

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMPUS DE ARARAQUARA

**“*TRYPANOSOMA CRUZI*: UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS PERMEÁVEIS NA
REAÇÃO DE *TRANS-SPLICING IN VITRO* COMO MODELO DE ESTUDO
DA AÇÃO DE FÁRMACOS NO PROCESSAMENTO DOS RNAS
MENSAGEIROS”**

CAROLINA FREGONESI BARBOSA

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP - Campus de Araraquara, para obtenção do título de mestre em Análises Clínicas - Área de concentração em Análises Clínicas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Regina Maria Barretto Cicarelli

ARARAQUARA-SP

2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Este trabalho teve os seguintes apoios:

PADC/FCF-UNESP (2002/12-I) e Fapesp (99/11393-4 e 04/01630-9).

À minha querida mãe e amiga,

Jeni Fregonesi Barbosa

*Pelo amor, dedicação e incansável luta
para atingir meus objetivos,*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela paz e conforto que me concedeu nos momentos de dificuldades e angústias e pelo maravilhoso Dom da Vida;

À Profª Drª Regina Maria Barreto Cicarelli, por todo o apoio, paciência, orientação e principalmente por ter me aceitado como sua aluna;

Ao Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann, pela enorme colaboração e boa vontade em sempre ajudar;

À Profª Drª Chung Man Chin, não só por ter cedido o fármaco de estudo, mas também pelas valiosas correções;

Aos meus queridos irmãos, Moacyr F. Barbosa e Maurício F. Barbosa, pelo enorme carinho, proteção e exemplos de vida;

Ao Gustavo Pavan Mateus, pelo amor, compreensão e incondicional estímulo, por sua ternura e seu sorriso, que fazem da felicidade uma constante em minha vida;

As adoráveis crianças, Leonardo, Júlia, Vitório e Felipe, por ter colocado em nossas vidas tanta alegria!

Aos meus queridos amigos, Luis Gustavo Silva Monnazzi e Valéria Aparecida de Araújo Mallavolta, pelas ricas conversas, pelo bom humor e por fazer de nosso dia a dia uma festa!

À grande amiga Marilena da Silva Peixoto, por todos esses anos de muito companheirismo e alegria que estarão sempre comigo;

À toda minha família, pela torcida ao meu sucesso profissional;

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XI
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 A doença de Chagas	1
1.2 O <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
1.3 Quimioterapia da doença de Chagas	7
1.4 Processamento dos RNAs mensageiros (mRNA) em <i>T. cruzi</i>	10
2 OBJETIVOS	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Cultivo das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	17
3.2 Extração de DNA genômico	17
3.3 PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	18
3.4 Purificação dos produtos de PCR do gel de agarose para utilização na clonagem	19
3.5 Sequenciamento dos produtos de PCR obtidos	20
3.6 Purificação do produto de PCR para sequenciamento	21
3.7 Reação utilizada para adição de deoxiadenosina (A) aos produtos de PCR	21
3.8 Reação de ligação do inserto no vetor pGEM-T (Promega)	22
3.9 Preparação de célula competente de <i>E. coli</i> DH5- α	23

3.10	Transformação em bactéria DH5- α competente	23
3.11	Plaqueamento e repique das colônias	24
3.12	Manutenção dos clones recombinantes.....	24
3.13	Extração do DNA plasmidial	24
3.14	Linearização dos plasmídeos utilizando enzima de restrição	25
3.15	Purificação das amostras linearizadas.....	26
3.16	Reação de Transcrição (a frio).....	26
3.17	Gel de poliacrilamida 10% com uréia (7M).....	27
3.18	Eluição da banda de RNA após a transcrição	28
3.19	Reação de <i>trans-splicing</i> com células permeáveis utilizando formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	28
3.20	Reação de proteção com RNases A e T1	30
3.21	Reação de coloração pelo nitrato de prata (<i>Silver Staining</i>)	30
3.22	Quantificação das bandas de RNA utilizando programa Multi Analyst.....	31
4	RESULTADOS	32
4.1	Extração de DNA genômico de três cepas de <i>T. cruzi</i>	32
4.2	Produtos de PCR utilizando DNA genômico de <i>T. cruzi</i> (cepas Y, NCS e Bolívia)....	34
4.3	Eluição dos produtos de PCR das três cepas de <i>T. cruzi</i>	35
4.4	Mini-prep dos clones SL obtidos após clonagem dos produtos de PCR	36
4.5	Sequenciamento dos clones SL das cepas Y, NCS e Bolívia	37
4.6	Alinhamento das seqüências SL das três cepas	39
4.7	Linearização dos plasmídeos com enzima de restrição	40
4.8	Reação de transcrição <i>in vitro</i> a frio	41

4.9 Reação de <i>trans-splicing</i> com células permeáveis utilizando formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> e diferentes concentrações do fármaco NFOH	41
4.10 Reação de proteção com RNases A e T1 (a quente)	42
4.11 Reação de células permeáveis (cepa NCS) a frio corada pelo nitrato de prata	43
4.12 Reação de células permeáveis a frio corada pelo nitrato de prata com as 3 cepas de <i>T. cruzi</i> (Y, NCS e Bolívia) e o fármaco NFOH.....	45
4.13 Reação de células permeáveis a frio corada pelo nitrato de prata utilizando fármacos NF e NFOH.....	47
5 DISCUSSÃO.....	49
6 CONCLUSÕES.....	56
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
APÊNDICE.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

AgNO ₃	Nitrato de Prata
APS	Persulfato de Amônio
ATP	Adenina Trifosfato
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Soro Albumina Bovina
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
dATP	Deoxiadenina Trifosfato
DNA	Ácido Desoxirribonucleíco
dNTP	Desoxinucleotídeo Trifosfato
D.O.	Densidade Ótica
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ETOH	Álcool Etílico
(x) g	Força centrífuga relativa
H ₂ O	Água
HCl	Ácido clorídrico
kb	Kilobase
KCl	Cloreto de potássio
KGlu	Glutamato de Potássio
LB	Lúria-Bertani
LIT	Liver Infusion Tryptone

MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MOPS	Ácido 3-(N-morpholino) Propanesulfônico
Na ₂ CO ₃	Carbonato de Sódio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio bibásico
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
PM	Marcador de Peso Molecular
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RNA	Ácido Ribonucléico
mRNA	RNA mensageiro
RNAsin	Inibidor de RNAses
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SL	<i>Spliced leader</i>
TAE	Tampão Tris Acetato EDTA
TBE	Tampão Tris Borato EDTA
TE	Tampão Tris EDTA
TEMED	N, N, N', N' - Tetrametiletenodiamina
UV	Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Esquema ilustrativo do parasita <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
2. Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
3. Diferenças no processo de <i>cis</i> e <i>trans-splicing</i>	12
4. Estrutura secundária do SL RNA.....	13
5. Representação esquemática das diferentes metodologias desenvolvidas no trabalho	16
6. Ilustração do vetor pGEM-T (Promega)	22
7. DNAs genômicos obtidos de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	33
8. Produtos de PCR utilizando DNA genômico de <i>T. cruzi</i> (cepas Y, NCS e Bolívia).	34
9. Produtos de PCR purificados do gel de agarose	35
10. Extração de DNA plasmidial pelo método da lise alcalina.....	36
11. Alinhamento múltiplo das seqüências SL utilizando o programa <i>GeneDoc</i>	39
12. DNAs plasmidiais e linearização dos mesmos utilizando enzima de restrição <i>Pst</i> I.	40
13. Reação de proteção com RNases A e T1, utilizando a cepa Y e diferentes concentrações do NFOH	42
14. Reação de células permeáveis utilizando a cepa NCS da forma epimastigota de <i>T.</i> <i>cruzi</i> e diferentes concentrações do fármaco NFOH.....	43
15. Reação de células permeáveis utilizando as formas epimastigotas das 3 cepas de <i>T. cruzi</i> incubadas com diferentes concentrações do fármaco NFOH	45
16. Reação de células permeáveis utilizando formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> , cepa Y, com os fármacos NF e NFOH.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1. Oligonucleotídeos gene específicos e suas respectivas seqüências.....	18
2. Concentração dos DNAs genômicos em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ das três cepas de <i>T. cruzi</i>	32
3. Clones e respectivas cepas de <i>T. cruzi</i> selecionados para linearização.....	38
4. Concentração dos RNAs antisentido.....	41
5. Leitura das densidades óticas das bandas indicadas na Figura 14	44
6. Leitura das densidades óticas das bandas indicadas na Figura 15	46
7. Leitura das densidades óticas das bandas indicadas na Figura 16	48

RESUMO

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* que possui como mecanismo de processamento dos seus mRNAs a reação de *trans-splicing*, que envolve a excisão de íntrons e a união de éxons de dois transcritos independentes; um transcrito curto *spliced leader* (SL RNA) é trans-spliceado ao pré-mRNA acceptor, originando o mRNA maduro. No presente trabalho utilizamos células permeáveis de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepas Y, NCS e Bolívia) como modelo de estudo da interferência de fármacos no processamento dos mRNAs. Assim, inicialmente, realizou-se uma reação de PCR de DNA genômico das cepas Y, BOL e NCS para amplificação da seqüência SL e clonagem em vetor pGEM-T de tal modo que, após transcrição (*in vitro*) de tais clones, foram obtidos SL RNA anti-sentido a serem utilizados na reação de proteção com RNases A e T1 para análise do processamento dos mRNAs com as células permeáveis de cada uma das cepas. As células do parasita foram permeabilizadas com lisolecitina e tratadas com o potencial fármaco hidroximetilnitrofural (NFOH), um nitrofurano com capacidade de inibir a tripanotiona redutase, uma importante enzima no metabolismo antioxidante do *T. cruzi*. Dos experimentos realizados, observou-se que aumentando a concentração do NFOH os RNAs recém-sintetizados decaíram, sugerindo que este fármaco age no processamento dos RNAs dos parasitas. O sistema de células permeáveis mostrou ser útil para o entendimento da ação de fármacos tripanocidas, podendo ser utilizados na triagem de outros fármacos potencialmente tripanocidas.

ABSTRACT

Chagas' disease is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* that uses *trans-splicing* reaction as a mechanism of mRNA processing which involves intron excision and union of exon from two transcribed independent; one short transcript *spliced leader* (SL RNA) is spliced to the pre-mRNA acceptor, originating the mature RNA. In the present work we used permeable cells from *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms (Y, NCS and Bolívia strains) as a model of study of drug interference in the mRNA processing. So, initially, we have done a PCR reaction on genomic DNA of Y, BOL and NCS strains for amplification of the SL sequence and cloning in pGEM-T vector to obtain, after transcription (*in vitro*) of such clones, the anti-sense SL RNA to be used in the RNases A and T1 protection reaction for analysis of the newly processing mRNAs using permeable cells of each strain. The parasite cells were permeabilizing with lissoclitina and treated with the drug, hidroximetilnitrofuril (NFOH), a nitrofuril that is capacity to inhibit the trypanothione reductase, an important enzyme in the antioxidant metabolism of *T. cruzi*. It could be observed in the experiments that increasing the NFOH concentration the recently synthesized RNA decreased, suggesting that this drug acts somehow in the RNA processing in the parasites. Further experiments will be necessary for a better evaluation of the drug performance in the *trans-splicing* of parasites, but this permeable cell system showed to be useful for understanding of the action of trypanocide drugs.

1 Introdução

1.1 A doença de Chagas

A tripanossomíase americana é uma zoonose causada pelo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) existem entre 16 e 18 milhões de pessoas infectadas nas Américas e onde, cerca de 25% da população, encontra-se em risco de contrair a doença (GÜRTLER et al., 2003), constituindo um sério problema de saúde pública. A doença também ocorre em aproximadamente 5% da população nas regiões metropolitanas dos Estados Unidos devido ao fluxo de imigrantes da América Central (WHO, 2003). O controle do inseto vetor nas áreas endêmicas da América do Sul e Central tem levado a uma diminuição da transmissão por picadas do inseto. Atualmente, a transmissão congênita e a transfusão sanguínea são as principais causas de transmissão da doença, sendo a congênita a mais preocupante, devido aos efeitos colaterais causados nas mães e bebês pelos medicamentos disponíveis (GÜRTLER et al., 2003). As complicações mais severas em decorrência da doença causam cerca de 45.000 mortes por ano (WHO, 2003).

A maior parte dos casos de infecção humana, ou de outros vertebrados, é causada pela via vetorial, importante via de disseminação do flagelado, conseqüência do contato da pele ou mucosas com as fezes ou urina de insetos hematófagos (triatomíneos) contaminados pelo *T. cruzi* (SCHUMUÑIS, 2000).

Os vetores da doença de Chagas pertencem à ordem *Hemiptera*, família *Reduviidae*, subfamília *Triatominae* e espécies *Triatoma infestans*, *T. brasilienses*, *T. dimidiata*, *T. sordida*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius prolixus*, encontrados principalmente nas regiões endêmicas das Américas do Sul e Central. Entre os reservatórios estão os vertebrados domésticos (homem, cão, gato e roedores) e silvestres (marsupiais, quirópteros, carnívoros,

edentados, roedores, e primatas). Os humanos são os principais reservatórios domésticos, seguidos pelos cães, gatos e ratos, enquanto que numerosas espécies de mamíferos silvestres, que vivem em árvores ou exclusivamente terrestres, são encontrados naturalmente infectados em todas as áreas endêmicas (DIAS, 1992).

Embora a transmissão clássica da doença de Chagas seja a vetorial por triatomíneos hematófagos, a via transfusional vem se tornando epidemiologicamente importante devido à migração de pessoas infectadas provenientes de área endêmica para os centros urbanos. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, estima-se que cerca de 20.000 novos casos surgem nos países que realizam entre 5 a 6 milhões de transfusões por ano. Outras vias de transmissão, como transplantes de órgãos, são consideradas secundárias, assim como os casos raros de transmissão pelo aleitamento por mulheres chagásicas (BITTENCOURT et al., 1998).

A doença de Chagas pode ser dividida em duas fases clínicas: aguda e crônica, sendo a fase crônica subdividida em indeterminada, cardíaca, digestiva e nervosa.

A fase aguda da doença, cujas características aparecem de 7 a 10 dias após a infecção, faz com que o paciente apresente sintomas atípicos e de difícil diagnóstico; os sinais da infecção são caracterizados por inchaço na região da picada semelhante a um furúnculo ao qual se dá o nome de “chagoma de inoculação” (BRENER, 1992).

Na fase crônica indeterminada da doença de Chagas, ocorre baixo nível de parasitemia e alto teor de anticorpos. Após a fase aguda, a maioria dos pacientes evolui durante uma ou duas décadas nesta forma indeterminada, na qual, embora exista a infecção ativa, praticamente não há lesões clinicamente demonstráveis e os órgãos e sistemas se encontram preservados (CIMERMAN & CIMERMAN, 1999).

A forma crônica cardíaca é a mais importante por sua elevada morbimortalidade nas áreas endêmicas. Inflamação crônica, miocitólise e fibrose ocorrem progressivamente nos três

folhetos do órgão, cujo volume pode ser normal, pequeno ou aumentado. As principais lesões ocorrem no miocárdio, com importante destruição de miocélulas e do sistema excitocondutor, o que origina as síndromes básicas, respectivamente, de insuficiência cardíaca e arritmias. Na fase crônica digestiva, todo o tubo digestivo é acometido e as lesões predominam no esôfago e cólon terminal. Macroscopicamente, o segmento pode apresentar-se absolutamente normal (estágios iniciais, ocorrendo somente disfunção motora) ou progressivamente dilatado (megaesôfago, megacólon, megaestômago). No cólon, complicação freqüente e grave nos casos mais avançados é uma torção da alça, mais comum na sigmóide (CIMERMAN & CIMERMAN, 1999).

Já a forma nervosa crônica atinge o sistema nervoso autônomo, provocando disfunções motoras e secretórias periféricas, geralmente discretas e pouco perceptíveis. As lesões no sistema nervoso central podem ocorrer nos casos de reativação da doença em pacientes imunodeficientes (PITTELLA, 1993; ACQUATELLA, 1998).

1.2 O *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado (gênero *Trypanosoma*; família *Trypanosomatidae*; ordem *Kinetoplastida*; superclasse *Mastigophora*; sub-filo *Sarcomastigophora*; filo *Protozoa*) com três formas evolutivas: tripomastigota, epimastigota e amastigota. Estas formas são morfologicamente distintas pela posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e a inserção do flagelo. O cinetoplasto é uma estrutura altamente especializada onde se encontra todo DNA mitocondrial do parasita. As formas tripomastigotas têm seu cinetoplasto na parte posterior do parasita em relação ao flagelo; nas epimastigotas, o mesmo se encontra na região entre o núcleo e a base do flagelo e nas formas amastigotas, arredondadas, o cinetoplasto é encontrado próximo ao núcleo e na região do flagelo que é muito reduzido ou ausente nesta forma (BRENER, 1992). A Figura 1 apresenta o parasita e suas estruturas.

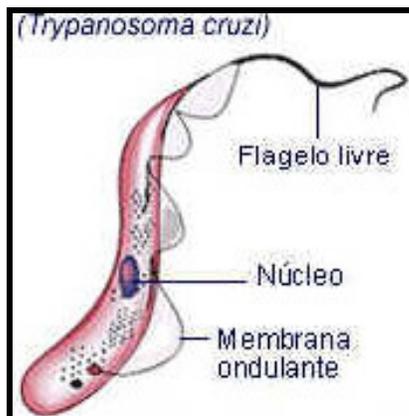


Figura 1: Esquema ilustrativo do parasita *Trypanosoma cruzi*. Disponível em www.biosci.ohio-state.edu/parasite.

O *T. cruzi* possui diferentes formas morfológicas e funcionais relacionadas com os hospedeiros vertebrados (tripomastigotas e amastigotas) e invertebrados (epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos). A penetração no hospedeiro vertebrado ocorre através da pele e mucosas, quando o inseto, durante seu repasto sanguíneo, elimina fezes e urina contaminadas com as formas metacíclicas (BRENER, 1984).

A primeira diferenciação do parasita ingerido pelo inseto vetor ocorre no estômago: o tripomastigota transforma-se em epimastigota poucas horas após sua ingestão. A segunda diferenciação do parasita no tubo digestivo do vetor se dá quando os epimastigotas se transformam em tripomastigotas metacíclicos (as formas infectantes para o hospedeiro vertebrado). Essa diferenciação ocorre predominantemente no final do intestino e do reto. Os tripomastigotas metacíclicos são liberados nas fezes e urinas do inseto vetor, penetram através da pele e mucosas, como já dito anteriormente, invadindo diferentes tipos de células no hospedeiro (GARCIA & AZAMBUJA, 2000).

Após a invasão das células, os parasitas rapidamente se diferenciam em amastigotas que sofrem várias divisões no interior das células infectadas. Posteriormente, os amastigotas se diferenciam em tripomastigotas, que são liberados para o sangue após rotura da membrana celular, iniciando o próximo ciclo de infecção de outras células ou ciclo biológico do parasita quando ingerido pelo vetor (GARCIA & AZAMBUJA, 1991). A Figura 2 ilustra o ciclo biológico do parasita.

Vários estudos têm mostrado que as formas amastigotas do *T. cruzi* também podem aderir e invadir células de mamíferos “*in vivo*” e “*in vitro*” (UMEZAWA et al., 1985).

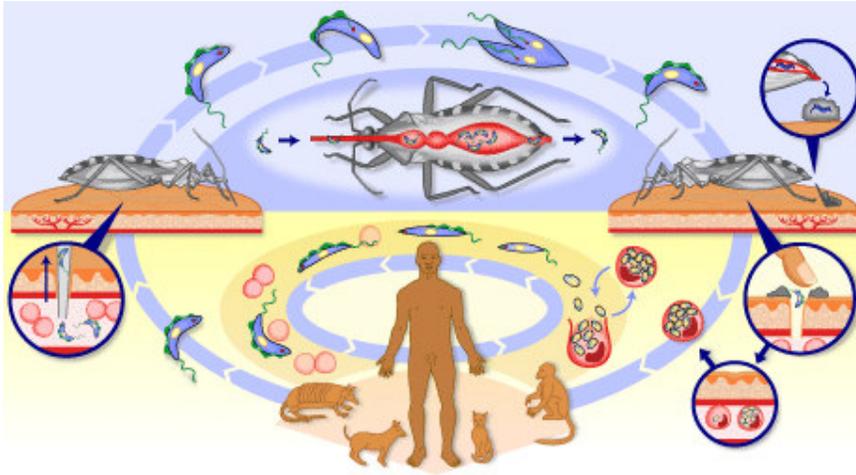


Figura 2: Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*. Disponível em www.med.sc.edu/trypanosomiasis.

1.3 Quimioterapia da doença de Chagas

Desde a descoberta da doença pelo médico sanitarista Carlos Chagas, em 1909, até os dias atuais, foram realizadas inúmeras tentativas de tratamento, sem se obter, entretanto, um medicamento totalmente eficaz. Muitas substâncias naturais e sintéticas apresentaram atividade tripanocida (CROFT et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2003; URBINA & DOCAMPO, 2003; VIEIRA & MIDIO, 2001; RODRIGUEZ et al., 1998; CERECETTO et al., 1998; SEPÚVELDA-BOZA & CASSELS, 1996), mas estão longe de tornarem-se um fármaco aprovado em todos os testes clínicos. Além disso, extratos e frações de produtos naturais também apresentaram-se ativos sugerindo futura investigação de seus componentes (FREITAS et al., 2002; MAFEZOLI et al., 2000; BASTOS et al., 1999; MOIDEEN et al., 1999; BERGER et al., 1998). Apesar disso, nenhum fármaco tornou-se disponível para o tratamento da doença desde 1970 quando foram introduzidos os dois fármacos atuais no mercado, benznidazol e nifurtimox, sendo este último não mais comercializado no Brasil devido à resistência apresentada pelas cepas brasileiras (CROFT, 1999; COURA & CASTRO, 2002).

Estes fármacos apresentam baixa eficácia e fortes efeitos colaterais (STOPPANI, 1999), como anorexia, distúrbios gastrintestinais, neuropatias e erupções cutâneas (BERGER et al., 1998); além de eficácia variável e toxicidade, precauções devem ser tomadas para uso parenteral prolongado e resistência do parasita ao fármaco (CROFT, 1999).

MURTA e colaboradores (1998) sugerem que a resistência natural do *T. cruzi* a derivados nitroeterocíclicos pode ser um fator importante para explicar a baixa taxa de cura em pacientes chagásicos. O aparecimento de resistência torna imprescindível a descoberta de novos protótipos de origem natural (NEWMAN et al., 2000), semi-sintética ou sintética, além

da viabilização do uso da biologia molecular para caracterizar a suscetibilidade das cepas infectantes às substâncias em questão (MURTA et al., 1998).

O desenvolvimento de fármacos mais efetivos e menos tóxicos requer um melhor conhecimento do ciclo de vida e metabolismo do *T. cruzi*. Uma extensa distribuição da forma intracelular amastigota dos parasitos nos tecidos e células, durante a fase aguda e crônica da doença de Chagas, é a mais difícil etapa para a ação de um fármaco específico, quando comparado com a leishmaniose, onde as formas amastigotas estão restritas aos macrófagos (CROFT, 1999).

O *T. cruzi* apresenta grande variedade nas propriedades biológicas de suas cepas; a cepa Y causa parasitemia e alta mortalidade em ratos. Esta cepa é considerada padrão do tipo I segundo BRIONES et al. (1999), que classifica como tipo I, linhagens isoladas de seres humanos e tipo II, linhagens que foram isoladas de vetores e de ciclos silvestres; a cepa NCS foi isolada de paciente chagásico pelo Prof. Dr. Arnaldo Buainain (Professor aposentado do Depto. de Análises Clínicas da FCF-UNESP) e gentilmente cedida ao nosso laboratório em 1987, podendo, também, ser classificada como *T. cruzi* I. A cepa Bolívia foi isolada de triatomíneo silvestre e descrita por FUNAYAMA & PRADO JÚNIOR (1974), mas, em virtude da existência de formas largas e finas, torna-se difícil sua classificação conforme sugerido nas recomendações publicadas por ZINGALES (2000).

Ensaio *in vivo* com nifurtimox e benznidazol mostraram que a cepa Y apresentou-se mais sensível do que a cepa Bolívia sendo, portanto, a cepa Y um bom candidato para triagem primária de novos agentes tripanocidas (MARTINEZ-DIAZ et al., 2001).

Para o desenvolvimento de fármacos mais seletivos e eficazes torna-se cada vez mais importante a seleção do alvo terapêutico, o que permitirá uma busca racional por agentes que provoquem a resposta desejada específica para o controle da doença. O maior foco para a

descoberta de novos fármacos antichagásicos durante as últimas décadas tem sido a identificação e caracterização bioquímica e molecular dos alvos (CROFT, 1999).

Na doença de Chagas, vários processos bioquímicos tem sido apontados como alvos terapêuticos potenciais (RODRIGUEZ, 2001; DOCAMPO, 2001), entre eles, a enzima tripanotiona redutase (SALMON et al., 2000), biossíntese de RNA mensageiro, biossíntese de lipídios, transialidase (FAIRLAMB, 1999), enzimas do glicossomo, envolvidas no metabolismo energético do parasita (SOUZA et al., 1998), dentre outras.

Nitrofurais (NF), 5-nitro-2-furfurilidene-semicarbazona, é um agente antimicrobiano primário ativo contra microorganismos gram-positivos e, usado somente em infecções tópicas (KOROLKOVAS, 2002). Além disso, BRENER e colaboradores (1961) encontraram atividade tripanocida nesta substância, cujo efeito pode ser atribuído à inibição da tripanotiona redutase.

A tripanotiona redutase de *T. cruzi* tem sido considerada uma enzima chave no metabolismo oxidativo do parasita e os derivados nitrofurais têm mostrado produzir inativação irreversível desta enzima. Chung e colaboradores (2003) obtiveram a partir do nitrofurais (NF), um derivado, o hidroximetilnitrofurais (NFOH), que se apresentou muito eficiente como tripanocida nos testes realizados.

O hidroximetilnitrofurais (NFOH), foi isolado e testado em cultura de células LLC-MK2 infectadas com formas tripomastigotas de *T. cruzi* mostrando alta atividade tripanocida, quando comparado ao nitrofurais e benznidazol em todos os estágios. Testes de mutagenicidade mostraram que o NFOH foi menos tóxico do que o componente parente (NF). Este potencial fármaco parece ser promissor no estudo de substâncias tripanocidas, já que se apresentou com atividade mais alta em relação ao fármaco disponível atualmente (benznidazol) e se mostrou menos tóxico para as células de mamíferos se comparado ao nitrofurais (NF) (CHUNG et al., 2003).

1.4 Processamento dos RNAs mensageiros (mRNA) em *T. cruzi*

O genoma nuclear do *T. cruzi* tal como ocorre em outros eucariontes, é composto por seqüências de DNA que podem ser agrupadas em três classes majoritárias: seqüências que codificam proteínas, seqüências que codificam RNAs e seqüências repetitivas, as quais, em geral, não são codificadoras. Deve-se também levar em conta a presença de seqüências espaçadoras existentes entre genes codificadores de proteínas ou RNA que podem conter elementos reguladores da transcrição. O estudo da expressão gênica dos tripanosomatídeos tem revelado a existência de mecanismos genéticos peculiares, como por exemplo, a organização dos genes de proteínas em unidades transcricionais policistrônicas, o processamento dos transcritos através de *trans-splicing* e a editoração do RNA (alteração das seqüências de nucleotídeos do mRNA, após a transcrição). Adicione-se a isso, a existência nos tripanossomas de promotores e RNA polimerases pouco convencionais (FRANCO DA SILVEIRA, 2000).

A expressão da informação genética contida em um segmento de DNA em eucariotos envolve etapas que se iniciam com a síntese de um precursor do RNA mensageiro (pré-mRNA ou transcrito primário), seguido de um processamento de maturação, tornando-o apto para sair do núcleo e ir para o citoplasma sofrer tradução nos ribossomos (BACH, 1992).

No processo de maturação do pré-mRNA, conhecido como *splicing*, os íntrons (regiões intergênicas não codificadoras de polipeptídios) são removidos dos transcritos primários e os éxons (regiões codificadoras), unidos para formar uma seqüência contígua especificando um polipeptídeo funcional. Estudando este mecanismo, observou-se que ele é dependente de ribonucleoproteínas, que são pequenas moléculas de RNA ligadas a proteínas de diferentes formas e tamanhos, formando um complexo macromolecular denominado “spliceossomo”, onde ocorre a reação de maturação (LEHNINGER 1995; DE ROBERTS, 1993).

Os mRNAs da maioria dos genes de vertebrados são sintetizados por *cis-splicing*, em um mecanismo de duas etapas, que se processa por meio de duas reações de transesterificação: na primeira etapa, o sítio 5' *splice site* do éxon 1 é cortado, deixando livre o –OH terminal da região 3'. Ao mesmo tempo, o 5' *end* do íntron liga-se, por uma ponte fosfodiéster 2'-5', a um resíduo de adenosina no íntron, denominado *branch site*, geralmente localizado dentro de 100 nucleotídeos do 3' *splice site*. Esta forma denomina-se *lariat* intermediário e contém o íntron ligado ao 3' éxon (éxon 2). O éxon 1 e o éxon 2 são subsequentemente clivados no sítio 3' *splice site* e os dois éxons unidos por uma ponte 3'-5' fosfodiéster. Dessa reação surgem, então, dois produtos: os éxons 1 e 2 unidos e um *lariat* contendo o íntron excisado com um 3' –OH terminal (BACH, 1992).

Em contraste com o *cis-splicing* intramolecular, o *trans-splicing* envolve a união de éxons de dois transcritos independentes. Em tripanosomas e nemátodes, um transcrito curto (aproximadamente 39 nucleotídeos), denominado de *spliced leader* (SL) RNA ou mini-éxon (como era antigamente referido), é transferido para todo mRNA nuclear, cuja maioria é sintetizada como precursores policistrônicos (AGABIAN,1990).

Exceto por essa natureza intermolecular, o *trans-splicing* apresenta as mesmas etapas do *cis-splicing*. Assim, na primeira fase da reação, a clivagem no sítio doador de SL gera o 5' SL éxon; o SL RNA remanescente liga-se à adenosina do *branch site* no pré-mRNA aceptor para formar o Y-intermediário (corresponde ao *lariat* do *cis-splicing*). Na segunda fase, a clivagem no 3' *splice site* e ligação do éxon gera éxons “spliceados” ou costurados e um Y-íntron excisado. Em tripanosomas, esta reação resulta numa seqüência de 39 nucleotídeos no 5' *end* de todos os mRNAs (NILSEN 1989; AGABIAN 1990; NILSEN 1995). A Figura 3 a seguir, apresenta as diferenças entre *cis* e *trans-splicing*.

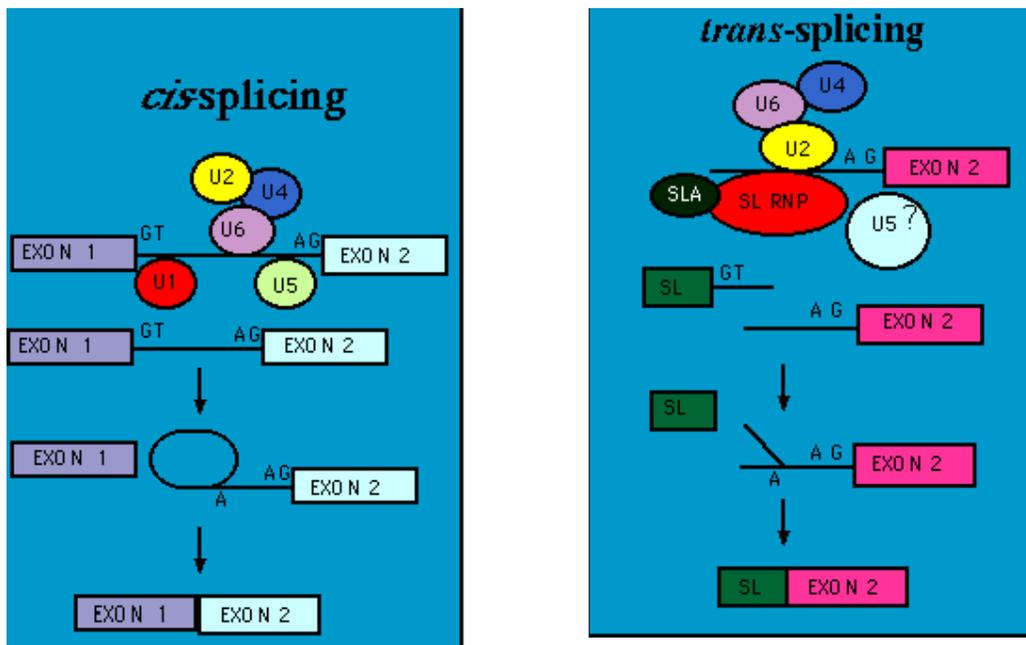


Figura 3: Diferenças no processo de *cis* e *trans-splicing*. Disponível em www.geneticengineering.org/RNA.

A seqüência SL está teoricamente presente em todos os mRNAs do tripanosoma e sua função exata não é conhecida. Existem evidências de que essa seqüência confere estabilidade ao mRNA, impedindo a sua degradação, auxiliando também a interação do mRNA com os ribossomos. Transcritos desprovidos de SL, perdem a sua estabilidade e não são traduzidos (FRANCO DA SILVEIRA, 2000).

Tal como ocorre nos eucariontes, os mRNAs dos tripanosomas apresentam na sua extremidade 3' uma cauda composta por cerca de 30 resíduos de adenina (cauda poli-A). Porém, ao contrário dos eucariontes superiores, os mRNAs dos tripanosomatídeos não apresentam uma seqüência consenso para a adição de resíduos de adenina. A adição de SL e da cauda poli-A ocorre durante a transcrição do mRNA, existindo uma certa controvérsia com relação à hierarquia desses eventos. Na transcrição dos genes de tubulina, o *trans-splicing*

precede a poliadenilação, enquanto, no caso dos genes de hsp70, ocorre o inverso (LIANG et al., 2003). Na Figura 4 observa-se a estrutura secundária do SL RNA.

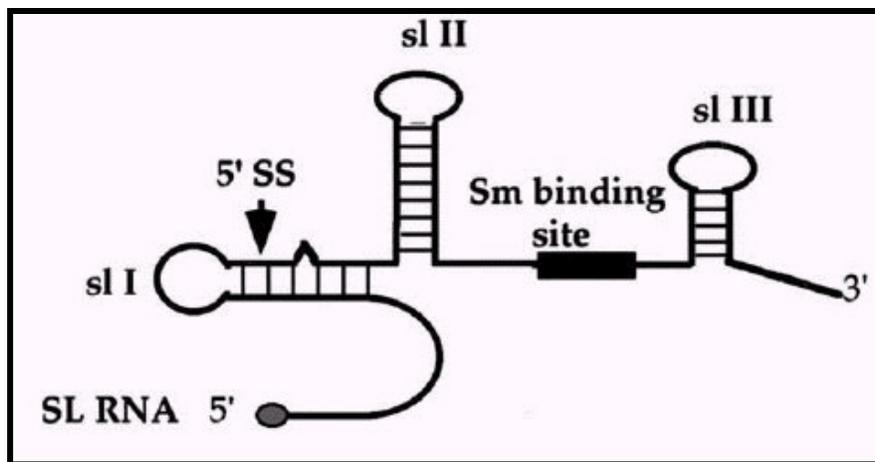


Figura 4: Estrutura secundária do SL RNA. As 3 estruturas do stem-loop (SL I, SL II e SL III); sítio 5' spliced (5' SS) e o sítio Sm são indicados. O círculo na extremidade 5' indica a estrutura cap 4. Esquema retirado de LIANG et al. 2003.

Em estudos mais recentes foi observado que o *cis-splicing* também pode ocorrer no gene PAP (*Poly (A) Polymerase*) de *T. brucei* e *T. cruzi*, sugerindo que ambos, *trans* e *cis-splicing* também ocorram nesses parasitas, com predominância do *trans-splicing* (MAIR et al., 2000).

Estudos da reação de *trans-splicing in vitro* com extratos nucleares de formas epimastigotas de *T. cruzi* e pré-mRNA sintético de alfa-tubulina demonstraram que o processamento do pré-mRNA também pode ocorrer *in vitro* sem a participação de células vivas; porém, o uso desta reação como um modelo de estudo de *trans-splicing* apresentou algumas dificuldades na reprodutibilidade, demandando muito tempo na avaliação das moléculas que intervêm direta ou indiretamente no *trans-splicing* de tripanosomas (VIANNA et al., 2001).

Um outro modelo de estudo da reação de *trans-splicing* em tripanossomas utilizando células permeáveis de *T. cruzi*, tratadas com detergente lissocitina, que as torna permeáveis a nucleotídeos trifosfatados e outras moléculas, permite sintetizar ativamente seus RNAs (AMBRÓSIO et al., 2004). Esse sistema pode propiciar a investigação da síntese, processamento e regulação do mRNA em tripanosomas, bem como o estudo da interferência de fármacos no processamento dos mRNAs por *trans-splicing*, sem contudo afetar as células hospedeiras que processam seus mRNAs através do *cis-splicing*.

2 Objetivos

O presente trabalho teve por objetivo analisar a interferência de fármacos no processamento dos mRNAs, utilizando como modelo da reação de *trans-splicing in vitro*, o sistema de células permeáveis com as formas epimastigotas de três cepas de *Trypanosoma cruzi*.

Para isso, alguns objetivos específicos foram traçados:

- ⊗ Síntese de seqüências SL das cepas de *T. cruzi* (Y, Bolívia e NCS) e clonagem das mesmas para posterior transcrição *in vitro*;
- ⊗ Reação de *trans-splicing* utilizando células permeáveis de cada uma das cepas;
- ⊗ Reação de proteção com RNases A e T1 com os transcritos (RNA) de SL anti-sentido;
- ⊗ Avaliação da interferência de diferentes concentrações dos fármacos hidroximetilnitrofural (NFOH) e nitrofural (NF) no processamento dos RNAs de cada cepa.

3 Material e Métodos

O trabalho foi desenvolvido de acordo com as metodologias descritas na Figura 5.

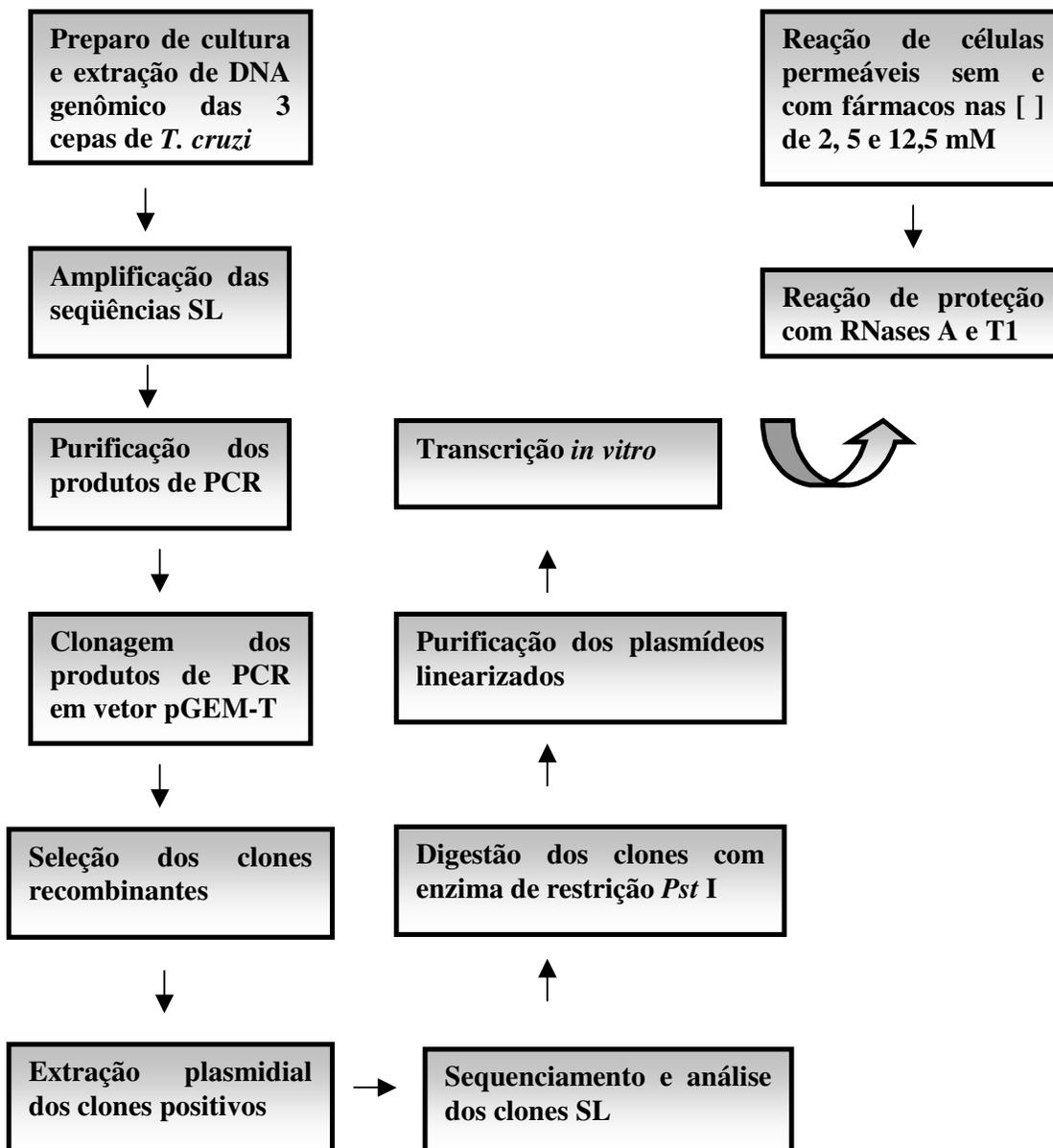


Figura 5: Representação esquemática das diferentes metodologias desenvolvidas no trabalho.

3.1 Cultivo das formas epimastigotas de *T. cruzi*

As cepas Y, NCS e Bolívia de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT. Para o cultivo, 2,0 a 3,0 ml da cultura (dependendo do número de formas no inóculo, que deve ser de aproximadamente 10^5 formas, contadas em câmara de Neubauer) foram semeados em 50 ml de meio LIT. O tempo de incubação foi de 15 a 20 dias a 25°C, sendo que após esse período foi feito outro repique das cepas para manutenção da cultura e posterior utilização na reação de células permeáveis.

3.2 Extração de DNA genômico

Uma cultura de 50 ml de *T. cruzi* (cepas NCS, Y e Bolívia) foi centrifugada a 1.300x g (centrífuga U-32R, Boeco) 4°C por 20 minutos. Em seguida, desprezou-se o sobrenadante e o sedimento formado foi transferido para um eppendorf de 1,5 ml.

Novamente a cultura foi centrifugada por 18.000x g, 4°C por 5 minutos para retirada do meio de cultura restante. Adicionou-se 750 μ l de DNAzd® (Invitrogen) para ressuspender o sedimento formado.

Centrifugou-se por 10 minutos a 1.300 x g, 4°C, desprezando o sobrenadante, seguindo-se a adição de 375 μ l de DNAzd®, homogeneizando para nova centrifugação a 4°C, 8.000x g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionou-se 500 μ l de etanol 100% para precipitação, invertendo o tubo várias vezes, incubou-se à temperatura ambiente por 3 minutos.

Centrifugou-se por 2 minutos, a 8.000x g a 4°C (centrífuga 5415C-Beckman), desprezou-se o sobrenadante e lavou-se a amostra com 500 μ l de etanol 95% por 2 vezes. Em seguida, centrifugou-se por 1 minuto, a 4°C e 8.000x g, descartando-se o sobrenadante e secando o sedimento a vácuo. A amostra foi ressuspensa em 30 μ l de NaOH 8mM para completa solubilização e armazenada à -20°C. Para a visualização do DNA genômico, foi

feito um gel de agarose 0,8% e a imagem capturada com o auxílio do aparelho Fluor-S MultiImager (Bio-Rad).

3.3 Amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) da seqüência SL

Após a extração dos DNAs genômicos das três cepas de *T.cruzi* foi feita a amplificação da região de interesse SL (*spliced leader*). Para isso, utilizou-se:

PCR Buffer [10X]

50mM MgCL₂

dNTP mix 100mM

SL DIR [10pmol/ul] - (primer ou iniciador gene-específico)

SL INV T3 [10pmol/ul] - (primer ou iniciador gene-específico contendo sítio para T3

RNA polimerase)

Taq DNA Polimerase [5U/ul] (Amersham)

100 ng DNA genômico

Na Tabela abaixo estão especificadas as seqüências dos oligonucleotídeos sintetizados:

Tabela 1: Oligonucleotídeos gene-específicos e suas respectivas seqüências.

Oligonucleotídeos	Seqüência
SL DIR	5'AACACAACCTCCTTTCAAC 3'
SL INV T3	5' ATTAACCCTCACTAAAGGGAGGGGTCCGTGGACCCCG 3'

Ciclo da reação de PCR:

- 1) 93°C _____ 3'
- 2) 94°C _____ 30"
- 3) 52°C _____ 40"
- 4) 72°C _____ 1'
- 5) Go to 2) 30 x
- 6) 72°C _____ 10'
- 7) 4°C _____ ∞

3.4 Purificação dos produtos de PCR do gel de agarose para utilização na clonagem

O gel de agarose apresenta uma matriz porosa que faz com que os fragmentos de DNA de diferentes massas moleculares migrem com velocidades inversamente proporcionais ao seu tamanho. As moléculas de DNA migram para o pólo positivo, já que sua carga é negativa devido à ionização dos grupamentos fosfatos. Moléculas de menor massa molecular migram com maior facilidade, sendo possível dessa forma separar e estimar o tamanho do fragmento de DNA.

A purificação dos produtos de PCR para utilização na clonagem foi realizada utilizando kit Qiagen de acordo com as instruções do fabricante. A técnica consiste em extrair os fragmentos de DNA selecionados do gel de agarose, eliminando todas as impurezas e contaminantes. O resultado foi analisado em gel de agarose 1% em tampão TAE [1X].

3.5 Sequenciamento dos produtos de PCR obtidos

Após a obtenção dos produtos de PCR, estes foram preparados para o sequenciamento:

4 μ l produto de PCR (400ng)

2 μ l *Big Dye Terminator* (Applied Biosystem)

2 μ l Buffer *Save Money*

2 μ l primers *Forward* e *Reverse* (1,6 pmol/ μ l)

A reação de sequenciamento automatizado analisada no “ABI 377 DNA Sequencer” (Applied Biosystem) implica basicamente na adição de nucleotídeos marcados com fluorocromos, onde cada base pode ser identificada por cores diferentes.

Ciclo da reação de PCR para sequenciamento:

1) 96°C _____ 2'

2) 96°C _____ 30”

3) 52°C _____ 30”

4) 72°C _____ 4'

5) Go to 2) 40 x

6) 4°C _____ ∞

3.6 Purificação do produto de PCR para sequenciamento

Adicionaram-se 80 μ l de isopropanol 75% em cada amostra para precipitar e deixou-se a temperatura ambiente por 15 minutos (no escuro).

Centrifugou-se a 18.000x g (centrifuga 5417R, Eppendorf) por 15 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, descartou-se o sobrenadante invertendo o tubo sobre papel absorvente. Adicionou-se cuidadosamente 1ml de etanol 70% em cada tubo, centrifugando-se novamente por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante por inversão cuidadosa do tubo sobre papel absorvente e secando-se o sedimento durante 15 minutos a 37°C.

As amostras foram ressuspensas em 2 μ l de *loading buffer*, vortexando para misturar. Antes de aplicar no gel de sequenciamento, as amostras foram fervidas por 2 minutos à 95°C.

Após a corrida eletroforética e análise do gel, foi realizado o BLAST (comparação) das seqüências obtidas com o Banco de Dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov.br/BLAST>).

3.7 Reação utilizada para adição de deoxiadenosina (A) aos produtos de PCR

Antes de realizar a reação de ligação do inserto (produtos de PCR) ao vetor foi necessário adicionar deoxiadenosina (A) às extremidades do inserto purificado para que o mesmo pudesse ligar-se ao vetor de clonagem pGEM-T (Promega), que apresenta timidina em sua extremidade de ligação. Este procedimento facilita a inserção do DNA exógeno no vetor.

Em eppendorf esterilizado misturou-se:

7,2 μ l produto de PCR purificado

1,0 μ l tampão de PCR [10X]

0,3 μ l MgCl₂ 50mM

0,5 μ l dATP 5mM (Amersham)

1,0µl Taq DNA polimerase [1U] (Amersham)

Volume final: 10µl

Incubou-se à 70°C por 30 minutos e em seguida as amostras foram armazenadas a –20°C até o momento do uso.

3.8 Reação de ligação do inserto no vetor pGEM-T (Promega)

Para a ligação do inserto ao vetor pGEM-T utilizou-se a seguinte reação:

7,5µl *Reaction buffer 2X*

1,0µl vetor pGEM-T (Promega)

5,5µl DNA (adicionado de A)

1,0µl DNA Ligase (Promega)

Volume final: 15µl

Incubou-se a 4°C por 15 horas e em seguida as amostras foram armazenadas a –20°C até o momento do uso. A Figura 6 ilustra o vetor utilizado e o sítio de clonagem.

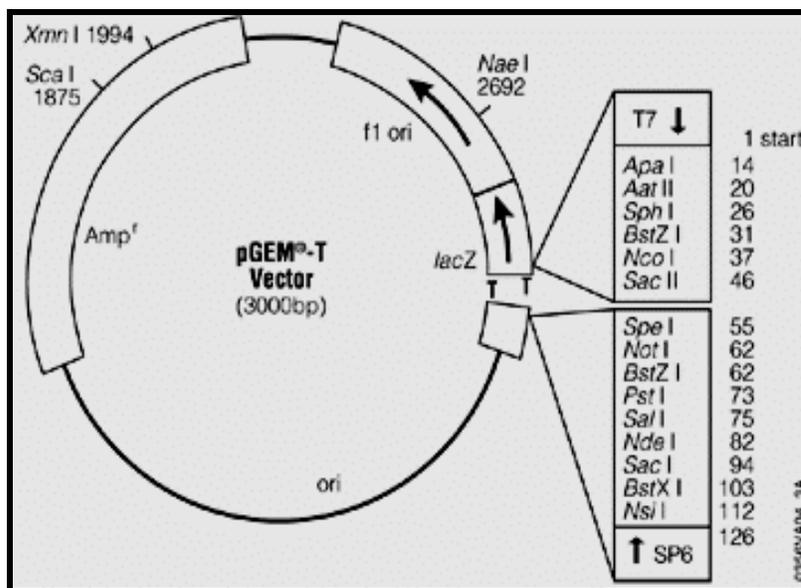


Figura 6: Ilustração do vetor pGEM-T (Promega). Disponível em www.promega.com

3.9 Preparação de célula competente de *E. coli* DH5- α

As bactérias DH5- α foram semeadas em 5ml de meio LB líquido sem antibiótico e incubadas em estufa (INNOVA 4000) com agitação de 160 rpm à 37°C por 18 horas.

No dia seguinte, transferiu-se a cultura de 5 ml de bactéria para 50 ml de meio LB líquido sem antibiótico e foram colocadas à 37°C com agitação de 160 rpm. A DO₆₀₀ foi monitorada após a primeira hora até atingir acima de 0,4. Após esse período, centrifugou-se a cultura a 1500x g, 4°C por 10 minutos e o sedimento foi ressuspensão em solução de cloreto de cálcio gelada. Este procedimento foi repetido mais uma vez. Os tubos foram mantidos em gelo por 1 hora e depois deste período, centrifugou-se nas mesmas condições descritas anteriormente.

O sedimento foi ressuspensão em 1:50 (300 μ l) do volume inicial de solução de cloreto de cálcio gelada, e as células (100 μ l) foram então aliquotadas em eppendorf esterilizado e armazenadas à -80°C.

3.10 Transformação em bactéria DH5- α competente

Para a transformação, 30 μ l de células competentes foram descongeladas em gelo, adicionando-se 5 μ l de DNA (plasmídeo contendo inserto) deixando em repouso por 30 minutos em gelo. Os tubos foram colocados em banho-maria 42°C durante 2 minutos, seguido de choque térmico em gelo por 2 a 5 minutos.

Adicionou-se 270 μ l de meio SOC previamente aquecido e incubou-se a 37°C, com agitação de 160 rpm durante 60 minutos. As amostras foram então plaqueadas em meio LB contendo antibiótico apropriado e incubadas a 37°C por 18 horas.

3.11 Plaqueamento e repique das colônias

Ao meio LB-ágar contendo ampicilina (100µg/ml), já em placas de Petri, foram adicionados 100µl de IPTG 5mM e 100µl de X-Gal 0,8% por placa, semeando-se 100µL da reação de transformação e incubando-se à 37°C durante 18 horas.

No dia seguinte, as colônias recombinantes (brancas) foram repicadas em 5ml de meio LB líquido com ampicilina (100µg/ml), deixando à 37°C, 160 rpm durante 18 horas. Das amostras que apresentaram crescimento foram isolados os DNAs plasmidiais.

3.12 Manutenção dos clones recombinantes

Para a manutenção dos clones de interesse, isto é, bactérias DH5-α contendo o plasmídeo pGEM-T fita dupla com inserto, procedeu-se da seguinte maneira:

Colônias foram selecionadas da placa de LB-ágar e colocadas para crescerem em meio LB líquido (5ml) contendo o antibiótico ampicilina (100µg/ml) e deixadas em estufa com agitação de 160rpm, 37°C por 18 horas. As bactérias contendo o inserto foram congeladas em glicerol v/v. As amostras foram então armazenadas em freezer -80°C.

3.13 Extração do DNA plasmidial

Para a extração do DNA plasmidial contendo o inserto de interesse foi utilizado o método da lise alcalina, segundo a técnica descrita por SAMBROOK et al (1989). Após crescimento dos clones (descrito no item 3.11), procedeu-se da seguinte maneira:

As bactérias foram centrifugadas a 18.000x g, 5 minutos a 4°C e ao sedimento acrescentou-se 100µl de solução I – TEG (descrita no Apêndice). Adicionaram-se 200µl de solução II preparada na hora do uso, misturou-se por inversão 5 vezes, incubando-se em gelo por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 150µl de solução III invertendo por 10 vezes as amostras e incubando no gelo por 5 minutos.

As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 4°C e 18.000x g e o sobrenadante transferido para um novo tubo. Adicionou-se volume a volume (v/v) de uma mistura de fenol/clorofórmio, levando-se ao vórtex e centrifugando-se por 2 minutos a 4°C. Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo e o DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol 100%, deixando-se a temperatura ambiente por 5 minutos; em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos, 18.000x g a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se 1ml de etanol 70%, centrifugando por 5 minutos (18.000x g a 4°C). O sobrenadante foi novamente desprezado e as amostras foram secas a vácuo por 15 minutos e em seguida foram ressuspensas em 25µl de água ou T.E.

A extração foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% TAE [1X] em cuba horizontal da “Life Technologies Gibco BRL Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus” a 100V. Utilizou-se “1 kb DNA Ladder” (Gibco BRL) como padrão de massa molecular. Em seguida, cada DNA extraído foi seqüenciado com oligonucleotídeo direto e reverso para posterior análise e confirmação da seqüência.

3.14 Linearização dos plasmídeos utilizando enzima de restrição

Os plasmídeos contendo DNA de *T. cruzi* foram digeridos com a enzima de restrição *Pst* I para linearização, utilizando-se 20 µg do DNA plasmidial e deixando-se a digestão por 2:30 horas a 37°C.

1,0µl de enzima *Pst* I (Gibco BRL)

2,5µl *React 2 buffer* (Gibco BRL)

1,5µl água mili-Q autoclavada

20µl plasmídeo

25µl volume final

Para visualização da digestão do plasmídeo foi feita eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE [1X].

3.15 Purificação das amostras linearizadas

Para obter-se amostras mais puras e livres de contaminantes para utilização na reação de transcrição *in vitro*, realizou-se o seguinte procedimento:

Às amostras contendo 20µl de plasmídeo linear, foram adicionados 80µL de água mili-Q e volume/volume de uma mistura de fenol/clorofórmio, centrifugando por 5 minutos, 18.000x g, a temperatura ambiente; em seguida, retirou-se a fase aquosa, transferiu-se para novo tubo e adicionou-se volume/volume de uma mistura de clorofórmio:isoamilálcool (24:1), centrifugando-se por 5 minutos, 18.000x g, a temperatura ambiente.

Após centrifugação, retirou-se a fase superior, transferiu-se para novo tubo e precipitou-se com 5 µL de SET [20X] e 300 µL de etanol 100%, centrifugando-se por 15 minutos, 18.000x g, 4°C e seguindo-se de lavagem com 100µL de etanol 70%. Uma nova centrifugação foi realizada (5minutos, 18.000x g, 4°C), o sobrenadante retirado e as amostras ressuspensas em 20µL de água e armazenadas no -20°C até o momento do uso.

3.16 Reação de transcrição *in vitro* (a frio)

Para a reação de transcrição ocorrer, adicionou-se um inibidor de RNases, denominado RNAsin (Promega), DTT, que auxilia a reação e facilita a ligação do cap, um resíduo de 7-metilguanossina que se une à extremidade 5' do mRNA, através de uma ligação incomum 5',5' trifosfato (as ligações em geral são 5', 3' trifosfato), MgCl₂, ribonucleotídeos trifosfatados (A, U, C, G), os quais permitem que a enzima T3 RNA polimerase sintetize o pré-mRNA.

Para realizar a reação de transcrição *in vitro* foram necessários:

5 µl de tampão de transcrição

0,7µl de RNAsin [40U/µl] (Promega)

0,5µl Cap [0,5A/µl]

Água q.s.p. 20µl

As amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e então acrescentou-se:

1,0µl NTP mix [10mM] (Promega)

0,8µl de enzima T3 RNA polimerase (USB)

As amostras foram incubadas por 4 horas a 37°C; em seguida, foram adicionados 20µl de formamida, fervendo-se a mistura por 2 minutos a 96°C, aplicando-se as amostras em gel de poliacrilamida 5% com uréia 7M. Após a corrida, o gel foi corado com solução de brometo de etídio (20mg/ml) por aproximadamente 20 minutos. As bandas transcritas foram observadas em trans-iluminador Flúor-S MultiImager (Bio-Rad) e recortadas do gel para eluição do RNA.

3.17 Gel de poliacrilamida 10% com uréia (7M)

42g de uréia

Acrilamida 40%

[0,5X] TBE

Após a dissolução da uréia por agitação, adicionou-se 1:100 de persulfato de amônio 10% e 1:1000 de TEMED para polimerização do gel. Depois, aplicou-se nas placas e esperou-se a polimerização para aplicação das amostras previamente aquecidas a 95°C por 2 minutos e mantidas em gelo. Os géis a 5%, para reação de transcrição, foram feitos seguindo-se o mesmo procedimento.

3.18 Eluição da banda de RNA após a transcrição

Recortou-se a banda de RNA presente no gel de poliacrilamida, colocando-se em eppendorf para maceração juntamente com 200µl do tampão de extração (descrito no Apêndice) incubando-se a 37°C por 1:30 hora. Em seguida, transferiu-se para outro tubo livre de RNases, extraíndo-se com 200µl butanol [1X], misturando-se no vórtex e centrifugando-se por 5 min, 18.000x g à temperatura ambiente; a seguir, desprezou-se a fase superior e adicionou-se 1ml de ETOH 100%, para precipitação do RNA, incubando em gelo por 15 min, seguindo-se centrifugação a 4°C, 18.000 x g por 15 min. As amostras foram lavadas com 100µl de ETOH 70%, repetindo-se a centrifugação por 5 min. O sedimento foi seco à temperatura ambiente, ressuspensão em 50% formamida/5X SET e o RNA anti-sentido usado na reação de proteção com RNases.

3.19 Reação de *trans-splicing* com células permeáveis utilizando formas epimastigotas de *T.cruzi*

Os experimentos utilizando células permeáveis para avaliação de fármacos no processamento dos mRNAs foi realizado segundo Ambrósio et al (2004).

As formas epimastigotas de *T. cruzi* das três cepas, Y, Bolívia e NCS, foram cultivadas em meio LIT (50 ml) até atingirem aproximadamente $1,25 \times 10^8$ células. As culturas foram centrifugadas durante 20 minutos a 1.300x g (centrífuga U-32R, Boeco) a 4°C, os sobrenadantes descartados de modo a permanecer ainda 1 ml de meio, com os quais as células foram ressuspensas para contagem dos parasitas.

A seguir, centrifugou-se por 35 segundos a 1.600x g em microcentrífuga, (Microfuge® Lite-Beckman) descartando-se o sobrenadante e prosseguindo-se com 4 lavagens em tampão TB[1X] para retirar o excesso de meio, sendo que após a última centrifugação, as células foram ressuspensas em 200µl do mesmo tampão e deixadas em gelo

por 5 minutos. Foram adicionados 10µl de lisolecitina (10mg/ml), que tem a função de permeabilizar a membrana do parasita para a passagem do fármaco e demais reagentes necessários para síntese e maturação dos mRNA, incubando-se por 1 minuto em gelo repetindo-se a centrifugação e descartando-se o sobrenadante; seguiu-se uma lavagem com 500µl de tampão TB[1X], descartando-se o sobrenadante, sendo as células então ressuspensas em 50µl de TB[1X] e adicionando-se o mesmo volume do *mix* (descrito no Apêndice) com e sem o isótopo radioativo e/ou os fármacos em diferentes concentrações (2,0, 5,0 e 12,5mM). Os fármacos utilizados nas reações (NF e NFOH) foram gentilmente cedidos pela Prof^a. Chung Man Chin, do Departamento de Fármacos e Medicamentos desta faculdade.

A reação foi incubada a 28°C durante 20 minutos e após a incubação foi adicionado 500µl de reagente Trizol® (Invitrogen), que serve para lisar as células e liberar os RNAs recém-sintetizados, levando-se ao vórtex por 10 segundos, adicionando-se 200µl de clorofórmio, vórtex e centrifugando os tubos por 15 minutos, a 4°C e 18.000x g (centrifuge 5415C, Beckman). As fases aquosas foram transferidas para novos tubos, acrescentando-se 500µl de isopropanol para precipitação dos RNAs, misturando-se por inversão várias vezes e repetindo a centrifugação. Os sobrenadantes foram descartados e lavados com 1ml de etanol 70%. Os RNAs precipitados foram secos e ressuspensos em 25µl de 50%formamida/5X SET, incubando-se por 15 minutos a 65°C para obter completa homogeneização.

Para observação da presença de RNAs, 2µl de cada amostra (RNAs com NFOH) e 2µl controle (RNA sem NFOH), foram misturados com formamida e fervidos por 2 minutos a 95°C e aplicados em gel de poliacrilamida 10% com uréia. A pré-corrída e a entrada de amostras foram realizadas com uma corrente de 400V por 20 minutos; para a corrida, utilizou-se 800V por 45 minutos. O gel foi então exposto ao filme de autorradiografia que foi revelado para verificação dos produtos da reação. Quando os experimentos não utilizaram material radioativo, os géis foram revelados pelo nitrato de prata.

3.20 Reação de proteção com RNases A e T1

Para estes experimentos, utilizou-se o SL RNA antisentido de *T. cruzi* transcrito a frio, como já mencionado no item 3.15; para tanto, em eppendorf, foram colocados 200ng do SL RNA em 18 μ l de tampão 50%formamida/5X SET, incubando-se, em banho seco a 80°C por 15 minutos, para denaturação do RNA. A seguir, foram adicionados 2 μ l da reação de *trans-splicing* com células permeáveis e a mistura foi novamente incubada durante 15 minutos a 80°C e deixada a 37°C por 18 horas. Como controle, 2 μ l da reação de *trans-splicing* foram incubados na ausência do SL antisentido.

No dia seguinte, foram adicionados 200 μ l de tampão contendo 20 μ g/ml de RNase A (Gibco BRL) e 5U/ml de RNase T1(Gibco BRL), incubando-se por 1 hora em gelo e 5 minutos à temperatura ambiente. As reações foram então tratadas com proteinase K [20mg/ml] (Gibco BRL) e os RNAs precipitados conforme já descrito anteriormente (item 3.18), para serem então submetidos à corrida eletroforética em gel 10% de poliacrilamida contendo uréia. O gel foi então exposto ao filme de autorradiografia que foi revelado para verificação dos produtos da reação.

3.21 Reação de coloração pelo nitrato de prata (*Silver Staining*)

Os géis contendo os RNAs originados da reação de *trans-splicing* sem radioatividade foram revelados pela coloração com prata. As soluções utilizadas estão descritas no Apêndice; o gel foi cuidadosamente colocado em cuba de vidro e processado como segue:

- ⊗ 30 min com Solução I
- ⊗ 15 min com Solução II
- Repetindo-se o passo anterior
- ⊗ 5 min com água destilada

⊖ 20 min com AgNO_3 (Nitrato de prata)

⊖ 1 min com H_2O destilada

⊖ 1 min com Solução III

Repetindo-se o passo anterior até o aparecimento de bandas.

⊖ 15 min com Solução IV

⊖ Depois de corado, o gel foi analisado no aparelho Flúor-S MultiImager (BioRad) e em seguida, foi embalado em papel celofane e guardado.

3.22 Quantificação das bandas de RNA utilizando programa Multi Analyst

Após a revelação dos géis de poliacrilamida contendo uréia das reações de células permeáveis pela coloração com nitrato de prata, foram feitas quantificações de algumas bandas (seleccionadas e indicadas nos respectivos géis) através da D.O. de cada uma delas. Esta análise foi feita utilizando-se o programa Muti Analyst (Bio-Rad).

Obs: O preparo de meios, tampões e reagentes utilizados encontram-se descritos no Apêndice.

4 Resultados

4.1 Extração de DNA genômico de três cepas de *T. cruzi*

Os DNAs genômicos das cepas Y, NCS e Bolívia de *T. cruzi* foram extraídos conforme descrito em Material e Métodos, tendo sido preparado um gel agarose 0,8% para a análise destes, que foram então quantificados em espectrofotômetro (Gene Quant®-Amersham) e utilizados na reação de PCR para amplificação do fragmento de interesse.

A tabela a seguir apresenta as concentrações obtidas após extração dos DNAs genômicos, num volume final de 50µl :

Tabela 2: Concentração dos DNAs genômicos em µg/µL das três cepas de *T. cruzi*.

	Concentração (µg/µl)
<i>T. cruzi</i> - cepa Y	10,5
<i>T. cruzi</i> - cepa NCS	9,4
<i>T. cruzi</i> - cepa Bolívia	8,7

Através da quantificação em espectrofotômetro e posterior análise dos DNAs genômicos pela corrida eletroforética em gel de agarose 0,8%, verificou-se que o rendimento da metodologia de extração do DNA genômico foi satisfatório, e este se apresentou em concentração ótima para utilização nos experimentos que se seguiram.

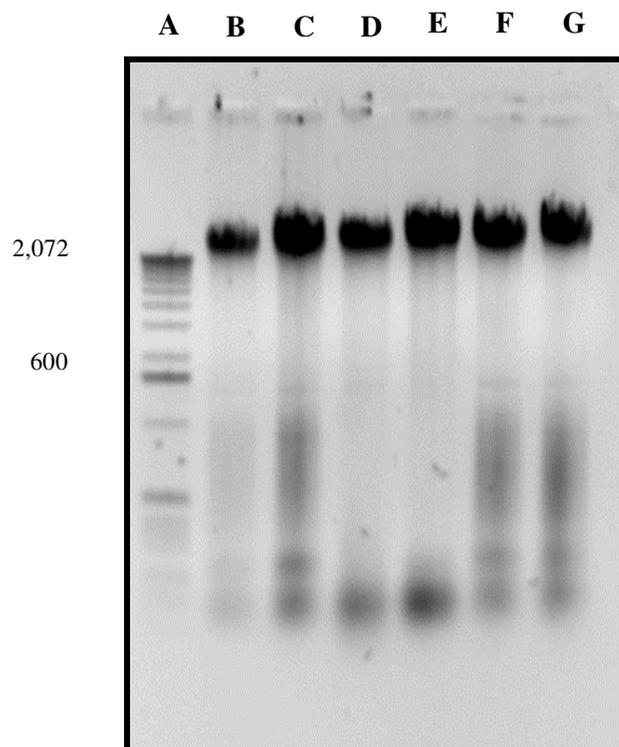


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos DNAs genômicos (em duplicata) obtidos de formas epimastigotas de *T. cruzi* como descrito em Material e Métodos. **A.** Peso Molecular 100pb (Gibco BRL); **B e C** cepa Y. **D e E** cepa NCS; **F e G** cepa Bolívia.

4.2 Produtos de PCR utilizando DNA genômico de *T. cruzi* (cepas Y, NCS e Bolívia)

As amplificações das seqüências SL (*spliced leader*) foram feitas a partir do DNA genômico das três cepas de *T. cruzi* (mostrados na Figura 7) utilizando os *primers* ou iniciadores gene-específicos. Os oligonucleotídeos foram construídos para as regiões 5' de SL sendo que, ao primer SL INV T3, também foi adicionada a seqüência da região promotora para enzima T3 RNA polimerase. Esta adição foi feita para que fosse possível usar esta enzima para transcrição com o vetor pGEM-T, o qual não apresenta região promotora para a mesma.

Após amplificação, os produtos (~147 pb) foram eluídos do gel para purificação.

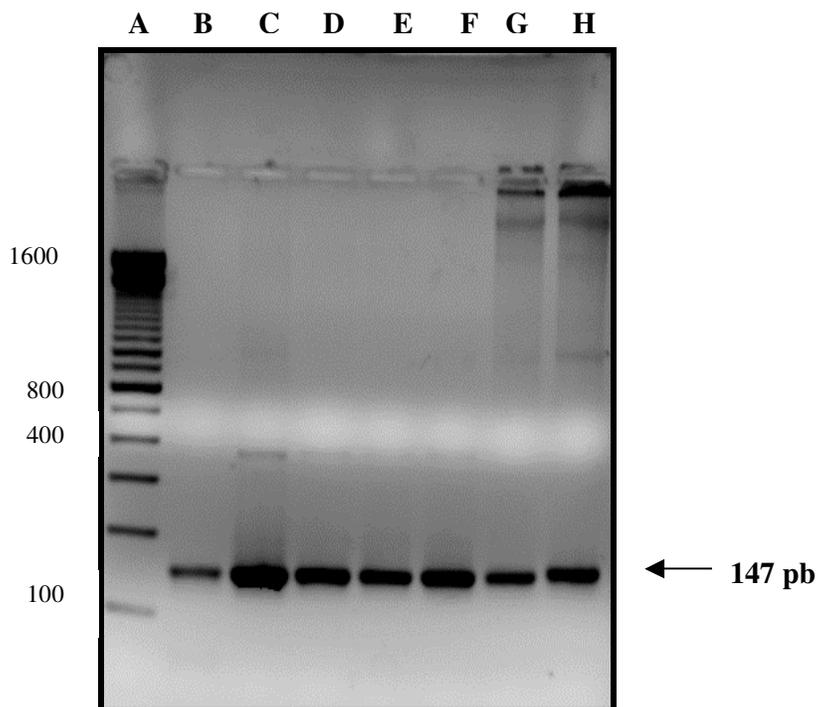


Figura 8: Produtos de PCR (em duplicata) utilizando DNA genômico de *T.cruzi* (cepas Y, NCS e Bolívia) submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em TAE [1X]. **A.** Peso molecular 100pb (Amersham); **B, C e D** cepa Y; **E e F** cepa NCS; **G e H** cepa Bolívia.

4.3 Eluição dos produtos de PCR das três cepas de *T. cruzi*

Os produtos amplificados (~147 pb) foram eluídos do gel utilizando o Kit Qiagen, para purificação dos mesmos, com intuito de facilitar a reação de ligação com o vetor de clonagem. Na Figura 9, observa-se que a purificação foi eficiente, resultando somente a banda desejada, isto é, uma banda em torno de 147 nucleotídeos.

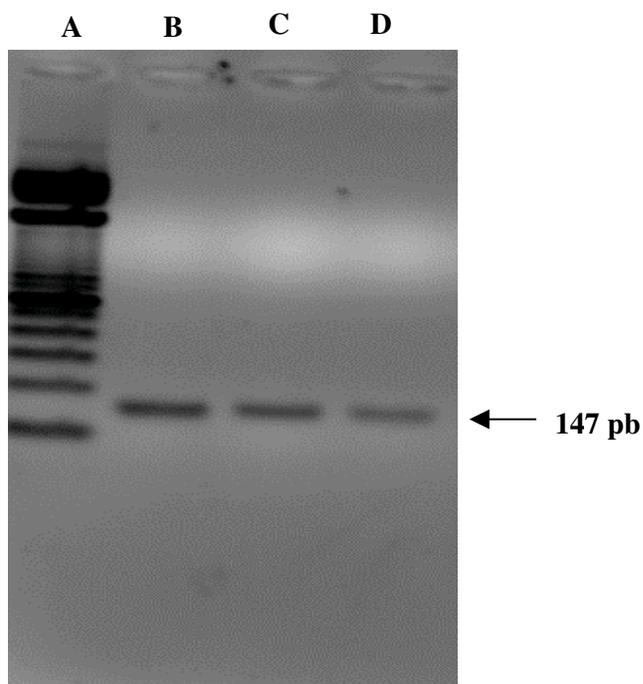


Figura 9: Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR purificados do gel de agarose. **A.** Peso molecular 100pb (Amersham); **B.** cepa Y; **C** cepa NCS; **D.** cepa Bolívia.

4.4 Mini-prep dos clones SL obtidos após clonagem dos produtos de PCR

Uma vez selecionados os clones, realizou-se a extração do DNA plasmidial seguida de duas etapas. Na primeira etapa provocou-se a lise das membranas celulares permitindo a liberação do DNA; já na segunda etapa, realizou-se um ou mais tratamentos químicos e enzimáticos para eliminar contaminantes como DNA genômico, RNA, proteínas, macromoléculas, etc.

Após a extração dos DNAs plasmidiais, estes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%. A Figura 10 apresenta o gel corado com brometo de etídio contendo os plasmídios com as seqüências SL de *T. cruzi* obtidos de cada uma das três cepas.

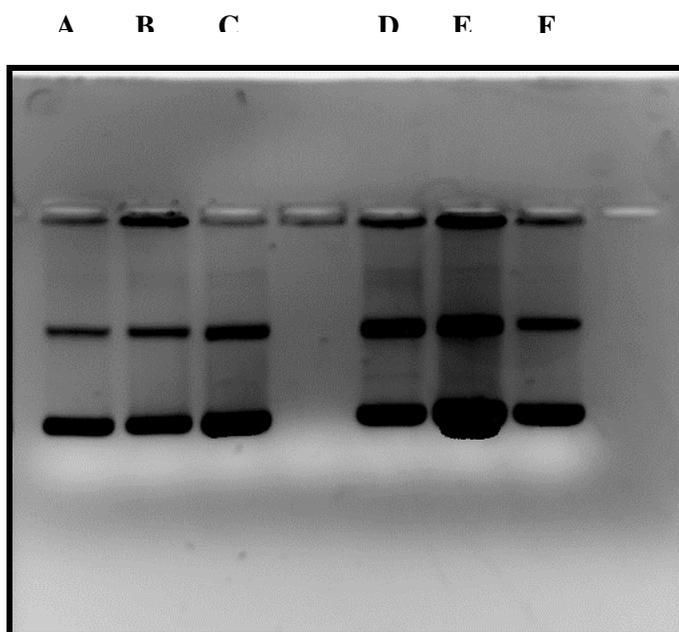


Figura 10: Extração de DNA plasmidial pelo método da lise alcalina submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%. **A.** Clone Y12 ; **B.** Clone B8; **C.** Clone B10; **D** Clone Y9; **E.** Clone Y10; **F.** Clone N2. As iniciais Y, N e C correspondem aos clones extraídos da cepa Y, NCS e Bolívia, respectivamente.

4.5 Sequenciamento dos clones SL das cepas Y, NCS e Bolívia

Após clonagem e extração do DNA plasmidial dos clones obtidos, estes foram sequenciados e confirmados como contendo a região *spliced leader* de *T. cruzi* utilizando comparação no Banco de Dados do NCBI. As seqüências grifadas em azul representam parte do vetor pGEM-T; as grifadas em vermelho e rosa correspondem aos *primers*, SL DIR e SL INV T3, respectivamente. A seqüência de interesse SL está em preto.

- ⊖ Seqüência nucleotídica da cepa Y de *T. cruzi* (clone Y12) contendo a seqüência *spliced leader* em estudo:

**TGATTAAACACAACCTCCTTTCAACTAACGCTATTATTGATACAGTTTCTGTTCT
ATATTGGTACGCGAAGCTTCCAACCCGCCTATGGCGGTAATGTTAGGTCAAT
TTCTTTTGACCGGGGTCCACGGACCCCTCCTTTTAGTGAGGGTTAATAATC**

- ⊖ Seqüência nucleotídica da cepa NCS de *T. cruzi* (clone N2) contendo a seqüência *spliced leader* em estudo:

**GATTAAACACAACCTCCTTTCAACTAACGCTATTATTGATACAGTTTCTGTACTA
TATTGGTACGCGAAGCTTCCAACCCGCCTCTGGCGGTTATGTTTGGTCAATT
TCTTTTGACCGGGGTCCACGGACCCCTCCTTTTAGTGAGGGTTAATAATC**

- ⊖ Seqüência nucleotídica da cepa Bolívia de *T. cruzi* (clone B8) contendo a seqüência *spliced leader* em estudo:

**TGATTAAACACAACCTCCTTTCAACTAACGCTATTATTGATACGGGCTCTGTTCT
ATATTGGTACGCGAAGCTTCAAATCCGCGAGTCGCGGTTATGTTTGGTCAA
TTCTTTTGACCGGGGTCCACGGACCCCTCCTTTTAGTGAGGGTTAATAATC**

Estas seqüências foram alinhadas e comparadas com uma seqüência retirada do Banco de Dados do NCBI. Os clones positivos selecionados para linearização estão descritos na tabela abaixo:

Tabela 3: Clones e respectivas cepas de *T. cruzi* selecionados para linearização.

Nome do Clone	Cepa
Y12	Y
N2	NCS
B8	Bolívia
B10	Bolívia

4.6 Alinhamento das seqüências SL das três cepas

O alinhamento múltiplo foi feito com as seqüências obtidas no sequenciamento e comparadas com uma seqüência retirada do NCBI (nº de acesso AY367128, CAMPBELL et al., 2004), que se refere à cepa CL Brener e foi denominada neste trabalho de SL original.

Para realizar o alinhamento utilizou-se o programa *GeneDoc* (NICHOLAS & NICHOLAS, 1997).

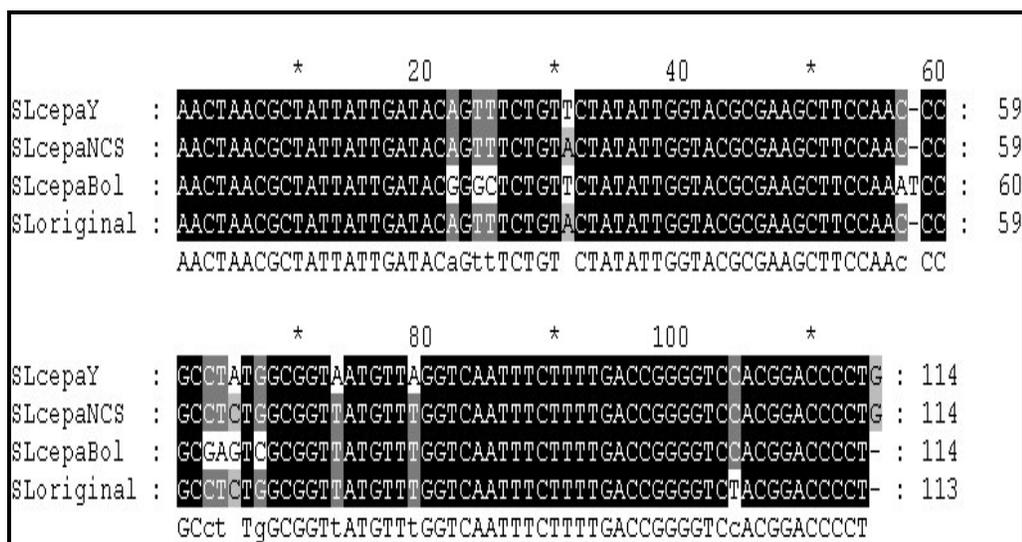


Figura 11: Alinhamento múltiplo das seqüências SL utilizando o programa *GeneDoc*.

Na Figura 11, observa-se através do alinhamento que a seqüência SL da cepa Bolívia mostrou mais diferenças quando comparada com as outras cepas e SL original (CAMPBELL et al., 2004).

4.7 Linearização dos plasmídeos com enzima de restrição

Sendo o DNA plasmidial circular, foi necessário linearizá-lo com enzima de restrição para deixar a região promotora livre para a enzima T3 RNA polimerase ligar-se e proceder com a síntese dos RNAs anti-sentido. Após a linearização, foi realizado um tratamento com os plasmídios para retirada dos reagentes que foram utilizados, evitando assim que interfiram na reação de transcrição.

A Figura 12 apresenta os DNAs plasmidiais contendo os insertos SL de *T. cruzi* linearizados com a enzima de restrição *Pst* I.

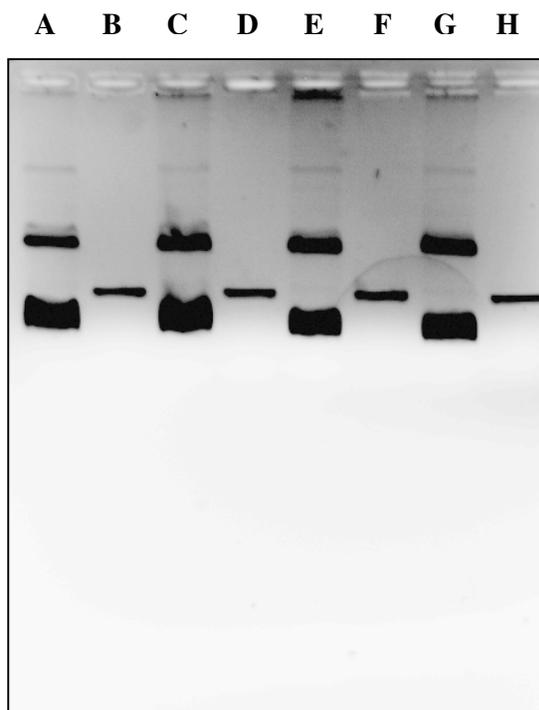


Figura 12: Eletroforese em gel de agarose 1% dos DNAs plasmidiais circulares e linearizados com enzima de restrição *Pst*. A,C, E e G: mini-prep dos clones Y12, B10, B8 e N2, respectivamente. B, D, F e H: digestão dos clones com enzima de restrição *Pst* I.

4.8 Reação de transcrição *in vitro* a frio

Após linearização dos DNAs plasmidiais, fez-se a reação de transcrição a frio com enzima T3 RNA polimerase para se obter os RNAs antisentido para serem posteriormente utilizados como sondas nas reações de proteção com RNases A e T1.

A tabela 4, a seguir, mostra os resultados da leitura feita em espectrofotômetro (Gene Quant®-Amersham) dos RNAs após transcrição a frio.

Tabela 4: Concentração dos RNAs anti-sentido.

	Concentração (ng/ μ L)
<i>T. cruzi</i> - cepa Y	196
<i>T. cruzi</i> - cepa NCS	188
<i>T. cruzi</i> - cepa Bolívia	192

4.9 Reação de *trans-splicing* com células permeáveis utilizando formas epimastigotas de *T. cruzi* e diferentes concentrações do fármaco NFOH

As reações de *trans-splicing* utilizando células permeáveis foram realizadas com as 3 cepas de *T. cruzi* e os fármacos NF e NFOH.

Nas diferentes concentrações utilizadas do fármaco NFOH (2, 5 e 12,5 mM), observou-se diferenças na concentração das bandas de RNAs recém-processados (tanto nas reações a frio, como nas reações com incorporação de material radioativo); conforme o aumento das concentrações dos fármacos, foi possível verificar uma interferência destes no processamento dos RNAs mensageiros, o que foi confirmado pela reação de proteção com RNases A e T1 (com material radioativo) e pela quantificação das D.O. das bandas através do programa Mult Analyst (coloração pela prata).

4.10 Reação de proteção com RNases A e T1 (a quente)

A reação de proteção com RNases A e T1 consiste na hibridização da seqüência antisentido do SL com parte dos RNAs da reação de células permeáveis, seguindo-se adição das RNases, que promovem a degradação dos RNAs que não estão híbridos (fita simples), permitindo a localização do SL éxon e íntron nas preparações.

Na reação de proteção com RNases a quente (incorporação de material radioativo), onde foi utilizado o fármaco NFOH com a cepa Y, observou-se uma discreta diminuição nas bandas de RNA conforme a concentração do fármaco foi aumentada. A Figura 13 mostra esses resultados.

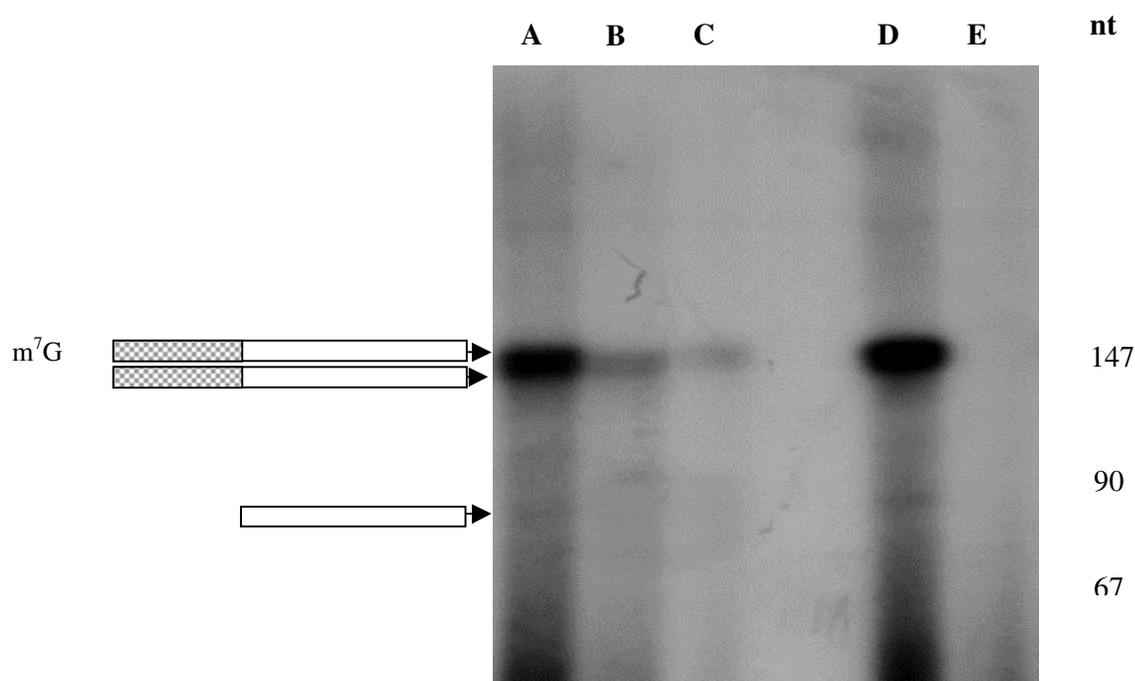


Figura 13: Reação de proteção com RNases A e T1, utilizando a cepa Y e diferentes concentrações do NFOH, submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e detectado por autorradiografia. As bandas correspondentes ao **SL éxon + SL íntron metilado**, **não metilado** e **SL íntron** estão indicadas na figura. Concentrações do NFOH: **A.** 2mM; **B.** 5mM.; **C.** 12,5mM; **D.** controle (sem o NFOH); **E.** controle negativo da RNase (ausência da sonda de SL). Os pesos moleculares em nucleotídeos estão indicados na figura.; **m⁷G**: 7-metilguanossina.

4.11 Reação de células permeáveis (cepa NCS), a frio (corada pelo nitrato de prata)

Na figura 14, apresenta-se o resultado da reação de células permeáveis com cepa NCS e o fármaco NFOH em diferentes concentrações (2, 5 e 12,5 mM), conforme mencionado na legenda. Observou-se uma diminuição nas concentrações das bandas de RNAs conforme a concentração do fármaco foi aumentada. As setas indicam as bandas onde houve diminuição da concentração de RNAs. A Tabela 5 apresenta as leituras de D.O. de cada banda assinalada.

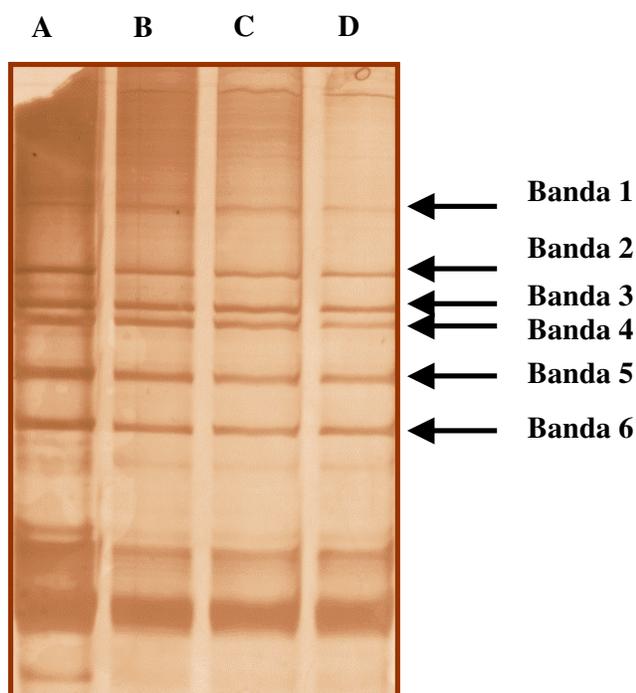


Figura 14: Eletroforese em gel de poli-acrilamida 10% contendo uréia (coloração pelo nitrato de prata) da reação de células permeáveis utilizando a cepa NCS de *T. cruzi* e diferentes concentrações do fármaco NFOH. **A.** Controle (sem o NFOH). **B.** 2 mM; **C.** 5 mM; **D.** 12,5 mM.

Tabela 5: Leituras das densidades óticas das bandas indicadas na Figura 14 através do programa Multi Analyst (Bio Rad).

Cepa NCS		
Banda	Canaleta	D.O.
1	A	0,42
	B	0,40
	C	0,37
	D	0,19
2	A	0,38
	B	0,37
	C	0,35
	D	0,31
3	A	0,39
	B	0,37
	C	0,33
	D	0,30
4	A	0,41
	B	0,39
	C	0,35
	D	0,21
5	A	0,37
	B	0,35
	C	0,34
	D	0,31
6	A	0,39
	B	0,36
	C	0,31
	D	0,27

4.12 Reação de células permeáveis corada pelo nitrato de prata com as 3 cepas de *T. cruzi* (Y, NCS e Bolívia) e o fármaco NFOH

Observa-se na Figura 15 que houve uma redução na concentração de bandas dos RNAs, quando utilizadas diferentes concentrações do fármaco NFOH com as 3 cepas de *T. cruzi*. Com a cepa Bolívia, essas diferenças foram menos intensas, ressaltando assim a importância da escolha da cepa para avaliação do fármaco.

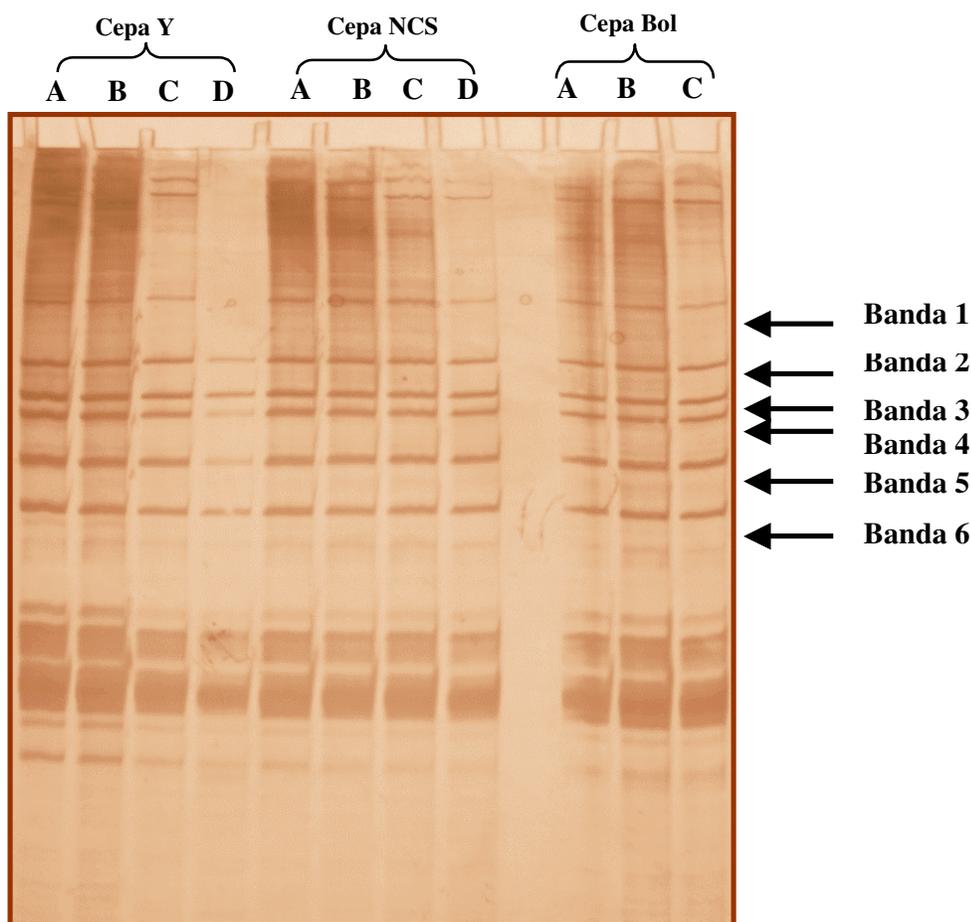


Figura 15: Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% contendo uréia (coloração pelo nitrato de prata) da reação de células permeáveis utilizando as 3 cepas de *T. cruzi* (indicadas na Figura) e diferentes concentrações do fármaco NFOH. **A.** Controle (sem o NFOH). **B.** 2 mM; **C.** 5 mM; **D.** 12,5 mM.

Conforme já descrito, foram feitas quantificações das D.O.s das bandas selecionadas, utilizando o programa Multi Analyst, podendo-se observar variações nas concentrações destes RNAs, principalmente com a cepa Y (cepa padrão) e NCS, enquanto com a cepa Bolívia as diferenças não foram tão significativas. A Tabela 6 apresenta esses resultados.

Tabela 6: Leituras das densidades óticas das bandas indicadas na Figura 15 através do programa Multi Analyst (Bio Rad).

Cepa Y			Cepa NCS			Cepa Bolívia		
Banda	Canaleta	D.O.	Banda	Canaleta	D.O.	Banda	Canaleta	D.O.
1	A	0,46	1	A	0,37	1	A	0,34
	B	0,42		B	0,36		B	0,37
	C	0,27		C	0,32		C	0,31
	D	0,19		D	0,22			
2	A	0,47	2	A	0,38	2	A	0,35
	B	0,41		B	0,36		B	0,36
	C	0,33		C	0,34		C	0,31
	D	0,23		D	0,31			
3	A	0,47	3	A	0,37	3	A	0,35
	B	0,43		B	0,35		B	0,37
	C	0,37		C	0,34		C	0,32
	D	0,21		D	0,31			
4	A	0,48	4	A	0,39	4	A	0,33
	B	0,41		B	0,35		B	0,35
	C	0,27		C	0,32		C	0,29
	D	0,17		D	0,21			
5	A	0,46	5	A	0,36	5	A	0,35
	B	0,42		B	0,34		B	0,36
	C	0,33		C	0,32		C	0,31
	D	0,21		D	0,30			
6	A	0,49	6	A	0,38	6	A	0,37
	B	0,43		B	0,35		B	0,38
	C	0,36		C	0,33		C	0,32
	D	0,21		D	0,31			

4.13 Reação de células permeáveis (cepa Y) a frio utilizando os fármacos NF e NFOH

Foram testados separadamente o fármaco NF e o seu intermediário NFOH, para avaliar e comparar a atividade de cada um no processamento dos RNAs. Assim, na Figura 16, estão apresentados os resultados obtidos com a cepa Y; a atividade do fármaco NFOH na concentração de 12,5 mM mostrou ser mais ativa quando comparado com a mesma concentração de NF. A concentração de 2 mM parece não ter atividade significativa com ambos os fármacos.

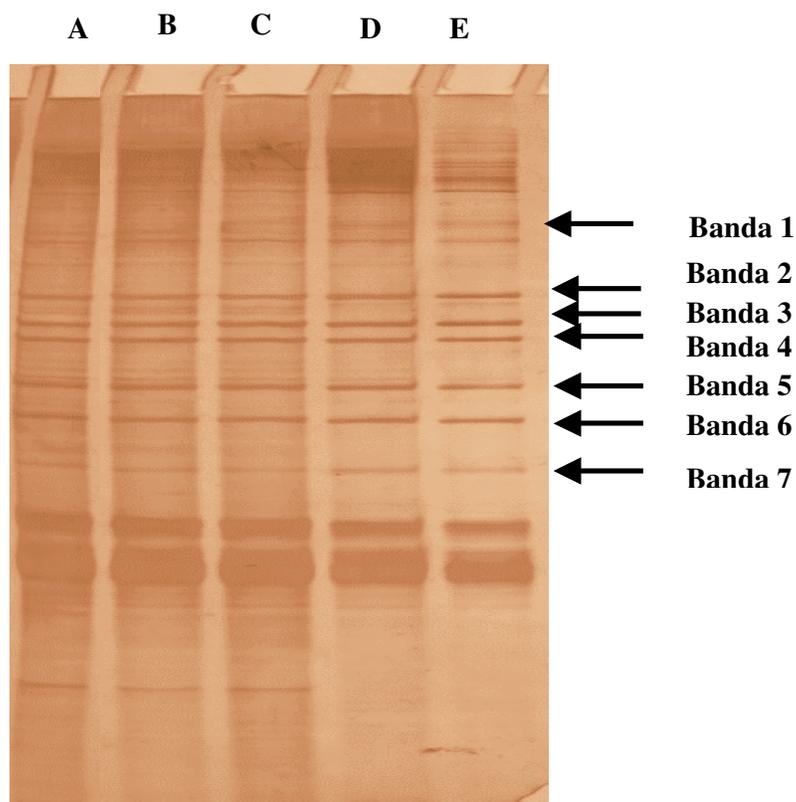


Figura 16: Eletroforese em gel de poli-acrilamida 10% com uréia corada pelo nitrato de prata da reação de células permeáveis, cepa Y, com os fármacos NF e NFOH. **A.** Controle da reação (sem os fármacos). **B.** 2 mM do NF **C.** 2mM do NFOH. **D.** 12,5 mM do NF **E.** 12,5 mM do NFOH. As setas apontam as bandas onde houve diminuição na concentração de

RNAs. A Tabela 7 apresenta os resultados das D.O.s de cada banda e as diferentes concentrações de fármacos, confirmando as observações.

Tabela 7: Leitura das densidades óticas das bandas indicadas na Figura 16 através do programa Multi Analyst (Bio-Rad).

Cepa Y		
Banda	Canaleta	D.O.
1	A	0,33
	B	0,33
	C	0,32
	D	0,29
	E	0,23
2	A	0,34
	B	0,33
	C	0,33
	D	0,29
	E	0,25
3	A	0,35
	B	0,33
	C	0,32
	D	0,31
	E	0,27
4	A	0,31
	B	0,31
	C	0,33
	D	0,29
	E	0,21
5	A	0,32
	B	0,32
	C	0,33
	D	0,29
	E	0,25
6	A	0,35
	B	0,33
	C	0,31
	D	0,30
	E	0,27
7	A	0,33
	B	0,31
	C	0,30
	D	0,29
	E	0,27

5 Discussão

A necessidade de novas substâncias (fármacos) para o tratamento da infecção chagásica, que atinge mais de 16 milhões e com mais de 100 milhões de pessoas expostas à infecção na América Latina, é urgente e necessária. Os dois fármacos existentes até o momento para tratamento, nifurtimox e benznidazol, atuam apenas na fase aguda e recente da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* e apresentam grandes limitações pelos seus efeitos colaterais e pela necessidade do seu emprego durante pelo menos 60 dias. Outro problema enfrentado refere-se às diferenças regionais de suscetibilidade do *T. cruzi* às drogas. Assim, o nifurtimox, por exemplo, mostra-se eficiente em chagásicos crônicos na Argentina, porém é pouco eficaz em pacientes de Minas Gerais (COURA & CASTRO, 2002).

Além do problema da terapêutica específica, outra dificuldade enfrentada pelos pesquisadores refere-se ao critério de cura, isto é, como se pode medir com segurança que o medicamento está sendo eficaz? Este controle de cura parasitológica em geral é realizado por xenodiagnósticos sucessivos. A hemocultura também é um recurso que pode ser utilizado, já que as reações imunológicas, em geral, não funcionam ou não são seguras, pois, após a terapêutica, podem diminuir o título (URBINA, 1999; CANÇADO, 1999).

À vista de fármacos realmente eficazes, e com o problema agravado pela emergência de *T. cruzi* resistentes aos quimioterápicos disponíveis contra a parasitose, torna-se urgente a busca por novos e melhores agentes antichagásicos.

O Nitrofuril (NF) é um agente antimicrobiano primário ativo contra microorganismos gram-positivos e, usado somente em infecções tópicas (KOROLKOVAS, 2002). Em 1988, Henderson e colaboradores encontraram atividade tripanocida nesta substância, cujo efeito pode ser atribuído à inibição da tripanotiona redutase, enzima chave do metabolismo antioxidante do parasita. Chung e colaboradores (2003) obtiveram, a partir do nitrofuril (NF),

um intermediário da reação, o hidroximetilnitrofural (NFOH), que apresentou alta atividade tripanocida e menor toxicidade, quando comparado ao nitrofural e benznidazol em todos os estágios.

Nesse sentido e considerando que os nitrofuranos inibem a tripanotiona redutase, o presente trabalho teve como objetivo analisar a interferência desses fármacos, NF e NFOH (derivados de nitrofuranos), no processamento dos mRNAs do parasita.

Resultados preliminares de Vianna et al. (2001) demonstraram que utilizando um pré-mRNA construído adequadamente e extratos de formas epimastigotas de *T. cruzi* pode ser obtido o processamento do pré-mRNA *in vitro*, embora, até o momento, o *trans-splicing* utilize extratos de nemátodes ou de células HeLa, ambas apresentando os dois mecanismos de *splicing* - *cis* e *trans* (NIELSEN, 1995; CAUDEVILLA et al., 1998). Entretanto devido à extrema dificuldade na reprodutibilidade da reação de *trans-splicing in vitro* utilizando extratos nucleares de *T. cruzi*, os quais tem que ser ativos na formação do “trans-spliceossomo” para processar os pré-mRNA sintéticos, o uso desta reação tornou-se altamente custoso e demorado para ser utilizado, por exemplo, na avaliação de moléculas (fármacos) que possam interferir direta ou indiretamente no *trans-splicing* de tripanosomas (VIANNA et al., 2001).

Diante dessas limitações, o uso do sistema de células permeáveis para estudo do *trans-splicing*, conforme descrito por Ullu & Tschudi (1990) e padronizado por Ambrósio et al. (2004) pode servir como modelo para auxiliar na investigação da síntese, processamento e regulação dos mRNAs em tripanosomas. Nesse sistema, os parasitas são tratados com lisolecitina, que torna as células do *T. cruzi* permeáveis a nucleotídeos trifosfatados e outras moléculas pequenas, permitindo a síntese ativa de seus RNAs utilizando o “pool” de proteínas e macromoléculas do próprio parasita. Os RNAs sintetizados podem ser recolhidos por precipitação e a confirmação da ocorrência da reação de *trans-splicing* nas células permeáveis

pode ser feita através da reação de proteção com RNases, que utiliza a hibridização de uma seqüência antisentido de SL RNA, seguida de tratamento com RNases A e T1 que degradam mRNA não híbridos.

Devido à sensibilidade da reação de hibridização do SL antisentido e às ligeiras diferenças na seqüência dos SL das diferentes cepas, fez-se necessário a extração do DNA genômico de cada cepa utilizada neste trabalho, que purificado e em concentração adequada foi usado nas reações de PCR, amplificando-se um fragmento de 147 pb, utilizando-se os *primers* construídos. Ao *primer* SL INV T3 foi adicionada a seqüência da região promotora para enzima T3 RNA polimerase para facilitar a transcrição do SL antisentido no vetor pGEM-T, o qual não apresenta região promotora para esta enzima.

Os genes de mini-éxon ou *spliced leader* são de grande importância nos tripanosomatídeos por participarem de um mecanismo de processamento pós-transcrição denominado *trans-splicing*, responsável pela maturação e estabilidade das moléculas de mRNA destes parasitas. Estes genes estão presentes no genoma dos tripanosomatídeos como 100 a 200 cópias de seqüências repetitivas *in tandem*, codificando um éxon de 39 nucleotídeos. Especificamente, o mecanismo resulta da adição da seqüência de 39 nucleotídeos denominada *Spliced Leader* (SL) à extremidade 5' de todos os mRNAs nucleares, tornando assim, as moléculas maduras e prontas para tradução (NILSEN, 1995).

A comparação das seqüências do gene SL de diferentes espécies dos diversos gêneros de tripanosomatídeos mostrou que esse gene é composto por 3 regiões distintas: éxon, íntron e região intergênica. O éxon é uma região altamente conservada e os íntrons apresentam uma pequena variação mas mantêm mais de 98% de identidade. Entretanto, a região intergênica, que não é transcrita, é altamente variável, mesmo dentro de um mesmo gênero, apresentando tamanhos e seqüências de nucleotídeos distintas mesmo entre espécies muito próximas (FERNANDES et al., 1998).

Após amplificação, os produtos de PCR de SL das 3 cepas foram clonados no vetor pGEM-T para posterior utilização na transcrição. A construção do plasmídeo resultante foi também sequenciada para confirmar a fidelidade da seqüência e verificar a orientação correta em relação à região promotora. Foram isolados 4 clones, sendo 1 da cepa Y (clone Y12), 1 da cepa NCS (clone N2) e 2 clones da cepa Bolívia (clones B8 e B10).

Após sequenciamento destes clones, utilizou-se o Banco de Dados do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) para reconfirmação das seqüências SL de *T. cruzi*; foram realizados também, alinhamentos múltiplos dessas seqüências com uma seqüência retirada do NCBI e chamada aqui, de SL original (CAMPBELL et al., 2004). No alinhamento, observou-se que a seqüência da cepa Bolívia foi a que mais apresentou variações em seus nucleotídeos, confirmando a necessidade da clonagem das regiões SL de cada cepa para melhorar a aferição da reação de proteção com RNases para avaliação da reação de *trans-splicing* com células permeáveis.

Com os clones em mãos, foram feitas digestões de cada um deles com a enzima de restrição *Pst* I para linearização dos DNAs plasmidiais circulares, deixando a região promotora livre para a enzima T3 RNA polimerase ligar-se e proceder com a síntese dos pré-mRNAs. Após a linearização foi realizado um tratamento com os plasmídios para retirada dos reagentes que foram utilizados, evitando assim que interfiram na reação de transcrição. Entretanto, não foi possível até o momento avaliar os resultados desses experimentos.

Em estudos utilizando células permeáveis foi verificado que a estrutura Cap metilado, presente no SL RNA, é requerida para a ocorrência do *trans-splicing*, podendo ser um sinal de reconhecimento para a maquinaria do mesmo. Já o pré-mRNA acceptor não necessita da presença desta estrutura para realizar o *trans-splicing* (ULLU & TSCHUDI, 1991).

In vivo o capacete (Cap) 5' também se liga a uma proteína e pode participar na ligação do mRNA ao ribossomo para iniciar a tradução, evitando a degradação exonucleásica na

direção 5' → 3', juntamente com a cauda Poli (A) localizada na extremidade 3' que também se liga a uma proteína específica e ajuda na estabilização do mRNA. Na reação de transcrição *in vitro* não se adiciona a cauda Poli (A), possuindo o pré-mRNA apenas o resíduo de 7-metilguanossina como proteção. Após obtenção dos mRNAs antisentido, seguiu-se com as reações de células permeáveis e proteção com RNases.

Nos experimentos com células permeáveis, onde a atividade do NFOH foi avaliada, observou-se uma discreta diminuição nas bandas de RNA (Figuras 14, 15 e 16) conforme a concentração do NFOH foi aumentada. Isto é confirmado quando se observa as densidades ópticas das bandas (Tabelas 5, 6 e 7), demonstrando variações nas mesmas. Através da tabela 6, observa-se que a cepa Y foi a que apresentou diferenças relevantes nas D.O.s quando comparado com as cepas NCS e Bolívia.

A diminuição na concentração dos RNAs sugere que uma interferência do fármaco no processamento dos mRNAs do parasita, embora não se possa afirmar, com os resultados até agora obtidos, que essa interferência tenha sido na reação de *trans-splicing*.

Quando comparadas as cepas Y, NCS e Bolívia, verificou-se que as respostas destas ao fármaco foram diferentes: a cepa Y e NCS responderam da mesma forma, diminuindo a concentração de RNA conforme aumentou-se a concentração do fármaco; já a cepa Bolívia parece não ter sofrido alterações com as diferentes concentrações do fármaco, demonstrando a importância de se avaliar um mesmo fármaco em diferentes cepas de *T. cruzi*. Esses dados sugerem que as cepas *T. cruzi* II (Y e NCS) foram mais suscetíveis à ação desses fármacos. Isto reforça a idéia da necessidade do uso de duas ou mais cepas diferentes para avaliação da atividade de potenciais fármacos anti-chagásicos.

Nos experimentos onde foram comparadas as atividades dos fármacos NF e NFOH nas mesmas condições e concentrações, possivelmente a maior solubilidade do NFOH foi determinante no aumento da penetração nas células, e, por conseguinte, em sua maior

atividade em relação ao NF, principalmente na concentração de 12,5mM (Figura 16). A quantificação das bandas reforça estas observações (Tabela 7).

Neste trabalho, foi possível também, padronizar as análises da reação de células permeáveis utilizando coloração pela prata em substituição ao material radioativo, objetivando seu uso no rastreamento da avaliação da interferência de fármacos no processamento dos mRNAs desses parasitas. Os resultados obtidos permitiram verificar que esta metodologia de coloração possibilita a análise do padrão de bandas após a reação de *trans-splicing*, sendo uma metodologia de custo mais baixo e menos complexa quando comparada com o uso do material radioativo, embora esta coloração não tenha sido sensível suficiente para a detecção dos mRNAs recém-sintetizados quando do tratamento com RNases.

A reação de proteção com RNases A e T1 consiste na hibridização da seqüência antisentido do SL com parte da reação de células permeáveis, seguindo-se adição de RNases que promovem a degradação dos RNAs que não estão híbridos (fita simples), permitindo a localização do SL éxon e íntron nas preparações. Nesta reação, com o uso de radioisótopo, observou-se nitidamente que houve diminuição na intensidade destas bandas (SL éxon e íntron) conforme aumentou-se a concentração do NFOH (Figura 13). Entretanto, os resultados ainda não foram conclusivos quanto à interferência direta do fármaco na reação de *trans-splicing*.

Os resultados descritos foram importantes no estudo da ação de fármacos no processamento de mRNAs de *T. cruzi*, pois o modelo de células permeáveis mostrou ser de grande utilidade no rastreamento e avaliação dos fármacos tripanocidas. Estudos posteriores com o fármaco NFOH deverão ser feitos com o intuito de avaliar com precisão qual o mecanismo de ação deste fármaco no processamento dos mRNAs. Entretanto, os resultados ora apresentados demonstram a atividade de NFOH, que foi obtido por modificação molecular de NF; além disso, pelo curto período de tempo de contato da substância com a maquinaria

celular (20 minutos), o qual não parece suficiente para clivagem da molécula, sugere que pode constituir-se num novo potencial fármaco.

O estudo sobre a interferência de fármacos no processamento dos mRNAs do *Trypanosoma cruzi* utilizando estas metodologias, apontam resultados promissores de que este modelo será útil para entendimento da ação de fármacos tripanocidas, podendo ser utilizados futuramente como triagem prévia dessas atividades.

6 Conclusões

A análise dos resultados nos permitiu elaborar as seguintes conclusões:

- ⊖ Os SL das três cepas estudadas neste trabalho puderam ser convenientemente clonados para obtenção dos respectivos transcritos anti-sentido;
- ⊖ O processamento dos mRNAs dos parasitas das diferentes cepas parece sofrer interferência quando as concentrações dos fármacos (NFOH e NF) foram aumentadas;
- ⊖ Em relação às cepas estudadas, houve diferenças na resposta ao fármaco, mostrando a importância de se avaliar diferentes cepas desse tripanosomatídeo para um mesmo fármaco;
- ⊖ As cepas *T. cruzi* II (Y e NCS) parecem ser mais sensíveis a ação desses fármacos;
- ⊖ O fármaco NFOH quando comparado ao NF mostrou-se mais eficiente quando avaliado nas mesmas condições e concentrações, utilizando-se a cepa Y;
- ⊖ A técnica de coloração pelo nitrato de prata, embora menos sensível em relação ao uso de material radioativo, mostrou-se muito eficiente para rastreamento da atividade com diferentes concentrações dos fármacos.

7 Referências Bibliográficas

ACQUATELA, H. Heart pathology of extracardiac origin (V). Recent advances in chagasic cardiomyopathy. **Rev. Esp. Cardiol.**, v. 51, p. 152-157, 1998.

AGABIAN, N. Trans-splicing of nuclear pre-mRNAs. **Cell**, v. 61, p. 1157-1160, 1990.

AMBRÓSIO, D.L.; BARBOSA, C.F.; VIANNA, V.F.; CICARELLI, R.M.B. *Trypanosoma cruzi*: Establishment of Permeable Cells for RNA Processing Analysis with Drugs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, vol 99, 2004.

BACH, M. Corte de intrones y empalme de exones. **Investigación y Ciencia**, p. 606-607, 1992.

BASTOS, J.K.; ALBUQUERQUE, S.; SILVA, M.L. Evaluation of the trypanocidal activity of lignans isolated from the leaves of *Zanthoxylum naranjilo*. **Planta Med.**, v. 65, p. 541-544, 1999.

BERGER, I.; BARRIENTOS, A.C.; CACERES, A.; HERNANDEZ, M.; RASTRELLI, L.; PASSREITER, C.M.; KUBELKA, W. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections: II. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 62, p. 107-115, 1998.

BITTENCOURT, A.L.; SADIGURSKY, M.; SILVA, A.; MENEZES, C.; MARIANETTI, M.; GUERRA, S.; SHERLOCK, I. Evaluation of Chagas'disease transmission through breast-feeding. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 83, p. 37-39, 1998.

BRENER, Z. Atividade terapêutica do 5 nitrofuraldeído-semicarbazona (nitrofurazona) em esquemas de duração prolongada na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 3, p. 43-49, 1961.

BRENER, Z. Laboratory-acquired Chagas'disease endemic among parasitologists? In MOREL, C.M. **Genes and Antigens of parasites, a laboratory manual**, p. 3-9, 1984.

BRENER, Z. P. Terapêutica Experimental na Doença de Chagas. Em: Brener Z, Andrade Z (eds). *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*, 2 st edição. Rio de janeiro: Guanabara Koogan Ed, p. 41-47, 2000.

BRENER, Z. *Trypanosoma cruzi*: taxonomy, morphology and life cycle. In WENDEL, S.; BRENER, Z.; CAMARGO, M.E. & RASSI, A. (eds). **Chagas'disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine**. ISBT Brazil SP, p. 13-30, 1992.

BRIONES, M.R.; SOUTO, R.P.; STOLF, B.S.; ZINGALES, B. The evolution of two *trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 104, p. 219-232, 1999.

CAMPBELL, D.A.; WESTENBERGER, S.J.; STURM, N.R. Genetic Variability of Hybrid Groups *Trypanosoma cruzi*. Unpublished, 2004.

CANÇADO, J.R. Criteria of Chagas disease cure. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 331-335, 1999.

CAUDEVILLA, C.; SERRA, D. MILIAR, A.; CODONY, C.; ASINS, G.; BACH, M.; HEGARDT, F.G. Natural trans-splicing in carnitine octanoyltransferase pre-mRNAs in rat liver. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 12185-12190, 1998.

CERECETTO, H.; DI MAIO, R.; IBARRURI, G.; SEOANE, G.; DENICOLA, A.; PELUFFO, G.; QUIJANO, C.; PAULINO, M. Synthesis and anti-trypanosomal activity of novel 5-nitro-2-furaldehyde and 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde semicarbazone derivatives. **Il Farmaco**, v. 53, p. 89-94, 1998.

CHUNG, M.C.; GUIDO, R.V.; MARTINELLI, T.F.; GONÇALVES, M.F.; POLLI, M.C.; BOTELHO, K.C. VARANDA, E.A.; COLLI, W.; MIRANDA, M.T.; FERREIRA, E.I. Synthesis and *in vitro* evaluation of potencial antichagasic hydroxymethylnitrofurazone (NFOH-121): a new nitrofurazone prodrug. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 11, p. 4779-4783, 2003.

CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. Parasitologia Humana e seus fundamentos gerais. São Paulo: Atheneu, cap. 11, p. 85-87, 1999.

COURA, J.R.; DE CASTRO, S.L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 3-24, 2002.

CROFT, S. L. Pharmacological approaches to antitrypanosomal chemotherapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 215-220, 1999.

CROFT, S.L.; SEIFERT, K.; DUCHENE, M. Antiprotozoal activities of phospholipid analogues. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 126, p. 165-172, 2003.

DE ROBERTS, E.D.P. **Bases da Biologia Celular e Molecular**, ed. 11, p. 227-241, 1993.

DIAS, J.C.P. Epidemiology of Chagas's disease. In WENDEL, S.; BRENER, Z.; CAMARGO, M.E. & RASSI, A. (eds). **Chagas's disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine**. ISBT Brazil SP, p. 13-29, 1992.

DOCAMPO, R. Recent developments in the chemotherapy of Chagas disease. **Curr Pharm Des.**, v. 7, p. 1157-1164, 2001.

FAIRLAMB, A.H. Future prospects for the chemotherapy of Chagas'disease. **Medicina**, v. 59 p. 179-187, 1999.

FERNANDES, O.; STURM, N.R.; DERRE, R.; CAMPBELL, D.A. The mini-exon gene: a genetic marker for zymodeme III of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** V. 95, p. 129-133, 1998.

FRANCO DA SILVEIRA, J. Biologia Molecular do *Trypanosoma cruzi*. Em: Brener Z, Andrade Z (eds). *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*, 2 st edição. Rio de janeiro: Guanabara Koogan Ed, p. 127-152, 2000.

FREITAS, T. P.; FURTADO, N.A.; BASTOS, J.K.; SAID, S. Active substances against trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* and microorganisms are produced in sequence by *Talaromyces flavus*. **Microbiol Res.**, v. 157, p. 201-206, 2002.

FUNAYAMA, G.K.; PRADO, J.C. Estudo dos caracteres de uma amostra Boliviana de *T.cruzi*. **Soc. Brasil. Med. Trop.**, v. 8, p. 75-81, 1974.

GARCIA, E.S.; AZAMBUJA, P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. **Parasitology Today**, v. 7, p. 240-244, 1991.

GARCIA, E.S.; AZAMBUJA, P. Fisiologia de Triatomíneos: Desenvolvimento, reprodução e interação com *Trypanosoma cruzi*. Em: Brener Z, Andrade Z (eds). *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*, 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Ed, p. 41-47, 2000.

GÜRTLER, R.E.; SEGURA, E.L.; COHEN, J.E. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. **Emerg Infect Dis.**, v. 9, p. 29-32, 2003.

HENDERSON, G.B.; ULRICH, P.; FAIRLAMB, A.H.; ROSENBERG, I.; PEREIRA, M.; SELA, M.; CERAMI, A. "Subversive" substrates for the enzyme trypanothione disulfide reductase: alternative approach to chemotherapy of Chagas disease. **Proc Natl Acad Sci**, v. 85, p. 5374-5348, 1988.

KOROLKOVAS, A. Dicionário Terapêutico 02/03; Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2002.

LENINGHER, A.L. **Princípios de Bioquímica**, ed. 25, p. 644-670, 1995.

LIANG, X. LIANG, X.H.; HARITAN, A. ULIEL, S.; MICHAELI, S. Trans e cis splicing in Trypanosomatids : Mechanism, factors and regulation. **Eukaryotic Cell**, v. 2, p. 830-839, 2003.

MAFEZOLI, J.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; DA SILVA, M.F.; DE ALBUQUERQUE, S. *In vitro* activity of Rutáceas species against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. **Ethnopharmacol.**, v. 73, p. 335-340, 2000.

MAIR, G.; SHI, H.; LI, H.; DJIKENG, A.; AVILES, H.O.; BISHOP, J.R.; FALCONE, F.H.; GAVRILESCU, C.; MONTGOMERY, J.L.; SANTORI, M.I.; STERN, L.S.; WANG, Z.; ULLU, E.; TSCHUDI, C. A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. **RNA**, v. 6, p. 163-169, 2000.

MARTINEZ-DIAZ, R.A.; ESCARIO, J.A.; NOGAL-RUIZ, J.J.; GOMEZ-BARRIO, A. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 53-59, 2001.

MOIDEEN, S.V.; HOUGHTON, P.J.; ROCK, P.; CROFT, S.L.; ABOAGYE-NYAME, F. Activity of extracts and naphthoquinones from *Kigelia pinnata* against *Trypanosoma brucei* *brucei* and *Trypanosoma brucei rhodesiense*. **Planta Med.**, v.65, p. 536-540, 1999.

MURTA, S.M.; GAZZINELLI, R.T.; BRENER, Z.; ROMANHA, A.J. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 93, p. 203-214, 1998.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. The influence of natural products upon drug discovery. **Nat. Prod. Rep.**, v. 17, p. 215-134, 2000.

NICHOLAS, K. B.; NICHOLAS H. B. Jr. GeneDoc: a tool for editig and annotating multiple sequence alignments, 1997.

NILSEN, T. W. Trans-splicing in nematodes. **Exp. Parasitol.**, v. 69, p. 413-416, 1989.

NILSEN, T.W. *Trans-splicing*: an update. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 73, p. 1-6, 1995.

OLIVEIRA, R.B.; PASSOS, A.P.; ALVES, R.O.; ROMANHA, A.J.; PRADO, M.A.; DE SOUZA FILHO, J.D.; ALVES, R.J. *In vitro* evaluation of the activity of aromatic nitrocompounds against *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 141-144, 2003.

PITELLA, J. Central nervous system involvement in Chagas'disease. An updating. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 35, p. 111-116, 1993.

RODRIGUEZ, J.B. Specific molecular targets to control tropical diseases. **Curr Pharm Des.**, v. 7 , p. 1105-1116, 2001.

RODRIGUEZ, J.B.; ZHONG, L.; DOCAMPO, R.; WIMMER, Z.; GROS, E.G. Growth inhibitory effect of juvenile hormone analogues on epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 8, p. 3257-3260, 1998.

SALMON-CHEMIN, L.; LEMAIRE, A.; DE FREITAS, S.; DEPREZ, B.; SERGHERAERT, C.; DAVIOUD-CHARVET, E. Parallel synthesis of a library of 1,4-naphthoquinones and automated screening of potencial inhibitors of trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 10, p. 631-635, 2000.

SAMBROOK, J. FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ª edição. New York, 1989.

SCHUMUNIS, G.A. A tripanossomíase Americana e seu impacto na saúde pública das Américas. In BRENER, Z. & ANDRADE, Z. (eds). **Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 1-3, 2000.

SEPÚLVEDA-BOZA, S.; CASSELS, B.K. Plant metabolites active against *Trypanosoma cruzi*. **Planta Med.**, v. 62, p. 98-115, 1996.

SOUZA, D.H.; GARRATT, R.C.; ARAUJO, A.P.; GUIMARÃES, B.G.; JESUS, W.D.; MICHELS, P.A.; HANNAERT, V.; OLIVA, G. *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design. **FEBS Lett.**, v. 424, p. 131-135, 1998.

STTOPANI, A.O. The chemotherapy of Chagas disease. **Medicina**, v.59, p. 147-165, 1999.

ULLU, E.; TSCHUDI, C. Permeable trypanosome cells as a model system for transcription and trans-splicing. **Nucleic Acids Reserch**, v. 11, p. 3319-26, 1990.

ULLU, E.; TSCHUDI, C. Trans splicing in trypanosomes requires methylation of the 5' end of the spliced leader RNA. **Proc Natl Acad Sci**, v. 88, p. 10074-10078, 1991.

UMEZAWA E.S.; MILDER R.V.; ABRAHAMSOHN, I. Trypanosoma cruzi amstigotes: development in vitro and infectivity in vivo of the forms isolated from spleen an liver. **Acta Tropica.**, v. 42, p. 25-32, 1985.

URBINA, J.A. Parasitological cure of Chagas disease: is it possible? Is it relevant? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 349-355, 1999.

URBINA, J.A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends Parasitol.**, v. 19, p. 495-501, 2003.

VIANNA, V.F.; AMBRÓSIO, D.L; CICARELLI, R.M.B. Mapeamento de bandas de “trans-splicing in vitro” com extratos nucleares de *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Ciências Farmacêuticas**, v. 22, p. 295-306, 2001.

VIEIRA, J.L.; MIDIO, A.F. Drug monitoring of quinine in men with nonsevere falciparum malaria: study in the Amazon region of Brazil. **Ther. Drug. Monit.**, v. 23, p. 612-615, 2001.

WHO. Chagas Disease Elimination-Burden and Trends. (available <http://www.who.int>), 2003.

ZINGALES, B. Revisiting Trypanosoma cruzi: the meaning of two major groups. Two species of the same parasite? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 10-12, 2000.

APÊNDICE

Meios de cultura, soluções, géis, tampões e reagentes utilizados:

A. Preparo de meio de cultura para *T.cruzi*

∞ Meio LIT (*Liver Infusion Tryptone*):

4,0 g de NaCl

0,4 g de KCl

8,0 g Na₂HPO₄

2,0 g de Dextrose

5,0 g de Tryptose

3,0 g de *Liver Infusion Broth*

0,25 g de Haemin dissolvido em 0,5 ml de NaOH

100 ml de Soro Fetal Bovino Inativado

Completou-se com água destilada para 1000 ml.

Os sais foram dissolvidos em 850 ml de água destilada. Após, incubou-se a 68°C por uma hora para dissolver o Haemin. O pH foi então acertado para 7,2 e completou-se o volume para 900 ml com água destilada. Realizou-se uma filtração em filtro Milipore 0,22 µm estéril, em seguida adicionou-se 100 ml de Soro Fetal Bovino Inativado. O meio foi deixado à 37°C durante a noite para teste de esterilidade e estocado a 4°C até o momento do uso.

B. Meio de cultura para bactéria:**⊗ Meio LB (*Luria Bertani*)**

5,0 g de Bacto Triptona

2,5 g de Extrato de Levedura

5,0 g de NaCl

Completo-se com água destilada para 500 ml.

Foi agitado até dissolução dos sais e autoclavou-se por 20 minutos a 121°C. Para preparação de LB sólido, adicionou-se ágar na concentração final de 1% antes de autoclavar.

⊗ Meio CG (*Circle Grow*)

Pesaram-se 20 g de CG, adicionando-se 500 ml de água para dissolução. O meio foi autoclavado por 15 minutos a 121°C.

C. Soluções para o sequenciamento:

⊗ **Big Dye:** Terminator RR mix (Applied Biosystem)

⊗ **Save-money Buffer**

200mM Tris-HCL 1M pH 9,0

5mM Cloreto de Magnésio.

⊗ **Isopropanol 75%**

⊗ **Etanol 70%**

⊗ **Loading buffer:**

5:1 de Formamida deionizada

25mM EDTA pH 8,0

50mg/ml de *Blue Dextran*

- ⊖ **Tampão de corrida TBE [1X]**. Preparado a partir do estoque TBE [10X].
- ⊖ **Gel para sequenciamento (Applied Biosystem)**: foi preparado conforme as instruções do fabricante antes de ser aplicado nas placas.

D. Soluções para mini-preparação dos plasmídios:

⊖ **Solução I:**

25mM Tris-HCl pH 8,0

10mM EDTA

50mM Glicose

A solução foi autoclavada por 15 minutos e estocada a 4 °C.

⊖ **Solução II:**

0,2M NaOH

1% SDS

A solução foi preparada no momento do uso.

⊖ **Solução III:**

3M Acetato de potássio pH 5,5

⊖ **Isopropanol**

⊖ **Tampão TE:**

10mM Tris-HCl pH 7,5

1mM EDTA pH 8,0

⊖ **Fenol/clorofórmio**

⊖ **Etanol 100% e 70%**

E. Soluções para o gel de agarose:**⊗ TAE [50X]:**

2M Tris-base

1M Ácido acético glacial

0,05M EDTA pH 8,0

⊗ Agarose (Promega)**⊗ Brometo de Etídio 10mg/ml****⊗ Tampão de amostra *Dye-front*:**0,25% *Bromophenol blue*0,25% *Xylene cyanol FF*

30% Glicerol

F. Gel de poliacrilamida com uréia:**⊗ Uréia****⊗ Tampão TBE [10X]:**

0,89M Tris-base

0,02M Na₂EDTA.H₂O

0,89M Ácido bórico

O pH foi acertado para 8,3 seguindo-se esterilização por autoclave durante 20 minutos a 121°C.

⊗ Acrilamida 40%**⊗ Persulfato de amônio 10%****⊗ TEMED****⊗ Brometo de Etídio 10mg/ml**

G. Soluções para extração do DNA genômico:

- ⊗ **DNAzol® (Invitrogen)**
- ⊗ **Tampão TE**
- ⊗ **Etanol 100%**
- ⊗ **Etanol 95%**
- ⊗ **NaOH 8mM**

H. Soluções para a clonagem

- ⊗ **Solução de Cloreto de Cálcio**

60 mM CaCl₂

10 mM MOPS pH 7,0

15% de Glicerol

Completo-se com água destilada para 50ml. A solução foi filtrada em filtro Millipore 0,22 µm dentro do fluxo laminar, passando para um tubo estéril.

- ⊗ **IPTG 5mM**
- ⊗ **X-Gal [20mg/ml]**
- ⊗ **Cloreto de Magnésio 1M (MgCl₂ 1M)**

I. Soluções para Reação de Transcrição

- ⊗ **Tampão de Transcrição**

200mM Tris-HCl pH 8,0

50mM MgCl₂

50mM DTT

20mM Espermidina

50mM NaCl

250 μ g/ml BSA

⊖ **SET [20X] pH 8,0**

3M NaCl

20mM EDTA pH 8,0

0,6M Tris-HCl pH 8,0

Completou-se com água destilada para 100ml e em seguida filtrou-se a solução utilizando filtro Milipore 0,22 μ m.

⊖ **Formamida Deionizada**

10g de Resina Amberlit

100ml de Formamida

Deixou-se agitando por 30 minutos e em seguida filtrou-se em filtro Millipore 0,22 μ m.

⊖ **Tampão de Extração da banda de RNA após transcrição**

2M Acetato de Amônio pH 8,0

SDS 1%

Glicogênio 20 μ g/ml

J. Soluções para reação de coloração pelo Nitrato de Prata

⊖ **Solução I**

40% Metanol/ 10% Ácido acético

⊖ **Solução II**

10% Etanol/ 5% Ácido acético

⊖ **Solução III**

0,28M Na₂CO₃/ 0,0185% formaldeído

⊖ **AgNO₃ 12mM**

⊖ **Solução IV**

5% Ácido acético

K. Soluções para Reação com Células Permeáveis

⊖ **Lisolecitina 10mg/ml**

⊖ **Tampão 50% formamida/5X SET**

⊖ **Tampão TB [10X]**

200mM KGlu

300mM MgCl₂

10mM DTT

100μg/ml Leupeptin

Completou-se com água para 100 ml. Após homogeneização, filtrou-se em filtro Millipore de 0,22μm e foram estocadas a – 20°C.

⊖ **Mix**

Tampão TB [1X]

0,5M *Creatin-fosfato* 12mg/ml (Sigma)

12 mg/ml *Creatin-kinase* (Sigma)

100μCi [α-³²P]-UTP (Amersham)

4mM ATP

2mM GTP

2mM CTP

NFOH ou NF (na concentração desejada)

L. Soluções para Reação de Proteção com RNases A e T1:**∞ Tampão para RNases (A e T1)**

300mM de NaCl

10mM Tris-HCl pH 7,5

5mM de EDTA pH 8,0

Observação: os reagentes utilizados foram obtidos das seguintes marcas: Merck, Difco, Cutilab, Life Technologies, Sigma, Pharmacia, Mallinckrodt, Amresco, Applied Biosystem, USB, BioLabs, Phoneutria.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)