



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

POLLYANA MYRELLA CAPELA DOS SANTOS

**EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO C-
TERMINAL DA SUBUNIDADE RRP44 DO COMPLEXO
EXOSSOMA DE *TRYPANOSOMA CRUZI***

POLLYANA MYRELLA CAPELA DOS SANTOS

**EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO C-
TERMINAL DA SUBUNIDADE RRP44 DO COMPLEXO
EXOSSOMA DE *TRYPANOSOMA CRUZI***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Microbiologia, da Universidade
Estadual de Londrina, como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Profa Dra. Lucy Megumi Yamauchi
Lioni.

Londrina
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Santos, Pollyana Myrella Capela dos.

Expressão e caracterização da região C-terminal da subunidade Rrp44 do complexo exossoma de *Trypanosoma cruzi* / Pollyana Myrella Capela dos Santos. - Londrina, 2014.

42 f. : il.

Orientador: Lucy Megumi Yamauchi Lioni.
(dissertação) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2014.
Inclui bibliografia.

1. *Trypanosoma cruzi* - Teses. 2. Antígenos protéicos - Teses. 3. Genética - Teses. 4. Biologia Molecular - Teses. I. Lioni, Lucy Megumi Yamauchi. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

POLLYANA MYRELLA CAPELA DOS SANTOS

**EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO C-TERMINAL DA
SUBUNIDADE RRP44 DO COMPLEXO EXOSSOMA DE
*TRYPANOSOMA CRUZI***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Microbiologia, da Universidade
Estadual de Londrina, como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA



Orientadora: Profa Dra. Lucy Megumi Yamauchi
Lioni
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa Dra. Tatiana de A. C. Brasil de Souza
Instituto Carlos Chagas – ICC Fiocruz/Curitiba

Prof Dr. Alexandre Tadashi Morey
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 17 de abril de 2014.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a Lucy Megumi Yamauchi Lioni, pela disposição e confiança em me orientar e permitir que eu desenvolvesse este trabalho. Agradeço pela paciência e perseverança durante esses dois anos, porque mesmo com os inúmeros obstáculos, nunca deixou de acreditar em mim e principalmente em meus esforços para que este trabalho pudesse ser concluído. Minha sincera gratidão.

À Prof^a Sueli Fumie Yamada-Ogatta, pela constante ajuda na busca de soluções e melhores resultados, e principalmente pelas palavras de encorajamento nos momentos mais difíceis.

Ao Prof Alexandre Tadachi Morey, pelos conhecimentos, presença e constante disposição em ajudar e melhorar este trabalho, muito obrigada.

À Danielle Kian e Cesar Contreras, sem os quais jamais teria desenvolvido este trabalho. Muito obrigada pela paciência, disposição e ensinamentos.

Aos meus amigos de laboratório, especialmente à Marina, Carol, Carline, Eliandro, Jussevania, Mayara, Gabriella, Eliane, Ana Elisa, Caibe e Caio, e a todos que me ajudaram, mesmo que da mais simples maneira, obrigada, a vocês todo meu agradecimento.

Ao Douglas, pelo companheirismo, amizade, amor, paciência e encorajamento nas horas mais difíceis. Obrigada por fazer parte da minha vida, sem você a minha força para concluir esse trabalho não teria sido a mesma.

Aos meus pais, José e Ilda, por toda a dedicação e trabalho e por sempre acreditarem em mim e estarem ao meu lado em todas as minhas escolhas!

À CAPES/CNPq pelo incentivo através de financiamento do projeto e bolsa de mestrado.

A Deus, por me dar tudo o que eu jamais serei capaz de agradecer com palavras!

"Deus nos deu, em certa medida, o poder de fazer nosso próprio destino; e quando nossas energias parecem exigir um apoio que não podemos conseguir, quando nossa força luta por um caminho que não podemos seguir, não precisamos morrer de fome, nem ficar parados em desespero: temos apenas de buscar outro alimento para a mente, tão forte quanto o fruto proibido pelo qual ela ansiava... e talvez mais puro; e traçar com os nossos próprios pés um caminho mais reto e largo quanto aquele que a sorte nos vedou, por mais duro que seja."

Jane Eyre, Charlotte Brontë

SANTOS, Pollyana Myrella Capela dos. **Expressão e caracterização da região C-terminal da subunidade Rrp44 do complexo exossoma de *Trypanosoma cruzi***. 2014. 42f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

Trypanosoma cruzi é um parasito heteroxênico com um complexo ciclo biológico envolvendo hospedeiros vertebrados e invertebrados. Ao contrário de outros eucariotos, seus genes estão organizados em unidades policistrônicas sem promotores típicos para a RNA polimerase II, a transcrição ocorre de forma contínua e a regulação da expressão gênica quase que totalmente, em nível pós-transcricional. Entre as estruturas responsáveis pela regulação pós-transcricional nesses parasitos, encontra-se o exossoma, um complexo multiprotéico com capacidade de degradação 3'→5' de diferentes tipos de RNA. Dentre as proteínas de atividade catalítica componentes desse complexo, a subunidade Rrp44 exibe a principal atividade de exoribonuclease e endonucleotídica. Deste modo, este trabalho teve como objetivo a expressão da região C-terminal da subunidade *Rrp44* de *T. cruzi* no vetor pGEX-3X, a caracterização molecular através de ensaios de *Northern* e *Southern blot* e a localização por imunofluorescência em diferentes formas do parasito. A proteína recombinante expressa apresentou cerca de 62 kDa. Anticorpos policlonais, obtido por imunização de camundongos, reconheceram uma proteína de cerca de 100 kDa em extratos proteicos de forma tripomastigotas. A imunolocalização da proteína nativa em formas epimastigotas e tripomastigotas mostrou que a proteína está distribuída pelo citoplasma e, em menor quantidade, também pelo núcleo do parasito. A análise genômica por *Northern blot* e *Southern blot* mostrou, respectivamente, que o gene *TcRrp44* apresenta um perfil de hibridação simples típico de gene presentes em poucas cópias, e um transcrito de cerca de 3 kb em todas as formas do parasito, indicando um gene constitutivo.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. Exossoma. Rrp44

SANTOS, Pollyana Myrella Capela dos. **Expression and characterization of the C-terminal region of subunit Rrp44 of *Trypanosoma cruzi* Exosome Complex.** 2014. 42p. Dissertation (Master degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is a heteroxenic parasite with a complex life cycle involving vertebrate and invertebrate hosts. Unlike other eukaryotes, its genes are organized in polycistronic units without any typical RNA polymerase II promoters. Transcription occurs continuously, with gene expression regulation, almost entirely, at the post-transcriptional level. The exosome is a multiproteic complex with 3'→5' degradation ability of different types of RNA, and seems to be the main structure responsible for the post-transcriptional regulation in eukaryotes. Among the eleven components of this complex, seems to display its main exoribonucleolytic and endonucleolytic activity. This subunit has already been intensively characterized in yeasts, humans and *Trypanosoma brucei*. Thus, in this work we describe the first study of this complex in *T. cruzi*. The gene *TcRrp44*, which showed 80% similarity with the subunit Rrp44 of *T. brucei*, was cloned, expressed and characterized. The expressed recombinant protein showed about 62 kDa. Polyclonal antibodies obtained by immunization of mice recognized a protein of approximately 100 kDa in protein extracts of trypomastigote forms. The serum against recombinant protein, obtained by immunization of mice, was used to react with protein extracts of *T. cruzi* and resulted in recognition of 110 kDa polypeptides in trypomastigotes forms. TcRrp44 immunolocalization in epimastigotes and trypomastigotes forms showed a nuclear and cytosolic localization. The Northern blot analysis showed a transcript of the same size in all three forms of parasite, and the genomic organization analysis suggests a single or a few gene copies in the *T. cruzi* genome.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Exosome. Rrp44.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
h	Hora
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
kDa	kilodaltons
LIT	<i>Liver infusion tryptose médium</i>
°C	Grau Celsius
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	Ácido ribonucléico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute médium</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
UI/ml	<i>Unidade internacional por mililitro</i>
μ g/ml	Micrograma por mililitro
μ m	Micrômetros

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formas evolutivas do <i>T. cruzi</i> . Epimastigota (A), tripomastigota (B) e amastigota (C).....	12
Figura 2 - Ciclo evolutivo do <i>T. cruzi</i>	13
Figura 3 - Estrutura do exossoma eucariótico	20

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	<i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> E A DOENÇA DE CHAGAS	10
1.2	CICLO BIOLÓGICO	11
1.3	FORMAS DE TRANSMISSÃO	14
1.4	FASES DA DOENÇA	15
1.5	DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO	16
1.6	EXPRESSÃO GÊNICA	17
1.7	EXOSSOMA	19
1.8	ORIGEM DO CLONE RRP44	21
2	OBJETIVOS	23
	REFERÊNCIAS	24
4	ARTICLE	31
5	CONCLUSÃO	42
ANEXOS		
ANEXO A -	Registro no Comitê de Ética em Experimentos Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP	41

1 INTRODUÇÃO

1.1 *TRYPANOSOMA CRUZI* E A DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas, também chamada de tripanosomíase Americana, é considerada a doença parasitária endêmica mais grave da América Latina (WHO, 2002). É causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, um parasito flagelado unicelular pertencente ao filo Sarcomastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, e que foi descrito pela primeira vez em 1909 pelo médico e pesquisador brasileiro do Instituto Oswaldo Cruz, Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, marcando a história da pesquisa e da saúde no Brasil (CHAGAS, 1909).

Inicialmente restrito à América do Sul, América Central, México e sul dos Estados Unidos, a alta taxa de imigrantes dessas regiões, principalmente para os Estados Unidos e Europa, fez com que a incidência da doença em países não endêmicos crescesse nos últimos 20 anos (KLEIN, 2012). Nos EUA, o país com maior taxa de imigrantes, estima-se que o número de infectados chegue a 300.000 (BERN, 2009), enquanto na Europa, onde a doença tem nos últimos anos sido reconhecida como um problema de saúde emergente, o número de pessoas infectadas pode variar de 63.000 - 128.000 de acordo com o país estudado. A Espanha é considerada o país de maior preocupação devido à alta prevalência (2,7 - 4,95%) da doença entre a população imigrante, originária principalmente de Equador, Argentina, Bolívia e Peru (GASCON, 2010). Países da Ásia e Oceania também registraram casos da doença entre a população imigrante, no Japão o número de infectados chega a 3.000, enquanto na Austrália fica acima dos 1.500 (COURA, 2010; SCHMUNIS, 2007a; SCHMUNIS, 2007b).

A doença é considerada endêmica em 22 países do continente americano, incluindo Brasil, e inicialmente restrita às regiões rurais pobres, passou a fazer parte também da população urbana com a crescente urbanização a partir da década de 40 (COURA, 2010). Estima-se que 10-15 milhões de pessoas estejam infectadas na América Latina, sendo que desse número 2-3 milhões estão no Brasil, e que 25 milhões ainda estejam em risco de contaminação (DIAS, 2008a; WHO, 2002). Apesar de o Brasil possuir uma baixa prevalência da doença (1%) quando comparado a outros países da América Latina, como Bolívia (6,8%), Argentina (4,1%) e El Salvador (3,4%), ele abriga junto ao México e Argentina, cerca de 60% da população latino americana infectada (RASSI, 2010a). Na América Latina, o número de óbitos pela doença é de cerca de 14000 por ano, sendo 43% desse valor, cerca de 6000

mortes, apenas no Brasil (MARTINS-MELO *et al.*, 2012; SCHMUNIS, 2007a). Portanto, além de um grave problema de saúde pública, a doença apresenta ainda um severo aspecto socioeconômico (PAHO, 2009).

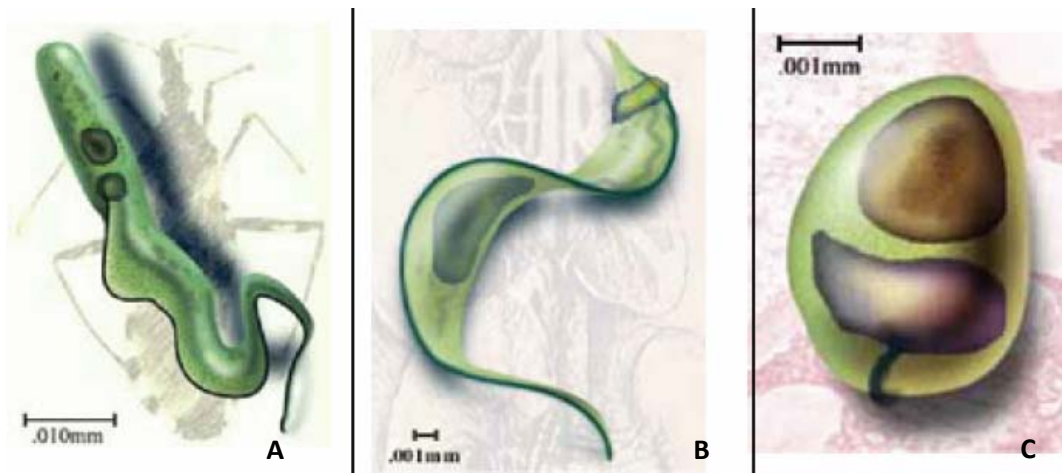
1.2 CICLO BIOLÓGICO

T. cruzi possui um complexo ciclo biológico com diferentes formas alternando entre o hospedeiro vertebrado e o invertebrado. O parasito tem como hospedeiro invertebrado, e transmissor da doença, insetos hematófagos do filo Arthropoda, subfilo Hexapoda, ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae. Das cerca de 140 espécies de triatomíneos já identificadas, apenas algumas são vetores para o parasito, *Triatoma infestans*, *T. dimidiata*, *Panstrongylus megitus*, *Rhodnius prolixus* e *T. barberi* são os principais transmissores da doença nas regiões endêmicas, enquanto *T. gerstaeckeri* é considerado o principal vetor do parasito nos EUA (BERN *et al.*, 2011; GORLA, 2010).

Além dos humanos, mais de 150 mamíferos domésticos e selvagens já foram identificados como hospedeiros vertebrados para o parasito. Entre os animais selvagens, marsupiais, roedores, morcegos, macacos e raposas são as principais fontes do parasito para o triatomíneo, entretanto, animais domésticos, como cães e gatos também atuam como reservatórios no ciclo urbano da doença (WHO, 2002). A importância da doença de Chagas estende-se também para o campo veterinário, já que o parasito pode infectar animais de importância econômica, como porcos, cabras, ovelhas, coelhos e gado. Aves e répteis, entretanto, são refratários ao parasito e não atuam como reservatórios (HABERLAND, 2013).

Durante o seu ciclo biológico o parasito apresenta três formas evolutivas definidas (Figura 1), e diversas formas intermediárias definidas pela posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e pelo local de onde emerge o flagelo (TEIXEIRA *et al.*, 2012; VÁSQUEZ, 2007). As formas replicativas no hospedeiro vertebrado são chamadas de amastigotas, possuem forma arredondada ou ovóide e um flagelo não exteriorizado. As formas epimastigotas representam o estágio replicativo no inseto vetor, medem de 20 a 40 µm de comprimento e seu cinetoplasto está localizado anteriormente em relação ao núcleo. As formas infectivas não replicativas são chamadas de tripomastigotas, permanecem na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado ou no reto do inseto vetor, medem cerca de 25 µm de comprimento, seu cinetoplasto localiza-se posterior ao núcleo e seu flagelo percorre todo o corpo formando uma membrana ondulante, principal característica de sua morfologia (DE SOUZA, 2002; TYLER; ENGMAN, 2001).

Figura 1 - Formas evolutivas do *T. cruzi*. Epimastigota (A), tripomastigota (B) e amastigota (C).

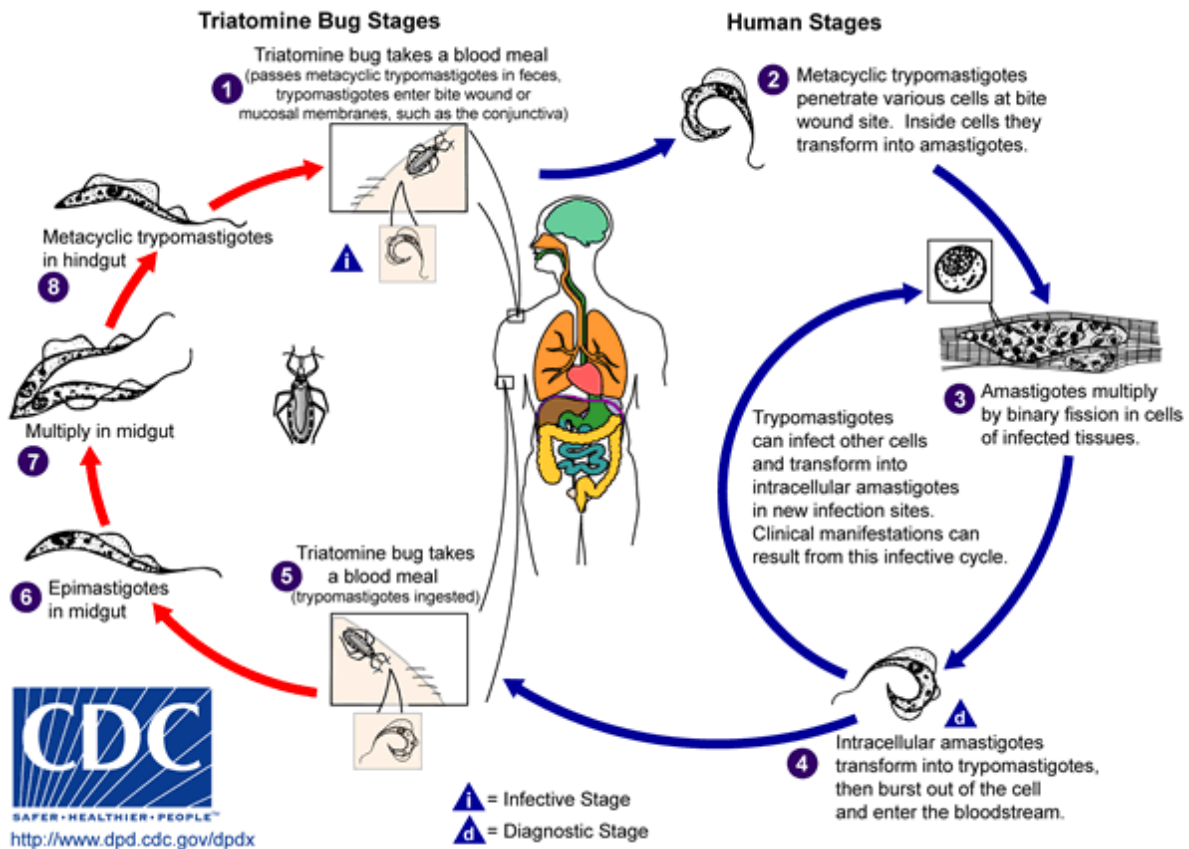


Fonte: MUÑOZ-SARAVIA *et al.*, (2012).

O ciclo de transmissão de *T. cruzi* (Figura 2) tem início quando o inseto vetor, ao alimentar-se de um hospedeiro vertebrado infectado, ingere as formas infectivas tripomastigotas de corrente sanguínea. Essas formas migram para a parte inicial do trato digestório do inseto onde se diferenciam em esferomastigotas ou nas formas replicativas epimastigotas, e se multiplicam por fissão binária. As formas epimastigotas, então, migram para a porção posterior do intestino do inseto onde se aderem ao epitélio intestinal via hemidesmossomos (ZELEDON, 1997). Essa etapa é fundamental para a metaciclogênese, o processo de diferenciação para as formas tripomastigotas metacíclicas infectantes (GOLDENBERG *et al.*, 1985). Essas formas, altamente infectantes para o hospedeiro vertebrado, permanecem no reto do inseto até serem eliminadas juntamente com as fezes e urina (GIDDINGS *et al.*, 2006).

As formas infectantes metacíclicas podem infectar o hospedeiro via lesão no local do repasto ou via penetração das mucosas. Após a penetração no tecido hospedeiro, as formas tripomastigotas encontram-se aptas para o ataque das células do sistema imune, e por isso devem invadir células fagocíticas e não-fagocíticas locais, como macrófagos, células do músculo estriado e fibroblastos, onde irão se multiplicar (GIDDINGS *et al.*, 2006). Os parasitos são internalizados em um vacúolo parasitóforo, formado da fusão dos lisossomos com a membrana plasmática celular, de onde eventualmente são liberados no citoplasma e diferenciam-se nas formas replicativas amastigotas. Essas formas replicam-se por divisão binária e diferenciam-se novamente em tripomastigotas circulantes liberados com o rompimento da célula (DVORAK; HYDE, 1973).

Figura 2 - Ciclo evolutivo do *T. cruzi*



Fonte: CDC, (2010)

Duas formas morfológicamente distintas de tripomastigotas podem ser observadas na corrente sanguínea, uma mais larga (“broad form”) e outra mais fina (“slender form”). A predominância dessas formas pode variar conforme a cepa do parasito, mas acredita-se que a primeira seja responsável principalmente pela infecção do inseto, enquanto a segunda infecta principalmente as células do hospedeiro vertebrado. As formas tripomastigotas podem infectar células vizinhas ou atingirem a corrente sanguínea e o sistema linfático, disseminando-se para outros órgãos e infectando diferentes tipos celulares, ou serem ingeridas pelo triatomíneo, dando início novamente ao ciclo (BRENER, 1973; RASSI, 2010a).

1.3 FORMAS DE TRANSMISSÃO

A doença de Chagas é transmitida a humanos e diversas espécies de animais domésticos e mamíferos selvagens, principalmente, pela via vetorial, por meio de insetos

hematófagos. No Brasil, com o controle na eliminação dos vetores em áreas endêmicas, este tipo de transmissão foi consideravelmente reduzido (DIAS *et al.*, 2011).

Outros meios de transmissão a seres humanos são os denominados mecanismos não vetoriais, através de transfusões sanguíneas, transmissão congênita, doação de órgãos e transmissão oral (BERN *et al.*, 2011). Raramente, a transmissão de *T. cruzi* pode ocorrer em acidentes laboratoriais a pessoas que trabalham com parasitos vivos (RASSI JR *et al.*, 2012).

Em caso de transfusão sanguínea, o risco de transmissão de *T. cruzi* por unidade de sangue infectado é cerca de 10 a 25% (BERN *et al.*, 2008). Em 1991, nos países da América Latina, essa faixa de valores elevou-se a 1-60% (SCHMUNIS, 1991). Desde então, esse número sofreu uma queda significativa, e a doação de sangue tornou-se um importante suporte a iniciativas de controle da doença de Chagas (PAHO, 2009; SCHMUNIS; CRUZ, 2005).

Entre um e dez por cento dos recém-nascidos de mães infectadas adquirem a doença de Chagas congênita (BASOMBRIIO *et al.*, 1999; AZOGUE; DARRAS, 1991). Essa transmissão pode ocorrer com mulheres também congenitamente infectadas, propagando a doença na ausência de um vetor (SCHENONE *et al.*, 2001). Dentre os fatores que intensificam o risco de infecção congênita estão: nível de parasitemia materno elevado, resposta imune menos acentuada, baixa idade materna, portadores de HIV e cepa do parasito (FREILIJ; ALTICHEH, 1995; TORRICO *et al.*, 2004).

Pacientes não infectados ao receberem órgão de um doador infectado por *T. cruzi* podem desenvolver a forma aguda da doença, porém, o risco de transmissão não é absoluto (BERN *et al.*, 2008). Em um estudo realizado por Riarte *et al.*, (1999), dentre 16 transplantes de rim realizados, apenas 3 receptores foram infectados (aproximadamente 19%). Entretanto, pressupõe-se que a chance de transmissão em transplantes de coração é superior às de rim e fígado (CHIN-HONG *et al.*, 2011).

Atualmente, a via oral representa a principal rota de transmissão da doença de Chagas aguda para humanos e animais, principalmente na região Amazônica (NATTAN-LARRIER, 1921). Surtos devido a esse mecanismo foram registrados em zonas rurais e perímetros urbanos não endêmicos da América do Sul (SHINAKAI-YASUDA; CARVALHO, 2012). No caso do Brasil, epidemias ocorrem em virtude de alimentos, açaí e demais frutas, caldo de cana e água contaminados (DIAS *et al.*, 2008b; STEINDEL *et al.*, 2008). Já em países como Colômbia e Venezuela, os surtos se devem, principalmente, a frutas infestadas, como laranja e tangerina (HERNANDEZ *et al.*, 2009; NOYA *et al.*, 2010).

1.4 FASES DA DOENÇA

A evolução da doença de Chagas depende da interação parasito-hospedeiro e da resposta imunológica desse hospedeiro. Assim, características, como, cepa e virulência do parasito, idade, perfil genético e imunidade do hospedeiro são cruciais para o desenvolvimento da doença. (ANDRADE *et al.*, 2006; MARCON *et al.*, 2011; ZINGALES *et al.*, 2009).

A doença de Chagas desenvolve-se em duas fases: aguda e crônica. A fase aguda da doença tem duração de 4-8 semanas e ocorre paralelamente à multiplicação dos parasitos em células fagocíticas e nucleares do hospedeiro, e é caracterizada pela alta parasitemia sanguínea e tecidual (ANDRADE; ANDREWS, 2005; DIAS, 1984). Essa fase é, na maioria das vezes, assintomática, podendo gerar sintomas leves como febre, mal estar geral e linfadenopatia 1-2 semanas após a infecção (RASSI JR *et al.*, 2010). Em alguns casos, sobretudo em crianças e pacientes imunosuprimidos, podem ocorrer sintomas mais graves, como hepatoesplenomegalia, miocardite e meningoencefalite (ANDRADE; ANDREWS, 2005). Alguns pacientes podem apresentar, também, sinais de porta de entrada da infecção do tipo ocular (sinal de Romaña) ou cutâneo (chagoma de inoculação), com inflamação e inchaço no local da inoculação (ROMAÑA, 1935). Nessa fase, a taxa de morte varia entre 5-10% entre os pacientes sintomáticos, e ocorre, geralmente, nos casos em que há o desenvolvimento de sintomas mais graves (RASSI JR *et al.*, 2010).

Com o desenvolvimento da resposta imune, a concentração e o número de parasitos nos tecidos diminuem, sinalizando o fim da fase aguda. Entretanto, não há eliminação completa do parasito, que pode ser encontrado em tecidos específicos ao longo de toda a vida do hospedeiro (RASSI JR *et al.*, 2012).

A fase crônica da doença de Chagas inicia-se cerca de 8 a 12 semanas após a infecção e resulta da incapacidade do sistema imune em controlar a infecção e o nível de parasitos durante a fase aguda. Apesar da ausência de parasitemia sanguínea, pacientes nessa fase da doença podem transmitir o parasito para o vetor invertebrado e diretamente para humanos através de doação sanguínea, de órgãos ou congênitalmente (MAGUIRE, 2004; WHO, 2002).

Cerca de 70% dos infectados que chegam à fase crônica não desenvolvem sintomas clínicos, sendo diagnosticados apenas pela positividade sorológica. Esses pacientes caracterizam a forma crônica indeterminada da doença, que poderá permanecer durante toda a vida (RASSI JR *et al.*, 2010b). Entretanto, esse estágio assintomático poderá ser interrompido

por episódios com características da doença aguda em alguns pacientes, principalmente imunossuprimidos, como portadores de HIV (PRATA, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2006a).

Dos pacientes cronicamente infectados, cerca de 30% se tornarão sintomáticos 10 a 30 anos após a infecção, progredindo para décadas de sintomas clínicos cardíacos e gastrointestinais graves (RASSI JR *et al.*, 2010b).

A forma cardíaca é a manifestação mais comum e frequente durante a fase crônica. Ela se desenvolve em 10 a 20% dos pacientes, e é caracterizada por um processo inflamatório crônico que se estabelece em todo o tecido cardíaco (MARIN-NETO *et al.*, 2007; RASSI JR *et al.*, 2010b). O principal sintoma é a cardiomiopatia, chamada também de Cardiomiopatia Chagásica Crônica, que leva à insuficiência cardíaca crônica devido à dilatação das paredes do coração. Cerca de 60% dos pacientes morrem devido à cardiomiopatia, que pode resultar na morte em apenas 5 anos após a identificação das primeiras falhas cardíacas (HABERLAND *et al.*, 2013; TEIXEIRA *et al.*, 2006b).

A doença gastrointestinal é mais rara que a cardíaca, atingindo cerca de 10-15% dos pacientes crônicos. Ela é caracterizada por alterações nas funções motoras, secretórias e absorptivas do sistema gastrointestinal, levando ao desenvolvimento de megaesôfago e megacólon (RASSI *et al.*, 2010b). No megaesôfago ocorrem sintomas como aumento da salivagem, regurgitação e soluço. Enquanto no megacólon o principal sintoma é a constipação, produzindo dilatação e comprometendo as funções do cólon, e podendo levar a oclusão intestinal, fecalomas e ulceração (TEIXEIRA *et al.*, 2006b).

A forma digestiva parece se desenvolver apenas ao sul da bacia Amazônica, sendo rara ao norte da América do Sul e na América Central. Essa distribuição geográfica se deve, principalmente, a diferenças entre cepas predominantes em cada região (CAMPBELL *et al.*, 2004; MILES *et al.*, 2003).

1.5 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

O principal método de diagnóstico da doença aguda é a detecção de formas tripomastigotas no sangue periférico, inclusive em recém-nascidos com suspeita de doença congênita. O teste sorológico não é recomendado no diagnóstico da doença aguda, a detecção de IgM, apesar de utilizável, não está amplamente disponível e completamente padronizada (KIRCHHOFF; RASSI, 2011).

Em recém-nascidos, caso o teste de detecção do parasito seja negativo ou não seja realizado nos primeiros meses de vida, deverá ser feita a procura por anticorpos IgG anti-*T.*

cruzi entre os 6 e 9 meses de vida, quando não estarão mais presentes os anticorpos maternos (GOMES; LORE, LUQUETTI, 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Durante a fase crônica, devido à baixa parasitemia sanguínea, o diagnóstico deve ser realizado através da detecção de anticorpos IgG por, pelos menos, dois métodos sorológicos diferentes, usualmente ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*), imunofluorescência indireta ou hemaglutinação indireta (RASSI JR; RASSI; REZENDE, 2012).

Técnicas moleculares, como, por exemplo, a reação em cadeia da polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*), apresentam maior sensibilidade em relação às técnicas sorológicas. Entretanto, devido à falta de padronização e risco de contaminação do DNA, essa técnica é indicada somente para a confirmação de casos inconclusivos e na monitoração de tratamentos (BRITTO, 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Para o tratamento da Doença de Chagas, apenas dois medicamentos, Nifurtimox e Benzonidazol, estão disponíveis atualmente (PARKER; SETHI, 2011). O objetivo da terapêutica consiste em erradicar o parasito e reduzir os sintomas da doença, já que não há vacina ou tratamento quimioterápico eficiente para a cura da doença na fase crônica (RASSI JR. *et al.*, 2010).

Quando utilizados durante a fase aguda, devido à sua ação tripanocida contra todas as formas do parasito, o tratamento com esses fármacos reduz a parasitemia, diminuindo os sintomas e a gravidade da doença. As taxas de cura, caso a quimioterapia seja corretamente aplicada, podem chegar a 81% (COURA *et al.*, 2002).

Quando utilizados durante a fase crônica, a eficácia do tratamento se mostra reduzida, resultando muitas vezes em falência, principalmente devido à resistência de algumas cepas. Além disso, o elevado número de efeitos colaterais pode levar à desistência do tratamento pelo paciente, resultando em agravamento da doença (FILARDI; BRENER, 1987).

1.6 EXPRESSÃO GÊNICA

O genoma do *T. cruzi* é organizado em 41 cromossomos com um total de 61Mb (EL-SAYED *et al.*, 2005a; KRAMER, 2012; WEATHERLY *et al.*, 2009). Os genes codificantes para proteínas estão organizados em grandes unidades policistrônicas bidirecionais, sob controle de apenas uma região promotora, localizada nas chamadas “strand switch regions”, e sem promotores típicos para a RNA polimerase II (EL-SAYED, 2005b; MARTINEZ-CALVILLO, 2003).

Genes co-transcritos em uma única unidade policistrônica, em geral, não são relacionados e não possuem funções em comum, sendo necessário que sejam processados em RNAm (RNA mensageiro) monocistrônicos maduros e funcionais (HAILE *et al.*, 2003).

O processamento do RNAm policistrônico ocorre no núcleo da célula através de dois eventos simultâneos, coordenados pelo mesmo trato de polipirimidina rico em uridina, denominados *trans*-splicing e poliadenilação. No *trans*-splicing, uma pequena sequência de 39 nucleotídeos, chamada de sequência líder (*Spliced Leader* RNA - sLRNA) ou mini-exon, é adicionada à extremidade 5' do RNAm em um sítio acceptor composto de dinucleotídeo AG à jusante ao trato de polipirimidina. Na poliadenilação, dependente do *splicing* à jusante, há a adição de aproximadamente 30 nucleotídeos adenina na extremidade 3' da fita de RNA, 100 a 300 nucleotídeos à montante do sítio de *trans*-splicing. (BENZ, 2005; LIANG, 2003).

A adaptação a ambientes distintos, inseto vetor e mamífero, com diferentes temperaturas, nutrientes, níveis de oxigenação e mecanismos de defesa faz com que o parasito necessite de grandes mudanças em sua expressão gênica. Entretanto, a organização policistrônica de genes de funções não similares e a falta de fatores de transcrição e promotores para RNA polimerase II, indica que a transcrição nesses parasitos ocorre de forma contínua e sem regulação transcricional. Portanto, os mecanismos envolvidos na regulação da expressão gênica nesses tripanossomatídeos parecem ser distintos daqueles comumente encontrados em eucariotos superiores, ocorrendo, na maior parte, em nível pós-transcricional (CLAYTON, 2002; HAILE, 2007).

O *trans*-splicing seria a primeira etapa sujeita à regulação pós-transcricional via modulação da sua eficiência, seguido do transporte da molécula para o citoplasma e o *turnover* do RNAm (CLAYTON, 2002; D'ORSO *et al.*, 2003). Entretanto, estudos mostram que os dois principais métodos de controle dos níveis de RNAm do parasito são a estabilidade da molécula e o controle da tradução (CLAYTON, 2002; D'ORSO *et al.*, 2003).

A abundância de RNAm no citoplasma é determinada, não somente pela taxa de processamento e síntese, como também pela sua taxa de degradação (FADDA, 2013). Existem três vias principais para o início da degradação da molécula de RNAm: degradação da cauda poli(A), perda do *cap* na extremidade 5' e digestão via endonucleases (CHEN; SHYU, 2011; LI; KILEDJIAN, 2011). Em células eucarióticas de leveduras e mamíferos, a degradação é iniciada principalmente pela deadenilação da cauda poli(A) por deadenilases (CLAYTON; SHAPIRA, 2007). O encurtamento para menos de 20 nucleotídeos leva ao desligamento de proteínas de ligação, seguido da perda do *cap* na extremidade 5' e consequente degradação do RNAm (CHEN; SHYU, 2011). A perda da cauda poli(A) leva à

degradação da molécula de RNAm via 5'-exonucleases citoplasmáticas ou via um complexo de 3'-exonucleases, denominado exossoma (BUTTLER, 2002).

1.7 EXOSSOMA

O exossoma é um complexo multiprotéico com capacidade de degradação 3'→5' de diferentes tipos de RNA, e com múltiplas funções na célula. Ele tem influência na meia vida do RNAm, tanto a partir da sua degradação quanto do seu processamento. No núcleo, o complexo atua também na maturação de diferentes RNAs, como RNA ribossomal (RNAr), pequenos RNAs nucleares (RNAsn) e pequenos RNAs nucleolares (RNAsno), na degradação de RNAs não codificantes ou RNAs defeituosos, limitando ou impedindo sua exportação para o citoplasma, atuando, assim, como um sistema de controle de qualidade. Já no citoplasma, o exossoma atua no *turnover* do RNA, na degradação de transcritos clivados por RNAi (RNA de interferência), além de impedir a tradução de moléculas de RNAm defeituosas, sendo, portanto, essenciais para a viabilidade da célula (LIKKE-ANDERSEN, 2011).

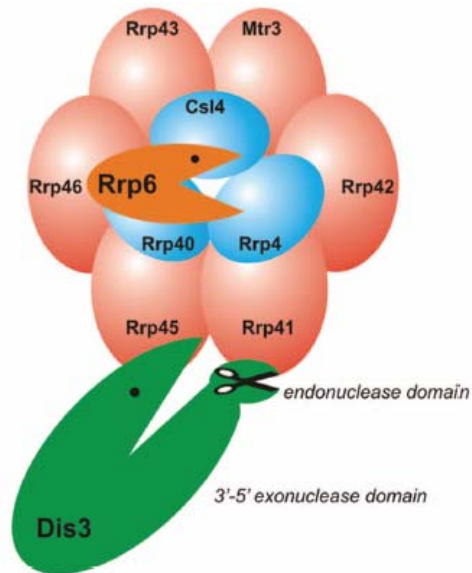
O exossoma foi descrito pela primeira vez por Mitchell e col. (1997) durante o estudo do processamento da subunidade 5.8S do rRNA de *Saccharomyces cerevisiae*. Eles identificaram que cepas mutantes para a proteína Rrp4 produziam RNAs com extremidades 3' de diferentes extensões, indicando uma atividade exoribonucleotídica 3' → 5' dessa proteína. A partir de então, após inúmeros estudos sobre a organização desse complexo, o exossoma dessa levedura tornou-se o modelo para o estudo dessa estrutura em outros eucariotos.

O exossoma eucarioto é um complexo de 300-400 kDa presente tanto no núcleo quanto no citoplasma. Ele é formado de nove subunidades em forma de um anel hexamérico (Figura 3), composto pelas proteínas Rrp41, Rrp42, Rrp43, Rrp45, Rrp46 e Mtr3, e de um canal central trimérico composto pelas subunidades Rrp4, Rrp40 e Cls4. Essas últimas possuem regiões de ligação ao RNA dos tipos S1 e KH. O anel central do exossoma, apesar de similar às RNase bacterianas, não possui atividade catalítica de ribonuclease, que permanece em proteínas acessórias ligadas ao complexo, e sua principal função é a apresentação do RNA para as subunidades catalíticas e a interação entre essas subunidades e as proteínas de degradação (BONNEAU, 2009; DZIEMBOWSKI *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2006).

A atividade catalítica do complexo permanece em duas subunidades acessórias, Rrp6 e Rrp44 (também chamada de Disp3), ligadas ao anel hexamérico. Rrp6 está estruturalmente ligada ao anel central e possui atividade de RNase D (ALLMANG *et al.*, 1999). Entretanto, a

principal atividade de exoribonuclease reside na subunidade Rrp44, que se liga ao anel principal formando um complexo de 10 proteínas (DZIEMBOWSKI *et al.*, 2007).

Figura 3 - Estrutura do exossoma eucariótico.



Fonte: LYKKE-ANDERSEN *et al.*, (2009).

A subunidade Rrp44 possui cerca de 110 kDa, apresenta um domínio PIN com atividade endonucleotídica em sua região N-terminal, e uma região C-terminal homóloga à RNase II de *E. coli*, com um domínio hidrolítico central de atividade exoribonucleotídica 3' → 5'. Ela permanece ligada à extremidade do anel hexamérico diretamente à subunidade Rrp45 através do seu domínio PIN e à Rrp41 pela região C-terminal. Sua atividade depende da correta ligação ao complexo e passagem do RNA pelo anel central, sendo que apenas moléculas simples fita maiores que 31-33 nucleotídeos estão sujeitas à degradação pela enzima (BONNEAU *et al.*, 2009; LEBRETON *et al.*, 2008; SCHAEFFER *et al.*, 2009; SHNEIDER *et al.*, 2009).

Apesar do anel hexamérico e o canal central serem comuns a todos os eucariotos, a composição das subunidades catalíticas pode variar em relação ao núcleo e citoplasma em diferentes espécies. Em leveduras, por exemplo, a subunidade Rrp6 está presente apenas no núcleo, enquanto a Rrp44 está localizada em ambos, já em humanos, ambas fazem parte tanto do complexo citoplasmático quanto nuclear (LORENTZEN *et al.*, 2008; MITCHELL *et al.*, 1997).

Em tripanosomatídios, o principal estudo sobre a presença e função do exossoma foi feito por Estévez e col. (2001), onde foi realizada a análise de sequências homólogas entre *S. cerevisiae* e *Trypanosoma brucei*, a localização das subunidades e a avaliação da sua atividade enzimática. Nesse estudo, os autores verificaram que a proteína nesse parasito, assim como em leveduras, possui cerca de 110 kDa, está presente em níveis semelhantes em todos os estágios do parasito (sanguínea e procíclica), e encontra-se tanto no citoplasma quanto no núcleo da célula. Entretanto, a proteína não pôde ser purificada a partir do complexo citosólico ou nuclear do exossoma, mostrando que ela encontra-se de forma monomérica nesse parasito.

1.8 ORIGEM DO CLONE RRP44

Durante o doutorado da Prof^a. Dra. Lucy M. Y. Lioni, realizado na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Universidade de São Paulo), foi avaliada e caracterizada a interação da quimiocina CCL2 murina nas diferentes formas de *T. cruzi*.

CCL2 é uma quimiocina pertencente à família de quimiocinas CC, também conhecida como proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) produzida por células endoteliais, células do músculo liso e macrófagos, e descrita em humanos e seu homólogo JE em camundongos (DESHMANE *et al.*, 2009). Em 1998, Aliberti realizou um estudo experimental utilizando camundongos no pico da parasitemia, que após receberem um estímulo quimiotático através do inóculo de CCL2 em uma cavidade artificial estéril criada pela injeção de ar, notou-se o acúmulo de formas amastigotas de *T. cruzi* no local. Mais tarde, verificou-se que este acúmulo resultou da ação direta das quimiocinas nas formas tripomastigotas circulantes, levando à mudança morfológica do parasita.

Portanto, com o objetivo de isolar genes que codificariam o suposto ligante de CCL2 nesses parasitos, foi construída uma biblioteca de cDNA de formas tripomastigotas de *T. cruzi*, utilizando-se como sonda um fragmento do gene receptor de quimiocina CCR2. Dentre os clones isolados, encontrava-se o clone *TcRrp44*. Inicialmente não se sabia por que este gene havia sido isolado, uma vez que não possui homologia com os genes de receptores de quimiocinas. Foi realizado, então, o alinhamento entre as sequências do clone e da sonda utilizada, no programa ClustalW, e o resultado indicou que o isolamento não foi ao acaso, existindo cerca de 46% de alinhamento, o que talvez seja o suficiente para que se justifique o isolamento deste clone de uma biblioteca de genes por rastreamento com sondas radioativas.

Este clone foi parcialmente sequenciado e analisado pela similaridade com outros genes depositados no banco de dados GenBank, e verificou-se que ele ainda não havia sido descrito em *T. cruzi*, mas que possuía 80% de similaridade com a proteína Rrp44p do exossoma de *T. brucei*. Como já citado anteriormente, as enzimas que compõem o exossoma possuem sequências altamente conservadas entre os eucariotos, portanto, acredita-se que a região estudada codifica para, pelo menos, parte dessa subunidade em *T. cruzi*. Portanto, devido a ausência de estudos sobre o exossoma de *T. cruzi* e a sua composição, decidiu-se por realizar a caracterização molecular e estudar a localização desta proteína nesse parasito.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral desse trabalho foi analisar e caracterizar o gene *Tc16* codificante para a subunidade Rrp44p do exossoma de *T. cruzi*, tendo, portanto, como objetivos específicos:

- Expressão do gene *TcRrp44* de *Trypanosoma cruzi* no vetor pGEX-3x.
- Expressão do clone *Tc16* para a produção e purificação de proteínas recombinantes em *Escherichia coli*.
- Produção de anticorpos policlonais anti-proteína recombinante em camundongos
- Análise da reatividade do soro com extratos totais de proteínas de formas tripomastigotas de *T. cruzi*.
- Imunolocalização da proteína nas diferentes formas dos parasitos através de imunofluorescência.
- Caracterização do gene por ensaios de *Northern blot* e *Southern blot*.

REFERÊNCIAS

- ALIBERTI, J.C.S. (1998). O envolvimento de quimiocinas e de fator ativador de plaquetas (PAF) na resistência e na patogênese da infecção experimental por *Trypanosoma cruzi* em Camundongos. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Ribeirão Preto.
- ALLMANG, C. et al. The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3' → 5' exonucleases. **Genes Dev**, v. 13, n. 16, p. 2148-58, Aug 1999.
- 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.
- AZOGUE, E.; DARRAS, C. Prospective study of Chagas disease in newborn children with placental infection caused by *Trypanosoma cruzi* (Santa Cruz-Bolivia). **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 24, n. 2, p. 105-9, 1991 Apr-Jun 1991.
- BASOMBRÍO, M. A. et al. [The transmission de Chagas disease in Salta and the detection of congenital cases]. **Medicina (B Aires)**, v. 59 Suppl 2, p. 143-6, 1999.
- BENZ, C. et al. Messenger RNA processing sites in *Trypanosoma brucei*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 143, n. 2, p. 125-34, Oct 2005.
- BERN, C.; MONTGOMERY, S. P. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. **Clin Infect Dis**, v. 49, n. 5, p. e52-4, Sep 2009.
- BERN, C. et al. Chagas disease and the US blood supply. **Curr Opin Infect Dis**, v. 21, n. 5, p. 476-82, Oct 2008.
- BERN, C. et al. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. **Clin Microbiol Rev**, v. 24, n. 4, p. 655-81, Oct 2011.
- BONNEAU, F. et al. The yeast exosome functions as a macromolecular cage to channel RNA substrates for degradation. **Cell**, v. 139, n. 3, p. 547-59, Oct 2009.
- BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annu Rev Microbiol**, v. 27, p. 347-82, 1973.
- BRITTO, C. C. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 122-35, Jul 2009.
- BUTLER, J. S. The yin and yang of the exosome. **Trends Cell Biol**, v. 12, n. 2, p. 90-6, Feb 2002.
- CAMPBELL, D. A.; WESTENBERGER, S. J.; STURM, N. R. The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. **Curr Mol Med**, v. 4, n. 6, p. 549-62, Sep 2004.
- CHAGAS, C. Nova tripanossomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909.

CHEN, C. Y.; SHYU, A. B. Mechanisms of deadenylation-dependent decay. **Wiley Interdiscip Rev RNA**, v. 2, n. 2, p. 167-83, 2011 Mar-Apr 2011.

CHIN-HONG, P. V. et al. Screening and treatment of chagas disease in organ transplant recipients in the United States: recommendations from the chagas in transplant working group. **Am J Transplant**, v. 11, n. 4, p. 672-80, Apr 2011.

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

CLAYTON, C.; SHAPIRA, M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. **Mol Biochem Parasitol**, v. 156, n. 2, p. 93-101, Dec 2007.

COMMITTEE, W. E. Control of Chagas disease. **World Health Organ Tech Rep Ser**, v. 905, p. i-vi, 1-109, back cover, 2002.

COURA, J. R. et al. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. **Trends Parasitol**, v. 18, n. 4, p. 171-6, Apr 2002.

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

D'ORSO, I.; DE GAUDENZI, J. G.; FRASCH, A. C. RNA-binding proteins and mRNA turnover in trypanosomes. **Trends Parasitol**, v. 19, n. 4, p. 151-5, Apr 2003.

DE SOUZA, W. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. **Kinetoplastid Biol Dis**, v. 1, n. 1, p. 3, May 2002.

DESHMANE, S. L. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. **J Interferon Cytokine Res**, v. 29, n. 6, p. 313-26, Jun 2009.

DIAS, J.C.P. Acute Chagas' disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.79, p.85-9, 1984.

DIAS, J. C.; PRATA, A.; CORREIA, D. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41, n. 2, p. 193-6, 2008a.

DIAS, J. P. et al. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41, n. 3, p. 296-300, 2008 May-Jun 2008b.

DIAS, J. C.; AMATO NETO, V.; LUNA, E. J. [Alternative transmission mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in Brazil and proposals for their prevention]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, n. 3, p. 375-9, 2011 May-Jun 2011.

DVORAK, J. A.; HYDE, T. P. *Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells in vitro. 1. Individual interactions at the cellular and subcellular levels. **Exp Parasitol**, v. 34, n. 2, p. 268-83, Oct 1973.

DZIEMBOWSKI, A. et al. A single subunit, Dis3, is essentially responsible for yeast exosome core activity. **Nat Struct Mol Biol**, v. 14, n. 1, p. 15-22, Jan 2007.

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 2005a.

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

ESTÉVEZ, A. M.; KEMPF, T.; CLAYTON, C. The exosome of *Trypanosoma brucei*. **EMBO J**, v. 20, n. 14, p. 3831-9, Jul 2001.

FADDA, A. et al. The roles of 3'-exoribonucleases and the exosome in trypanosome mRNA degradation. **RNA**, v. 19, n. 7, p. 937-47, Jul 2013.

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 81, n. 5, p. 755-9, 1987.

FREILIJ, H.; ALTSCHEH, J. Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects. **Clin Infect Dis**, v. 21, n. 3, p. 551-5, Sep 1995.

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, 2010 Jul-Aug 2010.

GIDDINGS, O. K. et al. Anatomical route of invasion and protective mucosal immunity in *Trypanosoma cruzi* conjunctival infection. **Infect Immun**, v. 74, n. 10, p. 5549-60, Oct 2006.

GOLDENBERG, S.; CONTRERAS, V. T.; SALLES, J. M.; BONALDO, M. C.; LIMA FRANCO, M. P. A.; LINSS, J.; LAFAILLE, J.; VALLE, D.; MOREL, C. M. Facts and hypothesis on *Trypanosoma cruzi* differentiation. **Mem do Inst Oswaldo Cruz**, v.79, p.39-44, 1985.

GOMES, Y. M.; LORENA, V. M.; LUQUETTI, A. O. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 115-21, Jul 2009.

GORLA, D.; NOIREAU, F. Geographic distribution of *Triatominae* vectors in America. In: TELLERIA, J.; TIBAYRENC, M. **American trypanosomiasis (Chagas disease). One hundred years of research**. 1^a ed. Burlington: Elsevier, 2010, p. 209-31.

HABERLAND, A. et al. Chronic Chagas disease: from basics to laboratory medicine. **Clin Chem Lab Med**, v. 51, n. 2, p. 271-94, Feb 2013.

HAILE, S.; ESTEVEZ, A. M.; CLAYTON, C. A role for the exosome in the in vivo degradation of unstable mRNAs. **RNA**, v. 9, n. 12, p. 1491-501, Dec 2003.

HAILE, S.; PAPADOPOULOU, B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. **Curr Opin Microbiol**, v. 10, n. 6, p. 569-77, Dec 2007.

HERNANDEZ, L.M.; RAMIREZ, A.N.; CUCUNUBÁ, Z.M.; ZAMBRANO, P. Brote de Chagas agudo en Lebrija, Santander 2008. **Rev Del Obser de Sal Púb de Santander**, v.1, p.28-36, 2009.

- KIRCHHOFF, L.V.; RASSI JR, A. Chagas' disease and trypanosomiasis. In: LONGO, D.L.; FAUCI, A.S.; KASPER, D.L. **Harrison's principles of internal medicine**. 18th edition. Nova York: McGraw-Hill, p.1716-21, 2011.
- KLEIN, N.; HURWITZ, I.; DURVASULA, R. Globalization of Chagas Disease: A Growing Concern in Nonendemic Countries. *Epidem. Res Internat.*, 2012.
- KRAMER, S. Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: the case of kinetoplastids. *Mol Biochem Parasitol*, v. 181, n. 2, p. 61-72, Feb 2012.
- LEBRETON, A. et al. Endonucleolytic RNA cleavage by a eukaryotic exosome. *Nature*, v. 456, n. 7224, p. 993-6, Dec 2008.
- LI, Y.; KILEDJIAN, M. Regulation of mRNA decapping. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, v. 1, n. 2, p. 253-65, 2010 Sep-Oct 2010.
- LIANG, X. H. et al. trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryot Cell*, v. 2, n. 5, p. 830-40, Oct 2003.
- LIU, Q.; GREIMANN, J. C.; LIMA, C. D. Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome. *Cell*, v. 127, n. 6, p. 1223-37, Dec 2006.
- LORENTZEN, E. et al. Structure of the active subunit of the yeast exosome core, Rrp44: diverse modes of substrate recruitment in the RNase II nuclease family. *Mol Cell*, v. 29, n. 6, p. 717-28, Mar 2008.
- LYKKE-ANDERSEN, S.; BRODERSEN, D. E.; JENSEN, T. H. Origins and activities of the eukaryotic exosome. *J Cell Sci*, v. 122, n. Pt 10, p. 1487-94, May 2009.
- LYKKE-ANDERSEN, S. et al. A. The eukaryotic RNA exosome. *RNA Biology*. v.8, p.61-66, 2011.
- MAGUIRE, J. H. Trypanosoma, In: Gorbach, S.; Bartlett, J.; Blacklow, N. **Infectious diseases**. 2nded. Lippincott: Williams & Wilkins, Philadelphia, p.2327-2334, 2004.
- MARCON, G. E. et al. Trypanosoma cruzi: parasite persistence in tissues in chronic chagasic Brazilian patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 106, n. 1, p. 85-91, Feb 2011.
- MARIN-NETO, J. A. et al. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*, v. 115, n. 9, p. 1109-23, Mar 2007.
- MARTINS-MELO, F. R. et al. Epidemiology of mortality related to Chagas' disease in Brazil, 1999-2007. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 6, n. 2, p. e1508, 2012.
- MARTÍNEZ-CALVILLO, S. et al. Transcription of Leishmania major Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol Cell*, v. 11, n. 5, p. 1291-9, May 2003.
- MILES, M. A.; FELICIANGELI, M. D.; DE ARIAS, A. R. American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *BMJ*, v. 326, n. 7404, p. 1444-8, Jun 2003.

MITCHELL, P. et al. The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 457-66, Nov 1997.

MUNOZ-SARAVIA, S.G.; HABERLAND, A.; WALLUKAT, G.; SCHIMKE, I. Chronic Chagas' heart disease: a disease on its way to becoming a worldwide health problem: epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine. **Heart Fail Ver**, v.17, p.45-64, 2012.

NATTAN-LARRIER, L. Infections à Trypanosomes et voies de penetrations des virus. **Bull de la Soc de Pat Exp**, v14, p537-42, 1921.

NOYA, B.A.; DIAZ-BELLO, Z.; COLMENARES, C. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. **J. Infect. Dis.** v.201, p.1308-15, 2010.

PAHO (2009). Pan American Health Organization. Em: www.paho.org.

PARKER, E. R.; SETHI, A. Chagas disease: coming to a place near you. **Dermatol Clin**, v. 29, n. 1, p. 53-62, Jan 2011.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infect Dis**, v. 1, n. 2, p. 92-100, Sep 2001.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infect Dis**, v.1, p.92-100, 2001.

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

RASSI, A.; REZENDE, J.M.; LUQUETTI, A.O. Clinical phases and forms of Chagas disease. In: TELLERIA, J.; TIBAYRENC, M. **American trypanosomiasis (Chagas disease). One hundred years of research**. 1ª ed. Burlington: Elsevier, p. 709-41, 2010b.

RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infect Dis Clin North Am**, v. 26, n. 2, p. 275-91, Jun 2012.

RIARTE, A. et al. Chagas' disease in patients with kidney transplants: 7 years of experience 1989-1996. **Clin Infect Dis**, v. 29, n. 3, p. 561-7, Sep 1999.

ROMAÑA, C. Acerca de un sintoma inicial de valor para el diagnostico de forma aguda de la enfermedad de Chagas. La conjuntivitis esquistripanósica unilateral. (Hipótesis sobre la puerta de entrada conjuntival de la enfermedad). **Miss de Estud de Pat Reg Arg (MEPRA)**, v.22, p.16-28, 1935.

SAÚDE, M. D. S. S. D. V. E. Brazilian Consensus on Chagas disease. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 38 Suppl 3, p. 7-29, 2005.

SCHAEFFER, D. et al. The exosome contains domains with specific endoribonuclease, exoribonuclease and cytoplasmic mRNA decay activities. **Nat Struct Mol Biol**, v. 16, n. 1, p. 56-62, Jan 2009.

SCHENONE, H. et al. Congenital Chagas disease of second generation in Santiago, Chile.

Report of two cases. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 43, n. 4, p. 231-2, 2001 Jul-Aug 2001.

SCHMUÑIS, G. A. Trypanosoma cruzi, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. **Transfusion**, v. 31, n. 6, p. 547-57, 1991 Jul-Aug 1991.

SCHMUNIS, G. A.; CRUZ, J. R. Safety of the blood supply in Latin America. **Clin Microbiol Rev**, v. 18, n. 1, p. 12-29, Jan 2005.

SCHMUNIS, G.A. The globalization of Chagas disease. ISBT Science Series. v.2, p.6-11, 2007a.

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

SCHNEIDER, C. et al. The N-terminal PIN domain of the exosome subunit Rrp44 harbors endonuclease activity and tethers Rrp44 to the yeast core exosome. **Nucleic Acids Res**, v. 37, n. 4, p. 1127-40, Mar 2009.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of Chagas disease. **Clin Infect Dis**, v. 54, n. 6, p. 845-52, Mar 2012.

STEINDEL, M. et al. Characterization of Trypanosoma cruzi isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 60, n. 1, p. 25-32, Jan 2008.

TEIXEIRA, A. R. et al. Chagas disease. **Postgrad Med J**, v. 82, n. 974, p. 788-98, Dec 2006a.

TEIXEIRA, A. R.; NASCIMENTO, R. J.; STURM, N. R. Evolution and pathology in chagas disease--a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 5, p. 463-91, Aug 2006b.

TEIXEIRA, S. M. et al. Trypanosomatid comparative genomics: Contributions to the study of parasite biology and different parasitic diseases. **Genet Mol Biol**, v. 35, n. 1, p. 1-17, Jan 2012.

TORRICO, F. et al. Maternal Trypanosoma cruzi infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. **Am J Trop Med Hyg**, v. 70, n. 2, p. 201-9, Feb 2004.

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

VAZQUEZ, M.P. The Genetics and Genomics of *Trypanosoma cruzi*. **Int. J of Biomed and Pharm Sci**, 2007.

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

YAMAUCHI, L.M. (2003). Avaliação da ligação de MCP-1/JE em *Trypanosoma cruzi* e análise molecular de genes que participam do processo de transcrição no parasita. **Tese de doutorado**. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Ribeirão Preto.

ZELEDON, R. Infection of the insect host by *Trypanosoma cruzi*. In: _____ **Atlas of Chaga's Disease Vectors in the Americas**. Editora Fiocruz. v.1, p.271-287, 1997.

ZINGALES, B., ANDRADE, S.G., BRIONES, M.R.S. *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.104, p.1051-1054, 2009.

4 ARTICLE

Expression and Characterization of the Subunit Rrp44 of *Trypanosoma cruzi* Exosome Complex

T. cruzi Rrp44 molecular characterization

Pollyana Myrella Capela dos Santos¹, Daniela Kian¹, Jackson Seiti Gundi², César Armando Contreras Lancheros¹, Mayara Fernandes Pereira da Silva², Gabriella Maria Andriani², Phileno Pinge Filho³, Márcia Regina Machado dos Santos⁴, José Franco da Silveira⁵, Sueli Fumie Yamada-Ogatta², João Santana da Silva⁶, Lucy Megumi Yamauchi^{2*}.

¹Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid s/n, km 380 PR445 Campus Universitário, Londrina, Paraná, 86057-970, Brazil.

²Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid s/n, km 380 PR445 Campus Universitário, Londrina, Paraná, 86057-970, Brazil.

³Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid s/n, km 380 PR445 Campus Universitário, Londrina, Paraná, 86057-970, Brazil.

⁴Universidade Bandeirante de São Paulo, Conselho de Pós-graduação e Pesquisa. Rua Maria Cândida, 1813, Vila Guilherme, São Paulo, SP, 02071-013, Brazil.

⁵Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Microbiologia Imunobiologia e Parasitologia. Rua Botucatu, 862. Vila Clementino, São Paulo, SP, 04023-062, Brazil.

⁶Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Parasitologia Microbiologia e Imunologia. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Imunologia, Ribeirão Preto, SP, 14049-900, Brazil.

*Corresponding author: Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid s/n, km 380 PR445 Campus Universitário, Londrina, Paraná, 86057-970, Brazil. Tel: +55-43-3371-5503; fax: +55-43-3371-4788. E-mail address: lionilmy@uel.br

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is an heteroxenous parasite with a complex life cycle involving vertebrate and invertebrate hosts. Due to its polycistronic genome organization, transcription in these parasites occurs continuously, with its gene expression regulation, almost entirely, at the post-transcriptional level. The exosome is a multiproteic complex with 3'→5' degradation ability of different types of RNA. Among the component of this complex, the subunit Rrp44 seems to display the main exoribonucleolytic and endonucleolytic activity. This subunit has already been intensively characterized in yeasts, humans and *Trypanosoma brucei*. Thus, in this work we describe the first study of this complex in *T. cruzi*. The gene *TcRrp44*, which showed 80% similarity with the subunit Rrp44 of *T. brucei*, was cloned, expressed and characterized. The serum against recombinant protein, obtained by immunization of mice, was used to react with protein extracts of *T. cruzi* and resulted in recognition of 110 kDa polypeptides in trypomastigotes forms. *TcRrp44* immunolocalization in epimastigotes and trypomastigotes forms showed a nuclear and cytosolic localization. The Northern blot analysis showed a transcript of the same size in all three forms of parasite, and the genomic organization analysis suggests a single or a few gene copies in the *T. cruzi* genome.

Key-words: *Trypanosoma cruzi*, Rrp44, Exosome

INTRODUCTION

Trypanosoma cruzi is the causative agent of Chagas disease, the most severe endemic parasitic disease of Latin America (Who 2002). It has an heteroxenic biologic cycle with different evolutive forms alternating between the vertebrate and the invertebrate host (Gorla 2010). During its cycle, the parasite presents four morphological forms, epimastigote and metacyclic trypomastigote, in the digestive tract of the insect, and amastigote and bloodstream trypomastigote, in the mammal tissues (Tyler and Engman, 2001).

The complexity of its biological cycle, the capacity to differentiate and adapt to the most distinct environments, with different temperatures, nutrients, oxygen levels and defense mechanisms, compel the parasite to require major changes and control of its gene expression (Clayton 2002).

The protein coding genes in these parasites are organized in large polycistronic units with no typical RNA polymerase II promoter, making necessary for the transcripts to be processed by two simultaneous and coordinated events, denominated *trans*-splicing and polyadenylation, in order to originate mature and functional monocistronic mRNA (Haile et al. 2003; Martinez-Calvillo 2003).

Transcription in these parasites occurs continuously and without any transcriptional control, indicating that the regulation of gene expression in these trypanosomatids occurs virtually all on the post-transcriptional level (Clayton 2002; Haile 2007). The mRNA molecule stability and the translation control seem to be the major pathways of this regulation process (Clayton, 2002).

On eukaryotic cells, the degradation of unstable, defected or non desired mRNAs initiate, mainly, by the loss of the poly (A) tail (Clayton and Shapira 2007), leading to the degradation of the molecule by cytoplasmatic 5'-exonucleases or via a complex of 3' exoribonucleases, named exosome (Buttler 2002). The exosome comprises a multiproteic complex with 3'→5' degradation activity of different sorts of RNA and multiple cell functions. The complex has approximately 300-400 kDa, localizes both in the nucleus and cytoplasm of the cell and consists of 11 subunits, nine structural proteins without any catalytic activity, and two accessories proteins with exoribonucleolytic activity (Lykke-andersen et al. 2011).

The main catalytic activity of the complex remains in the accessory subunit Rrp44. This subunit possesses a PIN domain with endonucleotidic activity on the N-terminal region, and a C-terminal region homologous to the RNase II of *Escherichia coli*, with a central hydrolytic domain with 3'→5' exoribonucleotidic activity (Bonneau et al. 2009; Lebreton et al. 2008; Schaeffer et al. 2009; Shneider et al. 2009). On the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, this subunit is found connected to the complex, however, in *Trypanosoma brucei*, it remains as a monomeric form on both nucleus and cytoplasm (Estévez et al. 2001; Lorentzen et al. 2008; Mitchell et al. 1997).

In this present work, we characterized a gene of *T. cruzi* isolated from a λ Zap cDNA library, similar to *T. brucei* Rrp44. The cDNA, named *TcRrp44*, was sequenced, analyzed on the databases *TcruziDB* and GenBank, expressed in heterologous system and molecularly characterized.

MATERIALS AND METHODS

Parasites

Epimastigote forms of *T. cruzi* strain Y (Silva and Nussenzweig 1953) were maintained in LIT medium (Liver Infusion Tryptose) (Camargo 1964) and supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, USA) at 28 °C. Trypomastigote forms were obtained from the supernatant of LLCMK₂ cells in culture, 120 h post-infection with parasite and amastigote forms by lysis of these cells cultured in RPMI (Gibco, USA) supplemented with 10% (v/v) inactivated FBS, 2 mM L-glutamine, 100 UI/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Gibco, USA) and 2.5 µg/ml Tylosin (Sigma-Aldrich, USA) and 5% CO₂ at 37°C.

Analysis of the gene sequence

The gene *TcRrp44* was isolated from a λ Zap cDNA library of trypomastigote. After the sequencing of the clone, the gene was compared to other sequences deposited on GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and *TcruziDB* (<http://www.tcruzidb.org>). The contigs obtained were aligned with the *TcRrp44* sequence in the software ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). The clone sequence was deposited on GenBank.

Cloning and expression of the gene *TcRrp44*

The amplicon was amplified by PCR using λ ZAP-*TcRrp44* as a template and the oligonucleotides, 5'-GGGATCCCTATGATTGAGGAAT-3' and T7 universal primer. After *Bam*HI digestion, the gene was inserted into the pGEX-3x vector and used to transform *Escherichia coli* BL21 (DE). The recombinant protein was produced after induction with 1mM IPTG (Invitrogen, USA) for 3 h at 37 °C. The recombinant protein was insoluble; therefore it was separated by SDS-PAGE (13%), excised from the gel and eluted with PBS pH 8.0.

Antibody production

The polyclonal antiserum against recombinant protein was produced in BALB/c mice. They were immunized subcutaneously, once a week for a month, with 10 μ g of the protein in Freund's complete or adjuvant (Sigma-Aldrich, USA) for the first inoculation, followed by inoculation with incomplete adjuvant. The use of animals was in accordance with the Ethics Committee on Animal Experiments of Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP number 13/2006.

Immunoblotting assay

Cell lysates from 5×10^6 parasites were loaded into SDS-PAGE and the proteins transferred onto nitrocellulose membrane (Hybond C, Amersham Biosciences, England) using standard protocols. The membrane was incubated with blocking solution (5% of nonfat powdered milk, 0.1% Tween-20 in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4) for 2 h. The membrane was incubated with polyclonal anti-*TcRrp44* antiserum diluted 1:100 in blocking solution for 2 h, washed with PBS/Tween 0.5%, then incubated with anti-mouse horseradish peroxidase conjugated IgG (Invitrogen, USA) (1:8000) diluted in PBS/Tween 0.5%. for 1 h After three washes with PBS/Tween 0.5%, the substrate (0.05% H₂O₂ and 0.3% 4-chloro-1-naphthol methanol dissolved in PBS) was added. The color was allowed to develop at room temperature.

Immunofluorescence

Approximately 1×10^7 parasites were washed in PBS (pH 8.0) and resuspended in 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min. Parasites were washed with PBS and deposited on glass slides pretreated with poly-L-lysine and permeabilized with 0.1% Triton X100 in PBS (pH 8.0) for 10 min. The slides were placed in blocking solution (4% PBS/BSA) for 16 h and then incubated with anti-*TcRrp44* (1:100) in PBS for 1 h. The samples were then washed and incubated for 45 min with AlexaFluor-488 conjugated anti-mouse IgG (Invitrogen, USA) (1:400). For staining of cellular material, DAPI (4'6-diamino-2-phenylindole) (Invitrogen, USA) was added (1:1000) in PBS and incubated for 10 min at room temperature. Slides were mounted with N-propyl-gallate (Sigma-Aldrich, USA) and the images acquired at Leica DM2000 fluorescence microscope, magnification of 100X.

Extraction of nucleic acids

Epimastigotes (1×10^7 cells) were collected by centrifugation, washed in (PBS), pH 7.0 and then resuspended in TELT buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 62.5 mM EDTA, pH 9.0, 2.5 M LiCl₂, 4% Triton X-100). The sample was incubated for 5 min at room temperature and DNA was then extracted with 1 volume of phenol/chloroform (1:1) (Medina-Acosta and Cross, 1993). The DNA was precipitated with absolute ethanol and recovered by centrifugation. The pellet was washed with 70% ethanol and resuspended in TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0). For extraction of RNA, amastigote, tripomastigote and epimastigote forms of *T. cruzi* were used (1×10^8 cells). Parasites

were centrifuged, washed in PBS buffer (pH 7.0), resuspended in TRIzol solution and processed according to the method recommended by the manufacturer (Invitrogen, USA).

Preparation of radioactive probe, Northern blot and Southern blot

The DNA fragment (*TcRrp44*) being labeled with radioactive nucleotide was prepared according to the protocol Radprime DNA Labeling system kit (Invitrogen, USA). The total RNA (12 µg), isolated from different developmental stages of *T. cruzi*, was separated by electrophoresis on 1% agarose/formaldehyde gel and blotted on to nylon Hybond N membranes (Amersham Biosciences, England) using a vacuum blotter (Bio-Rad Laboratories, USA). Hybridization was performed overnight at 42 °C in a solution containing 50% formamide, 5x SSC (1x SSC is 0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate), 5x Denhardt's solution and 0.1 mg/mL sonicated herring sperm DNA, 0.1% sodium dodecil sulphate. After hybridization, the membranes were washed once with 1x SSC/0.5% SDS for 20 min at room temperature and then three times with 0.2x SSC/0.5% SDS for 20 min each time at 65 °C. They were then exposed to X-ray film. *Southern blot* was performed with epimastigote genomic DNA (10 µg) digested by the following restriction enzymes: *Bam*HI, *Eco*RI, *Hae*III, *Sma*I, *Hind*III e *Pst*I (Invitrogen, USA), according to the manufacturer. DNA was separated by electrophoresis in a 0.8% agarose gel, transferred to nylon membrane and hybridized as described for *Northern blot*.

RESULTS

Cloning and expression of TcRrp44 gene

The gene TcRrp44 was isolated from a trypomastigote forms cDNA λZap library. After sequencing this clone, the gene was compared to genes deposited in the GenBank database (XM_808241.1) and TcruziDB. The contigs obtained were aligned with the sequence of TcRrp44 on ClustalW program (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>), It resulted in a consensus sequence of approximately 950 nucleotides in which was observed a single open reading frame of 414 amino acids. Based on this the amino acid sequence analysis showed 80% similarity to the Rrp44 protein of *Trypanosoma brucei* (ID number on TcruziDB: Tb11.02.5380b). Based on the *TcRrp44* gene sequence, the forward primer was delineated, the gene was amplified, cloned and expressed in the pGEX-3X vector, to allow studies of immunolocalization of the native protein. The gene produced an approximately 62 kDa recombinant insoluble protein in *Escherichia coli* BL21 (DE) strain (Fig. 1), therefore an inclusion bodies purification was performed, followed by running and elution from SDS-PAGE (Fig. 1). The protein sequence analysis showed a domain with exoribonucleolytic activity.

Immunolocalization of TcRrp44 native protein

The polyclonal antibodies against recombinant TcRrp44 produced in mice were used to immunolocalize proteins in the western blot analysis. It recognized single protein of 110 kDa in the trypomastigotes extract (Fig. 2). When immunofluorescent assays were performed, the results showed that the TcRrp44 native protein has a cytoplasmatic and nuclear distribution in both forms of the parasite, epimastigote or trypomastigote (Fig. 3).

Genome organization and transcription analysis

Southern blot results showed that TcRrp44 presents as single or few copies gene in the *T. cruzi* genome (Fig. 4B). The Northern blot analysis showed a transcript of 3 kb for all forms of the parasite (Fig. 4D).

DISCUSSION

The general structure of the exosome has remained highly conserved among eukaryotes throughout evolution. The majority of the complex subunits displays conserved proteic sequences and homologous functions, varying only on its localization, relative to the nucleus and cytoplasm (Lykke-Andersen, 2011). The exosome of tripanosomatids, based on studies of the complex in *Trypanosoma brucei*, appears to have a reduced size when compared to yeasts, although its structural and catalytic subunits seem to possess the same basic structure (Estévez *et al.*, 2001). In this present work, we expressed and characterized a putative subunit sequence of the exosome complex of *T. cruzi*.

The clone named *TcRrp44* was compared to other sequences of tripanosomatids deposited on different data banks. The analysis showed an identity of 80% with the subunit Rrp44 of the exosome of *T. brucei*. Due to the highly conservation of these sequences among the eukaryotes, we believe that the studied region codes for this protein in *T. cruzi*.

On the immunoblotting assay, the serum recognized a fragment of approximately 110 kDa in total protein extracts from trypomastigotes forms, corroborating with results obtained with other eukaryotes, like *T. brucei* and *Saccharomyces cerevisiae*, in which the subunit Rrp44 presents the same approximated molecular weight (Estévez *et al.*, 2001).

The immunolocalization of the native protein in epimastigotes and trypomastigotes forms showed that this subunit remains distributed throughout the cytoplasm and nucleus of the cell on a punctuated labeling, also observed in other cytoplasmatic proteins, such as cytosolic protein kinase arginine of *T. cruzi* (Miranda *et al.* 2009). These results confirm those from the literature, which show that Rrp44 is present on the nucleus and cytoplasm of yeasts, humans and *T. brucei* (Estévez *et al.* 2001; Lorentzen *et al.* 2008; Mitchell *et al.* 1997).

To analyze the genomic organization of the gene coding for the Rrp44 subunit and its transcripts, we first performed the Southern blot assay. The results showed a simple hybridization pattern, with bands of 1 to 15 kb, suggesting that *TcRrp44* is present on the genome as a single or a few copies gene, differently from multicopy gene family pattern such as gp85/sialidase (Tonelli *et al.* 2010). Next, the transcript analysis by Northern blot showed that *TcRrp44* hybridized with a transcript of 3 kb in the all three forms of the parasite, showing a similar processing in amastigotes, epimastigotes and trypomastigotes.

CONCLUSION

As stated before, the post-transcriptional regulation in these parasites shows utmost relevance on the control of the mRNA level mainly by degradation of the molecule. The exosome seems to play the main role of this degradation in other eukaryotes, including tripanosomatids, been essential to the integrity of the cell. Our work presents itself as the pioneer to bring forward the study of the exosome in *Trypanosoma cruzi*. We cloned, expressed and characterized the subunit Rrp44 from the exosome of *T. cruzi*, showing its nuclear and cytosolic localization and the genomic organization of the gene and its transcripts. However, further studies need to be done to determine the structural relation of Rrp44 with the others subunits of the exosome complex and mainly to access the role of this protein on the degradation of different types of RNA, and thereafter, on the post-transcriptional regulation of these parasites.

ACKNOWLEDGMENTS

This work is supported by grant from Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná (Grant number 10921/07) and Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina. PMCS, ATM, DK, CACL, SFYO and LMY received fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Pessoal and Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná. The authors thank technicians Jussevania Pereira Santos and Ediel Clemente Costa for their help with laboratory maintenance and Vera Lúcia Hideko Tatakihara and Aparecida Donizette Malvezi for their help with *T. cruzi* maintenance. We declare that there is no potential conflict of interest.

REFERENCES

- Bonneau F, Basquin J, Ebert J, Lorentzen E, Conti E. The yeast exosome functions as a macromolecular cage to channel RNA substrates for degradation. *Cell*. 2009;139(3):547-59.
- Butler JS. The yin and yang of the exosome. *Trends Cell Biol*. 2002;12(2):90-6.
- Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1964;6:93-100.
- Clayton CE. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J*. 2002;21(8):1881-8.
- Clayton C, Shapira M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol Biochem Parasitol*. 2007;156(2):93-101.
- Dias JC, Prata A, Correia D. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41(2):193-6.
- Estévez AM, Kempf T, Clayton C. The exosome of *Trypanosoma brucei*. *EMBO J*. 2001;20(14):3831-9.
- Gorla D, Noireau F. Geographic distribution of *Triatominae* vectors in America. In: TELLERIA, J.; TIBAYRENC, M. *American trypanosomiasis (Chagas disease). One hundred years of research*. 1^a ed. Burlington: Elsevier, 2010.
- Haile S, Estevez AM, Clayton C. A role for the exosome in the in vivo degradation of unstable mRNAs. *RNA*. 2003;9(12):1491-501.
- Haile S, Papadopoulou B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol*. 2007;10(6):569-77.
- Lebreton A, Tomecki R, Dziembowski A, Séraphin B. Endonucleolytic RNA cleavage by a eukaryotic exosome. *Nature*. 2008;456(7224):993-6.
- Lorentzen E, Basquin J, Tomecki R, Dziembowski A, Conti E. Structure of the active subunit of the yeast exosome core, Rrp44: diverse modes of substrate recruitment in the RNase II nuclease family. *Mol Cell*. 2008;29(6):717-28.
- Lykke-Andersen, S. et al. A. The eukaryotic RNA exosome. *RNA Biology*, 2011, 8:p.61-66.
- Martínez-Calvillo S, Yan S, Nguyen D, Fox M, Stuart K, Myler PJ. Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol Cell*. 2003;11(5):1291-9.
- Medina-Acosta E, Cross GA. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. *Mol Biochem Parasitol*. 1993;59(2):327-9.
- Miranda MR, Bouvier LA, Canepa GE, Pereira CA. Subcellular localization of *Trypanosoma cruzi* arginine kinase. *Parasitology*. 2009;136(10):1201-7.
- Mitchell P, Petfalski E, Shevchenko A, Mann M, Tollervey D. The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases. *Cell*. 1997;91(4):457-66.
- Schaeffer D, Tsanova B, Barbas A, Reis FP, Dastidar EG, Sanchez-Rotunno M, et al. The exosome contains domains with specific endoribonuclease, exoribonuclease and cytoplasmic mRNA decay activities. *Nat Struct Mol Biol*. 2009;16(1):56-62.
- Schneider C, Leung E, Brown J, Tollervey D. The N-terminal PIN domain of the exosome subunit Rrp44 harbors endonuclease activity and tethers Rrp44 to the yeast core exosome. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(4):1127-40.
- Silva LHP. Nussenzweig, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para camundongo branco. **Folia Cli Bio**. 1953; 20:191-207.
- Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol*. 2001;31(5-6):472-81.
- Tonelli, r.r., giordano, r., barbu, e.m. et al. Role of the gp85/Trans-Sialidases in *Trypanosoma cruzi* tissue tropism: Preferential binding of a conserved peptide motif to the vasculature *in vivo*. *PLOS Negl Trop Dis*. 2010; 4(11): e864.
- World Health Organization - WHO Expert Committee. Control of Chagas disease. WHO tech rep. 2002; 905:1-109.

SUBTITLES

Figure 1 - Expression of the gene *TcRrp44* on the PGEX-3X vector. Proteic extracts from *E. coli*: A - Non transformed with the recombinant plasmid and non induced with IPTG. B - Non transformed with the recombinant plasmid and induced. C - Transformed with the recombinant plasmid and non induced with IPTG. D - Transformed with the recombinant plasmid and induced with IPTG. E - Protein Rrp44 purified. MW - Molecular weight marker *BenchMarkTM Protein Ladder* (Invitrogen, USA), values are expressed in kDa.

Figure 2: Polyclonal antibodies against recombinant protein TcRrp44 recognized a polypeptid in *T. cruzi* parasite extracts. Trypomastigotes of *T. cruzi* Y strain were separated in the SDS-PAGE 10% and transferred into nitrocelulose membrane. Polyclonal antibodies against the protein TcRrp44 recognized a peptid of 110 kDa in the extract of trypomastigotes (T).

Figure 3 - Immunolocalization of native TcRrp44 by fluorecence microscopy. Epimastigote and trypomastigote of *T. cruzi* Y strain were fixed and the permeabilized. The polyclonal antibodies against the protein TcRrp44 recognize polipetids distributed through the cytoplasm and nucleous of *T. cruzi*. (A, B and C): epimastigotes, (D, E and F): trypomastigotes. (A and D): Microscopy showing the morphology of parasites. (B and E): cells stained with DAPI showing the nucleus and kinetoplast. (C and F): fluorecence of Alexa-Fluor 488 indicating TcRrp44 protein in the parasite, magnification of 100X.

Figure 4 - Genomic organization and transcript analysis of the gene *TcRrp44*. Panel A and B: Southern blot of genomic DNA from *T. cruzi* digested with restriction enzymes, lines: 1. *Bam*HI, 2. *Eco*RI, 3. *Hae*III, 4. *Hind*III, 5. *Pst*I, 6. *Sma*I. Electrophoresis in agarose-TBE gel 0.8%, stained with ethidium bromide. Panel C and D: Northern blot analysis of total RNA of epimastigote (E), trypomastigote (T) and amastigote (A) of *T. cruzi*. Electrophoresis in 1% agarose-MOPS stained with ethidium bromide. Panel B and D: Hybridization of labeled *T.c16 32^P*.

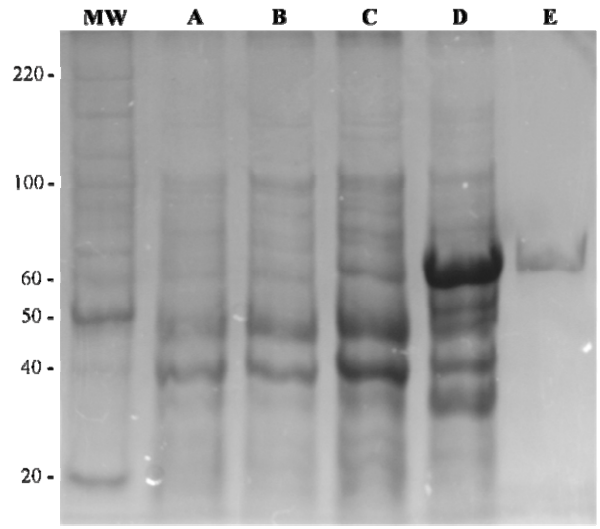


Figure 1

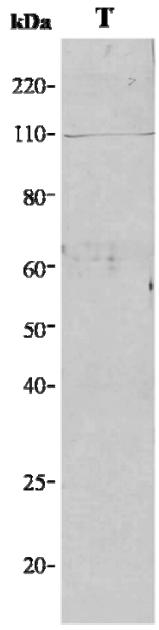


Figure 2

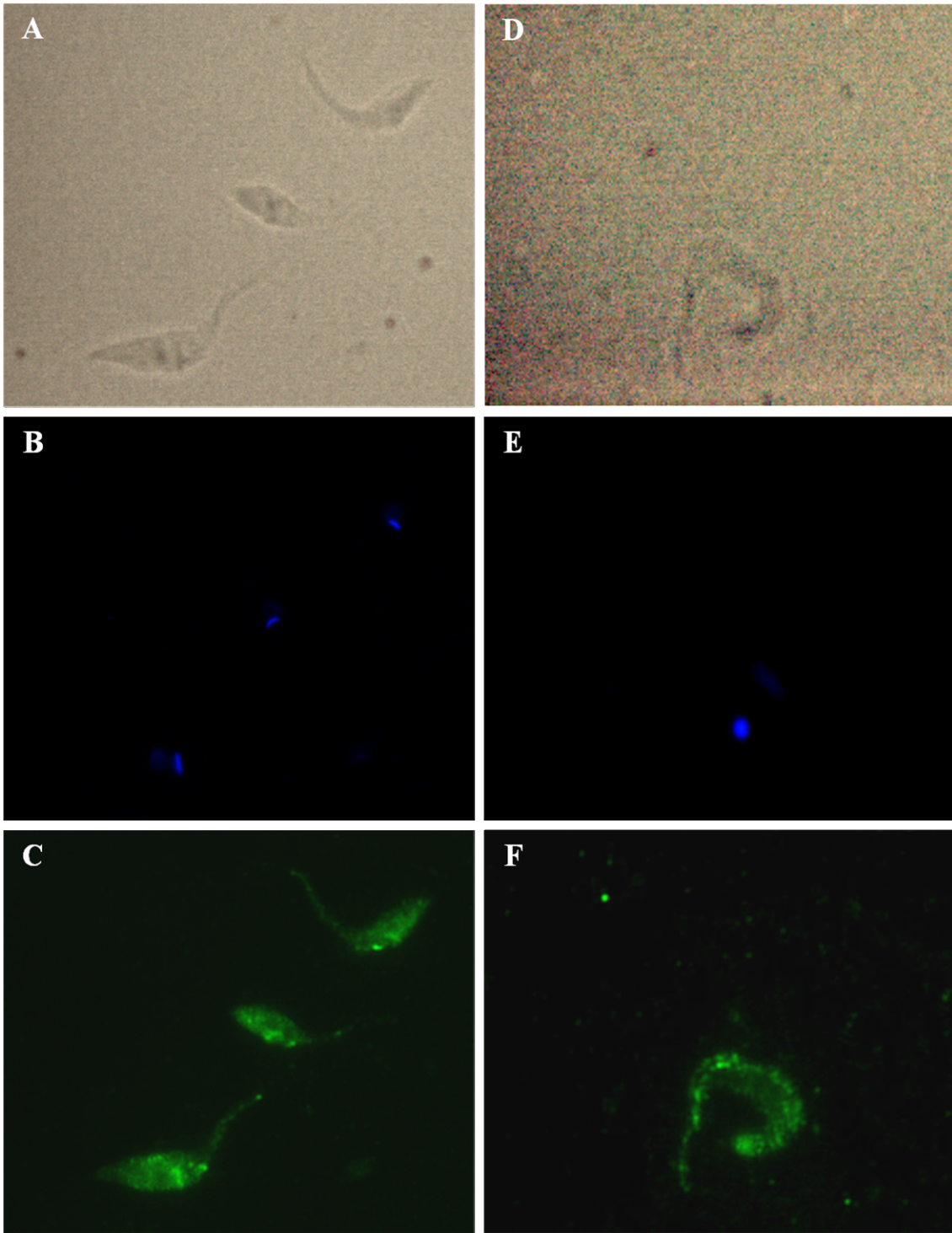


Figure 3

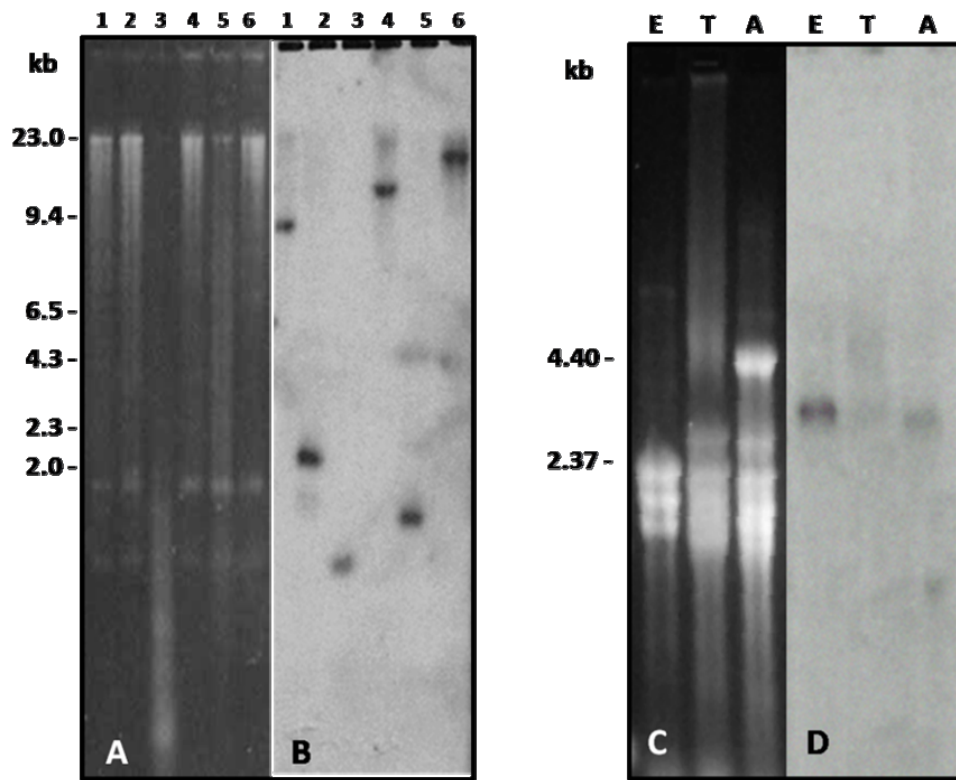


Figure 4

ANEXO A - Registro no Comitê de Ética em Experimentos Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
— Comissão de Ética em Experimentação Animal —



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 013/2006, intitulado: “Análise da ligação CCL2 ao parasita *T. cruzi* e caracterização de genes que codificam proteínas que participam do processo de transcrição no parasita”, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. João Santana da Silva**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de **27 de março de 2006**.

(We certify that the protocol nº 013/2006, about “Analysis of chemokine CCL2 binding to *T. cruzi* parasite and characterization of genes that encode proteins that participate of transcription process in the parasite”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the COLLEGE OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO – ETHICAL COMMISSION OF ETHICS IN ANIMAL RESEARCH (CETEA) in 03/27/2006 meeting).

Ribeirão Preto, 28 de março de 2006.

Prof. Dra. **CLÁUDIA MARIA LEITE MAFFEI**
Vice-Presidente da Comissão
de Ética em Experimentação Animal

5 CONCLUSÃO

A análise por bioinformática do gene *TcRrp44* mostrou que ele possui 80% de similaridade com a subunidade Rrp44p do exossoma de *Trypanosoma brucei*. A alta conservação das sequências de aminoácidos deste complexo em eucariotos sugere que esse clone codifica para, pelo menos, parte desta subunidade em *Trypanosoma cruzi*. O gene foi clonado e expressado no vetor pGEX-3X para a produção da proteína recombinante. Anticorpos policlonais anti-Rrp44 reconheceram um polipeptídeo de cerca de 100 kDa em extratos protéicos de formas tripomastigotas. No ensaio de imunolocalização, observou-se que a proteína TcRrp44 encontra-se distribuída por todo o citoplasma, e em menor quantidade, no núcleo de formas epimastigotas e tripomastigotas. No estudo da organização genômica do *TcRrp44*, a análise por *Southern blot* revelou que o gene possui um perfil de hibridação simples, tratando-se, assim, de um gene único ou em poucas cópias. Já o ensaio de *Northern blot* revelou um transcrito de cerca de 3 kb em todas as formas do parasito, epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas, indicando um gene constitutivo. Esses dados corroboram com aqueles obtidos na literatura, principalmente sobre a localização da subunidade Rrp44p na célula. Entretanto, estudos mais aprofundados sobre a função e participação dessa proteína no complexo exossomal são necessários para elucidar o seu papel na degradação de moléculas de RNA nesse parasito.