação de plasmídeo (item 4.9.4), obtendo-se os vetores de expressão pDEST15-ZC3H24 e pDEST17-ZC3H24.

Os vetores pDEST15-ZC3H24 e pDEST17-ZC3H24 tiveram sua identidade confirmada por sequenciamento de DNA (Macrogen, Coreia do Sul).

4.13.3 Expressão e purificação de TcZC3H24 recombinante

4.13.3.1 Expressão de TcZC3H24 recombinante em sistema heterólogo

Para a expressão da proteína TcZC3H24 recombinante foram utilizadas as cepas de *E. coli* BL21(DE3), BL21 Star™(DE3), BL21(DE3)pLysS, Rosetta-gami™2(DE3) e NiCo21(DE3).

Os testes iniciais de indução seguiram de acordo com o item 4.13.3.1.1, objetivando a análise do desempenho da indução.

A expressão da proteína TcZC3H24 recombinante em maior escala foi realizada de acordo como protocolo descrito no item 4.13.3.1.2.

4.13.3.1.1 Expressão com indução a 37°C

Foi realizado um pré-inóculo semeando-se uma colônia bacteriana em 2 mL de meio LB acrescido do antibiótico de resistência, mantido em estufa bacteriológica por 18 horas a 37°C sob agitação constante de 200 rpm.

Decorrido 18 horas, um inóculo de 5 mL foi preparado diluindo-se o pré-inóculo na proporção 1:100. Este inóculo foi incubado a 37°C sob agitação constante de 200 rpm e permaneceu em estufa bacteriológica até que a leitura de sua densidade óptica (DO_{600nm}) atingisse entre 0,4 e 0,6 em espectrofotômetro.

A indução ocorreu com a adição de um análogo da lactose, IPTG (Isopropil-tio-β-D-galactosídeo), em concentração de 1 mM durante 4 h a 37°C sob agitação constante de 200 rpm.

A cultura foi sedimentada por centrifugação a 5.000 g por 3 minutos e o sedimento bacteriano ressuspenso em 250 µL de PBS. A cultura foi analisada quanto ao desempenho da indução por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante, conforme descrito em 4.13.3.2.

Para o controle negativo da indução apenas não foi adicionado IPTG à cultura.

4.13.3.1.2 Expressão com indução a 22°C

Foi realizado um inóculo semeando-se uma colônia bacteriana em 2 mL de meio LB acrescido do antibiótico de resistência, mantido em estufa bacteriológica por 6 horas a 37°C sob agitação constante de 200 rpm. Decorrido 6 horas, 100 µL desta cultura foi semeada em

placa de Petri com meio LB ágar acrescido do antibiótico de resistência e mantida em estufa bacteriológica a 37°C por 18 horas.

A cultura bacteriana foi recuperada adicionando-se 5 mL de meio LB à placa e transferindo este volume, após homogeneização, a um inóculo de 200 mL de meio LB acrescido do antibiótico de resistência, o qual foi mantido a 37°C sob agitação constante de 200 rpm por 6 h. Em seguida, a cultura permaneceu em gelo por 15 minutos e a ela foi adicionado IPTG em concentração de 0,5 mM e acondicionada em estufa bacteriológica por 18 horas a 22°C com agitação constante de 200 rpm.

A cultura foi sedimentada por centrifugação a 13000 g por 10 minutos a 4°C e prosseguiu-se para a purificação da proteína TcZC3H24 recombinante, conforme descrito no item 4.13.3.3.

4.13.3.2 Ensaio de solubilidade

Células bacterianas (250 µL) provenientes do item 4.13.3.1.1 foram rompidas em sonificador (Ultrasonic Homogenizer 4710 series, Cole Parmer,) com 5 pulsos de ultrassom na potência 9, durante 15 segundos, com intervalo de dois minutos entre eles e em banho de gelo.

O material rompido foi sedimentado por centrifugação a 5000 g por 3 minutos, sendo o sobrenadante (fração solúvel) armazenado e o sedimento (fração insolúvel) ressuspenso em 250 µL de PBS. A estas frações foi adicionado 83 µL de tampão de amostra 4X e as mesmas desnaturadas por aquecimento a 100°C por 10 minutos. Prosseguiu-se com a análise das frações em eletroforese de poliacrilamida desnaturante (item 4.12.2).

Para a proteína recombinante expressa sob a forma de corpúsculos de inclusão foi realizado um ensaio de solubilização em gradiente de ureia. Para isso, oito amostras contendo 1 mL de cultura induzida foram centrifugadas a 10000 g por 3 minutos e o sedimento ressuspenso em 75 µL de tampão de lavagem contendo ureia em concentrações que variaram de 1M a 8M. Assim, as amostras contendo uma concentração molar de ureia em progressão aritmética de 1M, permaneceram em banho de gelo por 30 minutos, sendo em seguida centrifugadas a 10000 g por 3 minutos.

O sobrenadante (fração solúvel) foi armazenado e o sedimento (fração insolúvel) foi ressuspenso em 75 µL de tampão de amostra. A estas frações foi adicionado 25 µL de tampão de amostra 4X e as mesmas desnaturadas por aquecimento a 100°C por 10 minutos. Prosseguiu-se com a análise em eletroforese de poliacrilamida desnaturante (item 4.12.2).

4.13.3.3 Purificação de TcZC3H24 recombinante

O sedimento bacteriano proveniente do item 4.13.3.1.2 foi ressuspenso em 5 mL de PBS acrescido de PMSF em concentração final de 1 mM. Seguiu-se com o rompimento celular sob alta pressão em microfluidificador (M110, Microfluidics) com pressão de 80 psi por 15 ciclos em banho de gelo.

O lisado celular foi centrifugado por 10 minutos em 10000 g a 4°C e o sedimentado lavado três vezes em 15 mL de tampão de lavagem e uma vez em 15 mL de PBS. O sedimento resultante da última lavagem foi ressuspendido em 1,5 mL de PBS e 500 µL de tampão de amostra 4X, sendo desnaturado a 100°C por 10 minutos.

Este extrato foi submetido à eletroforese SDS-PAGE em gel preparativo, com concentração de acrilamida de 12%, em corrente constante de 15 mA por 18h. O gel foi corado em KCl 1 M e a banda de interesse excisada do gel e submetida a eletroeluição em membrana SnakeSkin Dialysis Tubing 10K MWCO (Thermofisher) em tampão de eletroforese para SDS-PAGE com voltagem constante de 100V por 2 horas.

A solução eletroeluída foi submetida a diálise em membrana SnakeSkin Dialysis Tubing 10K MWCO (Thermofisher) e tampão de diálise. A solução tampão foi trocada pelo menos 3 vezes a cada 4 horas, sob temperatura de 4°C. Por fim, a proteína TcZC3H24 recombinante foi analisada em eletroforese de gel de poliacrilamida desnaturante (item 4.12.2).

4.14 OBTENÇÃO DO SORO ANTI-TcZC3H24

4.14.1 Animais

Os animais utilizados para a produção do soro anti-TcZ3H24 consistiram de camundongos machos da linhagem Swiss com aproximadamente 2 meses de idade, totalizando três 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, sob o código de aprovação pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA FIOCRUZ) protocolo LW-34/16.

4.14.2 Imunização

Na semana anterior ao início das imunizações foi coletado o soro pré-imune dos animais pela sangria da extremidade distal da cauda e realizado testes de reatividade por Western Blot em extratos de *T. cruzi* epimastigotas (item 4.12.5).

A proteína purificada TcZC3H24 foi diluída em PBS e ureia 4M com a suspensão do adjuvante a base de hidróxido de alumínio Alu-Gel-S (SERVA Eletrophoresis) a 40% (v/v), na concentração final de 1,0 µg/µL.

A cada inoculação o animal recebeu 80 µg da proteína, totalizando quatro imunizações intraperitoneais, com intervalos de duas semanas cada.

Uma semana após a última imunização, os animais foram anestesiados com quetamina 100 mg/kg e xilazina 20 mg/kg intraperitoneal, sendo coletado o sangue por punção cardíaca.

Após a exsanguinação dos animais, eles foram eutanasiados por deslocamento cervical.

4.14.3 Processamento da amostra

O sangue coletado foi coagulado a 37°C por 1 hora e centrifugado a 4000 g por 10 minutos a 4°C a fim de separar o soro das células sanguíneas. Este foi aliquoteado em frações de 50 µL e mantidos a -20°C.

4.15 NOCAUTE DE *TcZC3H24* POR CASSETES CLÁSSICOS

4.15.1 Amplificações das regiões do gene *TcZC3H24*

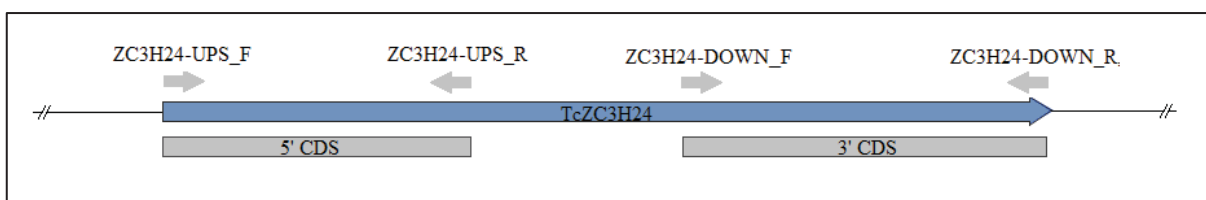
Para as amplificações das regiões codificadoras do gene *TcZC3H24* foi utilizada a anotação depositada por Grisard et al. (2014) disponível no banco de dados TritypDB (*TriTrypDB: The Kinetoplastid Genomics Resource*, 2016) sob a identificação de acesso (TritypDB Gene ID) TCDM_03246 (Figura 13).

Assim, parte da região CDS do gene compreendendo os nucleotídeos 4 a 203, denominada 5'CDS, e aquela compreendendo os nucleotídeos 529 a 768, denominada 3'CDS, foram amplificadas por PCR utilizando os pares de *primers* (Tabela 4) ZC3H24-UPS_F + ZC3H24-UPS_R e ZC3H24-DOWN_F + ZC3H24-DOWN_R, respectivamente, a partir do DNA genômico de *T. cruzi* Dm28c.

As reações de PCR foram processadas de acordo com o item 4.12.4. Os fragmentos de DNA amplificados foram purificados com o QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN).

O fragmento 5'CDS foi digerido com as enzimas de restrição *KpnI* e *SalI*, enquanto o fragmento 3'CDS foi digerido com as enzimas *BamHI* e *XbaI*, utilizando-se 20 U de cada enzima e seus respectivos tampões em volume final de 50 µL, a 37°C por 5 horas, sendo em seguida novamente purificados.

FIGURA 13 - DESENHO ESQUEMÁTICO DA LOCALIZAÇÃO DAS REGIÕES 5'CDS E 3'CDS NO GENE *TcZC3H24*



NOTA: As setas cinzas indicam a posição dos iniciadores utilizados para a amplificação das regiões 5'CDS e 3'CDS para o gene *TcZC3H24* (TritypDB Gene ID: TCDM_03246).

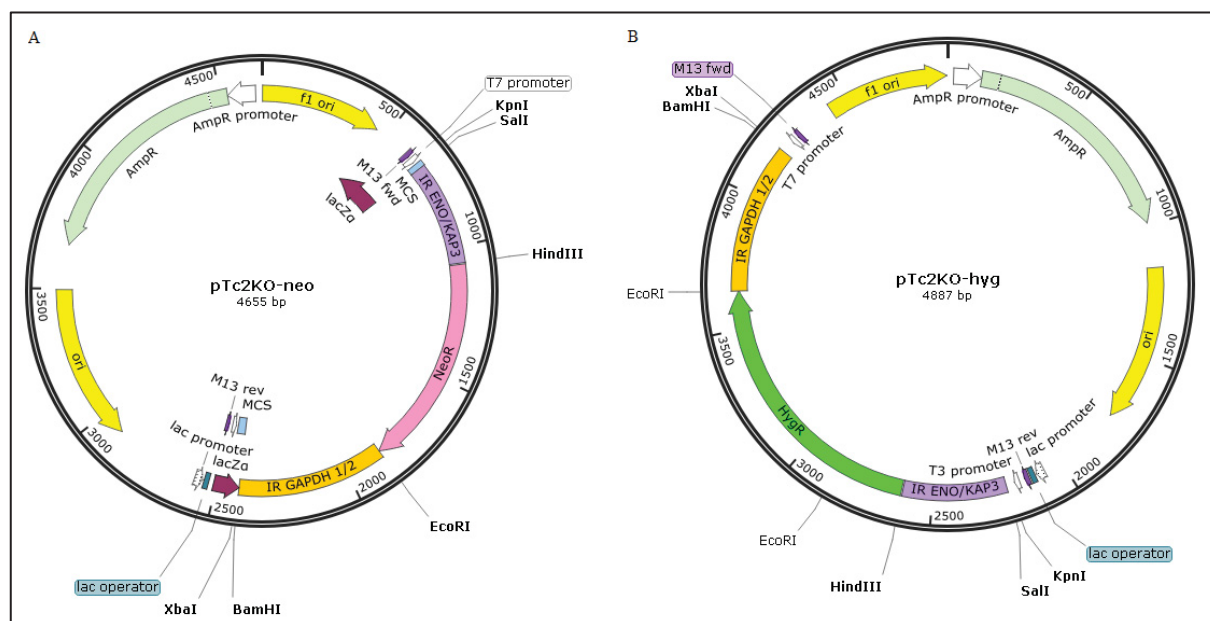
FONTE: A autora (2019).

4.15.2 Obtenção dos vetores pTc2KO-ZC3H24-neo e pTc2KO-ZC3H24-hyg

Para o nocaute por cassetes contendo genes repórteres do gene *TcZC3H24* foram utilizados os vetores pTc2KO-neo e pTc2KO-hyg (Pavani et al., 2016) construídos a partir do vetor pBlueScript II KS (Stratagene). O vetor pTc2KO-neo possui o gene que codifica a enzima neomicina fosfotransferase, a qual confere resistência ao antibiótico neomicina (G418) e pTc2KO-hyg contém o gene que codifica a enzima higromicina fosfotransferase, conferindo resistência ao antibiótico higromicina B (Figura 14).

Nestes plasmídeos, os genes de resistência a antibiótico são flanqueados por duas sequências obtidas de regiões não codificantes do genoma de *T. cruzi*, situadas entre os genes que codificam as proteínas enolase (TcCLB.511529.90) e KAP3 (TcCLB.511529.80), denominado “IR NEO/KAP3”, e entre duas cópias do gene que codifica a enzima GAPDH (TcCLB.506943.60 e TcCLB.506943.50), denominado “IR GAPDH 1/2”

FIGURA 14 - MAPA DOS VETORES pTc2KO-neo e pTc2KO-hyg



NOTA: Em (A) o vetor pTc2KO-neo e em (B) o vetor pTc2KO-hyg, onde são mostradas as regiões intergênicas que flanqueiam os genes de resistência (IR ENO/KAP3 e IR GAPDH 1/2) e os sítios de restrição utilizados para a clonagem das regiões 5'CDS e 3'CDS e para troca dos genes de resistência.

FONTE: A autora (2019). Desenvolvido com auxílio do software SnapGene (GSL Biotech).

O vetor pTc2KO-neo foi digerido com as enzimas de restrição *KpnI* e *SalI* para a clonagem do fragmento 5'CDS, digestão realizada nas mesmas condições do inserto. Estes foram ligados na proporção de 1 pmol de vetor para cada 5 pmol de inserto, com 1U de enzima T4 DNA ligase (1 U/μL), T4 DNA ligase buffer 1X, a 16°C por 18 horas, em volume final de 10 μL.

O produto da ligação foi transformado em *E. coli* TOP10 (item 4.9.2) e analisado pela técnica de Toothpick e PCR de colônia (item 4.9.3).

Após minipreparação do plasmídeo recombinante (item 4.9.4), este foi digerido com as enzimas *BamHI* e *XbaI* e ligado ao fragmento 3'CDS. As condições tanto para a digestão quanto para a ligação foram as mesmas citadas para a clonagem da região 5'CDS.

O produto desta ligação foi transformado em *E. coli* TOP10 (item 4.9.2), analisado pela técnica de *Toothpick* e PCR de colônia (item 4.9.3) e extraído por minipreparação de plasmídeo (item 4.9.4).

O plasmídeo recombinante desta etapa resultou no vetor pTc2KO-ZC3H24-neo (Figura 15A), cuja identidade foi confirmada por digestão com as enzimas *XbaI/SalI* e *BamHI/XbaI* e por sequenciamento de DNA (Macrogen, Coreia do Sul).

Um segundo plasmídeo foi construído a fim de nocautear o segundo alelo do gene *TcZC3H24*. Dado que o genoma do *T. cruzi* é diploide, uma marca de seleção diferente se fez necessária.

Deste modo, o gene que codifica a enzima neomicina fosfotransferase presente no vetor pTc2KO-ZC3H24-neo foi substituído pelo gene que codifica a enzima higromicina fosfotransferase presente no vetor pTc2KO-hyg.

Assim, os plasmídeos pTc2KO-ZC3H24-neo e pTc2KO-hyg foram digeridos com as enzimas de restrição *HindIII* e *EcoRI*, utilizando-se 20 U de cada enzima e seus respectivos tampões em volume final de 50 µL, a 37°C por 5h.

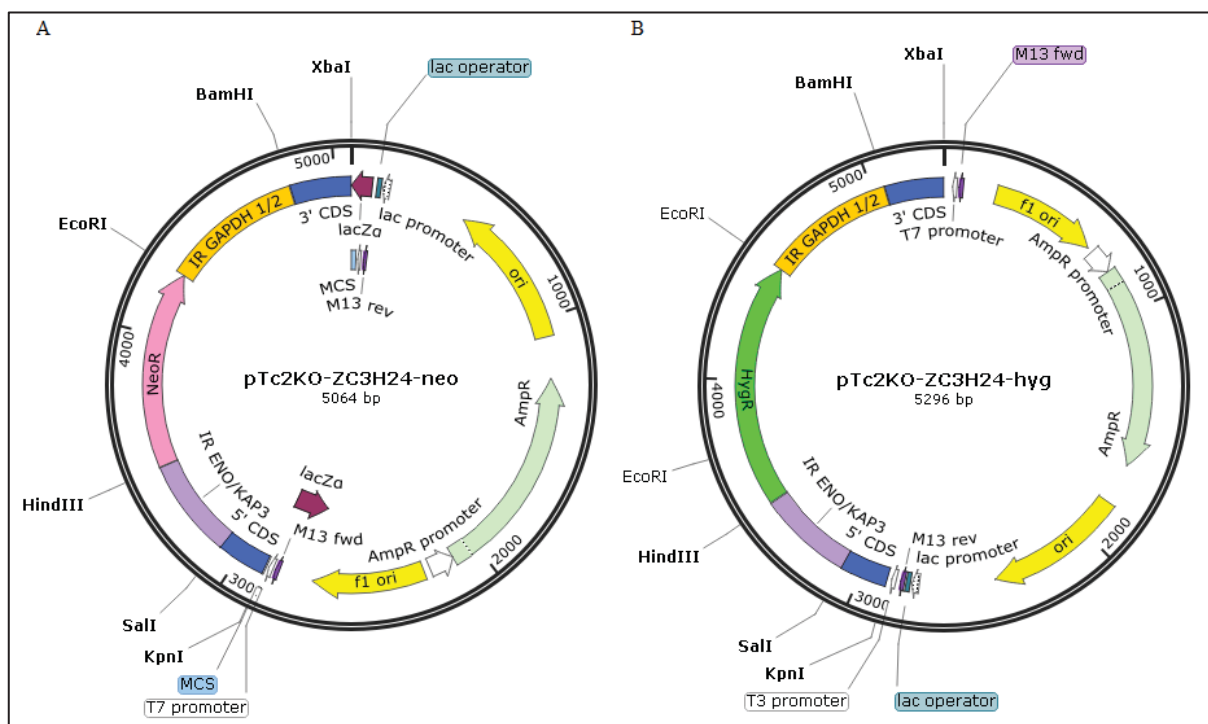
Os produtos destas digestões foram submetidos a eletroforese com gel de agarose 1% (item 4.12.3). O gel permaneceu em banho com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por aproximadamente 20 minutos, sendo em seguida analisado em transiluminador de luz ultravioleta (UV).

Foi excisado do gel a banda de tamanho 4265 bp (correspondente ao vetor pTc2KO-ZC3H24-neo sem a sequência que codifica o gene de resistência a neomicina fosfotransferase) e a banda de tamanho 1026 bp (correspondente a sequência que codifica a enzima higromicina fosfotransferase). Estes fragmentos foram purificados com o QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) e submetidos a uma reação de ligação na proporção de 1 pmol de vetor para cada 5 pmol de inserto, com 1U de enzima T4 DNA ligase (1 U/µL), T4 DNA ligase buffer 1X, a 16°C por 18 horas, em volume final de 10 µL.

O produto desta ligação foi transformado em *E. coli* TOP10 (item 4.9.2), analisado pela técnica de *Toothpick* e PCR de colônia (item 4.9.3) e extraído por minipreparação de plasmídeo (item 4.9.4).

O plasmídeo recombinante desta etapa resultou no vetor pTc2KO-ZC3H24-hyg (Figura 15B), cuja sequência foi confirmada por sequenciamento de DNA (Macrogen, Coreia do Sul).

FIGURA 15 - MAPA DOS VETORES pTc2KO-ZC3H24-neo E pTc2KO-ZC3H24-hyg



NOTA: Em (A) o vetor pTc2KO-ZC3H24-neo, em (B) o vetor pTc2KO-ZC3H24-hyg.

Nesta figura é observado a inserção das regiões 5'CDS e 3'CDS do gene *TcZC3H24* nos vetores pTc2KO-neo e pTc2KO-hyg, os sítios de restrição enzimática utilizados para a clonagem das regiões 5'CDS e 3'CDS e os sítios de restrição para troca do gene de resistência.

FONTE: A autora (2019). Desenvolvido com auxílio do software SnapGene (GSL Biotech).

4.15.3 Amplificação dos cassetes 5'CDS-NEO-3'CDS e 5'CDS-HYGRO-3'CDS

Os cassetes 5'CDS-NEO-3'CDS e 5'CDS-HYGRO-3'CDS, fragmentos que serão transfectados em *T. cruzi* com a finalidade de gerar recombinação homóloga, foram amplificados por PCR com os pares de iniciadores ZC3H24_UPS_F e ZC3H24_DOWN_R (Figura 16).

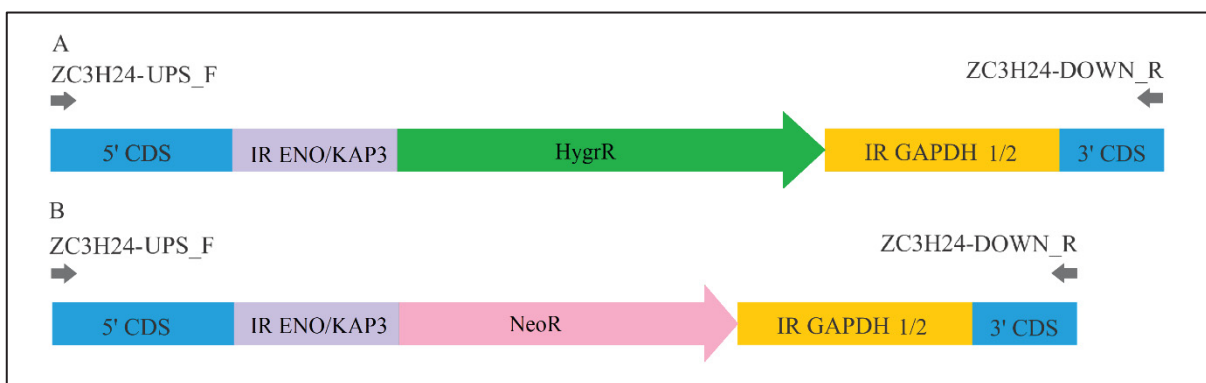
As reações de PCR foram executadas de acordo com o item 4.12.4, sendo amplificado cerca de 1 mL de material.

Os produtos resultantes das reações de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8% (item 4.12.3).

Os géis foram corados em brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por aproximadamente 20 minutos, os mesmos foram analisados em transiluminador de luz ultravioleta (UV) e os *amplicons* excisados do gel com auxílio de bisturi, os quais foram submetidos à extração por eletroeluição. A eletroeluição deu-se em tampão TBE 1X com voltagem constante de 100 V por 1 hora, utilizando para isso a membrana de diálise SnakeSkin™ Dialysis Tubing, 10K MWCO, 22 mm (Thermofisher).

Os materiais foram precipitados com etanol (item 4.12.1), suspensos em 40 μ L de água ultrapura e quantificados por espectrofotometria com uso do equipamento NanoDrop® (Thermoscientific).

FIGURA 16 - CASSETES PARA NOCAUTE POR RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA PARA O GENE *TcZC3H24*



NOTA: Em (A), representação do cassette 5'CDS-HYGRO-3'CDS, com a sequência que codifica a enzima higromicina fosfotransferase. Em (B) representação do cassette 5'CDS-NEO-3'CDS, com o gene de resistência que codifica a enzima neomicina fosfotransferase. As setas cinzas indicam a posição dos iniciadores utilizados para a amplificação dos cassetes.

FONTE: A autora (2019).

4.15.4 Transfecção dos cassetes 5'CDS-NEO-3'CDS e 5'CDS-HYGRO-3'CDS

Primeiramente, foi transfectado o cassette 5'CDS-NEO-3'CDS em *T. cruzi* e selecionado os mutantes resistentes a neomicina (500 μ g/mL), conforme descrito no item 4.11.8.1.

Foi extraído DNA genômico (item 4.11.7) dos parasitas resistentes a G418 e verificado a correta integração do cassette 5'CDS-NEO-3'CDS no locus do gene *TcZC3H24*.

Para esta verificação foi realizado uma PCR (item 4.12.4) com os pares de primers ZC3H24_Ext_F + Neo_R e ZC3H24_Ext_R + Neo_Out_F. (Tabela 4), sendo que os iniciadores ZC3H24_Ext_F e ZC3H24_Ext_R pertencem a regiões externas ao locus do gene *TcZC3H24*, não estando presentes nos cassetes.

Após confirmação da correta inserção do cassette 5'CDS-NEO-3'CDS no locus do gene *TcZC3H24*, e consequente deleção de um dos alelos do gene, foi transfectado o cassette 5'CDS-HYGRO-3'CDS e selecionado os mutantes resistentes a G418 (500 μ g/mL) e higromicina (500 μ g/mL), conforme descrito no item 4.11.8.1.

Novamente, foi extraído DNA genômico (item 4.11.7) dos parasitas resistentes a G418 e higromicina e verificado a correta integração de ambos os cassetes no locus do gene

TcZC3H24. Para isso, foi realizado uma PCR (item 4.12.4) com os pares de iniciadores: ZC3H24_Ext_F + Neo_R, ZC3H24_Ext_R + Neo_Out_F, ZC3H24_Ext_F + Higo_R e ZC3H24_Ext_R + Higo_Out_F (Tabela 4).

Após a confirmação do tamanho esperado para os produtos resultantes destas quatro reações, e consequente inativação dos dois alelos do gene *TcZC3H24*, procedeu-se a obtenção de populações clonais dos parasitas resistentes a ambas as drogas através de citometria de fluxo (*Single Cell Sorting*).

4.15.5 *Single Cell Sorting*

Os parasitas resistentes a G418 e higromicina foram cultivados em LIT até uma densidade de 3×10^7 células/mL. Um total de 1×10^6 células foram coletadas por centrifugação a 3000 g por 3 minutos.

Os parasitas foram ressuspensos em 1 mL de PBS e submetidos a análise em citômetro FACS Aria II (BD Biosciences). Foi selecionada a população celular mais homogênea pelo gráfico de contorno (*contour plot*) com os parâmetros referentes a tamanho relativo da célula (FSc - *forward scatter*) por granulosidade (SSc - *side scatter*) e submetidos a separação celular utilizando o parâmetro de precisão “*Single Cell*” no software FACSDiva (BD Biosciences).

Deste modo, foi coletado uma célula por poço em placa de 96 poços de fundo chato contendo 100 µL de LIT suplementado com penicilina 100UI/mL, estreptomicina 10 µg/mL, G418 500 µg/mL e higromicina 500 µg/mL.

Os parasitas foram incubados a 28°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, observando-se crescimento celular após cerca de 20 dias.

Finalmente, fez-se uma triagem para a expressão da proteína TcZC3H24 nos clones resultantes.

4.16 NOCAUTE DO GENE *TcZC3H24* PELA TÉCNICA CRISPR/Cas9

4.16.1 Obtenção do RNA guia

Para a obtenção de parasitas nocautes nulos (KO) para o gene *TcZC3H24* pela técnica CRISPR/Cas9 foi utilizada a metodologia descrita por Soares Medeiros et al. (2017).

O primer Cas9ZC3H24_Ko_F, que definiu a especificidade do gRNA da Cas9 para o gene *TcZC3H24*, bem como o oligonucleotídeo complementar ao gene *TcZC3H24* (*Donor DNA*), usado para o reparo do DNA após a clivagem do gene *TcZC3H24* pela Cas9 (Tabela 11) foram obtidos com o auxílio da plataforma online Eukaryotic Pathogen CRISPR guide RNA/DNA Design Tool – EuPaGDT (<http://grna.ctegd.uga.edu>). As sequências foram determinadas para a utilização da nucleasse Cas9 de *Staphylococcus aureus* (SaCas9).

TABELA 11 - INICIADORES E SEQUÊNCIA UTILIZADOS PARA AS AMPLIFICAÇÕES E CLONAGENS RESULTANTES NO NOCAUTE POR CRISPR/Cas9

Nome do iniciador/sequência	Sequência (5'- 3')
	GAGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGGAGAGCAGGTGCAGT CCGTGACGCTTGTTTTAGTACTCTGTAATTTTAGGTATGAGGTA GACGAAAATTAC
Cas9ZC3H24_KO_F	Onde: GAGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGA: Sítio promotor da T7 RNA polimerase GCAGGTGCAGTCCGTGACGCTT: gRNA selecionado na plataforma EuPaGDT GTTTGTAGTACTCTGTAATTTTAGGTATGAGGTAGACGAAAATTT AC: Iniciador senso da sequência <i>scaffold</i>
SaCas9gscaf-R	AAAAAATCTCGCCAACAAGTTGACGAGAT CTTCCCTCGGAGCAGGTGCAGTCCGTGACGTAGATAGATAGGC GGCCGCCTTCCGAATCTTCTTTCGTTGCGTTCGCCG
<i>Donor DNA</i>	Onde: TAGATAGATAG: Códon de parada para as três fases de leitura aberta GCGGCCGC: Sequência de reconhecimento da enzima de restrição <i>NotI</i> GTTTGTAGTACTCTGTAATTTTAGGTATGAGGTAGACGAAAATTT ACTTATACCTAAAATTACAGAATCTACTAAAACAAGGCAAAAG CCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTGGCGAGATTTTTTT
Sequência <i>scaffold</i> da SaCas9	

FONTE: A autora (2019).

Os *primers* Cas9ZC3H24_Ko_F e SaCas9gscaf-R (Tabela 11) foram utilizados para realizar a amplificação da sequência *scaffold* do gRNA da SaCas9, necessária para a ligação da Cas9 ao ribocomplexo. O produto dessa reação foi em seguida usado para transcrição *in vitro* e obtenção do RNA guia.

Esta reação de PCR foi realizada nas seguintes condições: aproximadamente 30 ng de DNA molde (sequência *scaffold* da SaCas9, cedida pela Dra Lia Carolina Soares Medeiros Kuczera, Instituto de Biologia Molecular do Paraná), 50 pmol de cada *primer*, 400 μ M de cada dNTP; tampão Phusion HF 1X (Biolabs) e 2 unidades de Phusion DNA polimerase (Biolabs) em reação final de 50 μ L. As condições da reação foram: desnaturação a 98°C por 30 segundos, seguidos de 35 ciclos com desnaturação a 98°C por 10 segundos; anelamento a 66°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 15 segundos, e por fim 1 ciclo de 5 minutos a 72°C. O produto de PCR foi purificado com o MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN).

Para a transcrição *in vitro* foi utilizado o MEGAscript™ T7 Transcription Kit (Invitrogen), procedimento realizado conforme orientações do fabricante. Após finalização da reação de transcrição *in vitro*, o RNA guia foi precipitado com etanol (item 4.12.1) e ressuspenso em água ultrapura livre de RNase.

O RNA foi analisado por eletroforese em gel de agarose 2% (item 4.12.3), quantificado por espectrofotometria no aparelho NanoDrop® (Thermoscientific) e armazenado a -70°C.

4.16.2 Transfecção do gRNA em *T. cruzi*

Para a transfecção do RNA guia, *Donor* DNA e SaCas9 em *T. cruzi* procedeu-se conforme descrito no item 4.11.8.2, com algumas modificações.

O RNA guia foi aquecido a 90°C por 5 minutos e resfriado a temperatura ambiente, seguida da adição da endonuclease SaCas9 (cedida pela Dra. Lia Carolina Soares Medeiros Kuczera, IBMP) em concentração equimolar ao gRNA, em um volume final de 20 μ L. A mistura foi incubada a temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos.

Para a transfecção foram coletadas 1×10^7 epimastigotas de *T. cruzi* em fase logarítmica de crescimento e processadas de acordo com o item 4.11.8.2, sendo estas células ressuspenso em 88 μ L de tampão de eletroporação Tb-BSF.

A suspensão celular foi transferida a uma cubeta estéril de eletroporação Gene Pulser® 0,2 cm gap (Bio-Rad) juntamente ao complexo SaCas9/gRNA e a 20 μ g do *Donor* DNA, totalizando um volume final de 110 μ L.

A amostra foi transfectada no eletroporador Amaxa Nucleofector 2b (Lonza), com um pulso único utilizando o programa U-033. Os parasitas transfectantes foram transferidos para uma garrafa de cultivo celular de 25 cm² (Corning) contendo 5 mL de meio LIT suplementado com penicilina (10.000 UI) e estreptomicina (10 µg/mL), sendo mantidos a 28°C em estufa BOD.

Decorrido 48 horas da transfecção, estes parasitas transfectantes foram submetidos a nova transfecção, nas condições citadas neste item (item 4.16.2).

Após 48 horas, os transfectantes foram utilizados para obtenção de clones individuais por citometria (citômetro FACS Aria II, BD Biosciences) conforme descrito no item 4.15.5.

Clones foram obtidos após aproximadamente 20 dias e foram analisados como descrito no item 4.16.3.

4.16.3 Triagem dos transfectantes

Primeiramente, a triagem dos parasitas transfectantes deu-se por PCR (item 4.12.4) com a utilização dos *primers* STOPNOT_R e ZC3H24_Ext_F (Tabela 4).

O iniciador STOPNOT_R hibridiza apenas no alelo mutado, enquanto o ZC3H24_Ext_F hibridiza tanto no mutante quanto no selvagem. Assim, apenas os clones que amplificaram o produto de PCR com o tamanho esperado prosseguiram nos testes.

Em seguida, analisou-se por Western Blotting a expressão do gene *TcZC3H24*, usando o soro anti-TcZC3H24 (item 4.12.5).

Por fim, o produto de PCR do gene *TcZC3H24* de alguns clones, amplificado com os pares de primers ZC3H24_GTW_F e ZC3H24_GTW_R2 (Tabela 4), foi sequenciado a fim de obter confirmação do nocaute (Plataforma de sequenciamento FIOCRUZ, RJ).

4.17 OBTENÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO EM *T. cruzi*

Para a complementação e superexpressão de *TcZC3H24* foram utilizados os vetores de expressão de *Trypanosoma cruzi* pTc3xHA_CO_2-neo, pTc3xHA_NH_2-neo, pTcGFP_NH_2-neo e pTcGFP_CO_2-neo (Tabela 12, Figura 17), modificados dos vetores construídos por Kugeratski et al. (2015).

Eles pertencem a plataforma pTcGW (Batista et al., 2010), os quais foram construídos a partir do pBluescript II (Stratagene) e são baseados no sistema de clonagem por recombinação sítio-específica associado a tecnologia Gateway® (Invitrogen).

Estes vetores apresentam uma cassette Gateway[®] composto pelos sítios de ligação (*att*) *attR1* e *attR2* necessários para recombinação, o marcador selecionável de cloranfenicol, o gene *ccdB* para seleção negativa e resistência à neomicina.

O gene de resistência a neomicina, bem como o gene de interesse são clonados em regiões flanqueadas por regiões integênicas de *T. cruzi*.

Estas regiões intergênicas, presente três vezes neste sistema, fornecem os sinais que dirigem o processamento dos pré-mRNAs transcritos a partir do plasmídeo, após a introdução do plasmídeo em *T. cruzi*.

Os vetores pTc3xHA_CO_2-neo e pTc3xHA_NH_2-neo possuem uma etiqueta HA (hemaglutinina) em tandem.

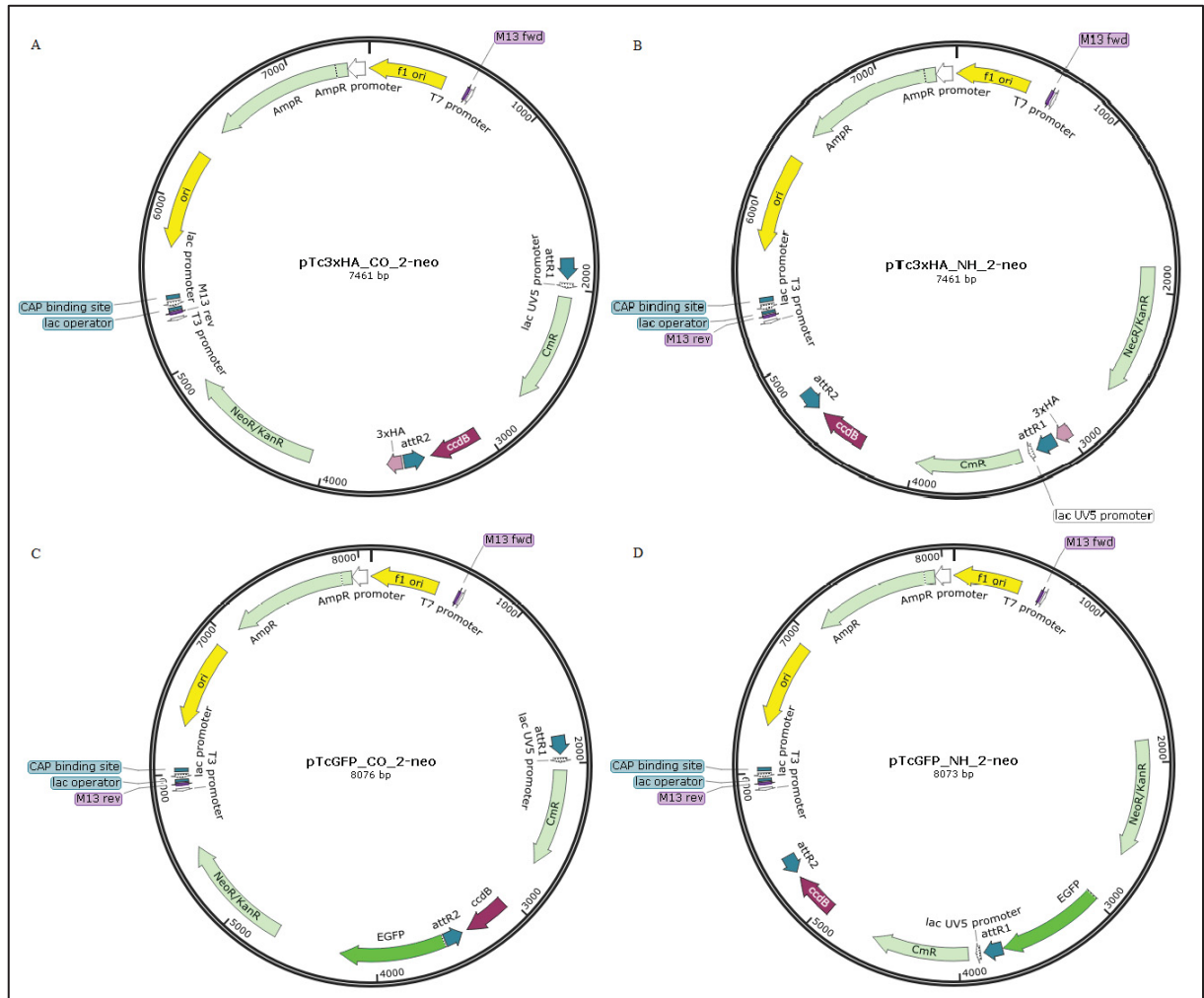
O vetores pTcGFP_NH_2-neo e pTcGFP_CO_2-neo possuem uma etiqueta com a proteína verde fluorescente melhorada (*Enhanced Green Fluorescent Protein*, EGFP), proteína autofluorescente da água-viva *Aequorea victoria* modificada para oferecer maior fluorescência e um único pico de excitação a 488 nm.

TABELA 12 - DESCRIÇÃO DOS VETORES DE DESTINO UTILIZADOS NA EXPRESSÃO DE TcZC3H24 EM *T. cruzi*

Vetor	Característica	Resistência
pTc3xHA_CO_2-neo	Expressão de proteínas fusionadas a três etiquetas HA em tandem na porção C-terminal	G418
pTc3xHA_NH_2-neo	Expressão de proteínas fusionadas a três etiquetas HA em tandem na porção N-terminal	G418
pTcGFP_CO_2-neo	Expressão de proteínas fusionadas a GFP na porção C-terminal	G418
pTcGFP_NH_2-neo	Expressão de proteínas fusionadas a GFP na porção N-terminal	G418

FONTE: A autora (2019).

FIGURA 17 - MAPA DOS VETORES DE EXPRESSÃO EM *T. cruzi* QUE CONFEREM RESISTÊNCIA A NEOMICINA



NOTA: Em (A), o vetor de expressão em *T. cruzi* que confere fusão de 3 etiquetas HA em tandem na porção C-terminal, em (B) o vetor de expressão em *T. cruzi* que confere fusão de 3 etiquetas HA em tandem na porção N-terminal, em (C) o vetor de expressão em *T. cruzi* que confere fusão com GFP na porção C-terminal, em (D) o vetor de expressão em *T. cruzi* que confere fusão com GFP na porção N-terminal

Todos os vetores possuem resistência a G418, os sítios de recombinação *attR1/attR2*, os promotores T3 e T7. LEGENDA: *ccdB*: gene para seleção negativa, Cm: marcador de seleção para cloranfenicol, CO: fusão carboxi-terminal, NH: fusão amino-terminal, p: plasmídeo, Tc: *Trypanosoma cruzi*, NEO: neomicina fosfotransferase.

FONTE: A autora (2019). Desenvolvido com auxílio do software SnapGene (GSL Biotech).

4.17.1 Construção de vetores de expressão com gene de resistência a blasticidina-S

Visto que os vetores de superexpressão em *T. cruzi* serão utilizados tanto para superexpressão quanto para complementação, foi preciso substituir o gene NEO dos vetores originais por outro gene de resistência, pois os parasitas nocautes para o gene *TcZC3H24* obtidos por recombinação homóloga possuem resistência a G418.

Assim, o gene que codifica a enzima blasticidina-S deaminase (BSD), a qual converte blasticidina S (BS) em um derivado desaminohidroxila não tóxico, foi amplificado por PCR

utilizando os pares de primers (Tabela 4) BLAST_SpeI_F e BLAST_XhoI_R, a partir do vetor pUC57-DSB, que possui clonado o gene BSD (gene sintético adquirido da empresa Genscript, USA).

Para a reação de PCR foram utilizados 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 200µM de cada dNTP, tampão Uni-Taq DNA polimerase HF 1X, 2,5 U de Uni-Taq DNA Polymerase High Fidelity (Uniscience) em volume final de 50 µL. Esta reação foi processada no termociclador modelo ProFlex (Applied Biosystems), com a desnaturação do material por 5 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos que compreendia uma desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridização dos *primers* a 57°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, finalizando com 1 ciclo de 7 minutos a 72°C.

O produto da PCR foi purificado com o QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) e quantificado por espectrofotometria com uso do equipamento NanoDrop® (Thermoscientific).

O *amplicon* BSD e os vetores pTc3xHA_CO_2-neo e pTc3xHA_NH_2-neo foram digeridos com as enzimas *XhoI* e *SpeI* utilizando-se 20U de cada enzima e seus respectivos tampões em volume final de 50 µL, a 37°C por 5 horas. O *amplicon* BSD foi purificado com o QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN).

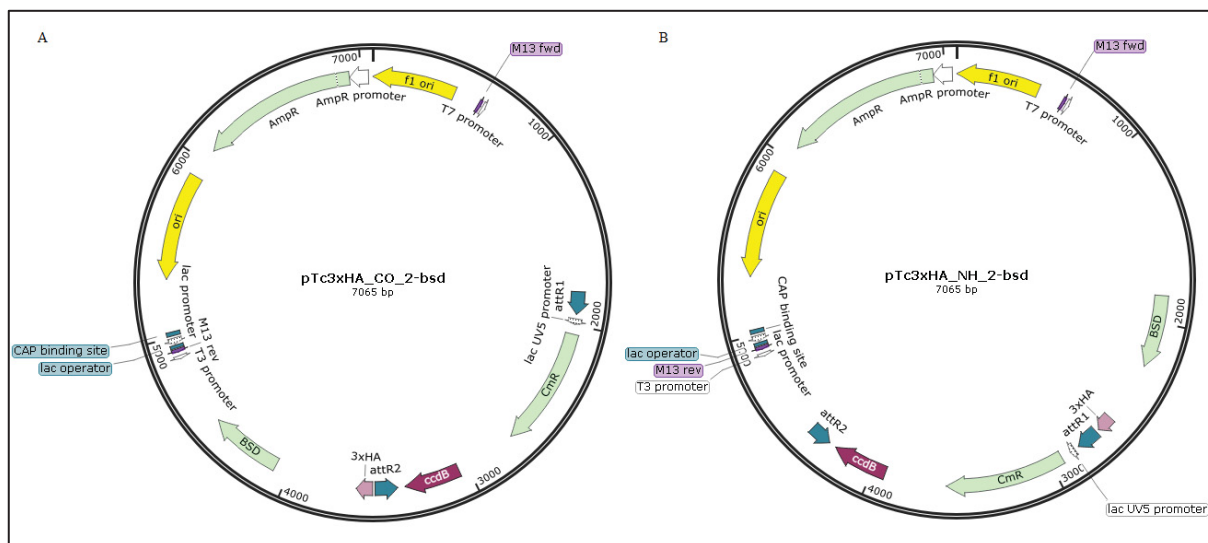
Os produtos das digestões dos vetores foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8% (item 4.12.3). O DNA foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por aproximadamente 20 minutos, sendo em seguida analisado em transiluminador de luz ultravioleta (UV).

As bandas correspondentes aos vetores pTc3xHA_CO_2-neo e pTc3xHA_NH_2-neo linearizados e sem a sequência que codifica o gene NEO foram excisadas do gel e purificadas com o QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). O *amplicon* BSD foi ligado a cada um destes fragmentos excisados na proporção de 1 pmol de vetor para cada 5 pmol de inserto, com 1U de enzima T4 DNA ligase (1 U/µL), T4 DNA ligase buffer 1X, a 16°C por 18 horas, em volume final de 10 µL.

Os produtos das ligações foram transformados em *E. coli* TOP10 (item 4.9.2), analisados pela técnica de *Toothpick* e PCR de colônia (item 4.9.3).

Os plasmídeos recombinantes desta etapa resultaram nos vetores pTc3xHA_CO_2-bsd e pTc3xHA_NH_2-bsd (Figura 18), cujas identidades foram confirmadas por digestão com as enzimas *XhoI/SaII* e por sequenciamento de DNA (Plataforma de sequenciamento FIOCRUZ, RJ).

FIGURA 18 - MAPA DOS VETORES DE EXPRESSÃO EM *T. cruzi* QUE CONFEREM RESISTENCIA A BLASTICIDINA



NOTA: Em (A), o vetor de expressão em *T. cruzi* que confere fusão de 3 etiquetas HA em tandem na porção C-terminal, em (B) o vetor de expressão em *T. cruzi* que confere fusão de 3 etiquetas HA em tandem na porção N-terminal. Ambos possuem resistência a Blasticidina, os sítios de recombinação *attR1/attR2*, os promotores T3 e T7.

LEGENDA: *ccdB*: gene para seleção negativa, Cm: marcador de seleção para cloranfenicol, CO: fusão carboxi-terminal, NH: fusão amino-terminal, p: plasmídeo, Tc: *Trypanosoma cruzi*, BSD: blasticidina S deaminase.

FONTE: A autora (2019). Desenvolvido com auxílio do software SnapGene (GSL Biotech).

4.17.2 Obtenção dos clones em vetor de entrada

Foram realizadas duas PCRs (item 4.12.4) a partir de DNA genômico de *T. cruzi* com os seguintes oligonucleotídeos iniciadores: ZC3H24_GTW1A_F + ZC3H24_GTW_R1 e ZC3H24_GTW1A_F + ZC3H24_GTW_R2 (Tabela 4), sendo que o primeiro produto amplifica o gene *TcZC3H24* com o códon de parada ausente e o segundo amplifica a sequência completa do gene. Estes produtos foram purificados com o QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) e quantificados por espectrofotometria utilizando o equipamento NanoDrop® (Thermoscientific).

Os *amplicons* foram recombinados com o vetor de entrada pDONR® 221 de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen), sendo utilizados para cada reação 50 fmol do amplicon purificado, 150 fmol do vetor pDONR® 221, 1 µL do mix de recombinases BP Clonase II™, solução tampão TE pH 8,0 em volume final de 10 µL. Cada reação foi incubada a 25°C por 18 horas e inativada a 37°C com 2 µg de Proteinase K por 10 minutos.

Estas recombinações foram transformadas em células competentes de *E. coli* TOP10 (item 4.9.2). A presença do inserto no vetor de entrada foi confirmada por PCR de colônia (item 4.9.3.3) e um clone de cada foi amplificado por minipreparação de plasmídeo (item 4.9.4),

obtendo-se os vetores de entrada intermediário pENTRY-ZC3H24- Δ stop (sem o códon de parada) e pENTRY-ZC3H24 (sequência completa do gene *TcZC3H24*).

4.17.3 Obtenção dos clones em vetores de destino

O vetor de entrada pENTRY-ZC3H24- Δ stop foi submetido a reações de recombinação com os vetores com etiquetas HA e GFP carboxi-terminais (pTc3xHA_CO-bsd e pTcGFP_CO_2-neo), para produzir as proteínas de fusão TcZC3H24-3xHA e TcZC3H24-GFP.

O vetor de entrada pENTRY-ZC3H24 foi submetido a reações de recombinação com os vetores tanto com as etiquetas HA e GFP amino-terminais (pTc3xHA_NH-bsd e pTcGFP_NH_2-neo), para produção das proteínas de fusão 3xHA-TcZC3H24 e GFP-TcZC3H24, quanto no vetor com etiqueta HA carboxi-terminal pTc3xHA_CO-bsd (que permite a expressão de TcZC3H24 sem qualquer etiqueta, em virtude da presença do códon de parada na sequência do gene)

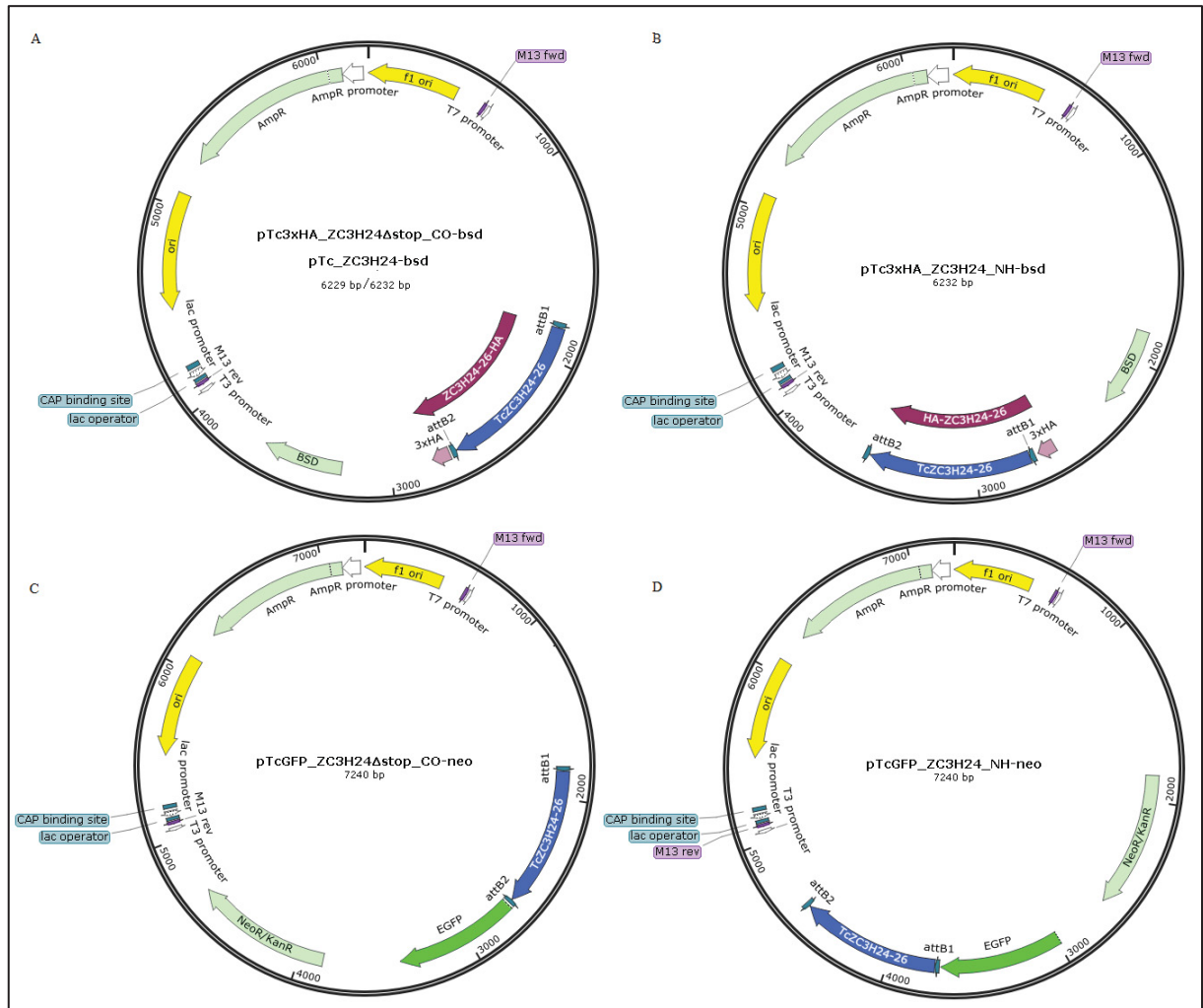
Cada reação de recombinação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen): 150 ng do vetor de entrada, 150 ng do vetor de destino, 1 μ L do mix de recombinases LR Clonase IITM, solução tampão TE pH 8,0 em volume final de 10 μ L. Estas reações foram incubadas a 25°C por 18 horas e inativadas a 37°C com 2 μ g de Proteinase K (Invitrogen) por 10 minutos, sendo transformadas em células competentes de *E. coli* TOP10 (item 4.9.2). Um clone de cada célula transformada foi amplificado por minipreparação de plasmídeo (item 4.9.4), obtendo-se os vetores de expressão, descritos na Tabela 13 (Figura 19).

Estes vetores tiveram sua identidade confirmada por sequenciamento de DNA (Plataforma de sequenciamento FIOCRUZ, RJ).

TABELA 13 - DESCRIÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO EM *T. cruzi*

Vetor	Característica	Resistência
pTc3xHA_ZC3H24 Δ stop_CO-bsd	Expressão de TcZC3H24 fusionada a três etiquetas HA em tandem na porção C-terminal	Blasticidina
pTc3xHA_ZC3H24_NH-bsd	Expressão de TcZC3H24 fusionada a três etiquetas HA em tandem na porção N-terminal	Blasticidina
pTc_ZC3H24-bsd	Expressão de TcZC3H24 sem etiqueta	Blasticidina
pTcGFP_ZC3H24 Δ stop_CO-neo	Expressão de TcZC3H24 fusionada a GFP na porção C-terminal	G418
pTcGFP_ZC3H24_NH-neo	Expressão de TcZC3H24 fusionada a GFP na porção N-terminal	G418

FONTE: A autora (2019).

FIGURA 19 - MAPA DOS VETORES EM *T. cruzi* QUE CONFEREM A EXPRESSÃO DE TcZC3H24

Em (A) vetor de expressão em *T. cruzi* pTc3xHA_ZC3H24Δstop_CO-bsd, com a proteína TcZC3H24 fusionada a três etiquetas HA em tandem na porção C-terminal e pTc_ZC3H24-bsd, expressando apenas a proteína TcZC3H24 (sem etiqueta). Em (B) vetor de expressão em *T. cruzi* pTc3xHA_ZC3H24_NH-bsd, com a proteína TcZC3H24 fusionada a três etiquetas HA em tandem na porção N-terminal. Em (C) vetor de expressão em *T. cruzi* pTcGFP_ZC3H24Δstop_CO-neo, com a proteína TcZC3H24 fusionada a GFP na porção C-terminal. Em (D) vetor de expressão em *T. cruzi* pTcGFP_ZC3H24_NH-neo, com a proteína TcZC3H24 fusionada a GFP na porção N-terminal. Os vetores (A) e (B) possuem resistência a blasticidina enquanto (C) e (D) possuem resistência a G418. Todos os vetores possuem os sítios de recombinação attR1/attR2 e os promotores T3 e T7.

LEGENDA: *ccdB*: gene para seleção negativa, Cm: marcador de seleção para cloranfenicol, CO: fusão carboxi-terminal, NH: fusão amino-terminal, p: plasmídeo, Tc: *Trypanosoma cruzi*, BSD: blasticidina S deaminase, NEO: neomicina fosfotransferase.

FONTE: A autora (2019). Desenvolvido com auxílio do software SnapGene (GSL Biotech).

4.18 COMPLEMENTAÇÃO E SUPEREXPRESSÃO DE TcZC3H24 em *T. cruzi*

Para a complementação gênica, formas epimastigotas de parasitas *knockout* nulo para TcZC3H24 em fase logarítmica de crescimento foram transfectados com os vetores pTc3xHA_ZC3H24Δstop_CO-bsd, pTc3xHA_ZC3H24_NH-bsd e pTc_ZC3H24-bsd.

Para a superexpressão da proteína TcZC3H24, formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento foram transfectadas com os vetores pTc3xHA_ZC3H24 Δ stop_CO-bsd, pTc3xHA_ZC3H24_NH-bsd, pTc_ZC3H24-bsd, pTcGFP_ZC3H24 Δ stop_CO-bsd e pTcGFP_ZC3H24_NH-neo.

As transfecções foram realizadas conforme descrito no item 4.11.8.2.

Os parasitas complementados foram selecionados em meio LIT contendo G418 (500 μ g/mL), higromicina (500 μ g/mL) e blasticidina (10 μ g/mL), enquanto os parasitas superexpressando a proteína TcZC3H24 foram selecionados em meio LIT contendo blasticidina (10 μ g/mL) para os transfectados com os plasmídeos pTc3xHA_ZC3H24 Δ stop_CO-bsd, pTc3xHA_ZC3H24_NH-bsd e pTc_ZC3H24-bsd e com G418 (500 μ g/mL) para os transfectados com os plasmídeos pTcGFP_ZC3H24 Δ stop_CO-neo e pTcGFP_ZC3H24_NH-neo.

Os parasitas complementados e superexpressando a proteína TcZC3H24 foram analisados quanto a proliferação celular (item 4.11.10) e a capacidade de diferenciação *in vitro* para tripomastigotas metacíclicos (item 4.11.11).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES *IN SILICO*

A proteína TcZC3H24 foi identificada *in silico* em *T. cruzi* CL Brener Esmeraldo-like (Tc00.1047053503897.150) por Kramer et al. (2010a) juntamente com todas as proteínas que possuem os motivos *Zinc Finger C-X₄₋₁₅-C-X₄₋₆-C-X₃-H* nos genomas dos protozoários *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. major*. Ao todo, foram identificadas 51 proteínas em *T. cruzi*, 48 proteínas em *T. brucei* e 54 proteínas em *L. major*, sendo que 34% destas proteínas possuem mais de um motivo *Zinc Finger C-X₄₋₁₅-C-X₄₋₆-C-X₃-H* (Kramer et al., 2010a).

Visto que este trabalho utilizou a cepa Dm28c de *T. cruzi*, buscou-se em bancos de dados a sequência específica da proteína TcZC3H24 para esta cepa.

Inicialmente estava disponível apenas o sequenciamento da cepa Dm28c depositado por Grisard et al. (2014) no banco de dados TritrypDB (<http://tritrypdb.org>) e no banco de dados GenBank do National Center of Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Atualmente, está disponível no banco de dados do National Center of Biotechnology Information (NCBI) o sequenciamento da cepa *Trypanosoma cruzi* Dm28c depositado por três grupos: Grisard et al. (2014), Probst et. al. (submetido para publicação) e Berná et al. (2018).

As anotações disponibilizadas pelos dois primeiros autores para o gene *TcZC3H24* encontram-se depositadas também no banco de dados TritrypDB (*TriTrypDB: The Kinetoplastid Genomics Resource*, 2016).

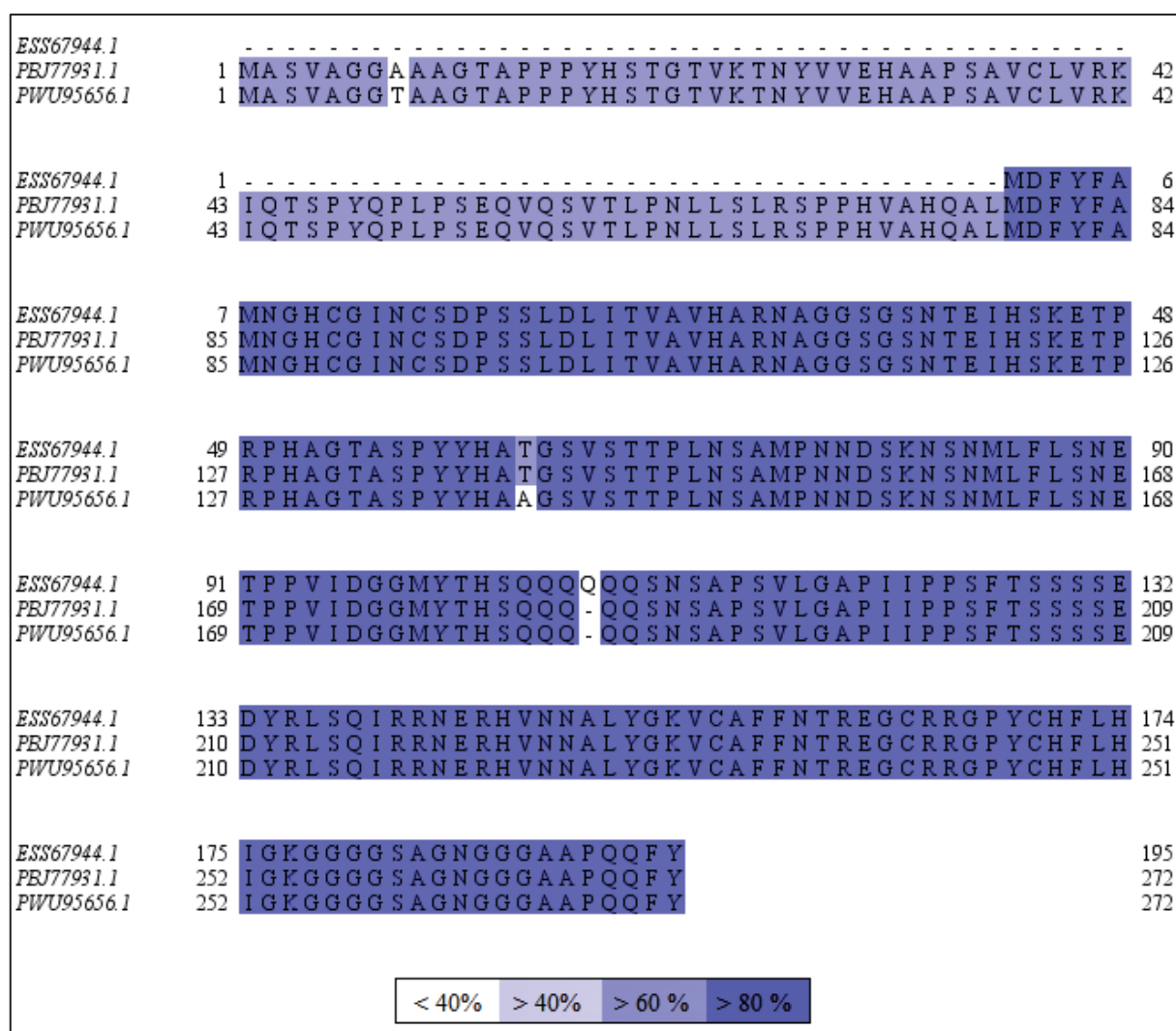
A proteína TcZC3H24 depositada por Grisard et al. (2014), está anotada como proteína hipotética TCDM_03246, possui uma sequência aminoácida menor, quando comparado as outras duas sequências disponíveis para esta proteína (Tabela 14). O alinhamento das sequências de aminoácidos das três proteínas mostrou que TCDM_03246 não possui os primeiros 78 aminoácidos presentes nas anotações de Probst et. al. (submetido para publicação) e Berná et al. (2018) e apresenta um resíduo de glutamina (Q107) extra na sequência repetitiva de 5 resíduos de glutamina (Figura 20).

TABELA 14 - DADOS DA PROTEÍNA TcZC3H24 PARA AS TRÊS ANOTAÇÕES DEPOSITADAS NO BANCO DE DADOS GENBANK PARA A CEPA *Trypanosoma cruzi* Dm28c

Número de acesso (GenBank)	Genoma ID (GenBank)	Identificação de acesso (TritrypID)	Anotação da proteína	Número de aminoácidos	Autores
ESS67944.1	225928	TCDM_03246	Proteína hipotética	195	Grisard et al. (2014)
PBJ77931.1	330977	BCY84_05335	Proteína hipotética	272	Probst et al. (submetido para publicação)
PWU95656.1	433042	-	Proteína hipotética	272	Berna et al. (2018)

FONTE: A autora (2019).

FIGURA 20 - ALINHAMENTO DA PROTEÍNA TcZC3H24 PARA AS TRÊS ANOTAÇÕES DEPOSITADAS NO BANCO DE DADOS GENBANK PARA A CEPA *Trypanosoma cruzi* Dm28c



NOTA: As sequências alinhadas foram coloridas por porcentagem de identidade, mostrando a conservação de resíduos em quatro camadas (variando a porcentagem de conservação entre maior que 80% e menor que 40%). O cálculo da identidade da proteína para as três cepas (identificadas pelo o número de acesso GenBank) revelaram valores de identidade de 71,1% para as anotações ESS67944.1 e PBJ77931.1; 70,7% para as anotações ESS67944.1 e PWU95656.1; 99,3% para as anotações PBJ77931.1 e PWU95656.1.

FONTE: A autora (2019).

Uma característica comum aos mRNAs de tripanossomatídeos é a presença de uma sequência de 39 nucleotídeos na extremidade 5', denominada *spliced leader* (SL) ou miniéxon (De Lange et al., 1984). Conhecendo-se a posição desta sequência no mRNA, pode-se inferir o início da região codante, pois em geral o primeiro códon AUG a montante do miniéxon define o início da região a ser traduzida. Consequentemente, define-se também a região 5'UTR.

Experimentos de RNA-seq de *T. cruzi* Dm28c, usando método de enriquecimento das regiões SL-5'UTR dos mRNAs (Kessler et al., 2017), geraram informações da região 5'UTR dos mRNAs e do sítio acceptor de splice 3' (3'SS) nesses transcritos.

Deste modo, utilizando estas análises foi encontrado no locus *TcZC3H24* uma sequência que incluía a região 5'UTR do transcrito *TcZC3H24* e o sítio de adição do miniéxon (definido como um par adenina-guanina) (Campos et al., 2008).

A partir deste resultado a região codante do gene *TcZC3H24* mais provável é aquela que foi definida nos trabalhos de Probst e colaboradores (submetido para publicação) e Berná e colaboradores (2018) e que já havia sido inferida previamente no genoma da cepa CL Brener de *T. cruzi* (haplótipos TcCLB.503897.150 e TcCLB.509561.39).

5.1.1 Proteína TcZC3H24

Uma busca por motivos proteicos revelou que TcZC3H24 possui apenas o motivo convencional *Zinc Finger* C-X₈-C-X₅-C-X₃-H, ou seja, possui três cisteínas e uma histidina separados por 8, 5 e 3 resíduos de aminoácidos coordenados em geometria tetraédrica a um átomo de zinco.

A Figura 21 apresenta a sequência aminoacídica de TcZC3H24, onde é mostrado o motivo C-X₈-C-X₅-C-X₃-H.

FIGURA 21 - SEQUÊNCIA AMINOACÍDICA DE TcZC3H24

Met	Ala	Ser	Val	Ala	Gly	Gly	Ala	Ala	Ala	Gly	Thr	Ala	Pro	Pro	Pro	Tyr	His	Ser	Thr	Gly	Thr	Val
Lys	Thr	Asn	Tyr	Val	Val	Glu	His	Ala	Ala	Pro	Ser	Ala	Val	Cys	Leu	Val	Arg	Lys	Ile	Gln	Thr	Ser
Pro	Tyr	Gln	Pro	Leu	Pro	Ser	Glu	Gln	Val	Gln	Ser	Val	Thr	Leu	Pro	Asn	Leu	Leu	Ser	Leu	Arg	Ser
Pro	Pro	His	Val	Ala	His	Gln	Ala	Leu	Met	Asp	Phe	Tyr	Phe	Ala	Met	Asn	Gly	His	Cys	Gly	Ile	Asn
Cys	Ser	Asp	Pro	Ser	Ser	Leu	Asp	Leu	Ile	Thr	Val	Ala	Val	His	Ala	Arg	Asn	Ala	Gly	Gly	Ser	Gly
Ser	Asn	Thr	Glu	Ile	His	Ser	Lys	Glu	Thr	Pro	Arg	Pro	His	Ala	Gly	Thr	Ala	Ser	Pro	Tyr	Tyr	His
Ala	Thr	Gly	Ser	Val	Ser	Thr	Thr	Pro	Leu	Asn	Ser	Ala	Met	Pro	Asn	Asn	Asp	Ser	Lys	Asn	Ser	Asn
Met	Leu	Phe	Leu	Ser	Asn	Glu	Thr	Pro	Pro	Val	Ile	Asp	Gly	Gly	Met	Tyr	Thr	His	Ser	Gln	Gln	Gln
Gln	Gln	Ser	Asn	Ser	Ala	Pro	Ser	Val	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Ile	Pro	Pro	Ser	Phe	Thr	Ser	Ser	Ser
Ser	Glu	Asp	Tyr	Arg	Leu	Ser	Gln	Ile	Arg	Arg	Asn	Glu	Arg	His	Val	Asn	Asn	Ala	Leu	Tyr	Gly	Lys
Val	Cys	Ala	Phe	Phe	Asn	Thr	Arg	Glu	Gly	Cys	Arg	Arg	Gly	Pro	Tyr	Cys	His	Phe	Leu	His	Ile	Gly
Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Gly	Asn	Gly	Gly	Gly	Ala	Ala	Pro	Gln	Gln	Phe	Tyr				

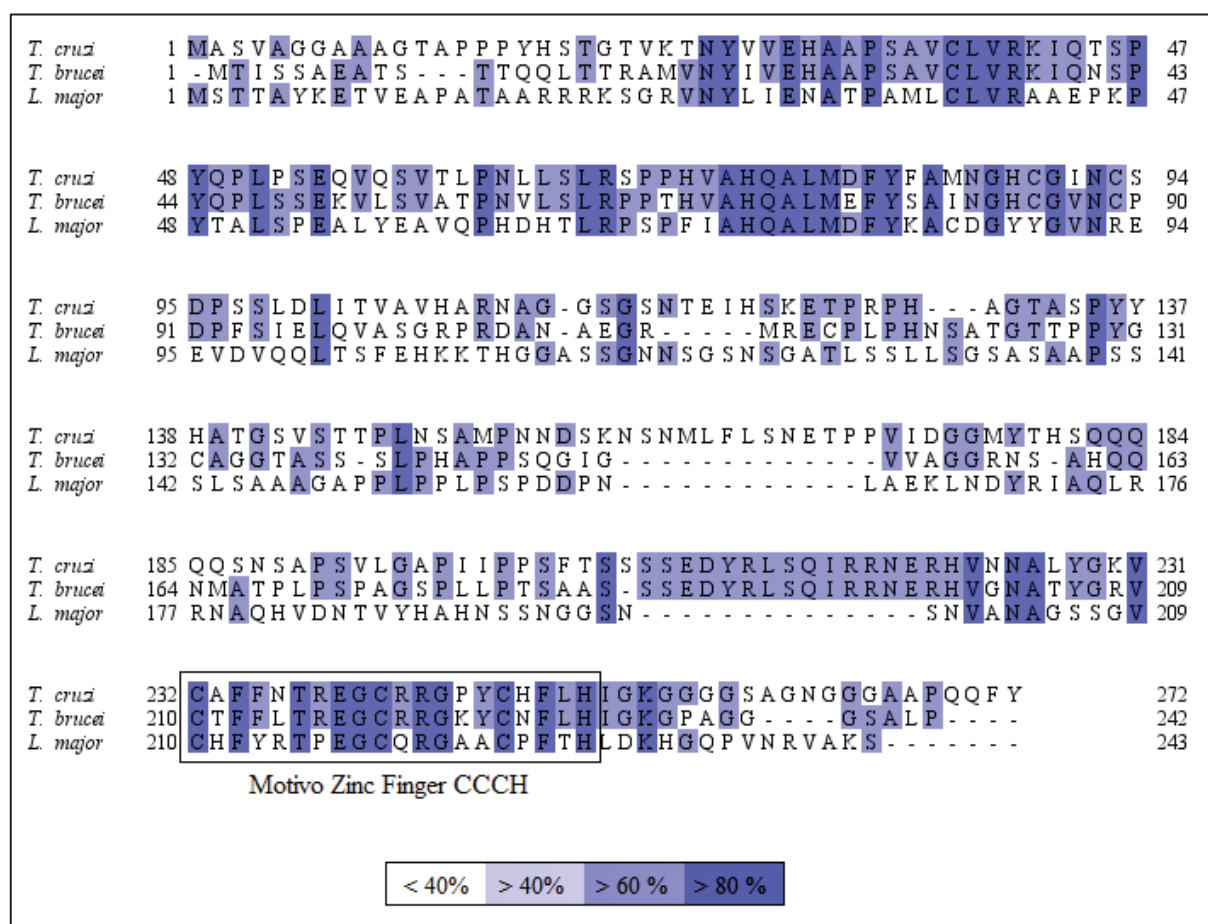
NOTA: O motivo C-X₈-C-X₅-C-X₃-H é representado pela sequência de aminoácidos inserida no retângulo sombreado em azul e os resíduos de cisteína e histidina que compõem o motivo estão evidenciados em azul.

FONTE: A autora (2019).

As proteínas ortólogas de TcZC3H24 apresentam tamanhos menores em *T. brucei* (242 aminoácidos) e *Leishmania major* (243 aminoácidos) em comparação à *T. cruzi* (272 aminoácidos), com similaridade de 59,3% e 35,9%, respectivamente.

A similaridade com ortólogos presentes em outras espécies de *Leishmania*, cujas sequências estão depositadas no banco de dados TritypDB está situada entre 35% e 39%.

A Figura 22 mostra o alinhamento entre as proteínas ortólogas de ZC3H24 para *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major*, destacando o alinhamento para o domínio CCCH. Observa-se que a similaridade entre os ortólogos de ZC3H24 nas três espécies de tripanossomatídeos está concentrada nas regiões amino e carboxi-terminal das proteínas, sendo que estas diferenças podem estar associadas a capacidade de interação com outras proteínas e com os mRNAs alvos específicos de cada espécie de tripanossomatídeo.

FIGURA 22 - ALINHAMENTO DOS ORTÓLOGOS DE ZC3H24 PARA *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major*

NOTA: As sequências alinhadas foram coloridas por porcentagem de identidade, mostrando a conservação de resíduos em quatro camadas (variando a porcentagem de conservação entre maior que 80% e menor que 40%).

FONTE: A autora (2019).

5.1.2 Organização genômica e conservação

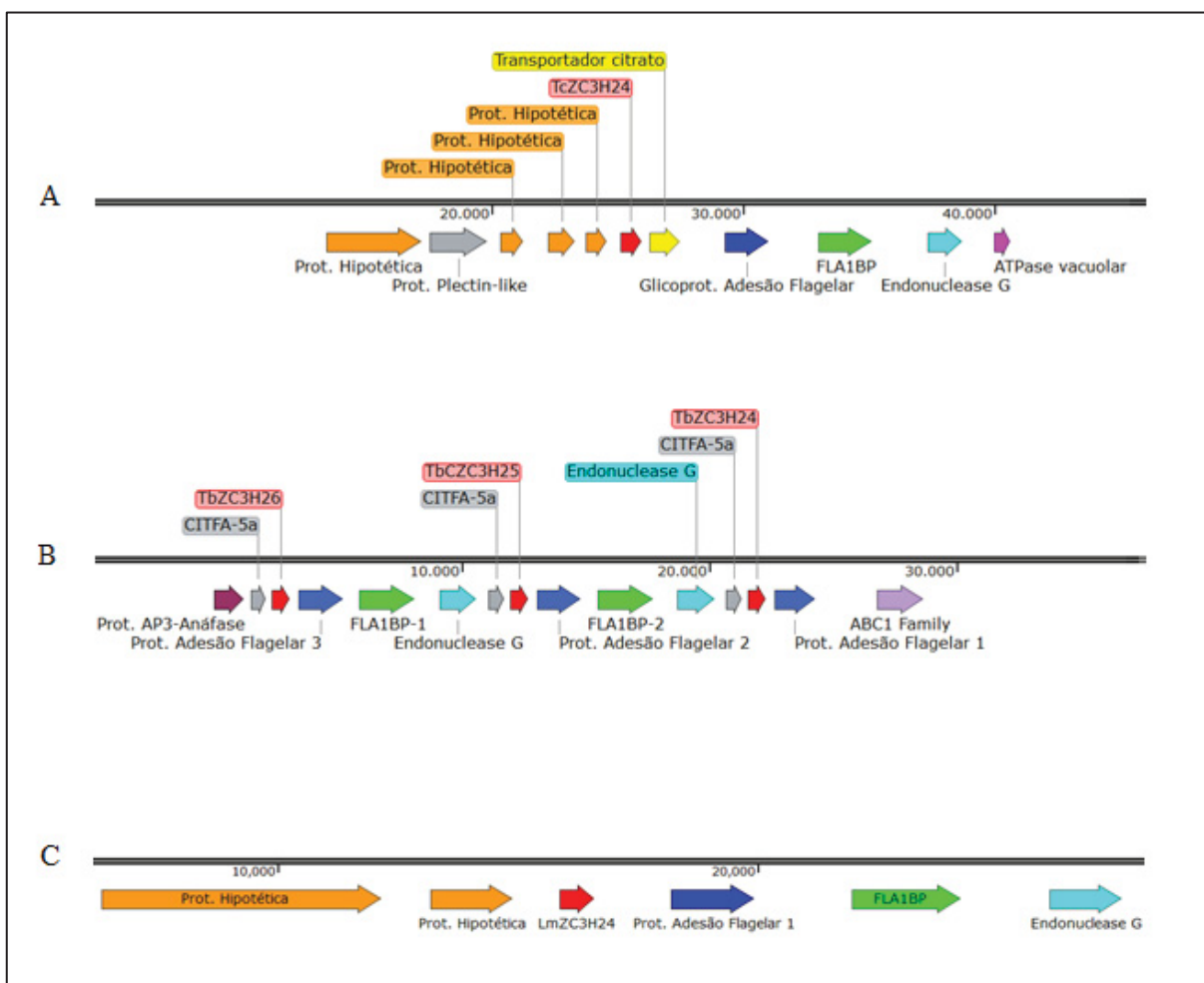
No genoma de *Trypanosoma cruzi* clone Dm28c o gene BCY84_05335 (TritrypDB ID) que codifica a proteína TcZC3H24 possui cópia única e está compreendido a 551 bp a jusante do gene BCY84_05336 (Proteína hipotética) e a 329 bp a montante do gene BCY84_05334 (Transportador de citrato) (Figura 23A).

Em *T. brucei*, este gene está presente em três cópias idênticas de 729 pb (Tb927.8.4020, Tb927.8.4070 e Tb927.8.4120), flanqueadas por grupos de genes conservados (Figura 23B), possivelmente geradas por eventos de duplicação gênica ao longo da evolução. Apesar da identidade das três cópias, as proteínas (242 aminoácidos) receberam denominações diferentes (TbZC3H24, TbZC3H25 e TbZC3H26, respectivamente) (Figura 23B).

Pode-se observar que *TcZC3H24* e *TbZC3H24/25/26* e *LmZC3H24* localizam-se em regiões cromossômicas que possuem sintenia nas espécies em questão. Contudo essa sintenia

não é total, principalmente a montante dos genes *ZC3H24*. Além disso há um gene que codifica um transportador de citrato a jusante de *ZC3H24* de *T. cruzi* que não está presente nas outras duas espécies.

FIGURA 23 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO LOCUS GÊNICO DE *ZC3H24* EM *T. cruzi*, *T. brucei* E *L. major*



NOTA: É mostrado o locus gênico para os ortólogos de *ZC3H24* em (A) *Trypanosoma cruzi*, (B) *Trypanosoma brucei* e em (C) *Leishmania major*.

FONTE: A autora (2019). Desenvolvido com auxílio do software SnapGene (GSL Biotech).

A busca por ortólogos e parálogos em cinetoplastídeos para o gene *TcZC3H24* revelou 43 genes, cujas identidades variaram de 45,61% a 98,90%. Destes genes, apenas 4 mostraram não possuir sintenia, corroborando com os estudos de Ghedin et al. (2004) e El-Sayed et al. (2005b), no qual foram comparados o genoma em larga escala de *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania major*, revelando um proteoma conservado de cerca de 6200 genes em grandes aglomerados policistronicos sintênicos, sugerindo que a seleção ao longo de milhões de anos de evolução manteve a ordem genética entre os tripanossomatídeos (Ghedin et al., 2004; El-Sayed et al., 2005b).

A busca por ortólogos e parálogos em outros eucariotos revelou existirem genes cuja identidade é muito baixa, fato observado por Kramer et al. (2010a) na análise *in silico* para os genes de *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major* que codificam proteínas com o motivo CCCH, confirmando que a maioria destas proteínas são exclusivas dos cinetoplastídeos ou até mesmo de um subgrupo dos cinetoplastídeos, sendo a similaridade com proteínas de outros eucariotos conservadas somente nos domínios (Kramer et al., 2010a).

A Tabela 15 elenca os genes ortólogos e parálogos de cinetoplastídeos encontrados para *TcZC3H24*.

TABELA 15 - ORTÓLOGOS E PARÁLOGOS PARA *TcZC3H24*

Número de acesso (TritrypDB ID)	Organismo	Sintênico
LmjF.10.0640	<i>Leishmania major</i> cepa Friedlin	sim
Tb927.8.4020	<i>Trypanosoma brucei</i> brucei TREU927	sim
Tb927.8.4070	<i>Trypanosoma brucei</i> brucei TREU927	sim
Tb927.8.4120	<i>Trypanosoma brucei</i> brucei TREU927	sim
TcCLB.503897.150	<i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brener Esmeraldo-like	sim
Baya_022_0180	<i>Blechnomonas ayalai</i> B08-376	sim
CFAC1_040014400	<i>Crithidia fasciculata</i> cepa Cf-C1	sim
DQ04_03901020	<i>Trypanosoma grayi</i> ANR4	sim
EMOLV88_100006900	<i>Endotrypanum monterogeii</i> cepa LV88	sim
LAEL147_000137900	<i>Leishmania aethiopica</i> L147	sim
LARLEM1108_100011800	<i>Leishmania arabica</i> cepa LEM1108	sim
LbrM.10.0780	<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904	sim
LBRM2903_100015900	<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2903	sim
LdBPK_100690.1	<i>Leishmania donovani</i> BPK282A1	sim
LENLEM3045_100012300	<i>Leishmania enriettii</i> cepa LEM3045	sim
LGELEM452_100011900	<i>Leishmania gerbilli</i> cepa LEM452	sim
LINF_100013200	<i>Leishmania infantum</i> JPCM5	sim
LMARLEM2494_100011300	<i>Leishmania</i> sp. MAR LEM2494	sim
LMJLV39_100012500	<i>Leishmania major</i> cepa LV39c5	sim
LMJSD75_100012600	<i>Leishmania major</i> cepa SD 75.1	sim
LmxM.10.0640	<i>Leishmania mexicana</i> MHOM/GT/2001/U1103	sim
LPAL13_100012500	<i>Leishmania panamensis</i> MHOM/COL/81/L13	sim
LPMP_100600	<i>Leishmania panamensis</i> cepa MHOM/PA/94/PSC-1	sim
LpyrH10_22_0980	<i>Leptomonas pyrrhocoris</i> H10	sim
LtaP10.1060	<i>Leishmania tarentolae</i> Parrot-TarII	sim
LTRL590_100007200	<i>Leishmania tropica</i> L590	sim

(continuação)

Número de acesso (TritrypDB ID)	Organismo	Sintênico
LTULEM423_100012100	<i>Leishmania turanica</i> cepa LEM423	sim
Tb427.08.4070	<i>Trypanosoma brucei</i> Lister cepa 427	sim
Tbg972.8.3770	<i>Trypanosoma brucei</i> gambiense DAL972	sim
Tbg972.8.3815	<i>Trypanosoma brucei</i> gambiense DAL972	sim
TcCLB.509561.39	<i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brener não-Esmeraldo-like	sim
TcIL3000_8_3820	<i>Trypanosoma congolense</i> IL3000	sim
TCSYLVIO_009967	<i>Trypanosoma cruzi</i> Sylvio X10/1-2012	sim
TevSTIB805.8.4140	<i>Trypanosoma evansi</i> cepa STIB 805	sim
TevSTIB805.8.4190	<i>Trypanosoma evansi</i> cepa STIB 805	sim
TevSTIB805.8.4240	<i>Trypanosoma evansi</i> cepa STIB 805	sim
TM35_000251780	<i>Trypanosoma theileri</i> isolate Edinburgh	sim
TRSC58_03638	<i>Trypanosoma rangeli</i> SC58	sim
TvY486_0803440	<i>Trypanosoma vivax</i> Y486	sim
Lsey_0127_0030	<i>Leptomonas seymouri</i> ATCC 30220	não
PCON_0078150	<i>ParaTrypanosoma confusum</i> CUL13	não
TcIL3000_0_31500	<i>Trypanosoma congolense</i> IL3000	não
TvY486_0802950	<i>Trypanosoma vivax</i> Y486	não

5.2 OBTENÇÃO DO SORO ANTI-TcZC3H24

Para a expressão da proteína recombinante TcZC3H24 em sistema heterólogo foram construídos os vetores de expressão em *E. coli* pDEST17-ZC3H24 e pDEST15-ZC3H24, conforme descrito em Materiais e Métodos (item 4.13).

Nesta etapa, para a amplificação do gene de interesse, foi utilizada a anotação depositada por Grisard et al. (2014) no banco de dados TritrypDB (*TriTrypDB: The Kinetoplastid Genomics Resource*, 2016) sob a identificação de acesso TCDM_03246. Esta identificação corresponde ao gene *TcZC3H24* incorretamente anotado, única disponível na época. Como mencionado previamente, a sequência de aminoácidos deduzida a partir de TCDM_03246 possui apenas 195 resíduos de aminoácidos, onde os primeiros 78 aminoácidos de TcZC3H24 corretamente anotado estão ausentes.

Assim, a fração carboxi-terminal da região codante de TcZC3H24 contendo 195 aminoácidos foi expressa em *E. coli* usando o sistema de expressão Gateway[®], com os vetores de destino pDEST17 e pDEST15.

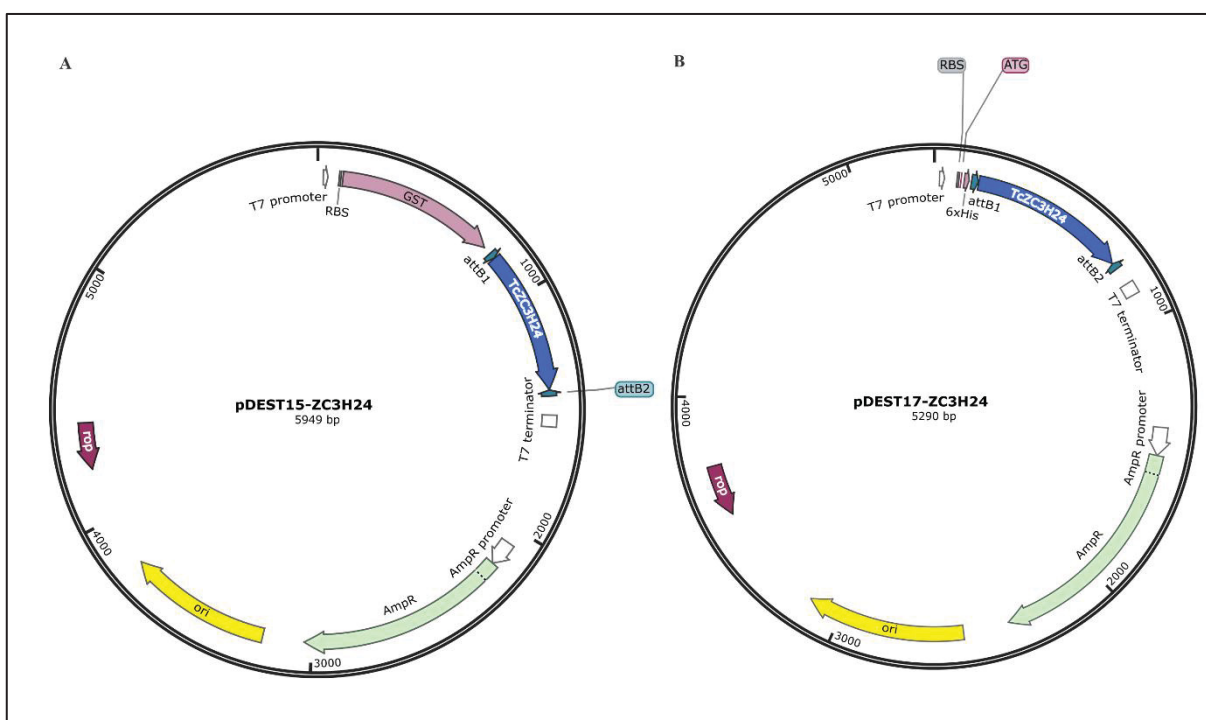
Desta reação resultaram os vetores de expressão pDEST17-ZC3H24 e pDEST15-ZC3H24 (Figura 24), os quais possuem uma etiqueta de 6 histidinas em tandem (6xHIS-Tag) e

a proteína glutationa-S-transferase (GST-Tag) fusionada à porção N-terminal de TcZC3H24, respectivamente.

A etiqueta glutationa-S-transferase (Smith et al., 1986), uma proteína de 26 kDa, pode solubilizar proteínas em *E. coli*, sendo mais eficiente quando posicionada na extremidade N-terminal (Hammarström et al., 2006; Kaplan et al., 2008). Quando disposta na extremidade C-terminal é menos eficiente em melhorar a solubilidade das proteínas, porém atua como uma etiqueta de afinidade (Smith e Johnson, 1988). Uma desvantagem desta etiqueta é a possibilidade de sofrer agregação oxidativa, visto que possui quatro cisteínas, além de poder afetar as propriedades da proteína e causar degradação da mesma devido ao seu maior tamanho e sua dimerização em solução (Li, 2011; Kimple et al., 2013).

A etiqueta contendo seis histidinas (6xHIS-tag), pode ajudar na solubilização de proteínas e permite a purificação das mesmas em uma única etapa diretamente do lisado celular por cromatografia de afinidade a metal (IMAC, *Immobilized metal ion affinity chromatography*) (Porath et al., 1975; Joshua e Falke, 2000).

FIGURA 24 - VETORES DE EXPRESSÃO EM *E. coli* pDEST15-ZC3H24 e pDEST17-ZC3H24



NOTA: Em (A), vetor de expressão de *E. coli* pDEST15-ZC3H24, com a proteína fusionada à etiqueta glutationa-S-transferase (GST-Tag) à porção N-terminal. Em (B), vetor pDEST17-ZC3H24 com a proteína fusionada à etiqueta de 6 histidinas em tandem (6xHIS-Tag) à porção N-terminal.

FONTE: A autora (2019). Desenvolvido com auxílio do software SnapGene (GSL Biotech).

Após obtenção dos vetores de expressão, estes foram transformados nas cepas de *E. coli* cálcio competente BL21(DE3), BL21 StarTM(DE3), BL21(DE3)pLysS, Rosetta-gamiTM 2(DE3) e NiCo21(DE3), conforme protocolo descrito no item 4.9.2.

Após a transformação e seleção das bactérias (item 4.9.3), seguiu-se com os ensaios de expressão da proteína recombinante (item 4.13.3.1).

A Tabela 16 apresenta as principais características das cepas utilizadas para a expressão heteróloga de TcZC3H24.

TABELA 16 - CARACTERÍSTICAS DAS CEPAS DE *E. coli* USADAS NA EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE TcZC3H24

<i>E. coli</i>	Características	Referência
BL21 Star TM (DE3)	Promove alta estabilidade do mRNA e rendimento da proteína;	Invitrogen
BL21(DE3)	Deficiente em proteases lon e ompT	Invitrogen
BL21(DE3) pLysS	Reduz a expressão basal dos genes heterólogos, recomendado para uso ao expressar genes tóxicos; Deficiente em proteases lon e ompT	Invitrogen
Rosetta-gami TM 2(DE3)	Contêm códons raramente usados em <i>E. coli</i> (AUA, AGG, AGA, CGG, CUA, CCC, e GGA), Deficiente em proteases lon e ompT Facilita a formação de ligações dissulfeto citoplasmáticas	Novagen
NiCo21(DE3)	Minimiza a contaminação de proteínas de <i>E. coli</i> na purificação por IMAC; Deficiente em proteases lon e ompT	New England Biolabs

NOTA: Lon corresponde a uma protease que degrada proteínas mal-formadas e impede que algumas proteínas específicas do ciclo celular se acumulem na célula. OmpT é uma protease que auxilia as células a receber aminoácidos do seu ambiente externo. IMAC refere-se a cromatografia de afinidade a metal (do inglês, *Immobilized metal ion affinity chromatography*).

FONTE: A autora (2019).

A expressão de TcZC3H24 deu-se de acordo com os dois protocolos descritos em 4.13.3.1. No primeiro, a indução ocorreu a 37°C durante 4 horas e no segundo a 22°C durante 18 horas.

Os testes de indução com IPTG resultaram na expressão da proteína recombinante apenas na cepa Rosetta-gamiTM 2(DE3).

A cepa Rosetta-gamiTM 2(DE3) possui o plasmídeo pRARE2, o qual codifica tRNAs para sete códons raros (AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA e CGG) sob o controle de seu promotor nativo, aumentando a expressão de proteínas eucarióticas que contêm códons raramente usados em *E. coli*.

Em uma expressão de proteínas recombinantes a eficiência da expressão gênica pode ser reduzida se há um domínio de códons raros na sequência proteica a ser traduzida, ou seja,

quando a frequência de uso de códons no organismo de origem difere muito dos códons utilizados pelo hospedeiro original (Rosano e Ceccarelli, 2009). Assim, quando um mRNA de um gene heterólogo é expresso em *E. coli*, as diferenças no uso de códons do hospedeiro pode impedir a tradução devido a demanda por tRNAs que podem ser raros ou ausentes nesta célula, incorrendo no término da tradução de forma prematura ou em falha na incorporação correta dos aminoácidos durante a tradução, afetando tanto os níveis de expressão heteróloga da proteína quanto sua qualidade (Gustafsson et al., 2004).

Deste modo, analisando-se os códons de TcZC3H24 é possível observar uma frequência alta de códons raros para o hospedeiro bacteriano (Figura 25). Este fato pode ter propiciado a expressão pela *E. coli* Rosetta-gamiTM 2(DE3), visto que ela possui tRNAs para sete códons raros.

FIGURA 25 - CÓDONS RAROS DA PROTEÍNA TcZC3H24 PARA EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM *E. coli*

ATG	GAC	TTC	TAC	TTT	GCG	ATG	AAT	GGC	CAC	TGT	GGC	ATT	AAC	TGT	TCC	GAC	CCG	TCG	TCG
CTG	GAC	CTC	ATT	ACG	GTT	GCC	GTG	CAC	GCA	CGA	AAT	GCG	GGT	GGG	AGT	GGC	AGT	AAC	ACC
GAA	ATC	CAT	TCG	AAG	GAA	ACA	CCT	AGA	CCG	CAT	GCG	GGG	ACC	GCC	TCG	CCT	TAC	TAT	CAC
GCG	ACA	GGT	TCC	GTG	TCG	ACA	ACC	CCG	CTG	AAT	TCA	GCC	ATG	CCA	AAT	AAT	GAT	AGC	AAG
AAT	AGC	AAC	ATG	TTG	TTT	TTA	TCA	AAC	GAA	ACG	CCA	CCT	GTG	ATA	GAT	GGT	GGC	ATG	TAC
ACT	CAC	AGT	CAA	CAA	CAA	CAA	CAG	TCC	AAT	TCG	GCG	CCA	TCC	GTC	TTG	GGT	GCA	CCG	
ATA	ATT	CCT	CCA	AGT	TTC	ACG	TCC	TCC	TCC	TCG	GAG	GAC	TAT	CGG	CTT	TCG	CAA	ATA	CGA
AGA	AAT	GAG	CGT	CAT	GTG	AAC	AAT	GCG	TTG	TAT	GGC	AAG	GTG	TGT	GCC	TTC	TTT	AAC	ACG
CGG	GAA	GGC	TGC	AGG	CGT	GGA	CCA	TAC	TGC	CAC	TTC	CTT	CAC	ATT	GGC	AAA	GGT	GGT	GGA
GGC	AGT	GCG	GGA	AAT	GGC	GGT	GGA	GCA	GCT	CCC	CAA	CAA	TTT	TAT	TGA				

NOTA: Sequência codante da proteína TcZC3H24. Em laranja estão os códons raros (5 a 10%) e em vermelho os altamente raros ($\leq 5\%$) para *E. coli*.

FONTE: A autora (2009). Obtido com o uso do software ATGme (Daniel et al., 2015).

Após as expressões em *E. coli* Rosetta-gamiTM2(DE3), a fração total do extrato induzido foi sonicada e suas frações solúveis e insolúveis foram examinadas conforme item 4.13.3.2.

Esta análise revelou que a proteína de interesse estava contida na fração insolúvel, tanto para a proteína fusionada a cauda de histidinas (6xHIS) quanto para a etiquetada com glutathione-S-transferase (GST).

Inúmeros fatores físicos-químicos puderam ter contribuído para que a proteína recombinante fosse expressa na forma de corpúsculos de inclusão, tais como, a cepa e o vetor de expressão, a temperatura e o tempo de indução, parâmetros do meio de cultura, características intrínsecas da proteína, entre outros.

A expressão heteróloga em bactérias que possuem o plasmídeo pRARE pode influenciar na solubilidade da proteína uma vez que há um aumento da tradução proteica devido a presença dos tRNAs adicionais, acelerando a formação de novas cadeias polipeptídicas e resultando na formação de agregados (Rosano e Ceccarelli, 2014). Neste caso, quando a indução foi conduzida de modo prolongado e a baixa temperatura com quantidade diminuída do indutor IPTG, condição empregada de acordo com o item 4.13.3.1.2, a solubilidade da proteína poderia ter aumentado pela diminuição da taxa de transcrição e de tradução, viabilizando deste modo a expressão da proteína adequadamente enovelada, fato que não foi observado.

Barron e Bishop (2018) compararam a atividade de uma proteína globular recombinante contendo motivos *Zinc Finger*, p53, expressa em sistema heterólogo em meio de cultura LB suplementado e não suplementado com zinco, resultando na perda enzimática de p53 quando expressa em meio não suplementado. Neste trabalho, os autores, por análise de espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN), observaram que a ausência de atividade enzimática de p53 dava-se quando o zinco não estava presente na estrutura proteica, desestabilizando a molécula (Barron e Bishop, 2018).

Deste modo, a ausência de suplementação de um sal de zinco ao meio pode ter acarretado na formação de pontes dissulfeto entre as cisteínas ou na inclusão de outro metal ao sítio de ligação ao zinco, desestabilizando a proteína.

Porém, concentrações muito altas de íons de zinco resultam em desdobramento e agregação do motivo *Zinc Finger* (Butler e Loh, 2007).

Tentativas de otimização da expressão e solubilidade de TcZC3H24, entre elas a adição de etanol ao meio de cultivo, técnica que reproduz a resposta ao choque térmico em *E. coli* e que aumenta a solubilidade de algumas proteínas recombinantes, foram infrutíferas e a proteína manteve-se expressa sob a forma de corpúsculos de inclusão (Oganesyan et al., 2007).

Uma análise em softwares baseados em aprendizado de máquina que predizem a probabilidade de proteínas heterólogas serem expressas de forma solúvel em sistema bacteriano previram que TcZC3H24 é insolúvel tanto em sua forma nativa quanto fusionada à GST ou a histidinas (6xHIS) em sua porção N-terminal. Para estas análises, foram utilizados os softwares PROSO II (*PROtein SOLubility evaluator*) (Smialowski et al., 2012) e SOLpro (*Solubility upon Overexpression*) (Magnan et al., 2009), cujos algoritmos podem ser compreendidos na revisão de Habibi et al. (2014), sendo os resultados sumarizados na Tabela 17.

TABELA 17 - ANÁLISE DA SOLUBILIDADE DE TcZC3H24 QUANDO EXPRESSA EM SISTEMA BACTERIANO

Software	Predição	Referência
PROSO II (PROtein SOLubility evaluator)	Previu uma pontuação de solubilidade (<i>solubility score</i>) de 0,348 para a proteína nativa, de 0,287 para a proteína fusionada à GST e de 0,327 para a proteína contendo a cauda de histidinas (6xHIS)	Smialowski et al. (2012)
SOLpro (Solubility upon Overexpression)	Previu uma probabilidade de insolubilidade de 88,7% para a proteína nativa, de 71,2%, para a proteína fusionada à GST e de 88,5% para a proteína contendo a cauda de histidinas (6xHIS)	Magnan et al. (2009)

NOTA: *Solubility Score* consiste no índice de probabilidade da proteína ser expressa na forma solúvel em sistema bacteriano, variando seus valores de 0 a 1, sendo que a maior probabilidade de expressão solúvel é referente ao valor mais próximo a 1.

PROSO II (PROtein SOLubility evaluator), disponível em: <http://mips.helmholtz-muenchen.de/prosoII>.

SOLpro (Solubility upon Overexpression), disponível em <http://scratch.proteomics.ics.uci.edu>.

FONTE: A autora (2019).

Assim, prosseguiu-se com a proteína expressa em corpúsculos de inclusão, sendo realizado um ensaio de solubilidade empregando dissolução do extrato proteico induzido em tampões com diferentes concentrações de ureia (item 4.13.3.2). Após os ensaios de solubilização da proteína TcZC3H24 (item 4.13.3.2), foi constatado que a mesma é solubilizada em concentrações a partir de 4M de ureia.

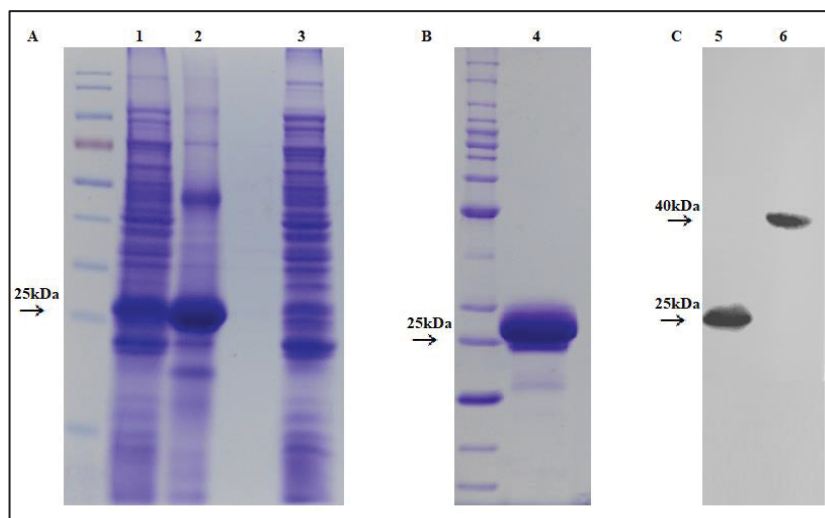
Tentativas de purificação de TcZC3H24 fusionada à etiqueta de histidinas (6xHIS) por cromatografia de afinidade (IMAC) em coluna de resina com afinidade a níquel (NI-NTA) também não tiveram sucesso, uma vez que a mesma formou agregados, impossibilitando sua purificação.

Uma possível explicação para esta agregação proteica é o fato do anel imidazólico presente na cadeia lateral da histidina possuir afinidade por cátions divalentes, como o zinco, resultando em interações intermoleculares entre o zinco presente no motivo *Zinc Finger* e a cauda de histidina ou na quelação do zinco pelos anéis imidazólicos.

Deste modo, optou-se pela purificação por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida, eliminando-se as etapas de desnaturação e renaturação da proteína.

Visto que após a etapa de purificação a etiqueta não seria removida, optou-se por prosseguir apenas com a proteína fusionada a cauda de histidinas (6xHIS), pois a mesma possui um menor tamanho, podendo resultar em menor interferência na produção do antissoro de TcZC3H24. A purificação da proteína recombinante foi realizada conforme item 4.13.3.3 e analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (item 4.12.2) (Figura 26A).

FIGURA 26 - PROTEÍNA RECOMBINATE TcZC3H24 PURIFICADA



LEGENDA: Em (A) observam-se as frações proteicas do extrato induzido. Sendo (1) a fração total do extrato induzido, (2) a fração insolúvel após sonicação, (3) a fração solúvel. Em (B4), a proteína purificada após eletroeluição. Em (C), ensaio de Western Blot desenvolvido com o anticorpo monoclonal anti-histidina, sendo (5) o extrato proteico total da indução de TcZC3H24 fusionada a histidinas (6xHIS) e (6) controle positivo, no qual foi utilizado o extrato proteico total da proteína hipotética com motivo *Zinc Finger* (ID TritypDB: BCY84_17496, 41,2 kDa) fusionada a cauda de histidinas (6xHIS) e expressa em *E. coli* Rosetta-gami™ 2(DE3). As setas indicam a massa corresponde ao marcador de peso molecular utilizado em cada ensaio. Em (A) e (C), marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) e em (B), marcador BenchMark™ Protein Ladder (Thermo Scientific).

FONTE: A autora (2019).

Deste modo, a proteína na forma de corpúsculos de inclusão, teve sua identidade confirmada por ensaio de Western blot desenvolvido com o anticorpo monoclonal anti-histidina (item 4.12.5, Figura 26C), sendo que para este ensaio foi utilizado como controle positivo o extrato proteico total da proteína hipotética com motivo *Zinc Finger* (ID TritypDB: BCY84_17496, 41,2 kDa) fusionada a cauda de histidinas (6xHIS) e expressa em *E. coli* Rosetta-gami™ 2(DE3).

Evidencia-se a indução de uma proteína com massa molecular compatível a TcZC3H24 truncada fusionada à cauda de histidinas, ou seja, com peso de 22,9 KDa.

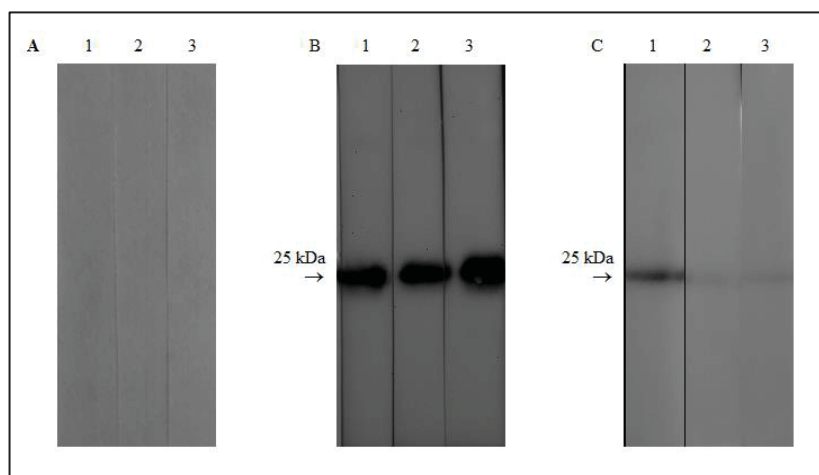
Previamente ao início das imunizações, foram realizados testes de especificidade por Western Blot com os soros dos animais (soro pré-imune) em extratos de *T. cruzi* epimastigotas (item 4.12.5), a fim de avaliar a presença de anticorpos com reatividade cruzada em proteínas presentes no extrato do parasita.

Em seguida, a proteína purificada TcZC3H24 foi utilizada na imunização de camundongos *Swiss* a fim de se obter o antissoro de TcZC3H24. O processamento da amostra e o protocolo de imunização seguiram conforme descrito em 4.14.

Após as imunizações, o sangue foi coletado (itens 4.14.3) e as amostras foram testadas quanto a reatividade com a proteína TcZC3H24 e especificidade em extrato proteico de *T. cruzi* epimastigota por ensaio de Western Blot (item 4.12.5).

A Figura 27 mostra os resultados dos ensaios por Western Blot da especificidade e reatividade do antissoro de TcZC3H24.

FIGURA 27 - ESPECIFICIDADE E REATIVIDADE DOS ANTISSOROS DE TcZC3H24



NOTA: Em (A), resultado observado da especificidade dos antissoros pré-imunes dos camundongos contra 1×10^7 células de extrato proteico de *T. cruzi* epimastigotas, em diluição de 1:100. Em (B), resultado observado para a reatividade dos antissoros de TcZC3H24 contra $1 \mu\text{g}$ de proteína recombinante purificada, na diluição de 1:1000. Em (C), resultado observado para a reatividade dos antissoros de TcZC3H24 contra 1×10^7 células de extrato proteico de *T. cruzi* epimastigotas, em diluição de 1:100. A numeração corresponde a identificação dos três camundongos usados na imunização e a seta indica a massa corresponde ao marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific).

FONTE: A autora (2019).

Demonstra-se assim, que o antissoro de TcZC3H24 é específico para as amostras dos três camundongos, embora tenha sido reativo em extrato de *T. cruzi* apenas com o soro obtido do camundongo 1. Diluições maiores do antissoro anti-TcZC3H24 não foram eficientes em detectar a proteína TcZC3H24 nos extratos de epimastigotas de *T. cruzi*.

Esta baixa avidéz pode ser explicada tanto pelo baixo título dos antissoros quanto pela relativa baixa expressão de TcZC3H24 nos epimastigotas. Deste modo, prosseguiu-se com o soro obtido pelo camundongo 1.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA TcZC3H24 EM *T. cruzi*

O soro anti-TcZC3H24 obtido foi utilizado na caracterização da expressão e localização celular desta proteína nas diferentes formas de *T. cruzi* ao longo do ciclo de vida do parasita.

Assim, um ensaio de Western Blot foi realizado utilizando extratos proteicos de *T. cruzi* nas formas epimastigotas (EPI), tripomastigotas metacíclicos (META) provenientes de diferenciação *in vitro* (item 4.11.3), amastigotas intracelular (AMA) obtidos por cavitação (item 4.11.4) e tripomastigotas sanguíneos (TRIPO) recolhidos de infecção em células VERO (item 4.11.5).

Cada extrato foi aplicado contendo o total de 1×10^7 parasitas, com exceção do extrato de tripomastigotas metacíclicos (META) o qual continha 2×10^7 parasitas, visto que há uma redução global da tradução neste estágio (Atwood et al., 2005).

A membrana contendo os extratos de *T. cruzi* foi incubada com o soro anti-TcZC3H24 na diluição de 1:50 por 18 horas a 4°C em agitação constante. O soro anti-TcGAPDH na diluição de 1:10000 foi utilizado como normalizador e incubado por 1h em temperatura ambiente com agitação constante.

A membrana foi revelada por quimiluminescência pela atividade da peroxidase em fotodocumentador L-Pix Chemi Express (Loccus Biotecnologia).

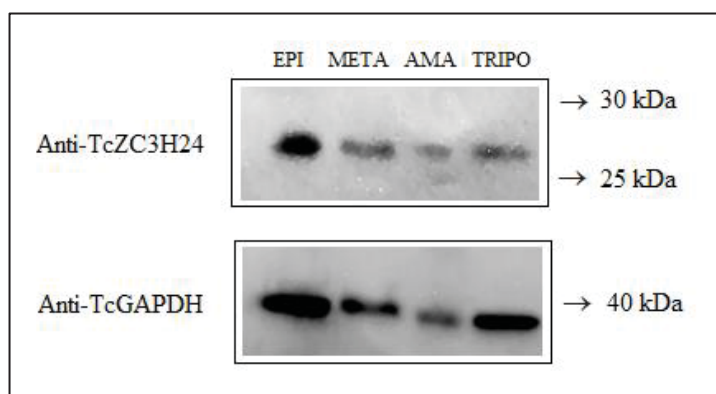
Este ensaio revelou que a proteína TcZC3H24 é expressa em todos os estágios de desenvolvimento do parasita (Figura 28), o que pode indicar que TcZC3H24 possui uma função importante na homeostase de *T. cruzi* visto que é transcrito constitutivamente ao longo do ciclo de vida.

A expressão das proteínas de ligação ao RNA tem se mostrado diferencialmente expressas ao longo do ciclo de vida do parasita e muitas delas enriquecidas no processo de diferenciação.

A primeira descrição do padrão de regulação da expressão de proteínas de ligação ao RNA com motivo CCCH em tripanosoma foi relatado por Hendriks et al. (2001), o qual demonstrou que TbZFP1 é transitoriamente enriquecida durante a diferenciação para as formas procíclicas em *T. brucei* (Hendriks et al., 2001), enquanto as proteínas TbZFP2 e TbZFP3, proteínas associadas a TbZFP1 em um complexo proteico, são expressas igualmente em formas sanguíneas e procíclicas e exibem uma expressão uniforme ao longo do processo de diferenciação para formas procíclicas (Hendriks et al., 2001; Paterou et al., 2006).

Entre as proteínas de ligação ao RNA de *T. cruzi*, TcUBP2 é predominantemente expressa em epimastigotas e pouco expressa em amastigotas (D'Orsoe Frasc, 2002), TcRBP3 e TcRBP4 expressas em epimastigotas (De Gaudenzi et al., 2003), TcRBP19 expressas em amastigotas (Pérez-Díaz et al., 2007), TcZFP2 regulada negativamente em tripomastigotas metacíclicos (Mörking et al., 2012) e TcZC3H31 regulada positivamente nos estágios epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos (Alcantara et al., 2018).

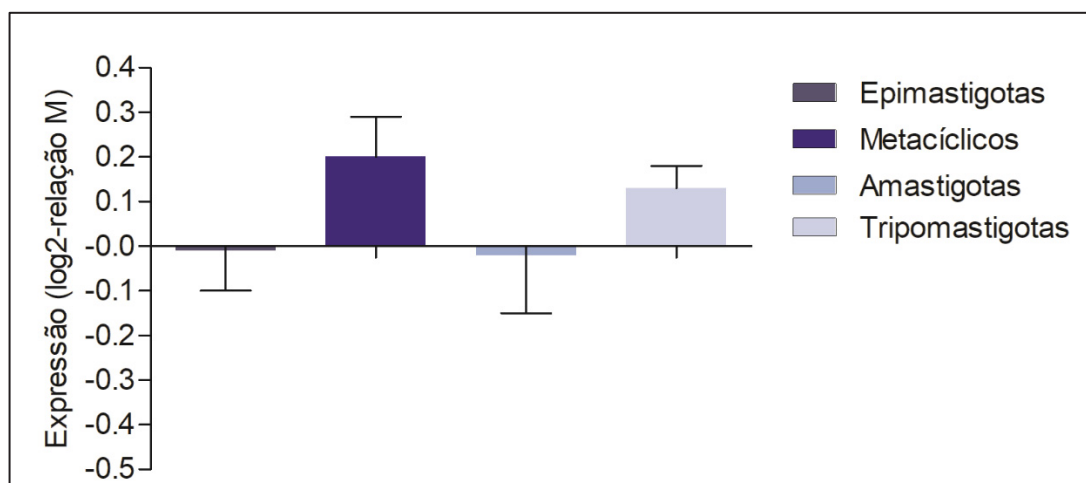
FIGURA 28 - EXPRESSÃO DE TcZC3H24 NAS DIFERENTES FORMAS DE *T. cruzi* AO LONGO DO CICLO DE VIDA



NOTA: Ensaio de Western Blot contra os extratos proteicos de *T. cruzi* nas formas epimastigotas (EPI), tripomastigotas metacíclicos (META), amastigotas intracelular (AMA) e tripomastigotas sanguíneos (TRIPO) incubado com o soro anti-TcZC3H24 na diluição de 1:50 e soro anti-TcGAPDH na diluição de 1:10000.

Ao se analisar os dados de microarray da expressão gênica durante o ciclo de vida do *T. cruzi* cepa CL Brener Esmeraldo-like obtido por Minning et al. (2009), depositado no banco de dados do Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) sob o acesso GSE14641, nota-se-se que o mRNA de TcZC3H24 é transcrito durante todo o ciclo, conforme observado na Figura 29.

FIGURA 29 - TRANSCRIPTOMA DE TcZC3H24 AO LONGO DO CICLO DE VIDA DE *T. cruzi* CL Brener Esmeraldo-like



NOTA: Níveis de expressão de mRNA de TcZC3H24 nos estágios do ciclo de vida do *T. cruzi* determinados por análise de microarray.

Foram realizadas seis hibridizações, sendo três experimentos de *dye-swap* a partir de três amostras independentes (réplicas biológicas).

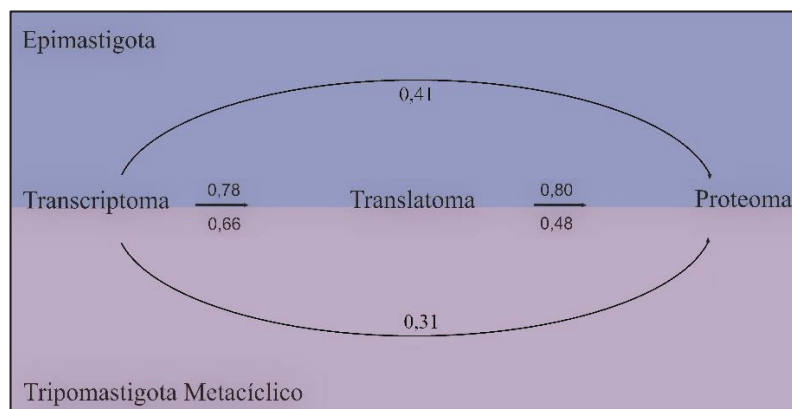
Em cada caso, a amostra experimental foi de um único estágio do ciclo de vida e a amostra controle foi uma mistura igual de todos os quatro estágios do ciclo de vida.

Os valores de expressão para experimentos de microarray de 2 canais são mostrados como relações logarítmicas ($M = \log_2 \text{Cy5/Cy3}$).

Embora tanto os resultados de transcriptômica (Figura 29) quanto a análise da expressão da proteína por Western Blot (Figura 28) indiquem que TcZC3H24 está presente nos quatro principais estágios de desenvolvimento de *T. cruzi*, não é possível correlacionar a abundância entre o número de transcritos e de produtos proteicos deste gene, visto que a regulação da expressão gênica de *T. cruzi* é predominantemente no nível pós-transcricional.

Smircich et al. (2015), em uma correlação do proteoma, transcriptoma e o translátoma de *T. cruzi* para os estágios epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos, observaram que os dados do translátoma são melhor correlacionados com a expressão da proteína do que os níveis do transcriptoma, refletindo a relevância da regulação traducional e sua contribuição para o controle da expressão gênica durante o desenvolvimento do parasita, conforme observado na Figura 30.

FIGURA 30 - CORRELAÇÃO DO PROTEOMA COM O TRANSCRIPTOMA E O TRANSLATOMA PARA OS ESTÁGIOS EPIMASTIGOTA E TRIPOMASTIGOTA METACÍCLICOS DE *T. cruzi*



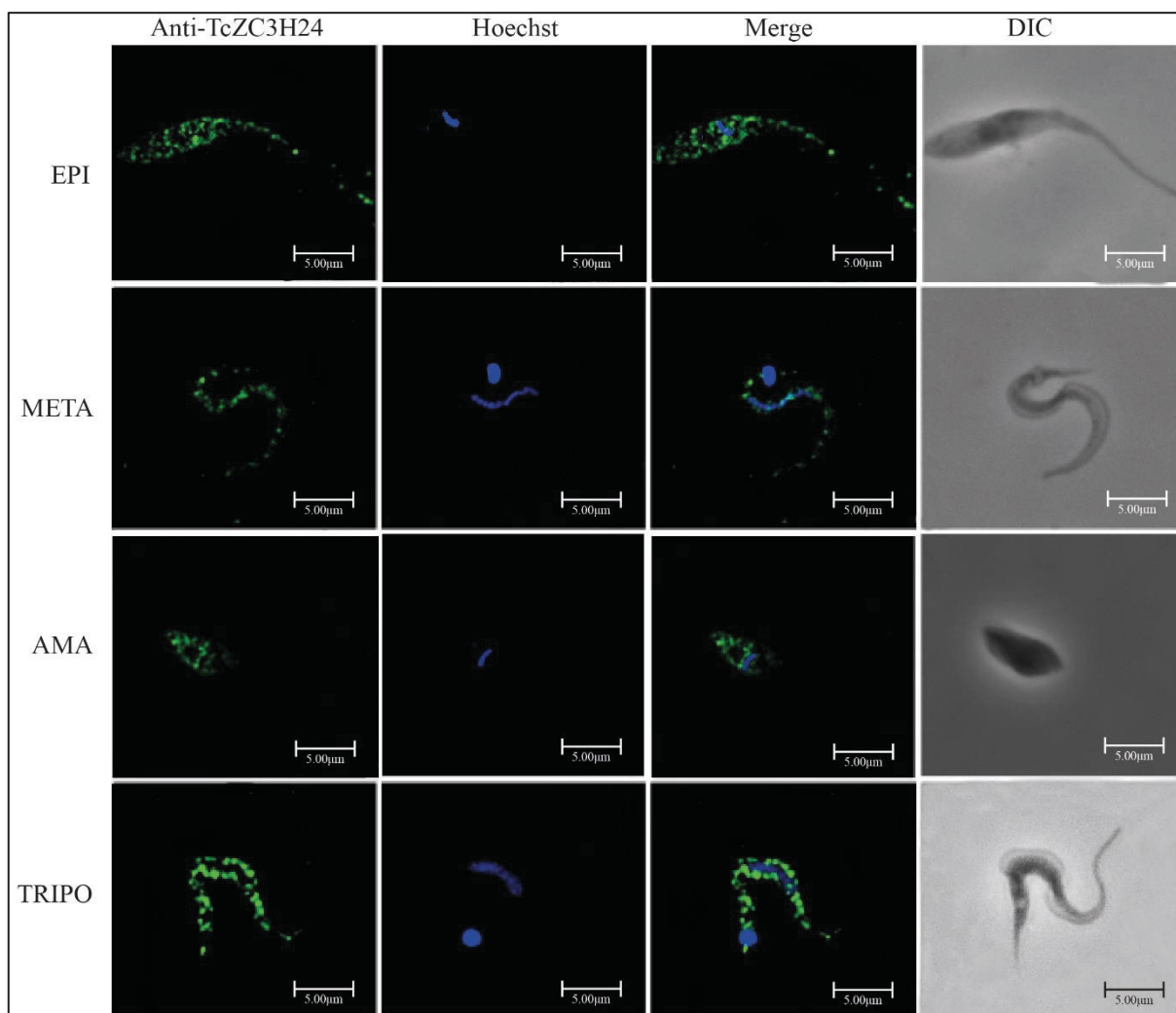
NOTA: Os valores indicados referem-se ao coeficiente de correlação de Pearson para as diferentes correlações. Os valores superiores correspondem aos observados para a fase epimastigota e os valores inferiores ao estágio tripomastigota metacíclico de *T. cruzi*.

FONTE: Modificado de Smircich et al. (2015).

Em seguida buscou-se avaliar a localização celular da proteína por imunofluorescência indireta em microscopia ótica de fluorescência, ensaio executado de acordo com o item 4.12.6. Novamente, todos os estágios de desenvolvimento do parasita foram analisados.

O antissoro TcZC3H24 foi utilizado na diluição de 1:30 e o anticorpo secundário Alexa Flúor-488 na diluição de 1:500. O DNA nuclear e cinetoplasto foram corados com Hoechst 33258 na concentração de 1 µg/mL.

A localização de TcZC3H24 mostrou-se irregularmente distribuída no citoplasma, possuindo um perfil relacionado a grânulos (Figura 31).

FIGURA 31 - IMUNOLOCALIZAÇÃO DE TcZC3H24 EM *T. cruzi*

NOTA: Ensaio de imunolocalização com as formas epimastigotas (EPI), tripomastigotas metacíclicos (META), amastigotas intracelular (AMA) e tripomastigotas sanguíneos (TRIPO).

LEGENDA: anti-TcZC3H24: visualização da marcação obtida através da incubação dos parasitas com o soro anti-TcZC3H24. Hoechst: marcação de DNA presente no núcleo e no cinetoplasto. MERGED: sobreposição das marcações provenientes do soro anti-TcZC3H24 com a marcação do DNA; DIC: Imagens dos parasitas obtidos através de contraste por interferência diferencial.

Em tripanossomatídeos, grânulos de RNA estão relacionados a diferenciação celular e a resposta ao estresse (Kramer, 2014).

Existem muitas diferenças entre os grânulos de RNA encontrados nas células e estes dependem principalmente do organismo, da fase de desenvolvimento e das condições ambientais, sendo comumente discriminados em grânulos de estresse (*stress granules*) e corpos de processamento (*processing bodies*, *p-bodies*), os quais estão envolvidos na regulação da expressão gênica em eucariotos, tais como estocagem, degradação, distribuição e transporte de mRNAs nas células. (Chan e Slack, 2006; Ivanov e Nadezhdina, 2006; Anderson e Kedersha, 2009).

Corpos de processamento são estruturas resultantes da agregação de complexos de ribonucleoproteínas (RNPs) constitutivamente presentes em todas as células e estão relacionados à degradação de mRNAs e ao armazenamento destes juntamente a fatores que inibem o processo de tradução, sendo que o número e o tamanho dos corpos de processamento são proporcionais à quantidade de mRNAs não traduzidos. Além disso, há uma troca de mRNAs entre os polissomos e os corpos de processamento (Teixeira et al., 2005; Anderson e Kedersha, 2006).

Grânulos de estresse se formam em resposta ao estresse e são complexos de ribonucleoproteínas citoplasmáticas que se formam quando o início da tradução é prejudicado, contendo complexos iniciadores e repressores de tradução e em alguns casos subunidades ribossômicas pequenas (Anderson e Kedersha, 2006; Buchan e Parker, 2009).

Embora a montagem e composição de diferentes tipos de grânulos de RNA seja distinta, todos os grânulos contêm transcritos que estão traducionalmente silenciados e tanto os corpos de processamento quanto os grânulos de estresse compartilham muitas proteínas e interagem trocando mRNAs entre si (Kedersha et al., 2005; Newbury et al., 2006).

Inúmeras proteínas de tripanossomatídeos já foram identificadas associadas a estes grânulos, destacando-se a Dhh1, SCD6, CAF1, eIF4E, XRNA, PABP1 e PABP2 (Kramer, 2014).

A RNA helicase TcDhh1, localizada em grânulos no citoplasma durante a fase de crescimento logarítmica é aumentada em número sob estresse nutricional, foi associada com proteínas da subunidade 40S ribossômica, fatores de iniciação e proteínas de choque térmico (Holetz et al., 2007; Holetz et al., 2010).

TbSCD6, concentrada em grânulos citoplasmáticos, está relacionada a repressão da tradução de mRNAs (Kramer et al., 2010b). TbCAF1, localizada em grânulos citoplasmáticos, regula os níveis de transcritos através do processo de degradação ou decaimento do mRNA pela atividade de deadenilação da cauda poli-A (Schwede et al., 2008; Kramer et al., 2012).

O fator de iniciação da tradução TceIF4E1, proteína ligadora de cap que sob estresse é retida e se localiza no núcleo, regula a síntese de proteínas (Kramer et al., 2012). TcXRNA, uma exonuclease citoplasmática 5'-3', localizada em grânulos no citoplasma sob estresse nutricional e colocalizada com grânulos de distintas ribonucleoproteínas na periferia nuclear quando o processamento de mRNA é inibido, catalisa uma das vias de degradação de mRNA (Cassola et al., 2007; Da Costa et al., 2018).

TcPABP1 e TcPABP2, que em parasitas submetidos a estresse nutricional mostraram-se fortemente acumuladas em grânulos de mRNA no citoplasma, estabiliza transcritos e interage com o complexo de iniciação da tradução (D’Orso et al., 2003).

Fritz et al. (2015), em uma análise da fração celular altamente enriquecida de grânulos provenientes de *T. brucei* em estresse nutricional, constataram que dentre as proteínas enriquecidas nestes grânulos a maior fração consistia de proteínas de ligação ao RNA com domínios PUF, *Zinc Finger* CCCH, DEAD/H helicase e RRM (Fritz et al., 2015), ressaltando a importância destas proteínas na regulação gênica.

Embora a presença de grânulos em *T. cruzi* tenham sido descritos como reguladores pós-transcricionais da expressão gênica e tenham sido postulados na modulação da tradução, atuando tanto como reservatórios de proteção e degradação de mRNA, especialmente quando as células são submetidas a estresse (Kedersha et al., 2005; Anderson e Kedersha, 2006), sem mais testes não é possível elucidar a função exata destes grânulos para TcZC3H24.

5.4 SUPEREXPRESSÃO DE TcZC3H24

A fim de elucidar possíveis funções de TcZC3H24 foi avaliado se a superexpressão desta proteína incorreria em alteração fenotípica em *T. cruzi*.

Para isso, formas epimastigotas de *T. cruzi* selvagem em fase logarítmica de crescimento foram transfectados com os plasmídeos pTc3xHA_ZC3H24 Δ stop_CO-bsd, pTc3xHA_ZC3H24_NH-bsd, pTc_ZC3H24-bsd, pTcGFP_ZC3H24 Δ stop_CO-bsd e pTcGFP_ZC3H24_NH-neo, descritos na Tabela 13.

As transfecções foram conduzidas conforme descrito no item 4.18.

A análise da expressão ectópica de TcZC3H24 deu-se por Western Blot (item 4.12.5) com a utilização do soro anti-TcZC3H24 na diluição de 1:50 por 18 horas a 4°C em agitação constante, do soro anti-GFP na diluição de 1:500 por 1 hora em temperatura ambiente com agitação constante, do soro anti-HA na diluição de 1:1000 por 1 hora em temperatura ambiente com agitação constante. Os soros anti-TcGAPDH na diluição de 1:10000 e anti-TcSUB2 na diluição de 1:600 foram utilizados como normalizadores e incubados por 1h em temperatura ambiente com agitação constante.

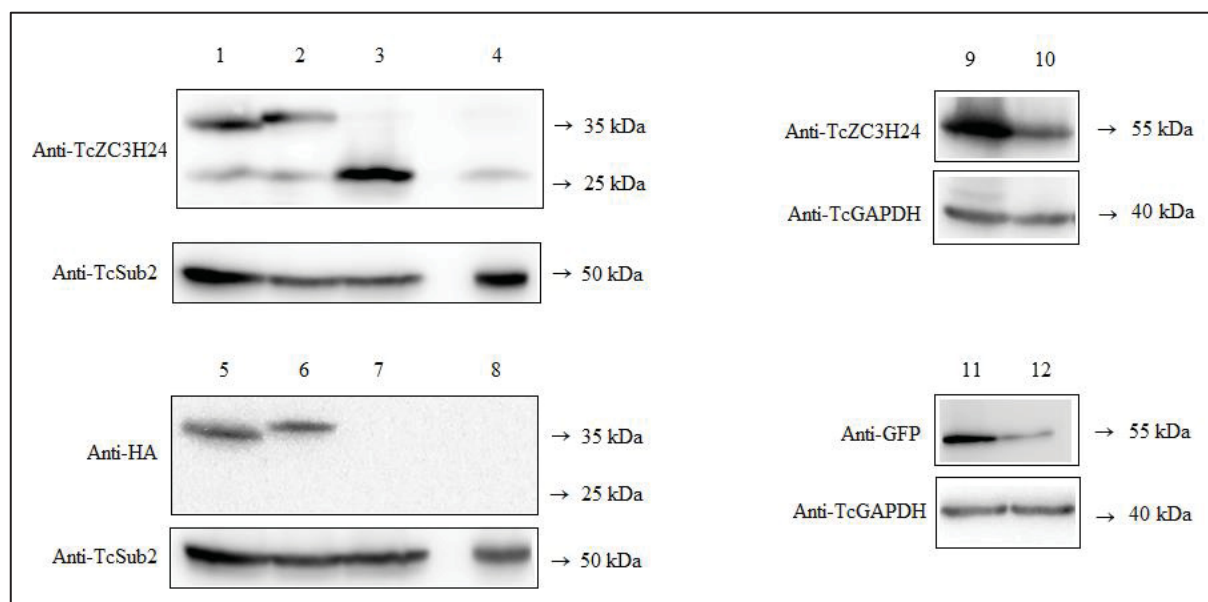
A Tabela 18 apresenta o tamanho e a característica das proteínas de expressão ectópica em *T. cruzi* e a Figura 32 o perfil da imunodeteção destas proteínas por Western Blot.

TABELA 18 - CARACTERÍSTICAS DAS PROTEÍNAS DE EXPRESSÃO ECTÓPICA DE TcZC3H24

Vetor	Expressão de TcZC3H24	Tamanho (kDa)
TcZC3H24::HA	TcZC3H24 fusionada a três etiquetas HA em tandem na porção C-terminal	34,1
HA::TcZC3H24	TcZC3H24 fusionada a três etiquetas HA em tandem na porção N-terminal	33,7
TcZC3H24	TcZC3H24 sem etiqueta	28,7
TcZC3H24::GFP	TcZC3H24 fusionada a GFP na porção C-terminal	56,9
GFP::TcZC3H24	TcZC3H24 fusionada a GFP na porção N-terminal	56,8

FONTE: A autora (2019).

FIGURA 32 - IMUNODETECÇÃO DAS SUPEREXPRESSÕES DE TcZC3H24



NOTA: Extratos proteicos de 1×10^6 de *T. cruzi* epimastigotas expressando (1) e (5): HA::TcZC3H24; (2) e (6): TcZC3H24::HA; (3) e (7): TcZC3H24; (4) e (8): Extrato proteico controle de *T. cruzi* epimastigotas selvagens; (9) e (11): GFP::TcZC3H24 (10) e (12): TcZC3H24::GFP.

O soro anti-TcZC3H24 foi incubado na diluição de 1:50, o soro anti-TcGAPDH na diluição de 1:10000, o soro anti-GFP na diluição de 1:500, o soro anti-HA na diluição de 1:1000 e o anti-TcSUB2 na diluição de 1:600.

A seta indica a massa corresponde ao marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific).

FONTE: A autora (2019).

Conforme observado na Figura 32, a análise da superexpressão de TcZC3H24 demonstrou que as expressões ectópicas em *T. cruzi* evidenciam bandas com massa molecular compatível as proteínas expressas por TcZC3H24::HA, HA::TcZC3H24, TcZC3H24, GFP::TcZC3H24 e TcZC3H24::GFP. Nota-se, inclusive, nos ensaios de imunodeteção utilizando o anticorpo anti-TcZC3H24 que é possível observar a proteína endógena em quantidades muito baixas em (1), (2) e (4).

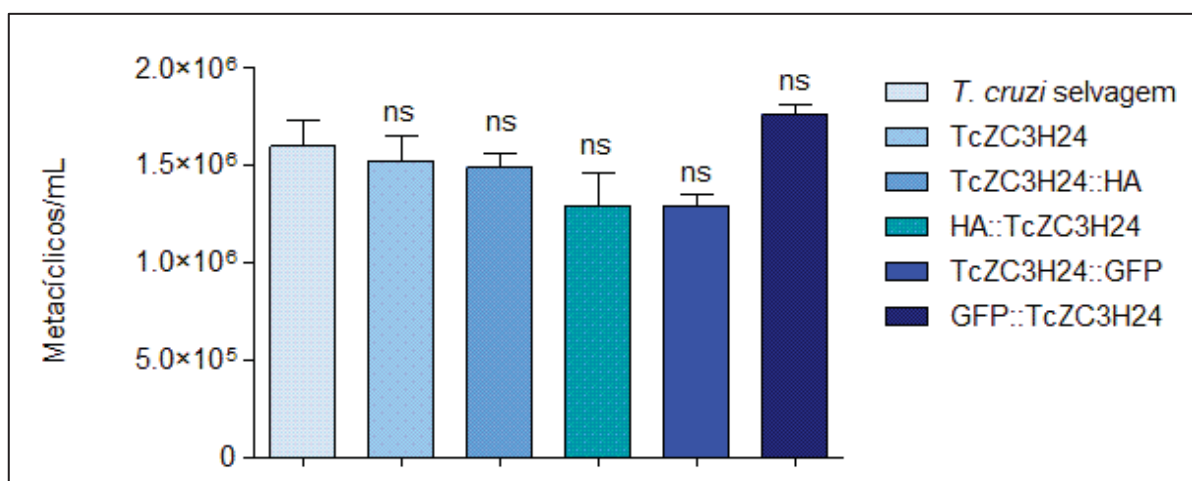
Houve uma pequena variação na expressão entre as diversas proteínas, isso dá-se possivelmente às características regulatórias da proteína, a natureza da etiqueta a ela fusionada e também a localização da etiqueta na proteína (porção N- ou C-terminal).

Prosseguiu-se com a análise dos superexpressores quanto a capacidade de diferenciação de formas epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos (Figura 33).

Parasitas na forma tripomastigota metacíclicos foram obtidos conforme descrito no item 4.11.11.

A contagem diferencial de metacíclicos deu-se em câmara de NeuBauer, sendo os parasitas retirados do sobrenadante do meio TAU3AAG. Os experimentos foram realizados em triplicatas técnicas e biológicas e os dados analisados por teste t não pareado utilizando o software GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software Inc.).

FIGURA 33 - METACICLOGÊNESE DAS SUPEREXPRESSÕES DE TcZC3H24

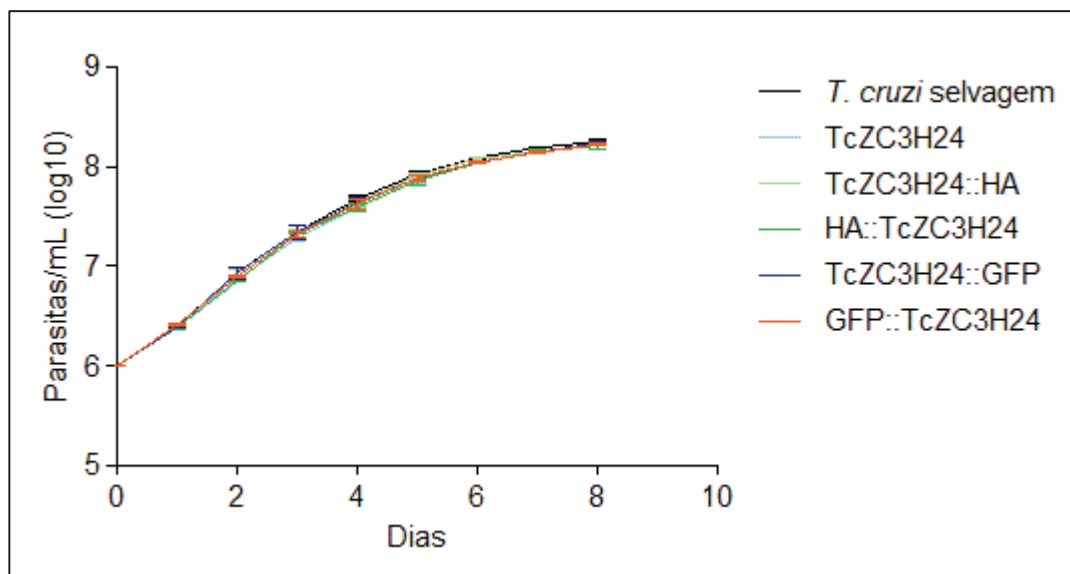


NOTA: Os dados representam valores médios e desvios padrão de um experimento independente e representativo em triplicata biológica, onde ns (não significativo) corresponde a $p > 0,05$ em relação a amostra *T. cruzi* selvagem. Dados analisado pelo teste t não pareado, utilizando o software GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software Inc.).

Em seguida os parasitas foram avaliados quanto a proliferação celular (Figura 34), comparando-se as células superexpressoras de TcZC3H24 aos selvagens ao longo de oito dias. Esta análise foi executada conforme descrito no item 4.11.10.

As contagens foram realizadas em triplicatas técnicas e biológicas e os dados analisados por Two-Way Anova com pós teste de Bonferroni, utilizando o software GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software Inc.)

FIGURA 34 – PROLIFERAÇÃO CELULAR DAS SUPEREXPRESSÕES DE TcZC3H24



NOTA: Os dados representam valores médios e desvios padrão de três experimentos independentes. Não houve diferença estatística entre a população selvagem e a superexpressora de TcZC3H24 ($P > 0,05$). Dados analisado por Two-Way Anova com pós teste de Bonferroni, utilizando o software GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software Inc.).

A superexpressão de TcZC3H24 não acarretou em defeitos no crescimento celular e tampouco na capacidade de diferenciação *in vitro* das formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos.

Nas condições analisadas, a superexpressão de proteínas não sobrecarregou os recursos celulares para tradução, dobramento, localização ou degradação proteica a ponto de se evidenciar alteração no fenótipo em relação ao *T. cruzi* selvagem nas análises executadas, ou seja, não houve alteração morfológica em epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos, e o processo de metaciclogênese *in vitro* e proliferação celular evoluíram de modo semelhante ao grupo controle.

Ainda, pode ter ocorrido um equilíbrio estequiométrico entre a proteína superexpressa e seu alvo ou seus alvos, sendo mantido a razão molecular do complexo formado entre eles. Caso a superexpressão tenha proporcionado a ligação de TcZC3H24 a alvos inespecíficos ou propiciado a formação de complexos anormais, tal desequilíbrio não incorreu em fenótipo aparente quando comparado ao parasita selvagem.

Outra possível causa da ausência de alteração fenotípica em relação ao grupo controle pode estar relacionada a expressão da proteína em sua forma não ativa, podendo existir um mecanismo de controle pós-traducional.

Como exemplo podem-se citar as proteínas Rab, que são capazes de alternar entre uma forma ativa, ligada a GTP, e uma inativa, ligada ao GDP (Bourne et al., 1991), sendo que apenas a

conformação ativa destas proteínas são capazes de regular o transporte vesicular específico ou o processo de fusão de membrana (Schiene et al., 2004). Deste modo, em trabalhos com RabA2, uma importante proteína para a nodulação, gênese e crescimento de cabelos na raiz de feijoeiro, quando esta proteína é superexpressa na forma selvagem não é observado efeito sobre o fenótipo na planta, evidenciando que sua atividade é determinada por modificações pós-traducionais e localização na membrana (Blanco et al., 2009).

A forma ativa de uma proteína pode-se dar também por *splicing* alternativo, o qual pode alterar a região regulatória 5'UTR ou o códon de início de tradução, modificando a proteína ou a regulação da expressão gênica (Nilsson et al., 2010).

Em *T. brucei* foi encontrado 2500 eventos de *splicing* alternativo e mais de 600 transcritos processados diferencialmente entre os estágios de vida, apoiando a idéia de que o *splicing* alternativo tem consequências funcionais para a regulação do desenvolvimento do parasita (Nilsson et al., 2010).

Inúmeros casos de processamento alternativo foram descritos em *T. cruzi*. Sítios alternativos de poliadenilação foram evidenciados para os genes da histona H2A (Marañón et al., 1998) e para proteína de choque térmico HSP10 (Fernandes et al., 2005) e *trans-splicing* alternativo foram descritos para os genes da proteína ribossômica P2 β (Vazquez et al., 1994), histona H2A (Marañón et al., 1998), TcRho1 (Nepomuceno-Silva et al., 2001) e TcLYT1 (Manning-Cela et al., 2002). Exemplificando, LYT1 é uma proteína com atividade lítica em condições ácidas, a qual participa do processo de infecção e do processo de transição estágio-específica em *T. cruzi* (Manning-Cela et al., 2001; Manning-Cela et al., 2002). Estudos demonstraram que parasitas mutantes nulos para LYT1 resultaram na atenuação da capacidade de infecção pelo *T. cruzi* e na conversão mais eficiente de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos e amastigotas quando comparados a parasitas selvagens, sendo este fenômeno explicado pela tradução desta proteína em isoformas originadas por eventos de *trans-splicing* alternativo (Manning-Cela et al., 2002). Assim, quando o *trans-splicing* resulta na tradução de uma proteína de 552 aminoácidos, mLYT1, esta se localizada na membrana plasmática e é responsável pela formação de poros no momento da infecção. A tradução de uma proteína menor em 28 aminoácidos na porção amino terminal, kLYT1, localiza-se em dois pontos na zona cinetofagelar mitocondrial e está relacionada ao papel de desenvolvimento do parasita (Benabdellah et al., 2007).

Há ainda a regulação diferencial de *splicing* alternativo estágio-específica em *T. cruzi*, exemplificado pelo gene que codifica a enzima prolina racemase (TcPRAC), que possui duas isoformas, uma secretada e expressa apenas nas formas tripomastigotas metacíclicas e

tripomastigotas sanguíneas, outra é citosólica e provavelmente constitutivamente expressa durante o ciclo de vida do parasita, (Reina-San-Martín et al., 2000; Chamond et al., 2003; Chamond et al., 2005).

Modificações pós-traducionais em RBPs podem alterar a ligação ao RNA, a função e a localização destas proteínas, sendo que para proteínas de ligação ao RNA em tripanossomatídeos as modificações comumente descritas na literatura consistem de fosforilação, metilação, sumoilação e ubiquitinação (Glisovic et al., 2008; Mittal et al., 2009).

No ensaio de imunodectecção por Western Blot ao longo do ciclo de vida do parasita não foi detectado diferenças no padrão de expressão da proteína entre os estágios de *T. cruzi* analisados que indique que a mesma seja regulada por alguma modificação pós traducional, ou seja, diferenças de tamanho entre as bandas ou bandas adicionais. Assim, a fim de elucidar se TcZC3H24 possui alguma modificação pós traducional, fator indispensável para a correta atividade da proteína, buscou-se modificações pós traducionais em dados gerados para o proteoma de *T. cruzi* na forma epimastigota de proteínas sumoilizadas (Bayona et al., 2011), no fosfoproteoma de *T. cruzi* em diferentes fases da metaciclogênese (Marchini et al., 2011), no fosfoproteoma e proteoma de *T. cruzi* sob estresse nutricional (Amorim et al., 2017) e no proteoma de *T. cruzi* contendo proteínas N-miristoiladas (Roberts e Fairlamb, 2016). Contudo, não se encontraram modificações pós traducionais para a proteína TcZC3H24, permanecendo incógnita se a mesma poderia se encontrar na forma inativa.

Visto que a superexpressão não forneceu indícios quanto à função de TcZC3H24, prosseguiu-se com a deleção do gene a fim de obter alguma alteração fenotípica em relação ao parasita selvagem.

5.5 NOCAUTE GÊNICO

Com o objetivo de elucidar a função gênica de TcZC3H24 foram obtidos parasitas *knockout* nulos (KO) para o gene em questão através das técnicas de recombinação homóloga tanto por inativação do gene TcZC3H24 por inserção de cassetes contendo genes repórteres quanto pela técnica de CRISPR/Cas9.

Na primeira, a inativação do gene ocorreu pelo processo de recombinação homóloga através da inserção, na sua região codificante, de genes repórteres que codificam as enzimas que conferem resistência aos antibióticos G418 e higromicina B.

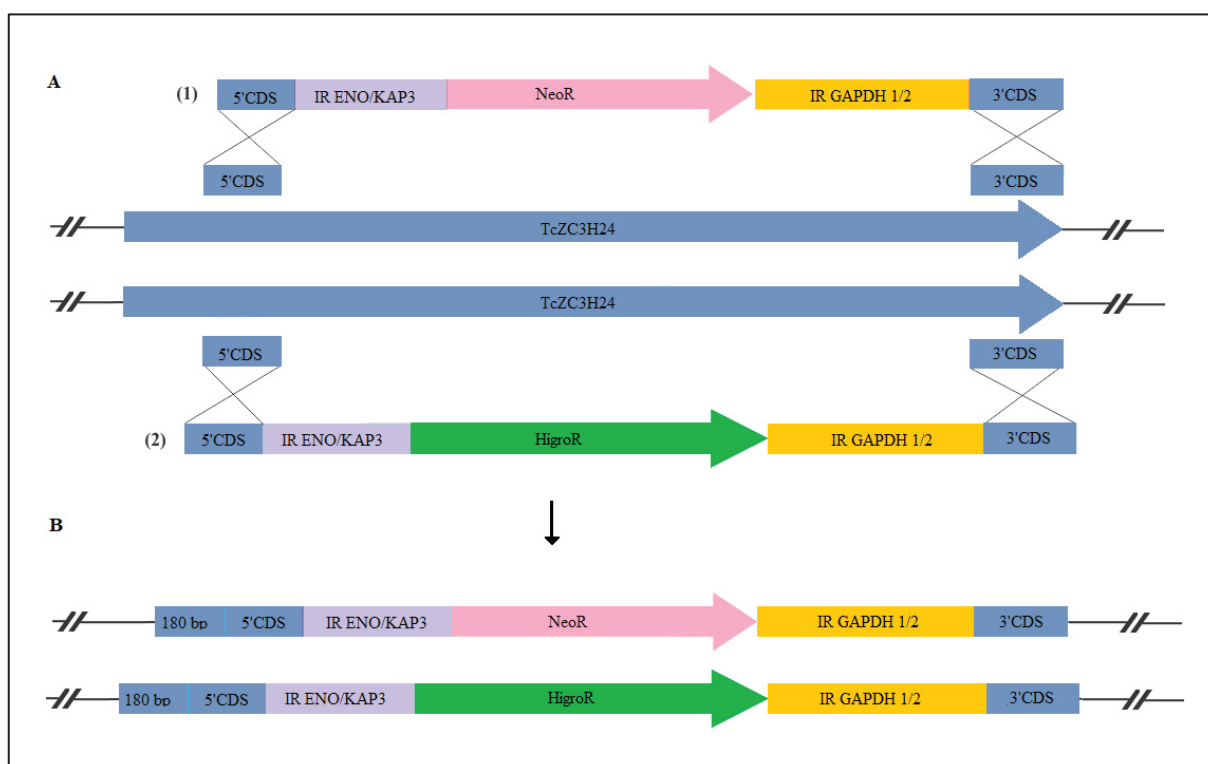
Para isso, os plasmídeos pTc2KO-ZC3H24-neo e pTc2KO-ZC3H24-hyg, obtidos de acordo com o item 4.15, foram utilizados para amplificar os fragmentos compreendidos entre

os pares de iniciadores ZC3H24_UPS_F e ZC3H24_DOWN_R (Tabela 4), resultando nos cassetes 5'CDS-NEO-3'CDS e 5'CDS-HYGRO-3'CDS (item 4.15.3) (Figura 16).

Assim, o cassete 5'CDS-HYGRO-3'CDS foi transfectado em *T. cruzi* selvagem (item 4.15.4) e selecionado por higromicina, obtendo-se o mutante simples TcZC3H24::Hygro.

Após verificação da correta integração do cassete 5'CDS-HYGRO-3'CDS no locus do gene *TcZC3H24*, o cassete 5'CDS-NEO-3'CDS foi transfectado em TcZC3H24::Hygro (Figura 35), resultando em mutantes resistentes aos antibióticos higromicina e G418, denominados TcZC3H24::Neo/TcZC3H24::Hygro.

FIGURA 35 - REPRESENTAÇÃO DO NOCAUTE GÊNICO DE *TcZC3H24* POR RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA PELA TRANSFEÇÃO DE CASSETES CONTENDO GENES REPÓRTERES



NOTA: Em (A), Diagrama do locus gênico de TcZC3H24 no parasita selvagem, demonstrando a recombinação por homologia com o cassete contendo o gene de resistência a neomicina (1) e o cassete contendo o gene de resistência a higromicina (2). Em (B), o locus gênico esperado para o *knockout* nulo de *TcZC3H24* após a correta integração dos cassetes. NeoR: gene que codifica a enzima neomicina fosfotransferase, HygroR: gene que codifica a enzima higromicina fosfotransferase, IR NEO/KAP3: região intergênica de *T. cruzi* situada entre os genes que codificam as proteínas enolase (TcCLB.511529.90) e KAP3 (TcCLB.511529.80), IR GAPDH 1/2: região intergênica de *T. cruzi* situada entre duas cópias do gene que codifica a enzima GAPDH (TcCLB.506943.60 e TcCLB.506943.50), 180 bp: primeiros 180 bp da região codante de *TcZC3H24*.

FONTE: A autora (2019).

Conforme observado pelo diagrama da Figura 35 a estratégia de nocaute por recombinação homóloga para *TcZC3H24* por substituição por genes repórteres não seguiu os padrões comumente empregados para este tipo de manipulação gênica, onde regiões que

flanqueiam o gene são recombinadas com a finalidade de todo o gene ser substituído pelo cassete contendo o marcador de seleção. Percebe-se que os primeiros 78 aminoácidos da região codante permaneceram no locus gênico. Isto ocorreu pelo fato da estratégia de genética reversa ter sido implementada com base no gene erroneamente anotado por Grisard et al. (2014).

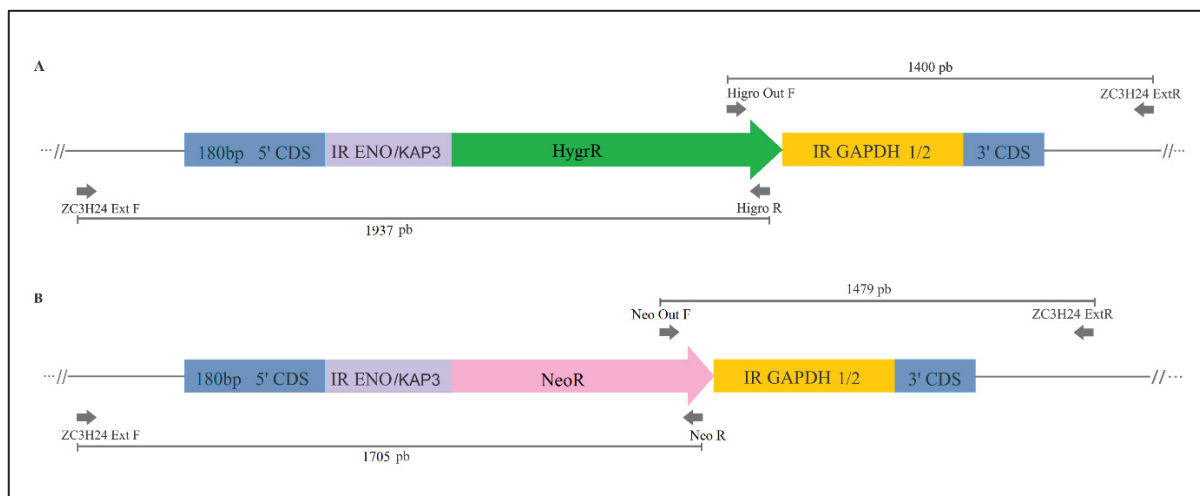
A verificação da correta integração dos cassetes 5'CDS-NEO-3'CDS e 5'CDS-HYGRO-3'CDS no locus do gene *TcZC3H24* para os mutantes *TcZC3H24-26::Neo/TcZC3H24-26::Hygro* procedeu-se por amplificação por PCR a partir do DNA genômico (item 4.12.4) com os pares de primers ZC3H24_Ext_F/Neo_R, ZC3H24_Ext_R/Neo_Out_F, ZC3H24_Ext_F/Higro_R e ZC3H24_Ext_R/Higro_Out_F (Tabela 4).

Visto que os iniciadores ZC3H24_Ext_F e ZC3H24_Ext_R hibridizam em regiões externas ao locus do gene *TcZC3H24* (o primeiro é complementar a uma sequência de 327 bp a montante da região de integração do cassete e o segundo é complementar a 477 bp a jusante desta mesma região) e os iniciadores Neo_R, Neo_Out_F, Higro_R e Higro_Out_F hibridizam-se na sequência codificadora inserida nos cassetes que confere resistência aos antibióticos, estas amplificações apenas podem ocorrer se os cassetes foram corretamente integrados por recombinação homóloga.

A Figura 36 apresenta o local de hibridização dos iniciadores utilizados para a confirmação da correta inserção dos cassetes de recombinação homóloga e o tamanho dos amplicons esperados para cada reação de amplificação por PCR.

Os produtos da amplificação foram detectados em gel de agarose 0,8% e corados em brometo de etídio (0,5 µg/ml) (Figura 37).

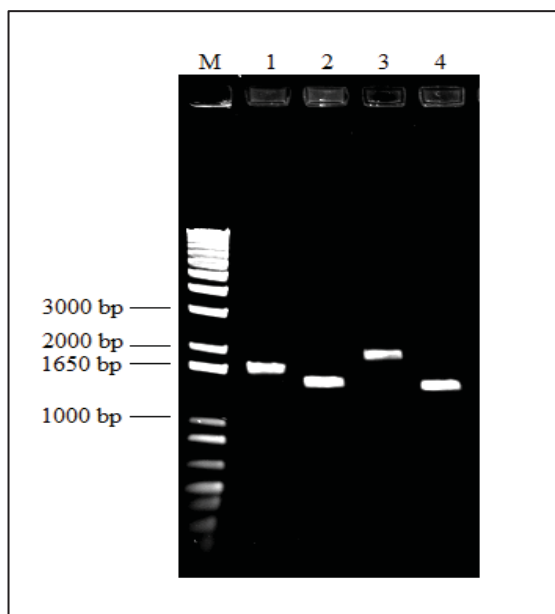
FIGURA 36 - DIAGRAMA REPRESENTATIVO DA INTEGRAÇÃO DOS CASSETES DE RECOMBINAÇÃO NO LOCUS DO GENE *TcZC3H24*



NOTA: Diagrama do locus gênico esperado para o nocaute nulo de *TcZC3H24* após a correta integração dos cassetes. São mostrados os tamanhos esperados para os produtos amplificados pelos iniciadores ZC3H24_Ext_F/Neo_R (1705 bp), ZC3H24_Ext_R/Neo_Out_F (1479 bp), ZC3H24_Ext_F/Higo_R (1937 bp) e ZC3H24_Ext_R/Higo_Out_F (1400 bp). As setas indicam os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações de PCR.

FONTE: A autora (2019).

FIGURA 37 - PERFIS ELETROFORÉTICOS PARA VERIFICAÇÃO DA INTEGRAÇÃO DOS CASSETES NO LOCUS DO GENE *TcZC3H24*



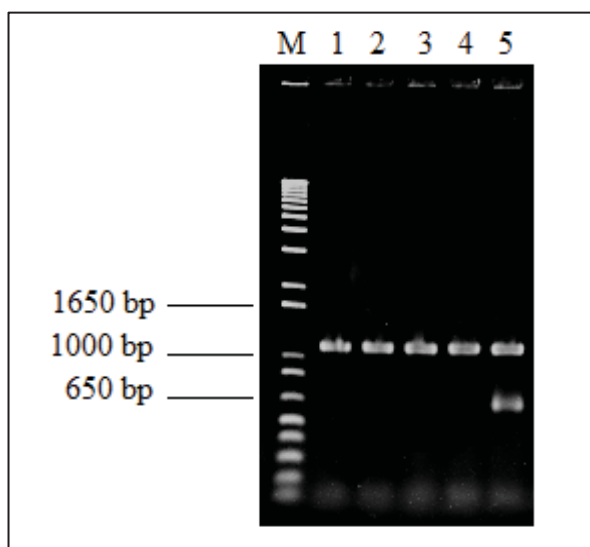
NOTA: Fragmentos obtidos da amplificação por PCR a partir de DNA genômico do mutante *TcZC3H24::Neo/TcZC3H24::Hygro*, utilizando os pares de primers: (1) ZC3H24_Ext_F e Neo_R (1705 bp), (2) ZC3H24_Ext_R e Neo_Out_F (1479 bp), (3) ZC3H24_Ext_F e Higo_R (1937 bp), (4) ZC3H24_Ext_R e Higo_Out_F (1400 bp). M: marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Os perfis eletroforéticos mostram que os fragmentos observados são compatíveis com os tamanhos esperados para cada amplificação, o que sugere que os cassetes 5'CDS-NEO-3'CDS e 5'CDS-HYGRO-3'CDS se integraram corretamente no locus do gene *TcZC3H24*.

Os mutantes *TcZC3H24::Neo/TcZC3H24::Hygro* foram submetidos a separação celular em citômetro FACS Aria II (BD Biosciences) utilizando o parâmetro de precisão “*Single Cell*” (item 4.15.5).

Em seguida, os clones resultantes da separação celular foram triados quanto a presença do gene *TcZC3H24* por amplificação por PCR a partir do DNA genômico (item 4.12.4) com os pares de primers ZC3H24_GTW1A_F/ZC3H24_GTW_R2 (Tabela 4). O iniciador ZC3H24_GTW1A_F hibridiza a 237 bp do ATG inicial da região codante de *TcZC3H24* e o iniciador ZC3H24_GTW_R2 hibridiza a região carboxi-terminal do gene em questão, resultando em um amplicon de 646 bp. Neste teste foi utilizado como controle positivo os primers HYP1_GTW_F/HYP1_GTW_R2 (Tabela 4), os quais hibridizam a região N-terminal e C-terminal, respectivamente, de um gene hipotético conservado com domínio CCCH (Tc00.1047053503453.20) de *T. cruzi*, o qual gera um amplicon de 1144 bp (Figura 38).

FIGURA 38 - PERFIS ELETROFORÉTICOS PARA ANÁLISE DA PRESENÇA DO GENE *TcZC3H24*



NOTA: Amplicons gerados com os pares de primers ZC3H24_GTW1A_F/ZC3H24_GTW_R2 e HYP1_GTW_F/HYP1_GTW_R2 para os mutantes *TcZC3H24::Neo/TcZC3H24::Hygro* obtidos por *Single Cell Sorting*, sendo (1): mutante clone 1, (2): mutante clone 2, (3): mutante clone 3, (4): mutante clone 4, (5): *T. cruzi* selvagem, (M): marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Os perfis eletroforéticos de TcZC3H24::Neo/TcZC3H24::Hygro referentes aos clones 1 a 4 apresentaram apenas uma banda de tamanho correspondente à amplificação do gene hipotético conservado Tc00.1047053503453.20, enquanto a cepa selvagem (controle positivo) apresentou os amplicons de tamanho correspondente tanto para *TcZC3H24* quanto para o gene Tc00.1047053503453.20, indicando que houve a deleção do gene *TcZC3H24* nos clones 1 a 4.

Por simplificação, os mutantes TcZC3H24::Neo/TcZC3H24::Hygro foram denominados TcZC3H24 KO.

Assim, prosseguiu-se com a obtenção de parasitas nocautes nulos (KO) para o gene *TcZC3H24* pela técnica CRISPR/Cas9, procedimentos realizados de acordo com o item 4.16.

O RNA guia, o DNA molde (*Donor* DNA) e a endonuclease SaCas9 foram transfectados em *T. cruzi* selvagem. Decorrido dois dias, estes parasitas transfectantes foram novamente transfectados e após 48 horas submetidos a separação celular *Single Cell Sorting* em citômetro FACS Aria II (BD Biosciences).

A Figura 39 esquematiza a sequência de *TcZC3H24* após a quebra da dupla fita pela endonuclease SaCas9 e subsequente recombinação com o DNA molde.

FIGURA 39 - LOCUS GÊNICO DE *TcZC3H24* APÓS EDIÇÃO GÊNICA POR CRISPR/Cas9

NOTA: A sequência aminoacídica em caixa vermelha e escrita azul (TAGATAGATAGGCGGCCGC) corresponde aos códons de parada para as três fases de leitura aberta e a sequência de reconhecimento da enzima de restrição *NotI*, os quais foram inseridos no locus *TcZC3H24* por recombinação homóloga. Os asteriscos em vermelho correspondem a códons de parada criados pela mudança da fase de leitura aberta após a inserção da sequência aminoacídica disposta acima.

A confirmação inicial do nocaute gênico pela técnica CRISPR/Cas9 deu-se por sequenciamento e por amplificação utilizando os oligonucleotídeos iniciadores STOPNOT_R e ZC3H24_Ext_F (Tabela 4). O primer STOPNOT_R hibridiza apenas no alelo mutado, enquanto o ZC3H24_Ext_F hibridiza tanto no mutante quanto no selvagem, deste modo, a amplificação será efetiva apenas no alelo recombinado, resultando em um amplicon de 293 pb (Figura 41).

A Figura 40 apresenta o local de hibridização dos iniciadores utilizados para a confirmação da inserção da sequência no locus do gene *TcZC3H24* e o tamanho do *amplicon* esperado para esta reação de amplificação por PCR.

Os produtos da amplificação foram detectados em gel de agarose 0,8% corados em brometo de etídio (0,5 µg/ml) (Figura 41).

FIGURA 40 - DIAGRAMA REPRESENTATIVO DA RECOMBINAÇÃO POR CRISPR/Cas9 EM UM ALELO DO LOCUS GÊNICO DE *TcZC3H24*



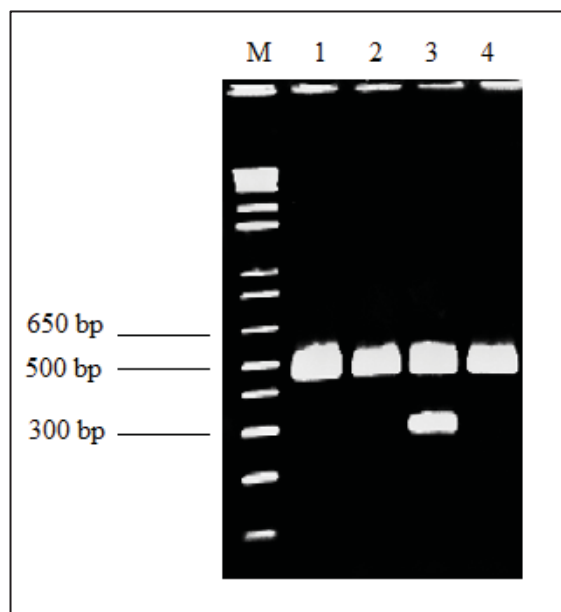
NOTA: Diagrama de um alelo do locus gênico esperado para o *knockout* nulo de *TcZC3H24* após a correta recombinação com o DNA molde.

É mostrado o tamanho esperado para o produto amplificado pelos iniciadores STOPNOT_R e ZC3H24_Ext_F. As setas em cinza indicam os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações de PCR.

A seta em verde indica o local onde foi inserido a sequência doadora TAGATAGATAGGCGGCCGC.

FONTE: A autora (2019).

FIGURA 41 - PERFIS ELETROFORÉTICOS PARA ANÁLISE DA RECOMBINAÇÃO POR CRISPR/Cas9 NO LOCUS GÊNICO DE *TcZC3H24*



NOTA: Produtos amplificados pelos iniciadores STOPNOT_R e ZC3H24_Ext_F a partir de DNA genômico de (1): mutante CRISPR/Cas9 clone 1, (2): mutante CRISPR/Cas9 clone 2, (3): mutante CRISPR/Cas9 clone 3, (4): *T. cruzi* selvagem. (M): marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Posto que todos os perfis eletroforéticos evidenciem um fragmento inespecífico de aproximadamente 500 bp, apenas o mutante clone 3 por CRISPR/Cas9 apresentou o *amplicon* cujo tamanho corresponde ao fragmento esperado de 293 bp, sendo este o clone selecionado para dar prosseguimento aos experimentos. A correta recombinação com o DNA molde foi confirmada por sequenciamento (Plataforma de sequenciamento FIOCRUZ, RJ).

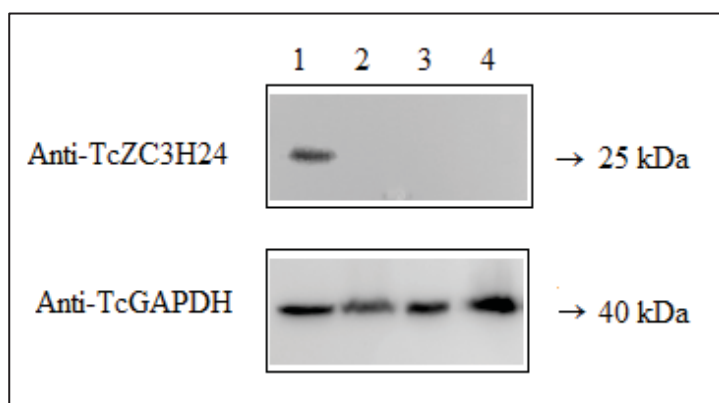
Para fins práticos denominou-se este mutante de TcZC3H24 KO CAS9.

Os mutantes TcZC3H24 KO Clone 1, TcZC3H24 KO Clone 4 e TcZC3H24 KO CAS9 foram analisados quanto a expressão da proteína TcZC3H24 em epimastigotas, de acordo com o descrito em 4.12.5

A membrana contendo os extratos de *T. cruzi* foi incubada com o soro anti-TcZC3H24 na diluição de 1:50 por 18 horas a 4°C em agitação constante. O soro anti-TcGAPDH foi utilizado como normalizador na diluição de 1:10000 e incubado por 1h em temperatura ambiente com agitação constante. A membrana foi revelada por quimioluminescência pela atividade da peroxidase em fotodocumentador de quimioluminescência L-Pix Chemi Express (Loccus Biotecnologia).

Observa-se a ausência de bandas com tamanho correspondente a proteína TcZC3H24 nos clones mutantes nulos, evidenciando a deleção do gene, visto que apenas na forma selvagem este é expresso (Figura 42).

FIGURA 42 - EXPRESSÃO DE TcZC3H24 NOS MUTANTES NULOS

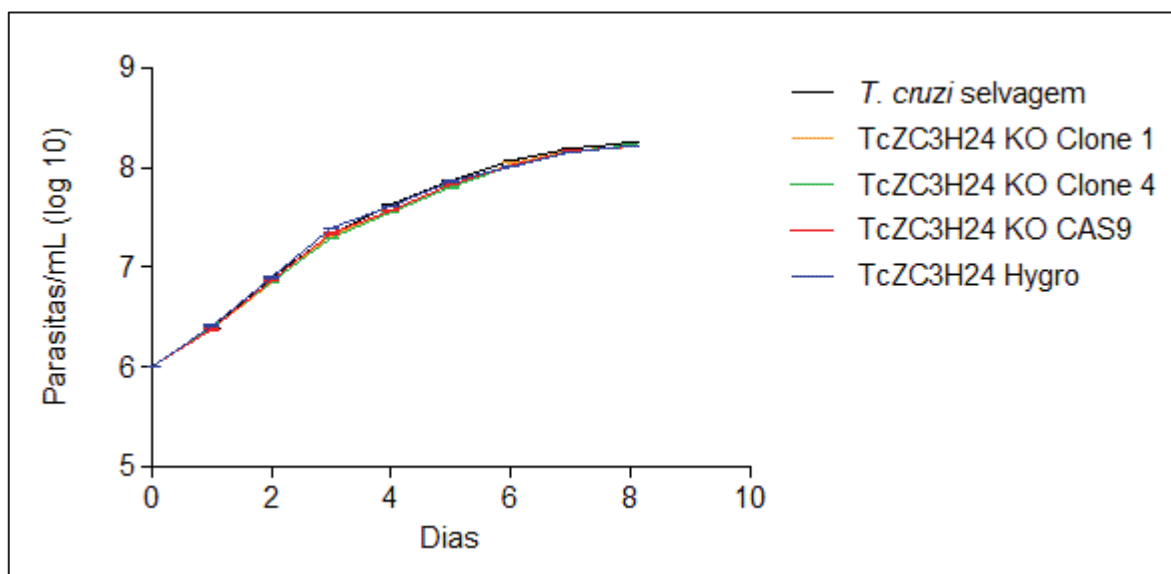


NOTA: Ensaio de Western Blot contra os extratos proteicos de *T. cruzi* nas formas epimastigotas, (1) selvagem, (2) TcZC3H24 KO Clone 1, (3) TcZC3H24 KO Clone 4 e (4) TcZC3H24 KO CAS9, incubados com o soro anti-TcZC3H24 na diluição de 1:50 e soro normalizador anti-TcGAPDH na diluição de 1:10000.

FONTE: A autora (2019).

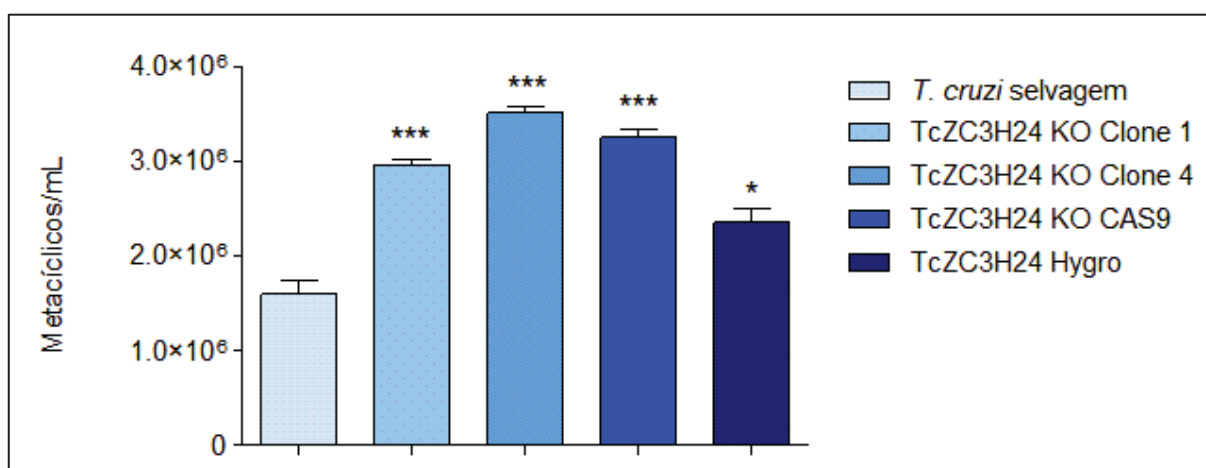
Seguiu-se com as análises quanto a capacidade de diferenciação *in vitro* de formas epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos (Figura 44) e quanto a proliferação celular (Figura 43). Os ensaios de metaciclogênese foram executados de acordo com o descrito no item 4.11.11 e a análise da proliferação celular elaborada conforme descrito no item 4.11.10.

Os experimentos foram realizados em triplicatas técnicas e biológicas. Os dados relativos a contagem de tripomastigotas metacíclicos no terceiro dia de teste foram analisados por teste t não pareado e a curva para análise da proliferação celular foi analisada por Two-Way Anova com pós teste de Bonferroni, utilizando o software GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software Inc.).

FIGURA 43 – PROLIFERAÇÃO CELULAR DOS MUTANTES NULOS DE *TcZC3H24*

NOTA: Os dados representam valores médios e desvios padrão de três experimentos independentes. Não houve diferença estatística entre a população selvagem e os parasitas mutantes ($P > 0,05$). Dados analisado por Two-Way Anova com pós teste de Bonferroni, utilizando o software GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software Inc.).

A análise da proliferação celular revelou que o crescimento dos mutantes assemelhou-se aos parasitas selvagens, indicando que a proliferação de formas epimastigotas não foi afetada pelo *knockout* de *TcZC3H24*.

FIGURA 44 - METACICLOGÊNESE DOS MUTANTES NULOS DE *TcZC3H24*

NOTA: Os dados representam valores médios e desvios padrão de um experimento independente e representativo em triplicata biológica, onde * $p < 0,05$ e *** $p < 0,0001$ em relação a amostra *T. cruzi* selvagem. Dados analisados pelo teste t não pareado, utilizando o software GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software Inc.).

O ensaio de diferenciação celular *in vitro* resultou na regulação positiva do processo de metaciclogênese *in vitro* para os mutantes nulos, porém o *knockout* simples (TcZC3H24 Hygro) mostrou-se haploinsuficiente, ou seja, a expressão de apenas um alelo de *TcZC3H24*

não supriu o produto gênico em quantidade suficiente a fim de impedir o fenótipo observado no mutante nulo, mantendo a regulação positiva do processo de metaciclogênese *in vitro* de forma significativa ($p < 0,05$).

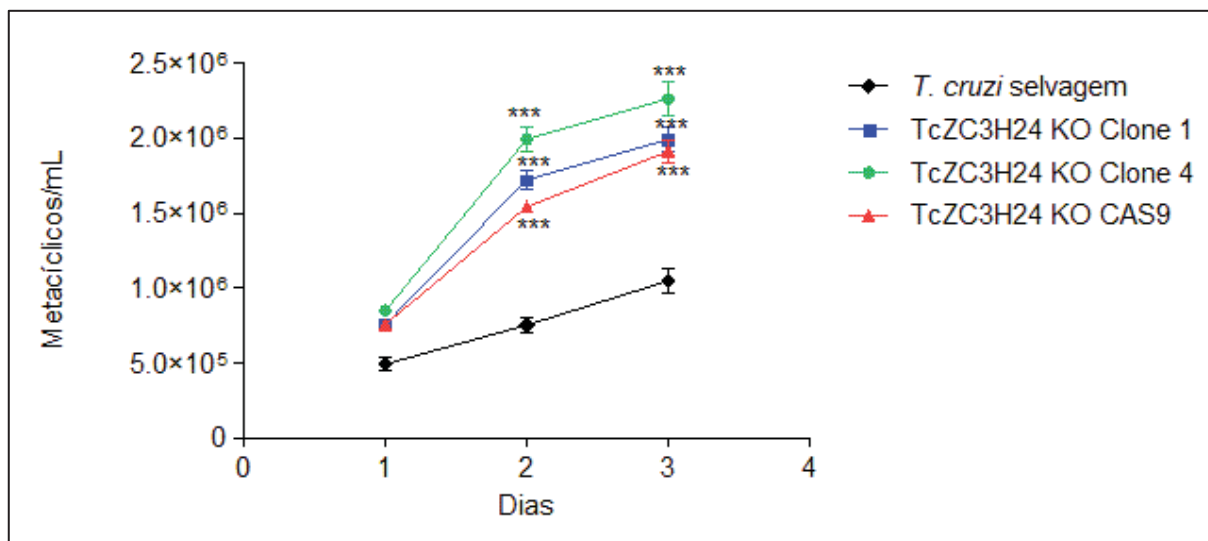
Nota-se que os mecanismos de regulação não compensaram a transcrição gênica proveniente de apenas um alelo. Assim, se houve aumento da taxa de transcrição esta não foi suficiente para suprir a demanda celular ou este aumento não resultou em uma taxa traducional apropriada, ou ainda, há o envolvimento de outros mecanismos regulatórios.

Nestes ensaios de diferenciação percebeu-se que os parasitas mutantes apresentavam um quantitativo de tripomastigotas metacíclos no sobrenadante do meio TAU 3AAG superior em relação aos parasitas selvagens a partir do primeiro dia do processo de metaciclogênese. Assim, com a finalidade de investigar se este aumento era significativo e mantinha-se durante toda diferenciação *in vitro*, os parasitas foram analisados durante seis dias. Desta forma, constatou-se que a diferenciação dos epimastigotas mutantes nulos para tripomastigotas metacíclicos manteve-se altamente significativa ($p < 0,0001$) em relação ao *T. cruzi* selvagem a partir do segundo dia.

Observou-se também que durante os primeiros três dias do processo de metaciclogênese *in vitro* quase a totalidade dos parasitas TcZC3H24 Ko recolhidos do meio TAU 3AAG estavam completamente diferenciados para tripomastigotas metacíclicos e somente a partir do quarto dia foi observado no sobrenadante do meio formas não completamente diferenciadas (epimastigotas-like) ou não diferenciadas (epimastigotas) para estes mutantes, enquanto no grupo controle as formas epimastigotas e epimastigotas-like foram encontradas durante todo o processo de diferenciação. Deste modo, a deleção do gene TcZC3H24 acelerou o processo de diferenciação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos bem como resultou em maior diferenciação destes no processo *in vitro*.

A Figura 45 mostra a curva do processo de metaciclogênese *in vitro* para os primeiros três dias, período no qual é encontrado no meio TAU 3AAG quase exclusivamente tripomastigotas metacíclicos para os parasitas duplo *knockout*. Os experimentos foram realizados em triplicatas técnicas e biológicas. Os dados relativos a contagem de tripomastigotas metacíclicos foram analisados por Two-Way Anova com pós teste de Bonferroni, utilizando o software GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software Inc.).

FIGURA 45 - CURVA DE TRIPOMASTIGOTAS METACICLÍCOS PARA OS MUTANTES NULOS DE *TcZC3H24*



NOTA: Os dados representam valores médios e desvios padrão de um experimento independente e representativo em triplicata biológica, onde *** $p < 0,0001$ em relação a amostra *T. cruzi* selvagem. Dados analisado por Two-Way ANOVA com pós teste de Bonferroni, utilizando o software GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software Inc.).

Deste modo, *TcZC3H24* mostrou-se um regulador negativo dos processos de disparo da diferenciação *in vitro* da forma epimastigota para a forma tripomastigota metacíclica de *T. cruzi*.

A diferenciação celular do *T. cruzi* é essencial na adaptação do parasita aos diferentes ambientes no qual este se prolifera durante seu ciclo de vida, o qual envolve alterações morfológicas, proliferativas e metabólicas (Adroher et al., 1990; Goldenberg e Ávila, 2011; Hamedí et al., 2015; Barisón et al., 2017; Gonçalves et al., 2018). O controle destes eventos celulares demandam alterações na expressão gênica, as quais operam principalmente por mecanismos de regulação pós-transcricionais (Clayton e Shapira, 2007; Lueong et al., 2016).

Em tripanossomatídeos, proteínas de ligação ao RNA estão envolvidas em diversos processos, tais como diferenciação celular (Benz et al., 2011; Subota, I. et al., 2011; Kolev et al., 2012), metabolismo de rRNA (Hellman et al., 2007; Droll et al., 2010; Umaer e Williams, 2015), resposta ao estresse (Droll et al., 2013; Alves et al., 2014; Singh et al., 2014), desenvolvimento e manutenção da homeostase celular (Mani et al., 2011; Das et al., 2012; Naguleswaran et al., 2015) e ciclo de vida (Archer et al., 2009; Ouna et al., 2012).

Em *T. cruzi* as quatro proteínas com motivo *Zinc Finger* CCCH estudadas até o momento, *TcZFP1*, *TcZFP2*, *TcZC3H31* e *TcZC3H39* mostraram-se relacionadas a regulação do processo de diferenciação do parasita.

TcZFP1 reconhece ribopolímeros ricos em citosina *in vitro* e é transitoriamente enriquecida durante a diferenciação para tripomastigotas metacíclicas, podendo estar envolvida na modulação das vias de decaimento de mRNA estágio-específico e na acessibilidade de mRNA para a maquinaria de tradução (Mörking et al., 2004).

TcZFP2 possui seus mRNAs associados regulados positivamente em tripomastigotas metacíclicas e liga-se com alta especificidade em regiões ricas em adenina nas sequências 3'UTRs de seus mRNAs alvos, estando relacionada a diferenciação celular estágio específica que ocorre no vetor (Mörking et al., 2012).

TcZC3H31 é quase exclusivamente expressa em epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas, sendo que seu mutante nulo é incapaz de se diferenciar em tripomastigotas metacíclicas, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Alcantara et al., 2018).

TcZC3H39 é constitutivamente expressa durante o ciclo de vida do parasita e seu padrão de localização celular é ligeiramente granular em epimastigotas e mais pronunciado em epimastigotas sob estresse nutricional. Nestes parasitas sob estresse nutricional, TcZC3H39 liga-se a mRNAs que codificam proteínas ribossômicas e mRNAs altamente expressos na forma replicativa, assim, TcZC3H39 poderia atuar sequestrando estes mRNAs, retardando a tradução em condições de estresse, fator que desencadeia a diferenciação para as formas tripomastigotas metacíclicas (Alves et al., 2014).

Assim como em *T. cruzi*, em *T. brucei* diversas proteínas com motivo CCCH estão correlacionadas ao processo de diferenciação.

TbZFP1 é regulada positivamente no processo de diferenciação e na forma procíclica, sendo que seu silenciamento por RNAi impediu a diferenciação dos parasitas para a forma procíclica pelo comprometimento no reposicionamento do cinetoplasto (Hendriks e Matthews, 2005). Esta proteína, juntamente a TbZFP2 e TbZFP3 se associam a um complexo proteico e estão envolvidas no processo de diferenciação para a forma procíclica de *T. brucei* (Paterou et al., 2006; Walrad et al., 2009).

A regulação negativa de TbZFP2 mediada por RNAi implicou no atraso da expressão da prociclina EP1 e inibiu a diferenciação para formas procíclicas, enquanto a superexpressão resultou em uma anormalidade morfológica, consistindo de parasitas com fenótipo alongado denominado ‘*nozzle*’.

A expressão ectópica de TbZFP3 resultou em diferenciação aumentada para formas procíclicas e também induziu um fenótipo de diferenciação semelhante a TbZFP2, além de regular a tradução dos mRNAs de TbEP1 e TbGPEET (Hendriks et al., 2001; Paterou et al., 2006; Walrad et al., 2009). TbZC3H18 silenciado por RNAi resultou no atraso da diferenciação

dos tripanosomas da forma sanguínea em procíclicos e ocasionou um atraso de 4 a 8 horas no aparecimento do mRNA de TbEP e da proteína TbEP (Benz et al., 2011).

De forma semelhante as proteínas CCCH *Zinc Finger* descritas até o momento para *T. cruzi*, TcZC3H24 mostrou-se influenciar o processo de regulação estágio-específica deste parasita, porém, o modo pelo qual esta proteína regula a expressão gênica que dirige as mudanças ocorridas no processo de diferenciação *in vitro* da forma epimastigota para a forma tripomastigota metacíclica é desconhecido, assim como são pouco conhecidos os processos de diferenciação em tripanossomatídeos. Ainda, nas condições estudadas, o *knockout* nulo de TcZC3H24 mostrou-se não deletério, sugerindo que o gene seja não essencial aos parasitas epimastigotas cultivados em meio LIT a 27°C e ao processo de metaciclogênese *in vitro*.

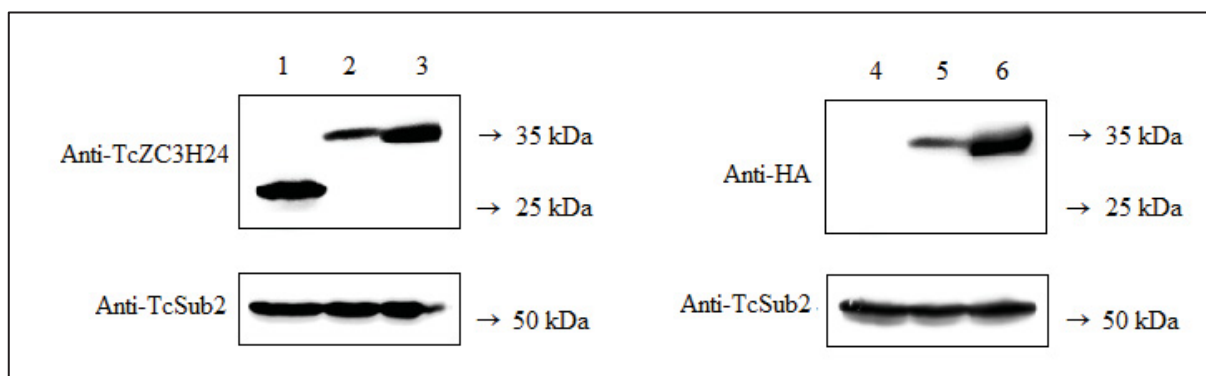
5.6 RESGATE DO FENÓTIPO SELVAGEM POR COMPLEMENTAÇÃO

Parasitas *knockout* nulos foram complementados com uma cópia ectópica do gene *TcZC3H24* com a finalidade de verificar se o fenótipo observado nestes mutantes é atribuído apenas a deleção do gene *TcZC3H24* e excluir a possibilidade de que este pertença a um efeito inesperado do evento de integração dos cassetes na expressão de genes ligados ou efeitos *off targets* no genoma do parasita.

Assim, formas epimastigotas de TcZC3H24 KO Clone 1 foram transfectadas com os vetores pTc3xHA_ZC3H24 Δ stop_CO-bsd, pTc3xHA_ZC3H24_NH-bsd e pTc_ZC3H24-bsd, descritos na Tabela 13, originando os mutantes nulos complementados TcZC3H24 cKO, HA::TcZC3H24 cKO e TcZC3H24::HA cKO (Tabela 19).

As transfecções foram conduzidas conforme descrito no item 4.18 e a análise da expressão ectópica de TcZC3H24 deu-se por imunodeteção por Western Blot (item 4.12.5) com a utilização do soro anti-TcZC3H24 na diluição de 1:50 por 18 horas a 4°C em agitação constante, do soro anti-HA na diluição de 1:1000 por 1 hora em temperatura ambiente com agitação constante. O soro anti-TcSUB2 na diluição de 1:600 foi utilizado como normalizador e incubado por 1h em temperatura ambiente com agitação constante (Figura 46).

FIGURA 46 - IMUNODETECÇÃO DE TcZC3H24 NOS MUTANTES NULOS COMPLEMENTADOS



NOTA: Extratos proteicos de 1×10^7 de *T. cruzi* epimastigotas mutantes nulos complementados de (1) e (4): TcZC3H24 cKO, (2) e (5): TcZC3H24-26::HA cKO, (3) e (6): HA::TcZC3H24 cKO.

O soro anti-TcZC3H24 foi incubado na diluição de 1:50, o soro anti-HA na diluição de 1:1000 e o soro normalizador anti-TcSUB2 na diluição de 1:600. A seta indica a massa corresponde ao marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific).

TABELA 19 - DESCRIÇÃO DOS MUTANTES NULOS COMPLEMENTADOS

Mutante nulo complementado	Características
TcZC3H24 cKO	Proveniente do mutante nulo TcZC3H24 KO Clone1, expressa ectopicamente a proteína TcZC3H24 (sem etiqueta)
HA::TcZC3H24 cKO	Proveniente do mutante nulo TcZC3H24 KO Clone1, expressa ectopicamente a proteína TcZC3H24 fusionada a etiqueta HA na porção amino-terminal
TcZC3H24::HA cKO	Proveniente do mutante nulo TcZC3H24 KO Clone1, expressa ectopicamente a proteína TcZC3H24 fusionada a etiqueta HA na porção carboxi-terminal

FONTE: A autora (2019).

Conforme observado na Figura 46, a análise dos mutantes nulos complementados para o gene *TcZC3H24* demonstrou que as expressões ectópicas evidenciam bandas com massa molecular compatível as proteínas expressas de TcZC3H24 (28,7 Kda), HA::TcZC3H24 (33,7 Kda) e TcZC3H24::HA (34,1 Kda). Observa-se também que não houve imunodeteção em (4) na Figura 46, visto tratar-se da expressão ectópica da proteína sem etiqueta fusionada.

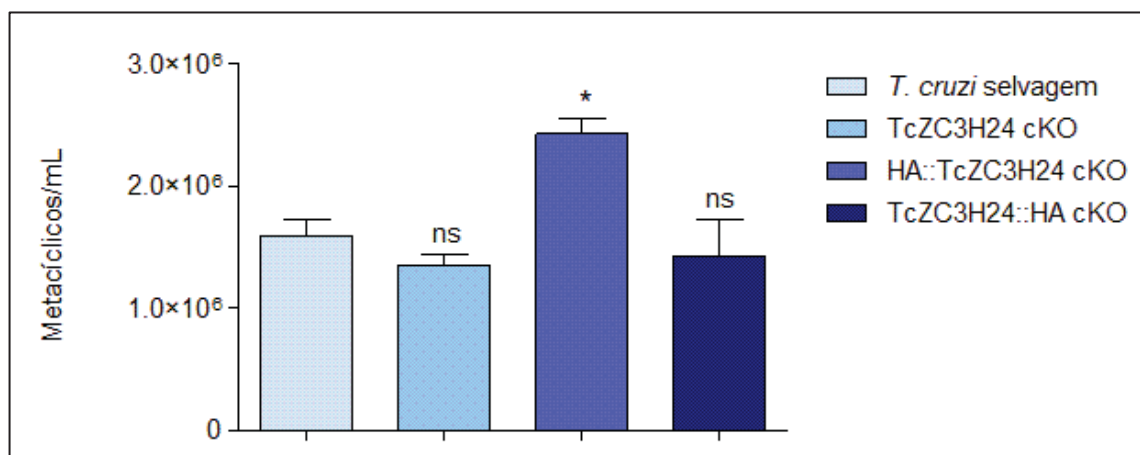
Prosseguiu-se com as análises a fim de se verificar o resgate fenotípico do mutante nulo, analisando-os quanto a capacidade de diferenciação *in vitro* de formas epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos (Figura 47) e quanto a proliferação celular (Figura 48).

Os ensaios de metaciclogênese foram executados de acordo com o descrito no item 4.11.11 e a proliferação celular elaborada conforme descrito no item 4.11.10.

Os experimentos foram realizados em triplicatas técnicas e biológicas e os dados relativos a metaciclogênese analisados por teste t não pareado e a proliferação celular analisada

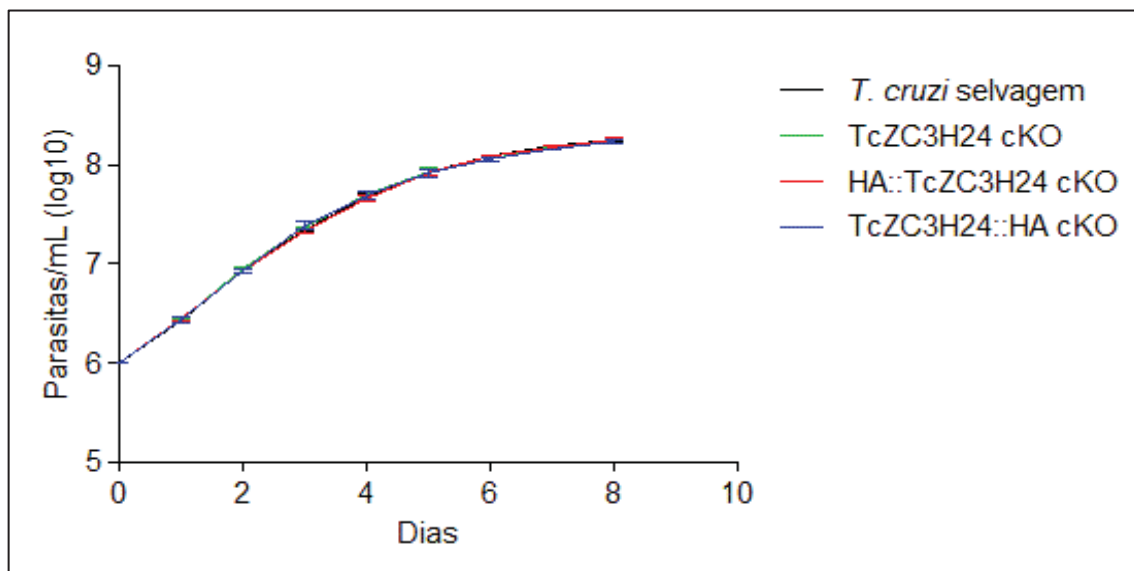
por Two-Way Anova com pós teste de Bonferroni, utilizando o software GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software Inc.).

FIGURA 47 - METACICLOGÊNESE DOS MUTANTES NULOS COMPLEMENTADOS



NOTA: Os dados representam valores médios e desvios padrão de um experimento independente e representativo em triplicata biológica, onde * é $P < 0,05$ e ns (não significativo) corresponde a $P > 0,05$ em relação a amostra *T. cruzi* selvagem. Dados analisado pelo teste t não pareado, utilizando o software GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software Inc.).

FIGURA 48 – PROLIFERAÇÃO CELULAR DOS MUTANTES NULOS COMPLEMENTADOS



NOTA: Os dados representam valores médios e desvios padrão de três experimentos independentes. Não houve diferença estatística entre a população selvagem e os complementados ($P > 0,05$). Dados analisado por Two-Way Anova com pós teste de Bonferroni, utilizando o software GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software Inc.).

Conforme observado pela Figura 47 e Figura 48, foi possível obter o resgate do fenótipo em todos os parasitas complementados, com exceção do mutante nulo expressando a

etiqueta HA na porção amino-terminal, o qual manteve a metaciclologênese regulada positivamente.

A etiqueta fusionada a proteína pode causar interferência estérica ou impedir que a proteína alvo atinja sua conformação final madura, além da possibilidade de ocorrer interações indesejadas nos domínios da proteína, acarretando em perda de função e localização celular anormal (Liu et al., 1997; Chant et al., 2005; Thielges et al., 2011).

Assim, a etiqueta HA fusionada a porção N-terminal pode ter ocasionado um impedimento estérico em HA::TcZC3H24 impossibilitando que a proteína ligue-se em seu(s) alvo(s) ou ocasionando a ruptura de um possível complexo molecular resultante desta ligação. Outra possível explicação para esta ausência de resgate é a inibição, por parte da etiqueta, de modificações pós-traducionais na proteína, impedindo-a de tornar-se ativa, ou ainda, a desestruturação da estrutura terciária proteica por parte da etiqueta.

Por exemplo, a expressão ectópica de TbZFP2 na forma procíclica de *T. brucei*, tanto fusionada a etiqueta TY1 na porção carboxi-terminal quanto sem etiquetamento, acarretaram em um fenótipo alongado “*nozzle*” devido a extensão polarizada de microtúbulos na extremidade posterior da célula, enquanto a expressão de TbZFP2 fusionada a etiqueta TY1 na porção amino-terminal não apresentou este fenótipo alongado (Hendriks et al., 2001).

Ainda, estudos de Liu et al. (1997), demonstraram que a porção de serinas carboxi-terminal da proteína Smad3 é responsável pela sua fosforilação e necessária para a ativação desta proteína na via de sinalização de inibição proliferativa por TGF- β . Os autores demonstraram que a expressão estável de Smad3 em células Mv1Lu as torna hipersensíveis aos efeitos antiproliferativos de TGF- β , enquanto as células que possuem expressão de Smad3 fusionada à etiqueta FLAG em sua porção C-terminal resultaram na criação de formas dominantes-negativas desta proteína que interrompe a sinalização de TGF- β (Liu et al., 1997).

5.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A coordenação do íon zinco ao motivo *Zinc Finger* é essencial para correta estrutura de TcZC3H24. Devido ao ambiente redutor do citoplasma e nucleoplasma celular, a estabilidade das moléculas não pode ser obtida pela formação de pontes dissulfetos, assim, o motivo *Zinc Finger* é dependente da coordenação ao íon zinco (II), cuja estabilidade depende de inúmeros fatores, incluindo pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas (Bulaj et al., 1998; Maynard e Covell, 2001; Quintal et al., 2011). O deslocamento do Zn (II) por outros íons metálicos geralmente acarreta em defeitos estruturais ou funcionais no motivo

Zinc Finger, incluindo a formação de complexos mistos, coordenação incompleta ao íon metálico ou oxidação dos resíduos de cisteínas (Shi et al., 1993; Hartwig et al., 2002; Witkiewicz-Kucharczyk e Bal, 2006).

Comparando-se os 14 genes identificados por Kramer et al. (2010a) em *T. cruzi* que codificam proteínas com o motivo C-X₈-C-X₅-C-X₃-H, percebe-se que estes possuem o domínio CCH conservado quanto as propriedades químicas de seus aminoácidos (Figura 49). Essa conservação possivelmente reflete a manutenção da estrutura tetraédrica deste motivo, pois para manter o íon de zinco corretamente acoplado a estrutura proteica, há no motivo *Zinc Finger* resíduos que conferem a formação de um núcleo hidrofóbico que permite interações neste domínio ou entre domínios *Zinc Finger*, os quais aumentam a estabilidade molecular (Kellis et al., 1988; Van Dan Burg et al., 1994).

FIGURA 49 - CONSERVAÇÃO DO MOTIVO C-X₈-C-X₅-C-X₃-H EM *T. cruzi*

BCT84 19587 (<i>Hipotética 2</i>)	P L M D G G K T R V C V A F Y E A A Q C P F D S R C E H A H F S E L
BCT84 13430 (<i>ZC3H17</i>)	R K V P E P K G A F C N L H L A D Q K C Y Q D F A C N Q L H L H E A G
BCT84 05335 (<i>ZC3H24</i>)	H V N N A L Y G K V C A F E N T R E G C R R G P Y C H F L H I G K G G
BCT84 21208 (<i>ZC3H7</i>)	L V Y R R A V A K W C P H T L A R E D C P F G T A C Y R L H K R A Y Q
BCT84 15754 (<i>ZC3H44</i>)	D A T P Q H E T R V C P V Y E S Y G F C P F V S V C F L P H V A G A E
BCT84 16172 (<i>ZC3H31</i>)	T L A K Q S G A A V C E D F M Y A Q S C P Y G E S C T K V H V P K E H
BCT84 01101 (<i>ZC3H14</i>)	K P C V E R S R K T C K Q F W E N G A C K F G S R C L Y H L S P S Q
BCT84 17496 (<i>Hipotética 1</i>)	N E P P T V T L O H C A N Y S K N G V C C F G Q N C Q F V H V S H T
BCT84 19706 (<i>ZC3H11</i>)	I L A E R Y K T K F C R N Y V L T G I C P Y Q R R C M F A H G D H E L
BCT84 21135 (<i>ZFP3</i>)	I D Q G K R K T K M C I Y W E K N G E C N W G D R C A F A H G Q G E L
BCT84 21741 (<i>ZC3H12</i>)	V K P S K Y R T A L C E F Y L R Q E K C P F G T R C A F A H G E H E L
BCT84 01036 (<i>ZFP1A</i>)	T N Y S K F R T R V C R N Y S M G I T C P F G E R C A F S H G E P D K
BCT84 01037 (<i>ZFP1B</i>)	G V D S K F R T R V C R N Y S M G I T C P F G E R C A F S H G E P D K
BCT84 18318 (<i>ZFP2</i>)	I D R T K L K T K M C M N I Q R G G V C N W G D N C A F A H N S E E L

NOTA: Alinhamento do motivo *Zinc Finger* para as proteínas C-X₈-C-X₅-C-X₃-H anotadas no genoma de *T. cruzi*. Os aminoácidos foram destacados de acordo com suas propriedades químicas: aminoácidos polares em verde; aminoácidos básicos em azul; aminoácidos ácidos em roxo; aminoácidos hidrofóbicos em vermelho. Em amarelo estão destacados os aminoácidos aromáticos. A esquerda das sequências está o número de acesso (TritypDB ID) e sua correspondente proteína.

FONTE: A autora (2019).

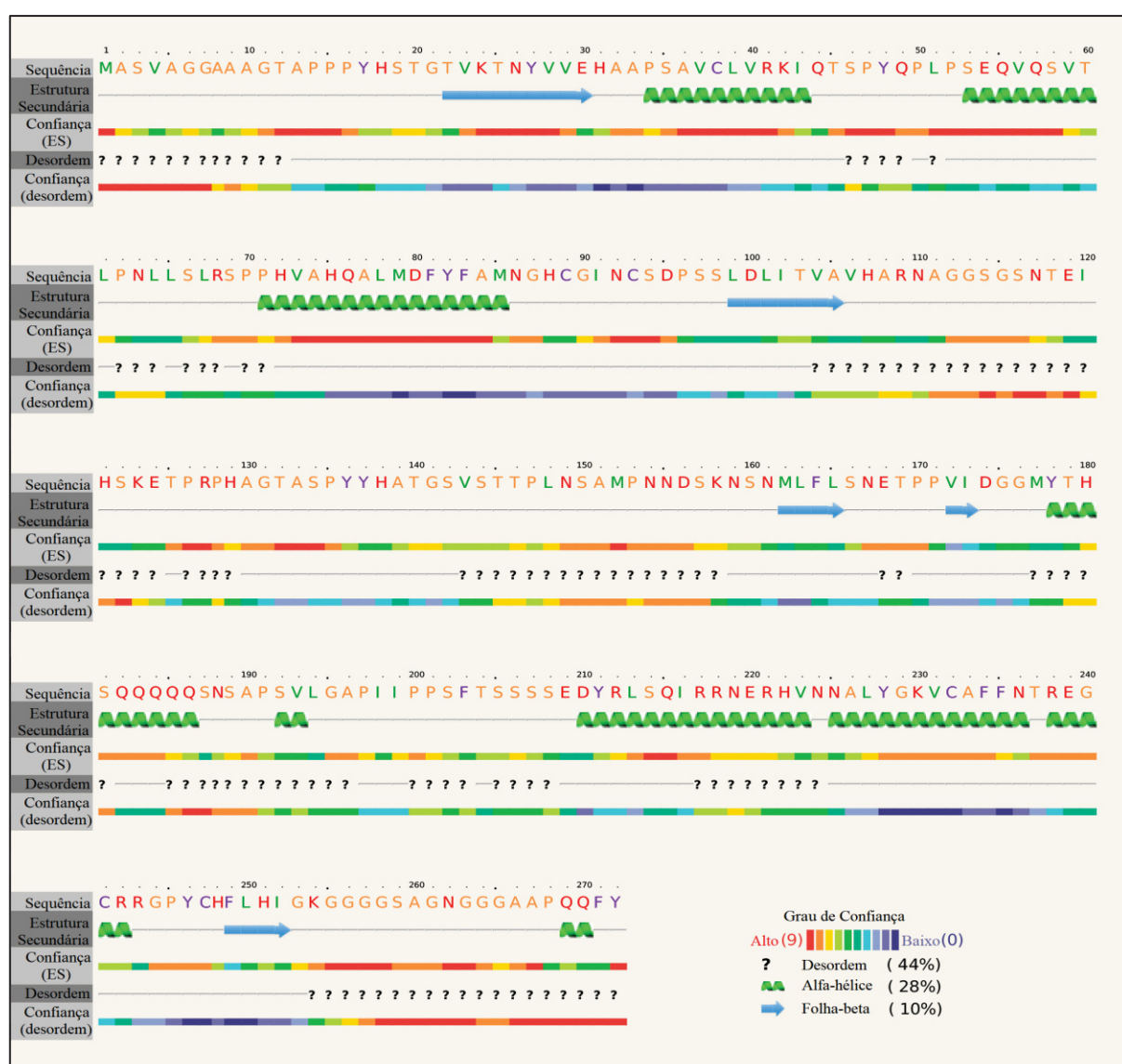
A predição da estrutura terciária de TcZC3H24 revelou que 44% de sua sequência possui regiões desordenadas, as quais propiciam a interação com outras proteínas (Figura 50 e Figura 51). Deste modo, observa-se que TcZC3H24 apresenta segmentos peptídicos que são incapazes de formar estruturas tridimensionais estáveis na proteína, ainda que esta apresente segmentos estruturados.

Apesar de TcZC3H24 não possuir longas regiões intrinsecamente desordenadas (*intrinsically disordered regions*, IDR), pequenas regiões desordenadas estão envolvidas na sinalização e regulação celular (Van der Lee et al., 2014). Assim, IDRs estão relacionadas a diversos processos biológicos, tais como diferenciação celular, transcrição, regulação do ciclo

celular, condensação do DNA e divisão celular (Dunker et al., 2001; Dyson e Wright, 2002; Iakoucheva et al., 2002; Romero et al., 2004).

Estas regiões desordenadas são frequentemente submetidas a modificações pós-traducionais, as quais aumentam as funcionalidades da proteína na célula (Iakoucheva et al., 2004). Além disso, IDRs alteram sua conformação estrutural ao se ligarem a outras moléculas, permitindo a formação de domínios estruturados, característica que viabiliza a capacidade da mesma proteína em interagir com múltiplos alvos proteicos e de desempenhar funções distintas na célula (Dunker et al., 2002; Dyson e Wright, 2005; Van der Lee et al., 2014).

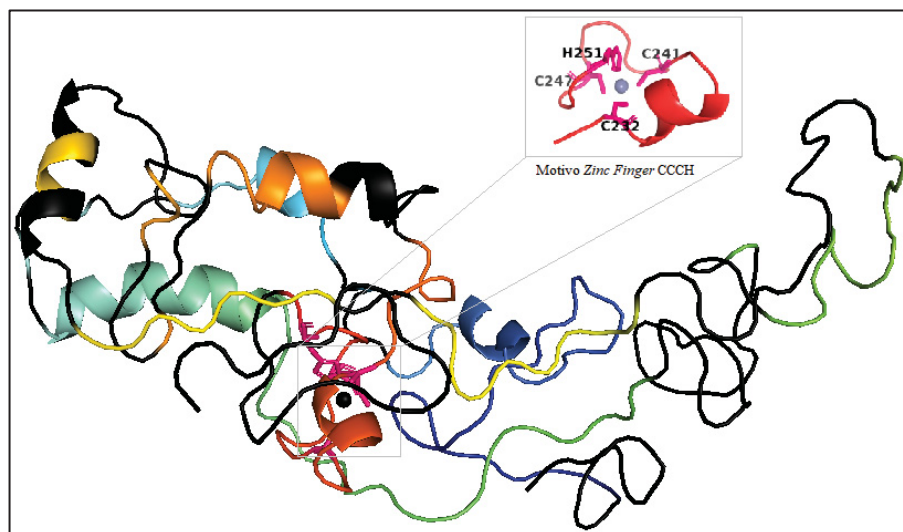
FIGURA 50 - PREDIÇÃO DA ESTRUTURA TERCIÁRIA DE TcZC3H24



NOTA: A primeira linha de cada agrupamento mostra a sequência aminoácídica de TcZC3H24, seguida por sua estrutura terciária. O símbolo “?” denota regiões desordenadas na molécula e as linhas contínuas indicam o grau de confiança para a predição da estrutura secundária (ES) e para a desordem proteica.

FONTE: A autora (2019). Desenvolvido com auxílio do software Phyre2 (Kelley et al., 2015).

FIGURA 51 - MODELAGEM MOLECULAR DA PROTEÍNA TcZC3H24

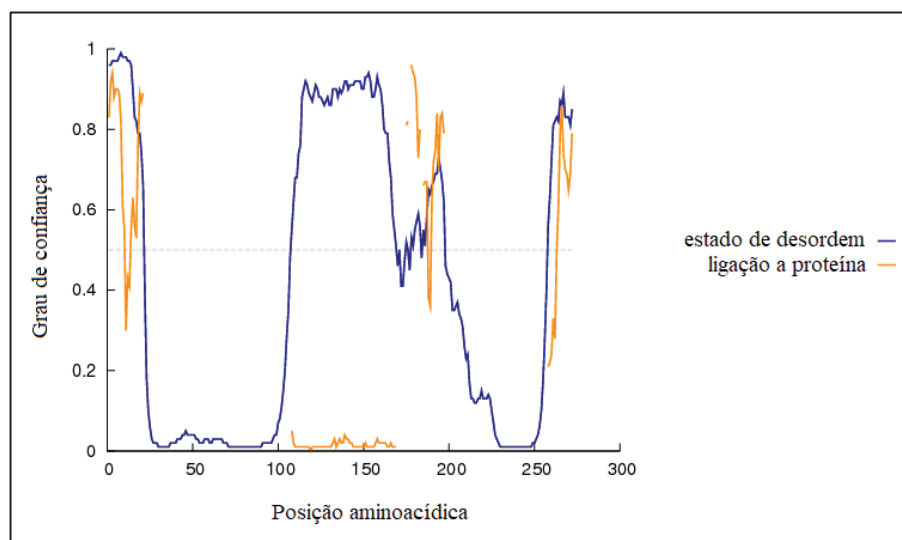


Nota: Modelagem tridimensional para a proteína TcZC3H24. As regiões em preto correspondem as sequências desordenadas previstas pelo software Phyre2. Em destaque o domínio CCCH da proteína, evidenciando a coordenação do íon zinco (esfera cinza) ao resíduo de histidina na posição 251 e aos resíduos de cisteína presentes nas posições 232, 241 e 247 da cadeia aminoacídica.

FONTE: A autora (2019). Modelagem tridimensional obtida com auxílio do software Phyre2 (Kelley et al., 2015) e análise executada com o software PyMol® 2.2 (Schrodinger, LLC).

A avaliação das regiões de desordem em TcZC3H24 foi executada em diversos preditores de desordem proteica, os quais dispõem de diferentes algoritmos para identificação de IDRs. Embora os programas de bioinformática executados apresentassem algumas variações na predição das IDRs, houve um consenso de que TcZC3H24 possui inúmeras regiões intrinsecamente desordenadas, permitindo a esta molécula a interação com outras proteínas (Figura 52).

FIGURA 52 - DESORDEM E INTERAÇÃO PROTEICA DE TcZC3H24



NOTA: As sequências de aminoácidos (linha azul) acima da linha tracejada cinza são consideradas desordenadas, ou seja, com grau de confiança maior que 0,5. A linha laranja mostra a confiança na predição de resíduos desordenados de ligação a proteínas.

FONTE: A autora (2019). Análise executada com o software DISOPRED3 (Jones e Cozzetto, 2015).

Assim, a flexibilidade estrutural e plasticidade inerente a estrutura de TcZC3H24 permite a esta proteína desempenhar distintas funções através não apenas da associação a mRNAs, mas também por meio de interações proteína-proteína.

Ainda, a estrutura molecular de TcZC3H24 poderia inclusive explicar porque sua superexpressão não resultou em fenótipo alterado em relação ao parasita selvagem. Neste caso, a proteína adota uma estrutura estável (estrutura responsável pela via de regulação na metaciclogênese) apenas quando associada a superfície de sua(s) proteína(s) parceira(s). Assim, a ausência de um estímulo celular que desencadeie esta interação ou uma razão estequiométrica inadequada entre sua(s) proteína(s) parceira(s) permitiram que o excedente de TcZC3H24 permanecesse em uma forma desordenada.

Uma análise nos dados de RNAseq em *T. brucei* na forma procíclica gerados por Droll et al. (2013), estudo que aponta TbZC3H11 no controle pós-transcricional de resposta ao estresse por calor, mostra que o transcrito de TbZC3H24 encontra-se enriquecido em 25,58 vezes na fração associada a TbZC3H11 e que após choque térmico a 41°C por 1 hora o mRNA de TbZC3H24 é aumentado em 2,05 vezes. Deste modo, TbZC3H24 pode estar envolvido em alguma via de controle de choque térmico. Embora *T. brucei* e *T. cruzi* possuam seus genomas altamente conservados, estes distintos organismos possuem diferentes fisiopatologias e estratégias de sobrevivência, impossibilitando a afirmação de que o gene ZC3H24 também

possa relacionar-se ao controle de estresse em *T. cruzi*, ainda que este indício mereça ser investigado. Ainda, Singh et al. (2014) constatou que TbZC3H11 interage com TbMKT1, cuja exata função é desconhecida em tripanossomatídeos, embora seu homólogo em levedura esteja envolvido na tradução e na resistência ao estresse (Wickner, 1987; Tadauchi et al., 2004; Demogines et al., 2008; Parreiras et al., 2011). MKT1 interage com muitas proteínas contendo domínios de ligação ao RNA e essa interação ocorre especificamente através do motivo (H/N)(D/N/E/Q)PY ou poli-Q (Singh et al., 2014). Mais uma vez, apesar da proteína TcZC3H24 conter cinco resíduos de glutamina (Q) sequenciais não é possível afirmar que esta interaja com TcMKT1 de *T. cruzi*.

Além disso, diversos trabalhos demonstram que regiões ricas em glutamina contribuem para o acúmulo eficiente de proteínas em corpos de processamento, fato observado para TcZC3H24, a qual se encontra em forma granular disperso no citoplasma durante suas quatro principais fases do ciclo de vida (Franks e Lykke-Andersen, 2008; Reijns et al., 2008; Decker e Parker, 2012; Huch et al., 2016; Luo et al., 2018).

As proteínas de ligação ao RNA desempenham um importante papel na regulação gênica dos tripanossomatídeos e permitem uma rápida e eficiente alteração da expressão gênica nestes organismos a fim de responder os diferentes estímulos aos quais a célula é submetida, garantindo a sobrevivência e adaptação destes parasitas as inúmeras alterações ambientais a que são submetidos. Durante o processo de metaciclogênese o parasita assume diferentes formas, as quais são resultados de alterações em sua expressão gênica que implicam em modificações morfológicas, metabólicas, fisiológicas e ultraestruturais, tais como, reposicionamento do flagelo e cinetoplasto, alongação do núcleo, remodelamento da cromatina, diminuição do volume dos reservosomos, aumento do volume dos corpos lipídicos, alterações morfológicas e ultraestruturais do núcleo e do cinetoplasto (Contreras et al., 1985a; Soares et al., 1989; Krieger et al., 1999; Avila et al., 2003; Parodi-Talice et al., 2007; Ferreira et al., 2008; Cavalcanti et al., 2009; Gonçalves et al., 2018). Assim, visto que este processo de diferenciação celular é multifatorial e compreende uma série de fatores, apenas com os dados dispostos neste trabalho não é possível elucidar a ação específica de TcZC3H24 na via de diferenciação *in vitro* de epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos, permanecendo somente a afirmação de que este gene participa de algum modo da via de regulação negativa deste processo.

6 CONCLUSÃO

1. O gene *TcZC3H24* codifica uma proteína de 28,7 Kda contendo um domínio C-X₈-C-X₅-C-X₃-H, o qual possui sintenia com seus ortólogos em *T. brucei* e *Leishmania major*, entre outros tripanossomatídeos.
2. A proteína TcZC3H24 é expressa nos quatro estágios de desenvolvimento do parasita (formas epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos provenientes de diferenciação *in vitro*, amastigotas intracelular obtidos por cavitação e tripomastigotas sanguíneos recolhidos de infecção em células VERO), o que pode indicar uma função importante na homeostase de *T. cruzi*, visto que é transcrito constitutivamente ao longo do ciclo de vida.
3. A localização subcelular de TcZC3H24 possui um perfil granular e está irregularmente distribuída no citoplasma nas formas epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos, amastigotas e tripomastigotas sanguíneos cultivados em condições axênicas e provenientes de ensaios de diferenciação e infecção *in vitro*.
4. A superexpressão da proteína TcZC3H24 não ocasionou defeitos na proliferação celular e na capacidade de diferenciação *in vitro* das formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos, podendo esta ausência de fenótipo em relação ao parasita selvagem estar relacionada a um equilíbrio estequiométrico entre a proteína superexpressa e seu(s) alvo(s) ou a mecanismos de controle pós-transcricionais e pós-traducionais.
5. O *knockout* nulo do gene *TcZC3H24* acelerou a diferenciação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos bem como resultou no aumento do número destas formas infectantes no sobrenadante do meio TAU3AAG durante o processo de diferenciação *in vitro*.
6. O *knockout* nulo de *TcZC3H24* mostrou-se não deletério, sugerindo que o gene seja não essencial aos parasitas epimastigotas cultivados em meio LIT a 27°C e ao processo de metaciclogênese *in vitro*, enquanto o *knockout* simples mostrou-se haploinsuficiente, mantendo o processo de metaciclogênese *in vitro* regulado de forma positiva.
7. A complementação dos mutantes nulos resultou na reversão do fenótipo observado para o *knockout* nulo, indicando que tal fenótipo é atribuído a deleção do gene *TcZC3H24*, confirmando que o mesmo atua na regulação negativa na via de diferenciação *in vitro* da forma epimastigota em tripomastigota metacíclico.

REFERÊNCIAS

- ADROHER, F. J.; OSUNA, A.; LUPIAÑEZ, J. A. Differential energetic metabolism during *Trypanosoma cruzi* differentiation. I. Citrate synthase, NADP-isocitrate dehydrogenase, and succinate dehydrogenase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 267, n. 1, p. 252–261, 1988.
- ADROHER, F. J.; OSUNA, A.; LUPIAÑEZ, J. A. Differential energetic metabolism during *Trypanosoma cruzi* differentiation. II. Hexokinase, phosphofructokinase and pyruvate kinase. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 94, n. 1, p. 71–82, 1990.
- AGABIAN, N. Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. **Cell**, v. 61, n. 7, p. 1157–60, 1990.
- ALBAJAR-VIÑAS, P.; JANNIN, J. The hidden Chagas disease burden in Europe. **Eurosurveillance**, v. 16, n. 38, p. 1-3, 2011.
- ALCANTARA, M. V.; KESSLER, R. L.; GONÇALVES, R. E. G.; et al. Knockout of the CCCH zinc finger protein TcZC3H31 blocks *Trypanosoma cruzi* differentiation into the infective metacyclic form. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 221, p. 1–9, 2018.
- ALMEIDA, E. A. DE; RAMOS JÚNIOR, A. N.; CORREIA, D.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. Co-infection *Trypanosoma cruzi*/HIV: systematic review (1980 - 2010). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 6, p. 762–770, 2011.
- ALVES, L. R.; OLIVEIRA, C.; MÖRKING, P. A.; et al. The mRNAs associated to a zinc finger protein from *Trypanosoma cruzi* shift during stress conditions. **RNA Biology**, v. 11, n. 7, p. 921–933, 2014.
- AMORIM, J. C.; BATISTA, M.; DA CUNHA, E. S.; et al. Quantitative proteome and phosphoproteome analyses highlight the adherent population during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.
- ANDERSON, B. A.; WONG, I. L. K.; BAUGH, L.; et al. Kinetoplastid-specific histone variant functions are conserved in *Leishmania major*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 191, n. 2, p. 53–57, 2013.
- ANDERSON, P.; KEDERSHA, N. RNA granules. **The Journal of Cell Biology**, v. 172, n. 6, p. 803–808, 2006.
- ANDERSON, P.; KEDERSHA, N. RNA granules: Post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 6, p. 430–436, 2009.
- ARAÚJO, P. R.; BURLE-CALDAS, G. A.; SILVA-PEREIRA, R. A.; et al. Development of a dual reporter system to identify regulatory cis-acting elements in untranslated regions of *Trypanosoma cruzi* mRNAs. **Parasitology International**, v. 60, n. 2, p. 161–169, 2011.

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. 257–266, 2011.

ARAVIND, L.; IYER, L. M.; ANANTHARAMAN, V. The two faces of Alba: the evolutionary connection between proteins participating in chromatin structure and RNA metabolism. **Genome Biology**, v. 4, n. 10, 2003.

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

ASCANO, M.; HAFNER, M.; CEKAN, P.; GERSTBERGER, S.; TUSCHL, T. Identification of RNA-protein interaction networks using PAR-CLIP. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 3, n. 2, p. 159–177, 2012.

ASLETT, M.; AURRECOECHEA, C.; BERRIMAN, M.; et al. TriTrypDB: A functional genomic resource for the Trypanosomatidae. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n.1, p. 457–462, 2009.

ATAYDE, V. D.; ULLU, E.; KOLEV, N. G. A single-cloning-step procedure for the generation of RNAi plasmids producing long stem-loop RNA. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 184, n. 1, p. 55–58, 2012.

AVILA, A. R.; DALLAGIOVANNA, B.; YAMADA-OGATTA, S. F.; et al. Stage-specific gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Genetics and Molecular Research: GMR**, v. 2, n. 1, p. 159–168, 2003.

ATWOOD, J. A.; WEATHERLY, D. B.; MINNING, T. A.; et al. The *Trypanosoma cruzi* Proteome. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 473–476, 2005.

BAKSHI, R. P.; SHAPIRO, T. A. RNA interference of *Trypanosoma brucei* topoisomerase IB: Both subunits are essential. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 136, n. 2, p. 249–255, 2004.

BALAÑA-FOUCE, R.; REGUERA, R. M. RNA interference in *Trypanosoma brucei*: a high-throughput engine for functional genomics in trypanosomatids? **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 8, p. 348–351, 2007.

BANERJEE, H.; RACHUBINSKI, R. A. Involvement of SNARE protein Ykt6 in glycosome biogenesis in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 218, p. 28–37, 2017.

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

BARISÓN, M. J.; RAPADO, L. N.; MERINO, E. F.; et al. Metabolomic profiling reveals a finely tuned, starvation-induced metabolic switch in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 21, p. 8964–8977, 2017.

BARNES, W. M. . Plasmid Detection and Sizing in Single Colony Lysates. **Science**, v. 195, n. 4276, p. 393–394, 1977.

BARREAU, C.; PAILLARD, L.; OSBORNE, H. B. AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 22, p. 7138–7150, 2005.

BARRON, L.; BISHOP, A. J. R. P53 and HIS-tag Binding. **Journal of Proteomics & Bioinformatics**, v. 11, n. 3, p. 62–67, 2018.

BASTIN, P.; ELLIS, K.; KOHL, L.; GULL, K. Flagellum ontogeny in trypanosomes studied via an inherited and regulated RNA interference system. **Journal of Cell Science**, v. 113, p. 3321–3328, 2000.

BASTOS, C. J. C.; ARAS, R.; MOTA, G.; et al. Clinical Outcomes of Thirteen Patients with Acute Chagas Disease Acquired through Oral Transmission from Two Urban Outbreaks in Northeastern Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 6, p.1-6, 2010.

BATES, E. J.; KNUEPFER, E.; SMITH, D. F. Poly(A)-binding protein I of *Leishmania*: functional analysis and localisation in trypanosomatid parasites. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 5, p. 1211–1220, 2000.

BATISTA, C. M.; KESSLER, R. L.; EGER, I.; SOARES, M. J. *Trypanosoma cruzi* intracellular amastigotes isolated by nitrogen decompression are capable of endocytosis and cargo storage in reservosomes. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–18, 2015.

BATISTA, J. A.; TEIXEIRA, S. M.; DONELSON, J. E.; KIRCHHOFF, L. V; DE SÁ, C. M. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* poly(A)-binding protein and its genes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 67, n. 2, p. 301–312, 1994.

BATISTA, M.; MARCHINI, F. K.; CELEDON, P. A. F.; FRAGOSO, S. P.; PROBST, C. M.; PRETI, H.; OZAKI, L. S.; BUCK, G. A.; GOLDENBERG, S.; KRIEGER, M. A. A high-throughput cloning system for reverse genetics in trypanosomatids. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 259, 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:MCP**, v. 10, n. 12, 2011.

BELL, S. D. The Interaction of Alba, a Conserved Archaeal Chromatin Protein, with Sir2 and Its Regulation by Acetylation. **Science**, v. 296, n. 5565, p. 148–151, 2002.

BELL, S. D.; DAVID BARRY, J. Trypanosome nuclear factors which bind to internal promoter elements of tRNA genes. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 16, p. 3103–3110, 1995.

BELLOFATTO, V.; CROSS, G. A. M. Expression of a bacterial gene in a trypanosomatid protozoan. **Science**, v. 244, n. 4909, p. 1167–1169, 1989.

BENABDELLAH, K.; GONZÁLEZ-REY, E.; GONZÁLEZ, A. Alternative trans-splicing of the *Trypanosoma cruzi* LYT1 gene transcript results in compartmental and functional switch for the encoded protein. **Molecular Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 1559–1567, 2007.

BENSON, D. A.; CAVANAUGH, M.; CLARK, K.; et al. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, p. 36–42, 2013.

BENZ, C.; MULINDWA, J.; OUNA, B.; CLAYTON, C. The *Trypanosoma brucei* zinc finger protein ZC3H18 is involved in differentiation. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 177, n. 2, p. 148–151, 2011.

BENZ, C.; NILSSON, D.; ANDERSSON, B.; CLAYTON, C.; GUILBRIDE, D. L. Messenger RNA processing sites in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 125–134, 2005.

BERBEROF, M.; VANHAMME, L.; TEBABI, P.; et al. The 3-terminal region of the mRNAs for VSG and procyclin can confer stage specificity to gene expression in *Trypanosoma brucei*. **EMBOJ**, v. 14, n. 12, p. 2925–2934, 1995.

BERCOVICH, N.; LEVIN, M. J.; VAZQUEZ, M. P. The FIP-1 like polyadenylation factor in trypanosomes and the structural basis for its interaction with CPSF30. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 380, n. 4, p. 850–855, 2009.

BERNÁ, L.; RODRÍGUEZ, M.; CHIRIBAO, M. L.; et al. Expanding an expanded genome: long-read sequencing of *Trypanosoma cruzi*. **bioRxiv**, n. 4, v. 5, p. 1–19, 2018.

BERRIMAN, M.; GHEDIN, E.; HERTZ-FOWLER, C.; et al. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 416–422, 2005.

BIEBINGER, S.; ELIZABETH WIRTZ, L.; LORENZ, P.; CLAYTON, C. Vectors for inducible expression of toxic gene products in bloodstream and procyclic *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 85, n. 1, p. 99–112, 1997.

BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 7, n. 6, p. 2381–2390, 1978.

BLANCO, F. A.; PELTZER MESCHINI, E.; ZANETTI, M. E.; AGUILAR, O. M. A Small GTPase of the Rab Family Is Required for Root Hair Formation and Preinfection Stages of the Common Bean-Rhizobium Symbiotic Association. **The Plant Cell Online**, v. 21, n. 9, p. 2797–2810, 2009.

BONALDO, M. C.; SOUTO-PADRON, T.; DE SOUZA, W.; GOLDENBERG, S. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. **Journal of Cell Biology**, v. 106, n. 4, p. 1349–1358, 1988.

BOURNE, H. R.; SANDERS, D. A.; MCCORMICK, F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. **Nature**, v. 349, n. 6305, p. 117–127, 1991.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annual Review of Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 347–382, 1973.

BROWN, S. D.; HUANG, J.; VAN DER PLOEG, L. H. The promoter for the procyclic acidic repetitive protein (PARP) genes of *Trypanosoma brucei* shares features with RNA polymerase I promoters. **Molecular and Cellular Biology**, v. 12, n. 6, p. 2644–2652., 1992.

BRUTUS, L.; SANTALLA, J. A.; SALAS, N. A.; SCHNEIDER, D.; CHIPPAUX, J. P. Screening for congenital infection by *Trypanosoma cruzi* in France [Le dépistage de l'infection congénitale par *Trypanosoma cruzi* en France métropolitaine]. **Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique**, v. 102, n. 5, p. 300–309, 2009.

BUCHAN, J. R.; PARKER, R. Eukaryotic Stress Granules: The Ins and Out of Translation. **Molecular Cell**, v. 36, n. 6, 2009.

BUCKLEY, P. T.; EBERWINE, J. RNA Binding Protein Methods. IN: SQUIRE, L. R. (ed). **Encyclopedia of Neuroscience**, Academic Press, p. 383–388, 2009.

BUEKENS, P.; ALMENDARES, O.; CARLIER, Y.; et al. Mother-to-Child Transmission of Chagas' Disease in North America: Why Don't We Do More? **Maternal and Child Health Journal**, v. 12, n. 3, p. 283–286, 2008.

BULAJ, G.; KORTEEMME, T.; GOLDENBERG, D. P. Ionization-reactivity relationships for cysteine thiols in polypeptides. **Biochemistry**, v. 37, n. 25, p. 8965–8972, 1998.

BURNS, J. M.; SHREFFLER, W. G.; ROSMAN, D. E.; et al. Identification and synthesis of a major conserved antigenic epitope of *Trypanosoma cruzi*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 4, p. 1239–1243, 1992.

BUSCAGLIA, C. A.; ALFONSO, J.; CAMPETELLA, O.; FRASCH, A. C. Tandem amino acid repeats from *Trypanosoma cruzi* shed antigens increase the half-life of proteins in blood. **Blood**, v. 93, p. 2025–2032, 1999.

BUTLER, J. S.; LOH, S. N. Zn(2+)-dependent misfolding of the p53 DNA binding domain. **Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 2630–2639, 2007.

CAMARGO, E. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 6, n. 3, p. 93–100, 1964.

CAMPBELL, D. A.; THOMAS, S.; STURM, N. R. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? **Microbes and Infection**, v. 5, n. 13, p. 1231–1240, 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.

CARO, F.; BERCOVICH, N.; ATORRASAGASTI, C.; LEVIN, M. J.; VÁZQUEZ, M. P. *Trypanosoma cruzi*: Analysis of the complete PUF RNA-binding protein family. **Experimental Parasitology**, v. 113, n. 2, p. 112–124, 2006.

CASSOLA, A.; FRASCH, A. C. An RNA Recognition Motif Mediates the Nucleocytoplasmic Transport of a Trypanosome RNA-binding Protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 50, p. 35015–35028, 2009.

CASSOLA, A.; DE GAUDENZI, J. G.; FRASCH, A. C. Recruitment of mRNAs to cytoplasmic ribonucleoprotein granules in trypanosomes. **Molecular Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 655–670, 2007.

CAVALCANTI, D.; SHIMADA, M.; PROBST, C.; et al. Expression and subcellular localization of kinetoplast-associated proteins in the different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 1, 2009.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Parasites - American Trypanosomiasis. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>>. Acesso em: 14 out. 2018.

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

CHAKRABORTY, C.; CLAYTON, C. Stress susceptibility in *Trypanosoma brucei* lacking the RNA-binding protein ZC3H30. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 10, p. 1-24, 2018.

CHAMOND, N.; GOYTIA, M.; COATNOAN, N.; et al. *Trypanosoma cruzi* proline racemases are involved in parasite differentiation and infectivity. **Molecular Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 46–60, 2005.

CHAMOND, N.; GRÉGOIRE, C.; COATNOAN, N.; et al. Biochemical characterization of proline racemases from the human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* and definition of putative protein signatures. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 18, p. 15484–15494, 2003.

CHAN, S. P.; SLACK, F. J. microRNA-mediated silencing inside P-bodies. **RNA biology**, v. 3, n. 3, p. 97–100, 2006.

CHANT, A.; KRAEMER-PECORE, C. M.; WATKIN, R.; KNEALE, G. G. Attachment of a histidine tag to the minimal zinc finger protein of the *Aspergillus nidulans* gene regulatory protein AreA causes a conformational change at the DNA-binding site. **Protein Expression and Purification**, v. 39, n. 2, p. 152–159, 2005.

CHEN, D.; ZHENG, W.; LIN, A.; et al. Pumilio 1 Suppresses Multiple Activators of p53 to Safeguard Spermatogenesis. **Current Biology**, v. 22, n. 5, p. 420–425, 2012.

CHEN, F. OrthoMCL-DB: querying a comprehensive multi-species collection of ortholog groups. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 90001, p. 363–368, 2006.

CLAYTON, C. E. Genetic manipulation of kinetoplastida. **Parasitology Today**, v. 15, n. 9, p. 372–378, 1999.

CLAYTON, C.; SHAPIRA, M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and Leishmanias. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 156, n. 2, p. 93–101, 2007.

CLÉRY, A.; BLATTER, M.; ALLAIN, F. H. T. RNA recognition motifs: boring? Not quite. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 18, n. 3, p. 290–298, 2008.

CONTRERAS, V. T.; ARAUJO-JORGE, T. C.; BONALDO, M. C.; et al. Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, n.1, p. 123-133, 1988.

CONTRERAS, V. T.; MOREL, C. M.; GOLDENBERG, S. Stage specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 14, n. 1, p. 83–96, 1985a.

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, 1985b.

DA COSTA, J. F.; FERRARINI, M. G.; NARDELLI, S. C.; et al. *Trypanosoma cruzi* XRNA granules colocalise with distinct mRNP granules at the nuclear periphery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 6, p. 1–8, 2018.

DA COSTA, K. S.; GALÚCIO, J. M. P.; LEONARDO, E. S.; et al. Structural and evolutionary analysis of Leishmania Alba proteins. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 217, p. 23–31, 2017.

CROSS, G. A.; BELLOFATTO, V.; CLAYTON, C. E.; SHERMAN, D. R. Using transfection to study gene expression in trypanosomes. **Biochemical Society Transaction**, v. 18, n. 5, p. 714–716, 1990.

CUNHA-NETO, E.; CHEVILLARD, C. Chagas Disease Cardiomyopathy: Immunopathology and Genetics. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 1–11, 2014.

D'ORSO, I.; FRASCH, A. C. Functionally different AU- and G-rich cis-elements confer developmentally regulated mRNA stability in *Trypanosoma cruzi* by interaction with specific RNA-binding proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 19, p. 15783–15793, 2001a.

D'ORSO, I.; FRASCH, A. C. C. TcUBP-1, a Developmentally Regulated U-rich RNA-binding Protein Involved in Selective mRNA Destabilization in Trypanosomes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 37, p. 34801–34809, 2001b.

D'ORSO, I.; FRASCH, A. C. C. TcUBP-1, an mRNA destabilizing factor from trypanosomes, homodimerizes and interacts with novel AU-rich element- and Poly(A)-binding proteins forming a ribonucleoprotein complex. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 52, p. 50520–50558, 2002.

D'ORSO, I.; DE GAUDENZI, J. G.; FRASCH, A. C. C. RNA-binding proteins and mRNA turnover in trypanosomes. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 4, p. 151–155, 2003.

DALLAGIOVANNA, B.; CORREA, A.; PROBST, C. M.; et al. Functional genomic characterization of mRNAs associated with TcPUF6, a pumilio-like protein from *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 13, p. 8266–8273, 2008.

DALLAGIOVANNA, B.; PÉREZ, L.; SOTELO-SILVEIRA, J.; et al. *Trypanosoma cruzi*: Molecular characterization of TcPUF6, a Pumilio protein. **Experimental Parasitology**, v. 109, n. 4, p. 260–264, 2005.

DANESHVAR, H.; WYLLIE, S.; PHILLIPS, S.; HAGAN, P.; BURCHMORE, R. Comparative proteomics profiling of a gentamicin-attenuated *Leishmania infantum* cell line identifies key changes in parasite thiol-redox metabolism. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 5, p. 1463–1471, 2012.

DANIEL, E.; ONWUKWE, G. U.; WIERENGA, R. K.; et al. ATGme: Open-source web application for rare codon identification and custom DNA sequence optimization. **BMC Bioinformatics**, v. 16, n. 1, p. 1–6, 2015.

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, 2004a.

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, 2004b.

DAS, A.; BANDAY, M.; BELLOFATTO, V. RNA polymerase transcription machinery in trypanosomes. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n. 3, p. 429–434, 2008.

DAS, A.; MORALES, R.; BANDAY, M.; et al. The essential polysome-associated RNA-binding protein RBP42 targets mRNAs involved in *Trypanosoma brucei* energy metabolism. **RNA**, v. 18, n. 11, p. 1968–1983, 2012.

DE ASSIS BURLE-CALDAS, G.; 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.

DECKER, C. J.; PARKER, R. P-bodies and stress granules: possible roles in the control of translation and mRNA degradation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 9, 2012.

DE GAUDENZI, J.; FRASCH, A. C.; CLAYTON, C. RNA-Binding Domain Proteins in Kinetoplastids: a Comparative Analysis. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 12, p. 2106–2114, 2005.

DE GAUDENZI, J. G.; CARMONA, S. J.; AGÜERO, F.; FRASCH, A. C. Genome-wide analysis of 3'-untranslated regions supports the existence of post-transcriptional regulons controlling gene expression in trypanosomes. **PeerJ**, v. 1, p. 1-28, 2013.

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. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 21, p. 18884–18894, 2003.

DEMOGINES, A.; SMITH, E.; KRUGLYAK, L.; ALANI, E. Identification and Dissection of a Complex DNA Repair Sensitivity Phenotype in Baker's Yeast. **PLOS Genetics**, v. 4, n. 7, 2008.

DE LANA, M.; DE MENEZES MACHADO, E. M. Biology of *Trypanosoma cruzi* and biological diversity. In: TELLERIA, J.; TIBAYRENC, M. **American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research**, 2nd ed. Elsevier, 2017, p. 345–369.

DEVEAU, H.; GARNEAU, J. E.; MOINEAU, S. CRISPR/Cas System and Its Role in Phage-Bacteria Interactions. **Annual Review of Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 475–493, 2010.

DIAZGRANADOS, C. A.; SAAVEDRA-TRUJILLO, C. H.; MANTILLA, M.; et al. Chagasic encephalitis in HIV patients: common presentation of an evolving epidemiological and clinical association. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 5, p. 324–330, 2009.

DIETRICH, P.; SOARES, M. B.; AFFONSO, M. H. T.; FLOETER-WINTER, L. M. The *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA-encoding gene: analysis of promoter and upstream intergenic spacer sequences. **Gene**, v. 125, n. 1, p. 103–107, 1993.

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. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 14, p. 10218–10227, 2000.

DORN, P. L.; PERNICIARO, L.; YABSLEY, M. J.; et al. Autochthonous transmission of *Trypanosoma cruzi*, Louisiana. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 605–607, 2007.

DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR/Cas9. **Science**, v. 346, n. 6213, 2014.

DREYFUSS, G.; KIM, V. N.; KATAOKA, N. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 3, p. 195–205, 2002.

DROLL, D.; ARCHER, S.; FENN, K.; et al. The trypanosome Pumilio-domain protein PUF7 associates with a nuclear cyclophilin and is involved in ribosomal RNA maturation. **FEBS letters**, v. 584, n. 6, p. 1156–1162, 2010.

DROLL, D.; MINIA, I.; FADDA, A.; et al. Post-Transcriptional Regulation of the Trypanosome Heat Shock Response by a Zinc Finger Protein. **PLOS Pathogens**, v. 9, n. 4, 2013.

DROZDZ, M.; PALAZZO, S. S.; SALAVATI, R.; et al. TbMP81 is required for RNA editing in *Trypanosoma brucei*. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 7, p. 1791–1799, 2002.

DUMONTEIL, E.; HERRERA, C. Ten years of Chagas disease research: Looking back to achievements, looking ahead to challenges. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 4, 2017.

DUNKER, A. K.; BROWN, C. J.; LAWSON, J. D.; IAKOUCHEVA, L. M.; OBRADOVIĆ, Z. Intrinsic disorder and protein function. **Biochemistry**, v. 41, n. 21, p. 6573–6582, 2002.

DUNKER, A. K.; LAWSON, J. D.; BROWN, C. J.; et al. Intrinsically disordered protein. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 19, n. 1, p. 26–59, 2001.

DUPÉ, A.; DUMAS, C.; PAPADOPOULOU, B. An Alba-domain protein contributes to the stage-regulated stability of amastin transcripts in *Leishmania*. **Molecular Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 548–561, 2014.

DUPÉ, A.; DUMAS, C.; PAPADOPOULOU, B. Differential Subcellular Localization of *Leishmania* Alba-Domain Proteins throughout the Parasite Development. **PLOS ONE**, v. 10, n. 9, 2015.

DYSON, H. J.; WRIGHT, P. E. Coupling of folding and binding for unstructured proteins. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 12, n. 1, p. 54–60, 2002.

DYSON, H. J.; WRIGHT, P. E. Intrinsically unstructured proteins and their functions. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 3, p. 197–208, 2005.

EDWARDS, T. A.; PYLE, S. E.; WHARTON, R. P.; AGGARWAL, A. K. Structure of Pumilio Reveals Similarity between RNA and Peptide Binding Motifs. **Cell**, v. 105, n. 2, p. 281–289, 2001.

EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BLANDIN, G.; et al. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 404–409, 2005b.

EL-SAYED NM, MYLER PJ, BARTHOLOMEU DC, NILSSON D, AGGARWAL G, TRAN AN, GHEDIN E, WORTHEY EA, DELCHER AL, BLANDIN G, WESTENBERGER SJ, CALER E, CERQUEIRA GC, BRANCHE C, HAAS B, ANUPAMA A, ARNER E, ASLUND L, ATTIPOE P, BONTEMPI E, BRINGAUD F, BURTON; et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v. 15, n. 5733, p. 409–415, 2005a.

ERICSSON, A. O.; FARIA, L. O.; CRUZ, W. B.; MARTINS DE SÁ, C.; LIMA, B. D. TcZFP8, a novel member of the *Trypanosoma cruzi* CCHC zinc finger protein family with nuclear localization. **Genetics and Molecular Research:GMR**, v. 5, n. 3, p. 553–563, 2006.

ESPINOSA, J. M.; PORTAL, D.; LOBO, G. S.; et al. *Trypanosoma cruzi* poly-zinc finger protein: A novel DNA/RNA-binding CCHC-zinc finger protein. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 131, n. 1, p. 35–44, 2003.

ESTÉVEZ, A. M. The RNA-binding protein TbDRBD3 regulates the stability of a specific subset of mRNAs in trypanosomes. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 14, p. 4573–4586, 2008.

FADDA, A.; FÄRBER, V.; DROLL, D.; CLAYTON, C. The roles of 3'-exoribonucleases and the exosome in trypanosome mRNA degradation. **RNA**, v. 19, n. 7, p. 937–947, 2013.

FERNANDES, M.; SILVA, R.; RÖSSLE, S. C.; et al. Gene characterization and predicted protein structure of the mitochondrial chaperonin HSP10 of *Trypanosoma cruzi*. **Gene**, v. 349, p. 135–142, 2005.

FERNÁNDEZ-MOYA, S. M.; CARRINGTON, M.; ESTÉVEZ, A. M. Depletion of the RNA-Binding protein rbp33 results in increased expression of silenced RNA polymerase II transcripts in *Trypanosoma brucei*. **PLOS ONE**, v. 9, n. 9, 2014.

FERNÁNDEZ-MOYA, S. M.; GARCÍA-PÉREZ, A.; KRAMER, S.; CARRINGTON, M.; ESTÉVEZ, A. M. Alterations in DRBD3 Ribonucleoprotein Complexes in Response to Stress in *Trypanosoma brucei*. **PLOS ONE**, v. 7, n. 11, 2012.

FERREIRA, L. R. P.; DOSSIN, F. DE M.; RAMOS, T. C.; FREYMÜLLER, E.; SCHENKMAN, S. Active transcription and ultrastructural changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, n. 1, p. 157–166, 2008.

FIGUEROA-ANGULO, E.; MARÍA CEVALLOS, A.; ZENTELLA, A.; LÓPEZ-VILLASEÑOR, I.; HERNÁNDEZ, R. Potential regulatory elements in the *Trypanosoma cruzi* rRNA gene promoter. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression**, v. 1759, n. 10, p. 497–501, 2006.

FINN, R. D.; BATEMAN, A.; CLEMENTS, J.; et al. Pfam: The protein families database. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 1, p. 222–230, 2014.

FINN, R. D.; CLEMENTS, J.; ARNDT, W.; et al. HMMER web server: 2015 Update. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 1, p. 30–38, 2015.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806–811, 1998.

FLORES-CHAVEZ, M.; FERNANDEZ, B.; PUENTE, S.; et al. Transfusional Chagas Disease: Parasitological and Serological Monitoring of an Infected Recipient and Blood Donor. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 5, p. 44–47, 2008.

FOLGUEIRA, C.; MARTINEZ-BONET, M.; REQUENA, J. M. The *Leishmania infantum* PUF proteins are targets of the humoral response during visceral Leishmaniasis. **BMC Research Notes**, v. 3, n. 1, p. 1-8, 2010.

FRANKS, T. M.; LYKKE-ANDERSEN, J. The control of mRNA decapping and P-body formation. **Molecular Cell**, v. 32, n. 5, p. 605–615, 2008.

FREISTADT, M. S.; CROSS, G. A. M.; ROBERTSON, H. D. Discontinuously synthesized mRNA from *Trypanosoma brucei* contains the highly methylated 5' cap structure, m⁷GpppA*A*C(2'-O)mU*A. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 29, p. 15071–15075, 1988.

FRITZ, M.; VANSELOW, J.; SAUER, N.; et al. Novel insights into RNP granules by employing the trypanosome's microtubule skeleton as a molecular sieve. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 16, p. 8013–8032, 2015.

GARCIA, M. N.; RIVERA, H.; ROSSMANN, S. N.; et al. Evidence of Autochthonous Chagas Disease in Southeastern Texas. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n. 2, p. 325–330, 2015.

GERBER, A. P.; HERSCHLAG, D.; BROWN, P. O. Extensive Association of Functionally and Cytotopically Related mRNAs with Puf Family RNA-Binding Proteins in Yeast. **PLOS Biology**, v. 2, n. 3, p. 342-354, 2004.

GERSTBERGER, S.; HAFNER, M.; TUSCHL, T. Learning the language of post-transcriptional gene regulation. **Genome Biology**, v. 14, n. 8, p. 6–10, 2013.

GHEDIN, E.; BRINGAUD, F.; PETERSON, J.; et al. Gene synteny and evolution of genome architecture in trypanosomatids. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 134, n. 2, p. 183–191, 2004.

GILINGER, G.; BELLOFATTO, V. Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 7, p. 1556–1564, 2001.

GLISOVIC, T.; BACHORIK, J. L.; YONG, J.; DREYFUSS, G. RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. **FEBS Letters**, v. 582, n. 14, p. 1977–1986, 2008.

GOLDENBERG, S.; ÁVILA, A. R. Aspects of *Trypanosoma cruzi* Stage Differentiation. **Advances in Parasitology**, v. 75, p. 285–305, 2011.

GONÇALVES, C. S.; ÁVILA, A. R.; DE SOUZA, W.; MOTTA, M. C. M.; CAVALCANTI, D. P. Revisiting the *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis: morphological and ultrastructural analyses during cell differentiation. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, 2018.

GOTO, Y.; CARTER, D.; REED, S. G. Immunological dominance of *Trypanosoma cruzi* tandem repeat proteins. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 9, p. 3967–3974, 2008.

GOURGUECHON, S.; SAVICH, J. M.; WANG, C. C. The Multiple Roles of cyclin E1 in Controlling Cell Cycle Progression and Cellular Morphology of *Trypanosoma brucei*. **Journal of Molecular Biology**, v. 368, n. 4, p. 939–950, 2007.

GOYAL, M.; BANERJEE, C.; NAG, S.; BANDYOPADHYAY, U. The Alba protein family: Structure and function. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1864, n. 5, p. 570–583, 2016.

GRISARD, E. C.; TEIXEIRA, S. M. R.; DE ALMEIDA, L. G. P.; et al. *Trypanosoma cruzi* Clone Dm28c Draft Genome Sequence. **Genome Announcements**, v. 2, n. 1, 2014.

GRUBER, A.; ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi*: Characterization of Two Recombinant Antigens with Potential Application in the Diagnosis of Chagas' Disease. **Experimental Parasitology**, v.76, n.1, p 1-12, 1993.

GRZYBEK, M.; GOLONKO, A.; GÓRSKA, A.; et al. The CRISPR/Cas9 system sheds new lights on the biology of protozoan parasites. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 11, p. 4629-4640, 2018.

GUERRA-SLOMPO, E. P.; PROBST, C. M.; PAVONI, D. P.; et al. Molecular characterization of the *Trypanosoma cruzi* specific RNA binding protein TcRBP40 and its associated mRNAs. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 420, n. 2, p. 302–307, 2012.

GÜNZL, A. The pre-mRNA splicing machinery of trypanosomes: Complex or simplified? **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 8, p. 1159–1170, 2010.

GÜNZL, A.; BRUDERER, T.; LAUFER, G.; et al. RNA Polymerase I Transcribes Procyclin Genes and Variant Surface Glycoprotein Gene Expression Sites in *Trypanosoma brucei*. **Eukaryotic Cell**, v. 2, n. 3, p. 542–551, 2003.

GUSTAFSSON, C.; GOVINDARAJAN, S.; MINSHULL, J. Codon bias and heterologous protein expression. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 7, p. 346–353, 2004.

HABIBI, N.; MOHD HASHIM, S. Z.; NOROUZI, A.; SAMIAN, M. A review of machine learning methods to predict the solubility of overexpressed recombinant proteins in *Escherichia coli*. **BMC Bioinformatics**, v. 15, n. 134, 2014.

HAFT, D. H.; SELENGUT, J. D.; RICHTER, R. A.; et al. TIGRFAMs and genome properties in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, p. 387–395, 2013.

HAMEDI, A.; BOTELHO, L.; BRITTO, C.; et al. *In vitro* metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi* induced by starvation correlates with a transient adenylyl cyclase stimulation as well as with a constitutive upregulation of adenylyl cyclase expression. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 200, p. 9–18, 2015.

HAMMARSTRÖM, M.; WOESTENENK, E. A.; HELLGREN, N.; HÄRD, T.; BERGLUND, H. Effect of N-terminal solubility enhancing fusion proteins on yield of purified target protein. **Journal of Structural and Functional Genomics**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2006.

HAMMOND, S. M.; BERNSTEIN, E.; BEACH, D.; HANNON, G. J. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. **Nature**, v. 404, n. 6775, p. 293–296, 2000.

HARTMANN, C.; BENZ, C.; BREMS, S.; et al. Small trypanosome RNA-binding proteins TbUBP1 and TbUBP2 influence expression of F-box protein mRNAs in bloodstream trypanosomes. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 11, p. 1964–1978, 2007.

HARTMANN, C.; CLAYTON, C. Regulation of a transmembrane protein gene family by the small RNA-binding proteins TbUBP1 and TbUBP2. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 157, n. 1, p. 112–115, 2008.

HARTWIG, A.; ASMUSS, M.; EHLEBEN, I.; et al. Interference by toxic metal ions with DNA repair processes and cell cycle control: Molecular mechanisms. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. 5, p. 797–799, 2002.

HELLMAN, K. M.; CIGANDA, M.; BROWN, S. V.; et al. Two trypanosome-specific proteins are essential factors for 5S rRNA abundance and ribosomal assembly in *Trypanosoma brucei*. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 10, p. 1766–1772, 2007.

HENAO-MARTÍNEZ, A. F.; SCHWARTZ, D. A.; YANG, I. V. Chagasic cardiomyopathy, from acute to chronic: is this mediated by host susceptibility factors? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 9, p. 521–527, 2012.

HENDRIKS, E. F.; ABDUL-RAZAK, A.; MATTHEWS, K. R. tbCPSF30 Depletion by RNA Interference Disrupts Polycistronic RNA Processing in *Trypanosoma brucei*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 29, p. 26870–26878, 2003.

HENDRIKS, E. F.; MATTHEWS, K. R. Disruption of the developmental programme of *Trypanosoma brucei* by genetic ablation of TbZFP1, a differentiation-enriched CCCH protein. **Molecular Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 706–716, 2005.

HENDRIKS, E. F.; ROBINSON, D. R.; HINKINS, M.; MATTHEWS, K. R. A novel CCCH protein which modulates differentiation of *Trypanosoma brucei* to its procyclic form. **EMBO Journal**, v. 20, n. 23, p. 6700–6711, 2001.

HERAS, S. R.; LÓPEZ, M. C.; LUIS GARCÍA-PÉREZ, J.; MARTIN, S. L.; THOMAS, M. C. The L1Tc C-Terminal Domain from *Trypanosoma cruzi* Non-Long Terminal Repeat Retrotransposon Codes for a Protein That Bears Two C2H2 Zinc Finger Motifs and Is Endowed with Nucleic Acid Chaperone Activity. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 21, p. 9209–9220, 2005.

HIERONYMUS, H.; SILVER, P. A. Genome-wide analysis of RNA–protein interactions illustrates specificity of the mRNA export machinery. **Nature Genetics**, v. 33, n. 2, p. 155–161, 2003.

HOEK, M.; ZANDERS, T.; CROSS, G. A. M. *Trypanosoma brucei* expression-site-associated-gene-8 protein interacts with a Pumilio family protein. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 120, n. 2, p. 269–283, 2002.

HOLETZ, F. B.; ALVES, L. R.; PROBST, C. M.; et al. Protein and mRNA content of TcDHH1-containing mRNPs in *Trypanosoma cruzi*. **FEBS Journal**, v. 277, n. 16, p. 3415–3426, 2010.

HOLETZ, F. B.; CORREA, A.; ÁVILA, A. R.; et al. Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 356, n. 4, p. 1062–1067, 2007.

HOTCHKISS, T. L.; NERANTZAKIS, G. E.; DILLS, S. C.; SHANG, L.; READ, L. K. *Trypanosoma brucei* poly(A) binding protein I cDNA cloning, expression, and binding to 5 untranslated region sequence elements. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 98, n. 1, p. 117–129, 1999.

HUANG, J.; VANDER PLOEG, L. H. Requirement of a polypyrimidine tract for trans-splicing in trypanosomes: discriminating the PARP promoter from the immediately adjacent 3' splice acceptor site. **The EMBO journal**, v. 10, n. 12, p. 3877–3885, 1991.

HUCH, S.; MÜ, M.; MUPPAVARAPU, M.; et al. The decapping activator Edc3 and the Q/N-rich domain of Lsm4 function together to enhance mRNA stability and alter mRNA decay pathway dependence in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biology Open**, v. 5, n. 10, p. 1388–1399, 2016.

HUG, M.; HOTZ, H.-R.; HARTMANN, C.; CLAYTON, C. Hierarchies of RNA-Processing Signals in a Trypanosome Surface Antigen mRNA Precursor. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14, n. 11, p. 7428–7435, 1994.

IAKOUICHEVA, L. M.; BROWN, C. J.; LAWSON, J. D.; OBRADOVIĆ, Z.; DUNKER, A. K. Intrinsic Disorder in Cell-signaling and Cancer-associated Proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 323, n. 3, p. 573–584, 2002.

IAKOUICHEVA, L. M.; RADIVOJAC, P.; BROWN, C. J.; et al. The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 3, p. 1037–1049, 2004.

IBAÑEZ, C. F.; AFFRANCHINO, J. L.; MACINA, R. A.; et al. Multiple *Trypanosoma cruzi* antigens containing tandemly repeated amino acid sequence motifs. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 30, n. 1, p. 27–33, 1988.

INOUE, N.; OTSU, K.; FERRARO, D. M.; DONELSON, J. E. Tetracycline-regulated RNA interference in *Trypanosoma congolense*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 120, n. 2, p. 309–313, 2002.

ISALAN, M. Zinc Fingers. In: LENNARZ, W. J.; LANE, M. D. **Encyclopedia of Biological Chemistry**. Academic Press, 2013, p.575–579.

ISHINO, Y.; SHINAGAWA, H.; MAKINO, K.; AMEMURA, M.; NAKATA, A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. **Journal of bacteriology**, v. 169, n. 12, p. 5429–5433, 1987.

IVANOV, P. A.; NADEZHDINA, E. S. Stress granules: RNP-containing cytoplasmic bodies arising in stress: Structure and mechanism of organization. **Molecular Biology**, v. 40, n. 6, p. 844–850, 2006.

IVENS, A. C.; PEACOCK, C. S.; WORTHEY, E. A.; et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 436–442, 2005.

JAGER, A. V.; DE GAUDENZI, J. G.; CASSOLA, A.; D'ORSO, I.; FRASCH, A. C. mRNA maturation by two-step trans-splicing/polyadenylation processing in trypanosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 7, p. 2035–2042, 2007.

JANZ, L.; CLAYTON, C. The PARP and rRNA promoters of *Trypanosoma brucei* are composed of dissimilar sequence elements that are functionally interchangeable. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14, n. 9, p. 5804–5811, 1994.

JENSEN, B. C.; BOOSTER, N.; VIDADALA, R. S. R.; MALY, D. J.; PARSONS, M. A novel protein kinase is essential in bloodstream *Trypanosoma brucei*. **International Journal for Parasitology**, v. 46, n. 8, p. 479–483, 2016.

JOHNSON, P. J.; KOOTER, J. M.; BORST, P. Inactivation of transcription by UV irradiation of *T. brucei* provides evidence for a multicistronic transcription unit including a VSG gene. **Cell**, v. 51, n. 2, p. 273–281, 1987.

JONES, D. T.; COZZETTO, D. DISOPRED3: Precise disordered region predictions with annotated protein-binding activity. **Bioinformatics**, v. 31, n. 6, p. 857–863, 2015.

JOSHUA, B.; FALKE, J. Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. **Methods in Enzymology**, v. 326, p. 245–254, 2000.

KAPELI, K.; MARTINEZ, F. J.; YEO, G. W. Genetic mutations in RNA-binding proteins and their roles in ALS. **Human Genetics**, v. 136, n. 9, p. 1193–1214, 2017.

KAPLAN, W.; ERHARDT, J.; SLUIS-CREMER, N.; et al. Conformational stability of pGEX-expressed *Schistosoma japonicum* glutathione S-transferase: A detoxification enzyme and fusion-protein affinity tag. **Protein Science**, v. 6, n. 2, p. 399–406, 2008.

KEDERSHA, N.; STOECKLIN, G.; AYODELE, M.; et al. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. **Journal of Cell Biology**, v. 169, n. 6, p. 871–884, 2005.

KEENE, J. D. Ribonucleoprotein infrastructure regulating the flow of genetic information between the genome and the proteome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 13, p. 7018–7024, 2001.

KEENE, J. D. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 7, p. 533–543, 2007.

KEENE, J. D.; LAGER, P. J. Post-transcriptional operons and regulons co-ordinating gene expression. **Chromosome Research**, v. 13, n. 3, p. 327–337, 2005.

KEENE, J. D.; TENENBAUM, S. A. Eukaryotic mRNPs may represent posttranscriptional operons. **Molecular Cell**, v. 9, n. 6, p. 1161–1167, 2002.

KELLEY, L. A.; MEZULIS, S.; YATES, C. M.; WASS, M. N.; STERNBERG, M. J. E. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols**, v. 10, n. 6, p. 845–858, 2015.

KELLIS, J. T.; NYBERG, K.; S[~]AIL, D.; FERSHT, A. R. Contribution of hydrophobic interactions to protein stability. **Nature**, v. 333, n. 6175, p. 784–786, 1988.

KELLY, J. M.; DAS, P.; TOMÁS, A. M. An approach to functional complementation by introduction of large DNA fragments into *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani* using a cosmid shuttle vector. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 65, n. 1, p. 51–62, 1994.

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.

KESSLER, R. L.; PAVONI, D. P.; KRIEGER, M. A.; PROBST, C. M. *Trypanosoma cruzi* specific mRNA amplification by in vitro transcription improves parasite transcriptomics in host-parasite RNA mixtures. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, 2017.

KIMPLE, M. E.; BRILL, A. L.; PASKER, R. L. Overview of affinity tags for protein purification. **Current Protocols in Protein Science**, v. 73, n.1, p. 608–616, 2013.

KLASS, D. M.; SCHEIBE, M.; BUTTER, F.; et al. Quantitative proteomic analysis reveals concurrent RNA-protein interactions and identifies new RNA-binding proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genome Research**, v. 23, n. 6, p. 1028–1038, 2013.

KLEFFMANN, T.; SCHMIDT, J.; SCHAUB, G. A. Attachment of *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes to Hydrophobic Substrates and Use of this Property to Separate Stages and Promote Metacyclogenesis. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 548–555, 1998.

KLEIN, C.; TERRAO, M.; CLAYTON, C. The role of the zinc finger protein ZC3H32 in bloodstream-form *Trypanosoma brucei*. **PLOS ONE**, v. 12, n. 5, 2017.

KLUSKA, K.; ADAMCZYK, J.; KREŻEL, A. Metal binding properties, stability and reactivity of zinc fingers. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 367, p. 18–64, 2018.

KOLEV, N. G.; FRANKLIN, J. B.; CARMI, S.; et al. The Transcriptome of the Human Pathogen *Trypanosoma brucei* at Single-Nucleotide Resolution. **PLOS Pathogens**, v. 6, n. 9, 2010.

KOLEV, N. G.; RAMEY-BUTLER, K.; CROSS, G. A. M.; ULLU, E.; TSCHUDI, C. Developmental progression to infectivity in *Trypanosoma brucei* triggered by an RNA-binding protein. **Science**, v. 338, n. 6112, p. 1352–1353, 2012.

KOLLIEN, A. H.; SCHAUB, G. A. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. **Parasitology Today**, v. 16, n. 9, p. 381–387, 2000.

KOONIN, E. V.; MAKAROVA, K. S. CRISPR-Cas: an adaptive immunity system in prokaryotes. **F1000 Biology Reports**, v. 6, n. 12, p. 1–6, 2009.

KRAEVA, N.; ISHEMGULOVA, A.; LUKEŠ, J.; YURCHENKO, V. Tetracycline-inducible gene expression system in *Leishmania mexicana*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 198, n. 1, p. 11–13, 2014.

KRAMER, S. RNA in development: How ribonucleoprotein granules regulate the life cycles of pathogenic protozoa. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 5, n. 2, p. 263–284, 2014.

KRAMER, S.; BANNERMAN-CHUKUALIM, B.; ELLIS, L.; et al. Differential Localization of the Two *T. brucei* Poly(A) Binding Proteins to the Nucleus and RNP Granules Suggests Binding to Distinct mRNA Pools. **PLOS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.

KRAMER, S.; KIMBLIN, N. C.; CARRINGTON, M. Genome-wide in silico screen for CCCH-type zinc finger proteins of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major*. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, 2010a.

KRAMER, S.; MARNEF, A.; STANDART, N.; CARRINGTON, M. Inhibition of mRNA maturation in trypanosomes causes the formation of novel foci at the nuclear periphery containing cytoplasmic regulators of mRNA fate. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. 12, p. 2896–2909, 2012.

KRAMER, S.; QUEIROZ, R.; ELLIS, L.; et al. Heat shock causes a decrease in polysomes and appearance of stress granules in trypanosomes independently of eIF2 α phosphorylation at threonine 169, the residue equivalent to serine 51 in mammalian eIF2 α . **Journal of Cell Science**, v. 121, n. 18, p. 3002–3014, 2010b.

KRIEGER, M. A.; AVILA, A. R.; OGATTA, S. F.; PLAZANET-MENUT, C.; GOLDENBERG, S. Differential gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 1, p. 165–168, 1999.

KRISHNA, S. S. Structural classification of zinc fingers: survey and summary. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 2, p. 532–550, 2003.

KUGERATSKI, F. G.; BATISTA, M.; INOUE, A. H.; et al. pTcGW plasmid vectors 1.1 version: A versatile tool for *Trypanosoma cruzi* gene characterisation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 5, p. 687–690, 2015.

KWON, S. C.; YI, H.; EICHELBAUM, K.; et al. The RNA-binding protein repertoire of embryonic stem cells. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 20, n. 9, p. 1122–1130, 2013.

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. 9119–9123, 1989.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LAFAILLE, J. J.; LINSS, J.; KRIEGER, M. A.; et al. Structure and expression of two *Trypanosoma cruzi* genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 35, n. 2, p. 127–136, 1989.

LAIRD, P. W.; KOOTER, J. M.; LOOSBROEK, N.; BORST, P. Mature mRNAs of *Trypanosoma brucei* possess a 5' cap acquired by discontinuous RNA synthesis. **Nucleic Acids Research**, v. 13, n. 12, p. 4253–4266, 1985.

LAITY, J. H.; LEE, B. M.; WRIGHT, P. E. Zinc finger proteins: New insights into structural and functional diversity. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 11, n. 1, p. 39–46, 2001.

DE LANGE, T.; MICHELS, P. A.; VEERMAN, H. J.; CORNELISSEN, A. W.; BORST, P. Many trypanosome messenger RNAs share a common 5' terminal sequence. **Nucleic Acids Research**, v. 12, n. 9, p. 3777–3790, 1984.

LAUFER, G.; SCHAAF, G.; BOLLGÖNN, S.; GÜNZL, A. In vitro analysis of alpha-amanitin-resistant transcription from the rRNA, procyclic acidic repetitive protein, and variant surface glycoprotein gene promoters in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. 8, p. 5466–5473, 1999.

LAVERRIÈRE, M.; CAZZULO, J. J.; ALVAREZ, V. E. Antagonic activities of *Trypanosoma cruzi* metacaspases affect the balance between cell proliferation, death and differentiation. **Cell Death & Differentiation**, v. 19, n. 8, p. 1358–1369, 2012.

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

LEE, M. G.-S.; VAN DER PLOEG, L. H. T. Transcription of protein-coding genes in trypanosomes by RNA Polymerase I. **Annual Review of Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 463–489, 1997.

LEE, Y.-M.; LIM, C. Factors Controlling the Reactivity of Zinc Finger Cores. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 22, p. 8691–8703, 2011.

LEGUIZAMON, M. S.; CAMPETELLA, O. E.; CAPP, S. M. G.; FRASCH, A. C. C. Mice infected with *Trypanosoma cruzi* produce antibodies against the enzymatic domain of trans-sialidase that inhibit its activity. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 8, p. 3441–3446, 1994.

LEIBY, D. A.; FUCCI, M. C. H.; STUMPF, R. J. *Trypanosoma cruzi* in a low-to moderate-risk blood donor population: Seroprevalence and possible congenital transmission. **Transfusion**, v. 39, n. 3, p. 310–315, 1999.

LI, W.; COWLEY, A.; ULUDAG, M.; et al. The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 1, p. 580–584, 2015.

LI, Y. Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: A review. **Protein Expression and Purification**, v. 80, n. 2, p. 260–267, 2011.

LI, Z. H.; DE GAUDENZI, J. G.; ALVAREZ, V. E.; et al. A 43-nucleotide U-rich element in 3'-untranslated region of large number of *Trypanosoma cruzi* transcripts is important for mRNA Abundance in intracellular amastigotes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 23, p. 19058–19069, 2012.

LIANG, X.; HARITAN, A.; ULIEL, S. Trans and cis Splicing in Trypanosomatids: Mechanism, Factors, and Regulation. **Eukaryotic Cell**, v. 2, n. 5, p. 830–840, 2003.

LING, A. S.; TROTTER, J. R.; HENDRIKS, E. F. A zinc finger protein, TbZC3H20, stabilizes two developmentally regulated mRNAs in trypanosomes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 23, p. 20152–20162, 2011.

LIU, X.; SUN, Y.; CONSTANTINESCU, S. N.; et al. Transforming growth factor β -induced phosphorylation of Smad3 is required for growth inhibition and transcriptional induction in epithelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 20, p. 10669–10674, 1997.

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.

LUEONG, S.; MERCE, C.; FISCHER, B.; HOHEISEL, J. D.; ERBEN, E. D. Gene expression regulatory networks in *Trypanosoma brucei*: Insights into the role of the mRNA-binding proteome. **Molecular Microbiology**, v. 100, n. 3, p. 457–471, 2016.

- LUKES, J.; GUILBRIDE, D. L.; VOTÝPKA, J.; et al. Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. **Eukaryotic Cell**, v. 1, n. 4, p. 495–502, 2002.
- LUNDE, B. M.; MOORE, C.; VARANI, G. RNA-binding proteins: modular design for efficient function. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 6, p. 479–490, 2007.
- LUU, V.-D.; BREMS, S.; HOHEISEL, J. D.; et al. Functional analysis of *Trypanosoma brucei* PUF1. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 150, n. 2, p. 340–349, 2006.
- LYE, L. F.; OWENS, K.; SHI, H.; et al. Retention and Loss of RNA interference pathways in trypanosomatid protozoans. **PLOS Pathogens**, v. 6, n. 10, 2010.
- MACDONALD, P. M. The *Drosophila pumilio* gene: an unusually long transcription unit and an unusual protein. **Development**, v. 114, n. 1, p. 221–232, 1992.
- MACÊDO, C. D. S.; DAROCHA, W. D.; MORTARA, R. A.; PRADO, M. A. M.; TEIXEIRA, S. M. R. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* antigen with homology to intracellular mammalian lectins. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 14, p. 1473–1484, 2006.
- MAGALHÃES, R. D. M.; DUARTE, M. C.; MATTOS, E. C.; et al. Identification of Differentially Expressed Proteins from *Leishmania amazonensis* Associated with the Loss of Virulence of the Parasites. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, 2014.
- MAGNAN, C. N.; RANDALL, A.; BALDI, P. SOLpro: Accurate sequence-based prediction of protein solubility. **Bioinformatics**, v. 25, n. 17, p. 2200–2207, 2009.
- 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. 163–169, 2000.
- MANFUL, T.; FADDA, A.; CLAYTON, C. The role of the 5'-3' exoribonuclease XRNA in transcriptome-wide mRNA degradation. **RNA**, v. 17, n. 11, p. 2039–2047, 2011.
- MANI, J.; GÜTTINGER, A.; SCHIMANSKI, B.; et al. Alba-domain proteins of *Trypanosoma brucei* are cytoplasmic RNA-Binding proteins that interact with the translation machinery. **PLOS ONE**, v. 6, n. 7, 2011.
- MANNING-CELA, R.; CORTÉS, A.; GONZÁLEZ-REY, E.; et al. LYT1 protein is required for efficient in vitro infection by *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 6, p. 3916–3923, 2001.
- MANNING-CELA, R.; GONZÁLEZ, A.; SWINDLE, J. Alternative splicing of LYT1 transcripts in *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 8, p. 4726–4728, 2002.
- MARAÑÓN, C.; PUERTA, C.; ALONSO, C.; LÓPEZ, M. C. Control mechanisms of the H2A genes expression in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 92, n. 2, p. 313–324, 1998.
- MARCHINI, F. K.; DE GODOY, L. M. F.; RAMPAZZO, R. C. P.; et al. Profiling the *Trypanosoma cruzi* Phosphoproteome. **PLOS ONE**, v. 6, n. 9, 2011.

- MARCHIORI, P. E.; ALEXANDRE, P. L.; BRITTO, N.; et al. Late Reactivation of Chagas' Disease Presenting in a Recipient as an Expansive Mass Lesion in the Brain after Heart Transplantation of Chagasic Myocardiopathy. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 26, n. 11, p. 1091–1096, 2007.
- MARIN-NETO, J. A.; CUNHA-NETO, E.; MACIEL, B. C.; SIMÕES, M. V. Pathogenesis of Chronic Chagas Heart Disease. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1109–1123, 2007.
- MARIN-NETO, J. A.; RASSI, A. Update on Chagas heart disease on the first centenary of its discovery. **Revista Espanola de Cardiologia**, v. 62, n. 11, p. 1211–1216, 2009.
- MARIS, C.; DOMINGUEZ, C.; ALLAIN, F. H.-T. The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. **FEBS Journal**, v. 272, n. 9, p. 2118–2131, 2005.
- 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.; NGUYEN, D.; STUART, K.; MYLER, P. J. Transcription initiation and termination on *Leishmania major* chromosome 3. **Eukaryotic Cell**, v. 3, n. 2, p. 506–517, 2004.
- 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, 2010.
- MARTÍNEZ-CALVILLO, S.; YAN, S.; NGUYEN, D.; et al. Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. **Molecular Cell**, v. 11, n. 5, p. 1291–1299, 2003.
- MATRANGOLO, F. S. V.; LIARTE, D. B.; ANDRADE, L. C.; et al. Comparative proteomic analysis of antimony-resistant and susceptible *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* chagasi lines. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 190, n. 2, p. 63–75, 2013.
- MATTHEWS, K. R.; TSCHUDI, C.; ULLU, E. A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. **Genes & Development**, v. 8, n. 4, p. 491–501, 1994.
- MAYHO, M.; FENN, K.; CRADDY, P.; CROSTHWAITE, S.; MATTHEWS, K. Post-transcriptional control of nuclear-encoded cytochrome oxidase subunits in *Trypanosoma brucei*: evidence for genome-wide conservation of life-cycle stage-specific regulatory elements. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 18, p. 5312–5324, 2006.
- MAYNARD, A. T.; COVELL, D. G. Reactivity of zinc finger cores: Analysis of protein packing and electrostatic screening. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 6, p. 1047–1058, 2001.
- MCWILLIAM, H.; LI, W.; ULUDAG, M.; et al. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. 597–600, 2013.

MEDINA-ACOSTA, E.; CROSS, G. A. M. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple “mini-prep” procedure. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 59, n. 2, p. 327–329, 1993.

MICHAELI, S. Trans-splicing in trypanosomes: Machinery and its impact on the parasite transcriptome. **Future Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 459–474, 2011.

MINIA, I.; CLAYTON, C. Regulating a Post-Transcriptional Regulator: Protein Phosphorylation, Degradation and Translational Blockage in Control of the Trypanosome Stress-Response RNA-Binding Protein ZC3H11. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 3, 2016.

MINNING, T. A.; WEATHERLY, D. B.; ATWOOD, J.; ORLANDO, R.; TARLETON, R. L. The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. **BMC Genomics**, v. 10, n. 307, 2009.

MITTAL, N.; ROY, N.; BABU, M. M.; CHANDRA, S. Dissecting the expression dynamics of RNA-binding proteins in posttranscriptional regulatory networks. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 48, p. 20300–20305, 2009.

MITTAL, N.; SCHERRER, T.; GERBER, A. P.; JANGA, S. C. Interplay between posttranscriptional and posttranslational interactions of RNA-binding proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 409, n. 3, p. 466–479, 2011.

MONY, B. M.; MACGREGOR, P.; IVENS, A.; et al. Genome-wide dissection of the quorum sensing signalling pathway in *Trypanosoma brucei*. **Nature**, v. 505, n. 7485, p. 681–685, 2014.

MÖRKING, P. A.; DALLAGIOVANNA, B. M.; FOTI, L.; et al. TcZFP1: A CCCH zinc finger protein of *Trypanosoma cruzi* that binds poly-C oligoribonucleotides in vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 319, n. 1, p. 169–177, 2004.

MÖRKING, P. A.; RAMPAZZO, R. DE C. P.; WALRAD, P.; et al. The zinc finger protein TcZFP2 binds target mRNAs enriched during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 6, p. 790–799, 2012.

MORRIS, J. C.; WANG, Z.; DREW, M. E.; ENGLUND, P. T. Glycolysis modulates trypanosome glycoprotein expression as revealed by an RNAi library. **EMBO Journal**, v. 21, n. 17, p. 4429–4438, 2002.

MUGO, E.; CLAYTON, C. Expression of the RNA-binding protein RBP10 promotes the bloodstream-form differentiation state in *Trypanosoma brucei*. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 8, 2017.

MUGO, E.; EGLER, F.; CLAYTON, C. Conversion of procyclic-form *Trypanosoma brucei* to the bloodstream form by transient expression of RBP10. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 216, p. 49–51, 2017.

MUHICH, M. L.; BOOTHROYD, J. C. Polycistronic transcripts in trypanosomes and their accumulation during heat shock: evidence for a precursor role in mRNA synthesis. **Molecular and Cellular Biology**, v. 8, n. 9, p. 3837–3846, 1988.

- MUÑOZ, J.; PRAT, J. G. I; GÁLLEGO, M.; et al. Clinical profile of *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic setting: Immigration and Chagas disease in Barcelona (Spain). **Acta Tropica**, v. 111, n. 1, p. 51–55, 2009.
- NAGAI, K.; OUBRIDGE, C.; JESSEN, T. H.; LI, J.; EVANS, P. R. Crystal structure of the RNA-binding domain of the U1 small nuclear ribonucleoprotein A. **Nature**, v. 348, n. 6301, p. 515–520, 1990.
- NAGULESWARAN, A.; GUNASEKERA, K.; SCHIMANSKI, B.; et al. *Trypanosoma brucei* RRM1 is a Nuclear RNA-Binding Protein and Modulator of Chromatin Structure. **mBio**, v. 6, n. 2, 2015.
- NEELAMRAJU, Y.; GONZALEZ-PEREZ, A.; BHAT-NAKSHATRI, P.; NAKSHATRI, H.; JANGA, S. C. Mutational landscape of RNA-binding proteins in human cancers. **RNA biology**, v. 15, n. 1, p. 115–129, 2018.
- NEPOMUCENO-SILVA, J. L.; YOKOYAMA, K.; DE MELLO, L. D. B.; et al. TcRho1, a farnesylated Rho family homologue from *Trypanosoma cruzi*. Cloning, trans-splicing, and prenylation studies. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 32, p. 29711–29718, 2001.
- NETT, I. R. E.; MARTIN, D. M. A.; MIRANDA-SAAVEDRA, D.; et al. The Phosphoproteome of Bloodstream Form *Trypanosoma brucei*, Causative Agent of African Sleeping Sickness. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 8, n. 7, p. 1527–1538, 2009.
- NEWBURY, S. F.; MÜHLEMANN, O.; STOECKLIN, G. Turnover in the Alps: An mRNA perspective. **EMBO Reports**, v. 7, n. 2, p. 143–148, 2006.
- NGO, H.; TSCHUDI, C.; GULL, K.; ULLU, E. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 25, p. 14687–14692, 1998.
- NILSEN, T. W. Trans-splicing in protozoa and helminths. **Infectious Agents and Disease**, v. 1, n. 4, p. 212–218, 1992.
- NILSSON, D.; GUNASEKERA, K.; MANI, J.; et al. Spliced leader trapping reveals widespread alternative splicing patterns in the highly dynamic transcriptome of *Trypanosoma brucei*. **PLOS Pathogens**, v. 6, n. 8, 2010.
- NÓBREGA, A. A.; GARCIA, M. H.; TATTO, E.; et al. Oral Transmission of Chagas Disease by Consumption of Açaí Palm Fruit, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 653–655, 2009.
- NOCUA, P. A.; RAMIREZ, C. A.; REQUENA, J. M.; PUERTA, C. J. *Leishmania braziliensis* SCD6 and RBP42 proteins, two factors with RNA binding capacity. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, 2017.
- NOÉ, G.; DE GAUDENZI, J. G.; FRASCH, A. C. Functionally related transcripts have common RNA motifs for specific RNA-binding proteins in trypanosomes. **BMC Molecular Biology**, v. 9, 2008.

NOWICKI, M. J.; CHINCHILLA, C.; CORADO, L.; et al. Prevalence of antibodies to *Trypanosoma cruzi* among solid organ donors in Southern California: A population at risk. **Transplantation**, v. 81, n. 3, p. 477–479, 2006.

OATES, M. E.; STAHLHACHE, J.; VAVOULIS, D. V.; et al. The SUPERFAMILY 1.75 database in 2014: A doubling of data. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 1, p. 227–233, 2015.

OGANESYAN, N.; ANKOUDINOVA, I.; KIM, S.-H.; KIM, R. Effect of osmotic stress and heat shock in recombinant protein overexpression and crystallization. **Protein Expression and Purification**, v. 52, n. 2, p. 280–285, 2007.

OLIVEIRA, C.; CARVALHO, P. C.; ALVES, L. R.; GOLDENBERG, S. The Role of the *Trypanosoma cruzi* TcNRBD1 Protein in Translation. **PLOS ONE**, v. 11, n. 10, 2016.

OLIVEIRA, C.; FAORO, H.; ALVES, L. R.; et al. RNA-binding proteins and their role in the regulation of gene expression in *Trypanosoma cruzi* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 40, n. 1, p. 22–30, 2017.

PARODI-TALICE, A.; MONTEIRO-GOES, V.; ARRAMBIDE, N.; et al. Proteomic analysis of metacyclic trypomastigotes undergoing *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 42, n. 11, p. 1422–1432, 2007.

PARREIRAS, L. S.; KOHN, L. M.; ANDERSON, J. B. Cellular effects and epistasis among three determinants of adaptation in experimental populations of *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 10, p. 1348–1356, 2011.

OUELLETTE, M.; PAPADOPOULOU, B. Coordinated gene expression by post-transcriptional regulons in African trypanosomes. **Journal of Biology**, v. 8, n. 11, 2009.

OUNA, B. A.; STEWART, M.; HELBIG, C.; CLAYTON, C. The *Trypanosoma brucei* CCCH zinc finger proteins ZC3H12 and ZC3H13. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 183, n. 2, p. 184–188, 2012.

PACHECO-LUGO, L.; DÍAZ-OLMOS, Y.; SÁENZ-GARCÍA, J.; PROBST, C. M.; DAROCHA, W. D. Effective gene delivery to *Trypanosoma cruzi* epimastigotes through nucleofection. **Parasitology International**, v. 66, n. 3, 2017.

PAIS, F. S.; DAROCHA, W. D.; ALMEIDA, R. M.; et al. Molecular characterization of ribonucleoproteic antigens containing repeated amino acid sequences from *Trypanosoma cruzi*. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 7, p. 716–725, 2008.

PARODI, A. J.; POLLEVICK, G. D.; MAUTNER, M.; et al. Identification of the gene(s) coding for the trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi*. **The EMBO Journal**, v. 11, n. 5, p. 1705–1710, 1992.

PATEROU, A.; WALRAD, P.; CRADDY, P.; FENN, K.; MATTHEWS, K. Identification and stage-specific association with the translational apparatus of TbZFP3, a CCCH protein that promotes trypanosome life-cycle development. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 51, p. 39002–39013, 2006.

PATTERSON, S.; WYLLIE, S. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 6, p. 289–298, 2014.

PAVANI, R. S.; DA SILVA, M. S.; FERNANDES, C. A. H.; et al. Replication Protein A Presents Canonical Functions and Is Also Involved in the Differentiation Capacity of *Trypanosoma cruzi*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 12, 2016.

PEARSON, W. R. Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. **Methods in Enzymology**, v. 183, p. 63–98, 1990.

PEARSON, W. R. Searching protein sequence libraries: Comparison of the sensitivity and selectivity of the Smith Waterman and FASTA algorithms. **Genomics**, v. 11, p. 635–650, 1991.

PEARSON, W. R.; LIPMAN, D. J. Improved tools for biological sequence comparison. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 8, p. 2444–2448, 1988.

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.

PÉREZ-DÍAZ, L.; CORREA, A.; MORETÃO, M. P.; et al. The overexpression of the trypanosomatid-exclusive TcRBP19 RNA-binding protein affects cellular infection by *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 8, p. 1076–1079, 2012.

PÉREZ-DÍAZ, L.; DUHAGON, M. A.; SMIRCICH, P.; et al. *Trypanosoma cruzi*: Molecular characterization of an RNA binding protein differentially expressed in the parasite life cycle. **Experimental Parasitology**, v. 117, n. 1, p. 99–105, 2007.

PÉREZ-DÍAZ, L.; PASTRO, L.; SMIRCICH, P.; DALLAGIOVANNA, B.; GARAT, B. Evidence for a negative feedback control mediated by the 3' untranslated region assuring the low expression level of the RNA binding protein TcRBP19 in *T. cruzi* epimastigotes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 436, n. 2, p. 295–299, 2013.

PÉREZ-DÍAZ, L.; SILVA, T. C.; TEIXEIRA, S. M. R. Involvement of an RNA binding protein containing Alba domain in the stage-specific regulation of beta-amastin expression in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 211, p. 1–8, 2017.

PIACENZA, L.; IRIGOÍN, F.; ALVAREZ, M. N.; et al. Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression. **Biochemical Journal**, v. 403, n. 2, p. 323–334, 2007.

PORATH, J.; CARLSSON, J.; OLSSON, I.; BELFRAGE, G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. **Nature**, v. 258, n. 5536, p. 598–599, 1975.

PREÜBER, C.; JAÉ, N.; BINDEREIF, A. mRNA splicing in trypanosomes. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 302, n. 4–5, p. 221–224, 2012.

PY, M. O. Neurologic Manifestations of Chagas Disease. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 11, n. 6, p. 536–542, 2011.

QUEIROZ, R.; BENZ, C.; FELLEBERG, K.; HOHEISEL, J. D.; CLAYTON, C. Transcriptome analysis of differentiating *trypanosomes* reveals the existence of multiple post-transcriptional regulons. **BMC Genomics**, v. 10, n. 495, 2009.

QUINTAL, S. M.; DEPAULA, Q. A.; FARRELL, N. P. Zinc finger proteins as templates for metal ion exchange and ligand reactivity. Chemical and biological consequences. **Metallomics**, v. 3, n. 2, p. 121–139, 2011.

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

REDMAN, M.; KING, A.; WATSON, C.; KING, D. What is CRISPR/Cas9? **Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition**, v. 101, n. 4, p. 213–215, 2016.

REDMOND, S.; VADIVELU, J.; FIELD, M. C. RNAi: An automated web-based tool for the selection of RNAi targets in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 128, n. 1, p. 115–118, 2003.

REINA-SAN-MARTÍN, B.; DEGRAVE, W.; ROUGEOT, C.; et al. A B-cell mitogen from a pathogenic trypanosome is a eukaryotic proline racemase. **Nature Medicine**, v. 6, n. 8, p. 890–897, 2000.

REIJNS, M. A. M.; ALEXANDER, R. D.; SPILLER, M. P.; BEGGS, J. D. A role for Q/N-rich aggregation-prone regions in P-body localization. **Journal of Cell Science**, v. 121, n. 15, p. 2463–2472, 2008.

RESPUELA, P.; FERELLA, M.; RADA-IGLESIAS, A.; ÅSLUND, L. Histone Acetylation and Methylation at Sites Initiating Divergent Polycistronic Transcription in *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 23, p. 15884–15892, 2008.

RICE, P.; LONGDEN, L.; BLEASBY, A. EMBOS: The European Molecular Biology Open Software Suite. **Trends in Genetics**, v. 16, n. 6, p. 276–277, 2000.

RICO, E.; JEACOCK, L.; KOVÁŘOVÁ, J.; HORN, D. Inducible high-efficiency CRISPR-Cas9-targeted gene editing and precision base editing in African trypanosomes. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018.

ROBERTS, A. J.; FAIRLAMB, A. H. The N-myristoylome of *Trypanosoma cruzi*. **Scientific reports**, v. 6, 2016.

ROMANIUK, M. A.; FRASCH, A. C.; CASSOLA, A. Translational repression by an RNA-binding protein promotes differentiation to infective forms in *Trypanosoma cruzi*. **PLOS Pathogens** v. 14, n.6, 2018.

ROMERO, P.; OBRADOVIC, Z.; DUNKER, A. K. Natively disordered proteins: functions and predictions. **Applied Bioinformatics**, v. 3, n. 2–3, p. 105–113, 2004.

- ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Rare codon content affects the solubility of recombinant proteins in a codon bias-adjusted *Escherichia coli* strain. **Microbial Cell Factories**, v. 8, p. 1–9, 2009.
- ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1–17, 2014.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- SANDER, J. D.; JOUNG, J. K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 347–355, 2014.
- SCHERRER, T.; MITTAL, N.; JANGA, S. C.; GERBER, A. P. A Screen for RNA-Binding Proteins in Yeast Indicates Dual Functions for Many Enzymes. **PLOS ONE**, v. 5, n. 11, 2010.
- SCHIENE, K.; DONATH, S.; BRECHT, M.; PÜHLER, A.; NIEHAUS, K. A Rab-related small GTP binding protein is predominantly expressed in root nodules of *Medicago sativa*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 272, n. 1, p. 57–66, 2004.
- SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 14–21, 2010.
- SCHUMANN BURKARD, G.; KÄSER, S.; DE ARAÚJO, P. R.; et al. Nucleolar proteins regulate stage-specific gene expression and ribosomal RNA maturation in *Trypanosoma brucei*. **Molecular Microbiology**, v. 88, n. 4, p. 827–840, 2013.
- SCHÜRCH, N.; HEHL, A.; VASSELLA, E.; BRAUN, R.; RODITI, I. Accurate polyadenylation of procyclin mRNAs in *Trypanosoma brucei* is determined by pyrimidine-rich elements in the intergenic regions. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14, n. 6, p. 3668–3675, 1994.
- SCHWEDE, A.; ELLIS, L.; LUTHER, J.; et al. A role for Caf1 in mRNA deadenylation and decay in trypanosomes and human cells. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 10, p. 3374–3388, 2008.
- SHAH, T. D.; HICKEY, M. C.; CAPASSO, K. E.; PALENCHAR, J. B. The characterization of a unique *Trypanosoma brucei* β -hydroxybutyrate dehydrogenase. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 179, n. 2, p. 100–106, 2011.
- SHAPIRO, T. A.; ENGLUND, P. T. The Structure and Replication of Kinetoplast DNA. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 117–143, 1995.
- SHI, H.; BUTLER, K.; TSCHUDI, C. A single-point mutation in the RNA-binding protein 6 generates *Trypanosoma brucei* metacyclics that are able to progress to bloodstream forms in vitro. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 224, p. 50–56, 2018.
- SHI, Y.; BEGER, R. D.; BERG, J. M. Metal binding properties of single amino acid deletion mutants of zinc finger peptides: studies using cobalt(II) as a spectroscopic probe. **Biophysical Journal**, v. 64, n. 3, p. 749–753, 1993.

SIEGEL, T. N.; GUNASEKERA, K.; CROSS, G. A. M.; OCHSENREITER, T. Gene expression in *Trypanosoma brucei*: lessons from high-throughput RNA sequencing. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 10, p. 434–441, 2011.

SIEGEL, T. N.; HEKSTRA, D. R.; KEMP, L. E.; et al. Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*. **Genes and Development**, v. 23, n. 9, p. 1063–1076, 2009.

SIEGEL, T. N.; HEKSTRA, D. R.; WANG, X.; DEWELL, S.; CROSS, G. A. M. Genome-wide analysis of mRNA abundance in two life-cycle stages of *Trypanosoma brucei* and identification of splicing and polyadenylation sites. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 15, p. 4946–4957, 2010.

SIEGEL, T. N.; TAN, K. S. W.; CROSS, G. A. M. Systematic Study of Sequence Motifs for RNA trans Splicing in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 21, p. 9586–9594, 2005.

SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D.; et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, v. 7, n. 539, 2011.

SILLITOE, I.; LEWIS, T. E.; CUFF, A.; et al. CATH: Comprehensive structural and functional annotations for genome sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 1, p. 376–381, 2015.

SINGH, A.; MINIA, I.; DROLL, D.; et al. Trypanosome MKT1 and the RNA-binding protein ZC3H11: Interactions and potential roles in post-transcriptional regulatory networks. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 7, p. 4652–4668, 2014.

SMIALOWSKI, P.; DOOSE, G.; TORKLER, P.; KAUFMANN, S.; FRISHMAN, D. PROSO II - A new method for protein solubility prediction. **FEBS Journal**, v. 279, n. 12, p. 2192–2200, 2012.

SMIRCICH, P.; EASTMAN, G.; BISPO, S.; et al. Ribosome profiling reveals translation control as a key mechanism generating differential gene expression in *Trypanosoma cruzi*. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1–14, 2015.

SMITH, D. B.; DAVERN, K. M.; BOARD, P. G.; et al. Mr 26,000 antigen of *Schistosoma japonicum* recognized by resistant WEHI 129/J mice is a parasite glutathione S-transferase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 22, p. 8703–8707, 1986.

SMITH, D. B.; JOHNSON, K. S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. **Gene**, v. 67, n. 1, p. 31–40, 1988.

SOARES MEDEIROS, L. C.; SOUTH, L.; PENG, D.; BUSTAMANTE, J. M.; et al. Rapid, Selection-Free, High-Efficiency Genome Editing in Protozoan Parasites Using CRISPR/Cas9 Ribonucleoproteins. **mBio**, v. 8, n. 6, 2017.

SOARES, M. J.; SOUTO-PADRÓN, T.; BONALDO, M. C.; GOLDENBERG, S.; DE SOUZA, W. A stereological study of the differentiation process in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, v. 75, n. 7, p. 522–527, 1989.

SOUZA, F. S. P. DE; RAMPAZZO, R. DE C. P.; MANHAES, L.; et al. Knockout of the gene encoding the kinetoplast-associated protein 3 (KAP3) in *Trypanosoma cruzi*: Effect on kinetoplast organization, cell proliferation and differentiation. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 172, n. 2, p. 90–98, 2010.

DE SOUZA, M. A. A simple method to purify biologically and antigenically preserved bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* using DEAE-cellulose columns. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 78, n. 3, p. 317–333, 1983.

DE SOUZA, W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **International Review of Cytology**, v. 86, p. 197–283, 1984.

STERN, M. Z.; GUPTA, S. K.; SALMON-DIVON, M.; et al. Multiple roles for polypyrimidine tract binding (PTB) proteins in trypanosome RNA metabolism. **RNA**, v. 15, n. 4, p. 648–665, 2009.

SUBOTA, I.; ROTUREAU, B.; BLISNICK, T.; et al. ALBA proteins are stage regulated during trypanosome development in the tsetse fly and participate in differentiation. **Molecular Biology of the Cell**, v. 22, n. 22, p. 4205–4219, 2011.

SUBRAMANIAM, C.; VEAZEY, P.; REDMOND, S.; et al. Chromosome-wide analysis of gene function by RNA interference in the African trypanosome. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 9, p. 1539–1549, 2006.

SUNTER, J.; WICKSTEAD, B.; GULL, K.; CARRINGTON, M. A new generation of T7 RNA polymerase-independent inducible expression plasmids for *Trypanosoma brucei*. **PloS ONE**, v. 7, n. 4, 2012.

TADAUCHI, T.; INADA, T.; MATSUMOTO, K.; IRIE, K. Posttranscriptional regulation of HO expression by the Mkt1-Pbp1 complex. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 9, p. 3670–3681, 2004.

TAYLOR, M. C.; KELLY, J. M. pTcINDEX: A stable tetracycline-regulated expression vector for *Trypanosoma cruzi*. **BMC Biotechnology**, v. 6, p. 1–18, 2006.

TEIXEIRA, A. R. L.; GOMES, C.; LOZZI, S. P.; et al. Environment, interactions between *Trypanosoma cruzi* and its host, and health. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. 1, 2009.

TEIXEIRA, A. R. L.; TEIXEIRA, G.; MACÊDO, V.; PRATA, A. Acquired Cell-Mediated Immunodepression in Acute Chagas' Disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 62, n. 6, p. 1132–1141, 1978.

TEIXEIRA, D.; SHETH, U.; VALENCIA-SANCHEZ, M. A.; BRENGUES, M.; PARKER, R. Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. **RNA**, v. 11, n. 4, p. 371–382, 2005.

TEIXEIRA, S. M.; 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. 20509–20516, 1994.

TENENBAUM, S. A.; CARSON, C. C.; LAGER, P. J.; KEENE, J. D. Identifying mRNA subsets in messenger ribonucleoprotein complexes by using cDNA arrays. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 26, p. 14085–90, 2000.

TENENBAUM, S. A.; CHRISTIANSEN, J.; NIELSEN, H. The Post-transcriptional Operon. **Methods in Molecular Biology**, v. 70, p. 237–245, 2011.

THIELGES, M. C.; CHUNG, J. K.; AXUP, J. Y.; FAYER, M. D. Influence of histidine tag attachment on picosecond protein dynamics. **Biochemistry**, v. 50, n. 25, p. 5799–5805, 2011.

TIBBETTS, R. S. R.; KLEIN, K. G. K.; ENGMAN, D. D. M. A rapid method for protein localization in trypanosomes. **Experimental Parasitology**, v. 80, n. 3, p. 572–574, 1995.

TOWBIN, H.; STAEGELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 9, p. 4350–4354, 1979.

TSCHUDI, C.; ULLU, E. Polygene transcripts are precursors to calmodulin mRNAs in trypanosomes. **The EMBO Journal**, v. 7, n. 2, p. 455–463, 1988.

TSVETANOVA, N. G.; KLASS, D. M.; SALZMAN, J.; BROWN, P. O. Proteome-Wide Search Reveals Unexpected RNA-Binding Proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLOS ONE**, v. 5, n. 9, 2010.

TYLER-CROSS, R. E.; SHORT, S. L.; FLOETER-WINTER, L. M.; BUCK, G. A. Transient expression mediated by the *Trypanosoma cruzi* rRNA promoter. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 72, n. 1–2, p. 23–31, 1995.

ULBERT, S.; CROSS, M.; BOORSTEIN, R. J.; TEEBOR, G. W.; BORST, P. Expression of the human DNA glycosylase hSMUG1 in *Trypanosoma brucei* causes DNA damage and interferes with J biosynthesis. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 18, p. 3919–2396, 2002.

ULLU, E.; DJIKENG, A.; SHI, H.; TSCHUDI, C. RNA interference: Advances and questions. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 357, n. 1417, p. 65–70, 2002.

ULLU, E.; MATTHEWS, T AND, 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.

UMAER, K.; WILLIAMS, N. Kinetoplastid Specific RNA-Protein Interactions in *Trypanosoma cruzi* Ribosome Biogenesis. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, 2015.

VALENCIANO, A. L.; RAMSEY, A. C.; SANTOS, W. L.; MACKEY, Z. B. Discovery and antiparasitic activity of AZ960 as a *Trypanosoma brucei* ERK8 inhibitor. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 19, p. 4647–4651, 2016.

VANHAMME, L.; PAYS, E. Control of gene expression in trypanosomes. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 2, p. 223–240, 1995.

VAN DAN BURG, B.; DIJKSTRA, B. W.; VRIEND, G.; et al. Protein stabilization by hydrophobic interactions at the surface. **European Journal of Biochemistry**, v. 220, n. 3, p. 981–985, 1994.

VAN DER LEE, R.; BULJAN, M.; LANG, B.; et al. Classification of intrinsically disordered regions and proteins. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 13, p. 6589–631, 2014.

VAN DER OOST, J.; JORE, M. M.; WESTRA, E. R.; LUNDGREN, M.; BROUNS, S. J. J. CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 34, n. 8, p. 401–407, 2009.

VAN DER OOST, J.; WESTRA, E. R.; JACKSON, R. N.; WIEDENHEFT, B. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR–Cas systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 7, p. 479–492, 2014.

VARANI, G.; NAGAI, K. Rna Recognition By Rnp Proteins During Rna Processing. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 27, n. 1, p. 407–445, 1998.

VASSELLA, E.; DEN ABEELE, J. VAN; BÜ, P.; et al. A major surface glycoprotein of *Trypanosoma brucei* is expressed transiently during development and can be regulated post-transcriptionally by glycerol or hypoxia. **Genes & Development**, v. 14, n. 5, p. 615–626, 2000.

VASSELLA, E.; BRAUN, R.; RODITI, I. Control of polyadenylation and alternative splicing of transcripts from adjacent genes in a procyclin expression site: a dual role for polypyrimidine tracts in trypanosomes? **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 8, p. 1359–1364, 1994.

VASSELLA, E.; PROBST, M.; SCHNEIDER, A.; et al. Expression of a Major Surface Protein of *Trypanosoma brucei* Insect Forms Is Controlled by the Activity of Mitochondrial Enzymes. **Molecular Biology of the Cell**, v. 15, p. 3986–3993, 2004.

VÁZQUEZ, M.; ATORRASAGASTI, C.; BERCOVICH, N.; VOLCOVICH, R.; LEVIN, M. J. Unique features of the *Trypanosoma cruzi* U2AF35 splicing factor. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 128, n. 1, p. 77–81, 2003.

VAZQUEZ, M. P.; LEVIN, M. J. Functional analysis of the intergenic regions of TcP2β gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. **Gene**, v. 239, n. 2, p. 217–225, 1999.

VAZQUEZ, M. P.; MUALEM, D.; BERCOVICH, N.; et al. Functional characterization and protein-protein interactions of trypanosome splicing factors U2AF35, U2AF65 and SF1. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 164, n. 2, p. 137–146, 2009.

- VAZQUEZ, M. P.; SCHIJMAN, A. G.; LEVIN, M. J. A short interspersed repetitive element provides a new 3' acceptor site for trans-splicing in certain ribosomal P2 β protein genes of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 64, n. 2, p. 327–336, 1994.
- VELASCO, A.; MORILLO, C. A. Chagas heart disease: A contemporary review. **Journal of Nuclear Cardiology**, 2018.
- WALRAD, P. B.; CAPEWELL, P.; FENN, K.; MATTHEWS, K. R. The post-transcriptional trans-acting regulator, TbZFP3, co-ordinates transmission-stage enriched mRNAs in *Trypanosoma brucei*. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 7, p. 2869–2883, 2012.
- WALRAD, P.; PATEROU, A.; ACOSTA-SERRANO, A.; MATTHEWS, K. R. Differential trypanosome surface coat regulation by a CCCH protein that co-associates with procyclin mRNA cis-elements. **PLOS Pathogens**, v. 5, n. 2, p. 1–10, 2009.
- WANG, M.; OGÉ, L.; PEREZ-GARCIA, M.-D.; et al. The PUF Protein Family: Overview on PUF RNA Targets, Biological Functions, and Post Transcriptional Regulation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, 2018.
- WANG, X.; ZAMORE, P. D.; HALL, T. M. T. Crystal Structure of a Pumilio Homology Domain. **Molecular Cell**, v. 7, n. 4, p. 855–865, 2001.
- WANG, Z.; MORRIS, J. C.; DREW, M. E.; ENGLUND, P. T. Inhibition of *Trypanosoma brucei* gene expression by RNA interference using an integratable vector with opposing T7 promoters. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 51, p. 40174–40179, 2000.
- WATERHOUSE, A. M.; PROCTER, J. B.; MARTIN, D. M. A.; CLAMP, M.; BARTON, G. J. Jalview Version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1189–1191, 2009.
- WEATHERLY, D. B.; BOEHLKE, C.; TARLETON, R. L. Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi* genome. **BMC Genomics**, v. 10, p. 1–13, 2009.
- WEBB, J. R.; MCMASTER, W. R. Molecular cloning and expression of a *Leishmania major* gene encoding a single-stranded DNA-binding protein containing nine “CCHC” zinc finger motifs. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 19, p. 13994–14002, 1993.
- WEBB, J. R.; MCMASTER, W. R. *Leishmania major* HEXBP deletion mutants generated by double targeted gene replacement. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 63, n. 2, p. 231–242, 1994.
- WEN, L. M.; XU, P.; BENEGAL, G.; et al. *Trypanosoma cruzi*: Exogenously regulated gene expression. **Experimental Parasitology**, v. 97, n. 4, p. 196–204, 2001.
- WHO. World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis); Disponível em: <<https://www.who.int/chagas/disease/en/>>. Acesso em: 14 out. 2018.
- WICKNER, R. B. MKT1, A nonessential *Saccharomyces cerevisiae* gene with a temperature-dependent effect on replication of M2 double-stranded RNA. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 11, p. 4941–4945, 1987.

WILKINSON, S. R.; MEYER, D. J.; TAYLOR, M. C.; et al. The *Trypanosoma cruzi* enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 19, p. 17062–17071, 2002.

WIPPEL, H. H.; INOUE, A. H.; VIDAL, N. M.; et al. Assessing the partners of the RBP9-mRNP complex in *Trypanosoma cruzi* using shotgun proteomics and RNA-seq. **RNA Biology**, v. 15, n. 8, p. 1106–1118, 2018.

WIRTZ, E.; CLAYTON, C. Inducible Gene Expression in Trypanosomes Mediated by a Prokaryotic Repressor. **Science**, v. 268, n. 5214, p. 1179–1183, 1995.

WIRTZ, E.; HARTMANN, C.; CLAYTON, C. Gene expression mediated by bacteriophage T3 and T7 RNA polymerases in transgenic trypanosomes. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 19, p. 3887–3894, 1994.

WIRTZ, E.; HOEK, M.; CROSS, G. A. M. Regulated processive transcription of chromatin by T7 RNA polymerase in *Trypanosoma brucei*. **Nucleic Acids Research**, v. 26, n. 20, p. 4626–4634, 1998.

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

WITKIEWICZ-KUCHARCZYK, A.; BAL, W. Damage of zinc fingers in DNA repair proteins, a novel molecular mechanism in carcinogenesis. **Toxicology Letters**, v. 162, n. 1, p. 29–42, 2006.

WOLFE, S. A.; NEKLUDOVA, L.; PABO, C. O. DNA Recognition by Cys₂His₂ Zinc Finger Proteins. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 29, n. 1, p. 183–212, 2000.

WORTHEY, E. A.; SCHNAUFER, A.; MIAN, I. S.; STUART, K.; SALAVATI, R. Comparative analysis of editosome proteins in trypanosomatids. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 22, p. 6392–408, 2003.

WU, C. H. PIRSF: family classification system at the Protein Information Resource. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 90001, p. 112–114, 2004.

WURST, M.; ROBLES, A.; PO, J.; et al. An RNAi screen of the RRM-domain proteins of *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 163, n. 1, p. 61–65, 2009.

WURST, M.; SELIGER, B.; JHA, B. A.; et al. Expression of the RNA recognition motif protein RBP10 promotes a bloodstream-form transcript pattern in *Trypanosoma brucei*. **Molecular Microbiology**, v. 83, n. 5, p. 1048–1063, 2012.

XU, D.; PÉREZ BRANDÁN, C.; BASOMBRÍO, M. A.; TARLETON, R. L. Evaluation of high efficiency gene knockout strategies for *Trypanosoma cruzi*. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 1–10, 2009.

YANG, X.; FIGUEIREDO, L. M.; ESPINAL, A.; OKUBO, E.; LI, B. RAP1 Is Essential for Silencing Telomeric Variant Surface Glycoprotein Genes in *Trypanosoma brucei*. **Cell**, v. 137, n. 1, p. 99–109, 2009.

YAO, C.; LUO, J.; HSIAO, C.-H. C.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. *Leishmania chagasi*: A tetracycline-inducible cell line driven by T7 RNA polymerase. **Experimental Parasitology**, v. 116, n. 3, p. 205–213, 2007.

ZAMORE, P. D.; WILLIAMSON, J. R.; LEHMANN, R. The Pumilio protein binds RNA through a conserved domain that defines a new class of RNA-binding proteins. **RNA**, v. 3, n. 12, p. 1421–33, 1997.

ZDOBNOV, E. M.; TEGENFELDT, F.; KUZNETSOV, D.; et al. OrthoDB v9.1: Cataloging evolutionary and functional annotations for animal, fungal, plant, archaeal, bacterial and viral orthologs. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 1, p. 744–749, 2017.

ZHANG, B.; GALLEGOS, M.; PUOTI, A.; et al. A conserved RNA-binding protein that regulates sexual fates in the *C. elegans* hermaphrodite germ line. **Nature**, v. 390, n. 6659, p. 477–484, 1997.

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