

ZAMIRA GUERRA SOARES

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ARGONAUTA
TcPIWI E DE PEQUENOS RNAs EM *Trypanosoma cruzi***

Belo Horizonte

22 de setembro de 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOINFORMÁTICA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ARGONAUTA
TcPIWI E DE PEQUENOS RNAs EM *Trypanosoma cruzi***

Tese apresentada ao Curso de Pós Graduação em Bioinformática da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para a obtenção do título de Doutor em Bioinformática.

Orientador: Dr. João Trindade Marques
Orientada: Zamira Guerra Soares

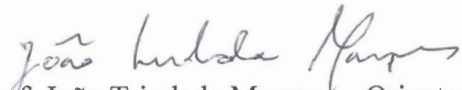
Belo Horizonte
22 de setembro de 2015




"Identificação e caracterização da TcPiwi e de pequenos RNAs em Trypanosoma cruzi"

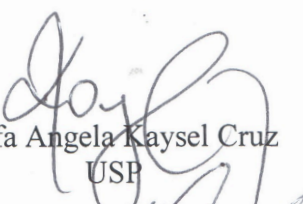
Zamira Guerra Soares

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Prof. João Trindade Marques - Orientador
UFMG

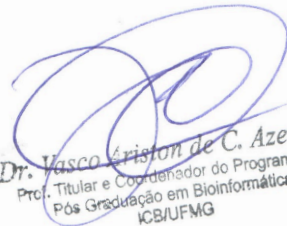

Profa Daniella Castanheira Bartholomeu
UFMG


Profa Fabiana Simão Machado
UFMG


Profa Angela Kaysel Cruz
USP


Prof. Edmundo Carlos Grisard
UFSC

Belo Horizonte, 22 de setembro de 2015.


Dr. Vasco Criston de C. Azevedo
Prof. Titular e Coordenador do Programa de
Pós Graduação em Bioinformática
ICB/UFMG

*“Let me go
I don't wanna be your hero
I don't wanna be a big man
Just wanna fight with everyone else”*

Hero – Family of the Year
(Boyhood Soundtrack)

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais, Beth e Lau, por todo o apoio, orações e paciência durante todo o processo. Aos meus irmãos, Filipe e Paulo, pelo abrigo, companhia e amizade. Às minhas cunhadas, Roxane e Paula, pelo carinho e atenção.

Àquele que me ensinou a amar novamente minha profissão de pesquisadora, que sempre me incentivou, apoiou e acreditou em mim, às vezes muito mais do que eu mesma. Meu mestre, meu orientador, Prof. João Marques.

À família que ganhei assim que me mudei para Belo Horizonte para me aventurar nessa jornada: o laboratório RNAi. Todos contribuíram de forma imensurável para o meu crescimento pessoal e profissional. Em especial gostaria de agradecer à Romina, indispensável durante o trabalho, foi apenas com a ajuda dela que tudo isso se tornou possível. A todos os outros, integrantes ou ex-integrantes do laboratório, obrigada por tudo. Tenho a certeza que sempre me lembrarei de todos vocês não importa onde estivermos.

À Fabíola e ao laboratório de Neurobioquímica por todo suporte e contribuições valiosas.

Aos colaboradores Wanderson Duarte, Santuza Teixeira, Glória Franco e Carla Polycarpo pelas discussões e conselhos que fizeram este trabalho mais rico. Ao laboratório da Prof. Santuza por todo suporte durante o projeto.

Ao professor Eric Miska, a todos os integrantes do seu laboratório e ao Instituto Gurdon, que me aceitaram e me mostraram um jeito diferente de se portar diante da ciência.

A todos os amigos, os de infância, da graduação, do mestrado e aos que fiz aqui e quando estava em Cambridge, vocês são parte fundamental da minha vida, afinal “happiness is only true when shared”.

Às secretárias da pós graduação em Bioinformática, os anjos Sheila e Natália, por todo o suporte aqui e quando estive fora no doutorado sanduíche.

Às agências de financiamento FAPEMIG, CAPES e CNPq, sem as quais este trabalho seria impossível.

Resumo

O *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas, é um parasita intracelular que possui um ciclo de vida complexo envolvendo vários estágios de desenvolvimento em hospedeiros vertebrados e invertebrados. Dessa forma, durante seu ciclo de vida, o *T. cruzi* deve adaptar-se a diferentes condições. Como um organismo unicelular, esta adaptação está basicamente limitada à regulação rápida do seu padrão de expressão gênica. A transcrição do *T. cruzi* é policistrônica e a regulação da expressão gênica parece ocorrer principalmente a nível pós-transcricional. Em vários organismos, a regulação pós-transcricional da expressão gênica envolve a via de RNA de interferência (RNAi) que utiliza pequenos RNAs não codificantes (ncRNAs) associados a uma proteína da família Argonauta para a busca de alvos contendo sequências complementares a do pequeno RNA. Nos tripanossomatídeos existem dois genes distintos que codificam proteínas pertencentes à família Argonauta, nomeadas de acordo com seus domínios de PIWI e AGO. A proteína AGO está associada à via clássica de silenciamento gênico induzida por RNA de fita dupla (dsRNA) mas este gene está ausente no genoma de *T. cruzi*. A proteína PIWI por sua vez é conservada em todos os tripanossomatídeos e, embora já tenha sido identificada em *T. cruzi* (TcPIWI), assim como os pequenos RNAs, sua função ainda não foi caracterizada. A ocorrência de TcPIWI sugere a presença de pelo menos uma via funcional de RNAi em *T. cruzi*. O objetivo deste trabalho foi estudar esta potencial via de RNAi em *T. cruzi* por meio da caracterização da Argonauta TcPIWI e de pequenos RNAs. Nós observamos que o gene *TcPIWI* tem sua expressão diminuída durante a infecção de macrófagos murinos e que parasitas deficientes para este gene apresentam uma maior taxa de infecção quando comparados aos selvagens. Em contraste, após exposição à radiação gama, não há grandes diferenças no comportamento do parasito, demonstrando que a resposta da Argonauta depende do tipo de estresse, não sendo um comportamento aleatório que ocorre pela deleção do gene. Observamos também que a proteína TcPIWI está difusa no citoplasma como algumas Argonautas de outros organismos. Com o intuito de identificar potenciais populações de ncRNAs que poderiam estar associados à TcPIWI, nós sequenciamos bibliotecas de pequenos RNAs de *T. cruzi* em diferentes condições. A população de ncRNAs encontrada de forma mais consistente é a derivada de tRNAs, que carregam os aminoácidos ácido glutâmico ou valina, principalmente da região 5', com tamanho médio de 33 nt. Estes ncRNAs não parecem estar associados à TcPIWI pois não são afetados pelos seus níveis de expressão ou deleção. Nossos resultados sugerem que TcPIWI é importante para regular a resposta de *T. cruzi* frente a diferentes estímulos, mas o mecanismo de ação desta nova via de RNAi ainda permanece obscuro. É importante destacar que populações de ncRNAs que potencialmente associam-se à TcPIWI possivelmente ainda não foram identificados em *T. cruzi*, tanto neste trabalho, quanto nos demais estudos já realizados. No momento, nossos resultados sugerem que TcPIWI pode estar associada a uma população completamente nova de ncRNAs ou mesmo, que poderia funcionar sem a associação com ncRNAs. Em ambos os casos, este seria um novo mecanismo de ação ainda não descrito para uma via de RNAi.

Abstract

Trypanosoma cruzi is an intracellular parasite, etiological agent of Chagas disease, with a complex life cycle between two hosts and displays different life stages. In order to adapt to the different challenges that undergoes during its life cycle, *T. cruzi* needs a fast and efficient molecular response. Since *T. cruzi* has a polycistronic transcription, the regulation of gene expression occurs mainly at the post-transcriptional level. In many eukaryotes one of the most important pathways to regulate gene expression at post-transcriptional level is the RNA interference pathway (RNAi). RNAi pathway utilizes small non-coding RNAs (ncRNAs) associated with Argonaute proteins to regulate gene expression. The ncRNA within the Argonaute complex serves as guide to find complementary sequences within RNA targets. In trypanosomatids two Argonaute proteins were described, AGO and PIWI. The AGO protein is associated with the gene silencing pathway induced by double stranded RNA, known as classic RNAi pathway. But the AGO protein and the classic RNAi pathway are not present in *T. cruzi*. Unlike this, the PIWI protein is conserved in all trypanosomatids. Despite of the presence of the PIWI protein, named TcPIWI, and ncRNAs in *T. cruzi*, the functions of these components are not well understood. The existence of the TcPIWI indicates the presence of at least one functional RNAi pathway. The goal of this work was the study of this potential RNAi pathway in *T. cruzi* through the characterization of the TcPIWI and ncRNAs. We observed a decrease in the expression of TcPIWI during macrophages infection and TcPIWI knockout parasites show higher infection rate in macrophages. On the other hand, we observed that TcPIWI has an increase in its expression when the parasite is exposed to gamma radiation and TcPIWI knockout parasites have a lower capacity to recover after the exposure. We observed that the protein TcPIWI is localized diffused in the cytoplasm like others Argonautes. In order to identify potential population of ncRNAs that could be associated with the TcPIWI, we sequenced *T. cruzi* small RNA libraries in different conditions. We observed that the most consistent ncRNAs population is derived from tRNAs and presents average size of 33 nt. These ncRNAs are derived mainly of the 5' region of the tRNA from glutamic acid and valine. These small RNAs derived from tRNA do not seem associated with the Argonaute protein because their abundance don't change when TcPIWI has different expression or is deleted. Our results suggest that the TcPIWI is important to regulate the response of trypanosomatids to different conditions but the mechanisms of action of this new RNAi pathway stills unclear. It seems that the ncRNAs populations associated with the Argonaute protein were not identified in several studies including ours. These results suggest that TcPIWI would be associated with a new population of ncRNAs or it works without any association with ncRNAs. In both cases, this would be a new mechanism of action not described in any RNAi pathway yet.

Sumário

Lista de Figuras	x
Lista de Tabelas	xii
1. Introdução	2
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
1.1.1. Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	3
1.1.2. Regulação da expressão gênica de tripanossomatídeos	5
1.2. Vias de RNA de interferência	7
1.2.1. Vias de RNA de interferência em tripanossomatídeos	10
1.2.1.1. Via clássica de RNAi em tripanossomatídeos	11
1.2.1.2. Vias alternativas de RNAi em tripanossomatídeos	13
1.2.1.3. Pequenos RNAs derivados de tRNA	15
2. Justificativa	19
3. Objetivos	22
3.1. Objetivo Geral.....	22
3.2. Objetivos Específicos	22
4. Materiais e Métodos	24
4.1. Construção de plasmídeos utilizados neste trabalho	24
4.1.1. Plasmídeos para deleção de <i>TcPIWI</i>	24
4.1.2. Plasmídeo para expressão da <i>TcPIWI</i>	26
4.1.3. Sequenciamento	27
4.2. Cultivo de Epimastigotas	27
4.3. Transfecção de Parasitas	27
4.4. Obtenção de Clones	28
4.5. Curva de Crescimento	28
4.6. Coloração por Panótico Rápido.....	28
4.7. Metaciclogênese <i>in vitro</i>	29
4.8. Irradiação de parasitos	29
4.9. Infecção de macrófagos por tripomastigotas metacíclicos de <i>T. cruzi</i>	29
4.9.1. Cultivo de Células L-929.....	29
4.9.2. Obtenção de Tripomastigotas Metacíclicos	30
4.9.3. Obtenção de Macrófagos Derivados de Medula Óssea	30
4.9.4. Infecção	31
4.10. Extração de RNA	31
4.11. Extração de DNA	32
4.12. RT-qPCR	33
4.12.1. Transcrição reversa (RT)	33
4.12.2. Desenho de iniciadores	33
4.12.3. Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR)	34
4.13. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	35

4.14. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na Presença de SDS.....	35
4.15. Imunodeteção de Proteínas (<i>Western Blot</i>).....	36
4.16. Imunofluorescência.....	36
4.17. Anticorpos e corante.....	37
4.18. Construção de Bibliotecas.....	37
4.18.1. RNAs de baixo peso molecular.....	37
4.18.1.1. Tratamento com polifosfatase.....	38
4.19. Sequenciamento de pequenos RNAs.....	39
4.20. Análise Bioinformática.....	39
5. Resultados e Discussão.....	41
5.1. Caracterização do gene codificador da Argonauta de <i>T. cruzi</i> (<i>TcPIWI</i>) cepa CL Brener.....	41
5.2. Geração de parasitos deficientes em <i>TcPIWI</i>	44
5.3. Caracterização fenotípica dos parasitos deficientes em <i>TcPIWI</i>	45
5.4. Caracterização da proteína <i>TcPIWI</i>	52
5.5. Caracterização de populações de pequenos RNAs em <i>T. cruzi</i>	56
5.6. Caracterização da população de pequenos RNAs nas diferentes formas do parasito.....	65
5.7. Caracterização das populações de pequenos RNAs nas condições nas quais a <i>TcPIWI</i> possui expressão diferencial.....	68
5.7.1. Radiação gama.....	68
5.7.2. Infecção.....	70
5.8. Caracterização das populações de pequenos RNAs dos parasitos heterozigotos para <i>TcPIWI</i>	73
5.9. Discussão final.....	75
6. Conclusões.....	79
7. Perspectivas.....	81
8. Referências Bibliográficas.....	83
9. Anexos.....	93
9.1. Trabalhos desenvolvidos durante o doutorado que não compõem o corpo desta tese.....	93
9.2. Trabalhos em colaboração desenvolvidos durante o doutorado.....	93

Lista de Figuras

Figura 1 – Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
Figura 2 – Transcrição e maturação de mRNAs em tripanossomatídeos.	6
Figura 3 – Panorama geral das vias de RNAi.....	8
Figura 4 – Obtenção das construções <i>TcPIWI</i> Neo e <i>TcPIWI</i> Higro para deleção do <i>TcPIWI</i> endógeno por recombinação homóloga.....	25
Figura 5 – Obtenção da construção para recuperação da expressão da <i>TcPIWI</i>	26
Figura 6 – Caracterização do gene <i>TcPIWI</i>	43
Figura 7 – Desenvolvimento de parasitos homozigotos deficientes para o gene <i>TcPIWI</i> endógeno	45
Figura 8 – Curva de crescimento dos parasitos selvagem e deficientes	46
Figura 9 – Diferenciação <i>in vitro</i> induzida por envelhecimento do meio.....	47
Figura 10 – Cinética de infecção de parasitos deficientes e selvagem em macrófagos derivados de medula óssea	50
Figura 11 – Cinética dos parasitos após irradiação. (A) Expressão de <i>TcPIWI</i> após as primeiras horas depois da irradiação	51
Figura 12 – Análise de expressão do gene e da proteína <i>TcPIWI</i> em fusão com a cauda HA na região 3'.....	53
Figura 13 – Desenvolvimento de parasitos expressando a proteína <i>TcPIWI</i> fusionada a cauda HA e da proteína contendo a mutação na tríade catalítica (D871A)....	54
Figura 14 – Imunofluorescência mostrando a localização da proteína <i>HA-TcPIWI</i> ..	55
Figura 15 – Análise comparativa de populações de pequenos RNAs de <i>T. cruzi</i> obtidos pelo sequenciamento nas empresas BGI, Fasteris e Gurdon.....	57
Figura 16 – Classificação dos pequenos RNAs de acordo com o tRNA do qual originaram obtidos pelo sequenciamento nas empresas BGI, Fasteris e Gurdon.	58
Figura 17 – Análise comparativa de populações de pequenos RNAs obtido através do sequenciamento de RNA total controle e tratado com polifostase (5' independente)	62
Figura 18 – Classificação dos pequenos RNAs de acordo com o tRNA do qual originaram obtidos pelo sequenciamento de amostras controle e tratada com polifosfatase (5' independente).....	63

Figura 19 – Análise comparativa de populações de pequenos RNAs das diferentes formas do parasito (amastigota, epimastigota e tripomastigota) 66

Figura 20 – Classificação dos pequenos RNAs de acordo com o tRNA do qual originaram nas diferentes formas do parasito (amastigota, epimastigota ou tripomastigota) 67

Figura 21 – Análise comparativa de populações de pequenos RNAs de parasitos controle e irradiado após 12h de radiação gama..... 70

Figura 22 – Análise comparativa de populações de pequenos RNAs mapeados no genoma de *T. cruzi* após 2, 4, 8 e 48h de infecção em macrófagos murinos ... 72

Figura 23 – Expressão da *TcPIWI* nas populações de parasitas heterozigotos 73

Figura 24 – Análise comparativa de populações de pequenos RNAs de parasitos selvagens (wt) ou heterozigotos para a deficiência em *TcPIWI* obtidos através de duas construções, Neo e Higo..... 74

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Proteínas da via de RNAi identificadas em espécies de tripanossomatídeos..... 11

Tabela 2 – Iniciadores utilizados para construção do nocaute 24

Tabela 3 – Iniciadores utilizados para recuperação da expressão da *TcPIWI* 27

Tabela 4 – Iniciadores utilizados para qPCR e PCR..... 34

Tabela 5 – Descrição geral das bibliotecas sequenciadas em diferentes companhias 56

Tabela 6 – Descrição geral das bibliotecas controle e tratadas com polifosfatase... 61

Tabela 7 – Descrição geral das bibliotecas de pequenos RNAs das diferentes formas do parasito 65

Tabela 8 – Descrição geral do mapeamento das bibliotecas de epimastigotas controle e irradiada com 500 Gy de radiação gama 69

Tabela 9 – Descrição geral das sequências mapeadas no genoma de *T.cruzi* após 2, 4, 8 e 48h de infecção em macrófagos murinos 71

1. Introdução

O parasito protista *Trypanosoma cruzi* é o agente causador da doença de Chagas (Rassi *et al.*, 2010) que afeta hoje de 7 a 8 milhões de pessoas mundialmente, segundo a Organização Mundial de Saúde. A transmissão do parasito ocorre quando um hospedeiro vertebrado é picado por um triatomíneo infectado (Rassi *et al.*, 2010). Apesar da maioria dos casos da doença estarem presentes na América Latina, o fluxo de imigrantes dos países endêmicos para a Europa, Estados Unidos e Canadá já torna significativo o número de indivíduos infectados nesses locais (Schmunis, 2007; Gascon *et al.*, 2010; Angheben *et al.*, 2011; Perez-Molina *et al.*, 2012). Nenhuma vacina está disponível para o combate à doença de Chagas (Bilbe, 2015) e são os programas desenvolvidos para acabar com o inseto vetor os mais eficientes para a redução da incidência da doença (Rassi *et al.*, 2010). Entretanto, é provável que a longevidade da infecção permita que humanos ou outros animais selvagens sirvam de reservatórios naturais ao parasito, mantendo seu ciclo infeccioso (Kribs-Zaleta, 2010; Barrett e Croft, 2012). O entendimento da biologia do parasito e a identificação de vias que possam ser utilizadas como alvo para terapias antiparasitárias são portanto, de extrema importância para o combate à doença de Chagas.

1.1. *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um parasito intracelular pertencente à classe de protozoários flagelados denominada *Kinetoplastida*, assim como *Leishmania* e *Trypanosoma brucei*. Esta classe de protozoários caracteriza-se pela presença de uma região contendo DNA, chamado kinetoplasto, em sua única mitocôndria (Stuart *et al.*, 2008). Devido sua alta variabilidade genética, *T. cruzi* é classificado em seis tipos de unidades discretas (DTU; *Discrete Typing Units*) denominadas TcI-TcVI. Cada DTU está associada com diferentes ciclos de transmissão, vetores e distribuição geográfica (Zingales *et al.*, 2009). O *T. cruzi* é um parasito obrigatório que possui um ciclo de vida complexo, com vários estágios de desenvolvimento em vetores invertebrados e vertebrados (Rassi *et al.*, 2010).

1.1.1. Ciclo de vida do *T. cruzi*

T. cruzi desenvolveu a habilidade de transitar entre vetores completamente distintos e replicar em ambientes adversos. O *Triatoma infestans* (vetor invertebrado mais importante para *T. cruzi*) infecta-se no momento que se alimenta de um mamífero com parasitas circulantes no sangue (tripomastigotas sanguíneos - formas infectivas, não replicativas). No trato digestivo do triatomíneo os tripomastigotas diferenciam-se em epimastigotas (formas replicativas, não infectivas) e durante a migração desde o estômago do vetor, onde chega junto com o sangue, até seu intestino, o parasita é submetido a mudanças drásticas no meio. As mudanças mais significativas são a disponibilidade de nutrientes e dessecação, que ocorrem quando os epimastigotas chegam ao reto e realizam a metaciclogênese (Li *et al.*, 2011; Bonansea *et al.*, 2012), processo de diferenciação das formas epimastigotas em formas tripomastigotas metacíclicas (formas infectivas, não replicativas).

Em *Deinococcus radiodurans*, bactéria que sobrevive em condições ambientais severas, o processo de dessecação causa uma significativa quebra de fitas duplas e simples de DNA, além de DNA *crosslinking*. Estas modificações causadas pelo estresse hiperosmótico também são causadas pela radiação ionizante (Tanaka *et al.*, 2004). O *T. cruzi* resiste a altas doses de radiação ionizante (Takeda *et al.*, 1986), sendo capaz de reestruturar após 48 h por exemplo, o padrão de bandas cromossômicas fragmentadas pela exposição a 500 Gy de radiação gama (Regis-Da-Silva *et al.*, 2006). Porém, o mecanismo de resposta envolvido que permite o reparo do DNA não está totalmente caracterizado. Como pequenos RNAs não codificantes específicos já foram identificados atuando em resposta à quebra da fita dupla de DNA causada tanto por radiação ionizante (Francia *et al.*, 2012) ou direcionada em plasmídeos transfectados nas células de *Drosophila* e *Arabidopsis* (Michalik *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2012), este pode ser um mecanismo ainda não explorado em *T. cruzi* que revelaria um modo de reparo do DNA que permitiria sua resistência a altas doses de radiação ionizante.

A infecção no mamífero ocorre quando feridas ou mucosas entram em contato com a forma metacíclica infectiva do parasito, eliminada junto com as fezes quando o inseto está se alimentando. Assim que entra na corrente sanguínea do vertebrado, embora o parasito possa infectar qualquer tipo celular, há um tropismo

para células musculares (Andrade e Andrews, 2005). Os primeiros efetores da resposta imune inata frente à infecção dos parasitas dependem de processos mediados pelo complemento e pela fagocitose (Piacenza *et al.*, 2009), como é o caso dos macrófagos que estão próximos ao local de invasão do parasito.

Dentro da célula o parasito diferencia-se em amastigota (forma replicativa, não infectiva), recomeçando o ciclo quando novamente diferencia-se em tripomastigota, rompe a célula e cai na corrente sanguínea, podendo assim, infectar outro triatomíneo que se alimente do hospedeiro vertebrado infectado (Figura 1) (Rassi *et al.*, 2010).

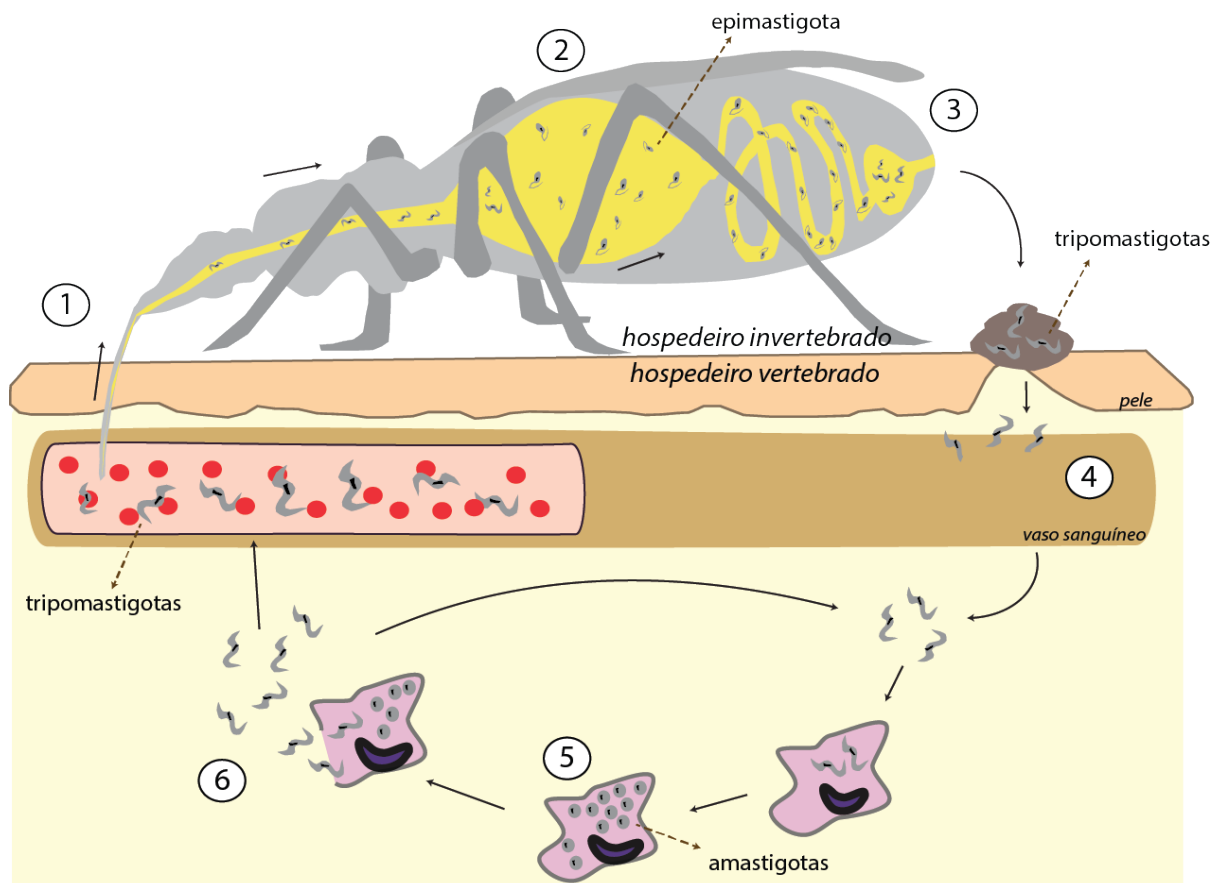


Figura 1 – Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. O triatomíneo alimenta-se de um vertebrado infectado ingerindo, junto com o sangue, parasitas na forma tripomastigota (1). Dentro do estômago do inseto o parasito diferencia-se na forma epimastigota e começa a replicar-se (2). Quando atinge a região final do intestino, o parasita sofre metaciclogênese, passando para a forma infectiva tripomastigota, sendo eliminado junto das fezes (3). Quando o inseto alimenta-se novamente e defeca, o vertebrado pode infectar-se quando as fezes contendo parasitas entram em contato com feridas ou mucosas, caindo na corrente sanguínea (4). Dentro do hospedeiro vertebrado, o parasito pode infectar diferentes tipos celulares, diferenciando-se em amastigotas e replicando-se (5). O parasito então diferencia-se em tripomastigota, acarretando a ruptura da célula e sua liberação na corrente sanguínea (6), podendo ser então ingerido por um novo inseto, recomeçando o ciclo.

Para adaptar-se aos diversos tipos de estresse ao qual é submetido durante o seu ciclo de vida, o parasito unicelular necessita de uma resposta molecular rápida e coordenada, principalmente no padrão da expressão gênica.

1.1.2. Regulação da expressão gênica de tripanossomatídeos

Diferentemente da maioria dos organismos eucariotos, a transcrição gênica de tripanossomatídeos é policistrônica (Imboden *et al.*, 1987) e os genes em sua quase totalidade não possuem íntrons (Teixeira, 1998). Isto significa que os RNAs mensageiros (mRNAs) são transcritos em conjunto e processados em mRNAs maduros após a transcrição (Martinez-Calvillo *et al.*, 2010). Realmente, os genes dos tripanossomatídeos são distribuídos nos cromossomos em longos grupos policistrônicos (PTU; *Polycistronic Transcript Units*) e, diferentemente de bactérias e nemátodes (Blumenthal *et al.*, 2002), estes genes agrupados não codificam para proteínas relacionadas (Campbell *et al.*, 2003). Esta organização genômica foi primeiramente observada no cromossomo I de *Leishmania major*, no qual os 85 genes estão organizados em dois grupos policistrônicos divergentes (32 genes agrupados em uma direção e os outros 53 agrupados na direção oposta) (Myler *et al.*, 1999). Com a publicação do sequenciamento dos genomas de *T. brucei* (Berriman *et al.*, 2005) e *T. cruzi* (El-Sayed, Myler, Bartholomeu, *et al.*, 2005) constatou-se que esta organização genômica se mantém nos diversos tripanossomatídeos (El-Sayed, Myler, Blandin, *et al.*, 2005).

A maturação do mRNA ocorre através do *trans-splicing* e da poliadenilação (Martinez-Calvillo *et al.*, 2010). O *trans-splicing* é o processo de adição do *splice leader* (SL), que consiste em uma sequência de 39 nucleotídeos em conjunto com a 7-metil guanosina (m^7G , *cap*) na região 5' do mRNA. A poliadenilação é a adição de uma cauda poli-A na região 3' do mRNA (Campbell *et al.*, 2003). Nenhuma sequência consenso de sinalização para estes processos foi identificada, mas já foi demonstrado que regiões intergênicas ricas em pirimidina (PolyPy) guiam o *trans-splicing* e a poliadenilação (Figura 2). Há indícios também de que a maturação do mRNA de genes adjacentes parece estar ligada, ocorrendo em conjunto (Lebowitz *et al.*, 1993).

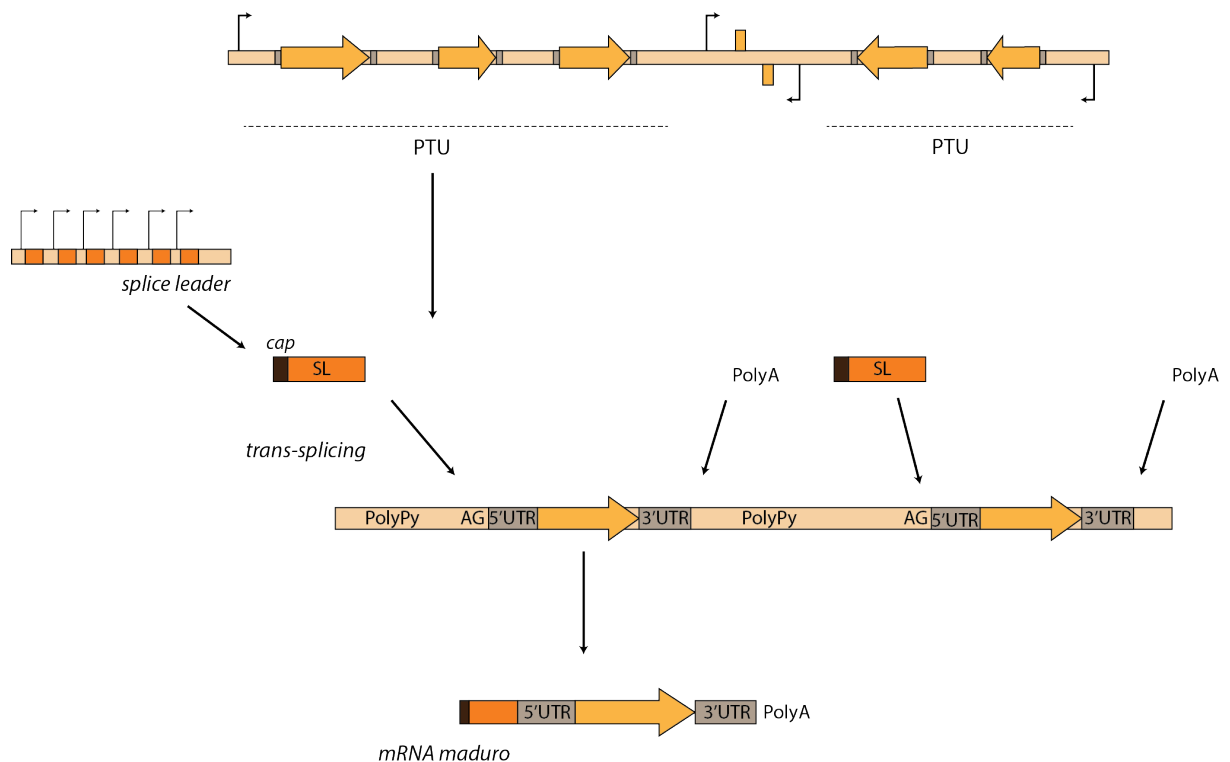


Figura 2 – Transcrição e maturação de mRNAs em tripanossomatídeos. Genes de grupos policistrônicos (PTU) são transcritos e através da sinalização de regiões intergênicas ricas em pirimidina (PolyPy) ocorre a adição do *splice leader* (SL) capeado e da poliadenilação (PolyA), gerando o mRNA maduro.

Todos os genes que fazem parte de um mesmo grupo policistrônico são transcritos no mesmo nível, mas mRNAs maduros de genes adjacentes podem conter variações de expressão dependendo do estado de equilíbrio do organismo (Martinez-Calvillo *et al.*, 2010).

A regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos é realizada na sua maioria, ao nível pós-transcricional (Teixeira e Darocha, 2003), como por exemplo: estabilização e processamento do mRNA (Clayton, 2002) e regulação da tradução (Smircich *et al.*, 2015). Em eucariotos, as vias de RNA de interferência (RNAi) estão envolvidas em vários aspectos da regulação da expressão gênica, como na regulação dos níveis de mRNA (Cerutti e Casas-Mollano, 2006), sendo portanto de extrema importância tanto para a resposta às mudanças, quanto para a manutenção da homeostase do organismo.

1.2. Vias de RNA de interferência

As vias de RNAi englobam diversas vias de regulação gênica mediadas por RNAs de baixo peso molecular (Carthew e Sontheimer, 2009). Estas vias possuem funções altamente especializadas e distintas em diferentes grupos de eucariotos (Cerutti e Casas-Mollano, 2006), como desenvolvimento embrionário, fertilidade e resposta antiviral (Bernstein *et al.*, 2003; De Faria *et al.*, 2013).

O primeiro mecanismo descrito como RNAi foi descoberto em 1998 por Craig Mello e Andrew Fire que mostraram que a introdução artificial de RNA de fita dupla (dsRNA) no nematelminto *Caenorhabditis elegans* levava à regulação negativa de expressão de genes com sequências complementares ao dsRNA introduzido inicialmente (Fire *et al.*, 1998). O potencial desta via como ferramenta para a regulação específica da expressão gênica foi imediatamente notado e sua funcionalidade foi demonstrada em diversos outros organismos, incluindo estudos em células de mamíferos (Caplen *et al.*, 2001) e protozoários (Shi *et al.*, 2000; Cerutti e Casas-Mollano, 2006; Braun *et al.*, 2010; Batista e Marques, 2011).

Esta via de silenciamento gênico pós-transcricional ativada por dsRNA é hoje tida como a via clássica de RNAi. Entretanto, existem diversas outras vias de RNAi que mesmo tendo mecanismos de ação distintos, são todas compostas por proteínas da família Argonauta que estão sempre associadas a RNAs não codificantes (ncRNAs) de pequeno peso molecular (Ender e Meister, 2010). O complexo Argonauta-ncRNA, chamado de complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) é usado como guia para a regulação da expressão gênica tanto transcricional, quanto pós-transcricional e para outros processos como reparo e edição do DNA (Figura 3) (Ghildiyal e Zamore, 2009; Joshua-Tor e Hannon, 2011).

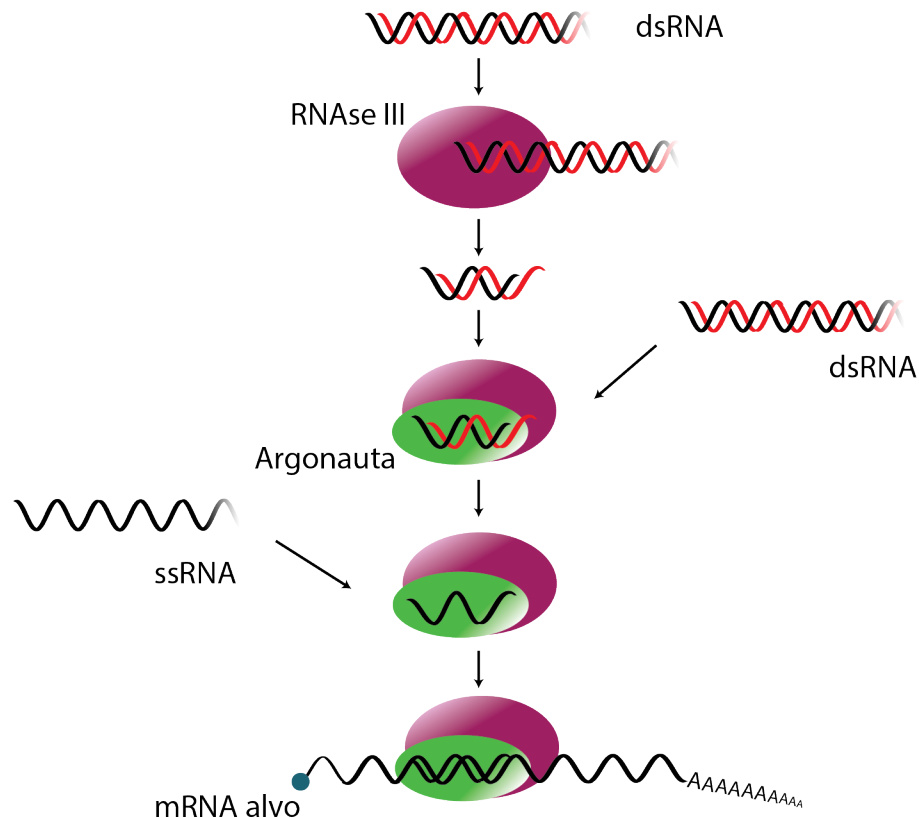


Figura 3 – Panorama geral das vias de RNAi. RNAs de fita dupla (dsRNA) são reconhecidos por uma proteína RNase do tipo III e processados em dsRNAs menores. Estes são então carregados na proteína efetora Argonauta. Após a seleção da fita guia, o complexo maduro busca por mRNAs alvos complementares à sequência do pequeno RNA, culminando na inibição da tradução, regulando a expressão gene específica. Vias independentes de RNase do tipo III já foram descritas e tanto o dsRNA quanto RNAs de fita simples (ssRNA) podem associar-se diretamente à proteína Argonauta, formando o complexo maduro.

Proteínas da família Argonauta são caracterizadas pela presença de dois domínios importantes: PAZ e PIWI (Joshua-Tor e Hannon, 2011). O domínio PIWI possui além de uma ribonuclease H que acomoda o pequeno ncRNA, também a tríade catalítica DDH, um conjunto de três aminoácidos conservados que direcionam a clivagem do mRNA alvo (Song *et al.*, 2004). O domínio PAZ possui um domínio de ligação a ácidos nucleicos que se liga à região 3' do pequeno ncRNA e orienta o seu posicionamento dentro do domínio PIWI (Lingel *et al.*, 2003). Em geral, a diversidade de proteínas Argonauta em um organismo está correlacionada diretamente à presença de ncRNAs com origem e funções distintas (Cerutti e Casas-Mollano, 2006; Batista e Marques, 2011).

Em animais, como na mosca da fruta *Drosophila melanogaster* por exemplo, existem pelo menos três classes distintas de ncRNAs, que representam vias de RNAi independentes. Estes ncRNAs diferem em sua origem, processamento, tamanho e na proteína Argonauta à qual eles estão associados (Ghildiyal e Zamore, 2009). Estas classes de ncRNAs:

- microRNAs (miRNAs): são originados de regiões não codificantes, transcritos pela polimerase II como ssRNAs que se dobram formando estruturas de grampo, que são reconhecidos no núcleo pela RNase do tipo III Drosha (Lee *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003; Lee, Y. *et al.*, 2004). Este pré-miRNA é então exportado para o citoplasma pela proteína chamada Exportin 5 (Yi *et al.*, 2003) onde o grampo é reconhecido pela RNase do tipo III Dicer-1, que cliva o dsRNA em pequenos RNAs de aproximadamente 22 nt (Saito *et al.*, 2005). Após seu processamento, os miRNAs interagem com Argonautas da subfamília AGO, AGO1 (Okamura *et al.*, 2004);

- siRNAs (*short interfering RNA*): são originados a partir do reconhecimento de dsRNAs longos pela RNase III Dicer-2 e clivados em pequenos RNAs de aproximadamente 21 nt. Este pequeno RNA é então carregado na Argonauta AGO2 e após liberação da fita passageira e metilação da fita guia do siRNA, o complexo maduro busca por mRNAs alvo com complementariedade total de sequência, o que culmina na clivagem do alvo pela AGO2 (Haley e Zamore, 2004; Lee, Y. S. *et al.*, 2004; Okamura *et al.*, 2004; Horwich *et al.*, 2007);

- piRNAs (*Piwi-interacting RNAs*): são originados de ssRNAs provenientes, em sua maioria, de elementos transponíveis ou *clusters* específicos no genoma, porém sua biogênese a partir de ssRNA ainda não é completamente elucidada. Os piRNAs primários gerados podem entrar em um *loop* de amplificação chamado *ping-pong*, que direciona a produção de piRNAs secundários. Os piRNAs interagem com Argonautas da subfamília PIWI e em *Drosophila*, associam-se também com Argonautas mais especializadas, como Aubergine e AGO3 (Brennecke *et al.*, 2007; Luteijn e Ketting, 2013).

Pode-se constatar portanto, que populações de pequenos RNAs específicas associam-se a proteínas Argonautas distintas em *Drosophila*, levando à montagem do complexo maduro de silenciamento (Lee, Y. S. *et al.*, 2004; Okamura *et al.*, 2004; Hartig e Forstemann, 2011). Atualmente vários estudos descrevem vias de RNAi

independentes de Dicer (Cheloufi *et al.*, 2010; Cifuentes *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2012), o que leva a uma maior diversidade de vias de RNAi.

No nemátodo *C. elegans*, por exemplo, há apenas uma Dicer e 27 Argonautas altamente especializadas que podem ter localização nuclear ou citoplasmática (Youngman e Claycomb, 2014). A produção de pequenos RNAs não canônicos por ação de RNA polimerases dependentes de RNA (RdRp) é Dicer independente (Sijen *et al.*, 2001). Estes pequenos RNAs secundários possuem estrutura definida e peculiar: 22 nt de tamanho, contendo uma guanosina tri-fosfato na região 5' (Pak e Fire, 2007).

Da mesma forma, o protozoário ciliado *Tetrahymena* possui também uma grande gama de Argonautas e uma delas em especial, a Twi12, não possui domínio de clivagem em sua sequência e parece ligar-se a pequenos RNAs não canônicos provenientes de tRNAs que não necessitam de Dicer para sua biogênese. Este complexo Twi12-pequenos RNAs está associado com a translocação da exonuclease Xrn2 para o núcleo (Couvillion *et al.*, 2010; Couvillion *et al.*, 2012).

Deste modo é importante salientar que, as vias de RNAi estendem-se além das vias clássicas que vêm sendo muito estudadas nos últimos anos em diferentes organismos. Estas vias, as quais poderíamos nomear “vias alternativas de RNAi”, assim como as clássicas, invariavelmente possuem proteínas Argonautas associadas a pequenos ncRNAs, o que parece ser suficiente para estabelecer que estas vias sejam funcionais (Joshua-Tor e Hannon, 2011).

1.2.1. Vias de RNA de interferência em tripanossomatídeos

A presença de proteínas do tipo Argonauta infere a capacidade de ativação da via de RNAi em tripanossomatídeos. Neste grupo, existe a presença de dois tipos de proteínas Argonauta, uma com os domínios PAZ e PIWI bem estruturados e outra que, inicialmente, foi descrita como contendo apenas o domínio PIWI bem estruturado. Deste modo, as duas proteínas foram nomeadas apenas levando em conta os domínios presentes, sendo portanto, AGO a que contém os domínios PAZ e PIWI, e PIWI a que contém exclusivamente o domínio PIWI (Ullu *et al.*, 2004).

A capacidade de ativação das vias de RNAi pela introdução de dsRNA foi perdida em várias espécies de tripanossomatídeos (Tabela 1) e está correlacionada

com a ausência de proteínas do tipo AGO (Lye *et al.*, 2010). Apesar de em algumas espécies de tripanossomatídeos ter ocorrido a perda da proteína nomeada AGO, a proteína nomeada PIWI é conservada em todas as espécies deste grupo (Garcia Silva *et al.*, 2010).

Tabela 1 – Proteínas da via de RNAi identificadas em espécies de tripanossomatídeos

Espécie	RNAse III	Argonauta	RNAi mediado por dsRNA	Referência
<i>Leishmania major</i>	-	PIWI	-	(Robinson e Beverley, 2003; Padmanabhan <i>et al.</i> , 2012)
<i>Leishmania infantum</i>	-	PIWI	nd	(Padmanabhan <i>et al.</i> , 2012)
<i>Leishmania brasiliensis</i>	DCL1 e DCL2	PIWI e AGO	+	(Peacock <i>et al.</i> , 2007; Lye <i>et al.</i> , 2010)
<i>Trypanosoma cruzi</i>	-	PIWI	-	(Darocha, Otsu, <i>et al.</i> , 2004; Ullu <i>et al.</i> , 2004)
<i>Trypanosoma rangeli</i>	DCL2	PIWI	-	(Stoco <i>et al.</i> , 2014)
<i>Trypanosoma congolense</i>	DCL1	PIWI e AGO	+	(Inoue <i>et al.</i> , 2002; Ullu <i>et al.</i> , 2004)
<i>Trypanosoma brucei</i>	DCL1 e DCL2	PIWI e AGO	+	(Ngo <i>et al.</i> , 1998)

DCL1 – RNAse III citoplasmática; DCL2 – RNAse III nuclear; (-) ausente; (+) presente; (nd) não demonstrado

1.2.1.1. Via clássica de RNAi em tripanossomatídeos

A via clássica de RNAi ocorre a partir do reconhecimento de um dsRNA pela RNAse do tipo III Dicer e da associação do siRNA com a Argonauta, culminando na regulação negativa do gene alvo.

Em *T. brucei* a via de RNAi gera siRNAs de diferentes origens, principalmente a partir de longos dsRNAs derivados de retrotransposons do tipo INGI e SLAC; da família de repetições de 147 pb nomeada CIR147 (do inglês ‘*Chromosome Internal Repeats*’); de repetições invertidas; de unidades de transcrição convergentes, e de NAT (do inglês ‘*Natural Antisense Transcripts*’) (Djikeng *et al.*, 2001; Patrick *et al.*, 2009; Tschudi *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2013). Até o presente momento, foram descritos seis genes essenciais para a codificação de proteínas da via de RNAi clássica em *T. brucei*. São elas: uma proteína Argonauta em sua maioria citoplasmática (TbAGO1) (Durand-Dubief e Bastin, 2003; Shi *et al.*, 2003); duas

Dicers (uma nuclear, TbDCL2 e uma citoplasmática, TbDCL1) (Shi *et al.*, 2006; Patrick *et al.*, 2009); uma exonuclease necessária para a seleção da fita guia do siRNA (TbRIF4); um cofator da TbDCL1 (TbRIF5) (Barnes *et al.*, 2012) e um homólogo da HEN1 (TbHEN1), uma metiltransferase que metila os siRNAs na região 3' protegendo-os de reações como β -eliminação (Shi *et al.*, 2014).

A maioria dos siRNAs em *T. brucei* possui tamanho aproximado de 23-26 nt e um enriquecimento para "U" como base inicial. Estes pequenos RNAs regulam a expressão de alvos distintos nos diferentes estágios de desenvolvimento do parasito (Zheng *et al.*, 2013). Uma comparação entre os estudos de sequenciamento de siRNAs demonstra que possivelmente, estes pequenos RNAs, correspondem aos pequenos RNAs sequenciados a partir da imunoprecipitação da TbAGO1, com mapeamento nos mesmos precursores (Tschudi *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2013).

Uma segunda população de pequenos RNAs de tamanho maior (~30 nt) pode ser encontrada nas bibliotecas de pequenos RNAs nas diferentes formas (Zheng *et al.*, 2013), sendo a maior parte deles derivados de tRNA. Na forma procíclica do parasito, a maioria destes pequenos RNAs derivados de tRNA são provenientes do tRNA-Glu, enquanto na forma *slender* a maioria provém do tRNA-Asp. É importante notar também que os pequenos RNAs derivados de tRNA geram dois picos de tamanho (24 e 30 nt), os quais derivam de regiões específicas do tRNA. No caso do tRNA-Asp por exemplo, o pico de 24 nt deriva da região 3', enquanto o pico de 30 nt deriva da região 5' do tRNA (Zheng *et al.*, 2013). Uma análise mais minuciosa desta população de pequenos RNAs que aparentemente não estão associados à TbAGO1 é necessária, mas atualmente a maioria dos sequenciamentos limita-se a fragmentos de até 30 pb.

Em *Leishmania braziliensis* foi reportada a presença da Argonauta AGO1 e das duas Dicers (DC1 e DCL2), além dos cofatores RIF4 e RIF5. Porém, não há a presença da HEN1 e portanto, os pequenos RNAs não são metilados na porção 3' (Lye *et al.*, 2010; Atayde *et al.*, 2013). Aproximadamente 20% dos pequenos RNAs possuem a adição de uma base na região 3', sendo na sua maioria, a adição de um "U", à semelhança de *T. brucei*. Esta adição provavelmente é realizada pelos homólogos das TUTase (*Terminal Uridyl Transferase*) de *T. brucei* e, TUTase3 (LbrM19.1680) e TUTase4 (LbrM32.2690) de *L. brasiliensis*, mas esta hipótese ainda está sendo estudada (Atayde *et al.*, 2013).

Similarmente aos pequenos RNAs de *T. brucei*, em *Leishmania* a maioria dos pequenos RNAs derivam de elementos móveis (retrotransposons SLAC) ou repetições (TATE, TAS-like e CIR74). Dessa forma, também em *Leishmania*, uma das principais funções dos siRNAs é garantir a integridade do genoma por meio da regulação negativa de elementos móveis (Tschudi *et al.*, 2012; Atayde *et al.*, 2013). O tamanho do siRNA entre os dois organismos difere, sendo o siRNA de *Leishmania* um pouco menor (20-25 nt), o que pode ser reflexo da especificidade de clivagem da Dicer (Atayde *et al.*, 2013).

Como já se sabe, a indução da regulação da expressão gênica pela introdução de um dsRNA é uma das características gerais da via clássica de RNAi, e é utilizada como forma de estudos da expressão gênica em *T. brucei* e *L. braziliensis*. Esta indução também já foi observada em *T. congolense* mas os pequenos RNAs gerados pela via não foram analisados com profundidade (Inoue *et al.*, 2002). Este tipo de ativação não foi observado em organismos como *T. cruzi* (Darocho, Otsu, *et al.*, 2004), *T. rangeli* (Stoco *et al.*, 2014) ou *L. major* (Robinson e Beverley, 2003). Porém, como estes organismos possuem a Argonauta do tipo PIWI extremamente conservada e pequenos ncRNAs, esperamos que ao menos uma via de RNAi funcional, ainda que uma via alternativa, esteja presente nestes organismos.

1.2.1.2. Vias alternativas de RNAi em tripanossomatídeos

A via de RNAi vem sendo usada como uma poderosa ferramenta para estudos de função gênica. Em tripanossomatídeos foram desenvolvidos métodos para implementar a produção de dsRNAs para silenciamento de genes específicos, como o uso de plasmídeos que transcrevem dsRNAs a partir de promotores de T7 induzidos por tetraciclina (Wang *et al.*, 2000; Inoue *et al.*, 2002; Darocho, Otsu, *et al.*, 2004). Esta transcrição pode ser de um dsRNA estruturado, com sequências invertidas separadas por uma sequência aleatória, dando origem a uma estrutura de grampo ou, de parte do gene de interesse entre promotores invertidos da T7, produzindo um longo dsRNA que será processado, gerando siRNAs (Darocho, Otsu, *et al.*, 2004). Esta ferramenta já foi utilizada na manipulação genética em *T. brucei* (Wang *et al.*, 2000), *T. congolense* (Inoue *et al.*, 2002) e *L. braziliensis* (Robinson e

Beverley, 2003), além de ser usada na avaliação da funcionalidade da via de RNAi em outros tripanossomatídeos (Darocho, Otsu, *et al.*, 2004; Stoco *et al.*, 2014).

Em *T. cruzi*, foram introduzidos plasmídeos para transcrição de dsRNAs tanto de forma transiente, quanto de forma integrada ao genoma. Embora não seja observada nenhuma mudança de expressão nos genes alvo dos dsRNAs introduzidos, é importante salientar que os grampos desenhados têm sequências grandes (no mínimo 300 pb de braço), o que implicaria na necessidade de processamento dos dsRNAs para gerarem siRNAs. A introdução direta de um siRNA de 21 nt também não induziu alteração de expressão do gene alvo (Darocho, Otsu, *et al.*, 2004).

A ausência de Dicers e de uma Argonauta do tipo AGO pode explicar a falta de resposta da via clássica de RNAi em *T. cruzi*. Porém, a presença de uma Argonauta do tipo PIWI, a TcPIWI, já foi caracterizada neste organismo (Garcia Silva *et al.*, 2010), previamente descrita como contendo apenas o domínio PIWI bem estruturado (Ullu *et al.*, 2004). Estudos mais recentes demonstram que a TcPIWI possui todos os domínios funcionais (PAZ, MIDI e PIWI), além dos aminoácidos conservados da tríade catalítica, responsável pela atividade de clivagem das Argonautas (Garcia Silva *et al.*, 2010). Supondo que a TcPIWI estivesse localizada em vesículas compartilhadas entre o parasito e o hospedeiro, contendo pequenos RNAs derivados de tRNAs, o que alteraria a infectividade do parasito, Garcia-Silva *et al.* (2014) transfectaram células de mamífero com essas vesículas. Observou-se uma alteração no padrão de expressão gênica do hospedeiro, embora nenhum mecanismo de ação tenha sido atribuído à TcPIWI. É importante ressaltar que o conteúdo das vesículas não se limita à presença dos pequenos RNAs derivados de tRNA, portanto a resposta observada pode não ser ligada diretamente a eles. (Garcia-Silva, Cabrera-Cabrera, *et al.*, 2014).

Também em *L. major* a transfecção de plasmídeos contendo dsRNAs não diminui a expressão de genes alvo, assim como a transfecção direta de siRNAs direcionados às ORFs de genes (Robinson e Beverley, 2003). A presença apenas da Argonauta PIWI nestes parasitos pode explicar a falta de resposta frente à estas construções. Porém, a importância da via alternativa de RNAi, onde a PIWI figura como componente principal, foi demonstrada em estudos com *L. major* e *L. infantum*, que também só possuem a Argonauta PIWI. O inchaço das patas de

camundongos infectados com *L. major* deficiente para a PIWI é significativamente menor do que o inchaço das patas de camundongos infectados com o parasito selvagem e a taxa de crescimento de amastigotas axênicas de *L. infantum* deficientes para a proteína PIWI é menor quando comparada com a de parasitos selvagens (Padmanabhan *et al.*, 2012).

Recentemente, o sequenciamento do genoma de *T. rangeli* possibilitou a busca de componentes da via de RNAi utilizando ortólogos da via caracterizados em *T. brucei*. Foi detectada a presença de genes codificadores para DCL2 e PIWI, e pseudogenes que corresponderiam a outras quatro proteínas da via (AGO1, DCL1, RIF4 e RIF5). Estes pseudogenes apresentaram códons de parada ou mudança na janela de tradução na região codificadora, o que sugere que não são funcionais (Stoco *et al.*, 2014). Assim como observado para *T. cruzi* e *L. major*, que não possuem a via clássica de RNAi, em *T. rangeli*, a expressão de um dsRNA sob comando do promotor T7 induzido por tetraciclina também não diminuiu a expressão do gene alvo (Stoco *et al.*, 2014).

O sequenciamento de pequenos RNAs de organismos que possuem vias alternativas de RNAi demonstra uma variedade de populações derivadas de snRNAs e tRNAs por exemplo. Os pequenos RNAs derivados de tRNAs constituem uma população conservada, que parece ter importância biológica e levanta a hipótese de sua ligação à via alternativa de RNAi (Lee e Collins, 2005; Garcia-Silva *et al.*, 2010; Garcia-Silva *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2013).

1.2.1.3. Pequenos RNAs derivados de tRNA

O acúmulo de RNAs de 30-35 nt que correspondem a pequenos RNAs derivados de tRNA foram primeiramente reportados em *Tetrahymena thermophila* (Lee & Collins 2005). Logo depois, o processo mostrou-se conservado e ter função na resposta ao estresse oxidativo em vários eucariotos (Thompson *et al.* 2008), assim como na resposta a outros tipos de estresse, como deficiência nutricional, mudanças bruscas de temperatura e hipóxia (Thompson & Parker 2009; Nawrot *et al.* 2011). Em formas epimastigotas de *T. cruzi* já foram identificados pequenos RNAs derivados da porção 5' de tRNAs específicos e sua produção é acentuada sob estresse nutricional (Garcia Silva *et al.* 2010). Outros estudos mostram que a forma

metacíclica do *T. cruzi* possui uma população de pequenos RNAs derivados da porção 3' do tRNA, com tamanho médio de 33 nt e distribuição dispersa no citoplasma, em contraste com a co-localização dos pequenos RNAs de formas epimastigotas com grânulos citoplasmáticos (Reifur et al. 2012). A localização dispersa no citoplasma das formas metacíclicas é consistente com a localização, em humanos, de pequenos RNAs derivados de tRNA gerados da clivagem pela enzima RNaseZ no citoplasma, e terminação pela RNA polimerase III. Além disso, estes pequenos RNAs já foram co-imunoprecipitados com proteínas Argonautas em humanos (Elbarbary et al. 2009; Haussecker et al. 2010) e também foram associados à Argonauta em *Tetrahymena* e plantas. Embora a função principal deste complexo seja desconhecida, sabe-se que em *Tetrahymena* a associação do pequeno RNA derivado de tRNA com a Argonauta leva à translocação do complexo para o núcleo e em plantas, a infecção com *Pseudomonas syringae* leva a um aumento significativo destes pequenos RNAs (Couvillion 2010; Loss-Morais et al. 2013).

O sequenciamento na plataforma 454 de pequenos RNAs, identificou ncRNAs em *T. cruzi*, sendo os mais abundantes os originados de tRNAs, seguido por ncRNAs derivados de rRNAs e snRNAs. Os pequenos RNAs derivados de tRNA possuem uma média de 38 nt de tamanho e mais de 80% deles derivam da região 3' do tRNA. A região do tRNA-His é responsável pelo maior número de pequenos RNAs gerados. A presença da sequência "CCA", que em tRNAs é adicionada após a transcrição, indica que os pequenos RNAs provém de tRNAs maduros (Franzen et al., 2011). Estudos recentes tentam fazer uma associação entre a TcPIWI e os pequenos RNAs derivados de tRNA por meio do sequenciamento dos RNAs imunoprecipitados com a TcPIWI (Garcia-Silva, Sanguinetti, et al., 2014). Estes pequenos RNAs estariam dentro de vesículas que seriam exportadas e trocadas entre parasitos e até entre o parasito e o hospedeiro (Garcia-Silva, Das Neves, et al., 2014). A incubação de vesículas de epimastigotas de *T. cruzi* com células HeLa de mamíferos induz uma mudança no padrão de expressão de genes do hospedeiro, teoricamente apontando para a importância da TcPIWI e dos pequenos RNAs derivados de tRNA (Garcia-Silva, Cabrera-Cabrera, et al., 2014). Estes resultados instigam para que novos estudos sejam realizados com o intuito de comprovar as

suposições aventadas, e especialmente, comprovar em *T. cruzi* a importância desta via não canônica de RNAi nos processos biológicos do parasito.

A identificação de pequenos RNAs derivados de tRNA em *T. cruzi* e a falta de uma via clássica de RNAi neste organismo levantou a questão se estes pequenos RNAs estariam ligados a uma via de RNAi não canônica (Garcia-Silva et al. 2012; Zheng et al. 2013). Vale ressaltar que em todos os organismos nos quais as proteínas Argonautas foram identificadas, existe sua associação com ncRNAs.

Os pequenos RNAs associados a PIWI de tripanossomatídeos e até mesmo a própria proteína Argonauta são pouco estudados por não estarem relacionados a uma via clássica de RNAi. Deste modo, o desenvolvimento de bibliotecas focadas em analisar o repertório de ncRNAs associados à PIWI, são essenciais para que se possa desvendar possíveis novas formas de regulação da expressão gênica em organismos deficientes na via clássica de RNAi.

Justificativa

2. Justificativa

As vias de RNAi utilizam pequenos RNAs não codificantes associados às proteínas Argonautas para regulação da expressão gênica e outros processos biológicos. A presença de proteínas da família Argonauta e de pequenos RNAs, que em todos os organismos eucariotos já caracterizados estão sempre associados, é indicativo da existência de vias de RNAi. Além disso, a diversidade de proteínas Argonautas em um organismo está diretamente relacionada à variedade de vias de RNAi encontradas. É importante destacar a grande variedade de vias de RNAi encontradas em protistas unicelulares tanto de vida livre, quanto parasitos.

Nos tripanossomatídeos são observadas somente duas proteínas da família Argonauta: as proteínas PIWI e AGO. A proteína AGO não é conservada em todos os tripanossomatídeos, mas é a Argonauta ligada à via clássica de RNAi, na qual o silenciamento gênico é ativado por dsRNA. A maioria dos estudos das vias de RNAi em tripanossomatídeos tem se concentrado na identificação e caracterização dos pequenos RNAs associados à proteína AGO. Os tripanossomatídeos que, como o *T. cruzi*, não possuem a proteína AGO, parece não serem capazes de ativar o silenciamento gênico induzido por dsRNA. Em contraste à AGO, a PIWI é pouco estudada e altamente conservada em todos os tripanossomatídeos. Sua conservação sugere uma função importante nestes organismos. De acordo com esta hipótese, duas espécies de *Leishmania* deficientes para o gene PIWI apresentam diminuição na replicação e patogenicidade. Entretanto, não sabemos por meio de qual mecanismo molecular a proteína PIWI funciona em tripanossomatídeos. Considerando as evidências de associação de proteínas Argonauta com ncRNAs em todos os eucariotos, é de se esperar que a função da PIWI também envolva ácidos nucléicos.

Pequenos ncRNAs também foram identificados em *T. cruzi*, porém sua função ainda não está bem caracterizada. É importante destacar que as famílias de ncRNAs identificadas em *T. cruzi* representam principalmente pequenos RNAs derivados de tRNA. Embora em outros organismos, estes pequenos RNAs derivados de tRNA já tenham sido mostrados em associação com proteínas Argonauta, em *T. cruzi* há fraca evidência de que estes ncRNAs podem se associar à PIWI.

A presença da PIWI e de pequenos RNAs em *T. cruzi* sugere a existência de uma via de RNAi que difere da função clássica de silenciamento gênico induzido por dsRNA. Comparada a outras proteínas Argonautas de eucariotos, a PIWI é somente encontrada em tripanossomatídeos e pode estar ligada a uma nova via de RNAi com mecanismo de ação próprio. Devido a sua conservação em tripanossomatídeos, a PIWI e esta nova via de RNAi devem ser de grande importância para a biologia do parasito e poderiam também ser exploradas como alvo de terapias antiparasitárias. Assim, para a compreensão desta nova via de RNAi e suas possíveis aplicações, é necessária a caracterização funcional da PIWI e de pequenos RNAs em *T. cruzi*.

Objetivos

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Identificar e caracterizar a Argonauta TcPIWI e populações de pequenos RNAs em *T. cruzi*.

3.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar o gene *PIWI* de *T. cruzi* (*TcPIWI*);
- Gerar e caracterizar parasitos deficientes para o gene *TcPIWI*;
- Gerar e caracterizar parasitos expressando *TcPIWI* fusionada a uma cauda HA ou Flag;
- Caracterizar a localização subcelular da TcPIWI em parasitos transgênicos;
- Identificar e caracterizar populações de RNAs de baixo peso molecular em *T. cruzi*.

4. Materiais e Métodos

4.1. Construção de plasmídeos

4.1.1. Plasmídeos para deleção do *TcPIWI* endógeno

Amplificamos o gene *TcPIWI* a partir do cDNA de epimastigotas usando iniciadores específicos (Tabela 2) e o ligamos ao vetor de clonagem pGEM[®]-T (PROMEGA[®]) de acordo com as instruções do fabricante, respeitando uma proporção de 3:1 entre o inserto e o vetor.

A partir dos plasmídeos molde pROCK-GFP-Hig e pROCK-GFP-Neo (gentilmente cedidos pela Prof. Dra. Santuza Teixeira, UFMG – Belo Horizonte/MG) amplificamos os genes de resistência à geneticina (*neo*) e higromicina (*higro*) com iniciadores específicos, acrescidos das sequências de reconhecimento das enzimas de restrição (PROMEGA[®]) *HindIII* (região 5') e *BamHI* (região 3') (Tabela 2). Os iniciadores amplificam regiões acima e abaixo dos genes de resistência, englobando sequências ricas em pirimidina, essenciais para a maturação do mRNA. A sequência rica em pirimidina que provem da região denominada HX1, localizada acima do gene *TcP2β* é responsável pela sinalização da adição do *splice leader* (Vazquez e Levin, 1999), enquanto a que provem da região abaixo do gene *GAPDH* que está abaixo dos genes de resistência, é responsável pela sinalização da poliadenilação (Darocho, Silva, *et al.*, 2004).

Tabela 2 – Iniciadores utilizados para deleção do *TcPIWI* endógeno (acho melhor manter a mesma nomenclatura do subítem)

Nome Iniciador	Sequência
<i>TcPIWI</i> _Fwd	ATGTTTTTGTTCCTCATGATC
<i>TcPIWI</i> _Rvs	TTCCAAAAACCACAAACGTTC
HX1_Fwd*	AACGGAAAGCTTAGTTTCTTCAAATATGCAG
GAPDH3'_Rvs**	GGCTAGAACTAGGGATCCAACCTC

(Fwd) iniciadores 5'; (Rvs) iniciadores 3'

* sublinhado indicando sítio da enzima de restrição *HindIII*

** sublinhado indicando sítio da enzima de restrição *BamHI*

Digerimos o vetor de clonagem contendo a sequência para *TcPIWI* (pGEM-*TcPIWI*) com as enzimas de restrição *HindIII* e *BamHI* de acordo com as especificações do fabricante. O gene *TcPIWI* foi clivado em 3 lugares, liberando um fragmento de 1474 pares de bases (pb), outro de 96 pb e mantendo no vetor uma sequência do *TcPIWI* de 945 pb na região 5', e uma de 798 pb na região 3'. O produto de PCR dos genes de resistência também foi digerido com ambas as enzimas.

Realizamos então a ligação do pGEM-*TcPIWI* digerido com os produtos de PCR dos genes de resistência também digeridos para a formação dos plasmídeos pGEM-*TcPIWI*Higro e pGEM-*TcPIWI*Neo (Figura 4). Finalmente, digerimos os plasmídeos obtidos com a enzima *NotI* (PROMEGA®) para liberação das construções *TcPIWI*Higro e *TcPIWI*Neo, e posterior transfecção no parasito, visando a recombinação homóloga nos *locus* da *TcPIWI* endógena.

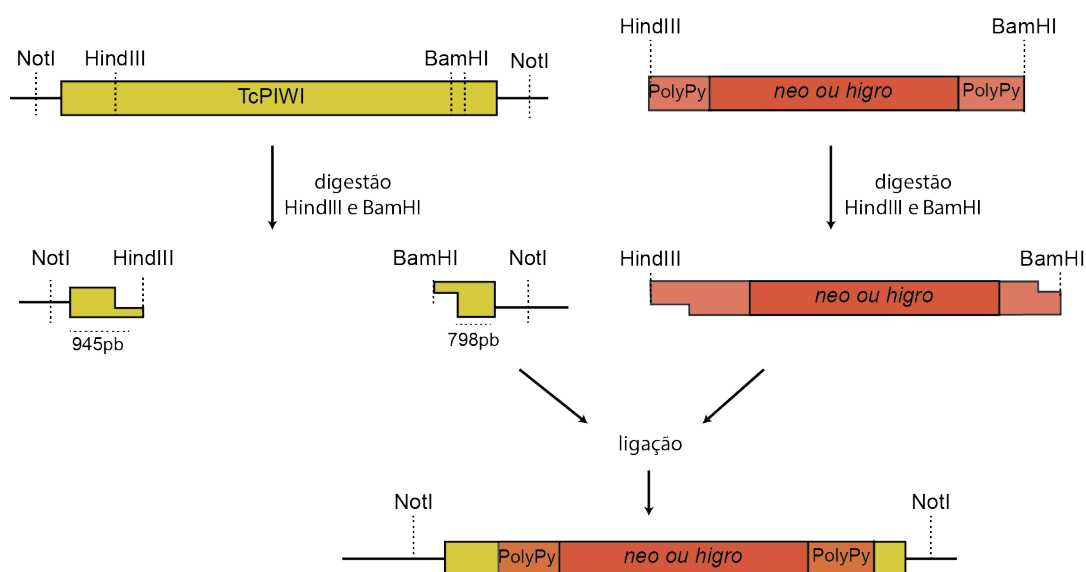


Figura 4 – Obtenção das construções *TcPIWI*Neo e *TcPIWI*Higro para deleção do *TcPIWI* endógeno por recombinação homóloga. O *TcPIWI* amplificado por PCR foi digerido com as enzimas *HindIII* e *BamHI* deixando apenas fragmentos de 945 pb na região 5' e 798 pb na região 3'. Após a digestão das resistências com as mesmas enzimas de restrição os fragmentos foram ligados, culminando em uma construção final com os braços de homologia do *TcPIWI* nas pontas, e o gene de resistência interrompendo a sequência.

4.1.2. Plasmídeo para expressão da *TcPIWI*

Para obtenção da construção de recuperação da expressão do *TcPIWI*, utilizamos o protocolo descrito por Gibson (Gibson *et al.*, 2009). Amplificamos três fragmentos: *TcPIWI* (sem o códon de iniciação), cauda HA-Flag (amplificado de um plasmídeo gentilmente cedido pelo Dr. Eric Miska, Universidade de Cambridge/UK) e o vetor pROCK-GFP-*pac* sem o GFP, para a inclusão do *TcPIWI* com cauda HA-Flag no seu lugar (Figura 5). O gene *pac* confere resistência à puromicina, uma terceira resistência para permitir a correta seleção dos parasitos transfectados. Os iniciadores utilizados estão descritos na Tabela 3. Realizamos a reação utilizando o *kit* Gibson Assembly[®] Master Mix (New England Biolabs[®]) de acordo com as especificações do fabricante.

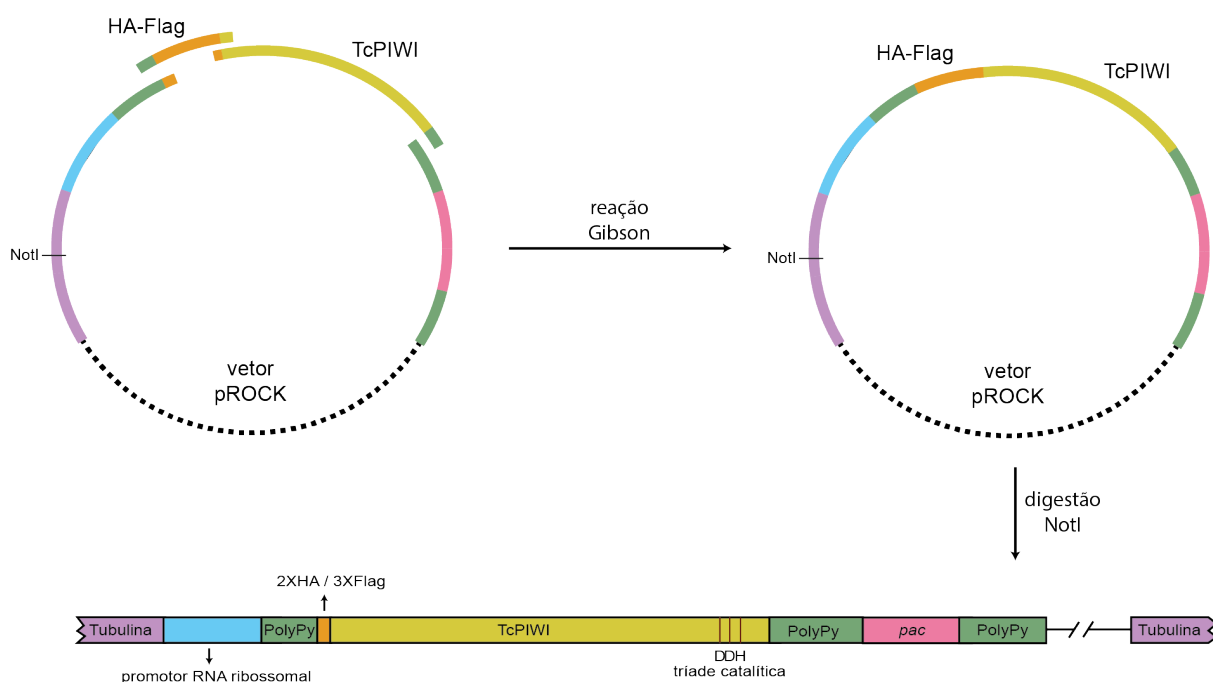


Figura 5 – Obtenção da construção para recuperação da expressão da *TcPIWI*. Os elementos HA-Flag, *TcPIWI* e o vetor pROCK foram amplificados por PCR, com extremidades que sobrepõem os fragmentos. A reação de Gibson une estes fragmentos sobrepostos fazendo a ligação completa do plasmídeo contendo a *TcPIWI* fusionada à cauda na região 5'. Após linearização com a digestão pela enzima *NotI*, o fragmento foi transfectado para integração no genoma.

Tabela 3 – Iniciadores utilizados para recuperação da expressão da TcPIWI

Nome Iniciador	Sequência*
Flag_Fwd	<u>TCTTTTTTTTTTTTTT</u> GCTCTATAAGTTGCTTTGCTCTAGAATGTACCCATACGATGTTTC
Flag_Rvs	ACAGGCATGTTTCGTTTAAAGATCATGAGGGAAAACAAAACTTGTCATCGTCATCCTTG
TcPIWI_Fwd	TAAAGATCATGACATCGACTACAAGGATGACGATGACAAGTTTTTTGTTTTCCCTCATGATCT
TcPIWI_Rvs	GTTGTTCTGCAGCGTTGCCTTGGAGTCGTAATGCTCGAGTTAAAAAACACAAACGTTTCATTC
Vetor_Fwd	<u>CTGCACCTCTGAATGAACGTTTGTGGTTTTTTTAACTCGAGCATTTACGACTCCAAGGCA</u>
Vetor_Rvs	ATGGGTAGCCAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTACATTCTAGACAAGACAACCTTATAGAGC

(Fwd) iniciadores 5'; (Rvs) iniciadores 3'

*sublinhado indicando as regiões de cada iniciador que permitiu a sobreposição das sequências

4.1.3. Sequenciamento

Enviamos os plasmídeos para a empresa MYLEUS Biotechnology & Laboratório de Genética Animal, sediada na Escola de Veterinária no *campus* da UFMG onde foram sequenciados pelo método de Sanger (Sanger e Coulson, 1975). A quantidade de amostra e de iniciadores foi determinada pela empresa e o resultado foi analisado pelo programa SnapGene (GSL Biotech LLC[®]).

4.2. Cultivo de Epimastigotas

Cultivamos epimastigotas de *T. cruzi* CL Brener em meio LIT contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab) e os antibióticos penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) (InvitrogenTM). Mantivemos a cultura a 28°C em fase exponencial de crescimento (0,8 a 1,8 x 10⁷ parasitas/mL) por meio de repiques diários. Para determinarmos o número de parasitos, a suspensão de parasitos vivos foi diluída em PBS 1X e submetida à contagem em câmara de Neubauer.

4.3. Transfecção de Parasitos

Realizamos a transfecção de parasitos com o kit Amaxa[®] Basic Parasite Nucleofector[®] 2 (Lonza) no equipamento NucleofectorTM 2d Device, utilizando o programa U-033 de acordo com as especificações do fabricante.

4.4. Obtenção de Clones

Obtivemos clones dos parasitos transfectados por meio de diluição limitante. Diluímos parasitos em fase exponencial até uma concentração de 10^2 parasitos/mL e então adicionamos 100 μ L desta diluição (contendo 10 parasitos) em 100 μ L de meio LIT em poços de uma placa de 96 poços. A partir daí, realizamos uma diluição seriada de 1:1 por toda a placa. Coletamos a suspensão da última diluição na qual houve crescimento do parasito, e a colocamos em garrafa de cultura com 5 mL de meio LIT acrescido dos antibióticos pertinentes à seleção. Após dois repiques em fase exponencial de crescimento, submetemos as amostras à extração de RNA e DNA para confirmação da seleção dos clones.

4.5. Curva de Crescimento

Repicamos parasitos em fase exponencial de crescimento por três dias. Após este tempo, ajustamos a concentração de todas as amostras experimentais para $1,3 \times 10^7$ parasitos/mL e passamos a efetuar uma contagem diária do número de parasitos. As alíquotas de amostra foram diluídas em PBS 1X e a contagem realizada em câmara de Neubauer.

4.6. Coloração por Panótico Rápido

O panótico rápido baseia-se no princípio de coloração hematológica estabelecida por Romanowsky no qual a amostra é submetida a uma sequência de três soluções: solução de fixação, de coloração de elementos básicos e a última de coloração de elementos ácidos (Power, 1982).

Plaqueamos 2×10^6 parasitos em lamínulas de 15 mm e esperamos secar. Em seguida, mergulhamos a lamínula por 60 s, em cada uma das soluções do kit de panótico rápido (RenyLab). Após a coloração, permitimos a completa secagem da lamínula e montamos em lâmina com Hydromount (National Diagnostics).

4.7. Diferenciação *in vitro*

O envelhecimento do meio de cultivo e a privação de nutrientes desencadeiam a diferenciação dos parasitos, que passam da forma epimastigota para tripomastigota metacíclico (Chiari, 1974). Para induzir a diferenciação nas nossas culturas, deixamos os parasitos em fase exponencial de crescimento em meio LIT para envelhecimento e, após 6 e 9 dias, coletamos 1×10^7 parasitos para fixação em lamínula e coloração com panótico rápido. A diferença morfológica e principalmente o posicionamento do kinetoplasto, permitiu a diferenciação e consequente contagem de epimastigotas e tripomastigotas, e, deste modo, determinamos a porcentagem de diferenciação ocorrida.

4.8. Irradiação de parasitos

Submetemos garrafas de cultura contendo epimastigotas em fase exponencial de crescimento a uma dose de 500 Gy de radiação gama proveniente de uma fonte de cobalto (^{60}Co), disponível no CNEN/CDTN - Instituto de Pesquisa do Ministério de Ciência e Tecnologia localizado no *campus* da UFMG, Belo Horizonte/MG. A dose de 500 Gy foi determinada com base em estudos anteriores (Regis-Da-Silva *et al.*, 2006) e obtida pela exposição a uma taxa de 1.500 Gy/h, distando 42 cm da fonte de radiação, por 20 min. Após a irradiação, contamos os parasitos em câmara de Neubauer em diferentes tempos e submetemos as amostras à extração de RNA.

4.9. Infecção de macrófagos por tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi*

4.9.1. Cultivo de Células L-929

O sobrenadante das células L-929 possui o fator estimulador de colônias de monócitos (M-CSF) denominado de *L929-cell Conditioned Medium* (LCCM), que induz a derivação de células hematopoiéticas pluripotentes em macrófagos. Para obtenção deste sobrenadante, cultivamos células L-929 derivadas de camundongos cepa C3H/An em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, GIBCO) completo suplementado (L-glutamina 1:100, penicilina e estreptomicina 1:100,

piruvato de sódio 1:100, HEPES 1:40 e 10% SFB), em garrafas de cultura a 37°C, 5% CO₂. Coletamos o sobrenadante após 10 dias da segunda passagem, filtrando através de membrana de 0,22 µm e armazenamos em tubos falcon de 50 mL no freezer -80°C.

4.9.2. Obtenção de *Tripomastigotas Metacíclicos*

Armazenamos 1×10^7 epimastigotas/mL em garrafas próprias a 28°C sem nenhuma perturbação para permitir a adesão das formas epimastigotas na garrafa, favorecendo o enriquecimento do sobrenadante com tripomastigotas metacíclicos (Bonaldo *et al.*, 1988). Após 10 dias de armazenamento para envelhecimento do meio de cultura, retiramos cuidadosamente o sobrenadante das garrafas e diluímos uma alíquota de parasitos em PBS 1X para contagem em câmara de Neubauer. Após fixação e coloração de 2×10^6 parasitos com panótico rápido, determinamos a quantidade de parasitos a serem utilizados para a infecção *in vitro* de macrófagos derivados de medula óssea de camundongo. A porcentagem de diferenciação foi calculada após contagem das formas tripomastigota e epimastigota na amostra.

4.9.3. Obtenção de Macrófagos Derivados de Medula Óssea

Sacrificamos camundongos C57/BL6 de 4 a 6 semanas por deslocamento cervical e os submergimos em álcool 70%. Removemos fêmures e tíbias, retiramos o tecido muscular e armazenamos os ossos em placas de petri mantidas no gelo. Retiramos as extremidades dos ossos, lavamos com 5 mL de HBSS (solução salina) 1X gelado e coletamos o lavado em falcons de 50 mL mantidos em gelo. Centrifugamos essa solução a $1.200 \times g$ por 10 min a 4°C. Desprezamos o sobrenadante e ressuspendemos o *pellet* em 1 mL de DMEM suplementado com 10% de SFB, 1% de HEPES 1 M (GIBCO) e 10% de LCCM (L929 *cell conditioned medium*), como uma fonte de M-CSF. Adicionamos então, 12 mL de DMEM completo a cada tubo. A fim de reter os resíduos de tecidos musculares e ossos filtramos a solução e ressuspendemos em placas de petri. Incubamos as placas em estufas a 37°C e 5% CO₂, *overnight*.

Coletamos as células não aderidas e centrifugamos a 1.200 x g por 10 min, a 4°C. Descartamos o sobrenadante, ressuspendemos o *pellet* em 1 mL de DMEM complementado e determinamos a concentração celular em câmara de Neubauer. Ajustamos a concentração para obtermos cerca de 5×10^5 células que foram plaqueadas em por poço de placas de 24 poços. No quarto dia após o plaqueamento adicionamos 100 µL de LCCM; no sétimo dia, trocamos o meio de cultura e no décimo dia, os macrófagos estavam prontos para infectarmos.

4.9.4. Infecção

Centrifugamos o sobrenadante da cultura envelhecida de *T. cruzi* a 2.500 x g por 10 min à temperatura ambiente (TA) e ressuspendemos em meio DMEM na proporção de $2,5 \times 10^6$ tripomastigotas para cada 200 µL de meio. Paralelamente, removemos o meio de cultura dos macrófagos plaqueados em placas de 24 poços, no décimo dia de cultivo, conforme descrito anteriormente, e adicionamos 200 µL de meio de cultura contendo tripomastigotas metacíclicos. A concentração de parasitos fica, deste modo, ajustada para multiplicidade de infecção de 5 tripomastigotas para cada macrófago (*Multiplicity Of Infection*; MOI 5:1) por poço (a infecção foi feita em triplicata). Macrófagos não submetidos à infecção por *T. cruzi* foram utilizados como controles. Nosso tempo de infecção foi de 30 min e, em cada *timepoint*, lavamos os poços por duas vezes com PBS 1X gelado, e coletamos os macrófagos para extração de RNA e DNA e para quantificação de células infectadas pela coloração por panótico rápido nos tempos de 4, 8, 16 e 48 horas após a infecção.

4.10. Extração de RNA

Esterilizamos todos os instrumentos utilizados por autoclavagem ou os limpamos com inibidor de RNase RNaseZap (Ambion®).

Homogeneizamos as amostras de parasitos ou células coletadas como descrito anteriormente com 1 mL de TRIzol® Reagent (Invitrogen™) e incubamos o homogeneizado por 10 min à TA. Adicionamos 50 µL de clorofórmio (Sigma®) seguindo de agitação vigorosa em vortex por 15 s. Após uma incubação por 10 min à TA, centrifugamos as amostras por 10 min a 12.000 x g, a 4°C. Depois da

centrifugação, transferimos a fase aquosa para um novo tubo, e armazenamos a fase orgânica para posterior extração de DNA.

Adicionamos então 500 µL de isopropanol (Sigma®) à fase aquosa, seguida de agitação leve em vortex e, após incubarmos por 10 min à TA, centrifugamos as amostras por 10 min a 12.000 x g. Descartamos o sobrenadante, e adicionamos, em cada tubo, 750 µL de etanol 75% v/v (Sigma®) preparado utilizando água livre de nucleases (*Nuclease-Free Water* – Ambion®). Após agitação branda em vortex, centrifugamos novamente os tubos por 5 min a 7.500 x g e, em seguida descartamos o sobrenadante deixando o *pellet* secar pela inversão dos tubos em papel absorvente. Após a secagem, ressuspendemos o RNA em água livre de nucleases (Ambion®) e armazenamos as amostras imediatamente a -80°C até o momento do uso.

4.11. Extração de DNA

Adicionamos 600 µL de etanol absoluto (Sigma®) na fase orgânica armazenada da extração de RNA e, após uma incubação de 5 min à TA, centrifugamos os tubos a 2.000 x g por 5 min, a 4°C.

Retiramos cuidadosamente o restante do TRIzol® observando o *pellet* e realizamos, no mínimo, 3 lavagens com adição de 1 mL de citrato de sódio 0,1 M em 10% de etanol; incubamos por 30 min à TA e centrifugamos a 2.000 x g por 5 min, a 4°C. Após as lavagens com citrato, adicionamos 1 mL de etanol 75% v/v (Sigma®) seguido de incubação por 20 min à TA. Centrifugamos então o tubo a 2.000 x g por 5 min a 4°C, descartamos o sobrenadante e ressuspendemos o DNA em água livre de nucleases (Ambion®).

4.12. RT-qPCR

4.12.1. Transcrição reversa (RT)

Sintetizamos a primeira fita do cDNA utilizando a enzima Transcriptase Reversa M-MLV (Promega[®]), com seu tampão (Tris-HCl 50 mM pH 8,3; KCl 75 mM; MgCl₂ 3 mM), 400 ng de RNA total, 15 mM de *Random Primers* (Invitrogen[™]), 625 µM de dNTPs (GE Healthcare), 0,01 M de DTT (Sigma[®]) e água livre de RNase para um volume final de 20 µL. Primeiramente fizemos a desnaturação do RNA por meio da incubação da mistura RNA e *Random Primers* a 70°C em termociclador durante 10 min, seguido de banho de gelo. Foram então adicionamos o tampão da enzima, DTT e 2 unidades da enzima transcriptase reversa. Posteriormente, incubamos essa mistura novamente em termociclador a 42°C durante 60 min e 72°C por 5 min. Por fim, estocamos a amostra a -20°C até o momento do uso.

Fizemos controles sem a presença da enzima (RT-) em todas as reações de transcrição reversa a fim de avaliar a possível contaminação com DNA genômico, tendo em vista que não é feito o tratamento com DNase nas amostras de RNA total.

4.12.2. Desenho de iniciadores

Desenhamos os iniciadores utilizados neste trabalho utilizando o software Primer3Plus (Untergasser *et al.*, 2012), com pequenas modificações nos parâmetros definidos como padrão. Para os iniciadores utilizados para qPCR por exemplo, temos: tamanho do *amplicon* entre 70 e 150 nt, temperatura ideal de anelamento em 60°C, conteúdo GC ideal de 50% e número máximo de 3 bases seguidas repetidas.

Tabela 4 – Iniciadores utilizados para qPCR e PCR

Método	Nome Iniciador	Sequência
qPCR	<i>TcPIWI_Fwd</i>	GCAGAAACTGACCTCGTATGG
	<i>TcPIWI_Rvs</i>	CGATTCTGTTTGTGATTCAAAGAT
	RPL9_Fwd	TGACAACTCGACCATCAACA
	RPL9_Rvs	GGCGAAGCGAATCTTAAAAC
	RPL32_Fwd	GCTGCCATCTGTTTTACGG
	RPL32_Rvs	TGACTGGTGCCTGATGAACT
PCR	GAP_Fwd	AGTGAGCGCCAGAGACAAAG
	GAP_Rvs	GGAGCACCCAGAGAGACTTGC
	5'UTR <i>TcPIWI_Fwd</i>	ATGAGTCCCTTGCGCATTCA
	Higro_Rvs	AGCTGCATCAGGTCGGAGAC
	Neo_Rvs	GGCGGCATCAGAGCAGC
	MSH2_Fwd	GAGTACTACGAACGACCAC
MSH2_Rvs	AGCAAATACGATATGAGAGA	

(Fwd) iniciadores 5'; (Rvs) iniciadores 3'

4.12.3. Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR)

Para análise da expressão gênica e quantificação relativa dos genes foi utilizada a técnica de PCR quantitativo, conhecida como *Real Time PCR*. Realizamos as reações utilizando o kit *SYBR® GREEN PCR Master Mix* (Applied® Biosystems) conforme boletim técnico do fabricante, utilizando o equipamento *StepOnePlus™ RealTime PCR System* (Applied® Biosystems). Realizamos as análises utilizando o método do $2^{-\Delta Ct}$ calculado em relação ao gene constitutivo RPL9 (*Ribosomal Large Subunit 9*) para as amostras do parasito e RPL32 (*Ribosomal Large Subunit 32*) para as amostras de macrófago.

Verificamos a eficiência dos diversos iniciadores utilizando diluições seriadas de 10X de diferentes amostras de cDNA. Realizamos os ensaios em duplicata e a concentração dos iniciadores foi de 400 nM. Ajustamos os valores de *baseline* e *threshold* de acordo com cada par de iniciadores.

4.13. *Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)*

Submetemos o cDNA ou DNA à reação de PCR utilizando reagentes da GoTaq® DNA Polymerase (Promega), sendo que cada uma das reações continha: 1 unidade de Taq DNA polimerase, 10 pmol de cada um dos iniciadores, 1 µL tampão GoTaq 10X, 0,2 µL dNTP [10 mM], 0,3 µL de cloreto de magnésio [50 mM], 0,1 µL de amostra e água livre de nucleases em quantidade suficiente para completar 10 µL. Realizamos as amplificações seguindo a ciclagem: uma desnaturação inicial (95°C por 5 min); ciclos contendo desnaturação (95°C por 30 s), anelamento dos iniciadores (as temperaturas são específicas para cada iniciador) e extensão (72°C, sendo o tempo de extensão dependente do tamanho do *amplicon*); e o passo final de extensão a 72°C por 10 min. Visualizamos o resultado da PCR por eletroforese em gel de agarose ou gel de poliacrilamida.

4.14. *Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na Presença de SDS*

Ressuspendemos as amostras contendo aproximadamente 10⁸ parasitos com tampão de lise (Tris-HCl pH 7,4 50 mM; EGTA 1 mM; Tween 20 1%; NaCl 150 mM e inibidores de protease - Sigma®) e sonicamos com 10 ciclos de 10 s no sonicador e 2 s no gelo. Após incubadas em gelo por 1 h, centrifugamos as amostras 14.000 rpm por 15 min para clarificação do lisado. Quantificamos as amostras pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e armazenamos a -20°C até o uso.

Para verificação das amostras protéicas, realizamos a eletroforese usando mini-géis constituídos de um gel de empilhamento (4%) e um de separação (8%). Em todos os lisados, antes de serem aplicados em SDS-PAGE, adicionamos tampão de amostra 6X e fervemos por 5 min. Aplicamos uma quantidade de aproximadamente 50 µg de proteína em cada gel.

Para a corrida da eletroforese utilizamos o tampão de eletrodo (Tris 25 mM; glicina 187 mM e SDS 0,1%), com voltagem inicial de 70 V, passando para 100 V após a entrada das amostras no gel de separação. Submetemos imediatamente os géis à transferência para membranas de nitrocelulose (BioRad) após o término da corrida.

4.15. Imunodetecção de Proteínas (Western Blot)

Transferimos as proteínas separadas por SDS-PAGE eletroforéticamente para uma membrana de nitrocelulose de acordo com método descrito anteriormente (Towbin *et al.*, 1979), por 2 h, a 35 mA, 4°C (BioRad), utilizando tampão de transferência (Tris 25 mM; glicina 192 mM; metanol 20% e SDS 0,1%).

Após a transferência coramos a membrana com *Ponceau* 0,5% em ácido tricloroacético (TCA) 0,3% por 15 min, sob agitação. Lavamos a seguir com água para remover o excesso de corante e possibilitar a visualização das amostras para confirmação da transferência.

Antes da imunomarcação, neutralizamos os sítios inespecíficos com solução de bloqueio (5% de leite desnatado em pó em TBS/T [Tris-HCl 50 mM pH 8,0; NaCl 150 mM e Tween-20 0,1% (v/v)]) sob agitação contínua por 1 h à TA.

Após o bloqueio, lavamos a membrana 3X por 5 min em TBS/T, sob agitação contínua à TA. Em seguida, adicionamos o anticorpo primário de interesse, diluído em TBS/T e 3% de leite e incubamos a membrana *overnight* a 4°C, sob agitação.

Lavamos novamente a membrana 3X por 5 min em TBS/T, sob agitação contínua à TA para retirar o anticorpo primário não ligado. Acrescentamos então o anticorpo secundário conjugado com peroxidase, diluído em TBS/T e 3% de leite, e incubamos a membrana 1 h à TA, sob agitação contínua. Guardamos as soluções de anticorpos utilizadas a 4°C para reutilização em uma próxima marcação.

Para revelação do anticorpo, banhamos a membrana com os reagentes do kit *ECL-Western Blotting analysis system* (GE Healthcare) na proporção 1:1. Utilizamos o equipamento ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) para expor e revelar a membrana.

4.16. Imunofluorescência

Quantificamos culturas de parasito durante a fase exponencial de crescimento, coletamos 1×10^7 parasitos e centrifugamos a 5.000 rpm por 5 min. Descartamos o sobrenadante, ressuspendemos o *pellet* em 1 mL de paraformaldeído (PFA) 2% e incubamos à TA por 3 min. Centrifugamos as amostras a 5.000 rpm por 5 min e lavamos 2X com 1 mL de PBS 1X. Ressuspendemos o *pellet* em 100 µL de PBS 1X

e plaqueamos 10 μ L dessa solução em lamínula alocada em poços de placa de 24 poços. Após secagem da amostra, lavamos a lamínula 2X com PBS 1X e adicionamos 200 μ L de 0,01% de Triton X100 em PBS por 5 min para permeabilizar a membrana do parasito.

Após a permeabilização, lavamos 2X com PBS 1X para retirar o excesso de Triton X100 e realizamos o bloqueio dos sítios inespecíficos com 4% BSA em por 1 h a 4°C. Prosseguimos com a lavagem com PBS 1X por 2X e adicionamos anticorpo primário (diluído em bloqueio) incubando 1h à TA.

Lavamos novamente o poço com PBS 1X por 2X e adicionamos o anticorpo secundário (diluído em bloqueio) incubando por 1h à TA. Para montagem da lamínula, lavamos o poço com PBS 1X por 2X e deixamos a lamínula secar completamente. Montamos a lamínula em lâminas com Hydromount (National Diagnostics).

A visualização e registro das imagens foi realizada em microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta (Zeiss®) disponível no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) do Instituto de Ciências Biológicas do *campus* da UFMG.

4.17. *Anticorpos e corante*

- anticorpo monoclonal camundongo anti-HA (Sigma®), na diluição 1:5000 (imunodeteção de proteínas) ou 1:500 (imunofluorescência);
- anticorpo monoclonal camundongo anti- α -tubulina (Sigma®), na diluição 1:5000
- anticorpo cabra anti-IgG de camundongo peroxidase (Millipore®), na diluição 1:5000
- anticorpo anti camundongo alexa-488 (Molecular Probes®), na diluição 1:500;
- hoechst 33342 (Trihydrochloride, Trihydrate), na diluição 1:1000.

4.18. *Construção de Bibliotecas*

4.18.1. *RNAs de baixo peso molecular*

Para construção da biblioteca de pequenos RNAs, submetemos 1 μ g de RNA total às reações do kit TruSeq Small RNA Library Preparation Kits (Illumina®) de

acordo com protocolo do fabricante. De maneira geral, ligamos os RNAs em adaptadores tanto na região 5', quanto 3'. Fizemos o cDNA utilizando iniciadores ancorados aos adaptadores e posterior reação de PCR para aumentar o sinal das sequências. Para seleção do tamanho desejado para o sequenciamento, corremos um gel de poliacrilamida com o produto de PCR e recuperamos do gel a banda correspondente aos tamanhos entre 140-165 nucleotídeos. Esta fração, que corresponde aos RNAs de tamanho entre 20 e 45 nucleotídeos, foi utilizada para o sequenciamento.

4.18.1.1. Tratamento com polifosfatase

Pequenos RNAs sintetizados por RNA polimerases dependentes de RNA (RdRp) são tri-fosfatados na região 5' e, por isso não permitem a ligação de adaptadores nesta região, impedindo o sequenciamento pelo protocolo padrão (Pak e Fire, 2007; Sijen *et al.*, 2007). Para favorecer o sequenciamento destes RNAs, identificando assim sua possível existência nos parasitos, tratamos o RNA total com polifosfatase. Preparamos a reação com 5 µg de RNA total, 2 µL de tampão 10X da enzima, 1 µL da enzima 5' polyphosphatase (Epicentre®) e água q.s.p. 20 µL. Incubamos a reação por 30 min a 37°C e, após a incubação elevamos o volume para 100 µL com água livre de nucleases. Seguimos então com extração do RNA com fenol-clorofórmio: uma primeira extração adicionando 100 µL de fenol saturado com Tris (Sigma®) e, uma segunda extração com 24:1 clorofórmio:álcool isoamílico (Sigma®), sempre recuperando a camada superior.

Posteriormente adicionamos 1/10 acetato de sódio 3M (v/v) (Ambion®), 2,5 volumes de etanol 100% (Sigma®) e 20 µg de glicogênio (Ambion®), e deixamos a mistura precipitando *overnight* a -20°C. As amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 20 min à TA, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com etanol 70%. Centrifugamos 7.500 x g por 5 min, descartamos o sobrenadante e deixamos o *pellet* de RNA secar por 3-4 min. Ressuspendemos o RNA em 5 µL de água livre de nucleases (Ambion®).

4.19. Sequenciamento de pequenos RNAs

Realizamos todos os sequenciamentos nas plataformas HiSeq 3000 e MiSeq (Illumina®) disponíveis no Gurdon Institute, durante o período de doutorado sanduíche no laboratório do Professor Dr. Eric Miska, em Cambridge, na Inglaterra; e também em duas empresas privadas, Fasteris e BGI .

4.20. Análise Bioinformática

Submetemos as bibliotecas a um filtro de qualidade utilizando o *script fastq_quality_filter*, disponibilizado no pacote FastX-toolkit (disponível em http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/). Utilizamos os parâmetros -q 20 e -p 60 que definem, respectivamente, a qualidade mínima e a porcentagem do número total de bases com a qualidade mínima estipulada. Submetemos as sequências que passaram nos filtros de qualidade à remoção de adaptadores utilizando o software *cutadapt* (Martin, 2011) e, posteriormente, descartamos as sequências menores que 15 nt.

Realizamos o mapeamento das sequências contra os genomas de referência do parasito *T. cruzi* (versão *T.cruzi*CLBrener9.0 disponível em tritrypdb.org) ou de camundongo utilizando o *software* Bowtie versão 1.1.1 (Langmead e Salzberg, 2012), permitindo duas bases discordantes por sequência mapeada (-v 2) e reportando todos os mapeamentos para cada sequência (--all). Analizamos a distribuição de tamanho das sequências que mapearam contra o genoma do parasito, normalizando o total de sequências mapeadas no genoma do parasito pelo total de sequências mapeadas, multiplicado por 10⁶ (sequências por milhão). Para todas as análises utilizamos *scripts* Perl desenvolvidos, em colaboração, pelo estudante de doutorado André Gonçalves. Utilizamos as seguintes versões: Perl versão 5.12.4, biblioteca BioPerl versão 1.6.923, R versão 3.2.1 e o pacote ggplot2 versão 1.0.1.

Resultados e Discussão

5. Resultados e Discussão

5.1. Caracterização do gene codificador da Argonauta de *T. cruzi* (*TcPIWI*) cepa CL Brener

Com o objetivo de caracterizar o gene *TcPIWI* de *T. cruzi* inicialmente buscamos sequências de todas as proteínas de tripanossomatídeos anotadas como AGO ou PIWI no banco de dados TriTryp (<http://tritrypdb.org/>). As sequências obtidas foram utilizadas para construir um cladograma tendo como grupo externo, a proteína Argonauta AGO2 de *Drosophila melanogaster* que é distante evolutivamente dos tripanossomatídeos (Figura 6A). Podemos constatar dois clados distintos no cladograma das Argonautas de tripanossomatídeos, que agrupam separadamente as proteínas nomeadas AGO e PIWI exclusiva destes organismos. Considerando que algumas espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma* têm genes codificadores de AGO e PIWI, estes resultados sugerem que as duas Argonautas originaram-se de uma duplicação de um único gene no ancestral comum que deu origem a todos os tripanossomatídeos. Como observado por outros autores, o gene AGO está ausente em vários genomas sequenciados tanto de *Leishmania*, quanto de *Trypanosoma*, o que infere sua perda independente em espécies pertencentes aos dois gêneros (Lye *et al.*, 2010). É importante notar que a proteína PIWI é conservada em todas as espécies de tripanossomatídeos com genoma sequenciado, sendo um indício de que esta proteína pode estar associada a uma via de grande importância para estes organismos. Em nossas análises todas as cepas de *T. cruzi* parecem ter somente o gene codificador da Argonauta PIWI.

Em seguida, nós caracterizamos o gene *TcPIWI* na cepa CL Brener de *T. cruzi* que foi a primeira cepa escolhida para sequenciamento do genoma e com a qual trabalhamos. Amplificamos por PCR o gene *TcPIWI* da cepa CL Brener utilizando iniciadores desenhados a partir da sequência depositada no TriTryp (número de acesso TcCLB.511367.240), que posteriormente foi clonado e sequenciado. Verificamos polimorfismos na sequência obtida comparada à sequência referência do TriTryp. Foi possível identificar 35 modificações de nucleotídeos sendo que 13 resultaram em alterações nos aminoácidos. Destas 13, apenas 5 destas alterações foram conservativas. O cerne da proteína é bem conservado, principalmente a

região onde se encontra o domínio C-terminal, PIWI. Observamos que o motivo de poliglutamina encontrado no gene *TcPIWI* que nós sequenciamos codifica 9 aminoácidos a menos do que o gene anotado no genoma depositado no TriTryp (Figura 6B). Estes domínios de poliglutamina já foram descritos em Argonautas de *Drosophila* (AGO2) (Meyer *et al.*, 2006) e *Arabidopsis* (AGO1) (Bohmert *et al.*, 1998).

Estes resultados sugerem que o gene *TcPIWI* possui dois alelos apesar de somente um deles ter sido montado no genoma de referência depositado no banco de dados. Para confirmar esta observação, obtivemos os dados originais do sequenciamento de *T. cruzi* (gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Daniella Bartholomeu, UFMG/MG) e constatamos que estes polimorfismos, assim como a diferença do motivo poliglutamina estão presentes também nas sequências originais (Figura 6C). Como a cepa CL Brener do *T. cruzi* possui um genoma híbrido, a explicação mais provável é que as duas sequências representam alelos distintos do gene *TcPIWI* presentes em cada haplótipo, mas um deles não foi originalmente montado. Ao analisarmos a região genômica do haplótipo Não-Esmeraldo onde o alelo da Argonauta que foi montado está anotado, em comparação à mesma região do haplótipo Esmeraldo, fica claro que esta região está ausente.

Para confirmar a existência dos dois alelos do gene *TcPIWI*, desenhamos iniciadores flanqueando a região do domínio poliglutamina, que possibilitaram diferenciar os dois alelos. Comprovamos a existência e co-expressão de ambos os alelos pela amplificação do DNA e do cDNA (Figura 6D). Esta caracterização foi importante para definirmos a melhor estratégia que utilizaríamos para gerar posteriormente, parasitos deficientes.

5.2. Geração de parasitos deficientes em *TcPIWI*

Para caracterizar a função de *TcPIWI* construímos plasmídeos para deletar os dois alelos de *TcPIWI* codificados na cepa CL Brener de *T. cruzi* por meio de recombinação homóloga. A descoberta de que *TcPIWI* possui dois alelos na cepa CL Brener tornou essencial a construção de dois plasmídeos diferentes. Assim, devido ao desconhecimento da existência de reprodução sexuada em *T. cruzi*, as construções foram utilizadas separadamente para deletar cada um dos alelos. Uma primeira construção, possuindo um gene de resistência à gentamicina (*neo*) foi transfectada no parasito e, após seleção dos transfectados, selecionamos 10 clones por diluição limitante, tendo sido um deles utilizado para a transfecção da segunda construção. A segunda transfecção foi realizada com uma construção contendo *higro* como segundo gene de resistência, possibilitando a seleção da população homozigota deficiente, para sua caracterização (Figura 7A).

Verificamos por qPCR que após a transfecção com a primeira construção houve uma redução de metade do número de cópias de *TcPIWI* no DNA genômico do clone selecionado, em comparação com o parental selvagem (Figura 7B). Após a transfecção da segunda construção, não detectamos mais o gene *TcPIWI*. Também por qPCR a partir do cDNA do clone, foi possível verificar a diminuição da expressão do gene no clone heterozigoto para a deleção, e a ausência de RNAs transcritos no clone homozigoto (Figura 7C), como era esperado. Para confirmar a correta integração das construções no genoma durante a recombinação homóloga, desenhamos um iniciador 5', 369 pb acima do códon de iniciação do gene *TcPIWI* e iniciadores 3' na região dos genes de resistência *neo* ou *higro* (setas verdes na Figura 7A). Constatamos pela amplificação destes dois fragmentos no parasito homozigoto que a integração de cada construção ocorreu no *locus* do gene endógeno de *TcPIWI* em ambos os alelos (Figura 7D).

Desenvolvemos portanto, parasitos homozigotos para a deleção do gene *TcPIWI* que mostrou-se não ser necessário para a viabilidade do *T. cruzi*. Nosso próximo passo foi caracterizar os parasitos deficientes para verificar a importância da *TcPIWI* em diversos processos biológicos.

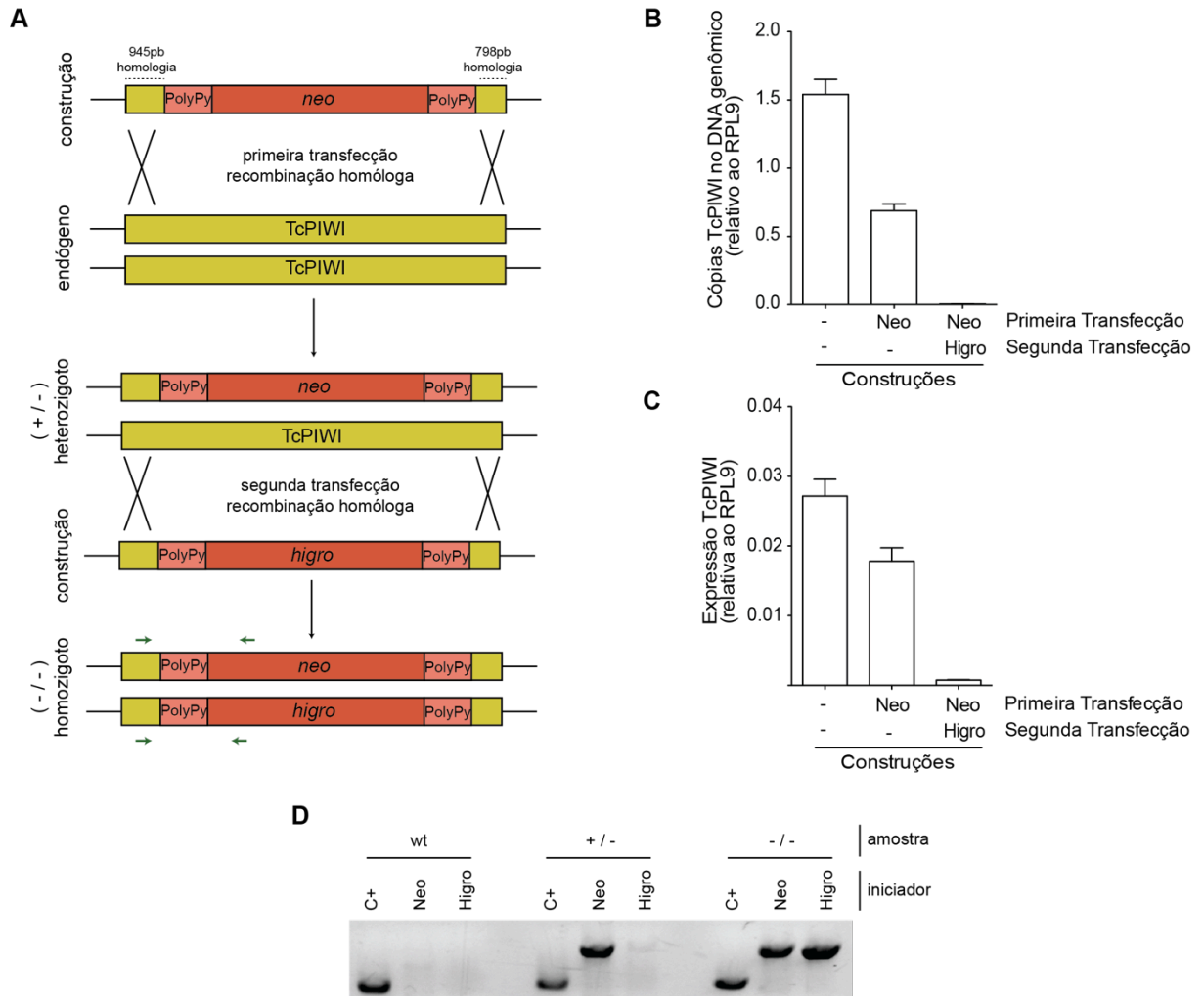


Figura 7 – Desenvolvimento de parasitos homozigotos deficientes para o gene *TcPIWI* endógeno. (A) Representação da recombinação homóloga esperada com as construções do *TcPIWI* interrompido pelos genes de resistência *neo* e *higro*, obtendo parasitos heterozigotos e homozigotos. As setas verdes mostram os iniciadores desenhados para confirmação da inserção das construções no genoma (B) qPCR do DNA dos clones de parasitos demonstrando a diminuição do número de cópias do *TcPIWI* no parasito heterozigoto e a ausência de cópias no homozigoto. (C) qPCR do cDNA dos clones demonstrando a diminuição da expressão do *TcPIWI* nestes parasitos. (D) Gel de agarose mostrando a correta inserção das construções nos clones heterozigotos (+/-) e homozigotos (-/-), além do controle positivo (C+) mostrando a integridade do DNA utilizado na reação de PCR.

5.3. Caracterização fenotípica dos parasitos deficientes em *TcPIWI*

Foi demonstrado em *Leishmania infantum* que a deleção da PIWI altera a replicação de amastigotas axênicas (Padmanabhan et al., 2012). Por este motivo, analisamos se a taxa de crescimento dos parasitos deficientes seria menor que a dos parasitos selvagens. Durante 9 dias consecutivos, contamos o número de epimastigotas axênicas/mL de cultura. Observamos que existe uma diferença

significativa no pico correspondente à quantidade máxima de parasitos (5, 6 e 7 dias), embora ao término de 9 dias, o número de parasitos na fase estacionária foi o mesmo nas 3 populações analisadas: selvagem, heterozigoto e homozigoto para a deficiência (Figura 8). Essa diminuição no crescimento observada nos primeiros 7 dias não é tão grande quanto à observada para as amastigotas axênicas de *Leishmania infantum* (Padmanabhan *et al.*, 2012), mas pode significar uma diferença durante no ciclo celular dos parasitos deficientes, o que deve ser investigado com mais cautela.

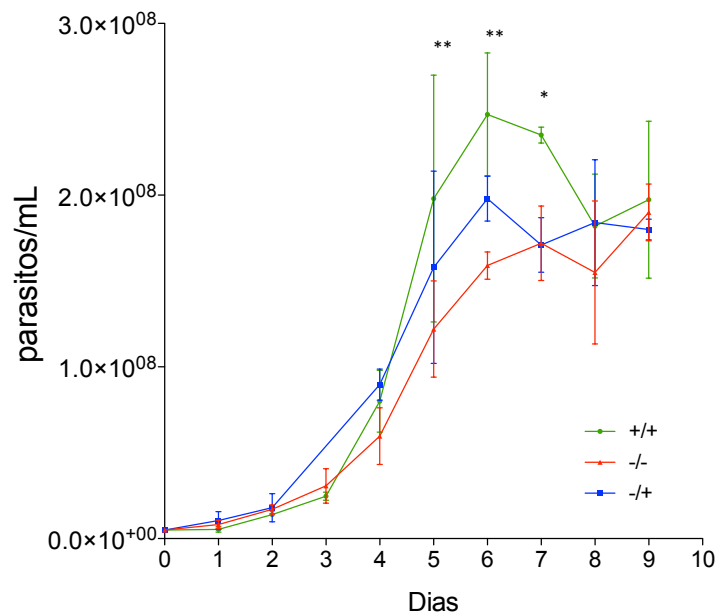


Figura 8 – Curva de crescimento dos parasitos selvagem e deficientes. Estatística realizada entre os grupos selvagem (+/+) e homozigoto (-/-), sendo Two-Way ANOVA e * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$.

Sabe-se que a metaciclogênese é o processo no qual o parasito, quando submetido à privação nutricional e de água na porção final do intestino do inseto, diferencia-se da forma epimastigota para tripomastigota. Em laboratório, podemos simular esta diferenciação *in vitro* pelo envelhecimento do meio de cultura, uma vez que resulta na perda de nutrientes, levando o parasito à mudança da forma epimastigota para a forma tripomastigota metacíclica, que é infectiva para células do hospedeiro vertebrado. Assim, analisamos a taxa de diferenciação dos parasitos

homozigotos deficientes para *TcPIWI* (que a partir deste momento serão nomeados exclusivamente de “deficientes”), comparada à dos parasitos selvagens após 6 e 9 dias de envelhecimento do meio de cultura. Após fixação e coloração dos parasitos fizemos a contagem dos parasitos nas suas formas, tripomastigota e epimastigota, que foram distinguidas morfologicamente. Parasitos tripomastigotas possuem o kinetoplasto mais afastado do núcleo, têm um formato mais delgado e dependendo da imagem, as “alças” que o flagelo forma podem inclusive ser observadas (Figura 9A).

Nos dois tempos analisados, 6 e 9 dias, foram identificados aproximadamente 30% de tripomastigotas, tanto na cultura do parasito deficiente, quanto na do selvagem (Figura 9B). Nossos resultados mostram que não houve diferença significativa na quantidade de parasitos que se diferenciam nestes tempos. É possível que haja diferença em tempos mais precoces, o que sugeriria um atraso na diferenciação, mas isto, ainda que ocorra, não parece afetar a diferenciação em si.

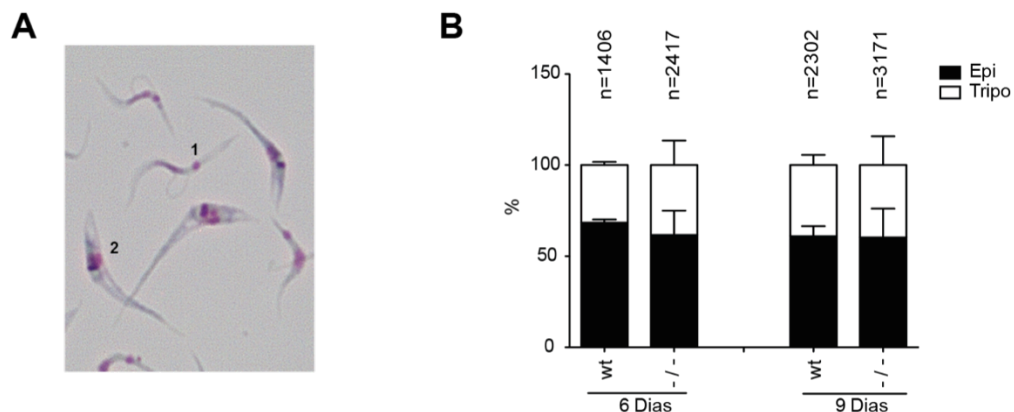


Figura 9 – Diferenciação *in vitro* induzida por envelhecimento do meio. (A) Foto mostrando a morfologia das formas tripomastigotas [1] e epimastigotas [2]. (B) Porcentagem de tripomastigotas e epimastigotas dos parasitos deficientes (-/-) e selvagens (wt) após 6 e 9 dias de envelhecimento do meio. Não houve diferença estatística entre a quantidade de tripomastigotas em cada uma das populações.

Já foi demonstrado que *Leishmania major* deficientes para a proteína PIWI apresentam menor virulência em modelo de infecção de camundongos (Padmanabhan *et al.*, 2012) sugerindo que este gene pode afetar a capacidade de

tripanosomatídeos em infectar células de mamíferos. Observamos que em nossos parasitos selvagens parece haver uma diminuição da expressão de *TcPIWI* durante a cinética de infecção em macrófagos murinos após 2h de infecção, cujos níveis mantêm-se reduzidos até pelo menos 48h após a infecção (Figura 10A). Assim, decidimos avaliar se a deficiência de *TcPIWI* afetaria a infecção em macrófagos derivados de medula óssea, o que indicaria que a regulação negativa na expressão de *TcPIWI* possa ser necessária para a infecção do parasito.

O tipo de coloração que utilizamos não nos permitiu diferenciar entre a internalização ou a adesão dos parasitos, mas foi possível observarmos uma associação significativamente maior entre os macrófagos e os parasitos deficientes para *TcPIWI* (aderidos ou internalizados), comparados aos parasitos selvagens nos tempos de 8 e 16h após a infecção (Figura 10B e C). Para estas infecções, utilizamos formas tripomastigotas metacíclicas derivadas de envelhecimento de meio de cultura. Estas amostras possuíam em média 40% de tripomastigotas numa população epimastigota, o que pode ter influenciado o processo de adesão dos parasitos aos macrófagos, até mesmo por competição de espaço, e explicar a baixa taxa de infecção observada, quando comparada aos níveis obtidos quando infectamos macrófagos com tripomastigotas derivados de cultura de tecidos (TCT) (dados não mostrados).

Também analisamos a quantidade de parasitos intracelulares após 48h de infecção, e observamos uma maior quantidade de amastigotas nos macrófagos infectados com os parasitos deficientes, quando comparada à quantidade observada no grupo infectado com o parasito selvagem. Além disso, observamos um número significativo de macrófagos com 4 ou mais amastigotas de parasitos deficientes, enquanto que macrófagos infectados com parasitos selvagens apresentaram poucas células com no máximo 4 amastigotas intracelulares (Figura 10D). Portanto, o aumento significativo da proporção de parasitos por macrófagos observado após 48h de infecção (Figura 10B) resulta do maior número de amastigotas intracelulares. Estes resultados parecem ir em direção oposta aos obtidos com *L. major*, mas é importante destacar que os autores avaliaram o tamanho da lesão em camundongos *in vivo*, não a quantidade de parasitos (Padmanabhan *et al.*, 2012). A lesão *in vivo* é dependente da resposta imune do hospedeiro. É possível que *TcPIWI* tenha um papel na regulação da capacidade de infecção e replicação dos parasitos, para que

não haja replicação exacerbada, o que poderia levar a uma resposta imune intensificada, levando o hospedeiro à morte. Várias PIWIs já foram caracterizadas e têm seu papel comprovado na regulação da proliferação celular (Yakushev *et al.*, 2013; Tan *et al.*, 2015). A regulação negativa da Argonauta durante a infecção (pelo menos até as 48 primeiras horas) seria importante para que o parasito conseguisse infectar e popular as células. Mas com a ausência da Argonauta, esta regulação de densidade seria perdida e a multiplicação ocorreria desordenadamente. Para testar melhor esta hipótese é importante a análise da infecção em tempos mais tardios, quando poderíamos verificar se a ruptura da célula e a liberação dos parasitos deficientes ocorre mais rapidamente.

Além de grandes mudanças sofridas pelo parasito durante a infecção em macrófagos, o *T. cruzi* passa por outras situações de estresse durante seu ciclo de vida, como por exemplo, quando é eliminado nas fezes do triatomíneo, sofrendo dessecação provocada pela falta de água. De forma interessante, o estresse de dessecação sofrido por *D. radiodurans* gera quebra de fitas duplas de DNA, assim como a radiação ionizante (Tanaka *et al.*, 2004). Trabalhos já associaram pequenos RNAs não codificantes e vias de RNAi como fatores importantes na resposta de eucariotos ao reparo da quebra de fitas duplas de DNA (Francia *et al.*, 2012; Michalik *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2014). Assim, avaliamos se a expressão de *TcPIWI* era alterada após a exposição à radiação gama, como forma de estimular as quebras de fita dupla de DNA, da mesma maneira que podem ocorrer durante o estresse de dessecação sofrido pelo parasito. Observamos que, a partir de 12 h após a irradiação, a expressão de *TcPIWI* é significativamente maior nos parasitos irradiados tanto em comparação aos controles não irradiados, quanto em comparação aos níveis pré-irradiação (Figura 11A). Isto pode ser indicação da ligação de *TcPIWI* com a resposta do parasito à radiação gama. Sabe-se que a radiação gama induz grandes quantidades de quebra de DNA, e que o parasito é capaz de reestruturar seu genoma após as primeiras 48h, parecendo retornar ao crescimento normal após 9 dias (Regis-Da-Silva *et al.*, 2006).

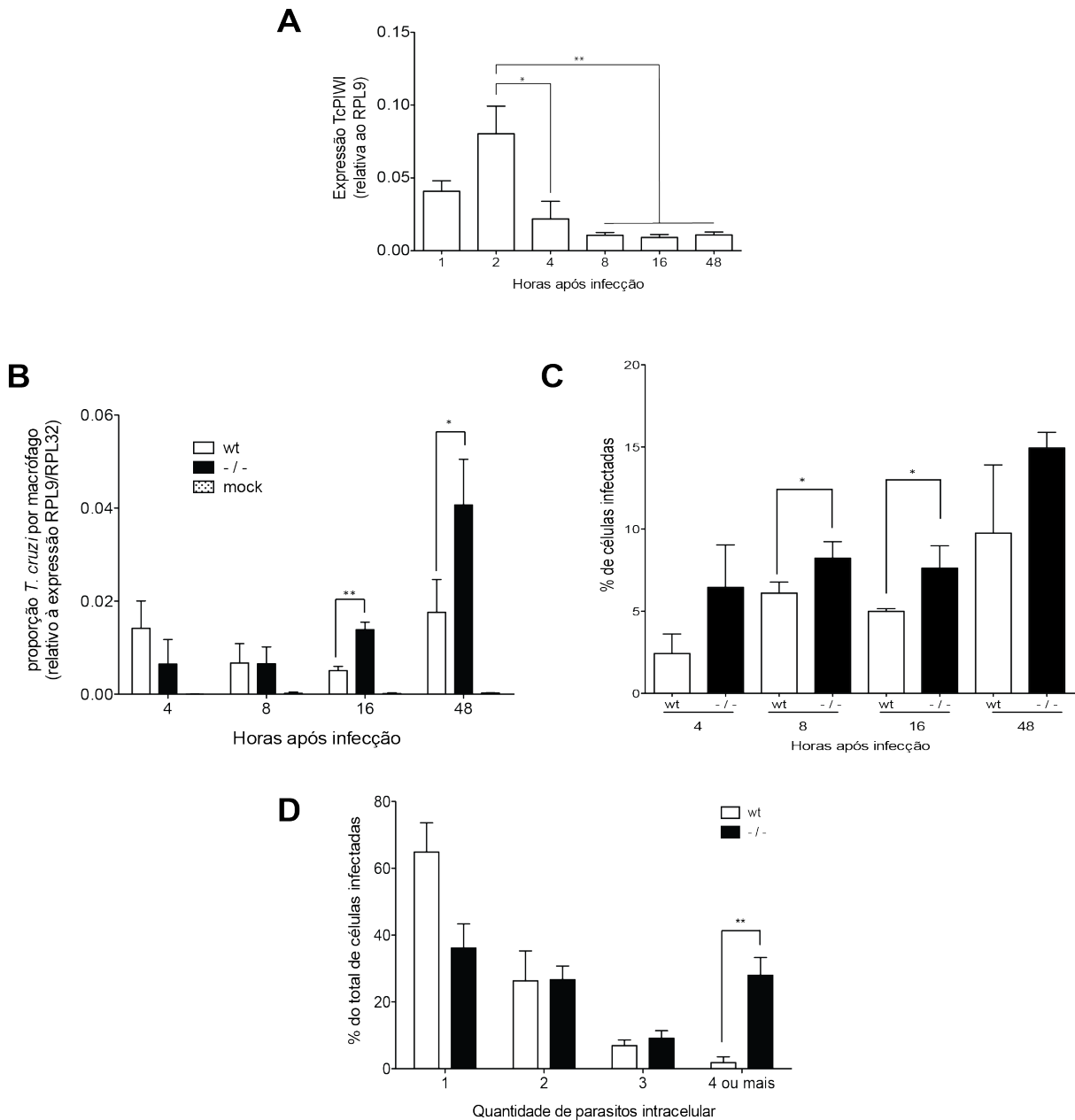


Figura 10 – Cinética de infecção de parasitos deficientes e selvagem em macrófagos derivados de medula óssea. (A) Expressão da *TcPIWI* em parasitos selvagens durante a infecção. (B) qPCR mostrando a proporção de parasitos por macrófagos (C) Quantidade de células infectadas durante a cinética. (D) Densidade de parasitos dentro das células 48 h após a infecção. Sendo wt – parasitos selvagens; (-/-) parasitos deficientes; mock – controle de macrófagos não infectados. Para estatística foi utilizado o teste t, com * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$.

Observamos que parasitos deficientes para *TcPIWI* não retomam seu crescimento após 10 dias da irradiação, como observado para os parasitos selvagens (Figura 11B). Apesar de significativa esta observação não é tão expressiva como quando o parasito infecta células e pode ser ligada apenas ao

pequeno atraso observado no crescimento axênico dos parasitos e não à recuperação direta do parasito ao estresse sofrido.

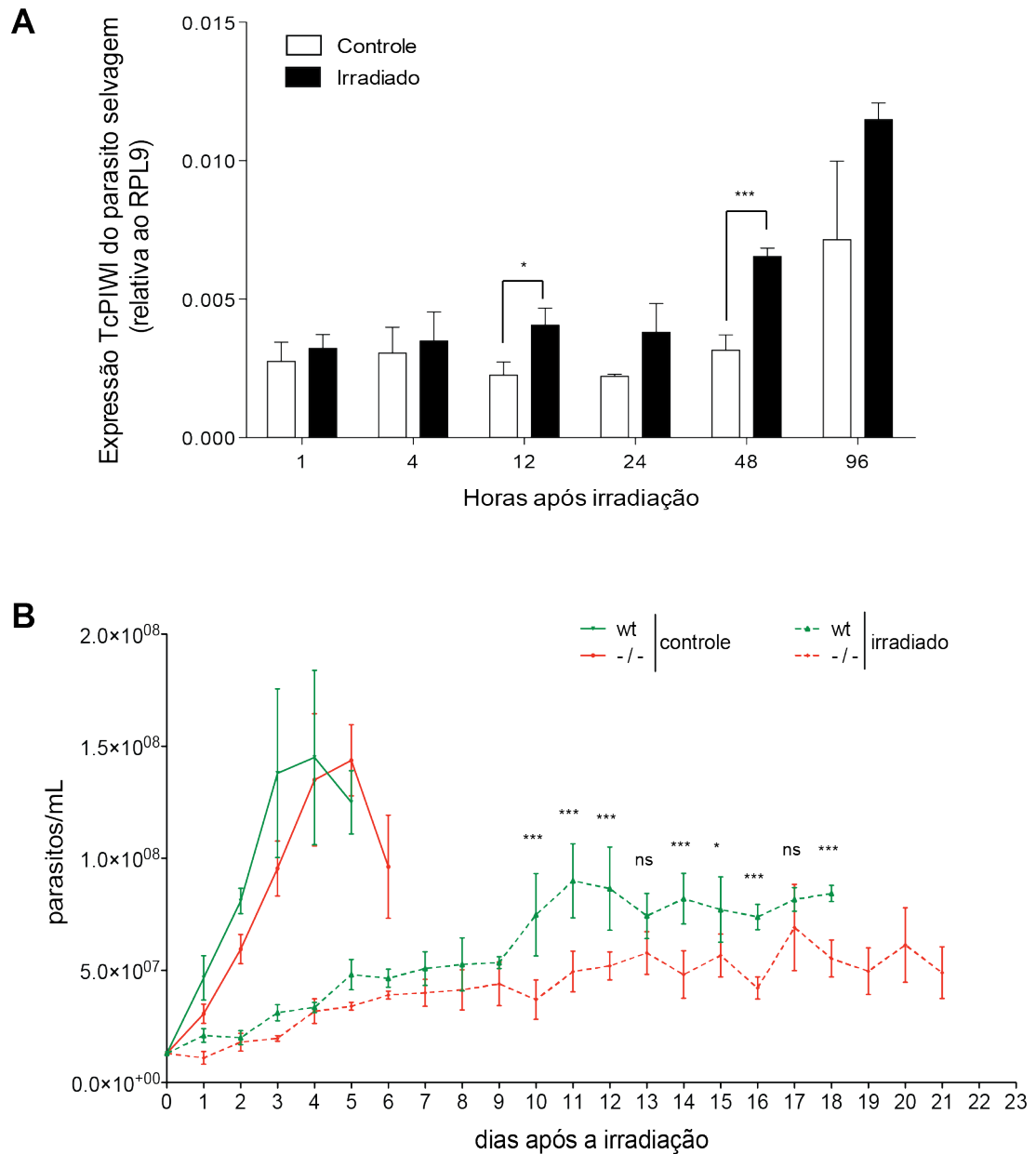


Figura 11 – Cinética dos parasitos após irradiação. (A) Expressão de *TcPIWI* após as primeiras horas depois da irradiação. (B) Curva de crescimento mostrando que os parasitos deficientes (-/-) não retomam o crescimento da mesma forma que os parasitos selvagens (wt). Como estatística na (A) foi utilizado o teste t, com * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$; na (B) foi utilizado Two-Way ANOVA, com * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$.

De forma geral, observamos o estabelecimento de um fenótipo relacionado à alteração de expressão do *TcPIWI*. Durante a infecção de macrófagos por exemplo, quando a expressão de *TcPIWI* diminui, parasitos deficientes induzem maiores níveis de infecção, sugerindo que *TcPIWI* regula negativamente o processo de infecção. Em contraste, em resposta à irradiação gama, observamos um aumento da expressão de *TcPIWI* porém não há grandes diferenças durante o crescimento do parasito após submetido à radiação, demonstrando que a resposta ligada à Argonauta não é aleatória, ocorrendo apenas em resposta a tipos específicos de estresse. É provável que haja um mecanismo pelo qual *TcPIWI* seja capaz de regular estes processos, embora este ainda não esteja claro. Para tentar caracterizar seu possível mecanismo de ação nestes processos, geramos parasitos que expressam a proteína *TcPIWI* conjugada com uma cauda de epítopo, o que nos permitiu realizar uma série de ensaios de biologia celular e molecular que não poderíamos fazer com a proteína endógena devido a ausência de anticorpos contra ela.

5.4. Caracterização da proteína *TcPIWI*

Proteínas Argonauta associam-se com pequenos RNAs que são utilizados como guias para a busca de alvos complementares que serão regulados. Na tentativa de identificar uma função molecular para *TcPIWI*, construímos um plasmídeo para expressão da proteína *TcPIWI* em fusão com uma cauda de epítopos HA e Flag na porção 3' ou 5' (*TcPIWI*-HA ou HA-*TcPIWI*). Também construímos um plasmídeo para a expressão da *TcPIWI* contendo uma mutação na tríade catalítica da Argonauta (D871A), pela substituição do ácido aspártico (D) na região 871 pela alanina (A). Como em outras Argonautas esta mutação é capaz de interferir com sua atividade catalítica (Liu *et al.*, 2004; Rivas *et al.*, 2005), acreditamos que a *TcPIWI* mutada poderia nos indicar a necessidade da atividade catalítica para sua função Argonauta em *T. cruzi*.

Inicialmente, transfectamos parasitos selvagens e deficientes para *TcPIWI* com a construção *TcPIWI*-HA, cauda fusionada na extremidade 3'. Observamos que ambos os parasitos transfectados com esta construção não expressaram a proteína *TcPIWI*, embora seu RNA tenha sido detectado em altos níveis (Figura 12). Estes

resultados corroboram os dados obtidos para todas as Argonautas até então testadas, nas quais a adição de cauda na região C-terminal parece interferir com o dobramento da proteína e causar sua instabilidade.

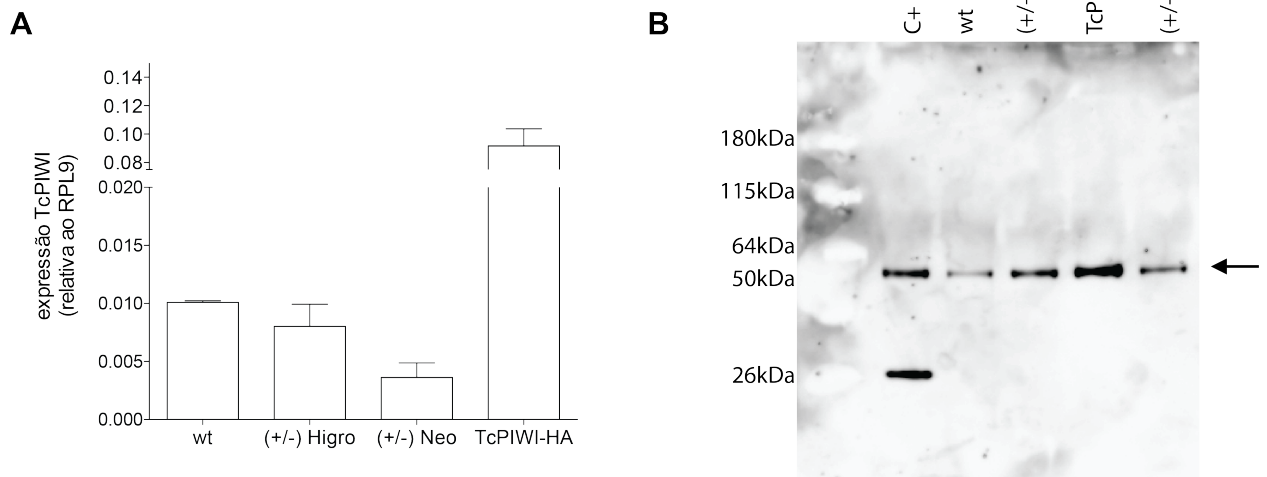


Figura 12 – Análise de expressão do gene e da proteína TcPIWI em fusão com a cauda HA na região 3’. (A) qPCR mostrando a expressão da *TcPIWI* em parasitos selvagem, heterozigotos para a deficiência da *TcPIWI* e transfectados com a construção *TcPIWI-HA*. (B) Western Blot evidenciando a ausência da proteína *TcPIWI-HA* nos parasitos transfectados. wt – parasitos selvagens; (+/-) Higo – população de parasitos heterozigotos para a deficiência de *TcPIWI* desenvolvidos com o plasmídeo com resistência a higromicina; (+/-) Neo – população de parasitos heterozigotos para a deficiência de *TcPIWI* desenvolvidos com o plasmídeo com resistência à gentamicina; *TcPIWI-HA* – parasitos selvagens transfectados com a construção *TcPIWI-HA*; C+ – parasitos expressando uma amastina fusionada à cauda HA. A seta indica a proteína controle do experimento, α tubulina, com tamanho aproximado de 50 kDa.

Também transfectamos parasitos selvagens e deficientes para *TcPIWI* com as construções HA-*TcPIWI* e HA-*TcPIWI*^{D871A}. Não conseguimos selecionar nenhum parasito selvagem transfectado com ambas as construções, o que pode indicar uma toxicidade ao parasito pela superexpressão de *TcPIWI*, resultado da sobreposição da expressão do gene endógeno com a do transfectado.

Após a seleção da população de parasitos previamente deficientes para *TcPIWI*, agora transfectados com as construções HA-*TcPIWI* e HA-*TcPIWI*^{D871A}, analisamos a amplificação do gene *TcPIWI* por qPCR a partir do DNA total (Figura 13A). A população transfectada mostrou um número maior de cópias de *TcPIWI* do que a população selvagem, o que pode ser explicado pela possível presença de plasmídeos episomais, ainda que o plasmídeo para expressão de *TcPIWI* tenha

vido linearizado para integração no *locus* da tubulina. Além disso, como a expressão da *TcPIWI* em nossas construções é controlada por um promotor ribossomal de *T. cruzi* (Darocho, Silva, *et al.*, 2004), os níveis de transcrição do mRNA são maiores do que os níveis nos parasitos selvagens (Figura 13B). Para verificarmos se o gene em fusão com HA está sendo traduzido em proteína, realizamos um Western Blot utilizando o anticorpo contra HA e observamos a expressão de uma proteína com aproximadamente 120 kDa nos parasitos transfectados, que correspondente ao peso da proteína Argonauta que esperávamos (Figura 13C).

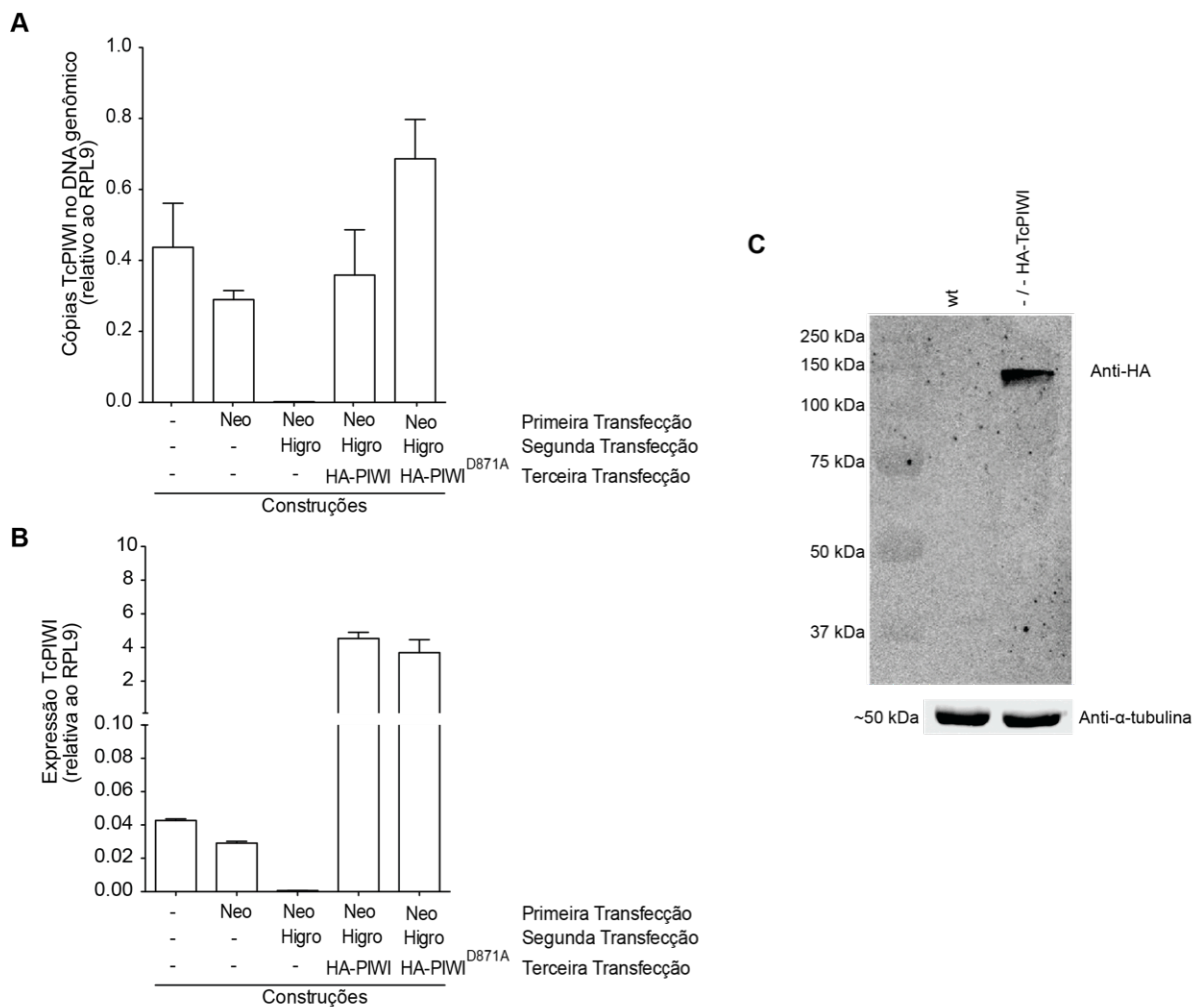


Figura 13 – Desenvolvimento de parasitos expressando a proteína TcPIWI fusionada à cauda HA e da proteína contendo a mutação na triade catalítica (D871A). (A) qPCR do DNA da população de parasitos mostrando a recuperação das cópias da *TcPIWI*. (B) qPCR do cDNA da população mostrando a super expressão da HA-*TcPIWI* e da HA-*TcPIWI*^{D871A}. (C) Western Blot mostrando a presença da proteína fusionada à HA na população de parasitos homocigotos para deficiência transfectados com HA-*TcPIWI* (-/- HA-*TcPIWI*).

Por imunofluorescência analisamos a localização subcelular da TcPIWI na população de parasitos transfectados com HA-TcPIWI. Observamos que a proteína TcPIWI está difusa no citoplasma de forma exclusiva, sem sobreposição com a marcação nuclear (Hoechst). Experimentos feitos na cepa Dm28c de *T. cruzi* e em *L. infantum* sugerem que a proteína PIWI está localizada no citoplasma (Garcia-Silva *et al.*, 2010; Padmanabhan *et al.*, 2012; Garcia-Silva, Das Neves, *et al.*, 2014), corroborando nossos dados. Entretanto, os níveis de expressão de TcPIWI foram bastante heterogêneos na população transfectada, como podemos constatar pela variação na intensidade de fluorescência verde (anti HA-alexa 488) detectada entre os diferentes parasitos observados (Figura 14). Estamos selecionando clones para obtenção de uma população que apresente um padrão de expressão homogêneo para HA-TcPIWI, que será essencial para testes funcionais.

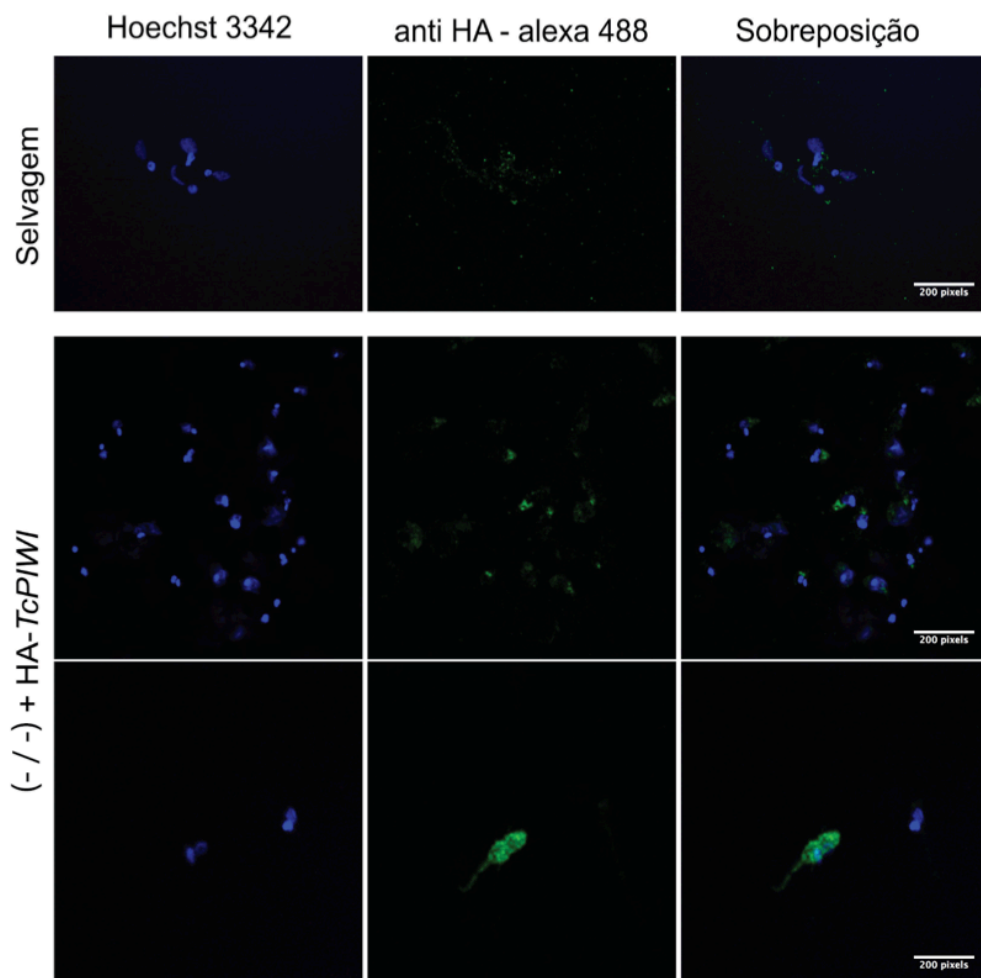


Figura 14 – Imunofluorescência mostrando a localização da proteína HA-TcPIWI. No painel superior é possível visualizar o parasito selvagem, sem marcação para o anticorpo anti-HA. No painel do meio é possível ver os parasitos com marcação para anti-HA dispersas por todo o citoplasma. No painel inferior, detalhe do parasito com marcação.

5.5. Caracterização de populações de pequenos RNAs em *T. cruzi*

Para identificar e caracterizar possíveis populações de pequenos RNAs em *T. cruzi*, construímos e sequenciamos bibliotecas preparadas a partir do RNA extraído de formas epimastigotas selvagens. Todas as amostras apresentaram o mesmo perfil de RNAs quando analisadas no Bioanalyzer (dados não mostrados), instrumento utilizado para a quantificação e análise da qualidade do RNA. Para evitarmos artefatos técnicos que poderiam interferir com os resultados, realizamos o sequenciamento utilizando diferentes estratégias. Construímos e sequenciamos uma das bibliotecas no Instituto Gurdon (Cambridge, Inglaterra) e comparamos com bibliotecas sequenciadas em duas empresas diferentes, Fasteris e BGI. Na empresa Fasteris o RNA foi fracionado nos tamanhos entre 18-45 nt, na BGI a fração do RNA foi entre 15-45 nt e no Gurdon o tamanho dos fragmentos de cDNA selecionados foram entre 20-45 nt (Tabela 5). Para minimizar a variação dos sequenciamentos, utilizamos sempre a mesma plataforma (Illumina®), independente de onde a amostra foi sequenciada, e o mesmo *pipeline* para análise. A porcentagem de seqüências mapeadas foi de 80% ou mais em todas as bibliotecas. As principais diferenças entre os protocolos de sequenciamento são os tipos de adaptadores utilizados e o momento de seleção do tamanho dos fragmentos a serem sequenciados.

Tabela 5 – Descrição geral das bibliotecas sequenciadas em diferentes companhias

Empresa	Seq Totais	% Mapeamento	Forma	Tamanho	Seleção Tamanho
BGI	32.547.306	81,57%	Epimastigota	18-45	RNA
Fasteris	13.442.022	95,77%	Epimastigota	15-45	RNA
Gurdon	4.677.637	95,05%	Epimastigota	20-45	cDNA

A análise geral dos resultados mostra que somente as populações de tRNA e snRNA apresentam um padrão consistente nas três bibliotecas. Dentre as duas populações, os pequenos RNAs derivados de tRNA mostraram abundância e distribuição de tamanho mais homogêneos. Os pequenos RNAs derivados de tRNA

possuem um pico entre 32-34nt com um “U” como primeira base em todas as bibliotecas analisadas (Figura 15).

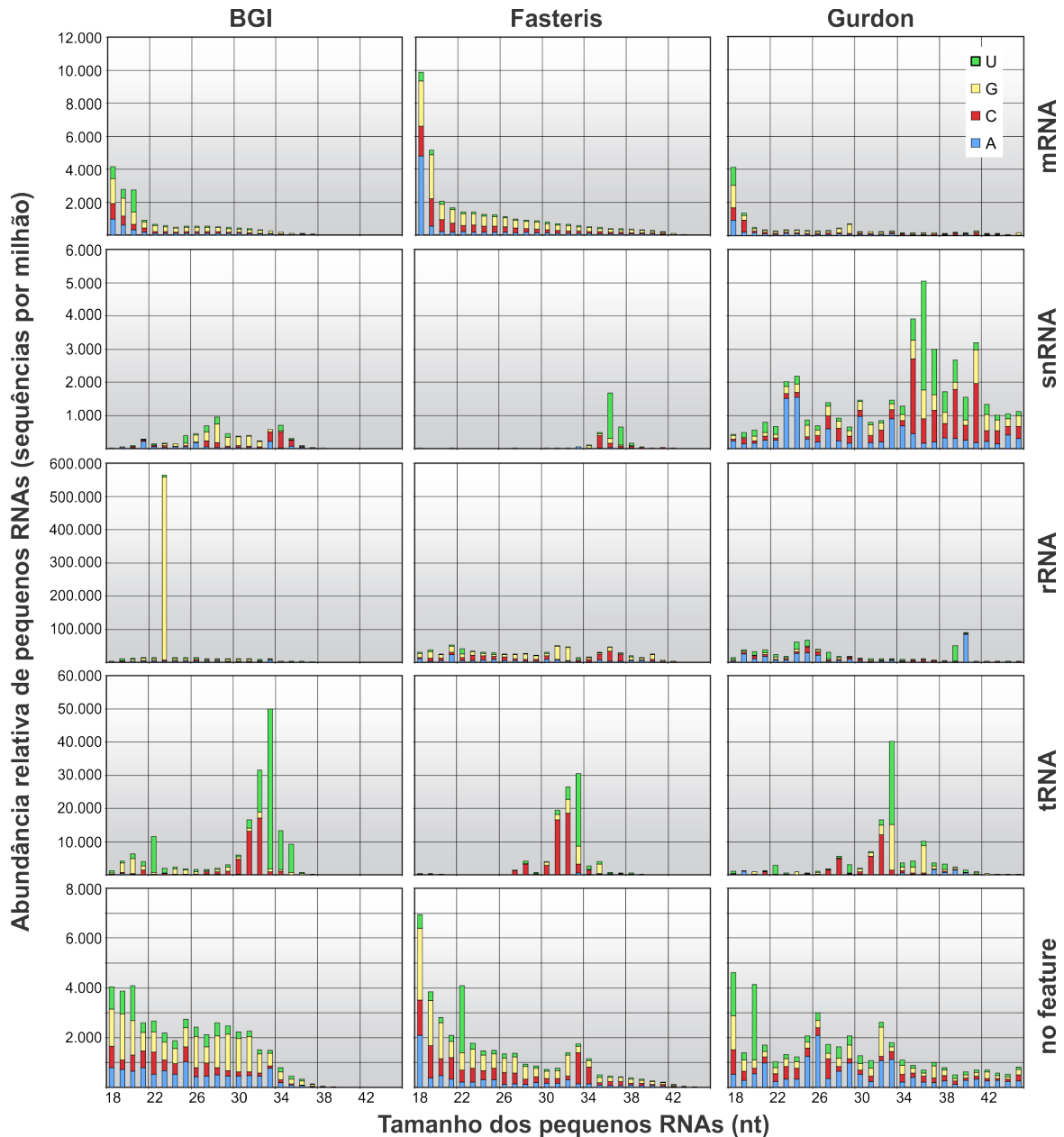


Figura 15 – Análise comparativa de populações de pequenos RNAs de *T. cruzi* obtidos pelo sequenciamento nas empresas BGI, Fasteris e Gurdon. Os pequenos RNAs foram agrupados com base na sua origem (mRNA, snRNA, rRNA, tRNA ou não anotado – *no feature*) e distribuídos de acordo com seu tamanho que variou de 18 a 45 nucleotídeos. O padrão de cores representado nas barras indica a proporção da base nitrogenada (U, C, G ou A) na primeira posição dos pequenos RNAs.

A população de pequenos RNAs derivados de tRNA representa 16,9% do total de pequenos RNAs na biblioteca BGI; 9,7% na Fasteris e 11,9% no Gurdon, com a mesma média de tamanho de 33 nt. Apesar das diferenças entre as bibliotecas nesta população de pequenos RNAs, ela pode ser considerada conservada e originada em sua maioria pelos tRNAs: ácido glutâmico (tRNA-Glu) e valina (tRNA-Val), como mostrado no painel superior da Figura 16. Além disso, também entre todas as bibliotecas, mais de 90% dos pequenos RNAs derivados de tRNA com 33 nt de tamanho são derivados da região 5' dos tRNAs (Figura 16– painel inferior).

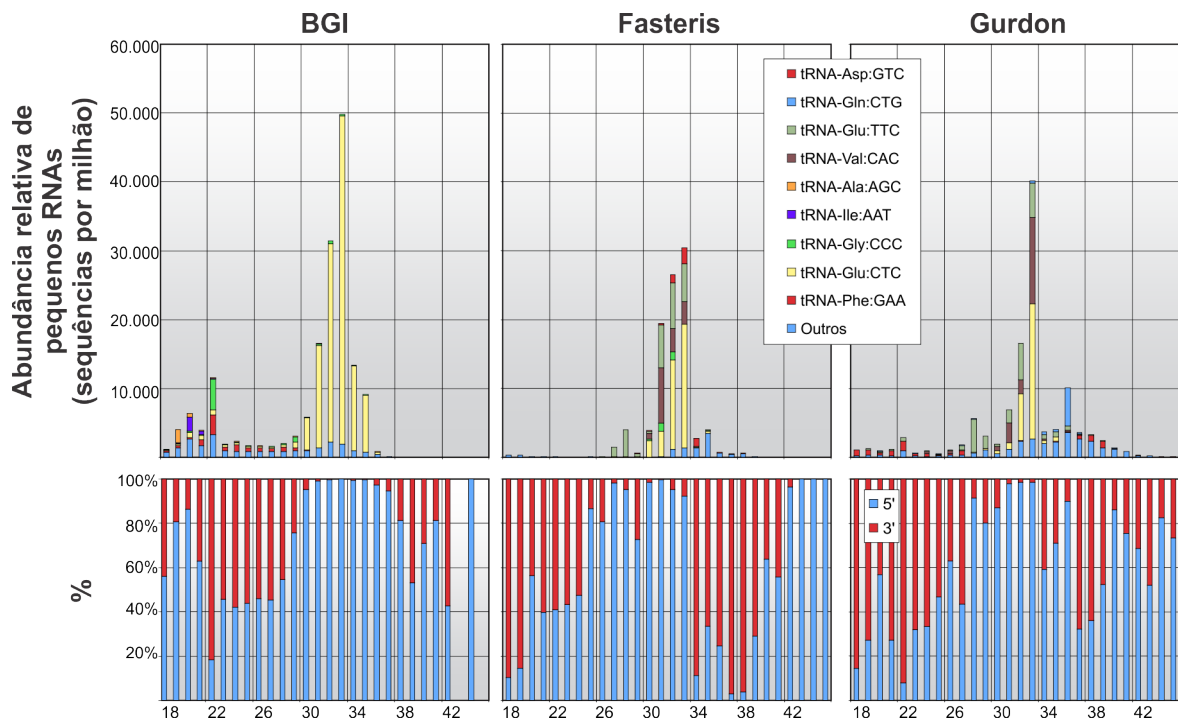


Figura 16 – Classificação dos pequenos RNAs de acordo com o tRNA do qual originaram obtidos pelo sequenciamento nas empresas BGI, Fasteris e Gurdon. No painel superior o padrão de cores representado nas barras indica o tRNA que originou os pequenos RNAs de acordo com a legenda. No painel inferior temos a representação da região 5' ou 3' do tRNA da qual foram derivados.

Estudos anteriores em tripanossomatídeos apontam os pequenos RNAs derivados de tRNA como sendo uma família de pequenos RNAs abundante e importante para *T. brucei* (Zheng *et al.*, 2013) e *T. cruzi* (Garcia-Silva *et al.*, 2010; Franzen *et al.*, 2011; Garcia-Silva, Sanguinetti, *et al.*, 2014). O sequenciamento de pequenos RNAs da cepa CL Brener de *T. cruzi* feito por Fránzen e colaboradores

(2011) utilizando a plataforma 454 mostrou que mais de 70% das sequências são pequenos RNAs derivados de tRNA, com média de tamanho de 38 nt, sendo mais de 80% destes, derivados da região 3'. Destes 80%, mais de 70% possui "CCA" na região 3', o que indica que estes pequenos RNAs provém dos tRNAs maduros, já que esta sequência é adicionada durante a maturação do tRNA (Franzen *et al.*, 2011). A princípio, estes resultados são diferentes dos obtidos por nosso grupo, diferindo em tamanho, origem e abundância de cada pequeno RNA. Nossos dados, considerando-se as três bibliotecas, mostram que os tRNAs de histidina (tRNA-His) e treonina (tRNA-Thr), que estão entre os 3 tRNAs que mais geram pequenos RNAs na biblioteca supracitada, também geram pequenos RNAs a partir da região 3'. Apenas o tRNA de arginina (tRNA-Arg), que gera pequenos RNAs em sua maioria da região 3' na biblioteca de Franzen e colaboradores (2011), provém de pequenos RNAs originados da região 5' em nossa biblioteca, mas com menor expressividade. As diferenças obtidas podem ser explicadas tanto pela diferença na plataforma utilizada para sequenciamento (454 utilizada por Franzen e colaboradores, e o Illumina utilizada pelo nosso grupo), quanto no *pipeline* utilizado para análise (o mapeador utilizado por Franzen e colaboradores foi BWA, enquanto nosso grupo utilizou o Bowtie).

Dados obtidos por Garcia-Silva e colaboradores (2010) pela clonagem dos pequenos RNAs da cepa Dm28c de *T. cruzi*, identificaram 348 sequências de fragmentos entre 22-30 nt e destas, 26% eram derivadas da região 5' de tRNAs. Mais de 90% dos pequenos RNAs derivam dos tRNAs de ácido aspártico (tRNA-Asp) e ácido glutâmico (tRNA-Glu) com média de tamanho em 30 nt. Este trabalho também demonstra que estes pequenos RNAs derivados da região 5' têm a sua produção aumentada quando o parasito está sob estresse nutricional (Garcia-Silva *et al.*, 2010).

A presença dos pequenos RNAs derivados de tRNA em todas as bibliotecas sugerem que eles são importantes para o parasito, uma vez que estão presentes em todos os tripanossomatídeos analisados até o momento e são altamente conservados. Pequenos RNAs derivados de tRNA já foram identificados durante o estresse oxidativo em vários eucariotos (Thompson *et al.*, 2008) e atualmente têm sido estudado em câncer (Goodarzi *et al.*, 2015; Honda *et al.*, 2015) e até mesmo em atividade antiviral (Deng *et al.*, 2015). Desconsideramos a possibilidade de que

sejam produtos de degradação aleatória dos tRNAs, uma vez que se originam de uma mesma região de tRNAs específicos. Portanto, uma análise mais aprofundada é necessária e crucial para o entendimento da função desta população de pequenos ncRNAs em *T. cruzi*.

Outra população de pequenos RNAs que possui padrão consistente nas bibliotecas sequenciadas é a dos pequenos RNAs derivados de snRNAs, embora tenham apresentado dois perfis distintos de distribuição de tamanho. As bibliotecas sequenciadas nas empresas Fasteris e no Gurdon apresentam um pico em 36 nt com preferência para “U” na posição inicial, enquanto na BGI o pico é menor, em 28 nt, com preferência para “G” na posição inicial (Figura 15).

As demais famílias de pequenos RNAs detectadas apresentam padrão de degradação e diferem mais entre as bibliotecas. Um exemplo é a família de RNAs que não tem anotação definida (*no feature*), variando bastante entre o sequenciamento das três empresas. Além disto, a biblioteca sequenciada na BGI apresenta uma grande contaminação de um RNA ribossomal de tamanho de 24 nt (Figura 15).

Estas variações, principalmente nas famílias menos abundantes, demonstram a importância de manter a mesma estratégia de sequenciamento para comparação entre as bibliotecas. Por este motivo, todas as comparações diretas que realizamos foram feitas a partir de bibliotecas construídas e sequenciadas na mesma empresa.

Uma das limitações de todas as estratégias de sequenciamento é o viés para a ligação de adaptadores em pequenos RNAs que são monofosfatados na extremidade 5'. Esta limitação já foi observada em *C. elegans*, onde os siRNAs secundários produzidos por RdRp, são trifosfatados na extremidade 5', o que inibe a ligação de adaptadores e, conseqüentemente, seu sequenciamento (Pak e Fire, 2007; Sijen *et al.*, 2007). O sequenciamento desta população de pequenos RNAs é possível pelo pré-tratamento enzimático com polifosfatase, que remove fosfatos deixando um único fosfato na extremidade 5' para a ligação do adaptador. Para minimizar as chances de perda desta população, realizamos então o pré-tratamento com polifosfatase de nossas amostras e adicionamos 10 ng de RNA total de *C. elegans* ao RNA de *T. cruzi*, como controle da estratégia. Observamos que a porcentagem de sequências mapeadas no genoma de *T. cruzi* a partir das

bibliotecas construídas com a estratégia de detecção de pequenos RNAs mono ou trifosfatados foi similar (Tabela 6).

Tabela 6 – Descrição geral das bibliotecas controle e tratadas com polifosfatase

Amostra	Empresa	Tratamento	RNA controle	Seq Totais	% Mapeamento
Tripomastigota	Gurdon	-	<i>C. elegans</i>	1.596.461	87,92%
Tripomastigota	Gurdon	Polifosfatase	<i>C. elegans</i>	1.822.176	86,88%

A análise geral das bibliotecas demonstra não haver alteração no padrão de distribuição de tamanho ou de nucleotídeos iniciais nas bibliotecas de *T. cruzi* tratadas com a polifosfatase, indicando que nenhuma população distinta de pequenos RNAs foi sequenciada (Figura 17). A população de pequenos RNAs derivados de tRNA permanece altamente conservada e os tRNAs que os geram, assim como a região 5' da qual derivam, são mantidos (tRNA-Glu e tRNA-Val) (Figura 18).

Como controle do funcionamento da estratégia, analisamos as sequências mapeadas no genoma de *C. elegans* e observamos a presença de pequenos RNAs de 22 nt com preferência para “G” na posição inicial, como já demonstrado anteriormente (Pak e Fire, 2007; Sijen *et al.*, 2007). Podemos concluir então que a estratégia foi eficiente, confirmando que dentre os pequenos RNAs sequenciados que mapeiam no genoma de *T. cruzi*, não existe nenhuma sequência tri-fosfatada na região 5'.

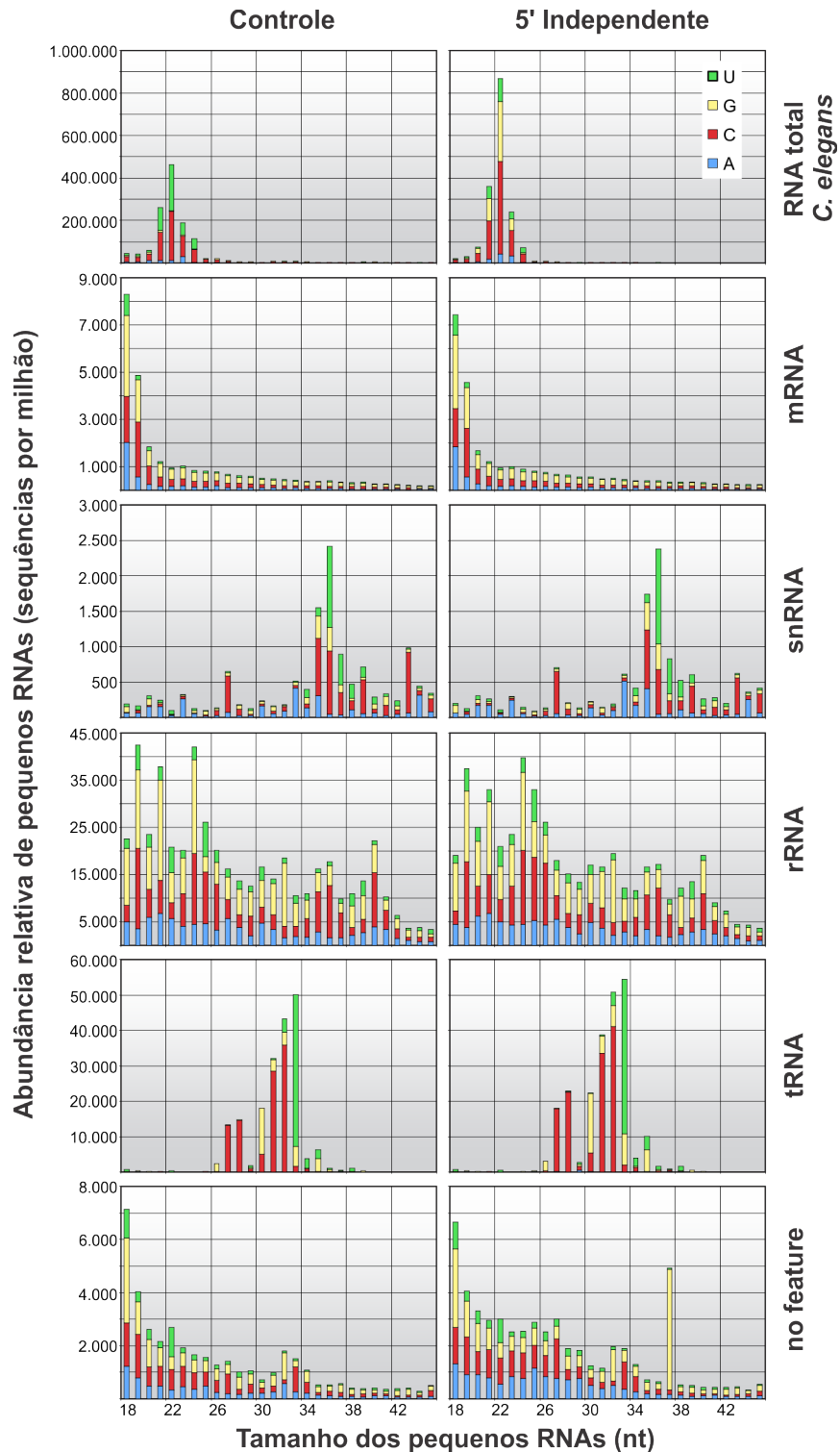


Figura 17 - Análise comparativa de populações de pequenos RNAs obtido pelo sequenciamento de RNA total controle e tratado com polifostase (5' independente). Os pequenos RNAs foram agrupados com base na sua origem (mRNA, snRNA, rRNA, tRNA ou não anotado – *no feature*) e distribuídos de acordo com seu tamanho que variou de 18 a 45 nucleotídeos. O padrão de cores representado nas barras indica a proporção da base nitrogenada (U, C, G ou A) na primeira posição dos pequenos RNAs.

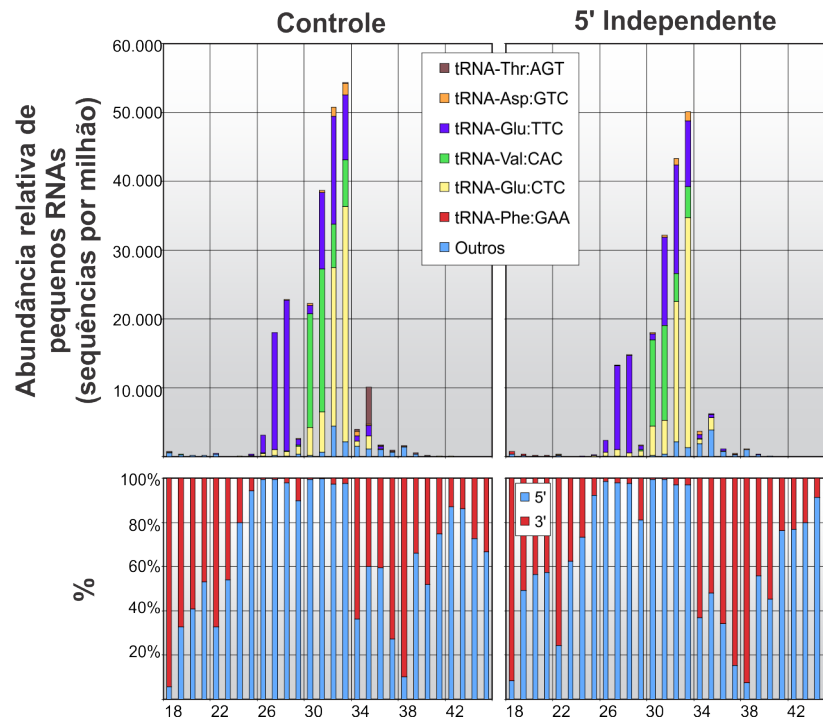


Figura 18 – Classificação dos pequenos RNAs de acordo com o tRNA do qual originaram obtidos pelo sequenciamento de amostras controle e tratada com polifosfatase (5' independente). No painel superior o padrão de cores representado nas barras indica o tRNA que originou os pequenos RNAs de acordo com a legenda. No painel inferior temos a representação da região 5' ou 3' do tRNA da qual foram derivados.

Outra modificação que pode existir nos pequenos RNAs é a uridilação na região 3' realizada diretamente no pequeno RNA e que é desconsiderada pelos programas padrões de mapeamento. Atayde e colaboradores (2013) observaram que pequenos RNAs de *Leishmania braziliensis* são uridilados na posição 3' e a presença de dois homólogos da uridiltransferase TUTase neste organismo parece corroborar esta observação. Como encontramos um possível homólogo para TUTase em *T. cruzi* (TcCLB.506657.70) mapeamos a biblioteca de epimastigotas através do Tailor, um programa que considera as adições de uridina sem a presença de uma sequência modelo (Chou *et al.*, 2015), para tentar identificar uma possível população de pequenos RNAs uridilados na posição 3'. Com esta análise observamos que as porcentagens de tRNAs e snRNAs mapeados foram 10 e 7,3% maiores, mantendo a mesma distribuição de tamanho observada anteriormente. Portanto, nenhuma população distinta de pequenos RNAs é evidenciada com esta estratégia.

Como o uso do genoma de referência do *T. cruzi* CL Brener obtido do banco de dados TriTryp é uma estratégia limitada para o mapeamento das sequências obtidas

a partir do sequenciamento de nossas bibliotecas, também procuramos identificar outras regiões que poderiam gerar pequenos RNAs independentemente de estarem ausentes do genoma de referência ou de não terem sido montadas, como elementos transponíveis não anotados ou o DNA do kinetoplasto. Para isto, fizemos uma análise inicial mapeando a biblioteca de epimastigotas contra os elementos transponíveis de *T. cruzi*, anotados como *retrotransposon*, *retroelement* ou *transposon* no banco de dados do NCBI (disponíveis em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Obtivemos 10 sequências e, destas, 6 estão presentes na referência do TriTryp, porém apenas 2 possuem anotação como RHS (do inglês “*Retrotransposon Hot Spot*”) e as outras estão anotadas como proteínas hipotéticas. Observamos que a taxa de mapeamento foi de apenas 0,25% e não parece haver nenhum padrão nos pequenos RNAs identificados (dados não mostrados). Mas, como o número de sequências utilizadas para o mapeamento foi pequeno, mais análises são necessárias para uma conclusão definitiva. A análise da mesma biblioteca contra a referência do DNA do kinetoplasto, também gerou uma taxa de mapeamento baixa, de apenas 0,4% e ausência de um padrão de pequenos RNAs. Considerando-se que a taxa de mapeamento no genoma de referência do *T. cruzi* foi de 95,77% estes resultados indicam que os pequenos RNAs sequenciados em nossas bibliotecas são derivados principalmente da referência do DNA genômico.

As populações de pequenos RNAs derivados de tRNAs e de snRNAs são as mais consistentes em nossos estudos. Por este motivo, para verificar a possível importância destes pequenos RNAs na biologia do parasito, ainda que não atuem diretamente nas vias de RNAi, decidimos sequenciar bibliotecas derivadas de RNA de parasitos em suas diferentes condições experimentais: em três das suas formas (amastigota, tripomastigota e epimastigota) e sob expressão alterada de *TcPIWI*.

5.6. Caracterização da população de pequenos RNAs nas diferentes formas do parasito

Considerando-se que a população de pequenos RNAs derivados de tRNAs parece ser a mais consistente em todas as bibliotecas de epimastigotas analisadas até o momento, decidimos comparar estes pequenos RNAs em diferentes formas do *T. cruzi*. Construimos bibliotecas a partir de amostras de epimastigotas axênicas, de tripomastigotas derivadas de sobrenadante de cultura celular, e de amastigotas obtidas de macrófagos após 48h de infecção com *T. cruzi*. Como na biblioteca de formas amastigotas parte das sequências são derivadas de RNAs do macrófago, que mapeiam no genoma do camundongo e, conseqüentemente, são excluídas das análises; a taxa de mapeamento é a menor (40%) dentre as formas analisadas. As outras duas bibliotecas obtiveram alta taxa de mapeamento, acima de 85% (Tabela 7).

Tabela 7 – Descrição geral das bibliotecas de pequenos RNAs das diferentes formas do parasito

Forma	Empresa	Seq Totais	% Mapeamento
Epimastigota	Gurdon	4.677.637	95,05%
Tripomastigota	Gurdon	1.596.461	87,92%
Amastigota*	Gurdon	1.803.315	40,25%

* biblioteca derivada do sequenciamento de macrófagos 48h após a infecção com *T. cruzi*

Uma vez mais, as populações de pequenos RNAs obtidas nestas bibliotecas, que não possuem padrão de degradação, são derivadas de tRNA e snRNA. Os pequenos RNAs derivados de tRNA foram os mais abundantes, representando 12% do total. Apesar da presença de um pico de 40 nt nos pequenos RNAs derivados de rRNA na biblioteca de epimastigotas, este pico não é representativo, pois não aparece em todas as bibliotecas de epimastigotas sequenciadas (Figura 19).

Observamos em nossas bibliotecas que independente da forma do parasito, os pequenos RNAs derivados de tRNA são gerados a partir dos mesmos tRNAs (tRNA-

Glu e tRNA-Val) e que mais de 90% dos pequenos RNAs de 33 nt derivam da região 5' do tRNA (Figura 20).

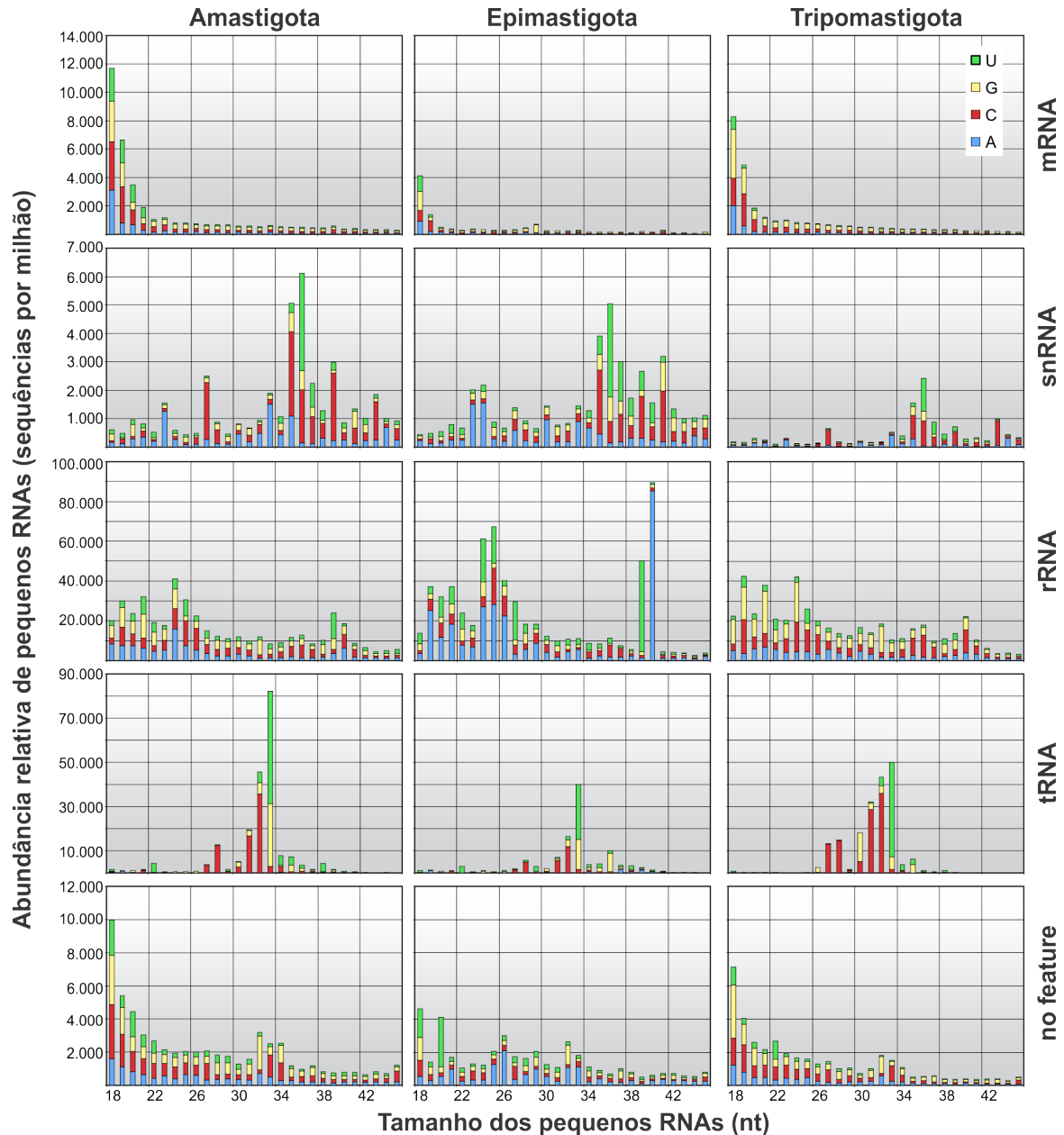


Figura 19 – Análise comparativa de populações de pequenos RNAs das diferentes formas do parasito (amastigota, epimastigota e tripomastigota). Os pequenos RNAs foram agrupados com base na sua origem (mRNA, snRNA, rRNA, tRNA ou não anotado – *no feature*) e distribuídos de acordo com seu tamanho que variou de 18 a 45 nucleotídeos. O padrão de cores representado nas barras indica a proporção da base nitrogenada (U, C, G ou A) na primeira posição dos pequenos RNAs.

É importante destacar que em *T. brucei* foram observadas diferenças em populações de pequenos RNAs entre as formas *slender* e procíclica (Zheng *et al.*, 2013). O tRNA-Asp por exemplo, gera o maior número de pequenos RNAs na forma *slender* de *T. brucei*, sendo que o pico de 30 nt é derivado da região 5' do tRNA. Já na biblioteca da forma procíclica, o pequeno RNA derivado do tRNA-Glu é o mais abundante e possui apenas o pico de 30 nt, também proveniente da região 5'.

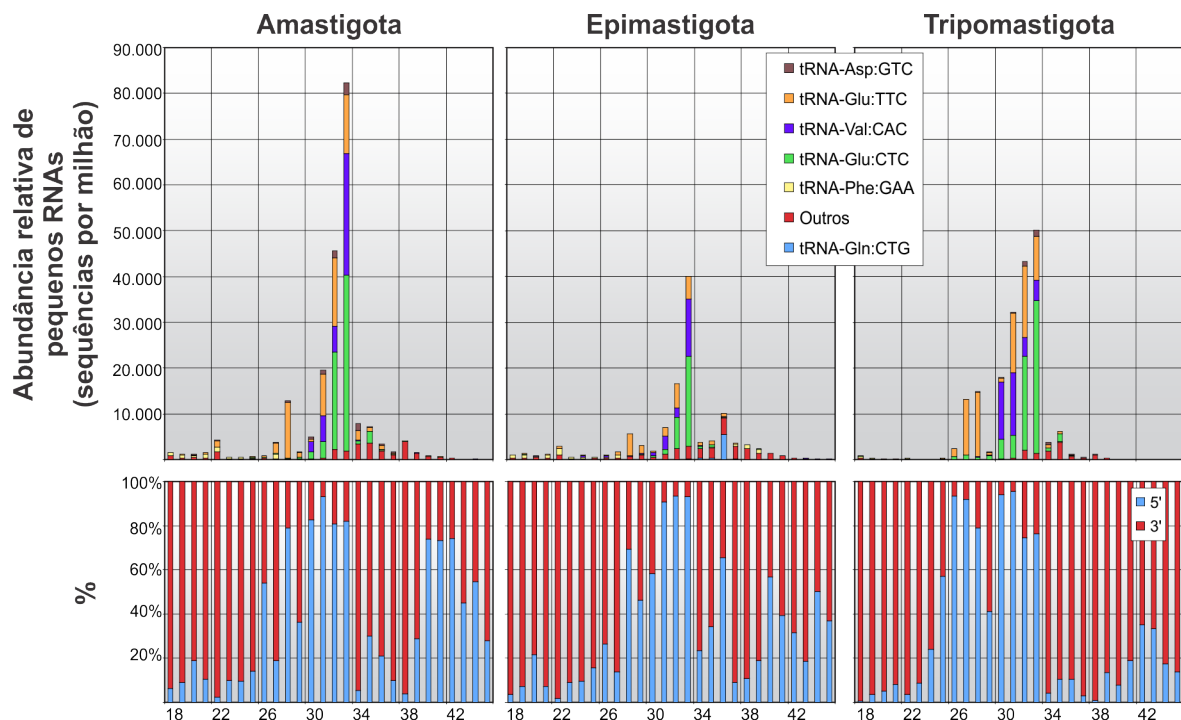


Figura 20 – Classificação dos pequenos RNAs de acordo com o tRNA do qual originaram nas diferentes formas do parasito (amastigota, epimastigota ou tripomastigota). No painel superior o padrão de cores representado nas barras indica o tRNA que originou os pequenos RNAs de acordo com a legenda. No painel inferior temos a representação percentual da região 5' ou 3' do tRNA da qual foram derivados.

Já foi demonstrado que modificações presentes em tRNAs maduros, como metilações em adenosinas e guaninas, geram regiões de parada de transcrição (Motorin *et al.*, 2007). Durante o sequenciamento, se o pequeno RNA derivado de uma região de tRNA tiver este tipo de modificação, ele estará sub-representado (Cozen *et al.*, 2015). Inicialmente poderíamos cogitar a possibilidade de viés técnico da estratégia de sequenciamento em nossas bibliotecas, pelo fato dos pequenos RNAs derivados de tRNA com tamanho aproximado de 30 nt serem

gerados em sua maioria, a partir da mesma região do tRNA. Entretanto, para ser considerado um artefato da técnica, todos os tamanhos dos pequenos RNAs deveriam ser afetados de forma similar, o que não foi observado. Esta preferência para a região 5' está presente principalmente nos pequenos RNAs com tamanho em torno de 30 nt.

A população de pequenos RNAs derivados de snRNA sofreu variação na sua abundância relativa entre as bibliotecas derivadas de diferentes formas do parasito com um aumento na biblioteca de amastigotas (Figura 19), sugerindo a possível participação destes pequenos RNAs na diferenciação ou na manutenção da forma do parasito, embora esta hipótese deva ser validada experimentalmente.

5.7. Caracterização das populações de pequenos RNAs sob expressão diferencial da TcPIWI

Em outros eucariotos, já foram descritas populações de pequenos RNAs cuja expressão é induzida em resposta a diferentes estímulos. Este é o caso de siRNAs derivados de sequências virais que só são produzidos em plantas e animais durante a infecção (Soares *et al.*, 2014). Também é o caso de pequenos RNAs produzidos no fungo *Neurospora crassa* em resposta ao estresse causado por dano no DNA (Lee *et al.*, 2009). Com base nestas evidências, decidimos sequenciar pequenos RNAs do *T. cruzi* expostos a diferentes estímulos durante seu ciclo de vida.

5.7.1. Radiação gama

Sabe-se que um estresse desafiador para o parasita durante seu ciclo de vida é a dessecação, que como demonstrado em *D. Radiodurans*, provoca quebras de fitas duplas de DNA (Tanaka *et al.*, 2004). Assim como a dessecação, também a radiação gama induz a formação pequenos RNAs em resposta à quebra de fitas duplas de DNA. Por isso utilizamos esta estratégia para analisar as populações de pequenos RNAs presentes em *T. cruzi* expostos à radiação gama.

Como já mencionamos anteriormente, os pequenos RNAs derivados de tRNA são os mais abundantes em nossas análises. Uma vez que a radiação gama já foi vista não aumentar a quantidade desta família de pequenos RNAs em células de

mamíferos (Fu *et al.*, 2009), cogitamos a possibilidade de identificar alguma outra população de pequenos ncRNAs que poderiam responder a este estresse.

Observamos que após a radiação gama, a expressão de *TcPIWI* aumenta significativamente a partir de 12h de exposição (Figura 11A). Baseado na íntima relação entre as proteínas Argonautas e os pequenos RNAs com os quais elas se associam, pode-se imaginar que variações na expressão de *TcPIWI* devam ser acompanhadas por mudanças nas populações de pequenos RNAs associados à ela. Desta forma, construímos e sequenciamos bibliotecas de epimastigotas irradiadas e não irradiadas no tempo de 12h, quando a *TcPIWI* parece atuar em resposta ao estresse da radiação. Os sequenciamentos foram realizados na empresa BGI, e ambas as bibliotecas obtiveram uma porcentagem de mapeamento similar (Tabela 8).

Tabela 8 – Descrição geral do mapeamento das bibliotecas de epimastigotas controle e irradiada com 500 Gy de radiação gama

Amostra	Tratamento	Tempo	Empresa	Seq Totais	% Mapeamento
Epimastigota	-	12h	BGI	32.547.306	81,57%
Epimastigota	Irradiado	12h	BGI	40.465.575	79,97%

A análise geral dos dados mostra um aumento na abundância relativa de pequenos RNAs, com média de 1,25 vezes, em todas as famílias de pequenos RNAs, com exceção dos derivados de rRNA (Figura 21). Estes resultados sugerem que a radiação não tem impacto específico em nenhuma população de pequenos RNAs sequenciada.

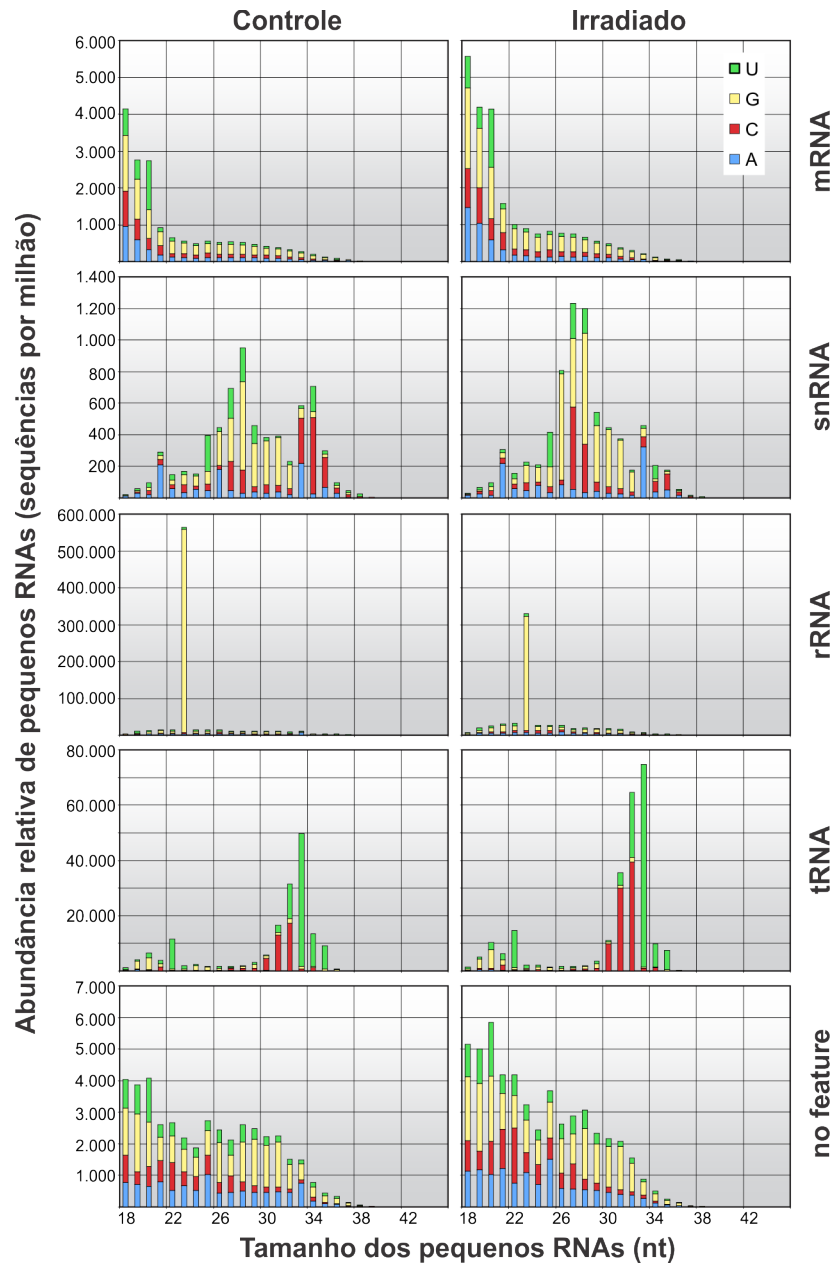


Figura 21 – Análise comparativa de populações de pequenos RNAs de parasitos controle e irradiado após 12h de radiação gama. Os pequenos RNAs foram agrupados com base na sua origem (mRNA, snRNA, rRNA, tRNA ou não anotado – *no feature*) e distribuídos de acordo com seu tamanho que variou de 18 a 45 nucleotídeos. O padrão de cores representado nas barras indica a proporção da base nitrogenada (U, C, G ou A) na primeira posição dos pequenos RNAs.

5.7.2. Infecção

Durante a cinética de infecção de macrófagos murinos, há uma diminuição significativa na expressão do gene *TcPIWI* após 4h de infecção (Figura 10A). Para avaliar as populações de pequenos RNAs presentes durante a infecção, nós

construímos e sequenciamos bibliotecas a partir do RNA extraído de macrófagos murinos infectados com *T. cruzi* após 2, 4, 8 e 48h de infecção. Observamos um aumento das sequências mapeadas no genoma de *T. cruzi* ao longo do tempo de infecção, principalmente comparando-se os tempos de 8 e 48h (Tabela 9), que é consistente com o aumento de parasitos (Figura 10B).

Tabela 9 – Descrição geral das sequências mapeadas no genoma de *T. cruzi* após 2, 4, 8 e 48h de infecção em macrófagos murinos

Tempo (h)	Empresa	Seq Totais	% Mapeamento no genoma de <i>T. crui</i>
2	Gurdon	1,884,673	20.47%
4	Gurdon	1,570,596	28.20%
8	Gurdon	2,929,089	26.37%
48	Gurdon	1,803,315	40.25%

Contrariando o que esperávamos inicialmente, nenhuma nova população de pequenos RNAs foi detectada além das que já haviam sido observadas. A população de pequenos RNAs derivados de tRNA não varia em resposta à infecção, mantendo a mesma abundância relativa independente do tempo.

É importante notar que a população derivada de snRNAs aumenta em abundância relativa a partir de 8h após a infecção (Figura 22). O aumento na expressão relativa destes pequenos RNAs ocorre principalmente quando o parasito estaria se diferenciando da forma tripomastigota para amastigota dentro do macrófago, o que pode ser correlacionado com a diferença obtida entre as bibliotecas de ambas as formas, como mostrado anteriormente (Figura 19). Em conjunto, estes dados podem indicar uma importante função destes pequenos RNAs durante est transição tripomastigota-amastigota.

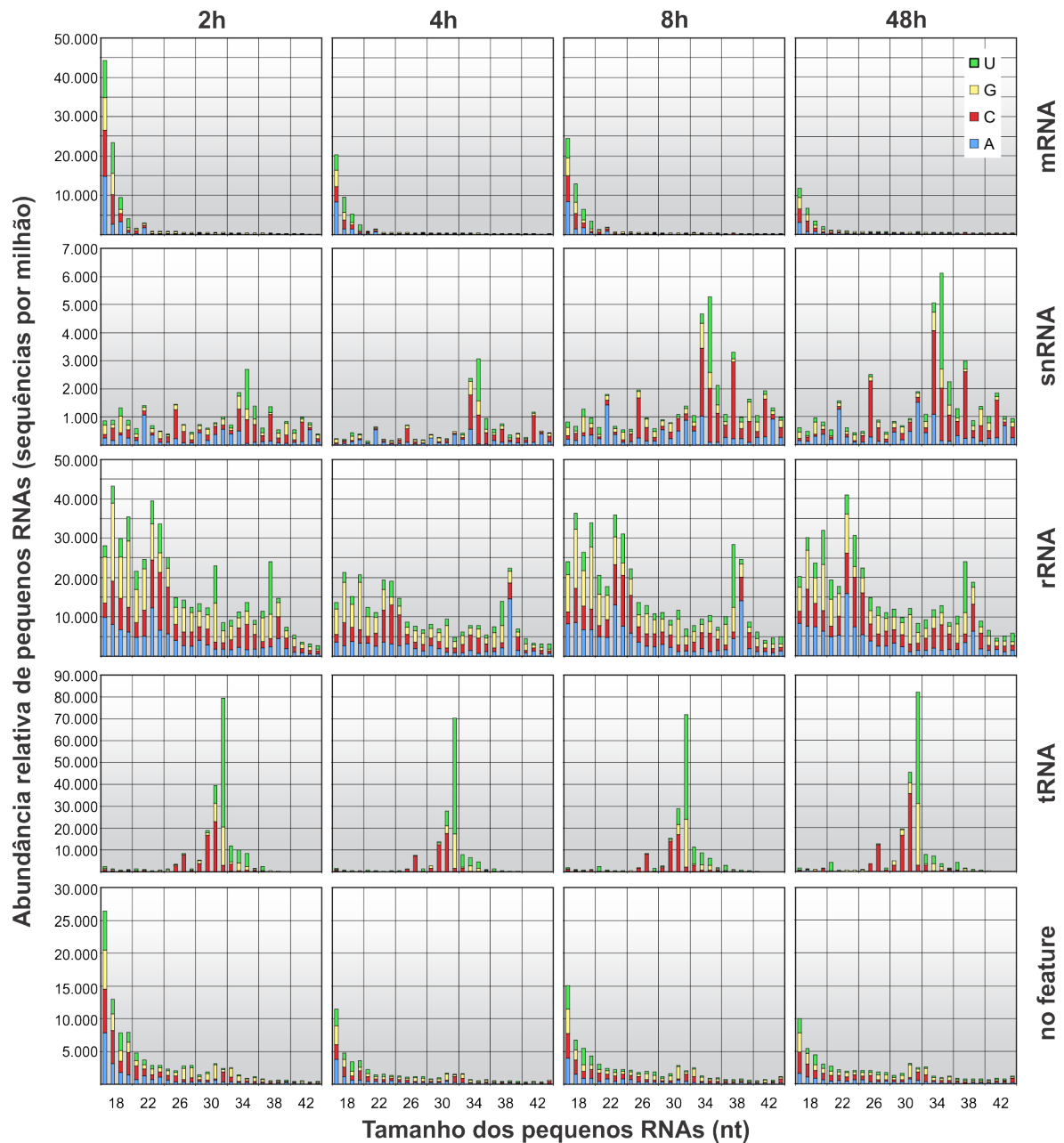


Figura 22 – Análise comparativa de populações de pequenos RNAs mapeados no genoma de *T. cruzi* após 2, 4, 8 e 48h de infecção em macrófagos murinos. Os pequenos RNAs foram agrupados com base na sua origem (mRNA, snRNA, rRNA, tRNA ou não anotado – *no feature*) e distribuídos de acordo com seu tamanho que variou de 18 a 45 nucleotídeos. O padrão de cores representado nas barras indica a proporção da base nitrogenada (U, C, G ou A) na primeira posição dos pequenos RNAs da família de RNA é mostrado, assim como a preferência da primeira base do RNA em cada tamanho.

5.8. Caracterização das populações de pequenos RNAs dos parasitos heterozigotos para *TcPIWI*

Uma vez que nós havíamos obtido parasitos heterozigotos para a deficiência do gene *TcPIWI*, nós construímos e sequenciamos bibliotecas destes parasitos com o objetivo de identificar possíveis ncRNAs associados à *TcPIWI*. Considerando-se que proteínas Argonautas estão sempre associadas com pequenos RNAs, a redução significativa na expressão de *TcPIWI* nos parasitos heterozigotos (Figura 23) deveria levar a uma diminuição proporcional na população de pequenos RNAs associados.

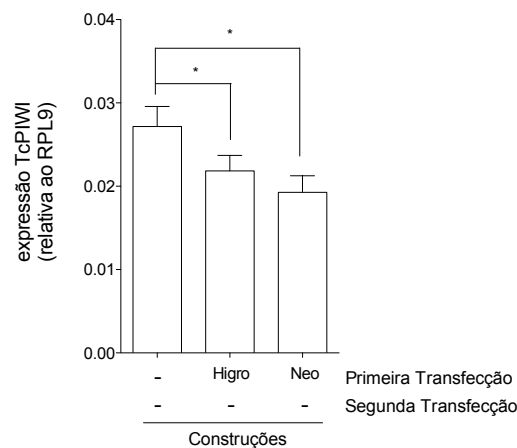


Figura 23 – Expressão da *TcPIWI* nas populações de parasitos heterozigotos. A população de parasitos heterozigotos apresenta uma diminuição significativa na expressão da *TcPIWI*. A estatística usada foi o teste t, com * $p < 0.05$.

A análise geral da biblioteca preparada a partir do RNA de parasitos heterozigotos mostrou que a abundância relativa das populações de pequenos RNAs derivados de tRNA aumentou 1,4 vezes em comparação com a dos parasitos selvagens (Figura 24). Como nesta condição a expressão da *TcPIWI* está diminuída, a ausência de relação entre as abundâncias de *TcPIWI* e de pequenos RNAs derivados de tRNA sugere que este grupo de pequenos RNAs não está associado à *TcPIWI*, como previamente descrito por Garcia-Silva e colaboradores (2014) que sequenciaram os pequenos RNAs co-imunoprecipitados com *TcPIWI*. Porém, esta população obtida e analisada por Garcia-Silva e colaboradores não está enriquecida, o que seria esperado caso ela estivesse realmente associada à *TcPIWI*.

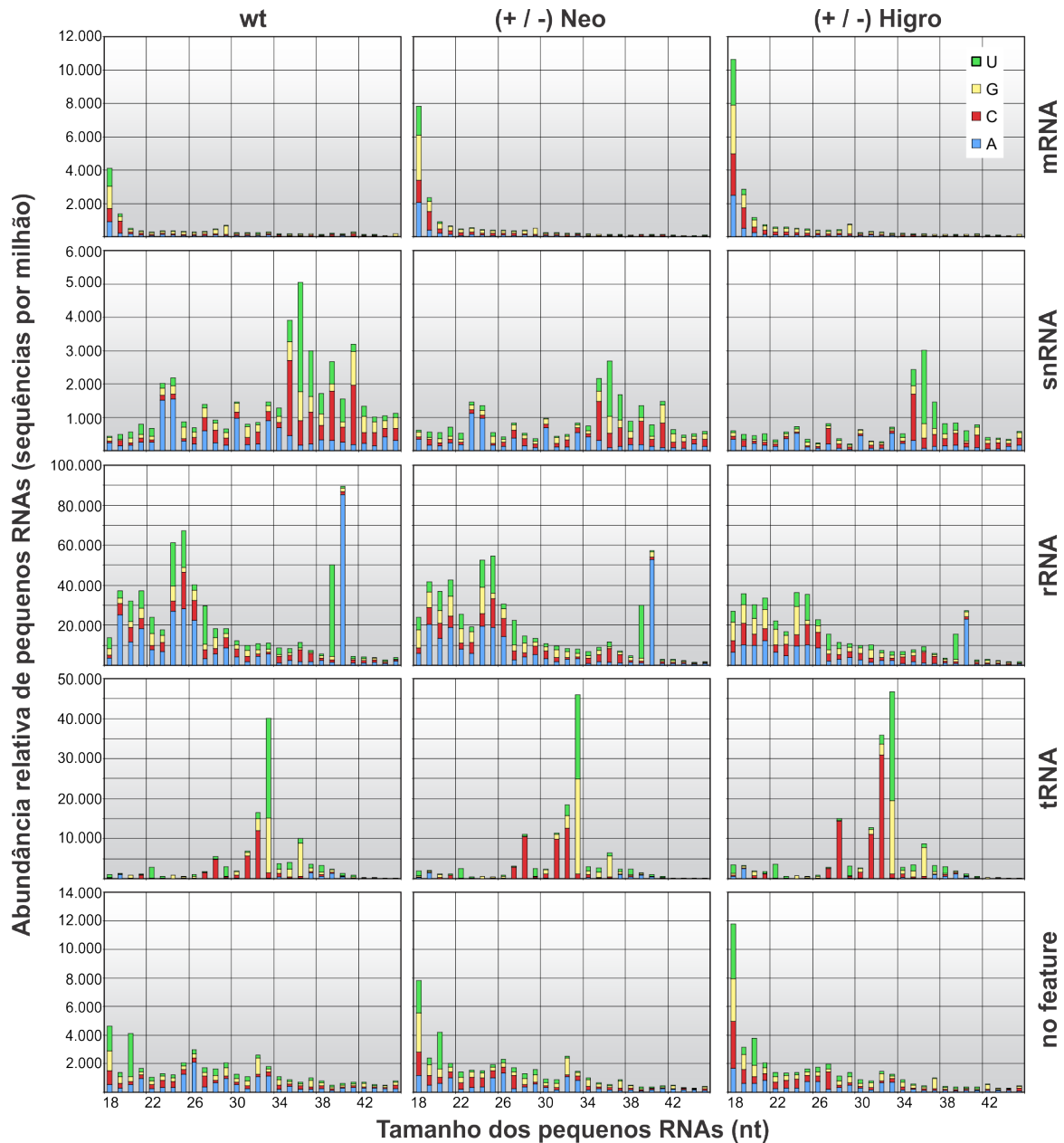


Figura 24 – Análise comparativa de populações de pequenos RNAs de parasitos selvagens (wt) ou heterozigotos para a deficiência em *TcPIWI* obtidos a partir das duas construções, Neo e Higo. Os pequenos RNAs foram agrupados com base na sua origem (mRNA, snRNA, rRNA, tRNA ou não anotado – *no feature*) e distribuídos de acordo com seu tamanho que variou de 18 a 45 nucleotídeos. O padrão de cores representado nas barras indica a proporção da base nitrogenada (U, C, G ou A) na primeira posição dos pequenos RNAs da família de RNA é mostrado, assim como a preferência da primeira base do RNA em cada tamanho.

Observamos também que a abundância relativa da população de pequenos RNAs derivadas de snRNA diminuiu aproximadamente pela metade (proporção de 0,56) nas bibliotecas de parasitos heterozigotos, quando comparada com a dos parasitos selvagens (Figura 24), acompanhando então a diminuição que

observamos na expressão da TcPIWI nos parasitos heterozigotos (Figura 23). Esta observação pode indicar uma possível associação dos pequenos RNAs derivados de snRNAs à TcPIWI. Para o melhor entendimento da função molecular destes componentes um estudo mais minucioso deve ser realizado, como o sequenciamento do parasita homozigoto deficiente para *TcPIWI*, ou a coimunoprecipitação RNA-TcPIWI.

5.9. Discussão final

Os resultados obtidos neste trabalho mostram a presença do gene da Argonauta PIWI, conservada em todos os tripanossomatídeos, em *T. cruzi*. Além de demonstrar diferenças estruturais, como a expansão do domínio de poliglutamina, nos dois alelos do gene *TcPIWI* presentes na cepa CL Brener. Estes achados nos permitiram desenvolver parasitos deficientes para *TcPIWI* e buscar características fenotípicas decorrentes desta intervenção.

As análises realizadas utilizando os parasitos deficientes sugerem que a TcPIWI pode estar envolvida mas não é essencial para a proliferação dos parasitos durante o crescimento axênico de epimastigotas ou durante a infecção em macrófagos.

A radiação gama promove quebras da fita dupla de DNA e, 48h após a irradiação o *T. cruzi* é capaz de reestruturar seu DNA e retomar seu crescimento. Apesar de vias de RNAi já terem sido descritas como auxiliares no reparo de DNA, nossos resultados demonstram apenas um leve atraso no crescimento de epimastigotas de *T. cruzi* deficientes para *TcPIWI* após a irradiação. Este dado corrobora os obtidos com o crescimento de epimastigotas controle, não submetidas à irradiação. Isto nos indica que o papel da Argonauta está mais provavelmente ligado ao ciclo celular, por exemplo atuando na proliferação celular, do que no reparo do DNA em si.

Durante a infecção em macrófagos, parasitos deficientes para *TcPIWI* apresentaram fenótipo mais acentuado. A taxa de proliferação dos parasitos deficientes intracelulares foi maior do que a dos parasitos controle, sugerindo que a TcPIWI tem um papel de regulação da infecção por meio do controle da replicação do parasito. A regulação negativa da transcrição do gene *TcPIWI* nos tempos iniciais de infecção parece ser necessária para que o parasito possa infectar e popular o

hospedeiro, porém, a completa ausência do gene parece desregular a taxa de replicação, levando o parasito à uma proliferação exacerbada que pode matar o hospedeiro rapidamente e ser detrimental para o parasito.

Como há expressão diferencial do gene *TcPIWI* quando o parasito é submetido a diferentes tipos de estresse, além de existirem diferenças de fenótipo nos parasitos deficientes para *TcPIWI*, esta via alternativa de RNAi que possui a Argonauta PIWI como componente principal, provavelmente, é importante para o parasito. Porém, nenhuma população de pequenos RNAs encontrada neste estudo parece ser responsiva à variação de expressão da Argonauta.

De uma forma geral, as populações de pequenos RNAs detectadas ou com o uso de diferentes estratégias de sequenciamento, ou com os parasitos submetidos a diferentes situações de estresse, foram muito semelhantes. Possivelmente então, estas podem ser as únicas populações de pequenos RNAs encontradas em *T. cruzi*. Porém não possuem correlação com a expressão da Argonauta e, portanto parecem não estar em associação com ela. Embora tenhamos feito um trabalho minucioso, a não detecção de outras populações de pequenos RNAs, ou mesmo particularidades entre as diferentes condições experimentais, não implica necessariamente a ausência destas populações. Por exemplo, se uma determinada população de pequenos RNAs tem alguma modificação que previne a incorporação de RNAs na biblioteca para sequenciamento, ela não será detectada. Assim, mais estratégias precisam ser realizadas para conseguir abranger o maior número possível de populações de pequenos RNAs.

Os pequenos RNAs derivados de tRNA também são outro foco importante, afinal, eles são conservados em todos os tripanossomatídeos e não são derivados de degradação randômica. Os recentes estudos destes pequenos RNAs em vários organismos têm mostrado que suas funções são variadas e com grande importância biológica.

A abundância relativa da população de pequenos RNAs derivados de snRNAs, também bem consistente em nossas análises, variou nas diferentes formas do parasito e reduziu em parasitos heterozigotos deficientes para *TcPIWI*, apontando uma possível importância destes pequenos RNAs na biologia do parasito independente de estar ou não associado com a *TcPIWI*.

Outro panorama que precisa ser explorado é o da Argonauta atuando sozinha na regulação de vias específicas do parasito, sem associação de pequenos RNAs, ainda que esta opção pareça ser a menos provável, uma vez que todas as Argonautas de eucariotos já descritas possuem associação com pequenos RNAs.

Portanto, é necessário um maior número de análises para o entendimento dos mecanismos e funções desta via alternativa de RNAi em *T. cruzi* e em outros tripanossomatídeos.

Conclusões

6. Conclusões

1 – Existem dois alelos do gene *TcPIWI* que são cotranscritos na cepa CL Brener de *T. cruzi* e que se diferem principalmente no tamanho do domínio poliglutamina;

2 – Parasitos deficientes para *TcPIWI* foram gerados com sucesso e mostraram-se viáveis em cultura axênica de epimastigotas;

3 – A expressão do mRNA de *TcPIWI* do parasito diminui no decorrer da infecção de macrófagos murinos e parasitos deficientes para *TcPIWI* apresentam maior taxa de infecção e replicação em macrófagos;

4 – A expressão do mRNA de *TcPIWI* aumenta durante a resposta à radiação gama, porém não há grandes diferenças de recuperação entre parasitos selvagens e deficientes;

5 – A proteína TcPIWI fusionada com cauda HA-Flag foi expressa com sucesso em *T. cruzi* somente na ausência do gene *TcPIWI* endógeno e teve localização citoplasmática em formas epimastigotas;

6 – Populações de pequenos RNAs derivadas de tRNA e snRNA foram identificadas consistentemente nas bibliotecas sequenciadas de *T. cruzi*. Enquanto a população derivada de tRNA é constante nas bibliotecas sequenciadas, a derivada de snRNA varia em abundância relativa entre as diferentes formas do parasito, e no parasito heterozigoto deficiente para *TcPIWI*.

Perspectivas

7. Perspectivas

1 – Construir e sequenciar bibliotecas de pequenos RNAs dos parasitos homozigotos deficientes para *TcPIWI*;

2 – Sequenciar os RNAs coimunoprecipitados com a *TcPIWI*;

3 – Analisar as proteínas coimunoprecipitadas com a *TcPIWI* por espectrometria de massas;

4 – Construir e sequenciar bibliotecas de transcriptoma de parasitos após exposição à radiação gama e durante a infecção em macrófagos murinos.

Referências Bibliográficas

8. Referências Bibliográficas

- ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. The Trypanosoma cruzi-host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 10, p. 819-23, Oct 2005.
- ANGHEBEN, A. et al. Chagas disease in Italy: breaking an epidemiological silence. **Euro Surveill**, v. 16, n. 37, 2011.
- ATAYDE, V. D. et al. The structure and repertoire of small interfering RNAs in Leishmania (Viannia) braziliensis reveal diversification in the trypanosomatid RNAi pathway. **Mol Microbiol**, v. 87, n. 3, p. 580-93, Feb 2013.
- BARNES, R. L. et al. Comparative genomics reveals two novel RNAi factors in Trypanosoma brucei and provides insight into the core machinery. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 5, p. e1002678, 2012.
- BARRETT, M. P.; CROFT, S. L. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. **Br Med Bull**, v. 104, p. 175-96, 2012.
- BATISTA, T. M.; MARQUES, J. T. RNAi pathways in parasitic protists and worms. **J Proteomics**, v. 74, n. 9, p. 1504-14, Aug 24 2011.
- BERNSTEIN, E. et al. Dicer is essential for mouse development. **Nat Genet**, v. 35, n. 3, p. 215-7, Nov 2003.
- BERRIMAN, M. et al. The genome of the African trypanosome Trypanosoma brucei. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 416-22, Jul 15 2005.
- BILBE, G. Infectious diseases. Overcoming neglect of kinetoplastid diseases. **Science**, v. 348, n. 6238, p. 974-6, May 29 2015.
- BLUMENTHAL, T. et al. A global analysis of Caenorhabditis elegans operons. **Nature**, v. 417, n. 6891, p. 851-4, Jun 20 2002.
- BOHMERT, K. et al. AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. **EMBO J**, v. 17, n. 1, p. 170-80, Jan 2 1998.
- BONALDO, M. C. et al. Cell-substrate adhesion during Trypanosoma cruzi differentiation. **J Cell Biol**, v. 106, n. 4, p. 1349-58, Apr 1988.
- BONANSEA, S. et al. Stress response to high osmolarity in Trypanosoma cruzi epimastigotes. **Arch Biochem Biophys**, v. 527, n. 1, p. 6-15, Nov 1 2012.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976.

- BRAUN, L. et al. A complex small RNA repertoire is generated by a plant/fungal-like machinery and effected by a metazoan-like Argonaute in the single-cell human parasite *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 5, p. e1000920, May 2010.
- BRENNECKE, J. et al. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. **Cell**, v. 128, n. 6, p. 1089-103, Mar 23 2007.
- CAMPBELL, D. A.; THOMAS, S.; STURM, N. R. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? **Microbes and Infection**, v. 5, n. 13, p. 1231-1240, 2003.
- CAPLEN, N. J. et al. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 17, p. 9742-7, Aug 14 2001.
- CARTHEW, R. W.; SONTHEIMER, E. J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 642-55, Feb 20 2009.
- 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.
- CHELOUFI, S. et al. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. **Nature**, v. 465, n. 7298, p. 584-9, Jun 3 2010.
- CHIARI, E. Growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi* culture forms kept in laboratory for different periods of time. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 16, n. 2, p. 81-7, Mar 1974.
- CHOU, M. T. et al. Tailor: a computational framework for detecting non-templated tailing of small silencing RNAs. **Nucleic Acids Res**, May 24 2015.
- CIFUENTES, D. et al. A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. **Science**, v. 328, n. 5986, p. 1694-8, Jun 25 2010.
- CLAYTON, C. E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. **EMBO J**, v. 21, n. 8, p. 1881-8, Apr 15 2002.
- COUVILLION, M. T. et al. A *Tetrahymena* Piwi bound to mature tRNA 3' fragments activates the exonuclease Xrn2 for RNA processing in the nucleus. **Mol Cell**, v. 48, n. 4, p. 509-20, Nov 30 2012.
- COUVILLION, M. T.; SACHIDANANDAM, R.; COLLINS, K. A growth-essential *Tetrahymena* Piwi protein carries tRNA fragment cargo. **Genes Dev**, v. 24, n. 24, p. 2742-7, Dec 15 2010.
- COZEN, A. E. et al. ARM-seq: AlkB-facilitated RNA methylation sequencing reveals a complex landscape of modified tRNA fragments. **Nat Methods**, Aug 3 2015.

- DAROCHA, W. D. 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. 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.
- DE FARIA, I. J. et al. dsRNA sensing during viral infection: lessons from plants, worms, insects, and mammals. **J Interferon Cytokine Res**, v. 33, n. 5, p. 239-53, May 2013.
- DENG, J. et al. Respiratory syncytial virus utilizes a tRNA fragment to suppress antiviral responses through a novel targeting mechanism. **Mol Ther**, Jul 9 2015.
- DJIKENG, A. 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.
- DURAND-DUBIEF, M.; BASTIN, P. TbAGO1, an argonaute protein required for RNA interference, is involved in mitosis and chromosome segregation in *Trypanosoma brucei*. **BMC Biol**, v. 1, p. 2, 2003.
- EL-SAYED, N. M. et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 409-15, Jul 15 2005.
- EL-SAYED, N. M. et al. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 404-9, Jul 15 2005.
- ENDER, C.; MEISTER, G. Argonaute proteins at a glance. **J Cell Sci**, v. 123, n. Pt 11, p. 1819-23, Jun 1 2010.
- FIRE, A. 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.
- FRANCIA, S. et al. Site-specific DICER and DROSHA RNA products control the DNA-damage response. **Nature**, v. 488, n. 7410, p. 231-5, Aug 9 2012.
- FRANZEN, O. et al. The short non-coding transcriptome of the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 8, p. e1283, Aug 2011.
- FU, H. et al. Stress induces tRNA cleavage by angiogenin in mammalian cells. **FEBS Lett**, v. 583, n. 2, p. 437-42, Jan 22 2009.
- GAO, M. et al. Ago2 facilitates Rad51 recruitment and DNA double-strand break repair by homologous recombination. **Cell Res**, v. 24, n. 5, p. 532-41, May 2014.

GARCIA SILVA, M. R. et al. Cloning, characterization and subcellular localization of a Trypanosoma cruzi argonaute protein defining a new subfamily distinctive of trypanosomatids. **Gene**, v. 466, n. 1-2, p. 26-35, Oct 15 2010.

GARCIA-SILVA, M. R. et al. Gene expression changes induced by Trypanosoma cruzi shed microvesicles in mammalian host cells: relevance of tRNA-derived halves. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 305239, 2014.

GARCIA-SILVA, M. R. et al. Hints of tRNA-Derived Small RNAs Role in RNA Silencing Mechanisms. **Genes (Basel)**, v. 3, n. 4, p. 603-14, 2012.

GARCIA-SILVA, M. R. et al. Extracellular vesicles shed by Trypanosoma cruzi are linked to small RNA pathways, life cycle regulation, and susceptibility to infection of mammalian cells. **Parasitol Res**, v. 113, n. 1, p. 285-304, Jan 2014.

GARCIA-SILVA, M. R. 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.

GARCIA-SILVA, M. R. et al. A particular set of small non-coding RNAs is bound to the distinctive Argonaute protein of Trypanosoma cruzi: insights from RNA-interference deficient organisms. **Gene**, v. 538, n. 2, p. 379-84, Apr 1 2014.

GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M. J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Trop**, v. 115, n. 1-2, p. 22-7, Jul-Aug 2010.

GHILDIYAL, M.; ZAMORE, P. D. Small silencing RNAs: an expanding universe. **Nat Rev Genet**, v. 10, n. 2, p. 94-108, Feb 2009.

GIBSON, D. G. et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. **Nat Methods**, v. 6, n. 5, p. 343-5, May 2009.

GOODARZI, H. et al. Endogenous tRNA-Derived Fragments Suppress Breast Cancer Progression via YBX1 Displacement. **Cell**, v. 161, n. 4, p. 790-802, May 7 2015.

HALEY, B.; ZAMORE, P. D. Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. **Nat Struct Mol Biol**, v. 11, n. 7, p. 599-606, Jul 2004.

HARTIG, J. V.; FORSTEMANN, K. Loqs-PD and R2D2 define independent pathways for RISC generation in Drosophila. **Nucleic Acids Res**, v. 39, n. 9, p. 3836-51, May 2011.

HONDA, S. et al. Sex hormone-dependent tRNA halves enhance cell proliferation in breast and prostate cancers. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 29, p. E3816-25, Jul 21 2015.

- HORWICH, M. D. et al. The *Drosophila* RNA methyltransferase, DmHen1, modifies germline piRNAs and single-stranded siRNAs in RISC. **Curr Biol**, v. 17, n. 14, p. 1265-72, Jul 17 2007.
- IMBODEN, M. A. et al. Transcription of the intergenic regions of the tubulin gene cluster of *Trypanosoma brucei*: evidence for a polycistronic transcription unit in a eukaryote. **Nucleic Acids Res**, v. 15, n. 18, p. 7357-68, Sep 25 1987.
- INOUE, N. et al. Tetracycline-regulated RNA interference in *Trypanosoma congolense*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 120, n. 2, p. 309-13, Apr 9 2002.
- JOSHUA-TOR, L.; HANNON, G. J. Ancestral roles of small RNAs: an Ago-centric perspective. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 3, n. 10, p. a003772, Oct 2011.
- KRIBS-ZALETA, C. Estimating contact process saturation in sylvatic transmission of *Trypanosoma cruzi* in the United States. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 4, p. e656, 2010.
- LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nat Methods**, v. 9, n. 4, p. 357-9, Apr 2012.
- LEBOWITZ, J. H. et al. Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. **Genes Dev**, v. 7, n. 6, p. 996-1007, Jun 1993.
- LEE, H. C. et al. qiRNA is a new type of small interfering RNA induced by DNA damage. **Nature**, v. 459, n. 7244, p. 274-7, May 14 2009.
- LEE, S. R.; COLLINS, K. Starvation-induced cleavage of the tRNA anticodon loop in *Tetrahymena thermophila*. **J Biol Chem**, v. 280, n. 52, p. 42744-9, Dec 30 2005.
- LEE, Y. et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. **Nature**, v. 425, n. 6956, p. 415-9, Sep 25 2003.
- LEE, Y. et al. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. **EMBO J**, v. 21, n. 17, p. 4663-70, Sep 2 2002.
- LEE, Y. et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **EMBO J**, v. 23, n. 20, p. 4051-60, Oct 13 2004.
- LEE, Y. S. 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.
- LI, Z. H. et al. Hyperosmotic stress induces aquaporin-dependent cell shrinkage, polyphosphate synthesis, amino acid accumulation, and global gene expression changes in *Trypanosoma cruzi*. **J Biol Chem**, v. 286, n. 51, p. 43959-71, Dec 23 2011.
- LINGEL, A. et al. Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain. **Nature**, v. 426, n. 6965, p. 465-9, Nov 27 2003.

- LIU, J. et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. **Science**, v. 305, n. 5689, p. 1437-41, Sep 3 2004.
- LUTEIJN, M. J.; KETTING, R. F. PIWI-interacting RNAs: from generation to transgenerational epigenetics. **Nat Rev Genet**, v. 14, n. 8, p. 523-34, Aug 2013.
- LYE, L. F. et al. Retention and loss of RNA interference pathways in trypanosomatid protozoans. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 10, p. e1001161, 2010.
- MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. 17 2011.
- MARTINEZ-CALVILLO, S. et al. Gene expression in trypanosomatid parasites. **J Biomed Biotechnol**, v. 2010, p. 525241, 2010.
- MEYER, W. J. et al. Overlapping functions of argonaute proteins in patterning and morphogenesis of Drosophila embryos. **PLoS Genet**, v. 2, n. 8, p. e134, Aug 25 2006.
- MICHALIK, K. M.; BOTTCHEER, R.; FORSTEMANN, K. A small RNA response at DNA ends in Drosophila. **Nucleic Acids Res**, v. 40, n. 19, p. 9596-603, Oct 2012.
- MOTORIN, Y. et al. Identification of modified residues in RNAs by reverse transcription-based methods. **Methods Enzymol**, v. 425, p. 21-53, 2007.
- MYLER, P. J. et al. Leishmania major Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 6, p. 2902-6, Mar 16 1999.
- NGO, H. 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.
- OKAMURA, K. et al. Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. **Genes Dev**, v. 18, n. 14, p. 1655-66, Jul 15 2004.
- PADMANABHAN, P. K. et al. Novel features of a PIWI-like protein homolog in the parasitic protozoan Leishmania. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e52612, 2012.
- PAK, J.; FIRE, A. Distinct populations of primary and secondary effectors during RNAi in C. elegans. **Science**, v. 315, n. 5809, p. 241-4, Jan 12 2007.
- PATRICK, K. L. 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.
- PEACOCK, C. S. et al. Comparative genomic analysis of three Leishmania species that cause diverse human disease. **Nat Genet**, v. 39, n. 7, p. 839-47, Jul 2007.

PEREZ-MOLINA, J. A.; NORMAN, F.; LOPEZ-VELEZ, R. Chagas disease in non-endemic countries: epidemiology, clinical presentation and treatment. **Curr Infect Dis Rep**, v. 14, n. 3, p. 263-74, Jun 2012.

PIACENZA, L. et al. Fighting the oxidative assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to infection. **Curr Opin Microbiol**, v. 12, n. 4, p. 415-21, Aug 2009.

POWER, K. T. The Romanowsky stains: a review. **Am J Med Technol**, v. 48, n. 6, p. 519-23, Jun 1982.

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

REGIS-DA-SILVA, C. G. et al. Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Rad51 gene and its role in recombination events associated with the parasite resistance to ionizing radiation. **Mol Biochem Parasitol**, v. 149, n. 2, p. 191-200, Oct 2006.

RIVAS, F. V. et al. Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. **Nat Struct Mol Biol**, v. 12, n. 4, p. 340-9, Apr 2005.

ROBINSON, K. A.; BEVERLEY, S. M. Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 128, n. 2, p. 217-28, May 2003.

SAITO, K. et al. Processing of pre-microRNAs by the Dicer-1-Loquacious complex in *Drosophila* cells. **PLoS Biol**, v. 3, n. 7, p. e235, Jul 2005.

SANGER, F.; COULSON, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **J Mol Biol**, v. 94, n. 3, p. 441-8, May 25 1975.

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102 Suppl 1, p. 75-85, Oct 30 2007.

SHI, H. et al. Role of the *Trypanosoma brucei* HEN1 family methyltransferase in small interfering RNA modification. **Eukaryot Cell**, v. 13, n. 1, p. 77-86, Jan 2014.

SHI, H. et al. Genetic interference in *Trypanosoma brucei* by heritable and inducible double-stranded RNA. **RNA**, v. 6, n. 7, p. 1069-76, Jul 2000.

SHI, H. et al. Argonaute Protein in the Early Divergent Eukaryote *Trypanosoma brucei*: Control of Small Interfering RNA Accumulation and Retroposon Transcript Abundance. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 1, p. 420-427, 2003.

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.

- SIJEN, T. et al. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. **Cell**, v. 107, n. 4, p. 465-76, Nov 16 2001.
- SIJEN, T. et al. Secondary siRNAs result from unprimed RNA synthesis and form a distinct class. **Science**, v. 315, n. 5809, p. 244-7, Jan 12 2007.
- SMIRCICH, P. 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.
- SOARES, Z. G. et al. Viral RNA recognition by the *Drosophila* small interfering RNA pathway. **Microbes Infect**, v. 16, n. 12, p. 1013-21, Dec 2014.
- SONG, J. J. et al. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. **Science**, v. 305, n. 5689, p. 1434-7, Sep 3 2004.
- STOCO, P. H. et al. Genome of the avirulent human-infective trypanosome--*Trypanosoma rangeli*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 9, p. e3176, Sep 2014.
- STUART, K. et al. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **J Clin Invest**, v. 118, n. 4, p. 1301-10, Apr 2008.
- TAKEDA, G. K. et al. [Effect of gamma rays on blood forms of *Trypanosoma cruzi*. Experimental study in mice]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 28, n. 1, p. 15-8, Jan-Feb 1986.
- TAN, Y. et al. Emerging roles for PIWI proteins in cancer. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, v. 47, n. 5, p. 315-24, May 2015.
- TANAKA, M. et al. Analysis of *Deinococcus radiodurans*'s transcriptional response to ionizing radiation and desiccation reveals novel proteins that contribute to extreme radioresistance. **Genetics**, v. 168, n. 1, p. 21-33, Sep 2004.
- TEIXEIRA, S. M.; DAROCHA, W. D. Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. **Genet Mol Res**, v. 2, n. 1, p. 148-58, 2003.
- TEIXEIRA, S. M. R. Control of gene expression in Trypanosomatidae. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 12, p. 1503-1516, Dec 1998.
- THOMPSON, D. M. et al. tRNA cleavage is a conserved response to oxidative stress in eukaryotes. **RNA**, v. 14, n. 10, p. 2095-103, Oct 2008.
- TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 76, n. 9, p. 4350-4, Sep 1979.
- TSCHUDI, C. et al. Small interfering RNA-producing loci in the ancient parasitic eukaryote *Trypanosoma brucei*. **BMC Genomics**, v. 13, p. 427, 2012.

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

UNTERGASSER, A. et al. Primer3--new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Res**, v. 40, n. 15, p. e115, Aug 2012.

VAZQUEZ, M. P.; LEVIN, M. J. Functional analysis of the intergenic regions of TcP2beta gene loci allowed the construction of an improved Trypanosoma cruzi expression vector. **Gene**, v. 239, n. 2, p. 217-25, Nov 1 1999.

WANG, Z. et al. Inhibition of Trypanosoma brucei gene expression by RNA interference using an integratable vector with opposing T7 promoters. **J Biol Chem**, v. 275, n. 51, p. 40174-9, Dec 22 2000.

WEI, W. et al. A role for small RNAs in DNA double-strand break repair. **Cell**, v. 149, n. 1, p. 101-12, Mar 30 2012.

YAKUSHEV, E. Y. et al. Multifunctionality of PIWI proteins in control of germline stem cell fate. **Biochemistry (Mosc)**, v. 78, n. 6, p. 585-91, Jun 2013.

YANG, J. S.; MAURIN, T.; LAI, E. C. Functional parameters of Dicer-independent microRNA biogenesis. **RNA**, v. 18, n. 5, p. 945-57, May 2012.

YI, R. et al. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. **Genes Dev**, v. 17, n. 24, p. 3011-6, Dec 15 2003.

YOUNGMAN, E. M.; CLAYCOMB, J. M. From early lessons to new frontiers: the worm as a treasure trove of small RNA biology. **Front Genet**, v. 5, p. 416, 2014.

ZHENG, L. L. et al. Comparative transcriptome analysis of small noncoding RNAs in different stages of Trypanosoma brucei. **RNA**, v. 19, n. 7, p. 863-75, Jul 2013.

ZINGALES, B. et al. A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051-4, Nov 2009.

9. Anexos

9.1. Trabalhos desenvolvidos durante o doutorado que não compõem o corpo desta tese

SOARES, Z. G. et al. Viral RNA recognition by the Drosophila small interfering RNA pathway. **Microbes Infect**, v. 16, n. 12, p. 1013-21, Dec 2014.

9.2. Trabalhos em colaboração desenvolvidos durante o doutorado

Análise da expressão de microRNAs em macrófagos murinos durante a infecção com *T. cruzi*, projeto para obtenção do título de doutor do aluno André Nicolau Aquime Gonçalves, em andamento.