UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO

PROGRAMA DE BIOLOGIA CELULAR E PARASITOLOGIA

ALLAN CÉZAR DE AZEVEDO MARTINS

SÍNTESE DE FOSFATIDILCOLINA EM *CRITHIDIA DEANEI*: a influência do endossimbionte

RIO DE JANEIRO

2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

ALLAN CÉZAR DE AZEVEDO MARTINS

SÍNTESE DE FOSFATIDILCOLINA EM *CRITHIDIA DEANEI*: a influência do endossimbionte

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Biologia Celular e Parasitologia de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre Ciências Biológicas (Biofísica)

Orientadores: Prof. Drª Maria Cristina Machado Motta e Prof. Dr Marcelo Einicker Lamas

RIO DE JANEIRO

2008

ALLAN CÉZAR DE AZEVEDO MARTINS

SÍNTESE DE FOSFATIDILCOLINA EM *CRITHIDIA DEANEI*: a influência do endossimbionte

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Biologia Celular e Parasitologia de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre Ciências Biológicas (Biofísica)

Aprovada em_____de_____de_____.

_____
PROFª DRª MARIA CRISTINA MACHADO MOTTA, IBCCF

_____
PROF DR MARCELO EINICKER LAMAS, IBCCF

_____
DRª CLAUDIA D'AVILA LEVY, IOC

_____
PROF DR EDNILDO DE ALCÂNTARA MACHADO, IBCCF

_____
PROFª DRª GEÓRGIA CORREA ATELLA, IBCCF

_____
PROF DR NORTON HEISE, IBCCF

À Luciana, por tudo que aprendi.

À Dra. Cristina Motta, pela confiança.

Ao Antônio, Dayse e André
minha família.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pela oportunidade de desenvolver um estudo e conseguir chegar até aqui.

À professora Dr.ª Maria Cristina Machado Motta que me inseriu na comunidade científica, seja através do projeto que me incumbiu, seja pelo estímulo em desenvolver o “pensar científico”; e pela confiança que teve em minha pessoa.

Ao professor Dr. Marcelo Einicker Lamas, que colaborou de maneira essencial nesse projeto ao auxiliar na resolução de ensaios que não poderiam ser realizados no meu laboratório; e pela pessoa muito divertida que é.

À Iamara pelo grande auxílio no desenvolvimento dos experimentos e na organização das hipóteses a serem estudadas.

Ao Paulo pela grande ajuda e apoio durante o período de estágio.

Aos conpanheiros de labuta diária, Aline, Danielle, Thiago, Carol, Felipe e Jaqueline por contribuir seja com a troca de experiências, seja passando sua experiência, mostrando a melhor maneira de realizar alguns ensaios de processamento de amostras.

Ao Bosco e à Nete pelo auxílio tanto na limpeza de material e higiene do ambiente de trabalho quanto nos momentos de descontração.

À FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO (FAPERJ) e à COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES), pelo patrocínio como órgãos fomentadores de bolsa de pós-graduação.

Ao LABORATÓRIO DE ULTRAESTRURA CELULAR HERTHA MEYER, por permitir o desenvolvimento desta pesquisa em seu espaço físico.

Ao LABORATÓRIO DE FÍSICO QUÍMICA BIOLÓGICA AÍDA HASSON-VOLOCH, por permitir o desenvolvimento de ensaios complementares a esta pesquisa em seu espaço físico.

Ao grupo de colaboração do Dr. Krieger no INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO PARANÁ (IBMP), com o qual deciframos alguns enigmas no genoma do simbionte.

Ao Dr. Antônio Galina Filho do INSTITUTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA (IBqM) da UFRJ, pela colaboração no estudo do consumo de O_2.

Sumário

Lista de figuras xi

Lista de tabelas xiii

Lista de abreviaturas xiv

Resumo xv

Abstract xvii

1 Introdução 1

1.1 A família Trypanosomatidae 1

1.2 Endossimbiose em tripanosomatídeos 3

1.3 O envoltório bacteriano 8

1.4 Metabolismo de fosfatidilcolina 12

1.4.1 Via de Kennedy 14

1.4.2 Via de Greenberg 14

1.4.3 Via da PC sintase 16

2 Objetivos 20

2.1 Objetivo Geral 20

2.2 Objetivos específicos 20

3 Material e métodos 21

3.1 Cultivo 21

3.2 Fracionamento celular 21

3.2.1 Obtenção das frações de endossimbionte e mitocôndria 21

3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão 24

3.4 Incorporação de traçadores radioativos 25

3.5 Extração de lipídeos 25

3.6 Cromatografia em camada fina 26

3.7 Pesquisa genômica 28

3.8 Consumo de O_2 29

4 Resultados 32

4.1 Síntese de fosfolipídeos nas cepas normal e curada de *C. deanei* 32

4.7 Ultraestrutura de *C. deanei* e das frações de simbionte e de mitocôndria 32

4.2 Quantificação de fosfolipídeos das frações de endossimbionte e de mitocôndria obtidas de *C. deanei* crescida em meio contendo ^{32}Pi 36

4.3 Capacidade de síntese de fosfolipídeos em endossimbiontes e mitocôndrias isolados de *C. deanei* e incubados com ^{32}Pi 38

4.4 Incorporação de [^{3}H]-colina pelo endossimbionte isolado de *C. deanei* 41

4.5 Busca de enzimas das vias de síntese de PC no genoma do simbionte de *C. deanei* 41

4.6 Diferenças no consumo de O_2 pelas cepas normal e curada de *C. deanei* e pelas frações de simbionte e mitocôndria 43

5 Discussão 48

6 Conclusões 57

7 Referências Bibliográficas 59

Lista de figuras

Figura 1 – *Crithidia deanei* 2

Figura 2 – Ultraestrutura de *Crithidia desouzai* 7

Figura 3 – Envoltório celular de bactérias Gram-negativas 9

Figura 4 – Envoltório do endossimbionte de tripanosomatídeos. 11

Figura 5 – Via de Kennedy e Via de Greenberg 15

Figura 6 – Via da PC Sintase (PCS) 18

Figura 7 – Incorporação de ^{32}Pi em fosfolipídeos pelas cepas selvagem e aposimbiótica de *C. deanei*. 33

Figura 8 – Ultraestrutura de *Crithidia deanei* 34

Figura 9 – Ultraestrutura das frações de simbionte e mitocôndria 35

Figura 10 – Quantificação fosfolipídica de simbiontes e mitocôndrias de *C. deanei* 37

Figura 11 – Síntese de fosfolipídeos pelas frações de simbionte e mitocôndria. 39

Figura 12 – Quantificação fosfolipídica da fração de simbionte isolada 40

Figura 13 – Incorporação de [^{3}H]-colina pela fraçãos de simbionte 42

Figura 14 – Consumo de O_2 pela cepa aposimbiótica e selvagem de *Crithidia deanei* 45

Figura 15 – Consumo de O_2 pelas frações de simbionte e mitocôndria após isolamento da *Crithidia deanei*. 46

Lista de tabelas

Tabela 1 - Ezimas das vias de síntese de PC (Via de Kennedy, Via de Greenberg e Via da PC Sintase). 19

Tabela 2 - Genes similares a fosfolipase D do gênero *Bordetella* encontrados no genoma do simbionte..... 44

Lista de abreviaturas

C, K = Cinetoplasto

E = Endossimbionte

EP = estrutura para-flagelar

F = flagelo

G = glicossomos

M = Mitocôndria

MS = microtúbulos sub-peliculares

PA = Ácido Fosfatídico

PC = Fosfatidilcolina

PCS = Fosfatidilcolina sintase

PE = Fosfatidiletanolamina

PI = Fosfatidilinositol

Resumo

AZEVEDO-MARTINS, A.C. **Síntese de fosfatidilcolina em *Crithidia deanei*: a influência da bacteria simbiótica**. Rio de Janeiro, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Biofísica) Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

Alguns tripanosomatídeos abrigam uma bactéria simbiótica em seu citoplasma, com a qual mantém uma relação mutualística, constituindo um excelente modelo para o estudo da origem das organelas e da evolução celular. Este trabalho mostra que a *Crithidia deanei* que hospeda o simbionte incorpora duas vezes mais ^{32}Pi em fosfolipídeos, após crescimento em meio de cultura, quando comparada a cepa aposimbiótica. O principal fosfolipídeo sintetizado por ambas as cepas é fosfatidilcolina (PC), seguida de fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilinositol (PI). O fracionamento celular indicou que ^{32}Pi-PC é o fosfolipídeo majoritário nas frações de simbionte e mitocôndria. O simbionte isolado é capaz de sintetizar fosfolipídeos independente do tripanosomatídeo hospedeiro. Entretanto, as bactérias isoladas sintetizam grande quantidade de PE, mais que PC, indicando que a associação com o protozoário hospedeiro é essencial para a produção de PC do simbionte. O endossimbionte isolado foi incubado com [^{3}H]-colina para verificar se a bactéria poderia incorporar o traçador do meio e sintetizar PC-marcado, mas nenhuma incorporação foi observada. Além disso, os genes que codificam as enzimas envolvidas na biossíntese de PC não foram encontrados no genoma do endossimbionte. Contudo, esta buscas revelaram um gene codificante de uma putativa fosfolipase D, indicando que a troca entre os grupos de cabeças polares pode explicar a síntese de PC em parte. A respeito do consumo de O_2 pela fração mitocondrial, taxas mais elevadas são observadas quando comparadas à fração de simbionte, sugerindo que, embora metabolicamente ativa após o fracionamento celular, a mitocôndria é incapaz de sintetizar fosfolipídeos. O consumo de O_2 pelo protozoário que contém o endossimbionte é mais elevado quando comparado ao aposimbiótico, reforçando a idéia de que a bactéria simbiótica acelera o metabolismo do hospedeiro. Os dados obtidos por microscopia eletrônica de transmissão revelaram uma proximidade entre endossimbionte, núcleo e retículo endoplasmático. Juntos, esses resultados sugerem que a bactéria simbiótica pode obter parte de sua PC, ou mesmo precursores de PC, do tripanosomatídeo hospedeiro.

Palavras-chave: *Crithidia deanei*; endossimbiose; bactéria simbiótica; fosfolipídeos; biossíntese de fosfatidilcolina.

Abstract

AZEVEDO-MARTINS, A.C. **Síntese de fosfatidilcolina em *Crithidia deanei*: a influência da bacteria simbiótica**. Rio de Janeiro, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Biofísica) Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

Some trypanosomatids harbor a symbiotic bacterium, which maintains a mutualistic relationship with the host, constituting an excellent model to study organelle origin and cellular evolution. This work shows that symbiont-bearing *C. deanei* incorporates more than two fold ^{32}Pi into phospholipids, after growth in culture medium, as compared to the aposymbiotic strain. The major phospholipid synthesized by both strains was phosphatidilcholine (PC), followed by phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylinositol (PI). Cellular fractionation indicated that ^{32}Pi-PC is the major phospholipid, both in the symbiont and in the mitochondrion fractions. Isolated symbionts were capable of synthesizing phospholipids independently from the host trypanosomatid. However, the isolated bacteria synthesized mostly PE, rather than PC, indicating that the association with the host protozoan is essential for the symbiont PC production. Isolated endosymbionts were incubated with [^{3}H]-choline in order to verify if the bacterium could uptake the tracer from the medium to synthesize radiolabeled-PC, but no incorporation was observed. Furthermore, genes that codify enzymes involved in PC biosynthesis were not found in the endosymbiont genome. However, this search revealed a putative gene enconding a phospholipase D, indicating that the change between polar head groups could explain in part the PC production. Regarding O_2 consumption by mitochondrial fraction, higher rates were observed when compared to the symbiont fraction, suggesting that although metabolically active after cell fractioning, mitochondrion is unable to synthesize phospholipids. The consumption of O_2 by symbiont-containing protozoa was higher when compared with the aposymbiotic cells, reinforcing the idea that the symbiotic bacterium accelerates the host metabolism. Data obtained by transmission electron microscopy revealed a close association between the endosymbiont, the nucleus and the endoplasmatic reticulum. Taken together, these results suggest that the symbiotic bacterium may obtain part of its PC, or even PC precursors, from the host trypanosomatid.

Keywords: *Crithidia deanei*; endosymbioses; symbiotic bacteria; phospholipids; phosphatidilcholine biosynthesis.

1 Introdução

1.1 A família Trypanosomatidae

Dentre as espécies parasitárias, os protozoários da família Trypanosomatidae despertam grande interesse de estudo por causarem doenças ao homem, como as leishmanioses, causadas por várias espécies do gênero *Leishmania*, a Doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, e a Doença do sono, causada pelo *Trypanosoma brucei* (WHO, 1998). Os tripanosomatídeos pertencem à Ordem Kinetoplastida, possuindo características ultraestruturais típicas (FIGURA 1), como: flagelo único contendo uma complexa estrutura paraflagelar; mitocôndria única e ramificada que contém uma região mais alargada e com acúmulo de DNA (denominada de cinetoplasto), glicossomos (tipo de peroxisomo que contém enzimas da via glicolítica) e microtúbulos subpeliculares associados à membrana plasmática (De SOUZA, 2002).

Com tantos organismos de importância médica, nesta família também são encontradas espécies não patogênicas ao ser humano, que parasitam somente um hospedeiro invertebrado, geralmente insetos. Tais espécies que parasitam apenas um hospedeiro são denominadas monoxênicas e pertencem a diferentes gêneros (McGHEE & COSGROVE, 1980; BARON *et al.*, 1996). Entre os tripanosomatídeos monoxênicos, existe um pequeno número de espécies que apresentam uma bactéria simbiótica em

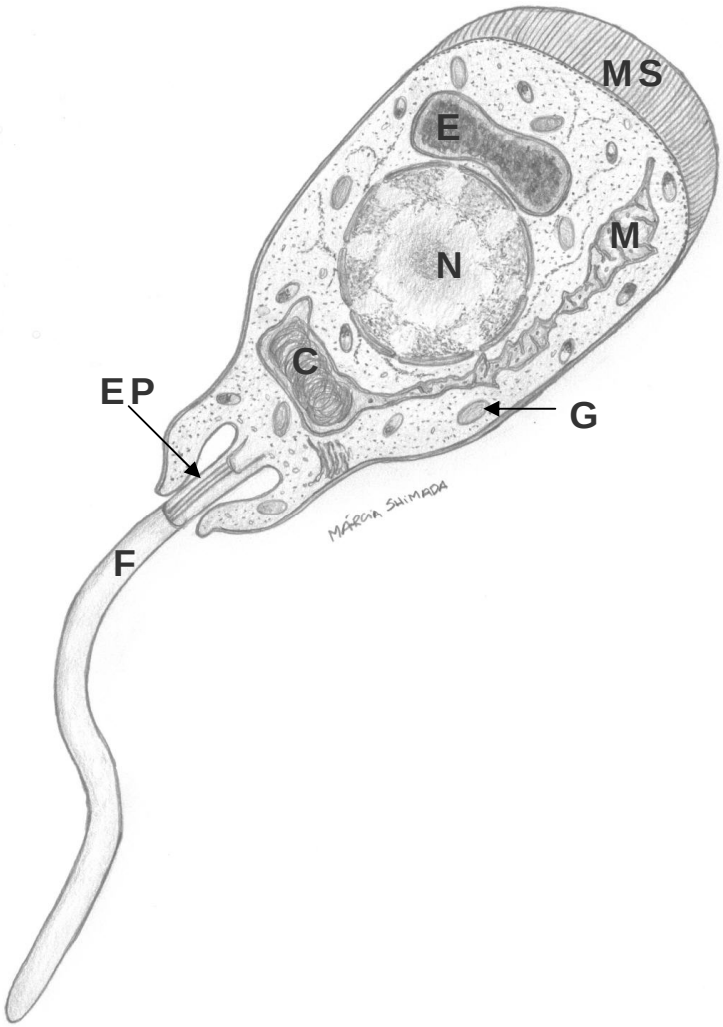


Figura 1 – *Crithidia deanei*.
Desenho esquemático do tripanosomatídeo *C. deanei*, por Márcia Shimada. Notar a presença do endossimbionte (E) próximo ao núcleo (N) e o cinetoplasto (C) na extremidade anterior do protozoário.
EP = estrutura para-flagelar; F = flagelo; G = glicossomo; M = mitocôndria; MS = microtúbulos sub-peliculares.

seu citoplasma, são elas: *Crithidia deanei*; *Crithidia desouzai*; *Crithidia oncopelti*; *Blastocrithidia culicis*; e *Herpetomonas roitmani*. (revisto por DE SOUZA e MOTTA, 1999).

1.2 Endossimbiose em tripanosomatídeos

Os endossimbiontes presentes nas diferentes espécies de tripanosomatídeos guardam grande identidade entre si e com bactérias do gênero *Bordetella*, levantando a hipótese de que um único evento evolutivo originou a endossimbiose nesta família de protozoários (DU *et al.*, 1994a e 1994b). O projeto genoma do endossimbionte de *C. deanei* está em fase final, sendo que os resultados do seqüenciamento revelam maior homologia entre este procarioto e a bactéria *Bordetella parapertussis*, uma Gram-negativa, pertencente à subdivisão β das Proteobactérias (PROBST *et al.*, 2006).

A endossimbiose em tripanosomatídeos apresenta um caráter mutualístico, sendo que intensas trocas metabólicas ocorrem entre a bactéria simbiótica e o protozoário hospedeiro. O endossimbionte fecha diversos ciclos metabólicos com o protozoário, que apresenta baixas exigências nutricionais (revisto por De SOUZA & MOTTA, 1999). A característica marcante do mutualismo reside no fato do hospedeiro e do simbionte serem incapazes de sobreviver na natureza quando separados, o que é observado em *C. deanei*. A bactéria simbiótica não é capaz de se replicar fora da célula hospedeira e sofre lise osmótica poucas horas após o seu isolamento. Já o protozoário curado (obtido após

tratamento com antibiótico), só consegue sobreviver *in vitro* se suplementos nutricionais forem adicionados ao meio de cultura (revisto por De SOUZA & MOTTA, 1999). Além disso, essa cepa aposimbiótica é incapaz de colonizar insetos (FAMPA *et al.*, 2003).

É possível obter uma cepa aposimbiótica, também chamada cepa curada, após o crescimento do protozoário em meio contendo cloranfenicol, um antibiótico que inibe a síntese protéica em procariotos, como descrito por Mundim *et al.* em 1974 para *Crithidia deanei* e por Chang em 1974 para *Blastocrithidia culicis* e *Crithidia oncopelti*. Assim, é possível se utilizar uma cepa aposimbiótica em estudos comparativos com a cepa normal ou selvagem para compreensão do papel metabólico do simbionte na biologia do protozoário hospedeiro.

A intensa troca metabólica observada na endossimbiose de tripanosomatídeos confere ao protozoário hospedeiro baixa exigência nutricional. Um exemplo é o fato da *C. deanei* não necessitar de fontes externas dos aminoácidos ornitina, arginina e citrulina, já que o simbionte contém a enzima ornitina carbamoiltransferase (OCT), que torna o ciclo da uréia completo nestes protozoários (CAMARGO & FREYMÜLLER, 1977). A presença do endossimbionte aumenta a capacidade biossintética de hemina já que a bactéria contém precursores metabólicos e a enzima uroporfirinogênio sintase, envolvida na formação de grupamentos heme (SALZMAN *et al.*, 1985).

A biossíntese de poliaminas, que está diretamente relacionada à produção de ornitina, mostra-se elevada em tripanosomatídeos que contêm o endossimbionte (FROSSARD *et al.*, 2006). Estes policátions estão envolvidos em processos celulares como duplicação do DNA, proliferação e diferenciação celular (HERBY & PERSSON, 1990; PEGG *et al.*, 1995). Recentemente, nosso grupo demonstrou a capacidade da bactéria simbiótica em produzir um fator protéico que aumenta a atividade da ornitina decarboxilase (ODC), que está diretamente ligada a biossíntese de poliaminas, atuando na conversão da ornitina em putrescina. Nas espécies de tripanosomatídeos com simbionte, a maior atividade desta enzima promove uma maior proliferação destas células, quando comparadas à cepa curada e também a outros protozoários da família (FROSSARD *et al.*, 2006).

Nosso grupo constatou diferenças entre as cepas normal e curada em um estudo sobre a influência do endossimbionte na biossíntese de fosfolipídeos do protozoário hospedeiro. A presença da bactéria simbiótica implica em maior produção de fosfolipídeos pelo protozoário, sendo a fosfatidilcolina (PC) o principal fosfolipídeo formado. Este dado reforça a importância da síntese de PC em *C. deanei*, um fosfolipídeo majoritário na composição da membrana plasmática e também nas membranas mitocondriais (PALMIÉ-PEIXOTO *et al.*, 2006).

A presença do endossimbionte promove alterações ultraestruturais na célula hospedeira. As cepas selvagem e curada

de espécies que contém a bactéria simbiótica apresentam uma estrutura paraxial reduzida (GADELHA *et al.*, 2005) e um cinetoplasto arredondado, onde o arranjo de fibrilas de DNA é mais frouxo (CAVALCANTI *et al.*, 2008). Além disso, estes tripanosomatídeos apresentam uma mitocôndria mais ramificada e microtúbulos subpeliculares ausentes nos pontos em que os ramos mitocondriais estão próximos à membrana plasmática (FIGURA 2) (FREYMULLER & CAMARGO, 1981). O endossimbionte parece dividir-se em sincronia com outras estruturas do tripanosomatídeo hospedeiro, já que cada célula filha contém apenas uma única bactéria simbiótica (MOTTA *et al.*, 2004).

Pela análise ultraestrutural e bioquímica da relação entre *Crithidia deanei* e sua bactéria simbiótica, foi constatada a localização de glicossomos próximos ao endossimbionte. Este dado, somado à baixa atividade da cadeia respiratória da bactéria, sugere que o protozoário hospedeiro pode estar fornecendo, através do metabolismo glicossomal, parte do ATP consumido pelo endossimbionte. Além disso, a presença de uma ectoATPase no envoltório do endossimbionte, sugere que a energia resultante da hidrólise de ATP pode estar sendo utilizada para transporte ativo de substâncias essenciais à bactéria simbiótica (MOTTA *et al.*, 1997a).

Quanto à morfologia do endossimbionte, estudos imunocitoquímicos demonstram que a sua matriz é composta por uma região granular e uma zona fibrilar. A região granular é

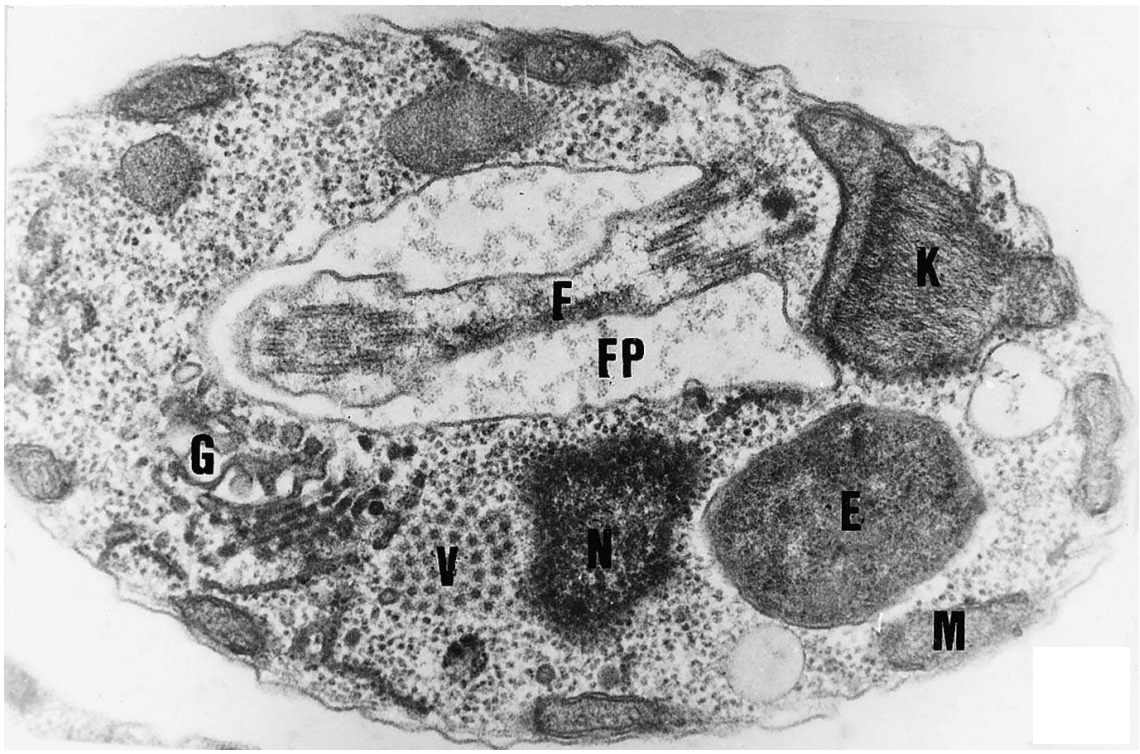


Figura 2 – Ultraestrutura de *Crithidia desouzai*.
Microscopia eletrônica de transmissão de *Crithidia desouzai* evidenciando a morfologia de tripanosomatídeos que contém o endossimbionte: cinetoplasto (K) arredondado com arranjo de DNA frouxo; endossimbionte (E) próximo ao núcleo (N); ausência de microtúbulos sub-peliclares nos pontos em que os ramos mitocondriais (M) se aproximam da membrana plasmática do hospedeiro.
F = flagelo; FP = bolsa flagelar; G = complexo de Golgi; V = agregado de partículas virais. 26000 X.
Soares *et al.*, 1989.

elétron-densa, sendo composta principalmente por ribossomos e distingue-se da fibrilar, que é mais elétron-lucente e composta por DNA (MOTTA *et al.*, 2003).

1.3 O envoltório bacteriano

Bactérias Gram negativas são delimitadas por duas unidades de membrana separadas entre si pelo espaço periplasmático, onde está presente uma camada de mureína ou peptidioglicano (FIGURA 3). Esta estrutura macromolecular é composta por glicanas unidas covalentemente por ligações peptídicas, apresentando a função de manter o formato celular e conferir estabilidade osmótica (CABEEN & JACOBS-WAGNER, 2005; RUIZ *et al*, 2006). As membranas plasmáticas de procariotos normalmente não apresentam esteróis e sua composição fosfolipídica é variada. Em *Escherichia coli* a membrana interna apresenta 70-80% de fosfatidiletanolamina (PE), 15-20% de fosfatidilglicerol (PG) e 5% ou menos de cardiolipina (CL). Estes percentuais são similares aos encontrados na membrana externa, embora os fosfolipídeos se localizem apenas no folheto interno, pois o folheto externo desta membrana é composto exclusivamente por lipopolisacarídeos (LPS) (RUIZ *et al.*, 2006). A PC está ausente na maioria dos procariotos, mas compõem o envoltório de bactérias intimamente associadas a eucariotos (LÓPEZ-LARA & GEIGER, 2001).

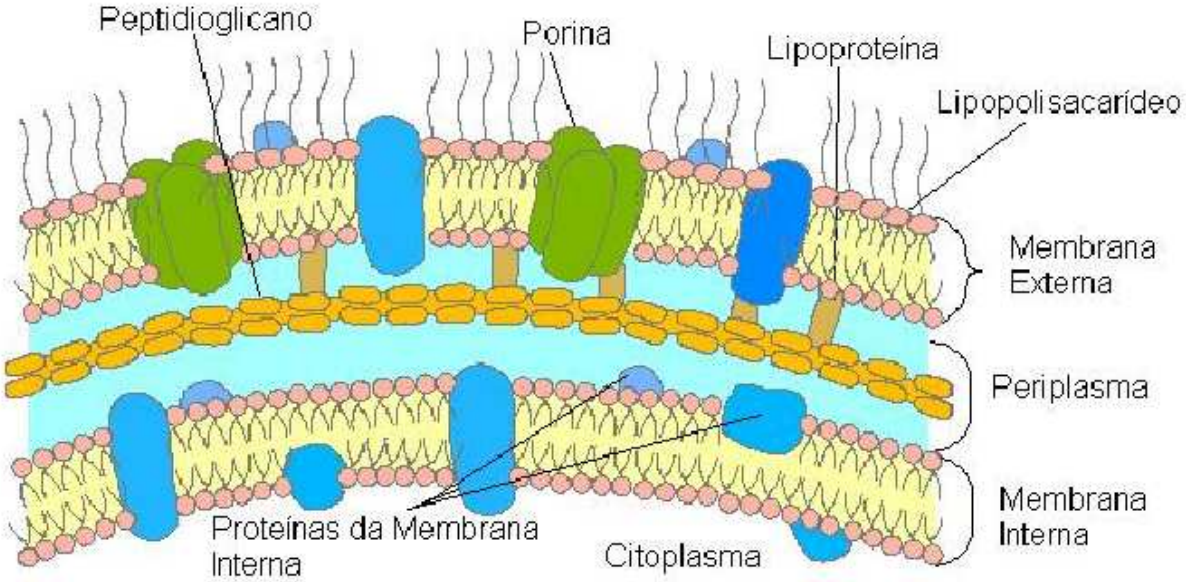


Figura 3 – Envoltório celular de bactérias Gram-negativas.
Desenho esquemático obtido do site http://www.conceptdraw.com evidenciando as estruturas que compõem o envoltório de bactérias Gram-negativas: membrana interna, que delimita o citoplasma, composta por proteínas e fosfolipídeos; periplasma (ou espaço periplasmático), onde se encontra a camada de peptidioglicano; e membrana externa, ligada a camada de peptidioglicano por lipoproteínas e constituída por lipopolisacarídeos e proteínas como as porinas.
http://www.conceptdraw.com/sampletour/medical/GramNegativeEnvelope.gif

O envoltório do endossimbionte é composto por duas unidades de membrana, entretanto análises ultraestruturais mostram que uma parede celular de bactérias Gram-negativas está reduzida (FIGURA 4) (SOARES & De SOUZA, 1987; MOTTA *et al.*, 1991). Segundo Motta *et al.* (1997b), a ação de antibióticos β-lactâmicos em *C. deanei* afeta tanto a forma quanto a divisão da bactéria simbiótica sugerindo que, apesar de extremamente reduzida, a parede celular desempenha papéis essenciais no endossimbionte.

A existência de duas membranas e a presença de uma parede reduzida (FIGURA 4A-B) leva a uma controvérsia quanto à origem da membrana externa. Alguns autores defendem a hipótese de que esta membrana é derivada da membrana plasmática do protozoário hospedeiro no momento em que a bactéria foi incorporada, formando o simbiosomo – vacúolo que contém a bactéria simbiótica (CHANG, 1974). Porém, para outros autores a membrana externa tem características procariotas, por apresentar porinas (ANDRADE *et al.*, 2008) e alta quantidade de proteínas transmembrana (FIGURA 4C), como descrito em bactérias Gram negativas (MOTTA *et al.*, 1991; SOARES & DE SOUZA, 1987).

Estudos recentes confirmaram a ausência de esteróis no envoltório do endossimbionte e mostraram que sua composição fosfolipídica é constituída por 25,7% de CL, 20,1% de PC, 19% de PE e 15,4% de PI (PALMIÉ-PEIXOTO *et al.*, 2006). Importante mencionar que PC não está presente em procariotos, mas

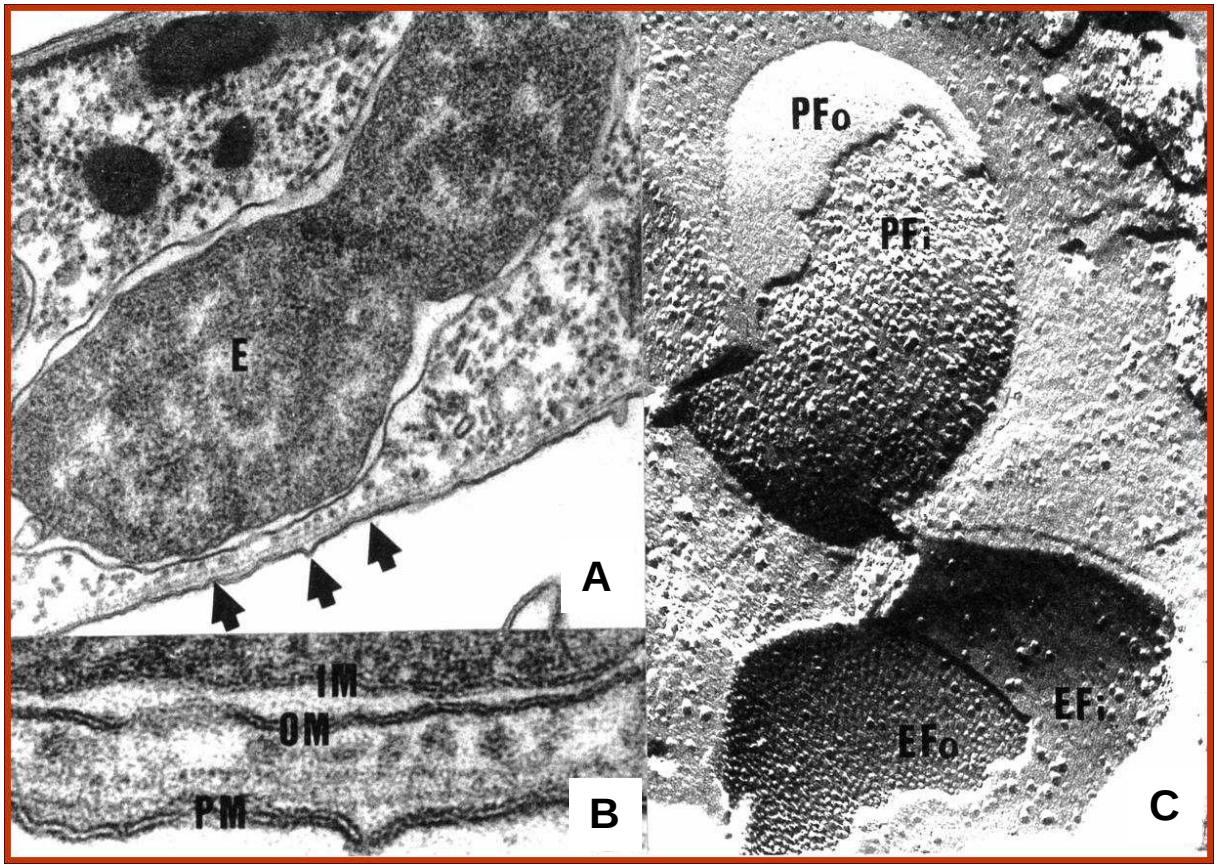


Figura 4 – Envoltório do endossimbionte de tripanosomatídeos.
Em A, microscopia eletrônica de transmissão do endosimbinote (E) de *Blastocrithidia culicis*. Setas indicam o aumento da figura A na figura B. 15.000 X
Em B, microscopia eletrônica de transmissão mostrando em maior aumento da figura A (setas), evidenciando as membranas interna (IM) e membrana externa (OM). Notar que a forma da bactéria não é bem definida sugerindo a ausência de parede externa entre as duas membranas do simbionte. PM = membrana plasmática. 40.000 X.
Em C, criofratura do endossimbionte revelando proteínas transmembranas presentes no envoltório da bactéria simbiótica. PFo = face protoplasmática da membrana externa; PFi = face protoplasmática da membrana iterna; EFo = face extracelular da membrana externa; EFi = face extracelular da membrana iterna. 64000 X.
Soares & De Souza 1987

encontras-se no envoltório de bactérias intimamente associadas a células eucariotas, seja por simbiose ou patogênicas (LÓPEZ-LARA & GEIGER, 2001).

1.4 Metabolismo de fosfatidilcolina

O estudo da estrutura dos fosfolipídeos, bem como de suas funções e vias de síntese, teve grandes avanços na década de 50, quando Eugene Kennedy e colaboradores utilizaram bactérias como modelo experimental. Nas décadas seguintes, vários estudos foram realizados sobre a regulação das vias de síntese de fosfolipídeos, utilizando inclusive abordagens moleculares. De um modo geral, os fosfolipídeos apresentam importantes funções: são constituintes majoritários da membrana plasmática; interagem com enzimas e proteínas integrais, contribuindo para a aquisição de uma conformação funcional final; participam de importantes processos de sinalização celular e influenciam a exportação protéica e a replicação de DNA (CRONAN, 2003). Com funções tão importantes e diversificadas, essas macromoléculas apresentam composição e distribuição variada nos diferentes tipos celulares (DOWHAN, 1997; KENT, 1995). A função unicamente estrutural de PC, fosfolipídeo predominante na membrana plasmática de eucariotos, ainda é discutida. Assim como PC, PE é um fosfolipídeo zwitteriônico, e também parece desempenhar um papel importante na estruturação de membranas e na citocinese bacteriana (MATSUMOTO et al., 2006). Já PI, participa da sinalização celular em eucariotos, após ser fosforilado a

fosfatidilinositol 4,5-bifosfato que é substrato da fosfolipase C, resultando na produção de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), que libera Ca^{++} de estoques intracelulares, e diacilglicerol (DAG) que ativa proteínas cinase C (SASAKI *et al.*, 2007).

Os fosfolipídeos possuem várias vias de síntese, que podem variar de um organismo para outro. Entretanto, a biossíntese de fosfolipídeos sempre começa com a formação de ácido fosfatídico (PA) após duas acilações de *sn*-glicerol-3-P. Nestas vias de síntese, um fosfolipídeo formado pode ser convertido em outro, considerando as enzimas envolvidas nestes processos e os precursores metabólicos disponíveis (DOWHAN, 1997).

Embora resultem nos mesmos fosfolipídeos, as vias de síntese dessas macromolélulas variam entre procariotos e eucariotos (DOWHAN, 1997; KENT, 1995). Dentres estas vias, a de síntese de PC é um alvo de estudo muito importante pelo fato deste fosfolipídeo estar ausente em procariotos livres, mas presente em bactérias associadas intimamente a eucariotos (LÓPEZ-LARA & GEIGER, 2001 e RUDDER *et al.*, 1999, 1997). A síntese de PC pode ocorrer a partir de três vias principais: Kennedy, Greenberg e PC sintase. Alguns dados relacionados às enzimas presentes nas vias de síntese de PC foram reunidos em uma tabela no final deste capítulo (TABELA 1).

1.4.1 Via de Kennedy

Também conhecida como via da CDP-colina, a via de Kennedy é a principal via de síntese de PC em células de mamíferos. Nessa via, a colina livre é utilizada para síntese de PC, passando por 3 etapas: a primeira conta com a ação da enzima colina cinase, que fosforila a colina livre em fosfocolina; a segunda etapa, que é limitante da reação, tem como enzima catalisadora a CTP:fosfocolina citidililtransferase (CCT), que forma CDP-colina a partir de colina fosfato e CTP; finalmente, na terceira etapa a enzima CDP-colina:1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase converte CDP-colina e diacilglicerol em PC (FIGURA 5).

A miltefosina atua como droga inibidora dessa via, ao impedir a ligação da CTP:fosfocolina citidililtransferase à membrana, para que esta torne-se ativa (URBINA, 1997; CUI & HOUWELING, 2002). Entretanto, esta droga apresenta outros alvos na célula, como os glicossomos (LUX *et al.*, 2000) e a mitocôndria, desencadeando o processo de apoptose (WIEDER *et al.*, 1999).

1.4.2 Via de Greenberg

Posteriormente denominada via das metilações por Cui e Houweling (2002), esta via é descrita como a principal em células procariotas e como uma via adicional em hepatócitos.

A via de Greenberg utiliza como substrato inicial a PE para formar PC em três etapas. Tais etapas são constituídas por

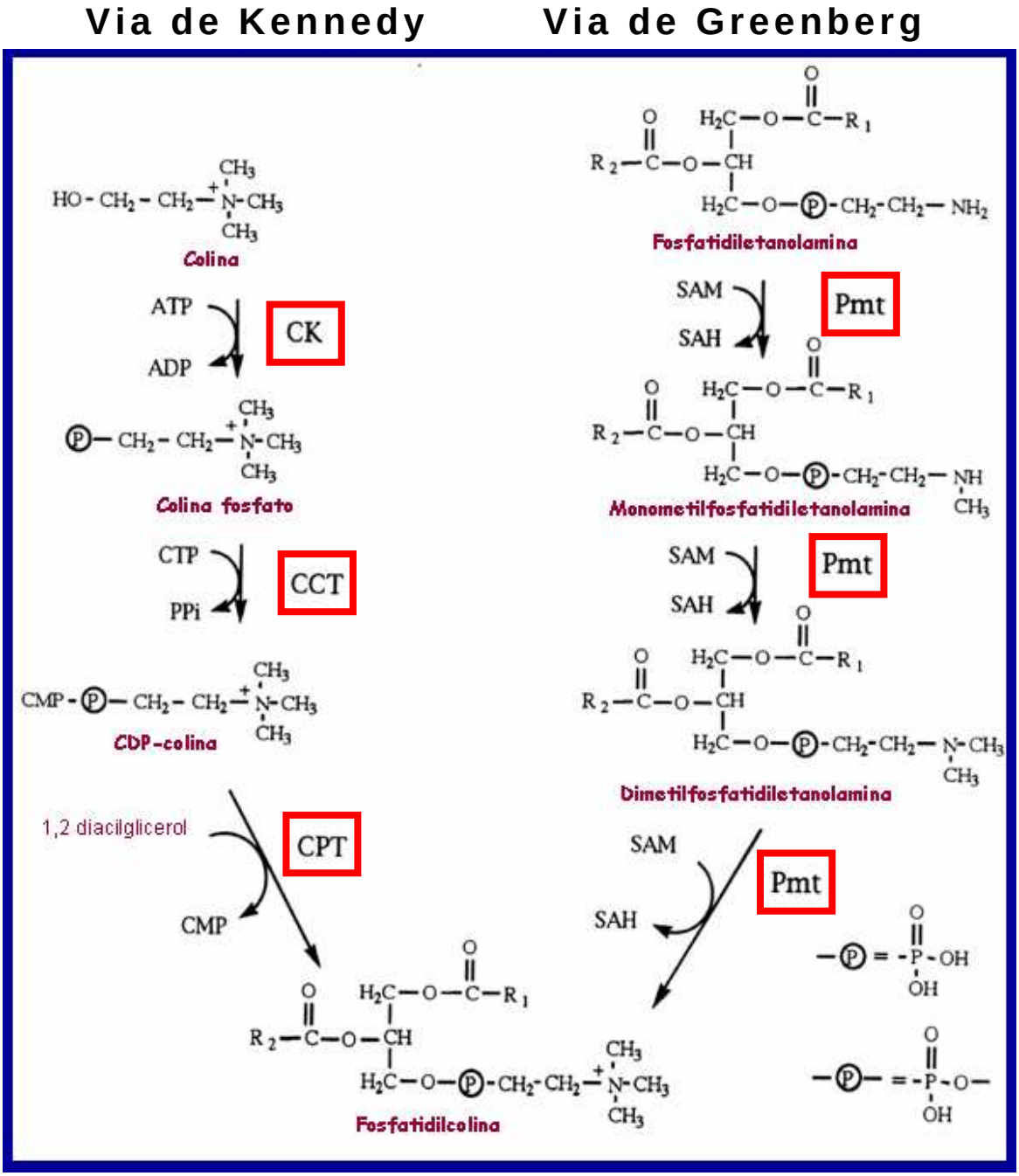


Figura 5 – Via de Kennedy e Via de Greenberg.
A síntese de PC ocorre predominantemente pela Via de Kennedy em eucariotos superiores. Já em eucariotos inferiores e em algumas bactérias intimamente associadas a eucariotos (parasitas e simbiontes), a Via de Greenberg é descrita como a principal.
CK = colina cinase; CCT = CTP:fosfocolina citidililtransferase; CPT = fosfatidilcolina trasnferase; Pmt = fosfatidiletanolamina metiltransferase; SAM = S-adenosilmetionina; SAH = S-adenosilhomocisteína
LÓPEZ-LARA & GEIGER, 2001

reações de metilação, onde a PE passa pelos intermediários monometilfosfatidiletanolamina (MMPE) e dimetilfosfa-tidiletanolamina (DMPE) antes de formar o produto final, a PC (FIGURA 5).

Nesta via, ocorre a ação de duas isoformas da enzima fosfatidiletanolamina-*N*-metiltransferase (Pmt), ambas derivadas de um único gene. Tais isoformas são capazes de catalizar reações para a formação de PC, mas apresentam diferenças quanto a atividade e a localização celular: no fígado, a Pmt1 é responsável por cerca de 80% da atividade metiltransferase e localiza-se no reticulo endoplasmático; já a Pmt2 representa apenas 20% dessa atividade e localiza-se exclusivamente em membranas associadas à mitocôndria (CUI & HOUWELING, 2002).

Embora tenha como alvo a inibição da síntese de esteróis, o 22,26-azasterol pode ser utilizado como inibidor dessa via por inibir a atividade das Pmt (URBINA, 1997; RODRIGUES *et al.*, 2002; PALMIÉ-PEIXOTO *et al.*, 2006).

1.4.3 Via da PC sintase

Descrita em procariotos com íntima associação a eucariotos, como no caso de simbioses, essa via apresenta-se como uma alternativa à síntese de PC em bactérias como *Sinorhizobium melilloti*. Segundo Rudder e colaboradores (1997) mutantes do gênero *Rhizobium* deficientes em *N*-metiltransferase apresentaram PC em suas membranas, sugerindo uma via alternativa à de Greenberg para a síntese deste fosfolipídeo.

Em 1999, Rudder e colaboradores descreveram, em procariotos intimamente associados a eucariotos, uma via alternativa para síntese de PC. Nesta via, PC é sintetizada em apenas uma reação: a enzima fosfatidilcolina sintase (Pcs) cataliza a reação de CDP-diacilglicerídeo com colina livre, formando PC e CMP (FIGURA 6).

Neste trabalho verificamos a influência do endossimbionte na síntese de fosfolipídeos de *C. deanei* e sua possível dependência da célula hospedeira para a síntese de PC. O estudo das vias de síntese de fosfolipídeos em *C. deanei* poderá revelar novas trocas metabólicas entre a bactéria simbiótica e o protozoário hospedeiro, possibilitando maior compreensão sobre o estabelecimento da endossimbiose em tripanosomatídeos.

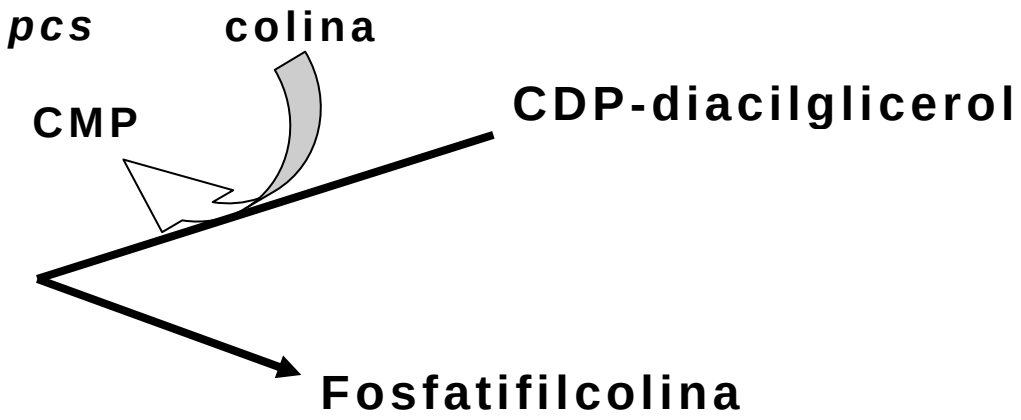


Figura 6 – Via da PC Sintase (PCS).
Via alternativa de síntese de PC descrita em algumas bactérias intimamente associadas a eucariotos, em casos de parasitismos e simbioses.

Tabela 1 – Ezimas das vias de síntese de PC (Via de Kennedy, Via de Greenberg e Via da PC Sintase).

Enzima	**Via**	**Função**	**Reagente**	**Produto**	**Tipo celular**	**Inibidores**
Colina cinase (CK)	Kennedy	Fosforilação da colina e etanolamina	Colina livre	Colina fosfato	Eucariotos	Hemicholium-3 (HC-3)
CTP:fosfocolina citidililtransferase (CT)	Kennedy	Adição de CMP à colina fosforilada (etapa limitante)	Colina fosfato + CTP	CDP-colina	Eucariotos	Lisofosfolipídeos: miltefosina (HePC); edelfosina (ET-18-OCH3)
CDP-colina:1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase (CPT)	Kennedy	Troca da CMP pelo 1,2 diacilglicerol	CDP-colina + DAG	PC	Eucariotos	Farsenol; geranilgeranol; celeritrina
Fosfatidilserina descarboxilase		Descarboxilação da fosfatidilserina	Fosfatidilserina	PE	Eucariotos	
Fosfatidil-etanolamina-*N*-metiltransferase (Pmt)	Greenberg	Metilação da PE e intermediários	PE; MMPE; DMPE	MMPE; DMPE; PC	Eucariotos, procariotos	22-26 Azasterol
PC sintase	Pcs	Síntese de PC	colina + CDP-diacilglicerol	CMP + PC	Procariotos íntimamente associados a eucariotos	

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Estudar a síntese de fosfolipídeos em *Crithidia deanei* e em seu endossimbionte isolado.

2.2 Objetivos específicos

- Comparar a síntese de fosfolipídeos nas cepas normal e curada de *C. deanei*;
- Observar por microscopia de transmissão a ultraestrutura das frações de simbionte e mitocôndria após 3 horas de isolamento;
- Avaliar a composição fosfolipídica das frações de simbionte e mitocôndria (modelo comparativo) obtidas de *C. deanei* crescida em meio contendo ^{32}Pi;
- Analisar a capacidade de síntese de fosfolipídeos em endossimbiontes e mitocôndrias isolados de *C. deanei*;
- Identificar enzimas envolvidas na síntese de PC no genoma do endossimbionte;
- Caracterizar a via de síntese de PC pelo simbionte isolado de *C. deanei*;
- Observar a diferença no consumo de O_2 entre cepas normal e curada de *C. deanei*;
- Observar o consumo de O_2 em frações de simbionte e mitocôndria de *C. deanei*, visando provar a viabilidade.

3 Material e métodos

3.1 Cultivo

As cepas normal e curada de *Crithidia deanei* foram cultivadas com inoculo de 10% de células em meio Warren (WARREN, 1960) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (Cultilab).

As células foram mantidas através de repiques semanais, onde um inóculo de 10% da cultura de células foi adicionado ao meio fresco. Em seguida, as células foram crescidas por 24 horas em estufa a 28°C. Após 24 horas, as células foram armazenadas em geladeira a 4 °C por 7 dias até o próximo repique.

3.2 Fracionamento celular

3.2.1 Obtenção das frações de endossimbionte e mitocôndria

Para isolar o endossimbionte de *Crithidia deanei* foi utilizada a técnica de fracionamento celular estabelecida por Alfieri *et al.* (1982) com algumas modificações, como descrito a seguir.

Foram crescidas entre 800 mL e 1,2 litros de células, obtendo-se a concentração de 10^7 células/mL (concentração celular em que a *Crithidia denei* atinge a fase log de crescimento), em meio Warren (WARREN, 1960) contendo 10% de soro fetal bovino. Os protozoários foram centrifugados e lavados 2 vezes em tampão fosfato de sódio (PBS), pH 7,2 e centrifugados a 4.000 *g* por 10

minutos a 4 °C em centrífuga Sorvall (RC-5B refrigerated superspeed centrifugue – Du Pont Instruments).

O sedimento obtido foi ressuspenso em 4 a 6 mL de água deionizada gelada onde é mantido em tubo de ensaio, em banho de gelo, por cerca de 35 minutos. Após esse tempo, as células foram centrifugadas a 4.000 *g* por 10 minutos a 4 °C na mesma centrífuga e ressuspensas em 10 a 13 mL de tampão tris-HCL 20 mM, pH 7,6 contendo sacarose 0,25 M. O rompimento celular foi realizado por ultra-som (Ultrasonic processor model GEX-600) em banho de gelo, onde foram aplicadas três sessões de três séries de pulsos de 15 s com amplitude de 10%. Entre cada série de pulsos, deu-se um intervalo de um minuto para promover a sedimentação das células inteiras, o que otimiza o rompimento.

Em seguida, o homogeneizado obtido do rompimento foi incubado em proveta de 50 mL em estufa a 25°C por 30 minutos em um volume final de solução de 20 mL de tampão tris-HCL 20 mM, pH 7,6 contendo sacarose 0,25 M, $CaCl_2$ 2 mM e $MgCl_2$ 10 mM e 25 µg/mL de DNAse (Sigma tipo I). Após este período, adicionou-se 10 mL de tampão tris-HCL 20 mM, pH 7,6 contendo sacarose 0,25 M e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 2 mM. O volume total de 30ml é homogeneizado e centrifugado a 5.000 *g* por 20 minutos a 4 °C em centrífuga Sorvall. O sedimento obtido foi ressuspendido em 20 mL tampão tris-HCL 20 mM, pH 7,6 contendo sacarose 0,25 M e 0,5 mg/mL de Pronase (protease tipo XIV de *Streptomyces griséus*, Sigma). Em seguida, a solução

foi centrifugada em centrífuga Sorvall por 20 minutos a 4.000 *g* 4 °C e o sedimento formado foi ressuspendido em 20 mL de tampão tris-HCL 20 mM, pH 7,6 contendo sacarose 0,25 M e EDTA 2mM.

Com o objetivo de retirar as células inteiras persistentes, o homogeneizado foi colocado sob colchão de sacarose 0,5M diluída em tampão tris-HCL 20 mM, pH 7,6 (proporção de 2,5 mL de homogeneizado para 2,5 mL de tampão contendo sacarose). Após centrifugação a 550 *g* por 10 minutos 4 °C em centrífuga refrigerada (Spin IV – Incibrás), o sedimento contendo as células inteiras foi descartado e parte do sobrenadante (a banda formada na parte superior de cada tubo) foi centrifugada a 4.000 *g* por 10 minutos 4 °C em centrífuga Sorvall. O sedimento obtido após esta centrifugação equivale à fração de simbionte, ainda impura, utilizada nos experimentos. Já o sobrenadante obtido foi centrifugado a 8.000 *g* por 10 minutos 4 °C em centrífuga Sorvall, donde obteve-se a fração de mitocôndrias.

A purificação da fração de simbionte se deu ressuspendendo o sedimento em 6 mL de tampão tris-HCL 20 mM, pH 7,6 contendo sacarose 0,25 M e aplicado em gradiente de sacarose: cada tubo contém 1 mL de uma solução 0,88 M de sacarose na fase inferior; 2 mL de solução 0,44 M de sacarose na fase inermediária; e, na fase superior, 1 mL do homogeneizado celular. Após centrifugação a 1.740 *g* por 30 minutos a 4 °C em centrífuga Beckman (L8-70M ultracentrifugue, com rotor SW 50.1), obteve-se um sedimento rico em simbiontes.

3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Com objetivo de analisar ultraestruturalmente as cepas normal e curada de *C. deanei* e as frações de simbionte e mitocôndria, bem como a integridade das frações após 3 horas de isolamento do protozoário hospedeiro, foi utilizada a microscopia eletrônica de transmissão como ferramenta de análise, seguindo protocolo de processamento de rotina.

Os protozoários e as frações de simbionte e mitocôndria foram fixados com glutaraldeído 2,5% diluído em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2. Após centrifugação e lavagem neste mesmo tampão, o material foi pós-fixado por 1 hora em solução de ferrocianeto de potássio 1,25% e tetróxido de ósmio 1% diluídos em igual proporção no tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2. Após centrifugação e lavagem no tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2, o material foi desidratado em concentrações crescentes de acetona (50%, 70%, 90% e duas vezes 100%). Em seguida o material foi infiltrado (em um frasco fechado, o material ficou mergulhado na solução especificada) por aproximadamente 12hs em resina epóxi (Epon) diluída em acetona 100% 1:1. No dia seguinte, o material foi infiltrado em resina Epon pura onde permaneceu por cerca de 6 horas e depois foi incluído em resina Epon pura em poços de placa específica para inclusão, onde ocorreu a polimerização a 60 °C em forno (Biomatic) por 48h.

Cortes ultrafinos foram obtidos após ultramicrotomia dos blocos em ultramicrótomo Reichert ultracuts (tipo 702501 –

Leica) e coletados com grade de cobre de 400 mesh. Seguiu-se para o contraste dos cortes das grades em acetato de uranila 5% e H_2O e citrato de chumbo e observação em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss 902).

3.4 Incorporação de traçadores radioativos

A incorporação foi medida seguindo o protocolo de EINICKER-LAMAS *et al*. (1999).

Estes ensaios tiveram como objetivo, fazer uma análise comparativa da incorporação de 10 µCi de ^{32}Pi entre as cepas normal e curada, bem como analisar a capacidade de síntese de fosfolipídeos pelas frações de simbionte e mitocôndria; e verificar a via de síntese de PC nos simbiontes isolados a partir da incorporação de 2,5 µCi [^{3}H]-colina pela fração em estudo.

As cepas normal e curada de *C. deanei*, bem como as frações de simbionte e mitocôndria, foram mantidas em meio Warren enriquecido com 10% de soro fetal bovino na concentração de 10^7 células/mL. Neste meio foi adicionado o traçador radioativo (^{32}Pi ou [^{3}H]-colina) e a incubação foi realizada por 1 hora e 3 horas em temperatura ambiente.

3.5 Extração de lipídeos

As cepas normal e curada de *C. deanei* e as frações de simbionte e mitocôndrias foram centrifugadas por 3 minutos a 600 *g* em centrífuga 5415 C (Eppendorf). O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 0,3 mL de H_2O ao tubo. A solução foi

homogeneizada e transferida para tubo de sedimentação, onde também adcionou-se 2 mL de solução clorofórmio:metanol:ácido clorídrico 0,6 N (200:100:0,75, v/v). À solução homogeneizada foi adicionada 0,3 mL de ácido clorídrico 0,6 N. A solução foi centrifugada a 800 *g* por 10 minutos (Excelsa Baby I 206, FANEM) para separação de fases, estando os fosfolipídeos na fase inferior. À fase inferior recolhida foram adicionados 2 mL de solução clorofórmio:metanol:H_2O (3:48:47, v/v), seguindo-se para centrifugação a 800 *g* por 10 minutos (Excelsa Baby I 206, FANEM) para nova separação de fases. A fase superior foi descartada e a fase inferior permaneceu no tubo onde os fosfolipídeos foram secos sob fluxo de N_2.

3.6 Cromatografia em camada fina

A cromatografia foi realizada segundo o protocolo utilizado por EINICKER-LAMAS *et al.* (1999), sendo todos os reagentes utilizados da marca Merck e os padrões da marca Sigma. Inicialmente, fez-se a delimitação de espaços na placa para a aplicação das amostras, guardando-se 2 cm a partir da base da placa. A placa de sílica foi colocada na estufa a 110 °C por 10 minutos para que a água adsorvida evaporasse. O conteúdo lipídico de cada amostra foi ressuspendido em 90 µL de solução clorofórmio:metanol:H_2O (7,5:2,5:0,2, v/v). Um volume total de 60 µL desta solução já homogeneizada com a amostra, foi aplicado na placa, sendo 10 µL de cada vez. Utilizaram-se como padrões: PA, CL, PE, PC e PI, que foram diluídos em clorofórmio:metanol

(2:1) para a concentração 10 mg/mL. O volume aplicado dos padrões foi de 5 µL.

O solvente utilizado para a corrida foi clorofórmio: acetona:metanol:ácido acético:H_2O (120:45:39:36:24, v/v). A corrida seguiu por aproximadamente 80 minutos dentro da capela de exaustão. Posteriormente, retirou-se a placa da cuba de corrida e o solvente foi evaporado por cerca de 12 h em capela de exaustão a temperatura ambiente. Com o intuito de visualizar os fosfolipídeos presentes na placa esta foi colocada em uma cuba contendo iodo metálico, que sublima e passa rapidamente para o estado gasoso. Os vapores de iodo se ligam nas duplas ligações de lipídios, permitindo assim a visualização dos lipídeos da amostra e dos padrões utilizados.

Assim, foi realizada cromatografia em camada fina em placa de sílica das cepas normal e curada de *C. deanei* e também das frações de simbionte e mitocôndria, como descrito previamente. Após cromatografia, em experimentos em que a [^{3}H]-colina foi utilizada como traçador radioativo, os fosfolipídeos foram identificados na placa de sílica e as bandas foram auto-radiografadas com filme de raio-X (Kodak T-Mat) ou observada usando Phophor Screen em equipamento Phosphor-Image. No caso em que o traçador utilizado foi o ^{32}Pi, os fosfolipídeos também foram identificados na cromatografia e as bandas foram auto-radiografadas com filme de raio-X (Kodak T-Mat). Neste caso, a quantificação dos fosfolipídeos (identificados na placa de sílica)

foi realizada raspando a banda correspondente a cada fosfolipídeo e determinando a radioatividade em cintilador (TRI-CARB 2100TR – Packard Bioscience), medida em cpm (cintilações por minuto).

3.7 Pesquisa genômica

Embora o genoma do simbionte ainda não esteja completamente seqüenciado, os contigs até o momento descritos foram utilizados para a busca de genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de PC, como a Pmt (via de Greenberg) e a PCS (via da PCS). Todas as buscas foram realizadas utilizando o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), com a Matriz blosum62 (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

A pesquisa genômica da enzima PCS foi iniciada criando-se um banco de dados no formato FASTA através dos comandos de busca "pcs[all fields] brucella[organism]" (enzimas com o nome PCS do gênero *Brucella*), "pcs[all fields] rhizobium" (enzimas com o nome PCS cruzando com o nome rhizobium) e "pcs[all fields]" (todas as enzimas com o nome PCS) do banco de dados PROTEIN do NCBI (2007). A primeira busca gerou 4 sequências, a segunda gerou 9 e a terceira gerou 35 sequências, respectivamente. Os gêneros *Brucella* e *Rhizobium* foram utilizados por apresentarem a atividade desta enzima (COMERCI *et al.*, 2006; DE RUDDER *et al.*, 1999). Então, todas as seqüências de cada banco de dados foram cruzadas com o banco de dados do genoma do endossimbionte (PROBST *et al.*, 2006) com o "e value" de $e10^{-5}$.

Com relação à Pmt, foram criados três bancos de dados de seqüências de proteínas no formato FASTA. Inicialmente foram realizadas as buscas "phosphatidylethanolamine methyltransferase" (todas as enzimas com o nome phosphatidylethanolamine methyltransferase) (203 seqüências) e "pmt[all fields] bordetella[organism]" (enzimas com o nome PMT do gênero *Bordetella*) (2 seqüências). Também nesse caso, todas as seqüências dos bancos de dados também foram cruzadas com o banco de dados do genoma do endossimbionte com o "e value" de $e10^{-5}$.

Paralelamente, buscando a presença de uma fosfolipase D, foi criado um banco de dados desta proteína usando o comando de busca "pld[all fields] bordetella[organism]", onde foram encontradas 39 seqüências. Todas as seqüências obtidas foram cruzadas com o banco de dados do genoma do endossimbionte com o "e value" de $e10^{-5}$.

3.8 Consumo de O_2

Para o consumo de O_2 das cepas normal e curada de *C. deanei* foi medido em oxígrafo com eletrodo Clark (Oxytherm, Hansatech Instrument) e em respirometria de alta resolução (Oroboros Oxygraph-2K, Instruments, Innsbruck), conforme especificações dos fabricantes. Foi utilizado o total de 10^7 células/ml, concentração celular em que o protozoário atinge a fase *log*, que foram acondicionadas em meio Warren suplementado

com 10% de soro fetal bovino a 28 °C. Este meio também foi utilizado para normalizar a leitura do equipamento.

O fluxo total de consumo de oxigênio em tempo real foi dado pela equação do programa DataLab:

$J_{O2} = -dC_{O2} / dt * 10^3 - (C_{O2} * b^0 + a^0)$

Onde:

J_{O2} = Fluxo de oxigênio volume específico (pmol * s^{-1} * ml^{-1});

C_{O2} = Concentração de O_2 em µM;

$J^0_{v,,O2}$ = Fluxo do consumo de oxigênio pelo sensor polarográfico ($C_{O2} * b^0 + a^0$);

b^0 = Pendente da reta;

a^0 = Fluxo de retrodifusão de O_2 do sistema a zero oxigênio dissolvido (-1,5 pmol * s^{-1} * ml^{-1}).

Os valores de a^0 e b^0 foram previamente determinados na calibração do oxigênio dissolvido no oxígrafo OROBOROS Oxygraph-2K.

O consumo de O_2 das frações de mitocôndria e simbionte de *C. deanei* foi medido apenas em oxígrafo com eletrodo Clark (oxytherm, Hansatech Instrument), conforme especificações dos fabricantes. A concentração de simbiontes e mitocôndrias foi relativa a obtida após o fracionamento, não sendo possível quantificar. As frações foram acondicionadas em meio Warren suplementado com 10% de soro fetal bovino a 28 °C.

Também neste caso, o meio foi utilizado para normalizar a leitura do equipamento.

4 Resultados

4.1 Síntese de fosfolipídeos nas cepas normal e curada de *C. deanei*

Quando adicionamos ^{32}Pi ao meio de cultura, para o crescimento das cepas normal e curada, observamos uma diferença significativa na incorporação deste traçador em fosfolipídeos (FIGURA 7A-C). A quantificação dos fosfolipídeos, observada após 5 horas de incubação na presença do traçador, mostrou que a cepa normal sintetizou cerca de 3 vezes mais PC (FIGURA 7A), cerca de 4 vezes mais PE (FIGURA 7B) e cerca de 2 vezes mais PI (FIGURA 7C) do que a cepa curada. Essa relação se manteve após 10 horas de crescimento.

Em ambas as cepas, a maior parte do ^{32}Pi foi incorporado em PC, o fosfolipídeo majoritário, seguido por PE e PI.

4.2 Ultraestrutura de *C. deanei* e das frações de simbionte e de mitocôndria

Os protozoários e as frações de simbionte e de mitocôndria utilizados neste estudo foram analisados ultraestruturalmente por microscopia eletrônica de transmissão (FIGURA 8-9). *Crithidia deanei* apresenta estruturas típicas de tripanosomatídeos, como núcleo, cinetoplasto e glicossomos. É interessante observar a proximidade do simbionte em relação ao

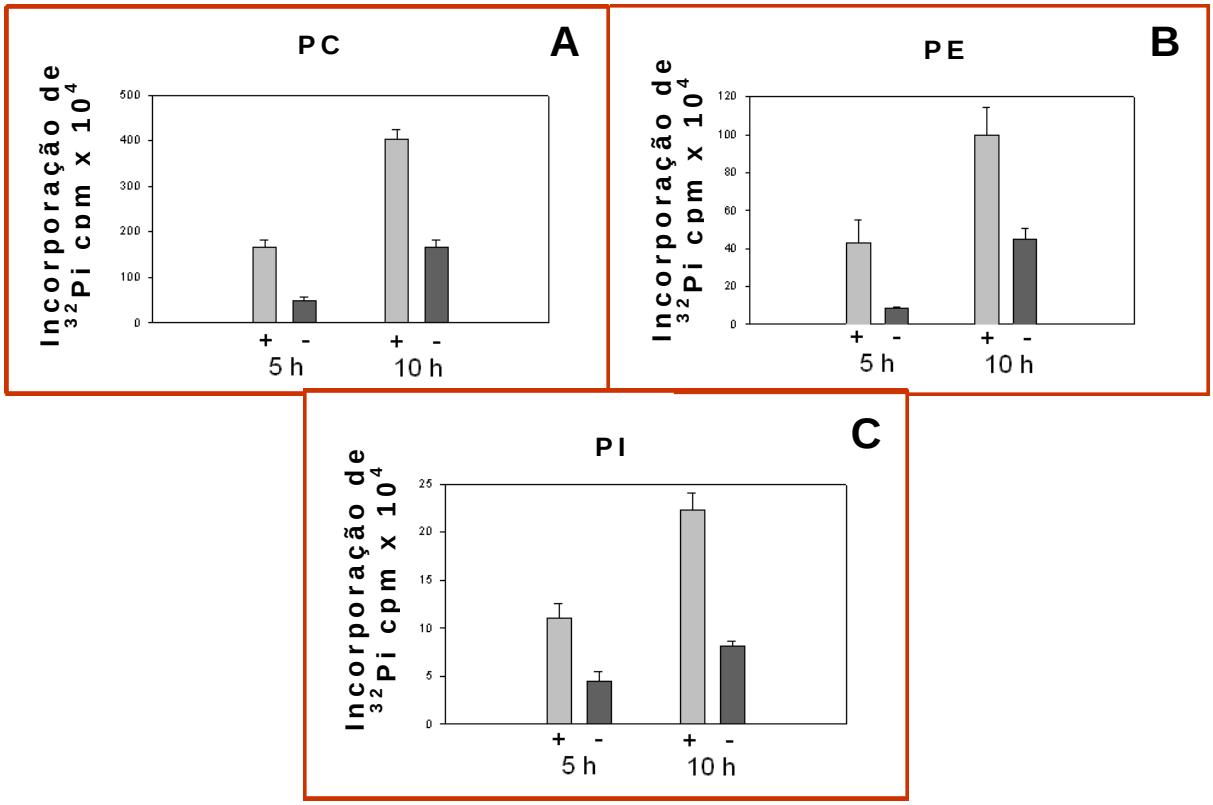


Figura 7 – Incorporação de ^{32}Pi em fosfolipídeos pelas cepas selvagem e aposimbiótica de *C. deanei*.

Os gráficos mostram os resultados de 3 experimentos independentes da incubação de 10^7 células de cada cepa (selvagem (+) e aposimbiótica (-)) por 5 e 10 horas com ^{32}Pi em meior Warren suplementado com 10% de soro fetal bovino.

Em A, incorporação de ^{32}Pi em PC.

Em B, incorporação de ^{32}Pi em PE.

Em C, incorporação de ^{32}Pi em PI.

Observar, pela escala dos gráficos, que PC é o fosfolipídeo com maior incorporação de ^{32}Pi.

As barras indicam a média da incorporação.

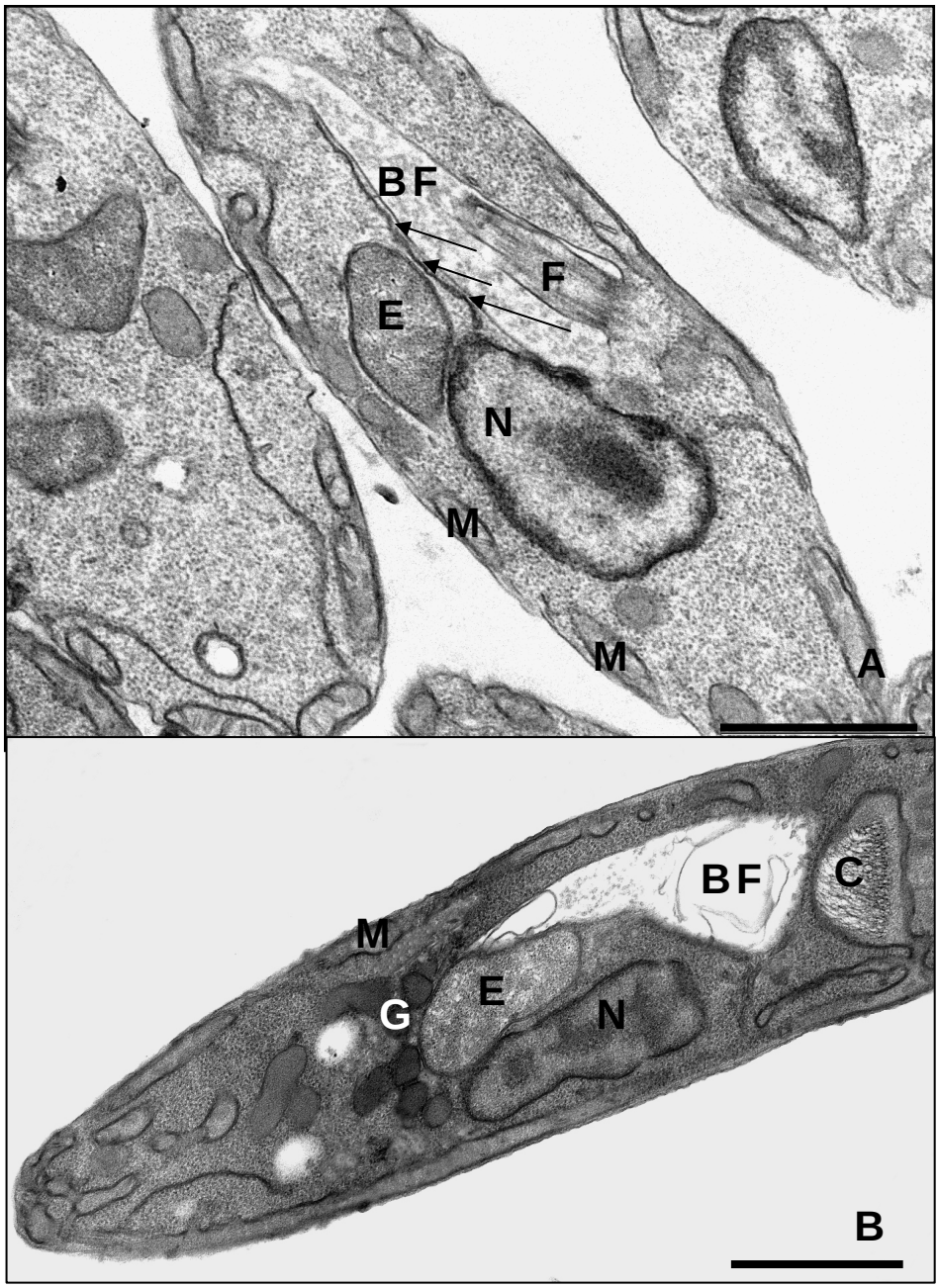


Figura 8 – Ultraestrutura de *Crithidia deanei*.
Miscroscopia eletrônica de transmissão de rotina (ver Material e Métodos) do protozoário hospedeiro.
Em A, notar a proximidade do endossimbionte (E) em relação ao núcleo (N) e ao retículo endoplasmático (setas).
Em B, notar a a proximidade do endossimbionte (E) em relação aos glicossomos (G) C = cinetoplasto; BF = bolsa flagelar; F = flagelo; M = mitocôndria.
Barras de aumento = 1 µm.

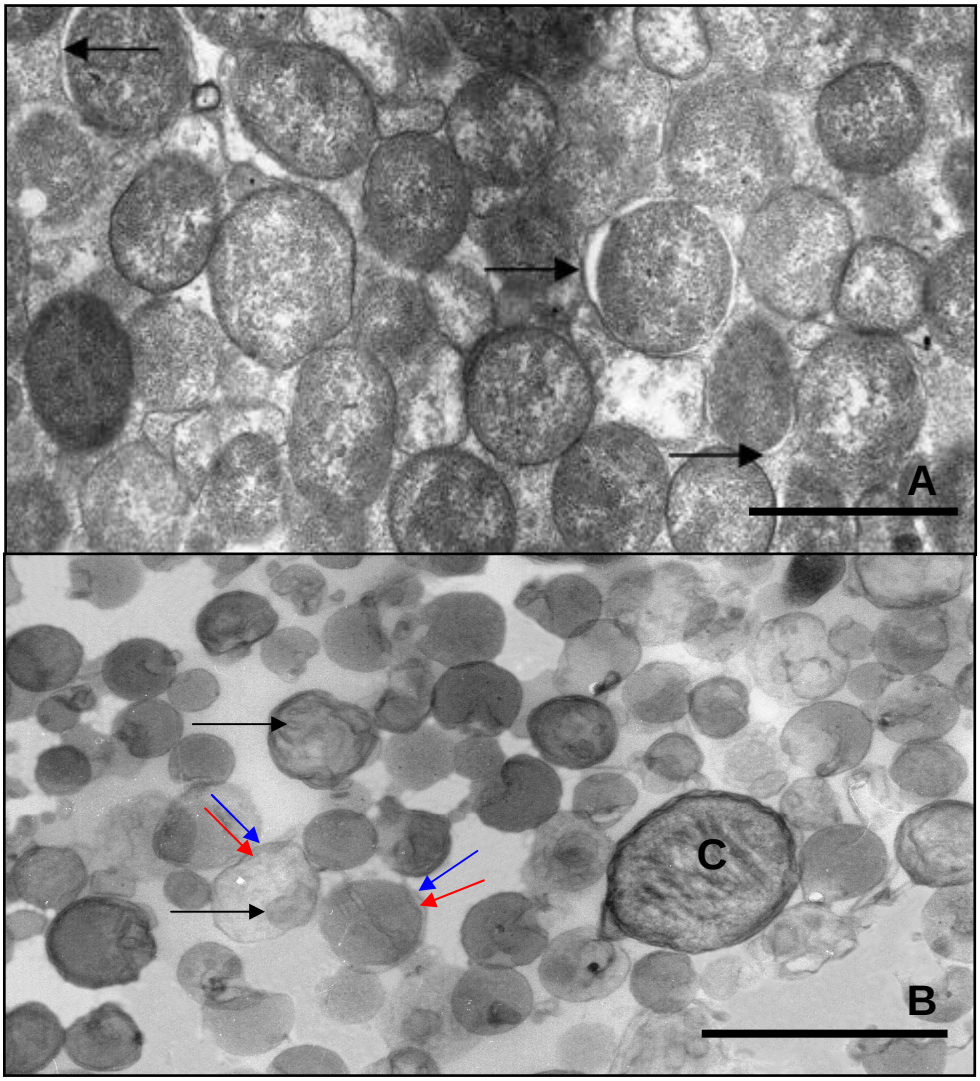


Figura 9 – Ultraestrutura das frações de simbionte e mitocôndria.
Miscroscopia eletrônica de transmissão de rotina (ver Material e Métodos) das frações de simbionte e mitocôndria após incubação de 3 horas em meio Warren suplementado com 10 % de soro fetal bovino.
Em A, as setas indicam a membrana externa do envoltório formado por duas unidades de membrana, revelando a integridade da membrana mesmo após 3 horas de fracionamento.
Em B, as setas pretas indicam as cristas mitocondriais; setas vermelhas indicam membrana interna; setas azuis indicam membrana externa. C = cinetoplasto.
Barras de aumento = 1 µm.

núcleo, ao retículo endoplasmático (FIGURA 8A) e também aos glicossomos (FIGURA 8B).

A fração da bactéria simbiótica também foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão após 3 horas de isolamento. Constatou-se a presença das duas unidades de membrana que compõem o envoltório do endossimbionte. O fato do envoltório do endossimbionte permanecer íntegro validou a realização dos estudos de identificação dos fosfolipídeos. (FIGURA 9A)

Na análise ultraestrutural da fração de mitocôndria, foi possível observar que, apesar de fragmentadas pelo fracionamento, as mitocôndrias apresentam duas unidades de membrana e as cristas mitocondriais (FIGURA 9B).

4.3 Quantificação de fosfolipídeos das frações de endossimbionte e de mitocôndria obtidas de *C. deanei* crescida em meio contendo ^{32}Pi

Nos ensaios em que os protozoários foram crescidos em meio de cultura contendo 10 µCi de ^{32}Pi e em seguida submetidos ao fracionamento celular, observamos que tanto na fração de simbionte como na de mitocôndria o traçador radioativo foi utilizado principalmente para a formação de PC (observar a escala da incorporação. Foram encontradas menores quantidades de fosfolipídeos marcados com ^{32}Pi na fração de simbionte (FIGURA 10A) em relação a fração mitocondrial (FIGURA 10B): 7 vezes mais PC, 6 vezes mais PI e 10 vezes mais PE.

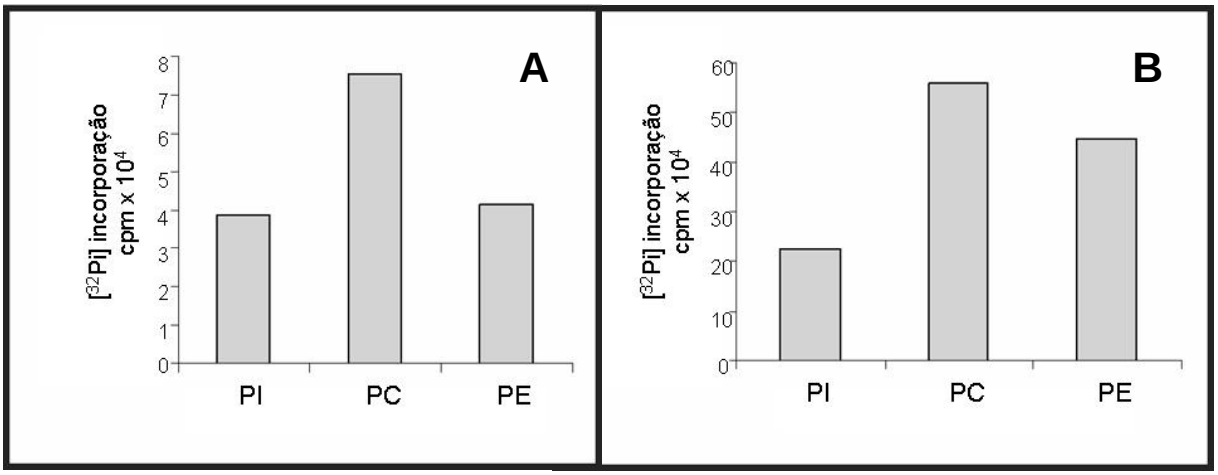


Figura 10 – Quantificação fosfolipídica de simbiontes e mitocôndrias de *C. deanei*.
Em A, quantificação fosfolipídica de simbiontes isolados obtidos de *C. deanei* crescida em meio contendo ^{32}Pi.
Em B, quantificação fosfolipídica de mitocôndrias isoladas obtidas de *C. deanei* crescida em meio contendo ^{32}Pi.
Gráficos representativos de 3 experimentos independentes.
PI = fosfatidilinositol; PC = fosfatidilcolina; PE = fosfatidiletanolamina.

4.4 Capacidade de síntese de fosfolipídeos em endossimbiontes e mitocôndrias isolados de *C. deanei* e incubados com ^{32}Pi

A síntese de fosfolipídeos por frações de simbionte e mitocôndria foi observada por até 3 horas de incubação em meio de cultura contendo ^{32}Pi. A fração de mitocôndria não mostrou a capacidade de incorporar ^{32}Pi ou sintetizar fosfolipídeos na presença do traçador radioativo, mesmo após 3 horas de incubação (FIGURA 11). Já os simbiontes isolados, foram capazes de incorporar ^{32}Pi e sintetizar fosfolipídeos (FIGURA 11), como observado após extração e separação por cromatografia em camada fina (TLC).

A comparação em função do tempo mostra uma modificação no perfil fosfolipídico do endossimbionte. Após 3 horas, a PC deixa de ser o fosfolipídeo majoritário, dando lugar à PE (FIGURA 12). Contudo, a maior taxa de incorporação do traçador destinou-se à síntese de PI: após 3 horas, observou-se incorporação 22 vezes maior quando comparado com o tempo de 1 hora. O conteúdo de PC e de PE também aumentou depois de 3 horas: cerca de 6 vezes para PC e cerca de 13 vezes para PE (FIGURA 12).

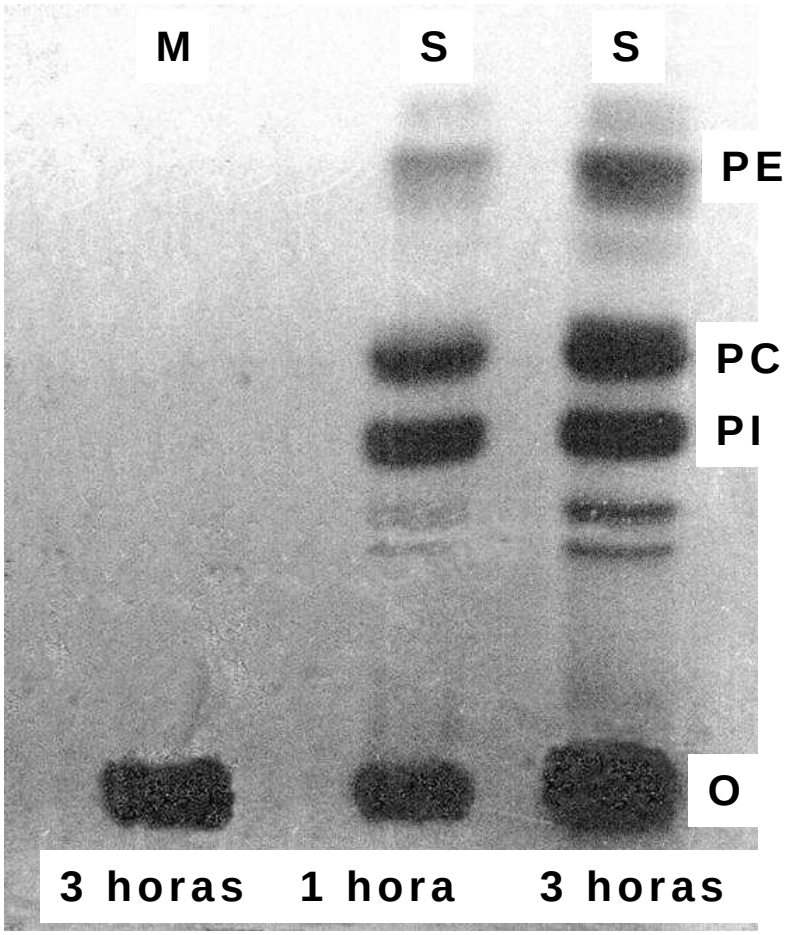


Figura 11 – Síntese de fosfolipídeos pelas frações de simbionte e mitocôndria.
Após fracionamento celular, as frações de simbionte e mitocôndria de *C. deanei* foram incubadas com ^{32}Pi em meio Warren suplementado com 10% de soro fetal bovino por 1 e 3 horas.
Os resultados mostram incorporação de ^{32}Pi em PC, PE e PI na fração de simbiontes; porém, nenhuma incorporação é observada na fração de mitocôndrias.
Filme meramente ilustrativo da incorporação de ^{32}Pi de 5 experimentos independentes.
M = fração de mitocôndrias; S = facão de simbiontes; PE = fosfatidiletanolamina; PC = fosfatidilcolina; PI = fosfatidilinositol; O = origem.

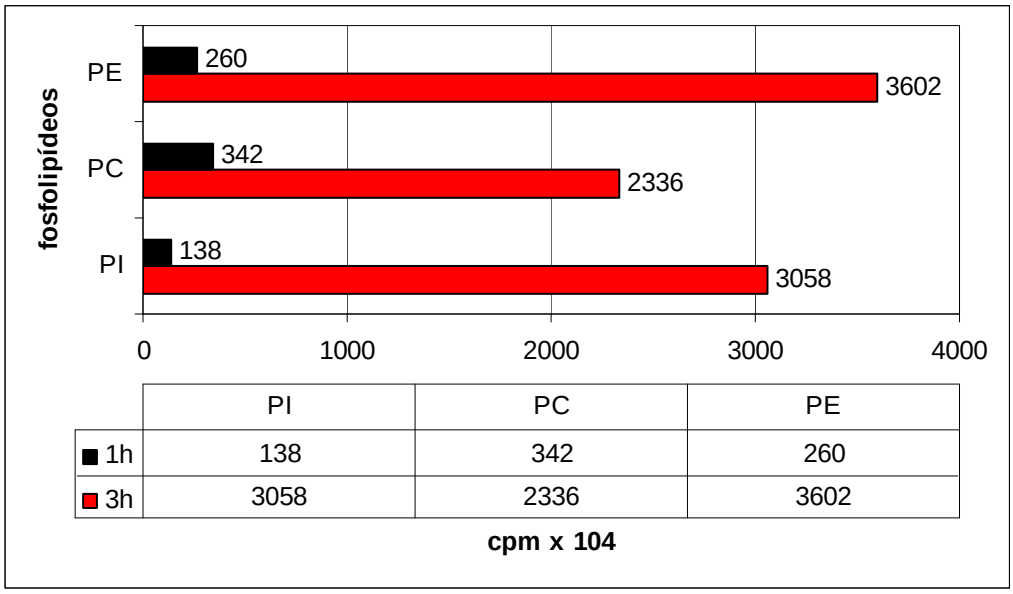


Figura 12 – Quantificação fosfolipídica da fração de simbionte isolada. Após fracionamento celular, a fração de simbionte foi incubada com ^{32}Pi em meio Warren suplementado com 10% de soro fetal bovino por 1 e 3 horas. Após extração lipídica e cromatografia em camada fina, as bandas correspondentes aos fosfolipídeos PC, PE e PI foram raspadas da placa de sílica e seguiu-se para a quantificação através da cintilação do traçador radioativo.
Observar que há incorporação do ^{32}Pi para os fosfolipídeos, sendo que a incorporação apresenta perfis diferentes entre 1 e 3 horas: PC que era o principal fosfolipídeo incorporando ^{32}Pi em 1 hora, passa a ser o de menor incorporação após 3 horas.
PE = fosfatidiletanolamina; PC = fosfatidilcolina; PI = fosfatidilinositol; 1h = 1 hora; 3h = 3 horas.

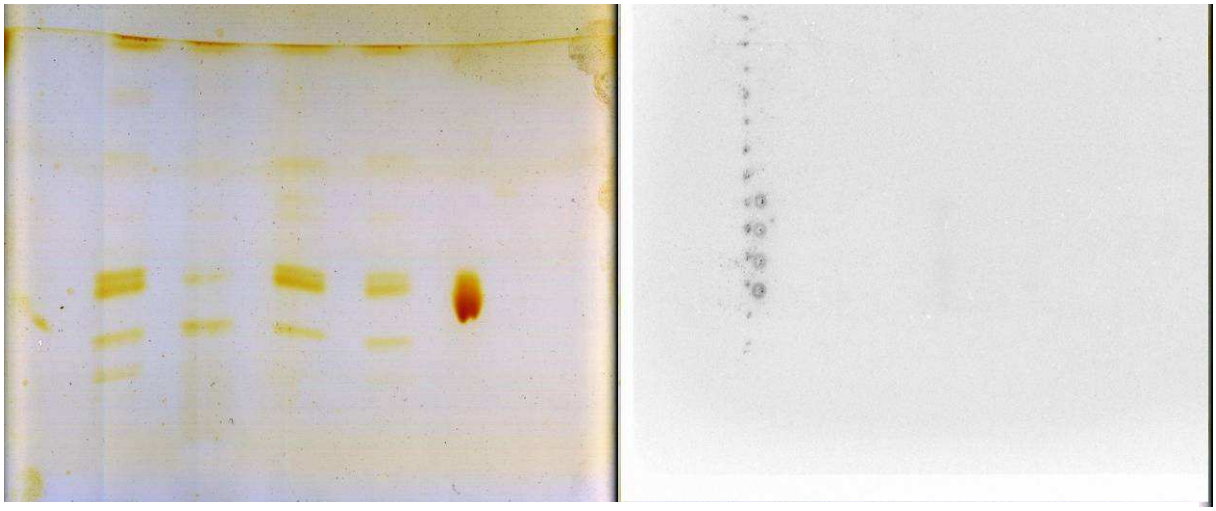
4.5 Incorporação de [^{3}H]-colina pelo endossimbionte isolado de *C. deanei*

Considerando que a via da PC sintase forma PC a partir da incorporação de colina, simbiontes isolados foram incubados com [^{3}H]-colina para checar a possibilidade de incorporação do traçador pela bactéria simbiótica. Este traçador radioativo foi adicionado à fração simbiótica concentrada em meio Warren contendo 10% de soro fetal bovino e após 1 e 3 horas as amostras foram submetidas à extração lipídica (ver Material e Métodos).

Os resultados não revelaram marcação radioativa pela ^{3}H-colina, sugerindo a não incorporação do traçador em PC (FIGURA 13).

4.6 Busca de enzimas das vias de síntese de PC no genoma do simbionte de *C. deanei*

Foram realizadas buscas no genoma do endossimbionte para os genes *pmt* (que codifica a PE metiltransferase) e *pcs* (que codifica a PC sintase), ambos envolvidos na síntese de fosfatidilcolina. Seqüências de aminoácidos destas enzimas foram obtidas no banco de dados PROTEIN do NCBI (2007). As enzimas PCS pesquisadas foram de bactérias do gênero *Bordetella*, ancestral evolutivo do endossimbionte, e do gênero *Rhizobium*. Já as enzimas PMT pesquisadas foram exclusivamente de bactérias do gênero *Bordetella*. A busca foi feita cruzando os dados do banco de dados criado com todas as seqüências de aminoácidos das enzimas encontradas no NCBI (2007). Com relação ao endossimbionte, os contigs seqüenciados até o momento não



PI S-1h S-3h S-1h S-3h PC PE PI S-1h S-3h S-1h S-3h PC PE

Figura 13 – Incorporação de [^{3}H]-colina pela fração de simbionte.
Após fracionamento celular, a fração de simbionte foi incubada com [^{3}H]-colina em meio Warren suplementado com 10% de soro fetal bovino por 1 e 3 horas. Após extração lipídica e cromatografia em camada fina, não foi observada marcação radioativa em Phosphor Screen das bandas correspondentes aos fosfolipídeos PC, PE e PI da placa de sílica.
À esquerda, extração lipídica de frações de simbiontes no período de 1 e 3 horas (duas amostras de cada tempo). À direita, tela sensível ao trítio sobreposta à placa de TLC, onde a incorporação de 3H-colina mostra-se nula.
Imagem representativo de 3 experimentos independentes.
PI = padrão de fosfatidilinositol; PE = padrão de fosfatidiletanolamina; PC = padrão de fosfatidilcolina; S-1h = fração de simbionte de 1 hora de incubação; S-3h = fração de simbionte de 3 horas de incubação.

apresentam identidade para esses genes. É possível, que genes ainda não seqüenciados, codifiquem enzimas envolvidas na síntese de PC.

Paralelamente, baseado na seqüência de aminoácidos da fosfolipase D do gênero *Bordetella*, no banco de genes do endosimbionte foi identificado um gene de uma putativa enzima bifuncional, com atividade de fosfolipase e oxidoredutase (TABELA 2). Foram identificados outros genes similares a essa fosfolipase, embora sejam de outras enzimas, como o de polifosfato quinases (troca bases nitrogenadas de fosforilados) e carboxilesterases (atua no fígado na desintoxicação de xenobióticos).

4.7 Diferenças no consumo de O_2 pelas cepas normal e curada de *C. deanei* e pelas frações de simbionte e mitocôndria

A influência da bactéria simbiótica no consumo de O_2 do hospedeiro foi verificada pela diferença do consumo de O_2 entre as cepas normal e curada de *C. deanei* (FIGURA 14A–B). A concentração de O_2 no meio de cultivo da cepa normal apresenta uma queda mais acentuada quando comparada com a queda da concentração de O_2 no meio de cultivo da cepa aposimbiótica (FIGURA 14A). Observando o fluxo de oxigênio, é observada uma estabilidade por ambas as cepas até a depleção total do oxigênio do meio (FIGURA 14B). Quantificando, a cepa normal apresentou

Tabela 2 – Genes similares à fosfolipase do gênero *Bordetella* encontrados no genoma do simbionte.

Proteína	Espécie	Score (bits)	Identidade	Identidades positivas	Gaps
Polifosfato quinase	*Bordetella petrii* DSM 12804	897 (2318)	439/684 (64%)	536/684 (78%)	2/684 (0%)
Polifosfato quinase	*Bordetella petrii*	897 (2318)	439/684 (64%)	536/684 (78%)	2/684 (0%)
Provável carboxilesterase	*Bordetella pertussis* Tohama I	160 (404)	82/217 (37%)	127/217 (58%)	1/217 (0%)
Provável carboxilesterase	*Bordetella parapertussis* 12822	161 (407)	82/217 (37%)	127/217 (58%)	1/217 (0%)
Proteína putativa bifuncional: fosfolipase e oxidoredutase	*Bordetella avium* 197N	44.3 (103)	47/192 (24%)	86/192 (44%)	8/192 (4%)

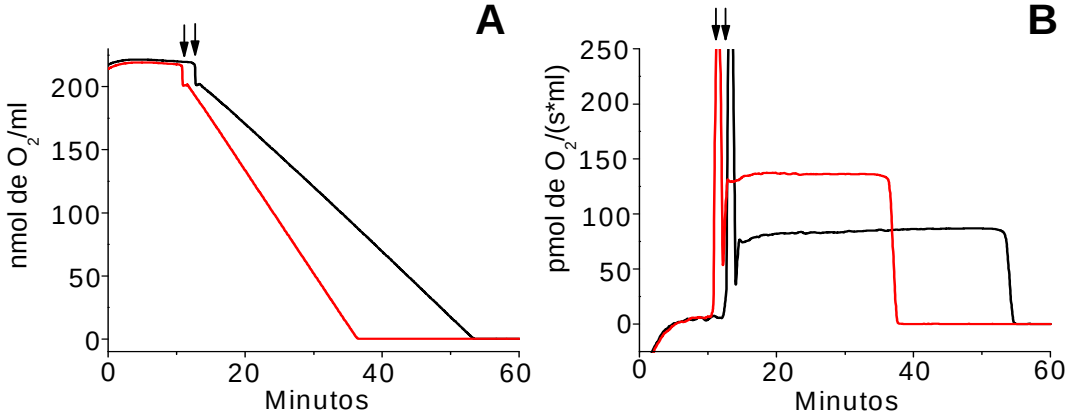


Figura 14 – Consumo de O_2 pela cepa aposimbiótica e selvagem de *Crithidia deanei*.

Os gráficos mostram o consumo de O_2 pelas cepas aposimbiótica (em preto) e selvagem (em vermelho) de *C. deanei*. As setas indicam momento em que foram adicionadas 10^7 células/mL de cada cepa ao meio Warren suplementado com 10% de soro fetal bovino que estava sendo analisado em respirometria de alta resolução.

A quantificação mostra um consumo de 100,129 pmol de O2/s/mL pela cepa selvagem e 84,9902 pmol de O2/s/mL pela cepa aposimbiótica.

Em A, concentração de O_2 no meio em nmol/mL.

Em B, fluxo do consumo de O_2 pelas frações em pmol/s/mL.

Gráfico representativo de 4 experimentos independentes.

um consumo de O_2 de 100,129 pmol de O_2/s/mL, enquando que a cepa curada consumiu cerca de 84,9902 pmol de O_2/s/mL.

O consumo de O2 pelas frações de simbionte e mitocôndria também foi medido. Embora nestes casos não tenha sido possível obter dados suficientes para realizar quantificações mais precisas, foi observado consumo de O_2 do meio por ambas as frações (FIGURA 15A e 15C). Também foi observado que a fração de mitocôndria apresenta um consumo mais acentuado de O_2 quando comparada à fração de simbionte (FIGURA 15B e D). O consumo de O_2, observado após 1 hora e 3 horas de fracionamento, demonstrou que ambas as frações apresentaram-se metabolicamente ativas para a realização dos experimentos propostos neste trabalho.

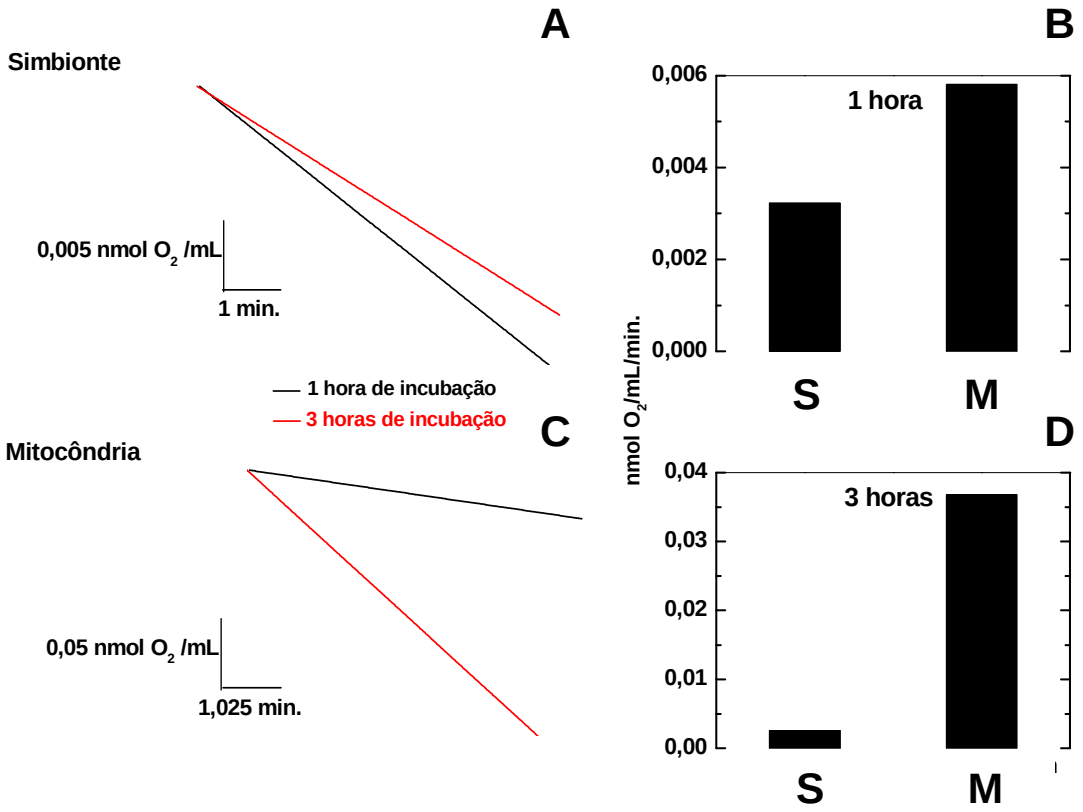


Figura 16 – Consumo de O_2 pelas frações de simbionte e mitocôndria após isolamento da *Crithidia deanei*.
Após o fracionamento celular, foi medido o consumo de O_2 pelas frações de simbionte (gráfico A) e mitocôndria (gráfico C) após 1 hora (preto) e 3 horas (vermelho) de incubação em meio Warren suplementado com soro fetal bovino.
Observar a atividade das frações consumindo O_2 do meio tanto após 1 hora (gráfico B) quanto após 3 horas (gráfico D) de isolamento do tripanosomatídeo hospedeiro.
Gráfico representativo de 2 experimentos independentes.
Fluxo de O_2 no meio em 0,05 nmol/min/mL; M = mitocôndria; S = simbionte.
S = fração de simbionte; M = fração de mitocôndria.

Discussão

Crithidia deanei é um tripanosomatídeo que mantém uma relação mutualística com uma bactéria endossimbiótica. Este tipo de relação é constatada pela influência do endossimbionte no metabolismo do protozoário hospedeiro. Estudos sobre a acentuada proliferação da cepa que contém o endossimbionte em relação a cepa aposimbiótica demonstram que a cepa selvagem é menos exigente nutricionalmente, não precisando de fontes externas de ornitina, arginina e citrulina, nem mesmo da adição de hemina ao meio de cultura (CAMARGO & FREYMÜLLER, 1977; SALZMAN *et al.*, 1985). A independência da *C. deanei* de uma fonte externa de ornitina pode ser explicada pela presença da enzima ornitina carbamoiltransferase na bactéria simbiótica (CAMARGO & FREYMÜLLER, 1977). O simbionte, por sua vez, é capaz de produzir um fator protéico que aumenta a atividade da ornitina decarboxilase (ODC), gerando poliaminas. Deste modo, a presença do simbionte promove uma acelerada proliferação celular no protozoário hospedeiro (FROSSARD *et al.*, 2006).

Quanto ao envoltório da bactéria simbiótica de tripanosomatídeos, pouco se conhece sobre a sua composição protéica. Todavia, a contagem do número de proteínas integrais das membranas do simbionte de *C. deanei*, *C. desouzai*, *C. oncopelti* e *B. culicis* mostrou-se similar ao encontrado em bactérias Gram negativas: o folheto externo da membrana externa e o folheto citoplasmático da membrana interna apresentam um

número reduzido de partículas transmembrana quando comparados com o folheto citoplasmático da membrana externa e com o folheto externo da membrana interna (MOTTA *et al.*, 1991).

Em relação à composição lipídica deste envoltório, sabemos que esta apresenta uma maior quantidade de CL (25,7%) seguida de PC (20,1%) (PALMIÉ-PEIXOTO *et al.*, 2006). A PC é encontrada como fosfolipídeo majoritário em algumas espécies de bactérias, especialmente nas que possuem uma íntima associação a eucariotos, seja por meio de simbiose ou parasitismo (LOPEZ-LARA & GEIGER, 2001). De um modo geral, fosfolipídeos são componentes de membrana essenciais na manutenção da permeabilidade celular seletiva e no posicionamento e conformação de proteínas (RAETZ & DOWHAN, 1990). Em eucariotos, a PC é o componente estrutural majoritário das membranas celulares, também desempenhando papéis importantes na sinalização celular (EXTON, 1994). Em procariotos, têm-se sugerido que a PC não apenas desempenha um importante papel como componente estrutural, mas também contribui para a proliferação celular (DE RUDDER *et al.*, 2000), para o estabelecimento de interações simbióticas (GOLDFINE, 1982; MINDER *et al.*, 2001), e para a virulência do procarioto (WILDERMAN *et al.*, 2002; COMERCI *et al.*, 2006; WESSEL *et al.*, 2006).

Neste trabalho, mostramos pela primeira vez que a cepa de *C. deanei* que contém o endossimbionte é capaz de incorporar

uma maior quantidade de ^{32}Pi presente no meio de cultura para síntese de fosfolipídeos quando comparado à cepa aposimbiótica. Este resultado coincide com o fato da cepa selvagem apresentar taxa de proliferação mais elevada quando comparada com a cepa curada (MUNDIM & ROITMAN, 1977). Recentemente, nosso grupo demonstrou que o endossimbionte de *C. deanei* produz um fator protéico que potencializa a atividade da ornitina descarboxilase (ODC). Essa enzima está envolvida na replicação do DNA e na proliferação celular e sua alta atividade em tripanosomatídeos que hospedam o endossimbionte pode explicar, em parte, a elevada taxa de proliferação celular observada nesses protozoários (FROSSARD *et al.*, 2006).

No presente estudo, endossimbiontes e mitocôndrias obtidos após o fracionamento celular de *C. deanei* crescida em meio de cultura contendo ^{32}Pi, apresentaram PC como o fosfolipídeo majoritário, seguido por PE e PI. Esses resultados estão de acordo com dados obtidos anteriormente que mostram a presença de PC no envoltório do simbionte (PALMIÉ-PEIXOTO *et al.*, 2006). O conteúdo fosfolipídico da fração mitocondrial também apresentou PC como fosfolipídeo majoritário, seguido de PE e PI, sendo que os percentuais foram mais altos do que aqueles encontrados na fração simbiótica. Este fato pode estar relacionado ao elevado volume relativo que a mitocôndria ocupa no citoplasma de *C. deanei* (MOTTA *et al.*, 1997b).

Foi interessante observar neste estudo que simbiontes isolados mostraram-se capazes de produzir fosfolipídeos independentemente da célula hospedeira. Trabalhos anteriores mostraram a autonomia da bactéria simbiótica para a síntese de proteínas, mesmo após 2 horas de isolamento (NOVAK *et al.*, 1988), embora ainda não havia sido mostrada a capacidade de síntese de fosfolipídeos. Apesar de poder sintetizar proteínas e lipídeos depois de isolado, o simbionte dos tripanosomatídeos não é capaz de permanecer íntegro por muitas horas fora da célula hospedeira. Este fato pode estar relacionado à parede celular reduzida e à baixa estabilidade osmótica desses procariotos (MOTTA *et al.*, 1997a). Além disso, dados recentes mostraram que vários genes que codificam proteínas envolvidas na divisão e na síntese da parede celular foram perdidos ao longo da evolução pelo simbionte de *C. deanei*, explicando em parte a sua incapacidade de se dividir fora do hospedeiro (YIM *et al.*, 2005; GONÇALVES, 2008).

Diferente do que foi observado com os simbiontes isolados, a fração mitocondrial não foi capaz de sintetizar fosfolipídeos independentemente da célula hospedeira. Este resultado poderia estar relacionado à perda de viabilidade da fração de mitocôndria após o processo de fracionamento. Porém, dados bioquímicos mostraram que a fração mitocondrial apresenta atividade da citocromo succinato c-redutase, indicando que esta organela mantém a cadeia respiratória ativa, mesmo depois de

isolada (MOTTA *et al.*, 1997b). Para explorar este fato, avaliamos o consumo de O_2 nas frações estudadas: no presente trabalho, observamos que a fração mitocondrial consome altas taxas de O_2, indicando a viabilidade desta organela após o fracionamento celular, ainda que incapaz de sintetizar fosfolipídeos. É preciso considerar que durante o processo evolutivo, a mitocôndria perdeu ou transferiu para o núcleo da célula hospedeira a maior parte do seu conteúdo genético (TIMMIS *et al.*, 2004). Como conseqüência, essa organela importa a maioria de suas proteínas e lipídeos, o que explica sua incapacidade de síntese de fosfolipídeos uma vez isolada do tripanosomatídeo.

Ainda em relação ao consumo de O_2, resultados obtidos com o oxígrafo sugerem que o metabolismo energético varia entre as cepas normal e curada de *C. deanei*. O maior consumo de O_2 pela cepa selvagem em relação a cepa aposimbiótica pode estar relacionada a presença do endossimbionte. Resultados anteriores indicam que parte do ATP usado pelo simbionte é obtido a partir dos glicossomos da célula hospedeira (MOTTA *et al.*, 1997a). Associando este dado com o fato do crescimento da cepa normal ser maior que o da cepa curada, podemos sugerir que o protozoário tem um metabolismo energético acelerado pela presença do endossimbionte, consumindo maiores quantidades de O_2 para manter sua homeostasia. Observamos que o simbionte também consome O_2 quando isolado do seu hospedeiro e este fato pode estar relacionado à produção de ATP necessária para a síntese

protéica e lipídica. Entretanto, não é possível comparar o consumo de O_2 pelo simbionte isolado com o consumo do simbionte quando dentro de seu hospedeiro, visto não ser possível criar as mesmas condições que o protozoário propicia ao endossimbionte em um modelo *in vitro*.

Considerando o conteúdo fosfolipídico no envoltório do simbionte e sua relação mutualística com o tripanosomatídeo hospedeiro, algumas questões importantes ainda precisam ser respondidas:

- Como o simbionte obtém a PC que integra as suas membranas?
- Quais são as vias de síntese que são utilizadas para a produção de fosfatidilcolina em tripanosomatídeos que hospedam simbiontes?

Segundo Palmié-Peixoto e colaboradores (2006), a atividade da via de Greenberg em *C. deanei* foi evidenciada após o tratamento do protozoário com azasterol. Em tripanosomatídeos, a utilização do 22,26-azasterol inibe a síntese de esteróis e altera a síntese de fosfolipídeos ao inibir a enzima fosfatidiletanolamina metiltransferase (PMT) (URBINA, 1997; RODRIGUES *et al.*, 2002). O tratamento de *C. deanei* com esta droga, mostrou a inibição da produção de PC e o aumento do conteúdo de PE tanto na célula hospedeira como na fração de simbionte (PALMIÉ-PEIXOTO *et al.*, 2006).

No presente trabalho, observamos que simbiontes foram capazes de sintetizar fosfolipídeos independentemente do protozoário mesmo após 3 horas de fracionamento. Todavia, PE apresenta-se como fosfolipídeo majoritário, enquanto que a PC foi encontrada em menor quantidade. Deste modo, os resultados obtidos sugerem que a bactéria simbiótica pode obter parte de seu conteúdo de PC, ou mesmo os precursores de PC a partir do tripanosomatídeo hospedeiro. Procariotos que contém PC usualmente possuem tanto a via da metilação (Greenberg) quanto a via da PC sintase para a produção de PC. Contudo, vias envolvidas na síntese de PC em procariotos são mais complexas do que o esperado: embora a principal via de síntese de PC em procariotos seja a via de Greenberg, bactérias patogênicas, como *Pseudomonas aeruginosa* (WILDERMAN *et al.*, 2002) e *Brucella abortus* (COMERCI *et al.*, 2006), realizam a síntese de PC exclusivamente pela via da PC sintase. Nestes casos, a síntese de PC depende de colina provida pelo hospedeiro. De modo similar, um mutante de *Sinorhizobium meliloti* deficiente em enzimas da via de metilação de Greenberg, requer suprimento de colina da célula hospedeira para formar PC pela via da PC sintase (DE RUDDER *et al.*, 1999). A estratégia utilizada para a síntese de PC usando precursores originários da célula hospedeira foi mantida no curso da evolução. Protozoários parasitas de mamíferos como *Leishmania major* (ZUFFEREY & MAMOUN, 2002), *Plasmodium falciparum* (SIMÕES *et al.*, 1991; PESSI *et al.*, 2004), e *Babesia bovis*

(FLORIN-CHRISTENSEN *et al.*, 2000), também utilizam o transporte de colina a partir do hospedeiro para sintetizar a PC.

No entanto, resultados obtidos neste trabalho sugerem ausência da via da PC sintase no endossimbionte de *C. deanei*, já que não houve formação de PC marcada com o traçador [^{3}H]-colina, o substrato da enzima PC sintase. Além disso, esta enzima não foi identificada no genoma da bactéria simbiótica, o mesmo ocorrendo com todas as outras enzimas das principais vias de síntese de PC. Porém, uma enzima putativa bifuncional com atividade de oxidoredutase e fosfolipase foi encontrada no genoma do endossimbionte. A atividade de fosfolipase desta enzima pode ser responsável por alterações na composição fosfolipídica da bactéria simbiótica, devido a sua atividade em hidrolisar fosfolipídeos formando PA e liberando o radical do fosfolipídeo.

Precisamos ainda considerar a possibilidade de o simbionte obter grande parte da PC presente no seu envoltório, a partir da célula hospedeira. Neste sentido, é importante destacar a proximidade entre o endossimbionte e o retículo endoplasmático, freqüentemente observada através de análises ultraestruturais por microscopia eletrônica. Este aspecto reforça o caráter mutualístico de uma relação simbiótica de intensas trocas metabólicas.

Estudos em procariotos mostraram que no início da divisão celular ocorrem mudanças na composição fosfolipídica de bactérias Gram negativas, que resultam no acúmulo de PE nos septos (MATSUMOTO *et al.*, 2006). A presença de domínios de

membrana em procariotos também pode estar relacionada à sinalização celular. Neste sentido, torna-se importante estudar futuramente o papel do fosfatidilinositol presente no envoltório do endossimbionte, visto que uma das atividades da fosfolipase C em eucariotos consiste em hidrolisar o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (fosfatidilinositol fosforilado) em diacilglicerol e inositol 1,4,5-trifosfato que são segundos mensageiros de vias de sinalização celular (SASAKI *et al.*, 2007). Esta é mais uma possibilidade a ser investigada de como o simbionte pode modular o metabolismo do tripanosomatídeo hospedeiro.

O uso de inibidores das vias de Kennedy e de Greenberg em culturas de *C. deanei* pode esclarecer a importância de cada uma destas vias para a síntese de PC pelo protozoário. Uma vez inibidas, estas vias podem pomover mudanças na composição fosfolipídica do endossimbionte, indicando sua dependência (ou não) em obter PC a partir do tripanosomatídeo hospedeiro.

5 Conclusões

- A maior incorporação de ^{32}Pi pela cepa selvagem de *Crithidia deanei*, quando comparada à cepa aposimbiótica, sugere a influência do endossimbionte no metabolismo do protozoário hospedeiro pois resulta em uma maior incorporação do traçador radioativo para a síntese de fosfolipídeos.
- Simbiontes e mitocôndrias isolados a partir de protozoários crescidos em meio contendo ^{32}Pi apresentam uma composição majoritária de PC.
- O simbionte isolado de *C. deanei* é capaz de produzir fosfolipídeos como PE, PC e PI. Todavia, uma maior quantidade de PE é observada após o período de 3 horas de fracionamento, enquanto a concentração de PC diminui. Estes dados indicam que o endossimbionte depende, ao menos em parte, da produção de PC realizada pelo tripanosomatídeo hospedeiro.
- Após 3 horas de fracionamento, o fosfolipídeo formado em maior quantidade no endossimbionte é PI.
- A incubação de simbiontes isolados em meio de cultura contendo [^{3}H]-colina não resultou na formação de PC.
- Pesquisas no genoma do endossimbionte de *C. deanei* não revelaram quaisquer seqüências específicas que correspondessem às enzimas envolvidas na síntese de PC (vias de Kennedy, Greenberg e PC sintase). Contudo, foram encontradas seqüências de polifosfato quinases, caboxilesterases e uma

putativa enzima bifuncional (fosfolipase e oxidoredutase) quando se buscou a seqüência de fosfolipase D.

- Os resultados obtidos com o oxígrafo mostram o maior consumo de O_2 pela cepa selvagem de *Crithidia deanei* quando comparada com a cepa aposimbiótica. Este resultado sugere que a presença da bactéria simbiótica promove um maior consumo de O_2 e acelera o metabolismo energético do protozoário hospedeiro.

- O consumo de O_2 e a ultraestrutura de simbiontes e mitocôndrias isolados indicam que estas frações estão metabolicamente ativas.

6 Referências Bibliográficas

ALFIERI, S.C., CAMARGO, E.P. Trypanosomatidae: isoleucine requirement and threonine deaminase in species with and without endosymbionts. Exp. Parasitol. **53**: 371-380, 1982.

ANDRADE, I.S., PROBST, C.M., KRIEGER, M.A., DE SOUZA, W., MOHANA-BORGES, R., MOTTA, M.C.M. The presence of a porin-like protein reveals the origin of the endosymbiont envelope in *Crithidia deanei*. Annals of the XXXVII Annual Meeting of SBBq. **F-9**, 2008

ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. **215**: 403-10.

BARON, S., PEAKE, R.C., JAMES, D.A., SUSMAN, M., KENNEDY, C.A., SINGLETON, M.J.D., SCHUENKE, S. Hemoflagellates. In: Medical Microbiol. 4th ed. – sec. 4, 1996.

CABEEN, M.T., JACOBS-WAGNER, C., Bacterial cell shape. Nat. Rev. Microbiol. **3**: 601-10, 2005.

CAMARGO, E.P., FREYMÜLLER, E. Endosymbiont as supplier of otnithine carbamoyltranferase in a trypanosomatid. Nature. **270**: 52-3, 1977.

CAVALCANTI, D.P., THIRY, M, DE SOUZA, W., MOTTA, M.C.M. The kinetoplast ultrastructural organization of endosymbiont-bearing trypanosomatids as revealed by deep-etching,

cytochemical and immunocytochemical analysis. Histochem. Cell Biol. **(no prelo)**, 2008.

CHANG, K.P. Ultrastructure of symbiotic bacteria in normal and antibiotic-treated *Blastocrithidia culicis* and *Crithidia oncopelti*. J. Protozool. **21**: 699-07, 1974.

COMERCI, D.J., ALTABE, S., DE MENDOZA, D., UGALDE, R.A. *Brucella abortus* synthesizes phosphatidylcholine from choline provided by the host. J. Bacteriol. **188**: 1929-34, 2006.

CRONAN, J.E. Bacterial membrane lipids: Where do we stand? Annu. Rev. Microbiol. **57**: 203-24, 2003.

CUI, Z., HOUWELING, M. Phosphatidylcholine and cell death. Biochim. Biophys. Acta. **1585**: 87-96, 2002.

DE RUDDER, K.E., SOHLENKAMP, C., GEIGER, O. Plant-exuded choline is used for rhizobial membrane lipids biosynthesis by phosphatidylcholine synthase. J. Biol. Chem. **274**: 20011-6, 1999.

DE RUDDER, K.E., LÓPEZ-LARA, I.M., GEIGER, O. Inactivation of the gene for phospholipid N-methyltransferase in *Sinorhizobium meliloti*: phosphatidylcholine is required for normal growth. Mol. Microbiol. **37**: 763-72, 2000.

DE SOUZA, W., MOTTA, M.C.M. Endosymbiosis in protozoa of the Trypanosomatidae family. FEMS Microbiol. Letters **173**: 1-8, 1999.

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

DOWHAN, W. Molecular basis for membrane phospholipids diversity: Why are there so many lipids? Annu. Rev. Biochem. **66**: 199-232, 1997.

DU, Y., MASLOV, D.A., CHANG, K.P. Monophyletic origin of *β*-division proteobacterial endosymbionts and their coevolution with insect trypanosomatid protozoa *Blastocrithidia culicis* and *Crithidia* spp. Proc. Natl. Acad. Sci. **91**: 8437-41, 1994a.

DU, Y., MCLAUGHLIN, G., CHANG, K.P. 16S Ribosomal DNA Sequence identities of *β*-proteobacterial endosymbionts in three *Crithidia* species. J. Bacteriol, **176**: 3081-4, 1994b.

EINICKER-LAMAS, M., MALAQUIAS, A.T., CASTRO, S.L., SMITH, G.A., OLIVEIRA, M.M. Effects of fluorinated inositols on the phosphoinositide metabolism and the proliferation of *Trypanosoma cruzi*. Parasitol. Res. **85**: 232-8, 1999.

EXTON, J.H. Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. Biochim. Biophys Acta. **1212**: 26-42, 1994.

FAMPA, P., CORRÊA-DA-SILVA, M.S., LIMA, D.C., OLIVEIRA, S.M.P., MOTTA, M.C.M, SARAIVA, E.M.B. Interaction of insect trypanosomatids with mosquitoes, sand fly and the respective insect cell lines. Int. J. Parasitology. **33**: 1019-26, 2003.

FLORIN-CHRISTENSEN, J., SUAREZ, C.E., FLORIN-CHRISTENSEN, M., HINES, S.A., MCELWAIN, T.F., PALMER, G.H. Phosphatidylcholine formation is the predominant lipid biosynthetic event in the hemoparasite *Babesia bovis*. Mol. Biochem. Parasitol. **106**: 147-56, 2000.

FREYMÜLLER, E., CAMARGO, E.P. Ultrastructural differences between species of trypanosomatids with and without endosymbionts. J. Protozool. **28**: 175-82, 1981.

FROSSARD, M., SEABRA, S.H., DaMATTA, R.A., DE SOUZA, W., DE MELLO, F.G., MOTTA, M.C.M. An endosymbiont positively modulates ornithine decarboxylase in host trypanosomatids. Biochem. Biophys. Res. Commun. **343**: 443-9, 2006.

GADELHA, C., WICKSTEAD, B., DE SOUZA, W., GULL, K., CUNHA-E-SILVA, N. Cryptic paraflagellar rod in endosymbiont-containing kinetoplastid protozoa. Eukariot. Cell. **4**: 516-25, 2005.

GOLDFINE, H., JOHNSTON, N.C., BISHOP, D.G. Ether phospholipid asymmetry in *Clostridium butyricum*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **108**: 1502-7, 1982.

GONÇALVES, G.R., **Caracterização de proteínas da maquinaria de divisão do endossimbionte do protozoário tripanosomatídeo *Crithidia deanei***. Orientador: Stenio Perdigão Fragoso. Curitiba, 2008. 110 f. Dissertação.

(Mestrado em Biologia Celular e Molecular)-Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2008.

HERBY, O., PERSSON, L. Molecular genetics of polyamine synthesis in eukaryotic cells. Trends Biochem. Sci. **15**: 153-8, 1990.

KENT, C. Eukariotic phospholipids biosynthesis. Annu. Rev. Biochem. **64**: 315-43, 1995.

LÓPEZ-LARA, I.M., GEIGER, O. Novel pathway for phosphatidylcholine biosynthesis in bacteria associated with eukaryotes. J. Biotechnol. **91**: 211-21, 2001.

LUX, H., HEISE, N., KLENNER, T., HART, D., OPPERDOES, F.R. Ether—lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether—lipid analogs in *Leishmania*. Mol. Biochem. Parasitol. **111**: 1-14, 2000.

MATSUMOTO, K., KUSADA, J., NISHIBORI, A., HARA, H. Lipid domains in bacterial membranes. Mol. Microbiol. **61**: 1110-7, 2006.

McGHEE, R.B., COSGROVE, W.B. Biology and Physiology of the Lower Trypanosomatidae. Microbiological Reviews **44**: 140-73, 1980.

MINDER, A.C., DE RUDDER, K.E., NARBERHAUS, F., FISCHER, H.M., HENNECKE, H., GEIGER, O. Phosphatidylcholine levels in *Bradyrhizobium japonicum* membranes are critical for an efficient symbiosis with the soybean host plant. Mol. Microbiol. **39**: 1186-98, 2001.

MOTTA, M.C.M., SOARES, M.J., DE SOUZA, W. Freeze-fracture study of endosymbiont-bearing trypanosomatids of the *Crithidia* genus. Micr. Electr. Biol. Cel. **15**: 131-44, 1991.

MOTTA, M.C.M., SOARES, M.J., ATTIAS, M., MORGADO, J., LEMOS, A.P., SAAD-NEHME, J., MEYER-FERNANDES, J.R., DE SOUZA, W. Ultraestructural and biochemical analysis of the relationship of *Crithidia deanei* with its endosimbiont. Euro. J. Cell. Biol. **72**: 370-7, 1997a.

MOTTA, M.C.M., MONTEIRO-LEAL, L.H., DE SOUZA, W., ALMEIDA, D.F. AND FERREIRA, L.C.S. Detection of penicillin-binding proteins in endosymbionts of the trypanosomatid *Crithidia deanei*. J. Euk. Microbiol. **44**: 492-6, 1997b.

MOTTA, M.C.M., DE SOUZA, W., THIRY, M. Immunocytochemical detection of DNA and RNA in endosymbiont-bearing trypanosomatids. FEMS Microbiol. Lett, **221**: 17-23, 2003.

MOTTA, M.C.M., PICCHI, G.F., PALMIÉ-PEIXOTO, I.V., ROCHA, M.R., DE CARVALHO, T.M., MORGADO-DIAZ, J., DE SOUZA, W., GOLDENBERG, S., FRAGOSO, S.P. The microtubule analog protein, FtsZ, in the endosymbiont of trypanosomatid protozoa. J. Eukaryot. Microbiol. **51**: 394-401, 2004.

MUNDIM, M.H., ROITMAN, I., HERMANS, M.A., KITAJIMA, E.W. Simple nutrition of *Crithidia deanei*, a reduviid

trypanosomatid with an endosymbiont. J. Protozool. **21**: 518-21, 1974.

MUNDIM, M.H., ROITMAN, I. Extra nutritional requirements of artificially aposymbiotic *Crithidia deanei*. J. Protozool. **24**: 329-31, 1977.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. www.ncbi.nlm.nih.org/sites/entrez, 2007.

NOVAK, E., HAAPALAINEN, E.F., SILVA, S., SILVEIRA, J.F. Protein synthesis in isolated symbionts from the flagellate protozoan *Crithidia deanei*. J. Protozool, **35**: 375-8, 1988.

PALMIÉ-PEIXOTO, I., ROCHA, M., URBINA, J., DE SOUZA, W., EINICKER-LAMAS, M. AND MOTTA, M.C.M. Effects of sterol biosynthesis inhibitors on endosymbiont-bearing trypanosomatids. FEMS Microbiol Lett. **255**: 33-42, 2006.

PEGG, A.E., SHANTZ, L.M., COLEMAN, C.S. Ornithine decarboxylase: structure, function and translational regulation. Biochem. Soc. Trans. **22**: 846-52, 1995.

PESSI, G., KOCIUBINSKI, G., MAMOUN, C.B. A pathway phosphatidylcholine biosynthesis in *Plasmodium falciparum* involving phosphoethanolamine methylation. Proc. Natl. Acad Sci. U. S. A. **101**: 6206-11, 2004.

PROBST, C.M., LEONE, L.N.Y., FOTI, L., UMAKI, A.C.S., GONÇALVES, R.E., SATAKE, T.S., MOTTA, M.C.M, FRAGOSO, S.P., GOLDENBERG, S., KRIEGER, M.A. Structural and functional genomics of endosymbiotic process:

Crithidia deanei as a model. Annals of the XXII Meeting of the SBPZ and XXXII Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease. **BM163**, 2006.

RAETZ, C.R., DOWHAN, W. Biosynthesis and function of phospholipids in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **165**: 1235-8, 1990.

RODRIGUES, J.C., ATTIAS, M., RODRIGUEZ, C., URBINA, J.A., DE SOUZA, W. Ultrastructural and biochemical alterations induced by 22,26-azasterol, a beta (24(25))-sterol methyltransferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms *Leishmania amazonensis*. Antimicrob. Agents. Chemother. **46**: 487-99, 2002.

RUDDER, K.E.E., THOMAS-OATES, J.E., GEIGER, O. *Rhizobium meliloti* mutants deficient in phospholipids *n*-methyltransferase still contain phosphatidylcholine. J. Bacteriol. **179**: 6921-8, 1997.

RUDDER, K.E.E., SOHLENKAMP, C., GEIGER, O. Plant-exuded choline is used for Rhizobial membrane lipid biosynthesis by phosphatidylcholine synthase. J. Biol. Chem. **274**: 20011-6, 1999.

RUIZ, N., KAHNE, D., SILHAVY, T.J. Advances in understanding bacterial outer-membrane biogenesis. Nat. Rev. Microbiol. **4**: 57-66, 2006.

SALZMAN, T.A, BATLLE, A.M., ANGLUSTER, J., DE SOUZA, W. Heme synthesis in *Crithidia deanie*: influence of the endosymbiote. Int. J. Biochem. **17**: 1343-7, 1985.

SASAKI, T., SASAKI, J., SAKAI, T., TAKASUGA, S., SUZUKI, A. The physiology of phosphoinositides. Biol. Pharm. Bull. **30**: 1599-604, 2007.

SIMÕES, A.P., MOLL, G.N., SLOTBOOM, A.J., ROELOFSEN, B., OP DEN KAMP, J.A. Selective internalization of choline-phospholipids in *Plasmodium falciparum* parasitizes human erythrocytes. Biochim. Biophys. Acta. **1063**: 45-50, 1991.

SOARES, M.J., DE SOUZA, W. Fine structures of *Blastocrithidia culicis* as seen in the sections and freeze-fracture replicas. Biol. Cell. **61**: 101-8, 1987.

SOARES, M.J., MOTTA, M.C.M, DE SOUZA, W., Bacterium-like endosymbiont and vírus-like particles in the trypanosomatid *Crithidia desouzai*. Microbios Lett **41**: 137-144, 1989.

TIMMIS, J.N., AYLIFFE, M.A., HUANG, C.Y., MARTIN, W. Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. Nat. Rev. Genet. **5**: 123-35, 2004.

URBINA, J.A. Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic target in kinetoplastid parasites. Parasitol. **114** Suppl:S91-9, 1997.

WARREN, L.G. Metabolism of *Schizotrypanum cruzi* Chagas. I. effect of culture age and substrate concetration on respiratory rate. J. Protozool. **5**: 529-39, 1960.

WESSEL, M., KLÜSENER, S., GÖDEKE, J., FRITZ, C., HACKER, S., NARBERHAUS, F. Virulence of *Agrobacterium tumefaciens* requires phosphatidylcholine in the bacterial membrane. Mol. Microbiol. **62**: 906-15, 2006.

WIEDER, T., REUTTER, W., ORFANOS, C.E., GEILEN, C.C. Mechanism of action of phospholipid analogs as anticancer compounds. Prog. Lipid. Res. **38**: 249-59, 1999.

WILDERMAN, P.J., VASIL, A.I., MARTIN, W.E., MURPHY, R.C., VASIL, M.L., *Pseudomonas aeruginosa* synthesizes phosphatidylcholine by use of the phosphatidylcholine synthase pathway. J. Bacteriol. **148**: 4792-9, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. www.who.int, 1998.

YIM, L., GONÇALVES, R., MOTTA, M.C.M., FOTI, L., ARAÚJO, P., PROBST, C.M., SUNAGA, D., GOLDENBERG, S., KRIEGER, M.A., FRAGOSO, S.P. Cell division in the endosymbiotic bacterium of the trypanosomatid *Crithidia deanei*. Annals of XXI Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology and XXXII Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease. **1, 50**, 2005.

ZUFFEREY, R., MAMOUN, C.B. Choline transport in *Leishmania major* promastigotes and its inhibition by phosphocholine analogs. Mol. Biochem. Parasitol. **125**: 127-34, 2002.

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