

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIOCIÊNCIAS**

Laís Eiko Yamanaka

**CARACTERIZAÇÃO DA DICER-LIKE 2 (*TrDCL2*) DE
*Trypanosoma rangeli***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientadores:

Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard

Prof^a. Dr^a. Patrícia Hermes Stoco

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Yamanaka, Laís
CARACTERIZAÇÃO DA DICER-LIKE 2 (TrDCL2) DE *Trypanosoma rangeli* / Laís Yamanaka ; orientador, Edmundo Grisard ; coorientadora, Patricia Stoco. - Florianópolis, SC, 2016.
106 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. DICER-LIKE 2. 3. RNA de interferência. 4. *Trypanosoma rangeli*. I. Grisard, Edmundo. II. Stoco, Patricia. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências
CEP: 88040-900 - Florianópolis - SC - Telefone: (48) 3721-2713

Ata de sessão de defesa de Dissertação de Mestrado de Laís Eiko Yamanaka

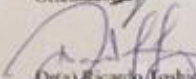
Aos dois dias(s) do mês de Março de 2016, às 08:30h, na sala MIP 008, realizou-se a sessão de apresentação e defesa da Dissertação de Laís Eiko Yamanaka, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Biociências, da Universidade Federal de Santa Catarina. A Comissão Examinadora, consoante a Portaria nº 08/PPGBTC/2016, esteve constituída pelos membros Doutores Ricardo Toshio Fujiwara (Universidade Federal de Minas Gerais), Daniel Santos Mansur (Universidade Federal de Santa Catarina), Guilherme de Toledo e Silva (Universidade Federal de Santa Catarina) como membros titulares, e Thais Cristine Marques Sincero (Universidade Federal de Santa Catarina) como membro(s) suplente(s). A Dissertação apresentada teve o seguinte título: "Caracterização da DICER-LIKE 2 de *Trypanosoma rangeli*". Após a exposição do trabalho pelo(a) candidato(a), o(a) mesmo(a) foi arguido(a) pelos membros da Comissão Examinadora e coube ao(a) candidato(a) responder aos questionamentos da Comissão. Laís Eiko Yamanaka foi considerado(a) Aprovada. A Comissão Examinadora solicitou as seguintes alterações na Dissertação:

Aguardar as recomendações da banca

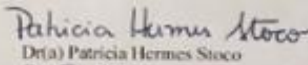
O (A) aluno(a) terá até 60 (sessenta) dias, a partir da presente data, para fazer as alterações solicitadas pela Comissão Examinadora e entregar as cópias corrigidas da Dissertação à Biblioteca Universitária (UFSC) e secretaria do Programa. Caso não haja alteração, o prazo é de 30 (trinta) dias. **O não cumprimento deste prazo acarretará em consequências legais de acordo com a legislação vigente nesta Universidade.**


Após o encerramento da sessão, eu, Dr(a) Edmundo Carlos Grisard lavrei a presente ata que, se aprovada, vai assinada pelos demais membros da Comissão Examinadora e pelo(a) Mestrando(a), Florianópolis, 02 de Março de 2016.

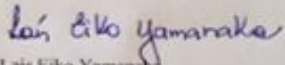

Dr(a) Edmundo Carlos Grisard
Orientador(a)


Dr(a) Ricardo Toshio Fujiwara


Dr(a) Guilherme de Toledo e Silva


Dr(a) Patricia Hermes Steco
Coorientador(a)


Dr(a) Daniel Santos Mansur


Laís Eiko Yamanaka
Mestrando(a)

AGRADECIMENTOS

À minha família, meus pais, Eiji e Maria, e ao meu irmão Leonardo por todo o carinho, suporte e incentivo que sempre me deram. Obrigada por apoiar as minhas escolhas e por sempre estarem ao meu lado.

Ao meu orientador, prof. Dr. Edmundo C. Grisard, ou melhor, ao meu querido chefe por abrir as portas do Laboratório de Protozoologia, onde tive a oportunidade de dar meus primeiros passos na carreira. Obrigada pelos ensinamentos científicos e principalmente pela paciência que teve comigo durante todos esses anos. Além de ter sido um ótimo orientador científico, também me ensinou muito sobre a vida, por isso, agradeço pelas inúmeras broncas e pelos vários consolos.

À minha orientadora Pati pela paciência de me orientar e por passar todo o seu conhecimento e experiência. Mais que uma orientadora, ela foi acima de tudo uma amiga em que pude confiar e que me ensinou a ser uma pessoa melhor. Obrigada por ter sentado comigo na bancada para me ensinar um experimento e obrigada por sentar comigo na mesa de um bar para uma conversa amiga.

À Milene que conviveu intensamente comigo durante todo o mestrado e foi quem me ajudou a desenvolver um pensamento mais crítico sobre o meu trabalho, pois sempre estávamos discutindo os protocolos e resultados. Agradeço pela amizade sincera que construímos, pela companhia no laboratório e nos almoços.

Aos meus colegas de laboratório, Laryssa, Greicy, Ana N., Ana G., Carine, Ingrid, Vagner, Tatiane, Lucas, Natália, Thais e Bruno que sempre estiveram dispostos a me ajudar, sem dúvida todos colaboraram muito com este trabalho. Em especial, agradeço à Carime que passou comigo por tantos momentos importantes e difíceis, formamos uma forte parceria durante todos esses anos e nem sei como agradecer por toda ajuda e cuidados que sempre teve comigo.

À minha amiga Débora que por muito tempo eu adotei como orientadora e que teve uma participação fundamental no meu

aprendizado laboratorial, obrigada por me aturar todos esses anos e pela amizade pura e sincera.

Ao pessoal do LAMEB, Vanessa, Bibiana, Denis e principalmente à Camille que me ajudou com o sequenciamento das minhas amostras.

Aos profs. Mário, Carlos, Glauber, André P. e André B. pelas conversas de corredor de caráter científico ou sobre questionamentos da vida e pelos momentos de descontração durante o cafezinho.

À banca avaliadora deste trabalho, pela disposição e aceite do convite.

Aos órgãos de fomento à pesquisa CNPq, CAPES e FINEP pelo incentivo financeiro.

RESUMO

O mecanismo de RNA de interferência (RNAi) é um sistema pós-transcricional de silenciamento gênico com ampla distribuição nos organismos eucariotos. Os pequenos RNA (siRNA e miRNA) são considerados moléculas chaves nesse mecanismo, os quais são gerados pela proteína Dicer. A presença desse sistema parece não seguir um padrão de distribuição filogenético e a sua evolução ainda não foi compreendida. Entre os protozoários, o mecanismo de RNAi está muito bem caracterizado em *Trypanosoma brucei*, entretanto é ausente em *Trypanosoma cruzi* e em muitas espécies de *Leishmania*. O *Trypanosoma rangeli* não possui vários componentes da maquinaria de RNAi, tornando-a não funcional. Entretanto, o gene que codifica para a Dicer- *Like2* (DCL2) foi encontrado completo em seu genoma, enquanto os demais genes codificantes para as outras proteínas da maquinaria estão truncados (pseudogenes). No presente estudo realizamos a caracterização do gene DCL2 de *T. rangeli* (*TrDCL2*), o qual apresentou-se como cópia única no genoma do parasito, possuindo uma janela aberta de leitura com 2.667 pb que codifica para uma proteína de 889 aminoácidos (± 100 kDa). Foram reveladas diferenças nas sequências aminoácídicas da *TrDCL2* entre as cepas KP1(+) e KP1(-) de *T. rangeli* e devido uma mudança na fase de leitura não é possível identificar os domínios RNase III nas cepas KP1(-). O gene *TrDCL2* é transcrito nas cepas KP1(+), sendo que os níveis de mRNA não apresentam alterações significativas durante o processo de diferenciação celular *in vitro* do parasito. Visando a avaliação da atividade enzimática e análise da presença e níveis proteicos, realizamos a expressão heteróloga de dois fragmentos e da proteína *TrDCL2* inteira. Um dos fragmentos foi utilizado para a produção de um antissoro policlonal anti-*TrDCL2*. Este antissoro reconheceu uma proteína do tamanho esperado (± 100 kDa) nos extratos proteicos totais das formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli*. Os ensaios de imunofluorescência indireta, utilizando o mesmo antissoro, revelaram uma distribuição difusa da proteína pelo citoplasma de ambas as formas do parasito. A *TrDCL2* é expressa em algumas cepas do *T. rangeli*, entretanto a determinação do seu papel biológico neste parasito ainda permanece a ser elucidada.

Palavras-chave: DICER-*LIKE2*, RNA de interferência,
Trypanosoma rangeli.

ABSTRACT

The interference RNA mechanism (RNAi) is a system of post-transcriptional gene silencing with wide distribution in the eukaryotes. Small RNA (siRNA e miRNA) are considered key molecules in this mechanism, which are generated by Dicer protein. The presence of this system seems not follow a pattern of phylogenetic distribution and its evolution is still not understood. Between trypanosomatids, the RNAi mechanism is well described in *Trypanosoma brucei*, but is absent in *Trypanosoma cruzi* and some *Leishmania* species. *Trypanosoma rangeli* does not have many components of RNAi machinery, making it not functional. However, the Dicer-Like2 (DCL2) coding gene was fully encountered in its genome, while the other genes of this machinery are truncated (pseudogenes). In the present study, we have realized the characterization of DCL2 gene of *T. rangeli* (*TrDCL2*), which presented a single copy in the parasite genome, having an open reading frame with 2.667 bp that encodes a protein with 889 amino acids (± 100 kDa). Differences in aminoacidic sequences were revealed between strains KP1(+) and KP1(-) of *T. rangeli* and due to a change in the reading phase it was not possible to identify RNAse III domains in the KP1(-) strains. *TrDCL2* gene is transcribed in the KP1(+), the mRNA levels do not show significant alterations during the process of cellular differentiation *in vitro*. Aiming the evaluation of the enzymatic activity and the analysis of the presence of the protein and its levels, we realized the heterologous expression of two fragments and the whole protein *TrDCL2*. One of the fragments was used to produce a polyclonal antiserum anti-*TrDCL2*. This antiserum recognized a protein with the expected size (± 100 kDa) in the total protein extracts of the epimastigotes and trypomastigotes of *T. rangeli*. Immunofluorescence assays, using the same antiserum, revealed a diffuse distribution of the protein in the cytoplasm in both forms of the parasite. The *TrDCL2* is expressed in some strains of *T. rangeli*, but the determination of its biological role in this parasite still needs to be elucidated.

Keywords: DICER-LIKE2, RNA interference, *Trypanosoma rangeli*

LISTA DE ABREVIATURAS

BLAST- do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*

cm - centímetro

Da - Dalton

DAPI - 4'-6'-diamidino-2-fenilindol

DMEM - do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

dNTP - desoxinucleotídeo trifosfatado (do inglês *Deoxynucleotide Triphosphate*)

DO - densidade óptica

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

g - força da gravidade

g - grama

G-418 - Geneticin

IPTG - isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo

kDa - kilodalton

LB - Meio Luria-Bertani

LIT – Meio de cultura de infusão de fígado (do inglês *Liver Infusion Tryptose*)

M - molar

mA - miliampere

mg - miligrama

ml - mililitro

mM - milimolar

ng - nanograma

nm - nanômetro

NP-40 - Nonidet 40 nonil fenoxi polietoxietanol

nt - nucleotídeo

°C - graus Celsius

ORF - do inglês *Open reading frame* (janela aberta de leitura)

pb - pares de bases

PBS - tampão salina fosfato

PCR - reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)

pH - potencial hidrogeniônico

pmol - picomol

SBF - soro bovino fetal

SOC - do inglês *Super Optimal broth with Catabolite repression*
SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante (do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

U - unidade

W - Watt

X-gal - 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

μ g - micrograma

μ l - microlitro

μ m - micrometro

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Distribuição geográfica da doença de Chagas e registros de ocorrência do *Trypanosoma rangeli*.** Mapa das Américas Central e do Sul, mostrando a sobreposição geográfica da doença de Chagas humana (sombreado) e dos registros de ocorrência comprovada do *T. rangeli* em humanos, triatomíneos ou animais silvestres (pontos) (GRISARD; STEINDEL, 2005).....17
- Figura 2:** Representação das regiões conservadas nos minicírculos de *Trypanosoma rangeli* caracterizando KP1, KP2 e KP3. Fonte: Adaptado de Vallejo et al. (2002).....17
- Figura 3: Representação esquemática do ciclo biológico do *Trypanosoma rangeli* no hospedeiro invertebrado.** A infecção do triatomíneo ocorre pela ingestão de formas tripomastigotas sanguíneas durante o repasto (A), sendo as formas tripomastigotas e epimastigotas predominantes no intestino médio (B). Formas epimastigotas curtas se dividem no intestino médio e podem invadir a hemocele (C), onde se dividem de forma livre como epimastigotas longos. Alguns parasitos podem invadir hemócitos (D), sendo desconhecida a capacidade de multiplicação no interior desta célula. As formas epimastigotas longas aderem e penetram na glândula salivar (E) diferenciando-se em seu interior em tripomastigotas metacíclicos (F) infectantes que são inoculados com a saliva durante o repasto sanguíneo. Fonte: (STOCO et al., 2014).....19
- Figura 4. Árvore filogenética dos tripanosomatídeos representando a retenção ou a perda da função da maquinaria de RNAi.** Símbolos + ou - indicam a pressuposta presença e/ou a perda de maquinaria de RNAi durante a evolução e em vermelho são as espécies sem a maquinaria de RNAi (LYE et al., 2010).....23
- Figura 5.** Representação do mecanismo de RNAi em *Trypanosoma brucei*. As enzimas Dicer-like (DCL2 ou DCL1) realizam o processamento de longos RNA dupla fita (dsRNA) derivados de transcritos de retrotransposons e sequências repetitivas em siRNA dupla fita no núcleo e no citoplasma, respectivamente. A proteína Argonauta (AGO1) degrada uma das fitas do siRNA e realiza modificações para formar o

complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). Adaptado de Kolev (2011).....24

Figura 6. Classificação das enzimas RNase III em relação à sua composição estrutural. Classe I contém ortólogos de RNase III de bactérias e fungos e a classe II contém as proteínas Dicer e Drosha. Estão destacados os domínios e suas organizações nas proteínas da família RNase III (JASKIEWICZ; FILIPOWICZ, 2008).....27

Figura 7. Representação esquemática da estratégia de sequenciamento do gene *TrDCL2*. A barra azul representa o quadro aberto de leitura do gene *TrDCL2*. As setas amarelas indicam os iniciadores senso e as azuis os iniciadores anti-senso.....34

Figura 8. Representação esquemática do gene *TrDCL2* e dos dois fragmentos escolhidos para a expressão heteróloga em *E. coli*. Barra azul representa a ORF completa de *TrDCL2*, destacando-se os domínios RNase IIIa e RNase IIIb (azul claro), e a barra verde e a laranja representam os fragmentos *TrDCL2-DOM* e *TrDCL2-FRAG*, respectivamente. A tabela mostra os iniciadores utilizados para a amplificação do gene íntegro (*TrDCL2_completo*) e dos fragmentos (*TrDCL2_DOM* e *TrDCL2_FRAG*).....37

Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 1% corada pelo brometo de etídio, revelando os produtos de amplificação via PCR do gene *TrDCL2* das diferentes cepas do *Trypanosoma rangeli*. PPM - Padrão de Peso Molecular (DNA de Fago Lambda digerido com *HindIII*); DNA genômico das cepas de *T. rangeli*: SC-58; SC-61; PIT10; C23; 5048; TRE; B450; R1625; H9; H14; Macias; Palma-2; Choachí; D3493; San Agustín; 1545; CN - Controle Negativo (Sem adição de DNA).....50

Figura 10 - Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos de DCL2 das cepas de *Trypanosoma rangeli* e outros tripanosomatídeos filogeneticamente relacionados. As sequências analisadas foram de *Trypanosoma brucei brucei* (Tbb_Dcl2), *Trypanosoma brucei gambiense* (Tbg_Dcl2), *Trypanosoma congolense* (Tc_Dcl2), *Trypanosoma grayi* (Tg_Dcl2) e as cepas de *T. rangeli* KP1(+) (1545, B450, D3493, H9, H14, Macias, Palma 2, R1625, San Agustín, Choachí) e KP1(-) (SC58, SC61, PIT10). Os aminoácidos em preto são conservados nas sequências e as setas são os resíduos de lisina

(K) e ácido glutâmicos (E) importantes para a atividade catalítica. Retângulo indica família ribonuclease, os aminoácidos em lilás mostram o domínio RNase IIIa (ExxGD) e em verde o domínio RNase IIIb (DxxE).....51

Figura 11. Esquema representando os domínios das proteínas RNase III e suas classes. Destaque em vermelho para a DCL2 de *Trypanosoma rangeli* proposta neste trabalho. Adaptado de Pompey et al. (2015).....54

Figura 12: Árvore filogenética elaborada com as sequências de aminoácidos das DCL2 de diferentes cepas de *Trypanosoma rangeli* e de outros tripanosomatídeos filogeneticamente relacionados gerada através do programa MEGA 6.06[®] pelo método de *Neighbour-joining* com análise por Bootstrap (1000 replicatas).....55

Figura 13. Caracterização da organização genômica do gene DCL2 de *Trypanosoma rangeli* por Southern Blot. (A) Digestão do DNA genômico de *T. rangeli* com as enzimas *Pst*I (789/2.130pb), *Nsi*I (1.835/1.084 pb), *Kpn*I (1.914/1.005 pb) e *Eco*RI (2.919 pb); DNA genômico não digerido. (B) Mapa de restrição do gene identificando os sítios de restrição das enzimas utilizadas e a sonda representada em laranja.....56

Figura 14. Testes da especificidade dos iniciadores F3 / R2 na detecção de transcritos do gene *TrDCL2* de *Trypanosoma rangeli*. (A) Curva de dissociação mostrando a ausência de contaminantes. (B) Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% corado pelo brometo de etídio do produto da reação de qPCR. 1- Padrão molecular 100 pb (Promega), 2- Produto de amplificação obtido com os iniciadores F3/R2.....57

Figura 15: Perfil de abundância de mRNA do gene *TrDCL2* de *Trypanosoma rangeli* durante o processo de diferenciação *in vitro*. A abundância de mRNA foi analisada em formas epimastigotas (T0), intermediárias (T4) e tripomastigotas (T8) de *T. rangeli* durante a diferenciação celular *in vitro* utilizando como referência a média geométrica dos valores de Cq dos genes GAPDH, HPGRT e RNA 60S. Os resultados foram obtidos por ensaio de qPCR e representam a média dos Cq e o desvio padrão do das triplicatas.....58

Figura 16. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídio revelando os produtos de amplificação via PCR do gene da *TrDCL2* em diferentes cepas de *Trypanosoma rangeli* utilizando os iniciadores desenhados

para clonagem direcional do gene em vetores de expressão. PPM- Padrão de Peso Molecular (DNA de Fago lambda digerido pela *HindIII*), CN- Controle negativo da reação (Sem adição de DNA).....59

Figura 17. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio confirmando a presença do gene *TrDCL2* em *Leishmania tarentolae* pós-transfecção via PCR utilizando os iniciadores desenhados para clonagem direcional do gene no vetor de expressão pLEXSY. PPM- Padrão de Peso Molecular (DNA de Fago lambda digerido pela *HindIII*); pLEXSY + DCL2- lisado celular de *L. tarentolae* transfectada com o vetor contendo o gene *TrDCL2*; pLEXSY- lisado celular de *L. tarentolae* transfectada somente com o vetor; CN- Controle negativo da reação (sem adição de DNA).....60

Figura 18. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio confirmando a transcrição do gene *TrDCL2* via PCR da transcrição reversa do RNA total de *Leishmania tarentolae*. PPM- Padrão de Peso Molecular (DNA de Fago lambda digerido pela *HindIII*); 1- RNA total de *L. tarentolae* pós-transfecção; 2- CN- Controle negativo da reação (sem adição de cDNA).....61

Figura 19. Análise de expressão dos fragmentos *TrDCL2*-DOM e *TrDCL2*-FRAG em *Escherichia coli* BL21(DE3) *Codon plus*. **A1 e A2** - Geis de poliacrilamida SDS-PAGE 12 % corado com *Coomassie blue* das frações insolúveis dos lisados de bactéria. **B1 e B2** - *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-His•Tag[®]. Indução da expressão utilizando 1 mM de IPTG em diferentes temperaturas (37, 27 e 15 °C) e tempos (3, 6 e 12 h). PPM- Padrão de peso molecular: *Protein Precision Plus Dual Color* (Bio-Rad).....62

Figura 20. Etapas da purificação do fragmento da proteína *TrDCL2* (*TrDCL2*-FRAG) por cromatografia de afinidade. **A-** Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12 % corado com *Coomassie blue*. **B-** *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-His•Tag[®]. Padrão de peso molecular: *Protein Precision Plus Dual Color* (Bio-Rad) (PM), controle não induzido (CNI); fração total pré purificação (T); fração insolúvel total (I), proteínas que não aderiram à resina (FT), lavagens (L1, L2, L3), eluições (E1, E2, E3, E4, E5, E6).....63

Figura 21. Análise da expressão da proteína recombinante *TrDCL2* em *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS. **A e C-** Géis

de poliacrilamida SDS-PAGE 10% corados com *Coomassie blue* da fração solúvel e insolúvel extrato proteico bacteriano, respectivamente. **B e D-** *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-His•Tag[®]. Indução da expressão heteróloga com 1mM de IPTG em diferentes temperaturas (37, 27 e 15°C) e tempos (3, 6 e 12h). PPM- Padrão de peso molecular *Protein Precision Plus Dual Color* (Bio-Rad); CNI - Controle não induzido.....64

Figura 22. Reconhecimento da proteína TrDCL2 em extrato proteico total da forma epimastigota de *Trypanosoma rangeli* utilizando os antissoros policlonais α -TrDCL2-FRAG. A- Gel SDS-PAGE 10% corado com *Coomassie blue* da fração proteica total (50 μ g) de epimastigota de *T. rangeli*. **B-** *Western blot* utilizando o antissoros 1 e 3, na concentração 1:100. PPM- Padrão de peso molecular: *Protein Precision Plus Dual Color* (Bio-Rad).....65

Figura 23. A proteína TrDCL2 está presente em epimastigotas e tripomastigota de *Trypanosoma rangeli*. *Western blot* utilizando o antissoro α -TrDCL2-FRAG e extratos proteicos totais de: 1) forma tripomastigota da cepa Choachí de *T. rangeli*; 2) forma epimastigota da cepa D3493 de *T. rangeli*; 3) forma epimastigota da cepa SC58; 4) lisado celular de *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS. PPM- Padrão de peso molecular: *Protein Precision Plus Dual Color* (Bio-Rad).....66

Figura 24. Citolocalização da TrDCL2 em formas tripomastigotas e epimastigotas de *Trypanosoma rangeli* por imunofluorescência utilizando o soro policlonal α -TrDCL2-FRAG. 1) As imagens representam micrografias da expressão da TrDCL2 e ; 2) Núcleo e cinetoplasto corados com reagente DAPI e 3) campo claro. As barras de aumento representam 10 μ m.....68

Figura 25. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 15% corado com brometo de etídio evidenciando uma população de pequenos RNA provenientes da separação do extrato de RNA total da cepa Choachí de *T. rangeli*. 1)PPM- Padrão de peso molecular (oligonucleotídeos sintetizados com tamanho conhecido); 2) Extrato de RNA total (300 μ g).....69

Figura 26. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 15% corado com brometo de etídio evidenciando a ligação dos adaptadores aos pequenos RNA.

A - Produto da ligação do adaptador na extremidade 5' nos pequenos RNA; **B** - Produto da ligação do adaptador na extremidade 3' nos pequenos RNA que já continham o adaptador 5'. PPM- Padrão de peso molecular (oligonucleotídeos sintetizados com tamanho conhecido).....70

Figura 27. Eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante 15% corado com brometo de etídio mostrando os cDNA obtidos da transcrição reversa dos pequenos RNA.

PPM- Padrão de peso molecular (oligonucleotídeos sintetizados com tamanho conhecido).....71

Figura 28. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% dos produtos da PCR de colônia para verificar os clones com os siRNA. PPM- Padrão de peso molecular 100pb (promega).....71

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Cepas de *Trypanosoma rangeli* utilizadas no presente estudo, suas classificações quanto à presença ou ausência de minicírculos tipo KP1, seus hospedeiros originais e suas origens de isolamento.....32

Tabela 2. Sequência dos iniciadores para os genes de referência (GAPDH, HGPRT e RNA 60S) e o tamanho dos produtos amplificados por cada par de iniciadores (PRESTES, 2013).....44

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	23
1.1 O <i>Trypanosoma rangeli</i>	23
1.1.1 Descrição e ocorrência	23
1.1.2 Aspectos moleculares do <i>Trypanosoma rangeli</i>	24
1.3 Mecanismo de RNA de interferência (RNAi)	28
1.4 RNAi em tripanosomatídeos	29
1.5 Proteína Dicer.....	33
1.5.1 Classificação e descrição.....	33
1.5.2 Função da Dicer.....	36
2. JUSTIFICATIVA	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 Material biológico e cultivos celulares	41
4.2 Isolamento do DNA total de <i>T. rangeli</i>	42
4.3 Dosagem do DNA	42
4.4 Sequenciamento do gene <i>TrDCL2</i>	43
4.5 Análise das sequências obtidas	44
4.6 Determinação do número de cópias da <i>TrDCL2</i> do genoma através de <i>Southern Blot</i>	45
4.7 Amplificação e clonagem do gene <i>TrDCL2</i>	46
4.8 Expressão <i>in vitro</i> e purificação de DCL2 recombinante	48
4.9 Transfecção dos parasitos	49
4.10 Imunização de camundongos e obtenção de antissoro anti- <i>TrDCL2</i>	50
4.11 Avaliação do antissoro por <i>Western Blot</i>	51
4.12 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR).....	52

4.12.1 Extração de RNA total.....	52
4.12.2 Reação de transcrição reversa (RT-PCR).....	53
4.12.3 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR).....	53
4.12.4 Análise dos resultados e análises estatísticas.....	54
4.13 Imunolocalização por microscopia óptica	55
4.14 Clonagem e identificação dos pequenos RNA.....	56
5. RESULTADOS.....	60
5.1 Análises <i>in silico</i> das sequências do gene DCL2 de <i>T. rangeli</i> (<i>TrDCL2</i>)	60
5.2 Caracterização da organização genômica da <i>TrDCL2</i>	65
5.3 Avaliação dos níveis de transcrição da <i>TrDCL2</i> em formas epimastigotas e tripomastigotas de <i>T. rangeli</i>	66
5.5 Expressão heteróloga da proteína <i>TrDCL2</i> recombinante	70
5.6 Avaliação do antissoro policlonal α - <i>TrDCL2</i> -FRAG	75
5.7 Ensaios de citolocalização dos sítios de expressão da <i>TrDCL2</i> por imunofluorescência.....	76
5.8 Clonagem e identificação dos pequenos RNA.....	79
6. DISCUSSÃO	83
7. CONCLUSÕES.....	90
8. PERSPECTIVAS	92
9. REFERÊNCIAS	93

1. INTRODUÇÃO

1.1 O *Trypanosoma rangeli*

1.1.1 Descrição e ocorrência

O *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* (TEJERA, 1920) é um protozoário hemoflagelado, pertencente à Ordem Kinetoplastida. Este parasito possui ciclo de vida heteroxênico, sendo capaz de infectar insetos triatomíneos, mamíferos silvestres e domésticos, incluindo seres humanos (GRISARD et al., 1999).

A sua distribuição geográfica é sobreposta a do *Trypanosoma cruzi* (Figura 1), agente etiológico da doença de Chagas, e abrange as Américas Central e do Sul. Ao compartilhar hospedeiros invertebrados e mamíferos existem evidências de infecções únicas e mistas nestes hospedeiros (AFCHAIN et al., 1979; GRISARD et al., 1999). Diferentemente do *T. cruzi*, o *T. rangeli* não é considerado patogênico ao hospedeiro mamífero, entretanto, sua infecção incorre em uma série de efeitos patogênicos para seus insetos vetores, em especial do gênero *Rhodnius* nos quais determina dificuldades nos processos de hematofagia e ecdise, que podem levar o inseto à morte (ANEZ; EAST, 1984).

A coexistência do *T. rangeli* e do *T. cruzi* pode, em especial, acarretar em problemas epidemiológicos uma vez que estes parasitos compartilham cerca de 60% da sua constituição antigênica solúvel, o que incorre em uma reatividade sorológica cruzada que pode levar a diagnósticos falso-positivos para a doença de Chagas (AFCHAIN et al., 1979). As consequências deste fato seriam o tratamento desnecessário de pacientes, além de acarretar um elevado custo socioeconômico e determinar estimativas epidemiológicas errôneas.

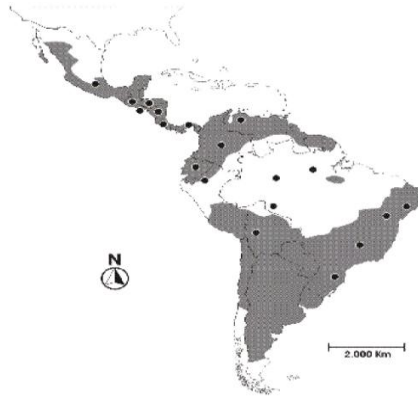


Figura 1. Distribuição geográfica da doença de Chagas e registros de ocorrência do *Trypanosoma rangeli*. Mapa das Américas Central e do Sul, mostrando a sobreposição geográfica da doença de Chagas humana (sombreado) e dos registros de ocorrência comprovada do *T. rangeli* em humanos, triatomíneos ou animais silvestres (pontos) (GRISARD; STEINDEL, 2005).

1.1.2 Aspectos moleculares do *Trypanosoma rangeli*

A principal característica dos parasitos da Ordem Kinetoplastida é a presença de uma mitocôndria única que contém uma região rica em DNA, denominada cinetoplasto (kDNA). O cinetoplasto contém moléculas de DNA dupla-fita circulares denominadas de maxicírculos e de minicírculos, os quais se encontram concatenados e representam cerca de 20-25 % do DNA total da célula (STUART, 1983).

O *T. rangeli* apresenta uma particularidade na organização dos seus minicírculos de kDNA, sendo os mesmos divididos em três classes: KP1, KP2 e KP3 que diferem quanto ao tamanho (1,6 - 1,8 kb) e à sua sequência. Os minicírculos KP1 apresentam apenas um bloco de sequências conservadas (BSC), enquanto os KP2 contêm dois BSC e os KP3 com quatro BSC (VALLEJO et al., 2002) (Figura 2).



Figura 2: Representação das regiões conservadas nos minicírculos de *Trypanosoma rangeli* caracterizando KP1, KP2 e KP3. Fonte: Adaptado de Vallejo et al. (2002).

Estudos com diferentes cepas de *T. rangeli* revelaram um polimorfismo genético constituído pela presença ou ausência do minicírculo tipo KP1. Com base nesta característica foram definidos dois principais grupos genéticos para as cepas de *T. rangeli*. As cepas denominadas KP1(+) são representadas por aquelas que contêm os três tipos de minicírculos (KP1, KP2 e KP3), e as cepas KP1(-) contêm exclusivamente os minicírculos tipos KP2 e KP3 (VALLEJO et al., 2002).

Estudos de Urrea e colaboradores (2005) demonstraram que estes dois grupos genéticos são diretamente correlacionados com as espécies do inseto vetor pelo qual são preferencialmente transmitidos. Os parasitos isolados de *Rhodnius prolixus* eram do grupo KP1(+) e isolados de *R. colombiensis* e *Panstrongylus megistus* eram do grupo KP1(-) sugerindo a ocorrência de um processo de co-evolução do *T. rangeli* com as espécies de vetores nos locais de transmissão das cepas do parasito.

Outros estudos ainda sugerem que possa ter ocorrido uma separação geográfica, pois cepas dos parasitos isoladas de Honduras, da Venezuela, do sudeste do Brasil e da Colômbia são classificadas como KP1(+), enquanto que outras cepas isoladas da Colômbia, do sul do Brasil e do Panamá foram classificadas como sendo do grupo KP1(-) (VALLEJO et al., 2003).

1.1.3 Ciclo de vida

O *T. rangeli* apresenta duas formas biológicas bem definidas durante o seu ciclo de vida, a forma epimastigota proliferativa com 45 a 56 µm de comprimento, e a tripomastigota sanguínea apresentando tamanho variando entre 26 a 34 µm, com uma membrana ondulante bem desenvolvida, além de apresentar um cinetoplasto pontual e subterminal (GUHL; VALLEJO, 2003).

O ciclo biológico do *T. rangeli* inicia quando o inseto vetor ingere as formas tripomastigotas sanguíneas presentes na circulação do hospedeiro mamífero durante o repasto alimentar. No trato digestivo do inseto, os parasitos diferenciam-se em formas epimastigotas que se dividem e, após aderir ao epitélio do intestino médio, atravessam esta barreira e alcançam a hemocele. Uma vez na hemolinfa, as formas epimastigotas multiplicam-se livremente e migram para a glândula salivar do

inseto onde penetram e realizam o processo de metacicloênese, o qual consiste na diferenciação para a forma infectante do parasito, a forma tripomastigota metacíclica (Figura 3) (GRISARD; STEINDEL, 2005).

Ainda que formas tripomastigotas do parasito tenham sido observadas no sangue de humanos e animais domésticos e silvestres, os dados acerca do ciclo de vida no hospedeiro mamífero são escassos, permanecendo controversa a capacidade de multiplicação intracelular do *T. rangeli* (EGER-MANGRICH et al., 2001; MOLYNEUX, 1973; OSORIO et al., 1995; STEINDEL, 1993; TANOURA et al., 1999; URDANETA-MORALES; TEJERO, 1985).

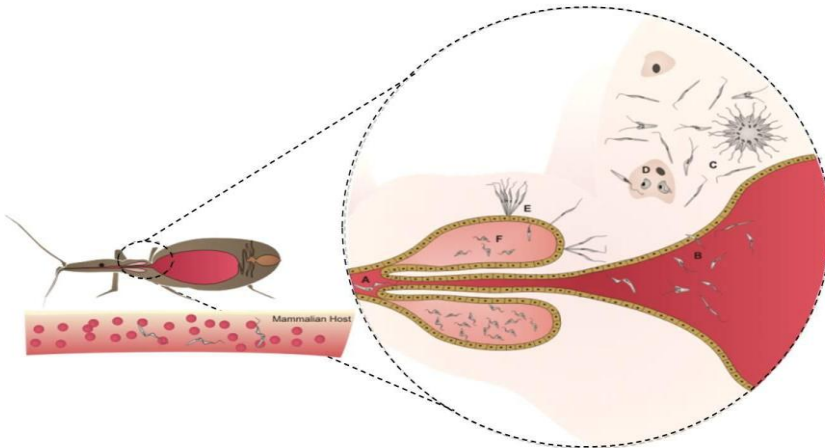


Figura 3: Representação esquemática do ciclo biológico do *Trypanosoma rangeli* no hospedeiro invertebrado. A infecção do triatomíneo ocorre pela ingestão de formas tripomastigotas sanguíneas durante o repasto (A), sendo as formas tripomastigotas e epimastigotas predominantes no intestino médio (B). Formas epimastigotas curtas se dividem no intestino médio e podem invadir a hemocele (C), onde se dividem de forma livre como epimastigotas longos. Alguns parasitos podem invadir hemócitos (D), sendo desconhecida a capacidade de multiplicação no interior desta célula. As formas epimastigotas longas aderem e penetram na glândula salivar (E) diferenciando-se em seu interior em tripomastigotas metacíclicas (F) infectantes que são inoculados com a saliva durante o repasto sanguíneo. Fonte: (STOCO et al., 2014).

Dentre as características próprias do *T. rangeli* que permitem sua diferenciação em relação ao *T. cruzi* destaca-se o seu desenvolvimento no inseto vetor, em especial, a capacidade de invasão da hemocele e o desenvolvimento das formas infectantes dentro das glândulas salivares, possibilitando a transmissão do parasito pela picada, ao invés da transmissão contaminativa (pelas fezes) como ocorre para o *T. cruzi* (MACHADO et al., 2001).

Devido aos seus ciclos biológicos heteroxênicos e complexos, os tripanosomatídeos passam por diversas alterações metabólicas e morfológicas as quais estão relacionadas à ativação ou repressão de importantes vias metabólicas, sendo estas coordenadas por um padrão de expressão gênico distinto.

1.2 Regulação da expressão gênica de tripanosomatídeos

A transcrição gênica nos tripanosomatídeos difere da maioria dos eucariotos, sendo seus genes transcritos em unidades policistrônicas, ou seja, os genes são organizados em conjuntos e ficam distribuídos nos cromossomos em longos grupos policistrônicos ou PTU (*Polycistronic Transcript Units*) (TEIXEIRA, 1998). Essas unidades policistrônicas se assemelham aos operons presentes nos procaríotos, entretanto, não codificam proteínas com funções relacionadas entre si, como ocorre nestes organismos (MARTÍNEZ-CALVILLO et al., 2010).

O processamento dos transcritos é feito por *trans-splicing* e poliadenilação para originar os RNA mensageiros (mRNA) maduros. O *trans-splicing* é o processo de adição de uma sequência extremamente conservada de 39 nucleotídeos denominada sequência líder (*spliced leader*, SL) ou mini-exon na extremidade 5' de cada transcrito. Há evidências de que a SL confere estabilidade ao mRNA, impedindo a sua degradação e auxilia na interação do mRNA maduro com os ribossomos (CAMPBELL; THOMAS; STURM, 2003).

A poliadenilação, que também ocorre nos eucariotos superiores, consiste de um acréscimo na sua extremidade 3' do mRNA de uma sequência composta por cerca de 30 resíduos de adenina (cauda poli-A) (ARAÚJO; TEIXEIRA, 2011; LANDFEAR, 2003). O fato de que genes presentes na mesma unidade

policistrônica apresentam diferentes níveis de mRNA processados, evidencia que a regulação da expressão gênica ocorre em nível pós-transcricional, como por exemplo, na estabilização e processamento do mRNA (CLAYTON, 2002) e na regulação da tradução (SMIRCICH et al., 2015). Deste modo, é possível observar em tripanosomatídeos que a expressão de alguns genes pode manter-se constante ou aumentar, mesmo com a redução na quantidade dos seus transcritos (ABUIN et al., 1999; RECINOS; KIRCHHOFF; DONELSON, 2001).

Um dos mecanismos de controle pós-transcricional é o silenciamento de mRNA mediado por RNA de interferência (RNAi), mecanismo este presente em grande parte dos eucariotos. Este mecanismo está envolvido em vários aspectos da regulação da expressão gênica, notadamente na regulação dos níveis de mRNA (CERUTTI; CASAS-MOLLANO, 2006), sendo de extrema importância tanto para a resposta aos estímulos externos quanto para a manutenção da homeostase do organismo.

1.3 Mecanismo de RNA de interferência (RNAi)

RNAi é um mecanismo de silenciamento gênico mediado por um RNA dupla fita (dsRNA) que desencadeia a degradação de um transcrito (BOSHER; LABOUESSE, 2000; FIRE, 1999; SHARP, 1999). As proteínas desta maquinaria realizam o reconhecimento e a degradação específica dos mRNA de acordo com sua sequência nucleotídica. Dessa maneira, desempenha tanto a função de proteção contra um material genético exógeno formado por RNA dupla fita (vírus e transgenes), quanto de regulação da expressão de genes endógenos, incluindo transposons (HANNON, 2002; ULLU; TSCHUDI; CHAKRABORTY, 2004).

As primeiras observações do silenciamento gênico pós-transcricional mediado por RNAi foram relatados em plantas do gênero *Petúnia* (NAPOLI; LEMIEUX; JORGENSEN, 1990). Entretanto, somente em 1998 o mecanismo de ação do RNAi foi elucidado em estudos com o nematódeo *Caenorhabditis elegans* (FIRE et al., 1998).

Sabe-se hoje que o mecanismo de RNAi é composto minimamente por um conjunto de proteínas: a Dicer, uma RNase do tipo III; e pelo complexo RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*), um conjunto de nucleases cujo componente catalítico é a enzima

Argonauta, sendo que esta enzima é responsável pelo reconhecimento e clivagem do mRNA (HANNON, 2002).

O processo de degradação via o mecanismo de RNAi pode ser dividido em duas fases: i) a fase de iniciação e ii) a fase efetora. Na fase de iniciação, uma longa molécula de RNA dupla fita (dsRNA) é clivada pela enzima Dicer em curtos RNA de 20 a 30 nt, denominados siRNA. Na fase efetora, os siRNA produzidos são ligados ao complexo RISC que os transforma em RNA simples fita (ssRNA). Esse ssRNA servirá então de sequência guia que se ligará aos mRNA de sequência complementar determinando sua clivagem ou a supressão da tradução (RAND et al., 2005).

A descoberta desse mecanismo proporcionou uma poderosa técnica experimental, sendo extremamente versátil na era pós-genômica, pois permite a realização de experimentos de silenciamento pontual de genes ou estudos em larga escala de genômica funcional, permitindo mapear, por exemplo, a inter-relação dos diferentes componentes de vias regulatórias intracelulares (HANNON; ROSSI, 2004).

1.4 RNAi em tripanosomatídeos

Trypanosoma brucei foi o primeiro protozoário para o qual se descreveu o mecanismo de RNAi funcional (NGO et al., 1998). Com a possibilidade de silenciamento gênico via RNAi, este organismo rapidamente tornou-se um modelo de escolha para estudos visando avaliar o efeito da redução da expressão proteica e para estudos da funcionalidade de genes em tripanosomatídeos (ULLU; TSCHUDI; CHAKRABORTY, 2004).

Entretanto, a presença do mecanismo RNAi funcional não segue um padrão de distribuição filogenética entre os tripanosomatídeos (LYE et al., 2010). Evidências sugerem que a ausência desta maquinaria ocorreu, por vezes, de forma independente no decorrer da linhagem eucariótica e ao menos duas vezes na linhagem dos tripanosomatídeos. Um destes eventos de perda do mecanismo de RNAi ocorreu no ramo que leva ao *Trypanosoma cruzi* e o outro após a divergência do subgênero *Viannia*, dentre as espécies de *Leishmania* (Figura 4).

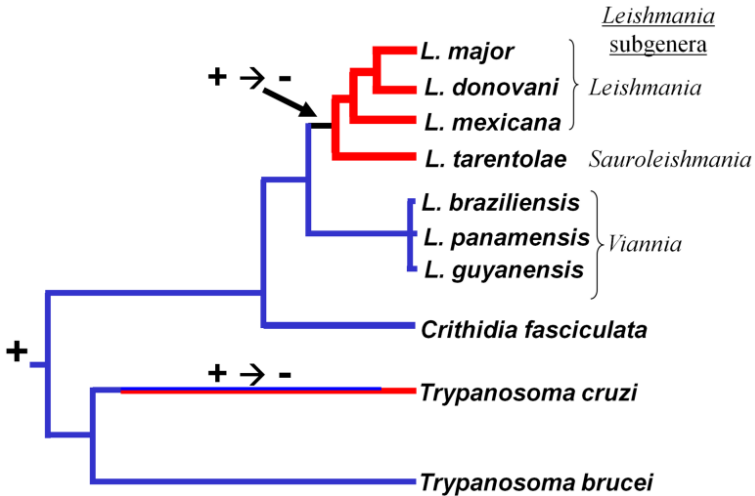


Figura 4. Árvore filogenética dos tripanosomatídeos representando a retenção ou a perda da função da maquinaria de RNAi. Símbolos + ou - indicam a pressuposta presença e/ou a perda de maquinaria de RNAi durante a evolução e em vermelho são as espécies sem a maquinaria de RNAi (LYE et al., 2010).

O mecanismo de RNAi em tripanosomatídeos foi melhor caracterizado em *T. brucei*. Este parasito possui cinco proteínas que participam da via de RNAi: a Argonauta ou AGO1 (*TbAGO1*), a Dicer-like1 (*TbDCL1*), a Dicer-like 2 (*TbDCL2*) e dois fatores de interferência denominados *TbRIF4* e *TbRIF5* (ULLU; TSCHUDI; CHAKRABORTY, 2004).

A isoforma *TbDCL1* localiza-se no citoplasma e é responsável por processar dsRNA exógenos, enquanto que a *TbDCL2* possui uma localização nuclear e processa os dsRNA endógenos, originários principalmente dos retrotransposons, denominados Ingi e SLACS, ou dos transcritos repetidos, CIR147 repeats (*chromosome inteRNAI repeats*) (PATRICK et al., 2009). A abundância de moléculas de siRNA representando esses retrotransposons sugere que RNAi em tripanosomas seja um mecanismo constitutivo (*housekeeping*) para silenciar transcritos codificados por retrotransposons (DIKENG et al., 2001) (Figura 5).

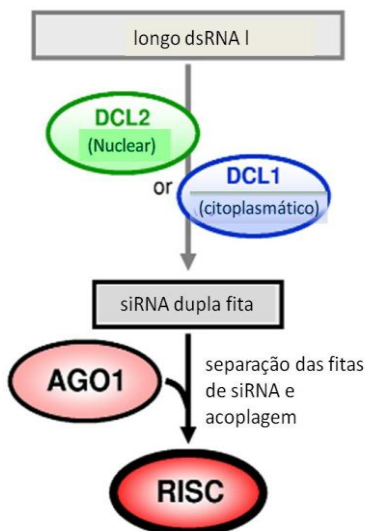


Figura 5. Representação do mecanismo de RNAi em *Trypanosoma brucei*. As enzimas Dicer-like (DCL2 ou DCL1) realizam o processamento de longos RNA dupla fita (dsRNA) derivados de transcritos de retrotransposons e sequências repetitivas em siRNA dupla fita no núcleo e no citoplasma, respectivamente. A proteína Argonauta (AGO1) degrada uma das fitas do siRNA e realiza modificações para formar o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). Adaptado de Kolev (2011).

Em contraste com o *T. brucei*, o *T. cruzi* não possui nenhum dos genes referentes ao mecanismo de RNAi (DAROCHAOTSU et al., 2004). Desta forma, a via clássica de silenciamento por RNAi não existe neste parasito. Todavia, GARCIA-SILVA e colaboradores (2010) demonstraram uma possível rota alternativa de silenciamento gênico associado à proteína AGO/PIWI. Esta é uma proteína semelhante à proteína Argonauta exceto pela ausência do domínio PAZ. Neste parasito foi então demonstrada uma relação da expressão desta proteína com a presença de pequenos RNA derivados de RNA transportadores (tRNA).

Os fragmentos de tRNA podem ser divididos em duas subfamílias de acordo com seu tamanho e biogênese. Um subgrupo é representado por fragmentos de $\pm 28-36$

nucleotídeos (nt) gerados por anticódon nucleases em bactérias, T2 RNase em levedura e por angiogenina em humanos. O segundo subgrupo é composto por fragmentos de RNA de \pm 20-22 nt que são gerados pela Dicer ou RNase Z em eucariotos superiores (HAUSSECKER et al., 2010).

A partir do sequenciamento do genoma do *T. rangeli* (STOCO et al., 2014) foi sugerido que este parasito não possui o mecanismo de RNAi ativo. No *T. rangeli* foram identificados ortólogos aos cinco genes que codificam os componentes da maquinaria de RNAi descrita em *T. brucei*. Entretanto, à exceção da *Dicer-like2* (DCL2), que revelou um padrão de conservação no domínio RNase III, e similaridade ao gene DCL2 de *T. congolense* e *T. brucei*, as demais sequências (AGO, DCL1, RIF4 e RIF5) apareceram como pseudogenes, uma vez que apresentam alterações nas fases de leitura acarretando na presença de códons de parada prematuros. Além destes genes, também foi encontrado no genoma do *T. rangeli* o gene que codifica para a AGO-PIWI, descrito até o momento em todos os tripanosomatídeos.

A funcionalidade da via clássica de silenciamento por RNAi neste parasito foi ainda testada experimentalmente através de duas abordagens: 1) a utilização de dois diferentes siRNA direcionados ao gene eGFP (utilizando parasitos transfectados com o plasmídeo pTEXeGFP) e através da utilização de um plasmídeo que produz um dsRNA de sequência correspondente ao gene da alfa-tubulina. Entretanto, nos dois casos não houve redução nos níveis de mRNA e proteicos das proteínas correspondentes, bem como alteração no fenótipo dos parasitos (STOCO et al., 2014).

Diferentemente da total ausência dos genes da via de RNAi no genoma do *T. cruzi*, o *T. rangeli* mantém 4 pseudogenes e um gene completo que codifica para a DCL2, entretanto a explicação do porquê desta manutenção e de uma possível função desta proteína permanece a ser investigado. Estudos com linhagens de células *knock-out* de *T. brucei* demonstraram que a atividade da DCL2 de gerar pequenos RNA independe da presença das proteínas AGO e DCL1 (BEST et al., 2005). Sendo assim, mesmo não possuindo todas as proteínas necessárias para funcionamento da maquinaria clássica de RNAi, o *T. rangeli* pode possuir a DCL2 ativa, ainda que a sua atividade possa

estar relacionada a uma rota metabólica distinta da via de silenciamento gênico por RNAi.

Apesar do *T. cruzi* não possuir o mecanismo de RNAi, foi descoberta a presença de pequenos RNA derivados de tRNA que apresentam diferentes funções metabólicas neste parasito (GARCIA-SILVA et al., 2010). Isso nos fez questionar sobre a presença dos pequenos RNA em *T. rangeli* e sobre as possíveis vias da sua biossíntese. No caso do *T. cruzi* ainda não se sabe como são produzidos os pequenos RNA derivados de tRNA, entretanto, em *T. rangeli* essa biossíntese poderia estar relacionada com a proteína TrDCL2.

1.5 Proteína Dicer

1.5.1 Classificação e descrição

A Dicer é uma endoribonuclease pertencente à superfamília das enzimas tipo RNase III encontradas em procariotos e eucariotos que apresentam especificidade em degradar RNA dupla fita (dsRNA) (NICHOLSON, 1999).

A classificação das enzimas RNase III proposta por Blasczczyk e colaboradores (2001) divide as enzimas em três classes: a Classe I, que inclui a enzima homóloga Rnt1p de bactérias e de leveduras; a Classe II que compreende as proteínas Drosha; e a Classe III que contém a proteína Dicer. A separação das proteínas Drosha e Dicer em classes distintas foi baseada principalmente pelas diferenças na organização dos domínios das proteínas que eram até então conhecidas.

Com a descoberta de proteínas Dicer ditas “primitivas” em eucariotos unicelulares como *Giardia intestinalis* e *T. brucei* (MACRAEZHOU et al., 2006; SHI; TSCHUDI; ULLU, 2006) foi observado que a complexidade e a organização dos domínios eram distintas, e que estes já não seriam mais critérios distintivos das proteínas Drosha e Dicer. Sendo assim, foi proposta uma nova classificação das enzimas RNase III por Jaskiewicz e Filipowicz (2008), dividindo as mesmas em duas classes: a Classe I compreendendo as enzimas com um único domínio RNase III que formam homodímeros; e a Classe II que alberga as enzimas que contenham dois domínios catalíticos de RNase III e atuam como monômeros.

Em relação à distribuição taxonômica a classe I está presente em bactérias e fungos, que além do único domínio

RNase III possuem o domínio de ligação ao RNA dupla – fita, dsRBD (*double-stranded RNA-Binding Domain*) e a enzima Rnt1p de levedura também tem uma extensão na região N-terminal que parece ser importante na dimerização do domínio RNase III (LAMONTAGNE; TREMBLAY; ABOU ELELA, 2000). A classe II inclui as proteínas Drosha e Dicer, sendo a Dicer encontrada em plantas, metazoários, em alguns protozoários (ATAYDE; TSCHUDI; ULLU, 2011) e helmintos (KRAUTZ-PETERSON; SKELLY, 2008) enquanto que a Drosha está presente apenas em animais (JASKIEWICZ; FILIPOWICZ, 2008).

As proteínas da classe II além de possuírem dois domínios RNase III, apresentam variações em relação à composição dos domínios que envolvem distintas atividades: dsRBD, ATPase/ helicase, PAZ (Piwi/ Argonauta/ Zwillle) e DUF283 (domínio com função desconhecida). A Figura 6 apresenta as variações de organização estrutural das classes I e II de RNase III em diferentes organismos.

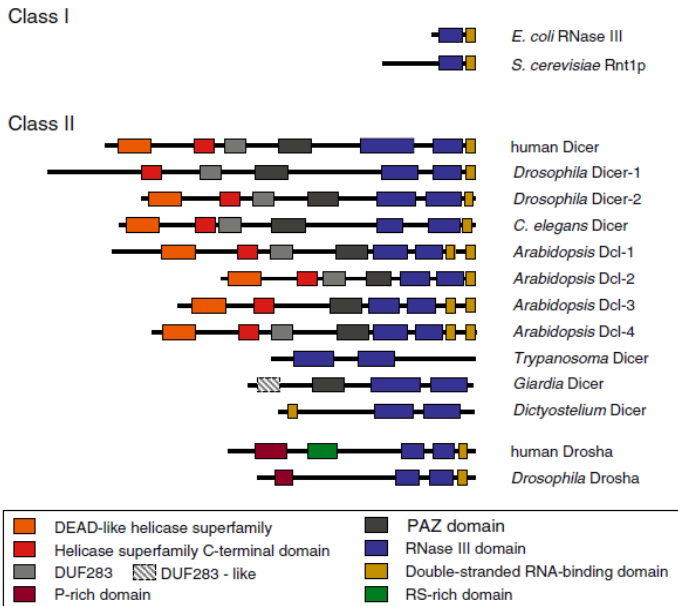


Figura 6. Classificação das enzimas RNase III em relação à sua composição estrutural. Classe I contém ortólogos de RNase III de bactérias e fungos e a classe II contém as proteínas Dicer e Drosha. Estão destacados os domínios e suas organizações nas proteínas da família RNase III (JASKIEWICZ; FILIPOWICZ, 2008).

Nessa figura pode-se observar que a Dicer possui múltiplos domínios na maioria dos eucariotos superiores, sendo que os eucariotos inferiores possuem uma organização estrutural menos complexa. Os domínios PAZ, dsRBD e RNase III estão envolvidos na interação e na clivagem do dsRNA. O domínio helicase/ATPase da Dicer de *C. elegans* e em uma das duas Dicer de *Drosophila* sp. está relacionado à produção de siRNA quando estimulado por ATP (BERNSTEIN et al., 2001; KETTING et al., 2001). Entretanto, as Dicer de *G. intestinalis*, *Dictyostelium discoideum* e *T. brucei* são desprovidas do domínio ATPase, indicando que o mesmo não é necessário para a sua atividade (MACRAEZHOU et al., 2006; MARTENS et al., 2002; SHI; TSCHUDI; ULLU, 2006).

A ocorrência de isoformas da Dicer é variável, sendo que em mamíferos, *Drosophila* spp., leveduras e nos protozoários *G. lamblia* e *Toxoplasma gondii* apenas uma isoforma é observada, enquanto que *Arabidopsis thaliana* e *T. brucei* quatro e duas isoformas são encontradas respectivamente (ATAYDE; TSCHUDI; ULLU, 2011; PATRICK et al., 2009). Algumas das isoformas da Dicer podem desempenhar funções diferentes, como por exemplo, a Dicer1 de *Drosophila* spp. é essencial no processamento do pré-miRNA enquanto que a Dicer2 é requerida para a produção de siRNA neste organismo (LEE et al., 2004).

A localização subcelular da Dicer difere nos distintos organismos e pode estar relacionado com a função que cada isoforma desempenha. Em plantas, as isoformas DCL1, DCL3 e DCL4 estão localizadas no núcleo o que condiz com as suas funções relacionadas com a manutenção da estabilidade DNA genômico, enquanto isso a DCL2 está localizada no citoplasma e desempenha a função de proteção contra dsRNA exógeno (HIRAGURI et al., 2005). Em *T. brucei* a isoforma *TbDCL2* se encontra no núcleo e é essencial para iniciar o mecanismo de RNAi endógeno, enquanto que a *TbDCL1* é expressa no citoplasma e desempenha uma função de proteção contra RNA exógenos (PATRICK et al., 2009).

1.5.2 Função da Dicer

A proteína Dicer é responsável pelo processamento de dsRNA em pequenos RNA com tamanhos em torno de 20 pb que podem pertencer a duas classes: pequenos RNA de interferência, também chamado de siRNA (do inglês: *small interfering RNAs*) ou micro RNA (miRNA).

Os siRNA são provenientes de longos dsRNA que contêm uma sequência específica complementar a um mRNA que será o alvo a ser clivado pelo mecanismo de RNAi. A segunda classe de pequenos RNA, os miRNA, são gerados pela Dicer a partir de um longo RNA simples fita (ssRNA) que forma um loop mantendo uma estrutura de dupla fita, denominado de pré-miRNA. A função de alguns miRNA atualmente conhecidos tem relação direta com o crescimento e desenvolvimento de diferentes espécies de plantas e animais (ABRAHANTE et al., 2003; LLAVE et al., 2002; PALATNIK et al., 2003).

Os produtos gerados pela Dicer podem ser identificados pela clivagem característica das enzimas do tipo RNase III, as quais geram produtos com um fosfato livre na extremidade 5', uma hidroxila e a extensão de 2 nt não pareados na extremidade 3' (ATAYDE; TSCHUDI; ULLU, 2011).

Além do seu papel específico em clivar o dsRNA, a Dicer também interage diretamente com outras proteínas da maquinaria de RNAi, possuindo papel fundamental no acoplamento dos siRNA na proteína Argonauta, sendo descrito que o domínio PIWI da Argonauta se liga diretamente no domínio RNase da Dicer para transferir os siRNA (LIU et al., 2003).

2. JUSTIFICATIVA

Recentemente foi descrito por nosso grupo de pesquisa a inatividade do mecanismo de RNA de interferência (RNAi) no *T. rangeli* (Stoco et al., 2014). Entretanto, a análise detalhada do genoma do parasito revelou a presença de pseudogenes ortólogos a quatro dos cinco componentes da maquinaria de RNAi clássica descrita em *T. brucei*. O quinto gene apresenta-se completo e corresponde ao gene que codifica para a proteína Dicer-like 2 (DCL2). Entretanto a manutenção dos pseudogenes e a presença da janela aberta de leitura do gene DCL2 em *T. rangeli* nos fez questionar sobre a real existência da proteína e seu possível papel neste parasito.

O fato do *T. rangeli* não possuir o mecanismo de RNAi funcional, não exclui a possibilidade de encontrar neste parasito pequenos RNA com funções regulatórias assim como ocorre em *T. cruzi* (GARCIA-SILVA et al., 2010). A origem desses pequenos RNA em *T. cruzi* ainda é desconhecida, pois nenhum dos genes que codificam proteínas que possuem a função de gerar pequenos RNA como a Dicer, Angiogenina e T2 RNase foram encontrados no seu genoma (GARCIA-SILVA et al., 2010).

Em contrapartida, supomos que a manutenção da DCL2 em *T. rangeli* deve ter relação com a biossíntese de diversos pequenos RNA. Sendo assim, a caracterização molecular e funcional da *T*DCL2 torna-se fundamental para tentarmos elucidar o seu papel.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a conservação do gene *Dicer-like 2* em diferentes cepas do *Trypanosoma rangeli* isoladas de regiões geográficas distintas e analisar a expressão da proteína no parasito.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar e analisar comparativamente a sequência aminoacídica da proteína *TrDCL2* em diferentes cepas de *T. rangeli* isoladas de regiões geográficas distintas e pertencentes aos diferentes grupos genéticos;
- Determinar o número de cópias da *TrDCL2* no genoma do *T. rangeli*;
- Avaliar os níveis de transcritos e proteicos da *TrDCL2* em formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli*;
- Determinar a citolocalização da *TrDCL2* em formas epimastigotas e tripomastigotas do *T. rangeli*;
- Identificar os pequenos RNA existentes neste parasito.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material biológico e cultivos celulares

Foram utilizadas neste estudo formas epimastigotas de *T. rangeli* das cepas descritas na tabela 1. As formas epimastigotas foram cultivadas através de passagens semanais a 27°C em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*), suplementado com 10 % de soro bovino fetal (SBF), 50 unidades/ml de penicilina e 50 µg/ml de estreptomicina.

As formas tripomastigotas da cepa Choachí de *T. rangeli* utilizadas neste trabalho foram obtidas a partir de modificações no protocolo descrito por Koerich et al. (2002). Inicialmente, $1,2 \times 10^8$ formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento em meio LIT foram lavadas duas vezes em PBS (Tampão salina fosfato, pH 7,4) e transferidos para garrafas de cultura celular de 25 cm² sem filtro contendo 15 ml de meio DMEM pH 8,0 (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (1 g/l glicose, 6 mM L-glutamina e 5 % SBF).

O processo de diferenciação foi acompanhado através da quantificação dos tripomastigotas por contagem direta em câmara de Neubauer e da visualização em microscópio óptico após a coloração dos parasitos pelo método de Giemsa. Os tripomastigotas foram coletados após oito dias de cultivo, quando a porcentagem de tripomastigotas foi superior a 95 %.

Tabela 1. Cepas de *Trypanosoma rangeli* utilizadas no presente estudo, incluindo suas classificações quanto à presença ou ausência de minicirculos tipo KP1, a origem geográfica e os hospedeiros dos quais foram isoladas.

Cepas	KP1	Hospedeiro	Origem
SC-58	-	<i>Echimys dasythrix</i>	Brasil
SC-61	-	<i>Echimys dasythrix</i>	Brasil
PIT10	-	<i>Panstrongylus megistus</i>	Brasil
C23	-	<i>Aotus sp.</i>	Colômbia
5048	-	<i>Homo sapiens</i>	Colômbia
TRE	-	ND	Colômbia
B450	+	<i>Rhodnius brethesi</i>	Brasil
R1625	+	<i>Homo sapiens</i>	El Salvador
H9	+	<i>Homo sapiens</i>	Honduras
H14	+	<i>Homo sapiens</i>	Honduras
Macias	+	<i>Homo sapiens</i>	Venezuela
Palma-2	+	<i>Rhodnius prolixus</i>	Venezuela
Choachi	+	<i>Rhodnius prolixus</i>	Colômbia
D3493	+	<i>Rhodnius prolixus</i>	Colômbia
San Agustín	+	<i>Homo sapiens</i>	Colômbia
1545	+	<i>Rhodnius colombiensis</i>	Colômbia

4.2 Isolamento do DNA total de *T. rangeli*

Formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento foram centrifugadas a 3.000 x g e lavadas duas vezes com PBS pH 7,4. Em seguida, ao volume dos parasitos sedimentados foram adicionados cerca de quatro vezes de tampão de lise (100 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8,0, 1 % SDS) acrescido de Proteinase K (100 µg/ml) e mantidos por 12 horas a 37°C. As etapas subsequentes foram realizadas através do método de fenol-clorofórmio, de acordo com protocolo padrão de Sambrook e Russell (2001).

4.3 Dosagem do DNA

As amostras de DNA extraídas foram dosadas e avaliadas quanto à sua pureza através de espectrofotometria nos equipamentos *BioPhotometer*[®] (Eppendorf) e/ou Pico100 (Picodrop), observando-se a absorvância a 260 e a 280 nm, além das relações 260/280 nm e 260/230 nm. As amostras extraídas também foram visualizadas em gel de agarose 1 % corado com

brometo de etídio (1 µg/ml) para comparação com padrões de DNA de concentração conhecida.

4.4 Sequenciamento do gene *TrDCL2*

Inicialmente, o gene *TrDCL2* foi amplificado via PCR a partir do DNA genômico das cepas de *T. rangeli* (Tabela 1), utilizando-se os iniciadores Dcl2_F1 (5'- CAT GCA AGC ACA CAA AGA CC - 3') e Dcl2_R3 (5'- CGA CGC ACA ACC ACA AGA AG -3') em um termociclador *Veriti® Thermal Cycler* (Applied Biosystems®). O produto da amplificação foi visualizado através de resolução por eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio. A banda referente ao gene *TrDCL2* foi excisada do gel e purificada utilizando o kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) e o produto purificado foi dosado através de espectrofotometria no equipamento Pico100 (Picodrop).

Face ao tamanho do gene *TrDCL2* e visando obter um sequenciamento de alta qualidade, as reações foram realizadas utilizando-se iniciadores previamente desenhados que são dirigidos a diferentes posições (Figura 7) dentro no gene, sendo: Dcl2_F1 (5'- CAT GCA AGC ACA CAA AGA CC -3'), Dcl2_F2 (5'- CAG GTG CTG TCA CAG TTT AG -3'), Dcl2_R1 (5'- CCC TCA CAA CGC TCA TAC C -3'), Dcl2_F3 (5'- TGA CCT GGG CGT TGT GTG T -3'), Dcl2_R2 (5'- TGC TCA CAT AGA GCG GAA CA - 3') e Dcl2_R3 (5'- CGA CGC ACA ACC ACA AGA AG -3').

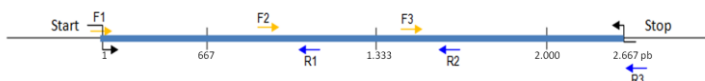


Figura 7. Representação esquemática da estratégia de sequenciamento do gene *TrDCL2*. A barra azul representa o quadro aberto de leitura do gene *TrDCL2*. As setas amarelas indicam os iniciadores senso e as azuis os iniciadores anti-senso.

Após a amplificação e purificação, o sequenciamento do gene *TrDCL2* das diferentes cepas de *T. rangeli*, descritas na tabela 1, foi realizado no equipamento *Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyzer* seguindo-se os protocolos sugeridos pelo fabricante. Resumidamente, foram utilizados na reação de

sequenciamento 5 pmol de um dos seis iniciadores acima descritos (Figura 6) e aproximadamente 200 ng do produto da PCR, sendo a reação efetuada nas seguintes condições térmicas: 95°C por 25 segundos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, ligação dos iniciadores a 55°C por 30 segundos e extensão a 60°C por 80 segundos. Posteriormente, os produtos marcados foram precipitados para retirada dos nucleotídeos e iniciadores não incorporados utilizando 2,5 µl de 125 mM de EDTA e 25 µl de etanol absoluto. Após centrifugação a 2.880 x g por 45 minutos a 20°C os produtos precipitados foram lavados por cinco minutos nas mesmas condições de centrifugação com 150 µl de etanol 70 %. Antes da injeção no sequenciador em condições padrão, os produtos foram eluídos em 10 µl de formamida.

4.5 Análise das sequências obtidas

As sequências geradas foram analisadas quanto à sua qualidade através do pacote *Phred/Phrap/Consed* (<http://www.phrap.org>), utilizando-se um valor mínimo de *Phred* igual a 25. A confirmação da identidade dos fragmentos foi realizada através do programa *BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (ALTSCHUL et al., 1997).

As sequências preditas de aminoácidos a partir das sequências gênicas da *TrDCL2* foram obtidas utilizando-se programa *Translate* do pacote *Expasy* (www.expasy.org), e seus preditos tamanhos moleculares e pontos isoelétricos foram estimados com o programa *ProtParam* (<http://web.expasy.org/protparam/>). Para a análise dos domínios foi utilizado o programa *Conserved Domain Search Service* (CD-Search) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).

As sequências aminoacídicas de *TrDCL2* das distintas cepas do parasito foram comparadas através de alinhamento realizado no programa *ClustalW*, e uma árvore filogenética foi criada utilizando-se os métodos de *Minimal Evolution* e *Neighbour-joining*, com modelo de Poisson e análise por Bootstrap (1000 replicatas) através do programa MEGA, versão MEGA[®] 6.06 (<http://www.megasoftware.net>).

4.6 Determinação do número de cópias da *TrDCL2* do genoma através de ***Southern Blot***

O DNA genômico de *T. rangeli* (20 µg) foi digerido com diferentes enzimas de restrição (*Pst*I, *Nsi*I, *Kpn*I e *Eco*RI) em reações contendo 60 unidades de cada enzima e seus tampões próprios em volume final de 15 µl. As reações foram mantidas a 37°C por três horas e os fragmentos resultantes resolvidos em eletroforese em gel de agarose 0,8 % em tampão TBE a 5 volts/cm. O gel foi então corado com brometo de etídio e os resultados digitalmente registrados.

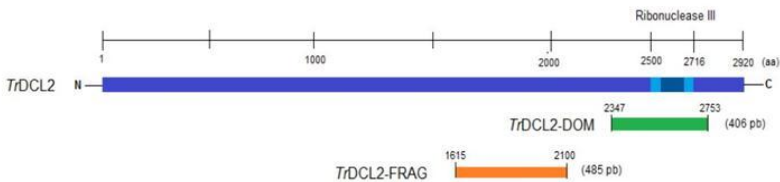
Na sequência, o gel foi imerso em uma solução de depurinação (250 mM HCl) durante 10 minutos sob agitação, lavado uma vez em água ultrapura estéril e em seguida imerso em uma solução de desnaturação (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) durante 25 minutos em temperatura ambiente. O gel foi lavado novamente com água ultrapura estéril e imerso em uma solução de neutralização (1,5 M NaCl; 0,5 M Tris) por 30 minutos sob agitação, sendo este procedimento repetido por mais 15 minutos após troca da solução. A transferência do DNA para a membrana de *Nylon* (Sigma) foi realizada através de capilaridade de acordo com protocolos padrão (SOUTHERN, 1975).

Após a transferência o DNA foi fixado na membrana através de exposição à luz ultravioleta (Energia 1.200 J) em um aparato *UV Cross Linker*® (GE Healthcare) e posteriormente a membrana foi mantida durante uma hora a 42 °C em tampão de hibridização (0,5 M NaCl, 5 % agente bloqueador diluído em *ECL Gold Hybridization Buffer*®) (GE Healthcare). A sonda utilizada correspondente ao gene *TrDCL2* foi obtida através de amplificação via PCR e marcada pelo kit *ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System*® (GE Healthcare) conforme especificações do fabricante. A sonda em tampão de hibridização foi adicionada à membrana e mantida por 16 horas sob agitação suave a 42°C, sendo posteriormente lavadas três vezes com o tampão de lavagem primário (SSC 0,5X, 0,4% SDS, 6M Uréia) por 15 minutos a 42°C e duas vezes com o tampão de lavagem secundário (SSC 2X) por cinco minutos. Em seguida, a detecção dos produtos de hibridização foi realizada através da adição do reagente ECL sobre a membrana e após cinco minutos a mesma foi exposta a um filme radiográfico para a detecção de quimioluminescência, sendo o filme revelado em um processador de filmes SRX 101A (Konica Minolta).

4.7 Amplificação e clonagem do gene *TrDCL2*

A amplificação do gene *TrDCL2* via PCR visando sua clonagem e expressão heteróloga utilizou três abordagens distintas baseadas em diferentes iniciadores e utilizando o DNA genômico da cepa D3493 de *T. rangeli*. Para tanto, utilizando a sequência do gene *TrDCL2* descrito por STOCO et al. (2014) e o programa *Primer Select* (Lasergene®) foram desenhados três pares de iniciadores visando à amplificação da ORF completa de *TrDCL2* (2.682 pb) e de dois fragmentos, sendo um de 406 pb que contém os dois domínios RNase III (RNase IIIa e RNase IIIb) denominado de *TrDCL2-DOM* e um fragmento de 485 pb que não inclui a porção do gene que contém tal domínio denominado de *TrDCL2-FRAG* (Figura 8).

A



Nome do iniciador	Sequência (5' – 3')
<i>TrDCL2_completo</i> F	CAT ATG AAT GTG GGA AAG ATG GC
<i>TrDCL2_completo</i> R	GGA TCC TGA CTA CGT CAC AA CCA CCT
<i>TrDCL2_dom</i> F	CAT ATG GTC GTT GAG CGT GAG TTT ATG
<i>TrDCL2_dom</i> R	GGA TCC CGA CGC CGC TGT AAG GAA TC
<i>TrDCL2_frag</i> F	CAT ATG TAC TTT GAC ATC GAA GCT GCG
<i>TrDCL2_frag</i> R	GGA TCC ATC GCT TTT TCG CTC TCC GAC

Figura 8. Representação esquemática do gene *TrDCL2* e dos dois fragmentos escolhidos para a expressão heteróloga em *E. coli*.

Barra azul representa a ORF completa de *TrDCL2*, destacando-se os domínios RNase IIIa e RNase IIIb (azul claro), e a barra verde e a laranja representam os fragmentos *TrDCL2-DOM* e *TrDCL2-FRAG*, respectivamente. A tabela mostra os iniciadores utilizados para a amplificação do gene íntegro (*TrDCL2_completo*) e dos fragmentos (*TrDCL2_DOM* e *TrDCL2_FRAG*).

As reações de amplificação foram realizadas utilizando-se 50 ng do DNA total da cepa D3493 de *T. rangeli*, 10 pmol de

cada um dos dois iniciadores, 200 μM de dNTP e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) em seu tampão apropriado. Utilizaram-se as seguintes condições térmicas: desnaturação do DNA a 95°C durante cinco minutos seguido de 30 ciclos com as etapas de desnaturação (95°C por 1 minuto), ligação dos iniciadores à sequência alvo (58°C por 50 segundos) e alongamento da cadeia de DNA (72°C por dois minutos para o gene completo e 45 segundos para os fragmentos), sendo a amplificação realizada em um termociclador *Veriti[®] Thermal Cycler* (Applied Biosystems[®]). Os resultados da PCR foram visualizados através de resolução dos produtos por eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio.

Os produtos de amplificação foram diretamente ligados ao plasmídeo *pGEM-T-Easy* (Promega) conforme as instruções do fabricante. Os produtos das reações de ligação foram transformados em *Escherichia coli* DH5- α cálcio-competente. Para tal, o DNA resultante da ligação foi adicionado a um tubo contendo as bactérias competentes e mantido durante 30 minutos em gelo. Após esse tempo, foi realizado um choque térmico a 42°C por 45 segundos seguindo-se uma rápida incubação em gelo por dois minutos. Em seguida foram adicionados 300 μl de meio SOC (2% triptona; 0,5 % extrato de levedura; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM glicose) às células transformadas e o crescimento da cultura foi realizado sob agitação de 250 rpm por 1 hora a 37°C. Decorrido o tempo, as células foram plaqueadas em meio LB-Ágar contendo ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$), X-Gal (20 $\mu\text{g/ml}$) e IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo- 40 $\mu\text{g/ml}$). As placas foram então mantidas a 37°C por 16 horas.

Os clones positivos foram selecionados com base na coloração das colônias (azul/branco). A comprovação da presença dos insertos nos clones recombinantes foi realizada através da amplificação dos fragmentos esperados diretamente da colônia de bactérias, utilizando os iniciadores específicos de cada inserto, descritos na figura 7. Os clones positivos foram inoculados em 10 ml de meio LB com 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina e as culturas foram crescidas sob agitação de 250 rpm a 37°C por 16 horas. Estas culturas bacterianas foram utilizadas para mini-preparações de plasmídeos por lise alcalina (Mini-Prep) conforme descrito por Sambrook e Russel (2001). Posteriormente esses plasmídeos foram sequenciados e a

identidade dos insertos clonados foi confirmada conforme descrito no item 4.5.

4.8 Expressão *in vitro* e purificação de DCL2 recombinante

A ORF completa de *TrDCL2* e os fragmentos (*TrDCL2_DOM* e *TrDCL2_FRAG*) que estavam clonados no plasmídeo *pGEM-T-Easy* foram submetidos à digestão com enzimas de restrição específicas (*Bam*HI e *Nde*I) para a liberação dos insertos, assim como o vetor de expressão pET14b. Devido a semelhança de tamanho entre o inserto referente à ORF completa de *TrDCL2* (± 2.800 pb) e o plasmídeo *pGEM-T-Easy* (3.015 pb) foi necessário a utilização de mais uma enzima de restrição (*Scal*I) a qual possui um único sítio de clivagem dentro do vetor, dessa maneira foi possível diferenciar as bandas no gel de agarose.

Os produtos das digestões foram visualizados através de gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, e as bandas com tamanhos de aproximadamente 2.800 pb, 406 pb e 485 pb referentes aos insertos da ORF completa, *TrDCL2_DOM* e *TrDCL2_FRAG*, respectivamente foram excisadas do gel e purificadas utilizando o kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), de acordo com as especificações do fabricante.

Após a purificação, esses insertos foram sub-clonados no vetor de expressão pET14b (Novagen). A clonagem neste vetor permite a adição de uma cauda de seis histidinas (*His-Tag 6x*), a qual facilita o processo de purificação por cromatografia de afinidade e a identificação por *Western blot*. Os clones contendo os insertos foram transformados em células competentes *E. coli* BL21 (DE3) pLysS para a ORF completa e em *E. coli* BL21 (DE3) Codon plus para os dois fragmentos. Para a expressão heteróloga, uma colônia de cada foi utilizada para um pré-inóculo em 10 ml de meio LB suplementado com 100 μ g/ml de ampicilina e 34 μ g/ml de cloranfenicol, sendo este mantido sob agitação a 37 °C por 16 horas. Uma diluição de 1:100 do pré-inóculo foi realizada em 300 ml do mesmo meio e mantida sob agitação constante a 37 °C até atingir uma densidade óptica (DO) de 0,6. Neste momento, foi adicionado o IPTG na concentração final de 1 mM, prosseguindo-se com diferentes tempos (3, 6 e 12 horas) e temperaturas (15, 27 e 37 °C) de cultivo sob agitação. As

bactérias foram coletadas por centrifugação a 4.000 x g por 10 minutos a 4°C. O sedimento celular foi suspenso em PBS pH 7,4 e submetido à lise por sonicação (*Ultrasonic dismembrator*, FISHER) em gelo, utilizando-se dez pulsos de 30 segundos. Em seguida o lisado foi centrifugado a 14.000 x g por 30 minutos a 4°C, sendo coletado o sobrenadante (fração solúvel) e o sedimento foi suspenso em SDS 10% (fração insolúvel). As frações coletadas foram analisadas quanto à expressão da proteína por gel *SDS-PAGE* 10 %, seguido de *Western blot* utilizando um anticorpo monoclonal contra a cauda de histidina (anti-His•Tag®).

A proteína recombinante *TrDCL2-FRAG*, destinada à produção do antissoro, foi purificada a partir da fração insolúvel por cromatografia de afinidade, usando uma resina de níquel (Ni-NTA, Qiagen) conforme os as instruções do fabricante. Para as lavagens e eluições da proteína foi utilizado o tampão B (100 mM NaH₂PO₄, 8 M Uréia, 10 mM Tris-HCl) em diferentes pH (lavagens: pH 6,0 e eluição: pH 4,0). Uma vez eluída a proteína foi dialisada duas vezes a 4°C em tampão de diálise (100 mM Tris-HCl, pH 8,5; 500 mM NaCl; 0,5 mM EDTA; 20 % glicerol; 5mM DTT), sendo que a última diálise foi realizada no mesmo tampão contendo glicerol 40 %. Posteriormente, a proteína purificada e as etapas de purificação também foram avaliadas por gel *SDS-PAGE* 10 %, e *Western blot* conforme descrito acima.

4.9 Transfecção dos parasitos

Devido à dificuldade encontrada em expressar a proteína *TrDCL2* completa utilizando o sistema bacteriano, nós testamos em paralelo um sistema de expressão heteróloga em um protozoário filogeneticamente relacionado, bem como a expressão homóloga no próprio *T. rangeli*.

Os ensaios de transfecção foram realizados com *Leishmania tarentolae* e com o *T. rangeli* utilizando o vetor pLEXSY2-Neo (Jena Bioscience) contendo o gene *TrDCL2*. Basicamente, 2 x 10⁶ parasitos foram lavados duas vezes em PBS pH 7,4, adicionados de 70 µl do tampão de eletroporação 1X (90 mM NaPO₄ pH 7,3; 5 mM KCl; 50 mM HEPES pH 7,3; 0,15 mM CaCl₂) e foram 10 µl do tampão de eletroporação 3X (270 mM NaPO₄ pH 7,3; 15 mM KCl; 150 mM HEPES pH 7,3;

0,45 mM CaCl₂) utilizando 20 µg do DNA plasmidial. Todo o volume desta suspensão foi transferido para cubetas de eletroporação de 0,2 centímetros (cm) de abertura e submetido à eletroporação no aparelho *Nucleofector*[®] (Lonza) utilizando-se o programa U-33. Após um único pulso, os parasitos foram transferidos para tubos contendo 2 ml de meio LIT 10% SBF. Após 48 horas a 27 °C, as culturas foram acrescidas de G-418 (Geneticin) (Sigma-Aldrich) em uma concentração inicial de 15 µg/ml. Os parasitos foram então mantidos em fase exponencial de crescimento através de repiques semanais em meio LIT 10 % SBF e 50 µg/ml de G-418.

4.10 Imunização de camundongos e obtenção de antissoro anti-*TrDCL2*

Neste trabalho, foram utilizados camundongos BALB/c oriundos do Biotério Setorial do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP/UFSC) da UFSC. Os procedimentos de produção de antissoros policlonais foram realizados na observância dos preceitos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, tendo sido aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais da UFSC (Processo CEUA: 23080.025618/2009-81).

Para a produção de soro policlonal anti-*TrDCL2*, foram imunizados três camundongos machos BALB/c com 50 µg da proteína *TrDCL2*-FRAG purificada e dialisada. Foram realizadas cinco inoculações por via subcutânea com intervalo de 15 dias, sendo que na primeira inoculação a proteína foi emulsificada em adjuvante completo de *Freund* (Sigma-Aldrich) e as demais em Alu-Gel S (hidróxido de alumínio 1,3%) (Sigma-Aldrich). Após a quinta inoculação a resposta imunológica dos camundongos frente à proteína *TrDCL2*-FRAG foi verificada através de ensaio de *Western blot*. O antissoro foi obtido através da coleta de sangue por punção cardíaca dos camundongos previamente anestesiados com Cetamina 10 % / Cloridrato de Xilazina 2 %). O sangue coletado foi refrigerado por 30 minutos para formação de coágulo e, em seguida, centrifugado a 800 x g por 10 minutos para separação do soro, o qual foi alíquotado e armazenado a -80 °C.

4.11 Avaliação do antissoro por *Western Blot*

Para os ensaios de *Western blot* foram utilizados os extratos proteicos totais de formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli* (cepa Choachi), formas promastigotas de *L. tarentolae* e epimastigotas de *T. rangeli* transfetadas com o vetor pLESXY contendo o gene *TrDCL2*, o fragmento proteico *TrDCL2-FRAG* e o lisado de *E. coli* (DE3) pLysS não transformada. Os extratos proteicos foram obtidos através da lise dos parasitos e bactérias em tampão de lise (50 mM NaCl; 200 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 % Triton X-100) aquecido a 100 °C e homogeneizados em vórtex. Em seguida adicionou-se um coquetel de inibidores de proteases (10 mM E-62; 2 mM 1,10-fenantrolina; 4 mM pepstatina A; 1 mM fenilmetilsulfonilfluoreto). As concentrações proteicas foram estimadas pelo método de Bradford (1976).

Os extratos proteicos totais (50 µg) e a proteína recombinante (10 µg) foram aquecidos a 95 °C durante cinco minutos e resolvidos por eletroforese em gel de poliácridamida desnaturante (SDS-PAGE 10%). Após a resolução, as amostras foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond-ECL – GE Healthcare) e a transferência ocorreu em aparato específico contendo tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM glicina; 20% metanol) durante 2 horas a 100 V em gelo.

Após a transferência, a membrana foi bloqueada em solução contendo 5 % de leite desnatado em tampão de “*blotting*” (150 mM de NaCl; 25 mM Tris - HCl pH 7,4; 1 % Tween 20) por 1 hora à temperatura ambiente. Decorrido este tempo, a membrana foi lavada (cinco vezes) durante cinco minutos com o mesmo tampão e mantida por 90 minutos em temperatura ambiente com o antissoro contra o fragmento da proteína *TrDCL2* na diluição 1:150 (v/v) em tampão de “*blotting*” contendo 2% de leite desnatado. Posteriormente, a membrana foi igualmente lavada e mantida durante 60 minutos com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich) na diluição de 1:10.000 (v/v). A membrana foi novamente lavada cinco vezes com tampão de “*blotting*” e adicionada do reagente ECL (GE Healthcare) durante cinco minutos. Em seguida a membrana foi exposta a um filme radiográfico por 20 minutos e o filme foi revelado utilizando o processador automático de filmes SRX 101A (Konica/Minolta).

4.12 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR)

4.12.1 Extração de RNA total

A extração de RNA foi realizada nos tempos 0 (T0 – formas epimastigotas), quarto dia (T4 – formas intermediárias) e oitavo dia (T8 – formas tripomastigotas) da diferenciação celular *in vitro* da cepa Choachí de *T. rangeli*. Os parasitos foram coletados e lavados duas vezes em PBS pH 7,4 (3.000 x g por 10 minutos), sendo imediatamente homogeneizados vigorosamente em 1 ml do reagente Trizol[®] (Invitrogen). As amostras foram armazenadas a -80 °C até o momento do uso.

Após o descongelamento, as amostras foram mantidas por cinco minutos à temperatura ambiente antes da extração do RNA total. Em seguida, adicionou-se 200 µl de clorofórmio 98 % (Merck) às amostras, as quais foram agitadas por 15 segundos, mantidas à temperatura ambiente por dois minutos e, então, centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa resultante foi transferida para um tubo novo, onde foi acrescida de 500 µl de isopropanol (Merck) e novamente submetida à centrifugação a 12.000 x g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1 ml de etanol 75 % gelado, através de centrifugação a 7.500 x g por cinco minutos a 4 °C. Novamente, o sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo o RNA total foi seco, invertendo-se os tubos sobre papel por aproximadamente 10 minutos à temperatura ambiente. O RNA total foi então solubilizado em 20 µl de água ultrapura livre de nucleases. A fim de eliminar qualquer DNA contaminante inadvertidamente purificado durante o processo de extração de RNA, este foi então tratado com DNase I na razão de 1 unidade por µg de RNA extraído durante 15 minutos à temperatura ambiente, na presença de tampão recomendado pelo fabricante. A inativação da enzima ocorreu por adição de EDTA na concentração final de 2,5 mM e aquecimento a 65 °C por 10 minutos. Após este tratamento, as amostras tiveram suas concentrações e purezas avaliadas em um espectrofotômetro BioPhotometer (Eppendorf), observando-se as relações de absorbância 260/280 nm e 260/230 nm, sendo imediatamente armazenado a -80 °C até o uso.

4.12.2 Reação de transcrição reversa (RT-PCR)

A reação de transcrição reversa (RT-PCR) foi conduzida utilizando 1 µg do RNA total a 37 °C por 50 minutos na presença de 200 unidades da enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen), 200 µM de dNTP (Invitrogen), 10 pmoles do iniciador OligodT-Anchor direcionado à cauda poli(A) (5'- GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA CT16 -3'), 10 mM de DTT (Invitrogen) e 40 unidades do inibidor de ribonucleases RNaseOUT™ (Invitrogen), em tampão recomendado pelo fabricante. A inativação da reação ocorreu por 15 minutos a 70 °C, sendo o DNA complementar (cDNA) obtido armazenado a -20 °C até a realização da qPCR.

4.12.3 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR)

Para utilização como molde na qPCR, o cDNA obtido foi diluído cinco vezes em água ultrapura livre de nucleases. As reações foram realizadas em placas de 96 poços AB-C (Axygen) utilizando-se o reagente *Maxima*® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific), 0,3 µM dos iniciadores Dcl2_F3 e Dcl2_R2 (descritos no item 5.6) em um volume final de 10 µl. As mesmas condições de amplificação foram utilizadas para as amplificações dos genes de referência a partir dos iniciadores descritos no trabalho de Prestes (2013) representados na tabela 2.

Tabela 2. Sequência dos iniciadores para os genes de referência (GAPDH, HGPRT e RNA 60S) e o tamanho dos produtos amplificados por cada par de iniciadores (PRESTES, 2013).

Gene	Sequências dos iniciadores (5'- 3')	Tamanho do produto (pb)
GAPDH	GCGACACCAGCATCAAAGAG CTGTGCTCACAAGTTCCTCG	102
HGPRT	TGACATCCGCCACAGCATTG CGAGCAACACAACGGTCTTC	137
RNA 60S	CGATGAAGCTCAAGTGGACC CGGTTGTA CTTGACGGGAAC	113

As placas foram vedadas com o selante óptico *MicroAmp® Optical Adhesive Film* (Applied Biosystems) e analisadas em um equipamento *ABI Prism® 7900HT Sequence Detection System* (Applied Biosystems) do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB-UFSC). As reações tiveram início com uma etapa de desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos contendo uma etapa de desnaturação (95°C por 15 segundos) e uma etapa de ligação dos iniciadores e extensão (60°C por um minuto). Ao final, foi incluída uma etapa para obtenção da curva de dissociação (95°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos e, novamente, 95°C por 15 segundos). Em cada placa adicionou-se um controle negativo para cada par de iniciadores, composto por todos os reagentes necessários à amplificação, à exceção do DNA molde.

A eficiência da qPCR com cada par de iniciadores foi calculada através da diluição seriada 1:2 de amostras de misturas de cDNA dos três pontos coletados ao longo da diferenciação celular *in vitro* (epimastigotas - T0, intermediários - T4 e tripomastigotas -T8). A inclinação da reta, obtida a partir da função entre o Cq (ciclo de quantificação, do inglês, *Cycle quantification*) e cada ponto da diluição, foi aplicada à equação: $E = 10e^{-\text{slope}} - 1$.

Nesta equação, E representa a eficiência da qPCR e slope é o valor de inclinação da reta. O valor de E é obtido como fração de uma unidade.

Foi verificado se havia contaminação dos iniciadores por produtos inespecíficos através da curva de dissociação. Esta curva avalia à temperatura em que se dissociam os fragmentos de DNA dupla fita presente na reação. A representação da curva de dissociação é um gráfico, onde cada pico indica uma temperatura onde houve dissociação de DNA, portanto a presença de vários picos pode indicar a contaminação dos iniciadores.

4.12.4 Análise dos resultados e análises estatísticas

Os experimentos de qPCR foram realizados utilizando-se triplicatas biológicas e técnicas, sendo os resultados posteriormente analisados pelo software SDS 2.4 (Applied Biosystems). Para avaliar a variação relativa nos níveis de cada transcrito entre as amostras analisadas, utilizou-se o método da

quantificação relativa (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), comparando o Cq apresentado para cada gene alvo à média geométrica dos Cq de três genes de referência (GAPDH, HGPRT e RNA60S), escolhendo-se aqueles com menor variância interna.

O programa RefFinder (<http://fulxie.0fees.us/?type=reference>) foi utilizado para a escolha do melhor gene de referência entre os três genes selecionados previamente: GAPDH, HGPRT e RNA60S. Para cada gene foi calculado um índice de estabilidade que leva em consideração a variação dos valores de Cq entre as diferentes condições. Assim, quanto menor o valor do índice de estabilidade, menor a variação de expressão do gene de referência entre as condições experimentais.

Os cálculos necessários para obtenção dos valores de abundância relativa foram realizados em planilha do Excel (*Microsoft Office*), através das seguintes equações:

Equação 1: $\Delta Cq = Cq \text{ (gene alvo)} - Cq \text{ (gene de referência)}$

Equação 2: $\Delta\Delta Cq = \Delta Cq \text{ (amostra)} - \Delta Cq \text{ (calibrador)}$

Equação 3: $QR = 2e^{-\Delta Cq}$

Nestas equações o *calibrador* é a amostra a partir da qual as demais serão comparadas. Entretanto, quando se compara a expressão gênica entre as formas biológicas, como estamos pretendendo nesse estudo, não é possível determinar qual amostra seria um bom *calibrador*, desta forma utilizamos apenas o ΔCq . Consequentemente, o QR que é o valor de quantificação relativa foi calculado utilizando apenas o ΔCq das amostras.

As análises estatísticas, bem como a confecção dos gráficos (valor de abundância de mRNA no eixo y e amostras no eixo x), foram realizadas no programa *Prism 5.0* (GraphPad). Foi utilizado o teste estatístico Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de comparação múltipla de Tukey. Valores de *p* menores que 0,01 foram considerados estatisticamente significantes.

4.13 Imunolocalização por microscopia óptica

O ensaio de imunofluorescência indireta foi realizado com formas epimastigotas e tripomastigotas da cepa Choachí de *T. rangeli*. Os parasitos mantidos em meio LIT foram coletados por centrifugação a 3.000 x g por 10 minutos e lavados duas vezes

em PBS pH 7,4. A concentração de parasitos foi ajustada para 5×10^6 células/ml, e aproximadamente 100 μ l da suspensão celular foram depositados em lamínula de vidro (13 cm diâmetro), seguido de fixação com paraformaldeído 4% diluído em PBS durante cinco minutos. Após três lavagens de cinco minutos com PBS, foi feita a permeabilização dos parasitos com 0,5 % Nonidet 40 (NP40) durante cinco minutos à temperatura ambiente. Os possíveis sítios inespecíficos para o antissoro foram bloqueados em solução de bloqueio (5% leite desnatado diluído em PBS-Tween 0,1%) durante 16 horas a 4°C. O antissoro anti-*TrDCL2* produzido conforme o descrito no item 4.10 foi adicionado na concentração de 1:100 (v/v) sobre os parasitos fixados nas lamínulas, sendo mantidos durante uma hora à temperatura ambiente. Após três lavagens de cinco minutos em PBS, o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa-fluor 488 (Molecular Probes) foi diluído 1:1.000 (v/v) em tampão de bloqueio e mantido sobre as lamínulas por 15 minutos ao abrigo da luz. Após três lavagens de cinco minutos em PBS-Tween 0,1% as lamínulas foram coradas com 1 μ g/ml de *4',6-diamidino-2-phenylindole* (DAPI) por cinco minutos, lavadas novamente (3 vezes) com PBS durante cinco minutos e montadas de forma invertida com o reagente *Hydromount* (National Diagnostics) sobre lâminas de vidro. As análises foram realizadas em microscópio óptico de fluorescência Olympus – Bx40–FL (Olympus) e digitalmente registradas.

4. 14 Clonagem e identificação dos pequenos RNA

A clonagem dos pequenos RNA foi realizada conforme descrito por Pfeffer e colaboradores (2005) com algumas modificações. Inicialmente foi realizada a extração do RNA total de formas epimastigotas de *T. rangeli* cepa Choachí utilizando o reagente Trizol[®] (Invitrogen) conforme as especificações do fabricante.

Os pequenos RNA foram obtidos a partir de 300 μ g de RNA total por separação eletroforética em gel desnaturante de poliacrilamida 15% e corado em brometo de etídio. Os fragmentos entre 18-30 nt foram excisados do gel em cubos de 1cm³ e transferidos para tubos de 2 ml. Para recuperar os pequenos RNA do gel foram adicionados 2-3 volumes de NaCl 0,3 M, incubado a 4°C por 12 horas sob agitação constante e centrifugado a $\geq 3,500 \times g$, 4°C.

Em seguida, o sobrenadante contendo os siRNA foi precipitado pela adição de 2 µg/ml de glicogênio, 3 volumes de etanol absoluto e incubado a -20°C por 12 horas. Após este período, a amostra foi centrifugada por 30 minutos a 3500 x g a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado contendo os pequenos RNA foi eluído com 24 µl de água livre de RNase. Esses pequenos RNA foram utilizados como molde para a síntese de cDNA e estes por sua vez foram utilizados na clonagem no vetor pGEM-T Easy Vector® (Promega).

Para realizar a transcrição reversa, foram sintetizados adaptadores que continham nucleotídeos de RNA em uma extremidade para ligar nos pequenos RNA e na outra extremidade continham nucleotídeos de DNA para que houvesse um local de reconhecimento dos iniciadores utilizados na reação de transcrição reversa. Além disso, para facilitar a posterior clonagem foram adicionados sítios de restrição enzimáticos *EcoRI* e *PstI*.

As ligações dos pequenos RNA com os adaptadores foram realizadas com a adição de 10 pmol do adaptador 3' (P rUrUrU CTA TCT GCA GAC TGT idT) tampão de ligação 10X (0,1 M MgCl₂, 0,1 M 2-mercaptoetanol, 0,5 M Tris HCl pH 7,6, 1 mg/ml BSA, 2 mM ATP) e 6 µl de DMSO 50% aquoso. O RNA foi desnaturado a 90°C por 30 segundos e rapidamente transferido para um banho de gelo por 20 segundos. Em seguida foi adicionado 1 µl de T4 ligase e incubado por 1h a 37°C.

Os produtos da ligação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 15% e os fragmentos entre 30 e 60 nt foram excisados e purificados como descrito anteriormente. Na amostra purificada foi adicionado o adaptador da extremidade 5' (TGG GAA TTC CTC ACT rArArA) e os mesmos passos anteriores foram repetido, entretanto os fragmentos excisados do gel, dessa vez, possuíam entre 50 e 80 nt, devido a adição dos adaptadores.

Após a purificação, os pequenos RNA foram utilizados na reação de transcrição reversa a qual foi conduzida a 37°C por 50 minutos na presença de 15 pmol/µ do iniciador para transcrição reversa (RT- 5'- GAC TAG CTG GAA TTC GCG GTT AAA -3'), 200 µM de dNTP, 200 unidades da enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen) em tampão recomendado pelo fabricante. A inativação da reação foi realizada durante 15 minutos a 70 °C.

Após a síntese de cDNA pela RT-PCR, foi prosseguindo a sua amplificação pela reação de PCR convencional utilizando iniciadores que continham com os mesmos sítios de enzimas de restrição contidos nos adaptadores (*EcoRI* e *PstI*). Na reação foram utilizados 10 µl de cDNA como molde, 200 µM dNTP, 1 unidade da Taq polimerase (Invitrogen), 10 pmol dos iniciadores PCR 5' (5'- CAT GGG AAT TCC TCA CTA AA -3') e PCR 3' (5'- TAC AGT CTG CAG ATA GAA A -3') durante 20 ciclos de 45 segundos a 94°C, 1 minuto a 50°C e 1 minuto a 72°C.

Todos os produtos de PCR obtidos foram visualizados em géis de poliacrilamida não desnaturante e corados pelo brometo de etídio. As bandas com tamanho entre 59-65 nt que correspondentes ao produto da ligação amplificadas com a presença dos pequenos RNA, foram retiradas do gel e novamente purificadas e eluídas em 85 µl de água livre de RNase.

O produto da purificação foi submetido à digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *PstI* durante 4 horas a 37°C. Após este período, foram adicionados 200 µl de tampão TE 1X (10 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA, pH 8) e 300 µl da mistura fenol/clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 25:24:1. Em seguida, foi homogeneizado no vortex por 10 segundos e centrifugado por 10 minutos a 16000 x *g* em temperatura ambiente. A fase superior foi removida para um novo tubo e foram adicionados 300 µl de clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 21:1, homogeneizado no vortex por 10 segundos e centrifugado por 3 minutos a 16000 x *g* em temperatura ambiente. Em seguida, o DNA foi precipitado por adição de 1/20 volumes de acetato de sódio 4 M, pH 5,2, glicogênio (2 µl/ml) e 2,5 volumes de etanol absoluto. A mistura foi realizada por inversão e incubada por 1 hora em gelo. Passado este período, o DNA foi recuperado por centrifugação de 15 minutos a 16000 x *g*, 4°C. O precipitado foi lavado com 1 ml de etanol 80% e centrifugado imediatamente por 5 minutos a 16000 x *g*, 4°C. Após a total remoção do etanol, o precipitado foi eluído em 8 µl de água livre de RNase.

Para uma maior eficiência da clonagem foi realizada a concatenação do DNA digerido. Para tal, foi adicionado 1 µl do tampão da enzima T4 ligase e 1 µl da enzima T4 ligase., incubado por 1 hora em temperatura ambiente. A reação foi interrompida por adição de 40 µl de TE 1X e o DNA foi purificado

utilizando o kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare).

Os fragmentos purificados foram ligados ao plasmídeo pGEM-T (Promega) previamente digerido com as enzimas *EcoRI* e *PstI*.

Os produtos dessa ligação foram utilizados na transformação de células competentes *E. coli* DH5- α . Os clones foram selecionados através de PCR utilizando iniciadores dirigidos às sequências M13 presentes no vetor e as colônias positivas, tiveram o seu DNA plasmidial extraído por lise alcalina (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) para posterior sequenciamento.

Análise e a comparação das sequências obtidas foi realizada utilizando-se informações obtidas a partir dos bancos de dados públicos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>), GeneDB (<http://www.genedb.org/genedb/tcruzi/index.jsp>) e TcruziDB (<http://tcruzidb.org/tcruzidb/>), além do próprio genoma do *T. rangeli*.

5. RESULTADOS

5.1 Análises *in silico* das sequências do gene DCL2 de *T. rangeli* (*TrDCL2*)

Recentemente foi descrito por nosso grupo de pesquisa a presença de um ortólogo do gene DCL2 de *T. brucei* no genoma do *T. rangeli* (STOCO et al., 2014). O gene *TrDCL2* apresenta uma janela de leitura (ORF) de 2.667 pb que codifica para uma proteína de 889 aminoácidos, com massa molecular de aproximadamente 100 kDa e ponto isoelétrico de 5,58. A proteína predita apresentou similaridade em nível de aminoácidos de 38% com *Trypanosoma grayi* (XP_009313726.1), 32% com *T. brucei gambiense* (XP_011772052.1), 31% com *T. brucei brucei* (XP_843717.1) e 29% com *Trypanosoma congolense* (CCC89630.1).

A sequência do gene *TrDCL2* foi utilizada para desenhar iniciadores específicos para PCR, sendo que os produtos amplificados apresentaram o tamanho esperado de aproximadamente 2.900 pb em todas as cepas descritas na tabela 1 (Figura 9).

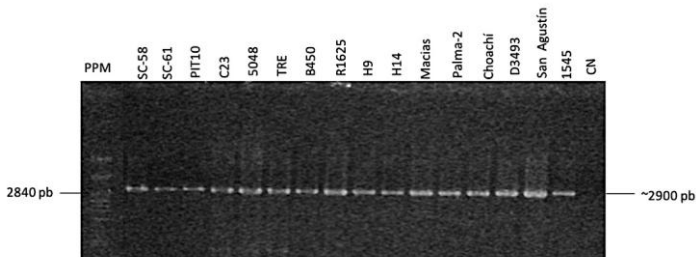


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 1% corada pelo brometo de etídio, revelando os produtos de amplificação via PCR do gene *TrDCL2* das diferentes cepas do *Trypanosoma rangeli*. PPM - Padrão de Peso Molecular (DNA de Fago Lambda digerido com *HindIII*); DNA genômico das cepas de *T. rangeli*: SC-58; SC-61; PIT10; C23; 5048; TRE; B450; R1625; H9; H14; Macias; Palma-2; Choachi; D3493; San Agustín; 1545; CN - Controle Negativo (Sem adição de DNA).

Os produtos de PCR gerados foram purificados e sequenciados, e após identificação da região codificante e predição das sequências aminoacídicas estas foram alinhadas juntamente com as proteínas de *T. brucei brucei*, *T. brucei gambiense*, *T. congolense* e *T. grayi* (Figura 10).


```

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
KPI(+)- G8SSDGDGALCFRTWLTQLCGQARATELSSKDDVEVNGKTKDKDNRLTQSLVITIEAALRCRLRVAEASDAFAFYGEFDVVVCSRWIIVGSS---
B450 G8SSDGDGALCFRTWLTQLCGQARATELSSKDDVEVNGKTKDKDNRLTQSLVITIEAALRCRLRVAEASDAFAFYGEFDVVVCSRWIIVGSS---
D3493 G8SSDGDGALCFRTWLTQLCGQARATELSSKDDVEVNGKTKDKDNRLTQSLVITIEAALRCRLRVAEASDAFAFYGEFDVVVCSRWIIVGSS---
H14 G8SSDGDGALCFRTWLTQLCGQARATELSSKDDVEVNGKTKDKDNRLTQSLVITIEAALRCRLRVAEASDAFAFYGEFDVVVCSRWIIVGSS---
Maclias G8SSDGDGALCFRTWLTQLCGQARATELSSKDDVEVNGKTKDKDNRLTQSLVITIEAALRCRLRVAEASDAFAFYGEFDVVVCSRWIIVGSS---
Palma2 G8SSDGDGALCFRTWLTQLCGQARATELSSKDDVEVNGKTKDKDNRLTQSLVITIEAALRCRLRVAEASDAFAFYGEFDVVVCSRWIIVGSS---
R1625 G8SSDGDGALCFRTWLTQLCGQARATELSSKDDVEVNGKTKDKDNRLTQSLVITIEAALRCRLRVAEASDAFAFYGEFDVVVCSRWIIVGSS---
San_agostin G8SSDGDGALCFRTWLTQLCGQARATELSSKDDVEVNGKTKDKDNRLTQSLVITIEAALRCRLRVAEASDAFAFYGEFDVVVCSRWIIVGSS---
Chochoi G8SSDGDGALCFRTWLTQLCGQARATELSSKDDVEVNGKTKDKDNRLTQSLVITIEAALRCRLRVAEASDAFAFYGEFDVVVCSRWIIVGSS---
SC61 G8SSDGDGALCFRTWLTQLCGQARATELSSKDDVEVNGKTKDKDNRLTQSLVITIEAALRCRLRVAEASDAFAFYGEFDVVVCSRWIIVGSS---
KPI(-)- MEATVAAAATGLSSAASRGSSLNFGVGHARRSVQTKMKVKLRIIGHSLSLTSKLR---SDAGCSILLRPOTRKCMASLTLRCPVGGW
IT110 MEATVAAAATGLSSAASRGSSLNFGVGHARRSVQTKMKVKLRIIGHSLSLTSKLR---SDAGCSILLRPOTRKCMASLTLRCPVGGW
Tbb_De12 TRP---TSALLFAALAEKISITFVPAESFRVSPFLANLILTKLRPFTPTMTATGCGLRSLSHGNGNFARAEAFKFKWIDALLARANNRNSGD---
Tbb_De12 TRP---TSALLFAALAEKISITFVPAESFRVSPFLANLILTKLRPFTPTMTATGCGLRSLSHGNGNFARAEAFKFKWIDALLARANNRNSGD---
Tc_De12 GCGVAVGSCRIAKGVSLVLDLVEPVOVSSPALVNVNDEKDTDLDPATVQHLRVISQRLLVITSSFKREKLEGITDYSKE--DKSCED---
Tg_De12 GGNVNTACFPQIQLKELTVDKSTEAITDVAALNVVHFDAEAERSLTETMR-----ECALANNAEATLTCGASAA---
110 120 130 140 150 160 170 180 190 200

```

```

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
KPI(+)- LPSCLANGNNLITLTSAVDAFAAASLWPCMRCSGAVPYSRVWVWKEVWELRRA---TEVTVYSOROGKQFFVIAGRTLAGVNGGALPATTMVF
B450 LPSCLANGNNLITLTSAVDAFAAASLWPCMRCSGAVPYSRVWVWKEVWELRRA---TEVTVYSOROGKQFFVIAGRTLAGVNGGALPATTMVF
D3493 LPSCLANGNNLITLTSAVDAFAAASLWPCMRCSGAVPYSRVWVWKEVWELRRA---TEVTVYSOROGKQFFVIAGRTLAGVNGGALPATTMVF
H14 LPSCLANGNNLITLTSAVDAFAAASLWPCMRCSGAVPYSRVWVWKEVWELRRA---TEVTVYSOROGKQFFVIAGRTLAGVNGGALPATTMVF
Maclias LPSCLANGNNLITLTSAVDAFAAASLWPCMRCSGAVPYSRVWVWKEVWELRRA---TEVTVYSOROGKQFFVIAGRTLAGVNGGALPATTMVF
Palma2 LPSCLANGNNLITLTSAVDAFAAASLWPCMRCSGAVPYSRVWVWKEVWELRRA---TEVTVYSOROGKQFFVIAGRTLAGVNGGALPATTMVF
R1625 LPSCLANGNNLITLTSAVDAFAAASLWPCMRCSGAVPYSRVWVWKEVWELRRA---TEVTVYSOROGKQFFVIAGRTLAGVNGGALPATTMVF
San_agostin LPSCLANGNNLITLTSAVDAFAAASLWPCMRCSGAVPYSRVWVWKEVWELRRA---TEVTVYSOROGKQFFVIAGRTLAGVNGGALPATTMVF
Chochoi LPSCLANGNNLITLTSAVDAFAAASLWPCMRCSGAVPYSRVWVWKEVWELRRA---TEVTVYSOROGKQFFVIAGRTLAGVNGGALPATTMVF
KPI(-)- RAPPFCVRLPMGTTWRVLYPFWMLLRRLLRFLCHCAATALCQVWRRSRSSSSGCLCSA---TQPAAKTATYGVCAAHGHERRRRTVGHADGA
SC61 RAPPFCVRLPMGTTWRVLYPFWMLLRRLLRFLCHCAATALCQVWRRSRSSSSGCLCSA---TQPAAKTATYGVCAAHGHERRRRTVGHADGA
IT110 RAPPFCVRLPMGTTWRVLYPFWMLLRRLLRFLCHCAATALCQVWRRSRSSSSGCLCSA---TQPAAKTATYGVCAAHGHERRRRTVGHADGA
Tbb_De12 -RNSCETPTFKVLISITPDCVYDRLSLIAGKQKQNSRPFGLRSLSEKINGIAE---GCDPLTKSKQEGTIVVISTVDERDERTIFFSPILL
Tbb_De12 -RNSCETPTFKVLISITPDCVYDRLSLIAGKQKQNSRPFGLRSLSEKINGIAE---GCDPLTKSKQEGTIVVISTVDERDERTIFFSPILL
Tc_De12 -VSKMTN---ALGSEFTTARSLGLVPRGCTTARLGGDPI---ETGAT---EGCTISANRQK---YV---LIDVSWQAD---RTPQVQVIL
Tg_De12 -----VQMSASAAAGFDASLVLPCRCRSTGSALRSLRTRKQRAKRA---HFDVPRASAEHQKQVLYVPLASPDGNSAKALWPMPL
210 220 230 240 250 260 270 280 290 300

```

```

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
KPI(+)- LRPQRTVDVVGTAQVSSSEKALIPRPAALVLYSISLQDQCCDGGAVIATELSEDEARYRGDRDVEDHHPDENHSSGCGARVSAVDEWELEAA
B450 LRPQRTVDVVGTAQVSSSEKALIPRPAALVLYSISLQDQCCDGGAVIATELSEDEARYRGDRDVEDHHPDENHSSGCGARVSAVDEWELEAA
D3493 LRPQRTVDVVGTAQVSSSEKALIPRPAALVLYSISLQDQCCDGGAVIATELSEDEARYRGDRDVEDHHPDENHSSGCGARVSAVDEWELEAA
H9 LRPQRTVDVVGTAQVSSSEKALIPRPAALVLYSISLQDQCCDGGAVIATELSEDEARYRGDRDVEDHHPDENHSSGCGARVSAVDEWELEAA
Maclias LRPQRTVDVVGTAQVSSSEKALIPRPAALVLYSISLQDQCCDGGAVIATELSEDEARYRGDRDVEDHHPDENHSSGCGARVSAVDEWELEAA
Palma2 LRPQRTVDVVGTAQVSSSEKALIPRPAALVLYSISLQDQCCDGGAVIATELSEDEARYRGDRDVEDHHPDENHSSGCGARVSAVDEWELEAA
R1625 LRPQRTVDVVGTAQVSSSEKALIPRPAALVLYSISLQDQCCDGGAVIATELSEDEARYRGDRDVEDHHPDENHSSGCGARVSAVDEWELEAA
San_agostin LRPQRTVDVVGTAQVSSSEKALIPRPAALVLYSISLQDQCCDGGAVIATELSEDEARYRGDRDVEDHHPDENHSSGCGARVSAVDEWELEAA
Chochoi LRPQRTVDVVGTAQVSSSEKALIPRPAALVLYSISLQDQCCDGGAVIATELSEDEARYRGDRDVEDHHPDENHSSGCGARVSAVDEWELEAA
KPI(-)- AASSAHRREADGARVRSKSDPPPSFGAVVHPARR--VWRGSLHCHGAGEGRGAVSQGLGHSFRGSGQRGRVALVGGDRRVAEGGKTRDVA
SC61 AASSAHRREADGARVRSKSDPPPSFGAVVHPARR--VWRGSLHCHGAGEGRGAVSQGLGHSFRGSGQRGRVALVGGDRRVAEGGKTRDVA
IT110 AASSAHRREADGARVRSKSDPPPSFGAVVHPARR--VWRGSLHCHGAGEGRGAVSQGLGHSFRGSGQRGRVALVGGDRRVAEGGKTRDVA
Tbb_De12 LRSSTVYVGNDEKQKETSIVANHSALFLVDKSSDS-----FAEGDFRSLTVVLEDRQKVAEALRSDCETVRSVLELWCLVLEL
Tbb_De12 LRSSTVYVGNDEKQKETSIVANHSALFLVDKSSDS-----FAEGDFRSLTVVLEDRQKVAEALRSDCETVRSVLELWCLVLEL
Tc_De12 LRSSEWEPGADESQAKLSVGRGTAVLLLSKAQRKN-----GAGGDFRTRTAVELSVAQDSDAEMYGCSGSLRVDLDELAPVLEL
Tg_De12 LRP---RHALLVGTHTA---SDSGLASRAVLVYVFRFD---GNNSSESGMSYVAVGLSEEARLCKRNGGLVQVDEWLVNLS
310 320 330 340 350 360 370 380 390 400

```

```

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
KPI(+)- KEIAEVVSEFMLELSESDINPACR--HNFPFVEQDALLGSRMGLVWVLDIETAVYAVNLDVWQDRSIFVGRIVSESNRRFVSYIPE
B450 KEIAEVVSEFMLELSESDINPACR--HNFPFVEQDALLGSRMGLVWVLDIETAVYAVNLDVWQDRSIFVGRIVSESNRRFVSYIPE
D3493 KEIAEVVSEFMLELSESDINPACR--HNFPFVEQDALLGSRMGLVWVLDIETAVYAVNLDVWQDRSIFVGRIVSESNRRFVSYIPE
H9 KEIAEVVSEFMLELSESDINPACR--HNFPFVEQDALLGSRMGLVWVLDIETAVYAVNLDVWQDRSIFVGRIVSESNRRFVSYIPE
Maclias KEIAEVVSEFMLELSESDINPACR--HNFPFVEQDALLGSRMGLVWVLDIETAVYAVNLDVWQDRSIFVGRIVSESNRRFVSYIPE
Palma2 KEIAEVVSEFMLELSESDINPACR--HNFPFVEQDALLGSRMGLVWVLDIETAVYAVNLDVWQDRSIFVGRIVSESNRRFVSYIPE
R1625 KEIAEVVSEFMLELSESDINPACR--HNFPFVEQDALLGSRMGLVWVLDIETAVYAVNLDVWQDRSIFVGRIVSESNRRFVSYIPE
San_agostin KEIAEVVSEFMLELSESDINPACR--HNFPFVEQDALLGSRMGLVWVLDIETAVYAVNLDVWQDRSIFVGRIVSESNRRFVSYIPE
Chochoi KEIAEVVSEFMLELSESDINPACR--HNFPFVEQDALLGSRMGLVWVLDIETAVYAVNLDVWQDRSIFVGRIVSESNRRFVSYIPE
KPI(-)- GRAVYAAHQKVHVAQGVPPVLSLCCGARRTAASADAAYPGG----DAAAKRERICVRRHSRGRGVAVNCGRRHRVFQQA-----GHS
SC61 GRAVYAAHQKVHVAQGVPPVLSLCCGARRTAASADAAYPGG----DAAAKRERICVRRHSRGRGVAVNCGRRHRVFQQA-----GHS
IT110 GRAVYAAHQKVHVAQGVPPVLSLCCGARRTAASADAAYPGG----DAAAKRERICVRRHSRGRGVAVNCGRRHRVFQQA-----GHS
Tbb_De12 VLELVSECFIKQKQVGNSSSESLLSLEADQAKLESLMEGLVWVLDIETAVYAVNLDVWQDRSIFVGRIVSESNRRFVSYIPE
Tbb_De12 VLELVSECFIKQKQVGNSSSESLLSLEADQAKLESLMEGLVWVLDIETAVYAVNLDVWQDRSIFVGRIVSESNRRFVSYIPE
Tc_De12 TETIDTDTMLLAVKSSSSGKATLFLSPVPEARATLISLRQVLDVWVLDIETAVYAVNLDVWQDRSIFVGRIVSESNRRFVSYIPE
Tg_De12 FRSVIVWSEFIVVEHSRGLPAPVLYNLPLEEQSLLISLRQVLDVWVLDIETAVYAVNLDVWQDRSIFVGRIVSESNRRFVSYIPE
410 420 430 440 450 460 470 480 490 500

```

```

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
KPI(+)- VITHLRLVWHSNRRKRWELRFGA--MALWVIVISG-----VARGLSAAGRLEPCVLGVVREMSVHVVT-----
B450 VITHLRLVWHSNRRKRWELRFGA--MALWVIVISG-----VARGLSAAGRLEPCVLGVVREMSVHVVT-----
D3493 VITHLRLVWHSNRRKRWELRFGA--MALWVIVISG-----VARGLSAAGRLEPCVLGVVREMSVHVVT-----
H9 VITHLRLVWHSNRRKRWELRFGA--MALWVIVISG-----VARGLSAAGRLEPCVLGVVREMSVHMATT-----
Maclias VITHLRLVWHSNRRKRWELRFGA--MALWVIVISG-----VARGLSAAGRLEPCVLGVVREMSVHVVT-----
Palma2 VITHLRLVWHSNRRKRWELRFGA--MALWVIVISG-----VARGLSAAGRLEPCVLGVVREMSVHVVT-----
R1625 VITHLRLVWHSNRRKRWELRFGA--MALWVIVISG-----IARGLSAAGRLEPCVLGVVREMSVHVVT-----
San_agostin VITHLRLVWHSNRRKRWELRFGA--MALWVIVISG-----VARGLSAAGRLEPCVLGVVREMSVHVVT-----
Chochoi VITHLRLVWHSNRRKRWELRFGA--MALWVIVISG-----VARGLSAAGRLEPCVLGVVREMSVHVVT-----
KPI(-)- TGGHFFVGVVYQEAESCCGPPVCCGCMDSLQRR-----LQGVTVGRGPPSVHVCISAGGTCDEAPKGGCVK-----
SC61 TGGHFFVGVVYQEAESCCGPPVCCGCMDSLQRR-----LQGVTVGRGPPSVHVCISAGGTCDEAPKGGCVK-----
IT110 TGGHFFVGVVYQEAESCCGPPVCCGCMDSLQRR-----LQGVTVGRGPPSVHVCISAGGTCDEAPKGGCVK-----
Tbb_De12 QLRNYFENKLSNRRKRWELRFGA--MALWVIVISG-----VARGLSAAGRLEPCVLGVVREMSVHMATT-----
Tbb_De12 QLRNYFENKLSNRRKRWELRFGA--MALWVIVISG-----VARGLSAAGRLEPCVLGVVREMSVHMATT-----
Tc_De12 PLIRLYRTEFNRRKRWELRFGA--MALWVIVISG-----DEGRHTADG-PLRPLVQVCEVDELSICQAQETEPSDQ
Tg_De12 ELCEYLVSIVNRRKRWELRFGA--MALWVIVISA-----AANRAAG-----LPLAVLVRVRAVRAAGLIALI
510 520 530 540 550 560 570 580 590 600

```

Figura 10 - Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos de DCL2 das cepas de *Trypanosoma rangeli* e outros tripanosomatídeos filogeneticamente relacionados. As sequências analisadas foram de *Trypanosoma brucei brucei* (Tbb_Dcl2), *Trypanosoma brucei gambiense* (Tbg_Dcl2), *Trypanosoma congolense* (Tc_Dcl2), *Trypanosoma grayi* (Tg_Dcl2) e as cepas de *T. rangeli* KP1(+) (1545, B450, D3493, H9, H14, Macias, Palma 2, R1625, San Agustín, Choachí) e KP1(-) (SC58, SC61, PIT10). Os aminoácidos em preto são conservados nas sequências e as setas são os resíduos de lisina (K) e ácido glutâmicos (E) importantes para a atividade catalítica. Retângulo indica família ribonuclease, os aminoácidos em lilás mostram o domínio RNase IIIa (ExxGD) e em verde o domínio RNase IIIb (DxxE).

É possível observar no alinhamento que a sequência de DCL2 de *T. rangeli* possui em todas as cepas um encurtamento de 64 aminoácidos na região N-terminal em comparação com os outros tripanosomatídeos analisados.

Além disso, ao analisar o alinhamento das cepas de *T. rangeli*, observa-se um padrão de conservação dentro das cepas de um mesmo grupo genético: KP1(+) ou KP1(-). Entretanto quando comparamos as sequências das cepas KP1(+) em relação às sequências das cepas KP1(-) observa-se uma conservação na porção N-terminal (\pm 340 aa) e uma perda total de conservação a partir deste ponto nas KP1(-). Ao analisar as sequências de nucleotídeos utilizadas para a predição das sequências de aminoácidos observa-se a deleção de um nucleotídeo na posição 1.027 pb que implica na alteração da janela de leitura correta.

Apesar da ausência dos resíduos de aminoácidos na porção N-terminal em comparação aos demais tripanosomatídeos, nas sequências das cepas KP1(+) pode-se observar as assinaturas dos domínios RNase IIIa (ExxGD) e RNase IIIb (DxxE) característicos da proteína Dicer (CONRAD; RAUHUT, 2002; POMPEY; FODA; SINGH, 2015), assim como os resíduos de Lisina (K⁹¹⁶) e Ácido glutâmico (E⁹²²) descritos como sendo importantes para a atividade catalítica. Devido à alteração na janela de leitura nas sequências das cepas KP1(-), estes domínios e resíduos não foram encontrados.

Em função da presença dos domínios RNase IIIa e RNase IIIb podemos classificar a DCL2 de *T. rangeli* sendo uma proteína pertencente à família das enzimas RNase III Classe II

de acordo com a nova classificação proposta por Jaskiewicz e Filipowicz (2008). Utilizando como base o esquema proposto por Pompey e colaboradores (2015), realizamos a comparação da estrutura dos domínios RNase III da DCL2 de *T. rangeli* com as demais proteínas da Classe I e II que contém domínios ortólogos (Figura 11).

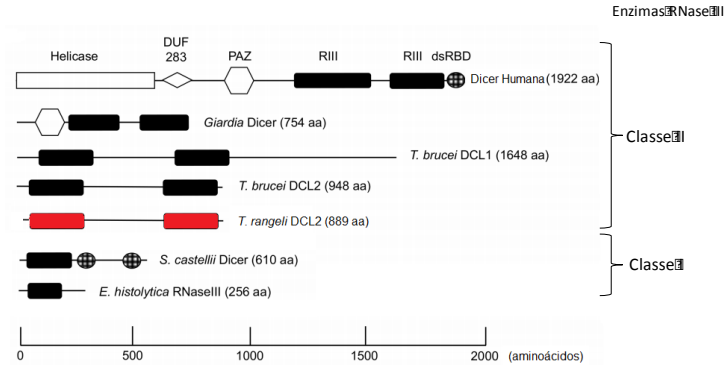


Figura 11. Esquema representando os domínios das proteínas RNase III e suas classes. Destaque em vermelho para a DCL2 de *Trypanosoma rangeli* proposta neste trabalho. Adaptado de Pompey et al. (2015).

A partir do alinhamento das DCL2 foram construídas duas árvores filogenéticas utilizando os métodos de *Neighbour joining* (Figura 10) e *Minimum Evolution* (dado não mostrado). Em ambas as árvores foi possível visualizar a formação de dois clados com alto valor de *bootstrap*: um contendo as proteínas de todas as cepas de *T. rangeli* e o outro formado pelas sequências dos outros tripanosomatídeos incluídos na análise. Dentro do clado formado pelas cepas de *T. rangeli* podemos observar uma nítida separação entre as cepas KP1(+) e KP1(-) também suportada por alto valor de *bootstrap*.

A DCL2 de *T. grayi* ficou localizada mais próxima do clado formado pelas cepas de *T. rangeli* do que do clado formado pelos tripanosomas africanos (*T. brucei brucei*, *T. brucei gambiense* e *T. congolense*) (Figura 12).

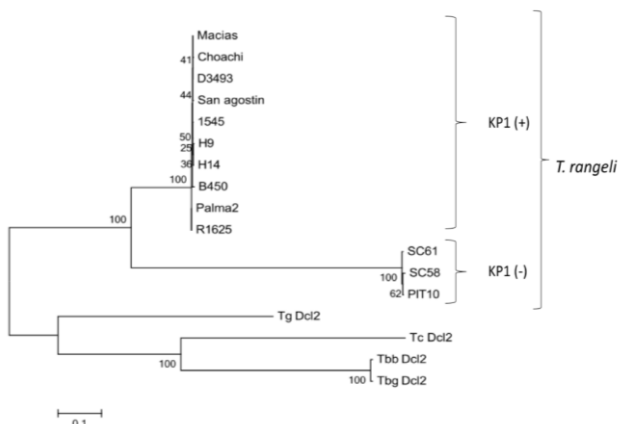


Figura 12: Árvore filogenética elaborada com as seqüências de aminoácidos das DCL2 de diferentes cepas de *Trypanosoma rangeli* e de outros tripanosomatídeos filogeneticamente relacionados gerada através do programa MEGA 6.06[®] pelo método de *Neighbour-joining* com análise por Bootstrap (1000 replicatas).

5.2 Caracterização da organização genômica da *TrDCL2*

A análise da organização genômica do gene *TrDCL2* por *Southern blot* (Figura 13) utilizando como sonda o produto de PCR referente ao gene *TrDCL2*, revelou um padrão compatível com um gene de cópia única.

A digestão do DNA genômico da cepa Choachí de *T. rangeli* com as enzimas *Pst*I, *Nsi*I e *Kpn*I revelou somente a geração de dois fragmentos de 789/2.130 pb, 1.835/1.084 pb e 1.914/1.005 pb, respectivamente (Figura 11). A confirmação que o gene DCL2 de *T. rangeli* está presente no genoma como cópia única foi feita pela digestão com a enzima *Eco*RI, que não possui o sítio de clivagem dentro do gene, tendo sido detectada apenas uma única banda.

Este resultado confirmou as análises *in silico*, no qual uma busca via *Blast* nos dados do genoma do *T. rangeli*, utilizando a sequência do gene obtida pelo sequenciamento resultou em apenas uma sequência com identidade de 99% (dado não mostrado).

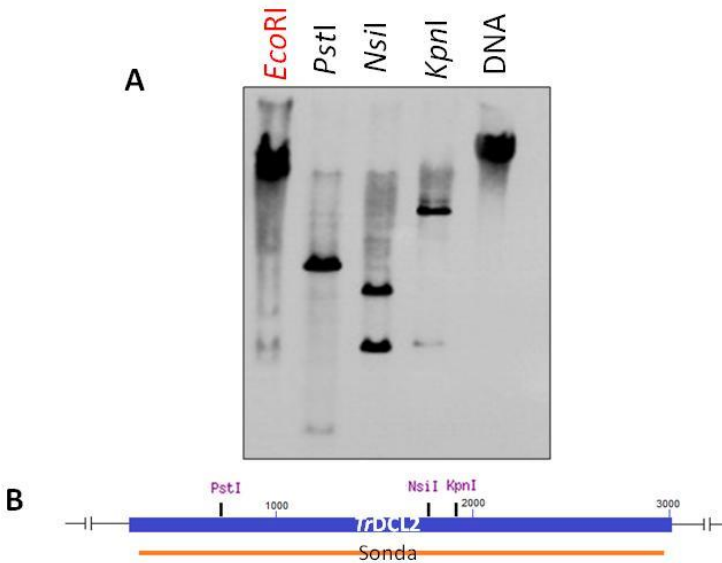


Figura 13. Caracterização da organização genômica do gene DCL2 de *Trypanosoma rangeli* por Southern Blot. (A) Digestão do DNA genômico de *T. rangeli* com as enzimas *Pst*I (789/2.130pb), *Nsi*I (1.835/1.084 pb), *Kpn*I (1.914/1.005 pb) e *Eco*RI (2.919 pb); DNA genômico não digerido. **(B)** Mapa de restrição do gene identificando os sítios de restrição das enzimas utilizadas e a sonda representada em laranja.

5.3 Avaliação dos níveis de transcrição da *TrDCL2* em formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli*

Inicialmente, foi realizada a validação dos iniciadores para as análises por qPCR, tanto para o gene-alvo (senso *TrDcl2F3* e anti-senso *TrDcl2R2* – seção 4.4), quanto para os genes de referência: GAPDH, HGPRT e RNA 60S (seção 4.12.3). Sendo assim, o cálculo da eficiência média da qPCR com cada par de iniciadores foi de aproximadamente 104% para *TrDCL2*, 99% para GAPDH, 95% para HGPRT e 96% para RNA 60S. Como este cálculo exige eficiências semelhantes, com no máximo 10 pontos percentuais de diferença entre os pares de iniciadores dos genes-alvo e dos genes de referência, os

resultados obtidos estão de acordo com o requerido para calcular os valores de abundância relativa.

As curvas de dissociação dos produtos de amplificação de *TrDCL2* apresentaram apenas um pico, em temperaturas próximas a 84°C, confirmando a ausência de dímeros e de outros produtos inespecíficos. Este resultado foi confirmado com a resolução do produto da qPCR em gel de poliácridamida 10% onde observamos a formação de um produto único com tamanho esperado de aproximadamente 250 pb (Figura 14).

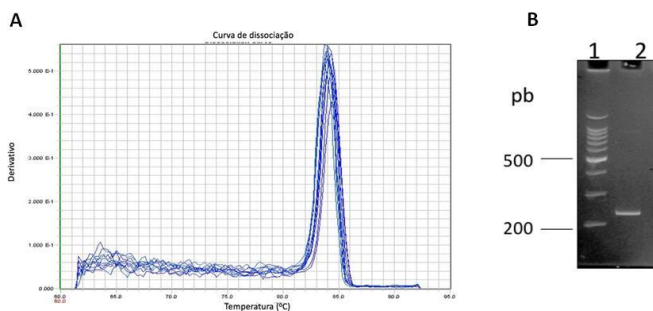


Figura 14. Testes representativos da especificidade dos iniciadores F3 / R2 na detecção de transcritos do gene *TrDCL2* de *Trypanosoma rangeli*. (A) Curva de dissociação mostrando a ausência de contaminantes. (B) Eletroforese em gel de poliácridamida 10% corado pelo brometo de etídio do produto da reação de qPCR. 1- Padrão molecular 100 pb (Promega), 2- Produto de amplificação obtido com os iniciadores F3/R2.

Conforme o resultado obtido através da análise utilizando o RefFinder e as recomendações do MIQE (*Minimum information for publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (BUSTIN et al., 2009) a maior estabilidade para normalização foi a obtida a partir da média geométrica dos três genes de referência utilizados: GAPDH, HGPRT e RNA 60S. Após a normalização, não foi evidenciada qualquer alteração significativa ($p < 0,01$) nos níveis de transcritos do gene *TrDCL2* durante o processo de diferenciação celular *in vitro* do *T. rangeli* (Figura 15).

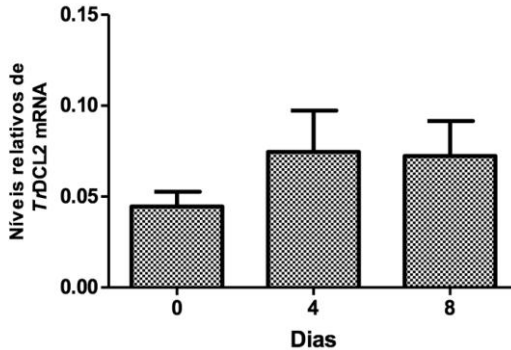


Figura 15: Perfil de abundância de mRNA do gene *TrDCL2* de *Trypanosoma rangeli* durante o processo de diferenciação *in vitro*. A abundância de mRNA foi analisada em formas epimastigotas (T0), intermediárias (T4) e tripomastigotas (T8) de *T. rangeli* durante a diferenciação celular *in vitro* utilizando como referência a média geométrica dos valores de Cq dos genes GAPDH, HPGRT e RNA 60S. Os resultados foram obtidos por ensaio de qPCR e representam a média dos Cq e o desvio padrão do das triplicatas.

5.4 Amplificação e clonagem do gene que codifica para *TrDCL2* de *T. rangeli*.

A amplificação da ORF completa de *TrDCL2* para a expressão heteróloga foi realizada através da técnica de PCR utilizando os iniciadores especificamente desenhados (*TrDCL2_completoF* e *TrDCL2_completoR*) descritos na seção 4.7. Esses iniciadores foram testados nas diferentes cepas de *T. rangeli* e observamos um produto de amplificação do tamanho esperado de 2.900 pb em quase todas as cepas testadas (Figura 16).

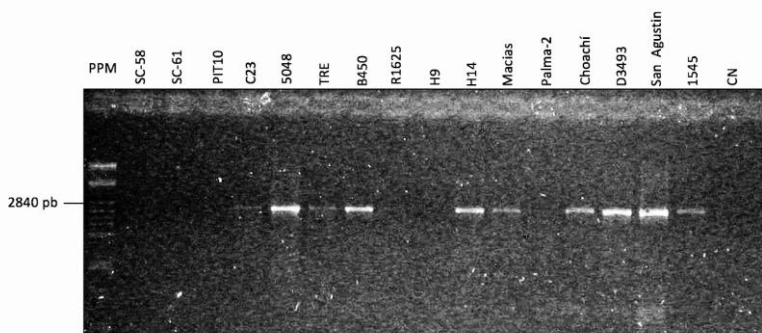


Figura 16. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídio revelando os produtos de amplificação via PCR do gene da *TrDCL2* em diferentes cepas de *Trypanosoma rangeli* utilizando os iniciadores desenhados para clonagem direcional do gene em vetores de expressão. PPM- Padrão de Peso Molecular (DNA de Fago lambda digerido pela *Hind*III), CN- Controle negativo da reação (Sem adição de DNA).

Dentre as cepas para as quais obteve-se amplificação do gene *TrDCL2*, escolhemos a cepa D3943 do grupo KP1(+) para prosseguir com a clonagem e posterior expressão heteróloga em função da intensidade e da pureza do produto amplificado obtido. Além disso, nas análises *in silico* a predição aminoacídica da proteína *TrDCL2* nas cepas KP1(-) apontou uma possível inatividade da proteína devido à ausência de resíduos importantes na atividade catalítica.

Após clonagem inicial em vetor *pGEM T- easy* os clones positivos foram selecionados e após extração plasmidial uma dupla digestão foi realizada com as enzimas *Nde*I e *Bam*HI (para excisão do gene *TrDCL2*) e outra digestão com a enzima *Scal* para clivagem do vetor (± 3.000 pb) em função do tamanho semelhante do inserto (± 2.800 pb).

Após a purificação e sub-clonagem da banda correspondente ao gene *TrDCL2* em vetor de expressão pET14b passamos aos testes de expressão heteróloga descrito no tópico a seguir.

5.5 Expressão heteróloga da proteína *TrDCL2* recombinante

Anteriormente a expressão, fizemos uma predição de códons raros das sequências dos fragmentos pelo programa *Rare Codon Calculador* – RaCC (www.nihserver.mbi.ucla.edu/RACC/) que nos identificou a Arginina, Leucina, e Prolina como códons raros presentes. Sendo assim, optamos tentar expressar a proteína *TrDCL2* nas linhagens *E. coli* BL-21 (DE3) *Codon plus* e Rosetta que são capazes de codificar esses códons raros encontrados. Além disso, testamos a *E. coli* BL-21 *Arctic Express* que é capaz de expressar a proteína de interesse em baixas temperaturas (15°C) favorecendo o processo de dobramento da proteína e aumenta a probabilidade de produzir uma proteína solúvel.

Inicialmente testamos a expressão da proteína, utilizando diferentes concentrações de IPTG (1; 0,5; 0,30; 0,15 mM) e temperaturas (37, 27, 15 °C), não obtendo-se sucesso em nenhuma condição testada.

Com o propósito de aumentar as chances de expressão utilizando um protozoário relacionado foram realizados testes de expressão da proteína *TrDCL2* em *L. tarentolae*, sendo que este não apresenta os genes relacionados ao mecanismo de RNAi (REAL et al., 2013). O gene *TrDCL2* foi introduzido na *L. tarentolae* através de uma transfecção episomal utilizando o vetor pLEXSY. A transfecção foi confirmada via PCR utilizando os iniciadores do inserto, evidenciando-se uma banda com tamanho esperado de ± 2.800 pb (Figura 17).

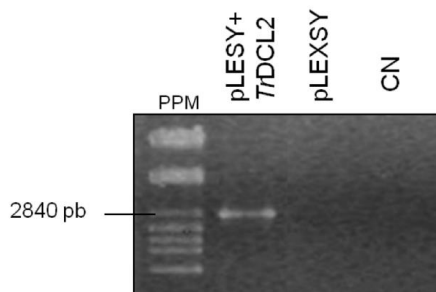


Figura 17. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio confirmando a presença do gene *TrDCL2* em *Leishmania tarentolae* pós-transfecção via PCR utilizando os iniciadores

desenhados para clonagem direcional do gene no vetor de expressão pLEXY. PPM- Padrão de Peso Molecular (DNA de Fago lambda digerido pela *HindIII*); pLEXY + DCL2- lisado celular de *L. tarentolae* transfectada com o vetor contendo o gene *TrDCL2*; pLEXY- lisado celular de *L. tarentolae* transfectada somente com o vetor; CN- Controle negativo da reação (sem adição de DNA).

Ainda que confirmada a presença do vetor e do inserto nos parasitos transfectados por PCR, não foi possível confirmar a expressão da proteína *TrDCL2* por ensaio de *Western blot*. Entretanto, foi possível observar a transcrição do gene *TrDCL2*, a partir da detecção do seu mRNA através de RT-PCR (Figura 18).

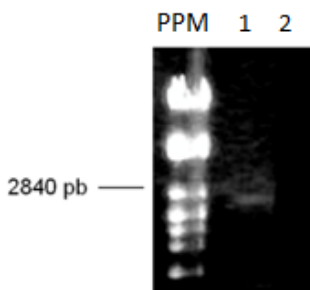


Figura 18. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio confirmando a transcrição do gene *TrDCL2* via PCR da transcrição reversa do RNA total de *Leishmania tarentolae*. PPM- Padrão de Peso Molecular (DNA de Fago lambda digerido pela *HindIII*); 1- RNA total de *L. tarentolae* pós-transfecção; 2- CN- Controle negativo da reação (sem adição de cDNA).

Juntamente com a transfecção em *L. tarentolae* foi realizada a transfecção em *T. rangeli*, nas mesmas condições. Entretanto, observamos que depois da segunda semana pós transfecção os parasitos transfectados não estavam mais viáveis. Este experimento foi repetido três vezes e o resultado obtido foi o mesmo, sendo assim cogitamos que a superexpressão da proteína *TrDCL2* possa inviabilizar a sobrevivência do parasito.

O fracasso das tentativas de expressar a proteína *TrDCL2*, poder estar relacionado ao seu grande tamanho (100 kDa), o que dificultaria a expressão heteróloga em sistema heterólogo, principalmente bacteriano. Pensando nisso, optou-se por expressar dois pequenos fragmentos da proteína, um

contendo os domínios RNase III denominado *TrDCL2-DOM* e outro fora desta região, denominado de *TrDCL2-FRAG*. O primeiro foi construído com o intuito de testar a atividade RNase III e o segundo fragmento foi pensado como uma alternativa para a produção de um antissoro policlonal.

Fizemos novamente a predição de códons raros das sequências dos fragmentos e observamos que mesmo reduzindo o tamanho alguns códons raros permaneceram. Sendo assim, optamos por expressar os fragmentos da proteína em *E. coli* BL21 (DE3) *Codon plus*. A expressão de ambos os fragmentos foi obtida com a indução de 1 mM de IPTG em todas as temperaturas (37, 27, 15 °C) e tempos testados (3, 6 e 18 h) (Figura 19).

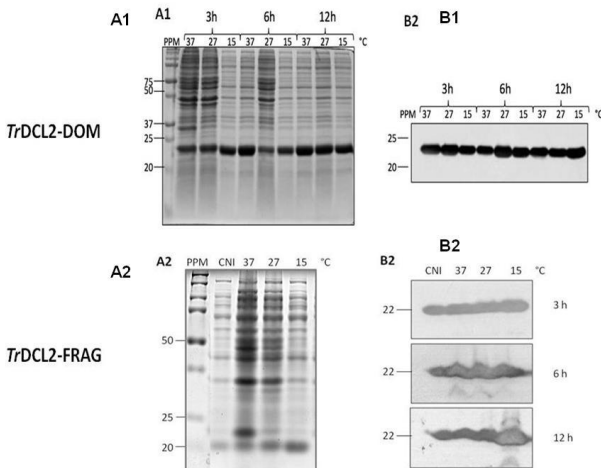


Figura 19. Análise de expressão dos fragmentos *TrDCL2-DOM* e *TrDCL2-FRAG* em *Escherichia coli* BL21(DE3) *Codon plus*. A1 e A2 - Geis de poliacrilamida SDS-PAGE 12 % corado com *Coomassie blue* das frações insolúveis dos lisados de bactéria. B1 e B2 - *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-His•Tag®. Indução da expressão utilizando 1 mM de IPTG em diferentes temperaturas (37, 27 e 15 °C) e tempos (3, 6 e 12 h). PPM- Padrão de peso molecular: *Protein Precision Plus Dual Color* (Bio-Rad).

Até o momento obtivemos a expressão de ambas as proteínas *TrDCL2* DOM e FRAG apenas na fração insolúvel das

bactérias. A proteína *TrDCL2*-FRAG destinada à produção do antissoro foi expressa e purificada da fração insolúvel por cromatografia de afinidade (Figura 20). Após a purificação, a proteína recombinante foi dialisada e quantificada pelo método de *Bradford*, sendo utilizado o eluato (E6) para a imunização de camundongos Balb/C conforme o descrito no item 4.10.

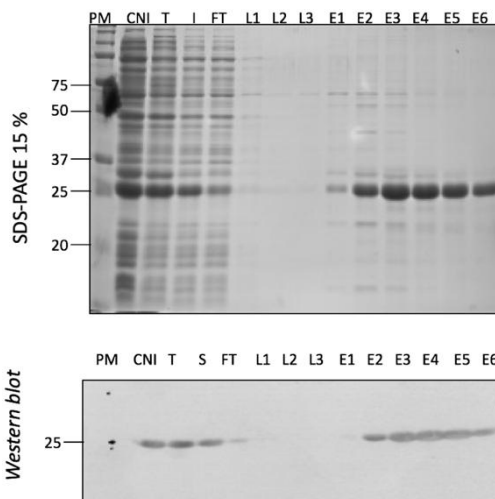


Figura 20. Etapas da purificação do fragmento da proteína *TrDCL2* (*TrDCL2*-FRAG) por cromatografia de afinidade. A- Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12 % corado com *Coomassie blue*. **B-** *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-His•Tag[®]. Padrão de peso molecular: *Protein Precision Plus Dual Color* (Bio-Rad) (PM), controle não induzido (CNI); fração total pré purificação (T); fração insolúvel total (I), proteínas que não aderiram à resina (FT), lavagens (L1, L2, L3), eluições (E1, E2, E3, E4, E5, E6).

Entretanto, para a proteína *TrDCL2*-DOM destinada para o teste enzimático de atividade RNase, a expressão na fração insolúvel é um problema uma vez que requer a desnaturação proteica no processo de purificação, o que modifica a sua estrutura e pode determinar a perda da sua atividade. Sendo assim, novas estratégias estão sendo elaboradas com vistas à expressão da proteína *TrDCL2*-DOM de forma solúvel.

A dificuldade de expressar a proteína *TrDCL2* inteira

também poderia estar relacionada a uma possível ação tóxica para as bactérias, visto que se trata de uma RNase. Buscamos solucionar estes problemas realizando a expressão de dois fragmentos distintos da proteína, como já descrito, mas também realizando a expressão da proteína inteira em *E. coli* BL21(DE3) pLysS, cepa recomendável para proteínas consideradas tóxicas para essas bactérias, pois controla melhor a expressão basal da proteína que poderia levar a perda do plasmídeo e baixo crescimento celular.

Com base nessas premissas, obtivemos sucesso na expressão da proteína *TrDCL2* inteira (± 100 kDa) na fração insolúvel da bactéria *E. coli* BL21(DE3) pLysS, induzida com 1 mM de IPTG em todas as temperaturas (37, 27, 15°C) e tempos testados (3, 6 e 18 h). Entretanto, não obtivemos expressão na fração solúvel da bactéria. A confirmação foi realizada através de *Western blot* utilizando o anticorpo monoclonal anti-His•Tag[®] que revelou uma banda de tamanho esperado (± 100 kDa) em SDS-PAGE apenas na fração insolúvel (Figura 21).

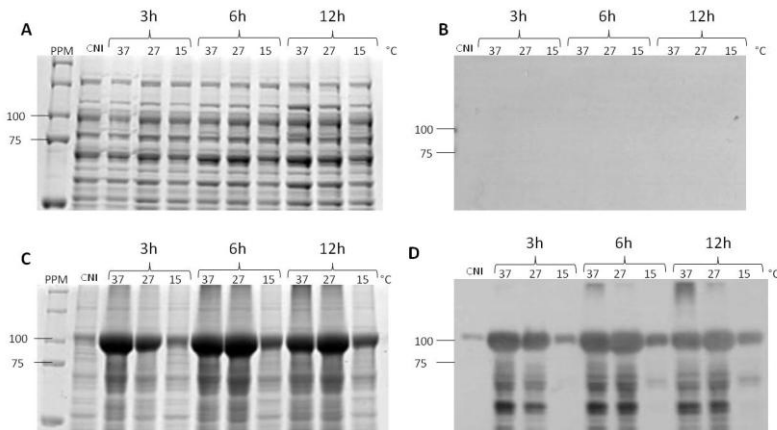


Figura 21. Análise da expressão da proteína recombinante *TrDCL2* em *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS. A e C- Géis de poliácridamida SDS-PAGE 10% corados com *Coomassie blue* da fração solúvel e insolúvel extrato proteico bacteriano, respectivamente. **B e D-** *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-His•Tag[®]. Indução da expressão heteróloga com 1mM de IPTG em diferentes temperaturas (37, 27 e 15°C) e tempos (3, 6 e 12h). PPM- Padrão de peso molecular

Protein Precision Plus Dual Color (Bio-Rad); CNI - Controle não induzido.

Até o presente momento, estamos também buscando otimizar a expressão da proteína *TrDCL2* na fração solúvel visando à realização dos testes de atividade.

5.6 Avaliação do antissoro policlonal α -*TrDCL2*-FRAG

Como obtivemos a expressão primariamente do fragmento da proteína *TrDCL2*-FRAG, este foi purificado e utilizado na inoculação de três camundongos BALB/c para induzir a produção do antissoro policlonal.

Os antissoros produzidos foram testados isoladamente contra extratos proteicos totais (50 μ g) de formas epimastigotas da cepa Choachí de *T. rangeli*. A detecção de uma banda do tamanho esperado nos extratos totais e da proteína recombinante (*rTrDCL2*) foi obtida em dois dos três antissoros produzidos (1 e 3) testados na diluição de 1:100. Dentre estes, o antissoro 3 apresentou uma detecção mais intensa que o antissoro 1, entretanto apresentou a detecção forte de uma banda inespecífica de aproximadamente 75 kDa (Figura 22). Desta forma, utilizamos o antissoro 1 nos experimentos de detecção da expressão em diferentes formas do *T. rangeli* e nos experimentos de citolocalização dos sítios de expressão da *TrDCL2*.

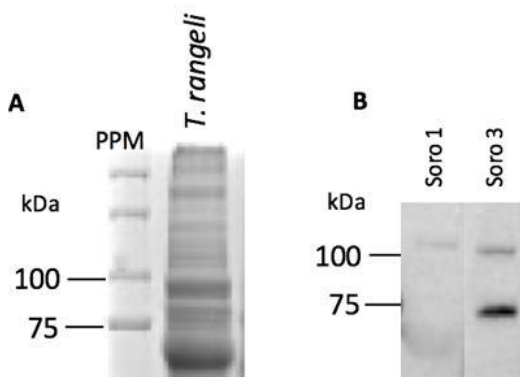


Figura 22. Reconhecimento da proteína *TrDCL2* em extrato proteico total da forma epimastigota de *Trypanosoma rangeli* utilizando os

antissoros policlonais α -TrDCL2-FRAG. A- Gel SDS-PAGE 10% corado com *Coomassie blue* da fração proteica total (50 μ g) de epimastigota de *T. rangeli*. B- *Western blot* utilizando o antissoros 1 e 3, na concentração 1:100. PPM- Padrão de peso molecular: *Protein Precision Plus Dual Color* (Bio-Rad).

O antissoro α -TrDCL2-FRAG foi testado também contra o extrato proteico total das formas tripomastigotas de *T. rangeli* (cepa Choachí), formas epimastigotas de *T. rangeli* da cepa D3493 (KP1+), formas epimastigotas de *T. rangeli* da cepa SC58 (KP1-) e da bactéria *E. coli* BL21 (DE3) pLysS sem o plasmídeo. Observa-se na figura 23 o reconhecimento da TrDCL2 tanto em epimastigotas da cepa D3493 quanto nas formas tripomastigotas da cepa Choachí, permitindo inferir que a proteína TrDCL2 é expressa nas duas formas biológicas do *T. rangeli*. A ausência no reconhecimento da TrDCL2 na cepa SC58 condiz com a análise *in silico* dessa proteína nas cepas de *T. rangeli* KP1(-) na qual previa a sua não expressão.

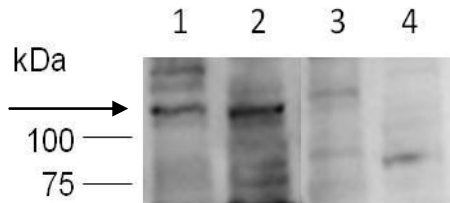


Figura 23. A proteína TrDCL2 está presente em epimastigotas e tripomastigota de *Trypanosoma rangeli*. *Western blot* utilizando o antissoro α -TrDCL2-FRAG e extratos proteicos totais de: 1) forma tripomastigota da cepa Choachí de *T. rangeli*; 2) forma epimastigota da cepa D3493 de *T. rangeli*; 3) forma epimastigota da cepa SC58; 4) lisado celular de *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS. PPM- Padrão de peso molecular: *Protein Precision Plus Dual Color* (Bio-Rad). Flecha indica a banda com o tamanho esperado para a proteína TrDCL2.

5.7 Ensaios de citolocalização dos sítios de expressão da TrDCL2 por imunofluorescência

Após a confirmação do reconhecimento da proteína TrDCL2 pelo antissoro α -TrDCL2-FRAG nos extratos proteicos dos parasitos tornou-se possível a realização do ensaio de

imunofluorescência para investigar a citolocalização da proteína.

Observamos em um único ensaio preliminar que tanto em formas epimastigotas quanto em formas tripomastigotas houve um reconhecimento difuso da *TrDCL2* no citoplasma dos parasitos permeabilizados, com uma maior intensidade da fluorescência próxima ao núcleo e ao longo do flagelo aderido ao corpo do parasito (Figura 24). Devido à utilização de um antissoro policlonal que revelou o reconhecimento inespecífico de algumas proteínas não-alvo nos ensaios de *Western blot*, faz-se necessário à purificação desse antissoro visando a realização de novos ensaios.

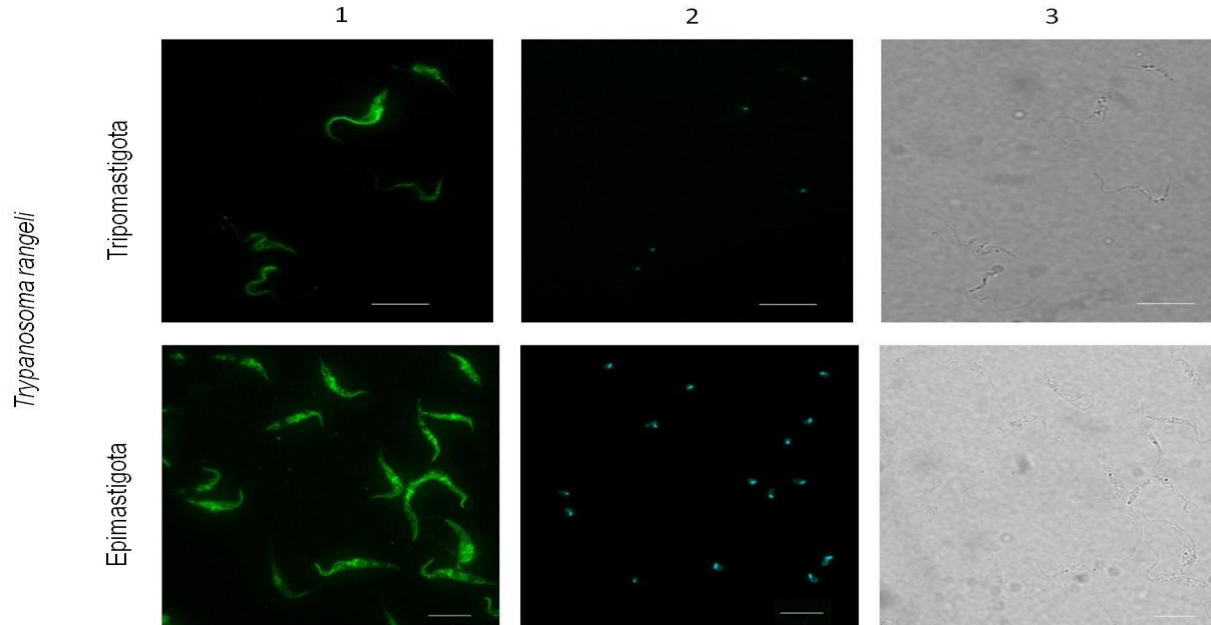


Figura 24. Citocalização da *TrDCL2* em formas tripomastigotas e epimastigotas de *Trypanosoma rangeli* por imunofluorescência utilizando o soro policlonal α -*TrDCL2*-FRAG. 1) As imagens representam micrografias da expressão da *TrDCL2* e ; 2) Núcleo e cinetoplasto corados com reagente DAPI e 3) campo claro. As barras de aumento representam 10 μ m.

5.8 Clonagem e identificação dos pequenos RNA

Antes de avaliar uma possível relação da proteína *TrDCL2* com síntese de pequenos RNA em *T. rangeli*, era preciso verificar, primeiramente, a existência desses pequenos RNA no parasito e posteriormente realizar as identificações.

Na separação do RNA total por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante, pudemos observar a existência de população de pequenos RNA com tamanho entre 20 a 30 nt (Figura 25).

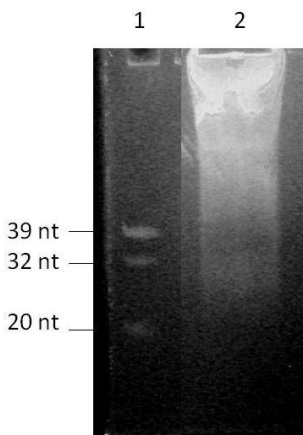


Figura 25. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 15% corado com brometo de etídio evidenciando uma população de pequenos RNA provenientes da separação do extrato de RNA total da cepa Choachí de *T. rangeli*. 1) PPM- Padrão de peso molecular (oligonucleotídeos sintetizados com tamanho conhecido); 2) Extrato de RNA total (300 µg).

Entretanto, é necessário verificar se esses pequenos RNA não são apenas produtos de degradação. Para tal, recortamos do gel a região entre 20 à 30 nt e prosseguimos a clonagem conforme descrito na seção 4.14. Após a extração dos pequenos RNA do gel, adicionamos separadamente os adaptadores nas extremidades 5' e 3' (Figura 26). Esses adaptadores contêm sequências específicas que são reconhecidas pelos iniciadores dirigidos à reação de transcrição reversa dos pequenos RNA em cDNA.

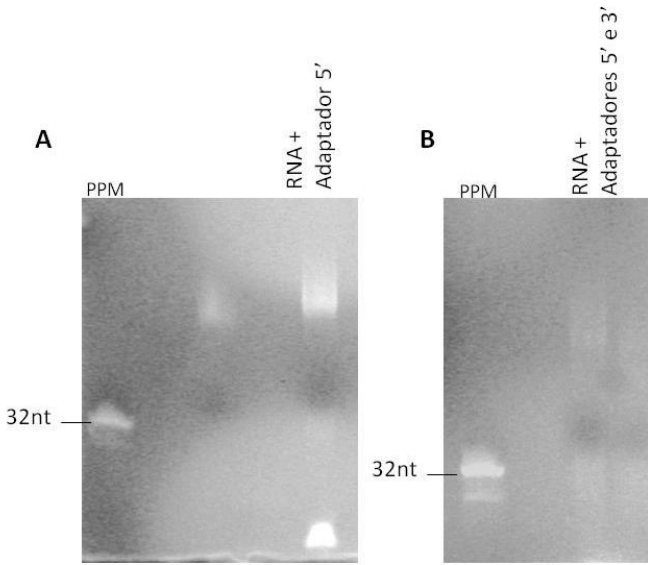


Figura 26. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 15% corado com brometo de etídio evidenciando a ligação dos adaptadores aos pequenos RNA. A - Produto da ligação do adaptador na extremidade 5' nos pequenos RNA; B - Produto da ligação do adaptador na extremidade 3' nos pequenos RNA que já continham o adaptador 5'. PPM- Padrão de peso molecular (oligonucleotídeos sintetizados com tamanho conhecido).

Podemos avaliar na figura acima que ocorreu a ligação entre os adaptadores e aos pequenos RNA devido ao aumento do seu tamanho em relação a população inicial que tinha entre 20-30 nt. O produto dessas ligações foi utilizado na reação de transcrição reversa e os cDNA resultantes dessa reação foram observados em gel de poliacrilamida não desnaturante (Figura 27).

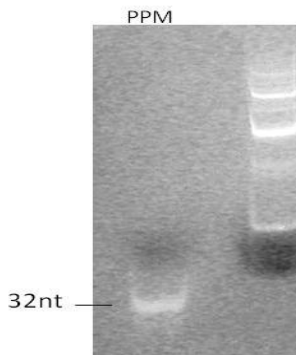


Figura 27. Eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante 15% corado com brometo de etídio mostrando os cDNA obtidos da transcrição reversa dos pequenos RNA. PPM- Padrão de peso molecular (oligonucleotídeos sintetizados com tamanho conhecido).

Os iniciadores utilizados na reação de transcrição reversa possuíam sítios de restrição para as enzimas *EcoRI* e *PstI* para facilitar a clonagem no vetor. Portanto, tanto os cDNA quanto o vetor pGEM T- easy foram digeridos com essas enzimas de restrição. Anterior a ligação, foi realizada a concatenação dos cDNA para otimizar a clonagem. O produto da ligação foi utilizado na transformação de células competentes *E. coli* DH5- α . As colônias crescidas foram analisadas por PCR de colônia utilizando iniciadores dirigidos às sequências M13 presentes no vetor e revelou bandas com diferentes tamanhos. As bandas com 249 pb correspondem ao vetor vazio (sem a presença de cDNA), os produtos contendo um único cDNA possuem \pm 260 pb e os produtos equivalentes ou maiores que 400 pb contêm pelo menos três sequências de cDNA (Figura 28).

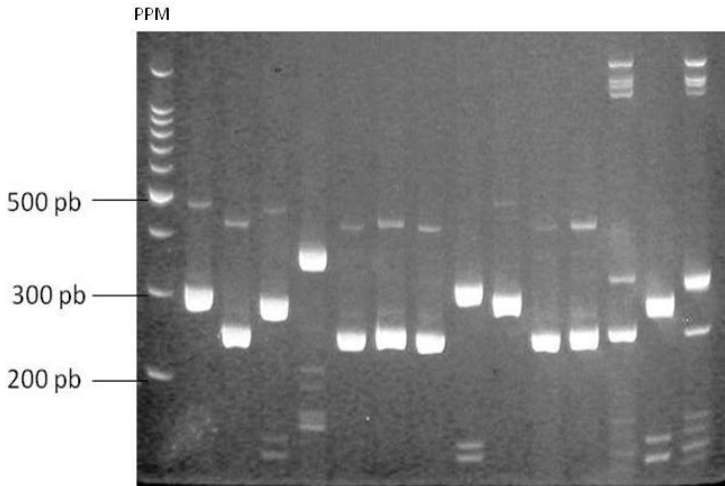


Figura 28. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% dos produtos da PCR de colônia para verificar os clones com os siRNA. PPM- Padrão de peso molecular 100pb (promega).

Foram analisadas aproximadamente 90 colônias por PCR de colônia e algumas colônias que apresentaram um produto equivalente 300 pb ou maior foram submetidas a extração plasmidial e o DNA plasmidial obtido foi preparado para o sequenciamento. Até o momento, foram sequenciadas 12 colônias, entretanto, não conseguimos identificar nenhuma sequência referente aos pequenos RNA. Encontramos apenas as sequências dos adaptadores, mas, sem a presença de uma sequência entre eles.

Entretanto, daremos continuidade nos sequenciamentos das demais colônias selecionadas, além de construir novas bibliotecas de cDNA referentes aos pequenos RNA. Pensando em outra estratégia para a identificação dos pequenos RNA, nós enviamos amostras do RNA total para a análise através do sequenciamento de RNA (RNAseq) em colaboração com o prof. João Marques na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e em Cambridge, UK.

6. DISCUSSÃO

A proteína Dicer é um dos componentes essenciais no mecanismo de RNA de interferência e desempenha um papel fundamental na biogênese de pequenos RNA (miRNA e siRNA) que são moléculas-chaves para o silenciamento gênico através da via de RNAi. Pertencente à família das enzimas RNase III, essa proteína tem como principal característica a presença do domínio RNase III, mas pode variar quanto à presença de outros domínios (DExH RNA helicase/ATPase, DUF283, PAZ, dsRBS) e quanto a sua massa molecular (135 até 200 kDa) (BERNSTEIN et al., 2001; CARMELL; HANNON, 2004; CERUTTI; CASAS-MOLLANO, 2006).

Embora a Dicer já tenha sido descrita e caracterizada em diversos protozoários tais como: *T. brucei*, *L. braziliensis*, *Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii*, entre outros, em cada uma dessas espécies apresenta características distintas, tornando-se necessário o estudo particular dessa proteína para uma dada espécie. Nesse sentido, nosso estudo foi baseado no fato de até o presente momento, não haver relato na literatura descrevendo a proteína Dicer em *T. rangeli* e tampouco sobre a presença dessa proteína em organismos deficientes do mecanismo de RNAi. Além disso, encontramos indícios da presença de uma população de pequenos RNA no *T. rangeli* que podem ou não ter relação com a atividade da *TrDCL2*.

As sequências de nucleotídeos e de aminoácidos obtidas para o gene *TrDCL2* de *T. rangeli* revelaram uma janela aberta de leitura 2.667 pb que codifica para uma proteína com 889 aminoácidos (100 kDa), mostrando-se semelhante a *DLC2* de *T. brucei* (Tb927.3.1230) o qual possui uma proteína de 2.844 pb (104 kDa) (PATRICK et al., 2009).

As análises dos domínios da proteína *TrDCL2* revelaram a presença apenas de dois domínios RNase III em sequência (RNase IIIa e RNase IIIb), assim como o descrito para as proteínas *DCL1* e *DCL2* de *T. brucei* (PATRICK et al., 2009; SHI; TSCHUDI; ULLU, 2006). Esses domínios são responsáveis por clivar o RNA dupla fita e a distância entre eles são críticas para a geração dos dois nucleotídeos desemparelhados na região 3', característico dos produtos clivados por enzimas RNase III.

Os resíduos de lisina e ácido glutâmico estão descritos

na literatura como fundamentais para a atividade enzimática, estando envolvidos no mecanismo de clivagem do RNA dupla fita rompendo a ligação fosfodiéster (DU et al., 2008; PATRICK et al., 2009). Estes resíduos foram encontrados somente na *TrDCL2* das cepas KP1(+) de *T. rangeli*. Em contraste, as cepas KP1(-) apresentaram uma conservação na porção inicial (± 340 aa) e uma perda total de conservação a partir deste ponto devido à deleção de um nucleotídeo (G^{1027}) o que determinou a alteração da janela aberta de leitura (ORF) correta e a consequente não codificação para os resíduos essenciais à atividade enzimática. Dessa forma, a inatividade da proteína *TrDCL2* nas cepas KP1(-) de *T. rangeli* poderia causar a ausência da sua expressão, o que foi confirmado pelos ensaios de *Western blot*.

As diferenças nas sequências da *DCL2* entre as cepas KP1(+) e KP1(-) de *T. rangeli* foram evidenciadas quando realizamos a análise filogenética, revelando a formação de dois clados distintos intraespecíficos separando as cepas KP1(+) das KP1(-) de cada grupo genético (Figura 10). Este resultado reforça a variação genética encontrada entre as cepas de *T. rangeli*, já demonstrado por diversos autores (GRISARD; CAMPBELL; ROMANHA, 1999; PUERTA et al., 2009; VALLEJO et al., 2002).

O número de cópias gênicas da *Dicer* varia muito entre os organismos e não guarda clara relação taxonômica ou evolutiva. Enquanto nos vertebrados e em *Schizosaccharomyces pombe* a *Dicer* é codificada por um gene de cópia única, em outros organismos como *Drosophila melanogaster*, *Neurospora crassa* e *T. brucei* existem duas cópias, chegando a quatro cópias como no caso de *Arabidopsis thaliana* (HANNON; ROSSI, 2004).

Em *T. rangeli* confirmamos existir uma cópia do gene *TrDCL2* no genoma através da técnica de *Southern blot*. Entretanto, quando foi realizada a busca pelos demais componentes do mecanismo de RNAi no genoma do *T. rangeli* encontrou-se um pseudogene da *DCL1* (STOCO et al., 2014). Dessa forma, inferimos que o *T. rangeli* deve ter possuído duas cópias do gene *DCL* (*DCL1* e *DCL2*), mas que ao longo da evolução do organismo, o gene *DCL1* deve ter perdido sua funcionalidade a partir de uma mutação que o tornou um pseudogene.

A natureza não funcional do pseudogene *TrDCL1* pode estar relacionado ao fato de que em alguns organismos a *DCL1*

está envolvida principalmente na biogênese de miRNA, entretanto presença de miRNA em protozoários ainda é incerta (ATAYDE; TSCHUDI; ULLU, 2011; GRIMSON et al., 2008), ao passo que a DCL2 produz principalmente os siRNA que são abundantemente encontrados nos protozoários (TSCHUDI et al., 2012; ULLU; LUJAN; TSCHUDI, 2005; ZHANG; DYER; ROSENBERG, 2002).

Sabe-se que a proteína DCL2 de *Drosophila* spp. possui um papel essencial na defesa contra infecções por vírus de RNA (GALIANA-ARNOUX et al., 2006) e, curiosamente, a DCL2 foi subsequentemente perdida nas linhagens que desenvolveram estratégias antivirais alternativas, como nos vertebrados (MUKHERJEE; CAMPOS; KOLACZKOWSKI, 2013). Em termos evolutivos, a perda de funcionalidade do gene DCL1 de *T. rangeli* e do gene DCL2 dos vertebrados pode estar relacionado à presença de outras vias de controle da expressão gênica não sendo a atividade desses produtos gênicos essenciais à regulação e/ou sobrevivência celular desses organismos. Estando menos sujeitos a pressão seletiva para a manutenção de sua funcionalidade, estes genes podem ter acumulado mutações que levaram à sua perda de função.

Os resultados da qPCR revelaram que não houve diferenças significativas nos níveis de transcrição gene *TrDCL2* durante o processo de diferenciação celular *in vitro* de formas epimastigotas em formas tripomastigotas do *T. rangeli*. Entretanto, não podemos afirmar que estes parasitos possuam o mesmo nível de expressão proteica, pois, nos tripanosomatídeos não há uma relação direta entre os níveis de transcritos com os níveis de expressão proteica. Isso se deve à falta de um controle específico durante a transcrição e eventos pré e pós-transcricionais (DAROCHASILVA et al., 2004; TEIXEIRA, 1998).

Uma alternativa que podemos realizar para avaliar a expressão do gene seria através de ensaios de *Western blot* utilizando um gene normalizador com expressão constitutiva para comparar a intensidade das bandas pelo programa ImageJ. A junção dos métodos de qPCR e *Western blot* nos daria um resultado mais fidedigno.

Com o intuito de produzir um antissoro contra a proteína *TrDCL2* realizamos a sua expressão heteróloga. Para tal, diversos métodos e sistemas de expressões foram testados. A princípio utilizamos o sistema bacteriano (*E. coli*) devido às

vantagens relacionadas à fácil manipulação, rápido crescimento, reprodutibilidade e taxas de produção elevadas. Entretanto, esse sistema apresenta algumas desvantagens como a incapacidade de realizar algumas modificações pós-traducionais e as proteínas são expressas geralmente na fração insolúvel em corpos de inclusão (BANEYX, 1999).

O sistema de expressão em protozoários (*L. tarentolae* e *T. rangeli*) também foi testado, mas sem sucesso na expressão da proteína. Este resultado pode ser explicado pelo fato de que os tripanosomatídeos realizam transcrição do tipo policistrônica e não fazem a maturação de todos os transcritos, portanto apenas a presença do mRNA não garante que ele seja traduzido. Entretanto, há a possibilidade de que houve a transcrição, a geração do mRNA maduro e a expressão da proteína, porém a cauda de histidina pode estar oculta devido ao dobramento da proteína ou possa ter sido clivada, não sendo possível sua detecção com o anticorpo monoclonal anti-His•Tag[®] em ensaios de *Western blot*.

Uma vez que a massa molecular de uma proteína é outro fator limitante na expressão em sistema procarioto e a *TrDCL2* possui aproximadamente 100 kDa, seu tamanho pode ter sido um impeditivo para a expressão no sistema *E. coli* BL21(DE3) *Codon plus*. Face aos resultados negativos, optamos por realizar a expressão de fragmentos da proteína (*TrDCL2-DOM* com 406 pb e *TrDCL2-FRAG* com 485 pb), utilizando a mesma cepa de *E. coli*, tendo obtido sucesso com essa estratégia. Na literatura, a maioria dos trabalhos descritos para expressão heteróloga de Dicer utilizou o sistema de expressão de Baculovirus (bac-to-bac) (MACRAELI et al., 2006; PODOLSKA et al., 2014) e relataram dificuldades de expressão no sistema bacteriano (MA et al., 2012).

Outro fator a ser considerado nos sistemas procariotos é a possível toxicidade dos produtos de expressão heteróloga para as bactérias. Nesse sentido, existem relatos de toxicidade das proteínas da família RNase III, as quais causam danos celulares e inviabilizam o crescimento bacteriano (LEHRER et al., 1989; ZHANG; DYER; ROSENBERG, 2002). No caso específico da *TrDCL2*, observamos que a mesma somente foi expressa na cepa *E. coli* BL21 (DE3) pLysS que possui maior resistência à proteínas tóxicas pois, contém o gene da T7 RNA polimerase controlada pelo promotor *lacUV5* no seu DNA cromossômico e

pelo gene T7 lisozima encontrado no plasmídeo pLysS. Quando é adicionado o IPTG no meio ele induz a expressão da T7 RNA polimerase, que por sua vez induz a altos níveis de expressão da proteína de interesse que está sob controle do promotor T7 no vetor de expressão, que neste caso era o pET14b. A T7 lisozima suprime a atividade da T7 DNA polimerase, o que reduz a expressão basal da proteína de interesse. Sendo assim, a presença de T7 lisozima mantém a expressão proteica mais controlada o que diminui seus níveis aumentando a tolerância de *E. coli* à toxicidade que proteínas heterólogas possam apresentar (pET System Manual by Novagem).

Com base em todos os testes realizados com as diferentes linhagens bacterianas, conseguimos expressar dois fragmentos da *TrDCL2* (*TrDCL2*-FRAG e *TrDCL2*-DOM) assim como a proteína completa. O fragmento *TrDCL2*-FRAG foi utilizado na produção de um antissoro policlonal com o intuito de determinar a expressão proteica e a citolocalização da proteína *TrDCL2* no *T. rangeli*. Apesar de termos conseguido a expressão do fragmento *TrDCL2*-DOM, o qual será utilizado na avaliação da atividade do domínio catalítico em estudos futuros, optamos por não prosseguir com os mesmos neste momento em função de termos obtido a expressão da *TrDCL2* completa.

O antissoro anti-*TrDCL2*-FRAG foi capaz de reconhecer um polipeptídeo de cerca de 100 kDa na fração total de proteínas de formas epimastigotas e tripomastigotas do *T. rangeli*, sendo compatível como tamanho esperado para a *TrDCL2*. Uma vez que o antissoro policlonal anti-*TrDCL2*-FRAG não se revelou mono-específico, tendo reconhecido outras proteínas, estamos testando métodos visando purificar este antissoro policlonal, como por exemplo, a purificação por afinidade do soro imune (ESPINDOLA et al., 2000). Uma segunda alternativa que estamos considerando é a produção de um novo antissoro utilizando a proteína *TrDCL2* completa, uma vez que moléculas maiores tendem a ser mais imunogênicas e podem ter um número maior de epítomos específicos.

Apesar desses processos a realizar, utilizamos o antissoro policlonal anti-*TrDCL2*-FRAG em um ensaio preliminar de citolocalização no qual observamos um padrão de reconhecimento difuso no citoplasma, não nos permitindo concluir uma citolocalização para *TrDCL2* em função do reconhecimento inespecífico observado nos ensaios de *Western*

blot. Além disso, este resultado difere da localização da DCL2 de *T. brucei* que se encontra no núcleo e se assemelha com o padrão de citolocalização da *TbDCL1* também encontrada no citoplasma (PATRICK et al., 2009).

Especula-se que a localização subcelular das isoformas da proteína DCL estaria relacionada com a sua função, por exemplo, a DCL2 de *T. brucei* que se encontra no núcleo e está envolvida na manutenção da estabilidade genômica frente à retrotransposons e transcritos repetidos, já a DCL1 encontrada no citoplasma atua no controle de dsRNA exógeno. (PATRICK et al., 2009).

Entretanto, nos organismos que possuem apenas uma isoforma da proteína DCL, como no caso da *Giardia lamblia* (SARAIYA; WANG, 2008) e de mamíferos (BILLY et al., 2001), está proteína encontra-se apenas no citoplasma. Visto que *T. rangeli* possui apenas uma Dicer o resultado encontrado não difere do que ocorre com outros organismos com uma única Dicer.

Os resultados obtidos neste trabalho confirmaram a presença do gene *TrDCL2* no genoma *T. rangeli*, assim como demonstrou pela primeira vez a presença da proteína *TrDCL2* nesse parasito. Este fato nos faz questionar sobre a funcionalidade dessa proteína em um parasito que não possui o mecanismo de RNAi.

Sabendo que a função da DCL em organismos com o mecanismo de RNAi funcional está relacionada com a síntese de pequenos dsRNA nos faz pensar na hipótese de que a DCL2 de *T. rangeli* possa ter mantido esta função, entretanto, os pequenos dsRNA é que desempenhariam uma função diferente, ou seja, não seriam utilizados como um guia para encontrar e mRNA alvo do silenciamento, mas estariam relacionadas a outras funções regulatórias. Como exemplo podemos citar os pequenos dsRNA originados da clivagem de RNA transportador encontrados no *T. cruzi* que parece estar relacionado com a regulação da expressão gênica (GARCIA-SILVA et al., 2010).

Entretanto a origem desses pequenos RNA em *T. cruzi* ainda é desconhecida, pois nenhum dos genes que codificam para proteínas que possuem a função de gerar pequenos RNA como a DICER, Angiogenina e T2 RNase foram encontrados no seu genoma (GARCIA-SILVA et al., 2010), provavelmente este parasito utiliza uma via alternativa para gerar seus pequenos

RNA.

Em mamíferos a proteína Dicer é responsável pela síntese tanto dos siRNA, relacionados ao mecanismo de RNAi, quanto dos pequenos dsRNA originados da clivagem de RNA transportador que estão relacionados a diferentes funções que não envolvem o mecanismo de RNAi (COLE et al., 2009). Dessa maneira supomos que o *T. rangeli* também possa utilizar a proteína *TrDCL2* para gerar os seus pequenos dsRNA.

A caracterização molecular e confirmação da presença da proteína *TrDCL2* em *T. rangeli* demonstradas neste trabalho abrem novas perspectivas em relação a sua função e uma possível relação com pequenos dsRNA desse parasito.

7. CONCLUSÕES

- O gene *TrDCL2* das cepas de *T. rangeli* KP1(+) apresentaram uma janela aberta de leitura com 2.667 pb, codificando para uma proteína com 889 aminoácidos (100 kDa) enquanto que as cepas KP1(-) apresentaram códons de parada ao longo das sequências. A análise comparativa das sequências de aminoácidos da *TrDCL2* revelou a presença dos dois domínios conservados (RNase IIIa e RNase IIIb) e dos resíduos lisina e ácido glutâmico somente as cepas de *T. rangeli* KP1(+). As diferenças entre as cepas KP1(+) e KP1(-) de *T. rangeli* definiu a separação das mesmas em uma análise filogenética;
- A análise do gene *TrDCL2* por *Southern blot* apontou um padrão simples de clivagem, sugestivo de cópia única;
- Os níveis de transcritos do gene *TrDCL2* da cepa Choachí KP1(+) de *T. rangeli* não mostraram alterações significativas durante o processo de diferenciação celular *in vitro* de formas epimastigotas à forma tripomastigotas. Houve reconhecimento de uma proteína do tamanho esperado (\pm 100 kDa) pelo antissoro policlonal α -*TrDCL2*-FRAG nos extratos proteicos totais em ambas as formas. Mas, nos extratos da cepa SC58 de *T. rangeli* não houve esse reconhecimento o que indica a ausência da expressão nas cepas KP1(-) como previsto nas análises *in silico*;
- Os resultados preliminares da imunofluorescência indireta apontam a distribuição da *TrDCL2* pelo citoplasma de forma difusa tanto em formas epimastigotas quanto em formas tripomastigotas de *T. rangeli*.
- Foi encontrada uma população de pequenos RNA (20-30 nt) em *T. rangeli* cepa Choachí, entretanto a identificação deles ainda não foi concluída neste trabalho.

Assim, este trabalho revelou pela primeira vez a presença da proteína *TrDCL2* na cepa Choachí de *T. rangeli* tanto na forma epimastigota quanto na tripomastigota, assim como a presença de uma população de pequenos RNA. Entretanto uma possível relação entre a proteína *TrDCL2* e os pequenos RNA ainda precisa ser investigada. Os resultados obtidos neste trabalho nos indica que essa proteína possa ter alguma função biológica no *T. rangeli*, apesar desse parasito não apresentar o mecanismo de RNAi.

8. PERSPECTIVAS

Embora o mecanismo de RNAi não esteja ativo no *T. rangeli*, a caracterização molecular realizada neste trabalho da proteína DCL2, que é remanescente desse mecanismo, possibilitará novos estudos sobre a sua atividade enzimática e o possível papel que desempenha neste parasito.

Com esse intuito, poderá ser feita a avaliação da atividade da proteína recombinante *TrDCL2* obtida neste trabalho, assim como da proteína endógena dos extratos proteicos totais de *T. rangeli*, avaliando a sua capacidade de gerar pequenos RNA.

Além disso, abre a possibilidade de explorar os siRNA existentes nesse parasito e talvez correlacionar a função da *TrDCL2* com a biossíntese dos siRNA. Para tal, continuaremos com os ensaios de identificação dos siRNA e além disso, já enviamos amostras de RNA total de *T. rangeli* para a realização do RNAseq em colaboração com o prof. João Marques na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e em Cambridge, UK.

Por fim, esses estudos poderão auxiliar uma melhor compreensão do comportamento do mecanismo de RNAi durante a evolução dos tripanosomatídeos.

9. REFERÊNCIAS

ABRAHANTE, J. E.; DAUL, A. L.; LI, M. et al. The *Caenorhabditis elegans* hunchback-like gene *lin-57/hbl-1* controls developmental time and is regulated by microRNAs. **Dev Cell**, v. 4, n. 5, p. 625-37, May. 2003.

ABUIN, G.; FREITAS-JUNIOR, L. H. G.; COLLI, W. et al. Expression of trans-sialidase and 85-kDa glycoprotein genes in *Trypanosoma cruzi* is differentially regulated at the post-transcriptional level by labile protein factors. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 274, p. 13041-13047, 1999.

AFCHAIN, D.; LE RAY, D.; FRUIT, J. et al. Antigenic make-up of *Trypanosoma cruzi* culture forms: identification of a specific component. **J Parasitol**, v. 65, n. 4, p. 507-14, Aug. 1979.

ANEZ, N.; EAST, J. S. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 II. Its effect on feeding behaviour of triatomine bugs. **Acta Trop**, v. 41, n. 1, p. 93-5, Mar. 1984.

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.

ATAYDE, V. D.; TSCHUDI, C.; ULLU, E. The emerging world of small silencing RNAs in protozoan parasites. **Trends Parasitol**, v. 27, n. 7, p. 321-7, Jul. 2011.

BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Curr Opin Biotechnol**, v. 10, n. 5, p. 411-21, Oct. 1999.

BERNSTEIN, E.; CAUDY, A. A.; HAMMOND, S. M. et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature**, v. 409, n. 6818, p. 363-6, Jan 18. 2001.

BEST, A.; HANDOKO, L.; SCHLUTER, E. et al. *In vitro* synthesized small interfering RNAs elicit RNA interference in african trypanosomes: an *in vitro* and *in vivo* analysis. **J Biol Chem**, v. 280, n. 21, p. 20573-9, May 27. 2005.

BILLY, E.; BRONDANI, V.; ZHANG, H. et al. Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 25, p. 14428-33, Dec 4. 2001.

BLASZCZYK, J.; TROPEA, J. E.; BUBUNENKO, M. et al. Crystallographic and modeling studies of RNase III suggest a mechanism for double-stranded RNA cleavage. **Structure**, v. 9, n. 12, p. 1225-36, Dec. 2001.

BOSHER, J. M.; LABOUESSE, M. RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. **Nat Cell Biol**, v. 2, n. 2, p. E31-6, Feb. 2000.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

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

CARMELL, M. A.; HANNON, G. J. RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. **Nat Struct Mol Biol**, v. 11, n. 3, p. 214-8, Mar. 2004.

CERUTTI, H.; CASAS-MOLLANO, J. A. On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. **Curr Genet**, v. 50, n. 2, p. 81-99, Aug. 2006.

CLAYTON, C. E. Life without transcriptional control? From fly to human and back again. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 8, p. 1881-1888, 2002.

COLE, C.; SOBALA, A.; LU, C. et al. Filtering of deep sequencing data reveals the existence of abundant Dicer-dependent small RNAs derived from tRNAs. **RNA**, v. 15, n. 12, p. 2147-60, Dec. 2009.

CONRAD, C.; RAUHUT, R. Ribonuclease III: new sense from nuisance. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 34, n. 2, p. 116-29, Feb. 2002.

DAROCHA, W. D.; OTSU, K.; TEIXEIRA, S. M. et al. Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 133, n. 2, p. 175-86, Feb. 2004.

DAROCHA, W. D.; SILVA, R. A.; BARTHOLOMEU, D. C. et al. Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. **Parasitol Res**, v. 92, n. 2, p. 113-20, Jan. 2004.

DJIKENG, A.; SHI, H.; TSCHUDI, C. et al. RNA interference in *Trypanosoma brucei*: cloning of small interfering RNAs provides evidence for retroposon-derived 24-26-nucleotide RNAs. **RNA**, v. 7, n. 11, p. 1522-30, Nov. 2001.

DU, Z.; LEE, J. K.; TJHEN, R. et al. Structural and biochemical insights into the dicing mechanism of mouse Dicer: a conserved lysine is critical for dsRNA cleavage. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 7, p. 2391-6, Feb 19. 2008.

EGER-MANGRICH, I.; DE OLIVEIRA, M. A.; GRISARD, E. C. et al. Interaction of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 with different cell lines in vitro. **Parasitol Res**, v. 87, n. 6, p. 505-9, Jun. 2001.

ESPINDOLA, F. S.; SUTER, D. M.; PARTATA, L. B. et al. The light chain composition of chicken brain myosin-Va: calmodulin, myosin-II essential light chains, and 8-kDa dynein light chain/PIN. **Cell Motil Cytoskeleton**, v. 47, n. 4, p. 269-81, Dec. 2000.

FIRE, A. RNA-triggered gene silencing. **Trends Genet**, v. 15, n. 9, p. 358-63, Sep. 1999.

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. 806-11, Feb 19. 1998.

GALIANA-ARNOUX, D.; DOSTERT, C.; SCHNEEMANN, A. et al. Essential function in vivo for Dicer-2 in host defense against RNA viruses in drosophila. **Nat Immunol**, v. 7, n. 6, p. 590-7, Jun. 2006.

GARCIA-SILVA, M. R.; FRUGIER, M.; TOSAR, J. P. et al. A population of tRNA-derived small RNAs is actively produced in *Trypanosoma cruzi* and recruited to specific cytoplasmic granules. **Mol Biochem Parasitol**, v. 171, n. 2, p. 64-73, Jun. 2010.

GRIMSON, A.; SRIVASTAVA, M.; FAHEY, B. et al. Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals. **Nature**, v. 455, n. 7217, p. 1193-7, Oct 30. 2008.

GRISARD; STEINDEL. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*. In: NEVES, D. P. (Ed.). **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 109-113.

GRISARD; STEINDEL, M.; GUARNERI, A. A. et al. Characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated in Central and South America: an overview. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 2, p. 203-9, Mar-Apr. 1999.

GRISARD, E. C.; CAMPBELL, D. A.; ROMANHA, A. J. Mini-exon gene sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. **Parasitology**, v. 118, p. 375-382, 1999.

GUHL, F.; VALLEJO, G. A. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: an updated review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 435-442 2003.

HANNON, G. J. RNA interference. **Nature**, v. 418, n. 6894, p. 244-51, Jul 11. 2002.

HANNON, G. J.; ROSSI, J. J. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 371-8, Sep 16. 2004.

HAUSSECKER, D.; HUANG, Y.; LAU, A. et al. Human tRNA-derived small RNAs in the global regulation of RNA silencing. **RNA**, v. 16, n. 4, p. 673-95, Apr. 2010.

HIRAGURI, A.; ITOH, R.; KONDO, N. et al. Specific interactions between Dicer-like proteins and HYL1/DRB-family dsRNA-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Mol Biol**, v. 57, n. 2, p. 173-88, Jan. 2005.

JASKIEWICZ, L.; FILIPOWICZ, W. Role of Dicer in posttranscriptional RNA silencing. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 320, p. 77-97, 2008.

KETTING, R. F.; FISCHER, S. E.; BERNSTEIN, E. et al. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. **Genes Dev**, v. 15, n. 20, p. 2654-9, Oct 15. 2001.

KOERICH, L. B.; EMMANUELLE-MACHADO, P.; SANTOS, K. et al. Differentiation of *Trypanosoma rangeli*: high production of infective trypomastigote forms *in vitro*. **Parasitology Research**, v. 88, n. 1, p. 21-25, 2002.

KOLEV, N. G.; TSCHUDI, C.; ULLU, E. RNA interference in protozoan parasites: achievements and challenges. **Eukaryot Cell**, v. 10, n. 9, p. 1156-63, Sep. 2011.

KRAUTZ-PETERSON, G.; SKELLY, P. J. *Schistosoma mansoni*: the dicer gene and its expression. **Exp Parasitol**, v. 118, n. 1, p. 122-8, Jan. 2008.

LAMONTAGNE, B.; TREMBLAY, A.; ABOU ELELA, S. The N-terminal domain that distinguishes yeast from bacterial RNase III contains a dimerization signal required for efficient double-stranded RNA cleavage. **Mol Cell Biol**, v. 20, n. 4, p. 1104-15, Feb. 2000.

LANDFEAR, S. M. Trypanosomatid transcription factors: Waiting for Godot. **PNAS**, v. 100, n. 1, p. 7-9, 2003.

LEE, Y. S.; NAKAHARA, K.; PHAM, J. W. et al. Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. **Cell**, v. 117, n. 1, p. 69-81, Apr 2. 2004.

LEHRER, R. I.; SZKLAREK, D.; BARTON, A. et al. Antibacterial properties of eosinophil major basic protein and eosinophil cationic protein. **J Immunol**, v. 142, n. 12, p. 4428-34, Jun 15. 1989.

LIU, Q.; RAND, T. A.; KALIDAS, S. et al. R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway. **Science**, v. 301, n. 5641, p. 1921-5, Sep 26. 2003.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{(-\Delta\Delta C(T))}$ Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LLAVE, C.; XIE, Z.; KASSCHAU, K. D. et al. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. **Science**, v. 297, n. 5589, p. 2053-6, Sep 20. 2002.

LYE, L. F.; OWENS, K.; SHI, H. et al. Retention and loss of RNA interference pathways in trypanosomatid protozoans. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 10, p. e1001161, 2010.

MA, E.; ZHOU, K.; KIDWELL, M. A. et al. Coordinated activities of human dicer domains in regulatory RNA processing. **J Mol Biol**, v. 422, n. 4, p. 466-76, Sep 28. 2012.

MACHADO, P. E.; EGER-MANGRICH, I.; ROSA, G. et al. Differential susceptibility of triatomines of the genus *Rhodnius* to *Trypanosoma rangeli* strains from different geographical origins. **Int J Parasitol**, v. 31, n. 5-6, p. 632-4, May 1. 2001.

MACRAE, I. J.; LI, F.; ZHOU, K. et al. Structure of Dicer and mechanistic implications for RNAi. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 71, p. 73-80, 2006.

MACRAE, I. J.; ZHOU, K.; LI, F. et al. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. **Science**, v. 311, n. 5758, p. 195-8, Jan 13. 2006.

MARTENS, H.; NOVOTNY, J.; OBERSTRASS, J. et al. RNAi in Dictyostelium: the role of RNA-directed RNA polymerases and double-stranded RNase. **Mol Biol Cell**, v. 13, n. 2, p. 445-53, Feb. 2002.

MARTÍNEZ-CALVILLO, S.; VIZUET-DE-RUEDA, J. C.; FLORENCIO-MARTÍNEZ, L. E. et al. Gene Expression in Trypanosomatid Parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2010.

MOLYNEUX, D. Division of the human trypanosome, *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 67, n. 3, p. 371-2, Sep. 1973.

MUKHERJEE, K.; CAMPOS, H.; KOLACZKOWSKI, B. Evolution of animal and plant dicers: early parallel duplications and recurrent adaptation of antiviral RNA binding in plants. **Mol Biol Evol**, v. 30, n. 3, p. 627-41, Mar. 2013.

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. **Plant Cell**, v. 2, n. 4, p. 279-289, Apr. 1990.

NGO, H.; TSCHUDI, C.; GULL, K. et al. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 25, p. 14687-92, Dec 8. 1998.

NICHOLSON, A. W. Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases. **FEMS Microbiol Rev**, v. 23, n. 3, p. 371-90, Jun. 1999.

OSORIO, Y.; TRAVI, B. L.; PALMA, G. I. et al. Infectivity of *Trypanosoma rangeli* in a promonocytic mammalian cell line. **J Parasitol**, v. 81, n. 5, p. 687-93, Oct. 1995.

PALATNIK, J. F.; ALLEN, E.; WU, X. et al. Control of leaf morphogenesis by microRNAs. **Nature**, v. 425, n. 6955, p. 257-63, Sep 18. 2003.

PATRICK, K. L.; SHI, H.; KOLEV, N. G. et al. Distinct and overlapping roles for two Dicer-like proteins in the RNA interference pathways of the ancient eukaryote *Trypanosoma brucei*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 42, p. 17933-8, Oct 20. 2009.

PFEFFER, S.; LAGOS-QUINTANA, M.; TUSCHL, T. Cloning of small RNA molecules. **Curr Protoc Mol Biol**, v. Chapter 26, p. Unit 26 4, Nov. 2005.

PODOLSKA, K.; SEDLAK, D.; BARTUNEK, P. et al. Fluorescence-based high-throughput screening of dicer cleavage activity. **J Biomol Screen**, v. 19, n. 3, p. 417-26, Mar. 2014.

POMPEY, J. M.; FODA, B.; SINGH, U. A Single RNaseIII Domain Protein from *Entamoeba histolytica* Has dsRNA Cleavage Activity and Can Help Mediate RNAi Gene Silencing in a Heterologous System. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0133740, 2015.

PRESTES, E. B. Marcadores moleculares e morfológicos da citocinese em *Trypanosoma rangeli*. Dissertação. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

PUERTA, C. J.; SINCERO, T. C.; STOCO, P. H. et al. Comparative analysis of *Trypanosoma rangeli* histone H2A gene intergenic region with distinct intraspecific lineage markers. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 9, n. 5, p. 449-56, Oct. 2009.

RAND, T. A.; PETERSEN, S.; DU, F. et al. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. **Cell**, v. 123, n. 4, p. 621-9, Nov 18. 2005.

REAL, F.; VIDAL, R. O.; CARAZZOLLE, M. F. et al. The genome sequence of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*: functional annotation and extended analysis of gene models. **DNA Res**, v. 20, n. 6, p. 567-81, Dec. 2013.

RECINOS, R. F.; KIRCHHOFF, L. V.; DONELSON, J. E. Cell cycle expression of histone genes in *Trypanosoma cruzi*.

Molecular & Biochemical Parasitology, v. 113, p. 215-222, 2001.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor, 2001.

SARAIYA, A. A.; WANG, C. C. snoRNA, a novel precursor of microRNA in *Giardia lamblia*. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 11, p. e1000224, Nov. 2008.

SHARP, P. A. RNAi and double-strand RNA. **Genes Dev**, v. 13, n. 2, p. 139-41, Jan 15. 1999.

SHI, H.; TSCHUDI, C.; ULLU, E. An unusual Dicer-like1 protein fuels the RNA interference pathway in *Trypanosoma brucei*. **RNA**, v. 12, n. 12, p. 2063-72, Dec. 2006.

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, p. 443, 2015.

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J Mol Biol**, v. 98, n. 3, p. 503-17, Nov 5. 1975.

STEINDEL, M. Caracterização de cepas de *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi* isolados de reservatórios e vetores silvestres em Santa Catarina. Universidade Federal de Minas Gerais, 1993.

STOCO, P. H.; WAGNER, G.; GERBER, A. et al. Genome of the avirulent human-infective Trypanosome - *Trypanosoma rangeli*. **Plos NTD**, 2014.

STUART, K. Kinetoplast DNA, mitochondrial DNA with a difference. **Mol Biochem Parasitol**, v. 9, n. 2, p. 93-104, Oct. 1983.

TANOURA, K.; YANAGI, T.; DE GARCIA, V. M. et al. *Trypanosoma rangeli*-in vitro metacyclogenesis and fate of

metacyclic trypomastigotes after infection to mice and fibroblast cultures. **J Eukaryot Microbiol**, v. 46, n. 1, p. 43-8, Jan-Feb. 1999.

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

TSCHUDI, C.; SHI, H.; FRANKLIN, J. B. et al. Small interfering RNA-producing loci in the ancient parasitic eukaryote *Trypanosoma brucei*. **BMC Genomics**, v. 13, p. 427, 2012.

ULLU, E.; LUJAN, H. D.; TSCHUDI, C. Small sense and antisense RNAs derived from a telomeric retroposon family in *Giardia intestinalis*. **Eukaryot Cell**, v. 4, n. 6, p. 1155-7, Jun. 2005.

ULLU, E.; TSCHUDI, C.; CHAKRABORTY, T. RNA interference in protozoan parasites. **Cell Microbiol**, v. 6, n. 6, p. 509-19, Jun. 2004.

URDANETA-MORALES, S.; TEJERO, F. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: mouse model for high, sustained parasitemia. **J Parasitol**, v. 71, n. 4, p. 409-14, Aug. 1985.

URREA, D. A.; CARRANZA, J. C.; CUBA, C. A. et al. Molecular characterisation of *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius ecuadoriensis* in Peru, *R. colombiensis* in Colombia and *R. pallescens* in Panama, supports a co-evolutionary association between parasites and vectors. **Infect Genet Evol**, v. 5, n. 2, p. 123-9, Mar. 2005.

VALLEJO, G. A.; GUHL, F.; CARRANZA, J. C. et al. kDNA markers define two major *Trypanosoma rangeli* lineages in Latin-America. **Acta Tropica**, v. 81, n. 1, p. 77-82, 2002.

VALLEJO, G. A.; GUHL, F.; CARRANZA, J. C. et al. Parity between kinetoplast DNA and mini-exon gene sequences supports either clonal evolution or speciation in *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius colombiensis*, *R.*

pallescens and *R. prolixus* in Colombia. **Infect Genet Evol**, v. 3, n. 1, p. 39-45, May. 2003.

ZHANG, J.; DYER, K. D.; ROSENBERG, H. F. RNase 8, a novel RNase A superfamily ribonuclease expressed uniquely in placenta. **Nucleic Acids Res**, v. 30, n. 5, p. 1169-75, Mar 1. 2002.

10. ANEXOS

Romero et al. *Parasites & Vectors* 2014, 7:197
<http://www.parasitesandvectors.com/content/7/1/197>



RESEARCH

Open Access

Transsulfuration is an active pathway for cysteine biosynthesis in *Trypanosoma rangeli*

Ibeth Romero^{1*}, Jair Téllez^{1*}, Laís Eiko Yamanaka¹, Mario Steindel¹, Alvaro José Romanha^{1,2} and Edmundo Carlos Grisard^{1*}

Abstract

Background: Cysteine, a sulfur-containing amino acid, plays an important role in a variety of cellular functions such as protein biosynthesis, methylation, and polyamine and glutathione syntheses. In trypanosomatids, glutathione is conjugated with spermidine to form the specific antioxidant thiol trypanothione (T[SH]₂) that plays a central role in maintaining intracellular redox homeostasis and providing defence against oxidative stress.

Methods: We cloned and characterised genes coding for a cystathionine β-synthase (CβS) and cysteine synthase (CS), key enzymes of the transsulfuration and assimilatory pathways, respectively, from the hemoflagellate protozoan parasite *Trypanosoma rangeli*.

Results: Our results show that *T. rangeli* CβS (TrCβS), similar to its homologs in *T. cruzi*, contains the catalytic domain essential for enzymatic activity. Unlike the enzymes in bacteria, plants, and other parasites, *T. rangeli* CS lacks two of the four lysine residues (Lys²⁶ and Lys¹⁸⁴) required for activity. Enzymatic studies using *T. rangeli* extracts confirmed the absence of CS activity but confirmed the expression of an active CβS. Moreover, CβS biochemical assays revealed that the *T. rangeli* CβS enzyme also has serine sulphydrylase activity.

Conclusion: These findings demonstrate that the RTS pathway is active in *T. rangeli*, suggesting that this may be the only pathway for cysteine biosynthesis in this parasite. In this sense, the RTS pathway appears to have an important functional role during the insect stage of the life cycle of this protozoan parasite.

Keywords: Cysteine biosynthesis, Cystathionine β-synthase, Cysteine synthase, *T. rangeli*, Thiol metabolism, Antioxidant defence

Background

L-cysteine, a sulfur-containing amino acid, is indispensable for the survival of virtually all living organisms, from bacteria to higher eukaryotes. This amino acid is implicated in several processes, including the stability, structure, regulation of catalytic activity, and post-translational modification of various proteins [1]. Due to the ability of its thiol group to undergo redox reactions, L-cysteine forms the basic building block of all thiol antioxidants, acting as a direct antioxidant and also as a precursor for the biosynthesis of glutathione, trypanothione, or ovoidiol [2]. In addition, cysteine is also essential for the synthesis of biomolecules, including

coenzyme A, hypotaurine, taurine, and ubiquitous iron-sulphur (Fe-S) clusters, which are involved in electron transfer, redox regulation, nitrogen fixation, and regulatory process sensing [3,4].

Two different routes for cysteine biosynthesis have been described: reverse-transsulfuration (RTS) and *de novo* or assimilatory pathways. RTS has been demonstrated in fungi and mammals and includes the complete process leading to cysteine from methionine via the intermediary formation of cystathionine [5]. These reactions are catalysed by two enzymes, CβS (cystathionine β-synthase), which synthesizes cystathionine from homocysteine and serine, and CGL (cystathionine γ-lyase), which forms cysteine from cystathionine [6]. The *de novo* pathway is also catalysed by two steps starting with serine acetyltransferase (SAT) to form O-acetylserine (OAS) from L-serine and acetyl-coenzyme A. Subsequently, OAS

* Correspondence: ibeth@gmail.com; edmundogrisard@ufsc.br
 *Equal contributors

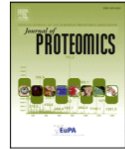
¹Laboratório de Protozoologia e de Bioinformática, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-970, Brazil
 Full list of author information is available at the end of the article



© 2014 Romero et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/jprot

The *Trypanosoma rangeli* trypomastigote surfaceome reveals novel proteins and targets for specific diagnosis

Glauber Wagner^{a, b, c}, Lais Eiko Yamanaka^a, Hércules Moura^c,
Débora Denardin Lückemeyer^a, Aline Daiane Schindwein^a, Patricia Hermes Stoco^a,
Henrique Bunselmeyer Ferreira^a, John Robert Barr^c,
Mario Steindel^a, Edmundo Carlos Grisard^{a,*}

^aLaboratórios de Protozoologia e de Bioinformática, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

^bLaboratório de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Universidade do Oeste de Santa Catarina, Joaçaba, Brazil

^cBiological Mass Spectrometry Laboratory, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA

^dLaboratório de Genômica Estrutural e Funcional, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 November 2012

Accepted 13 February 2013

Keywords:

Trypanosoma rangeli

Proteomic

Surface proteins

Antigens

GPI-anchored proteins

ABSTRACT

Sympatric distribution and sharing of hosts and antigens by *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas' disease, often incur in misdiagnosis and improper epidemiological inferences. Many secreted and surface proteins (SP) have been described as important antigens shared by these species. This work describes the *T. rangeli* surfaceome obtained by gel-free (LC-ESI-MS/MS) and gel-based (GelC-ESI-MS/MS) proteomic approaches, and immunoblotting analyses and the comparison of these SP with *T. cruzi*. A total of 138 *T. rangeli* proteins and 343 *T. cruzi* proteins were obtained, among which, 42 and 157 proteins were exclusively identified in *T. rangeli* or *T. cruzi* trypomastigotes, respectively. Immunoblotting assays using sera from experimentally infected mice revealed a distinct band pattern for each species. MS/MS analysis of *T. rangeli* exclusive bands revealed two unique GP63-related proteins and flagellar calcium-binding protein. Also, a ~32 kDa band composed of 12 distinct proteins was exclusively recognized by anti-*T. cruzi* serum. This highly sensitive proteomic assessment of surface proteins characterized the *T. rangeli* surfaceome, revealing several differences and similarities between these two parasites. The study reports new *T. rangeli*-specific proteins with promising use in differential diagnosis from *T. cruzi*.

Biological significance

In this manuscript, we report the first proteomic analysis of the *T. rangeli* surface (surfaceome), a non-pathogenic parasite occurring in sympatry with *T. cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. This comparative proteomic analysis was performed using high-throughput in-gel and gel-free proteomic approaches combined with immunoblotting, allowing us to identify new *T. rangeli*-specific proteins with promising use in differential serodiagnosis, among several other protein not previously reported for this taxon. Additionally, cross-recognition assays showed that *T. cruzi* surface proteins were recognized by heterologous serum (anti-*T. rangeli*) that strengthens the possibility of misdiagnosis of Chagas disease in humans and other mammals. Thus, this work provides new insights to

understand the serological cross-reactivity between *T. cruzi* and *T. rangeli*, as well as, the

* Corresponding author at: Laboratório de Protozoologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Setor F, Bloco A, Caixa Postal 476, Trindade, Florianópolis, SC 88040-970, Brazil. Tel.: +55 48 3721 2955; fax: +55 48 3721 9258.

E-mail address: edmundo.grisard@ufsc.br (E.C. Grisard).