

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

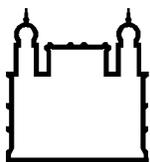
Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

Luana Tatiana Albuquerque Guerreiro

**Identificação e caracterização de minicírculos de
Trypanosoma vivax (Zieman, 1905) através de geração e
análise de GSS (Genome Sequence Survey)**

Rio de Janeiro

Julho 2005



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

Luana Tatiana Albuquerque Guerreiro

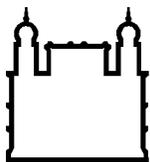
**Identificação e caracterização de minicírculos de
Trypanosoma vivax (Zieman, 1905) através de geração e
análise de GSS (Genome Sequence Survey)**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Dr. Alberto Martin Rivera Dávila

Rio de Janeiro

Julho 2005



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

Luana Tatiana Albuquerque Guerreiro

Identificação e caracterização de minicírculos de *Trypanosoma vivax* (Zieman, 1905) através de geração e análise de GSS (Genome Sequence Survey)

ORIENTADOR: Dr. Alberto Martin Rivera Dávila

Aprovada em: __13__/_07__/_2005__

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Ana Carolina Paulo Vicente - Presidente

Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard

Prof. Dr. Turan Peter Urmenyi

SUPLENTE:

Prof. Dra. Yara Maria Traub-Cseko

Prof. Dra. Maria Claudia Reis Cavalcanti

Rio de Janeiro, 13 de Julho de 2005

Aos meus pais, por todo
apoio e dedicação.

Agradecimentos

Ao meu querido orientador, Alberto Dávila, pela boa orientação e, mesmo de tão longe, sempre me ajudou na elaboração da minha dissertação.

À Dra. Yara Traub-Cseko, pelos bons conselhos.

Ao Dr. Marcel Ramirez, pelas dúvidas esclarecidas na ausência do Alberto.

Ao Instituto Oswaldo Cruz, pelo suporte financeiro.

Ao Dr. Edmundo Grisard, pela revisão da dissertação e as boas sugestões.

À Silvana, por sua paciência e grande ajuda na parte prática.

Ao Glauber, por toda ajuda na parte computacional.

A todo nosso grupo de trabalho.

A todos os colegas de laboratório, sempre dispostos a ajudar, e pelos bate papos na salinha de estudo.

A todo o pessoal da parte de Bioinformática, principalmente ao Edson, pela ajuda na análise das seqüências.

Ao meu irmão, por ter agüentado todas as noites que teve que dormir com a luz do computador.

Ao Alexandre, por ter (de novo) compreendido a minha dedicação total ao estudo.

A minha mãe, Regina, por sempre querer dar uma mãozinha, mesmo não entendendo nada.

Ao meu pai, Itamar, por sempre acreditar em mim.

A Deus, principalmente, por iluminar meus passos a cada dia que se passa em minha vida.

“Irmãos e irmãs estudando juntos
vão chegar juntos ao sucesso”.

Cláudio Guerreiro

Resumo

Trypanosoma vivax é um hemoparasita causador de doença em ruminantes, amplamente distribuído na África, principalmente nas áreas tropicais onde a mosca tsé-tsé é encontrada. Também encontrado em vários países da América do Sul, principalmente no Pantanal do Brasil e na Bolívia, o *T. vivax* é um parasita patogênico considerado de grande importância para grandes regiões agropecuárias da África e América do Sul. Estimam-se possíveis perdas econômicas de 160 milhões de dólares no Pantanal brasileiro e áreas inundáveis da Bolívia. Apesar da grande relevância econômica da doença causada por *T. vivax*, poucas pesquisas sobre sua caracterização foram realizadas até agora, comparado com tripanosomas que afetam a saúde humana como o *T. brucei* e *T. cruzi*, por exemplo, uma pesquisa no portal Entrez do NCBI (24/05/05) usando “*Trypanosoma vivax*” como palavra chave apresentou apenas 447, 27, 23 e 5 entradas disponíveis nas seções de PubMed, proteína, nucleotídeo e estrutura, respectivamente, mostrando o limitado conhecimento desta espécie. O diagnóstico das infecções por *T. vivax* continua sendo um desafio em função da baixa parasitemia observada na maioria das infecções, reforçando a importância da descoberta de novos marcadores para o desenvolvimento de ensaios mais sensíveis e espécie-específicos para o diagnóstico da infecção pelo *T. vivax*. Com o objetivo de gerar novos dados do genoma de *T. vivax* alçamos mão da geração e análise de GSS como uma técnica de descobertas de genes, focando especificamente na identificação de minicírculos. A partir de uma biblioteca genômica, foram obtidas 455 GSS de alta qualidade, equivalentes a 0,5% do genoma do parasita, que foi estimado ser em torno de 25 MB. Destas, foram obtidas 331 GSS-nr, das quais 108 seqüências tiveram uma similaridade significativa com seqüências depositadas nos bancos de dados públicos, sendo classificadas em três categorias funcionais do GO: processo biológico, componente celular e função molecular, e 18 seqüências não apresentaram nenhuma similaridade com os bancos de dados utilizados neste estudo, sendo consideradas genes órfãos. No presente estudo, iniciadores foram desenhados para obtenção das seqüências de minicírculo de diferentes cepas de *T. vivax*, e testados quanto a sua sensibilidade. Durante todo o trabalho foram identificados 36 minicírculos, cada um apresentando apenas uma região conservada e os blocos de seqüência conservada (CSB), estimando-se o tamanho do minicírculo em torno de 480 pb.

Abstract

Trypanosoma vivax is a hemoparasite which causes sickness in ruminants. In Africa it is found wide-spread, mainly in tropical areas where tsetse is found, and in several South America countries, mainly in the Pantanal of Brazil and in Bolivia. *T. vivax* is a pathogenic parasite considered of great importance for cattle-industry of Africa and South America. Possible economic losses of 160 million dollar in the Brazilian Pantanal and lowlands of Bolivia are estimated. Despite the high economic relevance of the disease caused by *T. vivax*, few researches on its molecular characterization have been done up to this moment compared with human trypanosomes as *T. brucei* and *T. cruzi*, for example, a search in the NCBI-Entrez portal (24/05/05) using “*Trypanosoma vivax*” as a keyword showed only 439, 27, 23 and 5 entries available in the PubMed, Protein, Nucleotide and Structure sections, respectively, showing the limited knowledge about this species. The diagnosis of the infections for *T. vivax* remains a challenge, since parasitemias are usually very low in the majority of the infections, reinforcing the necessity to discover new markers for the development of more sensitive and species-specific assays. The technique for gene discovery used in this study was the GSS, with the objective to generate new data from the *T. vivax* genome, to make a preliminary annotation of these sequences and identification of minicircles. From a genomic library, 455 high quality GSS were obtained, equivalent to 0.5% of the parasite genome, that was estimated to be around 25 MB. From those 455 GSS, 331 GSS-nr were obtained, of which 108 sequences had a significant similarity with sequences deposited in the public databases and were classified in the three functional categories of GO: biological process, cellular component and molecular function. Eighteen sequences did not show any similarity with the databases used in this study, being considered orphan genes. In the present study, primers were designed to obtain minicircle sequences of different *T. vivax* strains, and their sensitivity was tested. Thirty-six minicircles were identified, each one showing only one conserved region and conserved sequence blocks (CSB). The estimated size of the minicircle was of 480 bp.

Lista de figuras

Figura 1.1 – Mapa demonstrando a provável rota de introdução do <i>Trypanosoma vivax</i> na América Latina	1
Figura 1.2 - Formas sanguíneas do <i>Trypanosoma vivax</i> encontrados no sangue de bovinos naturalmente infectados no Pantanal de Poconé, MT, Brasil (reproduzido de Silva <i>et al.</i> , 2002).....	3
Figura 1.3 – Em A – Foto de <i>Trypanosoma vivax</i> em esfregaço sanguíneo de bovino (400X) indicando suas principais organelas. C: Cinetoplasto; N: Núcleo; F: Flagelo (Silva <i>et al.</i> , 2002). Em B- Microscopia eletrônica (5.500X) do cinetoplasto de <i>Trypanosoma vivax</i> (Borst <i>et al.</i> , 1985).....	4
Figura 1.4 - Desenho esquemático das formas de <i>Trypanosoma vivax</i> observadas no hospedeiro vertebrado e invertebrado.....	5
Figura 1.5 - Animais doentes infectados com <i>Trypanosoma vivax</i>	7
Figura 1.6 - Organização da rede de DNA do cinetoplasto (kDNA)	13
Figura 1.7 - Esquema de um minicírculo de <i>Trypanosoma brucei</i>	15
Figura 1.8 - Micrografia eletrônica (5.500X) de uma rede de DNA do cinetoplasto (kDNA) de <i>Trypanosoma vivax</i> (Borst <i>et al.</i> , 1985).....	16
Figura 3.1 - Representação esquemática dos blocos de região conservada do minicírculo de DNA do cinetoplasto (kDNA) apontando o local de ligação dos iniciadores utilizados na amplificação dos minicírculos de <i>Trypanosoma vivax</i>	23
Figura 4.1 - Distribuição das classificações das GSS-nr de <i>Trypanosoma vivax</i> de acordo com as três categorias funcionais do Consórcio Gene Ontology e o percentual representado por cada categoria.....	33
Figura 4.2 - Alinhamento dos clusters de <i>Trypanosoma vivax</i> que apresentaram similaridade com seqüências de minicírculos	34
Figura 4.3 - Esquema de um minicírculo de <i>Trypanosoma vivax</i>	35
Figura 4.4 - PCR com diferentes combinações de iniciadores e diferentes concentrações de dNTPs.....	36
Figura 4.5 - PCR com diferentes concentrações de iniciadores.....	37
Figura 4.6 - PCR utilizando o par de iniciadores MCTVF1/MCTVR1. com as cepas do Oeste da África.....	38
Figura 4.7 - PCR utilizando diferentes cepas de <i>Trypanosoma vivax</i> , uma do Peru e duas do Leste	

da África.....	39
Figura 4.8 - Alinhamento dos clones de <i>Trypanosoma vivax</i> que apresentaram similaridade com seqüências de minicírculos	40
Figura 4.9 - PCR utilizando o par de iniciadores TV-UMS-F/ TV-UMS-R. com DNA das cepas de <i>Trypanosoma vivax</i> do Oeste e leste da África, e do Peru.....	41
Figura 4.10 - PCR utilizando o par de iniciadores METV-UMS-F/METV-UMS-R com cepas de <i>Trypanosoma vivax</i> do Oeste da África.....	42
Figura 4.11 - PCR utilizando o par de iniciadores METV-UMS-F/METV-UMS-R com cepas de <i>Trypanosoma vivax</i> do Oeste e Leste da África.....	43
Figura 4.12 - PCR utilizando o par de iniciadores METV-UMS-F/METV-UMS-R com cepas de <i>Trypanosoma vivax</i> do Oeste da África (como controle positivo), do Peru e do Leste da África.....	43
Figura 4.13 - Alinhamento das seqüências dos clones de <i>Trypanosoma vivax</i> que apresentaram similaridade com seqüências de minicírculos.....	44
Figura 4.14 - PCR realizada com a cepa ILDat 2160 para avaliar a sensibilidade da reação.....	46

Lista de tabelas

Tabela 1.1 - Entradas disponíveis nas seções do Entrez (NCBI) em 25 de Maio de 2005.....	10
Tabela 1.2 - Diferentes tamanhos de minicírculos de parasitas da Ordem Kinetoplastida.....	14
Tabela 3.1 - Diferentes cepas de <i>Trypanosoma vivax</i> utilizadas nos ensaios de amplificação da região conservada dos minicírculos de DNA do cinetoplasto (kDNA) via PCR.....	24
Tabela 4.1 – Número de GSS de <i>Trypanosoma vivax</i> geradas no presente estudo e sua distribuição após a análise de agrupamento.....	27
Tabela 4.2 - Resultado da análise do programa Glimmer, fornecendo o tamanho e conteúdo de G+C dos clusters e genes hipotéticos encontrados.....	28
Tabela 4.3 - Lista das GSS-nr de <i>Trypanosoma vivax</i> que apresentaram similaridade com seqüências conhecidas de parasitas da Ordem kinetoplastida e outros organismos em banco de dados públicos, distribuído em classes de função celular baseado no GO.....	28
Tabela 4.4 - Lista das GSS-nr de <i>Trypanosoma vivax</i> que apresentaram similaridade significativa (E-value <10 ⁻⁵) em análises comparativas contra bancos de dados de domínio de proteínas CDD e Interpro.	31

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

DNA -	Ácido desoxirribonucléico
RNA -	Ácido ribonucléico
mRNA -	RNA mensageiro
cDNA -	DNA complementar
EST -	Expressed Sequence Tag
GSS -	Genome Sequence Survey
ELISA -	Enzyme – Linked Immunosorbent Assays
PSU -	Pathogen Sequencing Unit
kDNA -	DNA do cinetoplasto
Kb -	Kilobases
gRNA -	RNA guia
pb -	Pares de base
CSB -	Bloco de seqüência conservada
ILRI -	International Livestock Research Institute
µM -	Micrômetro
µL -	Microlitro
µg -	Micrograma
LB -	Luria-Bertani
X-gal -	5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactosídeo
IPTG -	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
mM -	Milimolar
mL -	Mililitro

min. -	Minuto
rDNA -	DNA ribossomal
pmol -	Picomol
mCi -	Milicurie
SDS -	Dodecil sulfato de sódio
SSC -	Solução salina de citrato
Rpm -	Rotação por minuto
TBE -	Tris base / Borato / EDTA
EDTA -	Etilenodiaminatetracetato
Volt -	Voltagem
Kvolt -	Kilovolt
Glimmer -	Gene Locator and Interpolated Markov Modeler
ORF -	Janela aberta de leitura (<i>open reading frame</i>)
BLAST -	Basic Local Alignment Search Tool
NCBI -	National Center for Biotechnology Information
EMBL -	European Molecular Biology Laboratory
EBI -	European Bioinformatics Institute
CDD -	Conserved Domain Database
GO -	Gene ontology
tRNA -	RNA transportador
PCR -	Reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
pg -	Picograma

fg -	Fentograma
mg -	Miligrama
IFI -	Imunofluorescência indireta
Ag-ELISA -	Antígeno-imunoensaio enzimático
Ab-ELISA -	Anticorpo-imunoensaio enzimático
nr -	Não redundante
nt -	Nucleotídeo
v/v -	Volume-volume
p/v -	Peso-volume
dNTP -	Desorribonucleotídeo trifosfatado
TIGR -	The Institute for Genomic Research
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
UMS	Universal Minicircle Sequence

Sumário

1. Introdução	1
1.1 - <i>Trypanosoma vivax</i> : Histórico.....	1
1.2 - Morfologia.....	2
1.3 - Ciclo de vida.....	4
1.4 – Infecção e Doença.....	5
1.5 - Diagnóstico da infecção.....	7
1.5.1 – Diagnóstico parasitológico e sorológico.....	8
1.5.2 – Diagnóstico molecular.....	8
1.6 – Caracterização molecular.....	9
1.7 – GSS e estudo do genoma	10
1.8 – Minicírculos	12
2. Objetivos	17
2.1 - Geral.....	17
2.2 - Específicos.....	17
3. Materiais e Métodos	18
3.1 – Construção da biblioteca genômica.....	18
3.2 – Hibridização da biblioteca genômica.....	18
3.3 – Seleção de clones e extração de DNA plasmidial (Mini-prep)	19
3.4 – Seqüenciamento.....	20
3.5 – Análise <i>in silico</i> e anotação das seqüências geradas.....	20
3.6 - Hibridização com sonda de minicírculo.....	22
3.7 – Iniciadores baseados na região conservada do minicírculo de kDNA.....	22
3.8 – Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	23
4. Resultados	26
4.1 – Geração e análise de GSS.....	26
4.1.1- Biblioteca genômica.....	26
4.1.2 – Seqüenciamento.....	26
4.1.3 - Classificação funcional dos GSS-nr de <i>Trypanosoma vivax</i>	32
4.2 – Identificação e caracterização de minicírculos.....	34
4.2.1 – Identificação de minicírculos.....	34
4.2.2 - Hibridização com a sonda de minicírculo.....	36
4.2.3 - PCR com os iniciadores A.....	36
4.2.4 – Seqüenciamento de clones obtidos com os iniciadores A.....	40
4.2.5 – PCR com o par de iniciadores B.....	41
4.2.6 – PCR com o par de iniciadores C.....	42
4.2.7 – Seqüenciamento dos clones obtidos com os iniciadores C.....	44
4.2.8 – Sensibilidade da PCR.....	45
5 – Discussão	47
6 – Conclusões	52
7 – Referências bibliográficas	53
8 – Anexo	67

1 – Introdução

1.1 – *Trypanosoma vivax*: Histórico

Trypanosoma vivax é um hemoparasita descrito por Ziemann (1905) como pertencendo ao Sub-gênero *Duttonella*, da Família Trypanosomatidae, da Ordem Kinetoplastida. O *T. vivax* é amplamente distribuído na África, principalmente nas áreas tropicais onde a mosca tsé-tsé (*Glossina* sp.) é encontrada (Gardiner, 1989), sendo também encontrado em vários países da América do Sul. Nesta região, o primeiro registro deste parasita foi na Guiana Francesa (Leger & Vienne, 1919). De acordo com Hoare (1972) a origem do *T. vivax* é da África e foi introduzido na América Latina, provavelmente, através do gado Zebu importado do Senegal para Guiana Francesa, Guadalupe e Martinica em 1830 (figura 1.1), depois sendo difundido entre um país e outro através de traslado de bovinos.



Figura 1.1 – Mapa demonstrando a provável rota de introdução do *Trypanosoma vivax* na América Latina.

No Brasil, o parasita foi descrito oficialmente pela primeira vez em Búfalo (*Bubalis bubalis*) na cidade de Belém, Estado do Pará por Shaw e Lainson (1972), porém, o primeiro relato divulgado como publicação não indexada corresponde a Boulhosa (1946) em vacas da zona Bragantina do Estado do Pará. Antes do Brasil, o *T. vivax* já havia sido identificado no sangue circulante de gado bovino na Venezuela (Tejera, 1920), Guadalupe (1926) e Martinica (1929) (revisado por Jones & Dávila, 2001), Colômbia (Plata, 1931), Suriname (Nieschulz & Frickers, 1938), Panamá (Johnson, 1941) e Guiana (1953) (revisado por Jones & Dávila, 2001). Posteriormente foi detectado em 1977 em El Salvador, Costa Rica, Equador, Peru, Paraguai (Wells *et al.*, 1977; revisado por Jones & Dávila, 2001). Dezoito anos depois o *T. vivax* foi encontrado na região de Poconé, Norte do Pantanal brasileiro e posteriormente encontrado em outros municípios do estado de Mato Grosso, e após alguns anos em áreas inundáveis da Bolívia (Silva *et al.*, 1995; 1998).

O *T. vivax* pode ser transmitido de duas formas: uma forma cíclica através de moscas tsé-tsé do gênero *Glossina* e uma mecânica por tabanídeos e outros insetos hematófagos (Gardiner, 1989). Na África, o parasita é predominantemente transmitido de maneira cíclica por moscas tsé-tsé, mas outros insetos hematófagos (por exemplo, espécies de Tabanidae e Stomoxidae) e a própria tsé-tsé são capazes de transmitir mecanicamente o parasita (Hoare, 1972; Desquesnes & Dia, 2003; 2004). Na América do Sul, devido à ausência da mosca tsé-tsé, somente ocorre transmissão mecânica através de *Stomoxys* spp. (mosca do estábulo) (Serra-Freire & Rezende, 1988) e tabanídeos (Diptera, Tabanidae) como as mutucas (Gardiner & Wilson, 1987). Adicionalmente, a transmissão vertical tem sido sugerida devido a achados de tripanosomas na corrente sangüínea de bezerros com apenas quatro horas de vida (Meléndez *et al.*, 1993). A transmissão mecânica na América do Sul acontece principalmente durante a época das chuvas na região do Pantanal (Dávila & Silva, 2000), enquanto na Guiana Francesa os surtos acontecem principalmente na estação seca (Desquesnes, 1997).

1.2 - Morfologia

O *T. vivax* apresenta-se nas formas tripomastigota e epimastigota extracelular, com um único e distinto flagelo livre anterior (Hoare, 1972; Gardiner, 1989). Enquanto nas cepas africanas é possível encontrar formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas nas moscas tsé-tsé, nas cepas da América do Sul, onde *T. vivax* não possui ciclo no vetor, a forma

tripomastigota (figura 1.2 e figura 1.3) é a única encontrada (Gardiner, 1989), sendo comum encontrar formas largas e finas (Dávila *et al.*, 1998). As formas largas são, geralmente, as mais observadas, mas as formas delgadas também são freqüentemente identificadas (Hoare, 1972) especialmente entre as cepas que infectam roedores (Leefflang *et al.*, 1976).

De acordo com Hoare (1972), o parasita possui um tamanho de comprimento que varia de 18 μm a 31 μm (incluindo flagelo livre), porém na América do Sul, o *T. vivax* parece apresentar um comprimento médio um pouco menor de 16 μm a 26,5 μm . No Brasil, a média encontrada foi de 18,73 μm no Pantanal, Estado do Mato Grosso (Silva *et al.*, 1996) e de 22,77 μm no Estado do Pará (Shaw & Lainson, 1972).

O parasita possui um cinetoplasto característico: grande, volumoso, redondo e de posição terminal (figura 1.3), apresentando valor diagnóstico (Hoare, 1972; Gardiner, 1989).

O *T. vivax* pode estar confinado ao sistema circulatório do hospedeiro infectado, mas também pode ser encontrado nos linfonodos e tecido cardíaco, bem como em esfregaços de medula óssea (Gardiner, 1989), no sistema nervoso central e humor aquoso dos olhos (Whitelaw *et al.*, 1988).

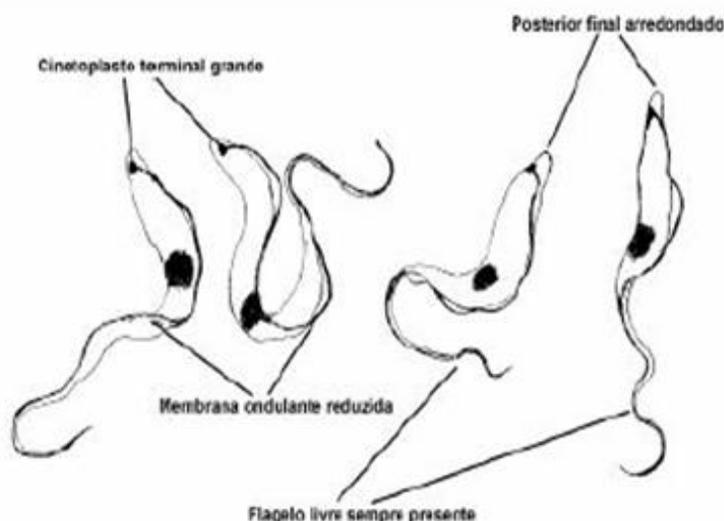


Figura 1.2 – Formas sanguíneas do *Trypanosoma vivax* encontrados no sangue de bovinos naturalmente infectados no Pantanal de Poconé, MT, Brasil (reproduzido de Silva *et al.*, 2002).

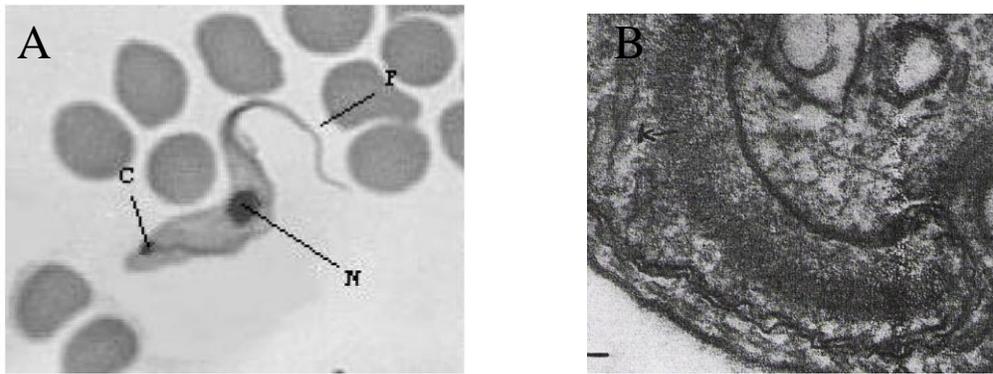


Figura 1.3 – Em A – Foto de *Trypanosoma vivax* em esfregaço sangüíneo de bovino (400X) indicando suas principais organelas. C: Cinetoplasto; N: Núcleo; F: Flagelo (Silva *et al.*, 2002). Em B – Microscopia eletrônica (5500X) do cinetoplasto de *Trypanosoma vivax* (Borst *et al.*, 1985).

1.3 - Ciclo de vida

O ciclo de vida se inicia quando as formas sangüíneas do *T. vivax* presentes no hospedeiro infectado são ingeridas pela tsé-tsé e se fixam diretamente na parede interior de sua probóscida (Bruce *et al.*, 1910; Roubaud, 1934). Então, os tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas (provavelmente dois dias depois) (Jefferies, 1984). Depois de 24 horas, as formas epimastigotas migram em direção ao canal alimentar e se fixam na parede do labro, onde se multiplicam intensivamente (Roubaud, 1935). Posteriormente, as formas epimastigotas migram em direção a hipofaringe onde se transformam em formas tripomastigotas, e depois em formas infectantes

(tripomastigotas metacíclicos). Uma representação das formas de *T. vivax* observadas no hospedeiro vertebrado e invertebrado é mostrado na figura 1.4.

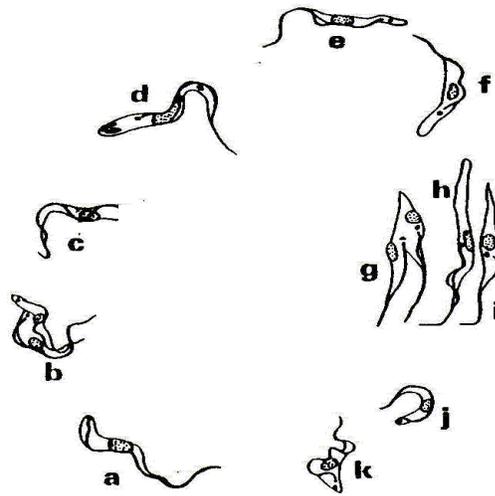


Figura 1.4 – Desenho esquemático das formas de *Trypanosoma vivax* observadas no hospedeiro vertebrado e invertebrado. (a), (b) e (c) – formas sanguíneas encontradas no sangue do hospedeiro vertebrado infectado. Em (b) está ocorrendo divisão da forma sanguínea, (d) é uma forma tardia observada no sangue de camundongo, (e) e (f) são formas tripomastigotas observadas na prosbócida da tsé-tsé, (g) são epimastigotas se dividindo na prosbócida da tsé-tsé, (h) e (i) são epimastigotas fixados na prosbócida da tsé-tsé, (j) e (k) são formas metacíclicas na hipofaringe da tsé-tsé (reproduzido de Gardiner, 1989).

1.4 – Infecção e Doença

O *T. vivax* afeta o rebanho de grandes regiões agropecuárias da África e América do Sul, sendo mantido e transmitido em várias épocas do ano (Dávila & Silva 2000). A infecção por este parasita induz o aparecimento de vários sinais clínicos. A gravidade da infecção está relacionada com a susceptibilidade do hospedeiro, a virulência da cepa envolvida e seu repertório antigênico (Anosa, 1983; Losos & Ikede, 1972). Os hospedeiros mais afetados são bovinos (Solano *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 1998), búfalos, caprinos e ovinos (Daniel *et al.*, 1994; Osaer *et al.*, 1999; Dávila *et al.*, 2002). Também são susceptíveis camelos (Pellegrini, 1950), cavalos e burros (Anosa, 1983; Faye *et al.*, 2001). Espécies de lhama também podem ser infectadas (Ferris, 1984), já os cães e suínos são refratários a infecção (Silva *et al.*, 2002). Mais recentemente, um estudo em Camarões, África, mostrou que espécies silvestres da ordem dos primatas, artiodáctilos e

roedores também podem ser infectadas, bem como pangolins, pequenos carnívoros e répteis (Njiokou *et al.*, 2004). Nos ruminantes, os principais sinais clínicos são anemia severa, perda de apetite, perda de peso, conjuntivite, prostração, abortos e mortes (Silva *et al.*, 1995; 1999) (Figura 1.5). Foi observado também, defeitos morfológicos em espermatozoides de gados infectados, bem como decréscimo no volume do sêmen, baixa ou nenhuma produção de sêmen, além de outros efeitos adversos (Sekoni *et al.*, 2004). Alguns animais infectados passam por um processo de auto-cura, mas a maioria permanece infectado por meses e até anos, exibindo baixos níveis de parasitemia, esses animais acabam servindo como fonte de infecção para insetos, criando um reservatório do parasita (Masake *et al.*, 2002).

Fairbairn (1953) observou que existe uma diferença na patogenicidade entre os isolados de *T. vivax* do Oeste e Leste da África. Cepas do Leste africano, geralmente causam uma infecção moderada em relação às cepas do Oeste africano, embora ter sido observado no Quênia, uma síndrome hemorrágica (Assoku & Gardiner, 1989; Hudson, 1944; Olubayo & Mugeru, 1985; Connor & Mukangi, 1986), enquanto que uma suave infecção sub-clínica foi registrada em animais infectados com um isolado de *T. vivax* do Oeste da África (Anosa 1983; Losos & Ikede, 1972).

Devido a esta diferença de patogenicidade, e por ter sido sugerido que as formas mais curtas de *T. vivax* encontradas em Poconé-MT (Brasil) e Santa Cruz de La Sierra (Bolívia) estão relacionadas com a forma aguda da doença (Dávila *et al.*, 1997), a qual foi observada na região Oeste da África, o *T. vivax* é um parasita patogênico considerado de grande importância para a pecuária na África e América do Sul. Estimam-se possíveis perdas econômicas de 160 milhões de dólares no Pantanal brasileiro e áreas inundáveis da Bolívia. Este parasita causa um impacto negativo na produção de leite e carne, podendo fazer com que as regiões e/ou países sejam obrigados a importarem esses produtos (Silva *et al.*, 2002). Por exemplo, em 1976 na Colômbia, durante surtos de *T. vivax* em gado leiteiro, as perdas estimadas foram em média de 56,5 dólares por animal (Betancourt & Wells, 1979).

Sendo assim, a tripanosomose bovina causada por *T. vivax* pode ser considerada entre as mais importantes doenças causada por protozoários na região do Pantanal (Silva *et al.*, 1996; Dávila & Silva, 2000).



Figura 1.5 – Animais doentes infectados com *Trypanosoma vivax*. Em A – Bezerro apresenta sinais clínicos da doença (emaciação e fraqueza) (Pantanal brasileiro). Em B – Vaca Zebu grávida apresenta sinais clínicos da doença (emaciação) (Nigéria, África) (<http://www.vet.uga.edu/vpp/IVM/ENG/Global/INFECTIOUS.HTM>, acessado em 07/05/05).

1.5 - Diagnóstico da infecção

O diagnóstico das infecções por *T. vivax* continua sendo um desafio, já que a parasitemia é quase sempre muito baixa na maioria das infecções. Várias técnicas de detecção do parasita estão disponíveis, com diferentes graus de sensibilidade. A escolha de qual técnica será utilizada dependerá dos recursos do laboratório e do objetivo do diagnóstico.

1.5.1 – Diagnóstico parasitológico e sorológico

No Brasil, o diagnóstico de *T. vivax* é realizado pela demonstração do parasita em esfregaços sanguíneos preparados diretamente com sangue do animal, é a chamada técnica do esfregaço, ou a partir da técnica do micro-hematócrito preenchido com o sangue do animal infectado, chamada técnica do micro-hematócrito ou técnica de Woo (1970). Este último é mais utilizado quando a parasitemia não é muito baixa, e apresenta baixa sensibilidade.

Existem ainda outras técnicas de detecção direta do parasita como descrito em Silva *et al.* (2002): técnica Buffy Coat ou método de Murray (1977), onde uma ou duas gotas do sangue centrifugado no capilar é usado para fazer um esfregaço, e ainda, a inoculação em roedores.

Os testes sorológicos existentes são: imunofluorescência indireta (IFI) (Wilson, 1969) e imunoadsorção enzimática, os quais podem apresentar reação cruzada com *T. evansi*, e ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (Luckins, 1977).

Até agora vários tipos de ELISA foram desenvolvidos para o diagnóstico de *T. vivax*, mas a maioria deles apresentam especificidade e sensibilidade variáveis (Ferenc *et al.*, 1990; Nantulya & Lindqvist, 1989; Wright *et al.*, 1993). São utilizados o Ag-ELISA para detecção de antígenos circulantes nos animais infectados, e o Ab-ELISA para a detecção de anticorpos circulantes em animais infectados.

O teste de anticorpos por imunofluorescência indireta foi o primeiro método sorológico aplicado no estudo de tripanosomoses bovina na América do Sul e os resultados confirmaram a ampla distribuição do *T. vivax* neste continente (Platt & Adams, 1976).

1.5.2 – Diagnóstico molecular

A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido empregada na tentativa de superar alguns problemas associados às técnicas parasitológicas e sorológicas (Dickin & Gilson, 1989). Em nível genômico, os ensaios de PCR têm se mostrado relativamente satisfatórios no que se refere à sensibilidade e especificidade (revisado por Desquesnes & Dávila, 2002). Masiga *et al.* (1992) desenvolveram iniciadores espécie-específicos baseados no DNA satélite (TVW1 e TVW2) para serem utilizados como diagnóstico de *T. vivax*. Já Masake *et al.* (1997) desenvolveram um par de iniciadores (ILO1264, ILO1265) que se ligam a uma região genômica do *T. vivax* que codifica um antígeno. Ventura *et al.* (2001) desenvolveram iniciadores para amplificar o gene do mini-exon e Morlais *et al.* (2001) desenvolveram iniciadores (TVMF e

TVMR) para amplificar microsátelite de *T. vivax*, mais sensíveis do que o par de iniciadores TVW1 e TVW2. Mais recentemente, foi desenvolvido por Dávila (2002) um ensaio de PCR baseado no locus ITS1 do DNA ribossomal (rDNA), que tem se mostrado útil no diagnóstico molecular diferencial.

Apesar dos métodos desenvolvidos, ensaios mais sensíveis e espécie-específicos são necessários para o diagnóstico de *T. vivax*.

1.6 – Caracterização molecular

Apesar da grande relevância econômica da doença causada por *T. vivax*, poucas pesquisas sobre sua caracterização foram realizadas até agora comparadas com os tripanosomas que afetam a saúde humana como *T. brucei* e *T. cruzi*. Ao pesquisar o portal Entrez do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>, acessado em 24/05/05) usando “*Trypanosoma vivax*” como palavra chave, foi observado apenas 447, 27, 23 e 5 entradas disponíveis nas seções de PubMed, proteína, nucleotídeo e estrutura, respectivamente, mostrando o limitado conhecimento desta espécie, quando comparado com 5.417, 7.334, 99.036 e 45 entradas disponíveis nas respectivas seções quando a palavra chave usada é “*Trypanosoma brucei*” (tabela 1.1). A principal razão para esta falta de informação é a dificuldade de cultivar esta espécie tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Gathuo *et al.*, 1987; Gardiner, 1989; Dirie *et al.*, 1993a). Devido à grande dificuldade na obtenção de grandes quantidades de parasita, a biologia do *T. vivax* é pouco entendida e poucos marcadores foram descritos para a sua caracterização molecular. Em roedores de laboratório a adaptação só teve êxito com cepas africanas após longas passagens (Clarkson & McCabe, 1969), algumas cepas do Oeste, como Zaria Y58, Zaria Y486 e Zaria V953 (Nigéria) (Leefflang, 1976) e do Leste da África, como IL 2005 e IL 2006 (Uganda), IL V-11 e IL V-12 (Quênia) (Gathuo *et al.*, 1987) foram adaptadas a roedores. Adicionalmente, a maioria dos isolados não podem ser caracterizados por RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), pois as parasitemias são muito baixas dificultando a separação dos parasitas do sangue do hospedeiro para a posterior purificação do DNA do parasita (revisado por Desquesnes & Dávila, 2002).

Estas características têm limitado a pesquisa do *T. vivax* durante as últimas décadas e por estas razões, é necessário identificar e caracterizar novos alvos moleculares. A identificação e utilização de marcadores do tipo espécie-específicos são de grande relevância para o diagnóstico e tipificação molecular, particularmente em amostras de campo e com espécies que são difíceis

de manipular no laboratório, como é o caso do *T. vivax*.

Os marcadores utilizados até agora têm mostrado que existem no mínimo dois grupos bem diferenciados de *T. vivax*, um no Leste e outro no Oeste da África. Dados morfométricos (Dávila *et al.*, 1997) e RAPD (Dirie *et al.*, 1993a) sugeriram a provável chegada do parasito do Oeste africano, conforme proposto por Curasson (1943). Adicionalmente, usando RAPD com algumas cepas de *T. vivax*, Dirie *et al.* (1993b) mostraram que as cepas do Oeste da África são mais relacionadas com as cepas da América do Sul. Este dado foi corroborado por Dávila (2002), que utilizando o ITS rDNA mostrou que as cepas do Oeste da África são mais relacionadas filogeneticamente com as da América do Sul, bem como a existência de 2 grupos bem diferenciados de *T. vivax* na África. Este mesmo autor mostrou também, que o ITS rDNA não apresentou variação suficiente para poder discriminar intra-especificamente as cepas da América do Sul, por isso é necessário a identificação de um marcador mais polimórfico que permita a discriminação entre cepas, ajudando na obtenção de informação sobre que genótipos estariam circulando na região. Segundo Ventura *et al.* (2001) a amplificação de seqüências de genes spliced-leader (ou mini-exon) de cepas de *T. vivax* de gado do Pantanal foram comparadas com as das cepas do Oeste da África (Nigéria) e apresentam uma alta similaridade entre as seqüências intergênicas.

Tabela 1.1 – Entradas disponíveis nas seções do Entrez (NCBI) em 25 de Maio de 2005.

	<i>Trypanosoma vivax</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>	<i>Trypanosoma congolense</i>	<i>Trypanosoma evansi</i>
Nucleotídeo	23	42.918	9.9036	85	118
Proteína	27	18.88	7.334	91	91
Estrutura	5	56	45	0	0
PubMed	447	7.485	5.417	952	461

1.7 – GSS e estudo do genoma

Considerando a importância econômica desta espécie, bem como a falta de marcadores para sua tipificação, se faz necessário a elaboração de um projeto para a descoberta de novos marcadores e comprovação de que eles realmente são espécie-específicos. Os melhores métodos para a descoberta rápida de genes, descritos até o momento, são GSS (Genome Sequence Survey)

(Peterson *et al.*, 1991; 1993) e EST (Expressed Sequence Tags) (Adams *et al.*, 1991). As seqüências produzidas pelo seqüenciamento de EST podem representar a expressão de genes estágio-específico, enquanto que as seqüências obtidas por GSS representam o DNA genômico. Essas ferramentas são poderosas na geração de sondas genes-específicos para estudos de mapeamento e para confirmação de anotação *in silico* de genomas (Carlton *et al.*, 2001). Além dessas duas técnicas, existe ainda a técnica de ORESTES (ORF Expressed Sequence Tags) (Dias-Neto *et al.*, 2000), que permite seqüenciar a parte central dos genes. Esta técnica descreve a informação contida na porção central das moléculas de RNA mensageiro, enquanto as outras técnicas partem de suas extremidades.

EST são seqüências derivadas de DNA complementar (cDNA) sintetizadas a partir de RNA mensageiro (mRNA) e permite a descoberta de novos genes funcionais e identificação de regiões codificantes nas seqüências genômicas. Esta técnica oferece a maneira mais rápida de obtenção de seqüências gene-específicas de um grande número de moléculas de cDNA. EST foi utilizado na descoberta de genes em *Toxoplasma gondii* (Ajioka *et al.*, 1998), *Schistosoma mansoni* (Franco, 1995), *T. brucei rhodesiense* (El-Sayed *et al.*, 1995) *Plasmodium falciparum* (Chakrabarti *et al.*, 1994) e *T. cruzi* (Verdún *et al.*, 1998).

GSS são seqüências curtas a partir de DNA genômico fragmentado randomicamente. Essa técnica tem permitido levantar informações de genes e revelado um panorama geral dos principais genes de um determinado organismo. Essa abordagem tem se mostrado satisfatória em genomas com baixa concentração de íntrons, como no caso dos genomas densos dos tripanosomatídeos e de outros microorganismos (Carlton *et al.*, 2001; Sánchez *et al.*, 2001).

A estratégia de geração de GSS tem se mostrado tão satisfatória quanto a de EST para descoberta de genes em *T. b. rhodesiense* (El-Sayed & Donelson, 1997). Porém, no geral em eucariotos, grande parte do genoma não codifica para proteínas, fazendo com que GSS seja mais apropriada para a descoberta de regiões intergênicas, íntrons, pseudogenes, regiões repetitivas, dentre outras. Estas regiões genômicas são de especial interesse devido a que podem evoluir mais rapidamente que as regiões que codificam para proteínas, representando possíveis marcadores espécie-específicos úteis para a tipificação molecular do *T. vivax*.

Através da geração de GSS é possível gerar novos dados do genoma de *T. vivax*, realizar uma anotação preliminar destas seqüências e obter conhecimento sobre o genoma e a biologia desta espécie, sendo assim, estas seqüências obtidas poderão representar marcadores potenciais para o diagnóstico e tipificação de *T. vivax*. A obtenção de um perfil do genoma de *T. vivax* através da geração de GSS tem sua originalidade baseada nos poucos estudos de biologia

molecular deste protozoário, além de possibilitar a abertura de caminhos para a descoberta de alvos marcadores moleculares espécie-específicos e o desenvolvimento de novos testes diagnósticos moleculares precisos e sensíveis (El-Sayed & Donelson, 1997).

Atualmente, o genoma do *T. vivax* está sendo seqüenciado pelo Sanger Institute Pathogen Sequencing Unit (PSU), financiado pelo The Wellcome Trust e irá servir como um recurso de genômica comparativa para complementar os genomas de *T. congolense* e de *T. brucei*, os quais estão atualmente sendo seqüenciados em colaboração entre o PSU e The Institute for Genomic Research (TIGR), além dos genomas de *T. cruzi*, *L. major*, *L. infantum* e *L. braziliensis*. A cobertura atual do seqüenciamento do *T. vivax* é de cinco vezes o tamanho estimado do genoma (http://www.sanger.ac.uk/Projects/T_vivax/overview.shtml, acessado em 07/05/05), sendo considerado como o passo inicial para o estudo do genoma do *T. vivax*.

1.8 – Minicírculos

Os tripanosomatídeos apresentam uma única e grande mitocôndria que contém o DNA do cinetoplasto chamado kDNA e consiste em um grande rede de círculos de DNA concatenados e covalentemente ligados (Riou & Delain, 1969) (figura 1.6). Essas moléculas circulares são de dois tipos, os maxicírculos e os minicírculos (Simpson, 1986; 1987). O kDNA representa aproximadamente 10-15% do DNA total da célula (Lukes *et al.*, 2002).

Os maxicírculos são as moléculas circulares maiores, variam entre 20 e 50 cópias por rede (Simpson, 1986) e apresentam um tamanho que varia de 20 a 40 kb, dependendo da espécie. Eles são funcionalmente equivalentes ao nosso DNA mitocondrial, mas contém vários genes cujos produtos requerem modificação pós-transcricional (Estevez & Simpson, 1999). São homogêneos em seqüência (Borst *et al.*, 1985) e contém genes para RNAs ribossomais, genes estruturais, várias proteínas componentes da cadeia respiratória e vários RNA guias (gRNAs) (Savill & Higgs, 2000).

Os minicírculos são os menores e mais abundantes componentes da rede de kDNA, variam entre 5.000 a 50.000 por rede (Simpson, 1986) e possuem um tamanho que varia de 465 pb (*T. vivax*) a 2,5 kb (*C. fasciculata*), porém foi observado minicírculos maiores em *Trypanosoma avium* (tabela 1.2). São geralmente quase idênticos em tamanho, mas são heterogêneos em seqüência (Lukes *et al.*, 2002). Eles codificam a maioria dos gRNAs, que estão

envolvidos no processo de edição dos transcritos do maxicírculo, através da inserção e deleção de resíduos de uridina em sítios específicos dos transcritos (Lukes *et al.*, 2002).

Os minicírculos são na maioria dos casos heterogêneos dentro de uma dada espécie e quase completamente diferentes entre as espécies de tripanosomas (Stuart, 1983). Cada conjunto de minicírculos com seqüência particular é referido como uma classe, e a distribuição de cada classe pode variar entre os isolados, sendo que o grau de heterogeneidade varia entre espécies (Simpson, 1986). Em alguns podem existir um grande número de classes diferentes, como é o caso dos minicírculos de *T. brucei*, que apresentam no mínimo 250 seqüências de classes distintas, já *T. equiperdum* é um dos poucos parasitas da Ordem Kinetoplastida que possuem uma população homogênea de minicírculos (Pollard & Hadjuk, 1991).

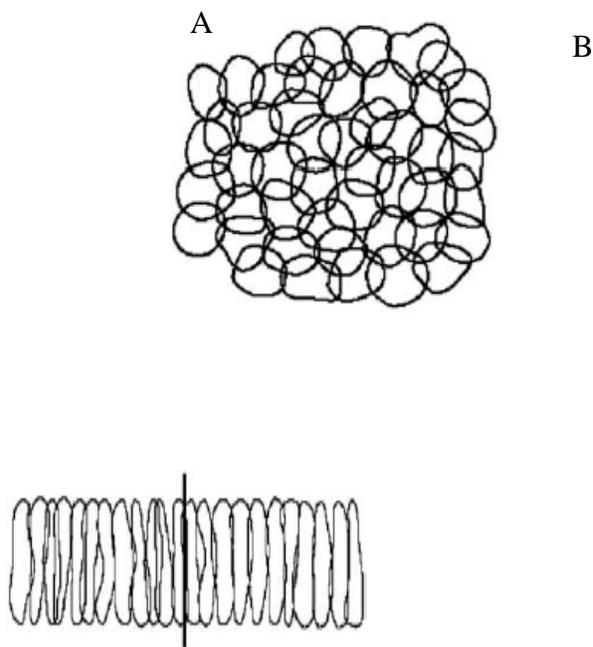


Figura 1.6 - Organização da rede de DNA do cinetoplasto (kDNA). (A) um segmento de uma rede de kDNA planar isolada. (B) um diagrama da rede de kDNA *in vivo*, condensada em forma de disco, dentro do cinetoplasto (reproduzido de Shlomai, 2004).

Os minicírculos podem apresentar de uma a quatro regiões conservadas, representando aproximadamente 10% da molécula, e um número igual de regiões variáveis dependendo da espécie (Simpson, 1997). A região variável é maior que a região conservada, e é onde se encontram as seqüências que codificam os gRNAs. O fato de indivíduos de uma mesma espécie possuírem um alto grau de heterogeneidade da região variável sugere que ocorre uma evolução diferencial entre a região conservada e a região variável (Rogers & Wirth, 1987). Essa heterogeneidade das seqüências permite a utilização dos minicírculos em diagnóstico, em epidemiologia e possui uma importância taxonômica, pois comparações feitas a partir do estudo de regiões heterólogas de diferentes minicírculos podem ser utilizadas na classificação de tripanosomatídeos ao nível de gênero e espécie (Morel *et al.*, 1980; Camargo *et al.*, 1982; Lopes *et al.*, 1984). Ao mesmo tempo, foi observado que a região variável dos minicírculos pode ser explorada para tipificação molecular como foi feito em *Trypanosoma cruzi* (Avila *et al.*, 1990).

Tabela 1.2 – Diferentes tamanhos de minicírculos de parasitas da Ordem Kinetoplastida.

Espécies	Tamanho em pb
<i>Trypanosoma vivax</i> (Borst <i>et al.</i> , 1985)	465
<i>Trypanosoma evansi</i> (Songa <i>et al.</i> , 1990)	999
<i>Trypanosoma brucei</i> (Metzenberg & Agabian, 1994)	1014
<i>Trypanosoma equiperdum</i> (Recinos <i>et al.</i> , 1994)	1012
<i>Trypanosoma congolense</i> (Myler, 1993)	958 / 962
<i>Trypanosoma rangeli</i> H9 (Recinos <i>et al.</i> , 1994)	1.587 / 1.764
<i>Trypanosoma cruzi</i> Y (Ávila, 1990)	1423
<i>Trypanosoma avium</i> A1412 (Yurchenko, 1999)	9480
<i>Leishmania donovani</i> (Smyth <i>et al.</i> , 1992)	805
<i>Phytomonas</i> sp. (Sa-Carvalho <i>et al.</i> , 1993)	1.457
<i>Crithidia fasciculata</i> (Sugisaki & Ray, 1987)	2.515

Em geral, apesar de serem homólogas entre indivíduos de uma mesma espécie, as regiões conservadas possuem pouca semelhança entre espécies diferentes, com algumas exceções, como é o caso de *T. brucei* e *T. equiperdum* que são bastante próximas (Barrois *et al.*, 1981). Cada

região conservada varia de 100-200 pb e contém três blocos de seqüências conservadas (CSB) que foram identificadas em diferentes espécies de tripanosomatídeos, chamadas CSB-1, CSB-2 e CSB-3 (figura 1.7). Dentro da CSB-3 há uma seqüência de 12 pb, que é conservada entre todos os parasitas da Ordem Kinetoplastida, chamada UMS (Universal Minicircle Sequence), e foi proposto que essa UMS serve como origem para a replicação contínua da fita-L (light) (*oriL*) do DNA do minicírculo (Ray, 1989). Já a CSB-1 estaria participando do processo de replicação descontínua da fita-H (heavy), ela contém no centro uma seqüência hexamérica bastante conservada em todos os tripanosomatídeos e que faria parte da *oriH* (Ray, 1989; Abu-Elneel *et al.*, 1999). A seqüência da região conservada é amplamente usada como marcador genético na filogenia de tripanosomatídeos (Jirku *et al.*, 1995). O grau de homologia encontrada entre a região conservada dos minicírculos de diferentes tripanosomatídeos pode ser utilizado como um critério taxonômico, por exemplo, se espera um alto grau de homologia entre os minicírculos de *T. cruzi* e *T. lewisi* por serem ambos tripanosomas da seção stercoraria (aqueles que são transmitidos através das fezes do vetor) do que entre *T. cruzi* e algum tripanosoma da seção salivaria (aqueles que são transmitidos através das glândulas salivares), como por exemplo *T. brucei* e *T. vivax*, e menos ainda com diferentes espécies do gênero *Leishmania* (Macina *et al.*, 1986).

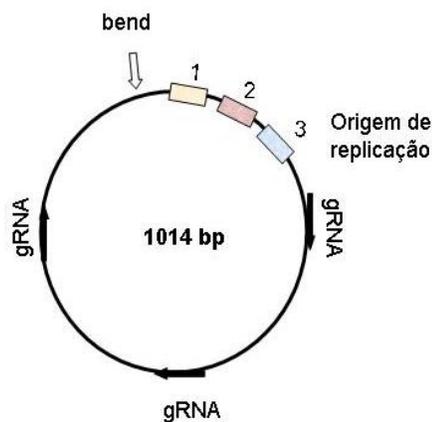


Figura 1.7 – Esquema de um minicírculo de *Trypanosoma brucei*. O minicírculo desta espécie apresenta apenas uma região conservada (note as três CSBs) e uma região variável (esquema reproduzido de acordo com Simpson, 1997).

Os minicírculos do *T. vivax* foram previamente investigados por Borst *et al.* (1985), por microscopia eletrônica e através da medida do contorno do comprimento de minicírculos livres, em uma preparação de kDNA rompido por sonicação, estes autores observaram a presença de duas classes de minicírculos: uma de 934 pb (0,31 μ M), que foi do mesmo tamanho que de *T. brucei* e uma classe menor de 465 pb (0,15 μ M), que foi o menor tamanho de minicírculo encontrado até agora. A relação do número de minicírculos grandes:pequenos foi de 1:6 em redes analisadas após sonicação (Borst *et al.*, 1985). Porém, estes mesmos autores não conseguiram observar os minicírculos de 934 pb em análise de gel de agarose dos minicírculos de *T. vivax*, levantando a suspeita que essa classe maior de 934 pb fossem dímeros dos minicírculos de 465 pb. Apesar dos minicírculos de *T. vivax* terem sido previamente investigados por Borst *et al.* (1985) (figura 1.8), suas seqüências não foram determinadas e não estão disponíveis nos bancos de dados, conseqüentemente não existem estudos com este locus em *T. vivax*.

Em uma pesquisa no PubMed do portal Entrez, NCBI feita em 25 de maio de 2005, apenas dois artigos estão relacionados a kDNA de *T. vivax*, um trabalho de Borst *et al.* (1985), já citado anteriormente e outro mais recente de Masiga e Gibson (1990). E nenhuma seqüência foi observada ao procurar na seção de nucleotídeos, fazendo-se necessário maiores estudos sobre os minicírculos deste parasita.

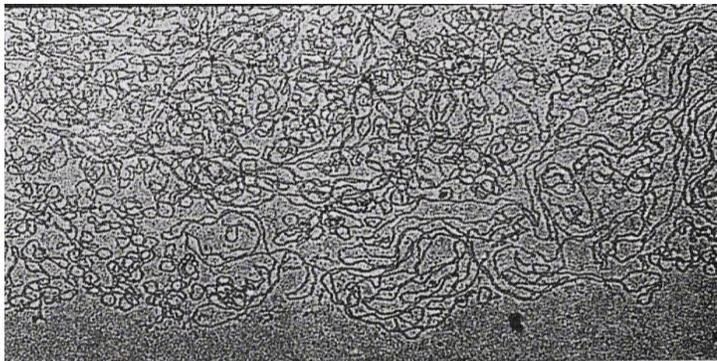


Figura 1.8 – Micrografia eletrônica (5500X) de uma rede de DNA do cinetoplasto (kDNA) de *Trypanosoma vivax* (Borst *et al.*, 1985).

2 – Objetivos

2.1 - Geral

Identificar e caracterizar os minicírculos de DNA de cinetoplasto (kDNA) de *Trypanosoma vivax*.

2.2 - Específicos

- a) Gerar, a partir de uma biblioteca genômica de *T. vivax*, seqüências do tipo GSS.
- b) Analisar e anotar preliminarmente as GSS de *T. vivax* geradas.
- c) Avaliar a utilidade dos minicírculos de kDNA de *T. vivax* como marcadores moleculares para caracterização intra-específica.

3 – Materiais e Métodos

3.1 – Construção da biblioteca genômica

O DNA genômico do clone ILDat 2160, da cepa Zaria Y486 obtida de uma infecção natural de uma vaca Zebu da Nigéria, Oeste da África (Leeflang *et al.*, 1976), foi gentilmente cedido pelo Dr. Noel Murphy do ILRI (International Livestock Research Institute). Este DNA foi utilizado para a construção da biblioteca genômica de *T. vivax*. Segundo o protocolo padrão de Sambrook e Russel (2001), 2 µg do DNA genômico de *T. vivax* foi digerido com a enzima de restrição *Sau3A* (Promega), por 2 horas a 37°C. Após digestão, os fragmentos de DNA obtidos foram ligados no sítio *Bam*HI (Promega) do vetor plasmidial pUC18 (Invitrogen) previamente digerido, através da enzima T4 ligase a 4°C por 12 a 18 horas. As ligações foram transformadas em células competentes, *Escherichia coli* DH5α através de choque térmico. Em seguida os produtos das transformações foram plaqueados em meio LB (Luria-Bertani)-ágar suplementado com ampicilina a 100 µg/mL, X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactosídeo) a 2% e IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo) (American Analytical) a 100 mM para a seleção dos clones contendo inserto. As placas foram incubadas a 37°C por 12 a 18 horas. As colônias foram armazenadas em solução de glicerol (10%) e meio de cultura LB no volume 1:1, e estocadas em freezer – 70°C □

3.2 – Hibridização da biblioteca genômica

As bibliotecas genômicas foram diluídas nas concentrações 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} , visando a obtenção de no máximo 500 colônias por placa. Para a primeira concentração, 10 μ L da biblioteca genômica foi diluída em 990 μ L de meio LB. Para a segunda e terceira concentração, 10 μ L da diluição anterior correspondente foi diluído em 990 μ L de meio LB. Para a quarta diluição 100 μ L da diluição anterior foi diluído em 900 μ L de meio LB e para a última concentração, 10 μ L da terceira diluição foi diluído em 990 μ L de meio LB. 100 μ L de todas as diluições foram plaqueadas e as placas foram incubadas a 37°C por 12 a 18 horas.

As colônias das placas foram transferidas para membranas de nylon (Amersham) de acordo com Sambrook e Russel (2001). Para a desnaturação do DNA, foi utilizado nas membranas 1 mL de uma solução de 0,5 M NaOH + 1,5 M NaCl por cinco minutos. Imediatamente, foi utilizado nas membranas 1 mL de uma solução de 0,5 M tris HCl pH 7,4 + 1,5 M NaCl durante cinco min. por duas vezes para a neutralização da reação. A fixação das colônias à superfície da membrana foi feita através de radiação ultravioleta no Stratilinker UV Crosslinker 1800 (Stratagene) por aproximadamente 25-50 segundos a 0,12 J/cm².

As membranas foram envolvidas em uma rede de nylon e colocadas em uma garrafa onde foi adicionado 15 a 20 mL de solução de pré-hibridização QuickHyb (Stratagene), por 30 min. a 60°C. As seguintes seqüências de regiões repetitivas disponíveis no GenBank foram utilizadas como sonda para evitar o seqüenciamento dos clones mais abundantes de *T. vivax*: DNA satélite (TVW) (Masiga *et al.*, 1992), spliced-leader (ME5) (Ventura *et al.*, 2001), 18S rDNA (Cupolillo *et al.*, 1995) e 5,8S rDNA (Dávila, 2002), gene codificante para antígeno (ILO5) (Masake *et al.*, 1997). A marcação das sondas foi realizada de acordo com o protocolo padrão de Sambrook e Russel (2001), com um volume final de 20 μ L por reação com: 5 pmol/ μ L dos oligonucleotídeos, 10 U/ μ L da enzima T4 polinucleotídeo quinase, solução tampão 10X e [γ -32P] ATP radioativo (Amersham) na concentração 0,001 mCi/ μ L durante 30 min. a 37°C. As sondas foram, então, adicionadas às garrafas e a hibridização realizada por 2 horas e 30 min. a 65°C. Após a hibridização, as membranas foram lavadas três vezes em solução 1 X SSC / 0,5% SDS a 55°C por 30 min. e expostas a um filme de raio-x (Kodak) a - 70°C por 12 a 18 horas, quando o filme foi revelado para a identificação de colônias positivas.

3.3 – Seleção de clones e extração de DNA plasmidial (Mini-prep)

Apenas as colônias não marcadas com as sondas foram selecionadas e crescidas em tubos com 6 mL de meio de cultura LB, suplementado com ampicilina (American Analytical) a 100 µg/mL, a 37°C no agitador a 200 rpm por 12 a 18 horas. O DNA plasmidial foi obtido através do método de boiling-prep por fervura (Sambrook & Russel, 2001) e digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *PstI* (Promega), por 2 horas a 37°C, para a verificação da presença de insertos.

Posteriormente, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose: 4 µl de tampão de amostra 6X (Azul de bromofenol 0,25% p/v, Xileno Cianol 0,25% p/v e 30% Glicerol v/v) foi adicionado a 20 µl do produto da digestão, e todo o volume foi resolvido em gel de agarose 1% (Invitrogen) em TBE 1X (Tris Base 0,089 M / Ácido Bórico 0,089 M / EDTA 0,5M pH 8,0) (SIGMA) corado com brometo de etídeo 0,12 µg/ml (SIGMA), em uma fonte (Pharmacia) a 100 volts por 1 hora e 30 min. O DNA foi visualizado através da fluorescência emitida pelo brometo de etídeo associado ao DNA quando exposto a radiação ultravioleta de onda curta.

Apenas clones com tamanho de 0,5-3 kb foram selecionados para seqüenciamento e seu DNA plasmidial purificado com o Kit Miniprep QIAprep (Qiagen).

3.4 – Seqüenciamento

Os plamídeos previamente selecionados foram submetidos a seqüenciamento usando o kit Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) em um seqüenciador ABI 3730 (Applied Biosystems) seguindo as instruções dos fabricantes. Os iniciadores M13 forward (5' - GTA AAA CGA CGC CCA GT - 3') e M13 reverse (5' - AAC AGC TAT GAC CAT G - 3') foram utilizados para seqüenciar as extremidades dos plamídeos. A concentração dos iniciadores utilizados foi de 3,2 pmol e a reação de seqüenciamento foi realizada com o seguinte ciclo: 96°C por 25 segundos (desnaturação inicial); seguido de 25 ciclos: 96°C por 10 segundos (desnaturação), 50°C graus por 5 segundos (ligação dos iniciadores) e 60°C por 4 min. (extensão). Em seguida, os produtos de extensão foram purificados pelo método de purificação por etanol (Applied Biosystems) com o objetivo de retirar os nucleotídeos e iniciadores não incorporados. Após a purificação os produtos foram eletroinjetados com 1,5 KV por 15 segundos e eletreoluídos por 2 horas a 8,5 KV no seqüenciador.

3.5 – Análise *in silico* e anotação das seqüências geradas

Os cromatogramas obtidos do seqüenciamento foram submetidos ao programa Phred/Phrap/Consed (www.phrap.org) (Ewing *et al.*, 1998; Ewing & Green, 1998) para a análise da qualidade do seqüenciamento, bem como para a retirada da seqüência dos vetores. Apenas as seqüências com qualidade Phred>20 foram incluídas no processo de clusterização. As seqüências validadas pelo programa foram clusterizadas (agrupadas) através do programa CAP3 (Huang & Madan, 1999).

A análise da similaridade das seqüências foi realizada usando várias rotinas do programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (BLASTn, BLASTx e tBLASTx) (Altschul *et al.*, 1997) na versão standalone com as bases de dados: nt (seqüências nucleotídicas não redundantes) e nr (seqüências protéicas não redundantes) do GenBank (NCBI - National Center for Biotechnology Information); KINETO (nucleotídeos de kinetoplastidas), UNIPROT-SPROT, UNIPROT-TREMBL do EMBL-EBI (European Molecular Biology Laboratory – European Bioinformatics Institute); Repetitive Database (Banco de seqüências repetitivas) (RepBASE v. 9.10) do Genetic Research Institute; e Kineto-nt (minicírculos de Kinetoplastidas) construído usando seqüências do GenBank. Os bancos de dados curados CDD (Conserved Domain Database) e Interpro foram utilizados na busca por domínios.

Em todas as análises por BLAST, as seqüências geradas que apresentaram baixa ou nenhuma similaridade com os banco de dados utilizados, e estavam fora do limite estipulado (cut-off) de E-value 10^{-5} foram separadas para análise posterior.

Para a estimativa do conteúdo G+C, a presença de janelas abertas de leitura (ORFs) e genes hipotéticos, e os seus tamanhos, foi utilizado o programa Glimmer (Gene Locator and Interpolated Markov Modeler) (v.2.13) (Delcher *et al.*, 1999), o qual foi treinado com 12 CDs (seqüências codificantes) completas de *T. vivax* obtidas do GenBank, e também os programas Geecee e Sixpack do pacote de programas Jembooss (Carver & Bleasby, 2003). Todas as ORFs encontradas pelo Glimmer foram traduzidas por scripts em Perl nas 6 fases de leitura e depois comparadas através de BLASTp contra os bancos de dados Uniprot-Swissprot: UNIPROT-SPROT e UNIPROT-TREMBL.

Os genes hipotéticos encontrados com o Glimmer foram anotados utilizando o Gene Ontology (www.geneontology.org/) junto com BLASTx . O programa tRNAscan-SE (Lowe & Eddy, 1997) foi utilizado para pesquisas de genes tRNA nas seqüências obtidas.

Todas as seqüências encontradas através de BLAST que apresentaram similaridade com minicírculos foram submetidas a um alinhamento múltiplo utilizando o programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) para análise da região conservada.

Todas as análises de bioinformática foram realizadas localmente em servidores Intel Xeon bi-processados do consórcio BiowebDB (www.biowebdb.org).

3.6 - Hibridização com sonda de minicírculo

Um primer foi desenhado baseado na região CSB-3 dos minicírculos, denominado TV-CB3 (5' - GTG GGG TTC GAG AGG GTT GGT GTA AT -3'). Este primer foi utilizado como sonda na hibridização com a biblioteca genômica de *T. vivax* (de acordo com a seção 3.2), a fim de identificar diferentes minicírculos. As colônias marcadas pelas sondas foram selecionadas, de acordo com o protocolo descrito na seção 3.3, e seqüenciadas.

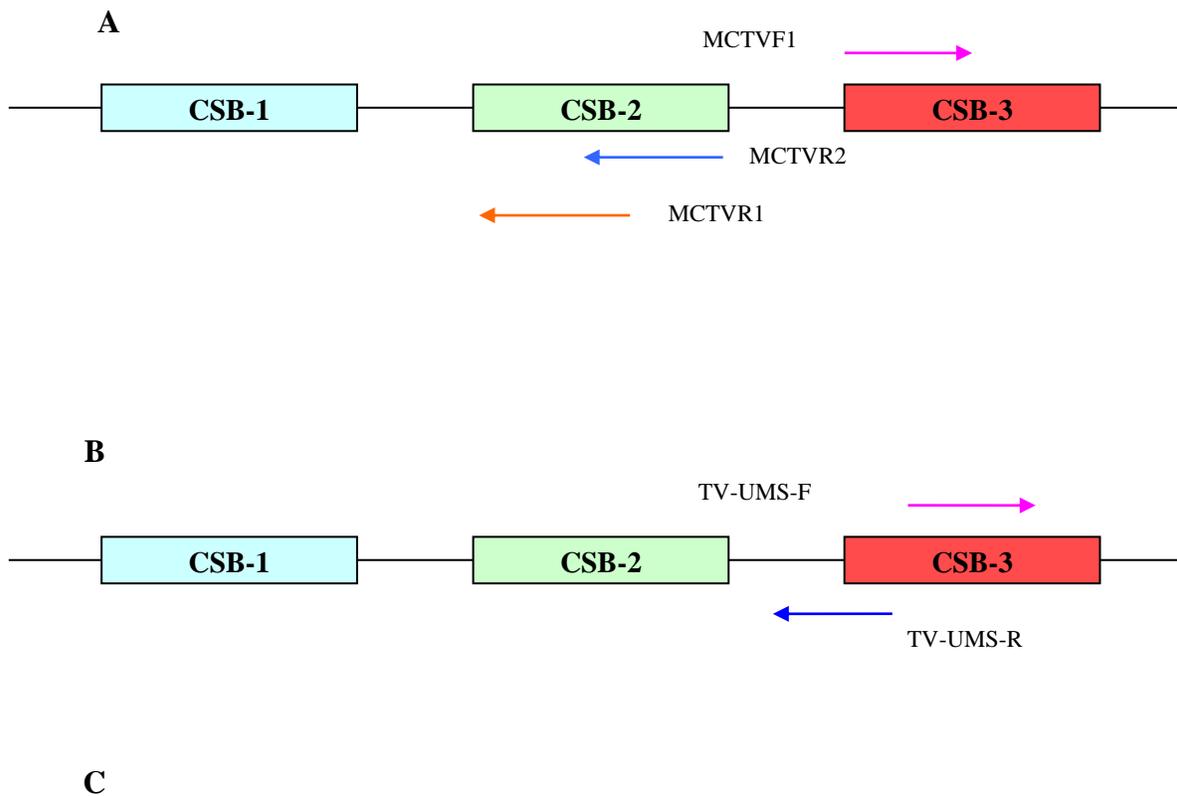
3.7 – Iniciadores baseados na região conservada dos minicírculos de kDNA

Foram empregados diferentes pares de iniciadores para obtenção, por PCR, das seqüências de minicírculos em diferentes cepas de *T. vivax*. Iniciadores A: MCTVF1 (5' - GTT CGA GAG GGG TTG GTG TA – 3'), MCTVR1 (5' - GAA TTT GGT ACG CAT CTA CGT AT – 3') e MCTVR2 (5' - AAA AGT TGA ACG CCC GTA AA - 3') (figura 3.1 A), testados entre eles para encontrar a melhor combinação (MCTVF1/MCTVR1 ou MCTVF1/MCTVR2). Iniciadores B: TVUMS-F (5' - CGA GAG GGG TTG GTG TAA TA – 3') e TVUMS-R (5' - TAC ACC AAC CCC TCT CGA AC -3') (figura 3.1 B). Iniciadores C: METV-UMS-F (5' - TCG GAG GGG TTG GTG TAA T -3') e METV-UMS-R (5' - TAC ACC AAC CCC TCT CGA AC

– 3’) (figura 3.1 C). Estes iniciadores foram desenhados com base na região conservada dos minicírculos, utilizando o programa Primer3 (www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3-www.cgi).

Os iniciadores A e B também foram utilizados como sonda, junto com a TV-CB3, para hibridizar com a biblioteca genômica de *T. vivax*, com o objetivo de obter diferentes minicírculos.

Os pares de iniciadores A, B e C foram testados quanto a sua sensibilidade de detecção de DNA de *T. vivax* em ensaios de PCR. Para esse teste foi utilizado o DNA da cepa ILDat 2160 nas seguintes concentrações: 100 µg, 10 µg, 1 µg, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg e 1 fg.



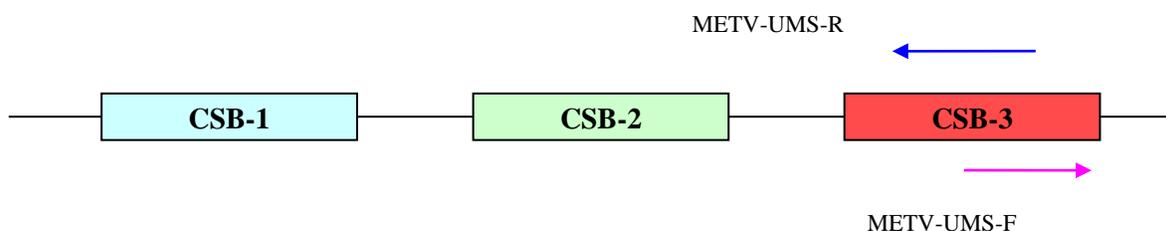


Figura 3.1 - Representação esquemática dos blocos de seqüência conservada do minicírculo de DNA do cinetoplasto (kDNA) apontando o local de ligação dos iniciadores utilizados na amplificação dos minicírculos de *Trypanosoma vivax*. (A), (B) e (C) local de ligação dos iniciadores A, dos iniciadores B e dos iniciadores C, respectivamente.

3.8 - Reação em cadeia da polimerase (PCR)

PCR com os iniciadores A, B e C foram realizadas para obtenção das seqüências de minicírculos em diferentes cepas de *T. vivax* (tabela 3.1).

O seguinte ciclo foi utilizado: 95°C/ 5 min.; então, 35 ciclos: 95°C/ 1 min. (temperatura de desnaturação), 60°C/ 1 min. (temperatura de ligação dos iniciadores), 72°C/ 1 min. (temperatura de extensão); extensão final 10 min. a 72°C. A temperatura de ligação variou para os pares de iniciadores B (55°C) e C (52°C).

Tabela 3.1 – Diferentes cepas de *Trypanosoma vivax* utilizadas nos ensaios de amplificação da região conservada dos minicírculos de DNA do cinetoplasto (kDNA) via PCR.

Cepa	Local	Ano de isolamento	Hospedeiro
Tv Banan 83 / CRTA / 73	Banan / Burkina Faso	1983	bovino
Tv Banan 87 / CRTA / 107	Banan / Burkina Faso	1987	bovino
Tv Lobi / CRTA / 282.1	Lobi / Burkina Faso	?	bovino
Tv Sarfalao 80 / CRTA / 1	Sarfalao / Burkina Faso	1980	bovino
Peru 43 CH	San Jorge / Peru	2000	bovino
Peru 3 CH	Pachacutec / Peru	2000	bovino

Ketri 1263	Lugala / Uganda	1969	mosca tsé-tsé
Ketri 1271	Lugala / Uganda	1969	mosca tsé-tsé
Ketri 2972	Okwata, S. Teso. Busia / Quênia	1987	bovino
Ketri 2067	Galana – Kapangani / Quênia	1972	cabra
Ketri 2783	Galana – Kapangani / Quênia	1986	bovino
Ketri 3085	Galana – Kapangani / Quênia	1988	bovino

Foi realizada uma padronização da PCR, onde diferentes concentrações de dNTPs e iniciadores foram testados com a cepa Y486, cuja concentração utilizada foi 0,25 ng. Foram utilizadas as concentrações de 180 μM , 217,5 μM e 254 μM de dNTPs. E as concentrações de iniciadores testados foram 0,1 μM , 0,2 μM , 0,3 μM , 0,5 μM e 1 μM .

Para o teste de sensibilidade dos iniciadores, o ciclo de PCR utilizado foi o mesmo descrito acima, apenas variando a temperatura de ligação até 50°C.

Os produtos de PCR foram resolvidos em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo como descrito em 3.3.

Após a eletroforese, os produtos da amplificação foram excisados e purificados com o kit de extração de gel QIAquick (Qiagen), clonados através do kit TOPO TA Cloning (Invitrogen) e transformados em células DH5 α . As colônias transformantes foram avaliadas quanto à presença de insertos e preparadas para o seqüenciamento conforme o descrito em 3.3.

4 - Resultados

4.1 – Geração e análise de GSS

4.1.1- Biblioteca genômica

As diluições das placas da biblioteca genômica que apresentaram os melhores resultados foram: 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} . Estas placas foram hibridizadas com as sondas das regiões repetitivas conhecidas de *T. vivax* (descritas na seção 3.2). As colônias que foram marcadas com as sondas foram excluídas, e foram selecionadas apenas as colônias negativas para hibridização, permitindo uma redução na redundância das seqüências obtidas, resultando na diminuição dos clones mais abundantes de *T.vivax*.

4.1.2 – Seqüenciamento, análise *in silico* e anotação das seqüências

Dos 1.086 clones obtidos, foram geradas 455 GSS de alta qualidade, que equivalem a 135.250 nucleotídeos, e 631 GSS de baixa qualidade que não foram incluídas no presente estudo. Das 455 seqüências válidas, 264 foram seqüências únicas (singlets) e 67 formaram agrupamentos (clusters), os quais são formados por 191 seqüências (reads). A soma dos singlets e clusters totalizam 331 seqüências não redundantes, denominadas GSS-nr (tabela 4.1).

O tamanho das GSS-nr obtidas variou de 100 pb, correspondente a três singlets (TVAD007003K16, TVAD007002H07 e TVAD007015D07) a 1.234 pb, correspondente a um cluster (TVAD007003K04) formado por 7 reads. O tamanho médio dos clusters (com um ou vários reads) foi 301 pb (tabela 4.2).

As GSS-nr foram submetidas a análises utilizando os programas do BLAST com os vários bancos de dados descritos na seção 3.5. A maioria do número de entradas (hits) encontrado foi com os bancos de dados nr do GenBank; TrEMBL, KINETO e Swiss-Prot do EMBL. O banco de dados que apresentou maior número de hits foi o nr com 3.302 hits, seguido dos bancos TrEMBL com 2.934 hits, KINETO com 1.111 hits, Swiss-prot com 864 hits, InterPro com 646 hits, CDD com 187 hits, Kineto-nt com 22 hits e RepBASE com apenas 11 hits.

Tabela 4.1 – Número de GSS de *Trypanosoma vivax* geradas no presente estudo e sua distribuição após a análise de agrupamento.

Resultado do seqüenciamento	Número
Clones seqüenciados	1.086
Seqüências de alta qualidade	455
Singlets	264
Clusters	67
Seqüências agrupadas em clusters	191
GSS-nr (clusters + singlets)	331
Seqüências descartadas	631

As análises com o programa Glimmer mostraram um total de 32 genes hipotéticos. O tamanho dos genes hipotéticos encontrado variou de 84 pb, correspondente aos singlets TVAD007002H10 e TVAD007200E04, e 498 pb correspondente ao singlet TVAD007001B07. O tamanho médio dos genes hipotéticos foi 222 pb (tabela 4.2).

A análise do conteúdo de G+C mostrou que o menor valor observado nas 331 GSS-nr foi 20,7%, correspondente ao singlet TVAD007002B06, e o maior conteúdo de G+C encontrado foi 95,5%, correspondente ao singlet TVAD007005M96, o conteúdo médio foi 51,6% (tabela 4.2).

O conteúdo de G+C também foi estimado para os genes hipotéticos. Dos 32 genes hipotéticos, o menor conteúdo de G+C encontrado foi 44%, correspondente aos singlets TVAD007002D10 e TVAD007200E04, e o maior conteúdo encontrado foi 64%, correspondente ao singlet TVAD007002C05, o conteúdo médio foi 56,7% (tabela 4.2). Foi realizada uma comparação do conteúdo de G+C dos clusters que possuíram genes hipotéticos (54,4%) contra os clusters que não possuíram genes hipotéticos (51,3%) e foi observada uma diferença de 3,1% a mais para os clusters que possuíram genes hipotéticos.

Apenas um tRNA hipotético (TVAD007005M96) foi encontrado nas GSS-nr de *T. vivax*, quando utilizado o modo de pesquisa “organellar”. E apenas uma similaridade significativa foi encontrada pelo FprintScan (InterPro) com a assinatura extensina rica em prolina (PR01217).

Tabela 4.2 – Resultado da análise do programa Glimmer, fornecendo o tamanho, e conteúdo de G+C, dos clusters e genes hipotéticos encontrados.

Tipo	Tamanho (pb)			Conteúdo de G+C (%)		
	menor	maior	média	menor	maior	média
GSS-nr *	100	1.234	301	20,7	95,5	51,6
Genes hipotéticos**	84	498	222	44	64	56,7

* n = 331, ** n = 32

Quando as GSS-nr foram submetidas a análises de similaridade utilizando os programas do BLAST e comparadas a nível de proteína e DNA com os bancos de dados descritos na seção 3.5, estas análises revelaram a presença de domínios de proteína em várias GSS-nr de *T. vivax*.

Estas GSS apresentaram similaridade com seqüências conhecidas de parasitas da Ordem Kinetoplastida e outros organismos em vários bancos de dados. O cut-off utilizado para inferir similaridade significativa a estas seqüências foi E-value $<10^{-5}$. As funções hipotéticas das proteínas encontradas nas GSS-nr foram apresentadas na tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Lista das GSS-nr de *Trypanosoma vivax* que apresentaram similaridade com seqüências conhecidas de parasitas da Ordem Kinetoplastida e outros organismos em banco de dados públicos, distribuídos em classes de função celular baseado no GO.

Função e nome do clone	Código ou número de acesso	Descrição	Organismo	Banco de dados	P	Score
Processo Biológico						
Proteólise						
TVAD007001E12	UBIQ_TRYBB	Ubiquitina	<i>T. brucei brucei</i>	Swiss-Prot	4.0e-10	64
TVAD007011B05	UBIQ_TRYBB	Ubiquitina	<i>T. brucei brucei</i>	Swiss-Prot	4.0e-12	69
TVAD007011H10	UBIQ_TRYCR	Ubiquitina	<i>T. cruzi</i>	Swiss-Prot	3.0e-08	56
Processo de desenvolvimento						
TVAD007005M96	26269	Extensina 2	<i>Core eudicots</i>	CDD	1.0e-37	148
TVAD007100A06	24679	Atrofina-1	<i>Eutheria (placentals)</i>	CDD	2.0e-06	46
TVAD007120B05	26269	Extensina 2	<i>Core eudicots</i>	CDD	9.0e-47	180
Processamento de DNA						
TVAD007001A08	EM_NEW:CF890591	Histona H4	<i>T. cruzi</i>	Kineto	2.0e-51	204
TVAD007001E07	AC136951	Proteína fator de splicing	<i>Leishmania major</i>	nt	4.0e-08	52
TVAD007003M72	27539	Histona H1	<i>Chlamydiaceae</i>	CDD	1.0e-06	46
TVAD007011C07	H3_LEIIN	Histona H3	<i>L. infantum</i>	Swiss-Prot	3.0e-06	49
TVAD007017D02	EMBL:L27660	Histona H3	<i>T. cruzi</i>	Kineto	2.0e-06	54
TVAD007018C07	L27659	Histona H3	<i>T. cruzi</i>	nt	9.0e-12	68
TVAD007100A06	24679	Histona H3	<i>L. infantum</i>	Swiss-Prot	3.0e-07	53
Transporte intracelular						
TVAD007001D12	AL499620	Complexo Vps53	<i>L. major</i> strain Friedlin	nt	2.0e-26	116
TVAD007100D12	AL499620	Complexo Vps53	<i>L. major</i> strain Friedlin	nt	9.0e-31	129
Elementos genéticos móveis						
TVAD007002F08	Q8T9M5	Retrotransposon hot spot	<i>T. brucei</i>	TrEMBL	3.0e-12	72
Metabolismo de nucleotídeos						
TVAD007003M65	AL398894	AMP deaminase	<i>L. major</i> strain Friedlin	nt	3.0e-10	63
Processo fisiológico						
TVAD007021A01	AI795168	Magnésio superóxido desmutase	<i>T. brucei brucei</i>	nt	5.0e-31	135
TVAD007021A02	AI795168	Magnésio superóxido desmutase	<i>T. brucei brucei</i>	nt	8.0e-33	141
TVAD007021A03	AI795168	Percursor de alatropina	<i>T. brucei brucei</i>	nt	9.0e-30	131
TVAD007021A04	AI795168	Percursor de alatropina	<i>T. brucei brucei</i>	nt	1.0e-32	141
TVAD007021A05	AI795174	Percursor de alatropina	<i>T. brucei brucei</i>	nt	8.0e-30	131
TVAD007021A06	AI795174	Percursor de alatropina	<i>T. brucei brucei</i>	nt	8.0e-30	131
TVAD007021A07	AI795168	Percursor de alatropina	<i>T. brucei brucei</i>	nt	9.0e-33	141
TVAD007021A08	AI795168	Percursor de alatropina	<i>T. brucei brucei</i>	nt	6.0e-33	141
TVAD007021A11	AA023881	Magnésio superóxido desmutase	<i>T. brucei brucei</i>	nt	5.0e-22	105
TVAD007021B01	AI795168	Percursor de alatropina	<i>T. brucei brucei</i>	nt	5.0e-28	125
TVAD007021B04	AI795168	Percursor de alatropina	<i>T. brucei brucei</i>	nt	4.0e-28	125
TVAD007021B05	AI795168	Magnésio superóxido desmutase	<i>T. brucei brucei</i>	nt	2.0e-26	119
Componente celular						

Mobilidade celular

TVAD007002C08	AQ653237	Dineína	<i>T. brucei</i>	nt	5.0e-36	147
TVAD007002C10	AC092736	Actina	<i>T. brucei</i>	nt	3.0e-17	86
TVAD007100B07	AL391562	Dineína	<i>L. major</i> strain Friedlin	nt	3.0e-89	325
TVAD007200F02	AQ653237	Dineína	<i>T. brucei</i>	nt	5.0e-31	130

Estrutura flagelar

TVAD007001B03	AC129009	Proteína paraflagelar	<i>L. major</i> strain Friedlin	nt	2.0e-30	131
TVAD007001B10	AF005193	Proteína paraflagelar	<i>T. cruzi</i>	nt	4.0e-29	127
TVAD007010B01	AQ651851	Proteína paraflagelar	<i>T. brucei</i>	nt	2.0e-12	72
TVAD007010F02	M97548	Proteína paraflagelar	<i>T. cruzi</i>	nt	2.0e-31	133
TVAD007010F06	AF005193	Proteína paraflagelar	<i>T. cruzi</i>	nt	4.0e-08	56
TVAD007015C06	M97548	Proteína paraflagelar	<i>T. cruzi</i>	nt	2.0e-31	133
TVAD007015C10	M97548	Proteína paraflagelar	<i>T. cruzi</i>	nt	3.0e-27	119
TVAD007016E11	EMBL:M97548	Proteína paraflagelar	<i>T. cruzi</i>	Kineto	7.0e-25	113
TVAD007018B02	M97548	Proteína paraflagelar	<i>T. cruzi</i>	nt	3.0e-24	109
TVAD007018B10	M97548	Proteína paraflagelar	<i>T. cruzi</i>	nt	4.0e-17	86
TVAD007018E01	M97548	Proteína paraflagelar	<i>T. cruzi</i>	nt	2.0e-31	133
TVAD007018F12	M97548	Proteína paraflagelar	<i>T. cruzi</i>	nt	4.0e-23	105

Cinetoplasto

TVAD007001B02	M19750	kDNA minicírculo	<i>T. congolense</i>	minicírculos	1.0e-06	43
TVAD007001B09	EMBL:X66923	DNA do cinetoplasto	<i>C. fasciculata</i>	Kineto	4.0e-06	54
TVAD007002A10	AQ445162	kDNA minicírculo	<i>T. cruzi</i>	nt	8.0e-06	50
TVAD007002G01	AF291716	kDNA minicírculo	<i>L. brasiliensis</i>	nt	4.0e-06	52
TVAD007002G07	AQ904936	kDNA minicírculo	<i>T. cruzi</i>	nt	2.0e-08	58
TVAD007005166	AQ904936	kDNA minicírculo	<i>T. cruzi</i>	nt	2.0e-08	58
TVAD007100B10	AQ904936	kDNA minicírculo	<i>T. cruzi</i>	nt	3.0e-08	58
TVAD007100C10	AF401099	kDNA minicírculo	<i>T. cruzi</i>	nt	3.0e-06	50
TVAD007120A01	AA052853	kDNA minicírculo	<i>T. brucei brucei</i>	nt	1.0e-14	80
TVAD007120B02	AA052853	kDNA minicírculo	<i>T. brucei brucei</i>	nt	8.0e-15	82
TVAD007200C02	AQ904936	kDNA minicírculo	<i>T. cruzi</i>	nt	2.0e-08	58
TVAD007200D01	M15511	kDNA minicírculo	<i>T. cruzi</i>	nt	6.8e-08	37
TVAD007200D07	M15511	kDNA minicírculo	<i>T. cruzi</i>	nt	8.0e-06	50
TVAD007200G01	M19190	kDNA minicírculo	<i>T. cruzi</i>	nt	8.0e-06	41
TVAD007700N94	M15511	kDNA minicírculo	<i>T. cruzi</i>	nt	2.0e-06	52
TVAD007800117	AQ444291	kDNA minicírculo	<i>T. cruzi</i>	nt	4.0e-06	47
TVAD007800165	AF401099	kDNA minicírculo	<i>T. cruzi</i>	nt	6.0e-08	56

Membrana

TVAD007003K04	5010	Proteína 45/70Kd	<i>Tymovirus</i>	CDD	2.0e-09	58
TVAD007003M83	AC087326	Adenilato ciclase	<i>T. brucei</i>	nt	2.0e-46	182

Núcleo

TVAD007009H10	continuação da tabela 4.3	Midasina	<i>T. brucei</i>	nt	5.0e-44	173
---------------	---------------------------	----------	------------------	----	---------	-----

Função molecular**Defesa / proteína de imunidade**

TVAD007002H05	AL499624	Sistema de transporte multidroga tipo ABC	<i>L. major</i>	nt	4.0e-57	194
TVAD007003M01	EMBL:AC096672	Glicoproteína variante de superfície (VSG)	<i>T. brucei</i>	kineto	3.0e-15	84
TVAD007003M12	AC096672	Glicoproteína variante de superfície (VSG)	<i>T. brucei</i>	nt	6.0e-29	125

Replicação de DNA

TVAD007002D08	AQ657065	RNA helicase II	<i>T. brucei</i>	nt	4.0e-28	119
---------------	----------	-----------------	------------------	----	---------	-----

Enzima

TVAD007001C12	AF359249	Treonina quinase	<i>T. brucei</i>	nt	3.0e-39	159
TVAD007002C04	AQ659772	Tioredoxina	<i>T. brucei</i>	nt	1.0e-04	48
TVAD007002G11	CAC14520	Fosfatase possível	<i>L. major</i>	nr	2.0e-11	68
TVAD007003K30	AA720380	ATP sintetase	<i>T. brucei</i>	nt	7.0e-19	91
TVAD007100B12	AQ431181	Acetil-CoA carboxilase	<i>T. brucei</i>	nt	1.0e-29	73
TVAD007100E07	BX543422	Fosfolipase A2	<i>L. brasiliensis</i>	nt	5.0e-07	36
TVAD007200H05	25296	Proteína quinase	<i>L. infantum</i>	CDD	4.0e-07	49
TVAD007700117	HL3B_ARATH	Fosfopantotnoiciteína sintetase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Swiss-Prot	7.0e-17	84

Metabolismo

TVAD007001A02	10280	Fructose-2,6-bisfosfatase	<i>T. brucei</i>	CDD	2.0e-24	105
Reparo de DNA						
TVAD007200E08	15765	Proteína PSP1 C-terminal	<i>L. major</i> strain Friedlin	CDD	9.0e-20	89
Regulador de transcrição / tradução						
TVAD007001A12	Q8RWB4	Proteína de domínio Ring finger	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TrEMBL	1.0e-09	64
TVAD007001G04	5398	Proteína de domínio WD40	<i>L. major</i>	CDD	3.0e-08	51
Transporte de íons						
TVAD007001F09	25919	Proteína transportadora de zinco	<i>L. major</i> strain Friedlin	CDD	2.0e-06	45
TVAD007001F10	AC103912	Citocromo C	<i>T. cruzi</i>	nt	4.0e-22	100
		Proteína de canal de potássio				
TVAD007100E01	25886		<i>T. brucei</i>	CDD	3.0e-10	59
TVAD007200F07	AC103912	Citocromo C	<i>T. cruzi</i>	nt	5.0e-15	76
Proteína hipotética						
TVAD007001A09	AL512293	Proteína hipotética	<i>L. major</i> strain Friedlin	nt	2.0e-06	35
TVAD007002F09	AI075532	Proteína hipotética	<i>T. cruzi</i>	nt	2.0e-07	50
TVAD007002G05	AI667941	Proteína hipotética	<i>T. cruzi</i>	nt	4.0e-10	61
TVAD007003K31	AC096672	Proteína hipotética	<i>T. brucei</i>	nt	7.0e-17	88
TVAD007003K34	AQ952263	Proteína hipotética	<i>T. brucei</i>	nt	3.0e-09	58
TVAD007014A07	XM_340362	Proteína hipotética	<i>T. brucei</i>	nt	2.0e-09	57
TVAD007015A10	AE017178	Proteína hipotética	<i>T. brucei</i>	nt	1.0e-13	71
TVAD007015E06	AZ218285	Proteína hipotética	<i>T. brucei</i>	nt	1.0e-06	50
TVAD007017G01	XM_340362	Proteína hipotética	<i>T. brucei</i>	nt	5.0e-10	59
TVAD007017G02	XM_340362	Proteína hipotética	<i>T. brucei</i>	nt	3.0e-10	54
TVAD007021A12	AA023881	Proteína hipotética	<i>T. brucei</i>	nt	1.0e-22	107
TVAD007100D04	AI456009	Proteína hipotética	<i>T. brucei</i>	nt	2.0e-21	97
TVAD007120A03	BF299436	Proteína hipotética	<i>T. cruzi</i>	nt	3.0e-08	58
TVAD007120A05	AA052883	Proteína hipotética	<i>T. brucei</i>	nt	5.0e-19	96
TVAD007120A09	BF299436	Proteína hipotética	<i>T. cruzi</i>	nt	3.0e-07	54
TVAD007120A10	BF299436	Proteína hipotética	<i>T. cruzi</i>	nt	3.0e-07	54
TVAD007120B04	BF299436	Proteína hipotética	<i>T. cruzi</i>	nt	1.0e-07	56
TVAD007200E05	AI707443	Proteína hipotética	<i>T. cruzi</i>	nt	5.0e-06	46
Número de seqüências com similaridade significativa (E-value < 10 ⁻⁵ como cut-off)						108
Número de seqüências sem hits significantes						205
Número de seqüências sem hits						18
Total						331

Seqüências com similaridade significativa utilizaram um E-value <10⁻⁵ como cut-off. Algumas das funções hipotéticas reveladas foram corroboradas *in silico* com análises realizadas utilizando o banco de dados de domínios de proteína: Conserved Domain Database (CDD) e InterPro. Foram obtidos um total de 36 hits com o CDD, 21 hits com o InterPro e 15 hits com ambos os bancos de dados. A lista destas funções hipotéticas é apresentada na tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Lista das GSS-nr de *Trypanosoma vivax* que apresentaram similaridade significativa (E-value <10⁻⁵) em análises comparativas contra bancos de dados de domínio de proteínas CDD e Interpro.

Nome do clone	Descrição	CDD		InterPro	
		acesso	E-value	acesso	E-value
TVAD007001A02	Fructose-2,6-bisfosfatase	10280	2.0e-24	IPR001345	1.4e-08
TVAD007001A08	Histona H4	14811	9.0e-17	IPR001951	2.1e-12
TVAD007001A12	Proteína de domínio Ring	14831	3.0e-11	IPR001841	1.3e-07

finger						
TVAD007001B03	Proteína paraflagelar	16444	4.0e-07			
TVAD007001B09	DNA do cinetoplasto			IPR001211		
TVAD007001C12	Treonina quinase	25296	3.0e-22	IPR000719	2e-32	
TVAD007001D12	Complexo Vps53	9659	9.0-12			
TVAD007001E07	Proteína de membrana	25873	2.0e-06			
TVAD007001E12	Ubiquitina	25454	1.0e-07			
TVAD007001H10	Midasina	14393	7.0e-20			
TVAD007002C04	Tioredoxina			IPR006662		
TVAD007002C08	Dineína	26007	7.0e-14			
TVAD007002C10	Actina	22736	5.0e-10	IPR004000	8.3e-06	
TVAD007002D08	RNA helicase II	10384	1.0e-07			
TVAD007002H05	Sistema de transporte multidroga tipo ABC	10852	1.0e-22	IPR003439	1.0e-15	
TVAD007003K04	Proteína 45/70Kd	5010	2.0e-09	IPR000276		
TVAD007003K30	ATP sintetase	17083	9.0e-09			
TVAD007003M72	Histona H1	27539	1.0e-06			
TVAD007005M96	Extensina 2	26497	4.0e-42	IPR003832	5.4e-07	
TVAD007010B01	Proteína paraflagelar	16444	5.0e-06			
TVAD007010F02	Proteína paraflagelar	16444	5.0e-06			
TVAD007011B05	Ubiquitina	5394	3.0e-08			
TVAD007011C07	Histona H3	383	6.0e-07			
TVAD007015C06	Proteína paraflagelar	16444	5.0e-06			
TVAD007018E01	Proteína paraflagelar	16444	5.0e-06			
TVAD007100A06	Atrofina-1	24679	2.0e-06			
TVAD007100B07	Dineinan	26007	7.0e-47			
TVAD007100B12	Acetil-CoA carboxilase	13908	2.0e-12			
TVAD007100D12	Complexo Vps53	9659	2.0e-12			
TVAD007100E07	Fosfolipase A2			IPR001221		
TVAD007100H03	Histona H3	383	7.0e-08	IPR009072	7.8e-06	
TVAD007120B02	kDNA minicírculo			IPR006209		
TVAD007120B05	Extensina 2	26269	9.0e-47	IPR003832	7.0e-07	
TVAD007200E08	Proteína PSP1 C-terminal	15765	9.0e20	IPR007557	2.1e-17	
TVAD007200F02	Dineína	26007	2.0e-13			
TVAD007200H05	Proteína quinase	25296	4.0e-07	IPR000719		
TVAD007700117	Fosfopantonoilcisteína sintetase	10326	1.0e-11	IPR003382	2.5e-17	
TVAD007001G04	Proteína de domínio WD40	5398	3.0e-08	IPR001680	2.9e-10	
TVAD007001F09	Proteína transportadora de zinco	25919	2.0e-06			
TVAD007001F10	Citocromo C			IPR000345		
TVAD007100E01	Proteína de canal de potássio	25886	3.0e-10	IPR003131	5.4e-08	
TVAD007200F07	Citocromo C			IPR000345		
Total:		42 seqüências				

Das 331 seqüências não redundantes, foi observado que 205 seqüências (61,93%) não apresentaram nenhum hit significativo quando utilizado o E-value $<10^{-5}$ como cut-off e 18 seqüências (5,78%) não apresentaram nenhum hit, quando comparado com todos os bancos de dados e algoritmos utilizados neste estudo.

4.1.3 - Classificação funcional das GSS-nr de *Trypanosoma vivax*

Foi realizada uma comparação das GSS-nr com as seqüências anotadas pelo Consórcio Gene Ontology (GO), essa comparação permitiu inferir a classificação funcional da maioria das seqüências de GSS-nr. Com base no GO, as 108 seqüências que apresentaram similaridade significativa (E-value $<10^{-5}$) foram relacionadas nas três categorias funcionais do GO (Ashburner

et al., 2000): processo biológico, componente celular e função molecular, e as seqüências que não foram relacionadas em nenhuma das três categorias foram classificadas como proteínas hipotéticas, e serão alvos de um estudo posterior. A figura 4.1 apresenta a distribuição das categorias definidas pelo GO, bem como o percentual representado por cada categoria.

Todos os resultados referentes à geração e análise de GSS de *T. vivax* apresentados neste estudo foram publicados no artigo “Exploring the genome of *Trypanosoma vivax* through GSS and *in silico* comparative analysis” que se encontra em anexo no final da dissertação.

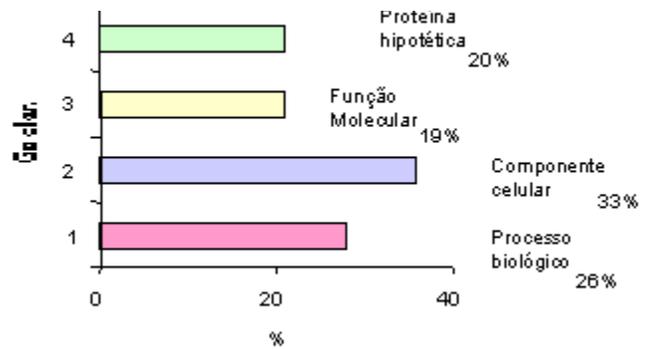
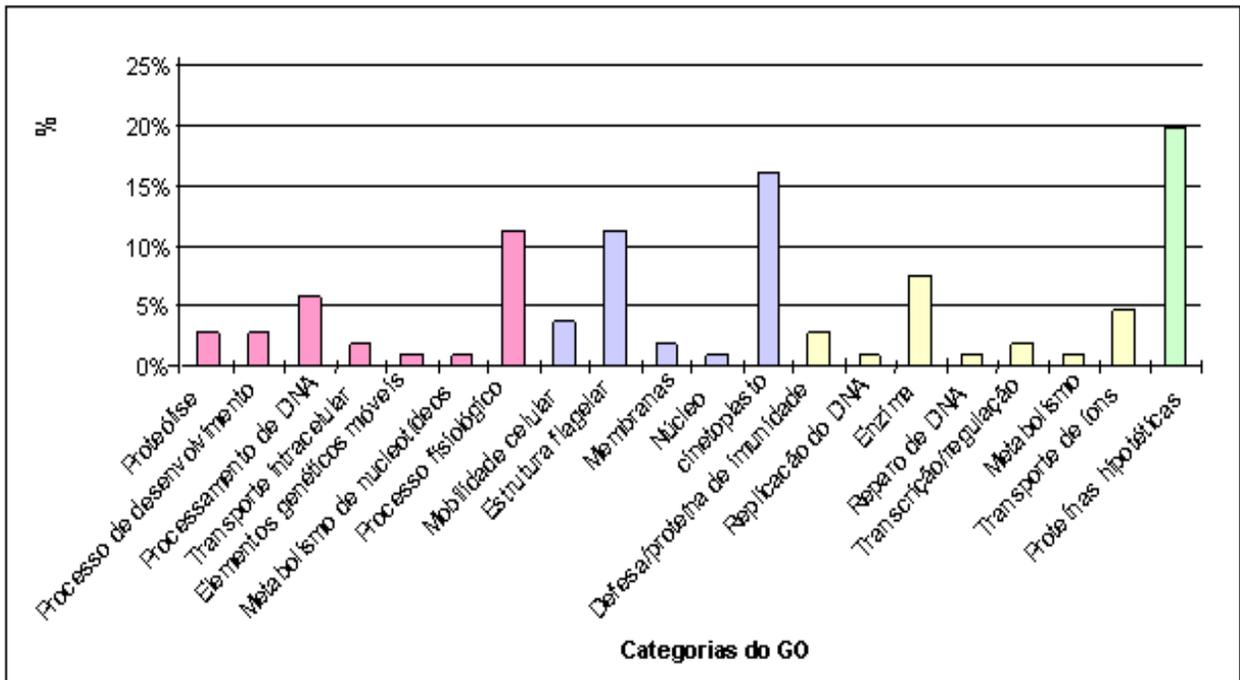


Figura 4.1 – Distribuição das classificações das GSS-nr de *Trypanosoma vivax* de acordo com as três categorias funcionais do Consórcio Gene Ontology e o percentual representado por cada categoria.

4.2 – Identificação e caracterização de minicírculos

4.2.1- Identificação de minicírculos

Das 331 GSS-nr submetidas a análises de similaridade, foram identificados como similares a minicírculos 17 clones, que foram agrupados em 8 clusters. Quando os clusters foram submetidos a um alinhamento múltiplo, os três blocos de seqüências conservadas (CSBs) foram identificados, e encontrada apenas uma região conservada, de aproximadamente 110 pb, nos minicírculos de *T. vivax* (figura 4.2).

A seqüência das três CSBs foram bastante conservadas nos minicírculos encontrados. Foi observado que a distância entre a seqüência da CSB-1 e a seqüência da CSB-2 foi de 21 nucleotídeos, enquanto a distância entre a seqüência da CSB-2 e a seqüência da CSB-3 foi de 56 nucleotídeos. A distância entre as CSBs se manteve regular em todos os minicírculos obtidos (figura 4.2). O tamanho médio observado nestes minicírculos foi de aproximadamente 480 pb. Apenas um clone (MC 100) apresentou variação na seqüência das CSBs, sendo observada na seqüência da CSB-1, e esta variação pode ser um indicativo da presença de um minicírculo diferente. Um esquema de um minicírculo de *T. vivax* é apresentado na figura 4.3.

MC100	CGTGCAGTCCGCGCGACTCGCGGGGCAC-- ATGGACGGCA -----TGATCGGAAAGTTGG
MC53	AGAAAAGTGT-CGAAATTCGTCAAAAATTT ACGGGCGTTCA ACTTTTATAGGTTTGATTG
MC115	CAAAAATCGC-TGACAAACCTCGAAATTTT ACGGGCGTTCA ACTTTTATGTGTTTATTATA
MC84	TGAAAAGCGT-TGAGAGAGGTCCAAAATTT ACGGGCGTTCA ACTTTTAAATGGATTTCTTG
MC21	GAAAAGTGGT-TGGTGAGTGCGGAAAATTT ACGGGCGTTCA ACTTTTGTAGTGGATTTACTC
MC94	TAAAATTTGG-TGAAATGTGTCGAAAATTT ACGGGCGTTCA ACTTTTGATTGGATTTATTC
MC102	AAGAGAGGAGGCGAAAATCGGCAAAAATTT ACGGGCGTTCA ACTTTTCATGAATTTGATG
MC106	CTAAACCCCGCGCAAAACCCCAAAAATTT ACGGGCGTTCA ACTTTGGTGGGAAAATACC
	* * * * *
MC100	CATACGTAG ACGCGTACGATAATAGTGGGATTTTCCGCTATAAA-AAGGGGAGGTGGGGT
MC53	AATACGTAG ACACGTACGATAATT-TGCCAAAACCGCTATAAATGAGGTGGGGTGGGGT
MC115	CATACGTAG ACGCGTACCAAAATATTGGGAATTTGGGGTATAAA-GAGGGGAGGTGGGGT
MC84	TATACGTAG GCTCGTACCAAAATTTGGTGAAAATGTGGGTATTCG-GGCCTAGGGTGGGGT
MC21	TATACGTAG ATGCGTGCCAAAATATTGAGAAAACAGCTTAAAAT-TAGGCGAGATGGGGT
MC94	GATACGTAG GCTCGCACCAAAATCCGGGGAAAATGAATGATTCT-GAGGGGAGGTGGGGT
MC102	GATACGTAG ATGCGTGCCAAAATTTCTGTGGTTTTGGGGTTTGGG-AAGGCTAGTTGGGGT
MC106	CATACGTAG ATGCGTACCAAAATTCCTCCCGTAAAATAGGGGATTTA-GAGGCCAGGTGGGGT
	***** ** * * * *

```

MC100      TCGAGAGGGGTTGGTGAATATAAAAGTT-----TGTGCTTAGT-----GAGAT
MC53       TCGAGAGGGGTTGGTGAATATAAAAGTTGA-----GTTGTATCTTGGGTGGTG-GGGGT
MC115      TCGAGAGGGGTTGGTGAATATAAAATAATT--TTAGTGTAGAACATATAATGGA-GTGTG
MC84       TCGAGAGGGGTTGGTGAATATAAAATTTTTA-TTTGTGTAGAGC----AGTGAG-TGGTG
MC21       TCGAGAGGGGTTGGTGAATATAAAGTTTGTCCGGCTTAGTGGAGTGTGAGTTAGT-ATGAT
MC94       TCGAGAGGGGTTGGTGAATATAAATCT-----AGTGAAGCGTGGGAGGG-----AT
MC102      TCGAGAGGGGTTGGTGAATATAAATCTTCCGGGGTTGGTGTACTCTTAAGATA-GTGTG
MC106      TCGAGAGGGGTTGGTGAATATAGTTGTGGG----TTGTACGGCTCGAGAGGGATGTGAG
*****

```

Figura 4.2 – Alinhamento dos clusters de *Trypanosoma vivax* que apresentaram similaridade com seqüências de minicírculos. As seqüências destacadas correspondem as CSBs. Azul – CSB-1, verde – CSB-2 e vermelho – CSB-3. É indicada com um asterisco (*) a posição onde todos os nucleotídeos da coluna foram idênticos e com um traço (-) o local onde houve gaps (espaços) no alinhamento. O programa utilizado para alinhamento foi o ClustalW (EBI).

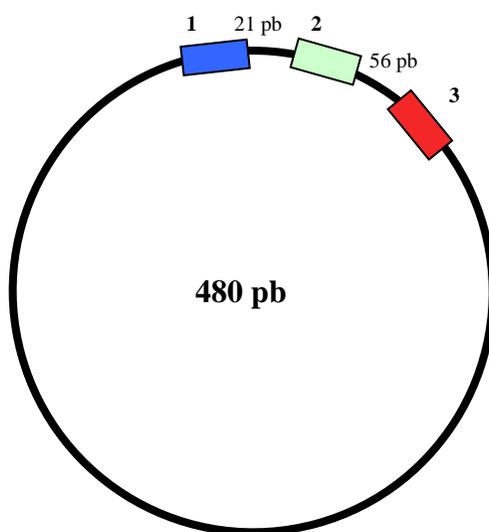


Figura 4.3 – Esquema de um minicírculo de *Trypanosoma vivax*. Os quadrados coloridos indicam as CSBs (azul – CSB-1, verde – CSB-2 e vermelho – CSB-3), que estão presentes na única região conservada encontrada.

4.2.2 – Hibridização com a sonda de minicírculo

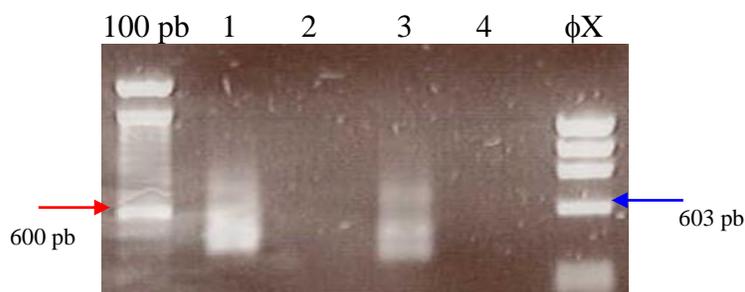
Quando a biblioteca genômica foi hibridizada com a sonda TV-CB3, poucas colônias positivas foram identificadas. Quando foram utilizados os iniciadores A e B como sonda, junto com a TV-CB3, em uma nova tentativa na obtenção de minicírculos, a quantidade de colônias positivas identificadas foi maior. Então, foram seqüenciados 26 clones obtidos com estas hibridizações. Após análise utilizando o BLAST, com a base de dados KINETO e nr, 8 clones só foram identificados como similares a minicírculos quando o cut-off utilizado foi E-value de 0.01, onde hits com a CSB-3 de *T. congolense*, *T. evansi*, *T. brucei* e *T. cruzi* foram encontrados.

4.2.3 – PCR com os iniciadores A

Das duas combinações de iniciadores utilizadas: MCTVF1/MCTVR1 e MCTVF1/MCTVR2, o primeiro par de iniciadores foi o que apresentou melhores resultados (figura 4.4 A e B). E de todas as concentrações de dNTPs e iniciadores testados, a que apresentou melhores resultados foi 217,5 μ M (figura 4.4 B) e 0,5 μ M (figura 4.5), respectivamente.

Depois de padronizada a PCR, esta foi realizada utilizando amostras de DNA de diferentes cepas de *T. vivax* de Burkina Faso, Oeste da África (figura 4.6); Uganda e Quênia, Leste da África, e do Peru, América do Sul (figura 4.7).

A



Legenda A

- 1 – MCTVF1/MCTVR1 +
- 2 – MCTVF1/MCTVR1 -
- 3 – MCTVF1/MCTVR2 +
- 4 – MCTVF1/MCTVR1 -

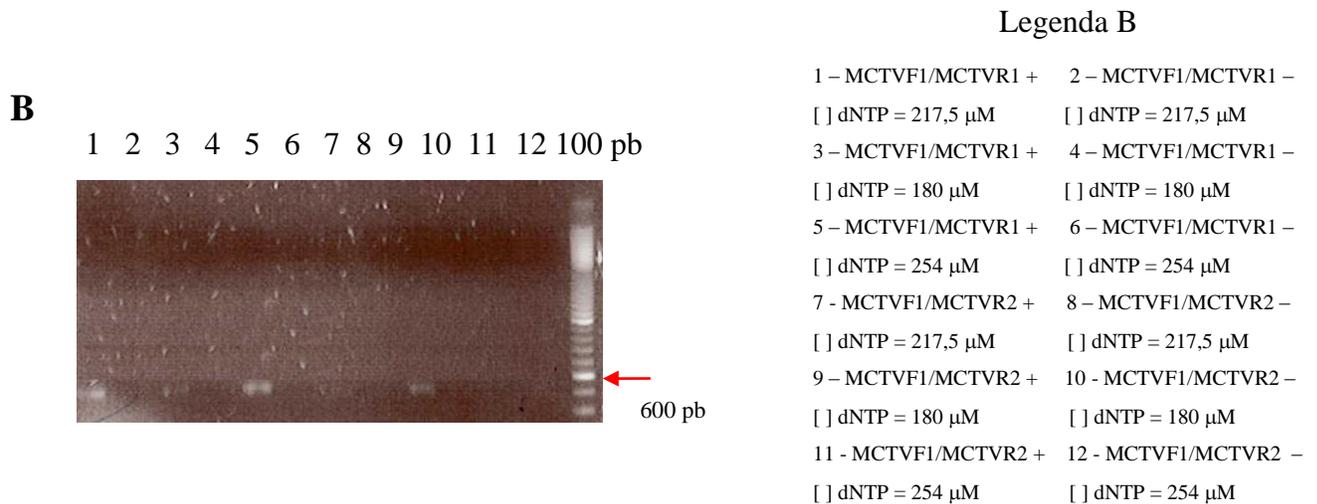
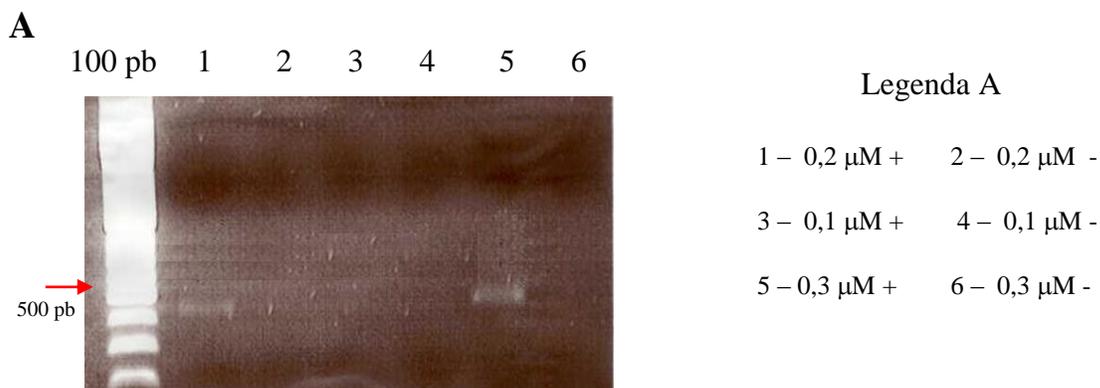


Figura 4.4 – PCR com diferentes combinações de iniciadores e diferentes concentrações de dNTPs. Em A, a cepa Y486 foi testada com as combinações de iniciadores MCTVF1/MCTVR1 e MCTVF1/MCTVR2. Em B, esta mesma cepa foi testada com as duas combinações de iniciadores, ao mesmo tempo que foi testada com diferentes concentrações de dNTPs. Marcadores utilizados: em A, a esquerda - 100 pb (GIBCO), a direita - ϕ X174 *Hae*III (GIBCO), em B - 100 pb (GIBCO). A seta vermelha indica o fragmento de 600 pb, a seta azul indica o fragmento de 603 pb. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Na legenda: sinal positivo (+) - presença de amostra, sinal negativo (-) - controle negativo e dois colchetes ([]) - concentração.



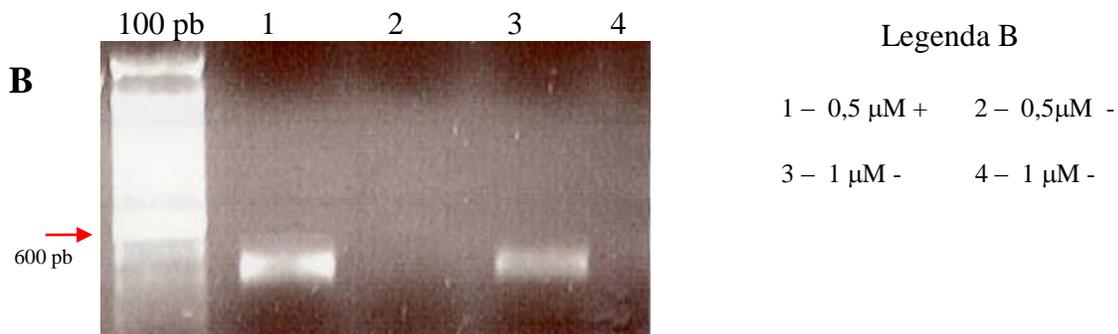
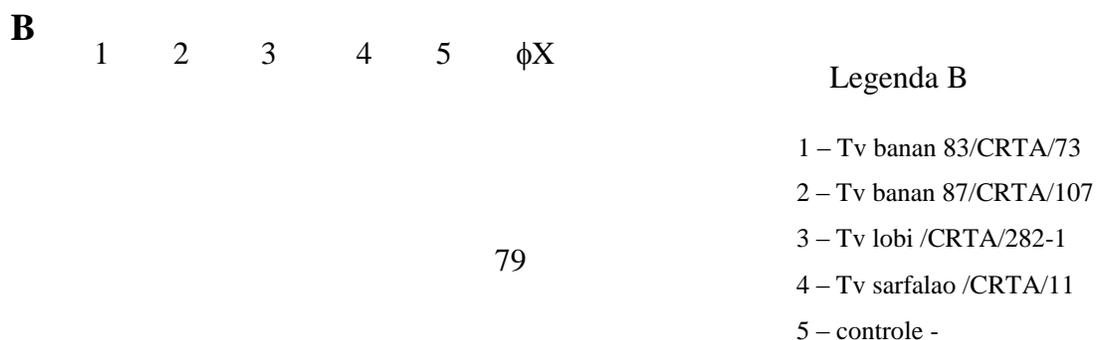
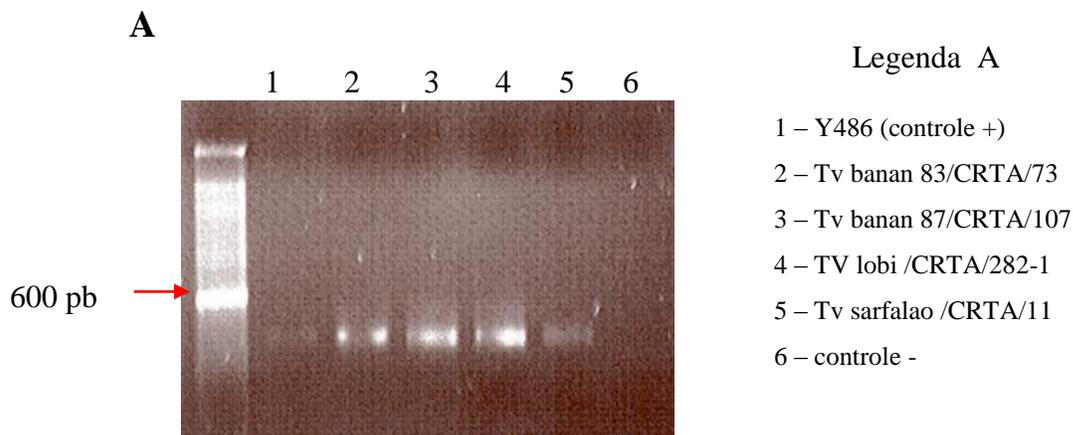


Figura 4.5 – PCR com diferentes concentrações de iniciadores. Em A, a cepa Y486 foi testada com três concentrações diferentes de iniciadores: 0,1 μM, 0,2 μM e 0,3 μM. Em B, esta mesma cepa foi testada com outras duas concentrações de iniciadores: 0,5 μM e 1 μM. A concentração de dNTPs utilizada foi de 217,5 μM. Marcador utilizado foi o 100 pb, a seta vermelha indica em A - fragmento de 500 pb (Promega) e em B - fragmento de 600 pb (GIBCO). Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Na legenda: sinal positivo (+) representa a presença de amostra, sinal negativo (-) representa o controle negativo.



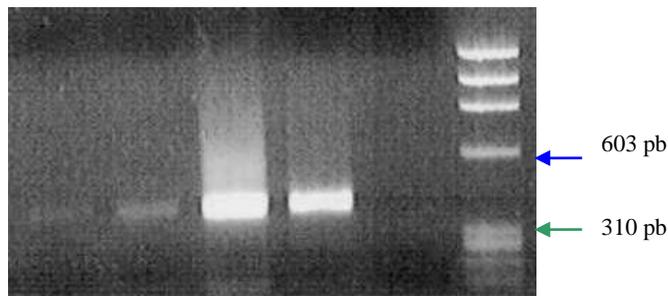
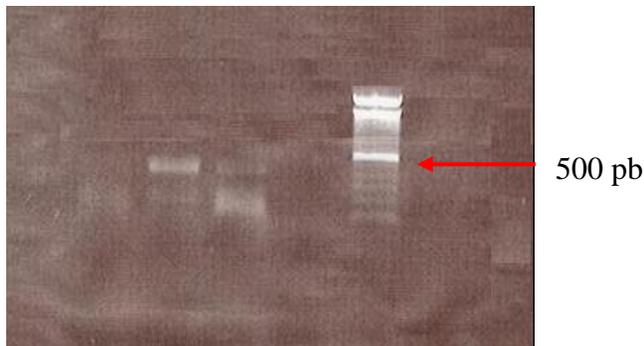


Figura 4.6 – PCR utilizando o par de iniciadores MCTVF1/MCTVR1 com as cepas do Oeste da África. O marcador utilizado foi em A - 100 pb (GIBCO), seta vermelha indica fragmento de 600 pb; em B - ϕ X174 *Hae* III, seta azul indica fragmento de 603 pb e seta verde indica fragmento de 310 pb. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Todas as amostras de DNA das cepas do Oeste e Leste da África amplificaram com o par de iniciadores A, porém a amostra de DNA do Peru ou amplificava um fragmento de intensidade fraca ou não amplificava, como foi observado na figura 4.7 A e B, respectivamente. Todos os fragmentos amplificados apresentaram tamanho aproximado de 480 pb, porém algumas cepas de *T. vivax* também apresentaram fragmentos um pouco menores de aproximadamente 300 pb (figura 4.7 A).

A

1 2 3 4 100 pb



Legenda A

- 1 – Peru /San Jorge 43
- 2 – Uganda /ketri 1263
- 3 – Quênia /ketri 2972
- 4 – controle -

B

1 2 3 4 5 100 pb

Legenda B

- 1 – Y486 (controle +)
- 2 – Peru /San Jorge 43 CH
- 3 – Uganda /ketri 1263
- 4 – Quênia /ketri 2972
- 5 – controle -



Figura 4.7 - PCR utilizando diferentes cepas de *Trypanosoma vivax*, uma do Peru e duas do Leste da África. O marcador utilizado foi o 100 pb (Promega), seta vermelha indica fragmento de 500 pb. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

4.2.4 – Seqüenciamento de clones obtidos com os iniciadores A

De 17 clones seqüenciados, 15 foram válidos. Quando estes 15 clones foram submetidos a um alinhamento múltiplo, as três CSBs foram identificadas, como é observado na figura 4.8. A distância da seqüência da CSB-1 até a seqüência da CSB-2 foi de 21 nucleotídeos, porém a distância da seqüência da CSB-2 até a seqüência da CSB-3 não pôde ser determinada, pois a região conservada não se encontrava completa.

Tvbanan83/CRTA/73-1	ATTT ACGGGCGTTC AACTTTCAT-GCATTTTTCTTG ATACGTAG ATGCGTACCAAATTCA
Tvbanan83/CRTA/73-2	ATTT ACGGGCGTTC AACTTTCAT-GCATTTTTCTTG ATACGTAG ATGCGTACCAAATTCA
Tvbanan87/CRTA/107-1	ATTT ACGGGCGTTC AACTTTTAC-TGATTTGTTGCG ATACGTAG ATGCGTACCAAATTCA
Tvbanan87/CRTA/107-3	ATTT ACGGGCGTTC AACTTTGTA-TAGAATTTACCC ATACGTAG ATGCGTACCAAATTCA
Y486-3	TTTT ACGGGCGTTC AACTTTATT-GCGTTTATTGCC ATACGTAG ATGCGTACCAAATTCA
Tvbanan87/CRTA/107-2	ATTT ACGGGCGTTC AACTTTGTA-CGAAAATATTGG ATACGTAG ATGCGTACCAAATTCA
Tvlobi/CRTA/282-1-2	ATTT ACGGGCGTTC AACTTTTATGTGAATTATCGG- ATACGTAG ATGCGTACCAAATTCA
Quênia/Ketri2972-2	ATTT ACGGGCGTTC CAAGTTTAT-TGATTTGTCTCT ATACGTAG ATGCGTACCAAATTCA
Y486-2	ATTT ACGGGCGTTC CAACTTTCAT-GGGTTTTTCTCG ATACGTAG ATGCGTACCAAATTCA
Tvsarfalao/CRTA/11-3	ATTT ACGGGCGTTC AACTTTTAT-CGATAATTCTCC ATACGTAG ATGCGTACCAAATTCA
Tvlobi/CRTA/282-1	ATTT ACGGGCGTTC AACTTCTAA-TGAAATTCGCC ATACGTAG ATGCGTACCAAATTCA
Y486-1	ATTT ACGGGCGTTC CAGATTTTATACCAAAT-TCATC ATACGTAG ATGCGTACCAAATTCA
Quênia/ketri2972-1	ATTT ACGGGCGTTC AAAATTATAGTGATTTATCGT- ATACGTAG ATGCGTACCAAATTCA
Tvsarfalao/CRTA/11-2	ATTT ACGGGCGTTC CAACTTTCAT-TGATTTTCTCTA ATACGTAG ATGCGTACCAAATTCA
Tvsarfalao/CRTA/11-1	GTTT ACGGGCGTTC AACTTTATTGACAATTTGCTC- ATACGTAG ATGCGTACCAAATTCA
	***** * *****
Tvbanan83/CRTA/73-1	...TGTTTCGAGAGGGG--TTGGT GTA AATATAG---TTATTCGGGGGTTGG-TG
Tvbanan83/CRTA/73-2	...TGTTTCGAGAGGGG--TTGGT GTA AATATAG---TTATTCGGGGGTTGG-TG
Tvbanan87/CRTA/107-1	...TGTTTCGAGAGGGG--TTGGT GTA AATATAAATTCGGTTGACTTGGG-TG
Tvbanan87/CRTA/107-3	...TGTTTCGAGAGGGG TT -GGT GTA AATATAAATCTTGGATA-GTGTGGG-AG
Y486-3	...TGTTTCGAGAGGGG--TTGGT GTA AATATAAATTCGGATGGTGGGGAG-TT
Tvbanan87/CRTA/107-2	...TGTTTCGAGAGGGG--TTGGT GTA AATATAAACTTGTCTGTG-AAGTGTG-GG

```

Tvlobi2/CRTA/282-1      ... TGTTCGAGAGGGG--TT-GGTGTAATATAAAAATAAATTG----AA---AC
Quênia/Ketri2972-2    ... TGTTCGAGAGGGG--TT-GGTGTAATATAAACTTTATTTGTGTGAG---AC
Y486-2                  ... TGTTCGAGAGGGG--TT-GGTGTAATATAA-----CTTGTGGGA---TT
Tvсарfalao/CRTA/11-3  ... TGTTCGAGAGGGG--TT-GGTGTAATATAATTTTAAATTGTATCTG---GT
Tvlobi/CRTA/282-1     ... TGTTCGAGAGGGG--TG-GGTGTAATATAAATTTGGATTGTAGCTACGTAA
Y486-1                  ... TGTTCGAGAGGGG--TT-GGTGTAATATAATCTTGGTGGGTATTTTCGTGC
Quênia/ketri2972-1   ... TGTTCGAGAGGGGG-TT-GGTGTAATATAAATGTTTCGATGAGATTTG--GG
Tvсарfalao/CRTA/11-2  ... TGTTCGAGAGGGG--TT-GGTGTAATATAAGTTTGTAGTTGGAGTTTTG--GT
Tvсарfalao/CRTA/11-1  ... TGTTCGAGAGGGGG-TG-GTTGTAATATAAGTTTGGAGGGGTTGCGTG-GT
*****  ***  *  *  *****

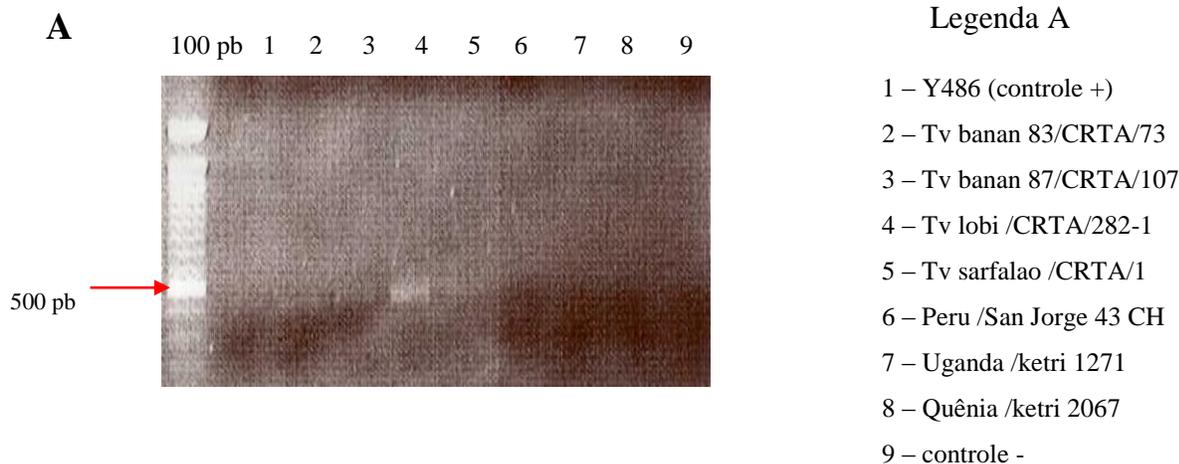
```

Figura 4.8 - Alinhamento dos clones de *Trypanosoma vivax* que apresentaram similaridade com seqüências de minicírculos. As seqüências destacadas correspondem as CSBs. Azul – CSB-1, verde – CSB-2 e vermelha – CSB-3. É indicada com um asterisco (*) a posição onde todos os nucleotídeos da coluna foram idênticos e com um traço (-) o local onde houve gaps no alinhamento, os pontos (...) entre a CSB-2 e a CSB-3 foram propositalmente inseridos para indicar que faltam nucleotídeos entre eles. O programa utilizado para alinhamento foi o ClustalW (EBI).

A seqüência das CSBs se apresentou bastante conservada entre os minicírculos encontrados, porém quatro clones apresentaram variação na seqüência da CSB-3, onde foi observado uma mutação e/ou inserção de alguns nucleotídeos como mostrado na figura 4.8.

4.2.5 – PCR com o par de iniciadores B

Quando o par de iniciadores B foi utilizado na PCR com as diferentes cepas de *T. vivax*, o fragmento de aproximadamente 480 pb observado com o par de iniciadores A, também foi observado com este par de iniciadores. O resultado desta PCR é apresentado na figura 4.9.



B

Legenda B

- 1 a 5 – as mesmas cepas da foto A
- 6 – Peru /San Jorge 3 CH
- 7 – Peru /San Jorge 43 CH

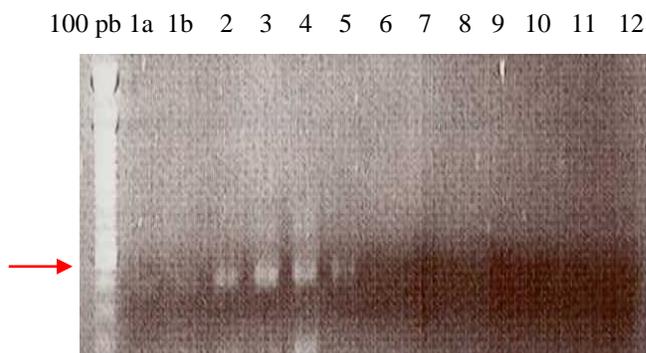


Figura 4.9 - PCR utilizando o par de iniciadores TV-UMS-F/ TV-UMS-R com DNA das cepas de *Trypanosoma vivax* do Oeste e Leste da África, e do Peru. O marcador utilizado foi em A -100 pb (Promega) e a seta vermelha indica o fragmento de 500 pb; em B – 100 pb (GIBCO) e a seta vermelha indica o fragmento de 600 pb. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Somente o DNA das cepas do Oeste da África foram amplificados com o par de iniciadores B, porém não eram regularmente amplificados e/ou os fragmentos eram de intensidade fraca, mesmo tendo sido abaixada a temperatura de ligação para 55°C. Conseqüentemente, a quantidade de DNA obtido não foi suficiente para o seqüenciamento.

4.2.6 – PCR com o par de iniciadores C

Quando o par de iniciadores C foi utilizado na PCR com as diferentes cepas de *T. vivax*, o fragmento de 480 pb observado com os pares de iniciadores A e B, foi confirmado, bem como o fragmento de aproximadamente 300 pb observado com o par de iniciadores A. Na figura 4.10 a PCR foi realizada somente com as cepas do Oeste da África, na figura 4.11 a PCR foi realizada com as cepas do Oeste e do Leste da África, e na figura 4.12 a PCR foi realizada com uma cepa do Peru e uma cepa de Uganda, Leste da África.

1 2 3 4 5 6 λHind φx

Legenda

- 1 – Y486 (controle +)
- 2 – Tv banan 83 /CRTA/73
- 3 – Tv banan 87 /CRTA/107
- 4 – TV lobi /CRTA/282-1
- 5 – Tv sarfalaio /CRTA/11
- 6 – controle -

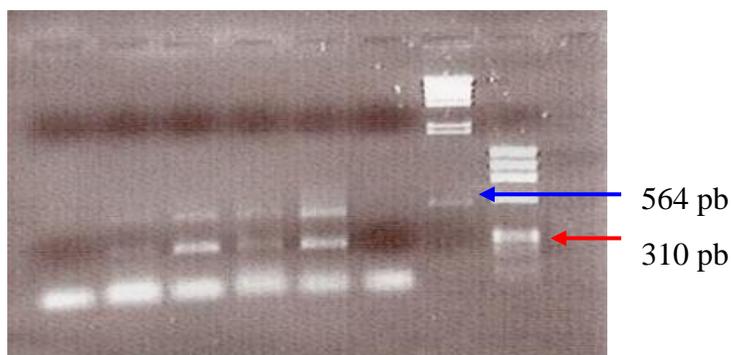


Figura 4.10 – PCR utilizando o par de iniciadores METV-UMS-F/METV-UMS-R com cepas de *Trypanosoma vivax* do Oeste da África. O marcador utilizado foi o λ HindIII, seta azul indica o fragmento de 564 pb; e ϕ X174 HaeIII, seta vermelha indica o fragmento de 310 pb. Gel de agarose 1% corados com brometo de etídeo.

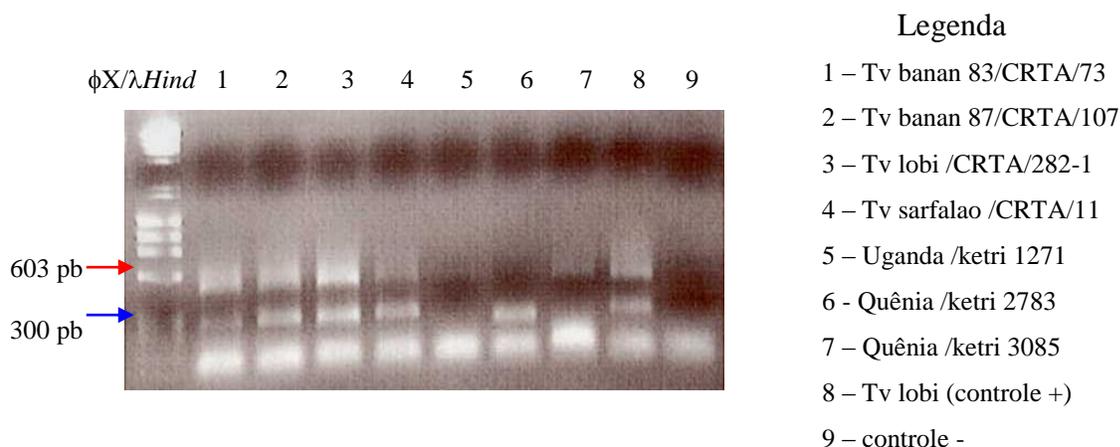
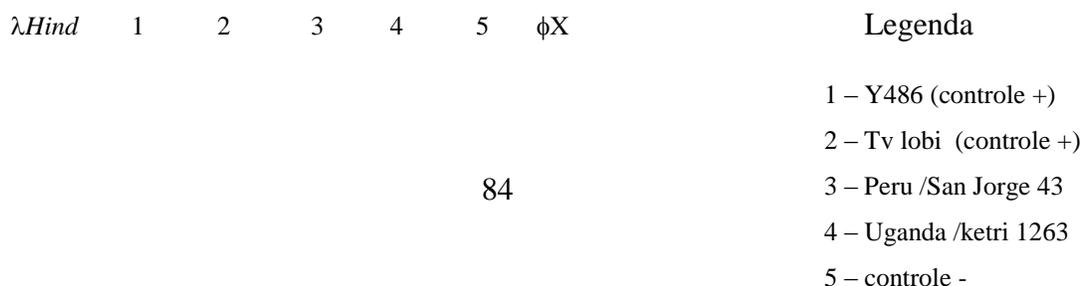


Figura 4.11 – PCR utilizando o par de iniciadores METV-UMS-F/METV-UMS-R com cepas de *Trypanosoma vivax* do Oeste e Leste da África. O marcador utilizado foi o ϕ X174 HaeIII e λ HindIII (juntos), a seta vermelha indica o fragmento de 603 pb e a seta azul indica o fragmento de 300 pb. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.



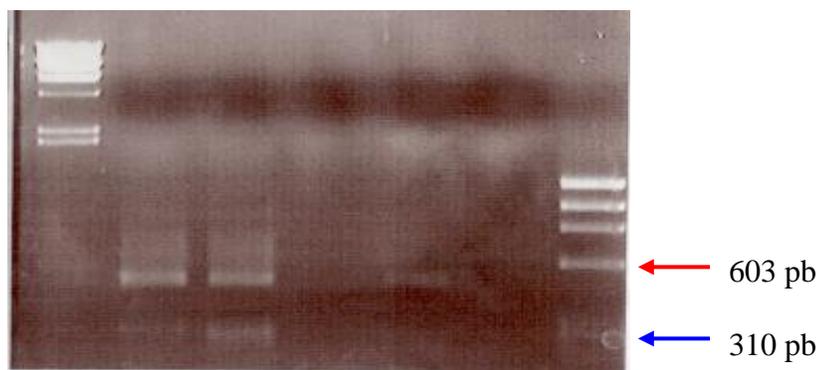


Figura 4.12 – PCR utilizando o par de iniciadores METV-UMS-F/METV-UMS-R com cepas de *Trypanosoma vivax* do Oeste da África (como controle positivo), do Peru e do Leste da África. O marcador utilizado foi o λ HindIII e ϕ X174 HaeIII, seta vermelha indica o fragmento de 603 pb e seta azul indica o fragmento de 310 pb. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

O par de iniciadores C sempre amplificava os dois fragmentos (de 480 pb e de aproximadamente 300 pb), com o DNA das cepas do Oeste da África (figura 4.10 e 4.11), porém estes fragmentos não eram regularmente amplificados com as cepas do Leste da África (figura 4.11 e 4.12), e com algumas cepas, apenas um dos dois fragmentos era observado. Este par de iniciadores não amplificou nenhum fragmento com a cepa do Peru (figura 4.12), assim como o par de iniciadores B e a maioria das reações com o par de iniciadores A.

4.2.7 – Seqüenciamento dos clones obtidos com os iniciadores C

Foram seqüenciados apenas os clones que apresentaram tamanho de aproximadamente 300 pb no gel de agarose, num total de 33 clones. Destes, 17 clones foram válidos. Depois de realizada uma busca pelas CSBs, apenas em cinco clones foram observadas as três CSBs e 8 clones apresentaram apenas a CSB-1 e CSB-2. Foi observado que a distância entre a seqüência da CSB-1 e a seqüência da CSB-2 foi de 21 nucleotídeos, enquanto a distância entre a seqüência da

CSB-2 e a seqüência da CSB-3 observada nos cinco clones foi de 56 nucleotídeos, essa distância entre as CSBs se manteve regular nos minicírculos obtidos (figura 4.13). Entretanto, o tamanho médio destes clones seqüenciados não estava de acordo com o tamanho dos fragmentos observados no gel de agarose. O tamanho da região conservada observado nos cinco clones que apresentaram as 3 CSBs foi de aproximadamente 110 pb.

Tv banan 87/CRTA/107-1	TTT-T ACGGGCGTTC AACTTTATTGCATATTTGCTG ATACGTAG ATGCGTACCAAATCT
Tv banan 87/CRTA/107-2	TTT-T ACGGGCGTTC AACTTTATTGCATATTTGCTG ATACGTAG ATGCGTACCAAATCT
Tv banan 87/CRTA/107-3	TTT-T ACGGGCGTTC AACTTTATTGCATATTTGCTG ATACGTAG ATGCGTACCAAATCT
Tv sarfalao/CRTA/11-1	TTT-T ACGGGCGTTC AACTTTATTGCATATTTGCTG ATACGTAG ATGCGTACCAAATCT
Tv sarfalao/CRTA/11-2	TTT-T ACGGGCGTTC AACTTTATTGCATATTTGCTG ATACGTAG ATGCGTACCAAATCT
Tv sarfalao/CRTA/11-3	TTT-T ACGGGCGTTC AACTTTATTGCATATTTGCTG ATACGTAG ATGCGTACCAAATCT
Tv sarfalao/CRTA/11-4	TTT-T ACGGGCGTTC AACTTTATTGCATATTTGCTG ATACGTAG ATGCGTACCAAATCT
Tv banan 87/CRTA/107-4	TTT-T ACGGGCGTTC AACTTTATTGCATATTTGCTG ATACGTAG ATGCGTACCAAATCT
Tv banan 87/CRTA/107-5	TTT-T ACGGGCGTTC AACTTTATTGCATATTTGCTG ATACGTAG ATGCGTACCAAATCT
Tv sarfalao/CRTA/11-5	TTT-T ACGGGCGTTC AACTTTATTGCATATTTGCTG ATACGTAG ATGCGTACCAAATCT
Tv sarfalao/CRTA/11-6	TTT-T ACGGGCGTTC AACTTTATTGCATATTTGCTG ATACGTAG ATGCGTACCAAATCT
Tv sarfalao/CRTA/11-7	TTT-T ACGGGCGTTC AACTTTATTGCATATTTGCTG ATACGTAG ATGCGTACCAAATCT
Tv banan 87/CRTA/107-6	TTT-T ACGGGCGTTC AACTTTATTGCATATTTGCTG ATACGTAG ATGCGTACCAAATCT
	*** *****
Tv banan 87/CRTA/107-1	AATGAAAACGGCCTATAAAGACCCTGGGTGGGG-----
Tv banan 87/CRTA/107-2	AATGAAAACGGCCTATAAAGACCCTGGGTGGGG-----
Tv banan 87/CRTA/107-3	AATGAAAACGGCCTATAAAGACCCTGGGTGGGGTTCGAGA GGGGTTGGTGTAA ATCACTA
Tv sarfalao/CRTA/11-1	AATGAAAACGGCCTATAAAGACCCTGGGTGGGG-----
Tv sarfalao/CRTA/11-2	AATGAAAACGGCCTATAAAGACCCTGGGTGGGGTTCGAGA GGGGTTGGTGTAA ATCACTA
Tv sarfalao/CRTA/11-3	AATGAAAACGGCCTATAAAGACCCTGGGTGGGGTTCGAGA GGGGTTGGTGTAA ATCACTA
Tv sarfalao/CRTA/11-4	AATGAAAACGGCCTATAAAGACCCTGGGTGGGGTTCGAGA GGGGTTGGTGTAA ATCACTA
Tv banan 87/CRTA/107-4	AATGAAAACGGCCTATAAAGACCCTGGGTGGGG-----
Tv banan 87/CRTA/107-5	AATGAAAACGGCCTATAAAGACCCTGGGTGGGG-----
Tv sarfalao/CRTA/11-5	AATGAAAACGGCCTATAAAGACCCTGGGTGGGG-----
Tv sarfalao/CRTA/11-6	AATGAAAACGGCCTATAAAGACCCTGGGTGGGG-----
Tv sarfalao/CRTA/11-7	AATGAAAACGGCCTATAAAGACCCTGGGTGGGGTTCGAGA GGGGTTGGTGTAA ATCACTA
Tv banan 87/CRTA/107-6	AATGAAAACGGCCTATAAAGACCCTGGGTGGGG-----

Figura 4.13 – Alinhamento das seqüências dos clones de *Trypanosoma vivax* que apresentaram similaridade com seqüências de minicírculos. As seqüências destacadas correspondem as CSBs. Azul – CSB-1, verde – CSB-2 e vermelho – CSB-3. É indicada com um asterisco (*) a posição onde todos os nucleotídeos da coluna foram idênticos e com um (-) o local onde houve gaps no alinhamento. O programa utilizado para o alinhamento foi o ClustalW.

4.2.8 – Sensibilidade da PCR

Todos os três pares de iniciadores amplificaram DNA das cepas do Oeste da África, porém, com exceção do par de iniciadores A, que amplificou um fragmento de intensidade fraca, nenhum dos outros pares de iniciadores amplificou DNA das cepas do Peru. Já o DNA das cepas do Leste da África, só não foram amplificadas com o par de iniciadores B. Contudo, o par de iniciadores mais sensível, testados com a cepa ILDat 2160, foi o par de iniciadores C, que amplificou DNA nas concentrações até 10 fg (figura 4.14). Enquanto os pares de iniciadores A e B, amplificaram DNA nas concentrações de até 1 pg.

Todos os dados gerados no presente estudo serão depositados no GenBank e já se encontram disponíveis através da plataforma Biowebdb (<http://www.biowebdb.org>) nas página web do sistema GARSa (Genomic Analysis Resources for Sequence Annotation) (<http://www.biowebdb.org/garsa>).

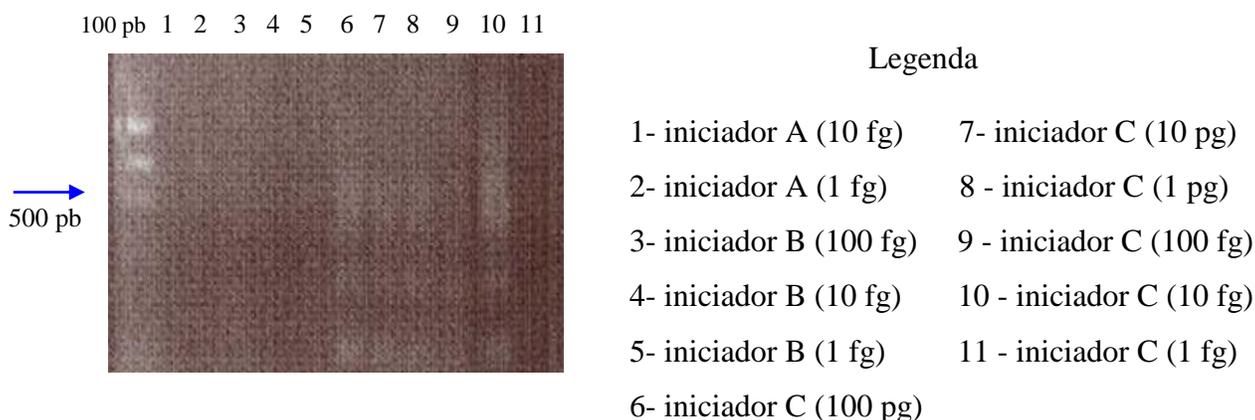


Figura 4.14 - PCR realizada com a cepa ILDat 2160 para avaliar a sensibilidade da reação. Foram incluídas no gel apenas as últimas concentrações de DNA da cepa com cada par de iniciadores. O marcador utilizado foi o 100 pb, seta azul indica o fragmento de 500 pb. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

5 – Discussão

A técnica de GSS permite levantar informações de genes de um determinado organismo e tem se mostrado satisfatória em genomas com baixa concentração de íntrons, como no caso dos genomas de tripanosomatídeos. Em *Leishmania braziliensis*, em torno de 15% do genoma haplóide do organismo foi obtido através da geração de GSS (Laurentino *et al.*, 2004), já em *T. cruzi* foi obtido 10% (Aguero *et al.*, 2000).

Durante este projeto foram seqüenciadas 1.086 GSS ao todo. Destas, 455 foram de alta qualidade, que equivalem a 135.250 nucleotídeos. Então, de acordo com o tamanho estimado do genoma do *T. vivax*, que é em torno de 25Mb (<http://www.sanger.ac.uk/Projects/Protozoa/>), o número de nucleotídeos seqüenciados equivalem a 0,5% do genoma total do parasita e as 331 GSS-nr obtidas equivalem a 99,6 Kb ou 0,39% do genoma do *T. vivax*. Estas seqüências representam uma boa fonte geradora de potenciais marcadores para o *T. vivax*, uma espécie de

difícil cultivo *in vitro*. Estes resultados aumentarão mais que 14 vezes o número atual de seqüências nucleotídicas de *T. vivax*, cujo número no GenBank, antes do presente estudo era de 23 seqüências.

Então, as GSS geraram novos dados do genoma de *T. vivax*, permitindo a anotação preliminar das seqüências obtidas. A obtenção destes dados do genoma de *T. vivax* através da geração de GSS se mostrou importante, levando em consideração os poucos estudos da biologia molecular deste parasita.

As GSS-nr mostraram um conteúdo médio de G+C de 51,6%, valor próximo ao encontrado em *T. cruzi*, cujo valor total de G+C foi 50,9% (Aguero *et al.*, 2000). Este alto valor do conteúdo de G+C também está em acordo com outros parasitas da Família Trypanosomatidae, como *L. braziliensis* e *L. major*, cujo conteúdo médio de G+C foi 55,9% e 62,5%, respectivamente (Laurentino *et al.*, 2004). O alto valor do conteúdo de G+C pode refletir uma alta densidade gênica, como foi observado em *T. cruzi* (Andersson *et al.*, 1998) e no genoma humano (Versteeg *et al.*, 2003).

Foram encontrados 32 genes hipotéticos com um tamanho médio de 222 pb. Esta média foi muito menor do que o tamanho médio de genes encontrados em outros tripanosomatídeos, que é aproximadamente 1.000 a 1500 pb, como é o caso de *T. cruzi* (Aguero *et al.*, 2000). A explicação mais óbvia seria o fato do tamanho médio das GSS-nr obtidas ser baixo (301 pb), porém já foram observados genes maiores no genoma de *T. vivax*, como por exemplo, o gene de 900 pb que codifica um antígeno espécie-específico descrito por Masake *et al.* (1994).

Apenas um tRNA hipotético foi encontrado, porém o seu tipo não pôde ser determinado. Em *Paramecium tetraurelia*, também foi encontrado apenas um tRNA em 2.990 GSS (Sperling *et al.*, 2002). A baixa abundância de tRNA foi observada em *T. brucei* (Tan *et al.*, 2002), cujo número de genes tRNA foi de aproximadamente 50, sendo menor do que o número total estimado de tRNA de tripanosomatídeos, que foi considerado 62. Análises preliminares do genoma de *Leishmania* sp. indicaram que ele também apresenta um número de tRNAs muito baixo (Tan *et al.*, 2002). Estes mesmos autores sugeriram que esta baixa abundância de tRNAs deve ser um aspecto geral do genoma de tripanosomatídeos ou até mesmo de parasitas em geral.

Das 331 GSS-nr, 108 seqüências (32,63%) apresentaram similaridade significativa (E-value $<10^{-5}$) nos bancos de dados públicos, destas, 101 seqüências (30,51%) apresentaram similaridade com seqüências protéicas descritas em kinetoplastídeos e apenas 7 seqüências (2,12%) apresentaram similaridades com seqüências descritas em plantas, mamíferos, bactérias, vírus. Aguero *et al.* (2000), ao analisar um número bem maior de GSS (3.724) de *T. cruzi*,

observou, utilizando o mesmo cut-off (E-value $<10^{-5}$), que praticamente a mesma porcentagem (32,5%) tiveram similaridades com banco de dados públicos. Em *T. brucei* essa porcentagem também se manteve, de 360 GSS, 33% tiveram similaridade significativa com qualquer banco de dados públicos (El-Sayed & Donelson, 1997). Já em *L. major* de 971 GSS, apenas 17,5% apresentaram similaridade significativa com seqüências protéicas no GenBank (Akopyants *et al.*, 2001).

Das 101 seqüências similares as seqüências de kinetoplastídeos, 17 (16,8%) apresentaram similaridade com kDNA e 12 (11,8%) com proteínas do flagelo, ao passo que 23 (22,7%) foram proteínas hipotéticas. Esses valores estão de acordo com os hits mais abundantes classificados pelo GO que foram: cinetoplasto (17%), estrutura flagelar (11%) e processo fisiológico (11%), já as proteínas hipotéticas sem função determinada representaram 20%. O alto percentual de proteínas hipotéticas costuma ser observado, em estudos de descoberta de genes, em um processo de primeira anotação. Em levedura, do total de 3.480, foi observado 56 % de proteínas hipotéticas, e em *E. coli* foi observado 60 % do total de 2.583 genes (Gull, 2001). De 360 GSS em *T. brucei*, 67% não apresentaram similaridade significativa (El-Sayed & Donelson, 1997). Em *L. major* o número de seqüências que não apresentaram similaridade foi de 73,1% dentre 7.543 GSS geradas (Akopyants *et al.*, 2001).

Somente 18 seqüências (5,4%) das 331 GSS-nr não apresentaram similaridade com qualquer seqüência depositada nos bancos de dados públicos, sendo qualificadas como “genes órfãos”. Estas seqüências serão analisadas mais detalhadamente durante o processo de anotação, onde serão realizadas análises de motivos e detecção de homologies distantes. Caso estes genes órfãos sejam órfãos verdadeiros, podem representar genes espécie-específicos servindo como potenciais marcadores moleculares.

No presente estudo, foram identificados um total de 36 minicírculos, apresentando apenas uma região conservada, o mesmo número de região conservada presente em *T. equiperdum* (Barrois *et al.*, 1981) e *T. brucei* (Jasmer & Stuart, 1986). O tamanho dos minicírculos encontrados foi de aproximadamente 480 pb, o qual estaria de acordo com o tamanho (465 pb) relatado por Borst *et al.* (1985) através de microscopia eletrônica, um dos menores tamanhos de minicírculos observados até agora (Borst & Hoeijmakers, 1979; revisado por Yurchenko & Koleniskov, 2001). Além dos minicírculos de tamanho de 480 pb, também foram observados minicírculos com tamanhos de aproximadamente 300 pb no gel de agarose, porém este tamanho não foi confirmado pelos clones seqüenciados. Estes minicírculos de aproximadamente 300 pb podem representar uma classe diferente de minicírculos, pois as várias classes existentes podem

ser determinadas pela estrutura primária, e tamanho dos minicírculos. A heterogeneidade do tamanho de um minicírculo pode ser observada não apenas entre espécies de tripanosomatídeos, mas também entre isolados de uma mesma espécie, e inclusive dentro de um mesmo organismo (revisado por Yurchenko & Koleniskov, 2001). A heterogeneidade de tamanho nos minicírculos de *T. vivax* já foi observada por Borst *et al.* (1985), quando foram analisados quantitativamente pela medida do contorno do comprimento dos minicírculos livres em uma preparação de kDNA sonificado, e observaram uma classe de minicírculo de 0,31 μm (934 pb) e uma classe de 0,15 μm (465 pb). Neste estudo, não foram identificados os minicírculos maiores de 934 pb, confirmando a suspeita de Borst *et al.* (1985) de que estes minicírculos sejam dímeros dos minicírculos menores de 465 pb.

As seqüências da CSB-1, CSB-2 e CSB-3 identificadas na região conservada dos minicírculos encontrados foram bastante conservadas entre eles. As seqüências da CSB-1 e CSB-3 dos minicírculos de *T. vivax* foram idênticas entre quase todos os tripanosomatídeos, sendo que a CSB-2 apresentou diferença entre 4 dos 8 nucleotídeos que compõem a CSB-2 da maioria dos tripanosomatídeos. Este resultado está em acordo com o descrito na literatura, onde CSB-1 e CSB-3 são idênticas entre quase todos os tripanosomatídeos, enquanto a CSB-2 apresenta diferenças entre estes (Ray, 1989). A CSB-1 e CSB-3 estariam fazendo parte do processo de iniciação da replicação do minicírculo (Ray, 1989; Yurchenko *et al.*, 1998), onde a CSB-3 é estruturalmente e funcionalmente relacionada a iniciação da replicação do DNA da fita-L, e a CSB-1 relacionada a iniciação da replicação da fita-H do minicírculo. A importância da CSB-2 ainda não foi determinada, mas devido a sua conservação e pela sua posição entre a CSB-1 e CSB-3, é cogitado que ela possua, também, um papel na replicação (Ray, 1989).

O espaçamento entre as CSBs observado neste estudo foi de 21 nucleotídeos entre a CSB-1 e CSB-2, a mesma distância observada entre estas duas CSBs nos minicírculos de *T. equiperdum* (Barrois *et al.*, 1981), porém a distância entre a CSB-2 e CSB-3 foi de 56 nucleotídeos nos minicírculos do *T. vivax*, enquanto em outros tripanosomatídeos, a distância entre estas CSBs variou de 38 nucleotídeos em *T. equiperdum* a 49 nucleotídeos em *T. cruzi* (Degraeve *et al.*, 1988).

Já foi observado que a região conservada dos minicírculos possui um alto conteúdo de G+C (Jasmer & Stuart, 1986). O conteúdo de G+C observado na região conservada dos minicírculos de *T. vivax* foi 50%, o que está de acordo com *T. brucei*, cuja região conservada também apresentou 50% de conteúdo G+C, enquanto outras partes deste minicírculo apresentaram 23% (revisado por Yurchenko & Kolesnikov, 2001).

A quantidade de gRNAs não parece estar relacionado ao tamanho do minicírculo, mas a heterogeneidade deste. O minicírculo de *L. tarentolae*, cujo tamanho é 890 pb, apresentou apenas 1 gRNA, *T. brucei*, cujo o tamanho é 1.014 bp apresentou 3 gRNAs, porém *C. fasciculata* com um tamanho de 2.550 pb apresentou apenas 1 gRNA. Já *T. cruzi*, cujo tamanho (1.450 pb) é um pouco maior que *T. brucei*, apresentou 4 gRNAs (Simpson, 1997). O minicírculo de *T. equiperdum*, apresentaria apenas três diferentes classes de gRNAs, esta pouca quantidade de gRNAs estaria relacionado ao fato dos minicírculos de *T. equiperdum* serem homogêneos, ao passo em que *T. brucei* poderia potencialmente produzir aproximadamente 750 classes de gRNAs por serem composto de no mínimo 250 classes diferentes de minicírculos (Pollard & Hajduk, 1991). Não foi realizada uma busca por gRNAs nos minicírculos encontrados no presente estudo, e conseqüentemente uma estimativa da quantidade de classes de gRNA não pode ser estipulada. A busca por gRNAs será feita em um estudo posterior.

A região variável dos minicírculos das diferentes cepas de *T. vivax* utilizados neste estudo apresentou um alto grau de heterogeneidade, dificultando a sua utilização para a caracterização molecular das cepas de *T. vivax*, enquanto a região conservada observada entre os minicírculos das cepas de Burkina Faso (Oeste da África) e a cepa do Quênia (Leste da África) apresentou-se bastante conservada, indicando que o minicírculo não é um bom marcador para a discriminação entre estas cepas do Leste e Oeste da África.

Dos três pares de iniciadores utilizados para amplificar a seqüência dos minicírculos do *T. vivax*, o terceiro par (METV-UMS-F/METV-UMS-R) foi o mais sensível entre eles, amplificando DNA numa concentração de 10 fg. Em *L. amazonensis*, a reação de PCR foi capaz de detectar concentração menor que 10 fg de DNA do cinetoplasto de um único parasito, utilizando iniciadores específicos (Bruijn & Barker, 1992; Rodgers *et al.*, 1990). Segundo Sturm *et al.* (1989), a sensibilidade dos iniciadores utilizados para amplificar minicírculo de *T. cruzi*, foi bem mais alta, amplificando DNA na concentração de 0,015 fg. Uma possível explicação, seria o fato dos minicírculos de *T. cruzi* possuírem maior número de cópias, em relação aos minicírculos de *T. vivax*, e no PCR, quanto maior o número de cópias do alvo, maiores são as chances dele ser amplificado (Desquesnes & Dávila, 2002).

De todos os iniciadores para diagnóstico de *T. vivax* descritos até agora, os iniciadores baseados no DNA satélite desenvolvidos por Masiga *et al.* (1992) foram os mais sensíveis, detectando até 5 fg de DNA. Apesar do par de iniciadores METV-UMS-F/METV-UMS-R baseado na CSB-3 da região conservada do minicírculo ter sido menos sensível (detectando até

10 fg de DNA de *T. vivax* purificado), ainda pode ser considerado sensível o suficiente para ser utilizado no diagnóstico de *T. vivax*.

6 – Conclusões

1 – Novos dados do genoma do *Trypanosoma vivax* foram gerados pelo seqüenciamento de clones a partir de uma biblioteca genômica, representando potenciais marcadores moleculares.

2 – Neste estudo, foi obtido 0,5% do genoma de *T. vivax* (135.250 nucleotídeos) correspondentes as 455 GSS de alta qualidade geradas.

3 – O processo de redução na redundância dos clones mais abundantes de *Trypanosoma vivax* funcionou como previsto, pois nenhuma das regiões utilizadas como sondas na hibridização da biblioteca genômica, foi observada nas GSS geradas.

4 – Foram encontrados um total de 32 genes hipotéticos, com tamanho médio baixo (222 pb), nas 331 GSS-nr.

5 – As 28 seqüências de alta qualidade foram classificadas funcionalmente na categoria processo biológico, 20 seqüências de alta qualidade foram classificadas funcionalmente na categoria função molecular, e 35 seqüências de alta qualidade foram classificadas funcionalmente na categoria componente celular do Gene Ontology.

6 - Os minicírculos de *Trypanosoma vivax* apresentaram apenas uma região conservada de aproximadamente 110 pb, contendo os três blocos de seqüências conservadas.

7 – A CSB-2 foi a única das três CSBs que não foi idêntica a de outros tripanosomatídeos descritas na literatura.

8 – Os minicírculos de *T. vivax* apresentaram um tamanho de aproximadamente 480 pb.

9 – O par de iniciadores METV-UMS-F/METV-UMS-R foi o mais sensível do três pares de iniciadores desenhados, podendo ser utilizados no diagnóstico de *T. vivax*.

7 - Referências bibliográficas

Abu-Elneel K, Kapeller I, Shlomai J (1999). Universal minicircle sequence-binding protein, a sequence-specific DNA-binding protein that recognizes the two replication origins of the kinetoplast DNA minicircle. *J Biol Chem*. May 274(19):13419-13426.

Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, *et al.* (1991). Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science*. Jun 252(5013):1651-1656.

Agüero F, Verdún RE, Frasch ACC, Sánchez D (2000). A Random Sequencing Approach for the Analysis of the *Trypanosoma cruzi* Genome: General Structure, Large Gene and Repetitive DNA Families, and Gene Discovery. *Genome Research* 10:1996–2005.

Ajioka JW, Boothroyd JC, Brunk BP, *et al.* (1998). Gene discovery by EST sequencing in *Toxoplasma gondii* reveals sequences restricted to the Apicomplexa. *Genome Res* 8:18–28.

Akopyants NS, Clifton SW, Martin J, *et al.* (2001). A survey of the *Leishmania major* Friedlin strain V1 genome by shotgun sequencing: a resource for DNA microarrays and expression profiling. *Mol Biochem Parasitol.* Apr 113(2):337-340.

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, *et al.* (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* Sep 25(17):3389-3402.

Andersson B, Aslund L, Tammi M, Tran AN, Hoheisel JD, Pettersson U (1998). Complete sequence of a 93.4-kb contig from chromosome 3 of *Trypanosoma cruzi* containing a strand-switch region. *Genome Res.* Aug 8(8):809-816.

Anosa VO (1983). Diseases produced by *Trypanosoma vivax* in ruminants, horses and rodents. *Zentralbl Veterinärmed, Beiheft* 30:717-741.

Ashburner M, Ball CA, Blake JA, *et al.* (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet.* May 25(1):25-29.

Assoku RKG, Gardiner PR (1989). Detection of antibodies to platelets and erythrocytes during infection with haemorrhage-causing *Trypanosoma vivax* in Ayrshire cattle. *Vet Parasitol.* Jun 31(3-4):199-216.

Avila H, Goncalves AM, Nehme NS, Morel CM, Simpson L (1990). Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from South and Central America by analysis of PCR-amplified minicircle variable region sequences. *Mol Biochem Parasitol.* Sep-Oct 42(2):175-187.

Barrois M, Riou G, Galibert F (1981). Complete nucleotide sequence of minicircle kinetoplast DNA from *Trypanosoma equiperdum*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 78(6):3323-3327.

Betancourt A, Wells E (1979). Pérdidas económicas en un brote de tripanosomiasis bovina causado por *Trypanosoma vivax*. *Rev Asoc Colomb Med Vet Zoot* 3:6-9.

Borst P, Hoeijmakers JHJ (1979). Kinetoplast DNA. *Plasmid*. Jan 2(1):20-40.

Borst P, Fase-Fowler F, Weijers PJ, Barry JD, Tetley L, Vickerman K (1985). Kinetoplast DNA from *Trypanosoma vivax* and *T. congolense*. *Mol Biochem Parasitol*. May 15(2):129-42.

Boulhosa JL (1946). *Boletim DEMA*, Jul-Nov.

Bruce D, Hamerton AE, Bateman HR, Mackie FP (1910). The development of tripanosomoses in tsetse flies. *Proc Royal Soc, Series B* 82:368-388.

Camargo EP, Mattei DM, Barbieri CL, Morel CM (1982). Electrophoretic analysis of endonuclease-generated fragments of k-DNA, of esterase isoenzymes, and of surface proteins as aids for species identification of insect trypanosomatids. *J Protozool*. May 29(2):251-258.

Carlton JM, Muller R, Yowell CA, Fluegge MR, Sturrock KA, *et al.* (2001). Profiling the malaria genome: a gene survey of three species of malaria parasite with comparison to other apicomplexan species. *Mol Biochem Parasitol*. Dec 118(2):201-210.

Carver T, Bleasby A (2003). The design of Jemboss: a graphical user interface to EMBOSS. *Bioinformatics* 19:1837–1843.

Chakrabarti D, Reddy GR, Dame JB, *et al.* (1994). Analysis of expressed sequence tags from *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 66: 97-104.

Clarkson MJ, McCabe W (1969). Infectivity and virulence of the Desowitz strain of *Trypanosoma vivax* in mice. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 63(1):116.

Connor RJ, Mukangi DJA (1986). Concurrent outbreak of pseudo-lumpy skin disease and acute *Trypanosoma vivax* infection in cattle. *Trop Anim Health Prod* 18:127-132.

Cupollilo E, Grimaldi G Jr, Momen H, Bervely S (1995). Intergenic Region Typing (IRT): A rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*. Jul 73:145-155.

Curasson G (1943). *Trypanosoma vivax* et variétés. In: Vigot Frères, ed. *Tome I Trypanosomes*. Paris.

Daniel AD, Joshua RA, Kalejaiye JO, Dada AJ (1994). Prevalence of trypanosomiasis in sheep and goats in a region of northern Nigeria. *Rev Elev Med Vet Pays Trop*. 47(3):295-297.

Dávila AMR, Ramirez L, Silva RAMS (1997). Morphological and biometrical differences among *Trypanosoma vivax* isolares from Brazil and Bolívia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92:357-358.

Dávila AMR, Ramirez L, Silva RAMS (1998). *Trypanosoma vivax* in the Americas: morphometry and host range. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 51(1):29-35.

Dávila AMR, Silva RAMS (2000). Animal trypanosomiasis in South America: Current status, Partnership and Information technology. *Ann N Y Acad Sci* 916:199-212.

Dávila AMR (2002). Tripanosomose animal na América do Sul: Epizootiologia, evolução e tecnologias da informação. Rio de Janeiro, 2002. 133. Tese [Doutorado em Biologia Celular e Molecular]– Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz.

Degrave W, Fragoso SP, Britto C, *et al.* (1988) Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. Jan 27(1):63-70.

Delcher AL, Harmon D, Kasif S, White O, Salzberg SL (1999). Improved microbial gene identification with GLIMMER. *Nucleic Acids Res*. Dec 27(23):4636-4641.

Desquesnes M (1997). Les trypanosomes du bétail en Amérique Latine, étude spéciale dans le Plateau des Guyanes. PhD thesis, Université de Lille p. 409.

Desquesnes M, Davila AM (2002). Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. *Vet Parasitol*. Nov 109(3-4):213-231.

- Desquesnes M, Dia ML (2003). *Trypanosoma vivax*: mechanical transmission in cattle by one of the most common African tabanids, *Atylotus agrestis*. *Exp Parasitol* Jan-Feb 103(1-2):35-43.
- Desquesnes M, Dia ML (2004). Mechanical transmission of *Trypanosoma vivax* in cattle by the African tabanid, *Atylotus fuscipes*. *Vet Parasitol* Jan 5;119(1):9-19.
- Dias-Neto E, Correa RG, Verjovski-Almeida S *et al.* (2000). Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 28;97(7):3491-3496.
- Dickin S, Gibson W (1989). Hybridisation with a repetitive DNA probes reveals the presence of small chromosomes in *Trypanosoma vivax*. *Mol Biochem Parasitol* 33:135-142.
- Dirie MF, Murphy NB, Gardiner PR (1993a). DNA fingerprinting of *Trypanosoma vivax* isolates rapidly identifies intraspecific relationships. *J Eukaryot Microbiol*. Mar-Apr 40(2):132-134.
- Dirie MF, Otte MJ, Thatthi R, Gardiner PR (1993b). Comparative studies of *Trypanosoma* (Duttonella) *vivax* isolates from Colombia. *Parasitology*. Jan 106(Pt 1):21-29.
- El-Sayed NMA, Alarcon CM, Beck JC, Sheffield VC, Donelson JE (1995). cDNA expressed sequence tags of *Trypanosoma brucei rhodesiense* provide new insights into the biology of the parasite. *Mol Biochem Parasitol* 73:75–90.
- El-Sayed NM, Donelson JE (1997). A survey of the *Trypanosoma brucei rhodesiense* genome using shotgun sequencing. *Mol Biochem Parasitol*. Feb 84(2):167-178.
- Estevez AM, Simpson L (1999). Uridine insertion/deletion RNA editing in trypanosome mitochondria-a review. *Gene*. Nov 240(2):247-260.
- Ewing B, Green P (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res* 8:186–194.

Ewing B, Hillier L, Wendl Mc, Green P (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res* 8:175–185.

Fairbairn H (1953). Studies on *Trypanosoma vivax* IX. Morphological differences in strains and their relation to pathogenicity. *Ann Trop Med Parasit* 47:394-405.

Faye D, Pereira de Almeida PJ, Goossens B, *et al.* (2001). Prevalence and incidence of trypanosomiasis in horses and donkeys in the Gambia. *Vet Parasitol*. Nov 5;101(2):101-114.

Ferenc SA, Stopinski V, Courtney CH (1990). The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* and its use in a seroepidemiological survey of the Eastern Caribbean Basin. *Int J Parasitol* 20:51-56.

Ferris DH (1984). Bovine trypanosomiasis (*T. vivax*) in Central and South America. *Trop Vet Med News* 2:1-37.

Franco GR, Adams MD, Soares MB, Simpson AJ, Venter JC, Pena SD (1995). Identification of new *Schistosoma mansoni* genes by the EST strategy using a directional cDNA library. *Gene*. Jan 152(2):141-147.

Gardiner PR, Wilson AJ (1987). *Trypanosoma* (Duttonella) *vivax*. *Parasitol Today* 3: 49-52.

Gardiner PR (1989). Recent studies of the biology of *Trypanosoma vivax*. *Adv Parasitol* 28: 229–317.

Gathuo HK, Nantulya VM, Gardiner PR (1987). *Trypanosoma vivax*: adaptation of two East African stocks to laboratory rodents. *J Protozool*. Feb 34(1):48-53.

Gull K (2001). The biology of kinetoplastid parasites: insights and challenges from genomics and post-genomics. *Int J Parasitol*. May 31(5-6):443-452.

Hoare CA (1972). The Trypanosomes of Mammals. A Zoological Monograph. Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh.

- Huang X, Madan A (1999). CAP3: a DNA sequence assembly program. *Genome Res* 9:868–877.
- Hudson JR (1944). Acute and subacute trypanosomosis in cattle caused by *T. vivax*. *J Comp Pathol* 54:108-119.
- Jasmer DP, Stuart K (1986). Conservation of kinetoplastid minicircle characteristics without nucleotide sequence conservation. *Mol Biochem Parasitol*. Mar 18(3):257-269.
- Jefferies D (1984). Transmission of disease by haematophagous arthropods: host-parasite interactions and fluid mechanics. PhD. Thesis, University of Salford, Salford,UK.
- Jirku M, Kolesnikov AA, Benada O, Lukes J (1995). Marine fish and ray trypanosomes have large kinetoplast minicircle DNA. *Mol Biochem Parasitol*. Jul 73(1-2):279-83.
- Johnson CM (1941). Bovine Trypanosomiasis in Panama. *Am J of Trop Med* 22:289-297.
- Jones TW, Dávila AMR (2001). *Trypanosoma vivax* – out of Africa. *Parasitol Today* 17:99-101.
- Katinka MD, Duprat S, Cornillot E, Metenier G, Thomarat F, Prensier G (2001). Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*. Nov 414(6862):450-453.
- Laurentino EC, Ruiz JC, Fazelina G, et al.(2004). A survey of *Leishmania braziliensis* genome by shotgun sequencing. *Mol Biochem Parasitol*. Sep 137(1):81-86.
- Leeflang P, Buys J, Blotkamp C (1976). Studies on *Trypanosoma vivax*: infectivity and serial maintenance of natural bovine isolates in mice. *Int J Parasitol*. Oct 6(5):413-417.
- Leger M, Vienne M (1919). Epizootic à trypanosomes chez les bovines de la Guyane Française. *Bull Soc Pathol Exot* 12:258-266.

Lopes UG, Momen H, Grimaldi G Jr, Marzochi MC, Pacheco RS, Morel CM (1984). Schizodeme and zymodeme characterization of *Leishmania* in the investigation of foci of visceral and cutaneous leishmaniasis. *J Parasitol*. Feb 70(1):89-98.

Losos GJ, Ikede BO (1972). Review of pathology of diseases in domestic and laboratory animals caused by *Trypanosoma congolense*, *T. vivax*, *T. brucei*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. *Vet Pathol* 9 (supplement):1-71.

Lowe TM, Eddy SR (1997). tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acid Res* 25: 955–964.

Luckins AG (1977). Detection of antibodies in trypanosome infected cattle by means of a microplate enzyme-linked immunosorbent assay. *Trop Anim Health Prod* 9:53–62.

Lukes J, Guilbride DL, Votypka J, Zikova A, Benne R, Englund PT (2002). Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. *Eukaryot Cell*. Aug 1(4):495-502.

Macina RA, Sanchez DO, Gluschkof DA, Burrone OR, Frasch AC (1986). Sequence diversity in the kinetoplast DNA minicircles of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. Oct 21(1):25-32.

Masake RA, Majiwua PA, Molloo SK, *et al.* (1997). Sensitive and specific detection of *Trypanosoma vivax* using the polymerase chain reaction. *Exp Parasitol* 85:193-205.

Masake RA, Nantulya VM, Pelle R, Makau JM, Gathuo H, ole-MoiYoi OK (1994). A species-specific antigen of *Trypanosoma* (*Duttonella*) *vivax* detectable in the course of infection is encoded by a differentially expressed tandemly reiterated gene. *Mol Biochem Parasitol*. Apr 64(2):207-218.

Masake RA, Njuguna JT, Brown CC, Majiwa PAO (2002). The application of PCR-ELISA to the detection of *Trypanosoma brucei* and *T. vivax* infections in livestock. *Vet Parasitol* 105:179-189.

Masiga DK, Smyth AJ, Hayes P, Bromidge TJ, Gibson WC (1992). Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. *Int J Parasitol* 22:909-918.

Masiga DK, Gibson WC (1990). Specific probes for *Trypanosoma* (Trypanozoon) *evansi* based on kinetoplast DNA minicircles. *Mol Biochem Parasitol*. May 40(2):279-283.

Melendez RD, Forlano M, Figueroa W (1993). Perinatal infection with *Trypanosoma vivax* in a calf in Venezuela. *J Parasito*. 79 (2):293–294.

Metzenberg S, Agabian N (1994). Mitochondrial minicircle DNA supports plasmid replication and maintenance in nuclei of *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 91(13):5962-5966.

Morel C, Chiari E, Camargo EP, Mattei DM, Romanha AJ, Simpson L (1980). Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 77(11):6810-6814.

Morlais I, Ravel S, Grébaud P, Dumas V, Cuny G (2001). New molecular marker for *Trypanosoma* (Duttonella) *vivax* identification. *Acta Tropica* 80:207-213.

Murray M, Murray PK, McIntyre WIM. (1977). An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 71:325–326.

Myler PJ (1993). Molecular variation in trypanosomes. *Acta Trop*. May 53(3-4):205-225.

Nantulya VM, Lindqvist KJ (1989). Antigen-detection enzyme immunoassays for diagnosis of *Trypanosoma vivax*, *T. congolense* and *T. brucei* infections in cattle. *Trop Med Parasitol* 40:267-272.

Nieschulz O, Bos A, Frickers J (1938). Over een infectie door *Trypanosoma viennei* bij een rund uit Suriname. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*, Utrecht 65:963-972.

Njiokou F, Simo G, Nkinin SW, Laveissière C, Herderc S (2004) Infection rate of *Trypanosoma brucei* s.l., *T. vivax*, *T. congolense* “forest type”, and *T. simiae* in small wild vertebrates in south Cameroon. *Acta Tropica* 92:139–146.

Olubayo RO, Mugeru GM (1985). Pathogenesis of haemorrhages in *Trypanosoma vivax* infection in cattle I. Disseminated intravascular coagulation. *Bull Anim Health Prod Afr* 33:211-217.

Osaer S, Goossens B, Kora S, Gaye M, Darboe L (1999). Health and productivity of traditionally managed Djallonke sheep and West African dwarf goats under high and moderate trypanosomosis risk. *Vet Parasitol.* Mar 82(2):101-119.

Pellegrini D (1950). *Trypanosoma vivax* (Ziemann) nel cammello. Infezione naturale esperimentale. [*Trypanosoma vivax* (Ziemann) in the camel; natural and experimental infections.] *Clin Vet.* Milan, Italy. Mar 73:65-76.

Peterson SN, Schramm N, Hu P-C, Bott KF, Hutchison CA III. (1991). A random sequencing approach for placing markers on the physical map of *Mycoplasma genitalium*. *Nucleic Acids Res* 19:6027-6031.

Peterson SN, Hu P-C, Bott KF, Hutchison CA (1993) A survey of the *Mycoplasma genitalium* genome by using random sequencing. *J Bacteriol* 175:7918-7930.

Plata R (1931). *Tripanosoma* tipo *cazalboui* en el ganado de la Costa Atlantica. *Rev Med Vet* (Bogotá) 3:141.

Platt KB, Adams LG (1976). Evaluation of the indirect fluorescent antibody test for detecting *Trypanosoma vivax* in South American cattle. *Res Vet Sci* 21:53-58.

Pollard VW, Hajduk SL (1991). *Trypanosoma equiperdum* minicircles encode three distinct primary transcripts which exhibit guide RNA characteristics. *Mol Cell Biol.* Mar 11(3):1668-1675.

Ray DS (1989). Conserved Sequence Blocks in Kinetoplast Minicircles from Diverse Species of Trypanosomes. *Mol Cell Biol.* Mar p. 1365-1367

Recinos RF, Kirchhoff LV, Donelson JE (1994). Characterization of kinetoplast DNA minicircles in *Trypanosoma rangeli*. *Mol Biochem Parasitol.* Jan 63(1):59-67.

- Riou G, Delain E (1969). Electron microscopy of the circular kinetoplastic DNA from *Trypanosoma cruzi*: occurrence of catenated forms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jan 62(1):210-217.
- Rogers WO, Burnheim PF, Wirth DF (1988). Detection of Leishmania within sand flies by kinetoplast DNA hybridization. *Am J Trop Med Hyg* 39(5): 434-439.
- Roubaud E (1934). Un type racial nouveau de l'*Anopheles maculipennis*. *Bull Soc Pathol Exot* 27:737-740.
- Roubaud E (1935). Les modalités atypiques de l'infection trypanosomienne cyclique chez les Glossines. *Ann Inst Pasteur* 55:340-364.
- Sa-Carvalho D, Perez-Morga D, Traub-Cseko YM (1993). Characterization of kinetoplast DNA from *Phytomonas serpens*. *J Eukaryot Microbiol*. May-Jun 40(3):317-22.
- Sambrook J, Russel D W (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. Third edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York. 2.
- Sanchez DO, Zandomeni RO, Cravero S, *et al.* (2001). Gene discovery through genomic sequencing of *Brucella abortus*. *Infect Immun*. Feb 69(2):865-868.
- Savill NJ, Higgs PG (2000). Redundant and non-functional guide RNA genes in *Trypanosoma brucei* are a consequence of multiple genes per minicircle. *Gene*. Oct 256(1-2):245-252.
- Sekoni VO, Rekwot PI, Bawa EK (2004). Effects of *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma congolense* infections on the reaction time and semen characteristics of Zebu (Bunaji) X Friesian crossbred bulls. *Theriogenology* 61:55-62.
- Serra-Freire NM, Rezende AML (1988). *Stomoxys calcitrans*, um vetor mecânico do *Trypanosoma vivax* no Brasil e notas sobre o comportamento do parasito no vetor. *Arq Univ Fed Rur Rio de J*, Itaguaí Jan-Dez 11 (1):77-82.
- Shaw JJ, Laison R (1972). *Trypanosoma vivax* in Brazil. *Ann Trop Med Parasitol* 66:25-32.

Shlomai J. (2004). The structure and replication of kinetoplast DNA. *Curr Mol Med.* Sep 4(6):623-647.

Simpson L (1986). Kinetoplast DNA in trypanosomid flagellates. *Int Rev Cytol* 99:119-79.

Simpson L (1987). The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annu Rev Microbiol* 41:363-82.

Simpson L (1997). The genomic organization of guide RNA genes in kinetoplastid protozoa: several conundrums and their solutions. *Mol Biochem Parasitol.* Jun 86(2):133-141.

Silva RAMS, Da Silva JA, Schneider RC, *et al.* (1995). Bovine trypanosomosis due to *Trypanosoma vivax* in the northern subregion of Pantanal, Brazil. *Trypnews* 2:1-2.

Silva RAMS, da Silva JA, Scheneider RC, *et al.* (1996). Oubreak of trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* (Zieman, 1905) in bovines of the Pantanal, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91:561-562.

Silva RAMS, Morales G, Eulert E, Montenegro A, Ybañez R (1998). Outbreaks of trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* in cattle in Bolivia. *Vet Parasitol* 76:153-157.

Silva RAMS, Ramirez L, Souza SS, Ortiz AG, Pereira SR, Dávila AM (1999). Hematology of natural bovine trypanosomosis in the Brazilian Pantanal and Bolivian wetlands. *Vet Parasitol.* Aug 85(1):87-93.

Silva RAMS, Seidl A, Ramirez L, Dávila AMR (2002). *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: Biologia, Diagnóstico e Controle [artigo on-line]. Embrapa Pantanal, disponível na internet via WWW: <URL: [http:// www.cpap.embrapa.br](http://www.cpap.embrapa.br). [arquivo capturado em 25 de maio de 2005].

Smyth AJ, Ghosh A, Hassan MQ, *et al.* (1992). Rapid and sensitive detection of Leishmania kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. *Parasitology.* Oct 105 (2):183-192.

Solano P, Michel JF, Lefrançois T, *et al.* (1999). Polymerase chain reaction as a diagnosis tool for detecting trypanosomes in naturally infected cattle in Burkina Faso. *Vet Parasitol* 86:95–103.

Songa EB, Painsavoine P, Wittouck E, *et al.* (1990). Evidence for kinetoplast and nuclear DNA homogeneity in *Trypanosoma evansi* isolates. *Mol Biochem Parasitol*. Dec 43(2):167-179.

Sperling L, Dessen P, Zagulski M, *et al.* (2002). Random sequencing of Paramecium somatic DNA. *Eukaryot Cell*. Jun 1(3):341-352.

Stuart K (1983). Kinetoplast DNA, mitochondrial DNA with a difference. *Mol Biochem Parasitol* 9:93-104.

Sturm NR, Degraeve W, Morel C, Simpson L (1989). Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol*. Mar 33(3):205-214.

Sugisaki H, Ray DS (1987). DNA sequence of *Crithidia fasciculata* kinetoplast minicircles. *Mol Biochem Parasitol*. Apr 23(3):253-263.

Tan TH, Pach R, Crausaz A, Ivens A, Schneider A (2002). tRNAs in *Trypanosoma brucei*: genomic organization, expression, and mitochondrial import. *Mol Cell Biol*. Jun 22(11):3707-3717.

Tejera E (1920). - Un nouveau flagellé de *Rhodnius prolixus*, (*Trypanosoma* ou *Crithidia*) *rangeli* n. sp. *Bull Soc Pathol Exot* 13:527.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994). ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 22:4673-4680.

Urmenyi TP, Bonaldo MF, Soares MB, Rondinelli E. (1999). Construction of a normalized cDNA library for the *Trypanosoma cruzi* genome project. *J Eukaryot Microbiol*. Sep-Oct 46(5):542-544.

Ventura RM, Paiva F, Silva RA, Takeda GF, Buck GA, Texeira MM (2001). *Trypanosoma vivax*: characterization of the spliced-leader gene of a Brazilian stock and species-specific detection by PCR amplification of an intergenic spacer sequence. *Exp Parasitol* 99:37-48.

Verdún RE, Di Paolo N, Urmenyi TP, Rondinelli E, Frasch AC, Sanchez DO (1998). Gene discovery through expressed sequence Tag sequencing in *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. Nov 66(11):5393-8.

Versteeg R, van Schaik BD, van Batenburg MF, *et al.* (2003). The human transcriptome map reveals extremes in gene density, intron length, GC content and repeat pattern for domains of highly and weakly expressed genes. *Genome Res*. Sep 13(9):1998-2004.

Wells EA, Betancourt A, Ramirez LE (1977). The geographic distribution of *Trypanosoma vivax* in the New World. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 71: 448.

Whitelaw DD, Gardiner PR, Muray M (1988). Extravascular foci of *Trypanosoma vivax* in goats: the central nervous system and aqueous humor of the eyes as potential sources of relapse infections after chemotherapy. *Parasitology* 97:1-11.

Wilson AJ (1969). Value of the indirect fluorescent antibody test as a serological aid to diagnosis of Glossina -transmitted bovine trypanosomiasis. *Trop Anim Health Prod* 1:89-95.

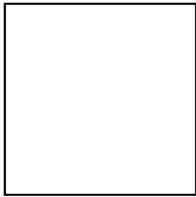
Woo PTK (1970). The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta Tropica* 27:384-386.

Wright PF, Nilsson E, Van Rooij EM, Lelenta M, Jeggo MH (1993). Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Rev Sci Tech*. Jun 12(2):435-450.

Yurchenko V, Hobza R, Benada O, Lukes J (1999) *Trypanosoma avium*: large minicircles in the kinetoplast DNA. *Exp Parasitol*. Jul 92(3):215-218.

Yurchenko VYu, Kolesnikov AA (2001). Minicircular kinetoplast DNA from Trypanosomatidae.
Mol Biol (Mosk). Jan-Feb 35(1):3-13.

Zieman H (1905). Beitrag zur Trypanosomenfrage. *Cbl. Bakt (I. Abt.)*, 38:307.



8 - Anexo