

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

INSTITUTO OSWALDO CRUZ  
Pós Graduação em Biologia Parasitária

NATHALIA PINHO DE SOUZA

**Comparação dos transcritos gênicos sob tensão físico-  
química entre *Trypanosoma cruzi* CL-Brener e um  
tripanossomatídeo monoxênico**

Dissertação apresentada ao  
Instituto Oswaldo Cruz como parte  
dos requisitos para obtenção do  
título de Mestre em Ciências.

**Orientador:** Adeílton Alves Brandão, D.Sc

Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas

Rio de Janeiro

2011

INSTITUTO OSWALDO CRUZ  
Pós Graduação em Biologia Parasitária

**Comparação dos transcritos gênicos sob tensão físico-  
química entre *Trypanosoma cruzi* CL-Brener e um  
tripanossomatídeo monoxênico**

Apresentada por:

**Nathalia Pinho de Souza**

**Orientador:** Adeílton Alves Brandão, D.Sc

**Aprovada em: 02 / 05 / 2011**

**Banca Avaliadora:**

Dra. Cláudia Masini d'Ávila Levy (IOC – FIOCRUZ) - Presidente

Dra. Patrícia Cuervo Escobar (IOC – FIOCRUZ)

Dr. Cristiano Valentim da Silva Lazoski (UFRJ)

Dr. José Batista de Jesus (UFSJ)

Dr. Antônio Basílio de Miranda (IOC – FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 02 de Maio 2011

*Ao meu Pai (meu melhor amigo e  
incentivador) e a minha Mãe (eterna).*

## Agradecimentos

Ao **Dr. Adeílton Brandão**, que foi ao longo desses dois anos de trabalho e convivência além de um surpreendente orientador, um amigo. Admiro sua sabedoria, competência e comprometimento com a ciência. Sua ciência de hipóteses instigantes, cheia de perguntas que nos impulsionam a ter cada vez mais prazer pelo que buscamos, pela ciência, sem distinção se básica ou aplicada, mas sim em seu caráter mais completo. Obrigada por me fazer questionar mais e mais e a querer fazer ciência com todos os riscos implicados no caminho às respostas.

A todos do **LipMed**, Dário Kalume, Nédia Nehme, Tainah Galdino, Mariângela Ziccardi, Franklyn Samudio, Simone Santos, Elisabeth Sanchez, Carla Sodré, Cátia Sodré, Aline Volot o, David Provance “Bill”, as “Malaretas” Juliana, Vivian, Grazi, e os ex-LipMeds, Nathalia Motta, Daniel Maia, Tarsis Brust e Josué Marcelo, que me receberam com todo carinho e aten o. Pelo auxílio dentro do laboratório no dia-a-dia, pela paciência e companheirismo. E pelas risadas diárias dentro ou fora do laboratório.

A minha turma “Mara” da Biologia Parasitária de 2009, que não poderia ter sido mais especial! Victor Pimentel, Nathália Daflon, Renata Tourinho, Daiana Perce, Raquel Ferraz, Priscila Viana, Lilian Carvalho, Renato Júnior, André Veloso, Elisângela Madureira, muito orgulho de todos vocês!

A todos do **IOC** que me apoiaram ao longo desses anos, em especial aos amigos que fiz dentro da Institui o, que alegraram os dias de aula e de trabalho.

A toda a equipe da Plataforma de Seqüenciamento de DNA - PDTIS/FIOCRUZ.

A Secretaria de Ensino do IOC e a coordena o da Pós Gradua o da Biologia Parasitária.

Aos membros da banca examinadora, por fazerem parte da avalia o e encerramento deste trabalho.

Ao Gentil Arthur Vasconcellos, biomédico veterano e amigo que foi o grande responsável pela iniciativa de entrar para a Biologia Parasitária e para a Fiocruz, onde me encontrei profissionalmente (da série “nada   por acaso”).

As minhas amigas de toda vida, Luana Monteiro e Silvia Sobral por serem meu apoio e minhas “válvulas de escape”.

Em especial, agradeço a toda a minha grande família, pelo apoio de sempre e para sempre! Ao meu pai, Celso e a minha mãe, Regina, pelo amor e a educação que me fizeram ser quem sou e alcançar mais esse objetivo. As minhas irmãs, Paula e Juliana, lindas e companheiras!

Por fim, agradeço ao meu namorado e amigo, Rubem Menna-Barreto, por TUDO que é, e que me completa. Pela paciência excepcional e auxílio na finalização deste trabalho.

“Nunca é tarde para tentar o desconhecido.

Nunca é tarde para ir mais além.”

Gabriele D’Annunzio

## Resumo

Os membros da família Trypanosomatidae são parasitos flagelados que podem infectar vertebrados e ou invertebrados, e de acordo com o tipo e número de hospedeiros são classificados como parasitas monoxênicos ou heteroxênicos. Neste trabalho realizamos a comparação da detecção de transcritos entre *Trypanosoma cruzi* clone CL-Brener, espécie heteroxênica, e *Blastocrithidia culicis*, como representante dos tripanossomatídeos monoxênicos, ambos submetidos a tensões físicas, químicas e nutricionais. A questão proposta é se duas espécies de tripanossomatídeos com estilos de vida distintos respondem à mesma pressão ambiental (tensão em meio de cultivo) com os mesmos genes. Para tanto foi realizado o crescimento de ambas as espécies em diferentes condições de tensão, como alterações de temperatura, variações de pH, redução de nutrientes do meio, adição de agentes químicos ao meio, entre outros. O perfil dos transcritos, obtidos, através de RT-PCR com iniciador arbitrário selecionado (RNA *fingerprinting*), foi comparado entre a condição padrão de crescimento (controle) e as condições alteradas entre as duas espécies. Com isso, foram observados comportamentos distintos dos tripanossomatídeos nas condições físicas impostas, como os extremos de temperaturas. Com esta abordagem metodológica que deve apontar os genes que mais respondem as condições de estresse nas células, obtivemos uma representação do momento transcricional dos protozoários. Foram gerados 722 ESTs após o sequenciamento de fragmentos transcritos de *T. cruzi* e *B. culicis* sob tensão, além de ESTs da condição padrão (controle) de *B. culicis*. Foi observada alta transcrição de genes de proteínas de superfície (mucinas, trans-sialidades, gp63, etc) sob tensão tanto em *T. cruzi* como *B. culicis*, além de proteínas regulatórias da expressão gênica em menor quantidade. Ambas as espécies apresentaram trans splicing de duas formas diferentes, através da utilização de sítios adicionais (AG), antes da ORF, ou splicing alternativo ao gerar transcritos internos às ORFs. Concluimos com isso que tripanossomatídeos de espécies e estilos de vida distintos compartilham apenas poucos genes quando em condições de estresse. Grande parte dos transcritos mostraram-se específicos para cada espécie.

## Abstract

The members of the family Trypanosomatidae are flagellated protozoa parasites which can infect vertebrates and invertebrates. According to the type and number of hosts they need to accomplish their life cycle, they are classified either as monoxenics or heteroxenics parasites. The goal in this work is to perform a comparative analysis of genic transcripts that have been amplified through RT-PCR in both *Trypanosoma cruzi* clone CL-Brener (heteroxenic species), and *Blastocrihthida culicis* (monoxenic species). Both species were grown under to physical, chemical and nutritional stress. We ask whether two species of trypanosomatids with distinct life styles respond to the environmental pressure (tension in culture medium) expressing the same genes. To this end, we carried out the growth of both species in different stress conditions, such as changes in temperature and in pH, nutrient content of the culture medium, addition of chemicals at maximal concentration, among others. Transcripts were generated after RT-PCR with selected arbitrary primer (RNA fingerprinting) and compared both to the standard growth condition (control) and the altered ones between the two species. Different responses were observed in the trypanosomatid physical demands, such as the extreme of temperatures. Through this methodological approach, which tends to select the most abundant genes under stress conditions, we obtained a sample of the transcription activity of protozoan. After fragment sequencing 722 ESTs were obtained under tension for *T. cruzi* and *B. culicis*. In addition ESTs in standard condition (control) for *B. culicis* were also generated. Analysis of these sequences reveal a high frequency of gene related to surface proteins (mucins, trans-sialidades, gp63, etc.) under tension in both *T. cruzi* and *B. culicis*. Transcripts of regulatory proteins were observed in small number. In both species the additional trans-splicing through the use of internal acceptor sites (AG) before the ORF, or the alternative trans-splicing using sites internal to the predicted ORF have been detected. In conclusion, trypanosomatid species with different life styles share only a few genes when they are exposed to stress and many transcripts appears to be exclusive for each species.

## Lista de Abreviaturas

- B.O.D:** demanda bioquímica de oxigênio
- BHI:** *Brain Heart Infusion*
- BLAST:** *Basic Local Alignment Search Tool*
- cDNA:** DNA complementar
- DGE:** digital gene expression
- DNA:** ácido desoxirribonucléico
- dNTP:** desoxirribonucleosídeo trifosfato
- EDTA:** ácido etileno-diamino-tetracético
- EST:** *expressed sequence tag*
- LB:** Luria Bertani
- MM:** meio mínimo
- mL:** mililitro
- μM:** micromolar
- Nt:** nucleotídeos
- OD:** densidade ótica
- ORF:** open reading frame
- pb:** pares de bases
- PCR:** *Polymerase chain Reaction*
- RNA:** ácido ribonucléico
- RNAm:** RNA mensageiro
- RT:** transcrição reversa
- S:** segundos
- SAGE:** *serial analysis of gene expression*
- SFB:** Soro Fetal Bovino
- TBE:** Tris-Borato-EDTA
- TS:** trans splicing
- uORF:** *upstream open reading frame*
- UTR:** *untranslated region*; região não traduzida

## Índice de Figuras e Tabelas

	Página
<b>Figura 1.1:</b> Principais formas evolutivas presentes em tripanossomatídeos -----	3
<b>Figura 1.2:</b> Microscopia eletrônica de varredura da forma tripomastigota sanguínea de <i>Trypanosoma cruzi</i> -----	4
<b>Figura 1.3 :</b> Desenhos esquemáticos de <i>T. cruzi</i> -----	5
<b>Figura 1.4:</b> Ciclo evolutivo do <i>Trypanosoma cruzi</i> -----	8
<b>Figura 1.5:</b> Formas epimastigotas de <i>B. culicis</i> aderidos a lamina basal da glândula salivar de <i>Aedes aegypti</i> .-----	12
<b>Figura 1.6:</b> Esquema do RNA mensageiro maduro de tripanossomatídeos-----	16
<b>Figura 3.1:</b> Mapa ilustrativo do vetor plasmidial pCR 2.1 –TOPO®-----	36
<b>Figura 4.1:</b> Curvas de crescimento de formas epimastigotas de (A) <i>T. cruzi</i> e (B) <i>B. culicis</i> -----	39
<b>Figura 4.2:</b> Gel de agarose 1% de perfil diferencial de RNA total das duas espécies, <i>T. cruzi</i> e <i>B. culicis</i> . (PM – peso molecular; BC – <i>B. culicis</i> ; TC – <i>T. cruzi</i> )-----	42
<b>Figura 4.3:</b> Gel de agarose 1,5% da RT-PCR do teste de diferentes combinações de oligonucleotídeos arbitrários com o iniciador Mini-Exon 2 (ME2).-----	43
<b>Figura 4.4:</b> Gel de agarose 1,5% de produtos de RT-PCR de testes de combinações de oligonucleotídeos arbitrários com iniciador Mini-Exon 2 (ME2), tanto com cDNAs gerados por oligo dT como com Random primers.-----	44
<b>Figura 4.5:</b> Gel de agarose 1,5% dos produtos de RT-PCR dos testes de combinações de oligonucleotídeos arbitrários com o iniciadores dT ancorados.-----	44
<b>Figura 4.6:</b> Gel de agarose 1,5% do teste de temperaturas de hibridação para RT-PCR com os diferentes combinações de oligonucleotídeos. -----	45
<b>Figura 4.7:</b> Gel de agarose 1,5% de quantificação dos RNAs extraídos nas condições de tensão de <i>T. cruzi</i> CL-Brener -----	46
<b>Figura 4.8 - A:</b> Gel de agarose 1,5% dos produtos de RT-PCR da espécie <i>T. cruzi</i> clone CL-Brener submetida a tensões físicas, químicas e nutricional. <b>B:</b> Gel de Agarose 1,5% dos produtos de RT-PCR da espécie <i>B. culicis</i> submetida a tensões físicas, químicas e nutricional -----	47
<b>Figura 4.9:</b> Gel de agarose 1,5% dos produtos da PCR colônia de seis clones.-----	48

<b>Figura 4.10:</b> Porcentagem de clones sequenciados a partir dos fragmentos amplificados por RT-PCR com iniciador arbitrário de <i>T. cruzi</i> CL-Brener obtidos de cada condição de tensão física e química -----	49
<b>Figura 4.11:</b> Porcentagem de clones sequenciados a partir dos fragmentos amplificados por RT-PCR com iniciador arbitrário de <i>B. culicis</i> obtidos em cada condição de tensão física e química. -----	50
<b>Figura 4.12:</b> Classificação funcional das ESTs de <i>T. cruzi</i> CL-Brener -----	51
<b>Figura 4.13:</b> Classificação das ESTs geradas de <i>B. culicis</i> . -----	52
<b>Figura 4.14:</b> Porcentagem de sequências de genes transcritos (identificados por busca BLAST- NCBI) na condição de tensão do meio BHI sem SFB. <b>A</b> – <i>T. cruzi</i> CL-Brener; <b>B</b> – <i>B. culicis</i> (BcHp: sequência hipotética de <i>B. culicis</i> ) -----	56
<b>Figura 4.15:</b> Porcentagem de sequências de genes transcritos na condição de tensão de incidência de luz fluorescente branca. <b>A</b> – <i>T. cruzi</i> CL-Brener; <b>B</b> – <i>B. culicis</i> -----	57
<b>Figura 4.16:</b> Porcentagem de sequências de genes transcritos na condição de tensão nutricional imposta pelo crescimento em Meio Mínimo (Ávila <i>et al</i> , 1983). <b>A</b> – <i>T. cruzi</i> CL-Brener; <b>B</b> – <i>B. culicis</i> . -----	58
<b>Figura 4.17:</b> Porcentagem de sequências de genes transcritos na condição de tensão de crescimento a 42 °C. <b>A</b> – <i>T. cruzi</i> CL-Brener; <b>B</b> – <i>B. culicis</i> . -----	59
<b>Figura 4.18:</b> Porcentagem de sequências de genes transcritos na condição de tensão de crescimento a 4 °C. <b>A</b> – <i>T. cruzi</i> CL-Brener; <b>B</b> – <i>B. culicis</i> . -----	60
<b>Figura 4.19:</b> Porcentagem de sequências de genes transcritos na condição de tensão de meio BHI com pH alterado para 5,0. <b>A</b> – <i>T. cruzi</i> CL-Brener; <b>B</b> – <i>B. culicis</i> . -----	61
<b>Figura 4.20:</b> Porcentagem de sequências de genes transcritos na condição de tensão de meio BHI com pH 9,0. <b>A</b> – <i>T. cruzi</i> CL-Brener; <b>B</b> – <i>B. culicis</i> . -----	62
<b>Figura 4.21:</b> Porcentagem de sequências de genes transcritos em condição de tensão de crescimento me meio BHI acrescido de Uréia 300mM (máxima concentração suportada pelo tripanosomatídeo). <b>A</b> – <i>T. cruzi</i> CL-Brener; <b>B</b> – <i>B. culicis</i> . -----	63
<b>Figura 4.22:</b> Exemplo de sítios adicionais de trans splicing AG canônicos, obtidos nas sequências geradas de crescimento sob condições de tensão física, química e nutricional. -----	<b>Erro! Indicador não definido.</b>

<b>Figura 4.23:</b> Exemplo de dois diferentes transcritos (ESTs) obtidos pela metodologia aplicada sob condições de tensão. -----	67
<b>Figura 4.24:</b> Histogramas representando o tamanho em nucleotídeos das 5'UTRs estimadas a partir das sequências das células de <i>T. cruzi</i> (A) e <i>B. culicis</i> (B) geradas sob tensão. -----	69
<b>Figura 4.25:</b> Mapeamento 5'UTR do gene hipotético do cromossomo 11 de <i>T. cruzi</i> CL-Brener-----	70
<b>Figura 4.26:</b> Mapeamento da 5'UTR do gene hipotético de 1443 pb de <i>T. cruzi</i> CL-Brener-----	71
<b>Tabela 3.1:</b> Lista dos agentes químicos adicionados ao meios de cultura BHI para crescimento das células sob tensão química e suas principais funções em células eucariotas.-----	30
<b>Tabela 3.2:</b> Lista dos oligonucleotídeos arbitrários testados:-----	33
<b>Tabela 4.1:</b> Condições de tensão físico-química impostas às culturas de <i>T. cruzi</i> CL-Brener e <i>B. culicis</i> , visualizadas ao microscópio óptico e comparadas visualmente ao controle realizado.-----	41
<b>Tabela 4.2:</b> Concentrações máximas dos agentes químicos suportadas pelas espécies <i>T. cruzi</i> CL-Brener e <i>B. culicis</i> . -----	41
<b>Tabela 4.3:</b> Lista de genes cujos transcritos foram detectados em <i>T. cruzi</i> e <i>B. culicis</i> nas condições de tensão físicas, químicas e nutricionais. -----	53
<b>Tabela 4.4:</b> Identificação e caracterização dos sítios adicionais de trans splicing em sequências de <i>T. cruzi</i> CL-Brener.-----	66
<b>Tabela 4.5:</b> Identificação e caracterização dos sítios adicionais de trans splicing em sequências de <i>B. culicis</i> .-----	68
<b>Tabela 8.1:</b> Lista de genes sequenciados a partir dos fragmentos do RT-PCR fingerprinting de <i>Trypanosoma cruzi</i> CL-Brener em condições de tensão físico-química. -----	96
<b>Tabela 8.2:</b> Lista de genes sequenciados a partir dos fragmentos do RT-PCR fingerprinting de <i>Blastocrithidia culicis</i> em condições de tensão físico química. -----	99

# Índice

	Página
<b>1- Introdução</b> .....	<b>i</b>
1.1 – A Família Trypanosomatidae .....	1
1.2– <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	4
1.2.1- Doença de Chagas .....	6
1.3 – <i>Blastocrithidia culicis</i> .....	9
1.4 - Origens do Parasitismo .....	13
1.5 - Organização e expressão Gênica nos Tripanossomatídeos .....	14
1.6 - Genoma dos Tripanossomatídeos .....	18
1.6.1 - Regiões não traduzidas ( <i>UTR - untranslated regions</i> ) .....	19
1.7 – Respostas ao estresse .....	22
1.8 - RNA <i>fingerprinting</i> .....	24
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>27</b>
2.1 Objetivo Geral .....	27
2.2 Objetivos Específicos .....	27
<b>3 - Materiais e Métodos</b> .....	<b>28</b>
3.1 - Cultivo dos tripanossomatídeos .....	28
3.1.1 - Meio de cultura BHI ( <i>Brain Heart Infusion</i> ) .....	28
3.2 - Estimativa do crescimento <i>in vitro</i> .....	29
3.3 - Cultivo nas condições de tensão físico-químicas .....	29
3.4 - Extração de RNA total de <i>T. cruzi</i> e <i>B. culicis</i> .....	31
3.5 - Quantificação do RNA .....	32
3.6 - Seleção dos oligonucleotídeos .....	32
3.7 - Transcrição Reversa e PCR (RT-PCR) .....	33
3.8 - Preparo de células competentes .....	35
3.9 - Clonagem .....	35
3.10 - PCR colônia .....	37
3.11 - Sequenciamento .....	38
3.12 - Análise das sequências obtidas .....	38

<b>4 - Resultados</b>	<b>39</b>
4.1 - Definição da condição de cultivo necessária para os agentes químicos e físicos induzirem tensão	39
4.2 - Otimização da metodologia de RNA <i>fingerprinting</i>	42
4.3 - Os fragmentos dos transcritos de <i>T. cruzi</i> CL-Brener e <i>B. culicis</i> , em condições normais de cultivo e sob tensão físico-química	46
4.4 - Identificação dos genes codificados por busca BLAST.	50
4.5 – Identificações de sítios adicionais de Trans splicing	64
<b>5 – Discussão</b>	<b>72</b>
<b>6 – Conclusões</b>	<b>82</b>
<b>7 - Referências Bibliográficas</b>	<b>83</b>
<b>8 - Anexos</b>	<b>96</b>

# 1- Introdução

## 1.1 – A Família Trypanosomatidae

A família Trypanosomatidae, pertencente à ordem Kinetoplastida, é composta por protozoários flagelados que contêm um complexo mitocondrial rico em DNA, organizado em maxicírculos e minicírculos, chamado cinetoplasto e localizado a base do flagelo. (Vickerman *et al*, 1976; Simpson *et al.*, 2006). Além desta, outras características podem distinguir os tripanossomatídeos dos outros protozoários, como o isolamento de enzimas glicolíticas em uma organela especial chamada glicosoma, o uso da bolsa flagelar para o tráfico de moléculas da célula e um método original de geração de microtúbulos corticais. Os tripanossomatídeos também apresentam fenômenos moleculares característicos tais como uma grande variação antigênica, o trans-splicing, a edição de RNA, e uma organização nuclear peculiar (Vickerman, 1994).

Os tripanossomatídeos parasitam os mais diversos organismos incluindo o homem. Podem ser monoxênicos ou heteroxênicos, necessitando de um ou mais hospedeiros para completarem seu ciclo, respectivamente (Wallace, 1966). Os tripanossomatídeos parecem estar aptos a adaptarem seu metabolismo energético à disponibilidade de substratos e oxigênio, e isto pode dar-lhes a capacidade de instituir novos ciclos de vida se os padrões de comportamento do hospedeiro permitirem (Vickerman, 1994).

Dentro da família em questão observamos os gêneros heteroxênicos *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Endotrypanum* e *Phytomonas*, com hospedeiros que podem ser vertebrados, invertebrados ou plantas (no caso de *Phytomonas*). Espécies destes grupos são transmitidas por insetos (vetores) para vertebrados, ou plantas e são causadoras de importantes doenças (Schaub, 1992). Os demais gêneros *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Leptomonas*, *Herpetomonas*, *Rhynchoidomonas* e *Wallaceina* (Podlipaev *et al*, 2004) são classificados como monoxênicos, parasitando insetos e outros poucos invertebrados e normalmente não são patogênicos ao homem (McGhee e Cosgrove, 1980). Geralmente são encontrados infectando

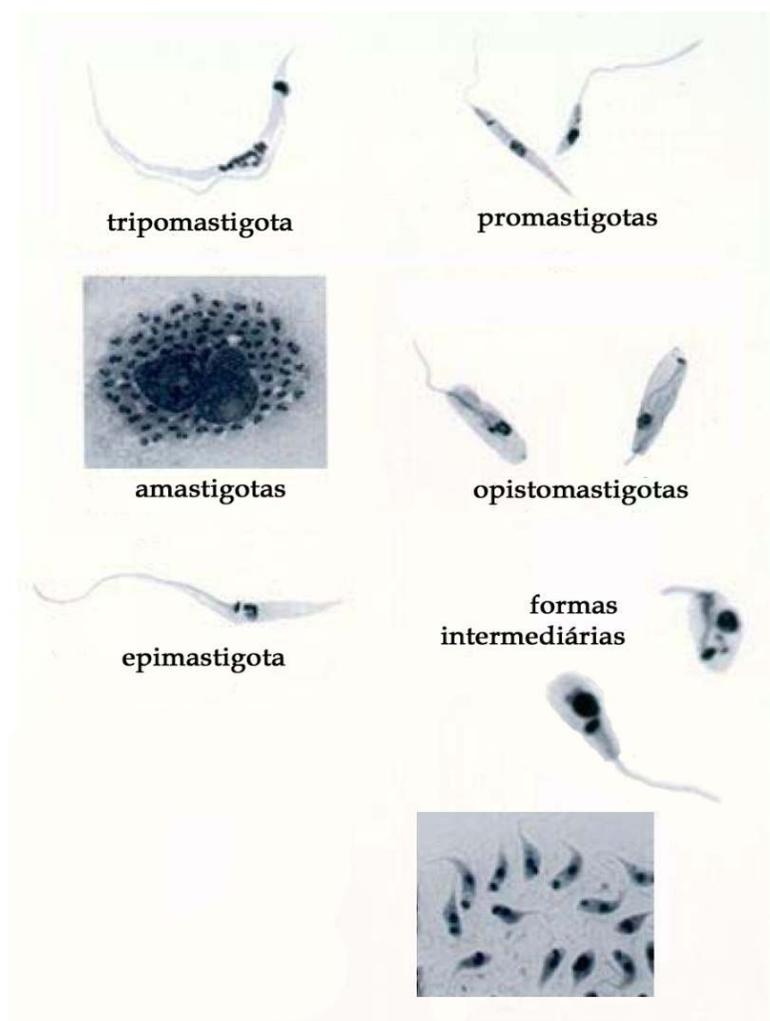
diferentes ordens de insetos como Diptera, Hemíptera e Siphonaptera (Vickerman, 1994; Podlipaev, 2001).

Os protozoários tripanossomatídeos desenvolvem-se dentro de diferentes órgãos dos insetos, como intestino médio, intestino posterior, reto, túbulos de Malpighi, glândulas salivares e alguns conseguem alcançar a hemocele. Na maioria dos casos, os tripanossomatídeos heteroxênicos não afetam seus vetores, salvo algumas exceções como *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma lewisi* e *Trypanosoma rangeli* (Schaub, 1992).

Infecções experimentais mostraram que os tripanossomatídeos monoxênicos colonizam uma grande variedade de insetos, incluindo vetores de doenças humanas. O isolamento destes flagelados de insetos sugadores de sangue tem sido reportado de *Triatoma infestans*, *Aedes vexans*, *Anopheles quadrimaculatus*, e *Culex pipiens* (Novy, MacNeal e Torrey, 1907; Correa-Da-Silva *et al.*, 2006). Em geral as espécies monoxênicas não são patogênicas para seus hospedeiros. Um exemplo do contrário acontece com *Blastocrithida triatomae*, que foi observado causando efeitos patogênicos em seu hospedeiro, *T. infestans*, importante vetor da doença de Chagas. Logo, ressaltou-se a importância dos estudos destes tripanossomatídeos monoxênicos atuando como parasitos de insetos, e assim vistos como potenciais agentes para estratégias de controle biológico do vetor (Schaub, 1988; Kollien e Schaub, 2002; Correa-Da-Silva *et al.*, 2006).

Alguns gêneros da família Trypanosomatidae possuem grande importância médica e econômica (Metzenberg e Agabian, 1994). Espécies dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* são causadores das Leishmanioses, cutânea e visceral, e das Tripanossomíases Americana (doença de Chagas) e Africana (doença do Sono), respectivamente. Com impacto econômico no Brasil, destacam-se espécies de *Phytomonas* que infectam plantas como o café e a palma (produção de óleo de palma principalmente no Pará, Amazonas, Amapá e Bahia) (Camargo, 1999). São transmitidos para as plantas na saliva de insetos fitófagos hemípteros (Insecta) e podendo causar doenças letais responsáveis pela destruição das plantações na América Central e do Sul. Espécies de *Trypanosoma* como *T. vivax* (transmitido pela mosca tsé-tsé) e *T. evansi* (transmitido por tabanídeos e sanguessugas) também possuem importância econômica ao infectar cavalos e gado no Pantanal.

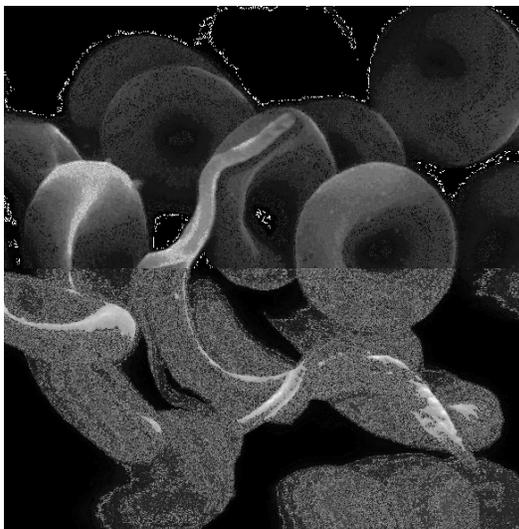
Esses parasitos flagelados não apresentam sempre o mesmo aspecto. Suas dimensões, morfologia e organização modificam-se de acordo com a fase evolutiva, com o hospedeiro (vertebrado ou invertebrado) ou com outras circunstâncias do meio. São três as principais características que definem as diferentes formas evolutivas dos tripanossomatídeos: a localização do cinetoplasto em relação ao núcleo, a presença ou ausência de membrana ondulante e o flagelo. Morfologicamente distinguem-se os seguintes tipos ou formas: amastigota, promastigota, epimastigota, tripomastigota, opistomastigota, esferomastigota e coanomastigota (Hoare e Wallace, 1966) (Fig. 1.1).



**Figura 1.1:** Principais formas evolutivas presentes em tripanossomatídeos (De Souza *et al*, 2002).

## 1.2– *Trypanosoma cruzi*

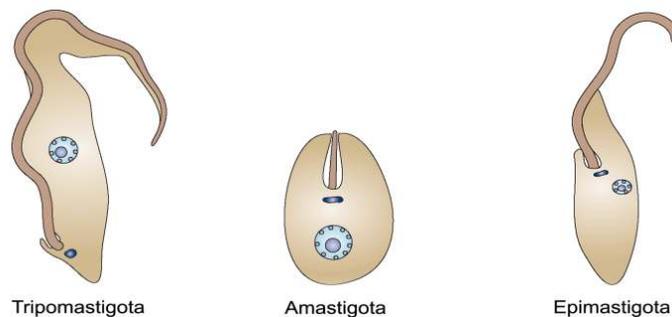
A espécie heteroxênica, *Trypanosoma cruzi* (ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Trypanosoma*, subgênero *Schizotrypanum*), caracteriza-se por apresentar as seguintes formas evolutivas: tripomastigota, epimastigota e amastigota. Tais formas podem ser identificadas através de microscopia óptica, que permite visualizar na célula, sua forma geral, seu núcleo e o cinetoplasto (DNA mitocondrial condensado), caracterizando-as de acordo com a forma da célula, a posição relativa entre o flagelo e o núcleo e a localização da bolsa flagelar (local de saída do flagelo) e do flagelo livre (De Souza, 1984) (Fig. 1.2).



**Figura 1.2:** Microscopia eletrônica de varredura da forma tripomastigota sanguínea de *Trypanosoma cruzi* (Foto de Rubem Menna-Barreto).

Assim, tripomastigotas são formas alongadas (finas ou largas), com flagelo que emerge da bolsa flagelar localizada lateralmente e adere-se ao longo do corpo do parasito tornando-se livre na região anterior. Apresenta cinetoplasto arredondado localizado na região posterior ao núcleo. Esta forma pode ser encontrada no vetor (intestino posterior e reto), nos hospedeiros vertebrados (entre as células e no sangue), células de cultura infectadas e cultivo axênico, apresentando-se altamente infectiva em todos. As formas epimastigotas são também alongadas com cinetoplasto em forma de bastão na região anterior ao núcleo, o flagelo emerge da bolsa flagelar com abertura lateral, permanece aderido a parte do corpo do parasito e torna-se livre na região anterior. Podem ser encontradas no tubo digestivo do

inseto vetor e também em cultivos axênicos. Já as formas amastigotas são arredondadas, com cinetoplasto (forma de bastão) anterior ao núcleo, apresenta flagelo curto (não visível ao microscópio óptico) que emerge da bolsa flagelar. Esta forma é encontrada no interior das células de hospedeiros vertebrados e em cultivo axênico (Fig. 1.3)



**Figura 1.3** : Desenhos esquemáticos das formas evolutivas de *T. cruzi*. Diferenças na inserção do flagelo entre as formas tripomastigota, amastigota e epimastigota (adaptado de Docampo *et al*, 2005).

Através de microscopia eletrônica (transmissão ou varredura) podemos analisar a organização celular e estrutural do parasito. Através desta análise visualizam-se estruturas comuns a maioria das células eucarióticas como núcleo, mitocôndria, retículo endoplasmático, aparelho de golgi, e principalmente aquelas peculiares e específicas dos tripanossomatídeos como o cinetoplasto, a estrutura paraflagelar, os microtúbulos subpeliculares, os reservossomos, os glicossomos e os acidocalcisomos (De Souza, 1984).

Há diferentes cepas ou linhagens do *Trypanosoma cruzi* quanto a antigenicidade, patogenicidade e composição genética. Esta diversidade populacional foi evidenciada primeiramente por isoenzimas (Miles *et al*, 1977, 1978) e mais recentemente por marcadores moleculares que distinguiram 3 grupos distintos denominados *T. cruzi* I, *T. cruzi* II e Zimodema III (Z3) (Coura, 2003). *T. cruzi* I e *T. cruzi* Z3 estariam relacionados ao ciclo de transmissão silvestre e *T. cruzi* II com o ciclo doméstico (Tibareyenc *et al*, 1986). Uma proposição recente sugere a

existência de três genomas ancestrais que estariam na origem das cepas de *T. cruzi* atualmente descritas, o que implicaria a existência de três linhagens para as populações de *T. cruzi* I, II e III (Pena *et al*, 2009). Por outro lado, outros autores propuseram que as cepas de *T. cruzi* fossem classificadas em seis grupos (DTUs – discrete type units), denominadas *T. cruzi* I a VI (Zingales *et al*, 2009).

O clone CL-Brener deriva da cepa CL de *Trypanosoma cruzi* e foi isolado pelo professor Zigman Brener e MES Pereira (Centro de Pesquisas René Rachou-Fiocruz, Belo Horizonte) do sangue de camundongos infectados com a cepa parental CL. Esta cepa apresenta todas as importantes características do parasito, pois foi isolado de *Triatoma infestans*, vetor estritamente domiciliar; se diferencia em meio líquido; tem parasitismo preferencial por células cardíacas e musculares; apresenta curvas definidas de parasitemia e mortalidade em camundongos; apresenta uma fase aguda clara em infecções humanas acidentais e é susceptível às drogas utilizadas clinicamente na doença de Chagas (Zingales B. *et al*, 1997).

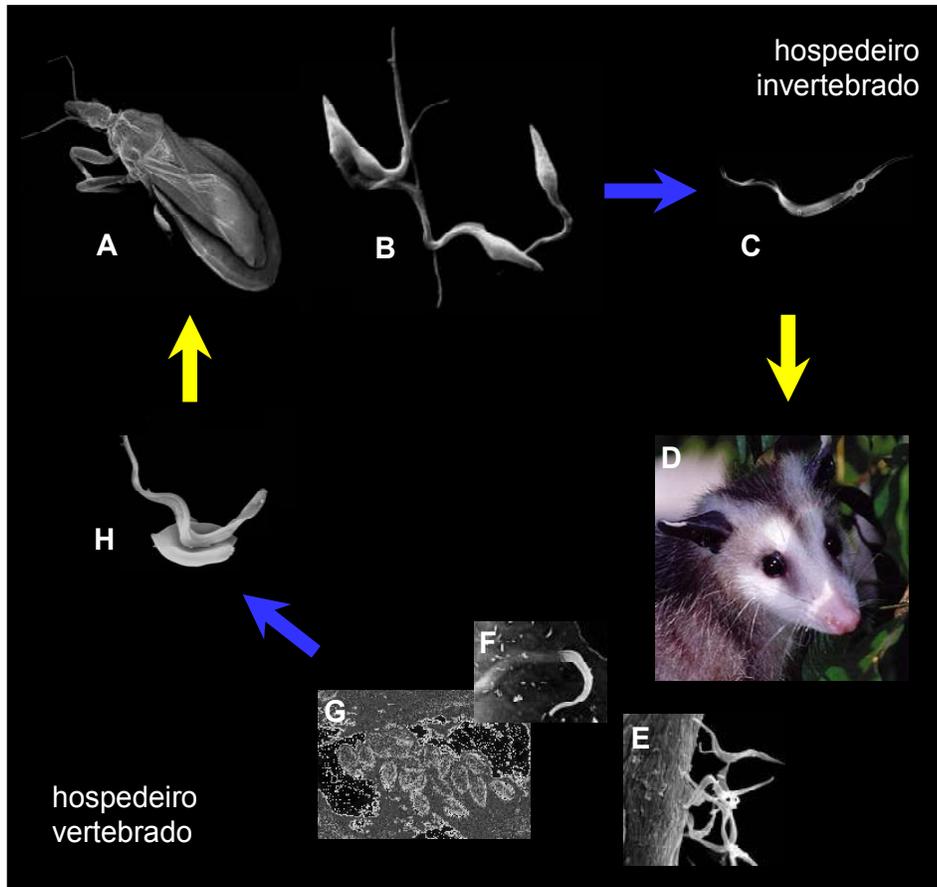
### **1.2.1- Doença de Chagas**

*Trypanosoma cruzi* adquiriu grande importância médica por ser o agente etiológico da Tripanossomíase Americana ou doença de Chagas (Chagas, 1909; Brener, Andrade e Barral-Netto, 2000). Doença esta que atinge, como estimado pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2010), 10 milhões de pessoas em todo o mundo principalmente em países da América Latina onde a doença de Chagas é endêmica. Aproximadamente 25 milhões estão sob risco de contrair a doença, que somente no ano de 2008 levou mais de 10.000 pessoas a óbito.

Originalmente uma zoonose ou enzootia de animais silvestres, a doença de Chagas passou a ser considerada uma antropozoonose quando os vetores começaram a habitar o domicílio e peridomicílio do homem. Esse processo de adaptação ocorreu pela necessidade do triatomíneo vetor de se alimentar, como também pelas suas mutações ao longo do tempo. O processo foi agravado ainda mais pelo desmatamento e diminuição dos animais silvestres, quando os triatomíneos passaram a alimentar-se do homem e de seus animais domésticos (Vinhaes e Dias, 2000).

Por ser um flagelado heteroxênico, *T. cruzi* circula em hospedeiros vertebrados, mamíferos silvestres ou domésticos, como primatas não humanos, gambá, quati, cachorro-do-mato, tatu, roedores, gato, cão e porco domésticos. Estes organismos servem também como reservatórios do parasito, sendo assim maior a dificuldade de erradicação total da doença de Chagas, principalmente por aqueles animais que coabitam ou estão muito próximos do homem. Como vetores encontramos os triatomíneos membros da família Triatominae (Hemiptera: *Reduviidae*), conhecidos genericamente por triatomíneos e popularmente como barbeiro, chupão ou procotó. De 120 espécies descritas nesta família, 30 já foram capturadas e identificadas no domicílio e peridomicílio humano no Brasil. Dessas espécies, 5 têm especial importância na transmissão da doença ao homem: *Triatoma infestans*, *T. brasiliensis*, *Panstrongylus megistus*, *T. pseudomaculata* e *T. sordida*. Tais vetores, por serem hematófagos, se infectam ao sugar sangue de pessoas ou animais infectados, assim, parte do ciclo de vida deste protozoário ocorre no triatomíneo e a outra parte no hospedeiro vertebrado infectado (Brener, Andrade e Barral-Netto, 2000).

O ciclo biológico inicia-se com o repasto sanguíneo do triatomíneo em um hospedeiro mamífero infectado, onde ingere formas tripomastigotas sanguíneas. A primeira diferenciação ocorre então no intestino do vetor no qual os tripomastigotas do sangue transformam-se em epimastigotas, forma não infectiva e replicativa do parasito que se divide por fissão binária ao longo do tubo digestivo. Do intestino posterior até o reto do vetor ocorre o processo da metaciclogênese, onde as formas epimastigotas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos, provavelmente devido a estímulos ambientais como a redução de nutrientes disponíveis. Estas são as formas infectantes que serão eliminadas junto com as fezes do vetor durante o repasto sanguíneo no próximo hospedeiro. Ao entrar em contato com a corrente sanguínea do vertebrado através de descontinuidades da pele ou mucosas, invadem macrófagos e diferentes células nas quais se diferenciam em formas amastigotas. Estas formas intracelulares replicativas irão se multiplicar até romper a célula e liberar, novamente para a corrente sanguínea, parasitos diferenciados em tripomastigotas sanguíneos, forma infectante para outras células e para o vetor (Fig. 1.4) (De Souza, 1984)



**Figura 1.4:** Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi* - No hospedeiro invertebrado **(A)** formas epimastigotas **(B)** se multiplicam no lúmen do intestino. Diferenciação para tripomastigotas metacíclicos **(C)** ocorre na porção final do intestino. Estas formas infectam o hospedeiro vertebrado **(D)**. Após adesão **(E)** e penetração **(F)** nas células hospedeiras, os tripomastigotas se diferenciam em amastigotas multiplicativos **(G)**. após diferenciação e liberação de tripomastigotas sangüíneos **(H)**, estas formas podem invadir músculos e outros tecidos. O ciclo se fecha quando o indivíduo infectado é picado pelo triatomíneo **(A: Demetry C, capturado em 26/07/2005; B: Santa-Rita *et al.*, 2005; C: Vatarunakamura *et al.*, 2005; D: USP, capturado em 26/07/2005; E: Barbosa HS, capturado em 26/07/2005; F: Andrews N, capturado em 26/07/2005; G: FIOCRUZ, capturado em 25/07/2005; H: Dantas *et al.*, 2003).**

A doença pode apresentar duas fases distintas, uma fase aguda, que tem início logo após a infecção, caracterizada por alta parasitemia e colonização de tecidos, podendo ser assintomática, oligossintomática (maioria) ou sintomática. Porém, crianças menores de dois anos, e menos freqüentemente alguns adultos, podem desenvolver graves sintomas nesta fase levando ao óbito. (Tanowitz *et al.*, 1992). A fase aguda irá evoluir para a fase crônica da doença onde a grande maioria dos pacientes não apresenta sintomas ou exames clínicos alterados, denominando-se esta de forma crônica indeterminada. Entretanto, cerca de 20 a 30% dos casos podem evoluir para as formas crônicas determinadas, que se dividem em três tipos principais de doença: a forma cardíaca, com miocardite aguda, e insuficiência cardíaca; a forma digestiva, com megaesôfago e megacólon; e por último a forma mista com cardiopatia e “megas” simultaneamente (Teixeira *et al.*, 2006).

Apesar dos anos de descoberta da doença, ainda não há um tratamento ideal e este é realizado por apenas dois fármacos, nifurtimox e benzonidazol. Até o momento, somente estes dois medicamentos mostraram-se terapeuticamente eficazes contra o parasito, e mesmo assim somente na fase aguda da doença, com tempo prolongado de tratamento e apresentando muitos efeitos colaterais indesejados (Coura e Castro, 2002; Boscardin *et al*, 2010).

### **1.3 – *Blastocrithidia culicis***

Mais de 30 espécies pertencentes ao gênero *Blastocrithidia* já foram descritas, dentre elas as mais relatadas são *Blastocrithidia triatomae* e *Blastocrithidia culicis*. A espécie monoxênica *Blastocrithidia culicis* (Novy, MacNeal e Torrey, 1907), (ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Blastocrithidia*) tem sido muito estudada devido a duas características principais: a facilidade de cultivo e a presença de uma bactéria simbiótica (De Souza e Motta, 1999) em seu citoplasma. *Blastocrithidia culicis* foi originalmente isolada de *Triatoma infestans* (Novy, MacNeal e Torrey, 1907), sendo encontrada também em hospedeiros como *Aedes vexans* (Wallace e Johnson, 1961; De Sousa, 1994) e, experimentalmente, em *Aedes aegypti* (Corrêa-da-Silva *et al*, 2006).

O endossimbionte de *B. culicis* fornece aos protozoários fatores de crescimento essenciais, como aminoácidos, vitaminas e hemina (De Souza e Motta, 1999) e sua presença tem sido associada com alterações morfológicas da célula do tripanosomatídeo, como o rearranjo das fibras de DNA do cinetoplasto e a ausência de estrutura paraflagelar (Fampa *et al*, 2003). Devido à bactéria conter enzimas que preenchem ciclos metabólicos do tripanosomatídeo, estes apresentam baixa exigência metabólica, o que pode explicar sua replicação mais ativa (aproximadamente 6h), quando comparados com *Trypanosoma cruzi* que necessita de aproximadamente 24 horas para completar sua divisão celular. Em tripanossomatídeos, a possibilidade de eliminação do endossimbionte através do uso de antibióticos (cura) tem aumentado o interesse no estudo das espécies que albergam tal bactéria, pois muitas interações entre a bactéria e o protozoário podem ser analisadas pela comparação das cepas “curadas” e selvagens (D’Ávila Levy *et al*, 2009).

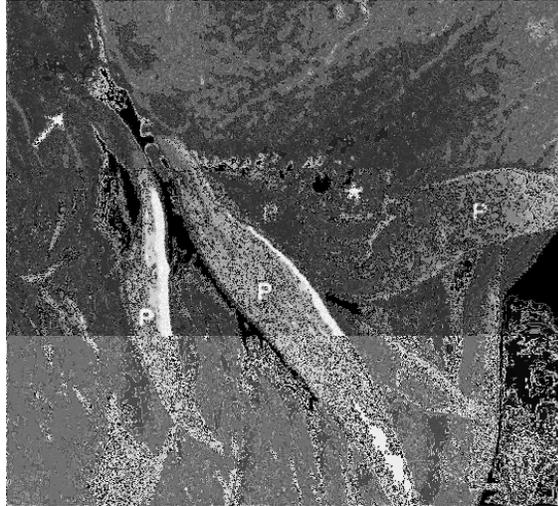
Logo, este protozoário torna-se importante modelo biológico no estudo da origem simbiótica de organelas e da evolução celular. Em geral, os tripanossomatídeos monoxênicos tem sido muito usados, como modelos para estudos bioquímicos e moleculares, pelo seu fácil cultivo e crescimento sob condições axênicas, além de apresentar fatores de virulência homólogos de tripanossomatídeos patogênicos (D’Ávila-Levy *et al*, 2005). Embora sejam filogeneticamente distantes do *Trypanosoma cruzi*, apresentam muitas características morfológicas, bioquímicas e imunológicas semelhantes a esta espécie (Manzine *et al*, 2006).

Segundo Fampa *et al* (2003), em infecções experimentais de insetos hematófagos transmissores de doenças humanas, como *Lutzomya longipalpis*, *Anopheles gambiae* e *Aedes albopictus*, *B. culicis* foi o tripanosomatídeo monoxênico que apresentou maior índice de associação com as células intestinais destes insetos. Outro dado relevante foi a redução em 55% da interação de *B. culicis* curada (sem o endossimbionte) com o intestino do inseto quando comparado com o tripanosomatídeo em seu estado natural, albergando a bactéria simbiote. Isto ocorre porque a adesão de *B. culicis* a células intestinais do inseto hospedeiro deve ser mediada em parte por carboidratos de superfície. Estudos comparativos utilizando tripanossomatídeos com o endossimbionte e suas respectivas cepas sem

o simbiote (ao tratá-los com antibióticos), revelou que a bactéria simbiótica induz uma expressão diferencial de carboidratos na superfície de seu hospedeiro, ou seja, do tripanosomatídeo monoxênico. Além disto, foi visto que aqueles com endossimbiote interagem mais com macrófagos peritoneais de ratos além de serem mais resistentes aos mecanismos de morte por macrófagos quando comparados com as cepas apossimbióticas (Rozental *et al.* 1987). Observaram também que os tripanossomatídeos com simbiote são capazes de infectar fibroblastos da derme de ratos (Santos *et al.* 2004).

Vistos juntos, estes fatos sugerem que tripanossomatídeos monoxênicos, uma vez atingindo o hospedeiro vertebrado, às vezes são capazes de sobreviver (Morio *et al.*, 2008). Dados de infecção experimental de *B. culicis* também enfatizam a grande capacidade deste protozoário de infectar insetos vetores, reforçando ainda mais a idéia de que os tripanossomatídeos monoxênicos possuem baixa especificidade parasitária (Corrêa-da-Silva, 2006). E como já foi demonstrada a colonização experimental de *B. culicis* em insetos hematófagos, inclusive de adesão do protozoário à glândula salivar dos insetos (Nascimento *et al.*, 2010), sugere-se também que vetores de transmissão de tripanossomatídeos monoxênicos possam ocorrer na natureza (Fig.1.5).

O gênero *Blastocrithidia* apresenta células tipicamente no estágio epimastigota, não sendo observado desenvolvimento além desta fase, apesar de algumas espécies mostrarem formas amastigotas como cistos flagelares. Em cultura de *B. culicis* foram evidenciadas formas tripomastigotas que podem ocorrer entre 2 - 7% (De Sousa, 1994). As formas epimastigotas de *Blastocrithidia* sp. podem ser cultivadas *in vitro* e as células medem entre 10 a 50 µm de comprimento, com flagelo flagelo de cerca de 5 a 12 µm.



**Figura 1.5:** Formas epimastigotas de *B. culicis* aderidos a lamina basal da glândula salivar de *Aedes aegypti*. Protozoa (P); dano na lamina basal (\*). Barra = 5  $\mu$ m (adaptado de Nascimento *et al*, 2010).

Apesar dos tripanossomatídeos monoxênicos nunca terem sido confirmados como patogênicos para humanos, há diversos relatos de infecções humanas com tais parasitos. Observamos na literatura casos reportados de pacientes infectados com o vírus HIV que apresentaram lesões cutâneas difusas e lesões viscerais, semelhantes à Leishmaniose, mas supostamente causadas por tripanossomatídeos monoxênicos. Casos de co-infecção HIV-*Leishmania* são comuns, porém em muitos destes o parasito encontrado diferiu isoenzimaticamente de *Leishmania* e *Trypanosoma*. (Dedet *et al*, 1995; Jimenez *et al*, 1996). O primeiro caso foi relatado em 1980, onde McGhee and Cosgrove (1980) descreveram uma possível infecção em uma mulher no Texas (EUA) por *Herpetomonas*. Em outro estudo, mais tarde, identificou-se a presença da espécie *Leptomonas pulex simulantis* de pulgas de cachorro em pacientes infectados HIV positivos (Pacheco, 1998).

É difícil explicar como humanos, imunocompetentes ou imunodeprimidos, realmente adquirem a infecção por tripanossomatídeos monoxênicos. Invertebrados geralmente tornam-se infectados ao ingerir parasitos de fezes de outros invertebrados ou ao ingerir o próprio. Parece possível que humanos também possam ser infectados por *Blastocrithidia gerridis* e *Crithidia flexonema*, parasitos de insetos da família Gerridae, que podem sobreviver na água por 48 e 30h

respectivamente e assim usuários de drogas injetáveis podem ser contaminados com esses parasitos ao usar seringas lavadas com água contaminada. Todos estes relatos reforçam a suposição de que seres humanos sob condições de imunossupressão podem ficar vulneráveis também a outros tripanossomatídeos de insetos, pois a depressão no sistema imune do paciente explicaria o parasitismo oportunista do tripanosomatídeo (Pacheco *et al*, 1998; Chicharro e Alvar, 2003).

#### **1.4 - Origens do Parasitismo**

A questão da origem e evolução do parasitismo em tripanossomatídeos tem atraído bastante atenção desde o início do século. A similaridade entre os tripanossomatídeos de insetos (monoxênicos) e aqueles de vertebrados que são transmitidos por insetos (heteroxênicos) estimulou uma série de especulações evolucionárias ao longo do tempo. As inúmeras teorias propostas e discutidas podem ser divididas em duas visões opostas que discordam quanto à natureza do hospedeiro primário (vertebrados ou invertebrados) e o tempo e modo de aquisição do ciclo biológico heteroxênico (Wallace, 1966).

Uma das hipóteses afirma que depois de inicialmente parasitar o intestino dos primeiros vertebrados aquáticos, os cinetoplastídeos ancestrais passaram a colonizar o sangue, sendo assim posteriormente passados para sanguessugas e insetos hematófagos que, por sua vez, continuaram a disseminação do parasito entre os diferentes grupos de vertebrados (aquáticos e terrestres). Esta teoria explicaria porque os tripanossomatídeos são encontrados hoje em todas as classes de vertebrados, mas preferencialmente ocorrem em grupos de invertebrados hematófagos (Wallace, 1966; Maslov *et al*, 2006).

Já a segunda hipótese propõem que os parasitos de vertebrados descendem de parasitos de insetos hematófagos e sanguessugas. Nesse modelo, o parasitismo foi originalmente estabelecido em antigos invertebrados onde esses parasitos co-evoluíram com seus hospedeiros. E ambos, insetos e sanguessugas teriam herdado seus parasitos de um ancestral comum semelhante a um anelídeo.

As duas hipóteses se mantiveram dentro do paradigma que postulava que os ciclos de vida monoxênicos deveriam preceder os ciclos heteroxênicos. No entanto,

as recentes tentativas de reconstruir a filogenia da ordem Kinetoplastida utilizando abordagens moleculares, não sustentam este paradigma. Pois viu-se que as linhagens divergentes mais antigas são representadas por dois parasitos de mamíferos heteroxênicos, *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*, enquanto os parasitos monoxênicos formam um grupo que divergiu mais recentemente. Esta topologia da árvore filogenética levou a conclusão de que os tripanossomatídeos ancestrais eram de fato heteroxênicos (Landweber *et al*, 1994). Mas o paradoxo resultante, que no tempo estimado da divergência da linhagem *Trypanosoma* da linhagem de relativa vida-livre a hematofagia ainda não havia aparecido na evolução, pode ser resolvido admitindo-se que o ciclo de vida heteroxênico dos tripanosomas ocorreu várias vezes ao longo da evolução, independentemente dos tripanossomatídeos parasitos de insetos (Maslov *et al*, 2006; Hamilton *et al*, 2007).

Considerando uma origem polifilética dos parasitos heteroxênicos, que também já foi proposta, previu-se a presença de parasitos monoxênicos de insetos como linhagens irmãs daquelas derivadas de parasitos heteroxênicos. Em termos taxonômicos específicos, linhagens de parasitos heteroxênicos *Trypanosoma*, *Leishmania* ou *Endotrypanum* deveriam ter linhagens irmãs intimamente relacionadas com gêneros parasitos de insetos como *Crithidia*, *Leptomonas* e *Herpetomonas*. No entanto linhagens irmãs de parasitos monoxênicos foram encontradas somente para *Leishmania* e *Endotrypanum*, apoiando a origem destes gêneros de parasitos monoxênicos de mosquitos. Embora a ausência de parasitos de insetos intimamente relacionados com parasitos de mamíferos como *T. cruzi* e *T. brucei*, pode ser simplesmente explicada pela origem recente de tripanosomas de mamíferos dos tripanosomas mais primitivos (Maslov *et al*, 2006).

### **1.5 - Organização e expressão gênica nos Tripanossomatídeos**

A regulação da expressão gênica nos tripanossomatídeos está sujeita às constantes mudanças de ambiente decorrentes da passagem pelos hospedeiros (no caso dos tripanossomatídeos heteroxênicos) ou mesmo diferentes características de microambiente (constituição do meio) dentro de um único hospedeiro (pH, temperatura, quantidade de nutrientes). Assim, devido à importância da expressão

de diferentes genes nas rápidas adaptações destes protozoários ao longo de sua vida, a regulação da expressão gênica é realizada por diversos fatores.

Os tripanossomatídeos apresentam uma organização gênica peculiar, que se mostra conservada nos genomas de *L. major*, *T. brucei* e *T. cruzi*. No genoma nuclear, os genes, organizados em cromossomos, são codificados (10-100) ao longo de uma mesma fita de DNA, formando conjuntos de genes (Monnerat *et al.*, 2004; Nilsson & Andersson, 2005; El-Sayed *et al.*, 2005b).

Há também um genoma mitocondrial grande e característico da ordem Kinetoplastida. O kDNA contém aproximadamente 20 a 30% do DNA total dos tripanossomatídeos e é composto por dois tipos de moléculas circulares: os maxicírculos e os minicírculos. Os maxicírculos, com tamanho entre 22-37 kb e presentes em menor quantidade de cópias na rede de kDNA contém os genes codificadores de proteínas mitocondriais e RNA ribossomal. Já os minicírculos com um tamanho variado entre espécies (0,6-5 kb), estão presentes com maior número de cópias (5.000-10.000) e são responsáveis por codificar os RNAs guias envolvidos na editoração do RNA (Shapiro e Englund, 1995).

Como os demais eucariotos os tripanossomatídeos apresentam três RNA polimerases: a RNA polimerase I responsável por transcrever os genes para RNAs ribossomais; a RNA polimerase II que transcreve os genes codificadores de proteínas e a RNA polimerase III responsável pelo RNAt (RNA de transferência) e outros pequenos RNAs. Já foram identificados promotores para RNA polimerase I e III, porém para RNA polimerase II somente o promotor relacionado ao gene do mini-exon foi identificado (Campbell *et al.*, 2003; Haile e Papadopoulou, 2007).

Assim, ao transcrever seus genes, os tripanossomatídeos geram moléculas de RNA contendo diversos genes, denominadas de unidades policistrônicas. Os genes de cada unidade transcrita não são relacionados funcionalmente e podem apresentar diferenças nos níveis de expressão, o que demonstra a importância dos mecanismos pós-transcricionais no controle da expressão gênica (Vanhamme & Pays, 1995; Teixeira e DaRocha, 2003).

Para o *T. cruzi*, assim como para os demais tripanossomatídeos, a maioria dos genes não apresenta íntrons e o processamento do RNAm ocorre através do

mecanismo de trans-splicing (Sutton & Boothroyd, 1986; Gull, 2001). Este é um processo similar ao cis-splicing (que ocorre nos demais eucariotos) entre dois precursores de RNA oriundos de diferentes loci gênicos a fim de gerar unidades monocistrônicas de RNAm prontas para serem traduzidas. Em tripanossomatídeos a principal molécula de RNA é a “spliced-leader” (SL) RNA, a qual doa sequências SL (mini-exons) para todos os RNA mensageiros através do trans splicing (Lustig *et al*, 2007). Envolve uma seqüência conservada com cerca de 39 nucleotídeos, denominada *Spliced leader* (SL) ou mini-exon que é transferido de uma extremidade 5' de um pequeno RNA (em torno de 140 nucleotídeos), para um sítio aceptor de *splice* rico em AG em outra molécula de RNA (Jager *et al*, 2007; Lustig *et al*, 2007). As moléculas de RNAm maduras nos tripanossomatídeos contêm o mini-exon na extremidade 5' e uma cauda composta por aproximadamente 30 resíduos de adenina (cauda poliA) na extremidade 3' (Fig. 1.6).

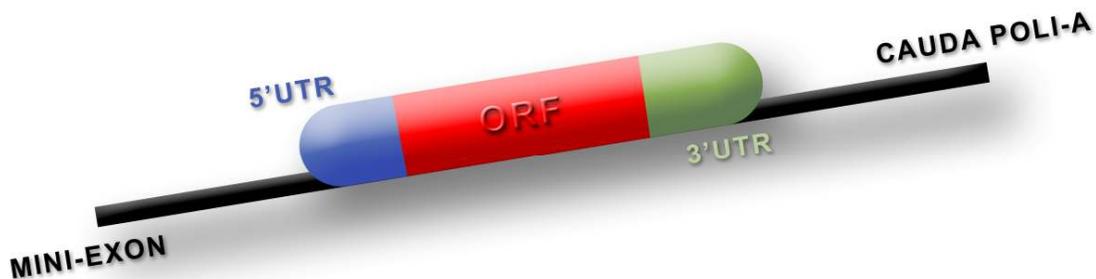


Figura 1.6: Esquema do RNA mensageiro maduro de tripanossomatídeos. ORF (Open reading Frame); UTR (Untranslated Region).

O trans splicing ocorre através de um sinal, que consiste em regiões ricas em pirimidina (trato polipirimidínico) e de sítios específicos, indicados por uma seqüência consenso AG (sítio aceptor), que irão regular a adição do mini-exon e da cauda poli-A. A adição destes elementos, por sua vez, são necessários para a estabilidade e proteção do RNAm maduro. Qualquer deleção nos sítios de trans-splicing podem impedir o correto processamento dos transcritos (Matthews *et al.*, 1994). Os tripanossomatídeos também apresentam trans-splicing alternativo, podendo ocorrer em alguns genes que possuam sítios adicionais de trans-splicing, como a presença de mais de um sítio aceptor AG no RNA, gerando assim transcritos

do mesmo gene com diferentes 5'UTR (Mayer *et al*, 2005). O mais interessante e ressaltado no estudo do trans-splicing alternativo é a geração de transcritos de tamanhos diferentes e que serão traduzidos em proteínas idênticas ou semelhantes, porém cada uma possuindo uma localização diferente na célula (Benabdella *et al*, 2007).

Esta possibilidade freqüentemente depende da escolha, mediante diferentes estímulos, entre os códons iniciadores alternativos, a presença ou ausência de uma sequência aminoterminal junto a uma maquinaria de reconhecimento de sinal, determinando assim o destino da proteína. Os mecanismos moleculares subjacentes a esta habilidade são tanto transcricionais como traducionais. Entretanto, em tripanossomatídeos a transcrição é policistrônica e a tradução é estritamente dependente do mini-exon (cap) na terminação 5' do RNAm. Conseqüentemente, para a finalidade do duplo direcionamento de uma única proteína, os tripanossomatídeos devem contar com o trans-splicing alternativo para converter RNAs policistrônicos precursores em RNAs mensageiros capeados e assim traduzíveis (Benabdella *et al*, 2007).

Observou-se também variação nas regiões não traduzidas (UTRs) do RNAm, mais exatamente na 5'UTR, devido ao uso de diferentes sítios adicionais (canônicos ou não) de trans-splicing, gerando os diferentes transcritos com 5'UTRs de tamanhos distintos. Como também a poliadenilação alternativa apresentou-se como um mecanismo para a geração da diversidade transcricional (3'UTRs de diferentes tamanhos) de um mesmo gene (Benz *et al*, 2005)

A geração de RNAs mensageiros funcionais também envolve a adição ou deleção pós-transcricional de resíduos de Uridina em um processo conhecido como edição de RNA. Este processo é mediado por pequenos RNAs, chamados de RNA guias, codificados no cinetoplasto (kDNA) (Vanhamme e Pays, 1995).

O fato de o protozoário realizar uma transcrição policistrônica, associado à presença de níveis distintos de RNAm e diferentes padrões de expressão de proteínas, ambos originados de uma mesma unidade policistrônica, reforçam a importância da regulação dos genes dos tripanossomatídeos ao nível pós-transcricional (Teixeira e Da Rocha, 2003)

## 1.6 - Genoma dos Tripanossomatídeos

Em 2001, três instituições: *The Institute for Genomic Research* (TIGR), atualmente parte do *J Craig Venter Institute*, *Seattle Biomedical Research Institute* (SBRI) e *Karolinska Institute* iniciaram um consórcio internacional para o sequenciamento do genoma completo de *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major* (*TriTryps*). A disponibilidade destes genomas permitiu uma melhor compreensão das bases genéticas e evolucionárias compartilhadas por estes patógenos (Zingales *et al*, 1997).

O genoma nuclear de *L. major* é constituído de 32,8 Mb de DNA distribuídos em 36 cromossomos relativamente pequenos que variam de tamanho entre 0,28 e 2,8 Mb. *Trypanosoma cruzi* possui um genoma maior, de 60,4 Mb organizado em 43 pequenos cromossomos, enquanto *T. brucei* apresenta genoma de apenas 26 Mb distribuídos em 11 grandes cromossomos (Martinez-Calvillo *et al*, 2010). *T. brucei*, *L. major* e *T. cruzi* possuem aproximadamente 8.100, 8.300 e 12.000 genes codificadores de proteínas respectivamente (El-Sayed *et al*, 2005b).

A publicação do genoma de *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major* mostrou que a maioria dos genes de todos os cromossomos nos tripanossomatídeos são organizados em grandes conjuntos policistrônicos de genes (PGCs). Estes são constituídos por 10 a 100 genes codificadores de proteínas dispostos sequencialmente em uma mesma fita de DNA (organizados em *tandem*), e em geral não são funcionalmente relacionados (Martinez-Calvillo *et al*, 2010).

Embora grande parte dos genes de tripanossomatídeos seja conservada (foram reveladas cerca de 6.200 proteínas essenciais presentes no genoma dos *TriTryps*), (Clayton, 2010) existem consideráveis diferenças, o que presumivelmente reflete as adaptações espécie-específicas às distintas pressões seletivas e às distintas estratégias fisiopatológicas e de sobrevivência de cada organismo (El-Sayed *et al*, 2005b).

O genoma de *T. cruzi* é referente à cepa CL-Brener por esta ser bem caracterizada experimentalmente, incluindo os trabalhos anteriores de análise do sequenciamento de ESTs (*expressed sequence tags*) de varias formas do ciclo

deste parasito (Zingales *et al.*, 1997). Demonstrou-se que *T. cruzi* apresenta um genoma com mais de 12.000 genes codificadores de proteínas, incluindo a superfamília que codifica para mucinas de superfície. Pelo menos 50% do genoma consistem em sequências repetitivas, basicamente constituídas por grandes famílias gênicas, como as proteínas de superfície, retrotransposons e repetições subteloméricas (El-Sayed *et al.*, 2005b). Somente foi possível determinar a função de 50,8% genes de *T. cruzi*, isso com base na literatura, em resultados de similaridades com proteínas já caracterizadas ou na presença de domínios funcionais característicos.

Ainda não há dados disponíveis sobre sequenciamento genômico de tripanossomatídeos monoxênicos. Apesar de já ter sido sequenciado recentemente (<http://www.culicis.Incc.br/index.php#>, 2010) o genoma de *Blastocrithidia culicis* ainda está em fase de anotação. Assim como o genoma de *Crithidia deanei*, *Trypanosoma rangeli* e outras cepas de *Trypanosoma cruzi*. Quando disponíveis estas informações serão de grande relevância no estudo de co-evolução entre o tripanossomatídeo e seu simbiote e a investigação da transferência gênica entre estes microorganismos. Além disso, o mais importante será adquirir maior conhecimento e entendimento acerca do processo evolutivo da família *Trypanosomatidae*.

A base de dados com o genoma de tripanossomatídeos monoxênicos incluídos terá como vantagem a comparação dos genes identificados, e baseado nas diferenças encontradas, elaborar uma explicação para o parasitismo das espécies heteroxênicas em vertebrados, ou seja, de onde viria sua capacidade de infecção e a patogenicidade para estes hospedeiros.

#### **1.6.1 - Regiões não traduzidas (UTR - *untranslated regions*)**

A idéia de que somente as regiões codificadoras dos RNAs interessavam alterou-se somente durante a última década quando relatos mostraram que as regiões não traduzidas do RNA (5' UTR e 3' UTR) eram capazes de regular este de diversas formas, podendo, inclusive, influenciar a função do gene. Mesmo assim, ainda há poucas informações disponíveis sobre as UTRs, visto que grande parte das análises genômicas ignoram estas regiões (Brandão, 2008).

A capacidade de regulação dos RNAs pelas UTRs é realizada por determinados componentes, como as suas sequencias repetitivas, as estruturas secundárias encontradas nas 5' ou 3' UTR e as uORFs (*upstream open reading frame*), que são pequenas sequencias codificantes (ORFs) encontradas dentro das UTRs. As UTRs podem assim controlar a tradução, a meia vida dos RNAs mensageiros, as interações com proteínas e a comunicação entre as próprias UTRs. Foi observado que em *T. cruzi* as UTRs (5' e 3') realizam também atividades a nível pós-transcricional (Brandão e Jiang, 2009).

As 5' UTRs possuem um tamanho variável de 30 a 400 nucleotídeos dependendo do tamanho do gene, assim a proporção entre a UTR e o segmento codificador da proteína (ORF) mostrou-se limitada a 20% do tamanho total do transcrito final (Brandão e Jiang, 2009). As UTRs localizadas na porção 5' são de 2 a 3 vezes menores que as 3' UTRs.

Não há ainda descrições a respeito das UTRs em diferentes espécies de tripanossomatídeos, e pouco se sabe sobre essas regiões entre as populações de *T. cruzi*. Tal conhecimento seria de grande importância para problemas como a tipagem de cepas e a evolução da doença de Chagas.

A fim de preencher esta lacuna no conhecimento da expressão gênica em tripanossomatídeos, surgiram estudos que combinam a geração de dados experimentais com a análise computacional de sequências, como a geração de ESTs (*expressed sequence tags*). Através das ESTs é possível analisar as UTRs quanto ao seu tamanho e composição (Brandão 2008). Antes do sequenciamento do genoma de *T. cruzi*, diversos estudos de ESTs resultaram na geração e análise de sequências expressas (Brandão *et al*, 1997). A análise de ESTs mostrou-se uma técnica rápida e satisfatória na identificação de genes, apresentando porém um viés analítico para genes expressos em maior quantidade (Matsubara e Okubo, 1993)

A análise de sequências de ESTs rapidamente ganhou grande importância e tem sido muito aplicada na descoberta das sequências transcritas no genoma em uma variedade de organismos. Isto porque as ESTs são geradas a partir do sequenciamento de partes de cDNAs dos genes transcritos. Logo, mostrou-se como uma forma rápida e eficiente de obter detalhados perfis de genes expressos em

determinada célula, ou ainda em fases específicas do desenvolvimento desta (Verdun *et al*, 1998).

Os bancos de dados, como dbEST *GenBank* – NCBI, possuem relativamente poucas sequências de ESTs de tripanossomatídeos quando comparados com outros organismos modelos e economicamente mais importantes (Pesole *et al*, 2001). O sequenciamento de ESTs pode ser substituído por técnicas mais eficientes para análise de transcrição gênica como os Microarranjos (*Microarray*), SAGE (Serial analysis of gene expression) e mais recentemente baseado neste último o DGE (Digital gene expression), que permite gerar dados digitais proporcionais ao número de transcritos por RNAm (Veitch *et al*, 2010).

A geração de ESTs é limitada devido a dependência da técnica do sequenciamento e pelo típico viés de obtenção de clones dos genes mais frequentemente transcritos (Brandão, 2008). Ainda assim, precisando-se que cada vez mais ESTs de tripanossomatídeos monoxênicos e heteroxênicos sejam geradas, servindo estas como ferramentas para entender a evolução da transcrição nesses protozoários.

Embora técnicas de transformação estável sejam empregadas há vários anos nos tripanossomatídeos (Taylor e Kelly, 2003), estes, pelas suas peculiaridades biológicas e moleculares, apresentam certa dificuldade para manipulação genética. Este fato limita a aplicação das abordagens metodológicas que visam ao estudo da função gênica. O sequenciamento do genoma dos três importantes tripanossomatídeos (*L. major*, *T. cruzi* e *T. brucei*) (El-Sayed *et al.*, 2005) revelou um elevado número de genes hipotéticos, previstos por métodos computacionais, mas sem confirmação experimental. Vários desses genes são específicos para os tripanossomatídeos, não existindo similares em outros organismos. Isto aumenta o desafio para os pesquisadores, que impossibilitados de usar as ferramentas comumente aplicadas e validadas nos organismos modelos (*S. cerevisiae*, *A. thaliana*, *C. elegans*, etc), não dispõem de muitas alternativas para avaliar a função dos milhares de genes novos desvendados pelos projetos genomas.

## 1.7 – Respostas ao Estresse

De forma geral as células são capazes de responder as alterações ambientais e variações de fatores do meio em que se encontram, como temperatura, nutrientes, pH, entre outras. Esta rápida resposta é de grande importância para a atividade geral da célula e sua sobrevivência. Logo, estudos buscam compreender a resposta celular às alterações do meio, tentando entender os mecanismos moleculares que estão envolvidos na adaptação das células a novos ambientes (Góes, 2008).

A mudança no comportamento celular perante variados estímulos e sua adaptação a ambientes distintos, é resultante da modificação da expressão gênica, com ajustes nos níveis de expressão de cada gene. Assim, os mecanismos moleculares que estão envolvidos na regulação da expressão dos genes poderiam elucidar questões a respeito da adaptação celular a diferentes tensões impostas pelo meio. Indícios dos mecanismos envolvidos na mudança de ambientes vieram de pesquisas com genes que são diferencialmente expressos em resposta a estresses celulares específicos. (Causton *et al*, 2001).

Procariotos e eucariotos parecem responder de forma similar a condições de choque térmico impostas. Como exemplo, estudos demonstraram que ao induzir tensão de choque térmico ocorria um aumento na síntese e acúmulo de proteínas chamadas “proteínas de choque térmico” (HSPs) (Graefer *et al*, 2002). É um grupo de proteínas altamente conservado que são sintetizadas em resposta a condições de tensão do meio. Além das alterações de temperatura as HSPs também aparecem alteradas em condições de tensão como depleção de energia e concentrações extremas de íons, gases e substâncias tóxicas a célula (Feder e Hofmann, 1999). Tais proteínas também possuem funções essenciais na célula como dobramento de proteínas, acoplamento, localização intracelular, secreção e degradação de outras proteínas.

Segundo Rodrigues *et al* (2010) a capacidade de responder a mudanças ambientais parece ser um mecanismo conservado, e parte dessa resposta está no aumento do nível das HSPs, que parecem estar implicadas na adaptação e sobrevivência da célula sob condições de estresse. Para o parasito então, a síntese das HSPs funciona como mecanismo de defesa celular, permitindo que este viva em diferentes ambientes térmicos ao longo de sua vida. Assim, foi observada a

importância da regulação da síntese dessas proteínas em parasitos heteroxênicos que passam de um hospedeiro para outro (vetorialmente), trocando repentinamente de meio, e também no caso daqueles de vida livre ou dos monoxênicos, onde a indução das HSPs acompanha a transição do hospedeiro em diferentes ambientes (Feder e Hofmann, 1999). A adaptação dos parasitos heteroxênicos a dois distintos ambiente, com diferentes temperaturas, nutrientes e defesas, pode requerer uma maior alteração na expressão dos seus genes (Clayton, 2002).

Trabalhos com bactérias como *Escherichia coli*, por exemplo, mostraram haver uma maquinaria essencial para sobrevivência desta em diferentes tipos de tensão no meio (Delgado-Olivarez *et al*, 2006). Em *Pseudomonas putida* submetida às tensões de temperatura, estudos mostraram que a adaptação ao novo ambiente se dá pela ativação de módulos funcionais de ribossomos associados que facilitam e aumentam a eficiência da tradução. Outros sinais também foram observados, como reorganização do perfil da membrana externa, as vias anabólicas e essenciais e o metabolismo energético foram reprimidos e o catabolismo de açúcar ativado. Observou-se também que no tempo observado, bem no início da adaptação à tensão, o transcriptoma foi reprogramado em quase todas suas categorias funcionais, entretanto o perfil protéico (proteoma) ainda não estava adaptado às novas condições de sobrevivência (Frank *et al*, 2011).

Em estudos com leveduras (Causton *et al*, 2001), como o modelo *Saccharomyces cerevisiae*, foi observado que cerca de dois terços do genoma estaria envolvido nas respostas transcricionais destas células às tensões no meio, com diferentes perfis de transcrição característicos para cada tipo de tensão aplicada. Porém também demonstrou-se que aproximadamente 10% dos genes de *S. cerevisiae* são induzidos ou reprimidos em comum quando as células respondem a uma variedade de condições de tensão impostas. Este resultado demonstra a importância da reformulação da expressão gênica na adaptação às mudanças do meio e ainda implica um conjunto substancial de genes de função desconhecida (hipotéticos) nestas respostas (Teixeira *et al*, 2010).

Pouco se sabe a respeito de como alterações no ambiente dos tripanossomatídeos acarretam mudanças em sua expressão gênica, embora regulações disparadas por alterações de temperatura e pH já tenham sido bem

definidas (Ali *et al*, 1994; Zilberstein e Shapira, 1994; Clayton, 2002). Inclusive, as mudanças de pH e temperatura além de dispararem a expressão diferencial de genes, também são estímulos para a diferenciação celular deste parasito.

Condições de tensão sobre a célula de um tripananossomatídeo podem resultar em modificações nas 5'UTR ou 3'UTR, regiões que possuem sequencias responsáveis pela regulação pós-transcricional dos RNAm. Se, por exemplo, ocorrer a utilização de sítios adicionais de trans-splicing, canônicos ou não, irá alterar a sequência e a função destas regiões não traduzidas. Pode assim ser regulada a meia-vida de RNAs mensageiros, modulando a taxa de degradação destes (alteração da estabilidade do RNAm), ou ainda a inibição do início da tradução (alteração na eficiência de tradução do RNAm) levando a um acúmulo de RNAm no citoplasma (Ali *et al*, 1994; Hilgers *et al*, 2006). Mostra-se, desta forma, como os mecanismos de controle pós-transcricionais exercem um importante papel na regulação da expressão gênica durante a resposta ao estresse (Spicher *et al*, 1998).

Apesar de muitos estudos acerca dos mecanismos moleculares envolvidos na resposta às tensões do meio nos parasitos, estes ainda não foram completamente elucidados, devido às complexas vias de sinalização e o envolvimento de diversas proteínas neste processo (Miura, 2004). Dessa forma, a análise da expressão do genoma em condições de tensão distintas, ainda pode revelar os principais reguladores na resposta ao estresse (Teixeira *et al*, 2010).

### **1.8 - RNA *fingerprinting***

Estima-se em torno de 100.000 o número de genes diferentes em eucariotos, sendo que destes, apenas uma pequena fração, talvez 15% sejam expressos em cada célula individualmente. É a partir da escolha de quais genes serão expressos que se baseiam todos os processos vitais da célula, como desenvolvimento e diferenciação, regulação do ciclo celular, envelhecimento e até a morte celular programada. Da mesma forma que podemos comparar a expressão gênica em diferentes tipos celulares de um mesmo organismo, na visão de protozoários unicelulares buscamos comparar a organização e regulação gênica em diferentes

momentos de desenvolvimento e diferenciação do parasito em seu ciclo biológico e celular (Liang e Pardee, 1992).

Dentre diversas técnicas da biologia molecular algumas buscam revelar especificamente a expressão gênica de um determinado momento (forma evolutiva, hospedeiro, metaciclogênese, etc), além de saber quais genes e em que quantidade estes são expressos na célula em estudo. Os métodos atuais usados para analisar expressão diferencial de genes baseiam-se na técnica de hibridização, como os microarranjos (Veitch *et al*, 2010). Tais métodos estão sujeitos a hibridizações não específicas, hibridização cruzada, cinética de hibridização não-linear e saturável, produzindo níveis quantitativos de expressão que podem não ser comparáveis entre os experimentos.

Técnicas alternativas mais recentes para análise de expressão gênica estão tornando-se cada vez mais populares devido ao rápido desenvolvimento atual das tecnologias de sequenciamento. O primeiro, com o sequenciamento direto de cDNAs chamado RNAseq, e o segundo baseado na análise seriada de expressão gênica SAGE, chamado DGE (*Digital gene expression*) permite a obtenção de perfis transcricionais de grande parte dos genes em um genoma, fornecendo o número absoluto de transcritos em formato digital bem como a identificação de novos genes (Veitch *et al*, 2010; Qing Ye *et al*, 2000).

Já a técnica de RNA *fingerprinting* (Welsh *et al*, 1992) baseia-se na amplificação de sequências parciais de cDNAs de um subconjunto de RNAs por transcrição reversa (RT) e reação em cadeia da polimerase (PCR). Assim, a reação pode utilizar iniciadores arbitrariamente selecionado, escolhidos de tal forma a produzir o melhor *fingerprinting* da reação de PCR (McClelland, Mathieu-Daudé e Welsh, 1995). Esta metodologia permite também a obtenção de ESTs do perfil de expressão através de RAP-PCR (*RNA arbitrarily primed PCR*), gerando, com eficiência, mini biblioteca de cDNAs a partir de pequenas quantidades de RNAm (Dias Neto *et al*, 1997; Bosch *et al*, 2000)

O método de exibição diferencial, de sequências diferencialmente expressas amplificadas randomicamente por PCR (também chamado RADES-PCR), tem sido utilizado para identificar RNAs que são positiva ou negativamente regulados durante determinada situação, que pode ser de morte celular programada, tensões físicas ou

químicas para a célula, entre outras que irão induzir, no caso do protozoário, alteração de seu repertório gênico expresso através de regulação pós-transcricional (Murphy e Welburn, 1997; Murphy e Pelle, 1994). Diferentemente de outros métodos de perfis diferenciais, o RADES utiliza cDNAs como amostras e utiliza as extremidades fixas, 5' específica com mini-exon e/ou 3' específica com oido dT de todos os RNAm de tripanossomas caracterizados.

A abordagem do RNA *fingerprinting* permite a simultânea comparação de um grande número de amostras, permitindo o estudo da diferente expressão de genes nos parasitos submetidos a diferentes tratamentos em uma grande variedade de situações. O uso de diferentes combinações de drogas não específicas assim como medicamentos tripanocidas podem identificar novos transcritos e fornecer pistas sobre a função e o papel de sequências desconhecidas. Esta estratégia pode assim revelar novas proteínas e vias metabólicas, levando a uma melhor compreensão das doenças causadas por tripanossomatídeos, e eventualmente, para o controle destas, proporcionando novos alvos potenciais para fármacos tripanocidas (Mathieu-Daudé *et al*, 1998).

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

- Identificar, em um tripanossomatídeo heteroxênico e outro monoxênico, os transcritos de genes mais expressos durante uma tensão físico-química.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Definir a condição de cultivo necessária para os agentes químicos e físicos induzirem tensão.
- Otimizar a metodologia de RNA *fingerprinting* para a obtenção de fragmentos gênicos dos tripanossomatídeos em análise.
- Obter e comparar fragmentos gênicos transcritos de *Blastocrithidia culicis* e do clone referência *T. cruzi* CL-Brener, em condições normais de cultivo e sob tensão físico-química.
- Clonar e sequenciar os fragmentos gênicos obtidos por RNA *fingerprinting*, e identificar os genes codificados por busca BLAST.

## 3 - Materiais e Métodos

### 3.1 - Cultivo dos tripanossomatídeos:

Foram cultivadas células na forma epimastigotas da espécie heteroxênica *Trypanosoma cruzi* clone CL-Brener, (CP-IOC-005), e da espécie monoxênica *Blastocrithidia culicis* (CP-IOC-041), ambas da coleção de protozoários do Instituto Oswaldo Cruz.

#### 3.1.1 - Meio de cultura BHI (*Brain Heart Infusion*):

A espécie *T. cruzi* CL-Brener, já cultivada no Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas foi retirada de cultura em meio bifásico ágar-sangue NNN (Novy & McNeal, 1904), a fase sólida contendo 1,5% de ágar suplementado com 10% de sangue de carneiro e meio BHI (Gibco) e mantida em meio BHI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco) com temperatura de incubação de 28 °C em estufa B.O.D., mantida por repiques a cada 7-9 dias. Este meio foi preparado a partir de 37g de BHI em 1L de água destilada e autoclavado a 121 °C por 20 minutos.

Ambos os cultivos foram realizados em condição padrão de crescimento em meio BHI (Warren, 1960) suplementado com 10% de SFB estéril, a 28 °C e em condições de tensão física (variações de temperatura e exposição à luz branca) ou química (alterações de pH e adição ao meio BHI de agentes químicos em alta concentração).

Todos os cultivos foram iniciados com  $2 \times 10^6$  células/mL, tanto a condição padrão como as condições experimentais de cultivo sob tensão. Foram realizados cálculos ajustando o volume de meio BHI, SFB e agente químico para manter sempre o mesmo inóculo inicial.

### **3.2 - Estimativa do crescimento in vitro**

Para coletar as células antes do início da fase log (máximo de crescimento celular), elaboramos as curvas de crescimento das espécies em estudo. As curvas das duas espécies iniciaram-se com inoculo de  $2 \times 10^6$  células/mL de cultura prévia em meio NNN e passadas para meio BHI com 10% de SFB. A contagem foi iniciada apenas após duas passagens das espécies em meio BHI + SFB. As culturas foram distribuídas em tubos falcon® de 15 mL. O crescimento foi estimado em células/mL, com contagem em hemocitômetro de Neubauer (câmara de Neubauer) a cada 24 horas, em 21 dias consecutivos.

### **3.3 - Cultivo nas condições de tensão físico-químicas:**

As células das duas espécies, *T. cruzi* e *B. culicis* foram submetidas a condições de tensão físicas e químicas. Para alcançar os objetivos propostos a tensão deveria ser a máxima suportável pela célula. Assim, com os agentes químicos testamos (Tabela 3.1), em placas de polipropileno de 24 poços, crescentes concentrações dos agentes acrescidos ao meio de cultura BHI suplementados com soro fetal bovino. Os agentes utilizados neste estudo foram: ácido fumárico, ácido maleico, cloreto de sódio, citrato de sódio e uréia (Sigma®) e testados em concentrações que variaram de 1mM a 1M.

**Tabela 3.1:** Lista dos agentes químicos adicionados ao meios de cultura BHI para crescimento das células sob tensão química e suas principais funções em células eucariotas.

<b>Ácido fumárico</b>	Faz parte dos processos de produção celular de energia, e é produzido pela pele humana durante a exposição à luz solar.
<b>Ácido maleico</b>	Tóxico, isômero do ácido fumárico
<b>Citrato de sódio</b>	Estabilizante, minimiza a precipitação de proteínas e minerais. Age como coagulante do sangue em soluções de glicose
<b>Cloreto de sódio</b>	Contém dois elementos, cloro e sódio de alta importância para o equilíbrio eletrolítico e tonicidade do meio extracelular. Participam ainda de inúmeras reações. Atua na manutenção da tensão osmótica de sangue e tecidos
<b>Uréia</b>	Composto formado no fígado a partir de amônia produzida pela deaminação de aminoácidos. Ele é o produto final do catabolismo de proteínas e constitui aproximadamente a metade do sólido urinário total

A concentração para cada agente foi definida como sendo aquela cujo valor era o máximo que as células suportavam no período de crescimento observado, isto é, uma concentração em que qualquer valor acima as células não mais sobreviviam. Esta concentração é definida então como “máxima tolerada pelas células”

Também submetemos as células a alterações de pH. Para alterarmos o pH do meio BHI que normalmente é pH 7,2, utilizamos HCl 9M para pH 5,0 e 6,0 e NaOH 10M pH 8,0 e 9,0 e ambas as células foram cultivadas nestes meios e observados seus perfis de transcritos. Como tensão física as condições escolhidas foram: alterações de temperatura para 4 °C, 37 °C, 40 °C e 42 °C, exposição à luz branca e meio BHI sem SFB.

Para o controle dos experimentos de cultivo em condições de tensão tanto físicas como químicas, utilizou-se *T. cruzi* CL-Brener e *B. culicis* cultivadas em condição normal de crescimento, ou seja, meio BHI suplementado com 10% de SFB mantidos em estufa 28 °C e sem adição de agentes químicos ao meio.

Tensão nutricional:

A condição de tensão nutricional controlada foi gerada a partir de um meio mínimo (Ávila *et al.*,1983), ou seja, um meio conhecido de composição definida testado em diferentes cepas de *T. cruzi*, exceto CL- Brener.

O meio mínimo constitui-se dos seguintes componentes: NaCl; KCl; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; CaCl<sub>2</sub>; cloreto de colina; ácido fólico; glicose; NaHCO<sub>3</sub>; HEPES; EPPS; Vermelho de fenol; estreptomicina; penicilina; Catalase (fígado bovino) nas concentrações indicadas pelo autor.

### **3.4 - Extração de RNA total de *T. cruzi* e *B. culicis*:**

Após três dias (72 horas) de crescimento em cultivo tanto na condição padrão como nas condições de tensão físico-química, as células foram coletadas por centrifugação a 2.500 rpm por 10 minutos a 4 °C e o RNA total foi extraído por TRIZOL® (Invitrogen), segundo recomendações do fabricante. Entre 10<sup>6</sup> e 10<sup>7</sup> células foram lisadas em 1mL de Trizol®. Após a lise, centrifugação e separação das fases aquosa e orgânica, o RNA foi precipitado com 0,5 mL de etanol e dissolvido em 50 µl de H<sub>2</sub>O livre de RNases, mantidos em freezer -80 °C até o momento do uso.

A pureza e integridade do RNA extraído foram definidas pela eletroforese em gel de agarose a 1%. Foram aplicados 3 µl de RNA total recém extraído, acrescidos de 10 µl de formamida, incubados por 10 minutos antes de serem aplicados no gel, a fim de eliminar as estruturas secundárias inerentes ao RNA e melhorar a visualização do mesmo.

### 3.5 - Quantificação do RNA:

A quantificação do RNA total foi realizada inicialmente por densidade ótica através de espectrofotometria em UV (“Ultrospec 1100 Pro – Amersham Biosciences”), sendo normalizada por meio de visualização de quantidades crescentes de RNA total (padrão) em gel de agarose 1%. O RNA padrão (ou seja,  $2 \times 10^6$  células/ $\mu$ l crescidas em BHI com 10% de SFB a 28°C por 3 dias) foi quantificado e este diluído 1:100 e aplicado em quantidades crescentes no gel de agarose (10 ng, 50 ng, 100 ng, 200 ng, 400 ng, 800 ng, 1000 ng e 2000 ng), com as amostras de RNA extraídas aplicadas em seguida. Assim, após coloração com GelRed® (corante que substitui o brometo de etídio) e visualização da intensidade de coloração das bandas podemos inferir e normalizar a quantidade de RNA total presente após a extração. Isto assegura que a quantidade de RNA total a ser utilizada na transcrição reversa seja aproximadamente a mesma para todas as condições experimentais usadas.

### 3.6 - Seleção dos oligonucleotídeos:

Devido à técnica utilizada ser baseada no “RNA *fingerprinting*” com amplificação através de iniciadores arbitrários, o cDNA foi produzido com iniciadores aleatórios (*Random primers* de 6 nt). Para a amplificação por PCR foram testados diversos oligonucleotídeos aleatórios (Tabela 3.2) disponíveis no laboratório. Ao final da RT-PCR por todos estes iniciadores combinados com o segundo oligonucleotídeo utilizado derivado da sequência do mini-exon (5' CGCTATTATTAGAACAGTTTCT 3'), utilizou-se um oligonucleotídeo aleatório (5' TGGAGCAGCAGC 3'), desenhado com base em sequências repetidamente mais encontradas em regiões 5'UTR e ORFs de *Trypanosoma cruzi*. Assim, ancoramos todas as sequências de genes amplificados na região da 5'UTR. Este iniciador aleatório produziu o melhor *fingerprinting* de bandas após a RT-PCR visualizada através do gel de agarose.

Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela empresa Invitrogen® e diluídos em solução de TE 1X (10 mM Tris-HCL e 10 mM EDTA pH8,0) a uma concentração de 100  $\mu$ M (solução estoque) e diluídos em água ultra pura a uma concentração de 10  $\mu$ M (solução de trabalho). Os iniciadores utilizados são armazenados a -20 °C.

**Tabela 3.2:** Lista dos oligonucleotídeos arbitrários testados:

<b>A1</b>	5' ACACAGAGGT 3'
<b>A2</b>	5' GTCTACGGCA 3'
<b>A3</b>	5' ATGCTGTATG 3'
<b>A4</b>	5' TCGGTCATAC 3'
<b>Ta 1</b>	5' TTTTTTTTTTTTTTTA 3'
<b>Ta 2</b>	5' TTTTTTTTTTTTTTTG 3'
<b>Ta 3</b>	5' TTTTTTTTTTTTTTTC 3'
<b>T3</b>	5' GCAATTAACCCTCACTAAAGG 3'
<b>T7</b>	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'
<b>SP6</b>	5' ATTTAGGTGACACTATAG 3'
<b>M13 F</b>	5' GTAAAACGACGGCCAG 3'
<b>M13 R</b>	5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'
<b>M13 (-21)</b>	5' TGTAACGACGGCCAGT 3'
<b>Tc-Ale</b>	5' TGGAGCAGCAGC 3'

### 3.7 - Transcrição Reversa e PCR (RT-PCR):

A reação de transcrição reversa foi realizada com quantidades normalizadas de RNA total, sendo a síntese da primeira fita feita com iniciadores aleatórios de 6 bases (hexâmeros). Os cDNAs gerados foram amplificados com oligonucleotídeo derivado de mini-exon (20 bases centrais) e um oligonucleotídeo aleatório de 12 bases (5' TGGAGCAGCAGC 3'), o qual foi selecionado por apresentar um melhor perfil de fragmentos, após uma série de testes com outros iniciadores arbitrários. Foram avaliados os seguintes parâmetros com os oligos utilizados: concentração de  $Mg^{2+}$ , temperatura de hibridação e quantidade de cDNA.

A reação de RT acoplada a PCR ficou então assim definida para ambas as espécies sob condições padrão e experimentais de cultivo:

#### Transcrição Reversa:

A 2 µg de RNA total (1 a 10 µl), iniciadores aleatórios de 6 bases (Invitrogen®) 10 µM (2 µl) e H<sub>2</sub>O são incubados a 65 °C por 5 minutos., depois adicionados à mistura com deoxinucleotídeos (dNTPs-Roche) 5 mM (1 µl), DTT 0,1 M (2 µl), enzima transcriptase reversa (M-MLV) 200 U/µl (1 µl) e Tampão 5X (4 µl) e novamente incubados a 37 °C por 1 hora.

Como controle negativo da reação, foi adicionado mais um tubo específico onde não foi adicionada a enzima RT M-MLV. Após a produção do cDNA o mesmo foi estocado a -80 °C até a realização da técnica de PCR.

#### PCR:

A 2 µl de cDNA foram adicionados à H<sub>2</sub>O ultra-pura (36,8 µl), Tampão 10X (5 µl), MgCl<sub>2</sub> 50 mM (2 µl), dNTP 5 mM (2 µl), enzima Taq polimerase 5 U/µl (0,2 µl), com primers Mini-exon 2 (5' CGCTATTATTAGAACAGTTTCT 3') e Tc-Ale, aleatório (5' TGGAGCAGCAGC 3') a 10 µM (1 µl), resultando assim em um volume final de 50 µl de reação.

A amplificação ocorreu em termociclador "GeneAmp PCR System 9700" (Applied Biosystems) conforme programação iniciada com uma pré-desnaturação a 94 °C por 5 minutos., depois seguida por 35 ciclos que compreendem a desnaturação a 96 °C por 10s, hibridação a 46 °C por 30 s e a extensão a 72 °C por 30 s, seguido de extensão final a 72 °C por 7 minutos.

Os fragmentos amplificados foram revelados com alíquotas de 2 µl, aplicados em gel de agarose 1,5% imerso em tampão TBE 0,5X (Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM) corados com Gel Red. Os resultados foram visualizados por transiluminação com luz ultravioleta e registrados digitalmente com o auxílio do sistema de fotodocumentação de imagem de gel (Bio-Rad®).

### **3.8 - Preparo de células competentes:**

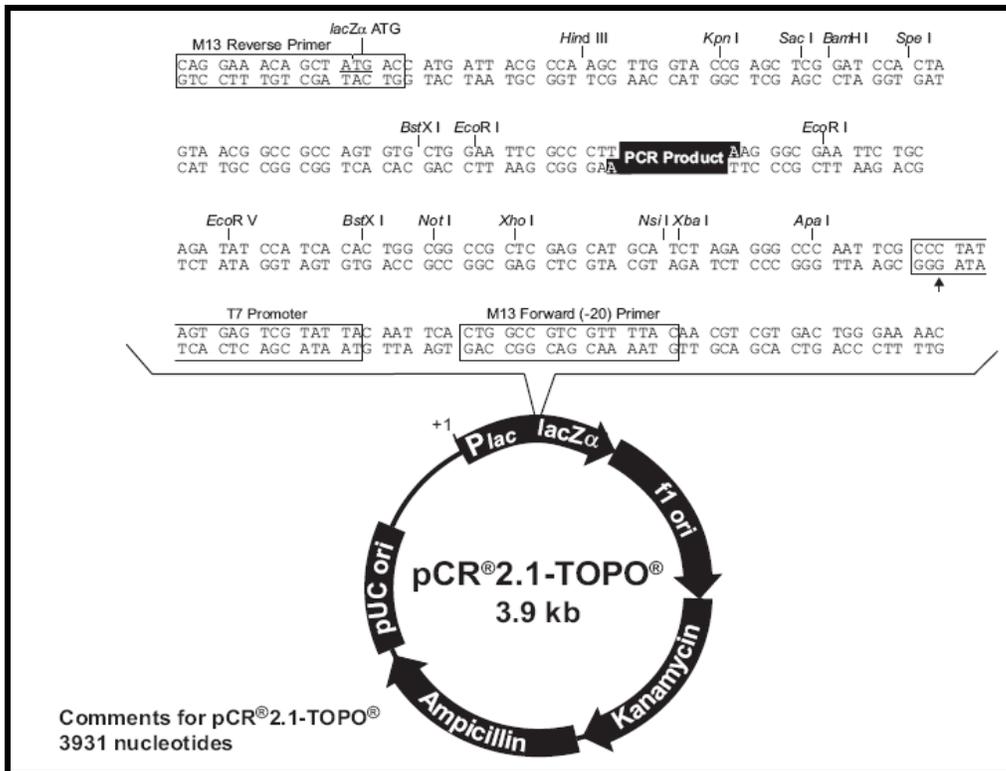
A preparação de células competentes foi realizada utilizando o protocolo de cloreto de cálcio segundo Sambrook *et al* (1989).

A metodologia foi iniciada com uma semeadura da cultura de *Escherichia coli* linhagem TOP10 (Invitrogen®) em placa contendo LB (“Luria-Bertani”) adicionado de 20% de ágar, sem antibiótico, com crescimento durante 18 horas a 37 °C. Uma colônia foi retirada e transferida para um erlemeyer de 200 mL contendo LB líquido sem antibiótico, com forte agitação a 37 °C . Depois de 1h foi iniciada a quantificação por leitura D.O. a 550 nm em espectrofotometria, e depois, em intervalos de 20 - 30 minutos até chegar ao valor de D.O. = 0.5 (fase log). A cultura foi incubada em banho de gelo por 10 minutos e centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos em tubos cônicos de 50 mL estéril. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensão cuidadosamente com 25 mL de CaCl<sub>2</sub> estéril a 100 mM. Uma nova centrifugação foi realizada por 10 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensão, cuidadosamente, em 25 mL de CaCl<sub>2</sub> estéril a 100 mM. Uma nova centrifugação foi realizada por 10 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi descartado e novamente o pellet foi ressuspensão, cuidadosamente, em 2 mL de CaCl<sub>2</sub> estéril a 100 mM acrescido de 20% de Glicerol 100%. Foram feitas alíquotas de 100 µL em tubos eppendorf de 1,5 mL mantendo-as no gelo. Em seguida, as células foram submetidas ao choque térmico com nitrogênio líquido ou gelo seco em álcool por 1 minuto, e rapidamente estocadas em freezer -80 °C.

Com a finalidade de testar a competência dessas células, inoculou-se uma alíquota das colônias bacteriana em 5 mL de meio de cultura LB acrescido do antibiótico seletivo para o plasmídeo utilizado (ampicilina 100 mg/mL), e foi realizada uma reação de transformação com o plasmídeo controle (PUC19).

### **3.9 - Clonagem:**

Os produtos de PCR das condições de estresse (4 °C, 42 °C , luz fluorescente branca, meio BHI sem SFB, pH 5,0 e pH 9,0) das duas espécies cultivadas foram ligados ao vetor de clonagem TOPO-TA kit Invitrogen® (Fig. 3.1).



**Figura 3.1:** Mapa ilustrativo do vetor plasmidial pCR 2.1 –TOPO® utilizado na clonagem dos fragmentos obtidos.

A ligação foi realizada com 4 µl de produto de RT-PCR fresco com 1 µl de solução salina e 1 µl do vetor TOPO em um volume final de 6 µl, conforme indicado pelo fabricante.

Depois de homogeneizada a mistura em pequenos tubos, deixamos 30 minutos à temperatura ambiente. Após colocadas no gelo as ligações, tubos de 100 µl de células competentes (*E. coli*) foram retirados e descongelados no gelo.

Em seguida foram adicionados 2 µl da ligação a cada 100 µl de células competentes. A transformação foi realizada através de choque térmico. Este consistiu em uma incubação de 30 minutos no gelo, seguido do choque térmico à 42°C por 1 minuto e por fim mais 5 minutos no gelo.

Logo após, completamos os tubos para 1 mL de meio LB líquido sem antibiótico e estes ficaram 1 hora no shaker a 37 °C (150 rpm). Após retirados, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 10.000 rpm. Em seguida, excluiu-se o

sobrenadante e o pellet foi ressuspendido gentilmente com micropipeta em 200 mL de meio LB líquido sem ampicilina. Por fim, foi adicionado 100 µl em cada placa de petri estéril e semeados com pérolas de vidro até completo espalhamento. As placas foram recém preparadas com LB-ágar acrescido de ampicilina a 100 µg/ mL e depois plaqueadas com 40 µl de X-Gal a 20 mg/ mL (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo). As placas ficaram overnight (de 12 a 18 horas) a 37 °C em estufa bacteriológica.

No dia seguinte as colônias brancas foram coletadas, com palitos ou ponteiros estéreis, e levadas diretamente para a reação de PCR colônia ou congelados.

### **3.10 - PCR colônia:**

Os plasmídeos foram extraídos pela técnica de PCR colônia.

Através da amplificação em cadeia da polimerase com primers específicos para regiões do plasmídeo M13 Foward (5' GTA AAA CGA CGG CCAG 3') e M13 Reverse (5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3') conseguimos obter o isolamento do inserto clonado e a concomitante amplificação deste.

A técnica consiste em adicionar cada clone obtido das placas de clonagem em 9µl de água. Após esta primeira etapa, é preparada a mistura de PCR com 29 µl de H<sub>2</sub>O ultra-pura, 5 µl de Tampão 10X, 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 2 µl de dNTPs a 5 mM, 0,5 µl de Taq polimerase a 5U/µl e 1 de cada primer M13F e M13R a 10 µM, em volume final de 40 µl.

O seguinte regime térmico foi utilizado: 95 °C por 5 minutos inicialmente e 40 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 55 °C por 1,5 minuto e 72 °C por 1 minuto, com uma extensão final de 72 °C por 5 minutos.

Ao fim da reação visualizamos os produtos em gel de agarose 1,5%, corado e visualizado para verificação da amplificação e da qualidade da clonagem, podendo verificar o tamanho do inserto que conseguimos inserir no plasmídeo durante a clonagem, quando comparado com a amplificação de colônia azul sem o inserto, ou seja, somente com o plasmídeo.

### **3.11 - Sequenciamento:**

As reações de sequenciamento foram realizadas com o *ABI Prim™ Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)*.

Na reação utilizamos 2 µl do produto de PCR colônia, e adicionamos os reagente “Sequencing Buffer 5X” e “Big Dye Terminator v 3.1”. Foi utilizado apenas um dos primers M13F (5' GTA AAA CGA CGG CCAG 3') ou M13R (5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'), (na concentração de 3,2 µM) para o sequenciamento dos clones devido ao caráter de “screening” de seqüências proposto pelo projeto.

A reação seguiu-se no termociclador *Master Cycler gradient (Eppendorf®)*, conforme a seguinte programação: 94 °C por 10 s, 50 °C por 5 s e 60 °C por 4 minutos, por 40 ciclos.

As etapas seguintes de precipitação e seqüenciamento foram realizadas pelo serviço de seqüenciamento da Plataforma de Seqüenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ, no seqüenciador “Applied Biosystems ABI 3730 48-Capilar” (Otto *et al*, 2007).

### **3.12 - Análise das seqüências obtidas:**

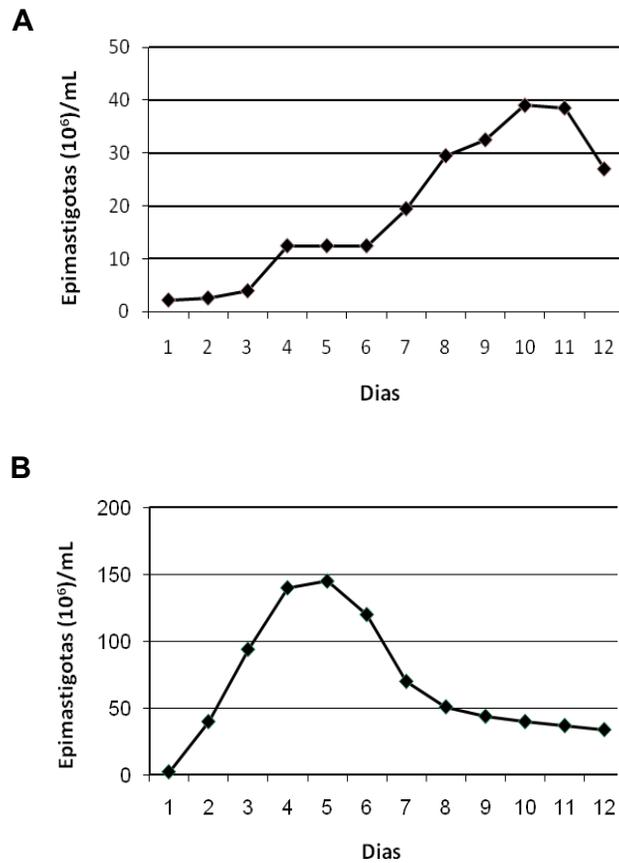
Todas as seqüências foram editadas em formato FASTA. Para análise, edição e alinhamento utilizou-se os programas BioEdit (Sequence Alignment Editor) e MEGA 4.0 (Kumar *et al*, 2008).

Foi realizada a busca por similaridades de seqüências (EST/cDNA) encontradas com as seqüências genômicas já depositadas e disponíveis no banco de dados, por meio da ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) no banco de seqüências do NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))

## 4 - Resultados

### 4.1 - Definição da condição de cultivo necessária para os agentes químicos e físicos induzirem tensão

Após acompanhar o crescimento das formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* e *Blastocrithidia culicis* em meio BHI suplementado com 10% de SFB elaboramos as respectivas curvas de crescimento. (Fig. 4.1 A,B).



**Figura 4.1:** Curvas de crescimento de formas epimastigotas de (A) *T. cruzi* e (B) *B. culicis*. Crescimento em meio BHI suplementado com 10% de SFB por 12 dias e inóculo inicial de  $2 \times 10^6$  células/mL.

Apesar da diferença de metabolismo das duas espécies, definimos que as células seriam coletadas após 72 horas de crescimento, como referência para análise de transcritos em condições padrão de tensão. O tempo de coleta foi definido no início do máximo crescimento celular para não ocorrer interferência de fatores de estresse naturais do cultivo *in vitro* (e.g. consumo de nutrientes).

As células foram assim submetidas às tensões definidas na Tabela 4.1 e observado o seu crescimento por microscópio invertido e sob lâmina e lamínula por microscopia óptica.

Comparando o crescimento das duas espécies nas condições de tensão conseguimos detectar comportamentos distintos principalmente mediante alteração de temperatura. *B. culicis* manteve o crescimento com baixa taxa de multiplicação a baixas temperaturas, como observado a 4 °C, e não suportou temperaturas mais elevadas, como por exemplo a 37 °C. Por outro lado, as células de *T. cruzi* apresentaram comportamento distinto, pois não suportaram a baixa temperatura (4 °C), mas cresceram bem a 37 °C. E as células de ambas não sobrevivem ao cultivo a temperatura de 42 °C.

Quanto à alteração de pH do meio BHI padrão observou-se que *B. culicis* parece suportar mais o meio ácido que *T. cruzi*. Da mesma forma que em estresse nutricional (Meio Mínimo) a espécie monoxênica *B. culicis* parece demonstrar maior resistência a falta de nutrientes do meio comparado a *Trypanosoma cruzi*.

Foram também realizados testes para encontrar a máxima concentração suportada por *B. culicis* para cada agente químico, ou seja, a concentração limite (vida X morte) dos agentes químicos nas quais os protozoários ainda sobrevivessem. Os valores das concentrações para *T. cruzi* CL-Brener já estavam definidos (Ziccardi, 2011) e foram aplicados neste trabalho. (Tabela 4.2)

Ao analisar os valores máximos dos agentes químicos suportados pelas duas espécies, *T. cruzi* mostrou maior resistência a concentrações mais elevadas dos agentes no meio BHI de crescimento. A exceção foi do ácido maleico, onde *B. culicis* suportou concentração maior do agente comparado a *T. cruzi* e da uréia, na qual ambos apresentam comportamento semelhante na mesma concentração (300 mM).

**Tabela 4.1:** Condições de tensão físico-química impostas às culturas de *T. cruzi* CL-Brener e *B. culicis*, visualizadas ao microscópio óptico e comparadas visualmente ao controle realizado.

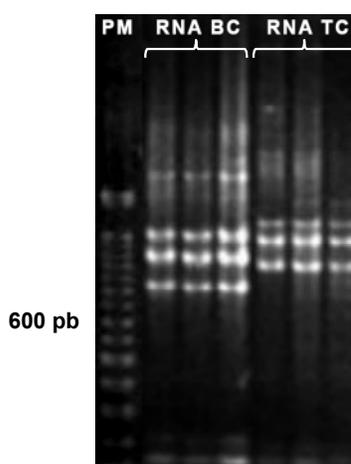
	<i>T. cruzi</i>	<i>B. culicis</i>
<b>Luz branca</b>	=	<
<b>BHI sem SFB</b>	<	<
<b>4°C</b>	<	<
<b>37°C</b>	<	O
<b>40°C</b>	O	O
<b>42 °C</b>	O	O
<b>pH 5,0</b>	<	<
<b>pH 6,0</b>	<	=
<b>pH 8,0</b>	<	<
<b>pH 9,0</b>	<	<
<b>Meio Mínimo</b>	<	<

(>: maior; <: menor; =: igual; O: ausência de crescimento)

**Tabela 4.2:** Concentrações máximas dos agentes químicos suportadas pelas espécies *T. cruzi* CL-Brener e *B. culicis*.

	<i>T. cruzi</i>	<i>B. culicis</i>
<b>Ácido Fumárico</b>	850 mM	500 mM
<b>Ácido Maleico</b>	10 mM	25 mM
<b>Citrato de sódio</b>	750 mM	450 mM
<b>Cloreto de Sódio</b>	1,1 M	700 mM
<b>Uréia</b>	300 mM	300 mM

Com as células dos protozoários de 3 dias (72 horas) de crescimento em cada condição de tensão, extraímos o RNA total (Fig. 4.2) e verificamos a integridade destes RNAs por eletroforese em gel de agarose 1%. Na análise deste gel observamos que os RNAs estavam íntegros e que a extração foi realizada de forma a isolar o RNA satisfatoriamente. Dada a diferença de tamanho do RNA ribossomal entre estas espécies, o perfil de migração do RNA total no gel de agarose apresenta variação.



**Figura 4.2:** Gel de agarose 1% de perfil diferencial de RNA total das duas espécies, *T. cruzi* e *B. culicis*. (PM (100pb) – peso molecular; BC – *B. culicis*; TC – *T. cruzi*)

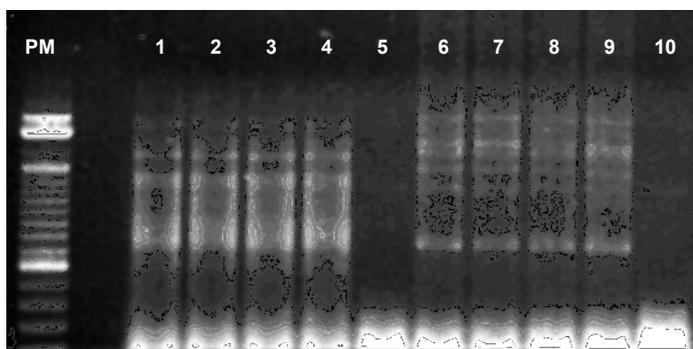
#### 4.2 - Otimização da metodologia de RNA *fingerprinting*

A fim de adaptar a metodologia descrita por Welsh e colaboradores (1992) aos propósitos do trabalho, foram realizados diversos testes de transcrição reversa seguido de amplificação por PCR.

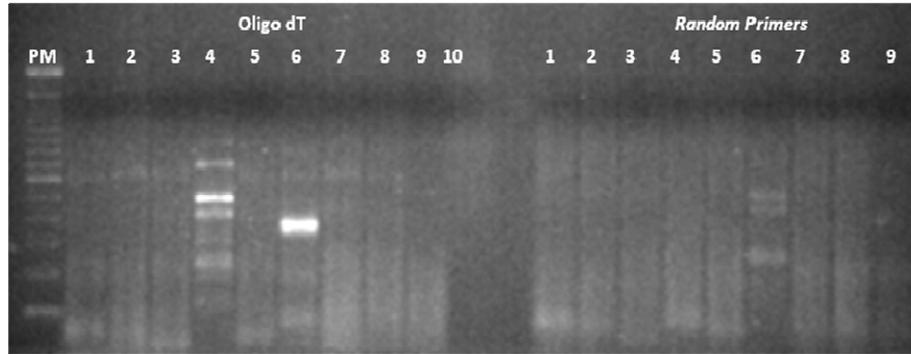
Na busca pelo melhor perfil de fragmentos amplificados com os iniciadores utilizados, testamos a melhor forma de obter o cDNA, se a partir de oligo dT (ancorando assim os fragmentos na cauda poli-A dos RNAm) ou com hexâmeros

aleatórios (gerando fragmentos diversificados de todo o RNA) (Fig. 4.3). Por apresentar, ao final, um perfil com fragmentos (bandas) mais discriminados e em maior número, optamos pela utilização dos hexâmeros aleatórios na obtenção do cDNA.

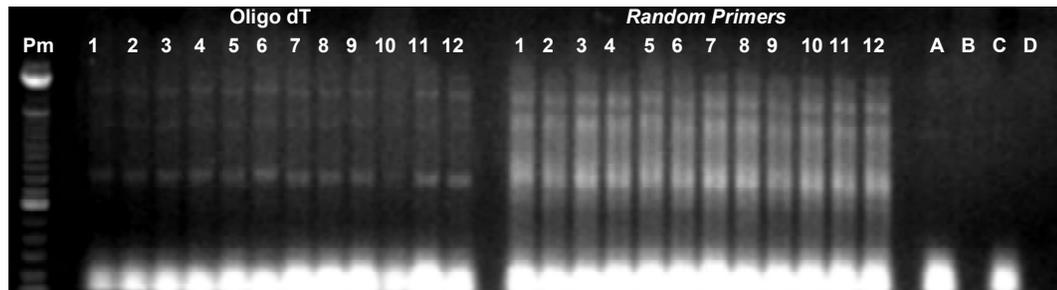
Para a seleção dos iniciadores para PCR após a transcrição reversa, foram testados oligonucleotídeos arbitrários disponíveis no Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas (LipMed). Estes iniciadores foram combinados com o iniciador derivado da sequencia conservada do Mini-exon (ME2) (Fig. 4.4) ou com oligonucleotídeos dTs ancorados (Ta1, Ta2, Ta3) (Fig. 4.5).



**Figura 4.3:** Gel de agarose 1,5% da RT-PCR do teste de diferentes combinações de oligonucleotídeos arbitrários com o iniciador Mini-Exon 2 (ME2). **PM** 100pb: peso molecular; **1-4**: cDNAs gerados com oligo dT; **6-9**: cDNAs gerados com Random primers; **1 e 6**: ME2 + A1, **2 e 7**: ME2 + A2, **3 e 8**: ME2 + A3, **4 e 9**: ME2 + A4, **5 e 10**: Controle negativo RT. (oligonucleotídeos utilizados: vide tabela 3.2)

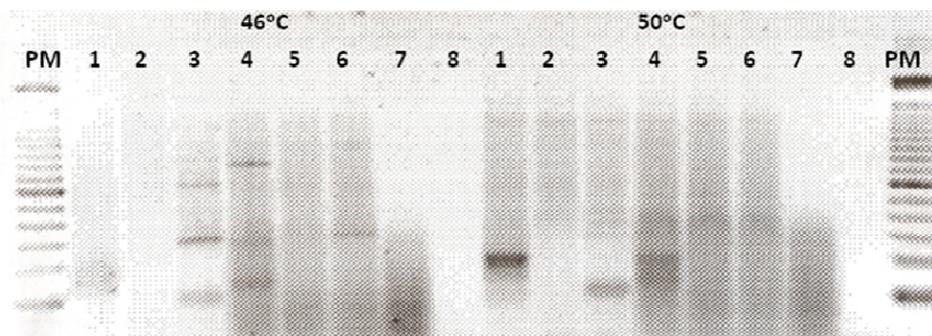


**Figura 4.4:** Gel de agarose 1,5% de produtos de RT-PCR de testes de combinações de oligonucleotídeos arbitrários com iniciador Mini-Exon 2 (ME2), tanto com cDNAs gerados por oligo dT como com hexâmeros aleatórios (Random primers). **PM** 100pb: peso molecular, ME2 + **1:** T7, **2:** T6, **3:** SP6, **4:** M13F, **5:** M13R, **6:** M13 -17, **7:** A1, **8:** A4, **9:** Controle negativo RT e **10:** Controle negativo PCR.



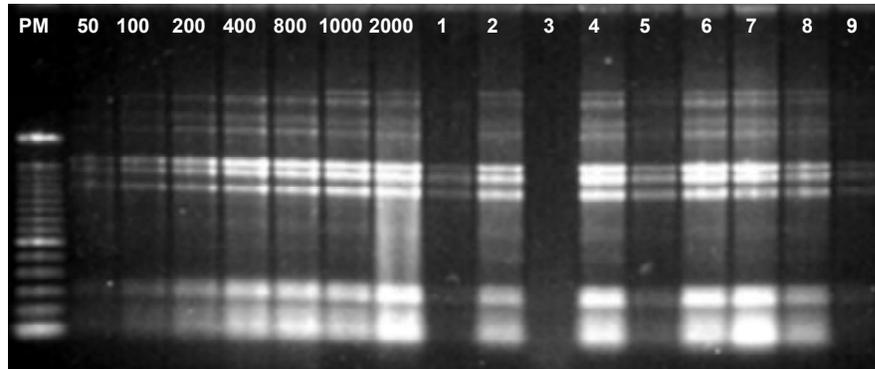
**Figura 4.5:** Gel de agarose 1,5% dos produtos de RT-PCR dos testes de combinações de oligonucleotídeos arbitrários com o iniciadores dT ancorados. **PM** 100pb: peso molecular; **1-4:** Ta1 + (A1, A2, A3, A4); **5-8:** Ta2 + (A1, A2, A3, A4); **9-12:** Ta3 + (A1, A2, A3, A4); **A:** Controle negativo RT com oligo dT; **B:** Controle negativo PCR; **C:** Controle negativo RT com hexâmeros aleatórios (*Random primers*); **D:** Controle negativo PCR.

Com a definição de cDNAs gerados a partir de hexâneos aleatórios e a utilização do iniciador derivado de Mini-Exon (ME2) como um dos oligonucleotídeos utilizados, foi iniciada a otimização da amplificação por PCR. No teste de diferentes temperaturas de hibridação optamos por 46°C, que ao configurar uma reação de baixa estringência propiciou um maior número de fragmentos (Fig. 4.6). Ao final desta etapa de otimização, a combinação de oligonucleotídeos que se revelou mais adequada nesta temperatura foi do Mini-exon (ME2) com um iniciador aleatório desenhado a partir de repetição de *triplets* mais encontrados em regiões 5'UTR de *T. cruzi*. (Tc-Ale).



**Figura 4.6:** Gel de agarose 1,5% do teste de temperaturas de hibridação para RT-PCR com os diferentes combinações de oligonucleotídeos. **PM** 100pb: peso molecular, **1-3:** *T. cruzi*; **4-6:** *B. culicis*; **7 e 8:** controles negativos RT e da reação de PCR respectivamente. Iniciadores utilizados em combinação com ME2: **1 e 4:** Tc-Ale, **2 e 5:** A4, **3 e 6:** M13.

Antes da reação de transcrição reversa utilizando os RNAs extraídos para convertê-los em cDNAs, quantificamos os RNAs por normalização em gel de agarose 1,5% através de comparação de intensidade das bandas com quantidades crescentes de RNA padrão (1000ng) diluído. (Fig. 4.7)



**Figura 4.7:** Gel de agarose 1,5% de quantificação dos RNAs extraídos nas condições de tensão de *T. cruzi* CL-Brener (**PM** 100pb – peso molecular; 50, 100, 200, 400, 800,1000, e 2000 nanogramas de RNA padrão; **1-9** RNAs de TC CL-Brener: *Trypanosoma cruzi* CL-Brener).

#### **4.3 - Os fragmentos dos transcritos de *T. cruzi* CL-Brener e *B. culicis*, em condições normais de cultivo e sob tensão físico-química**

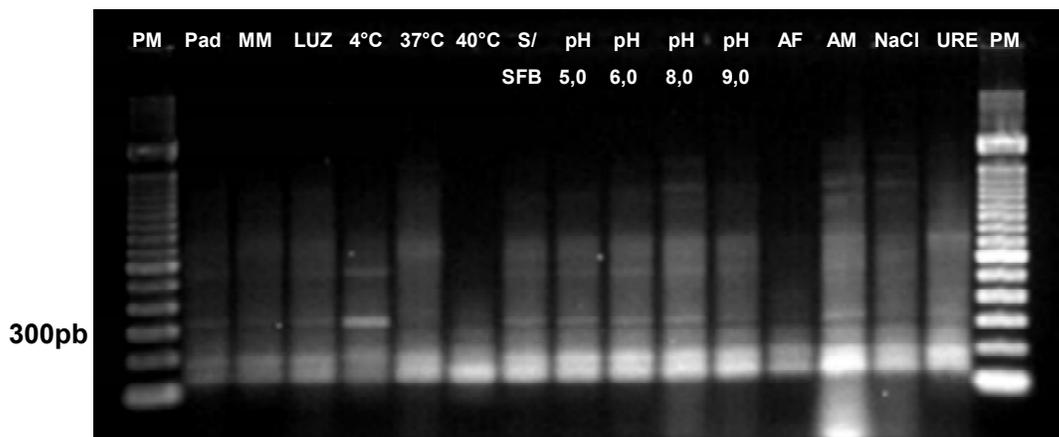
Na análise dos géis de agarose com as condições de tensão impostas às células, (Fig. 4.8 A,B) observamos prováveis diferenças nos grupos de genes transcritos (bandas com fragmentos amplificados) nas tensões físicas (temperaturas, luz branca) e nas químicas (pH alterado e agentes químicos).

Também foi possível visualizar que fragmentos (de um ou mais genes) apresentam bandas mais fortes quando comparados com o controle (crescimento padrão) e outros como bandas que desaparecem em determinada condição de tensão. Estas diferenças de intensidade sugerem um impacto de tensão distinto no processo transcricional destes genes.

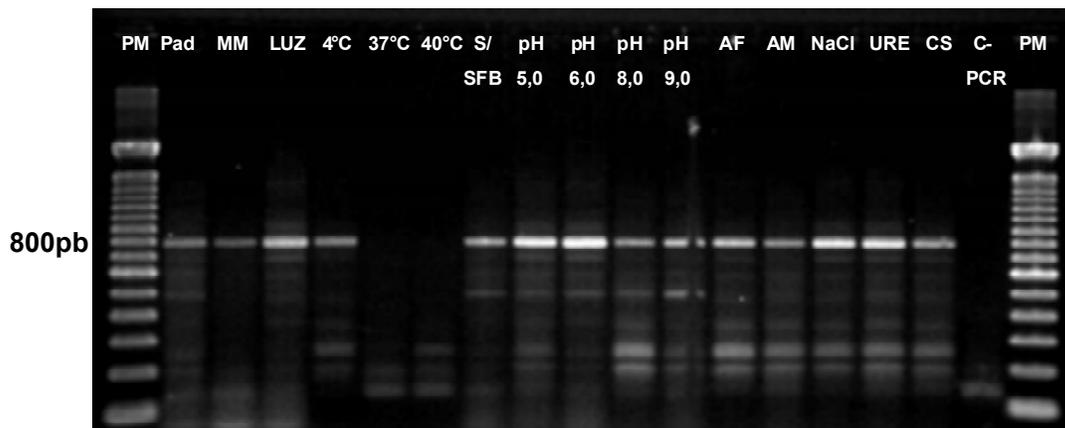
A RT-PCR gerou preferencialmente as extremidades transcritas e não traduzidas dos genes (5' UTR), as quais foram sequenciados indistintamente. Com este procedimento, esperávamos detectar genes que poderiam ter os sítios de *trans splicing* alterados pelos efeitos da tensão físico-química.

Assim responderemos a questão proposta inicialmente: quais genes respondem em níveis elevados a cada condição de tensão imposta às células em meio de cultura.

**A**



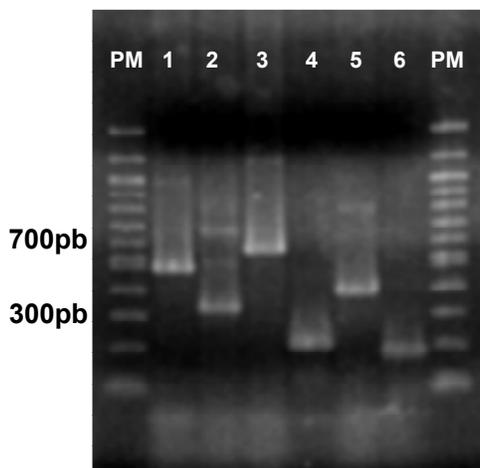
**B**



**Figura 4.8 - A:** Gel de agarose 1,5% dos produtos de RT-PCR da espécie *T. cruzi* clone CL-Brener submetida a tensões físicas, químicas e nutricional. **B:** Gel de Agarose 1,5% dos produtos de RT-PCR da espécie *B. culicis* submetida a tensões físicas, químicas e nutricional (**Pad:** condição padrão; **MM:** Meio Mínimo; **LUZ:** luz branca; **S/SFB:** Meio BHI sem Soro Fetal Bovino; **AF:** Ácido Fumárico; **AM:** Ácido Maleico; **URE:** Uréia; **CS:** Citrato de Sódio; **PM 100pb:** Peso Molecular).

Após a clonagem e a obtenção dos clones foi realizada a técnica de PCR colônia para extração do plasmídeo. Através de gel de agarose a 1,5% conferimos a eficiência da reação de PCR colônia observando a presença ou não de inserto nos plasmídeos amplificados pela diferença de pares de bases entre o plasmídeo com

inserto (Fig. 4.9) e o plasmídeo controle sem o inserto. Nesta figura já podemos observar a presença de fragmentos (insertos) de diferentes tamanhos (de 300 a 700 pb).



**Figura 4.9:** Gel de agarose 1,5% dos produtos da PCR colônia de seis clones. (PM: peso molecular; 1-5: clones com fragmentos de diferentes tamanhos obtidos de condição padrão de crescimento de *T. cruzi* CL-Brener; 6: clone controle sem inserto, somente plasmídeo com aproximadamente 200pb)

Tais fragmentos foram levados diretamente ao sequenciamento.

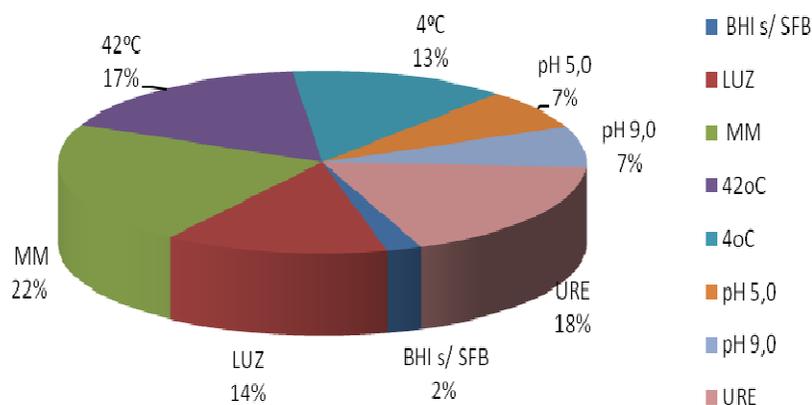
Foram seqüenciados 1.041 clones diretamente do produto de PCR colônia, gerando ao final da edição e alinhamento, um total de 722 seqüências das duas espécies, *T. cruzi* CL-Brener e *B. culicis* sob condições de tensão e da espécie *B. culicis* também em condição padrão de crescimento.

Obtivemos seqüências de 278 clones de RT-PCR da espécie *T. cruzi* CL-Brener, sendo 6 na condição de meio BHI sem SFB, 38 na condição de luz branca fluorescente, 61 em estresse nutricional do meio mínimo, 46 a 42°C e 37 a 4°C, extremos de temperatura, 20 em cada extremo de pH 5,0 e pH 9,0 e por fim 50 em

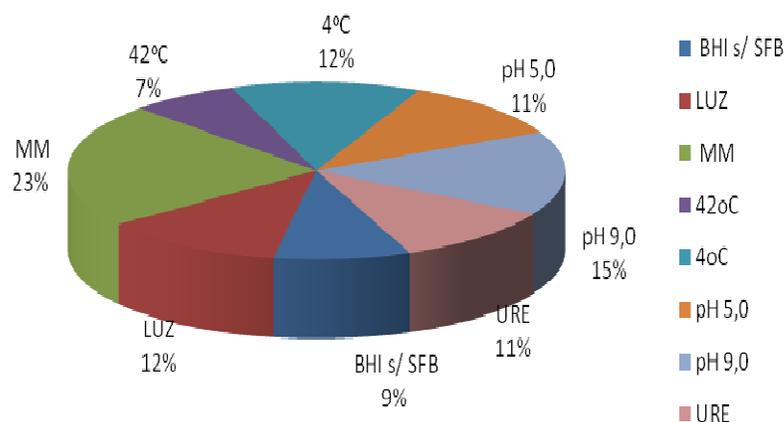
presença de Uréia no meio (representando os agentes químicos testados na máxima concentração suportada) (Fig. 4.10).

No caso de *B. culicis*, foram obtidas 316 sequências de fragmentos de RT-PCR clonados das condições de tensão utilizadas. No total foram 30 na condição de meio BHI sem SFB, 22 na luz branca, 73 em estresse nutricional no Meio mínimo, 22 a 42°C e 39 a 4°C, 43 em pH 5,0 e 47 em pH 9,0 e finalmente 40 em presença de uréia no meio (Fig. 4.11).

Também foram obtidas 128 sequências de *B. culicis* em condição padrão de crescimento, como parâmetro de comparação com as condições de estresse e também como geração de ESTs de uma espécie monoxênica que possui ainda pouca informação depositada em banco de dados.



**Figura 4.10:** Porcentagem de clones sequenciados a partir dos fragmentos amplificados por RT-PCR com iniciador arbitrário de *T. cruzi* CL-Brener obtidos de cada condição de tensão física e química (Total: 278).



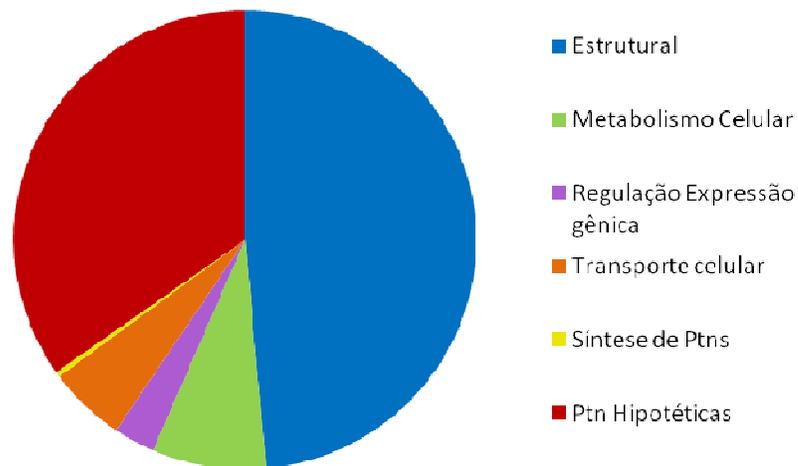
**Figura 4.11:** Porcentagem de clones sequenciados a partir dos fragmentos amplificados por RT-PCR com iniciador arbitrário de *B. culicis* obtidos em cada condição de tensão física e química. (Total: 316)

#### 4.4 - Identificação dos genes codificados por busca BLAST.

Após o alinhamento das sequências das duas espécies, foram feitas buscas de identificação destas por BLAST (NCBI).

As tabelas com a listagem de todos os genes encontram-se em anexo.

Ao final, obtivemos um total de 182 sequencias identificadas no banco de dados (72 genes sem a redundância) e 96 sequencias identificadas como genes hipotéticos presentes no genoma de *T. cruzi* CL-Brener. Ao classificar o total de genes obtidos, observou-se que 48,5% desses estão relacionados a funções estruturais na célula do protozoário, enquanto o metabolismo (7,9%), transporte celular (5,4%), regulação da expressão gênica (2,9%) e síntese de proteínas (0,4%) representam apenas 17,3% da transcrição revelada. A outra grande parte dos genes (34,5%) foram identificados como proteínas hipotéticas de *T. cruzi*. (Fig. 4.12)



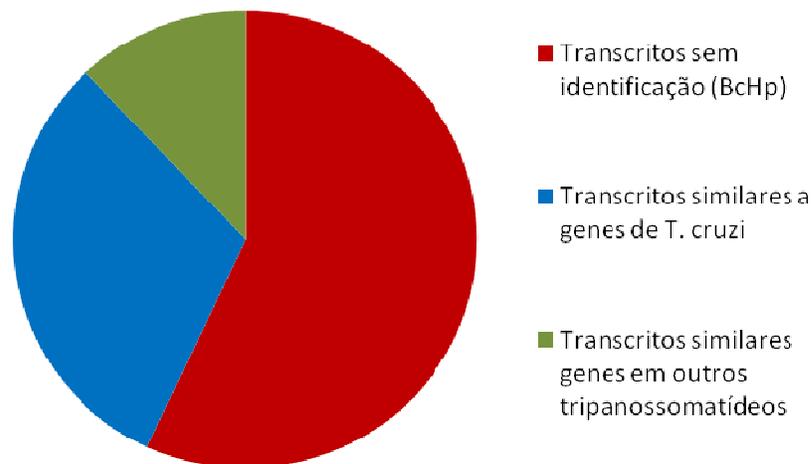
**Figura 4.12:** Classificação funcional das ESTs de *T. cruzi* CL-Brener mostrando a proporção de genes encontrados com a metodologia utilizada, de acordo com a sua possível função biológica. Um total de 278 ESTs foram classificadas em 6 categorias.

Os principais genes detectados foram de superfície celular, como mucinas, trans-sialidases, gp85, gp63 e TASV-C. Além de, em menor quantidade, encontramos genes regulatórios da expressão gênica como a proteína ligadora de RNA Pumillio, e pequenas ribonucleoproteínas nucleares.

Para a espécie monoxênica *B. culicis* foram obtidas 316 sequências, das quais 180 não foram identificadas em banco de dados por não haver ainda sequências genômicas disponíveis desta espécie e nem informações de transcritos (ESTs). Por tal motivo, denominamos neste trabalho estas sequências encontradas de BcHp (*Blastocrithidia culicis* proteína hipotética).

Do total sequências de *B. culicis* 98 foram identificadas apresentando similaridade com genes de *T. cruzi* CL-Brener e as demais 38 mostraram alguma semelhança com sequências contidas em cromossomos (não mapeamos o gene) de outros tripanossomatídeos como espécies de *Leishmania* sp.

Estas sequências que apresentaram similaridade com sequência de genes de outros tripanossomatídeos foram selecionadas de acordo com critério de *E-value* a partir de  $10E^{-3}$  e cobertura acima de 25%.



**Figura 4.13:** Classificação das ESTs geradas de *B. culicis*. Um total de 316 ESTs foram divididas em 3 categorias, conforme a identificação em banco de dados.

Após exclusão das sequências redundantes obtivemos 79 diferentes sequências de *B. culicis* nas condições de tensão utilizadas, e destas, apenas 16 também foram encontradas no grupo de sequências obtidas do protozoário na condição padrão de crescimento (37 sequências sem redundância, do total de 129 editadas e alinhadas) (Fig. 4.13).

A grande maioria das sequências geradas para *B. culicis* não foram identificadas, ou seja, possivelmente não possuem similaridade com outros tripanossomatídeos. Observamos também a presença de grande parte dos principais genes encontrados em *T. cruzi*, como mucinas (maioria), TASV antígeno de superfície, gp63 e serina carboxipeptidase. Isto é um indicativo de que *B. culicis* pode apresentar muitos genes específicos.

Das sequências obtidas de *B. culicis* sob diferentes tensões, apenas 30% mostraram similaridade com genes de *T. cruzi* CL-Brener.

Ao sequenciar cDNAs amplificados de fragmentos de RT-PCR obtidos com oligonucleotídeo derivado da sequência conservada do mini-exon de 39 nt (no caso 22 bases centrais: ME2. (5' CGCTATTATTAGAACAGTTTCT 3') ancoramos todas as

sequências obtidas na região 5' do RNA. Consequentemente, seria possível determinar o início da 5'UTR de cada gene cujo transcrito foi detectado.

Com isso observamos que apesar de conservado entre as espécies de tripanossomatídeos, o mini-exon apresenta em *B. culicis* mutações em sua sequência, principalmente nas suas 8 bases finais (5' CTATATTG 3' alterada para 5' CTTTAAAG 3'). Assim, nas sequências de *B. culicis* foram encontradas as duas variações da sequência de mini-exon, a característica de *T. cruzi* e outra, ainda não descrita e nem depositada em banco de dados (5' CTTTAAAG 3').

Ao comparar as sequências obtidas após edição e alinhamento dos fragmentos clonados, observamos que 17 genes eram transcritos concomitantemente nas duas espécies, *T. cruzi* e *B. culicis*. Nove genes apresentaram sítios de trans splicing adicionais em condições de tensão, sendo que quatro deles aparecem nas duas espécies, quatro apenas em *T. cruzi* CL-Brener e um em *B. culicis* em condição padrão de crescimento (Tabela 4.3).

**Tabela 4.3:** Lista de genes cujos transcritos foram detectados em *T. cruzi* e *B. culicis* nas condições de tensão físicas, químicas e nutricionais. (genes em comum). (TS: trans splicing)

Identificação	Acesso GenBank	Tensão		Sítios adicionais de Trans splicing
		<i>T. cruzi</i>	<i>B. culicis</i>	
<b>Mucina 2</b> <i>T. cruzi</i> CL	XM_814040.1	MM; URE; 42°C; 4°C; LUZ; pH 5,0; pH 9,0	BHI; MM; 4°C, 42°C; LUZ; pH 9,0	BC.(4°C, BHI), TC (42°C, MM)
<b>Mucina</b> <i>T. cruzi</i> CL	XM_806542.1	URE	MM; 4°C; 42°C	
<b>Ptn mucina-like</b> <i>T. cruzi</i> CL	AF036450.1	URE; pH 5,0	4°C; 42°C; LUZ; pH 9,0	
<b>Ptn mucina-like</b> <i>T. cruzi</i> CL	AF036441.1	42°C; URE	4°C	TC URE
<b>Ptn Hipotética 30</b> <i>T. cruzi</i> CL	XM_801496.1	MM; pH 5,0, LUZ; URE	BHI; 4°C	TC URE

<b>Serina carboxipeptidase <i>T. cruzi</i> CL</b>	XM_797910.1	MM; URE	BHI; MM; pH 9,0	
<b>Antígeno de superfície TASV-<i>C T. cruzi</i> CL</b>	AM492204.1	MM; LUZ; 42°C; 4°C; pH 5,0	4°C	TC LUZ
<b>Antígeno de superfície TASV-<i>C T. cruzi</i> CL</b>	XM_804326.1	URE; S/SFB; pH 5,0; 42°C; MM	BHI; MM; pH 9,0; LUZ; 42°C	BC (BHI, MM, pH 9); TC (URE, BHI S/SFB, 42°C, pH 5,0)
<b>GP63 <i>T. cruzi</i></b>	XM_802023.1	pH 9,0; LUZ; 4°C	42°C	TC pH 9,0 e BC 42°C
<b>Ptn hipotética 10 <i>T. cruzi</i> CL</b>	XM_811864.1	MM	MM	TC MM
<b>Ptn hipotética 12 <i>T. cruzi</i> CL</b>	XM_802330.1	URE; MM; 42°C; pH 5,0	BHI; 4°C; 42°C; pH 9,0; LUZ	BC BHI
<b>Ptn hipotética 1 <i>T. cruzi</i> CL</b>	XM_810829.1	MM; LUZ; 4°C, URE	4°C	
<b>Ptn hipotética 24 <i>T. cruzi</i> CL</b>	XM_812957.1	MM; 4°C; 42°C; pH 5,0; pH 9,0	MM; pH 9,0	Sítios add de TS (4) em todos (exceto em TC MM e BC pH 9,0)
<b>Ptn hipotética 28 <i>T. cruzi</i> CL</b>	XM_814408.1	4°C; 42°C; URE	4°C	
<b>Ptn hipotética 3 <i>T. cruzi</i> CL</b>	XM_813454.1	MM; 42°C,	pH 9,0	
<b>Ptn hipotética <i>T. cruzi</i> CL</b>	XM_813614.1	URE	pH 9,0	
<b>Ptn hipotética <i>T. cruzi</i> CL</b>	XM_805338.1	URE; MM	pH 9,0	

Ao comparar os genes transcritos (porcentagem de sequências obtidas) e identificados nas duas espécies em cada condição de tensão à qual estas foram submetidas, vemos que na condição de tensão de crescimento em meio BHI sem acréscimo de SFB (Fig. 4.14) *T. cruzi* CL-Brener apresentou maior quantidade do

gene da proteína de superfície TASV-C2, enquanto em *B. culicis* a sequência BcHp 9 foi largamente encontrada.

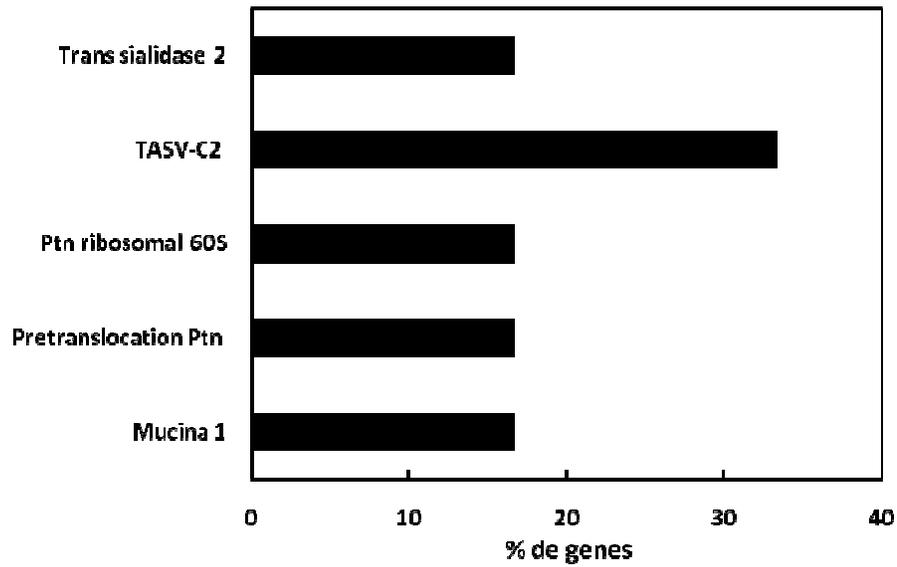
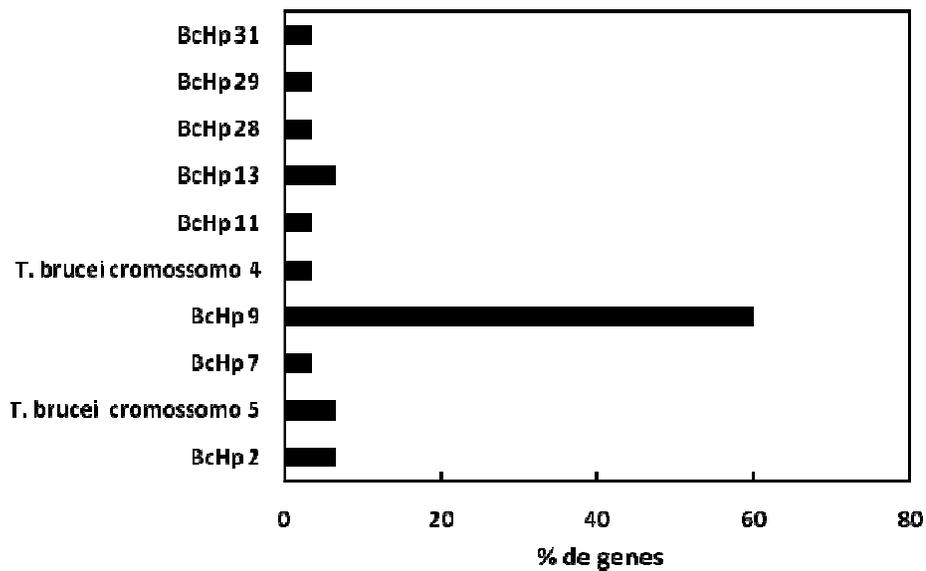
Na condição de crescimento em tensão com incidência de luz fluorescente branca (Fig. 4.15), o gene mais observado em *T. cruzi* foi a sequência da proteína hipotética 1, seguida do antígeno de superfície TASV-C2. Já em *B. culicis* destacaram-se o gene de mucina e duas sequências hipotéticas, BcHp 11 e BcHp 7.

Com a condição de tensão de estresse nutricional no Meio mínimo (Fig. 4.16), encontramos em *T. cruzi* alta porcentagem de duas cópias do gene da mucina seguida de serina carboxipeptidase. Em *B. culicis* na mesma condição observamos predominância de BcHp 2.

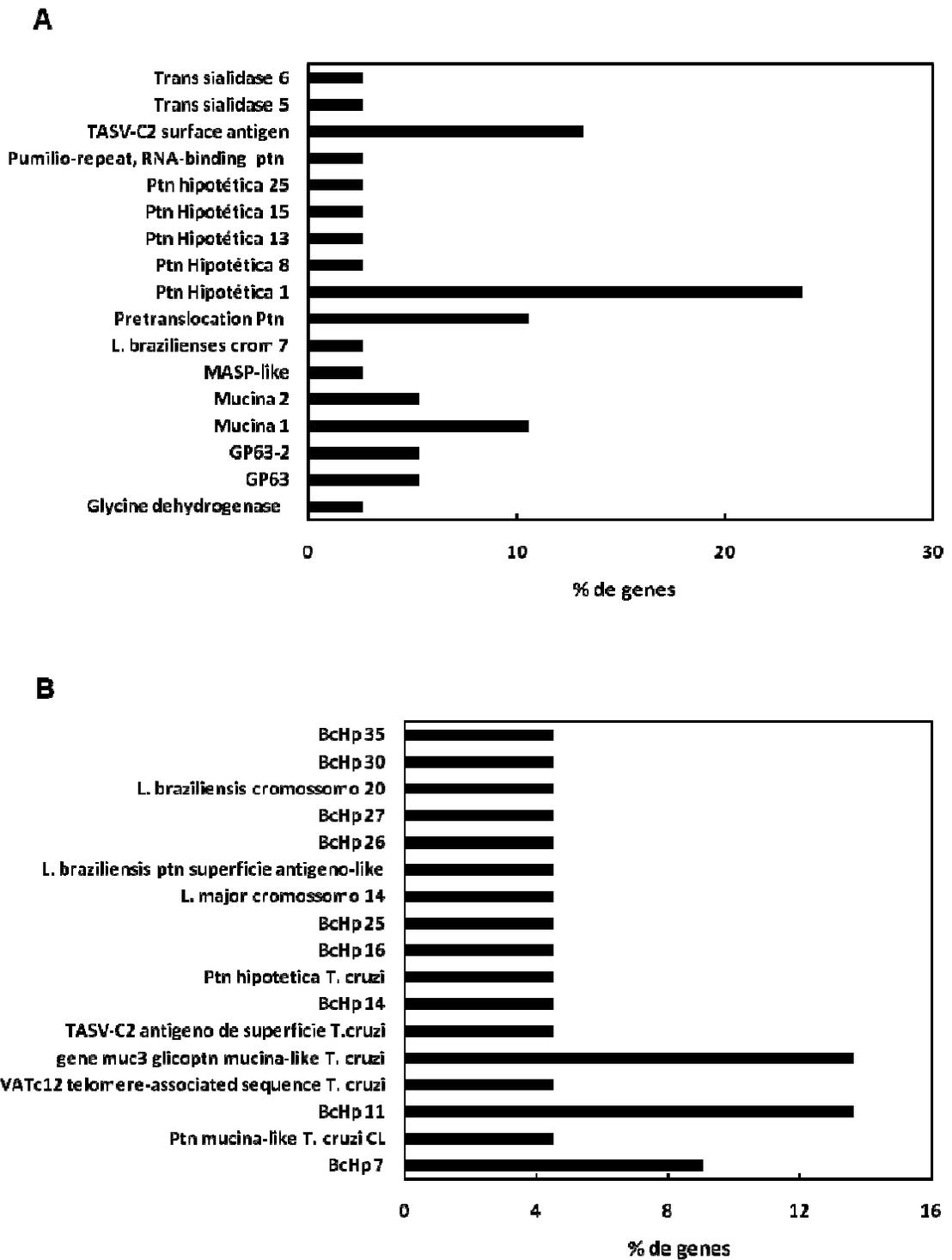
Na tensão induzida pelo crescimento a 42°C (Fig. 4.17) *T. cruzi* apresentou maior quantidade de duas cópias do gene da mucina, da mesma forma que em *B. culicis* o gene da mucina apresentou mais transcritos. Ao crescer a 4°C (Fig. 4.18), *T. cruzi* apresentou maior quantidade da proteína ribossomal 60S, proteína hipotética 28 e da cópia 3 de TASV-C2, enquanto em *B. culicis*, foi visto a predominância do gene da mucina mais uma vez.

Na condição de crescimento com alteração do pH do meio BHI para pH 5,0 (Fig. 4.19), observamos em *T. cruzi* a presença em maior quantidade do gene da proteína pré-translocamento e da cópia 2 da mucina. Em *B. culicis* na mesma condição encontramos alta quantidade da sequência BcHp 9. Ao modificarmos o pH do meio para o outro extremo, pH 9,0 (Fig. 4.20), *T. cruzi* apresentou igual quantidade de proteína hipotética 24, cópia 4 da trans sialidase, cópia 1 da mucina e gp63 cópia 2. Em *B. culicis* o gene da mucina foi predominante.

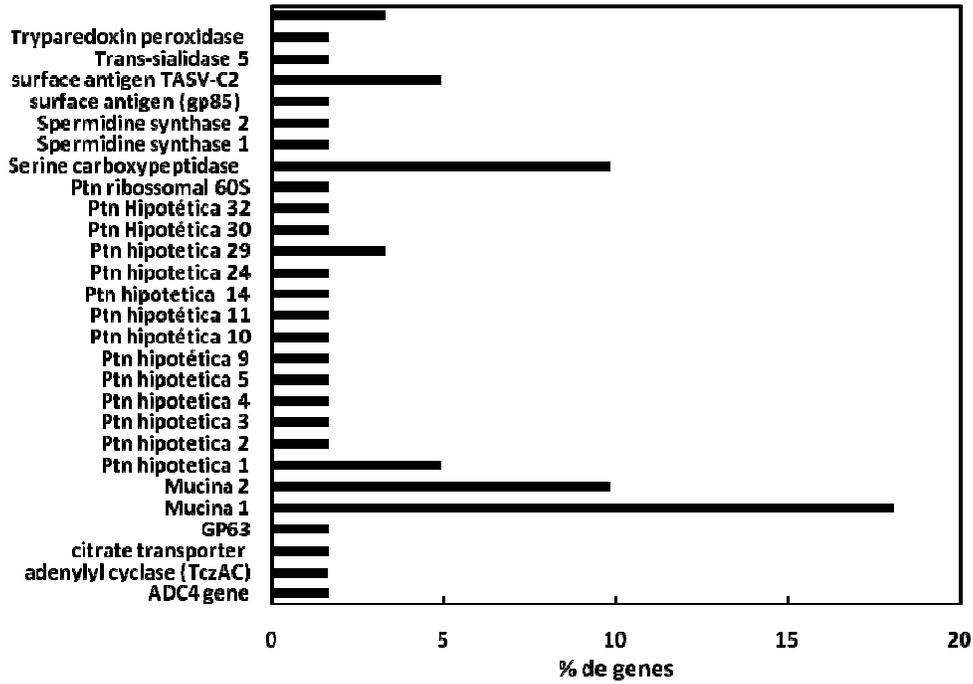
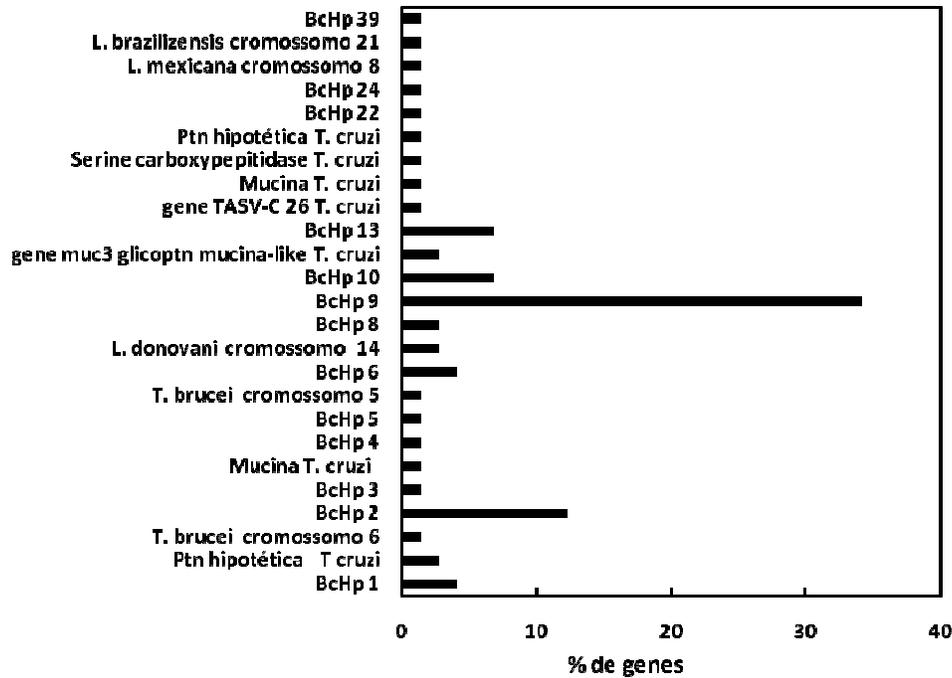
Na última condição de tensão testada, com adição de uréia ao meio na concentração de 300mM (Fig. 4.21), observamos em *T. cruzi* mais sequências da proteína hipotética 28, de mucinas (duas cópias diferentes) e serina carboxipeptidase. Em *B. culicis* destacaram-se dois genes, BcHp 9 e BcHp 11.

**A****B**

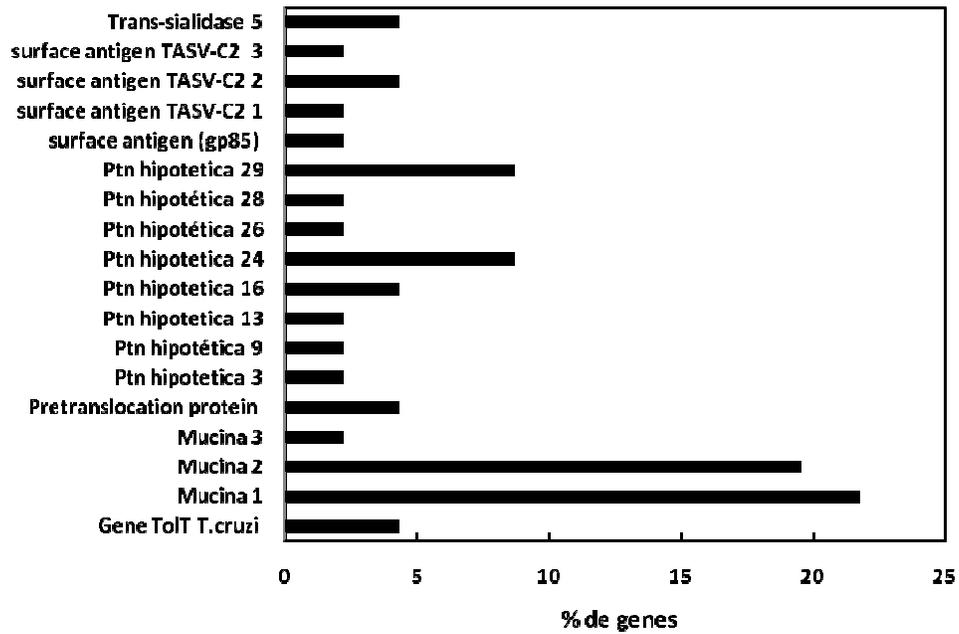
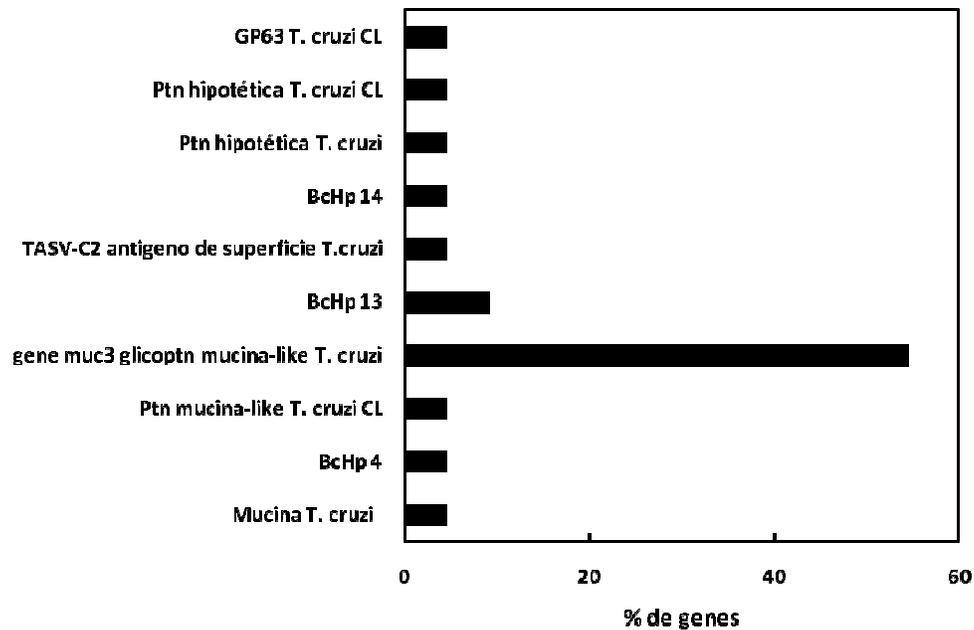
**Figura 4.14:** Porcentagem de seqüências de genes transcritos (identificados por busca BLAST- NCBI) na condição de tensão do meio BHI sem SFB. **A** – *T. cruzi* CL-Brener; **B** – *B. culicis* (BcHp: seqüência hipotética de *B. culicis*)



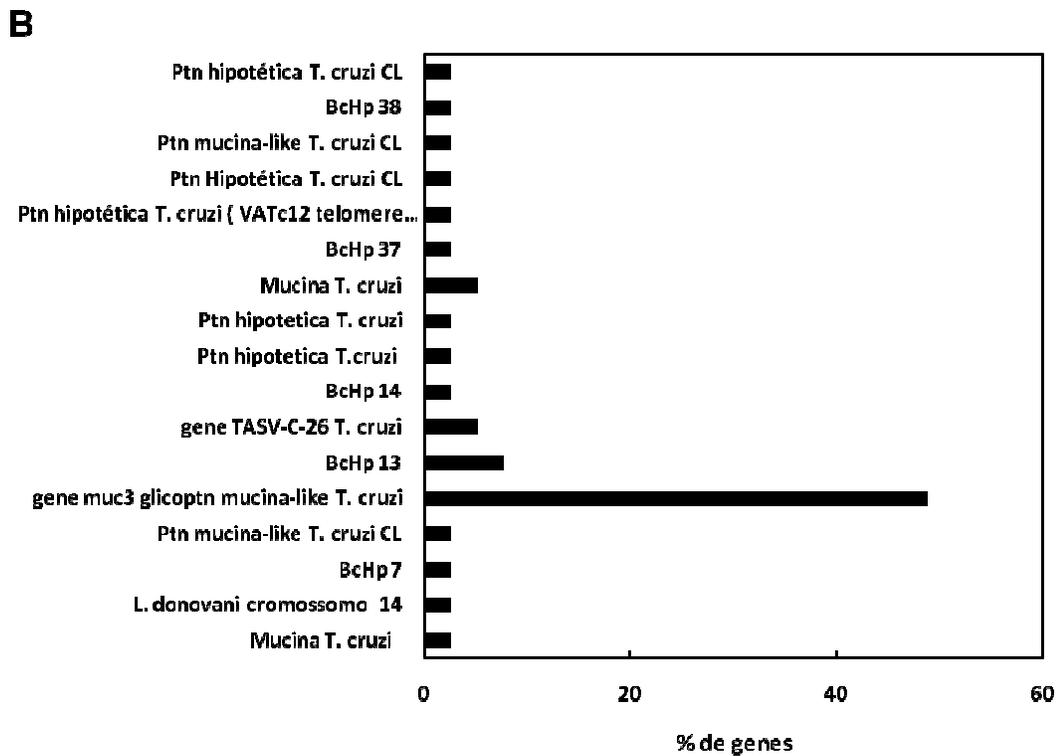
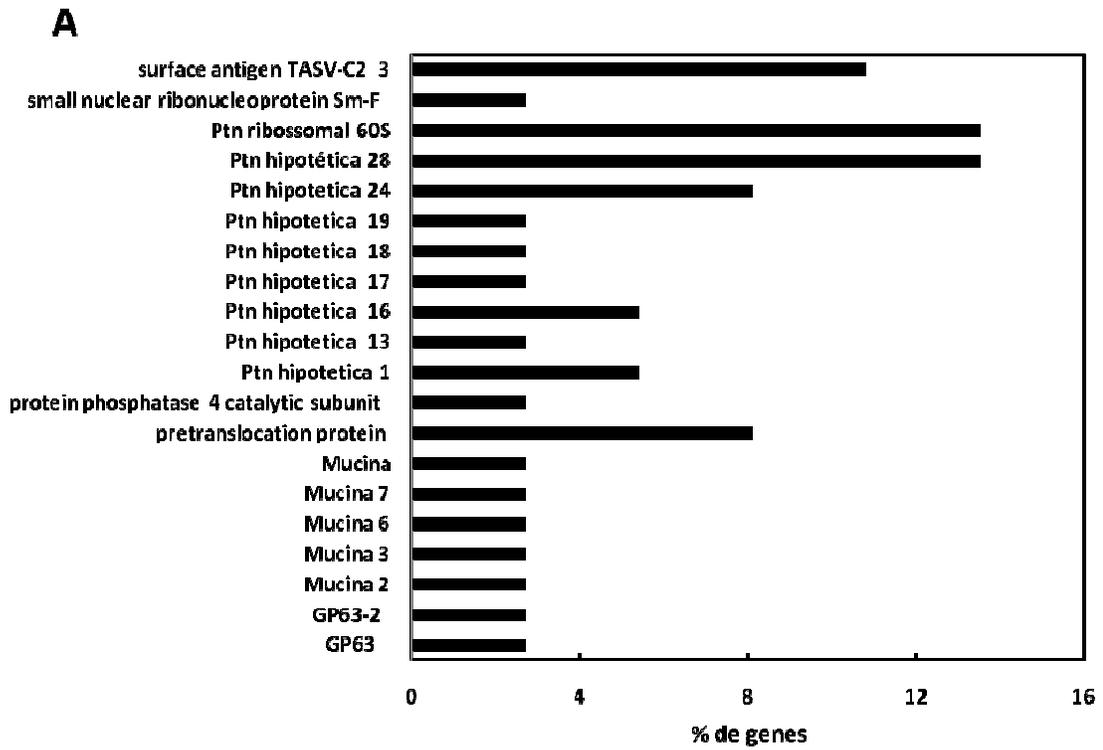
**Figura 4.15:** Porcentagem de seqüências de genes transcritos na condição de tensão de incidência de luz fluorescente branca. **A** – *T. cruzi* CL-Brener; **B** – *B. culicis*

**A****B**

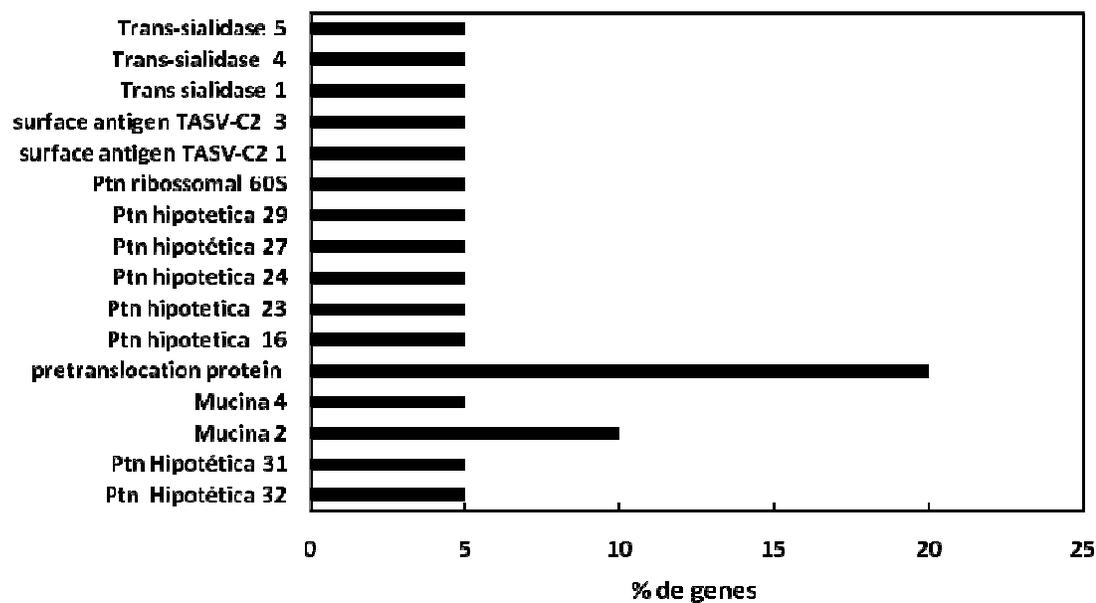
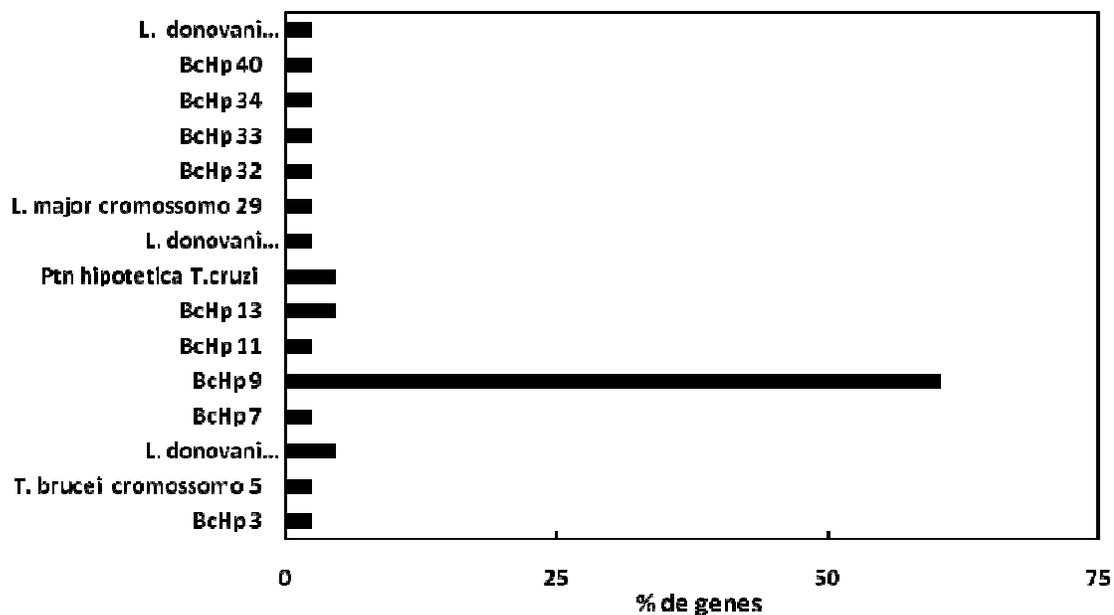
**Figura 4.16:** Porcentagem de seqüências de genes transcritos na condição de tensão nutricional imposta pelo crescimento em Meio Mínimo (Ávila *et al*, 1983). **A** – *T. cruzi* CL-Brener; **B** – *B. culicis*.

**A****B**

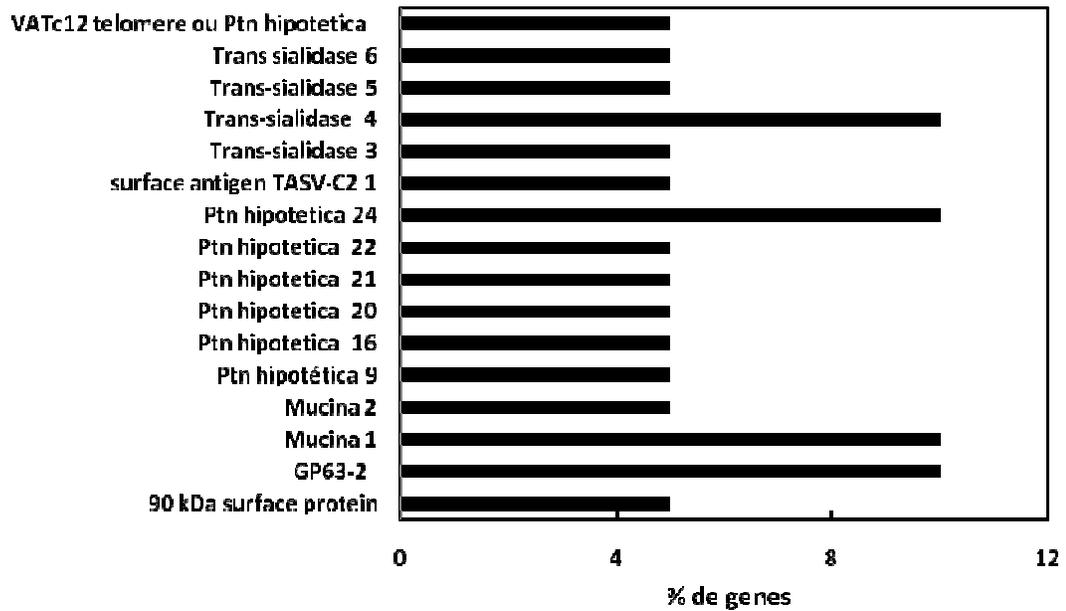
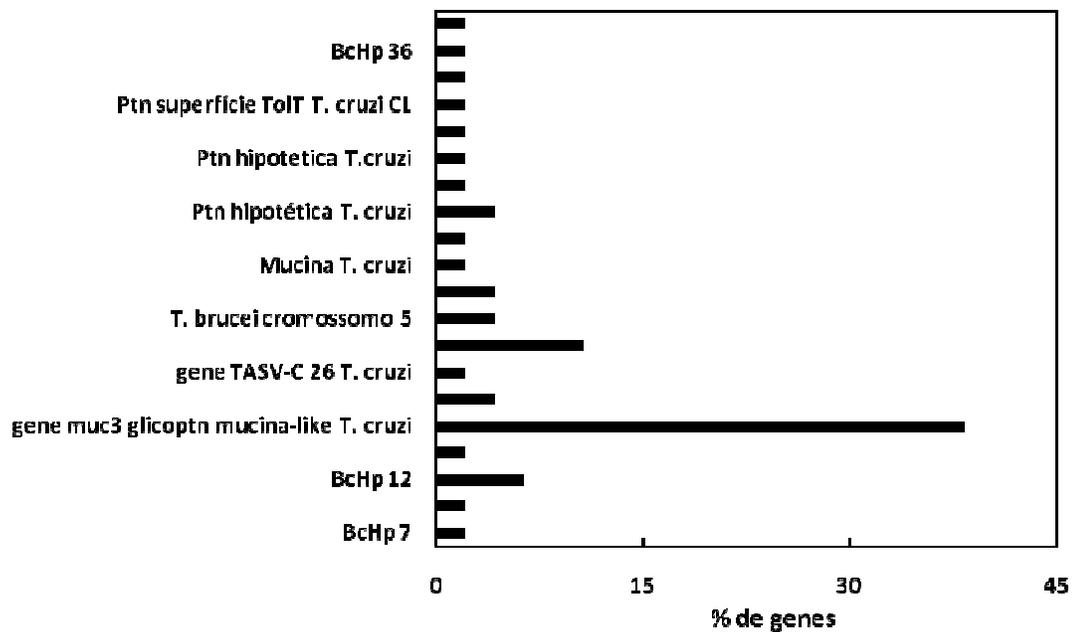
**Figura 4.17:** Porcentagem de seqüências de genes transcritos na condição de tensão de crescimento a 42°C. **A** – *T. cruzi* CL-Brener; **B** – *B. culicis*.



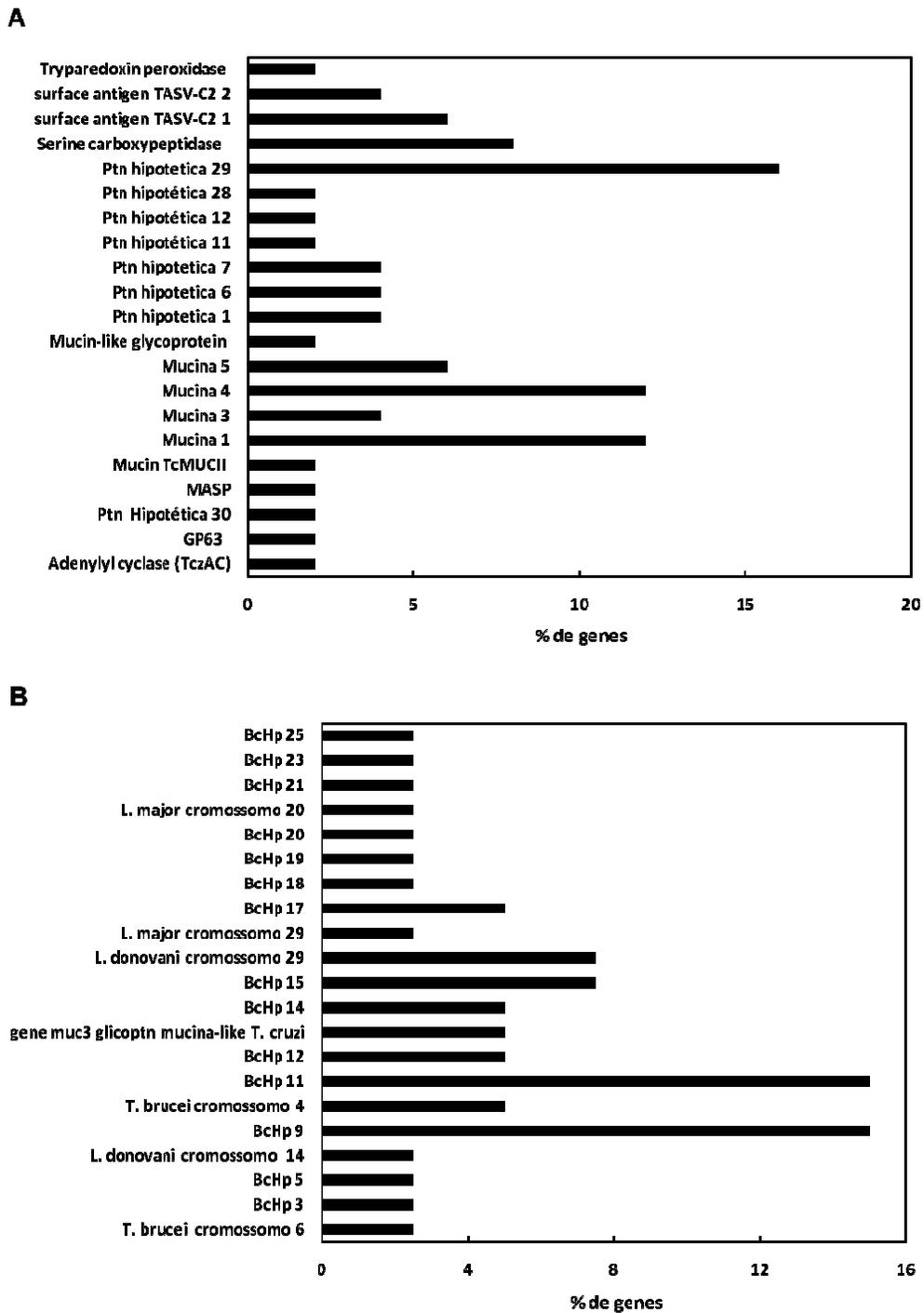
**Figura 4.18:** Porcentagem de seqüências de genes transcritos na condição de tensão de crescimento a 4 °C. **A** – *T. cruzi* CL-Brener; **B** – *B. culicis*.

**A****B**

**Figura 4.19:** Porcentagem de seqüências de genes transcritos na condição de tensão de meio BHI com pH alterado para 5,0. **A** – *T. cruzi* CL-Brener; **B** – *B. culicis*.

**A****B**

**Figura 4.20:** Porcentagem de seqüências de genes transcritos na condição de tensão de meio BHI com pH 9,0. **A** – *T. cruzi* CL-Brener; **B** – *B. culicis*.

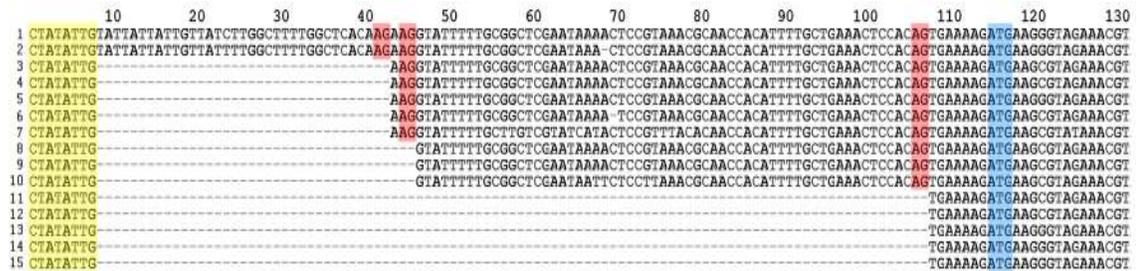


**Figura 4.21:** Porcentagem de seqüências de genes transcritos em condição de tensão de crescimento me meio BHI acrescido de Uréia 300mM (máxima concentração suportada pelo tripanosomatídeo). **A** – *T. cruzi* CL-Brener; **B** – *B. culicis*.

#### **4.5 – Identificações de sítios adicionais de Trans splicing**

Ao alinhar as sequências, observamos que muitas possuíam variados tamanhos do mesmo transcrito. Analisando-as como situações de uso de sítios adicionais de trans splicing (sítios AG aceptores da sequência do mini-exon), vimos que a sua ocorrência tanto em *T. cruzi* CL-Brener como em *B. culicis*.

No gene hipotético mostrado na figura 4.22 encontramos diferentes transcritos gerados a partir do uso pelos protozoários dos diferentes sítios adicionais de trans splicing, marcados pelo dinucleotídeo AG, acceptor da sequência do mini-exon.



**Figura 4.22:** Alinhamento de gene hipotético para análise de sítios adicionais de trans splicing detectados em sequências e *T. cruzi* e *B. culicis* geradas em crescimento sob condições de tensão física, química e nutricional. (1. *T. cruzi* Meio mínimo; 2. *B. culicis* pH 9,0; 3. *T. cruzi* 4 °C; 4. *T. cruzi* 42 °C; 5. *T. cruzi* pH 9,0; 6. *T. cruzi* pH 5,0; 7. *B. culicis* Meio Mínimo; 8. *B. culicis* 42 °C; 9. *T. cruzi* 42 °C; 10. *T. cruzi* 4 °C; 11. *B. culicis* pH 9,0; 12. *T. cruzi* pH 9,0; 13. *T. cruzi* 42 °C; 14. *T. cruzi* 42 °C; 15. *T. cruzi* 4 °C) Em amarelo sequência final do mini-exon; colunas vermelhas marcam os sítios AG utilizados e coluna azul realça o códon ATG que marca o início da ORF.

Oito genes em *T. cruzi* apresentaram utilização destes diferentes sítios (Tabela 4.4), enquanto *B. culicis* variou os transcritos em apenas três genes (Tabela 4.5).

**Tabela 4.4:** Identificação e caracterização dos sítios adicionais de trans splicing em sequências de *T. cruzi* CL-Brener. Colunas: Identificação do gene por BLAST; número de sítios adicionais encontrados na sequência de cDNA; condição de tensão na qual foi encontrado o cDNA; se é um sítio canônico (AG) ou não, número de cópias sequenciadas e a distância da inserção do mini-exon ao sítio acceptor. (LUZ: luz branca fluorescente; MM: Meio mínimo; URE: Uréia)

Gene	Nº de sítios	Tensão	Sítio	Sítio utilizado	Nº de cópias	Distância (nt)
<b>GP63</b>	2	LUZ; pH 5,0	AG	2º	2	48
<b>Ptn Hipotética 30</b>	2	URE	CA	2º	1	20
<b>Pretranslocation protein</b>	2	pH 5,0; 4 °C	AG	2º	2	9
<b>Ptn hipotética 9</b>	2	pH 9,0; 42 °C	AG	2º	2	19
<b>Ptn hipotética 13</b>	2	LUZ	AG	2º	1	19
<b>Ptn hipotética 24</b>	4	pH 5,0; pH 9,0; 4 °C; 42 °C; MM	AG	todos	10	35; 38; 100
<b>surface antigen TASV-C2</b>	3	BHI s/SFB; URE; pH 5,0; LUZ; 42 °C	AG	3º	2	19; 14
<b>Mucina 2</b>	2	42 °C; MM	AG	2º	2	5
<b>VATc12 telomere ou Ptn hipotetica</b>	2	pH 9,0	AG	2º	1	32

Comparamos as sequências de ESTs obtidas nas condições de tensão (alteradas pela utilização de sítios adicionais de trans splicing) com as ESTs do banco de dados NCBI (dbEST), em sua maioria encontrados sob condição padrão de crescimento (Fig. 4.23). Em cinco dos nove genes que apresentaram sequências distintas por utilizar também outros sítios de trans splicing (Tabela 4.6), não foi encontrada nenhuma sequência de EST semelhante depositada.

Assim, para as proteínas hipotéticas (4) e para “pretranslocation protein” que realizaram trans splicing, não foram encontradas ESTs semelhantes no banco de dados (controle).

1- TTGATTGTTGGGCTTACCA <b>AG</b> GGCGTTGTTGCTGCCGTCGTCGCCGTCTTTCTCCCTGTCTCTCTGT
2- GGCGTTGTTGCTGCCGTCGTCGCCGTCTTTCTCCCTGTCTCTCTGT

**Figura 4.23:** Exemplo de dois diferentes transcritos (ESTs) obtidos pela metodologia aplicada sob condições de tensão. Neste caso, para o gene da proteína hipotética 30 (ID: GW883736. 1) apenas foi identificada a sequência 1 na condição padrão de crescimento (dbEST- NCBI), e não foram encontrados registros no banco de dados do transcrito 2 gerado quando a célula foi submetida a condições de tensão.

Em *B. culicis*, ao comparar as sequências dos genes que apresentaram utilização de sítio adicional de trans splicing nas condições de tensão com as sequências obtidas sob condição padrão de crescimento (meio BHI com 10% SFB a 28°C), não foram encontradas sequências semelhantes. Ao buscar no banco de dados de EST por BLAST (dbEST) também não encontramos ESTs semelhantes depositadas.

**Tabela 4.5:** Identificação e caracterização dos sítios adicionais de trans splicing em sequências de *B. culicis*. Colunas: Identificação do gene por BLAST; número de sítios adicionais encontrados na sequência de cDNA; condição de tensão na qual foi encontrado o cDNA; se é um sítio canônico (AG) ou não, número de cópias sequenciadas e a distância da inserção do mini-exon ao sítio acceptor. (LUZ: luz branca fluorescente; MM: Meio mínimo; URE: Uréia)

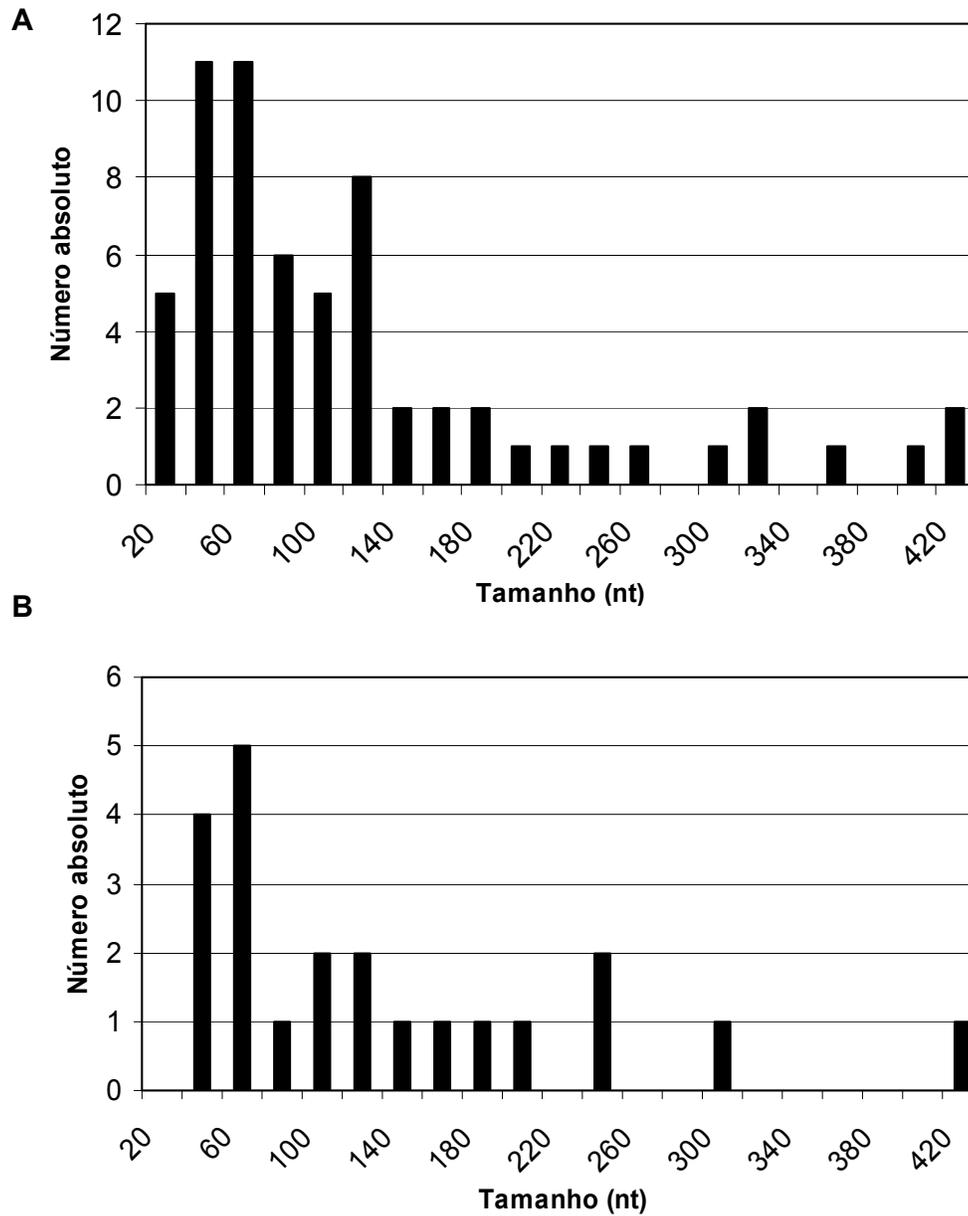
Gene	Nº sítios	Tensão	Sítio	Sítio utilizado	Nº de cópias	Distância (nt)
<b>BcHp 11</b>	2	URE; pH 5,0; LUZ; BHI/ s/SFB	AG	2º	10	24
<b>gene TASV-C 26 (<i>T. cruzi</i>)</b>	2	MM; pH 9,0	AG	2º	2	19
<b>Ptn hipotética 16 (<i>T. cruzi</i>)</b>	4	MM; 42 °C; pH 9,0	AG	todos	3	35; 38; 98

Nos genes em comum, transcritos pelas duas espécies nas condições de tensão, quatro deles apresentaram diferentes transcritos.

Com a estratégia utilizada na amplificação, pela RT-PCR, de utilizar o oligonucleotídeo do mini-exon, ancoramos os fragmentos na região 5' do transcrito, obtendo a 5'UTR e parte da ORF das sequências clonadas. Assim, mapeamos a 5'UTR dos genes encontrados identificados por BLAST contra o genoma de *Trypanosoma cruzi* CL-Brener.

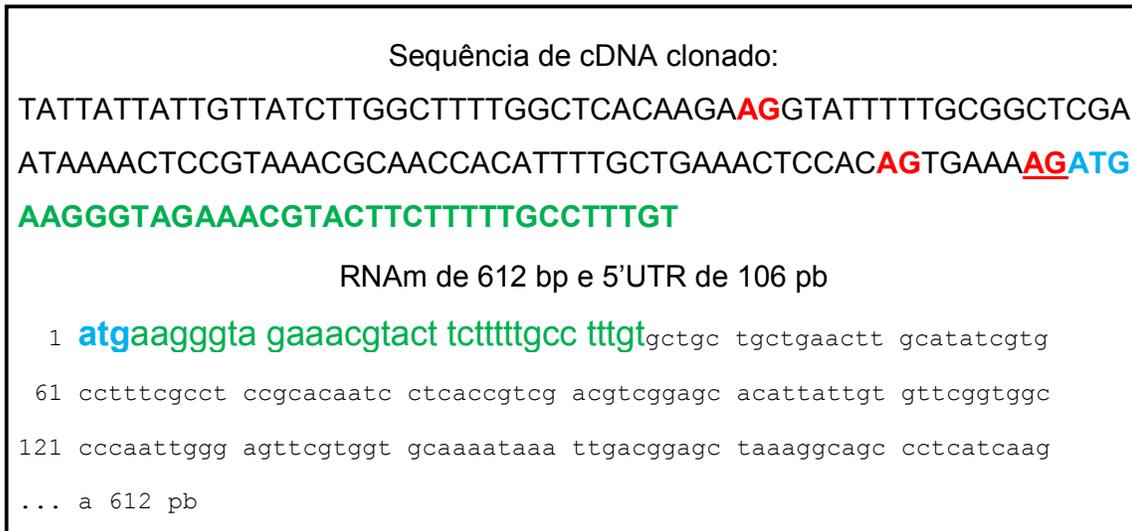
O tamanho das 5' UTRs foi estimado a partir do final do mini-exon, o qual é inserido na sequência genômica imediatamente após o sítio dinucleotídico acceptor do mini-exon (AG), até o códon de início da ORF (ATG). Foram encontradas 5'UTRs de diferentes tamanhos, variando entre 10 e 420 nucleotídeos.

Nos histogramas abaixo mostramos o tamanho das 5' UTRs das sequências expressas sob tensão das duas espécies, *T. cruzi* e *B. culicis*. Aproximadamente 60% das 5' UTRs das duas espécies são compostas por até 100 nt (Fig. 4.24 A,B). As maiores 5'UTRs foram observadas, em grande parte, nos genes que realizaram trans splicing alternativo, segundo nossos resultados e nas condições expostas.



**Figura 4.24:** Histogramas representando o tamanho em nucleotídeos das 5'UTRs estimadas a partir das sequências das células de *T. cruzi* (A) e *B. culicis* (B) geradas sob tensão.

No exemplo da figura 4.25 mostramos a 5' UTR do gene hipotético de *T. cruzi* identificado por BLAST composta por 106 pb, para um gene com um total de 612 pb. Também observamos possíveis sítios adicionais de trans splicing presentes na sequência desta UTR (3 sítios canônicos AG).



**Figura 4.25:** Mapeamento 5'UTR do gene hipotético do cromossomo 11 de *T. cruzi* CL-Brener (início 5'UTR posição 260507 a 260613) BLAST - NCBI Sequência referência: XM\_812957.1 (Proteína Hipotética 24 de *T. cruzi* CL-Brener). Em vermelho: possíveis sítios adicionais de trans splicing; AG: sítio acceptor utilizado. Em azul: ATG: início da ORF do gene. Em verde: sequência do cDNA mapeada na sequência genômica.

Muitas sequências deste trabalho (cDNAs) encontravam-se inseridas após o início da fase aberta de leitura (ORF) de genes identificados na seção do NCBI de sequências referenciais do genoma de *Trypanosoma cruzi* (RefSeq – XM). Esta observação sugere a ocorrência de trans splicing alternativo, com a possibilidade de tradução de duas diferentes proteínas a partir do mesmo gene. Para que este fenômeno seja confirmado, é preciso detectar diretamente as respectivas proteínas, por espectrometria de massa. Neste caso (Fig. 4.26) também foi revelado possível sítio adicional de trans splicing na 5' UTR deste gene.

Sequência de cDNA clonado (Tensão química: Uréia):

**ATTGTCTCACACTCGAGCGACTCTACGACGAATGATGATGGTGACTGTGCG  
GCGCTGCGTGGCGTGCGACCTGCTGGTCCTTGCGGTCTTGT**

RNAm de 1.443 pb e possíveis 5'UTRs de 393 pb (utilizando primeiro sítio adicional de trans splicing não canônico GG) e de 412 pb (utilizando o segundo sítio adicional de trans splicing canônico encontrado AG)

```
1 atgccatttg cctggcagac aacgcaatgt ggctccgctc ttggacaaat gtggggactt
61 ttacttgtcc tttgtgctgc ttctctttt cccgtgagac acgccgcaca cccaacgccc
121 acacaccgtc gttcctgctt gcgtatctcc tgcgggctcg gcaactcttc gcgggcgcgt
181 gccctccacg aggaacgcgc acccattccc ggttcccgga actgtagtta catccaccgg
241 agcctggggg ctacactgtt ctctccctc cccttttgtg tgcgtgtggg gtgctgggtg
301 ctgcttcacg accgtgtgtg tgtgtgtcac tgtagtgccg cacatttatt tctctcttgt
361 tgttgttgtt gttgtccttg cccactgtg tggattgtct cacacactcg agcgactcta
421 cgaogaatga tgatggtgac tgtgcggcgc tgcgtggcgt gcgacctget ggtccttgcc
481 ctcttgtgct gctgctgctt gtccgtctgc agggctactg cttcgggcgt gcgatctacc
541 gtgcgctcga caataatatt ggtggaggta gaagtgttga gtgcggagac tgacggtaag
... a 1.443 pb
```

**Figura 4.26:** Mapeamento da 5'UTR do gene hipotético de 1443 pb de *T. cruzi* CL-Brener (ou gene TASV-C2; BLAST: XM\_811895.1). Este caso apresenta o cDNA dentro da ORF anotada pelo genoma e ainda a existência de sítio adicional de trans splicing. (sítios não canônicos mais utilizados GT e GG). Em verde: sequencia do cDNA mapeada dentro da ORF genômica. Vermelho: sítios adicionais de trans splicing, Azul: códon iniciador da tradução ATG.

## 5 – Discussão

Ao utilizar uma nova abordagem metodológica, o presente trabalho teve como principal objetivo, visualizar e identificar alterações na transcrição de genes, quando os protozoários da família Trypanosomatidae são submetidos a diferentes tensões em meio de crescimento.

Foi realizada a comparação dos genes transcritos entre a condição padrão de crescimento (controle) e as condições alteradas (tensões) de cada espécie. Foram também obtidos os genes em comum utilizados nas condições de estresse (tensão física, química ou nutricional), pelas duas espécies, *Trypanosoma cruzi* e *Blastocrithidia culicis*. Espécies estas que possuem estilos de vida distintos, classificadas como heteroxênica e monoxênica, respectivamente.

A metodologia alternativa utilizada para a visualização e comparação de transcritos utilizados pelos protozoários em diferentes situações, através de RNA *fingerprinting* (Welsh *et al*, 1992), permitiu a obtenção de quase 1% dos transcritos de *T. cruzi* CL-Brener, quando incluímos o número total de cópias de cada gene encontrado. Segundo El sayed *et al* (2005) o genoma de *T. cruzi* CL-Brener mostrou ser composto por aproximadamente 12.000 genes.

Ao ancorar a amplificação na extremidade 5' dos RNAs e utilizar um oligonucleotídeo arbitrário, realizamos um corte do momento transcricional dos protozoários, obtendo a representação dos genes mais transcritos em situações de estresse para o protozoário. Os genes mais expressos não são necessariamente os genes específicos de determinada tensão, e sim genes mais transcritos nas condições gerais do meio enfrentadas pelos tripanossomatídeos.

Ao contrário de outras técnicas utilizadas para análises da expressão gênica, esta metodologia não tem como alvo a totalidade dos genes expressos. A combinação de um iniciador ancorado (o iniciador mini-exon) e um arbitrário permite obter uma fração daqueles genes cujos transcritos estão mais abundantes sob um determinado estímulo. Análises de sequencias expressas ou ESTs (expressed sequence tags) constituem uma ótima abordagem para identificação de genes, que no caso de patógenos humanos como os tripanossomas podem resultar em novos

alvos para fármacos e desenvolvimento de vacinas (Verdun *et al*, 1998). A técnica realizada, da amplificação de sequências expressas (ESTs) através de iniciadores arbitrários, permitiu visualizar as variações na transcrição daqueles genes que estariam diretamente relacionados à resposta a condições muito adversas, no caso aqui discutido, condições de tensão físico-químico.

Os tripanossomatídeos são expostos ciclicamente a diferentes tipos de tensões. Enfrentam diferenças de temperatura de no mínimo 10°C do inseto para o hospedeiro mamífero e são expostos a condições de escassez nutricional em muitos compartimentos do trato digestivo dentro do vetor invertebrado (Fernandez-Moya e Estévez, 2010). Também estão sujeitos a enfrentar meios altamente ácidos e tensões oxidativas ao infectar células do hospedeiro vertebrado, como os macrófagos.

Logo, a sobrevivência do parasito é facilitada por mecanismos de tolerância a pH e temperatura, morfogênese, resistência a lise por complemento e mudança das moléculas de superfície. As respostas ao estresse geradas pelos protozoários são transitórias e podem nem sempre evitar a morte celular (Zilberstein e Shapira, 1994).

Com o objetivo de mimetizar pressões ambientais sofridas pelos protozoários durante seu ciclo de vida, induzimos tensões físicas, químicas e nutricionais nos meios de crescimento e observamos assim variações nos transcritos de genes por *T. cruzi* e *B. culicis*.

Nas alterações físicas e nutricionais em meio de cultivo, observamos que em fatores como incidência de luz fluorescente branca, pH alterado e em baixo estresse nutricional (BHI sem SFB), o comportamento das duas espécies foi muito semelhante. Entretanto, alterações de temperatura e crescimento em meio mínimo (alto estresse nutricional) foram suportados de forma diferente pelas espécies. Estes resultados sugerem que as principais diferenças de comportamento estejam relacionadas ao diferente ciclo de vida de cada espécie, sendo uma parasito de vertebrados, inclusive do homem, e a outra não.

Espécies de *Leishmania* (heteroxênica) passam por mudanças extremas de temperatura durante seu ciclo. No inseto vetor sobrevivem a temperatura de 22-28 °C, e quando transmitidos a hospedeiros mamíferos são expostos a 31-35 °C em

lesões na pele e 37 °C em órgãos viscerais. Assim, para sobreviver em seus hospedeiros, os tripanossomatídeos adquiriram mecanismos de termo-tolerância (Zilberstein e Shapira, 1994).

O comportamento distinto mediante diferentes temperaturas entre as duas espécies parece ser devido principalmente ao estilo de vida não compartilhado por estas. A espécie heteroxênica, *T. cruzi* CL-Brener, por infectar hospedeiros vertebrados, necessita sobreviver em temperaturas elevadas conforme encontradas no organismo destes hospedeiros. Já *B. culicis*, espécie monoxênica, normalmente não se encontra adaptada a sobreviver em hospedeiros com temperatura corporal elevada (salvo exceções dos possíveis casos de infecção por *B. culicis* em pacientes HIV positivos), sendo encontrado somente em invertebrados. Hospedeiros estes que podem variar sua temperatura conforme o meio a sua volta, mas também não sobreviveriam em temperaturas muito altas (máximo de 35 °C).

No estresse nutricional (meio mínimo e BHI sem SFB) a espécie monoxênica *B. culicis* pareceu demonstrar maior resistência à falta de nutrientes do meio comparado a *Trypanosoma cruzi*. Esta diferença pode ser explicada pela presença do endossimbionte em *B. culicis*, pois podem fornecer aos protozoários fatores de crescimento essenciais, como aminoácidos, vitaminas e hemina (De Souza e Motta, 1999). Segundo a literatura, hospedeiros invertebrados destes flagelados como os triatomíneos, podem passar por longos períodos de fome. Como exemplo do *Triatoma infestans*, hospedeiro compartilhado por *T. cruzi* e *B. triatominae*, que pode passar até 14 meses sem se alimentar (Kollien e Schaub, 2002). A influência da baixa disponibilidade de nutrientes na relação entre o flagelado e o triatomíneo já foi muito estudada no caso de *T. cruzi*. Em invertebrados não alimentados, há redução do número de parasitos, aumento de flagelados mortos, além do aparecimento de formas intermediárias como esferomastigotas (Kollien e Schaub, 1998; Kollien e Schaub, 2002)

Na espécie *B. triatominae*, segundo Schaub (1990), podem ser visualizadas formas císticas no triatomíneo além das formas epimatigotas. Porém, a porcentagem dos cistos aumenta quando há deterioração das condições nutricionais no cultivo *in vitro* do flagelado (Kollien e Schaub, 2002). Tais informações podem explicar as formas arredondadas encontradas após o cultivo das células de ambas as espécies

sob as condições de tensão. Sugerimos assim, que as formas císticas em *B. triatominae* e *B. culicis* (observada em nossos experimentos) e esferomastigotas propostas por Schaub possam constituir formas do protozoário de possível resistência quando em condições de estresse no meio. Estudos dos efeitos de drogas em células epimastigotas de *T. cruzi* (Menna-Barreto *et al*, 2005; Adade *et al*, 2007) relatam, por microscopia eletrônica de varredura, alteração na morfologia da célula com retração do corpo, ficando este arredondado. Apesar de o flagelo permanecer ligado á célula, mostra-se mais delgado e possivelmente não visível por microscopia óptica, usada neste trabalho. Logo, mais experimentos são necessários a fim de melhor caracterizar as diferenças morfológicas que os protozoários apresentam em situações adversas.

Estudos realizados antes do sequenciamento do genoma de *T. cruzi* CL-Brener, como o de Verdun *et al* (1998), se concentravam principalmente na geração de ESTs como metodologia para revelar genes desconhecidos de *T. cruzi*. A maior parte das ESTs geradas no estudo citado foram classificadas funcionalmente como genes relacionados à síntese protéica, proteínas de superfície celular e proteínas hipotéticas.

Estes dados corroboram em parte as análises das sequencias expressas por *T. cruzi* nas condições de tensão, quando classificadas em seis categorias funcionais (Fig. 4.12), onde observamos também predominância de genes estruturais como as proteínas de superfície do parasito, metabolismo celular e proteínas hipotéticas. Interessante ressaltar que o trabalho citado gerou um número maior de ESTs relacionadas à síntese protéica, mas em condição normal de crescimento, diferentemente dos nossos resultados, que em condições de tensão a maioria de ESTs foi relacionada a proteínas de superfície. Sugerimos que isto ocorra pela diminuição da síntese protéica durante a situação de estresse enfrentada pelo protozoário, evitando o gasto excessivo de energia.

Ao analisar EST geradas de *B.culicis*, tanto na condição de crescimento padrão como nas alteradas, percebemos que grande parte (57%) não mostrou similaridade considerável com nenhum outro tripanossomatídeo ou organismo. A geração de sequências expressas em condição normal e em condições de estresse deste trabalho acrescentou a base de dados com novas informações, visto que o

genoma de *B. culicis* ainda não está disponível, e que não há quase nenhuma informação desta espécie depositada em banco de dados. Igualmente para *T. cruzi* as ESTs (cDNAs) geradas sob condições de tensão são inéditas.

Quando em estresse, os genes do conjunto detectado através desta metodologia, tiveram um aumento na quantidade de transcritos. Os principais genes observados em *T. cruzi* foram os de superfície celular, como mucinas, trans-sialidases, gp85 e gp63 e TASV-C. Em *B. culicis* estes mesmos genes também foram vistos, mas a presença de muitas sequências hipotéticas não permitiu avaliar a composição exata da resposta ao estresse nesta espécie.

O fato de encontramos em *T. cruzi* grande quantidade de transcritos relacionados a genes de proteínas de superfície celular pode ser explicado e corroborado diretamente pela análise do genoma de *T. cruzi* (El-Sayed *et al*, 2005). Este consiste em mais de 50% de sequencias repetidas como os retrotransposons e os genes das grandes famílias de moléculas de superfície, que incluem as trans-sialidades, mucinas, gp63s, e a grande familia de proteínas de superfície associadas à mucina (MASP).

Conforme visto em leveduras como *S. cerevisiae* (Causton *et al*, 2001), observamos um conjunto de genes comuns em respostas ao estresse ambiental exercido. Causton observou que aproximadamente 10% do genoma da levedura em questão era induzido ou reprimido da mesma forma quando as células respondiam a uma variedade de mudanças ambientais (tensões). Isto parece ser devido a um efeito comum gerado nas células quando expostas a praticamente qualquer alteração que afete a permeabilidade da membrana celular ou a integridade da estrutura de proteínas.

Em vista destes argumentos, sugere-se que a grande proporção de proteínas de superfície obtidas no crescimento sob diferentes tensões seja devido a um conjunto de alterações na célula semelhantes em todas as modificações das condições de cultivo. E que a maioria das condições alteradas leve as células dos tripanossomatídeos a um ponto crítico comum de estresse celular, que antecederia os processos de morte celular.

Nossos resultados indicam que os genes vistos em maior quantidade fariam parte do conjunto de genes comuns de resposta ao estresse, enquanto aqueles, principalmente genes hipotéticos que apareceram apenas uma vez em nossas análises, possam fazer parte do conjunto de genes específicos e que seja interessante investigá-los quando associados a cada condição de tensão separadamente.

Em relação à pergunta principal deste trabalho, se as espécies com estilos de vida distintos responderiam às condições de tensão com os mesmos genes, obtivemos resultados já esperados por serem espécies distintas, ou seja, eles compartilham apenas poucos genes quando em condições de estresse. Principalmente genes da superfamília das mucinas, do antígeno de superfície TASV-C, de gp63, de serina carboxipeptidase, e de muitas proteínas hipotéticas. Isto indica que grande parte dos genes compartilhados possam ser constitutivos e conservados, pois além de serem transcritos nas duas espécies, apresentaram trans splicing semelhante. Podemos considerar que a taxa de transcrição destes genes sob tensão no meio aumentou muito, a ponto de serem detectados em grande quantidade pela técnica aqui utilizada.

A resposta ao estresse em *B. culicis* não foi direcionada para determinados transcritos, ou seja, apresentou-se mais diversificada. Em contraste, *T. cruzi* mostra uma resposta mais específica, exibindo uma menor variedade de transcritos nestas condições de tensão. Isto é um indício que *T. cruzi* é bem mais adaptado às condições adversas por limitar seu repertório de transcritos gênicos, confirmando o retrospecto evolutivo desta espécie cujas populações convivem há milhões de anos passando por tensões em hospedeiros distintos.

Ainda não é possível inferir a diferença gênica que determinaria o parasitismo, ou seja, a capacidade dos tripanossomatídeos serem patogênicos em vertebrados. Com base nos resultados obtidos, vimos que poucos genes respondem da mesma forma a condições de estresse pelas duas espécies. Muito provavelmente as diferenças genômicas por si mesmas não são capazes de explicar o fenômeno do parasitismo.

Como na amplificação por PCR utilizamos um oligonucleotídeo derivado da região do mini-exon, obtivemos a região 5' dos RNAs. Após o sequenciamento dos transcritos de *T. cruzi* e *B. culicis*, foram observadas diferenças na sequência dos nucleotídeos finais do mini-exon entre as espécies estudadas. Contudo, mais intrigante foi encontrar a variação do mini-exon de *T. cruzi* (5' CTATATTG 3') em *B. culicis*, que também apresentava sequências com esta região alterada (5' CTTTAAAG 3'), possuindo assim, curiosamente dois tipos de RNA SL.

Apesar da estrutura secundária do RNA SL (*spliced leader* ou mini-exon) apresentar-se evolutivamente conservada, sua sequência mostra-se alterada entre os diferentes organismos capazes de realizar trans splicing. Somente nos tripanossomatídeos foi observado considerável grau de conservação da sequência nucleotídica na região do mini-exon. (Liang *et al*, 2003). Entretanto estudos realizados por Fernandes *et al* (2007) mostraram ser o gene do mini-exon heterogêneo em sua sequência, diferenciando-se entre as espécies de tripanossomatídeos, tanto monoxênicos, como visto em *Crithidia sp.* e *Leptomonas sp.* (Sturm, Fernandes e Campbell, 2006), como entre os heteroxênicos, *T. cruzi*, *T. vivax* e *T. brucei*.

Ao analisar a frequência da utilização dos sítios adicionais de trans splicing nos transcritos gênicos sequenciados pela metodologia utilizada, observamos que esta foi muito maior em *T. cruzi* quando comparado a *B. culicis*. Isto foi visto tanto na quantidade e variedade de transcritos que realizaram trans splicing em tensão, como também no número de diferentes sítios utilizados por cada transcrito. Ao variar mais os sítios utilizados, *T. cruzi* gerou diferentes transcritos de um mesmo gene. A significância das variantes do RNAm mostra-se cada vez mais clara pela influência que as UTRs podem exercer no aumento da expressão gênica (Hughes, 2006).

A identificação de menos variações de RNAm para um mesmo gene em *B. culicis*, quando comparado a *T. cruzi*, pode ser devido aos seus diferentes estilos de vida. Pois, segundo Clayton (2002), a adaptação dos parasitos heteroxênicos a dois ambientes distintos, com diferentes temperaturas, nutrientes e defesas, pode requerer uma maior alteração na expressão dos seus genes.

Observamos também, ao mapear a região 5' não traduzida (5' UTR), sequências transcritas (cDNAs seqüenciados) que encontravam-se inseridas dentro da região codificadora de diferentes genes, após o primeiro ATG da ORF (*open reading frame*). Como exemplificado na figura 4.7.5, do gene hipotético de *T. cruzi*, visualizamos a sequência encontrada no meio da ORF principal (quando mapeadas na sequência genômica), sugerindo a utilização de outro sítio ATG, iniciador da tradução (AUG), e conseqüentemente uma proteína de tamanho diferente da conhecida para este gene.

Resultado muito semelhante ao encontrado neste trabalho foi visto por Nepomuceno-Silva *et al* (2001) ao mapear a 5'UTR dos transcritos do gene TcRho1 de *T. cruzi*, que revelaram ao menos 5 diferentes transcritos derivados de trans splicing diferencial. E ainda 3 destes transcritos continham o sítio de trans splicing dentro da região codificadora do gene TcRho1.

Assim, diferenciamos dois tipos possíveis de *splice* realizados nos tripanossomatídeos. O primeiro apenas alterando os transcritos pela presença de diferentes 5' UTR geradas através da utilização dos sítios adicionais de trans splicing pelo protozoário. Já a segunda possibilidade é o *splice* alternativo, onde o tripanosomatídeo realiza o trans splicing em sítios que encontram-se dentro da região codificadora dos genes, alterando assim a composição da proteína traduzida.

Desta forma, o splicing alternativo pode permitir a criação de diferentes transcritos de RNAm a partir de um mesmo gene. E a regulação dos sítios de *splice* fornece um versátil mecanismo para o controle da expressão gênica e para a geração de uma maior diversidade de proteínas (Hagiwara, 2005).

Há poucos relatos de genes em tripanossomatídeos que realizam a seleção alternativa de sítios de trans splicing resultando em diferentes localizações da proteína codificada (Benabdellah *et al*, 2007) Em 2002, Manning-Cela *et al*, observaram que o produto primário da transcrição de um gene cópia única (LYT1) de *T. cruzi* é processado por trans splicing principalmente em dois sítios alternativos gerando produtos protéicos distintos que diferem em 28 aminoácidos na extremidade amino-terminal. Outro gene já publicado é a prolina racemase também de *T. cruzi*, onde o transcrito maior é secretado enquanto o transcrito menor apresenta localização citosólica (Chamond *et al*, 2003). Em *Crithidia fasciculata*

encontrou-se que o produto da tradução transcrito maior do gene RNH localizava-se dentro da mitocôndria, enquanto o produto do transcrito menor era endereçado ao núcleo (Engel *et al*, 2001).

Ao submetemos os tripanossomatídeos a diferentes tensões (pressão ambiental), conseguimos induzir alterações na rede gênica destes. Estas alterações puderam ser detectadas no processamento do RNA (o qual está implicado na regulação da expressão gênica), através da visualização do mecanismo de *splice* utilizado nas suas duas formas. E, ao comparar as ESTs geradas nas condições de tensão com as já existentes (*T. cruzi*) ou com as geradas (*B. culicis*) em condição normal (controle), observamos que grande parte dessas sequências são novas, ainda não publicadas e nem depositadas em banco de dados, principalmente quando são de genes ainda hipotéticos.

Logo, as tensões induziram ou estimularam eventos transcricionais em diversos genes que resultaram em 5'UTRs de diferentes tamanho e composição. Adicionalmente, influenciaram o surgimento de RNAs mensageiros que podem codificar diferentes produtos protéicos.

Quando o genoma de *T. cruzi* CL-Brener foi anotado foram contabilizados além dos 12.000 genes codificadores de proteínas, 19.607 proteínas ou ORFs (El-Sayed *et al*, 2005; NCBI - Genome Project), ou seja, como visto em eucariotos, um número de proteínas maior que o número de genes. Este dado eleva a importância do trans splicing e splicing alternativo nos tripanossomatídeos, o que permite uma regulação a nível pós-transcricional e como consequência uma maior variedade de proteínas (Nilsson *et al*, 2010).

Contudo, a fim de confirmar se realmente os diferentes transcritos do mesmo gene são convertidos em produtos protéicos (grande e pequeno), estes necessitam ser identificados por espectrometria de massa.

Na análise do tamanho de 5' UTRs das sequências geradas através da abordagem utilizada (sob tensão), observamos que variaram de 10 a 420 nucleotídeos. Brandão e Jiang (2009), demonstraram em um amplo estudo composicional de regiões não-traduzidas de *T. cruzi* que 5' UTRs variavam de 10 a 400 pb.

Apesar de mostrarem menos genes utilizando trans splicing adicional, as sequências de *B. culicis* geradas mostraram nas 5' UTRs, tamanho médio semelhante às de *T. cruzi*. O tamanho da 5'UTR é a princípio, uma pista da sua importância no metabolismo do RNAm. Têm sido observado, que genes com sequências mais curtas de 5'UTR apresentam maior expressão (Davuluri et al, 2000). Isto pode explicar a grande quantidade de sequências curtas de 5'UTR encontradas tanto em *T. cruzi* como em *B. culicis*, principalmente nas condições do meio alteradas.

## 6 – Conclusões

Com base nos resultados expostos nesta dissertação podemos concluir que:

- Esta abordagem metodológica, após a devida adaptação, possibilita a identificação de sequências da 5' UTR dos genes mais expressos em tensão físico-química e nutricional nos tripanossomatídeos.
- Em condições de tensão, a rede gênica dos protozoários deste estudo sofre alterações durante o processamento de RNA. Gera assim, RNAs mensageiros variados de um mesmo gene, seja através de sítios adicionais aceptores do “spliced leader” (na própria 5' UTR) ou através de trans-splicing alternativo (internamente a uma ORF através de splicing alternativo).
- As tensões induzidas em ambas as espécies, *T. cruzi* e *B. culicis* estimularam um pequeno conjunto de genes comuns em respostas as condições de estresse do meio (principalmente constitutivos). Porém um conjunto maior demonstrou ser específico de cada espécie (muitos sem função identificada).
- Os tripanossomatídeos de espécies e estilos de vida distintos compartilham apenas poucos genes quando em condições de estresse.
- Grande parte das sequências geradas neste trabalho (ESTs) em condições de tensão das duas espécies são novas, ou seja, ainda não publicadas e nem depositadas em banco de dados.

## 7 - Referências Bibliográficas

- Adade CM, Figueiredo RC, De Castro SL, Soares MJ. Effect of L-leucine methyl ester on growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop*. 2007;101(1):69-79.
- Ali R, Argaman M, Halman S, Shapira, M A regulatory role for the 5' and 3' untranslated regions in differential expression of hsp83 in Leishmania. *Nucl Acid Res*. 1994; 22 (15): 2922-2929.
- Andrews N. Yale Medical School. Cell Biology – Yale [online] Yale, USA, 2005. [ capturado em 26 de julho de 2005]. Disponível em: [http://www.cellbiology.yale.edu/cellbio/images/faculty/n\\_andrews/n\\_andrews\\_fig01.jpg](http://www.cellbiology.yale.edu/cellbio/images/faculty/n_andrews/n_andrews_fig01.jpg)
- Avila JL, Perez-Keep R, Bretaña AA. Minimal Medium for the Cultivation of infective *Trypanosoma cruzi* epimastigotas *Journal Gener Microbiol*. 1983; 129: 285-291.
- Barbosa HS. Fundação Oswaldo Cruz. Agência Fiocruz de Notícias [online]. Rio de Janeiro, Brasil; 2005. [capturado em 25 de julho de 2005]. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ccs/estetica/chagas.htm>
- Benabdellah K, Gonzalez-Rey E, Gonzalez A. Alternative trans-splicing of the *Trypanosoma cruzi* LYT1 gene transcript results in compartmental and functional switch for the encoded protein. *Molecular Microbiology*. 2007; 65(6): 1559–1567.
- Benz C, Nilsson D, Andersson B, Clayton C, Guilbride DL. Messenger RNA processing sites in *Trypanosoma brucei*. *Molec & Biochem Parasitol*. 2005; 143 : 125–134.
- Boscardin, SB, Torrecilhas, AC, Manarin, R, Revelli, S, Rey, EG, Tonelli, RR, Silber, AA. Chagas disease: na update on immune mechanisms and therapeutic strategies. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2010; 14: 13730-1384.
- Bosch I, Melichar H, Pardee AB. Identification of differentially expressed genes from limited amounts of RNA. *Nucl Acid Res*. 2000; 28 (7): 1639-1646.

- Brandão A, Umenyyi T, Rondineli E, Gonzalez A, Miranda AB, Degraive W. Identification of transcribed sequences (ESTs) in the *Trypanosoma cruzi* genome Project. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1997; 92(6): 863-866.
- Brandão A. Trypanosomatid EST: a neglected information resource regarding flagellated protozoa? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008; 103(6): 622-6.
- Brandão A e Jiang T. The composition of untranslated regions in *Trypanosoma cruzi* genes. *Parasitology International*. 2009; 58(3): 215-9.
- Brener, Z, Andrade, ZA, Barral-Netto, M. *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas 2ed. Editora Guanabara-Koogan , 2000.
- Camargo, EP. Phytomonas and other parasites of plants and fruit. *Advances in Parasitology*. 1999; 42: 29-112.
- Campbell DA, Thomas S, Sturn N. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? *Microbes Infect*. 2003; 5: 1231-1240.
- Campos PC, Bartholomeu DC, DaRocha WD, Cerqueira GC, Teixeira SM. Sequences involved in mRNA processing in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol* 2008;38:1383–9.
- Causton, HC, Ren B, Koh SS, Harbison CT, Kanin E, Jennings EG, *et al*. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol. Biol. Cell*. 2001; 12 (2): 323-27.
- Chagas, C. Nova tripanozomíaze humana. "Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen. n. sp, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem". *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1909; 1: 159-218.
- Chamond N, Gregoire C, Coatnoan N, Rougeot C, Freitas-Junior LH, da Silveira JF, *et al*. Biochemical characterization of proline racemases from the human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* and definition of putative protein signatures. *J Biol Chem*. 2003; 278: 15.484-15.494.
- Chicharro C e Alvar J. Lower trypanosomatids in HIV/AIDS patients. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. 2003; 97 (1), 75–78.

- Clayton CE. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J.* 2002; 21 (8): 1881-1888.
- Clayton, J. The promise of *T.cruzi* genomics. *Nature – Outlook Chagas Disease.* 2010: 516-17.
- Correa-da-Silva, MS, Fampa P, Lessa LP, Silva ER, Mallet JRS, Saraiva EMB, *et al.* Colonization of *Aedes aegypti* midgut by the endosymbiont-bearing trypanosomatid *Blastocrithidia culicis*. *Parasitol Res* 2006; 99 (4): 384-91.
- Coura JR. Tripanosomose, Doença de Chagas. *Ciência e Cultura.* 2003; 55 (1) São Paulo.
- Coura JR, Castro SL. A critical review on Chagas Disease Chemoterapy. *Memórias do Inst. Oswaldo Cruz,* 2002; 97: 3-24.
- Dantas AP, Barbosa HS, De Castro SL. Biological and ultrastructural effects of the anti-microtubule agent taxol against *Trypanosoma cruzi*. *J Submicr Cytol Pathol* 2003; 35: 287-294.
- D'Ávila Levy CM, Araújo FM, Vermelho AB, Soares MA, Santos ALS, Braquinha MH. Proteolytic expression in *Blastocrithidia culicis*: influence of the endosymbiont and similarities with virulence factor of pathogenic trypanosomatids. *Parasitology, Cambridge Journals,* 2009; 130: 413-420.
- D'Ávila Levy CM, Silva BA, Hayashi EA, Vermelho AB, Alviano CS, Saraiva, EMB, *et al.* Influence of the endosymbiont of *Blastocrithidia culicis* and *Crithidia deanei* on the glycoconjugate expression and on *Aedes aegypti* interaction. *FEMS Microbiology Letters.* 2005; 252: 279–286.
- Davuluri RV, Suzuki Y, Sugano S, Zhang MQ. CART classification of human 5' UTR sequences. *Genome Res* 2000;10:1807–16.
- Demetry C. Worcester Polytechnic Institute [online]. Massachusetts, USA; 2005. [capturado em 25 de julho de 2005]. Disponível em: <http://users.wpi.edu/~cdemetry/Images/kiss-1.gif>

- De Sousa, MA. Tripomastigotes in culture of *Blastocrithidia culicis* (Novy, MacNeal and Torrey, 1907) (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1994; 89 (1): 111-112.
- De Souza, W. Cell Biology of *Trypanosma cruzi*. International Reviews in Cytology, 1984; 86: 197-283.
- De Souza, W e Motta, MCM. Endosymbiosis in protozoa of the Trypanosomatidae family. FEMS Microbiology Letters 1999; 173; 1–8.
- Dedet JP , Roche B, Pratlong F, Cales-Quist D, Jouannelle J, Benichou JC, Heurre M Diffuse cutaneous infection caused by a presumed monoxenous trypanosomatids in a patient infected with HIV. Trans R Soc Trop Med Hyg 1995; 89: 644-646.
- Delgado-Olivares L, Diaz-Acosta A, Membrillo-Hernández J, Un acercamiento a las condiciones ambientales de vida de Escherichia coli. Respuesta al estrés oxidativo y térmico em condiciones de limitación de oxígeno y fase estacionaria. Ver Latinoamericana de Microbiologia. 2006; 48 (2): 162-172.
- Dias-Neto E, Harrop R, Corre-Oliveira R, Wilson RA, Pena SDJ, Simpson AJG. Minilibraries constructed from cDNAs generated by arbitrarily primed RT-PCR: na alternative to normalized libraries for the generation of ESTs from nanogram quantities of mRNA. Gene. 1997; 186: 135-142.
- Docampo R, De Souza W, Miranda K, Rohloff P, Moreno SN. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. Nat Rev Microbiol, 2005; 3: 251-261.
- Engel ML, Hines JC, Rays DS. The Crithidia fasciculata RNH1 encodes both nuclear and mitochondrial isoforms of RNase H. Nucleic Acid Res. 2001; 29: 725-731.
- El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran A, et al. The genome sequence of *Trypanosma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. Science. 2005a; 309: 409-415.
- El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G. Comparative Genomics of Trypanosomatid Parasitic Protozoa. Science. 2005b; 309: 404-409.

- Fampa, P, *et al* Interaction of insect trypanosomatids with mosquitoes, sand fly and the respective insect cell lines. *International Journal for Parasitology*. 2003; 33: 1019-1026.
- Feder, ME, Hofmann, GE. Heat-shock proteins, molecular chaperones and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 1999; 61: 243-82.
- Fernandes O, Teixeira, MMG, Sturm N, Sousa MA, Camargo EP, Degrave WM, Campbell DA. Mini-exon Gene Sequences Define Six Groups within the Genus *Crithidia*. *J Eukaryot Microbiol.* 2007; 44(6): 535-539.
- Fundação Oswaldo Cruz. Agência Fiocruz de Notícias [online]. Rio de Janeiro, Brasil; 2005. [capturado em 25 de julho de 2005]. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ccs/estetica/chagas.htm>.
- Frank S, *et al* Functional genomics of the initial phase of cold adaptation of *Pseudomonas putida* KT2440. *FEMS Microbiol Letters*. "Accepted article".
- Góes, VM. Análise genômica funcional do *Trypanosma cruzi* submetido a diferentes tipos de estresse. [Tese de Doutorado] Curitiba; 2008. Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, IOC, Fundação Oswaldo Cruz.
- Gull, K. The biology of Kinetoplastida parasites: insights and challenges from genomics and post-genomics. *Int. J. Parasitol.* 2001; 31: 443-52.
- Graefe SEB, Wiesgigl M, Gaworski, MacDonald A, Clos J. Inhibition of HSP90 in *Trypanosma cruzi* Induces a Stress Response but No Stage Differentiation. *Eukaryotic Cell.* 2002; 1(6): 936-943.
- Haile S e Papadopoulou B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Cur Opi Microbiol.* 2007; 10: 569-577.
- Hamilton, PB Gibson, WC, Stevens, JR. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2007; 44 (1): 15-25.

- Hagiwara M. Alternative splicing: a new target of the post-genome era. *Bioch Biophys Acta*. 2005; 1754: 324-331.
- Hilgers V, Teixeira V, Parker R. Translation-independent inhibition of mRNA deadenylation during stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*. 2006; 12: 1835-1845.
- Hoare, CA, Wallace, FG. Developmental stages of trypanosomatid flagellate: a new terminology. *Nature*. 1966; 244: 69-70.
- Hughes TA. Regulation of genes expression by alternative untranslated regions. *Trends Genet*. 2006; 22 (3): 119-122.
- Jager AV, Gaudenzi JG, Cassola A, D'orso I, Frasch AC. mRNA maturation by two-step trans-splicing/ polyadenylation processing in trypanosomes. *PNAS* 2007; 104 (7): 2035-2042.
- Jimenez M, Ferrer-Dufol M, Cañavate C, Gutierrez-Solar B, Molina R, Lagun F, *et al*. Variability of *Leishmania (Leishmania) infantum* among stocks from immunocompromised, immunocompetent patients and dogs in Spain. *FEMS Microbiol Letters*. 1995; 131: 197-204.
- Kollien AH, Schaub GA The development of *Trypanosoma cruzi* (Trypanosomatidae) in the reduviid bug *Triatoma infestans* (Insecta): influence of starvation. *J Eukaryot Microbiol*. 1998;45:59–63
- Kollien AH, Schaub GA. The development of *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) in the reduviid bug *Triatoma infestans* (Insecta): influence of starvation. *Parasitol Res*. 2002; 88: 804–809.
- Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform* 2008; 9 (4): 299-306.
- Landweber LF. and Gilbert W. Phylogenetic analysis of RNA editing: A primitive genetic phenomenon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994; 91: 918-921.
- Liang P e Pardee AP. Differential Display of Eukaryotic Messenger RNA by Means of the Polymerase Chain Reaction. *Science*. 1992; 257: 967-971.

- Lustig Y, Sheiner L, Vagima Y, Goldshmidt H, Das A, Bellofatto V, Michaeli S. Spliced-leader RNA silencing: a novel stress-induced mechanism in *Trypanosoma brucei*. *EMBO reports*. 2007; 8 (4): 408-413.
- Manning-Cela R, Gómez A, Swindle J. Alternative Splicing of LYT1 Transcript in *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 2002; 70 (8): 4726-4728.
- Manzine, LR, Da Silva, MTL., Thiemann, OH, Ciccarelli, MB. Molecular Characterization of *Blastocrithidia culicis* L17 Ribosomal Protein. *Acta Protozool*. 2006; 45: 367-375.
- Martinez-Calvillo S, Vizuet-de-Rueda JC, Florencio-Martínez LE, Manning-Cela RG, Figueroa-Ángulo EE. Gene Expression in Trypanosomatid Parasites. *J Biomed and Biotechnol*. 2010; Article ID 525241: 1-15.
- Maslov DA, Lukes J, Jirku M, Simpson L. Phylogeny of trypanosomes as inferred from the small and large subunits rRNAs: implication for evolution of parasitism in the trypanosomatid protozoa. *Mol Biochem Parasitol*. 2006; 75: 197-205.
- Mathieu-Daudé F, Welsh J, Davis C, McClelland M. Differentially expressed genes in the *Trypanosoma brucei* life cycle identified by RNA *fingerprinting*. *Mol and Bioch Parasitol*. 1998; 92: 15-28.
- Matthews K R, Tschudi C, Ullu E. A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes & Dev*. 1994; 8: 491-501.
- Matsubara K e Okubo K. Identification of new genes by systematic analysis of cDNAs and database construction. *Current Opinion in Biotechnol*. 1993; 4 (6): 672-677.
- Mayer MG e Floeter-Winter LM. Pre-mRNA trans-splicing: from kinetoplastids to mammals, an easy language for life diversity. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005; 100 (5): 501-513.
- McClelland M, Mathieu-Daudé F, Welsh J. RNA fingerprinting and differential display using arbitrarily primed PCR. *Science Reviews*. 1995; 11 (6): 242-246.
- McGhee RB e Cosgrove WB. Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae. *Microbiol Rev*. 1980; 44 (1): 140-173.

- Menna-Barreto RFS, Henrique-Pons A, Pinto AV, Morgado-Diaz JÁ, Soares MJ, De Castro SL. Effect of a b-lapachone-derived naphthoimidazole on *Trypanosoma cruzi*: identification of target organelles. *J Antimicro Chemother*. 2005; 56: 1034-1041
- Menna-Barreto RFS. Estudo do mecanismo de ação de derivados naftoimidazólicos de  $\beta$ -lapachona sobre *Trypanosoma cruzi*. [dissertação de mestrado] Rio de Janeiro; 2006  
Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, IOC, Fundação Oswaldo Cruz
- Metzenberg, S, e Agabian, N. Mitochondrial minicircle DNA supports plasmid replication and maintenance in nuclei of *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994; 91: 5962-66.
- Miles MA, Souza A, Pova M, Shaw JJ, Lainson R, Tøye PJ Isomyc heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patient with Chagas disease in Amazonian Brazil. *Nature*. 1978; 272: 819-21.
- Miles MA, Tøye PJ, Oswald SC, Godfrey DG. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1977; 71 (3): 217-25.
- Miura Y. Oxidative stress, radiation-adaptive responses and aging. *J Radiat Res (Tokyo)*. 2004; 45(3): 357-72.
- Monnerat S, Martinnez-Calvillo S, Worthey E, Myler PJ, Stuart KD, Fasel N. Genomic organization and gene expression in a chromosomal region of *Leishmania major*. *Mol and Biochem Parasitol*. 2004; 134 (2): 233-243.
- Morio F, Reynes J, Dollet M, et al. Isolation of a protozoan parasite genetically related to the insect trypanosomatid *Herpetomonas samuelpessoai* from a human immunodeficiency virus-positive patient. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 3845-7.
- Murphy NB e Welburn SC. Programmed cell death in procyclic *Trypanosoma brucei* rhodesiense is associated with differential expression of mRNAs. *Cell death and Different*. 1997; 4: 365-370.
- Murphy NB e Pellé R. The use of arbitrary primers and the RADES method for the rapid identification of developmentally regulated genes in trypanosomes. *Gene*. 1994; 14 (1): 53-61.

- Nascimento MTC, Garcia MCF, Silva KP, Pinto-da-Silva LH, Atella GC, Motta MCM, *et al.* Interaction of the monoxenic trypanosomatid *Blastocrithidia culicis* with the *Aedes aegypti* salivary gland. *Acta Tropica*. 2010; 113: 269–278.
- Nepomuceno-Silva JL, Yokoyama K, de Mello LDB, Mendonça SM, Paixão JC, Baron R, *et al.* TcRho1 a Farnesylated Rho family homologue from *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*. 2001; 276 (32): 29.711-29.718.
- Nilsson D e Andersson B. Strand asymmetry patterns in trypanosomatid parasites *Exp Parasitol*. 2005; 109 (3): 143-149.
- Nilsson D, Gunasekera K, Mani J, Osteras M, Farinelli L, Baerlocher L, *et al.* Spliced Leader Trapping Reveals Widespread Alternative Splicing Patterns in the Highly Dynamic Transcriptome of *Trypanosoma brucei*. *Plos Path*. 2010; 6 (8): 1-13.
- Novy FG e MacNeal WJ. On the cultivation of *Trypanosoma brucei*. *J Inf Diseases* 1904; 1: 1-30.
- Novy FG, MacNeal WJ, Torrey HN. The Trypanosomes of mosquitoes and other insects. *Journal of Infec Dis*. 1907.
- Otto TD, Catanho M, Degrave W, de Miranda AB. The PDTIS bioinformatics platform: from sequence to function. *RECIIS: R Eletr Com Inf Inov Saúde*. 2007; 1(2): 286-294.
- Pacheco RS, Marzochi MCA, Pires MQ, Brito CMM, Madeira MF, Barbosa-Santos EGO. Parasite Genotypically Related to a Monoxenous Trypanosomatid of Dog.s Flea Causing Opportunistic Infection in an HIV Positive Patient. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1998; 93 (4): 531-537.
- Pena S. D., Machado C. R., Macedo A. M. *Trypanosoma cruzi*: ancestral genomes and population structure. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104: 108-114.
- Pesole G, Mignone F, Gissi C, Grillo G, Licciulli F, Liuni S. Structural and functional features of eukaryotic mRNA untranslated regions. *Gene*. 2001; 276: 73–81.
- Podlipaev SA. The more insect trypanosomatids under study-the more diverse Trypanosomatidae appears. *International Journal for Parasitology* 2001; 31: 648-652.

- Podlipaev SA, Sturm NR, Fiala I, Fernandes O, Westenberger SJ, Dollet M, Campbell DA, Lukes J. Diversity of Insect Trypanosomatids Assessed from the Spliced Leader RNA and 5s rRNA Genes and Intergenic Regions. *Eukaryot. Microbia.* 2004; 51(3): 283-290.
- Qing Ye S, Zhang LQ, Zheng F, Virgil D, Kwitrovich PO. MiniSAGE: Gene Expression Profiling Using Serial Analysis of Gene Expression from 1 µg Total RNA. *Analy Biochem.* 2000; 287 (1): 144-152.
- Rodrigues DC, Silva R, Rondinelli E, Ürményi TP. *Trypanosoma cruzi*: Modulation of HSP70 mRNA stability by untranslated regions during heat shock. *Exp Parasitol.* 2010; 126 (2): 245-253.
- Rozental S, Carvalho TU, De Souza, W. Influence of the endosymbiont on the interaction of *Crithidia deanei* with macrophages. *Microsc Eletron Biol Cel.* 1987; 11(2): 167-177.
- Sambrook J, Fritsch EF, Manniatis T. Extraction, purification and analysis of messenger RNA from Eukariotic cells. In *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. USA, p. 737-757, 1989.
- Santa-Rita RM, Lira R, Barbosa HS, Urbina JA, De Castro SL. Anti-proliferative synergy of lysophospholipid analogues and ketoconazole against *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): cellular and ultrastructural analysis. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 780-784.
- Santos DO, Bourguignon SC, Castro HC, Silva JS, Franco LS, Hespanhol R, *et al.* Infection of Mouse Dermal Fibroblasts by the Monoxenous Trypanosomatid Protozoa *Crithidia deanei* and *Herpetomonas roitmani*. *J of Euk Microbiol.* 2004; 51(5): 570-574.
- Schaub, GA. The effects of Trypanosomatids on insects. *Advances in Parasitology.* 1992; 31: 255-319.
- Schaub, GA. Parasite-host interrelationships of *Blastocrithidia triatomine* and Triatomines. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1988; Supl. I, 83: 622-623.
- Shapiro TA e Englund PT. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu. Rev. Microbiol.* 1995; 49: 117-143.

- Simpson, AGB., Stevens, JR and Lukes, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends in Parasitology*. 2006; 22: 168-174.
- Spicher A, Guicherit OM, Duret L, Aslanian A, Sanjines EM, Denko NC, *et al*. Highly Conserved RNA Sequences That Are Sensors of Environmental Stress. *Molec and Cell Biol*. 1998; 18 (12): 7371–7382.
- Sturm NR, Fernandes O, Campbell DA. The mini-exon genes of three *Phytomonas* isolates that differ in plant tissue tropism. *FEMS Microbiol Lett*. 1995; 130 (2-3): 177-182.
- Sutton RE, Boothroyd JC. Evidence for trans splicing in trypanosomes. *Cell*. 1986; 47 (4): 527-535.
- Tanowitz HB, Kirchhoff LV, Simon D, Morris SA, Weiss LM, Wittner M. Chagas' disease. *Clin Microbiol Rev*. 1992 ; 5(4): 400-19.
- Taylor MC, Kelly JM. Functional dissection of the *Trypanosma cruzi* genome: new approaches in a new era. In: *World Class Parasites. v.7 American Trypanosomiasis*. Tyler, K.M.; Miles, M.A. (Eds), Kluwer Academic Publishers, 2003: 57-67.
- Teixeira AR, Nascimento RJ, Sturm NR. Evolution and pathology in chagas disease-a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006; 101 (5): 463-91.
- Teixeira MC, Mira NP, Sá-Correia I. A genome-wide perspective on the response and tolerance to food-relevant stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Opinion in Biotechnology*, 2010; 22: 1–7.
- Teixeira SM, DaRocha WD. Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. *Genetic and Molecular Research*. 2003; 2 (1): 148-58.
- Tibayrenc M, Ward P, Moya A, Ayala FJ. Natural populations of *Trypanosma cruzi* the agent of Chagas' disease, have a complex multiclonal structure. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986; 83: 1335-39.
- Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências da USP [online]. São Paulo, Brasil; 2005. [capturado em 25 de julho de 2005]. Disponível em: <http://dreyfus.ib.usp.br/bio435/bio4351999/chavemoa/mar.html>.

- Vanhamme L e Pays E. Control of Gene Expression in Trypanosomes. *Microbiol. Rev.* 1995; 59 (2): 223–240.
- Vatarunakamura C, Ueda-Nakamura T, de Souza W. Visualization of the cytostome in *Trypanosoma cruzi* by high resolution field emission scanning electron microscopy using secondary and backscattered electron imaging. *FEMS Microbiol Lett.* 2005; 242: 227-230.
- Veitch NJ, Johnson PCD, Trivedi U, Terry S, Wildridge D, MacLeod A. Digital gene expression analysis of two life cycle stages of the human-infective parasite, *Trypanosoma brucei gambiense* reveals differentially expressed clusters of co-regulated genes. *BMC Genomics.* 2010; 11 (124): 2-14.
- Verdun RE, Di Paolo N, Urmenyi TP, Rondinelli E, Frasch ACC, Sanchez DO. Gene Discovery through Expressed Sequence Tag Sequencing in *Trypanosma cruzi*. *Infect and Immun.* 1998; 66 (11): 5393-5398.
- Vickerman K. The diversity of the kinetoplastid flagellates, p. 1-34. In WH Lumsden, DA Evans (eds), *Biology of the Kinetoplastida*, Academic Press, London, 1976.
- Vickerman K. The evolutionary expansion of trypanosomatid flagellates. *Int J Parasitol.* 1994; 24 (8): 1317-1331.
- Villarreal D, Nirdé P, Hide M, Barnabé C, Tibayrenc M. .Differential gene expression in benznidazole-resistant *Trypanosma cruzi* parasites. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 2701-9.
- Vinhaes MC e Dias JCP. Doenças de Chagas no Brasil. *Cad. Saúde Pública*, 2000; 16 (Sup. 2): 7-12.
- Wallace FG e Johnson A. The infectivity of old cultures strains of mosquito flagellates. *J Insect Path:* 1961; 3: 75-80.
- Wallace FG. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. *Exp Parasitol.* 1966; 18: 124-193.
- Warren LG. Metabolism of *Schizotrypanum cruzi* Chagas. I. Effect of culture age and substrate concentration on respiratory rate. *Journal of Parasitology.* 1960; 46: 529-39.

Welsh J, Chada K, Dalal SS, Cheng R, Relph D, McClelland M. Arbitrarily primed PCR *fingerprinting* of RNA. *Nucleic Acids Res.* 1992; 20: 4965-70.

Ziccardi M. Efeitos de agentes físico-químicos em *Trypanosma cruzi* clone CL-Brener: Uma abordagem para o estudo de genes hipotéticos a partir da 5'UTR. [Tese de Doutorado] Rio de Janeiro; 2011. Pós Graduação em Biologia Parasitária, IOC, Fundação Oswaldo cruz

Zilberstein D e Shapira M. The Role of pH and Temperature in the Development of Leishmania Parasites. *Ann Ver Microbiol.* 1994; 48: 449-470.

Zingales B, Pereira MES, Almeida KA, Umezawa ES, Nehme NS, Oliveira RP, *et al.* Biological parameters and molecular markers of clone CL Brener – the reference organism of the *Trypanosma cruzi* genome project. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1997; 92 (6): 811-4.

Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, *et al.* Second Satellite Meeting. A new consensus for *Trypanosma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcIV. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104 (7): 1051-4.

<http://www.culicis.Incc.br/>

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>

<http://www.csun.edu/~mLs42367/Protocols/Colony%20PCR.pdf>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomeprj/15540>

## 8 - Anexos

**Tabela 8.1:** Lista de genes sequenciados a partir dos fragmentos do RT-PCR fingerprinting de *Trypanosoma cruzi* CL-Brener em condições de tensão físico-química.

Acesso GenBank	Identificação (BLAST)	Total de sequencias
XM_810816.1	90 kDa surface protein	1
XM_810367.1	ADC4 gene/ receptor-type adenylate cyclase	1
AF040382.1	Adenylyl cyclase (TczAC)	2
XM_809854.1	Citrate transporter	1
AF099099.1	Gene ToIT <i>T.cruzi</i>	2
XM_802414.1	Glycine dehydrogenase	1
XM_807559.1	GP63	3
XM_813452.1	GP63	1
XM_816329.1	GP63	1
XM_802023.1	GP63-2	5
XM_806129.1	MASP-like mRNA	1
XM_815678.1	MASP	1
XM_806542.1	Mucin TcMUCII	1
XM_800521.1	Mucina 1	35
XM_814040.1	Mucina 2	21
AF036441.1	Mucina 3	4
AF036450.1	Mucina 4	7
XM_797340.1	Mucina 5	3
AF203100.1	Mucina 6	1
XM_803568.1	Mucina 7	1
XM_808587.1	Mucin-like glycoprotein	1
XM_815115.1	Pretranslocation protein	14
XM_812634.1	Protein phosphatase 4 catalytic subunit	1

<b>XM_810829.1</b>	Ptn hipotética 1	16
<b>XM_811868.1</b>	Ptn hipotética 2	1
<b>XM_813454.1</b>	Ptn hipotética 3	2
<b>XM_815772.1</b>	Ptn hipotética 4	1
<b>XM_816658.1</b>	Ptn hipotética 5	1
<b>XM_813614.1</b>	Ptn hipotética 6	2
<b>XM_812722.1</b>	Ptn hipotética 7	2
<b>XM_804110.1</b>	Ptn hipotética 8	1
<b>XM_814623.1</b>	Ptn hipotética 9	3
<b>XM_811864.1</b>	Ptn hipotética 10	1
<b>XM_805338.1</b>	Ptn hipotética 11	2
<b>XM_802330.1</b>	Ptn hipotética 12	1
<b>XM_805530.1</b>	Ptn hipotética 13	3
<b>XM_810083.1</b>	Ptn hipotética 14	1
<b>XM_811777.1</b>	Ptn hipotética 15	1
<b>XM_808893.1</b>	Ptn hipotética 16	6
<b>XM_809557.1</b>	Ptn hipotética 17	1
<b>XM_814408.1</b>	Ptn hipotética 18	1
<b>XM_813229.1</b>	Ptn hipotética 19	1
<b>XM_804110.1</b>	Ptn hipotética 20	1
<b>XM_798948.1</b>	Ptn hipotética 21	1
<b>XM_805863.1</b>	Ptn hipotética 22	1
<b>XM_812653.1</b>	Ptn hipotética 23	1
<b>XM_812957.1</b>	Ptn hipotética 24	11
<b>XM_814177.1</b>	Ptn hipotética 25	1
<b>XM_808997.1 a</b>	Ptn hipotética 26	1
<b>XM_808997.1 b</b>	Ptn hipotética 27	1
<b>XM_814408.1</b>	Ptn hipotética 28	7
<b>XM_802330.1</b>	Ptn hipotética 29	15

<b>XM_801496.1</b>	Ptn Hipotética 30	5
<b>XM_799559.1</b>	Ptn Hipotética 31	1
<b>XM_798697.1</b>	Ptn Hipotética 32	3
<b>XM_808971.1</b>	Ptn ribossomal 60S	8
<b>XM_811515.1</b>	Pumilio-repeat, RNA-binding ptn	1
<b>XM_797910.1</b>	Serine carboxypeptidase	10
<b>XM_809459.1</b>	Small nuclear ribonucleoprotein Sm-F	1
<b>XM_806179.1</b>	Spermidine synthase 1	1
<b>XM_801758.1</b>	Spermidine synthase 2	1
<b>M64836.1</b>	Surface antigen (gp85)	2
<b>XM_811895.1</b>	surface antigen TASV-C2 1	8
<b>AM492204.1</b>	surface antigen TASV-C2 2	8
<b>FN599136.1</b>	surface antigen TASV-C2 3	14
<b>XM_807701.1</b>	Trans sialidase 1	1
<b>XM_812522.1</b>	Trans sialidase 2	1
<b>XM_810729.1</b>	Trans sialidase 3	1
<b>XM_810729.1</b>	Trans sialidase 4	3
<b>XM_806149.1</b>	Trans sialidase 5	6
<b>XM_801338.1</b>	Trans sialidase 6	2
<b>AJ012101.1</b>	Tryparedoxin peroxidase	2
<b>AF100653.1</b>	VATc12 telomere-associated seq (Ptn hipotetica)	3
	<b>TOTAL</b>	<b>278</b>

**Tabela 8.2:** Lista de genes sequenciados a partir dos fragmentos do RT-PCR fingerprinting de *Blastocrithidia culicis* em condições de tensão físico química.

<b>Acesso Genbank</b>	<b>Identificação (BLAST)</b>	<b>Total de sequencias</b>
	BcHp 1	3
<b>XM_811864.1</b>	Ptn hipotética <i>T. cruzi</i>	2
<b>FN554972.1</b>	<i>T. brucei</i> cromossomo 6	2
	BcHp 2	11
	BcHp 3	3
<b>XM_806542.1</b>	Mucina <i>T. cruzi</i>	3
	BcHp 4	2
	BcHp 5	2
<b>FN554968.1</b>	<i>T. brucei</i> cromossomo 5	4
	BcHp 6	3
<b>FN554968.1</b>	<i>L. donovani</i> cromossomo 14	6
	BcHp 7	6
	BcHp 8	2
	BcHp 9	75
	BcHp 10	5
<b>AF036450.1</b>	Ptn mucina-like <i>T. cruzi</i> CL	4
<b>AC087327.7</b>	<i>T. brucei</i> cromossomo 4	3
	BcHp 11	11
	BcHp 12	5
<b>AF100653.1</b>	VATc12 telomere-associated sequence <i>T. cruzi</i>	2
<b>AJ239064.1</b>	gene muc3 glicoptn mucina-like <i>T. cruzi</i>	56
	BcHp 13	16
<b>FN599136.1</b>	gene TASV-C-26 <i>T. Cruzi</i>	2
<b>XM_804326.1</b>	TASV-C2 antígeno de superfície <i>T.cruzi</i>	2
<b>AM492204.1</b>	gene TASV-C 26 <i>T. Cruzi</i>	2
	BcHp 14	10

FR796425.1	<i>T. brucei</i> cromossomo 5	2
XM_802330.1	Ptn hipotetica <i>T. cruzi</i>	3
XM_813454.1	Ptn hipotetica <i>T. cruzi</i>	4
XM_806129.1	Mucina <i>T. cruzi</i>	4
XM_797910.1	Serine carboxypeptidase <i>T. cruzi</i>	2
	BcHp 15	3
AC159441.1	<i>L. donovani</i> cromossomo 29	4
FR796425.1	<i>L. major</i> cromossomo 29	2
XM_808893.1	Ptn hipotética <i>T. cruzi</i>	4
	BcHp 16	1
	BcHp 17	2
	BcHp 18	1
	BcHp 19	1
	BcHp 20	1
FR796416.1	<i>L. major</i> cromossomo 20	1
	BcHp 21	1
	BcHp 22	1
	BcHp 23	1
	BcHp 24	1
	<i>L. mexicana</i> cromossomo 8	1
	BcHp 25	2
FR796416.1	<i>L. major</i> cromossomo 14	1
	<i>L. braziliensis</i> ptn superficie antígeno-like	1
	BcHp 26	1
	BcHp 27	1
	<i>L. braziliensis</i> cromossomo 20	1
	BcHp 28	1
	BcHp 29	1
	BcHp 30	1

<b>FR798996.1</b>	<i>L. mexicana</i> cromossomo 30	1
	BcHp 31	1
	BcHp 32	1
	BcHp 33	1
	BcHp 34	1
	BcHp 35	1
<b>FR798996.1</b>	<i>L. braziliensis</i> cromossomo 21	1
<b>XM_812957.1</b>	Ptn hipotética <i>T. cruzi</i>	1
<b>XM_814040.1</b>	Gene muc3 glicoptn superfície mucina-like <i>T. cruzi</i>	1
<b>AF099099.1</b>	Ptn superfície ToIT <i>T. cruzi</i> CL	1
<b>XM_805338.1</b>	Ptn hipotética <i>T. cruzi</i> CL	1
	BcHp 36	1
<b>XM_798593.1</b>	Ptn hipotética <i>T. cruzi</i> CL	1
<b>AF267162.1</b>	GP63 <i>T. cruzi</i> CL	1
	BcHp 37	1
<b>XM_802330.1</b>	Ptn hipotética <i>T. cruzi</i> ( VATc12 telomere assoc)	1
<b>XM_801496.1</b>	Ptn Hipotética <i>T. cruzi</i> CL	1
<b>AF036441.1</b>	Ptn mucina-like <i>T. cruzi</i> CL	1
	BcHp 38	1
	BcHp 39	1
<b>XM_810829.1</b>	Ptn hipotética <i>T. cruzi</i> CL	1
<b>XM_814815.1</b>	Mucina-like ptn <i>T. cruzi</i> CL	1
	BcHp 40	1
	<i>L. donovani</i> cromossomo 24	1
	TOTAL	316

