



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA



**“tRNA LIGASE (Trl1) – *like* DE
Trypanosoma brucei:
EFEITOS DO RNAi *in vivo*”**

Roberta Eitler Bruno

RIO DE JANEIRO

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA

**“tRNA LIGASE (Trl1) *-like* DE
Trypanosoma brucei:
EFEITOS DO RNAi *in vitro*”**

Roberta Eitler Bruno

Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em Química
Biológica, Instituto de Bioquímica Médica,
Universidade Federal do Rio de Janeiro
(IBqM/UFRJ), como parte dos requisitos
necessários para a obtenção do título de
Mestre em Química Biológica

Orientadora: Dra. Carla Ribeiro Polycarpo

RIO DE JANEIRO

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Eitler, Roberta Bruno

“tRNA ligase (Trl1) -like de *Trypanosoma brucei*: efeitos do RNAi *in vivo*” / Roberta Eitler Bruno - 2012. xx, 110 p

Orientadora: Carla Ribeiro Polycarpo

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica.

1. *Trypanosoma brucei*. 2. tRNA ligase. 3. Editoração de tRNA.

I. Polycarpo, Carla, R. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica. III. tRNA ligase (Trl1)-like de *Trypanosoma brucei*: efeitos do RNAi *in vivo* / Roberta Eitler Bruno.

ROBERTA EITLER BRUNO

**“tRNA LIGASE (Trl1) -like DE *Trypanosoma brucei*:
EFEITOS DO RNAi *in vivo*”**

Aprovada em _____ de _____ de 2012, pela Banca Examinadora:

Orientadora: Dr^a. Carla Ribeiro Polycarpo

Professor Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica/CCS/UFRJ

Dr. José Roberto Meyer Fernandes

Professor Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ

Dr. André Luis Souza dos Santos

Professor Adjunto do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, UFRJ

Dr^a. Claudia Mansini d'Avila Levy

Pesquisadora Fiocruz

Revisor/Suplente interno: Dr. Marcelo Rosado Fantappié

Professor Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica/CCS/UFRJ

Suplente externo: Dr^a. Juliany Cola Fernandes Rodrigues

Professor Adjunto do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ

*Aos meus pais
e ao Rafael
Amo vocês!!*

AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais, por acreditarem e apoiarem a realização dos meus sonhos!
- Ao Rafael por ter sobrevivido ao meu mestrado, pelas intermináveis discussões sobre meus resultados, por estar sempre ao meu lado, por me apoiar, me divertir, me animar, e principalmente, por me amar!
- Ao Fumaça por ter permanecido sempre ao meu lado durante a digitação deste trabalho.
- À Fabi e à Isabel pela imensa amizade e por me ajudarem a concluir esse trabalho.
- Às minhas grandes amigas Aline e Cynthia, por tudo!
- À Juliana, Joyce, Bárbara, ao Biscoito e ao Teko, por nossa amizade e por todos os conselhos!
- Aos amigos do laboratório, obrigada por toda a ajuda.
- À Carla Polycarpo, pelo suporte técnico, conhecimento e auxílio na realização desse trabalho.
- À Fernanda, ao professor Otávio Thiemann e a todos do seu laboratório por me ensinarem a técnica de RNAi e por me acolherem tão bem.
- Ao Marcelo Fantappié, por ter mantida a porta de seu laboratório sempre aberta para mim.
- Ao Vitor, Schneider e à Amanda, por toda a ajuda e incentivo.
- Ao Claudio Masuda, pela paciência e pelos ensinamentos.
- Aos alunos do Claudio e da Monica, pelos reagentes, pelas risadas e por todo o apoio.
- À Elaine, por me receber em seu laboratório, permitindo o uso do citômetro.
- Aos alunos da Elaine: Marcela, Elen, Kathy, Ana Paula, Cris, Vitor e Eduardo, pelo apoio e revezamento do citômetro.
- Às minhas amigas: Amanda, Andreia, Angélica, Andréa, Dani, Fabi e Pati, pela amizade.
- Ao Ralfa, obrigada por tudo sempre!
- Ao Paulinho e Pardal, pela ajuda com o citômetro.

- À Patrícia Ingridis, Tereza, Patrícia, Leandro e Charlion, pelo carinho, pela resolução de pepinos, burocracias e por descomplicar um pouco da nossa vida.
- Ao S. João, pela amizade e pela companhia nos almoços.
- À Creuza, pelo carinho, conselhos e por me ensinar a levar a vida de forma mais leve.
- Aos professores Pedro, Orlando, Ricardo, Sorgine, Gabriela, Marcus, Aurélio e Patrícia por todo carinho e apoio.
- E a todos os amigos que não foram citados, mas que souberam compreender minha ausência durante o período do mestrado.

“No meio do caminho tinha uma pedra
tinha uma pedra no meio do caminho
tinha uma pedra
no meio do caminho tinha uma pedra.

Nunca me esquecerei desse acontecimento
na vida de minhas retinas tão fatigadas.
Nunca me esquecerei que no meio do caminho
tinha uma pedra
tinha uma pedra no meio do caminho
no meio do caminho tinha uma pedra.”

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

EITLER, Roberta Bruno. **tRNA ligase (Trl1) -like de *Trypanosoma brucei***: efeitos do RNAi *in vivo*. Rio de Janeiro, 2012. Dissertação (Mestrado em Química Biológica) – Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 2012.

Doenças negligenciadas são definidas como um grupo de doenças infecciosas crônicas relacionadas com a pobreza que ocorrem principalmente em populações da América Latina, África e Ásia. Entre elas estão a Doença de Chagas, Doença do Sono e Leishmaniose, transmitidas por insetos e causadas pelos protozoários *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* e *Leishmania* sp., respectivamente. Em busca de conhecimento básico sobre a biologia do tRNA destes tripanossomatídeos e prevendo a possibilidade de descoberta de novos alvos terapêuticos foi estudado o pouco conhecido mecanismo de editoração de tRNAs em tripanossomatídeos. Dentre as enzimas envolvidas na maturação de tRNAs, estão as tRNA ligases, que efetuam a ligação dos éxons gerados após retirada do íntron pela ação de uma tRNA endonuclease. O produto do gene da putativa tRNA ligase dos tripanossomatídeos (*trl1-like*) não possui homologia com o gene da tRNA ligase humana, sendo um promissor alvo para droga. O gene *trl1* (tRNA ligase) é essencial para a levedura *S. cerevisiae*, dessa forma, esse trabalho procurou caracterizar funcionalmente a tRNA ligase de tripanossomatídeos, analisando os domínios da enzima dos parasitos, investigando a essencialidade do gene *trl1-like* em *T. brucei* e observando a atividade da enzima de *T. brucei in vitro*. O alinhamento das sequências da tRNA ligase de classe I de tripanossomatídeos e leveduras confirmou que as sequências tratam-se de tRNA ligases, apresentando os três domínios: ligase, polinucleotídeo quinase e fosfodiesterase cíclica assim como os motivos conservados essenciais para o funcionamento da enzima. Para os ensaios *in vivo*, foi construído o plasmídeo pLew100-trl1-2 e transfectado em *T. brucei* procíclicos, para os ensaios de RNAi. Durante a indução do RNAi pode-se observar a inibição do crescimento do *T. brucei*, sempre a partir do quarto dia de indução. No entanto, nenhuma alteração no ciclo celular e na viabilidade dos parasitos foi verificada. O silenciamento gênico foi confirmado por qPCR, demonstrando diminuição da expressão do mRNA a partir de 48 h de indução. A enzima Trl1-like foi expressa e purificada *in vitro* sob diversas condições experimentais, no entanto não foi possível testar sua atividade devido a sua instabilidade *in vitro*. Esse trabalho permitiu demonstrar a importância da Trl1-like para a sobrevivência do *T. brucei* contribuindo para um maior entendimento da biologia dos tripanossomatídeos.

ABSTRACT

EITLER, Roberta Bruno. **tRNA ligase (Trl1-like) de *Trypanosoma brucei***: efeitos do RNAi *in vitro*. Rio de Janeiro, 2012. Dissertação (Mestrado em Química Biológica) – Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 2012.

Neglected Diseases are defined as a group of chronic infectious diseases that affect poor populations occurring mainly in Latin America, Africa and Asia. These include Chagas disease, Sleeping Sickness and leishmaniasis, which are transmitted by insects and caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* and *Leishmania* sp., respectively. The mechanism of tRNA editing in trypanosomes have been studied in order to better understand the tRNA biology of trypanosomes in the search for new therapeutic targets. tRNA ligases are among the enzymes involved in the maturation of tRNAs, responsible for the ligation of the two tRNA fragments generated after intron removal by the activity of a tRNA endonuclease. The putative tRNA ligase enzyme of trypanosomes has no homology with the human tRNA ligase protein, making it a promising drug target. Since the tRNA ligase gene is essential for the survival of the yeast *S. cerevisiae* this study aimed to functionally characterize the tRNA ligase gene of trypanosomatids, thorough analysis of enzymatic domains of the enzyme from the parasites, essentiality investigating *trl1-like* gene in *T. brucei* by RNAi silencing and observation of enzyme activity of *T. brucei in vitro*. Alignment of sequences of class I tRNA ligase of trypanosomatids and yeasts confirmed that these are in fact tRNA ligase sequences, which contains, besides the conserved motives essential for enzyme functioning, three distinct domains: ligase, polynucleotide kinase and cyclic phosphodiesterase. Plasmid pLew100-trl1-2 was constructed and transfected in *T. brucei* procyclic, for the production of RNAi. Induction of RNAi in *T. brucei* resulted in growth inhibition, after the fourth day of induction. However, no changes in cell cycle and viability of parasites were observed. Gene silencing was confirmed by qPCR, which demonstrated a decrease in mRNA expression levels of after 48 h of induction. *Trl1-like* enzyme was expressed and purified *in vitro* under various experimental conditions, however, it was not possible to test its activity due to its *in vitro* instability. This work demonstrated that *Trl1-like* plays an important role in the survival of *T. brucei*, hence, contributing for a better understanding of the biology of trypanosomatids.

LISTA DE FIGURAS

	Página	
Figura 1	Distribuição geográfica da Tripanossomíase Africana	24
Figura 2	Ciclo biológico do <i>Trypanosoma brucei</i>	25
Figura 3	Distribuição geográfica da Doença de Chagas	29
Figura 4	Ciclo Biológico, doméstico e selvagem do <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
Figura 5	Distribuição geográfica de Leishmaniose no mundo	33
Figura 6	Ciclo biológico da <i>Leishmania sp.</i>	35
Figura 7	Duas representações da estrutura do tRNA	39
Figura 8	Quadro demonstrativo das modificações das quatro bases do tRNA: uracila, citosina, adenosina e guanósina	41
Figura 9	tRNA com mais de um íntron presente em arqueias.	44
Figura 10	Modelo da tRNA endonuclease	45
Figura 11	Mecanismo de processamento do tRNA de plantas e fungos	46
Figura 12	Representação esquemática das quatro classes de tRNA ligases com suas correspondentes atividades enzimáticas	47
Figura 13	Esquema demonstrando as duas via de editoração do tRNA	49
Figura 14	Sequência do gene da tRNA ligase de <i>Trypanosoma brucei</i>	56
Figura 15	Mapa do vetor de clonagem pTZ57R/T	58
Figura 16	Mapa do vetor de clonagem pLew 100	63
Figura 17	Esquema da construção do vetor de expressão de dsRNA da Trl1-like	65
Figura 18	Região de inserção dos genes alvos no vetor pLew100	66
Figura 19	Alinhamento das sequências da tRNA ligase de classe I de tripanossomatídeos e fungos	77
Figura 20	Alinhamento do fragmento de 617 pares de base do gene trl1-like obtido após sequenciamento	78
Figura 21	Digestão do pLew100 e do pTZ57R/T-trl1 com XbaI e MluI	79
Figura 22	Digestão do pTZ57R/T-trl1 com XbaI e MluI e do pJM325 com NheI e HindIII	80

Figura 23	Digestão do pJM325-trl1 com XbaI e HindIII	81
Figura 24	Digestão do pLew100-trl1 com o fragmento da sequência antisense do gene da tRNA ligase com XbaI e HindIII	82
Figura 25	Digestão do pLew100-trl1-2 MluI e HindIII	83
Figura 26	Digestão do pLew100-trl1-2 com EcoRV	83
Figura 27	Testes dos clones obtidos após a transfecção com do plasmídeo pLew 100-trl1-2	85
Figura 28	Curvas de crescimento do <i>T. brucei</i> após silenciamento do gene <i>trl1-like</i>	86
Figura 29	Tendência do crescimento do <i>Trypanosoma brucei</i> após silenciamento gênico da tRNA ligase	87
Figura 30	Análise do ciclo celular do <i>T. brucei</i> durante a indução do gene <i>Trl1-like</i>	89
Figura 31	Ensaio de viabilidade do <i>T. brucei</i> durante a indução do gene <i>Trl1-like</i>	90
Figura 32	Análise quantitativa da expressão da tRNA ligase após o silenciamento por PCR em tempo real	91
Figura 33	Mini-indução da bactéria <i>E. coli</i> roseta DE3 transformada com o plasmídeo pET15b com o gene da tRNA ligase de <i>T. brucei</i>	92
Figura 34	Teste da melhor condição de expressão da tRNA ligase em <i>E. coli</i> roseta DE3	93
Figura 35	Eluições obtidas durante a purificação da tRNA ligase de <i>T. brucei</i> expressa <i>in vitro</i>	94
Figura 36	Western blot das amostras purificadas após a expressão da tRNA ligase <i>in vitro</i>	95

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Tabela com a média dos valores máximos (cél/mL) obtidos durante a contagem do crescimento celular do <i>T. brucei</i> na curva de silenciamento	88

LISTA DE ABREVIATURAS

μF	Microfaraday
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrometro
μM	Micromolar
anti-his	anticorpo monoclonal anti-his
anti- <i>trl1-like</i>	Anticorpo anti-Trl1- <i>like</i>
APS	Persulfato de amônio
ATP	Adenosina Trifosfato
BHB	Bulbo-hélice-bulbo
CaCl_2	Cloreto de cálcio
cDNA	DNA complementar
Clp1/hClp1	Polinucleotídeo quinase / polinucleotídeo quinase de humano
CPDase	fosfodiesterase cíclica
DNDi	Iniciativa de medicamentos para Doenças Negligenciadas
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatado
dsRNA	RNA de dupla fita
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FINEP	Financiadora de Estudos e Projetos
GTP	Guanosina Trifosfato
HCl	Ácido clorídrico
HSPC117	tRNA Ligase de classe IV (humanos)
I	Induzido: <i>T. brucei</i> 29-13 transfectado e induzido com tetraciclina
IgM	imunoglobulinas
IPTG	beta-isopropiltiogalactopiranosídeo
KCl	Cloreto de potássio
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Quilo Daltons

kDNA	DNA do kinetoplasto
KH_2PO_4	Fosfato de potássio monobásico
LB	Meio Luria Bertani
LiCl	Cloreto de Lítio
M	Molar
mA	Miliampere
MgCl_2	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mm	Milímetros
mRNA	RNA mensageiro
ms	Milisegundos
Na_2HPO_4	Fosfato de sódio dibásico
NaAc	Acetato de Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NAD^+	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica
NECT	Tratamento Combinado de Nifurtimox e Eflornitina
NI	Não-Induzido: <i>T. brucei</i> 29-13 transfetado sem adição de tetraciclina
NIH	Instituto Nacional de Saúde
PARP	Proteína acídica repetitiva na forma procíclica
pb	Pares de bases
PBS	Tampão Fosfato de Sódio Salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pET15b	Plasmídeo de subclonagem
PI	Iodeto de propídio
pJM325	Plasmídeo de clonagem
pJM325-trl1	Plasmídeo de clonagem com o fragmento antisenso da <i>trl1-like</i>
pLEW100	Plasmídeo de subclonagem
pLEW1000-trl1-2	Plasmídeo de subclonagem com os fragmentos senso e antisenso da <i>trl1-like</i>
pmoles	Picomoles

PNK	Polinucleotídeo quinase
pTZ57R/T	Plasmídeo de clonagem
pTZ57R-trl1	Plasmídeo de clonagem com o fragmento senso da <i>trl1-like</i>
PVDA	Polivinilideno difluorídeo hidrofóbico
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
RNAi	RNA de interferência
RNL	tRNA Ligase de classe III
rpm	Rotações por minuto
RtcB	tRNA ligase de <i>E. coli</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
siRNA	Pequenos RNAs de interferência
TAE	Tris Acetato EDTA
TBS	Tampão Fosfato de Sódio Salino
TBS-Tween	Tampão Fosfato de Sódio Salino com Tween 20
Tc	Tetraciclina
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil-1,2-diaminometano
Tet	Tetraciclina
Tpt1	2'-fosfotransferase
Trl1	tRNA Ligase de <i>S. cerevisiae</i>
trl1F	Oligonucleotídeo do fragmento do gene da <i>trl1-like</i> usado para a construção do RNAi (senso)
Trl1-like	tRNA ligase de <i>Trypanosoma brucei</i>
trl1R	Oligonucleotídeo do fragmento do gene da <i>trl1-like</i> usado para a construção do RNAi (antisense)
tRNA	RNA transportador
tRNA ^{Tyr}	tRNA decodificador da Tirosina
UPR	resposta de proteínas desdobradas
V	Volts
VSG	glicoproteínas variantes de superfície
W	Wats
WHO	Organização Mundial de Saúde
WT	cepa de <i>T. brucei</i> 29-13 não transfectada sem adição de tetraciclina

WTT

cepa de *T. brucei* 29-13 não transfectada com adição de tetraciclina

X-gal

5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

	Página
1 – INTRODUÇÃO	21
1.1 Doenças negligenciadas	21
1.2 Doença do Sono	22
1.3 Doença de Chagas e Leishmaníose	28
1.4 O genoma dos tritryps	36
1.5 RNAs transportadores (tRNAs)	38
1.6 tRNAs e íntrons	43
1.7 tRNA ligases	47
2 – OBJETIVOS	52
2.1 Objetivo geral	52
2.2 Objetivos específicos	52
3 – MATERIAL E MÉTODOS	54
3.1 Alinhamento das sequências da tRNA ligase de classe I	54
3.2 Cultivo de <i>Trypanosoma brucei</i>	54
3.3 Extração de DNA genômico de <i>T. brucei</i>	54
3.4 Amplificação do fragmento do gene <i>trl1-like</i> de <i>Trypanosoma brucei</i>	55
3.5 Eletroforese em gel de agarose	57
3.6 Purificação do fragmento de DNA amplificado por PCR em gel de agarose	57
3.7 Ligação do fragmento do gene <i>trl1-like</i> de <i>T. brucei</i> ao vetor de clonagem pTZ57R/T	58
3.8 Diálise da ligação do fragmento do gene <i>trl1-like</i> de <i>T. brucei</i> ao vetor de clonagem pTZ57R/T	59
3.9 Preparação de bactérias <i>Escherichia coli</i> eletrocompetentes	59

3.10	Transformação de bactérias eletrocompetentes	60
3.11	PCR de colônia	61
3.12	Preparação de DNA plasmidial	61
3.13	Sequenciamento de DNA	62
3.14	Construção do vetor de RNAi	62
3.15	Transfecção da cepa procíclica de <i>T. brucei</i> 29-13 com vetor para indução de RNAi	66
3.16	Seleção e crescimento de clones <i>T. brucei</i> pLew100/Tb tRNA ligase	67
3.17	Indução do silenciamento do gene <i>trl1-like</i> de <i>T. brucei</i>	68
3.18	Análise do ciclo celular	69
3.19	Ensaio de viabilidade	69
3.20	Extração de RNA total do <i>T. brucei</i> induzido	70
3.21	Síntese de cDNA	70
3.22	Amplificação do cDNA por PCR	71
3.23	PCR quantitativo em tempo real	71
3.24	Cálculo da quantificação relativa	72
3.25	Subclonagem e Clonagem dos genes <i>trl1-like</i> de <i>T. cruzi</i>	72
3.26	Expressão da enzima Trl1-like recombinante de <i>T. cruzi</i>	73
3.27	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida 10 % em condições desnaturantes	74
3.28	<i>Western Blot</i>	74
3.29	Análises estatísticas	75
4	– RESULTADOS	76
4.1	Análise dos domínios da tRNA ligase de <i>T. brucei</i>	76
4.2	Construção do plasmídeo para indução de RNA de interferência	78
4.3	Silenciamento da tRNA ligase de <i>Trypanosoma brucei</i>	84
4.4	Expressão da tRNA ligase de <i>Trypanosoma brucei in vitro</i>	92

5 – DISCUSSÃO	96
6 – CONCLUSÕES	100
7 – REFERÊNCIAS	101

1. Introdução

1.1 Doenças negligenciadas

Doenças negligenciadas são definidas como um grupo de doenças infecciosas crônicas relacionadas com a pobreza que ocorrem principalmente em populações da América Latina, África e Ásia (PLOS - <http://www.plosntds.org/static/scope.action>). Tais doenças podem ser causadas por protozoários (Doença de Chagas, Tripanossomíase Africana, Leishmanioses, Amebíase, Giardíase e Balantidiose), helmintos (Teníase, Esquistossomose, Filariose, Ascaridíase etc), vírus (Dengue, Febre Amarela, Raiva etc), bactérias (Bartonelose, Tuberculose, Hanseníase, Cólera etc), fungos (Micetoma e Paracociodiomiose) e ectoparasitos (Escabiose e Míase) (PLOS - www.plosntds.org/static/scope.action).

A maioria das doenças negligenciadas é endêmica dos trópicos, em locais com carência de água potável e saneamento básico, com moradias precárias e com pouco ou nenhum acesso a rede de saúde (Villa, 2009). Normalmente, essas doenças não causam surtos, caracterizam-se por serem doenças crônicas, levando a queda de produtividade de trabalhadores, problemas no desenvolvimento infantil e na gravidez (Drugs for Neglected Disease initiative - DNDi América Latina - www.dndi.org.br/pt/doencas-negligenciadas.html e PLOS - www.plosntds.org/static/scope.action). Por se tratarem de doenças de pessoas com baixa ou nenhuma renda, tais doenças são esquecidas pelos desenvolvedores de medicamentos, pelos governantes, por programas de saúde pública e pela mídia

(National Human Genome Research Institute – NIH – <www.genome.gov/27531964>).

No entanto, no Brasil tem-se feito esforços a fim de solucionar esse problema, através do incentivo de projetos de pesquisa em instituições públicas e filantrópicas, visando o desenvolvimento de fármacos menos agressivos. O Brasil é classificado como o sexto país que mais investe em doenças negligenciadas, e o primeiro, dos países em desenvolvimento onde essas doenças são endêmicas (FINEP - <www.finep.gov.br/imprensa/revista/edicao6/inovacao_em_pauta_6_doencas_negl.pdf>).

1.2 Doença do Sono

A Tripanossomíase Africana ou Doença do Sono é causada pelo protozoário *Trypanosoma brucei*, que compreende cinco subespécies. São elas: *T. brucei rhodesiense*, *T. brucei gambiense*, *T. brucei brucei*, *T. brucei evansi* e *T. brucei equiperdum*. As cinco subespécies são morfológicamente indistinguíveis. A primeira subespécie (*T. b. rhodesiense*) responde por uma forma aguda e mais grave da doença, presente na África Oriental. A segunda subespécie (*T. b. gambiense*) causa a doença do sono da África Ocidental, e pode ser dividida em dois tipos: o tipo I que é caracterizado por baixa virulência para o homem e o tipo II, o qual provoca uma síndrome que lembra a infecção por *T. b. rhodesiense*, maior virulência. A terceira subespécie citada (*T. b. brucei*), com ampla distribuição na África tropical, é encontrada na fauna nativa de ungulados (sobretudo nos antílopes) e em carnívoros, causando doença nos animais domésticos, popularmente chamada de nagana. O *T. b. evansi*, que é mecanicamente transmitido por moscas hematófagas, em geral

pertencentes ao gênero *Tabanus*, infecta camelídeos e outros mamíferos domésticos do Velho Mundo, nos quais causa uma tripanossomíase conhecida como surra. Na América Latina, adquiriu um outro vetor, além das moscas: o morcego *Desmodus rotundus*, responsável pela transmissão entre equinos e bovino. A última subespécie (*T. b. equiperdum*) é o agente causal de uma infecção de equinos, a durina, transmitida diretamente de animal a animal pelo coito. As três últimas subespécies não afetam o homem (Rey, 2008; Urech *et al.*, 2011).

Existem aproximadamente 60 mil casos da doença no planeta e anualmente ocorrem 48 mil mortes. Ao todo, 36 países são considerados endêmicos. No entanto, seis desses países (regiões com números de casos superiores a 101, conforme legenda da figura 1) são mais afetados, representando 96% do total de casos (DNDi – www.dndi.org/diseases/hat.html; Simarro *et al.*, 2011). Normalmente, as áreas afetadas são as áreas rurais, embora sejam registrados muitos casos no subúrbio de Kinshasa e Luanda, capital da República Democrática do Congo e de Angola, respectivamente (WHO - www.who.int/trypanosomiasis_african/en/).

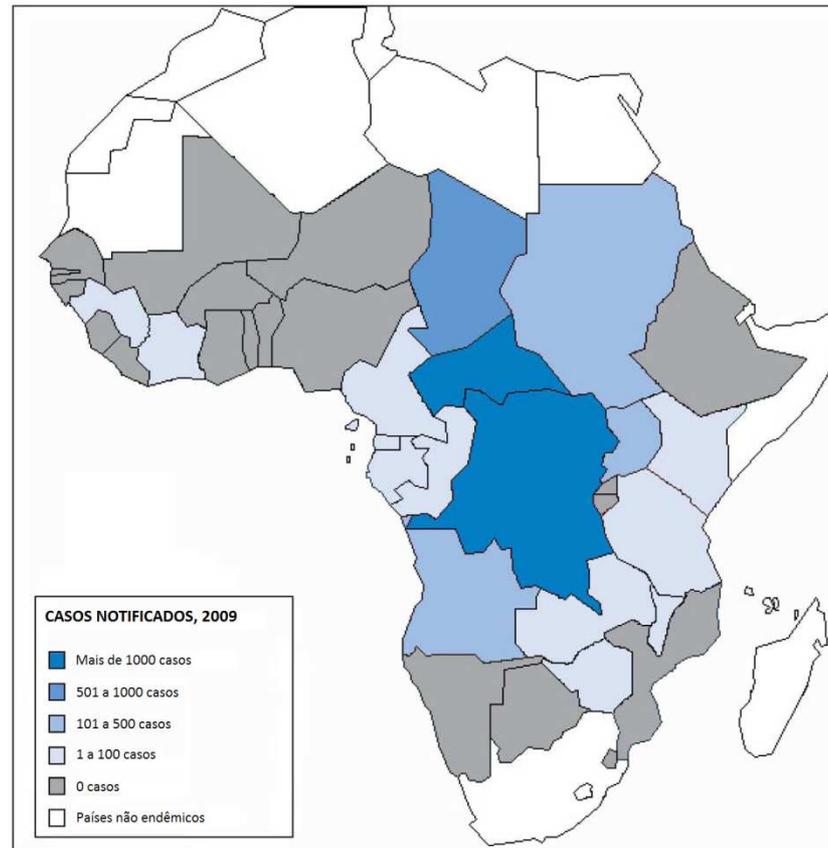


Figura 1: **Distribuição geográfica da Tripanossomíase Africana.** Cada tonalidade de azul indica uma faixa de casos notificados em 2009, de acordo com a legenda da figura (Figura adaptada de Simarro *et al.*, 2011).

A Doença do Sono é uma das mais complexas doenças tropicais. Ela é causada pela forma tripomastigota metacíclica do protozoário *Trypanosoma brucei*, que é transmitido no momento da picada da mosca *Glossina sp.*, conhecida como Tsé-Tsé, pela saliva. Nos vasos sanguíneos e linfáticos do hospedeiro, o parasito se diferencia em uma forma tripomastigota longa e delgada que se replica e diferencia-se em uma forma pequena não-proliferativa (figura 2). Essa forma pode ser ingerida pela mosca durante a picada do hospedeiro vertebrado, se transformando em procíclicos no intestino do inseto. Os procíclicos se replicam por divisão binária, colonizam o intestino do inseto e seguem para as glândulas salivares, onde se transformam em epimastigotas e, por fim em tripomastigotas metacíclicos, encerrando o ciclo (Pays *et al.*, 2006; Cuervo *et al.*, 2010).

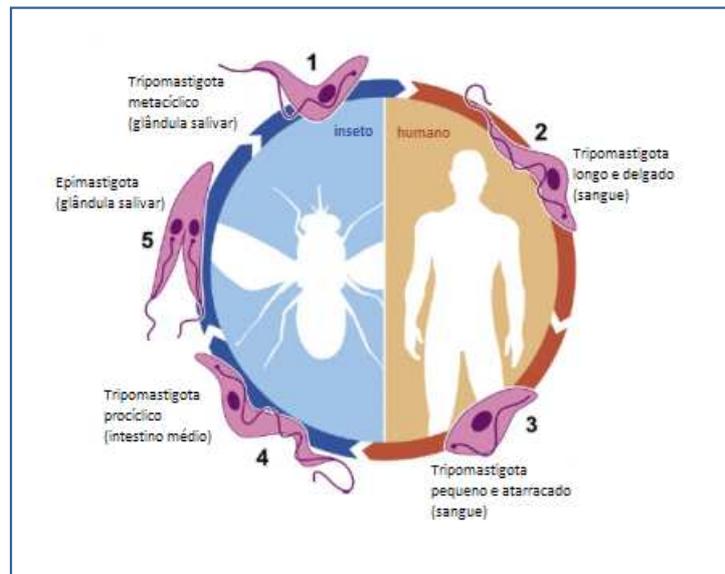


Figura 2: **Ciclo biológico do *Trypanosoma brucei*** (adaptada de Cuervo *et al.*, 2010).

As dimensões do *T. brucei* variam entre 10 a 40 μm . As formas finas (enumeradas de 1, 2, 4 e 5, na figura 2) costumam ter o extremo posterior afilado, mas nunca pontudo, o cinetoplasto pequeno subterminal, o flagelo com um segmento que é livre e relativamente longo, núcleo alongado e geralmente central. As formas largas (forma de número 3, na figura 2) não costumam apresentar a porção livre do flagelo, que é curto, mas possuem membrana ondulante bem desenvolvida, o núcleo é arredondado e localiza-se na parte central ou posterior do citosomo. As formas finas se reproduzem ativamente por divisão binária, são mais características e constantes, enquanto as grossas, únicas capazes de infectar as glossinas, variam no decurso da infecção e podem desaparecer na fase crônica (Rey, 2008).

O organismo hospedeiro vertebrado responde a infecção com a produção de anticorpos específicos a partir do reconhecimento de moléculas produzidas pelo *T. brucei* como os antígenos comuns e os específicos variantes. Os antígenos comuns

são constituídos por proteínas e outras substâncias internas ou somáticas. Já os antígenos variantes são glicoproteínas de baixo peso molecular chamadas de glicoproteínas variantes de superfície (Rey, 2008). As glicoproteínas variantes de superfície (VSG) constituem aproximadamente 10% de toda proteína total do *T. brucei* nas formas sanguíneas (Sheader *et al.*, 2005) e está presente em toda a superfície do parasito. O revestimento da superfície do parasito com vsg confere proteção pois modula o sistema imunológico do hospedeiro e protege o parasito contra o sistema complemento (Schwede *et al.*, 2011).

No entanto, o tripanossomatídeo só expressa uma VSG por vez, sendo assim, enquanto o sistema imune do hospedeiro produz imunoglobulinas (IgM) específicas para tal antígeno, o parasito multiplica-se exponencialmente. Sendo quase que completamente destruídos pela IgM, até o surgimento de uma nova população de flagelados expressando uma nova VSG. Essa nova VSG será então reconhecida pelo hospedeiro, que produzirá novos anticorpos (Rey, 2008 e Schwede *et al.*, 2011). Esse fenômeno pode se repetir diversas vezes, causando hipergamaglobulinemia e podendo gerar fator reumatóide (Rey, 2008).

A Doença do Sono possui quadro clínico muito varável, principalmente quando causado por *T. b. gambiense*. Há casos benignos que passam despercebidos. Normalmente, o período de incubação varia de alguns dias ou semanas para infecção por *T. b. rhodesiense* a alguns meses ou anos, infecção por *T. b. gambiense*. Dois períodos evolutivos são descritos durante a doença: o primeiro ou fase linfático-sanguínea e o segundo ou fase meningoencefálica. O primeiro período é caracterizado pela presença inicial de um cancro de inoculação de natureza inflamatória, com base rígida, presença de edema e infiltração perivascular de pequenas células redondas, com poucos polimorfonucleares.

Quando a parasitemia alcança altos índices, surge acesso febril, que dura de um a três dias, após alguns dias de remissão, o surto febril se repete, podendo a patologia, ser confundida com gripe ou malária. Em seguida, o hospedeiro apresenta cefaléias intensas e persistentes, dores musculares e articulares, pruridos, exantemas, anemia hemolítica e leucocitose com linfocitose e monocitose. Posteriormente, ocorre hipertrofia dos linfonodos do baço e fígado, onde degeneração e morte celular são acompanhadas de infiltração linfoplasmocitária e de macrófagos, ocorrem depósitos granuloses nos tecidos devido ao excesso de imunoglobulinas, alterações da parede vascular e perturbação da microcirculação. O segundo período é caracterizado pela escassez de parasitos no líquido cefalorraquidiano, entretanto, as lesões no sistema nervoso central conduzem a um quadro de meningoencefalite, com aumento do volume do líquido, infiltração de linfócitos e plasmócitos em torno dos vasos das meninges e do encéfalo e aparecimento de zonas de necrose isquêmica e de hemorragias petequiais, as quais passam a dominar a patologia e condicionar os aspectos clínicos da doença do sono (Rey, 2008; Kuepfer *et al.*, 2011; Urech *et al.*, 2011).

Até o presente momento, os fármacos existentes contra a Tripanossomíase Africana são muito tóxicos, caros e de difícil aplicação. Na primeira fase da doença, a suramidina sódica e a pentamidina são, em geral, eficazes, sendo ambas eficientes somente nos parasitos livres na corrente sanguínea, nenhuma delas é capaz de atravessar a barreira hemoliquórica. Já para a segunda fase, encontram-se disponíveis o Melarsoprol, a Eflornitina e o Nifurtimox, capazes de permear a barreira hemoliquórica (Simarro *et al.*, 2011). Por ser muito tóxico, o Melarsoprol, um derivado de arsênio, está sendo substituído desde 2003 por Eflornitina ou pelo Tratamento Combinado de Nifurtimox e Eflornitina (em inglês, NECT), embora já

tenha sido demonstrado que não há diferenças entre o tratamento apenas com Eflornitina ou com NECT (Simarro *et al.*, 2011). No entanto, o uso de Nifurtimox, tripanocida preconizado para a Doença de Chagas, combate o *T. brucei rhodesiense*, enquanto que a Eflornitina só mostrou-se útil no tratamento de infecções causadas por *T. b. gambiense* (Simarro *et al.*, 2011). Todos esses tripanocidas, além de muito tóxicos, são de aplicação venosa o que dificulta o tratamento, pois é necessária uma equipe especializada para aplicar e controlar/monitorar os efeitos colaterais, sendo difícil manter equipes em determinados locais endêmicos, visto que a doença é prevalente em ambientes rurais e selvagens (Simarro *et al.*, 2011).

1.3 Doença de Chagas e Leishmaniose

Assim como a Doença do Sono, a Doença de Chagas e a Leishmaniose são causadas por protozoários e consideradas doenças negligenciadas. Juntas, as três doenças são consideradas um grande problema de saúde pública, pois são endêmicas de regiões pobres em diversas partes do globo terrestre.

A Doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana é uma parasitose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). Essa endemia ocorre nos países do Cone Sul, na América Central e no México (figura 3). Atualmente 10 milhões de pessoas estão infectadas com o *T. cruzi* e 25 milhões de pessoas correm o risco de adquiri-la por habitarem zonas de risco (WHO, 2010 - <www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>).



Figura 3: **Distribuição geográfica da Doença de Chagas.** As áreas em vermelho destacam as regiões endêmicas, enquanto as azuis, destacam a região não-endêmica. (DNDi - América Latina, <www.dndi.org.br/pt/doencas-negligenciadas/doenca-de-chagas.html>).

Na cadeia de transmissão da Doença de Chagas estão envolvidos um grande número de reservatórios vertebrados como marsupiais, primatas e roedores, e invertebrados como triatomíneos, que dificultam a sua erradicação. O homem passou a fazer parte desta cadeia epidemiológica ao invadir as matas e provocar desequilíbrios ecológicos, forçando os triatomíneos a se adaptarem à vida doméstica, habitando as casas, como as de barro e as de *pau-a-pique*. Dessa forma, os triatomíneos encontraram refúgio e alimento suficiente no sangue humano e de animais domésticos (Coura e Borges-Pereira, 2010). Atualmente, tem sido reportada uma nova forma de transmissão da Doença de Chagas, que consiste na transmissão oral a partir da ingestão de alimentos contaminados com a fezes do barbeiro como o caldo de cana e o açaí (Andrade *et al*, 2011; Shikanai-Yasuda e Carvalho, 2012), atingindo inclusive regiões urbanas.

O quadro clínico da Doença de Chagas possui duas fases: uma aguda e outra crônica, que são separadas por um período indeterminado, durante o qual o paciente é assintomático. A fase aguda caracteriza-se por uma alta parasitemia,

febre, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia. Já a fase crônica começa entre 10 a 15 anos após a contaminação. Nesta fase, aproximadamente um terço dos pacientes infectados desenvolvem sintomas graves devido: ao comprometimento cardíaco (cardiopatia crônica chagásica) que pode levar à morte. Tal enfermidade é uma das principais causas de cardiopatia na América Latina (Rassi *et al.*, 2010). A Doença de Chagas também pode causar complicações no sistema digestivo causadas pela destruição da musculatura lisa do esôfago e do cólon (megassíndrome digestiva).

A combate da Doença de Chagas é baseada principalmente no controle dos insetos vetores (Abad-Franch *et al.*, 2010). Os dois únicos fármacos usados para o tratamento são o Nifurtimox (produzido pela Bayer e recentemente, com produção descontinuada) e o Benznidazol (fabricado pela Roche), eficazes apenas durante a fase aguda e na transmissão congênita. Porém, por não terem alvos moleculares específicos para o tripanossomatídeo, ambos têm baixa eficácia e severos efeitos colaterais. Até o momento, não há vacinas, nem tratamento efetivo para a fase crônica (Urbina, 2010) e há pouco interesse das indústrias farmacêuticas em produzir novos fármacos (Gates Foundation - www.gatesfoundation.org/topics/Pages/neglected-diseases.aspx).

O *Trypanosoma cruzi* apresenta os diferentes estágios morfológicos definidos: epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos, tripomastigotas sanguícolas e amastigotas. Nos hospedeiros vertebrados encontram-se os tripomastigotas do tipo sanguícolas e os amastigotas intracelulares, e nos hospedeiros invertebrados, epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos (Rey, 2008). As formas evolutivas são definidas pelo local de inserção do flagelo, pela presença de membrana ondulante,

pela posição do cinetoplasto e base do flagelo em relação ao núcleo, entre outras características (Hoare, 1966).

A forma tripomastigota é a forma infectiva, possui flagelo extracelular, membrana ondulante estreita pouco pregueada e cinetoplasto localizado entre o núcleo e o flagelo. A amastigota, não possui flagelo extracelular aparente e nem membrana ondulante. O seu cinetoplasto situa-se mais próximo ao núcleo em comparação a forma tripomastigota, sendo a forma multiplicativa no citoplasma da célula hospedeira. Já a forma epimastigota apresenta flagelo extracelular, uma pequena membrana ondulante e cinetoplasto junto ao núcleo quando comparado as outras formas, essa é a forma replicativa e não infectiva, encontrada na região posterior do intestino médio do hospedeiro invertebrado (Rey, 2008).

Sendo o triatomíneo um inseto hematófago, durante o repasto sanguíneo, ele pode ingerir o *Trypanosoma cruzi*, na forma tripomastigota sanguínea, caso o hospedeiro vertebrado esteja infectado (figura 4). No trato digestivo do inseto, o tripanossomatídeo se diferencia em epimastigota, se replica e diferencia-se novamente em tripomastigota metacíclico, o qual será eliminado junto às fezes do triatomíneo no momento da picada. Após a picada, o hospedeiro vertebrado costuma coçar ou esfregar o local, introduzindo os tripomastigotas nas mucosas e derme, onde infecta diferentes tipos celulares. O *T. cruzi* é capaz de invadir uma grande variedade de células não-fagocíticas, onde se diferencia em amastigota, replica-se e diferencia-se novamente em tripomastigota sanguíneo, levando ao rompimento da célula, depois de 3 a 5 dias, quando será disseminado na corrente sanguínea e outros tecidos, podendo infectar outras células ou ser sugado pelo triatomíneo, completando o ciclo – fase aguda. Outra possibilidade é a colonização

dos tecidos musculares e nervosos pelo parasito, ocasionando cardiomiopatia e desordens digestivas – fase crônica. (Gonzales-Perdomo *et al.*, 1988; Rey, 2008).

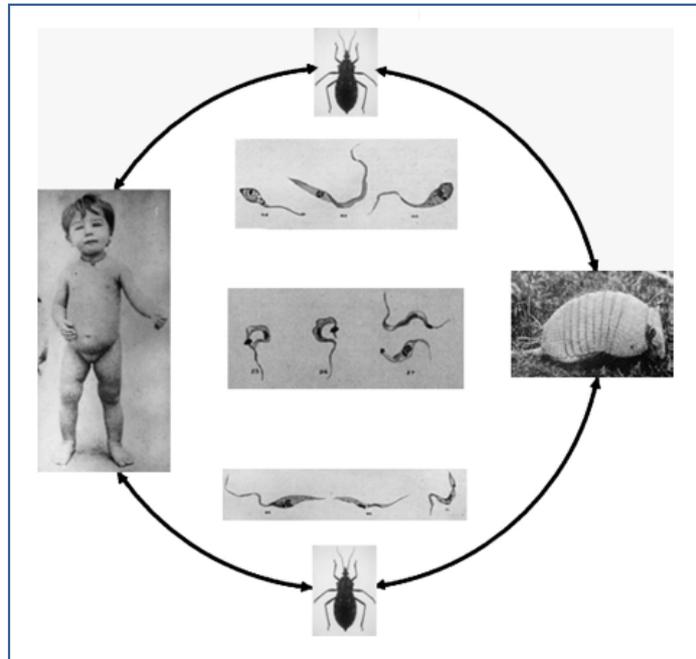


Figura 4: **Ciclo Biológico, doméstico e selvagem, do *Trypanosoma cruzi*** esquematizado pelo pesquisador Carlos Chagas (Coura e Borges-Pereira, 2010).

Outro problema de saúde pública em diversas regiões do mundo, conforme apresentado na figura 5, e também uma doença negligenciada, é a leishmaníose. São estimados 500 mil casos de Leishmaniose visceral e 1,5 milhões de casos de Leishmaniose cutânea (figura 5), com 51 mil mortes anuais em todo o mundo (DNDi - <www.dndi.org/diseases/vl.html>). Atualmente, 350 milhões de pessoas estão em risco em 88 países dos trópicos, sub-trópicos e Europa mediterrânea (Cuervo *et. al.*, 2010).

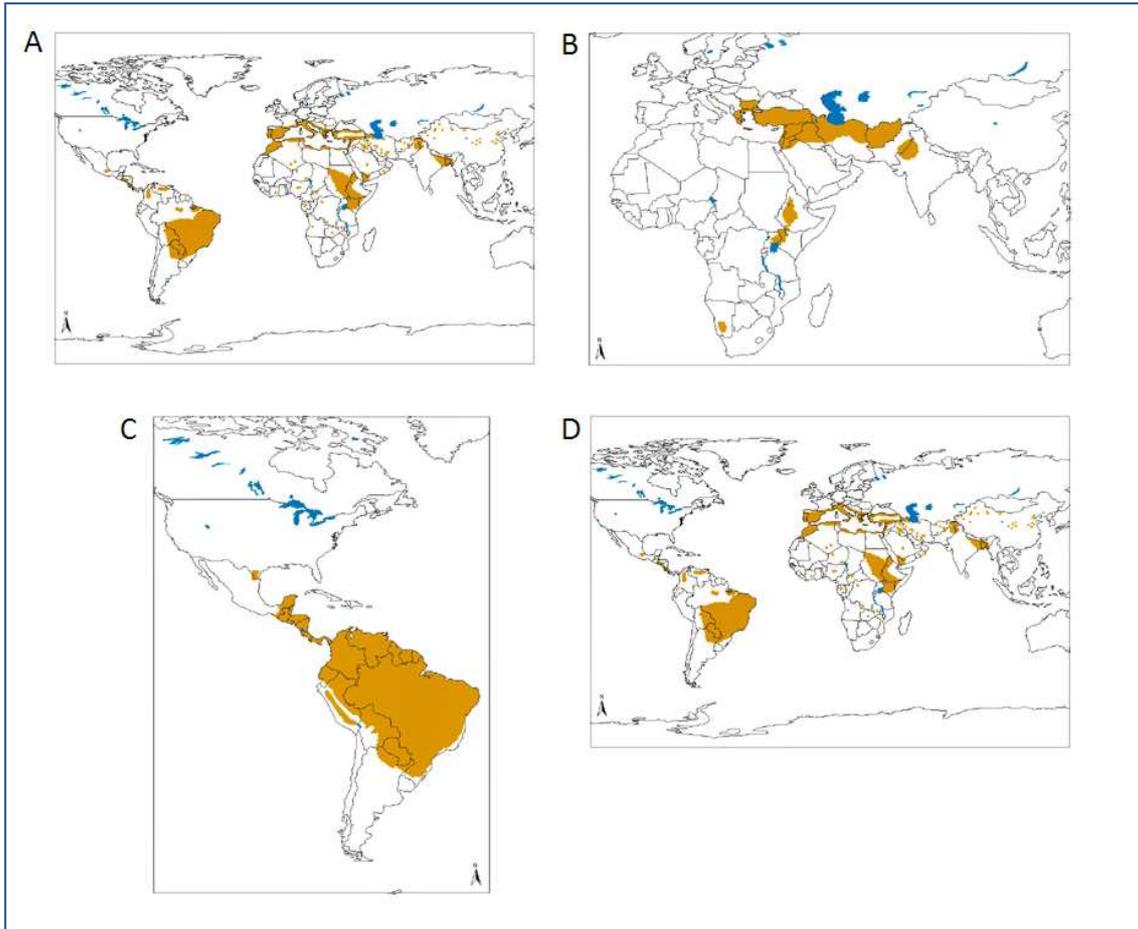


Figura 5: **Distribuição geográfica de Leishmaniose no mundo.** Em A, países acometidos com a Leishmaniose visceral, em B, Leishmaniose cutânea e mucocutânea, em C, Leishmaniose cutânea (*L. tropica* e *L. aethiopica*) e em D, Leishmaniose cutânea (*L. major*) (WHO - <www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index.html>).

A leishmaniose é causada pelo protozoário *Leishmania* sp.. Embora morfológicamente semelhantes, cada espécie de *Leishmania* causa doenças com características clínicas e epidemiológicas muito diferentes e peculiares, que podem ser agrupadas em quatro categorias (Sarkar *et al.*, 2011):

- Leishmaniose cutânea: lesões cutâneas limitadas, ulcerosas ou não, causadas principalmente pelas espécies *L. major*, *L. tropica*, *L. mexicana*, *L. peruviana*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. lainsoni*, *L. shawi*, *L. naiffi*. É relativamente benigna.

- Leishmaniose mucocutânea ou cutâneo-mucosa: formas cutâneas que se complicam com o aparecimento de lesões destrutivas nas mucosas do nariz, boca e faringe. É causada pela *L. braziliensis*.

- Leishmaniose cutânea difusa: lesões cutâneas nodulares ou em placas cobrindo grandes extensões do corpo, que se apresentam em indivíduos anérgicos ou, tardiamente, em pacientes que haviam sido tratados de calazar. *L. amazonensis* e *L. pifanoi* são os agentes etiológicos.

- Leishmaníase visceral ou calazar: formas viscerais, em que os parasitos da espécie *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi* apresentam acentuado tropismo pelo sistema fagocítico mononuclear do baço, fígado, da medula óssea e dos tecidos linfóides. Quando não tratada causa elevada taxa de mortalidade.

A leishmaniose é transmitida pela picada da fêmea do mosquito *Lutzomia sp.* ou *Phlebotomus sp.*. A *Leishmania sp.* promastigota metacíclica é inoculada no hospedeiro vertebrado, onde são fagocitadas pelos macrófagos (figura 6). No interior dos macrófagos, o parasito promastigosta se diferencia em amastigota, o qual se divide por fissão binária, até provocar a lise do macrófago. Nesse momento, os protozoários infectam outras células mononucleares fagocíticas da pele, do sistema reticular endotelial, da medula óssea, do fígado e do baço (Maltezou, 2010). O ciclo do parasito pode ser completado se ele for ingerido durante o repasto sanguíneo de outro flebotomíneo, permitindo que o parasito se diferencie em promastigotas procíclicos no intestino do inseto, proliferando-se e migrando para a probócite do mesmo, onde se diferencia em promastigota metacíclico, tornando-se apto para infectar um novo organismo que pode ser humano ou outros mamíferos como cães (Cuervo *et al.*, 2010).

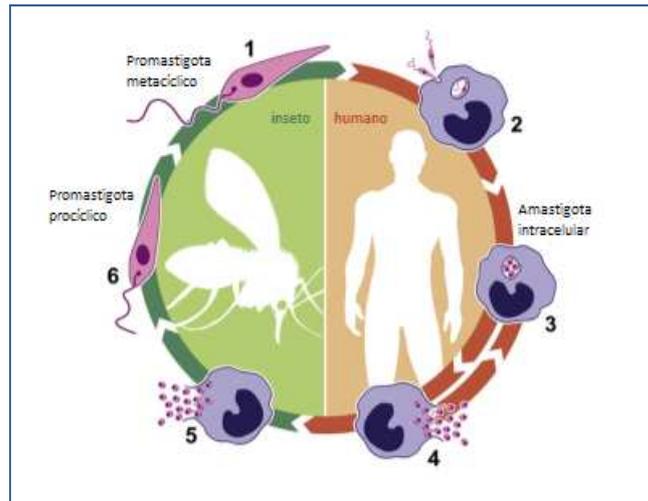


Figura 6: **Ciclo biológico da *Leishmania* sp.** (Figura adaptada de Cuervo *et al.*, 2010).

A leishmaniose foi selecionada, junto a outras doenças tropicais negligenciadas, pela Organização Mundial de Saúde em um programa que busca sua eliminação até 2015 (WHO - whqlibdoc.who.int/hq/2007/who_cds_ntd_2007.3_eng.pdf). No entanto, ainda não existe uma droga efetiva para o combate da doença. Os fármacos mais utilizados hoje em dia são os antimoniais, descoberto com atividade antileishmania, em 1912, pelo médico e cientista brasileiro Gaspar de Oliveira Vianna (Rey L., www.imtsp.fm.usp.br/portal/images/stories/dmdocuments/vol04_f1/47-52.pdf; Mackie, 1915), que curou diversos pacientes com injeção de Tártaro Emético. O tártaro emético é um antimonial pentavalente assim como o antimoniato de metaglumina e o estibogluconato de sódio, ambos possuem a mesma indicação, posologia e toxicidade, e a dose recomendada é de 10-20 mg/Kg/dia durante até 20 dias (Maltezou, 2010 e Oliveira *et al.*, 2011). Esses medicamentos são utilizados em todo o mundo com taxa de cura maior que 90%, exceto na Índia, onde apenas 60% dos casos tratados de leishmania visceral respondem ao tratamento. O tratamento inadequado de dose e duração (acima de 20 mg/Kg/dia durante 30 dias), por duas

décadas, ocasionou a seleção de parasitos resistentes, e a transmissão antrópica fez com que aumentasse a propagação desse parasito (Maltezou, 2010). Nos casos de resistência, intolerância ou contra-indicação, são receitados medicamentos de segunda linha como a anfotericina B, a pentamidina (Oliveira *et al.*, 2011) e a rifampicina (Rey, 2008).

Na tentativa de mudar essa situação, alguns grupos trabalham no desenvolvimento de vacinas, como Chakravarty *et al.* (2011) que desenvolveu uma vacina para leishmaniose visceral com três proteínas conservadas entre várias espécies de *Leishmania*, como *L. major*, *L. donovani*, *L. chagasi* e *L. braziliensis*, que são: o fator de iniciação do alongamento (LeIF), o antioxidante tiol específico (TSA) e a proteína 1 induzida por estresse (LmST1). Palatinik e colaboradores em parceria com a Pfizer desenvolveu uma vacina chamada de Leishmune®, atualmente utilizada em cães, na tentativa de evitar que os cães sejam hospedeiros da doença (Marcondes *et al.*, 2011).

1.4 O genoma dos tritryps

Os três parasitos *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major* pertencem à ordem Kinetoplastida sendo referido muitas vezes em conjunto como Tritryps. Ambos causam algumas das doenças mais debilitantes da humanidade, possuindo semelhanças como do ciclo de vida alternado entre inseto e hospedeiro mamífero, passando por distintas mudanças no desenvolvimento, tanto nos vetores quanto nos hospedeiros. Apesar de considerável esforços em pesquisa, os medicamentos existentes são altamente tóxicos e propenso ao desenvolvimento de resistência dos parasitos (Chanda *et al.*, 2007).

Os três protozoários possuem genomas com diferentes tamanhos sendo o genoma do *T. cruzi* diplóide com tamanho igual a 55 Mbp, os genomas do *T. brucei* e da *L. major* são haplóides com tamanhos iguais a 25 Mpb e 33 Mpb, respectivamente, distribuído em 28, 11 e 36 cromossomos diplóides, respectivamente, com aproximadamente 12000, 9068 e 8311 genes codificadores de proteínas (El-Sayed *et al.*, 2005).

O genoma nuclear dos tripanossomatídeos é organizado de forma atípica quando comparado aos outros eucariotos. Seus genes são fortemente agrupados e muitos pertencem a unidades policistrônicas, sob controle de um único promotor, com mRNAs individuais sendo transcritos simultaneamente e formado após *trans-splicing* (Mottran *et al.*, 1991)

Os genes que codificam os RNAs transportadores podem ser encontrados de forma dispersa pelo genoma dos tritryps ou então, agrupados em unidades policistrônicas, as quais consistem na disposição ordenada de sequências codificadoras de tRNA, separadas por sequências não traduzidas (Mottran *et al.*, 1991). Cada um dos tritryps, possui 66, 120 e 83 genes de tRNA, respectivamente em *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. major* (Padilla-Mejía *et al.*, 2009). Porém, nenhum desses tRNAs é sintetizado na mitocôndria, pois o genoma dessa organela não possui nenhum gene de tRNA. Consequentemente, todos os tRNAs presentes na mitocôndria são importados do citosol já com as editorações e modificações necessárias (Simpson *et al.*, 1989; Hancock e Hajduk, 1990; Aphasizhev *et al.*, 1998; Tan *et al.*, 2002)

1.5 RNAs transportadores (tRNAs)

Os tRNAs são transcritos no núcleo e exportados para o citoplasma, onde atuam na tradução do mRNA, fornecendo aminoácidos para o crescimento da cadeia polipeptídica de acordo com a sequência do RNA mensageiro (Rubio e Hopper, 2011). Para serem capazes de exercer a função de tradutores do código genético, após a transcrição dos genes de tRNAs, os mesmos sofrem um processo de maturação ainda no núcleo, que envolve a modificação de bases, o processamento das bases terminais 5' e 3', a adição do trinucleotídeo CCA na extremidade 3' final (somente em eucariotos) e, em alguns casos a clivagem pela RNase P e RNase Z, a retirada do íntron e ligação dos éxons pela tRNA endonuclease e ligase, respectivamente e, aminoacilação (Lund e Dahlberg, 1998; Paushkin *et al.*, 2004; Maraia e Lamichhane, 2011).

Durante o término da transcrição do pré-tRNA pela RNA polimerase III, a extremidade 5' é clivada pela RNase P e a sequência terminal 3' é retirada por um processo endo-nucleolítico, realizado pela RNase Z, retirando-se assim a sequência de bases, sem retirar a extremidade 3'-OH, essas reações marcam o início do processamento (Maraia e Lamichhane, 2011).

Os tRNAs são formados por quatro hastes principais, cuja estrutura secundária se apresenta em forma de trevo (figura 7 – Lake, 1967). Cada uma das hastes é nomeada por sua estrutura ou função. A haste acceptora (ou braço acceptor) consiste em um tronco de bases pareadas que termina em uma sequência não pareada cujo grupamento 2'- ou 3'-OH livre pode ser ligado a um aminoácido. O braço D foi nomeado dessa forma por possuir a base dihidrouridina. Já o braço do anticódon, sempre possui a trinca do anticódon no centro da alça. E o braço T, é

caracterizado pela presença da sequência T Ψ C, onde Ψ é a representação de uma pseudouridina, uma base modificada (Helm, 2006; Sobala e Hutvagner, 2011). Alguns tRNAs possuem um quinto braço, localizado entre o braço do anticódon e o braço T, chamado de alça variável. Dependendo da natureza da alça variável, os tRNAs podem ser divididos em duas classes: a classe I, com alça variável de tamanho entre 3 a 5 nucleotídeos, consistindo 75% dos tRNAs ou classe II, quando os tRNAs possuem alça variável entre 13 e 21 nucleotídeos, com aproximadamente 5 pares de bases na haste (Gupta, 1984).

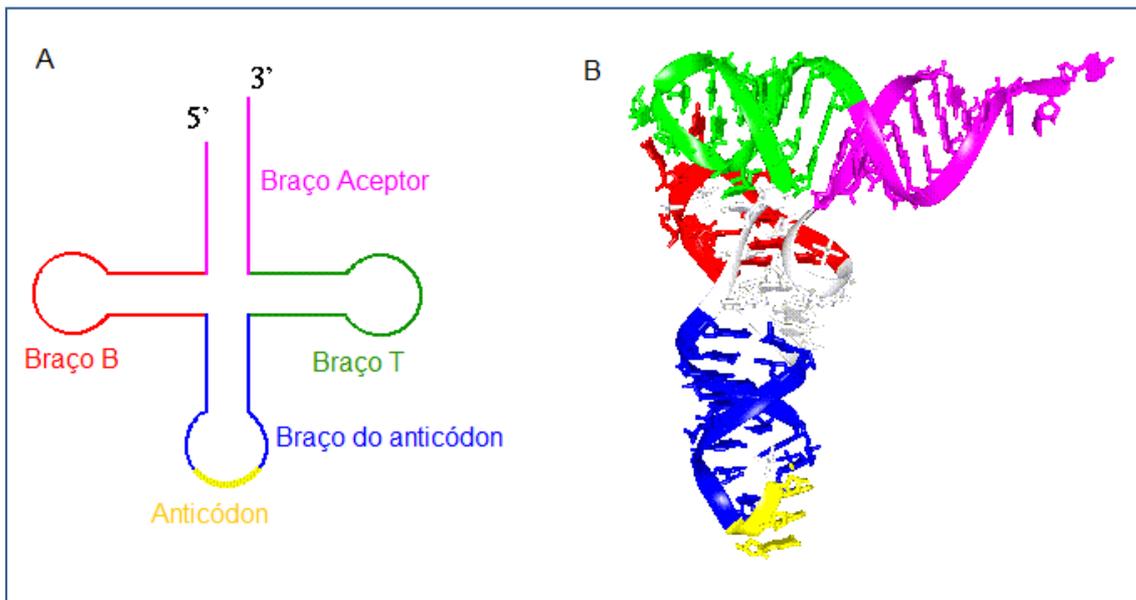


Figura 7: **Duas representações da estrutura do tRNA.** Em A, está representada a estrutura secundária do tRNA em forma de trevo, onde cada um dos braços está representado por diferentes cores. Em B, a estrutura terciária do tRNA^{Phe} de *S. cerevisiae*. Em vermelho está ressaltado o braço B, em azul o braço do anticódon, em verde, o braço T e em rosa, o braço aceptor. O anticódon está destacado pela cor amarela (<<http://www.iop.vast.ac.vn/theor/conferences/smp/1st/kaminuma/UCSFComputerGraphicsLab/trna.html>>).

A estrutura secundária do tRNA dobra-se formando uma estrutura terciária em forma de L (figura 7). A estrutura terciária é formada por pontes de hidrogênio entre as bases que não estão pareadas na estrutura secundária. Onde o braço aceptor e o

braço T formam uma hélice dupla contínua, com uma pequena distância entre eles e o braço D e o braço do anticódon formam outra hélice dupla contínua, também com uma pequena distância entre eles, mantendo o aminoácido na extremidade de um braço do L e a alça do anticódon na extremidade do outro braço (Jorgensen *et al* 1985; Giegé *et al*, 2012).

O tRNA tem como característica a presença de bases incomuns, gerados por modificações das bases A, U, C e G, após sua incorporação à cadeia. Existem 81 tipos de modificação em tRNAs (<<http://rnadb.cas.albany.edu/RNAmods/rnaover.htm>>), encontradas nos três domínios da vida (Rozenki *et al.*, 1999), que podem ser simples como metilação a mais complexas como reestruturação do anel de purina (figura 8). Essas modificações ocorrem em todas as partes da molécula de tRNA e normalmente envolve alterações ou adições às bases existentes no tRNA (Hopper e Phizicky, 2003; Phizicky e Hopper, 2010; Yu *et al*, 2011). Modificações de purinas (A e G) são mais complexas que modificações em pirimidinas (C e U). As modificações mais comuns de uridina consistem em metilação na posição 5 originando a ribotimidina (T), essa é a mesma base presente no DNA, no entanto, ela está ligada a uma ribose em vez de desoxirribose (Johansson e Byström, 2002; Hou e Perona, 2010). A saturação da dupla ligação do anel da uridina modifica sua estrutura gerando a dihidrouridina (D) (Molinaro *et al*, 1968). A pseudouridina (ψ) é caracterizada pela substituição de um átomo de carbono na posição 5, do anel por um átomo de hidrogênio, a modificação da uridina na posição 55 é conservada nos três domínios da vida (Hur *et al*, 2006; Roovers *et al*, 2006). A modificação 4-Tiouridina possui o oxigênio da posição 4, substituído por um enxofre (Mueller *et al*, 2001).

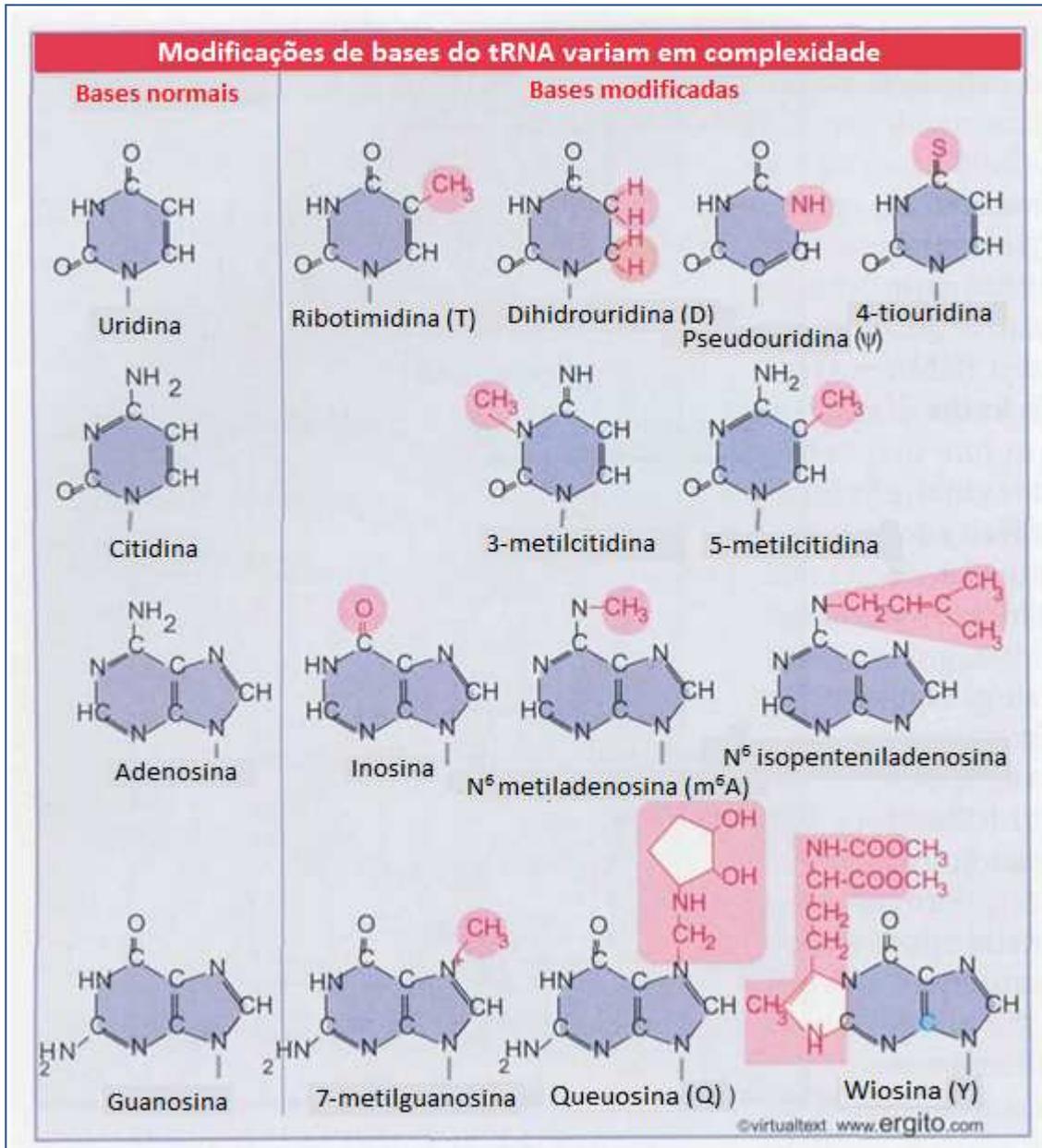


Figura 8: Quadro demonstrativo das modificações das quatro bases do tRNA: uracila, citosina, adenosina e guanossina (Figura adaptada de Lewin, 2004).

Os nucleosídeos de inosina são normalmente encontrados na via de biossíntese de purina como um intermediário. Não sendo incorporados diretamente nos tRNAs, sua existência se dá pela modificação de uma adenina à inosina. Duas complexas modificações ocorrem a partir de uma guanina como a base queuosina (Q), que possui a adição de um anel pentenil através de uma ligação NH para o grupo metila da ligação 7-metilguanossina e a base wiosina (Y), a qual possui um

anel adicional fundido ao anel da purina, podendo ser adicionados outros grupos como metil nesse anel (Su e Randau 2011; Vinayak e Pathak, 2009; Itaya *et al*, 2002)

Todas as modificações são geradas por enzimas específicas que podem variar quanto à especificidade, em alguns casos, uma única enzima age fazendo uma modificação em uma única posição, em outros casos, uma enzima pode modificar bases em diversas posições do tRNA alvo. As modificações ocorrem após a transcrição do tRNA. Sendo algumas modificações presentes em todas as moléculas de tRNA como os resíduos D, que dão origem ao nome do braço D e a pseudouridina encontrada na sequência T ψ C, do braço T. Outras modificações são específicas para grupos de tRNA, por exemplo, as bases de wiosina são características do tRNA^{Phe} em bactérias (Itaya *et al*, 2002; Hopper e Phizicky, 2003; Phizicky e Hopper, 2010; Yu *et al*, 2011; Watanabe e Yokobori, 2011). As modificações das bases do tRNA estão relacionadas ao reconhecimento do anticódon no emparelhamento do tRNA, durante a tradução do mRNA. Apesar, de tantas semelhanças, os tRNAs possuem peculiaridades que possibilitam sua distinção de outros tRNAs como a diferença dos ângulos dos braços, quando em L, durante a conformação terciária, a protusão de bases individuais, as modificações, o posicionamento de algumas bases e o anticódon (Jorgensen *et al*, 1985).

Para cada aminoácido existe pelo menos um tRNA. Quando o tRNA está ligado ao aminoácido correspondente ao anticódon ele é chamado de aminoacil-tRNA. A ligação entre o aminoácido e o tRNA é a ligação de um éster da carboxila do aminoácido à hidroxila da ribose terminal do tRNA (Schimmel, 1987; Jakubowski 2011).

1.6 tRNAs e íntrons

Muitos tRNAs possuem íntrons que normalmente são pequenos com tamanho entre 8 a 106 nucleotídeos (Schneider *et al.*, 1993). Em eucariotos, os íntrons dos tRNAs são pequenos e invariavelmente posicionam-se uma base 3' após o anticódon na volta do braço do anticódon. Em aproximadamente 75% dos tRNAs das 800 arqueias estudadas, os íntrons possuem a mesma posição que nos eucariotos, nos outros 25% o íntron pode se localizar no braço do anticódon, na volta ou não e também, nos braços D, T e no acceptor (Tocchini-Valentini *et al.*, 2009).

As leveduras possuem 272 genes de tRNA, dos quais 59 codificam 10 diferentes tRNA que possuem íntrons. Embora todas os íntrons se localizem no mesmo lugar (uma base 3' após o anticódon na alça do braço), não há conservação entre as dez sequências na região da emenda (Abelson *et al.*, 1998). Em arqueias, os íntrons também são pequenos e, muitas vezes interrompem a alça do anticódon. No entanto são encontrados íntrons em outros lugares como na haste U dihidro do braço T. Muitos genes de tRNA de arqueias possuem mais de um íntron (figura 9). Os íntrons de arqueias são caracterizados por duas voltas de três bases separadas por uma hélice de quatro pares de base (BHB, em inglês *bulge-helix-bulge* – Heinemann *et al.*, 2010). Em humanos, 6% dos 497 genes de tRNAs possuem íntron (Lowe e Eddy, 1997; International Human Genome Sequencing Consortium, 2001; Paushkin *et al.*, 2004).

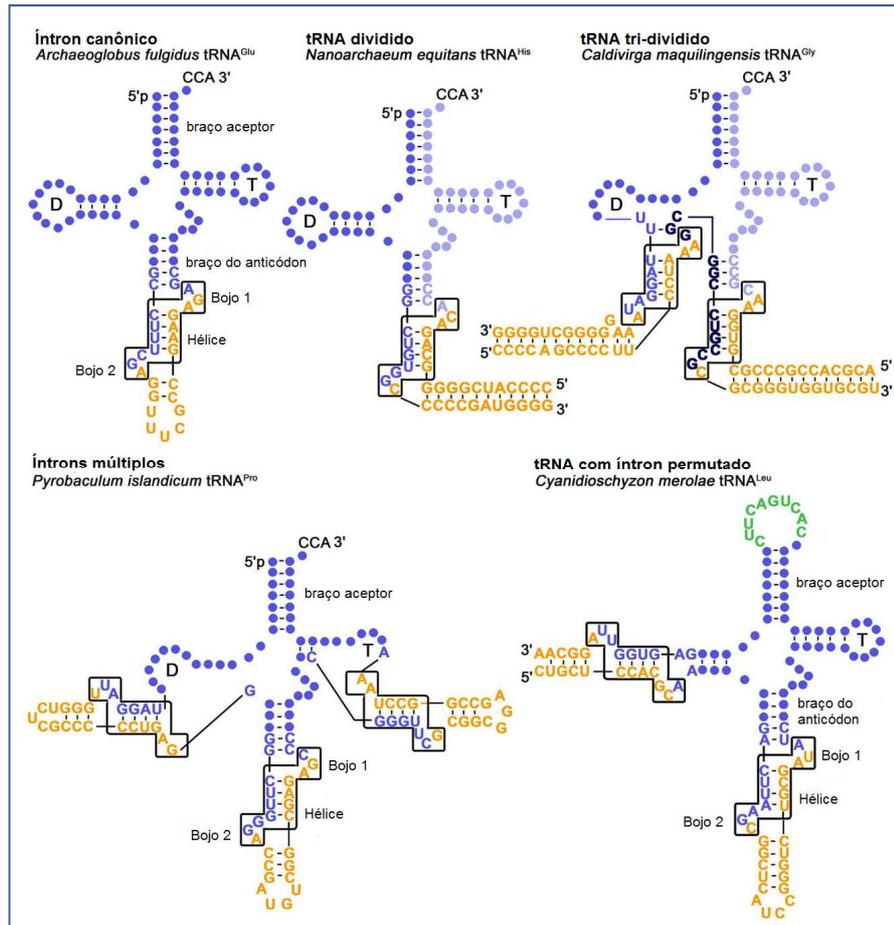


Figura 9: **tRNA com mais de um íntron presente em arqueias.** Os íntrons estão circutados por uma linha preta (Figura adaptada de Heinemann *et al.*, 2010).

Padilla-Mejía e colaboradores (2009) fizeram uma análise *in silico* do genoma dos tritryps que resultou na identificação de 66, 120 e 83 genes de tRNA, respectivamente em *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. major*, sendo 46 tipo de isoceptores capazes de ler os 61 códons que especificam cada um dos 21 aminoácidos. O número de espécies de isoceptores é semelhante ao encontrado em outros organismos. O número de genes de tRNA é baixo quando comparado com outros genomas eucarióticos, por exemplo *C. elegans* possui 568 genes de tRNA, *Homo sapiens* apresenta 497, *Danio rerio*, aproximadamente 6000, com exceção do parasito microsporídeo *Encephalitozoon cuniculi* que tem 44 genes de tRNA (Tan *et al.*, 2002; Padilla-Mejía *et al.*, 2009). Em tripanossomatídeos, de todos os tRNAs

decodificados, o tRNA^{Tyr} é o único que contém íntron – de onze nucleotídeos em *T. brucei* e *L. major* e treze nucleotídeos em *T. cruzi* – na mesma posição que os íntrons de eucariotos (Schneider *et al.*, 1993; Tan *et al.*, 2002; Padilla-Mejía *et al.*, 2009).

A retirada do íntron é um passo crucial na expressão gênica. E essa etapa é iniciada com a ação da endonuclease que reconhece a estrutura do pré-tRNA, clivando o íntron em dois pontos (em ambas extremidades), deixando a extremidades e 2'-3' fosfato cíclica, na metade 5' do tRNA e 5'-OH, na metade 3' (Abelson *et al.*, 1998; Fruscoloni *et al.*, 2001; Englert *et al.*, 2011). Apesar de altamente conservada, existem três tipos de tRNA endonuclease: homotetrâmera, homodimérica e heterodimérica, ambas com quatro subunidades (figura 10).

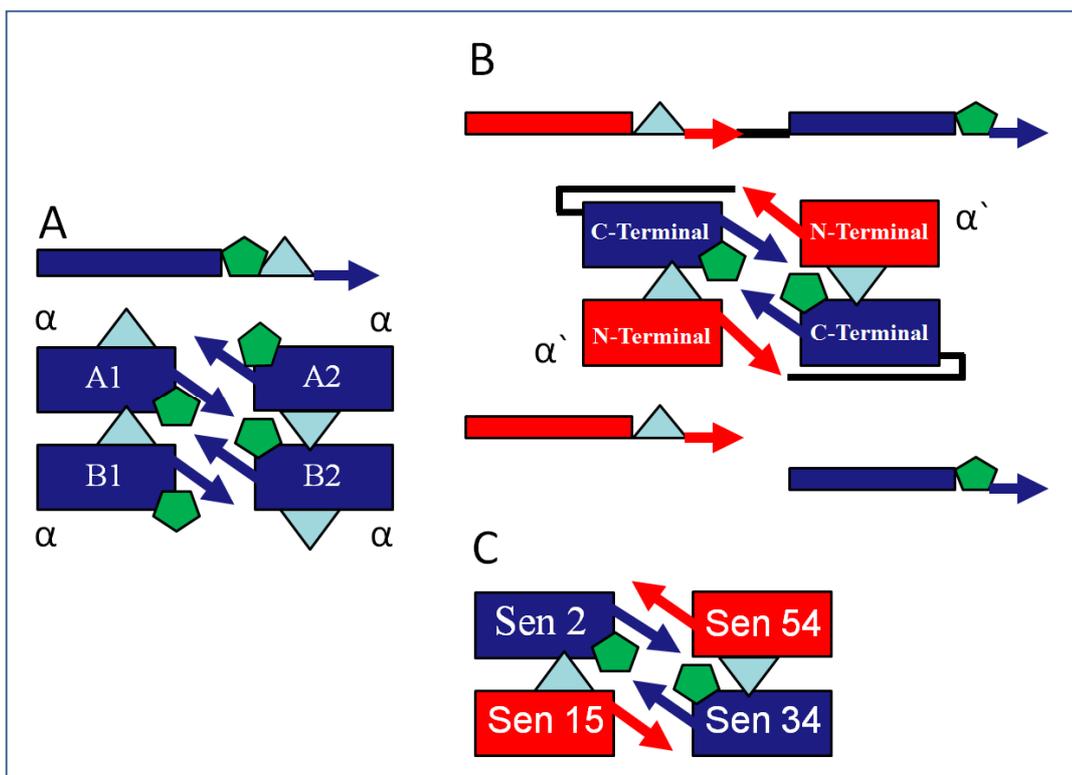


Figura 10: **Modelo da tRNA endonuclease.** Em A, o modelo homotetrâmera, em B o modelo homodímero e em C, heterodimérico (Figura adaptada de Tochini-Valentini *et al.*, 2005).

A clivagem do tRNA pela endonuclease gera na ponta terminal 3' da metade 5', o 2',3' fosfato cíclico e na extremidade 5' da metade 3' do tRNA é gerado um radical 5'-OH. Para que as metades do tRNA possam ser ligadas, são necessárias algumas modificações. Esse preparo ocorre em três etapas (figura 11) e é realizado pela enzima tRNA ligase, uma enzima multifuncional composta por três domínios. A primeira etapa consiste na hidrólise da extremidade 2',3' fosfato cíclico que é convertida a 3'-OH e 2'-PO₄ pelo domínio fosfodiesterase cíclica. Em seguida, a ponta 5'-OH é fosforilada pela transferência do γ-fosfato do GTP pelo domínio polinucleotídeo quinase, e por fim, as extremidades 3'-OH e 5'-PO₄ são ligadas com consumo de um ATP, formando a ligação 2'-fosfomonoéster, 3'-5' fosfodiéster (Schwartz *et al.*, 1983; Phizicky *et al.*, 1985; Xu *et al.*, 1990; Wang e Shuman, 2005; Englert *et al.*, 2005).

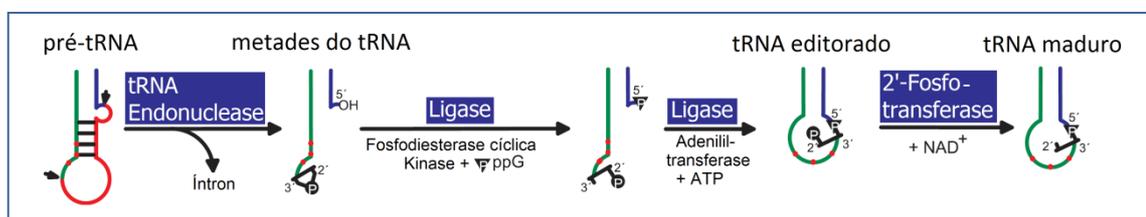


Figura 11: **Mecanismo de processamento do tRNA de plantas e fungos** (Figura adaptada de Englert *et al.*, 2005).

O radical 2'-PO₄ é removido por outra enzima a 2'-fosfotransferase (Tpt1). A 2'-fosfotransferase dependente de NAD⁺ (Tpt1) catalisa a do radical 2'-PO₄ para o NAD⁺ formando uma ribose ADP 1'-2' fosfato cíclico e nicotinamida. Tal reação ocorre em dois passos: primeiro o NAD⁺ reage com o 2'-fosfato do tRNA, expulsando a nicotinamida e gerando um tRNA 2'-fosfo-ADP-ribosilado em seguida, a ADP-ribose 2'-O é transesterificado em tRNA 2'-fosfato desloca o tRNA, gerando ADP-ribose 1'-2' fosfato cíclico (Sawaya *et al.*, 2005). Tpt1 representa uma família de

proteínas estruturalmente homóloga, encontrada em proteomas de eucaria, arqueias e bactérias (Spinelli *et al.*, 1998).

1.7 tRNA ligases

Atualmente, sabe-se que existem quatro classes de tRNA ligases. As classes I e II são caracterizadas por enzimas multifuncionais que combinam três reações em um único polipeptídeo (figura 12), cada reação realizada por um domínio (Wang e Shuman, 2005 e Englert *et al.*, 2010). São eles: adenililtransferase, polinucleotídeo quinase (PNK) e fosfodiesterase cíclica (CPDase).

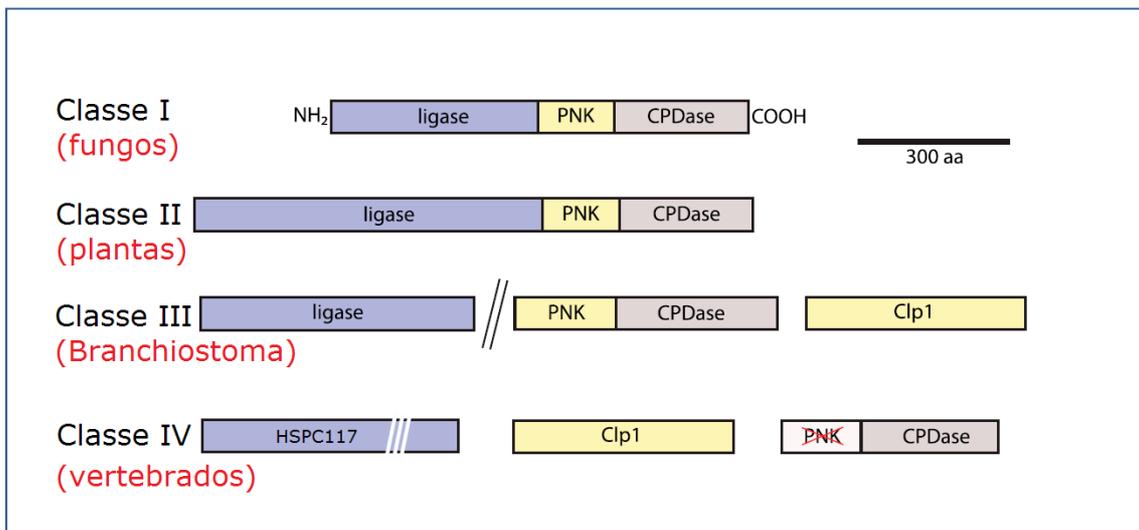


Figura 12: **Representação esquemática das quatro classes de tRNA ligases com suas correspondentes atividades enzimáticas** (Figura adaptada de Englert *et al.*, 2010).

Tanto a classe I quanto a II apresentam um módulo N-terminal correspondente à ligase, um módulo central correspondente à PNK e um módulo C-terminal, a CPDase (Wang e Shuman, 2005). Entre as classes ocorre pequena similaridade entre as sequências, exceto pelas principais sequências de assinatura

como o motivo N-terminal nucleotidiltransferase característicos de DNA/RNA ligases e de enzimas capeadoras de mRNA, a posição do sítio ativo da PNK na alça P central e o duplo motivo “HxT” na região C-terminal da CPD (Ramirez *et al.*, 2008; Englert *et al.*, 2010). As tRNAs ligases de classe I podem ser encontradas em todos os fungos – chamadas de Trl1 -, tripanossomatídeos e *Tetrahymena sp.*, já a classe II pode ser representada pela ligase de plantas vasculares, como o trigo (Schwartz *et al.*, 1983) e *Arabidopsis thaliana* (Englert *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006).

Nas classes III e IV, a RNA ligase e todas essas atividades enzimáticas podem ser encontradas em genes separados (figura 12), no entanto, possuem ação conjunta. A classe III, presente em alguns cordatas como o *Branchiostoma floridae*, em chromalveolatas e em amebozoas, conhecida como RNL, apesar de apresentar pouca similaridade com a RNA ligase das classes I e II, possui os motivos da nucleotidiltransferase equivalentes a todas as RNAs e DNA ligases e é capaz de transferir o adenilil e ligar as duas metades do tRNA. Nessa classe também são expressas a enzima bifuncional PNK/CPDase e a Clp1 que, respectivamente, têm função de polinucleotídeo quinase, fosfodiesterase e polinucleotídeo quinase. Apesar da existência de duas quinases, a Clp1 demonstra exclusiva propriedade RNA quinase, enquanto que a PNK/CPDase possui preferência por DNA a RNA. No entanto, foi demonstrado que somente a RNL e PNK/CPDase são capazes de maturar o tRNA sem ação da Clp1, deixando assim, ainda desconhecida a utilidade da Clp1 (Englert *et al.*, 2010).

Englert e colaboradores (2010) sugerem uma origem comum entre as três classes de ligases devido à homologia entre os domínios da ligase, da CPDase e da PNK, sugerindo também que o ancestral comum poderia ter as enzimas fusionadas.

A classe IV, presente em mamíferos e algumas arqueias, é composta por uma enzima do tipo 3'-P ligase, que em humanos é chamada de HSPC117. A HSPC117 é homóloga à família RtcB presente em bactérias e arqueias e requer como substrato os terminais 5'-OH e 2'-3' fosfato cíclico - produto da tRNA endonuclease - ATP ou dATP e o cátion divalente Mg^{+2} (Perkins *et al.*, 1985; Popow *et al.*, 2011), dispensando a ação da PNK e da CPDase (figura 13). Em 2008, Ramirez e colaboradores, demonstraram que a hClp1 possui atividade de quinase, por fosforilar 5'-OH terminais, no entanto, tinham dúvidas quanto à participação da hClp1 no processo de editoração do tRNA, visto que sua ausência em camundongos não é essencial. Dessa forma, acredita-se que as Clp1 participem de outros processos celulares como refosforilação de siRNA, miRNAs e mRNAs processados.

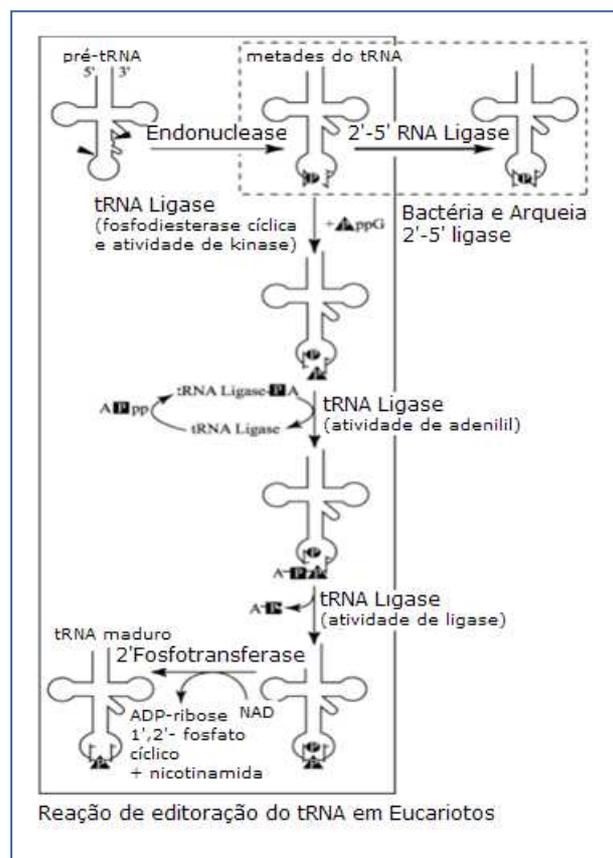


Figura 13: **Esquema demonstrando as duas via de editoração do tRNA**, a via da tRNA ligase de levedura e de plantas (classes I, II e III) que exige um preparo das pontas a serem

ligadas e a via de ligadura direta de animais e arqueias realizada pela RtcB (Figura adaptada de Kato *et al.*, 2003).

A 2',3'-nucleotídeo fosfodiesterase cíclica (CNP) é um membro da superfamília 2H fosfotransferase e é capaz de hidrolisar a ligação O3'-P de 2',3' nucleotídeos cíclicos produzindo um nucleosídeo 2'-fosfato e um terminal 3'-OH. A CNP de mamíferos é estruturalmente homóloga aos domínios CNP de levedura (classe I) e plantas (classe II), assim como seu produto de reação, no entanto, assim como a Clp1, camundongos nocautes para o gene *cnp* são viáveis e não apresentam nenhuma anormalidade até quatro meses de idade, além disso, a CNP não está presente em todas as células de mamíferos (Schwer *et al.*, 2008).

A existência de dois diferentes mecanismos de ligação dos éxons de tRNA em células de mamífero (5'-P – tipo levedura e, 3'-P – tipo arqueia) levanta a seguinte questão: são eles funcionalmente redundantes ou dedicados a uma determinada configuração fisiológica? Por exemplo, uma via pode ser responsável pela editoração do tRNA enquanto a outra, especializada em *splicing* de mRNA e UPR – resposta de proteínas desdobradas (Schwer *et al.*, 2008).

A RtcB de *Escherichia coli* exemplifica uma nova família de RNA ligases que une diretamente as extremidades 2',3'-fosfato cíclico e 5'-OH (figura 13). Esta família também pode ser encontrada em metazoa e protozoa, mas não em fungos e plantas (Tanaka *et al.*, 2011). Tanaka e colaboradores observaram que a RtcB, além de ligar as duas metades do tRNA, é capaz de fazer reparos no mRNA também, podendo atuar também nas UPRs.

Como dito anteriormente, algumas arqueias, como a *Haloferax volcanii* e *Methanopyrus kandleri*, também possuem um mecanismo de ligação de tRNAs do tipo 3'-P (Zofalova *et al.*, 2000; Salgia *et al.*, 2003; Schwer *et al.*, 2008; Englert *et al.*,

2011), no qual a ligação das extremidades 2',3' fosfato cíclico e 5'-OH é realizada sem o uso de ATP exógeno e de cátions, sendo o fosfato cíclico convertido em ligação fosfato, permitindo assim a formação da ligação 3',5' fosfodiéster (Zofalova *et al.*, 2000 e Salgia *et al.*, 2003).

Tendo como base a essencialidade da enzima tRNA ligase em *S. cerevisiae* (Apostol *et al.*, 1991) e sabendo que o produto do gene das possíveis tRNA ligases dos kinetoplasteas possui homologia com a tRNA ligase humana (Wang e Shuman, 2005; Englert *et al.*, 2010) , estudar o pouco conhecido mecanismo de editoração de tRNAs em tripanossomatídeos torna-se um foco interessante. Pois além de ampliar os conhecimentos básicos sobre a biologia dos tripanossomatídeos, a confirmação da essencialidade do gene da tRNA ligase para tripanossomatídeos possibilita o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos. Esse trabalho se baseou em estudar a tRNA ligase de *T. brucei* pois o silenciamento gênico por RNAi foi bem demonstrado nesse protozoário (Ullu *et al.*, 2004; Balaña-Fouce e Reguera, 2007). E desde o seu descobrimento, o RNAi tornou-se o método de escolha para investigar a função dos genes em *T. brucei* (Tschudi *et al.*, 2003; Ullu *et al.*, 2004). Essa técnica facilita o uso em proteínas muito abundantes ou quando há dificuldades em deletar os genes (Balaña-Fouce e Reguera, 2007) e possibilita a extrapolação no entendimento do funcionamento das proteínas estudadas em *T. brucei*, para *T. cruzi* e *L. major* (Subramanian *et al.*, 2006).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Observar os efeitos do silenciamento do gene *trl1-like* em *Trypanosoma brucei* e expressar a enzima recombinante em *Escherichia coli*

2.2 Objetivos específicos

- Alinhar as sequências das tRNA ligases-*like* de tritryps com as sequências de tRNA ligases de leveduras e confirmar a presença dos domínios quinase, ligase e CPD;
- Analisar o grau de identidade entre as sequências;
- Construir e transfectar o plasmídeo que será utilizado para indução do silenciamento da expressão do gene *trl1-like* de *T. brucei*;
- Induzir o silenciamento do gene *trl1-like* na forma procíclica de *T. brucei* e observar os efeitos no crescimento celular;
- Observar os efeitos do silenciamento no ciclo celular e na viabilidade através de citometria de fluxo;
- Analisar os níveis de mRNA da tRNA ligase-*like* através de qPCR antes e após indução do silenciamento;

- Testar diversas condições de expressão da enzima recombinante Trl1-*like* de *T. brucei* em *Escherichia coli*
- Purificar a enzima Trl1-*like* de *T. brucei* para posteriores testes bioquímicos

3. MATERIAL e MÉTODOS

3.1 Alinhamento das sequências da tRNA ligase de classe I

As sequências das possíveis tRNA ligases de classe I de fungos (*Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pombe*) e tripanossomatídeos (*Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major*) adquiridas no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) foram alinhadas no programa Genedoc, para Windows. A divisão dos domínios e a marcação dos motivos conservados foram realizadas no programa Paint Microsoft Windows, versão 6.1, a partir dos motivos descritos por Wang e Shuman, 2005.

3.2 Cultivo de *Trypanosoma brucei*

Trypanosoma brucei, forma procíclica, linhagem 29-13 (gentilmente doadas pelo Prof. Otavio Thiemann, IFSC/USP), portadora de um sistema promotor tetraciclina/T7 e resistente aos antibióticos higromicina e G418, foram mantidos em garrafas de cultura a 28 °C, contendo meio SDM-79 (LGC Biotecnologia), suplementado com 10 % (v/v) de soro fetal bovino inativado, 50 µg/mL de higromicina e 15 µg/mL de G418 (Brun e Schönenberger, 1979).

3.3 Extração de DNA genômico de *T. brucei*

Para a extração de DNA genômico de *T. brucei* foram utilizados aproximadamente 1×10^7 procíclicos, os quais foram submetidos a uma centrifugação

de 3000 xg, por 1 min, a 25 °C. Ao sedimento foi adicionado 800 µL de tampão de lavagem (100 mM de NaCl, 3 mM MgCl₂ e 20 mM de Tris-HCl pH 7,5) e a amostra foi centrifugada nas mesmas condições de centrifugação relatadas anteriormente. Em seguida, o sedimento foi ressuspensão em 250 µL de tampão TELT (50 mM Tris-HCl pH 8, 62,5 mM de EDTA pH 8, 2,5 M de LiCl e 4% de Triton X-100), adicionado de 250 µL de fenol/clorofórmio 1:1 (v, v) e centrifugado à 16000 xg, por 2 min, a 25°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, adicionada de 250 µL de clorofórmio 100 % e centrifugada a 16000 xg, por 2 min. Novamente, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo, onde foram adicionados 3 volumes de etanol 100 % e 0,1 volume de NaAc 3 M, pH 7. A amostra foi centrifugada a 16000 xg por 5 min, a 25 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 70 % e centrifugado a 16000 xg por 5 min, a 25 °C. O sobrenadante foi descartado e o DNA foi ressuspensão em 30 µL de água ultra pura autoclavada e armazenado a 4 °C.

3.4 Amplificação do fragmento do gene *trl1-like* de *Trypanosoma brucei*

O fragmento de 617 nucleotídeos do gene *trl1-like* de *T. brucei* (ressaltado na figura 14) foi amplificado a partir do DNA genômico de *T. brucei* (cepa ILTaR1) por reação em cadeia da polimerase (PCR), nas seguintes condições: Tampão *High Fidelity* da Thermo Scientific 1x; 300 µM MgCl₂; 300 µM dNTP; 1 µM de cada oligonucleotídeo: (trl1F: 5'-
AAGCTTACGCGTGAGAGGCAGCATTGGGAAGGGAAAGATCC-3' e trl1R: 5'-
TCTAGAATGGTGCTCCGCCACGCACTTCGCA-3') e 5U de Taq DNA polimerase (*High Fidelity*, Thermo Scientific). O ciclo térmico utilizado foi: I) 94 °C – 10 minutos, II) 94 °C - 1minuto, III) 56 °C – 1 minuto, IV) 72 °C – 3 minutos, V) Repetição das

etapas II a IV por 35 ciclos, VI) 72 °C – 10 minutos. O resultado da amplificação foi avaliado em gel de agarose 0,8 % em tampão TAE 1X (40Mm Tris-acetato; 1mM EDTA) com 1,3 µg/mL de brometo de etídio. As cores acima, nas sequências dos oligonucleotídeos, representam os sítios de restrição adicionados, onde em vermelho encontra-se o sítio de restrição da enzima HindIII, em verde, MluI e em azul Xba I.

```

ATGGAGGTTCTTGTGAAAGGTGTCTTTTCAAGAGGGAATGGAACGGCGCAAACGTGGAAGACATTG
TTGAATGCGCTCATAGCGGAAAGGCACATTTTCATCGCCACTGGCGCATTCAACTCATTAGTTGTGAA
GGAATCTCATCAGGGGGATGTAGAAAGCCTGCCATCGCAGCACGTACTCTTCTTCTTAGCGCTGAT
ACCAGCGAAATGTTGTGCGTGGCGTTAACAAGTTTTTTGACATCGAGGATGTGAGCGGGATCTCC
TGATGTGAAAAGGCGATGTAGCGAAGCTGCAGGGCATATGGTTGCAGAGAAAAC TAGCCGATTTGT
TGTAACATTGTTTTCTCTTGATGGCAAGTCGCTTGGCGTTGTACGAAGCACGTTGTGGAGGGTCCG
CACGTCGATATTGCGTATCACATTTCTGGAGTCCATGTTGAGTACCGAGCAGCGTAGACGGCTGGCGC
GTGATTTGTTGAGTTGAGAGCTGCTGTGAGCTGCGAGTGCATTTCACTCAAGGACGACTCGCACCA
TCCGGTGCCAGAGCGGACCGTGTGTTGACAACAAACTGGTCGTTTTCTCCATTCAACAAGCGGGATGAT
ATGCGGGAGGTGAGTGTTCCTCCCGGATATCATGCAGAAGATGGCAAAGGAGTGGGGGTTTTCCATCGG
TTCTTGTGTTGGCGCGTTAAGAATTTGTGAGGAGTTAATCACTTGGCTAGGAGAGAGGCAGCATTGGGA
AGGAAAAGATCCCGCTGGTGAGGCGCTAGCAGAGGGATATGTGGTGGTCATTGAAGACACTGTGCAG
CGTGTTCCTCCCGAAAGTCAGTCGATTTACCCCTTACGGCTTTGTTGATCCGCTTGAAGGCAAAGA
CGGTGAAGTACCGTGTGCTGCGCTCACTTCGGTCTATTGTGTCCGGCGAATCTGCTGCGCACCCGTT
GCTCTTCATAAAATTTCTCGGCTCATGGACAGAACATATCTCCGGCTACACATGTTTGCAGCAGGCT
GTAACAAATCGTGGCGTACACCAGATATACAGCGAATTTGAGTGTATATCAATGATCAAGGTAATA
AGCGTTATCGCGTAGCCACTTGAGTGTCCAAGAGGCCATAAAGGACTCCTCGGGTTCACCGAAAA
AGAGGCCAGACTATATCGTATGCGCCGCTCGATGTCATTTTTTTGTGTGGTCTTCTCGGTGTTGGGA
AAAACCACACTCGCAAGGCTAATTTGGGAAAATGGGAGGGAACGGGTGTTCTACTTTTCGTTACATTC
TGCACCTGAGTCCGGATGAAGTTGCGAAGTGCCTGGCGGAGCACCATGGCATCAATGACTCTTCGAG
TAAGCACAAAGAAGCGAAGGTTGCGCTCAATGGTGCACCAGTTTGTGCAACGTGCGTTCAGGCAGTCA
ATTTTGTGTGTCATTTCTACTTGAGGGACCGGTCTTCTGATCTTCGACGCGTGCAACGCCAAGCCGA
GCACACGGCAGCGGTGGCGCTATATGCTTCCAGAGAGTTGGCTAGCTTCCGCATAGTTTACTTTGGC
ATCGCTGAGCGGAACATCCTAGCGTCTCGTATTGCTGGAAGACGAAACCACTCCGTCATGCTCGAGGT
CCGAGGAAGCTCAGGCTGCCCTTTATGCTGTGGGAAAGGAGTTTGTGCCCCACTGGAAGTGTGAGC
CTTGTTTTTGTTTAGATGCTGCAGCAGCCTCGACTGAGGACCTCGCCCCGCTCGGTATTACTCCTCTA
CGAGGAAACAAATGGGCCTGCTCCGAGCTGTGCCATCGTGCCACTGTCTATGATCATCAACAAGCA
GAGAGAGAGCTAACAAAGCACTGTGCAACATTCGCTACATCGATTCTTGAGATCATTATAACGACA
GTATGACCCCTGCGCGAAGTCTTGAAGTGAGTCGTA AAAAGGCGGTTAACACAGTGGCGGTCCAGTT
GTTGGTGAAATTCGACGAGTTGTACGAGATTATATCAGACGTTGTTAAGAGCATCACAGTGGTAGTG
GATCTGCCGAAGTTGAGCTGGTGGGAAAGGTGTAACGTGGTCTGGGCTTAGGCAACAGACGACGTC
CCGGCGTAGTGGAGAAGGGGCACACCCATTGGCTTCGCGGTTGGCTTCTTGACGGGCGAGAAGTGGG
GGAACACCACCAGAAAAGTGTGTGGTTTTCGTGCCCTTGAAGATCGGTACGAGTGCCAACCTGCTTTG
CCCCAGTCCACAGTGTTCACGGTCTTACAAGTGTGCGACGTGGGTTTTCTGTGCCAGCTATTGGAA
GTGCTGTGGACGTTACCCTTCACTCCGTCTTGATCGATCCCTTTGCCTTGTGCCTCGGTGCCACGGT
GGTGTGAAATGGTTCGCCGTCAGGAACTACAGTTGAGCCCAGGTTGTGCGGTTCCGCTTACAGTGACG
GTGGGCCACACGCGTCTGTGTAAGGCCCTCTACGCTGGCGAAATGTTTGATTTATTTACAGCAGCGGG
AGAGTCAACAACAGGAACTTGAACATATGCGTCTCGGCTTCTCAGTGAAAAAGAGTGTGCTCGAAGTT

```

Figura 14: Sequência do gene da tRNA ligase de *Trypanosoma brucei*, retirada do banco de genes NCBI, com número de acesso da sequência igual a XM 817953. Em roxo, a sequência selecionada para a amplificação.

3.5 Eletroforese em gel de agarose

As eletroforeses de DNA foram realizadas em gel de agarose 0,8 % preparado em tampão TAE 1X (40mM Tris-acetato; 1mM EDTA), contendo 1,3 µg/mL de brometo de etídio, um fluoróforo que se intercala entre as moléculas de ácidos nucleicos, que ao ser excitado por raios ultra-violetas, exibe uma coloração vermelho/alaranjada. As amostras foram misturadas com tampão de amostra 1x a partir da solução 6x concentrada (0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xilenocianol e 30% glicerol). As amostras foram aplicadas no gel e submetidas à eletroforese por 45 min a 50 mA em tampão TAE 1X. Em geral foi utilizado como padrão de peso molecular 0,5 µg de DNA λ digerido com PstI (Thermo Scientific). Quando diferente, será indicado na figura.

3.6 Purificação do fragmento de DNA amplificado por PCR em gel de agarose

O produto do PCR foi inteiramente aplicado em gel de agarose e, após a separação dos fragmentos, a região de interesse do gel foi cortada, colocada em um tubo cônico de 1,5 mL e o DNA amplificado foi purificado a partir do gel, utilizando-se o kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN). Seguindo o protocolo do fabricante, a fatia do gel foi dissolvida em 3 volumes (100 mg ~ 100 µL) de tampão QG, por 10 min, a 55°C. À solução foi misturado 1 volume de gel de isopropanol e a mesma foi transferida para a coluna QIAquick e submetida à centrifugação de 16000 xg, por 1 min, a 25 °C. O eluato foi descartado, foram adicionados 500 µL de tampão QG à coluna, que foi novamente centrifugada. Em seguida, a coluna foi lavada com 750 µL de tampão PE e submetida à centrifugação nas mesmas condições anteriores. A

3.8 Diálise da ligação do fragmento do gene *trl1-like* de *T. brucei* ao vetor de clonagem pTZ57R/T

A reação de ligação do fragmento do gene *trl1-like* de *T. brucei* ao vetor de clonagem pTZ57R/T foi dialisada em membrana de diálise com poro de tamanho igual a 0,025 μm (Millipore "V" *Series Membranes*), durante 1 h em placa de petri com água ultra pura autoclavada. Dessa forma, é possível retirar os sais residuais do tampão de ligação da reação, permitindo dar continuidade ao processo de transformação do plasmídeo em células eletrocompetentes.

3.9 Preparação de bactérias *Escherichia coli* eletrocompetentes

Para preparação de bactérias eletrocompetentes, uma colônia isolada de *E. coli* cepa DH10b ou cepa BL21(DE3) foi inoculada em 5 mL de meio LB líquido (Luria Bertani - 1 % de Triptona, 1 % de NaCl e 0,5% de Extrato de Levedura), no caso da *E. coli* DH10b, contendo 20 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina, antibiótico ao qual a bactéria possui resistência, garantindo assim, a sobrevivência apenas da bactéria desejada. O pré-inóculo foi crescido por 18 h, a 37 °C, sob agitação a 200 rpm. Após 18 h, 5 mL do pré-inóculo foram inoculados em 500 mL de meio LB contendo, no caso da cepa DH10b, 20 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina, até que as culturas alcançassem a densidade óptica, à 600 nm, entre 0,5 à 0,6, nas mesmas condições de agitação e temperatura mencionadas anteriormente. Em seguida, as culturas foram distribuídas em tubos de 50 mL resfriadas no gelo por 15 min e centrifugadas a 4000 xg, por 10 min, a 4 °C. Os sedimentos celulares foram ressuspensos em 50 mL de água ultra pura autoclavada gelada (4 °C) e novamente centrifugado. Esse procedimento foi

repetido 1 vez. Em seguida, os sedimentos foram ressuspensos em cinco mL de solução de glicerol 10 % gelada (4 °C), reunidos em um único tubo e centrifugado nas mesmas condições anteriores. Por fim, o sedimento foi ressuspenso em 1 mL da solução de glicerol 10 % e aliqotado em tubos cônicos de 1,5 mL previamente gelados. Alíquotas de 50 µL foram armazenadas em freezer a -80 °C.

3.10 Transformação de bactérias eletrocompetentes

Para as transformações, foram adicionados aos tubos contendo 50 µL de bactérias eletrocompetentes, 5 µL da reação de ligação de interesse dialisada. Essa mistura foi então transferida para cubetas de eletroporação de 0,1 cm e o choque elétrico foi disparado em eletroporador BioRad Gene Pulser, com um pulso de 1800 V a 25 µF. Imediatamente, as células transformadas foram transferidas para um tubo cônico de 15 mL contendo 1 mL de meio LB líquido, permanecendo sob agitação de 200 rpm, a 37°C, por 1 hora. Ao final da recuperação, as células foram centrifugadas por 1 min a 16000 xg, o sedimento foi ressuspenso em 100 µL de meio LB líquido e plaqueado em meio LB com 2 % de ágar com o antibiótico necessário para cada cepa e plasmídeo nas seguintes concentrações: 100 µg/mL de ampicilina, 50 µg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de cloranfenicol. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C, por 18 h. Quando possível a utilização do sistema da beta-galactosidase de seleção (colônias azuis – negativas para clonagem, colônias brancas – positivas para clonagem), ao meio de cultura sólido também foram adicionados 40 µg/mL de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosídeo) e 0,4 µM de IPTG (beta-isopropiltiogalactopiranosídeo).

3.11 PCR de colônia

Para o PCR de colônia, uma solução foi preparada contendo os seguintes reagentes nas concentrações finais: Tampão Taq Platinum Life Technologies™ 1X; 2 mM de MgCl₂, 150 µM de dNTPs, 0,5 µM dos oligonucleotídeos trl1F e trl1R (descritos no tópico 3.2) e 0,025 U/µL de Taq Platinum DNA Polimerase Life Technologies. Foram utilizados 25 µL desta solução para cada colônia a ser analisada para o recebimento do plasmídeo com o fragmento de interesse. A colônia foi retirada da placa de origem com auxílio de uma ponteira estéril e repicada em uma nova placa de ágar LB. O resíduo da colônia na ponteira foi adicionado ao tubo cônico de 200 µL contendo a solução acima citada. A reação de PCR foi realizada nos mesmos parâmetros de temperatura citados no item 3.2. O resultado foi analisado em gel de agarose 0,8 % em TAE 1X, corado com 1,3 µg/mL de brometo de etídio.

3.12 Preparação de DNA plasmidial

As minipreparações plasmidiais foram realizadas com o QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen), de acordo com o manual. Um a 5 mL de cultura bacteriana crescida em meio LB foram centrifugados a 6800 xg, por 3 min, a 25 °C. Ao sedimento foi adicionado o tampão P1, ressuspenso e transferido para um tubo cônico de 1,5 mL. Em seguida, foi adicionado o tampão P2, que foi misturado completamente por inversão em quatro a seis vezes, até toda a solução ficar azul. Depois foi adicionado o tampão N3 e novamente misturado completamente por quatro a seis inversões até a mistura ficar branca, novamente, após essa etapa, a mistura foi centrifugada por

10 min, a 17900 xg, em temperatura ambiente. Após a centrifugação o sobrenadante foi transferido para a coluna QIAprep spin e centrifugado por 1 min, a 17900 xg, em temperatura ambiente. Posteriormente a coluna foi lavada com o tampão PE em 1 min de centrifugação a 17900 xg, a 25 °C. Em seguida, a coluna foi centrifugada novamente, para remover resíduos do tampão de lavagem. Por fim, o DNA foi eluído em água após centrifugação de 1 min, a 17900 xg, a 25 °C.

3.13 Sequenciamento de DNA

O sequenciamento dos plasmídeos foi realizado pelo laboratório SONDA da UFRJ. O sistema de reação foi constituído de aproximadamente 125 ng de DNA de fita dupla, 3,2 pmoles de oligonucleotídeos, 1 µL de reativo BigDye (Applied Biosystems) e 1,5 µL de tampão BigDye (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. A análise das sequências obtidas foi realizada através do programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Altschul *et al.*, 1997).

3.14 Construção do vetor de RNAi

Parte do plasmídeo pTZ57R/T com o fragmento do gene *trl1-like* de *T. brucei* (pTZ57R-trl1) foi digerido com as enzimas de restrição XbaI e MluI (Thermo Scientific) e parte, com XbaI e HindIII (Thermo Scientific), a 37°C, durante 16 h, para liberação do fragmento do gene *trl1-like* deixando os sítios complementares das enzimas disponíveis para a posterior ligação (figura 17). Uma vez com o fragmento do gene liberado do plasmídeo pTZ57R-trl1, foi possível proceder com a construção do vetor de RNAi (Wirtz *et al.*, 1999). Os produtos das digestões foram aplicados em

gel de agarose 0,8 % preparados com TAE 1X, corados com 1,3 µg/mL de brometo de etídio e submetidos à separação por eletroforese por 45 min, a 50 mA em tampão TAE 1X. Ao final da separação, os genes de interesse foram cortados do gel e purificados conforme descrito no item 3.4.

O plasmídeo pLEW100 (figura 16 - cedido gentilmente pela Dr^a. Elisabetta Ullu, Universidade de Yale, EUA) foi previamente digerido com as enzimas MluI e XbaI, por 16 h, a 37 °C e foi realizada a ligação do fragmento do gene *trl1-like* obtido da digestão de pTZ57R-*trl1*, gerando o plasmídeo pLEW100-*trl1*.

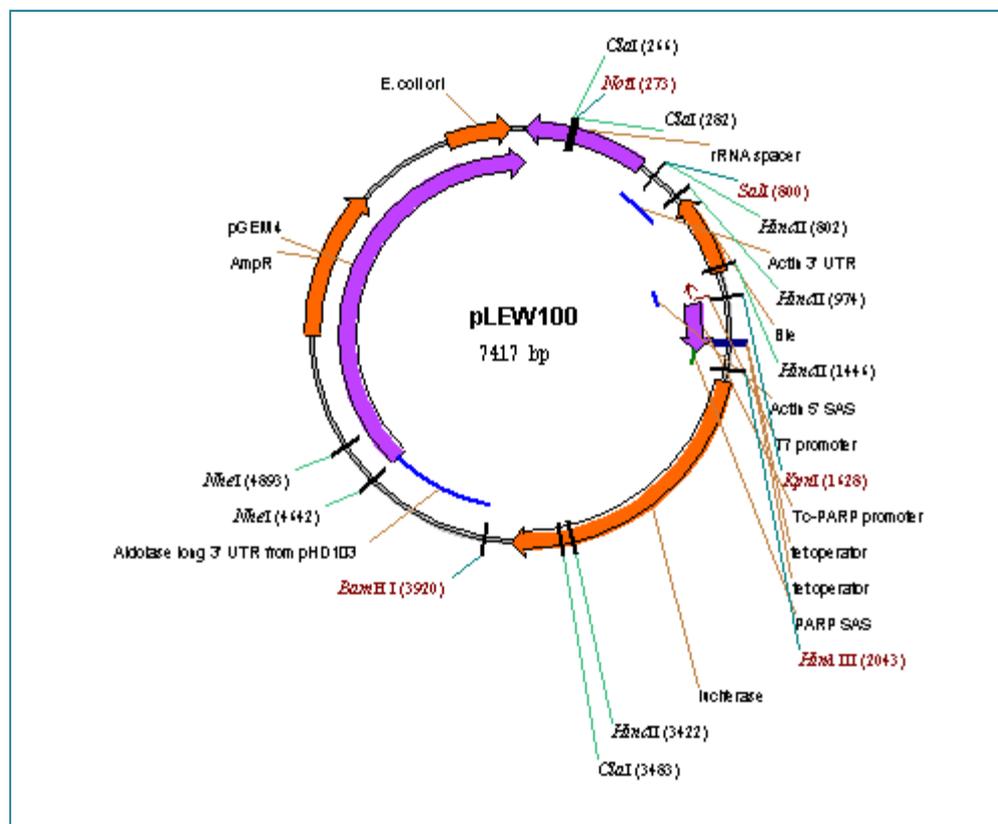


Figura 16: **Mapa do vetor de clonagem pLew 100**, com seus sítios de clonagem por enzimas de restrição e promotores (<http://tryps.rockefeller.edu/trypsru2_plasmids.html>).

O fragmento do gene *trl1-like* obtido da digestão de pTZ57R-*trl1* com XbaI e HindIII foi clonado no vetor pJM325 (cedido gentilmente pela Dr^a. Elisabetta Ullu, Universidade de Yale, EUA) digerido com NheI e HindIII (Thermo Scientific), por 16 h, a 37 °C, gerando o plasmídeo pJM325-*trl1*. As reações de ligação foram

realizadas com 1 μ L de T4 DNA Ligase, 1X de tampão de ligação, 150 ng de vetor pLew100 ou pJM325, 600 ng de inserto e água q.s.p.. A reação foi incubada por 16 h, a 16°C, seguindo a metodologia também recomendada pelo fabricante (Thermo Scientific). Uma vez com os dois vetores anteriores montados (figura 17), eles foram transformados em bactérias eletrocompetentes *E. coli* DH10b, a fim de ampliar o número de cópias dos vetores. Em seguida, foi realizada a minipreparação plasmidial, conforme descrito no item 3.11. Posteriormente, foi realizada a digestão do vetor pJM325-trl1 com as enzimas de restrição HindIII e XbaI (Thermo Scientific) para liberação do fragmento do gene *trl1-like* ligado a região *stuffer* do plasmídeo pJM325 (figura 17).

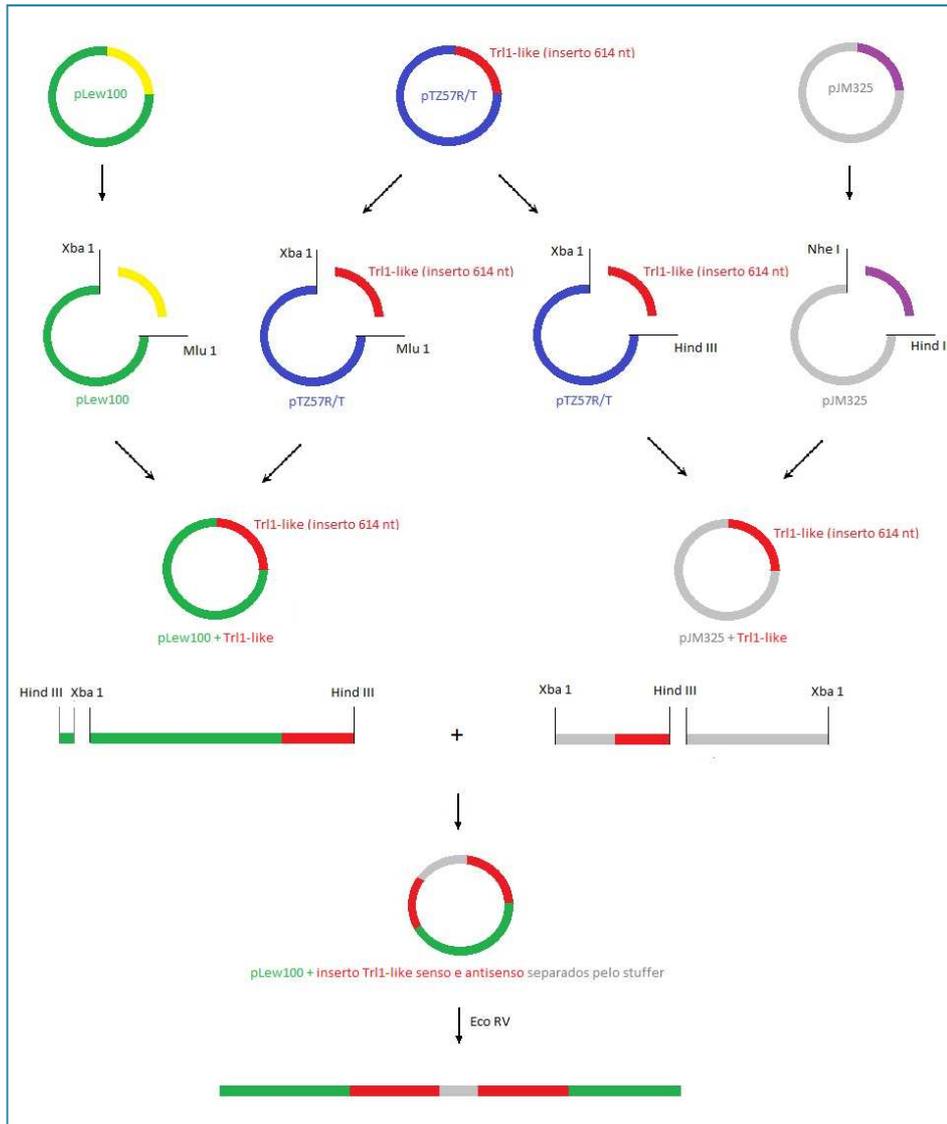


Figura 17: **Esquema da construção do vetor de expressão de dsRNA da Trl1-like**, que será transfectado no *T. brucei*. Os desenhos não foram desenhados com escalas.

O fragmento obtido foi clonado no plasmídeo pLew100-trl1, previamente digerido com HindIII e XbaI (Thermo Scientific). Concluindo a construção do plasmídeo (pLEW1000-trl1-2) para indução do RNAi da tRNA ligase-like em *T. brucei* (Figura 17). O plasmídeo pLew100 é um plasmídeo do tipo PARP (proteína acídica repetitiva da forma procíclica), que pode induzir o promotor induzido por tetraciclina, promovendo a expressão de “grampos” do RNA alvo (figura 18, Wirtz *et al.*, 1999).

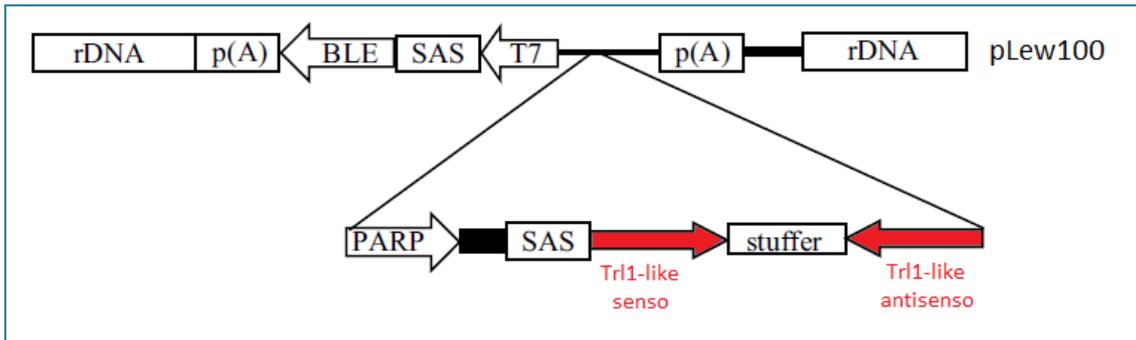


Figura 18: **Região de inserção dos genes alvos no vetor pLew100.** O fragmento do gene alvo (*Trl1-like* de *T. brucei*) foi inserido em um cassete que consiste de duas repetições invertidas do mRNA da sequência alvo separadas por um sequência não traduzida chamada de *stuffer*. As siglas e figuras do esquema consistem em: seta PARP: promotor PARP; retângulo preto: operador de tetraciclina; seta T7: promotor T7; rDNA: DNA ribossômico espaçador não-transcrito; p(A): poli (A); BLE: gene de resistência à fleomicina; SAS: emenda sítio-acceptora (Figura adaptada de Ullu *et al.*, 2002).

3.15 Transfecção da cepa procíclica de *T. brucei* 29-13 com vetor para indução de RNAi

Após a construção do plasmídeo pLEW1000-trl1-2, a cepa de *E. coli* DH10b eletrocompetente foi transformada e os clones obtidos foram utilizados para minipreparação plasmidial (kit Qiagen). O plasmídeo purificado foi digerido com EcoRV (Thermo Scientific) para linearização e posterior transfecção dos parasitas (Wang *et al.*, 2000). Para a transfecção, 5×10^7 células totais de uma cultura viável, em fase de crescimento logarítmico, foram lavadas a 1200 xg por 10 min, a 25 °C em Tampão de Eletroporação ZPMF (KCl 8 mM, NaCl 132 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, MgCl₂ 0,5 mM e CaCl₂ 0,09 mM, pH 7 ajustado com ácido acético glacial) e ressuspensas em 1 mL do mesmo tampão. O volume foi distribuído em duas cubetas de eletroporação de 0,4 cm (BioSystem), uma para o controle e a outra com a adição de 30 µg de pLEW1000-trl1-2 digerido com EcoRV. O conteúdo total de 500 µL foi eletroporado em um aparelho BioRad Gene Pulser, da seguinte maneira: 2 pulsos de 1600 V, 25 µF, com intervalo de 10 segundos entre os pulsos

(a constante de tempo foi de aproximadamente 0,9 ms). Imediatamente, as amostras foram transferidas para garrafas contendo 30 mL de meio SDM-79 com 10 % de soro fetal bovino, 50 µg/mL de higromicina e 15 µg/mL de G418 e foram colocadas na estufa a 28 °C. Vinte e quatro horas depois foram adicionados 2,5 µg/mL de fleomicina às garrafas numa concentração final de 2,5 µg/mL, para seleção de transfectantes estáveis, uma vez que o plasmídeo pLew100 confere resistência a este antibiótico de seleção.

3.16 Seleção e crescimento de clones *T. brucei* pLew100/Tb tRNA ligase

Após 5 dias de crescimento foi realizada uma diluição seriada em placa de 24 poços com meio condicionado nas seguintes proporções 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16. O meio condicionado consiste na reutilização de meio, após sua filtração para retirar células. A placa foi devidamente incubada a 28 °C, para seleção dos clones recombinantes. Após 10 dias, foi adicionado meio a fim de diluir os poços na razão 1:1. Mais uma diluição de 1:1 foi realizada em 10 dias, permitindo sua transferência para garrafas. De 24 poços, 8 clones de parasitas em seleção foram transferidos para garrafas de cultura, em volume final igual a 4 mL de meio SDM-79 com 10 % de SFB, 50 µg/mL de higromicina e 15 µg/mL de G418 higromicina e 2,5 µg/mL de fleomicina, onde foram mantidos em estufa a 28 °C até atingirem densidade igual a 1×10^6 cél/mL, possibilitando o início dos experimentos com a indução do RNAi (<tryps.rockefeller.edu>).

3.17 Indução do silenciamento do gene *trl1-like* de *T. brucei*

Após monitorações diárias do crescimento e alguns repiques dos grupos isolados, dois dos oito clones foram escolhidos para o ensaio de indução do RNAi. Uma vez atingida à fase de crescimento logarítmico (1×10^6 cél/mL), foi adicionada tetraciclina na concentração final de 1 $\mu\text{g/mL}$, que se liga aos promotores e induz a transcrição das duas fitas complementares do fragmento do gene *trl1-like*, formando o RNA dupla fita capaz de ativar a maquinaria de RNAi em *T. brucei*, com conseqüente diminuição intracelular do número de RNAs mensageiros do gene *trl1-like*. As células viáveis das culturas induzidas e não-induzidas foram contadas diariamente, em Câmara de Neubauer (durante período de até 18 dias) para monitoração e comparação do crescimento. Para a manutenção dessas células, duas estratégias foram adotadas: 1) durante o período de cultivo, ambas as culturas foram diluídas ao atingiam uma alta densidade celular, no caso, aproximadamente 1×10^7 cél/mL, para permitir o cultivo por maior tempo. Mesmo não atingindo a densidade limite, a cultura induzida também foi diluída, garantindo o mesmo tratamento; 2) curvas iniciadas com uma densidade menor de células não foram repicadas durante a indução, tendo apenas a adição de 1 $\mu\text{g/mL}$ de tetraciclina a cada 4 dias, a fim de manter a concentração da mesma. Os gráficos de crescimento celular foram construídos no programa Prisma 5 para Windows, sendo os fatores de diluições, quando realizados, considerados nos cálculos, permitindo a continuidade da curva de sobrevivência. Já os gráficos de tendência de crescimento foram construídos no programa Microsoft Office Excel 2007 para Windows, os valores obtidos foram normalizados a partir da divisão da média diária de cada um dos dias

pela média do maior valor obtido pela contagem em câmara de Neubauer em cada uma das condições (NI, I, WT e WTT).

3.18 Análise do ciclo celular

Diariamente, foram retiradas 2×10^5 células de uma cultura de *T. brucei* durante a curva de indução de cada um dos grupos: não-induzido (cepa de *T. brucei* 29-13 transfectada sem adição de tetraciclina), induzido (cepa de *T. brucei* 29-13 transfectada e induzida com tetraciclina), WT (cepa de *T. brucei* 29-13 não transfectada sem adição de tetraciclina) e WTT (cepa de *T. brucei* 29-13 não transfectada com adição de tetraciclina). As culturas foram lavadas 2 vezes em PBS (Tampão Fosfato de Sódio 20mM pH 7,2 + 150 mM de Cloreto de Sódio), a 2000 xg, por 10 min, a 25 °C. As células sedimentadas foram ressuspensas em 200 µL de PBS contendo 50 µg/mL de iodeto de propídio, 50 µg/mL de RNase e 0,1 % de Triton X-100, incubadas por 10 min no escuro e analisadas no citômetro de fluxo FACSCanto II e no programa DIVA[®], ambos da empresa BD Biosciences (Sienkiewicz, *et al.*, 2008). Os gráficos foram construídos no programa Prisma 5 para Windows.

3.19 Ensaio de viabilidade

Durante a curva de indução do RNAi foram retiradas 2×10^5 células de uma cultura de *T. brucei* de cada um dos grupos: não-induzido, induzido, WT e WTT. As culturas foram lavadas 2 vezes em PBS, a 2000 xg, por 10 min, a 25 °C. As células sedimentadas foram ressuspensas em 200 µL de PBS contendo 50 µg/mL de

iodeto de propídio, incubadas por 10 min no escuro e analisadas no citômetro de fluxo FACSCanto II e no programa DIVA[®], ambos da BD Biosciences. Os gráficos foram construídos no programa Prisma 5 para Windows.

3.20 Extração de RNA total do *T. brucei* induzido

Após indução do RNAi, o RNA total de *T. brucei* dos quatro grupos observados (NI, I, WT e WTT) foi isolado usando Trizol[®] (Life Technologies[™]). Para esse experimento foram retiradas alíquotas de aproximadamente 1×10^8 céls nos dias 0, 2, 5 e 7 após a indução. As concentrações de RNA foram mensuradas por absorbância sob o comprimento de onda de 260 nm no espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, onde se pode obter o valor em ng/ μ L e a relação da leitura em 260/280 nm, indicando o grau de pureza do RNA. Em seguida, o RNA foi tratado com DNase I (Thermo Scientific) por 30 min, a 37 °C, para remover possíveis contaminações por DNA genômico. A enzima foi desnaturada através da adição de EDTA na concentração final de 25 mM, por 10 min, a 65 °C.

3.21 Síntese de cDNA

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada por transcrição reversa do RNA obtido, utilizando-se o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Os cDNAs foram estocados a -20 °C até serem utilizados, mas por não mais do que 1 mês, para evitar possível degradação.

3.22 Amplificação do cDNA por PCR

O teste da síntese de cDNA foi realizado através da amplificação por PCR. As reações foram realizadas com o kit Master Mix (Thermo Scientific) com 300 nM de cada um dos seguintes oligonucleotídeos: Forward – 5'-TCGCTCGTATTGACCACAAA-3' e Reverse 5'-TCCTCCTCACCGTCCATATC-3' para a beta tubulina de *T. brucei* (controle endógeno). A amplificação por esse conjunto de oligonucleotídeos gera fragmentos em torno de 200-250 pares de base e o produto da reação foi aplicado em gel de agarose 2 % em TAE 1X, com 1,3 µg/mL de brometo de etídio e separados por eletroforese durante 45 min a 50 mA em tampão TAE 1X. Nesse experimento foi utilizado como padrão de peso molecular 0,2 µg do padrão 100 bp da Thermo Scientific.

3.23 PCR quantitativo em tempo real

Os cDNAs obtidos foram diluídos 10x para a quantificação relativa realizada com o equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). As reações foram feitas em placa de 96 poços utilizando Power SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems), onde cada amostra foi analisada em triplicata e normalizada em relação ao controle interno, beta tubulina. Para os genes usados foram utilizados os mesmos pares de oligonucleotídeos descritos no item 3.22, que geram fragmentos de 200 pares de base. Antes de realizar a quantificação, cada oligonucleotídeo foi testado por PCR convencional para estabelecer as condições da reação. Também foram feitas curvas de concentração de oligonucleotídeo e de cDNA (Curva de Eficiência) para determinar a melhor condição (linearidade do

método). As reações foram realizadas utilizando-se 7,5 μ L do kit Power SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems), 200 nM do par de oligonucleotídeos específico a ser analisado, 5 μ L do cDNA de interesse (previamente diluído 10x) e uma quantidade de água ultrapura autoclavada suficiente para completar o volume final de 15 μ L. O experimento foi realizado nas seguintes condições: 95 °C por 10 min, 40 ciclos de duas temperaturas (95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min), seguidos de uma curva de desnaturação (95° por 15 s, 60 °C por 1 min e 95 °C por 15 s).

3.24 Cálculo da quantificação relativa

O método que utilizamos para realizar a quantificação relativa dos genes neste trabalho foi o *Comparative Ct Method*, também chamado de Método do $\Delta\Delta$ Ct (Livak e Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001), utilizando o gene da beta tubulina como normalizador endógeno. O detalhamento dos cálculos utilizados para a análise dos dados encontra-se explicado no manual da Applied Biosystems (Método do $\Delta\Delta$ Ct).

3.25 Subclonagem e Clonagem dos genes *trl1-like* de *T. brucei*

Várias tentativas de clonagem dos fragmentos amplificados do gene *trl1-like* dos *T. brucei* foram realizadas no vetor de subclonagem pTZ57R/T da Thermo Scientific segundo protocolo do fabricante e utilizando diferentes razões vetor/inserto. As ligações foram transformadas na cepa DH10b de *E. coli* eletrocompetentes como descrito anteriormente. Como não foram encontrados clones positivos, a etapa de clonagem em pET15b não foi realizada.

3.26 Expressão da enzima Trl1-like recombinante de *T. brucei*

O plasmídeo recebido da empresa Genscript, pET15b com o gene trl1-like de *T. brucei* foi transformado em *E. coli* roseta DE3 conforme descrito anteriormente. A partir de uma colônia (confirmada para presença do plasmídeo) foi preparado um pré-inóculo de 5 mL de meio LB contendo ampicilina 100 µg/mL, estreptomicina 50 µg/mL e 25 µg/mL de clorafenicol. O pré-inóculo foi crescido por 18 h, sob uma rotação de 200 rpm a 37 °C. Após 18 h, 150 µL do pré-inóculo foram transferidos para um tubo cônico de 50 mL com 15 mL de meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina, 50 µg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de clorafenicol. A cultura foi crescida sob agitação a 200 rpm, a 37 °C até alcançar a densidade óptica (O.D) entre 0,5 a 0,6, a 600 nm, quando foi retirada uma alíquota de 1 mL (controle). Para indução da expressão da proteína recombinante, foi adicionado IPTG inicialmente a uma concentração final de 1mM. A proteína recombinante foi expressa a 37 °C, sob agitação de 200 rpm por 5 h, sendo retirada uma alíquota a cada hora. Posteriormente, foram testadas outras nove condições de indução a partir da combinação das concentrações de IPTG iguais a 0,2, 0,5 e 1 mM e temperatura igual a 15, 30 e 37°C. Os tempos de indução variaram entre 0 a 21 h, sendo retiradas alíquotas a cada hora. As alíquotas foram centrifugadas e o sedimento foi ressuspensão em tampão de lise (5 mM Tris-Cl pH7,5; 1 M NaCl; 0,1 % Triton X-100; 4 mM β-Mercaptoetanol; 10 % Glicerol; ¼ do comprimido do coquetel de inibidores de proteases Roche® e 1 mg/mL Lisozima (Sigma-Aldrich). Após a ressuspensão, a cultura foi sonicada à 6 W por 20 min com intervalos de 5 s. Ao final da sonicação, centrifugou-se a mistura a 10000 xg por 10 min. O sobrenadante foi separado do sedimento. As amostras coletadas foram analisadas em gel de poliacrilamida 10 %.

3.27 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida 10 % em condições desnaturantes

A separação de proteínas em gel de poliacrilamida foi realizada de acordo com o protocolo de Sambrook e Russell (2001) em gel de tamanho igual a 0,75 mm contendo 3 mL de gel de separação composto por 10 % de solução de bis-acrilamida 30 % (29 acrilamida: 1 bisacrilamida, v,v), 0,39 M de Tris pH 8; 0,1 % de SDS; 0,1 % de APS e 2 μ L de N,N,N',N'-Tetrametil-1,2-diaminometano (TEMED)] e 2 mL do gel de empacotamento (5 % de bis-acrilamida, 0,125 M de Tris pH 6,8, 0,1 % de SDS; 0,1 % de APS e 0,002 μ L TEMED). As amostras foram aplicadas ao gel em tampão de amostra contendo 200 mM Tris-HCl pH 6,8; 8 %; 0,4 % de azul de bromofenol; 40 % de glicerol e 400 mM de β -mercaptoetanol. As eletroforeses ocorreram durante 2 h sob 90 V em tampão de corrida contendo 25 mM Tris-Cl; 250 mM Glicina e 0,1 % de SDS.

3.28 Western Blot

Ao final da eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 10 %, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de PVDA embebida em tampão de transferência 1x (48 mM Tris.Cl; 39 mM Glicina) no equipamento *semidry* Biorad Trans-Blot_{SD}, sob 190 mA por 30 min. A membrana foi bloqueada por 18 h com solução de 10 % de albumina em TBS-Tween 1 X (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 24,8 mM Tris; 0,05% Tween 20), e posteriormente incubada com anticorpo monoclonal anti-his (GE Healthcare), na mesma solução de bloqueio, na seguinte titulação: 1:5000, por 2 h. A membrana foi então lavada 3 vezes com tampão TBS-Tween 1 X

por 5 min e o anticorpo secundário anti-*rabbit* peroxidase (GE Healthcare) adicionado na titulação 1:5000. A incubação com o anticorpo secundário prosseguiu por mais 2 h. Ao final da incubação a membrana foi lavada 3 vezes com tampão TBS-Tween 1 X por 5 min e revelada para análise.

A revelação da membrana foi realizada através do kit de revelação por peroxidase da empresa Thermo Scientific. Em seguida, a membrana foi posicionada em um cassete de revelação sob um filme de revelação Amersham®. Após variáveis tempos de exposição, o filme foi colocado em solução reveladora por 1 min, enxaguado em água corrente, colocado em solução fixadora, por mais 1 min, lavado em água corrente e analisado.

3.29 Análises estatísticas

Os resultados tiveram sua variância analisada estatisticamente pelo teste t de *student*, sendo a significância das diferenças entre os grupos calculada por teste pareado. Onde para cada grupo havia ao menos 3 experimentos independentes. Foram consideradas significativas as variações que apresentaram 95 %, no mínimo, de probabilidade de serem verdadeiramente diferentes ($p < 0,05$), segundo o programa Microsoft Office Excel 2007 para Windows.

4. Resultados

4.1 Análise dos domínios da tRNA ligase de *T. brucei*

O alinhamento de sequências da enzima tRNA ligase classe I (figura 19), demonstra que a enzima de *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. major*, assim como as outras tRNAs ligases de classe I, são compostas por um domínio N-terminal adenililtransferase/ligase, um domínio polinucleotídeo quinase e um domínio C-terminal de CPDase. Nota-se também que as proteínas dos tripanossomatídeos se assemelham às proteínas de leveduras, tanto devido à organização quanto devido à presença dos motivos I, Ia, III e IV no domínio ligase e do motivo V no domínio CPDase; do segmento equivalente à T4 Rnl-*like*, no domínio da quinase; dos motivos GxGKT e RxxxR no domínio CPDase, e do motivo HΦHΦ, típico de enzimas fosfotransferases (Wang e Shuman, 2005).

Pode-se observar também que o grau de semelhança entre a sequência do *T. brucei* e *T. cruzi* é de 50 %. A homologia entre a sequência de *T. brucei* e *L. major* é de 33 %. Enquanto que a homologia do protozoário *T. brucei* para o fungo *S. cerevisiae* e *S. pombe* é de 9 e 13 %, respectivamente. Desta forma, acreditamos que esta sejam as sequências codificantes para as tRNA ligases de tripanossomatídeos.

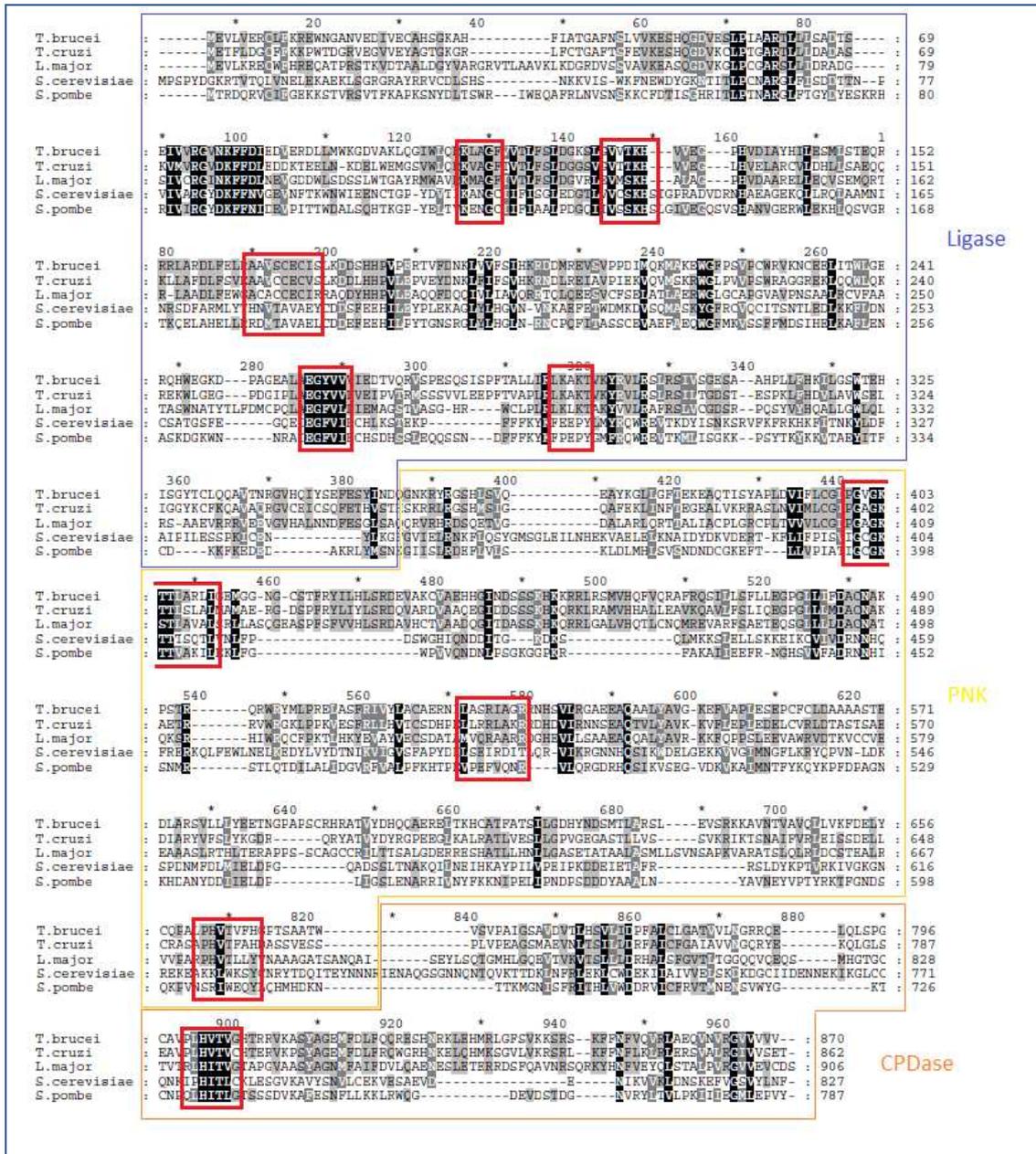


Figura 19: Alinhamento das seqüências de aminoácidos da tRNA ligase de classe I de tripanossomatídeos e fungos. As seqüência da enzima Trl1 de *T. brucei*, *T. cruzi*, *L. major*, *S. cerevisiae* e *S. pombe* foram alinhadas no programa GeneDoc. Em azul está circulado o domínio da ligase, em amarelo, polinucleotídeo kinase (PNK) e em laranja, fosfodiesterase cíclica (CPDase). Os quadros vermelhos indicam os motivos conservados entre as proteínas. As cores preto e cinza demonstra o grau de igualdade entre as seqüências, onde o preto indica similaridade total e o cinza, similaridade parcial.

4.2 Construção do plasmídeo para indução de RNA de interferência

O fragmento de 617 pb do gene da *trl1-like* de *Trypanosoma brucei* foi clonado no vetor pTZ57R/T e sequenciado. Em um dos quatro clones sequenciados, obtivemos uma sequência com 99% de identidade com a sequência depositada no banco de dados (Figura 20).

```

>lcl|38493 pTZ57RT
Length=729

Score = 896 bits (485), Expect = 0.0
Identities = 491/494 (99%), Gaps = 0/494 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1699 GCAGCCTCGACTGAGGACCTCGCCCGCTCGGTATTACTCCTCTACGAGGAAACAAATGGG 1758
          |||
Sbjct 577 GCAGCCTCGACTGAGGACCTCGCCCGCTCGGTATTACTCCTCTACGAGGAAACAAATGGG 518

Query 1759 CCTGCTCCGAGCTGTCGCCATCGTGCCACTGTCTATGATCATCAACAAGCAGAGAGAGAG 1818
          |||
Sbjct 517 CCTGCTCCGAGCTGTCGCCATCGTGCCACTGTCTATGATCATCAACAAGCAGAGAGAGAG 458

Query 1819 CTAACAAAGCACTGTGCAACATTTCGCTACATCGATTCTTGAGATCATTATAACGACAGT 1878
          |||
Sbjct 457 CTAACAAAGCACTGTGCAACATTTCGCTACATCGATTCTTGAGATCATTATAACGACAGT 398

Query 1879 ATGACCCTTGCGCGAAGTCTTGAAGTGAAGTGCATGATAAAGGCGGTTAATCAGTGGCGGTC 1938
          |||
Sbjct 397 ATGACCCTTGCGCGAAGTCTTGAAGTGAAGTGCATGATAAAGGCGGTTAATCAGTGGCGGTC 338

Query 1939 CAGTTGTTGGTGAATTCGACGAGTTGTACGAGATTATATCAGACGTTGTTAAGAGCATC 1998
          |||
Sbjct 337 CAGTTGTTGGTGAATTCGACGAGTTGTACGAGATTATATCAGACGTTGTTAAGAGCATC 278

Query 1999 ACAGTGGTAGTGGATCTGCCGAAGTTGAGCTGGTGGGAAAGGTGTAACGTGGTCTGGGC 2058
          |||
Sbjct 277 ACAGTGGTAGTGGATCTGCCGAAGTTGAGCTGGTGGGAAAGGTGTAACGTGGTCTGGGC 218

Query 2059 TTAGGCAACAGACGACGTCCTCCGGCGTAGTGGAGAAGGGGCACACCCATTGGCTTCGCGGT 2118
          |||
Sbjct 217 TTAGGCAACAGACGACGTCCTCCGGCGTAGTGGAGAAGGGGCACACCCGTTGGCTTCGCGGT 158

Query 2119 TGGCTTCTTGACGGGCGAGAAGTGGGGGAAACACCACCAGAAAATGTTGTTGGTTTCGTGCC 2178
          |||
Sbjct 157 TGGCTTCTTGACGGGCGAGAAGTGGGGGAAACACCACCAGAAAATGTTGTTGGTTTCGTGCC 98

Query 2179 CTTGAAGATCGGTA 2192
          |||
Sbjct 97 CTTGAAGATCGGTA 84

```

Figura 20: Alinhamento do fragmento de 617 pares de base do gene *trl1-like* obtido após sequenciamento. “Query” representa a região do gene da tRNA ligase depositada no banco de dados genômicos do NCBI da cepa TREU927 de *T. brucei* e “Sbjct”, região obtida após o sequenciamento do plasmídeo pTZ57R/T. O programa utilizado para fazer o alinhamento foi o Align2seq do NCBI. Os retângulos vermelhos representam as bases mutadas.

Tendo em vista que a sequência tem 99% de identidade com a sequência depositada no banco de dados, assumindo que as mutações são características da cepa utilizada (ILTAR1) e sabendo que para o funcionamento do RNAi o dsRNA é quebrado em siRNAs de 25 nucleotídeos (Balaña-Fouce e Reguera, 2007), assumimos que a diferença de três bases não comprometeria o processo. Dessa forma, deu-se continuidade com a construção do plasmídeo.

Após a confirmação da sequência, o fragmento de 617 pares de bases (sequência antisense) foi digerido do pTZ57R/T-trl1 com MluI e XbaI e clonado no pLew100 (Wirtz *et al.*, 1999), um plasmídeo com promotor PARP que produz dsRNA e que foi utilizado para a transfecção (figura 21).

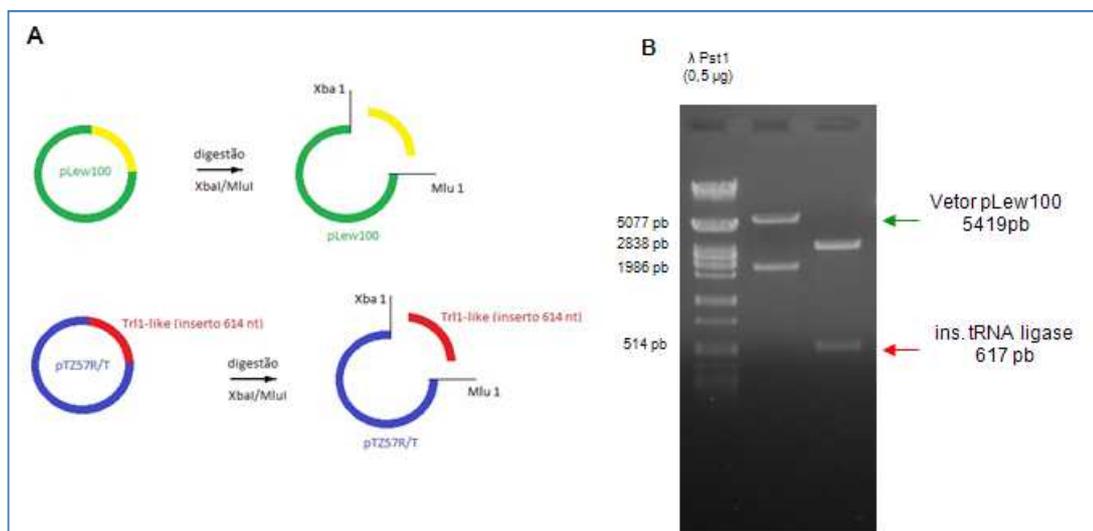


Figura 21: **Digestão do pLew100 e do pTZ57R/T-trl1 com XbaI e MluI.** Em A, o esquema da construção do plasmídeo. Em B, o resultado da digestão, onde observa-se na linha 1, o marcador de peso molecular DNA λ Pst1, na linha 2, as bandas referentes à digestão do pLew100 e na linha 3, as bandas referentes à digestão do pTZ57R/T com o fragmento do gene da tRNA ligase. A seta verde indica a banda referente ao pLew100 e a seta vermelha, o fragmento da tRNA ligase. Trezentos ng de DNA foram aplicadas em gel de agarose 0,8%. O gel foi corado com brometo de etídio (1,3 μ g/mL) e visualizado sob luz ultra-violeta.

Simultaneamente, o vetor pTZ57R/T-trl1 foi digerido com XbaI e HindIII (sequência senso) e o vetor pJM325 foi digerido com NheI e HindIII (figura 22) para

receber o fragmento. A ligação formada entre as pontas de XbaI e NheI é irreversível.

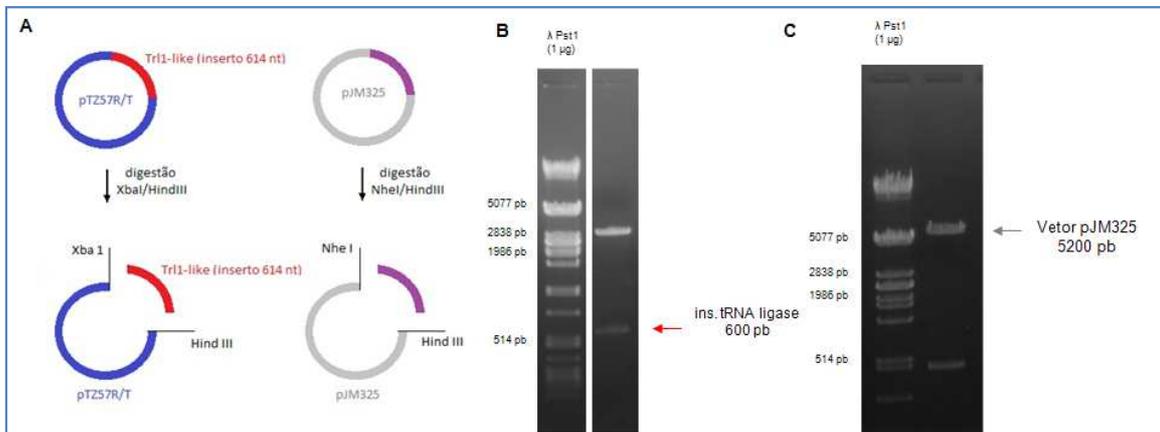


Figura 22: Digestão do pTZ57R/T-trl1 com XbaI e HindIII e do pJM325 com NheI e HindIII. Em A e C, o esquema da construção do plasmídeo. Em B, o resultado da digestão, onde observa-se na linha 1, o marcador de peso molecular DNA λ Pst1, na linha 2, as bandas referentes à digestão do pTZ57R/T-trl1, em C, a digestão do pJM325, na linha 1, o marcador de peso molecular DNA λ Pst1, na linha 2, as bandas referentes à digestão do pJM325. A seta vermelha indica a banda referente ao fragmento da tRNA ligase e a seta cinza, a banda referente ao plasmídeo pJM325. Trezentos ng de DNA foram aplicadas em gel de agarose 0.8% corado com brometo de etídio (1,3 μ g/mL). O gel foi visualizado sob luz ultra-violeta.

Em seguida, o plasmídeo pJM325 contendo o inserto da tRNA ligase, nomeado de pJM325-trl1 foi digerido com HindIII e XbaI, liberando um fragmento de 819 pb referente ao fragmento da tRNA ligase mais o *stuffer*, região não traduzida que ficará entre as sequências senso e antisenso no plasmídeo pLew100-trl1 (figura 23).

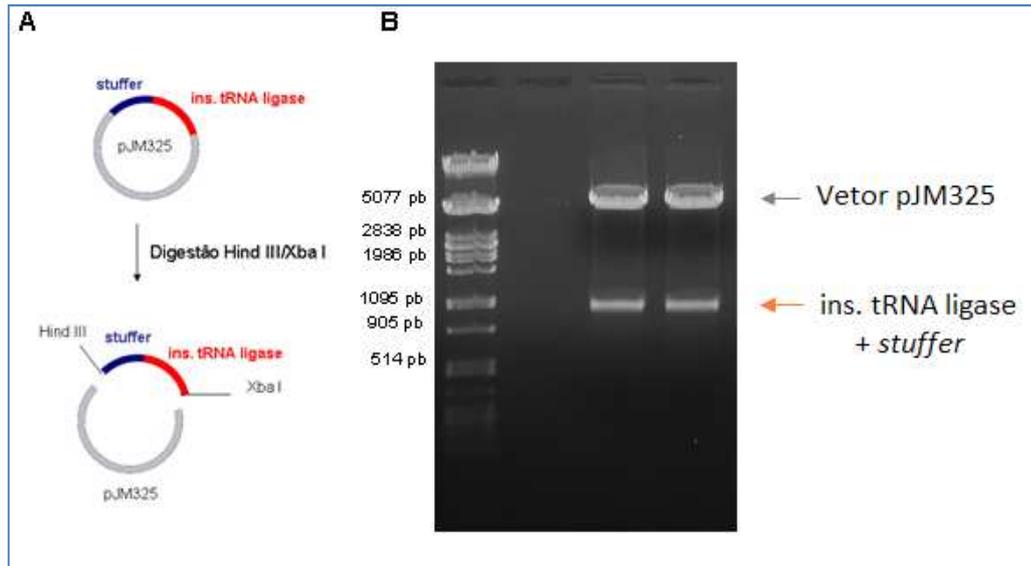


Figura 23: **Digestão do pJM325-trl1 com XbaI e HindIII.** Em A, encontra-se o esquema da construção do plasmídeo. Em B, o resultado da digestão, onde observa-se na linha 1, o marcador de peso molecular DNA λ Pst1, nas linhas 3 e 4, as bandas referentes à digestão do pJM325-trl1. A seta vermelha indica a banda referente ao fragmento da tRNA ligase mais o *stuffer* e a seta cinza, o fragmento do plasmídeo pJM325. Trezentos ng de DNA foram aplicadas em gel de agarose 0.8% corado com brometo de etídio (1,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$). O gel foi visualizado sob luz ultra-violeta.

Para receber a sequência senso o plasmídeo pLew100-trl1 foi digerido com HindIII e XbaI, liberando um fragmento de 122 pares de bases que não é necessário na construção final (figura 24).

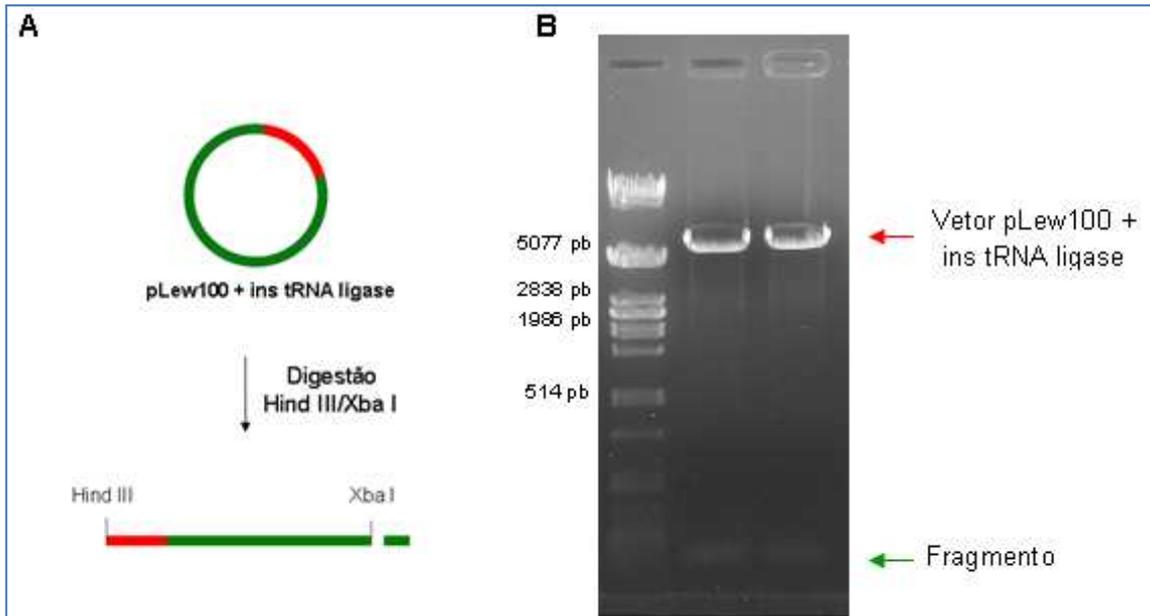


Figura 24: Digestão do pLew100-trl1 com o fragmento da sequência antisense do gene da tRNA ligase com XbaI e HindIII. Em A, o esquema da construção do plasmídeo. Em B, o resultado da digestão, onde observa-se na linha 1, o marcador de peso molecular DNA λ Pst1, nas linhas 2 e 3, as bandas referentes à digestão do plasmídeo. A seta vermelha indica a banda referente ao pLew100-trl1 e a seta verde, o fragmento de 122 pb desprezado. Trezentos ng de DNA foram aplicadas em gel de agarose 0.8% corado com brometo de etídio (1,3 μ g/mL). O gel foi visualizado sob luz ultra-violeta.

O fragmento liberado referente à sequência senso mais o *stuffer* foi inserido no pLew100-trl1, finalizando a construção do plasmídeo. A fim de conferir a realização da clonagem dos dois insertos e transformação em *E. coli* DH10b, quatro colônias aleatórias foram escolhidas, os plasmídeos purificados e digeridos com HindIII/MluI liberando um inserto de tamanho igual a 1436 pb referente aos dois fragmentos da sequência da tRNA ligase (sequência senso e antisense) mais o *stuffer* (figura 25). Os quatro clones testados apresentaram-se como o esperado.

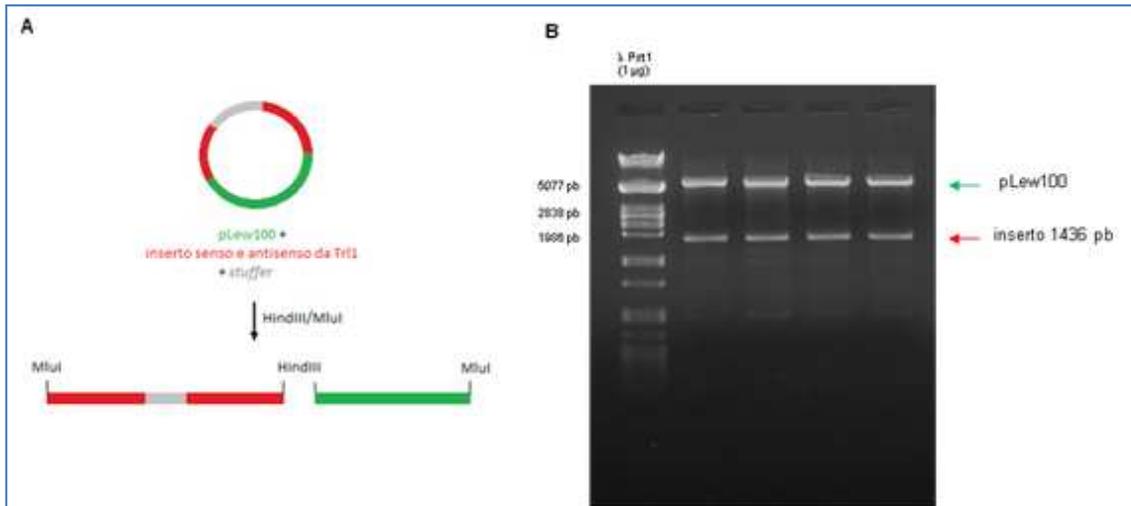


Figura 25: Digestão do pLew100-trl1-2 MluI e HindIII. Em A, o esquema demonstrando o plasmídeo fechado. Em B, o resultado da digestão de quatro clones onde observa-se na linha 1, o marcador de peso molecular DNA λ Pst1, na linhas 2 a 5, as bandas referentes à digestão do plasmídeo. A seta verde indica a banda referente ao pLew100, a seta vermelha, a banda do inserto (1436 pb). Trezentos ng de DNA foram aplicadas em gel de agarose 0.8% corado com brometo de etídio (1,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$). O gel foi visualizado sob luz ultra-violeta.

Para a transfecção em *T. brucei* o plasmídeo pLew100-trl1-2 foi linearizado com EcoRV, permitindo, após sua entrada na célula, a sua integração à região espaçadora do rDNA do *Trypanosoma brucei* (Figura 26).



Figura 26: Digestão do pLew100-trl1-2 com EcoRV. Na linha 1 observa-se o marcador de peso molecular DNA λ Pst1, na linha 2, a banda referente à digestão do plasmídeo. A seta verde indica a banda referente ao plasmídeo linearizado. Um microlitro da reação (1 μg de DNA) foi aplicado em gel de agarose 0.8% corado com brometo de etídio (1,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$). O gel foi visualizado sob luz ultra-violeta.

4.3 Silenciamento da tRNA ligase de *Trypanosoma brucei*

Após a transfecção dos parasitas foi realizada uma diluição seriada em placas de 24 poços com meio condicionado nas seguintes proporções 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16, conforme descrito no item 3.16 do material e métodos e obtendo-se oito clones possivelmente transfectados (2A, 2B, 2C, 2D, 6A, 6B, 6C e 6D). Na tentativa de isolar apenas um clone foram realizadas outras diluições como o método de placas de agarose proposto por Carruthers e Cross (1992) e o método da diluição limitante desenvolvido por Cross e colaboradores, no entanto, após muitas tentativas e falhas, foram utilizados dois clones dos oito obtidos na primeira diluição: o 2B e o 6C. Esses dois clones foram divididos em dois grupos, o induzido (I) e o não-induzido (NI). Ao atingirem a densidade de 1×10^6 cél/mL foi adicionada tetraciclina nos grupos denominados de induzidos, a fim de induzir o RNAi. A sobrevivência dos tripanossomatídeos foi monitorada por três contagens diárias. Com esse experimento observou-se que a proliferação do *T. brucei* em ambos clones (2B e 2C) começou a ser inibida 120 horas após a indução do silenciamento da tRNA ligase, demonstrando que o gene é essencial para o crescimento destes parasitas (figura 27).

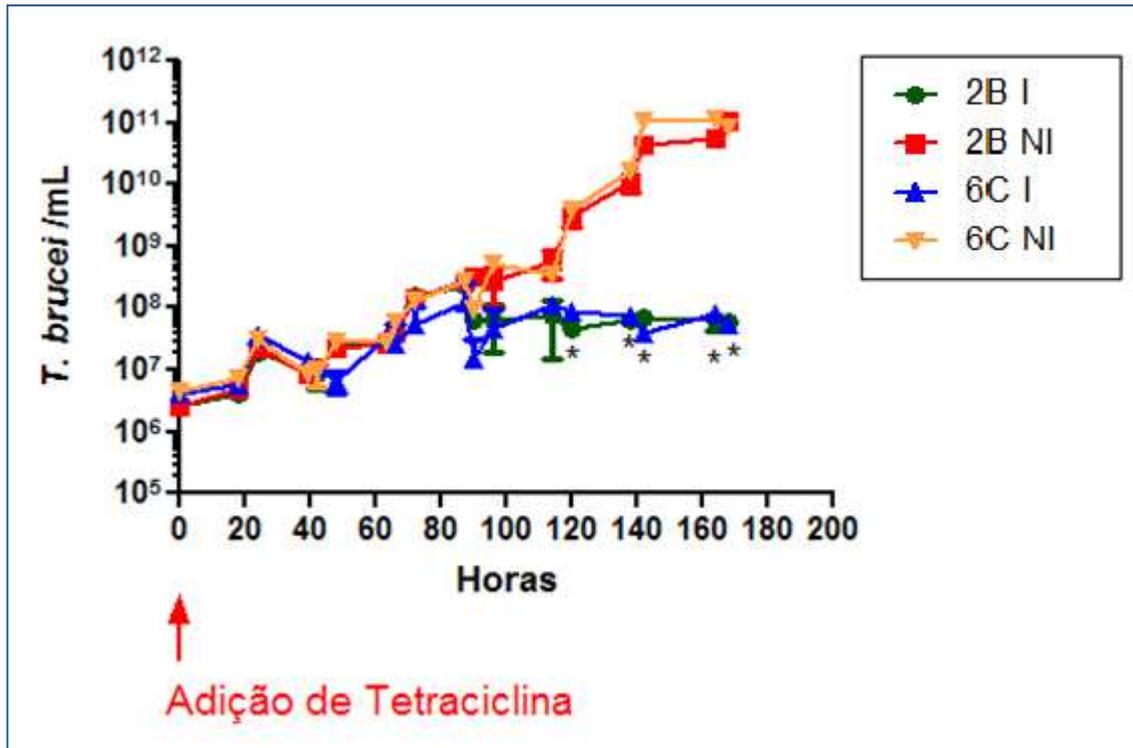


Figura 27: **Testes dos clones obtidos após a transfecção com do plasmídeo pLew 100-trI1-2.** Os clones 2B e 6C foram mantidos em meio SDM-79, acrescido de 10% de soro fetal bovino, 50 µg/mL de higromicina, 15 µg/mL de G418 e 2,5 µg/mL de fleomicina e nos grupos I foram adicionados 1 µg/mL de tetraciclina. Durante esse período, ambas as culturas foram diluídas para 5×10^5 cél/mL, no mesmo meio descrito anteriormente, ao atingir a densidade celular de aproximadamente 1×10^7 cél/mL. Mesmo não atingindo a densidade limite, a cultura induzida também foi diluída, garantindo o mesmo tratamento. Os parasitos viáveis foram contados em câmara de Neubauer, as 9, 12 e 18h, durante 10 dias.

Devido ao comportamento semelhante dos dois clones, um deles foi escolhido (6C) para dar prosseguimento aos experimentos. A curva de indução foi repetida, com apenas uma contagem diária, por um tempo maior, no entanto sem a realização de diluições, mas com a adição do indutor (tetraciclina) a cada quatro dias, mantendo assim o estímulo para a manutenção do silenciamento.

Conforme descrito no item 3.17 do material e métodos foram realizadas curvas de crescimento com diferentes densidades celulares iniciais: 1×10^4 , 1×10^5 e 1×10^6 cél/mL, sempre com a mesma quantidade de tetraciclina (1 µg/mL – Shi *et al*, 2000). Independente da concentração inicial de células e de tetraciclina, observa-se uma parada do crescimento do parasito a partir do quinto dia, exceto para a curva

iniciada em 1×10^6 cél/mL, onde não foi observada diferença entre os grupos testados (figura 28).

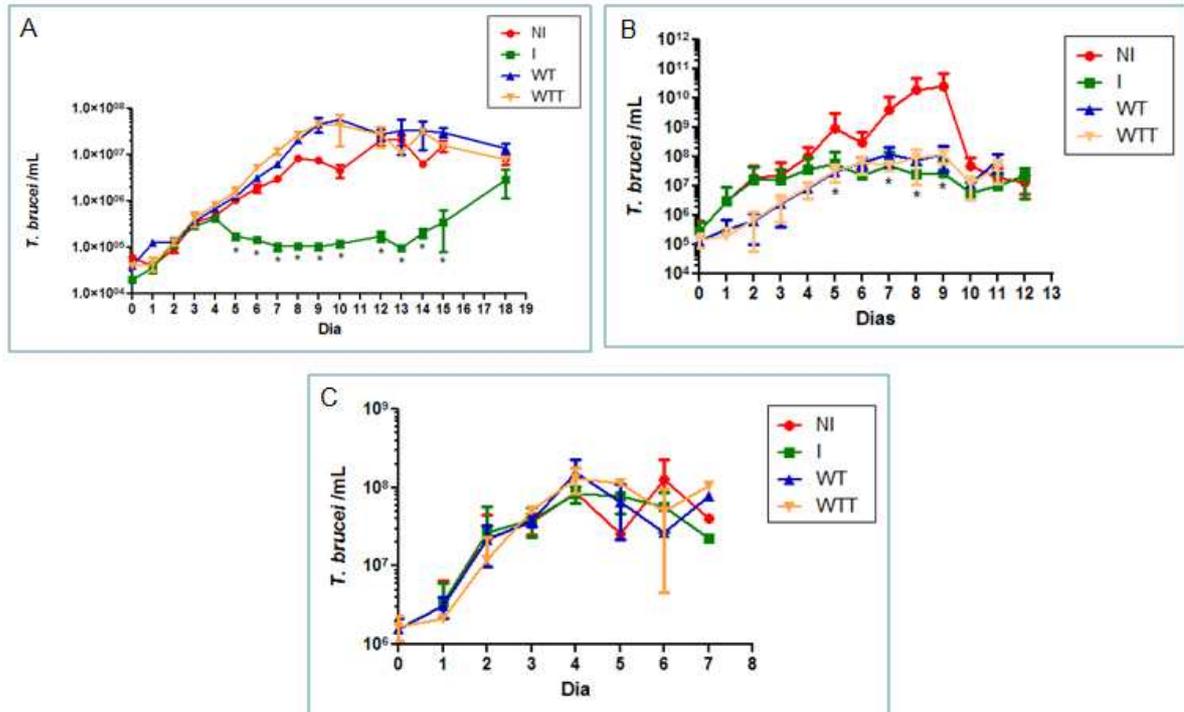


Figura 28: **Curvas de crescimento do *T. brucei* após silenciamento do gene *trl1-like*.** O clone 6C foi mantido em meio SDM-79, acrescido de 10% de soro fetal bovino, 50 $\mu\text{g/mL}$ de higromicina, 15 $\mu\text{g/mL}$ de G418 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$ de fleomicina e nos grupos I e WTT foram adicionados 1 $\mu\text{g/mL}$ de tetraciclina durante 18, 12 e 7 dias, respectivamente para as curvas iniciadas com 1×10^4 (A), 1×10^5 (B) e 1×10^6 (C) cél/mL. Os parasitos viáveis foram contados em câmara de Neubauer.

A fim de verificar a tendência de crescimento nas curvas apresentadas anteriormente (figura 28), foi realizada a normalização das contagens de cada experimento (figura 29) demonstrando que a população máxima dos parasitos não-induzidos (NI) ocorre nos dias 13, 9 e 4 para as curvas iniciadas com 1×10^4 , 1×10^5 e 1×10^6 cél/mL (figura 29A), respectivamente. O mesmo teste foi realizado com as células selvagens (linhagem 29-13, sem a presença do plasmídeo pLew100-trl1-2 – figura 29 C e D), onde observa-se que tanto o selvagem (WT – figura 29C), como o selvagem com tetraciclina (WTT – figura 29D) apresentam a população máxima nos

mesmos dias que o grupo NI (dias 13, 9 e 4, respectivamente para as curvas iniciadas com 1×10^4 , 1×10^5 e 1×10^6 cél/mL). Esse resultado indica que a densidade populacional sofre influência do espaço e da concentração de nutrientes e excretas presentes no meio nos grupos NI, WT, WTT.

No entanto, as células induzidas atingem a população máxima (figura 29B), entre os dias 4 (1×10^4 cél/mL) e 5 (1×10^5 e 1×10^6 cél/mL) de silenciamento, seguido de um decréscimo populacional após esse momento, proporcionado pelo silenciamento da tRNA ligase-*like* que impede o crescimento populacional do *T. brucei*, mesmo quando há espaço e nutrientes disponíveis.

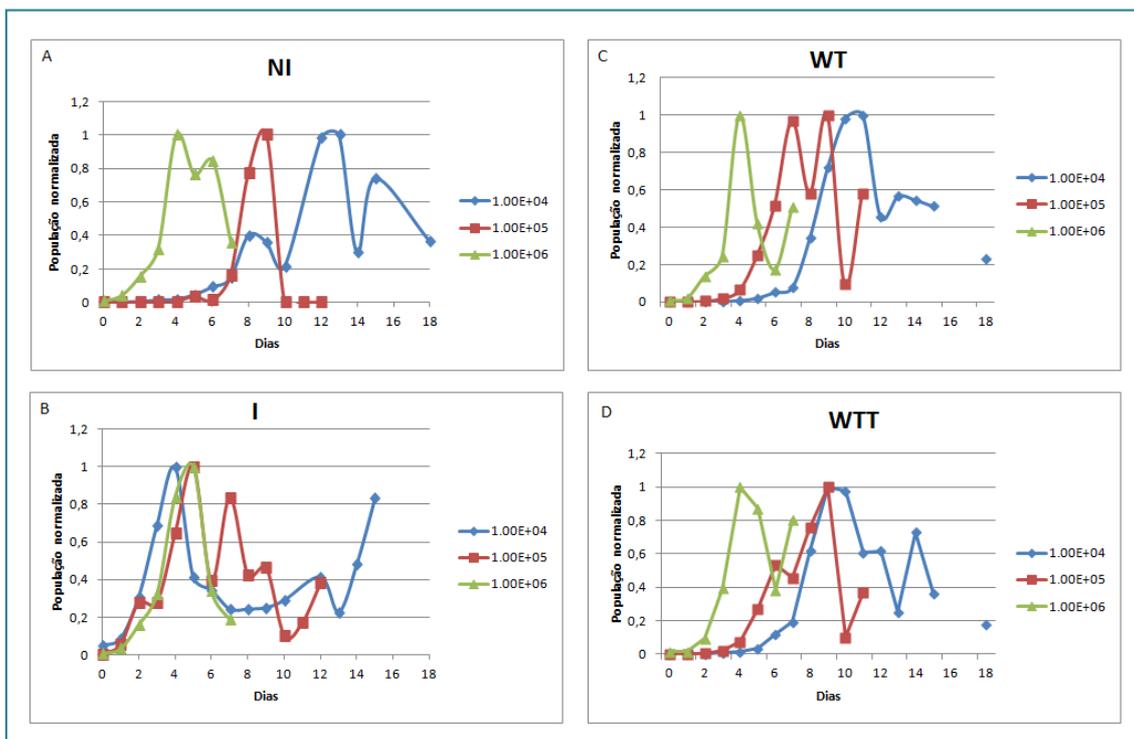


Figura 29: **Tendência do crescimento do *Trypanosoma brucei* após silenciamento gênico da tRNA ligase.** Os tripanosomatídeos foram mantidos em meio SDM-79, acrescido de 10% de soro fetal bovino, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de higromicina, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G418 e 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fleomicina e nos grupos I e WTT foram adicionados 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tetraciclina a cada quatro dias. Os parasitos viáveis foram contados em câmara de Neubauer, a cada 24h, durante 18 dias para curva iniciada em 1×10^4 cél/mL (n=3), 12 dias para a curva iniciada em 1×10^5 cél/mL (n=8) e, durante 7 dias para a curva iniciada em 1×10^6 cél/mL (n=3). Em, A o grupo não-induzido (NI), em B, o grupo induzido (I), em C, o selvagem (WT) e em D, o selvagem com tetraciclina (WTT). Os valores das contagens foram normalizados e os resultados obtidos apresentados de forma gráfica.

Na tabela 1 encontram-se as médias dos valores máximos obtidos na contagem da curva para cada condição apresentada na figura 29. Nota-se que a diferença entre os valores médios populacionais máximos obtidos entre o grupo I e o seu controle NI é de aproximadamente 49, 425 e 0,94 vezes, respectivamente para as curvas iniciadas com concentração igual 1×10^4 , 1×10^5 e 1×10^6 cél/mL. O grupo I, iniciado com 1×10^6 cél/mL confirma a hipótese de esgotamentos de espaço e nutrientes, visto que o número máximo populacional obtido em contagem celular é praticamente o mesmo que seu controle NI (tabela 1).

Tabela 1: Tabela com a média dos valores máximos (cél/mL) obtidos durante a contagem do crescimento celular do *T. brucei* na curva de silenciamento. Na primeira coluna, encontram-se os valores das concentrações iniciais de cada curva. Nas colunas restantes, a média dos valores obtidos em cada uma das condições em cél/mL, onde NI é igual a não-induzido, I, induzido, WT, cepa selvagem e WTT, cepa selvagem na presença de 1 µg/mL de tetraciclina (indutor).

Concentração inicial de célula (cél/mL)	NI	I	WT	WTT
1×10^4	$2,13 \times 10^7$	$4,27 \times 10^5$	$6,00 \times 10^7$	$4,45 \times 10^7$
1×10^5	$2,53 \times 10^{10}$	$5,94 \times 10^7$	$1,28 \times 10^8$	$1,21 \times 10^8$
1×10^6	$1,14 \times 10^8$	$1,21 \times 10^8$	$1,56 \times 10^8$	$1,31 \times 10^8$

De forma a relacionar alguma alteração no ciclo celular ao fenômeno observado anteriormente de decréscimo no crescimento do *T. brucei* durante o silenciamento, realizou-se ensaios de ciclo celular por citometria de fluxo, onde os grupos de *T. brucei* não-induzido (NI) e induzido (I) foram monitorados diariamente (figura 28 e 29). Apesar da presença de diferença significativa $p < 0,05$ entre os grupos NI e I, nos dias 0, 2 e 3 das fases G1 e S, não há nenhum momento em que esteja presente uma grande diferença entre os tratamentos e as fases (figura 30).

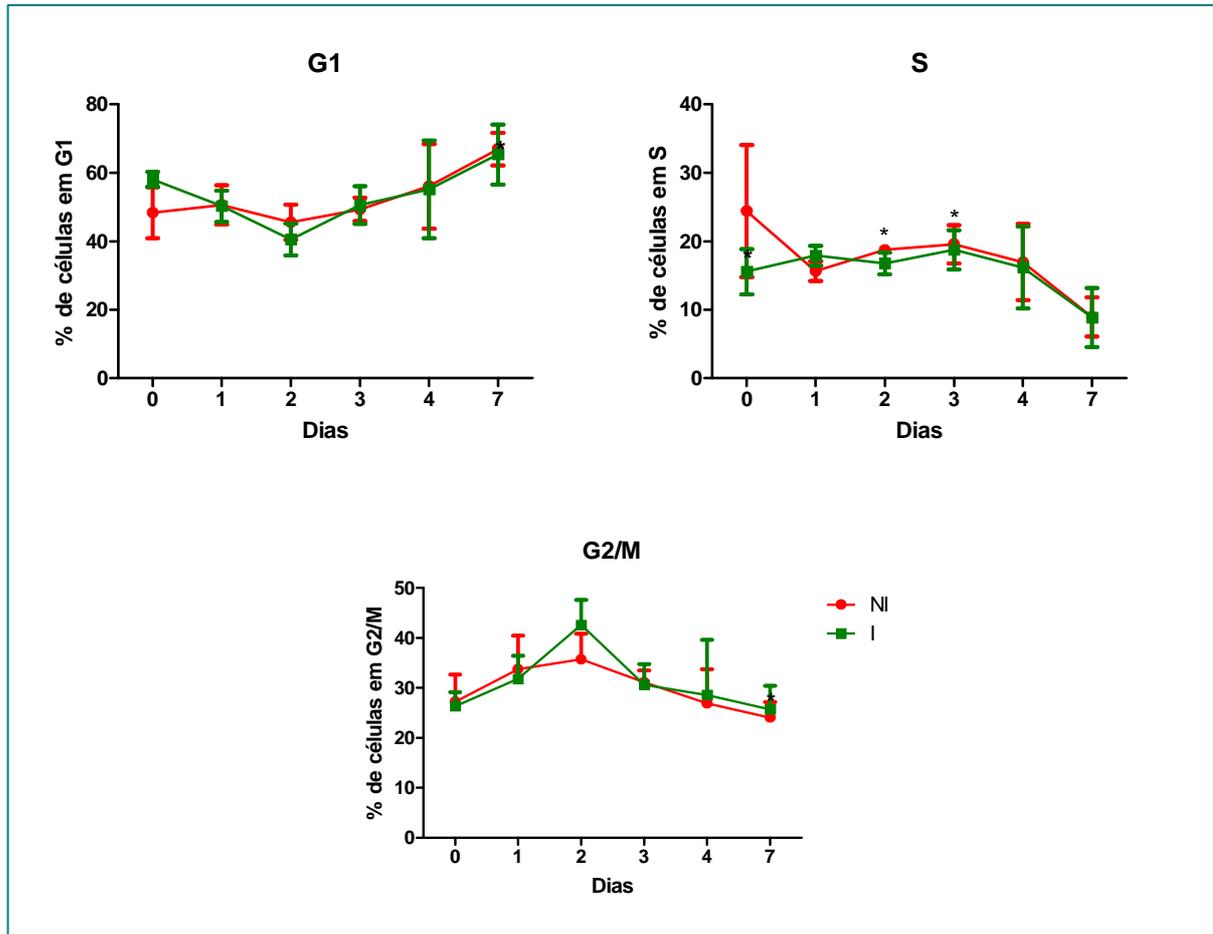


Figura 30: **Análise do ciclo celular do *T. brucei* durante a indução do gene *Trl1-like*.** Através do FACS e do programa DIVA[®], alíquotas dos grupos NI, I, WT e WTT puderam ser analisadas, após incubação por 10 min, em PBS, com triton X-100, iodeto de propídio e RNase, segundo descrito em material e métodos. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão, * $p < 0.05$ em relação ao grupo controle baseado no teste t de *student*. Os resultados são representados por três experimentos independentes.

A viabilidade dos tripanossomatídeos induzidos também foi examinada através de citometria de fluxo onde a entrada de PI indica que a membrana encontra-se permeável. Os grupos analisados NI e I foram incubados em PBS contendo PI e apesar de apresentarem diferença significativa ($p < 0,05$) em alguns dias experimentais nas diversas concentrações de células iniciais utilizadas (1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 e 1×10^6 cél/mL) as células presentes são majoritariamente viáveis.

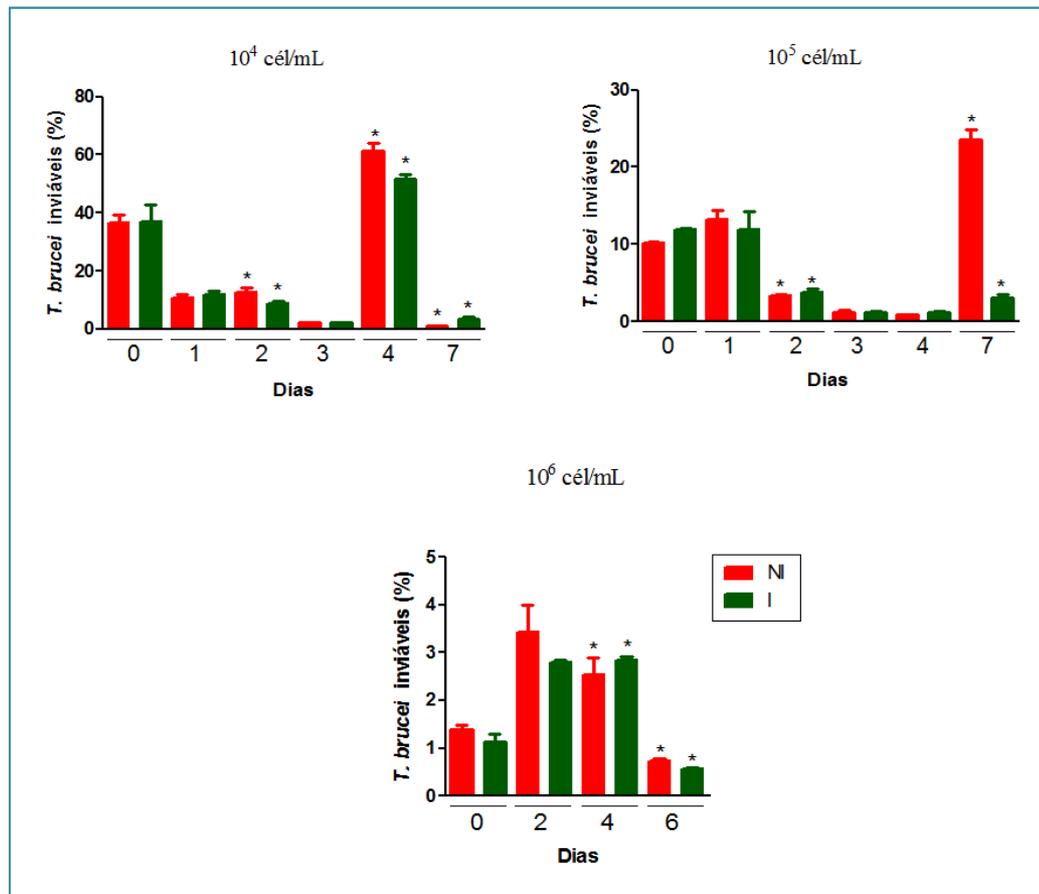


Figura 31: **Ensaio de viabilidade do *T. brucei* durante a indução do gene *Trl1-like*.** Através do FACS e do programa DIVA[®], a viabilidade dos parasitas induzidos puderam ser comparadas aos grupos controles (NI, WT e WTT), na presença de iodeto de propídeo diluído em PBS, conforme descrito no item 3.19 do material e métodos. Em A, o ensaio de viabilidade da curva de silenciamento iniciada com 1×10^3 cél/mL, em B, 1×10^4 cél/mL, em C, 1×10^5 cél/mL e em D, 1×10^6 cél/mL. O asterisco (*) indica os grupos com diferença significativa $p < 0,05$, de acordo com o teste t de *student*, onde o induzido é comparado ao controle (NI). Cada um dos gráficos representa três experimentos independentes.

A fim de confirmar se os efeitos fenotípicos foram resultado do silenciamento gênico, foi realizada a análise quantitativa da expressão do gene da tRNA ligase através do PCR em tempo real (qPCR), onde a curva de indução do RNAi do gene da tRNA ligase foi repetida com os mesmos grupos (NI, I, WT e WTT), com a concentração inicial de 1×10^5 cél/mL, na presença de 1 µg/mL de tetraciclina nos grupos I e WTT. Amostras dos dias 0, 2, 5 e 7 tiveram seu RNA total extraído

usando o Trizol® (Invitrogen) a partir do qual o cDNA foi sintetizado e amplificado, obtendo-se assim, substrato para a realização do qPCR. A análise do resultado do qPCR confirma o silenciamento gênico da tRNA ligase nos dias dois e cinco, com reversão dos efeitos ao sétimo dia, comparado ao grupo de parasitas não-induzido (figura 32), sendo o segundo dia e o quinto dias os momento onde ocorrem silenciamento do gene que é de 55,2 e 64,4%, respectivamente. O controle selvagem com tetraciclina (WTT) demonstra uma variação na expressão desse gene ao longo dos dias e confirma a especificidade do sistema utilizado para o silenciamento.

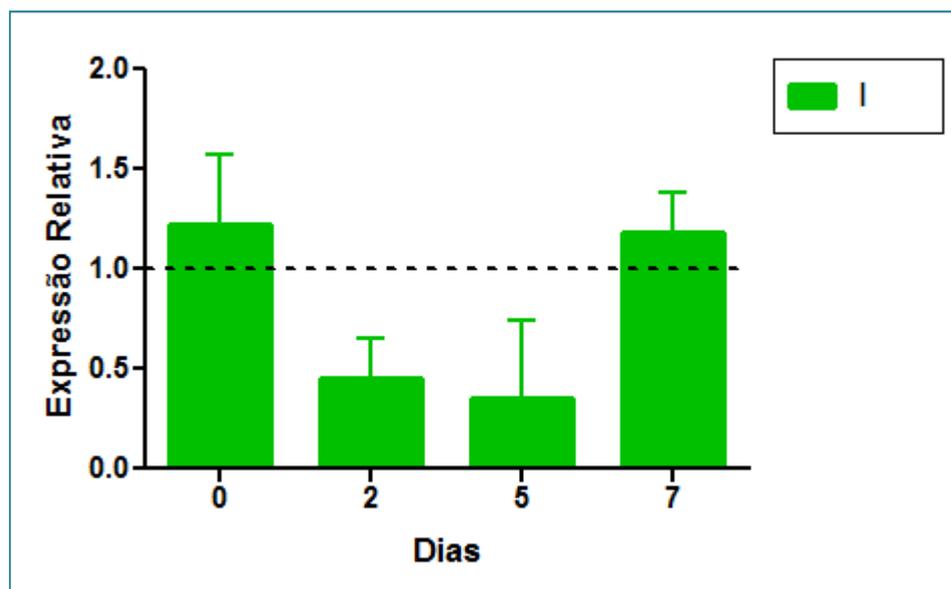


Figura 32: **Análise quantitativa da expressão da tRNA ligase após silenciamento por PCR em tempo real.** A partir da síntese de primeira fita de cDNA e a sua amplificação foi realizado o qPCR, conforme descrito em material e métodos. Cada amostra foi analisada em triplicata e normalizada em relação ao controle interno: beta-tubulina. A linha tracejada demonstra os níveis de expressão da tRNA ligase nos controles não-induzido (NI) e selvagem (WT) e as barras, os valores da expressão relativa de cada amostra. A expressão relativa dos genes foi calculada tendo como base o Método do $\Delta\Delta Ct$. Esse gráfico é representativo de quatro experimentos independentes.

4.4 Expressão da tRNA ligase de *Trypanosoma brucei* *in vitro*

Para investigar *in vitro* a atividade da tRNA ligase do *T. brucei* sobre seus substratos foram realizadas diversas tentativas de clonagem do gene de interesse (tRNA ligase) no vetor pET15b (Novagen). Dessa forma foi encomendado a empresa Genscript o vetor pET15b com o gene de interesse (de 2614 pb) clonado com cauda de 6x de histidina na porção N-terminal. O plasmídeo foi transformado em bactérias eletrocompetentes *E. coli* Roseta DE3 e submetido a uma mini-indução, a 37°C, com 1 mM de IPTG conforme explicitado em material e métodos. O perfil de proteínas obtido pode ser visualizado na figura 33, assim como a presença da proteína tRNA ligase de 95 kDa, marcados pela seta a esquerda da figura.

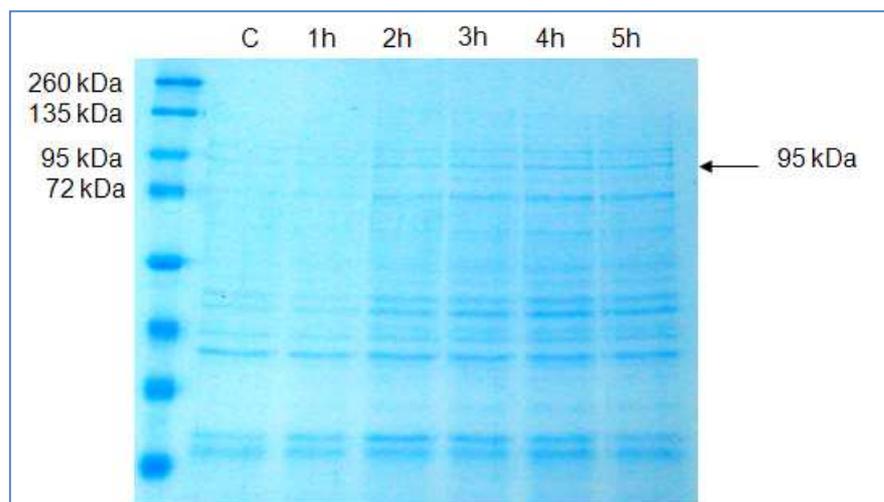


Figura 33: **Mini-indução da bactéria *E. coli* roseta DE3 transformada com o plasmídeo pET15b com o gene da tRNA ligase de *T. brucei*.** Amostras da bactéria em meio LB, a 37°C, com 1 mM de IPTG foram retiradas a cada hora e após lise em tampão descrito no material e métodos, as proteínas foram separadas em gel de poliácridamida 10% e coradas com corante Comassie blue R-250.

Em busca de melhores condições de expressão da enzima foram realizadas induções da expressão em que foram variados temperatura, concentração de IPTG e tempo (figura 34). Através desses experimentos verificou-se que as melhores

condições de expressão foram: 16h a 15 °C com 0,5 mM de IPTG, 2, 3 e 4h a 30°C com 0,2 mM de IPTG, 3 h e 21 h a 30 °C com 1 mM de IPTG, 1, 2 e 3 h a 37 °C com 0,2 mM de IPTG e 2 h a 37°C com 0,5 mM de IPTG, marcadas com um círculo vermelho na figura 34.

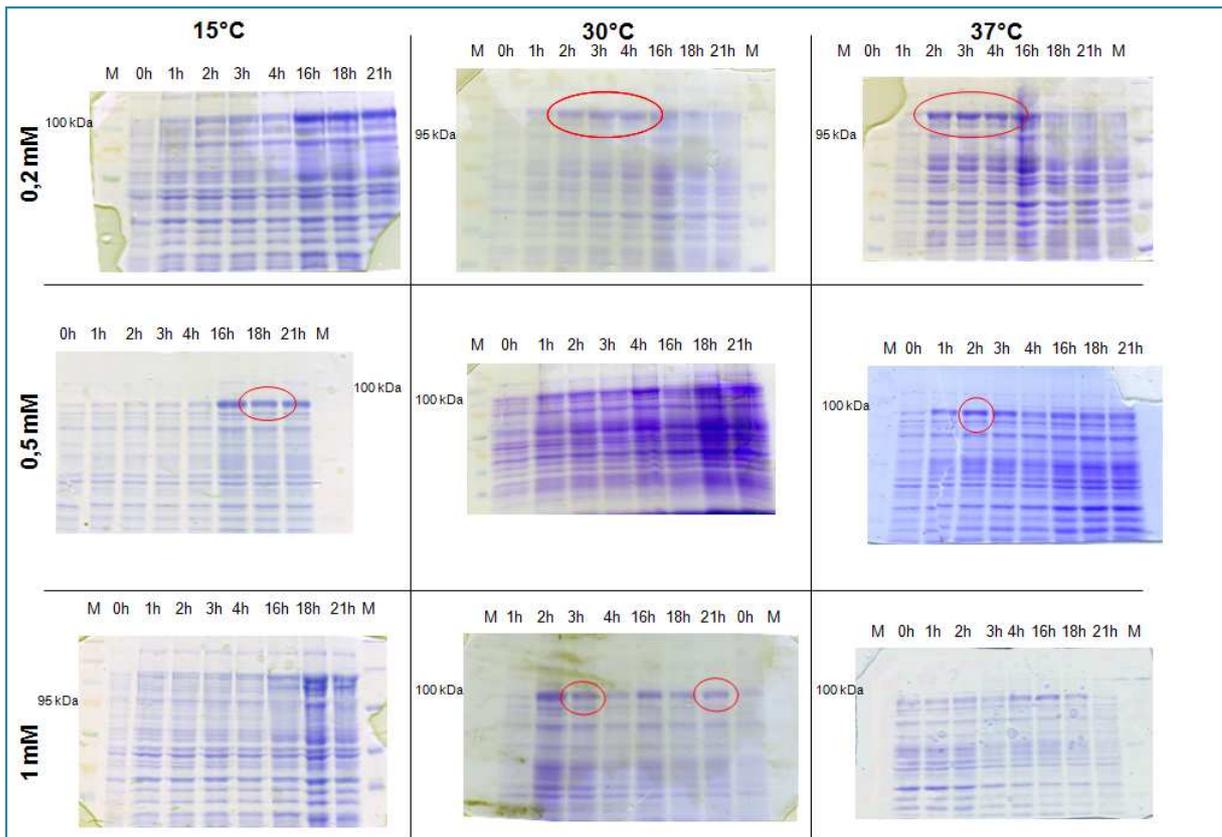


Figura 34: **Teste da melhor condição de expressão da tRNA ligase em *E. coli* roseta DE3.** Foram realizadas mini-induções em três diferentes temperaturas: 15, 30 e 37°C, em três concentrações de IPTG: 0,2; 0,5 e 1 mM e diversos tempos entre 0 a 21 h. As proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida 10% e coradas com comassie blue R-250.

A condição de 3 h, a 30 °C, em 1 mM de IPTG foi escolhida para uma indução da expressão e posterior purificação da proteína tRNA ligase em coluna de níquel. As eluições após a purificação foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10 %, podendo-se verificar a presença da proteína nas frações 1, 2, 3 e 4 marcadas na figura 35 com um retângulo azul. Como demonstrado na figura 33 a proteína obtida apresenta peso molecular de 95 kDa.

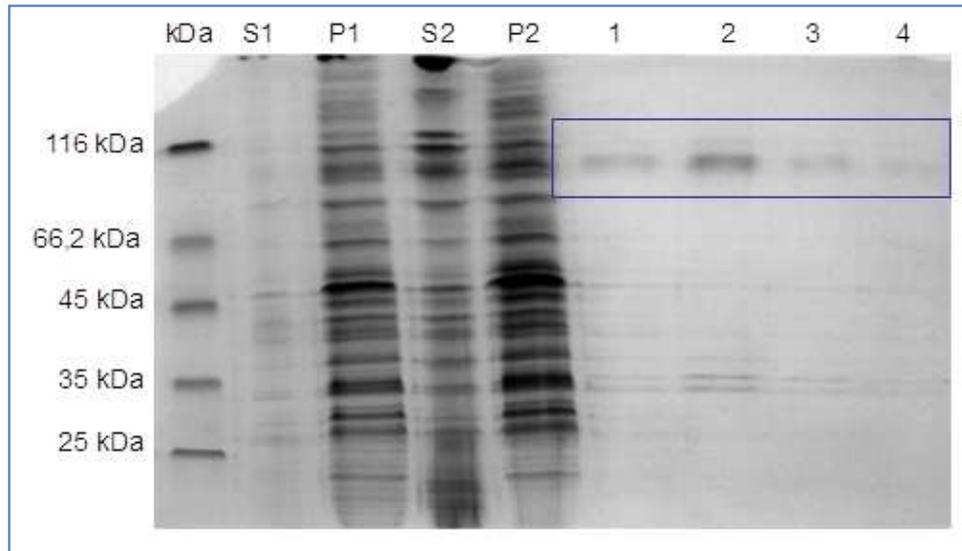


Figura 35: **Eluições obtidas durante a purificação da tRNA ligase de *T. brucei* expressa *in vitro*.** Eletroforese em gel de Poliacrilamida 10%. Linha 1, padrão de peso molecular não corado da Fermentas. Linha S1, sobrenadante após centrifugação a 10000 rpm por 10 min, a 4 °C do extrato bacteriano induzi do por 3h com 1 mM de IPTG. Linha P1, sedimento da centrifugação descrita no item anterior. Linha S2, sobrenadante após centrifugação a 40000 rpm por 1 h, a 4 °C do sobrenadante separado após a primeira centrifugação. Linha P2, sedimento da centrifugação descrita no item anterior. Linhas 1 a 4, eluições do sobrenadante (S2) em coluna de níquel.

Para confirmar se a proteína encontrada era mesmo a proteína desejada, foi realizado um *western blot* com anticorpo anti-His. No *western blot* (figura 36) foram aplicados um controle positivo, uma proteína de 30 kDa que também possui a cauda de histidina (linha 3), a proteína purificada (linha 2) e o extrato bacteriano total logo após a lise (linha 1). Ambas as proteínas foram marcadas pelo anticorpo anti-his conforme esperado, no entanto observa-se que houve degradação da proteína durante a purificação, fato que não ocorre no extrato total mesmo apresentando pouca proteína. Outras tentativas foram realizadas sem êxito.



Figura 36: **Western blot das amostras purificadas após a expressão da tRNA ligase in vitro.** Na linha 1 está o marcador de peso molecular não marcado da Fermentas Life Sciences, na linha 2, extrato total da lise bacteriana, linha 3, fração 2 da purificação da figura 35 e na linha 4, o controle positivo, uma proteína com cauda de histidina. O * marca as bandas de interesse.

5. Discussão

O presente trabalho permitiu a observação da essencialidade do gene *trl1-like* de *Trypanosoma brucei in vitro*. O alinhamento e a análise dos domínios conservados entre as sequências da enzima de Kinetoplastea e fungos, confirmou que as sequências depositadas no banco de dados do NCBI, como proteínas putativas e sem anotação, tratam-se de tRNA ligases. Através desse alinhamento foi constatado que os motivos importantes para a caracterização de cada um dos três domínios: ligase, polinucleotídeo quinase e fosfodiesterase cíclica estão presentes e que cada um dos domínios tem condições de exercer o seu papel esperado (Wang e Shuman, 2005).

Com a confirmação da presença da enzima Trl1-*like* em tripanossomatídeos tornou-se possível seu estudo *in vivo*. Esse estudo pode ser realizado após a construção do plasmídeo pLew100-trl1-2 com dois fragmentos complementares do gene *trl1-like* que ao serem transcritos geram um grampo que será reconhecido pela maquinaria de RNAi de *T. brucei*. Esse vetor possui um promotor do gene PARP induzível por tetraciclina, na ausência de tetraciclina a expressão desse promotor é quase insignificante (Ullu *et al*, 2002).

Após a transfecção do plasmídeo pLew100-trl1-2 e seleção dos clones, verificou-se que o silenciamento do gene promoveu a inibição do crescimento do parasita, sempre a partir do quarto dia de indução. Os grupos induzidos atingiram a maior concentração de células entre quatro e cinco dias após a indução. Para o grupo NI, a concentração inicial de células interfere no tempo para o alcance do número máximo de indivíduos, provavelmente devido à diminuição de nutrientes,

espaço e aumento de excretas, enquanto que para o grupo I, independente da concentração inicial de células e da dose de tetraciclina, o crescimento máximo das populações, seguido do declínio ocorre ao mesmo tempo, possivelmente pela diminuição dos níveis de tRNA^{Tyr} maduro.

Segundo Shi e colaboradores (2000 – figura 3 do artigo) a concentração ideal de tetraciclina é de 1 µg/mL, para curvas iniciadas em 1x10⁶ cél/mL. Nesse trabalho foi utilizada a mesma concentração de tetraciclina, em diversas concentrações iniciais de célula como 1x10⁴, 1x10⁵ e 1x10⁶ /mL, e em todas as curvas a população máxima é atingida ao quarto e quinto dias após a indução do RNAi. Sendo assim, a concentração de tetraciclina utilizada pode estar acima da dose eficiente mínima, como demonstrado por Wirtz e colaboradores (1999 – figura 4A do artigo), onde não há diferença de efeito entre as doses de 50, 100 e 1000 ng/mL, justificando o fato de não haver diferença entre a densidade de células e a dose de tetraciclina utilizada.

Os resultados obtidos através do ensaio de ciclo celular e viabilidade mostraram que não houve variação nos fenótipos do grupo induzido e não induzido, apesar da expressão do mRNA ter sido quantificada confirmando a inibição da transcrição do mRNA. Sabendo-se que a tirosina é um aminoácido essencial na composição da maioria, senão de todas as proteínas celulares, a ausência de interferência no ciclo celular e alteração na viabilidade, provavelmente se deve ao fato de que com um número baixo de cópias de tRNA ligases é capaz de manter o ciclo celular e a membrana celular normais.

Durante a realização desse trabalho foram realizadas diversas tentativas de determinação do silenciamento da expressão da proteína *trl1-like* através do ensaio de *Western blot* (dados não apresentados). No entanto, não foi possível identificar a proteína através da ligação de um anticorpo anti-*trl1-like*, produzido para esse fim.

Abelson e colaboradores (1998) realizaram a caracterização da tRNA endonuclease de levedura após muitas dificuldades, ocasionadas pela expressão da enzima ocorrer em baixos níveis em levedura (aproximadamente 150 moléculas por célula). Logo, é possível que a tRNA ligase também seja expressa em níveis baixos, tanto em levedura como em *T. brucei*, o qual possui 10 vezes menos tRNAs com íntron que a levedura (Abelson *et al.*, 1998; Schneider *et al.*, 1993), motivo pelo qual o método de Western blot pode não ter sido sensível. No entanto, foi possível quantificar a expressão da *Trl1-like* através do qPCR, indicando o silenciamento da enzima entre 2 a 5 dias de indução, com eficiência de 55,2 e 64,4 %, respectivamente. A redução dos níveis de tRNA^{Tyr} maduros formados a partir do segundo dia de indução e o aumento dessa redução ao quinto dia, reflete no crescimento do *T. brucei*, que conforme demonstrado na figura 28, após o quinto dia de indução a taxa de crescimento populacional entra em declínio.

Apesar da análise da expressão do gene *trl1-like* ter demonstrado diminuição da expressão do gene entre o segundo e quinto dia de silenciamento, o crescimento celular não sofreu alteração até quatro dias de silenciamento, provavelmente ocasionado pela presença de moléculas residuais da enzima *Trl1-like*, assim como de tRNA^{Tyr} maduro (Ullu, 2002). Passado esse período de quatro a cinco dias, a célula não conseguiu mais aumentar sua proliferação, ocasionada, provavelmente pelos baixos níveis de tRNA^{Tyr} maduro, necessário para a tradução de proteínas.

Outra possível explicação para não ter havido morte completa dos parasitas e alterações no ciclo celular e viabilidade seria a presença da enzima RtcB em *T. brucei* (dado não apresentado). A RtcB foi descrita no início do ano passado como uma nova RNA ligase, capaz de fazer a ligação dos terminais 2'-3' fosfato cíclico e

5'-OH na ausência de ATP e estão presentes em arqueia, bactérias e metazoa, mas não em levedura (Popow *et al*, 2011; Englert *et al*, 2011; Tanaka *et al.*, 2011).

Para a caracterização *in vitro* da Trl1-like de *Trypanosoma brucei* foi preciso expressá-la *in vitro* e purificá-la. No entanto, a enzima não resistiu ao armazenamento apresentando-se degradada no ensaio de *Western blot*. Diante desse fato, a caracterização não pode ser finalizada, nem utilizando-se um extrato total das bactérias, devido a presença da enzima heteróloga RtcB na bactéria *E. coli* (Tanaka *et al.*, 2011), utilizada para a expressão da proteína *in vitro*.

Sabe-se que em experimentos de silenciamento gênico em diversos laboratórios, aproximadamente 50 % dos casos de observação de fenótipos apresentaram falhas, seja devido ao tamanho da sequência de dsRNA formada, ou pela concentração residual de mRNA nas células. Dessa forma, a síntese do produto do gene de interesse nunca é completamente abolida e em muitos casos os parasitas podem sobreviver mesmo com pouco mRNA (Ullu, 2002). Nesse trabalho foi possível demonstrar com a utilização da técnica de RNA de interferência a importância do gene de tRNA ligase-like para o crescimento do *T. brucei* e a possibilidade da extrapolação dos conhecimentos adquiridos para os outros tritryps, além de contribuir para o aumento do conhecimento da biologia de tripanossomatídeos.

6. Conclusão

- Através da comparação entre as sequências das enzimas tRNA ligase de tripanossomatídeos e levedura pode-se concluir que as sequências depositadas no banco de dados do NCBI, como proteínas putativas e sem anotação, tratam-se de tRNA ligases.
- A constatação da presença de diversos motivos conservados importantes para o funcionamento dos domínios na comparação das sequências da enzima de Kinetoplastea e levedura confirmam sua função.
- A construção do plasmídeo para a produção de RNA de interferência foi realizada com sucesso.
- O silenciamento da enzima demonstra a essencialidade da *Trl1-like* para a proliferação celular do *Trypanosoma brucei*.
- Os grupos induzidos atingem o crescimento máximo entre quatro e cinco dias após a indução.
- A concentração inicial de células interfere no tempo para o alcance do número máximo de indivíduos nos grupos não-induzidos e selvagens.
- O ciclo celular do *T. brucei* não é alterado com o silenciamento da enzima *trl1-like*.
- O silenciamento da tRNA ligase não interfere na viabilidade das células.
- O mRNA da tRNA ligase apresenta-se reduzido após 48h de indução e com reversão após esse tempo.
- A enzima tRNA ligase foi expressa *in vitro* em diversas condições experimentais.
- A purificação da enzima foi realizada no entanto, não foi possível testar sua atividade devido a sua instabilidade *in vitro*.

7. Referências

- ABAD-FRANCH, Fernando; SANTOS, Walter S.; SCHOFIELD, Christopher J.. (2010) **Research needs for Chagas disease prevention**. *Acta Tropica* 115: 44–54
- ALBENSON, John; TROTTA, Christopher R.; LI, Hong. (1998) **tRNA Splicing**. *The Journal of Biological Chemistry* 273 (21): 12685–12688.
- ALTSCHUL, Stephen F.; MADDEN, Thomas L.; SCHÄFFER Alejandro A.; ZHANG, Jinghui; ZHANG, Zheng; MILLER, Webb; LIPMAN, David J.. (1997) **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs**. *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-402.
- ANDRADE, Sonia Gumes; CAMPOS, Rozália Figueira; STEINDEL, Mario; GUERREIRO, Marcos Lázaro; MAGALHÃES, Juracy Barbosa; DE ALMEIDA, Marcio Cerqueira; REIS, Joice Neves; SANTOS, Viviane Corrêa; VALADARES, Helder Magno Silva; DOS REIS, Mitermayer Galvão; MACEDO, Andréa Mara. (2011) **Biological, biochemical and molecular features of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients infected through oral transmission during a 2005 outbreak in the state of Santa Catarina, Brazil: its correspondence with the new *T. cruzi* Taxonomy Consensus (2009)**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(8): 948-956.
- APHASIZHEV, Ruslan; KARMARKAR, Uma; SIMPSON, Larry. (1998) **Are tRNAs imported into the mitochondria of kinetoplastid protozoa as 5'-extended precursors?** *Molecular and Biochemical Parasitology* 93: 73–80
- APOSTOL, Barbara L.; WESTAWAYV, Shawn K.; ABELSON, John; GREER, Chris L. (1991) **Deletion Analysis of a Multifunctional Yeast tRNA Ligase Polypeptide: Identification of Essential and Dispensable Functional Domains**. *The Journal of Biological Chemistry* 266 (12): 7445-7455.
- BALANÑA-FOUCE, Rafael; REGUERA, Rosa M.. (2007) **RNA interference in *Trypanosoma brucei*: a high-throughput engine for functional genomics in trypanosomatids?** *Trends in Parasitology* 23(8): 348-351.
- Bill and Melina Gates Foundation – Disponível em: <www.gatesfoundation.org/topics/Pages/neglected-diseases.aspx>. Acessado em: 9 de maio de 2011.
- BRUN, R.; SCHÖNENBERGER. (1979) **Cultivation and in vitro cloning or procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium**. Short communication. *Acta Trop.* 36(3): 289-92.
- CARRUTHERS, Vern B.; CROSS, George A.M.. (1992) **High-efficiency clonal growth of bloodstream- and insect-form *Trypanosoma brucei* on agarose plates**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89: 8818-8821.

CHAGAS, C.. (1909) **Nova tripanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen, n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem.** Mem Inst Oswaldo Cruz 1: 11-80.

CHAKRAVARTYA, Jaya; KUMARA, Subodh; TRIVEDIA, Sonali; RAI, Vijay K.; SINGHA, Anup; ASHMANB, Jill A.; LAUGHLINB, Elsa M.; COLERB, Rhea N.; KAHNB, Stuart J.; BECKMANN, Anna Marie; COWGILL, Karen D.; REED, Steven G.; SUNDARA, Shyam; PIAZZAB, Franco M.. (2011) **A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1 + MPL-SE vaccine for use in the prevention of visceral leishmaniasis.** Vaccine 29: 3531–3537.

CHANDA, Ipsita; PAN, Archana; SAHA, Sanjoy Kumar; DUTTA, Chitra. (2007) **Comparative codon and amino acid composition analysis of Trityps-conspicuous features of *Leishmania major*.** FEBS Letters 581: 5751–5758.

COURA, José Rodrigues; BORGES-PEREIRA, José. (2010) **Chagas disease: 100 years after its discovery.** A systemic review. Acta Tropica 115: 5–13.

CUERVO, Patricia; DOMONT, Gilberto B.; DE JESUS, Jose B.. (2010) Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. Journal of Proteomics 73: 845-867.

Drugs for Neglected Disease initiative – DNDi – América Latina. Disponível em: <www.dndi.org.br/pt/doencas-negligenciadas/doenca-de-chagas.html>. Acesso em 9 de maio de 2011.

Drugs for Neglected Disease initiative – DNDi – América Latina. Disponível em: <www.dndi.org.br/pt/doencas-negligenciadas.html>. Acesso em 9 de maio de 2011.

Drugs for Neglected Disease initiative – DNDi. Disponível em: <www.dndi.org/diseases/hat.html>. Acesso em: 9 de maio de 2011.

Drugs for Neglected Disease initiative – DNDi. Disponível em: <www.dndi.org/diseases/vl.html>. Acesso em: 9 de maio de 2011.

EL-SAYED, Najib M.; MYLER, Peter J.; BARTHOLOMEU, Daniella C.; NILSSON, Daniel; AGGARWAL, Gautam; TRAN, Anh-Nhi; GHEDIN, Elodie; WORTHEY, Elizabeth A.; DELCHER, Arthur L.; BLANDIN, Gaëlle; ESTENBERGER, Scott J.; CALER, Elisabet; CERQUEIRA, Gustavo C.; BRANCHE, Carole; HAAS, Brian; ANUPAMA, Atashi; ARNER, Erik; ÅSLUND, Lena; ATTIPOE, Philip; BONTEMPI, Esteban; BRINGAUD, Frédéric; BURTON, Peter; CADAG, Eithon; CAMPBELL, David A.; CARRINGTON, Mark; CRABTREE, Jonathan; DARBAN, Hamid; DA SILVEIRA, Jose Franco; DE JONG, Pieter; EDWARDS, Kimberly; ENGLUND, Paul T.; FAZELINA, Gholam; FELDBLYUM, Tamara; FERELLA, Marcela; FRASCH, Alberto Carlos; GULL, Keith; HORN, David; HOU, Lihua; HUANG, Yiting; KINDLUND, Ellen; KLINGBEIL, Michele; KLUGE, Sindy; KOO, Hean; LACERDA, Daniela; LEVIN, Mariano J.; LORENZI, Hernan; LOUIE, Tin; MACHADO, Carlos Renato; MCCULLOCH, Richard; MCKENNA, Alan; MIZUNO, Yumi; MOTTRAM, Jeremy C.; NELSON, Siri; OCHAYA, Stephen; OSOEGAWA, Kazutoyo; PAI, Grace; PARSONS, Marilyn; PENTONY, Martin; PETTERSSON, Ulf; POP, Mihai; RAMIREZ, Jose Luis; RINTA, Joel; ROBERTSON, Laura; SALZBERG, Steven L.; SANCHEZ,

Daniel O.; SEYLER, Amber; SHARMA, Reuben; SHETTY, Jyoti; SIMPSON, Anjana J.; SISK, Ellen; TAMMI, Martti T.; TARLETON, Rick; TEIXEIRA, Santuza; VAN Aken, Susan; VOGT, Christy; WARD, Pauline N.; WICKSTEAD, Bill; WORTMAN, Jennifer; WHITE, Owen; FRASER, Claire M.; STUART, Kenneth D.; ANDERSSON, Björn. (2005) **The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease.** *Science* 309(5733): 409-415

ENGLERT, Markus; BEIER, Hildburg (2005) **Plant tRNA ligases are multifunctional enzymes that have diverged in sequence and substrate specificity from RNA ligases of other phylogenetic origins.** *Nucleic Acids Research* 33(1): 388–399.

ENGLERT, Markus; SHEPPARD, Kelly; ASLANIANB, Aaron; YATES, John R.; SÖLL, Dieter. (2011) **Archaeal 3'-phosphate RNA splicing ligase characterization identifies the missing component in tRNA maturation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(4):1290-5.

ENGLERT, Markus; SHEPPARD, Kelly; GUNDLLAPALLI, Sarath, BEIER, Hildburg; SÖLL, Dieter. (2010) ***Branchiostoma floridae* has separate healing and sealing enzymes for 5'-phosphate RNA ligation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(39):16834-9.

Estrutura do tRNA. Disponível em:

<<http://www.iop.vast.ac.vn/theor/conferences/smp/1st/kaminuma/UCSFComputerGraphicsLab/trna.html>>. Acesso em: 15 de dezembro de 2011.

Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP – Brasil. Disponível em:

<www.finep.gov.br/imprensa/revista/edicao6/inovacao_em_pauta_6_doencas_negl.pdf>. Acessado em 8 de maio de 2011.

FRUSCOLONI, Paolo; BALDI, Maria I.; TOCCHINI-VALENTINI Glauco P.. (2001) **Cleavage of non-tRNA substrates by eukaryal tRNA splicing endonucleases.** *EMBO reports* 2(31): 217-221

GIEGÉ, Richard; JÜHLING, Frank; PÜTZ, Joern; STADLER, Peter; SAUTER, Claude; FLORENTZ, Catherine. (2012) **Structure of transfer RNAs: similarity and variability.** *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 3(1): 37–61.

GONZALES-PERDOMO, M; ROMERO, P; GOLDENBERG, S. (1988) **Cyclic AMP and adenylate cyclase activators stimulate *Trypanosoma cruzi* differentiation.** *Exp Parasitol.* 66(2): 205-12.

GUPTA, Ramesh. (1984) ***Halobacterium volcanii* tRNAs. Identification of 41 tRNAs covering all amino acids, and the sequences of 33 class I tRNAs.** *Journal of Biological Chemistry* 259(15): 9461-71.

HANCOCK, Kathy; HAJDUK, Stephen L.. (1990) **The mitochondrial tRNAs of *Trypanosoma brucei* are nuclear encoded.** *Journal of Biological Chemistry* 265(31): 19208-15.

HEINEMANN, Ilka U.; SÖLL, Dieter; RANDAU, Lennart. (2010) **Transfer RNA processing in archaea: Unusual pathways and enzymes.** FEBS Letters 584: 303–309

HELM, Mark. (2006) **Post-transcriptional nucleotide modification and alternative folding of RNA.** Nucleic Acids Research 34(2): 721–733.

Hoare, C.A.; Wallace, F.G.. (1966) **Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology.** Nature 212: 1385-1386.

HOPPER, ANITA K.; PHIZICKY, Eric M.:(2003) **tRNA transfers to the limelight.** Genes Dev. 17(2): 162-80.

HOU, Ya-Ming; PERONA, John J.. (2010) **Stereochemical mechanisms of tRNA methyltransferases.** FEBS Lett. 584(2): 278-86.

HUR, Sun; STROUD, Robert M.; FINER-MOORE, Janet. (2006) **Substrate recognition by RNA 5-methyluridine methyltransferases and pseudouridine synthases: a structural perspective.** Journal of Biological Chemistry 281(51):38969-73.

International Human Genome Sequencing Consortium (2001) **Initial sequencing and analysis of the human genome.** Nature. 2001 Feb 15;409(6822):860-921. Erratum in: Nature 2001 Aug 2;412(6846):565. Nature 2001 Jun 7;411(6838):720.

ITAYA, Taisuke; KANAI, Tae; SAWADA, Takehiko. (2002) **Structure of wyosine, the condensed tricyclic nucleoside of torula yeast phenylalanine transfer ribonucleic acid.** Chemical & Pharmaceutical Bulletin **50(4): 547-8.**

JAKUBOWSKI, Hieronim (2011) **Quality control in tRNA charging.** Wiley Interdiscip Rev RNA Nov 17.

JOHANSSON, Marcus J.; BYSTRÖM, Anders S.. (2002) **Dual function of the tRNA(m(5)U54)methyltransferase in tRNA maturation.** RNA 8(3): 324-35.

KATO, Miyuki; SHIROUZU, Mikako; TERADA, Takaho; YAMAGUCHI, Hiroto; MURAYAMA, Kazutaka; SAKAI, Hiroaki; KURAMITSU, Seiki; YOKOYAMA, Shigeyuki. (2003) **Crystal Structure of the 20-50 RNA Ligase from *Thermus thermophilus* HB8.** J. Mol. Biol. (2003) 329, 903–911

KUEPFER, Irene; HHARY, Emma Peter; ALLAN, Mpairwe; EDIELU, Andrew; BURRI, Christian; BLUM, Johannes A.. (2011) **Clinical Presentation of *T.b. rhodesiense* Sleeping Sickness in Second Stage Patients from Tanzania and Uganda.** PLoS Negl Trop Dis 5(3): e968.

LAKE, James A.; Beeman, W.W.. (1967) **Yeast transfer RNA: a small-angle x-ray study.** Science 156(3780): 1371-3.

LEWIN, Benjamin. (2004) **Genes VIII.** Pearson Prentice Hall. Pearson Education, Inc. Upper Saddle River, NJ, USA.

LIVAK, Kenneth J ., Schmittgen Thomas D. (2001) **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)).** Methods 25(4):402-8.

LOWE, Todd M.; EDDY, Sean R.. (1997) **tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence.** Nucleic Acids Research 25(5):955-64.

LUND, Elsebet; DAHLBERG, James E.. (1998). **Proofreading and Aminoacylation of tRNAs Before Export from the Nucleus.** Science 282: 2082-2085.

MACKIE, Percival. (1915) **Tartar Emetic in Kala-azar.** The British Medical Journal 2(2864): 745.

MALTEZOU, Helena C.. (2010) **Drug Resistance in Visceral Leishmaniasis.** Journal of Biomedicine and Biotechnology 2010:617521.

MARAIA, Richard J.; LAMICHHANE, Tek N. (2011) **3' processing of eukaryotic precursor tRNAs.** Wiley Interdiscip Review RNA 2(3): 362-375.

MARCONDES, M; BIONDO AW, GOMES AA, SILVA AR, VIEIRA RF, CAMACHO AA, QUINN J, CHANDRASHEKAR R. (2011) **Validation of a *Leishmania infantum* ELISA rapid test for serological diagnosis of *Leishmania chagasi* in dogs.** Vet Parasitol. 175(1-2):15-9.

MOLINARO, Mario; SHEINER, Lewis B.; NEELON, Francis A.; CANTONI, GIULIO L.. (1968) **Effect of Chemical Modification of Dihydrouridine in gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*.** Molecular and Biochemical Parasitology 99: 89–101.

MOTTRAM, Jeremy C.; BELL, Stephen D.; NELSON, Richard G.; BARRY, J. David (1991) **tRNAs of *Trypanosoma brucei*.** Unusual Gene Organization and Mitochondrial Importation. The Journal of Biological Chemistry 266(27): 18313-18317.

MUELLER, Eugene G.; PALENCHAR, Peter M.; BUCK, Christopher J. (2001). **The Role of the Cysteine Residues of Thil in the Generation of 4-Thiouridine in tRNA.** The Journal of Biological Chemistry 276(36): 33588–33595.

National Human Genome Research Institute – National Institutes of Health – NIH – Disponível em: <www.genome.gov/27531964>. Acessado em: 15 de outubro de 2011.

OLIVEIRA, Luiz F.; SCHUBACHA, Armando O., MARTINS, Maria M., PASSOS, Sônia L.; OLIVEIRA, Raquel V.; MARZOCHIA, Mauro C.; ANDRADE, Carlos A. Andrade. (2011) **Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World.** Acta Tropica 118: 87–96.

PADILLA-MEJÍA, Norma E.; FLORENCIO-MARTÍNEZ, Luis E.; FIGUEROA-ANGULO, Elisa E.; MANNING-CELA, Rebeca G.; HERNÁNDEZ-RIVAS, Rosaura;

MYLER, Peter J.; MARTÍNEZ-CALVILLO, Santiago. (2009) **Gene organization and sequence analyses of transfer RNA genes in Trypanosomatid parasites.** BMC Genomics,10:232.

PAUSHKIN, Sergey V.; PATEL, Meenal; FURIA, Bansri S.; PELTZ, Stuart W.; TROTTA, Christopher R. (2004) **Identification of a Human Endonuclease Complex Reveals a Link between tRNA Splicing and Pre-mRNA 3'End Formation.** Cell 117: 311-321.

PAYS, Etienne; VANHOLLEBEKE, Benoit; VANHAMME, Luc; PATURIAUX-HANOCQ, Françoise; NOLAN, Derek P.; PEREZ-MORGA, David. (2006) **The trypanolytic factor of human serum.** Nat Rev Microbiol. 4(6):477-86.

PERKINS, Karen K.; FURNEAUX, Henry; HURWITZ, Jerard. **Isolation and characterization of an RNA ligase from HeLa cells.** Proceedings of the National Academy of Sciences 82: 684-688.

PFAFFL, Michael W.. (2001) **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** Nucleic Acids Research 29(9):e45.

PHIZICKY, Eric M.; HOPPER, Anita K. (2010) **tRNA biology charges to the front.** Genes Dev 24:1832-1860.

PHIZICKY, Eric M.; SCHWARTZ, Richard C.; ABELSON, John. (2005) **Saccharomyces cerevisiae tRNA Ligase.** Purification of the protein and isolation of the structural gene. The Journal of Biological Chemistry 261(6) 2978-2986.

PLOS Neglected Tropical Diseases. Disponível em:
<<http://www.plosntds.org/static/scope.action>>. Acessado em: 9 de maio de 2011.

POPOW, Johannes; ENGLERT, Markus; WEITZER, Stefan; SCHLEIFFER, Alexander; MIERZWA, Beata; MECHTLER, Karl; TROWITZSCH, Simon; L.WILL, Cindy; LÜHRMANN, Reinhard; SÖLL, Dieter; MARTINEZ, Javier. (2011) **HSPC117 Is the Essential Subunit of a Human tRNA Splicing Ligase Complex.** Science 331: 760-764.

RAMIREZ, Alejandro; SHUMAN, Stewart; SCHWER, Beate. (2008) **Human RNA 5'-kinase (hClp1) can function as a tRNA splicing enzyme in vivo.** RNA 14: 1737-1745

RASSI, Anis; RASSI, Anis; MARIN-NETO, José Antonio. (2010) **Chagas disease.** Lancet 375(9723):1388-402.

REY, L. **Gaspar Vianna e a descoberta do tratamento das Leishmanioses pelos antimoniais.** Disponível em:
<www.imtsp.fm.usp.br/portal/images/stories/dmdocuments/vol04_f1/47-52.pdf>
Acessado em: 12 de maio de 2011.

REY, Luis. (2008) **Parasitologia.** Editora: Guanabara Koogan.

ROOVERS, Martine; HALE, Caryn; TRICOT, Catherine, TERNS, Michael P.; TERNS, Rebecca M.; GROSJEAN, Henri; DROOGMANS, Louis. (2006) **Formation of the conserved pseudouridine at position 55 in archaeal tRNA**. *Nucleic Acids Research*, 2006, Vol. 34, No. 15 4293–4301

ROZENSKI, Jef; CRAIN, Pamela F.; MCCLOSKEY, James A.. (1999) **The RNA Modification Database: 1999 update**. *Nucleic Acids Research* 27(1): 196-197.

RUBIO, Mary Anne T.; HOPPER, Anita K.. (2011) **Transfer RNA travels from the cytoplasm to organelles**. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2(6):802-17.

SALGIA, Shilpa R., SINGH, Sanjay K.; GURHA, Priyatansh; GUPTA, Ramesh. (2003) **Two reactions of *Haloflex volcanii* RNA splicing enzymes: Joining of exons and circularization of introns**. *RNA* 9:319–330.

SAMBROOK, Joseph; RUSSELL, David. (2001). **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory 3^a edição

SARKAR, Avijit; SAHA, Piu; MANDAL, Goutam; MUKHOPADHYAY, Debanjan; ROY, Susmita; SINGH, Sunny Kumar; DAS, Sukhen; GOSWAMI, R. P.; SAHA, Bibhuti; KUMAR, Deepak; DAS, Padma; CHATTERJEE, Mitali. (2011) **Monitoring of Intracellular Nitric Oxide in Leishmaniasis: Its Applicability in Patients with Visceral Leishmaniasis**. *Cytometry Part A* 79A: 35-45.

SAWAYA, Rana; SCHWER, Beate; SHUMAN, Stewart (2005) **Structure-function analysis of the yeast NAD⁺-dependent tRNA 2'-phosphotransferase Tpt1**. *RNA* 11: 107-113

SCHIMMEL, Paul. (1987) **AMINOACYL tRNA SYNTHETASES: GENERAL SCHEME OF STRUCTURE-FUNCTION RELATIONSHIPS IN THE POLYPEPTIDES AND RECOGNITION OF TRANSFER RNAs**. *Ann. Rev. Biochem.* 56:125-58.

SCHNEIDER, André; MCNALLY, Karen Perry; AGABIAN, Nina. (1993) **Splicing and 3'-Processing of the Tyrosine tRNA of *Trypanosoma brucei***. *The Journal of Biological Chemistry* 268(29): 21868-21874.

SCHWARTZ, Richard C.; GREERS, Chris L.; GEGENHEIMERT, Peter; ABELSON, John. (1983) **Enzymatic Mechanism of an RNA Ligase from Wheat Germ**. *The Journal of Biological Chemistry* 258(13): 8374-8383.

SCHWEDE, Angela; JONES, Nicola; ENGSTLER, Markus; CARRINGTON, Mark. (2011) **The VSG C-terminal domain is inaccessible to antibodies on live trypanosomes**. *Molecular & Biochemical Parasitology* 175: 201–204

SCHWER, Beate; ARONOVA, Anna; RAMIREZ, Alejandro; BRAUN, Peter; SHAPIRO, Theresa A. (1993) **Kinetoplast DNA maxicircles: Networks within networks**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90: 7809-7813.

SHI, Huafang; DJIKENG, Appolinaire; MARK, Tomer ; WIRTZ, Elizabeth ;

SHIKANAI-YASUDA, M. A. e CARVALHO, N. B. (2012) **Oral Transmission of Chagas Disease**. Clin Infect Dis.

SHUMAN, Stewart. (2008) Mammalian 2',3' cyclic nucleotide phosphodiesterase (CNP) can function as a tRNA splicing enzyme in vivo. RNA 14: 204-210

SIENKIEWICZ, Natasha; JAROSŁAWSKI, Szymon; WYLLIE, Susan; FAIRLAMB, Alan H..(2008) **Chemical and genetic validation of dihydrofolate reductase–thymidylate synthase as a drug target in African trypanosomes**. Molecular Microbiology 69(2): 520–533.

SIMARRO, Pere P.; DIARRA, Abdoulaye; POSTIGO, Jose A. Ruiz; FRANCO, Jose R.; JANNIN, Jean G. (2011) **The Human African Trypanosomiasis Control and Surveillance Programme of the World Health Organization 2000–2009: The Way Forward**. PLoS Negl Trop Dis.5(2):e1007.

SIMPSON, Larry; SHAW, Janet. (1989) **RNA editing and the mitochondrial cryptogenes of kinetoplastid protozoa**. Cell. 57(3): 355-66.

SOBALA, Andrew; HUTVAGNER, Gyorgy. (2011) **Transfer RNA-derived fragments: origins, processing, and functions**. Wiley Interdiscip Rev RNA 2(6): 853-62.

SPINELLI, Sherry L.; MALIK, Harmit S.; CONSAUL, Sandra A.; PHIZICKY, Eric M. (1998) **A functional homolog of a yeast tRNA splicing enzyme is conserved in higher eukaryotes and in *Escherichia coli*** Proceedings of the National Academy of Sciences 95: 14136–14141.

SU, A.A.H.; RANDAU, L. (2011) **A-to-I and C-to-U Editing within Transfer RNAs**. Published in Russian in Biokhimiya 76(8): 1142-1148.

SUBRAMANIAM, Chandra; VEAZEY, Paul; REDMOND, Seth; HAYES-SINCLAIR, Jamie; CHAMBERS, Emma; CARRINGTON, Mark; GULL, Keith; MATTHEWS, Keith; HORN, David; FIELD, Mark C.. (2006) **Chromosome-Wide Analysis of Gene Function by RNA Interference in the African Trypanosome**. Eukariotic Cell 5(9): 1539–1549.

TAN, Timothy H. P.; PACH, Roland; CRAUSAZ, Anne; IVENS, AI; SCHNEIDER André. (2002) **tRNAs in *Trypanosoma brucei*: Genomic Organization, Expression, and Mitochondrial Import**. Molecular and Cellular Biology 22(11): 3707–3716.

TANAKA, Naoko; MEINEKE, Birthe; SHUMAN, Stewart. (2011) **RtcB, a novel RNA ligase, can catalyze tRNA splicing and *HAC1* mRNA splicing *in vivo***. J Biol Chem. 286(35): 30253-7.

TSCHUDI, Christian ; ULLU, Elisabetta. (2000). **Genetic interference in *Trypanosoma brucei* by heritable and inducible double-stranded RNA.** RNA 6:1069–1076.

The RNA Modification Database - University of Utah – Utah, USA. Disponível em: <<http://rna-mdb.cas.albany.edu/RNAmods/rnaover.htm>>. Acessado em: 19 de dezembro de 2011.

TOCCHINI-VALENTINI, Giuseppe; FRUSCOLONI, D. Paolo; TOCCHINI-VALENTINI, Glauco P.. (2005) **Structure, function, and evolution of the tRNA endonucleases of Archaea: An example of subfunctionalization.** Proceedings of the National Academy of Sciences 102(25):8933-8.

TOCCHINI-VALENTINI, Giuseppe; FRUSCOLONI, D. Paolo; TOCCHINI-VALENTINI, Glauco P.. (2009) **Processing of multiple-intron-containing pretRNA.** Proceedings of the National Academy of Sciences 106(48):20246-51.

TrypsRU Home - The Rockefeller University - New York, NY, USA. Disponível em: <tryps.rockefeller.edu>. Acessado em: 12 de novembro de 2011.

TrypsRU Home - The Rockefeller University - New York, NY, USA. Disponível em: <http://tryps.rockefeller.edu/trypsru2_plasmids.html>. Acessado em: 12 de novembro de 2011.

TSCHUDI, Christian; DJIKENG, Appolinaire; SHI, Huafang; ULLU, Elisabetta. (2003) **In vivo analysis of the RNA interference mechanism in *Trypanosoma brucei*.** Methods 30: 304–312

ULLU, Elisabetta; DJIKENG, Appolinaire; SHI, Huafang; TSCHUDI, Christian. (2002) **RNA interference: advances and questions.** Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 357: 65–70

ULLU, Elisabetta; TSCHUDI, C.; CHAKRABORTY, Tirtha. (2004) **RNA interference in protozoan parasites.** Cellular Microbiology 6(6): 509–519.

URBINA, Julio A.. (2010) **Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches.** Acta Tropica 115: 55–68.

URECH, Karin; NEUMAYR, Andreas; BLUM, Johannes. (2011) **Sleeping sickness in travelers - do they really sleep?** PLoS Negl Trop Dis. 5(11):e1358.

VILLA, Tereza Cristina Scatena. (2009) **Research strategies for controlling neglected diseases: collaborative network projects in nursing.** Rev Latino-am Enfermagem 17(4): 439-40.

VINAYAK, M.; PATHAK, C..(2009) **Queuosine modification of tRNA: its divergent role in cellular machinery.** Biosci Rep. 30(2):135-48.

WANG, Li Kai; SCHWER, Beate; ENGLERT, Markus; BEIER, Hildburg; SHUMAN, Stewart. (2006) **Structure–function analysis of the kinase-CPD domain of yeast tRNA ligase (Trl1) and requirements for complementation of tRNA splicing by a plant Trl1 homolog.** *Nucleic Acids Research* 34(2): 517–527

WANG, Li Kai; SHUMAN, Stewart. (2005) **Structure-function analysis of yeast tRNA ligase.** *RNA* 2005 11: 966-975

WANG, Zefeng ; MORRIS, James C.; DREW, Mark E.; ENGLUND, Paul T.. (2000) **Inhibition of *Trypanosoma brucei* gene expression by RNA interference using an integratable vector with opposing T7 promoters.** *Journal of Biological Chemistry* 275: 40 174–40 179.

WATANABE, Kimitsuna ; YOKOBORI, Shin-ichi. (2011) **tRNA Modification and Genetic Code Variations in Animal Mitochondria.** *J Nucleic Acids*. 2011:623095.

WIRTZ, Elizabeth; LEAL, Simone; OCHATT, Claudia; CROSS, George A. M.. (1999) **A tightly regulated inducible expression system for conditional**

World Health Organization – WHO. Disponível em:
<whqlibdoc.who.int/hq/2007/who_cds_ntd_2007.3_eng.pdf> . Acessado em 10 de maio de 2011.

World Health Organization – WHO. Disponível em:
<www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index.html> . Acessado em 10 de maio de 2011.

World Health Organization – WHO. Disponível em:
<www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> . Acessado em 10 de maio de 2011.

World Health Organization – WHO. Disponível em:
<www.who.int/trypanosomiasis_african/en/>. Acessado em 10 de maio de 2011.

XU, Qi; TELOW, David ; LEE, Terry D.; ABELSON, John. (1990) **Domain Structure in Yeast tRNA Ligase.** *Biochemistry* 29: 6 132-6 138.

Yeast Transfer Ribonucleic Acid on Amino Acid Acceptor Activity and Ribosomal Binding. *The Journal of Biological Chemistry* 243(6): 1277-1282.

YU, Futao; TANAKA, Yoshikazu; YAMASHITA, Keitaro; SUZUKI, Takeo; NAKAMURA, Akiyoshi; HIRANO, Nagisa; SUZUKI, Tsutomu; YAO, Min; TANAKA, Isao. (2011) **Molecular basis of dihydrouridine formation on tRNA.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(49):19593-8.

ZOFALLOVA, Libuse; GUO, Yuhong; GUPTA, Ramesh. (2000) **Junction phosphate is derived from the precursor in the tRNA spliced by the archaeon *Haloferax volcanii* cell extract.** *RNA* 6:1019–1030.