

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES
DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM CEPAS
DE *Entamoeba histolytica* APÓS ATIVAÇÃO DA
VIRULÊNCIA**

Helen Cristine Fernandes

Belo Horizonte
2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Helen Cristine Fernandes

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES
DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM CEPAS
DE *Entamoeba histolytica* APÓS ATIVAÇÃO DA
VIRULÊNCIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Parasitologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida Gomes

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Élica Mara Leite Rabelo

Belo Horizonte
2009

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do ICB/UFMG pela oportunidade.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me sustentado durante toda essa jornada, cuidando de mim até nos mais pequeninos detalhes, por ser minha força e meu lugar seguro. Obrigada Senhor pela mão estendida a meu favor, por ouvir minhas orações e por todas as bênçãos a mim concedidas.

A minha família pelo amor incondicional: minha mãe por não medir esforços para me ajudar a realizar meus sonhos e pela paciência... Obrigada Isaque, meu sobrinho querido, por ser minha fonte inesgotável de inspiração. E obrigada Roberta, minha irmã, por estar sempre ao meu lado.

À Prof.^a Maria Aparecida Gomes, minha orientadora, cujo exemplo, ensinamentos e dedicação, desde a graduação, me incentivaram a ser uma parasitologista. Obrigada pela oportunidade, atenção, carinho, conversas e todos os bons momentos.

À Prof.^a Elida Mara Leite Rabelo, pela receptividade, pelos ensinamentos, pelos grupos de discussão, por ter me ajudado sempre que precisei e por ter confiado a mim um projeto para que eu pudesse participar do Arthromint.

A minha amiga Ana Flávia, pela prontidão e disponibilidade, por ter me ajudado em todos os experimentos e na redação da dissertação. Obrigada também pelo incentivo e torcida a meu favor em todas as fases do concurso da polícia civil. Ao ser designada para me auxiliar no mestrado, você não podia imaginar o trabalho que eu te daria... Além de professora, você foi motorista, conselheira, psicóloga, secretária, *personal trainer*, amiga e irmã, eu sou grata por tudo isso. Você foi essencial para a realização deste trabalho e muito importante nas minhas conquistas no último ano.

Às minhas amigas de infância Flávia e Bruna e as suas famílias, com as quais pude contar em todos os momentos, por me receberem tão bem e por torcerem por mim.

Ao prof.^o e amigo Pesquero, por ser tão especial na minha vida, por acreditar em mim, por toda a consideração, pelo carinho, pelos conselhos, por me ouvir e pelos ensinamentos.

À Mércia, pela amizade, por se preocupar comigo e por ter me ensinado a trabalhar com proteínas.

Aos amigos do Laboratório de Parasitologia Molecular Ariadna, Carina, Silvia, Camila, Julia, Erlisson, Denilson e Fábio Júnior, pelas reuniões, pelas festas, pela amizade.

Aos meus amigos: Sydnei, por me lembrar sempre da teoria da colisão efetiva; Ceres, Vânia, Kelly e Lara pelo carinho.

Aos amigos do Laboratório de Amebíase: Michelle, Haendel, Juliana, Filipe, Fred e Rodrigo pela agradável convivência.

Ao Joãozinho e à Edna, por terem me auxiliado em tudo que precisei, principalmente no sacrifício dos hamsters.

Aos amigos do Mestrado Diana, Luciana, Ariadna, Denilson, Diogo, Jailza, Paula, Rizia, Eduardo e Carlos, pela convivência e amizade, durante esses dois anos.

Aos meus amigos farmacêuticos Tobias, Francisco, Simone, Lídia, Ana Maria e especialmente ao Gleydson por estarem sempre presentes.

A todos os professores do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG, pelos ensinamentos fundamentais para a minha formação, e em especial à prof.^a Daniella, por ter me ajudado a analisar as proteínas hipotéticas, e ao prof.^o Antônio César, pelo carinho, conselhos e prosas.

A todos os funcionários do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG, em especial à Sumara por estar sempre disposta a nos ajudar e ao senhor Neri, pelo cafezinho e pelo maravilhoso bolo de limão.

Ao Ricardo Araújo pela colaboração nas análises da PCR semiquantitativa e PCR em tempo real.

Ao Ricardo Fujiwara, por ter cedido, gentilmente, seu laboratório no René para a montagem da placa de PCR em tempo real.

À Isabela, responsável pelo aparelho de *real time* no René, por ser tão prestativa e atenciosa.

Ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro.

A todos que, de alguma forma, contribuíram na elaboração e execução dessa Dissertação.

RESUMO

Entamoeba histolytica é um protozoário parasito que representa risco para a saúde de milhões de indivíduos. Em virtude da existência de diversas formas clínicas da doença e de cepas com virulências distintas, é de se esperar que ocorram variações no perfil de transcritos gênicos entre cepas atenuadas e virulentas. Neste trabalho, a técnica de apresentação diferencial de RNAs (DDRT-PCR) foi utilizada com o intuito de identificar genes diferencialmente expressos entre cepas atenuadas, HM1 e CSP e reisoladas (virulenta), HM1R e CSPR de *E. histolytica*. Para alcançar esse objetivo, RNAs das cepas atenuadas e reisoladas foram extraídos, o cDNA foi preparado e submetido a reações de PCR utilizando iniciadores aleatórios em condições de baixa estringência. Inicialmente, 29 fragmentos foram identificados como específicos das cepas reisoladas, sendo que 14 foram clonados e seqüenciados. Estas seqüências foram submetidas à pesquisa de homologia em bancos de dados, totalizando 12 genes a serem testados. O caráter de expressão diferencial foi avaliado pelas técnicas de RT-PCR semiquantitativa e por PCR em tempo real para 11 dos genes encontrados. Houve a confirmação da expressão diferencial de todos, sendo 10 mais expressos pelas cepas reisoladas e um pelas cepas atenuadas. Os genes confirmados, por RT-PCR em tempo real e RT-PCR semiquantitativa, como mais expressos nas cepas reisoladas de *E. histolytica* foram os que codificam proteínas hipotéticas, fosfatase ácida, fator de troca de nucleotídeo Ras guanina, enzima envolvida no transporte de cálcio e proteína similar à cdc48. Além disso, também foi avaliada, entre as cepas atenuadas e reisoladas a expressão dos genes da acetiltransferase, triptofanil tRNA sintetase, proteína

diaphaunos e cisteil proteinase 1, considerados mais expressos em trofozoítos provenientes de lesão em fígado de hamster quando comparados aos de cultura. Destes, os três primeiros foram mais expressos nas cepas reisoladas, demonstrando que o perfil de transcrição, ao menos para alguns genes, nas cepas reisoladas reflete ao encontrado nos trofozoítos presentes em abscesso hepático em modelo experimental.

ABSTRACT

Entamoeba histolytica is a protozoan parasite that represents a health risk to millions of individuals around the world. Infected people can present diverse forms of clinical disease. It has already been demonstrated, that this fact correlates to differences in the virulence of different strains. Therefore, it is expected that the genetic expression profile, should be, at least in part, specific to attenuated and virulent strains. In this work, the technique of differential display of RNAs (DDRT-PCR) was used to identify differentially expressed genes between attenuated strains HM1 and CSP, and between virulent strains, HM1R and CSPR of *E. histolytica*. Therefore, RNAs of the attenuated and virulent strains were extracted, the cDNA was prepared and submitted to PCR reactions using arbitrary primers. Initially, 29 fragments were identified as virulent strains specific, 14 were cloned and sequenced. These sequences were submitted to homology search in gene databases, and 12 presenting homology either to hypothetical or known genes, were selected to be tested. The character of differential expression was evaluated by the techniques of semiquantitative RT-PCR and real-time PCR for 11 of the identified genes. There was the confirmation of differential expression to all genes analyzed, 10 more expressed by virulent strains and one more expressed by an attenuated strain. From the confirmed differentially expressed genes, five coded to hypothetical *E. histolytica* proteins. Other ESTS confirmed as more expressed to virulent strains, presented homology to *E. histolytic* genes: acid phosphatase,; factor of Ras guanine nucleotide exchange; enzyme involved in the transport of calcium; and a protein similar to cdc48. Moreover, the expression of genes identified in a previous work as

been more expressed in trophozoites originated from hamster injured liver when compared to trophozoites from culture, was also analyzed in virulent versus attenuated strains. The genes evaluated, were, acetyltransferase, triptofanil tRNA synthetase, protein diaphaunos and cisteil proteinase 1. It was shown that the first three genes were more expressed in virulent strains, demonstrating that the transcription profile, at least for some genes, in virulent strains reflects the same results found to trophozoites from liver abscess, in an experimental model.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** Confirmação da virulência das cepas reisoladas de *E. histolytica* em hamster.....51
- FIGURA 2:** Perfis eletroforéticos da apresentação diferencial de RNA entre cepas atenuadas e reisoladas de *E. histolytica*, em gel de poliacrilamida 6%.....53
- FIGURA 3:** Reamplificação de bandas obtidas por apresentação diferencial de RNA de cepas reisoladas de *E. histolytica* utilizando-se uma PCR convencional, apresentado em gel de poliacrilamida 6%.....56
- FIGURA 4:** Resultado da PCR de colônias provenientes de transformações com plasmídeos recombinantes contendo ESTs identificadas como específicas das cepas reisoladas de *E. histolytica*, apresentado em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata.....57
- FIGURA 5:** Análise dos iniciadores sintetizados utilizando como molde DNA da cepa HM1 atenuada e cDNA da cepa HM1 reisolada de *E. histolytica*, apresentado em gel de poliacrilamida 6%.....62
- FIGURA 6:** RT-PCR com iniciadores do gene constitutivo – gene da proteína actina – das cepas de *E. histolytica*, apresentado em gel de poliacrilamida 6%.....62

FIGURA 7: RT-PCR com iniciadores sintetizados para os genes referentes às ESTs selecionadas como específicas das cepas reisoladas de *E. histolytica* que foram seqüenciadas, apresentado em gel de poliacrilamida 6%.....64

FIGURA 8: Curvas de amplificação da PCR em tempo real realizada para confirmar a expressão diferencial dos genes referentes às ESTs selecionadas como específicas das cepas reisoladas de *E. histolytica*.....65

FIGURA 9: Amplificação os genes referentes às ESTs selecionadas como específicas das cepas reisoladas de *E. histolytica* pela PCR em tempo real, apresentado em gel de poliacrilamida 6%.....66

FIGURA 10: Gráfico gerado a partir dos resultados obtidos na PCR em tempo real apresentando a diferença de expressão entre as cepas reisoladas e atenuadas de *E. histolytica*.....67

FIGURA 11: Reação duplex de RT-PCR semiquantitativa para confirmação da expressão diferencial dos genes referentes às ESTs tidas como específicas das cepas reisoladas de *E. histolytica* apresentado em gel de poliacrilamida 6%.....70

FIGURA 12: RT-PCR semiquantitativa para confirmação da expressão diferencial dos genes referentes às ESTs tidas como específicas das cepas reisoladas de *E. histolytica* apresentado em gel de poliacrilamida 6%.....71

FIGURA 13: RT-PCR semiquantitativa para confirmação da expressão diferencial dos genes referentes às ESTs tidas como específicas das cepas reisoladas de *E. histolytica* apresentado em gel de poliacrilamida 6%.....72

FIGURA 14: RT-PCR com iniciadores sintetizados para avaliar a expressão dos genes tidos como mais expressos em trofozoítos provenientes de lesão hepática de hamster para a cepa CSP atenuada e reisolada de *E. histolytica* apresentada em gel de poliacrilamida 6%.....76

FIGURA 15: Gráfico gerado a partir dos resultados obtidos na PCR em tempo real apresentando a diferença de expressão dos genes, selecionados em trofozoítos retirados de lesão em fígado de hamster, entre as cepas reisoladas e atenuadas de *E. histolytica*.....78

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1: Iniciadores utilizados nas reações de apresentação diferencial de RNA...40

QUADRO 2: Genes tidos como mais expressos em trofozoítos de *E. histolytica* retirados de lesão em fígado de hamster50

QUADRO 3: Homologias das ESTs específicas de uma das cepas reisoladas de *E. histolytica*, obtidas por apresentação diferencial de RNA, com seqüências catalogadas em bancos de dados.....59

QUADRO 4: Diferença de expressão entre cepas atenuadas e reisoladas de *E. histolytica* para os genes que apresentaram amplificação na PCR em tempo real.....68

QUADRO 5: Diferença de expressão das ESTs entre as cepas atenuadas e reisoladas de *E. histolytica* por RT-PCR semiquantitativa.....73

QUADRO 6: Comparação dos resultados obtidos por RT-PCR semiquantitativa e RT-PCR em tempo real.....75

QUADRO 7: Diferença de expressão entre a cepa CSP atenuada e reisolada de *E. histolytica* para os genes tidos como mais expressos em trofozoítos retirados de lesão

em fígado de hamster, que apresentaram amplificação específica na PCR em tempo real.....77

TABELA 1: Bandas selecionadas como específicas das cepas reisoladas de *E. histolytica* após a realização da apresentação diferencial de RNA.....54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

cDNA – DNA complementar

C_t – *threshold cycle*

DEPC – dietil pirocarbonato

DNA – ácido desoxirribonucléico

DNase - desoxirribonuclease

dNTP – Desoxirribonucleotídeo 5' fosfato

DTT – Ditioneitol

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

EST – *Expressed Sequence Tags*

GET – solução de glicose, EDTA e Tris

GPI – glicosilfosfatidilinositol

IPTG – isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

kV – kilovolt

μ g – micrograma

μ l – microlitro

ml – mililitro

μ m – micrômetros

μ M – micromolar

mm – milímetros

mM – milimolar

mRNA – RNA mensageiro

NCBI – *National Center for Biotechnology*

ng – nanograma

ORF – *Open Reading Frame*

p/v – peso por volume

pb – pares de base

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

pH – potencial hidrogeniônico

PM – padrão de peso molecular

RNA – ácido ribonucléico

rpm – rotações por minuto

RT-PCR – *Reverse Transcriptase PCR*

SDS – duodecil sulfato de sódio

Taq – *Thermophilus aquaticus*

TAE – tampão tris-acetato-EDTA

T_m – *melting temperature*

UV – luz ultra violeta

v/v – volume por volume

xg – vezes gravidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Importância médica	20
1.2 Classificação taxonômica e histórico.....	<u>21</u>
1.3 Morfologia e biologia	<u>23</u>
1.4 Epidemiologia.....	<u>25</u>
1.5 Patogenia	27
1.6 Estudos moleculares relacionados à virulência da <i>E. histolytica</i>	29
1.7 Apresentação diferencial de RNA.....	31
2 JUSTIFICATIVA.....	33
3 OBJETIVOS.....	34
3.1 Gerais	34
3.2 Específicos	34
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 Cepas de <i>E. histolytica</i>	35
4.2 Ativação da virulência.....	36
4.3 Confirmação da virulência.....	37
4.4 Extração do RNA total.....	38
4.5 Síntese de cDNA.....	38
4.6 Reação de apresentação diferencial e análise em gel de poliacrilamida	39
4.7 Obtenção dos fragmentos de interesse e reamplificação	42
4.8 Clonagem e transformação	43
4.9 Mini preparação de plasmídeos (Mini-prep).....	44

4.10 Seqüenciamento.....	46
4.11 Análise das seqüências em bancos de dados.....	47
4.12 RT-PCR quantitativa em tempo real.....	47
4.13 RT-PCR semiquantitativa.....	49
4.14 Avaliação do perfil de transcrição de genes potencialmente relacionados à virulência	50
5 RESULTADOS.....	51
5.1 Ativação e confirmação da virulência das cepas de <i>E. histolytica</i> e extração do RNA	51
5.2 Apresentação diferencial de RNA: Perfis eletroforéticos obtidos e bandas selecionadas.....	52
5.3 Recuperação de bandas do gel de poliacrilamida e reamplificação dos fragmentos selecionados como específicos para uma das cepas reisoladas de <i>E. histolytica</i>	55
5.4 Clonagem e PCR das colônias contendo produtos recombinantes.....	56
5.5 Seqüenciamento das ESTs consideradas específicas das cepas reisoladas de <i>E. histolytica</i> obtidas pela apresentação diferencial de RNA e busca de homologias em bancos de dados	57
5.6 Confirmação da diferença na expressão dos genes, referentes às ESTs seqüenciadas, entre as cepas atenuadas e reisoladas de <i>E. histolytica</i>	61
5.6.1 Construção dos iniciadores e avaliação da amplificação dos genes seqüenciados por RT-PCR	61
5.6.2 PCR em tempo real.....	64
5.6.3 RT-PCR semiquantitativa.....	68
5.6.4 Concordância dos resultados obtidos na PCR em tempo real e RT-PCR semiquantitativa	73
5.7 Avaliação da expressão de genes potencialmente relacionados à virulência de <i>E. histolytica</i>	76

6 DISCUSSÃO	79
7 CONCLUSÃO	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
APÊNDICES	101

1 INTRODUÇÃO

1.1 Importância médica

Entamoeba histolytica é um protozoário parasito responsável pela amebíase, uma doença de distribuição mundial. Este parasito infecta 500 milhões de pessoas por ano, destes, 50 milhões apresentam a doença na forma invasiva (amebíase hepática ou colite amebiana) resultando em cerca 100.000 mortes anuais (WHO, 1997).

Nas infecções por *E. histolytica*, o parasito pode viver na luz intestinal de seu hospedeiro, sem causar manifestações clínicas, nestas, o indivíduo infectado é considerado portador assintomático, ou manifestar-se de forma agressiva, a partir da invasão do epitélio intestinal (ACKERS & MIRELMAN, 2006), nos casos sintomáticos. O resultado da infecção depende de um balanço entre fatores de virulência do parasito e a resposta imune do hospedeiro (HUSTON, 2004).

As manifestações clínicas da amebíase invasiva podem ser intestinais ou extra intestinais. As intestinais são quatro, geralmente agudas, disenteria ou diarréia sanguinolenta, colite fulminante, apendicite amebiana e ameboma de cólon (ESPINOSA-CANTELLANO & MARTINEZ-PALOMO, 2000). A forma fulminante de colite disentérica é uma complicação grave com mortalidade maior que 75%, mesmo com cuidados paliativos e procedimento cirúrgico (ZLOBL, 2001). A disenteria é caracterizada por cólicas intestinais e diarréia muco-sanguinolenta (ESPINOSA-CANTELLANO & MARTINEZ-PALOMO, 2000).

A forma extra intestinal mais comum da amebíase ocorre no fígado, onde a *E. histolytica* provoca necrose coliquativa com infiltrado inflamatório escasso (SALLES et

al., 2003). Os sintomas dessa forma clínica são febre, dores brandas na base do pulmão e no fígado, tosse e dores abdominais (PETRI et al., 2002; STANLEY, 2003). Os indivíduos infectados podem apresentar a doença hepática meses ou anos após a infecção, sendo que geralmente não apresentam cistos nas fezes e nem infecção intestinal (STANLEY, 2003).

Uma questão intrigante na infecção por *E. histolytica* é o fato de que somente 10% dos indivíduos infectados apresentam a doença sintomática enquanto 90% são assintomáticos (BAXT & SINGH, 2008). Esta discrepância tem sido investigada por diversos pesquisadores, mas até o momento não se tem uma justificativa.

1.2 Classificação taxonômica e histórico

A *Entamoeba histolytica* (Shaudinn, 1903), está incluída no Filo Sarcomastigophora, Subfilo Sarcodina, Superclasse Rhizopoda, Classe Loboza, Ordem Aemoebida, Família Entamoebidae (SILVA & GOMES, 2005)

O primeiro a identificar a ameba foi Fedor Lösch, em 1875, quando ele observou a presença de trofozoítos nas fezes de um paciente com disenteria, denominando-os *Amoeba coli*, porém não atribuiu a esses a causa da disenteria (LÖSCH, 1875). A descrição patológica da invasão do intestino e do fígado pelas amebas foi realizada por Councilman e Lafleur, em 1891, que denominaram o parasito de *Amoeba dysenteriae* (COUNCILMAN & LAFLEUR, 1891). Os cistos do parasito foram descritos por Quincke e Ross, em 1893 (QUINCKE & ROSS, 1893).

Em 1903, Schaudinn demonstrou a existência de dois tipos de ameba infectando o homem, uma patogênica e outra não. A forma não patogênica foi denominada

Entamoeba coli e a patogênica de *Entamoeba histolytica*, devido a sua extraordinária habilidade de destruir tecidos (SCHAUDINN, 1903). No entanto, esta habilidade não se estende a todas as cepas do parasito. Ao contrário, na maioria das infecções o parasito se comporta como não invasivo (PINILLA, 2008).

Durante muitos anos ficou bem estabelecido que o número de indivíduos infectados por *E. histolytica* era bem maior que o número de indivíduos que desenvolviam a doença clínica, entretanto o motivo dessa diferença era desconhecido. Para explicar esse comportamento do parasito surgiram algumas hipóteses:

1. Teoria unicista (DOBELL, 1919) - Postula que toda *E. histolytica* seria invasiva. Entretanto, amebas pouco invasivas causariam sintomas de baixa intensidade que não seriam percebidos pelo indivíduo infectado.
2. Teoria dualista (BRUMPT, 1925) - Postula a existência de duas espécies morfologicamente semelhantes, a *E. dysenteriae*, patogênica, responsável pela forma sintomática da doença e a *E. dispar*, comensal, responsável pelos casos assintomáticos.
3. Teoria neodualista ou pluralista (HOARE, 1961) - Postula que a *E. histolytica* possui uma variabilidade no seu potencial patogênico e que existem cepas com diferentes graus de virulência, causando desde infecções assintomáticas até formas graves da doença.

A teoria dualista se firmou quando Sargeant observou diferenças no perfil enzimático de isolados patogênicos e não patogênicos de *E. histolytica* (SARGEANT, 1982). Essas observações foram confirmadas por outros pesquisadores que encontraram diferenças genéticas e antigênicas entre isolados patogênicos e não patogênicos (DIAMOND & CLARCK, 1993). Considerando estes resultados a

Organização Mundial de Saúde (WHO, *World Health Organization*) em 1997, apoiou a teoria dualista. A *E. histolytica* foi caracterizada como espécie patogênica e a *E. dispar*, não patogênica.

A *E. histolytica* e a *E. dispar* são morfologicamente idênticas, filogeneticamente relacionadas e apresentam hospedeiros e estágios de desenvolvimento semelhantes. Entretanto, estas espécies são extremamente diferentes quando se considera a patogenicidade *in vivo*. Somente a *E. histolytica* é capaz de causar sintomas clínicos (MACFARLANE et al., 2005). Assim, a maioria dos casos assintomáticos de infecção por amebas tetranucleadas, que antes eram atribuídos à *E. histolytica*, agora acredita-se ser infecção por *E. dispar*.

1.3 Morfologia e biologia

A *E. histolytica* apresenta um ciclo biológico simples e tem como hospedeiro natural o homem (STANLEY, 2003). Apresenta dois estágios, cisto e trofozoíto. Os cistos são esféricos e medem de 10 a 16 μm de diâmetro, apresentam em seu envoltório uma parede refratária, formada por quitina. Os núcleos variam em número de um a quatro, apresentam vacúolo de glicogênio, corpos cromatóides e bastonetes. O núcleo é vesicular e esférico, sendo regularmente revestido com grânulos de cromatina, apresenta um cariossoma pequeno que se localiza no centro do núcleo (LOHIA, 2003).

Os trofozoítos da *E. histolytica*, são móveis, unicelulares e o tamanho varia entre 10 a 50 μm . Apresentam núcleo único, que mede de 4 a 7 μm , com cariossoma central, membrana nuclear delgada e cromatina uniforme sob a forma de finos grânulos na

periferia da carioteca. Os trofozoítos se alimentam de bactérias e partículas e quando isolado de infecções invasivas seu citoplasma pode se apresentar repleto de eritrócitos (LOHIA, 2003). A *E. histolytica* não apresenta retículo endoplasmático, complexo de golgi e mitocôndria clássica, sendo a energia derivada de processo fermentativo (STANLEY, 2005).

A infecção é promovida pela ingestão de água e alimentos contaminados por cistos, que passam intactos pelo suco gástrico do estômago e chegam ao intestino delgado, onde os trofozoítos serão liberados, estes migram para o intestino grosso, onde se multiplicam (HAQUE et al. 2003; FREDERICK & PETRI, 2005). A *E. histolytica* pode permanecer por meses ou anos no intestino como comensal, ou ocasionalmente o parasito penetra na mucosa intestinal, induzindo a colite ou se disseminando para outros órgãos como fígado, pulmões e cérebro.

A invasão de tecidos por *E. histolytica* parece não fazer parte do seu ciclo de vida, pois nos tecidos, o trofozoíto não se diferencia em cisto, portanto não é transmitido a outros hospedeiros (LOHIA, 2003).

Em um ciclo normal, por estímulos desconhecidos o trofozoíto toma a forma de cisto e é eliminado juntamente com as fezes para o meio ambiente (ACKERS & MIRELMAN, 2006).

Os cistos, dependendo das condições ambientais, permanecem infectantes de semanas a meses (ZLOBL, 2001). Os trofozoítos não têm importância na transmissão da amebíase, pois são destruídos quando expostos às enzimas e ao ácido clorídrico do trato gastrointestinal. Os trofozoítos se multiplicam por reprodução assexuada e foram, por um longo tempo, classificados como amitóticos. No entanto, com o projeto genoma da *E. histolytica* descobriu-se que existe uma seqüência gênica homóloga aos genes

requeridos na mitose de organismos eucariotos, surgindo assim, mais uma questão a ser elucidada na amebíase (LOHIA, 2003; STANLEY, 2005).

1.4 Epidemiologia

A amebíase apresenta distribuição cosmopolita, com maior prevalência nas regiões tropicais e subtropicais, devido às precárias condições de higiene e educação sanitária (ZLOBL, 2001). De acordo com estimativas da WHO (1997), a amebíase ocupa o 2º lugar dentre as causas de morte por protozoários e o 14º dentre as doenças mais importantes do mundo.

Estima-se que aproximadamente 10% da população mundial esteja infectada com *E. dispar* ou *E. histolytica* (STAUFFER & RAVDIN, 2003). Entretanto, a maioria dos indivíduos infectados com *E. histolytica* permanecem assintomáticos. Apenas 10% dos indivíduos infectados apresentam colites amebianas e 1% desenvolvem o abscesso amebiano no fígado (ZLOBL, 2001; BAXT & SINGH, 2008).

A colite amebiana tem sido igualmente reportada em crianças e adultos de ambos os sexos, enquanto o abscesso hepático amebiano é mais prevalente em indivíduos adultos do sexo masculino (ESPINOSA-CANTELLANO & MARTINEZ-PALOMO, 2000). A razão para essas diferenças na taxa de infecção da amebíase hepática é desconhecida, mas especula-se que efeitos hormonais e álcool sejam possíveis fatores (STANLEY, 2003). A prevalência de *E. histoytica* na população de homens homossexuais é alta, variando de 20 a 30% (ZLOBL, 2001).

A amebíase é altamente endêmica no México, Índia, Vietnã, Leste e Sul da África e América do Sul (ZLOBL, 2001). As manifestações clínicas da doença parecem seguir

uma distribuição geográfica. No Egito, por exemplo, a forma invasiva predominante é a colite amebiana, já em Hue, Vietnam, e sul da África o abscesso hepático é a manifestação predominante (STAUFFER & RAVDIN, 2003; STAUFFER et al., 2006). No Brasil predomina a amebíase assintomática (GOMES et al., 1999). As razões desse fato ainda são desconhecidas, mas podem estar relacionadas à fatores genéticos e comportamentais dos hospedeiros, além de fatores ambientais e variações genéticas do parasito (STAUFFER et al., 2006).

Na Austrália a doença é endêmica acometendo predominantemente pessoas aborígenas no norte, e em Sidney, homossexuais do sexo masculino (VAN HAL et al., 2007). Nos EUA, muitos casos de amebíase, ocorrem em imigrantes de áreas endêmicas. Em 1993, 2970 casos de amebíase foram relatados nos EUA, destes 33% foram em imigrantes vindos do México e de outros países da América Central e América do Sul e 17% vindos da Ásia e Ilhas do Pacífico (STANLEY, 2003). Barwick e colaboradores (2002) relataram um surto epidêmico ocorrido na República da Geórgia, através de contaminação fecal na rede pública de abastecimento de água (BARWICK et al., 2002).

No México, um em cada cinco pacientes infectado pela *E. histolytica* desenvolve amebíase invasiva. Um inquérito sorológico na população mexicana demonstrou que 8,4% dos mexicanos já foram expostos à amebíase invasiva (CABALERO et al., 1998).

No Brasil a prevalência da amebíase é bastante variável de 5,6% a 40,0% nas diferentes regiões do país, assim como sua patogenicidade e virulência (OLIVEIRA-COSTA et al., 2007; MORAES SILVA et al., 2005). As formas de colite disentérica são pouco freqüentes, predominando a forma de colite não disentérica. Assim, é provável que a *E. dispar* seja mais freqüente que a *E. histolytica* em nosso país. A ocorrência de

amebíase hepática varia entre as regiões, sendo incomum no sul e prevalente no norte do país (SALLES et al., 2003).

No Hospital Universitário Getúlio Vargas de Manaus (AM) foram relatados vários casos de amebíase hepática, mas a manifestação clínica de maior prevalência foi colite não disentérica. Em Belém/PA, foi encontrado uma prevalência de 29,35% de *E. histolytica*, e houve uma relação significativa entre a presença de *E. histolytica* e o desenvolvimento de diarréia e cólicas intestinais em pacientes infectados (MORAES-SILVA et al., 2005).

1.5 Patogenia

O resultado da infecção depende de vários fatores, dentre eles a genética do parasito. Foi observado que trofozoítos de infecção intestinal e de abscesso hepático, de um mesmo paciente, são geneticamente distintos. Esse resultado sugere que subpopulações de *E. histolytica* de uma mesma infecção apresenta diferentes tropismos ou que eventos de reorganização do DNA aconteçam antes ou durante a metástase do intestino para o fígado (ALI et al., 2007, ALI et al., 2008).

A invasão intestinal pela *E. histolytica* é caracterizada por extensiva degradação da matriz extracelular por proteases secretadas, citólise, fagocitose das células intestinais e alta motilidade do parasito. Os trofozoítos formam úlceras no intestino e podem ganhar a corrente sanguínea e disseminar para outros órgãos (TAVARES et al., 2005). A citotoxicidade exercida por algumas cepas de *E. histolytica* é um evento multifatorial determinado pelo potencial patogênico da cepa de *E. histolytica* e pela resposta imune dos hospedeiros (HUSTON, 2004).

Quatro principais classes de fatores de virulência da *E. histolytica* tem sido extensivamente estudados: as moléculas de adesão, especialmente a lectina de superfície Galactose-N-acetil galactosamina (Gal/GalNAc), as cisteil proteinases, os amebaporos, e os complexos lipofosfoglicano (LPG) de superfície (ACKES & MIRELMAN, 2006). Os LPGs assumem um importante papel na proteção do parasito contra seus fatores de virulência e os mecanismos de defesa do hospedeiro. A composição desses LPGs é variável entre cepas virulentas e avirulentas (FREDERICK & PETRI, 2005).

O mecanismo de invasão tecidual inicia-se pelo contato do trofozoíto de *E. histolytica* com a célula do epitélio intestinal. Lectinas da superfície do parasito, Gal/GalNAc, reconhecem resíduos de galactose e N-acetyl galactosamina nas células do hospedeiro (STAUFFER & RAVDIN, 2003). Além da ligação com a célula hospedeira, as lectinas Gal/GalNAc estão envolvidas, com citotoxicidade, resistência ao sistema de complemento, indução de encistamento e geração da parede do cisto. (FREDERICK & PETRI, 2005). Após a interação molecular com a superfície da célula intestinal, o trofozoíto secreta um peptídeo denominado amebaporo, responsável pela formação de poros (LEIPPE, 1997) e indução de apoptose (BOETTNER & PETRI, 2005).

Enzimas proteolíticas, cisteil proteinases, também são secretadas pelos trofozoítos durante a invasão. Estas têm sido associadas à citoaderência, hemólise, citotoxicidade, degradação de componentes da matriz extracelular, evasão da resposta imune e aquisição de nutrientes. (OCADIZ et al., 2005). Foram descritos na literatura 20 genes para Cisteil proteinases. É importante ressaltar que a maioria desses genes não

é expressa quando o parasito está atenuado pelo cultivo “*in vitro*”, isso sugere que essas enzimas são importantes fatores de virulência (BRUCHHAUS et al., 2003).

Diferenças genéticas entre os hospedeiros e a eficiência da resposta imune inata também são relevantes na determinação da amebíase invasiva (ACUNA-SOTO et al., 2000; CAMPOS-RODRIGUEZ & JARILLO-LUNA, 2005).

O passo final na patogênese da amebíase invasiva, provavelmente, envolve a resposta imune do hospedeiro. Mediadores químicos, liberados pelos tecidos normais e necrosados, estimulam a migração principalmente de neutrófilos, macrófagos e linfócitos, que se acumulam nas bordas da lesão dando início a uma cascata de eventos, que leva à destruição e morte de células do hospedeiro (HUSTON, 2004; ACKERS & MIRELMAN, 2006).

1.6 Estudos moleculares relacionados à virulência da *E. histolytica*

A conclusão do projeto genoma da *E. histolytica* revelou aspectos importantes, como a identificação de um enorme número de genes relacionados à kinases transmembrânicas, enzimas proteolíticas, abundância em seqüências que se repetem e genes com funções ainda não conhecidas (LOFTUS et al., 2005)

Diversos trabalhos têm sido realizados na tentativa de identificar os genes envolvidos nos mecanismos de patogênese deste parasito. Alguns genes já foram descritos como importantes na capacidade da *E. histolytica* lisar e invadir a mucosa intestinal, dentre eles estão os que codificam amebaporos, lectinas de superfície, collagenases, cisteil proteinases, serino proteinases e fosfatases (LEIPPE et al., 1993; LOPEZ-VANCELL et al., 2000; QUE & REED, 2000; TAVARES et al., 2005). Estudos

de inibição da expressão de amebaporos e cisteil proteinases permitiram observar redução expressiva na capacidade lítica dos trofozoítos de *E. histolytica* sobre hemácias (BRACHA et al., 1999), redução significativa na formação de abscesso hepático em ratos (STANLEY, 2001), inibe a capacidade de fagocitar (ANKRI et al., 1998) e também interfere no ciclo biológico e no metabolismo do parasito, sugerindo que as cisteil proteinases tem papel importante na fisiologia e são essenciais para sobrevivência do mesmo (OLIVOS-GARCIA et al., 2003). Esses resultados demonstram a importância destas moléculas na patogenia da ameba.

Outros estudos, como os de perfil de transcrição, têm contribuído para a identificação de novos genes que caracterizam o fenótipo virulento em algumas cepas ou que tenham sua expressão aumentada em condições que mimetizam a invasão, bem como confirmam a importância de alguns genes já descritos como participantes na fisiopatologia da *E. histolytica*. Davis e colaboradores (2007) observaram que genes que codificam as cisteil proteinases 4, 6 e 7, são mais expressos em cepa virulenta (HM1-IMSS) quando comparada à cepa não virulenta (Rahman). Trofozoítos quando submetidos à condições de estresse, como presença de cálcio, células intestinas, ou aumento de temperatura, tiveram alterações na transcrição de alguns genes (MACFARLANE et al., 2005 e BALDERAS-RENTERIA et al., 2007).

Esses estudos têm contribuído grandemente para um melhor entendimento dos vários aspectos relacionados aos mecanismos de virulência/não virulência demonstrado por algumas cepas de amebas. Contudo, estudos para diferentes cepas oriundas de diferentes regiões, ainda necessitam ser realizados. Acredita-se que a invasão tecidual seja fruto de vias múltiplas e complexas e que nem todos os genes envolvidos nesse processo sejam conhecidos (LOFTUS et al., 2005). O aprofundamento na análise da

expressão gênica em diferentes cepas de *E. histolytica* pode contribuir para uma melhor compreensão da biologia deste parasito.

1.7 Apresentação diferencial de RNA

A apresentação diferencial de RNA, *differential display* (DD), foi descrita simultaneamente por Welsh e colaboradores (1992) e Liang e Pardee (1992). Essa técnica baseia-se na amplificação de fragmentos de DNA, a partir de cDNA, utilizando iniciadores escolhidos aleatoriamente e temperaturas de anelamento inferiores à temperatura específica do iniciador, com o objetivo de identificar padrões de expressão diferencial através da seleção de fragmentos amplificados diferencialmente entre as amostras analisadas. É uma técnica rápida, simples e sensível, que permite a análise simultânea de várias amostras de RNA (LIANG, 2002). Outra vantagem é o fato de não ser necessário o conhecimento prévio das seqüências analisadas, o que permite, além do estudo da expressão, a identificação de novas seqüências gênicas.

Esta técnica tem sido extensivamente descrita na literatura em pesquisas diversas de comparação da expressão gênica, incluindo estudos de câncer (CHANG, 2007), identificação de genes estágio-específicos em protozoários (ABRAHAMSEN et al. 1995; LAU et al. 2000) e sexo-específicos em helmintos (MIRANDA et al., 2004; COSTA et al., 2008) dentre vários outros. Utilizando esta mesma técnica genes envolvidos na virulência de parasitos foram identificados em *Leishmania mexicana amazonensis* (HEARD et al., 1996) e *E. histolytica* (BRUCHHAUS et al., 2002; BALDERAS-RENTERIA et al., 2007) quando cepas virulentas dos protozoários foram analisadas contra as não virulentas.

Neste trabalho, a técnica DD foi utilizada como ferramenta para comparar e analisar genes que foram mais expressos quando cepas de *E. histolytica* tiveram a virulência ativada pela passagem em fígado de hamster.

2 JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, têm sido realizados, inúmeros estudos voltados para o esclarecimento dos mecanismos de patogenicidade da *E. histolytica*. Uma questão intrigante com relação à virulência da *E. histolytica* é a perda da capacidade de produzir lesão quando mantida em cultivo axênico prolongado. Gomes e colaboradores (1997) demonstraram diferenças no perfil eletroforético de proteínas totais em uma cepa de *E. histolytica* sob duas condições diferentes: atenuada, pelo cultivo prolongado e com virulência ativada após a passagem em fígado de hamster. Como se trata da mesma cepa e ambos isolados foram originados de cultivo axênicos, os autores acreditam que as proteínas apresentadas somente pelo isolado virulento podem estar relacionadas à capacidade da ameba invadir os tecidos e causar lesões.

Visto o exposto e na tentativa de elucidar alguns fatores relacionados com a virulência da *E. histolytica*, foi utilizada a apresentação diferencial de RNA para analisar possíveis genes diferencialmente expressos em cepas deste parasito, quando atenuadas e com a virulência ativada. O estudo das proteínas codificadas pelos genes aqui caracterizados como mais expressos quando o trofozoíto está virulento pode auxiliar no entendimento da patogênese da amebíase, o que poderá contribuir para síntese racional de novos agentes quimioterápicos, novas técnicas de diagnóstico e até na obtenção de uma vacina.

OBJETIVOS

3.1 Geral

Identificar genes específicos ou mais expressos em cepas de *E. histolytica* que tiveram a virulência ativada, em comparação com cepas atenuadas.

3.2 Específicos

- Reativar a virulência das cepas de *E. histolytica* através da passagem em fígado de hamsters;
- Avaliar diferentes iniciadores para as reações de apresentação diferencial de RNA com amostras de cDNA das cepas de *E. histolytica*;
- Clonar e seqüenciar os fragmentos identificados como específicos ou mais expressos nas cepas *E. histolytica* quando exibiam o fenótipo virulento e realizar busca de homologias das seqüências dos fragmentos e/ou genes obtidos em bancos de dados de seqüências;
- Confirmar a expressão gênica diferencial entre as cepas atenuadas e reisoladas de *E. histolytica* por RT-PCR em tempo real e RT-PCR semiquantitativa.
- Analisar o perfil de transcrição de genes potencialmente relacionados à virulência obtidos em projeto anterior, na cepa atenuada e reisolada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cepas de *E. histolytica*

Duas cepas de *E. histolytica* mantidas em cultivo axênico, em meio TYI-S-33 (Tripcase, extrato de levedo, glicose, L. caseína, ácido ascórbico, citrato de ferro amoniacal) (DIAMOND et al., 1978), pelo laboratório de amebíase do Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG foram selecionadas: a cepa ICB-CSP (CSP), foi isolada no laboratório de amebíase do Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG, e a cepa HM-1:IMSS (HM1), usada como referência em todo o mundo e foi isolada no México (De La Torre, 1972).

As cepas HM1 e CSP foram isoladas de pacientes com colite disentérica e apresentaram-se virulentas nos testes *in vitro* (eritrofagocitose e efeito citopático) e produziram severas lesões nos animais inoculados (hamsters e ratos) usados na quantificação de virulência. Entretanto, estas cepas perderam a capacidade de produzir lesão em animais de experimentação, devido ao cultivo axênico prolongado, estando no momento atenuadas.

Estas cepas tiveram a virulência reativada através da passagem em fígado de hamster, com posterior reisolamento. As cepas com virulência ativada foram denominadas HM1R e CSPR.

4.2 Ativação da virulência

As culturas axênicas das cepas HM1 e CSP foram crescidas em 15mL de meio TYI-S-33 (Diamond et al. 1978). Culturas, em fase exponencial de crescimento, foram resfriadas em banho de gelo por 10 minutos e centrifugadas a 3000xg por 5 minutos, para concentração das amebas. O sedimento foi resuspenso em 1 mL de PBS estéril para contagem do número de trofozoítos em câmara de *Neubauer*. A concentração foi ajustada para 10^6 células/100 μ L. Dois hamsters (*Mesocricetus auratus*), com aproximadamente um mês de idade (cerca de 70 gramas), foram utilizados para inoculação de cada cepa de *E. histolytica*. Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (Hipnol®) e inoculados com 10^6 trofozoítos diretamente no lobo esquerdo do fígado em um procedimento de laparotomia, em condições estéreis.

Os animais foram sacrificados após 24h, um fragmento do local de inoculação no fígado foi retirado e plantado em meio de cultivo TYI-S-33 com 20 μ L de norfloxacino 40mg/mL, para a obtenção do reisolado. Este procedimento foi realizado, também em condições estéreis. Os trofozoítos foram cultivados pelo período de 72h, trocando-se o meio de cultura a cada 24h. Após esse período foi realizada a confirmação da ativação da virulência e a extração do RNA, como descrito a seguir.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal – UFMG (CETEA), sob o protocolo de número 18/2008.

4.3 Confirmação da virulência

O restabelecimento da virulência dos reisolados foi medido através da inoculação em fígado de hamsters. Para as inoculações, as culturas axênicas dos reisolados foram processadas como citado anteriormente na secção 4.2 para obtenção dos inóculos de $1,0 \times 10^6$ células/100 μ L de PBS.

Dois hamsters foram utilizados para cada cepa, inclusive para as cepas atenuadas, controle negativo, seguindo também o protocolo descrito na secção anterior.

Os animais foram sacrificados seis dias após a inoculação, para exame macroscópica das lesões. A gravidade das lesões foi classificada em graus de 0 a IV de acordo com Diamond e colaboradores (1974), como descrito a seguir:

Grau 0 - Fígado normal, fibrose no local ou lesão bacteriana menor que 4mm (ausência de amebas, confirmada por cultivo do fragmento da lesão);

Grau I – Lesão no ponto de inoculação menor que 15mm de diâmetro;

Grau II – Lesão maior que 15mm, sem metástase;

Grau III – Lesão no lobo primário, algumas metástases para outras áreas;

Grau IV – Lesão extensa, com metástase, mínimo de 50% do fígado comprometido.

A virulência foi considerada ativada quando a lesão provocada pela cepa reisolada foi classificada a partir do grau II.

4.4 Extração do RNA total

Os trofozoítos das cepas HM1 e CSP atenuadas e reisoladas, após o cultivo de 72h foram ajustados à uma proporção de 1×10^6 trofozoítos/mL em meio de cultura, para a extração de RNA. Esta extração ocorreu simultaneamente para todas as cepas. Os tubos de cultivo foram centrifugados a 1200xg por 5 min, os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos lavados com PBS. Aos sedimentos foi adicionado 1mL de Trizol (GIRCO-BRL), como instruído pelo fabricante. Os sedimentos foram ressuspensos e incubados por 5 min à temperatura ambiente, para romper as células. Em seguida foi adicionado 200 μ L de clorofórmio aos produtos, esses foram agitados vigorosamente por 15s e centrifugados a 10000xg por 15 min a 4°C, para a extração do RNA. A fase superior, incolor, de cada amostra foi transferida para um novo tubo de microcentrifuga (2mL) estéril, devidamente identificado. Neste tubo foi adicionado 500 μ L de álcool isopropanol para precipitação do RNA. As amostras foram incubadas por 15 minutos a -20°C e posteriormente centrifugadas a 12000xg por 20 minutos a 4°C. O produto precipitado foi lavado com 1mL de etanol 75% em DEPC (dietilpirocarbonato) 0,01% e o RNA foi ressuspensado em água DEPC 0,01% para posterior quantificação em espectrofotômetro ($A_{260/280}$). Os RNAs foram armazenados a -70°C até o momento do uso.

4.5 Síntese de cDNA

As amostras de RNA foram tratadas com DNaseI (Deoxyribonuclease I, Amplification Grade – GIBCO BRL) para degradação de possíveis traços de DNA. Esta

reação ocorreu em um volume final de 10 μ L contendo 20mM Tris-HCl (pH 8,4), 2mM MgCl₂, 50mM de KCl, 0,1 unidade da DNase I e 6 μ g da amostra de RNA, a temperatura ambiente (25°C) por 15 minutos. Em seguida a enzima DNase I foi inativada pela adição de 1 μ L de EDTA (25mM) e incubação a 65°C por 15 minutos.

Após o tratamento com a DNase, 3 μ g de RNA total foram utilizados como molde para a síntese de cDNA. Esta ocorreu em um volume final de 20 μ L contendo 25ng/ μ L de oligo (dt)₁₂₋₁₈, 500 μ M de cada dNTP, 50mM Tris-HCl (pH 8,3), 75mM KCl, 3mM MgCl₂, 10mM de DTT e 200 unidades da transcriptase reversa (SuperScript™ II RNase H⁻ Reverse Transcriptase - INVITROGEN), com incubação a 42°C por 50 minutos. Posteriormente, a enzima foi degradada a temperatura de 70°C por 15 minutos. Simultaneamente, foram preparadas “amostras de cDNA” das cepas originais e reisoladas sem adição da enzima transcriptase reversa (SuperScript™ II RNase H⁻ Reverse Transcriptase - INVITROGEN) para atuarem como controle negativo na reação da específica.

4.6 Reação de apresentação diferencial e análise em gel de poliacrilamida

As amostras de cDNA das cepas originais e reisoladas de *E. histolytica* foram submetidas às reações de apresentação diferencial de RNA (*differential display*) utilizando os iniciadores apresentados no QUADRO 1. Estes iniciadores foram escolhidos de forma arbitrária.

Iniciador	Seqüência	Temperatura de anelamento
HSP1	5' TGCAATTTTTTGGTACTATCG 3'	52°C
HSP2	5' TGTTTCTTTTTGTTGTTTTTCG 3'	49°C
α PR	5' AAGTGGATATTTGGAGCGTT 3'	56°C
AP1	5' ACAGGATTAATTAATACATTAGAAAAT 3'	59°C
AP2	5' ACAGGACTTATTAATACACCTTGAAAAT 3'	64°C
ERR1	5' CGCTCAAATATCCACTTCTAC 3'	62°C
AP3	5' ACTGGTTTAATTAATACTTTAGAAAAT 3'	59°C
AP4	5' ACTGGTCTTATTAATACTCTTGAAAAT 3'	64°C
RD3	5' ATCCTTCCGCAGGTTACCT 3'	55°C
RD5	5' ATCTGGTTGATCCTCCTGCCAGT 3'	55°C
RB1.1	5' CAGGTGTGTGAGCATGGGC 3'	62°C
Kcal1	5'GCGGCCGCTCAGGGGTTTTCTTC 3'	48°C
Kcal2	5'CTCGAGAAAAGAGTTGTTGGAGGATATAAC 3'	48°C
GR	5'ACTAATTTACGAAGTTGTTG 3'	52°C
Edmt1	5' TATTATAATGGCTTTATTTTG 3'	49°C
PF	5' TTCAACTCTGTGAGATGAATGC 3'	62°C
Carbox-u	5' CAGAGTGACCCTGCCTGC 3'	60°C

QUADRO 1: Iniciadores utilizados nas reações de apresentação diferencial de RNA

As reações de amplificação utilizando a técnica de apresentação diferencial de RNAs (*differential display*) entre as cepas atenuadas e reisoladas de *E. histolytica* foram realizadas em um volume final de 10 μ L contendo 10mM Tris-HCl pH 8,4, 50mM KCl,

1,5mM, $MgCl_2$, 0,1% Triton®X-100, 200 μ M de cada dNTP, 2,6 μ M de um iniciador (nesse caso o iniciador que gerou o fragmento), 0,12 unidades de *Taq* DNA Polimerase (PHONEUTRIA, MG, Brasil) além de 1 μ L do cDNA. A mistura foi coberta com 20 μ L de óleo mineral e a reação em cadeia da polimerase realizada em um termociclador (MJ Research) com uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos. Posteriormente, foram realizados dois ciclos a 37°C por 2 minutos para um anelamento inespecífico, 72°C por 1 minutos para a extensão e 95°C por 1 minuto para um nova desnaturação, seguidos por 29 ciclos sob as mesmas condições mencionadas anteriormente, exceto com relação à temperatura de anelamento, que foi alterada para a temperatura específica de cada iniciador utilizado. Para finalizar esta reação, foi realizado um último ciclo de extensão a 72°C, por 8 minutos.

Após a reação de apresentação diferencial, 5 μ L do produto da reação foi submetido à uma eletroforese em gel de poliacrilamida 5% (SAMBROOK, 1989) não desnaturante, em tampão TAE (Tris-acetato-EDTA) 1X, por aproximadamente duas horas, sob um campo elétrico de 100 volts. Posteriormente, os fragmentos amplificados foram visualizados por coloração com nitrato de prata (SANTOS, 1993). Os géis foram fixados a temperatura ambiente por 20 minutos em solução contendo 10% de etanol absoluto e 0,5% de ácido acético, seguida de uma incubação por 20 minutos em solução contendo 0,17% de nitrato de prata. A revelação foi realizada em solução contendo 3% (P/V) NaOH e 0,1% formaldeído 37% (V/V).

4.7 Obtenção dos fragmentos de interesse e reamplificação

Os fragmentos de interesse foram recortados do gel com o auxílio de uma lâmina de bisturi estéril, transferidos para tubos de microcentrifuga de 0,5mL contendo 100 μ L de tampão Taq 1X (10mM Tris-HCl pH 8,41, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂ e 0,1% Triton®X-100), e incubados à uma temperatura de 95°C por 20 minutos, para eluição do DNA. Posteriormente, uma alíquota de 2,5 μ L das bandas eluídas foram submetidas a uma reação de reamplificação, que foi realizada em um volume final de 25 μ L contendo 10mM Tris-HCl pH 8,4, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,1% Triton®X-100, 200 μ M de cada dNTP, 0,6 μ M de um iniciador, 0,5 unidades de *Taq* DNA Polimerase. A mistura foi coberta com 20 μ L de óleo mineral e a reação em cadeia da polimerase realizada em um termociclador com uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguindo-se de 29 ciclos com: anelamento, temperatura específica do iniciador utilizado por 1 minuto; extensão, 72°C por 1 minuto. No último ciclo a extensão a 72°C ocorreu por 8 minutos.

Os produtos reamplificados foram submetidos à uma eletroforese em gel de agarose 1% acrescido de brometo de etídio (0.5 μ g/mL). Em seguida, os amplicons foram purificados para remoção de produtos indesejáveis como nucleotídeos e iniciadores não incorporados utilizando o kit GFX (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH INC.) conforme instruções do fabricante. O DNA purificado foi quantificado em gel de agarose 1% acrescido com brometo de etídio (0.5 μ g/mL), utilizando um padrão de DNA de concentração conhecida.

4.8 Clonagem e transformação

As bandas reamplificadas e purificadas foram clonadas em vetor pGEM-T Easy Vector (Promega). Aproximadamente 4 μ L dos produtos obtidos na purificação foram adicionados à 1 μ L de T4 DNA ligase e 1 μ L tampão de T4 DNA ligase (Tris-HCl 30mM pH 7,8, contendo MgCl₂ 10mM, ditioneitol 10 mM e ATP 0,5mM). O volume foi ajustado para 10 μ L com água e o produto foi incubado a 4° C por 16 horas.

O produto da reação de ligação foi utilizado para transformação de bactérias termocompetentes, *Escherichia coli* linhagem DH5- α . Os 10 μ L do produto de ligação foram incubados com aproximadamente 100 μ L de bactérias termocompetentes em gelo, por 30 minutos. Em seguida as bactérias foram submetidas a um choque térmico a 42° C por 30 segundos. As bactérias foram novamente incubadas em gelo por 2 minutos e a seguir foi acrescentado às bactérias 450 μ L de meio LB (triptona 10g/L, extrato de levedura 5,0g/L, NaCl 5,0g/L e pH ajustado para 7,4). Esta mistura foi incubada a 37° C por aproximadamente 3 horas em termomixer (Eppendorf, Alemanha) com agitação.

Da suspensão de bactérias, semeou-se 150 μ L, em placa de Petri contendo ágar a 1,5%, ampicilina 100 μ g/mL, IPTG - (200 μ g/mL) e 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-beta-D-galactosídeo – Xgal – (65 μ g/mL) em meio Luria Broth (LB) com posterior incubação a 37°C durante 16 horas.

A presença dos insertos de interesse nos plasmídeos recombinantes foram confirmadas por meio de uma reação de PCR utilizando diretamente uma pequena amostra de algumas colônias brancas retirada com o auxílio de um palito de madeira

estéril e transferida para um tubo de reação contendo 10mM Tris-HCl pH 8.4, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,1% Triton®X-100, 20 µM de cada dNTP, 0,6µM dos iniciadores M13 direto (5'CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC3') e reverso (5'TCACACAGGAAACAGCTATGAC3') e 0,5 unidade de Taq DNA Polimerase em um volume final de 10µL. Da mesma forma, foram preparadas reações de PCR com colônias azuis, colônias que receberam o plasmídeo sem inserto, que funcionaram como controle positivo da reação de PCR para verificar a eficiência da clonagem, as colônias negativas amplificam apenas a região de ligação, dando origem a um produto de ligação de 250 pb. O programa utilizado para amplificação dos produtos desejados foi composto por um ciclo a 95°C por 5 minutos, seguindo-se 29 ciclos a 50°C por 1 minuto para anelamento, 72°C por 1 minuto para a extensão e 95°C por 1 minuto para uma nova desnaturação. Posteriormente, foi realizado um ciclo a 50°C por 1 minuto para anelamento, seguindo-se uma temperatura a 72°C por 8 minutos para uma extensão final. Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de poliacrilamida 5% corado com nitrato de prata.

4.9 Mini preparação de plasmídeos (Mini-prep)

Após a confirmação dos insertos recombinantes esperados pelo PCR de colônia, foram inoculadas, com o auxílio de palitos de madeira estéreis, um fragmento destas colônias em placas de cultura de 96 poços contendo 1,2mL de meio de cultura líquido LB acrescido de ampicilina (100µg/mL) em cada poço. As placas foram incubadas por 22 horas, a 37°C, sob agitação constante (250 rpm). Após esse período, as amostras

foram centrifugadas a 4000xg por 6 minutos a 25°C para sedimentação das células. O sobrenadante foi descartado e 240µL de solução GET (0,9% glicose, 0,01% EDTA pH 8, 26mM Tris-HCl pH 7,4) adicionados em cada poço para ressuspender as células em agitador vortex por 2 minutos. As amostras foram centrifugadas a 4000xg por 9 minutos a 25°C. O sobrenadante foi descartado e 80 µL de solução GET e 1µL de RNase adicionados em cada poço, sendo as células ressuspendidas por agitação em vortex. A suspensão de células foi transferida para uma microplaca (96 poços) de polipropileno com fundo redondo, com capacidade para 250µL. Em cada poço foram adicionados 80µL de NaOH 0,2N e SDS 10%, seguindo-se incubação das amostras por 10 minutos a 25°C. Acrescentou-se, em cada poço, 80µL de acetato de potássio 3M com posterior homogeneização do conteúdo por inversão da placa, a qual foi incubada por 10 minutos a 25°C e, subseqüentemente, a 90°C por exatos 30 minutos, seguido de resfriamento por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas à 4000xg por 9 minutos a 20°C.

Finalmente, uma placa Millipore® foi fixada, com fita adesiva, no topo de uma microplaca de fundo em “V” de polipropileno com capacidade para 250µL. Após a realização deste procedimento, todo o volume do sobrenadante foi transferido para a placa Millipore®, evitando-se transferir os restos celulares. As amostras foram centrifugadas a 4000xg, por 6 minutos a 20°C, e 100µL de isopropanol adicionados ao produto da centrifugação, para precipitação do DNA. Essas foram novamente centrifugadas a 4000xg por 45 minutos a 20°C, e o precipitado lavado com 200µL de etanol 70% gelado, no qual foram submetidas a uma última centrifugação a 4000xg, por 10 minutos a 20°C, seguido do descarte do sobrenadante. As amostras ficaram em repouso à temperatura ambiente durante 30 minutos para evaporação de etanol

residual. Posteriormente, as amostras foram ressuspensas em 30 μ L de água isenta de nucleases e analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% com padrões de concentração definidos para quantificação das mesmas.

4.10 Seqüenciamento

As reações de seqüenciamento foram realizadas segundo método descrito originalmente por SANGER e colaboradores (1977) utilizando o BigDye® v 3.1Cycle sequencing kit (Applied Biosystems), em tubos de microcentrífuga de 0,5mL com um volume final de 10 μ L, contendo 0,5 μ M do iniciador M13 direto (5' CGCCAGG GTTTTCCCAGTCACGAC3') ou reverso (5'TCACACAGGAAACAGCTATGAC3'), 200ng de DNA plasmidial, 0,3 μ L de BigDye®, 1,77 μ L de Tampão 5X e água pura suficiente para completar o volume. As reações foram realizadas em um termociclador com 30 ciclos a 95°C por 20 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Em seguida, os nucleotídeos não incorporados foram retirados, adicionando-se 1 μ L de acetato de amônio (7,5M) e 25 μ L de etanol 95%, após incubação a 25°C por 15 minutos, seguiu-se uma centrifugação a 4000xg por 45 minutos a 25°C. O sobrenadante foi descartado e 150 μ L de etanol 70% adicionados às amostras. Realizou-se uma centrifugação a 4000xg por 15 minutos a 25°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensado por agitação em vortex com 10 μ L do tampão de ressuspensão contendo 70% de formamida e 1 μ L de EDTA.

Os produtos do seqüenciamento foram submetidos à leitura no seqüenciador ABI PRISM® 3130 *Genetic Analyzer*.

4.11 Análise das seqüências em bancos de dados

As etiquetas de seqüências transcritas (ESTs) obtidas foram submetidas à procura de homologia com seqüências depositadas em banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) utilizando o *Basic Local Alignment Search Tool program* para nucleotídeos (BLAST N), peptídeos (BLAST X) ou ESTs traduzidas (t BLAST X), disponíveis na internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Após a obtenção dos resultados de homologias com genes depositados nos bancos de dados, foram analisados os valores de similaridade (*positives*), identidade (*identities*), pontuação (*score*) e probabilidade (*expect*) para as respectivas ESTs tidas como mais expressas ou específicas das cepas atenuadas e reisoladas de *E. histolytica*.

4.12 RT-PCR quantitativa em tempo real

Os iniciadores utilizados nestas reações foram desenhados para confirmação dos genes referentes às ESTs tidas como específicas das cepas reisoladas, no programa *Primer Express*® v2.0, da empresa Applied Biosystems. O gene da proteína actina foi utilizado como gene constitutivo para esta metodologia. Estes iniciadores foram sintetizados pela companhia *BIOGENETIX*, diluídos em água deionizada e estocados em alíquotas na concentração de 100µM. O cDNA sintetizado foi amplificado utilizando Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), composto pelo marcador SYBR® Green I, AmpliTaq Gold® DNA Polimerase, dNTPs, referência

passiva e tampão otimizado. As reações ocorreram em um volume final de 25µl contendo Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) 1X, 0,45µM de cada iniciador e cDNA diluído 1:25, além de água. As reações foram realizadas em duplicata, para cDNA das cepas reisoladas, cDNA das cepas atenuadas e controle negativo (contendo água). As reações foram feitas no sistema de PCR em tempo real ABI PRISM 7900HT, em placas de polipropileno para 96 amostras cobertas por adesivos ópticos, todos da empresa Applied Biosystems. As condições de amplificação foram: 95°C por 10 minutos para ativação da AmpliTaq Gold® DNA Polimerase seguido de 40 ciclos com 95°C por 15 segundos para desnaturação, 60°C por 45 segundos para anelamento dos iniciadores e 72°C por 30 segundos para extensão. O estágio de dissociação foi adicionado ao programa para que as análises de amplificação específica pudessem ser feitas após o término das reações, também foram feitas análises de quantificação relativa das amplificações usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). A expressão gênica foi considerada diferente, entre as cepas atenuada e reisolada, quando o valor da quantificação relativa foi maior que 2.

Os produtos desta PCR foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata, conforme mencionado anteriormente, para confirmação dos produtos amplificados dos genes referentes às ESTs tidas como específicas das cepas reisoladas.

4.13 RT-PCR semiquantitativa

As reações de RT-PCR semiquantitativa foram realizadas como uma PCR duplex, contendo o par de iniciador para o alvo investigado e um par de iniciador para o fragmento do gene da actina, expresso constitutivamente em todas as cepas. Nos casos em que houve interação entre os pares de iniciadores, foram feitas reações apenas com o par de iniciador do alvo investigado. As reações ocorreram em um volume final de 25 μ L contendo 10mM Tris-HCl pH 8,4, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,1% Triton®X-100, 200 μ M de cada dNTP, 0,6 μ M de cada um dos quatro (ou dois) iniciadores e 0,5 unidades de *Taq* DNA Polimerase. Foram utilizados, como alvos para amplificação, 2,5 μ L de cDNA de cada cepa. A mistura foi coberta com 20 μ L de óleo mineral e a reação executada em um termociclador no seguinte programa: 95°C por 3 minutos para desnaturação inicial seguindo de 35 ciclos com 95°C por 1 minuto para nova desnaturação, 60°C por 1 minuto para anelamento e 72°C por 1 minuto e 30 segundos para extensão, realizando-se posteriormente um passo com 72°C por 7 minutos para extensão final. Alíquotas de 8 μ L foram retiradas dos tubos nos ciclos 25, 30 e 36 e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata, conforme mencionado anteriormente, para confirmação dos produtos amplificados dos genes tidos como específicos ou mais expressos das cepas reisoladas.

4.14 Avaliação do perfil de transcrição de genes potencialmente relacionados à virulência

Em um projeto anterior, utilizando a técnica de apresentação diferencial de RNA, foi comparada a expressão gênica da cepa EGG, virulenta, mantida em cultura e retirada diretamente de fígado de hamsters. Foram encontrados quatro genes mais abundantemente expressos nos trofozoítos retirados da lesão hepática. No quadro abaixo estão apresentados estes genes.

Nome do gene	Número de acesso
Acetiltransferase	XM_648675.1
Triptofanil tRNA sintetase	XM_649174.1
Proteína diaphanous	XM_647202.1
Cisteil proteinase 1	XM_645064.2

QUADRO 2: Genes diferencialmente expressos da cepa EGG de *E. histolytica* provenientes de cultura e de fragmentos de fígado lesionado.

A expressão destes genes foi avaliada na cepa CSP atenuada e reisolada de *E. histolytica* através da RT-PCR em tempo real.

5 RESULTADOS

5.1 Ativação e confirmação da virulência das cepas de *E. histolytica* e extração do RNA

Neste estudo, foram utilizadas duas cepas CSP e HM1, ambas virulentas, porém atenuadas pelo cultivo prolongado “in vitro”. Estas cepas foram mantidas em meio TYI-S-33 à 37°. A ativação da virulência pela passagem em fígado de hamster ocorreu como o esperado e foi confirmada com sucesso. As lesões provocadas pelas cepas agora denominadas HM1R e CSPR foram classificadas em grau IV e as cepas atenuadas HM1 e CSP não foram capazes de produzir lesão em fígado de hamster (FIGURA 1).

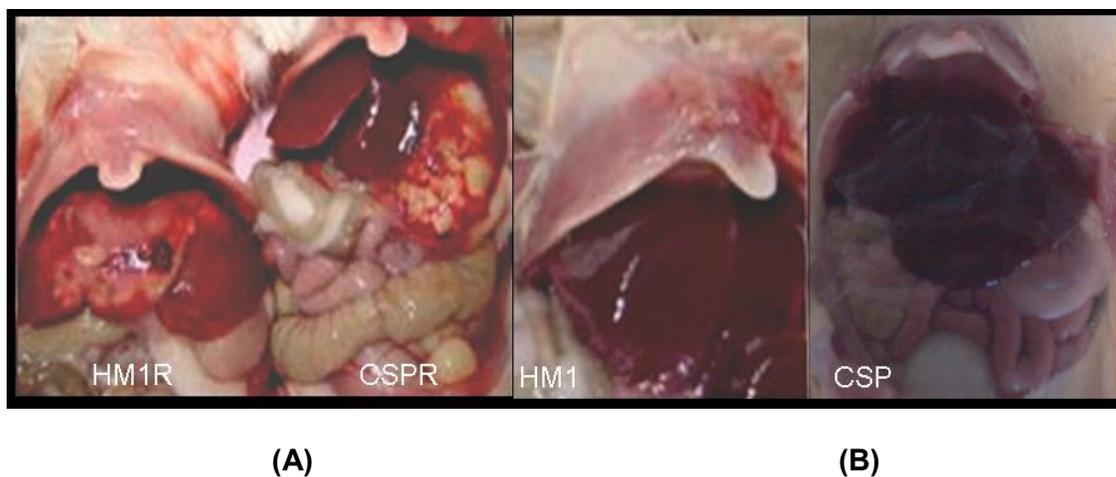


FIGURA 1: Confirmação da virulência das cepas reisoladas de *E. histolytica* em hamster. (A) lesões produzidas no fígado de hamsters pelas cepas HM1R (à esquerda) e CSPR (à direita). (B) controles negativos, animais sem lesão, animal inoculado com a cepa HM1 (à esquerda) e CSP (à direita).

As cepas atenuadas e reisoladas foram submetidas à extração de RNA com quantidades obtidas de: 267 μ g para HM1, 83 μ g para HM1R, 147 μ g para CSP e 291 μ g para CSPR.

5.2 Apresentação diferencial de RNA: Perfis eletroforéticos obtidos e bandas selecionadas

Na reação de apresentação diferencial de RNA, foram utilizados 17 iniciadores com a finalidade de se obter perfis eletroforéticos diferentes entre as cepas reisoladas (HM1R e CSPR) e as atenuadas (HM1 e CSP). A maioria dos fragmentos amplificados a partir desses iniciadores foi compartilhada por todas as cepas, enquanto alguns fragmentos se apresentaram como específicos ou mais intensos para uma delas. Foram selecionadas as bandas específicas para as cepas reisoladas. Dentre os iniciadores utilizados neste estudo, dez (AP1, AP3, AP2, Kcal2, Edmt1, ERR1, RD5, PF, GR, CARBOXI – U), produziram perfis com bandas potencialmente específicas para as cepas reisoladas (FIGURA 1).

Foram selecionadas, visualmente, 29 bandas específicas para as cepas reisoladas, obtidas dos perfis eletroforéticos gerados pelos dez iniciadores mencionados anteriormente. Dessas, seis foram identificadas como específicas da cepa CSPR, dezenove como específicas da HM1R e quatro que apareceram tanto na CSPR quanto na HM1R (TABELA 1).

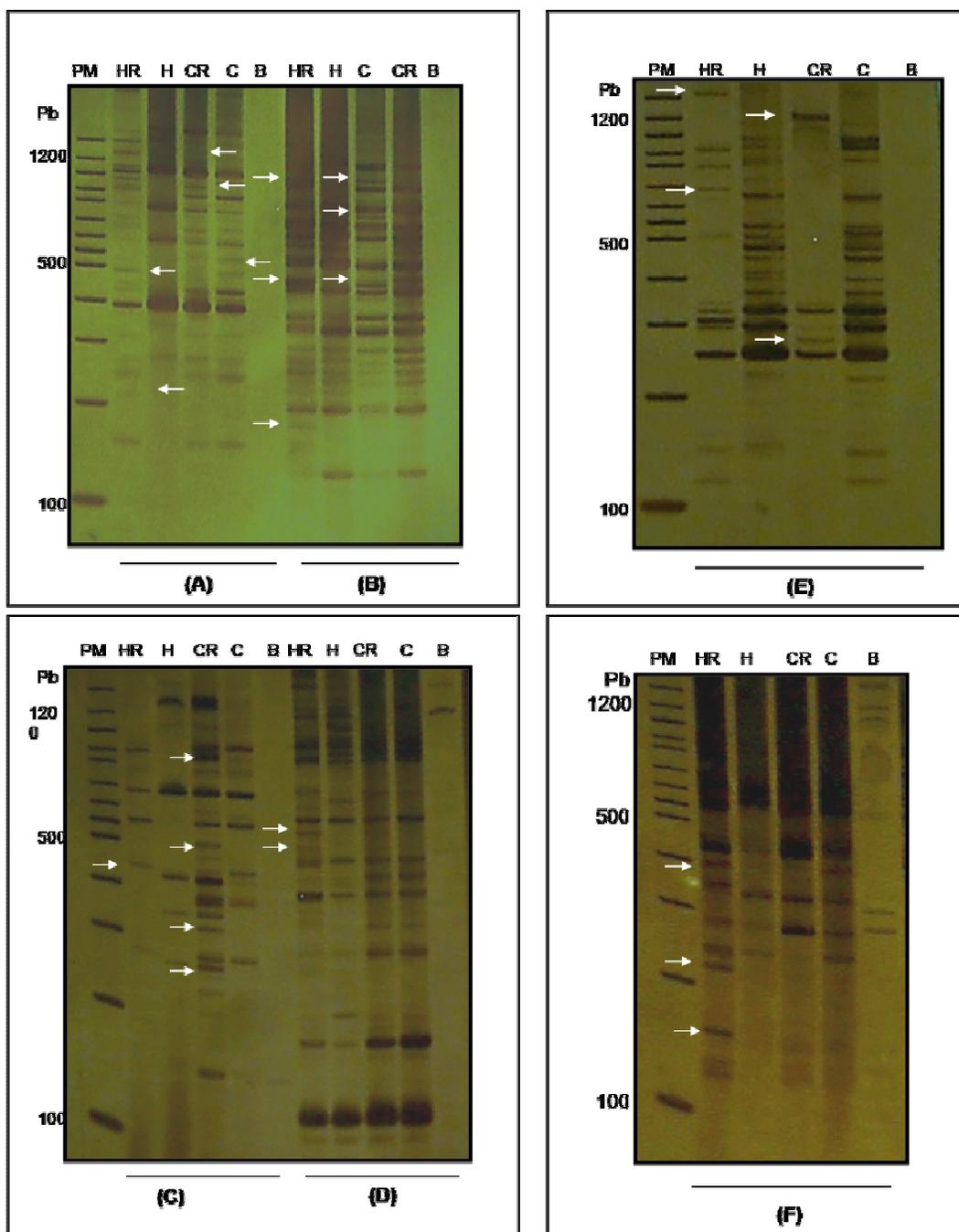


FIGURA 2: Perfis eletroforéticos da apresentação diferencial de RNA entre cepas atenuadas (H – HM1 e C – CSP) e reisoladas (HR – HM1R e CR – CSPR) de *E. histolytica*, em gel de poliacrilamida 6%, utilizando os iniciadores: (A) AP1, (B) AP3, (C) Kcal2, (D) RD5, (E) ERR1, (F) GR. B: Branco e PM: Padrão de peso molecular em pares de base (pb)

TABELA 1

Bandas selecionadas como específicas das cepas reisoladas de *E. histolytica* após a realização da apresentação diferencial de RNA

Código da banda obtida por apresentação diferencial de RNA	Tamanho	Iniciador	Expressão gênica			
			HM1R	HM1	CSPR	CSP
BH1	1000 pb	AP1	+	-	+	-
BH2	300 pb	AP1	+	-	-	-
BH3	450 pb	AP1	+	-	-	-
BH4	510 pb	AP1	+	-	-	-
BH5	800 pb	AP3	-	-	+	-
BH6	180 pb	AP3	+	-	-	-
BH7	450 pb	AP3	+	-	-	-
BH8	600 pb	AP3	+	-	-	-
BH9	1100 pb	AP3	+	-	+	-
BH10	1150 pb	AP3	+	-	-	-
BH11	180 pb	AP2	+	-	+	-
BH12	600 pb	Kcal2	+	-	-	-
BH13	900 pb	Kcal2	+	-	-	-
BH14	300 pb	Kcal2	+	-	+	-
BH15	150 pb	Edmt1	+	-	-	-
BH16	850 pb	Edmt1	+	-	-	-
BH17	300pb	ERR1	-	-	+	-
BH18	330 pb	ERR1	+	-	-	-
BH19	1200 pb	ERR1	-	-	+	-
BH20	500 pb	RD5	+	-	-	-
BH21	800 pb	RD5	+	-	-	-
BH22	250 pb	PF	+	-	-	-
BH23	170 pb	GR	+	-	-	-
BH24	220 pb	GR	+	-	-	-
BH25	250 pb	GR	+	-	-	-
BH26	350 pb	GR	+	-	-	-
BH27	800 pb	GR	-	-	+	-
BH28	300 pb	CARBOXI – U	-	-	+	-
BH29	350 pb	CARBOXI – U	-	-	+	-

5.3 Recuperação de bandas do gel de poliacrilamida e reamplificação dos fragmentos selecionados como específicos para uma das cepas reisoladas de *E. histolytica*

As bandas identificadas como específicas para uma das cepas reisoladas foram cortadas do gel de poliacrilamida, eluídas em tampão Taq 1X e submetidas às reações de PCR convencionais com a finalidade de reamplificar esses produtos para posterior clonagem em plasmídeos e seqüenciamento.

Das 29 bandas selecionadas, doze não reamplificaram, nestas, o par de iniciadores não foi capaz de amplificar o fragmento selecionado na apresentação diferencial do RNA em sua temperatura de anelamento. Seis bandas apresentaram reamplificação inespecífica, ou seja, houve a amplificação de várias bandas além da esperada e, portanto, foram descartadas.

As reamplificações das outras onze bandas apresentaram como produtos principais, fragmentos correspondentes ao tamanho esperado para cada reação, tendo como base o resultado da apresentação diferencial de RNA.

A menor EST reamplificada foi de 170 pb proveniente do cDNA da cepa HM1R com o iniciador GR, já a maior obtida foi de 1150 pb, também oriunda do cDNA da cepa HM1R de *E. histolytica* com o iniciador AP3.

Alguns resultados das reamplificações das ESTs consideradas como específicas das cepas reisolada de *E. histolytica* obtidas por apresentação diferencial de RNA estão representados na FIGURA 3.

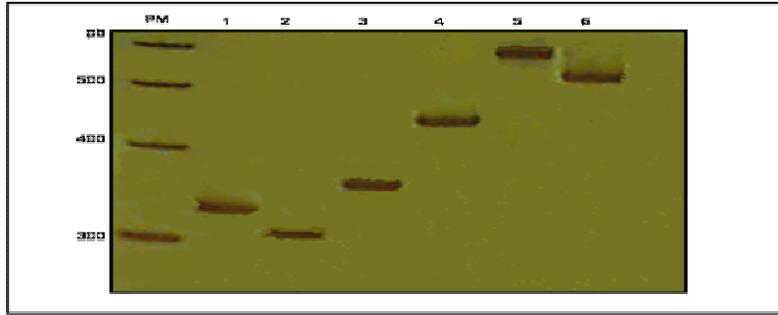


FIGURA 3: Reamplificação de bandas obtidas por apresentação diferencial de RNA de cepas reisoladas de *E. histolytica* utilizando-se uma PCR convencional, apresentado em gel de poliacrilamida 6%. 1: banda de 330pb obtida com iniciador ERR1; 2: banda de 300pb obtida com iniciador ERR1; 3: banda de 350pb obtida com iniciador GR, 4: banda de 450pb obtida com iniciador AP3, 5: banda de 600pb obtida com iniciador Kcal2, 6: banda de 510pb obtida com iniciador AP1e PM: Padrão de peso molecular em pares de base (pb)

5.4 Clonagem e PCR das colônias contendo produtos recombinantes

As ESTs reamplificadas foram clonadas e transformadas em bactérias termocompetentes com sucesso.

A clonagem e a transformação foram confirmadas por uma PCR convencional, com as colônias crescidas a partir das bactérias transformadas. Foram escolhidas colônias brancas, colônias que apresentam o inserto e colônias azuis, que continham apenas o plasmídeo sem inserto, para serem usadas como controle da clonagem e PCR.

Na PCR de colônia foram utilizados os iniciadores M13 direto e reverso que se anelam em seqüências do plasmídeo utilizado na clonagem (pGEM-T Easy Vector - Promega). Isso faz com que os tamanhos dos fragmentos gerados a partir dessa PCR de colônia sejam 250 pb maior que o esperado, pois além de haver a amplificação do fragmento em estudo, há também a amplificação de parte do

plasmídeo. A FIGURA 4 ilustra o resultado de uma PCR de colônia feita com colônias brancas e azuis.

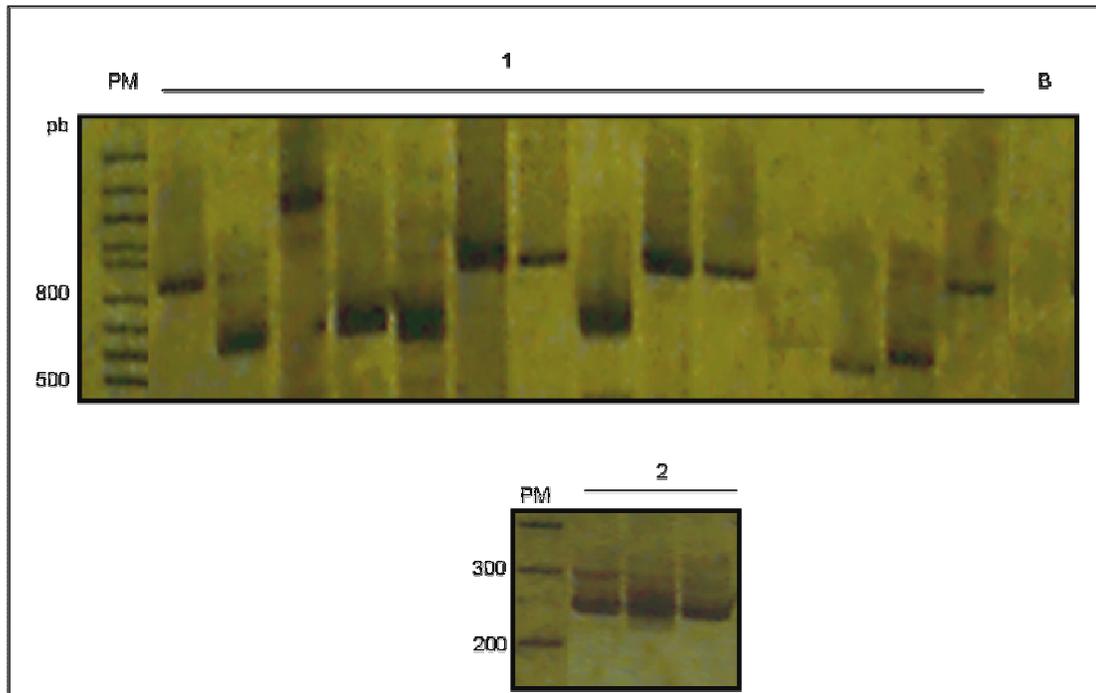


FIGURA 4: Resultado da PCR de colônias provenientes de transformações com plasmídeos recombinantes contendo ESTs identificadas como específicas das cepas reisoladas de *E. histolytica*, apresentado em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata. 1: colônias contendo insertos; 2: colônias azuis, sem inserto; B: Branco e PM: Padrão de peso molecular em pares de base (pb)

5.5 Seqüenciamento das ESTs consideradas específicas das cepas reisoladas de *E. histolytica* obtidas pela apresentação diferencial de RNA e busca de homologias em bancos de dados

Após análises dos resultados da PCR de colônia, foi realizada a extração do DNA plasmidial dos clones selecionados, seguido pelo seqüenciamento dos mesmos. Para tal procedimento, foram selecionadas 3 colônias para cada EST em estudo.

As 11 ESTs foram seqüenciadas com sucesso. Foram feitas buscas por homologias entre todas as seqüências obtidas e seqüências depositadas em banco de dados de genes e proteínas. Em alguns casos, seqüências de uma mesma banda apresentaram homologias diferentes, indicando que havia mais de um fragmento na banda selecionada como específica de uma das cepas, portanto, produtos diferentes foram clonados e seqüenciados sob um mesmo código de banda. Sendo assim, havendo mais de uma seqüência para uma determinada banda selecionada, todas foram estudadas, pois em uma mesma banda podem ter fragmentos com seqüências distintas, porém com o mesmo tamanho em pares de bases. No total foram encontradas 14 seqüências distintas a partir dos clones das 11 ESTs seqüenciadas, estas seqüências estão apresentadas no APÊNDICE A.

As homologias foram avaliadas através da análise dos valores de identidade, pontuação e probabilidade. As seqüências obtidas apresentam grande homologia com seqüências depositadas em bancos de genes ou proteínas quando os valores de pontuação (score) são superiores a 100, valores entre 50 e 100 indicam que essa homologia é parcial e valores menores que 50 indicam baixa homologia. No QUADRO 5 estão apresentadas homologias com os maiores valores de pontuação obtidos nos programas de análise de seqüências em banco de dados.

Das 14 seqüências obtidas com o seqüenciamento das bandas consideradas específicas das cepas reisoladas de *E. histolytica*, nove apresentaram homologias significativas com seqüências gênicas de *E. histolytica*, duas apresentaram homologias parciais com tais seqüências, uma apresentou baixa homologia, também com *E. histolytica*, e duas não apresentaram homologia com nenhuma seqüência depositada em bancos de genes ou proteínas. (QUADRO 3).

EST	CEPA	Tamanho seqüenciado/ região homóloga	Homologias/ nº de acesso	Programa	Identidade	Pontuação	Probabilidade
BH2	HM1R	251pb/ 1-249	Proteína hipotética <i>Entamoeba histolytica</i> HM-1:IMSS ref XP_655762.1	BLASTX	100%	166	4e-56
BH4	HM1R	474pb/ 104-304	Fosfatase ácida <i>Entamoeba histolytica</i> HM-1:IMSS ref XM_644626.1	BLASTN	96%	283	4e-76
BH6.2	HM1R	182pb/ 47-113	Proteína hipotética <i>Entamoeba histolytica</i> HM-1:IMSS ref XM_643628.1	BLASTN	90%	87.9	2e-17
BH6.4	HM1R	187pb/3-134	Proteína hipotética <i>Entamoeba histolytica</i> HM-1:IMSS ref XM_652098.1	BLASTN	94%	198	4e-51
BH7	HM1R	377pb/ 3-374	Proteína canal de sódio e potássio <i>Entamoeba histolytica</i> HM-1:IMSS ref XP_655083.1	BLASTX	97%	203	4e-51
BH10.19	HM1R	833pb/ 1-617	Proteína hipotética <i>Entamoeba histolytica</i> HM-1:IMSS ref XM_645643.1	BLASTN	98%	402	1e-110
BH10.22	HM1R	414pb/ 162-413	Fator de troca de nucleotídeo Ras guanina <i>Entamoeba histolytica</i> HM1:IMSS ref XP_649781.1	BLASTX	95%	177	2e-50

(Continua)

QUADRO 3: Homologias das ESTs específicas de uma das cepas reisoladas de *E. histolytica*, obtidas por apresentação diferencial de RNA, com seqüências catalogadas em bancos de dados

Resultados

Banda	Cepa	Tamanho seqüenciado/ região homóloga	Homologias/ nº de acesso	Programa	Identidade	Pontuação	Probabilidade
BH11	CSPR	180pb/1-96	Transporte de cálcio ATPase da membrana plasmática <i>Entamoeba histolytica</i> HM-:IMSS ref XP_651287.2	BLASTX	100%	68.2	2e-10
BH12	HM1R	443pb	Homologia insignificante	-	-	-	-
BH17	CSPR	223pb/ 2-199	Proteína hipotética <i>Entamoeba histolytica</i> HM-1:IMSS ref XP_656432.1	BLASTX	100%	117	9e-28
BH18.34	HM1R	255pb/ 3-254	Proteína hipotética <i>Entamoeba histolytica</i> HM-1:IMSS ref XP_001914291.1	BLASTX	94%	409	3e-41
BH18.36	HM1R	102pb/ 3-101	Proteína similar à cdc48 <i>Entamoeba histolytica</i> gb AAF74998.1	BLASTX	64%	25.8	9e-12
BH21	HM1R	600pb	Homologia insignificante	-	-	-	-
BH23	HM1R	115pb/1-115	Canal mecanosensitivo <i>Entamoeba histolytica</i> HM-1:IMSS ref XM_650592.1	BLASTN	100%	213	7e-56

(Conclusão)

QUADRO 3: Homologias das ESTs específicas de uma das cepas reisoladas de *E. histolytica*, obtidas por apresentação diferencial de RNA, com seqüências catalogadas em bancos de dados

Como o genoma da *E. histolytica* já é conhecido, as seqüências que não apresentaram homologia com este parasito, BH12 e BH21, não foram consideradas na confirmação da expressão gênica, pois provavelmente não são seqüências do parasito em estudo. Além disso, estas seqüências não apresentaram ORFs, o que descarta a possibilidade de serem novos genes, também não foram homologas a nenhuma EST depositada em banco de dados. Assim sendo, estas seqüências provavelmente são artefatos das técnicas aplicadas.

Dentre as seqüências tidas como específicas das cepas reisoladas de *E. histolytica*, seis apresentaram homologia com genes que codificam proteínas hipotéticas. As seqüências de aminoácidos destas proteínas, encontradas no banco de dados, foram submetidas à predição de peptídeo sinal pelo programa *SignalP 3.0 Server* disponível na internet (<http://www.cbs.dtu.dk/services>) e identificação de sinal para âncora de GPI pelo programa *GPI-SOM*, também disponível na internet (<http://gpi.unibe.ch>). Três destas proteínas apresentaram predição para peptídeo sinal, BH6.2, BH6.4, BH10.19, e nenhuma apresentou predição para âncora de GPI.

5.6 Confirmação da diferença na expressão dos genes, referentes às ESTs seqüenciadas, entre as cepas atenuadas e reisoladas de *E. histolytica*

5.6.1 Construção dos iniciadores e avaliação da amplificação dos genes selecionados por RT-PCR

Após o sequenciamento e análise de homologias das ESTs selecionadas como específicas das cepas reisoladas de *E. histolytica* com seqüências depositadas em banco de dados, foram desenhados iniciadores específicos para

confirmação da diferença de expressão de tais ESTs entre as cepas, por PCR em tempo real e RT-PCR semiquantitativo.

As seqüências obtidas não permitiram a obtenção de iniciadores viáveis, pois eram pequenas e ricas em repetições de nucleotídeos adenina e timina, o que favorece a formação de dímeros e grampos entre os iniciadores, por isso foram utilizadas para a síntese dos iniciadores as seqüências depositadas em banco de dados homologas às seqüências tidas como específicas das cepas reisoladas. A partir de então, todos os estudos de diferença de expressão foram feitos para os genes referentes às ESTs seqüenciadas. Os iniciadores foram desenhados no programa *Primer Express*® v2.0, da empresa *Applied Biosystems*, e sintetizados pela companhia *Genetix*. Os tamanhos dos fragmentos produzidos na reação de RT-PCR variaram de 70 a 190pb. Além disso, foi sintetizado um par de iniciador de um gene constitutivo, gene da proteína actina, desenhado a partir da seqüência do gene depositada no banco de dados sob o código de acesso XP_648828.1 produzindo um fragmento de 90pb. As seqüências dos iniciadores sintetizados, assim como seus nomes e temperaturas de anelamento estão apresentados no APÊNDICE B.

A análise da eficiência da amplificação dos iniciadores foi realizada, em um primeiro momento, através de uma PCR utilizando como molde o DNA da cepa HM1 atenuada de *E. histolytica*, que funcionou como controle positivo, já que as seqüências depositadas em banco de dados, que foram utilizadas na síntese dos iniciadores foram provenientes desta cepa, e o cDNA da cepa HM1 reisolada de *E. histolytica*. Dentre todos os iniciadores testados, somente o desenhado para o gene referente à EST BH23 não foi capaz de anelar ao DNA ou ao cDNA e amplificar o fragmento de interesse, para avaliar a expressão deste seria necessário desenhar um novo par de iniciador, por isso o estudo desta EST foi interrompido nesta etapa.

Para os demais iniciadores foi observada amplificação tanto para o cDNA quanto para o DNA (FIGURA 5).

Os pares de iniciadores sintetizados, também, foram testados em uma reação de RT-PCR para todas as cepas estudadas. O resultado da amplificação do gene constitutivo e alguns dos iniciadores estão apresentados nas FIGURAS 6 e 7. Todos os genes foram amplificadas com êxito, a partir desses resultados foi realizada a análise da diferença de expressão dos genes selecionados entre as cepas atenuadas e reisoladas de *E. histolytica* por RT-PCR em tempo real e RT-PCR semiquantitativa.

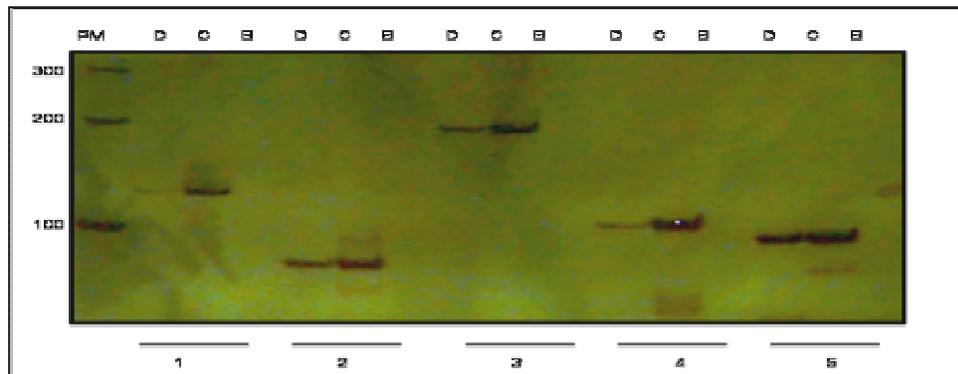


FIGURA 5: Análise dos iniciadores sintetizados utilizando como molde DNA da cepa HM1 atenuada e cDNA da cepa HM1 reisolada de *E. histolytica*, apresentado em gel de poliacrilamida 6%. D: DNA da cepa HM1 atenuada; C: cDNA da cepa HM1 reisolada; B: Branco e PM: Padrão de peso molecular em pares de base (pb). Genes referentes às ESTs - 1: BH7; 2: BH18.36; 3: BH2, 4: BH17; 5: BH18.34

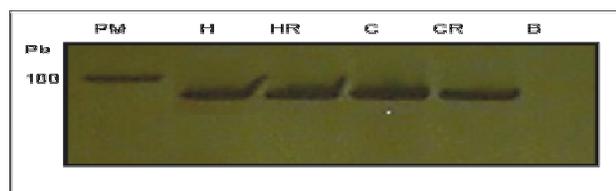


FIGURA 6: RT-PCR com iniciadores do gene constitutivo – gene da proteína actina – das cepas de *E. histolytica*, apresentado em gel de poliacrilamida 6%. H: cDNA da cepa HM1 atenuada; HR: cDNA da cepa HM1 reisolada; C: cDNA da cepa CSP atenuada; CR: cDNA da cepa CSP reisolada; B: Branco e PM: Padrão de peso molecular em pares de base (pb)

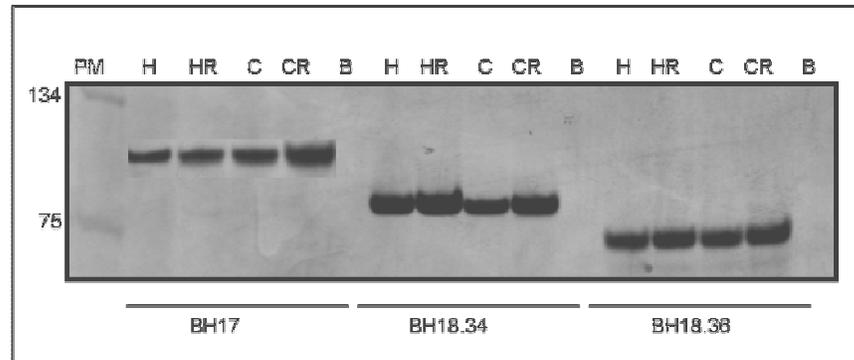


FIGURA 7: RT-PCR com iniciadores sintetizados para os genes referentes às ESTs selecionadas como específicas das cepas reisoladas de *E. histolytica* que foram seqüenciadas, apresentado em gel de poliacrilamida 6%. H: cDNA da cepa HM1 atenuada; HR: cDNA da cepa HM1 reisolada; C: cDNA da cepa CSP atenuada; CR: cDNA da cepa CSP reisolada; B: Branco e PM: Padrão de peso molecular em pares de base (pb)

5.6.2 PCR em tempo real

A expressão de todos os genes foi avaliada pela técnica de PCR em tempo real. A eficiência das reações de PCR em tempo real, realizadas com os 11 genes testados e com o gene constitutivo, foi verificada através da análise das curvas de amplificação de cada reação. Foi feita uma curva de concentração de cDNA utilizando os iniciadores para o gene constitutivo e para o gene referente à EST BH17 para definir a quantidade de cDNA a ser usada nas reações. Como não houve diferença na amplificação, optou-se por realizar a técnica com a menor concentração.

Os genes foram avaliados comparando cada cepa atenuada com sua respectiva reisolada, nem todas as reações apresentaram resultado satisfatório FIGURA 8.

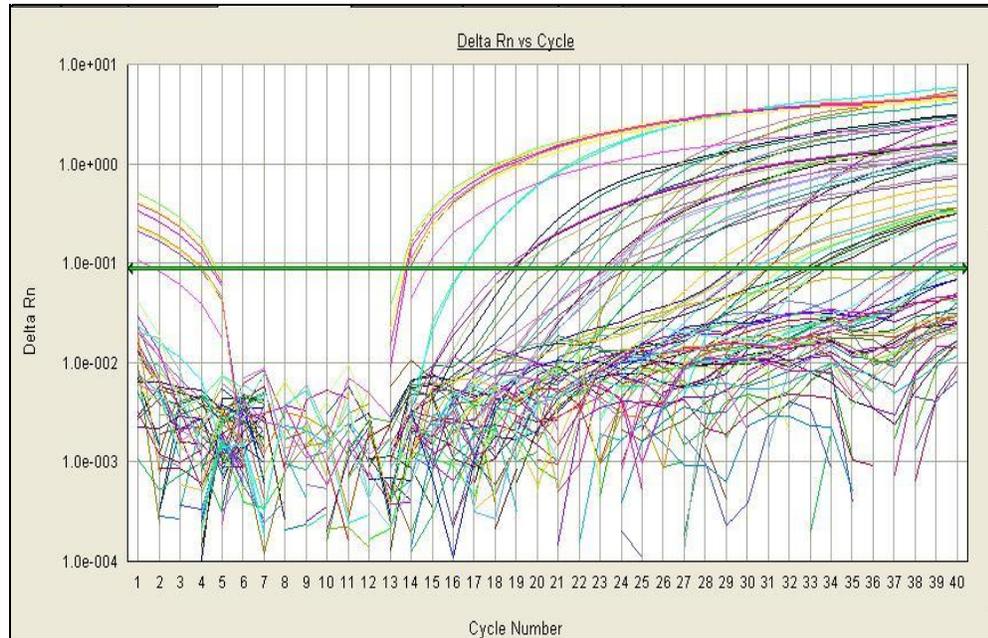


FIGURA 8: Curvas de amplificação da PCR em tempo real realizada para confirmar a expressão diferencial dos genes referentes às ESTs selecionadas como específicas das cepas reisoladas de *E. histolytica*.

Para cepas CSP atenuada e reisolada, seis dentre os 11 genes avaliados apresentaram curva de amplificação, já para as cepas HM1 só foi possível detectar a expressão de dois. Esses resultados sugeriram que para os demais genes testados não havia ocorrido a amplificação, entretanto ao se realizar a eletroforese do produto das reações foi observado que a amplificação ocorreu, porém essa não foi capaz de ser detectada pelo aparelho FIGURA 9.

As análises foram repetidas, inclusive em aparelho distinto e novo Kit *Power SYBR® Green*, porém o perfil de detecção se manteve, sugerindo que possa ter havido interferência na ligação do fluoróforo com a dupla fita de DNA, o que prejudicou a emissão de fluorescência e, conseqüentemente, a detecção do produto amplificado. Esse fato demonstra que a PCR em tempo real nem sempre apresenta

resultados completamente confiáveis, fazendo com que a análise visual em gel venha a ser um teste auxiliar a essa metodologia.

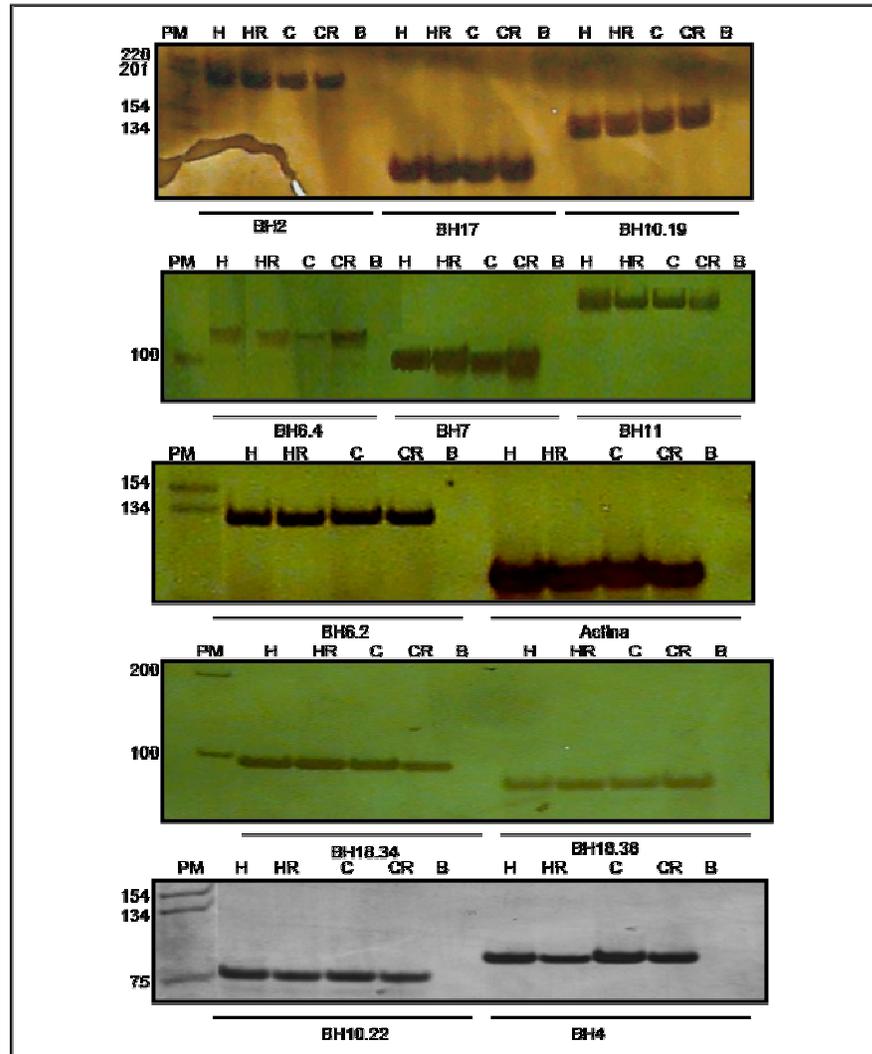


FIGURA 9: Amplificação os genes referentes às ESTs selecionadas como específicas das cepas reisoladas de *E. histolytica* pela PCR em tempo real, apresentado em gel de poliacrilamida 6%. H: cDNA da cepa HM1 atenuada; HR: cDNA da cepa HM1 reisolada; C: cDNA da cepa CSP atenuada; CR: cDNA da cepa CSP reisolada; B: Branco e PM: Padrão de peso molecular em pares de base (pb)

Para os genes que apresentaram curvas de amplificação, foi feita análise da curva de dissociação de cada grupo de reação - cepa atenuada, cepa reisolada e

branco - a fim de verificar se a amplificação foi específica. Nenhum dos genes apresentou amplificação inespecífica. Depois de verificar a especificidade das reações de PCR em tempo real, foram feitas análise de quantificação relativa das amplificações.

A análise de quantificação relativa mostrou que os seis genes que apresentaram curva de amplificação para as cepas CSP atenuada e reisolada e as duas ESTs para as cepas HM1 atenuada e reisolada tiveram sua expressão diferencial confirmada. Para as cepas CSP foram confirmadas as expressões dos genes referentes às ESTs BH2, BH17, BH18.34, BH18.36, BH10.19, BH4, e para as cepas HM1, os referentes às ESTs BH18.34, BH18.36. Apesar de nenhum ter apresentado expressão específica das cepas reisoladas, todas as ESTs confirmadas foram mais expressas nestas.

A FIGURA 10 e o QUADRO 4 apresentam as diferenças de expressão dos genes detectados entre as cepas atenuados e reisoladas.

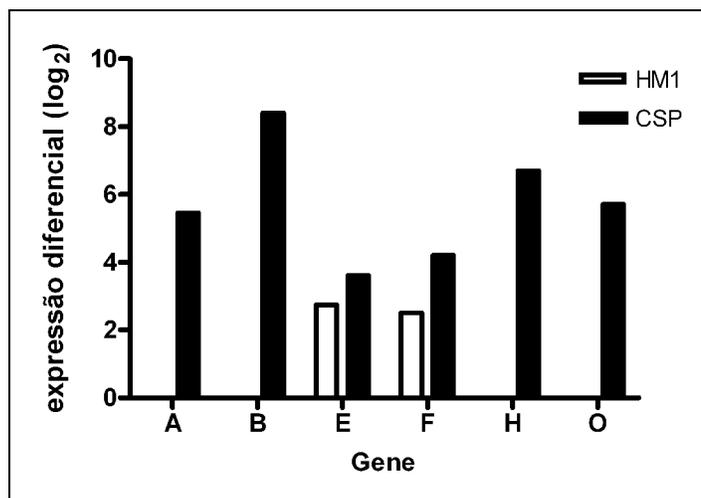


FIGURA 10: Gráfico gerado a partir dos resultados obtidos na PCR em tempo real apresentando a diferença de expressão entre as cepas reisoladas e atenuadas de *E. histolytica*. Genes referentes às ESTs - A: BH2; B: BH17; E: BH18.34, F: BH18.36; H: BH10.19; O: BH4.

A diferença para os genes que tiveram a expressão diferencial confirmada, variou de 5,7 vezes (BH18.36 para a cepa HM1R) a 339 vezes (BH17 para a cepa CSPR).

Gene referente à EST:	Cepa	Quantificação relativa	
		atenuada	reisolada
BH2	CSP	1x	43,9x
BH17	CSP	1x	339x
BH18.34	CSP	1x	12,1x
BH18.36	CSP	1x	18,4x
BH10.19	CSP	1x	103,6x
BH4	CSP	1x	52,3x
BH18.34	HM1	1x	6,7x
BH18.36	HM1	1x	5,7x

QUADRO 4: Diferença de expressão entre cepas atenuadas e reisoladas de *E. histolytica* para os genes que apresentaram amplificação na PCR em tempo real

5.6.3 RT-PCR semiquantitativa

Devido aos problemas de detecção de amplificação de alguns genes pela PCR em tempo real, foram realizadas reações de RT-PCR semiquantitativa para confirmação e possível quantificação da expressão diferencial entre as cepas reisoladas e atenuadas de *E. histolytica*. Os genes referentes às ESTs BH18.34 e BH18.36 não foram analisados neste procedimento, pois já tiveram a confirmação da diferença de expressão por RT-PCR em tempo real para ambas as cepas avaliadas.

Na reação de RT-PCR seimi quantitativa, além do par de iniciadores específico do gene a ter confirmada a diferença de expressão, foi utilizado um par de iniciadores de um gene constitutivo (controle), para que haja uma comparação entre a amplificação do gene testado e o gene constitutivo, e assim demonstrar a diferença de expressão entre as amostras analisadas. Neste estudo, assim como na RT-PCR em tempo real, foram utilizados como controle, iniciadores do gene da proteína actina.

A análise da diferença de expressão entre as cepas atenuadas e reisoladas foi realizada através do cálculo do valor de densidade integrada, no programa *AlphaEaseFc™ Software* (AlphaDigiDoc 1201) versão 3.3.0. Para encontrar esse valor, dividiu-se a intensidade da banda correspondente à cepa reisolada pela cepa atenuada e multiplicou-se pela razão da intensidade da banda referente a actina da cepa atenuada pela cepa reisolada para os ciclos analisados.

Os três genes testados nas reações *duplex* de RT-PCR seimi quantitativa – referentes às ESTs BH6, BH11, BH17 – foram mais expressas nas cepas reisoladas de *E. histolytica* (FIGURA 11).

Com os outros seis genes testados não foi possível realizar reações *duplex*, pois somente apresentaram amplificação da banda correspondente ao gene da actina. A amplificação do gene foi inibida, provavelmente por ter ocorrido interação entre os dois pares de iniciadores testados na reação, iniciador teste e do gene constitutivo, comprometendo a amplificação do fragmento esperado. Por isso, foram feitas reações de RT-PCR seimi quantitativas separadas, uma reação com o par de iniciador específico do gene e outra com o par de iniciador específico para o gene constitutivo (FIGURA 12 e 13). Os valores da diferença de expressão de cada gene testado encontram-se no QUADRO 5.

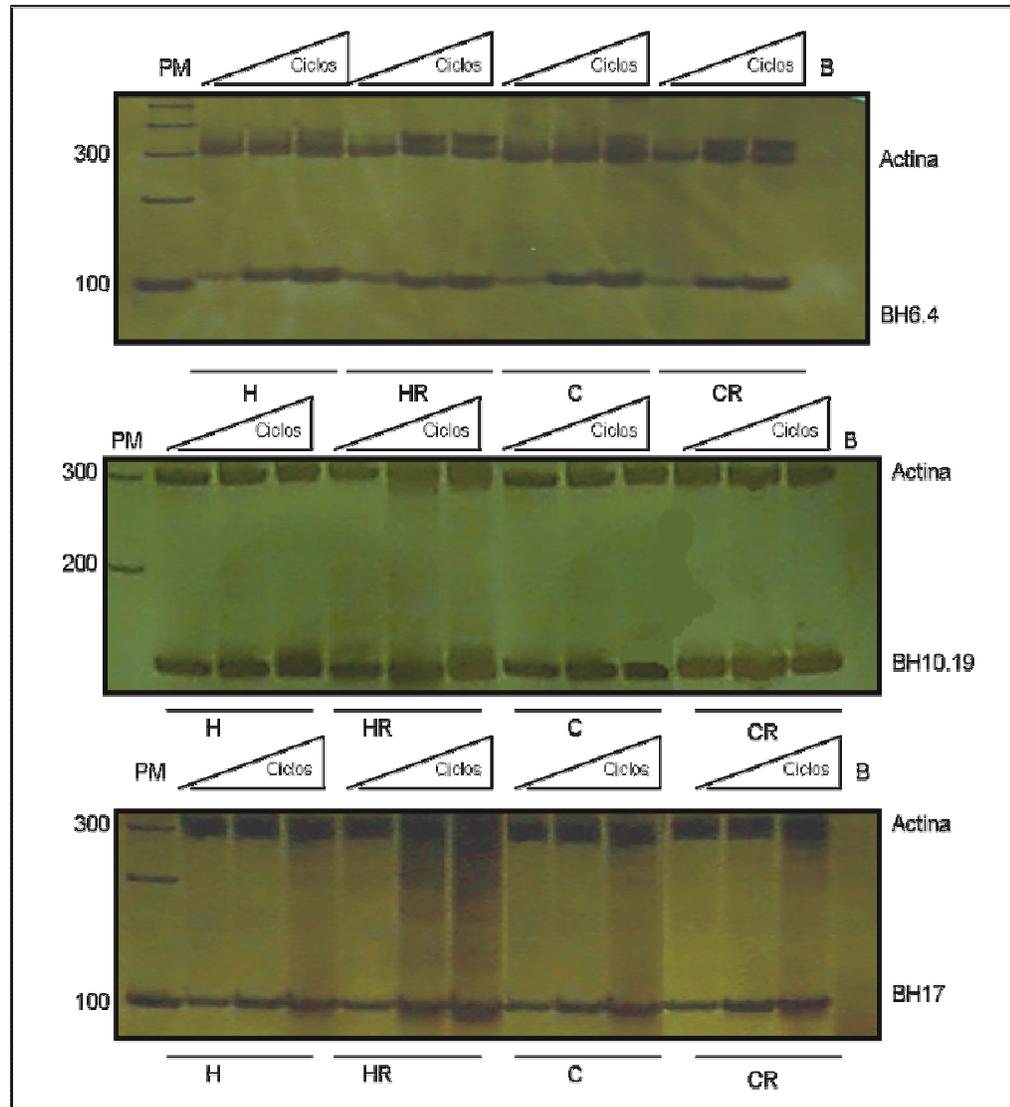


FIGURA 11: Reação *duplex* de RT-PCR semiquantitativa para confirmação da expressão diferencial dos genes referentes às ESTs tidas como específicas das cepas reisoladas de *E. histolytica* apresentado em gel de poliacrilamida 6%. Amostras de cepas reisoladas e atenuadas retiradas nos ciclos 25, 30, 36. H: Produto amplificado da cepa HM1 atenuada; HR: Produto amplificado da cepa HM1 reisolada; C: Produto amplificado da cepa CSP atenuada; CR: Produto amplificado da cepa CSP reisolada B: Branco e PM: Padrão de peso molecular em pares de base (pb)

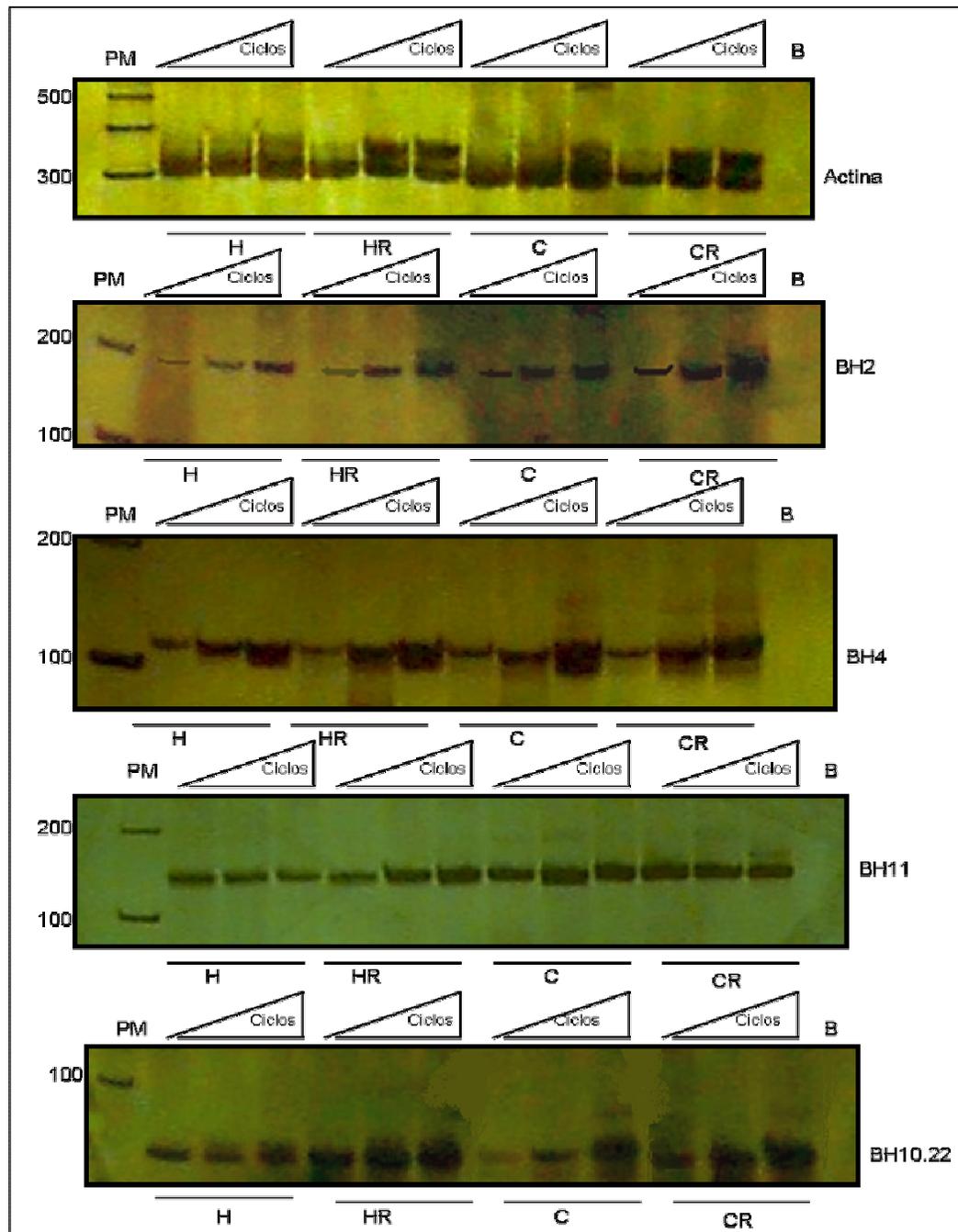


FIGURA 12: RT-PCR semiquantitativa para confirmação da expressão diferencial dos genes referentes às ESTs tidas como específicas das cepas reisoladas de *E. histolytica* apresentado em gel de poliacrilamida 6%. Amostras de cepas reisoladas e atenuadas retiradas nos ciclos 25, 30, 36. H: Produto amplificado da cepa HM1 atenuada; HR: Produto amplificado da cepa HM1 reisolada; C: Produto amplificado da cepa CSP atenuada; CR: Produto amplificado da cepa CSP reisolada B: Branco e PM: Padrão de peso molecular em pares de base (pb)

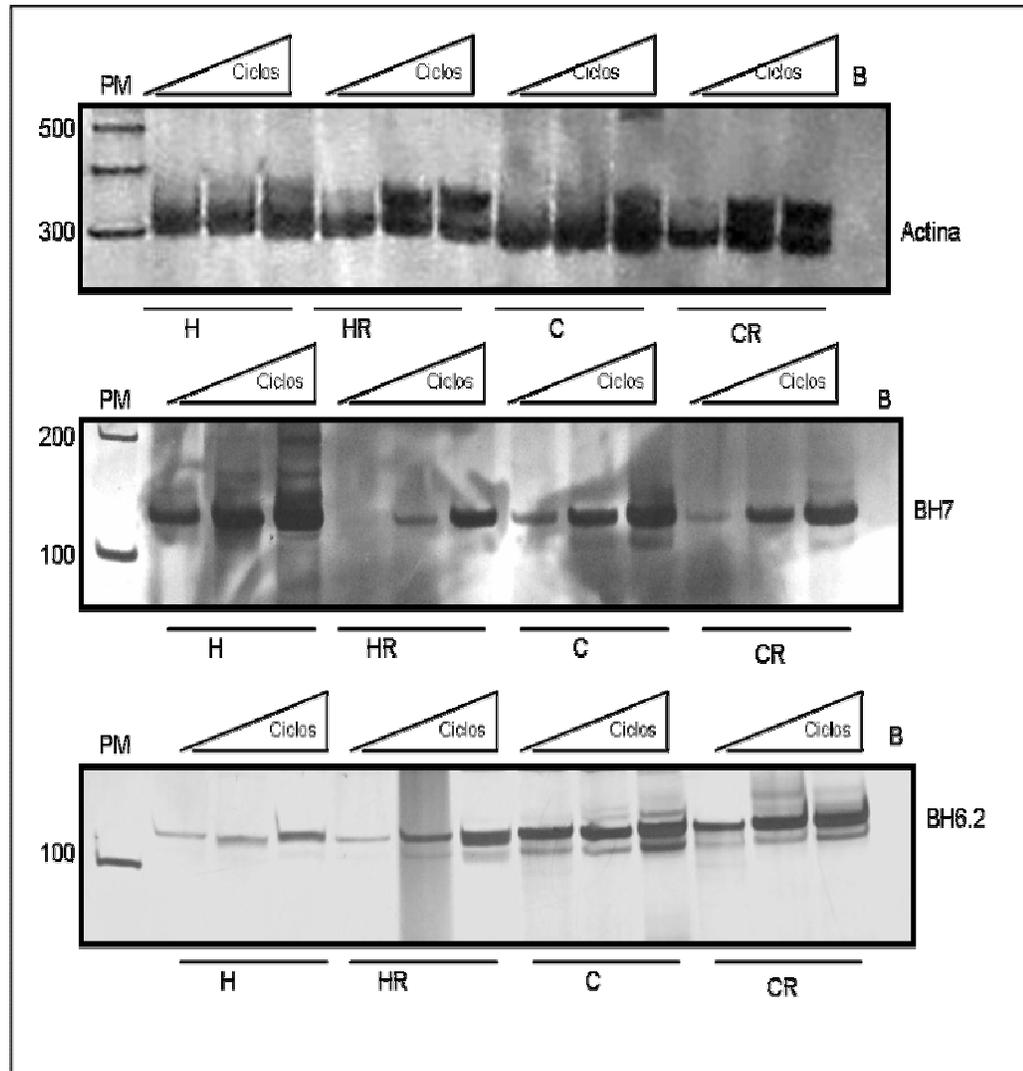


FIGURA 13: RT-PCR semiquantitativa para confirmação da expressão diferencial dos genes referentes às ESTs tidas como específicas das cepas reisoladas de *E. histolytica* apresentado em gel de poliacrilamida 6%. Amostras de cepas reisoladas e atenuadas retiradas nos ciclos 25, 30, 36. H: Produto amplificado da cepa HM1 atenuada; HR: Produto amplificado da cepa HM1 reisolada; C: Produto amplificado da cepa CSP atenuada; CR: Produto amplificado da cepa CSP reisolada B: Branco e PM: Padrão de peso molecular em pares de base (pb)

Embora nenhuma EST tenha sido específica das cepas reisoladas, cinco foram mais expressas nestas, com uma diferença de expressão variando de 1,54 a

3,8, de acordo com o QUADRO 5. O gene referente à EST BH7 apresentou resultado contrário ao esperado, foi mais expressa nas cepas atenuadas de *E. histolytica*, como pode ser observado na FIGURA 12.

Gene referente à EST:	Quantificação por RT-PCR semiquantitativa			
	HM1	HM1R	CSP	CSPR
Actina	1,02x	1x	1,21X	1x
BH2	1x	1,54x	1x	1,62x
BH4	1x	1,84x	1x	2,78x
BH6.2	1x	1,94x	1x	1,85x
BH6.4	1x	3,80x	1x	2,70x
BH7	2,1x	1x	1,85x	1x
BH10.19	1x	1,72x	1x	1,93x
BH10.22	1x	1,90x	1x	2,20x
BH11	1x	1,87x	1x	1,73x
BH17	1x	2,40x	1x	2,20x

QUADRO 5: Diferença de expressão das ESTs entre as cepas atenuadas e reisoladas de *E. histolytica* por RT-PCR semiquantitativa

5.6.4 Concordância entre os resultados obtidos com PCR em tempo real e RT-PCR semiquantitativa.

Os genes confirmados, por RT-PCR em tempo real e RT-PCR semiquantitativa, como mais expressos nas cepas reisoladas de *E. histolytica* foram

os que codificam proteínas hipotéticas – referentes às ESTs BH2, BH6.2, BH6.4, BH10.19, BH17 e BH18.34 – fosfatase ácida – referente à EST BH4 – fator de troca de nucleotídeo Ras guanina – referente à EST BH10.22 – enzima envolvida no transporte de cálcio – referente à EST BH11– e proteína similar à cdc48 – referente à EST BH18.36.

Os resultados obtidos nos experimentos de confirmação da expressão diferencial dos genes referentes às ESTs entre as cepas atenuadas e reisoladas de *E. histolytica*, pela reação de RT-PCR semiquantitativa, foi coerente com os encontrados na RT-PCR em tempo real QUADRO 6. Embora o último seja mais sensível e preciso, a RT-PCR semiquantitativa foi capaz de detectar diferença de expressão em um maior número de genes. Como a análise semiquantitativa é menos robusta, os valores de diferença de expressão tornam-se menores, o que pode ser observado para o gene referente à EST BH17, que foi quantificada em 339 vezes mais expressa, na cepa CSP reisolada, pela RT-PCR em tempo real e apenas 2,20 vezes mais expressa nesta mesma cepa pela RT-PCR semiquantitativa.

O mais importante nesses resultados é que os dez genes, confirmados pela RT-PCR semiquantitativa, foram mais expressos em ambas as cepas reisoladas, assim como os genes referentes às ESTs BH18.34 e BH18.36 pelo RT-PCR em tempo real. A maior expressão do gene referente à EST BH7 pelas cepas atenuadas indica que, durante a apresentação diferencial de RNA, este foi um resultado falso positivo, característica intrínseca da técnica, o que faz com que seja necessária a confirmação por uma ou mais técnicas.

Gene referente à EST:	Diferença de expressão Confirmada na RT-PCR semiquantitativa		Diferença de expressão Confirmada na PCR em tempo real	
	HM1/HM1R	CSP/CSPR	HM1/HM1R	CSP/CSPR
BH2	sim	sim	não	sim
BH4	sim	sim	não	sim
BH6.2	sim	sim	não	não
BH6.4	sim	sim	não	não
BH7	sim	sim	não	não
BH10.19	sim	sim	não	sim
BH10.22	sim	sim	não	não
BH11	sim	sim	não	não
BH17	sim	sim	não	sim
BH18.34	não realizada	não realizada	sim	sim
BH18.36	não realizada	não realizada	sim	sim

QUADRO 6: Comparação dos resultados obtidos por RT-PCR semiquantitativa e RT-PCR em tempo real

Todas as ESTs selecionadas na apresentação diferencial de RNA foram consideradas específicas de uma das cepas reisoladas, resultado que não se confirmou pelas técnicas de avaliação da diferença de expressão, foi observado para todos os genes, referentes às ESTs seqüenciadas, expressão em todas as cepas, porém maior nas cepas reisoladas, exceto para a EST BH7. Isso já era esperado, pois a reação de apresentação diferencial de RNA é uma PCR de baixa stringência e feita com iniciadores aleatórios, o que torna seus resultados parcialmente confiáveis. Além disso, estas ESTs podem ser transcritos menos

abundante e por isso mais difícil de serem detectadas em todas as cepas na técnica de apresentação diferencial de RNA.

5.7 Avaliação da expressão de genes potencialmente relacionados à virulência de *E. histolytica*

Genes identificados como mais expressos em trofozoítos provenientes da lesão em fígado de hamster em um projeto anterior tiveram a expressão avaliada na cepa CSP atenuada e reisolada. Iniciadores foram desenhados a partir das seqüências depositadas em banco de dados e foram sintetizados pela empresa BIOGENETX, as seqüências dos iniciadores, assim como seus nomes e temperaturas de anelamento estão apresentadas no APÊNDICE C.

Estes iniciadores foram testados em uma RT-PCR convencional com as amostras de cDNA das cepas CSP de *E. histolytica* atenuada e reisolada, todos os iniciadores apresentaram resultados satisfatórios como ilustrado pela FIGURA 14.

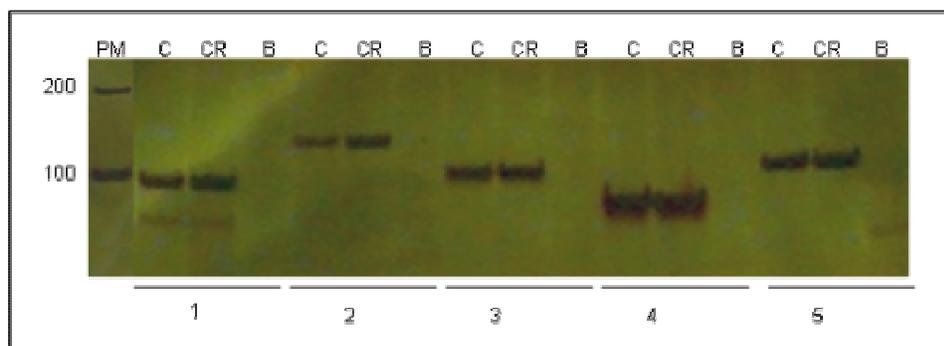


FIGURA 14: RT-PCR com iniciadores sintetizados para avaliar a expressão dos genes tidos como mais expressos em trofozoítos provenientes de lesão hepática de hamster para a cepa CSP atenuada e reisolada de *E. histolytica* apresentada em gel de poliacrilamida 6%. C: cDNA da cepa CSP; CR: cDNA da cepa CSP reisolada; B: Branco e PM: Padrão de peso molecular em pares de base (pb). 1: BE17b; 2: BE17a; 3: BE18c; 4: gene da proteína actina; 5: BE18d.

Após verificar a eficiência de amplificação dos iniciadores sintetizados, foi realizada uma RT-PCR em tempo real para quantificar a expressão desses genes nas duas amostras de cDNA e compará-las. Também foi utilizado nesse experimento o gene que codifica a proteína actina como gene constitutivo para a análise de quantificação relativa.

As curvas de amplificação e dissociação foram analisadas e verificou-se a amplificação específica de fragmentos de DNA.

A partir da análise de quantificação relativa foi confirmado maior expressão de três dentre os genes avaliados pela cepa CSP reisolada de *E. histolytica*, sendo o gene da acetiltransferase 22,7 vezes mais expresso, o da triptofanil tRNA sintetase 55,3 vezes e o da proteína diaphaunos 14,7 vezes. A expressão do gene da cisteil proteinase 1 foi considerada equivalente entre as cepas CSP atenuada e reisolada de *E. histolytica*, pois na técnica PCR em tempo real considera-se que houve diferença de expressão quando esse valor é superior a duas vezes, dados apresentados no QUADRO 7.

Nome do gene	Cepa	Quantificação relativa		Expressão diferencial
		atenuada	reisolada	
Acetiltransferase	CSP	1X	22,7X	confirmada
Triptofanil tRNA sintetase	CSP	1X	55,3X	confirmada
Proteína diaphaunos	CSP	1X	14,7X	confirmada
Cisteil proteinase 1	CSP	1X	1,7X	equivalente

QUADRO 7: Diferença de expressão entre a cepa CSP atenuada e reisolada de *E. histolytica* para os genes tidos como mais expressos em trofozoítos retirados de lesão em fígado de hamster, que apresentaram amplificação específica na PCR em tempo real

A FIGURA 15 apresenta o gráfico com as diferenças de expressão dos genes tidos como mais expressos por trofozoítos provenientes de lesão hepática de hamster entre as cepas CSP atenuada e reisolada de *E. histolytica*.

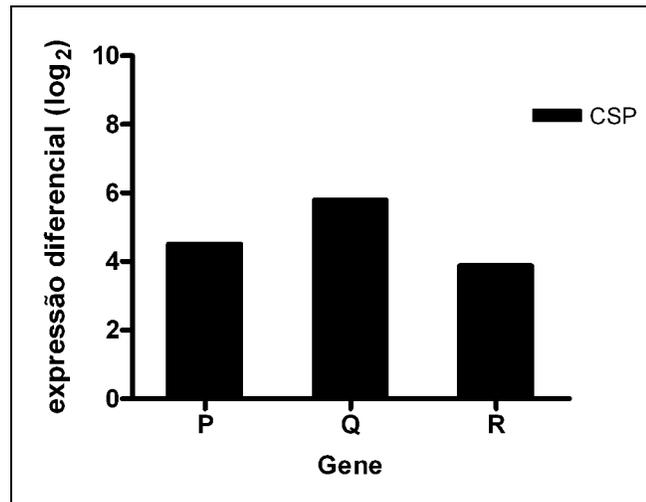


FIGURA 15: Gráfico gerado a partir dos resultados obtidos na PCR em tempo real apresentando a diferença de expressão dos genes, selecionados em trofozoítos retirados de lesão em fígado de hamster, entre a cepa CSP reisolada e atenuada de *E. histolytica*. P: Acetiltransferase; Q: Triptofanil tRNA sintetase; R: Proteína diaphaunos.

6 DISCUSSÃO

Estudos do perfil de transcrição e de alteração na expressão gênica em diferentes condições são importantes para a compreensão da fisiologia e patogênica de parasitos como *E. histolytica*, incluindo regulação do ciclo de vida, diferenciação de estágios, desenvolvimento e invasão tecidual. Nesse contexto, a identificação e caracterização da expressão diferencial de genes podem desvendar importantes marcadores moleculares nos eventos supracitados.

Numerosas técnicas podem ser usadas para identificar genes diferencialmente expressos, estas incluem apresentação diferencial de RNA, hibridização subtrativa de bibliotecas de cDNA, SAGE – *serial analysis of gene expression* e microarranjos de cDNA (KANG et al.,1998; PARDINAS et al.,1998; PATHAK & KANUNGO, 2007). Para a escolha da técnica a ser utilizada nos estudos de expressão diferencial deve-se considerar as vantagens e desvantagens de cada uma bem como os recursos financeiros disponíveis.

No presente trabalho, a técnica de apresentação diferencial de RNA, descrita simultaneamente por Liang e Pardee (1992) e Welsh e colaboradores (1992), foi utilizada para o estudo da expressão diferencial de genes entre culturas não virulentas, cepas atenuadas, e culturas virulentas, cepas reisoladas, de cepas de *E. histolytica*.

Em vários estudos de expressão diferencial de genes, essa técnica foi aplicada, como no estudo de diferenciação celular (CALLARD et al., 1994), ciclo celular (NAG & AXELROD, 1998), resposta inflamatória (SILVA et al., 1999), câncer (LIANG, et al. 1992), resistência e alvos para drogas (LEE et al., 1997), diferenças

ambientais (MEYER et al., 2005), estágios biológicos (RABELO, et al. 2000), dentre outras.

Esta técnica permite que um vasto número de diferentes transcritos seja analisado a partir de uma pequena quantidade de RNA (PATHAK & KANUNGO, 2007), também possibilita a comparação da expressão gênica de várias amostras simultaneamente e permite identificar e isolar tanto genes com baixa expressão quanto os com expressão aumentada na mesma reação. Além disso, é uma técnica simples, rápida e sensível. Entretanto, como qualquer método, apresenta limitações, nesta a principal desvantagem são os resultados falsos positivos (MATZ & LUKYANOV, 1998; STURTEVANT, 2000; ZHANG et al., 1998). Estratégias para minimizar os falsos positivos vem sendo empregadas, dentre elas estão o tratamento das amostras de RNA com DNase (LIANG et al., 1993), o uso de iniciadores maiores e o aumento da temperatura de anelamento do iniciador após o primeiro ciclo de amplificação (ZHAO et al., 1995).

A confirmação da diferença de expressão encontrada na apresentação diferencial de RNA pode ser realizada por métodos, como RT-PCR semiquantitativa (MIRANDA et al., 2006), *Northern blot* (BRUCHHAUS et al., 2002) e RT-PCR em tempo real (RAJEEVAN et al., 2001; FENG et al., 2006; COSTA et al. 2008).

A PCR (*polymerase chain reaction*) em tempo real foi desenvolvida em 1992 por Higuchi e colaboradores a partir do refinamento da PCR original (KUBISTA et al., 2006). Esta técnica permite a simultânea amplificação e quantificação de seqüências específica de DNA, sendo mais sensível que outros métodos, como a densitometria de bandas (SCHMITTGEN et al., 2000).

As utilizações típicas da PCR em tempo real incluem detecção de patógenos, análise de expressão gênica, genotipagem, análise de aberrações cromossômicas

dentre outras (KUBISTA et al., 2006). Dentre as vantagens da técnica, estão a rapidez, a sensibilidade, o uso de sistemas fechados, o que reduz possíveis variações e contaminações, a capacidade de realização de reações *multiplex* e o fato de não ser necessário outras manipulações após a PCR (SCHMITTGEN, 2001). As principais variáveis que influenciam a análise da expressão gênica por PCR em tempo real são a qualidade do RNA (RAJEEVAN et al., 2001), marcador de fluorescência específico ou não específico, análise dos dados (BUSTIN & NOLAN, 2004) e a escolha de um controle interno ideal, que deve ser um gene com níveis de expressão constante entre diferentes tecidos, de qualquer um mesmo, em todos os estágios, e não deve ser afetado por tratamentos experimentais (BUSTIN, 2000). Como controle interno, foi utilizado, neste trabalho, o gene que codifica a proteína actina, já utilizado em estudos de comparação de expressão gênica entre espécies e cepas de *Entamoeba* (MACFARLANE & SINGH, 2006).

Na RT-PCR deste trabalho, foi utilizado um marcador de fluorescência não específico, o SYBR green, que se liga à dupla fita de DNA (KUBISTA et al., 2006), este apresenta em sua estrutura um nitrogênio quaternário, carga positiva, responsável pela ligação ao DNA que apresenta carga negativa. Um possível interferente na ligação do SYBR à molécula de DNA pode ser a quantidade e características químicas de íons presentes nas amostras, estes poderiam competir com o marcador pelos sítios de ligação ao DNA, tornando a intensidade da fluorescência menor e para genes pouco expressos, a detecção se tornaria inviável. Embora não haja relatos na literatura desta interferência, essa pode ter ocorrido neste trabalho, uma vez que as amplificações aparentemente negativas pelo PCR em tempo real, ou seja, que não produziram leituras, apresentaram produtos, quando essas mesmas reações foram analisadas em gel de poliacrilamida. O mais

provável foi uma deficiência na leitura desses transcritos especificamente, talvez por uma falha na incorporação do marcador fluorescente, outras possíveis variáveis como calibração do aparelho e problemas relacionados ao kit *Power SYBR® Green* foram descartadas.

A expressão diferencial pode ser avaliada por dois métodos de análise, quantificação absoluta e quantificação relativa, a primeira determina o número de cópias do transcrito em estudo e, a segunda, demonstra a variação da expressão de um gene entre as amostras analisadas (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). A quantificação relativa foi adotada neste trabalho, pois o objetivo do estudo era verificar maior expressão de alguns genes nas cepas reisoladas de *E. histolytica*. A confirmação da maior expressão de alguns genes foi considerada quando uma amostra – cepa atenuada ou cepa reisolada – apresentou diferença superior a duas vezes em relação à outra, como sugerido por Rajeevan e colaboradores (2001). Este parâmetro é relativamente arbitrário, pois a relevância da expressão diferencial de um gene depende das características funcionais e biológicas do mesmo.

Na área da Parasitologia, estudos semelhantes a este, onde genes diferencialmente expressos foram selecionados pela técnica de apresentação diferencial de RNA e confirmados por PCR em tempo real, já têm sido descritos. Ouakad e colaboradores (2007) confirmaram oito, dos 13 genes selecionados de *Leishmania major*, como mais expressos em amastigotas, quando comparadas com promastigotas. Além disso, Michalski e Weil (1999) identificaram a maior expressão de seis, dos 22 genes testados para *Brugia malayi*, que foram confirmados por RT-PCR e, posteriormente, por PCR em tempo real (LI et al., 2004).

O estudo da expressão gênica de *E. histolytica* de Bruchhaus e colaboradores (2002), demonstrou aumento na expressão de genes que codificam proteínas

associadas à resposta ao estresse, regulação da transcrição e tráfico vesicular em trofozoítos cultivados em temperatura elevada e trofozoítos com virulência ativada, quando comparados à trofozoítos de cultura. Baldeiras-Renteiras e colaboradores (2007), utilizando a técnica de apresentação diferencial de genes, também encontraram diferenças na transcrição gênica entre culturas virulentas e não virulentas de *E. histolytica*, foram seqüenciados oito possíveis genes mais expressos na cultura virulenta. Da mesma forma, o estudo do transcriptoma, por microarranjos, deste parasito realizado por Davis e colaboradores (2007) comparando cepa virulenta HM1:IMSS com não virulenta, Rahman, permitiu detectar um enorme número de genes que são diferencialmente expressos entre as cepas. Esses resultados, bem como os encontrados neste trabalho, suportam a hipótese de que a invasão tecidual e a formação do abscesso hepático requerem regulação e ação sincronizada de várias proteínas da ameba, ou seja, as dificuldades enfrentadas pelos trofozoítos de *E. histolytica* durante a invasão do epitélio intestinal e no tecido hepático, principalmente na formação do abscesso, exige um forte processo adaptativo, que requer uma específica regulação de um grande número de genes.

Neste estudo, foram selecionadas, inicialmente, 29 ESTs tidas como específicas de uma das cepas reisoladas de *E. histolytica*, sendo seis da cepa CSPR, dezenove da HM1R e quatro comuns à CSPR e HM1R. Após a clonagem, seqüenciamento e busca de homologias, 11 genes tiveram sua expressão diferencial avaliadas na PCR em tempo real e RT-PCR semiquantitativa, devido à perda de algumas ESTs por falhas na reamplificação, falta de homologia e incapacidade do iniciador sintetizado se anelar ao gene esperado.

Dos 11 genes avaliados, dez foram mais expressos em ambas as cepas reisoladas de *E. histolytica* e uma mais expressa nas cepas atenuadas. Em um

estudo em que foi aplicada metodologia semelhante, Costa e colaboradores (2008) confirmaram a expressão diferencial, por RT-PCR em tempo real, de nove ESTs entre machos e fêmeas de *Ancylostoma braziliense*, sendo sete específicas ou mais expressas em machos e duas em fêmeas. Essas foram provenientes de 18 ESTs selecionadas na apresentação diferencial de RNA (COSTA et al., 2008).

Neste trabalho, a diferença de expressão foi analisada por duas metodologias. Na RT-PCR em tempo real, devido a problemas na detecção dos produtos amplificados, principalmente os da cepa HM1 atenuada e reisolada na qual apenas dois genes tiveram a diferença de expressão confirmada, enquanto para a cepa CSP reisolada e atenuada seis tiveram a diferença de expressão confirmada. Na RT-PCR semiquantitativa foi possível confirmar a diferença de expressão para todos os genes avaliados, foi encontrado aumento na expressão de oito genes nas cepas reisoladas e um nas cepas atenuadas. Ambos os métodos foram comparados e houve concordância entre o aumento de expressão dos genes detectados pela RT-PCR em tempo real e a RT-PCR semiquantitativa. Embora a RT-PCR em tempo real seja um método mais preciso e sensível, neste trabalho, a RT-PCR semiquantitativa foi capaz de identificar diferença de expressão em um maior número de genes.

Seis genes que codificam proteínas hipotéticas distintas, referentes às ESTs BH2, BH6.2, BH6.4, BH10.19, BH17 e BH18.34, tiveram a expressão diferencial confirmada, sendo todas mais expressas nas cepas HM1 e CSP reisoladas, este dado demonstra a importância de um estudo mais detalhado sobre estas proteínas. Neste âmbito o RNA interferente poderá ser uma boa ferramenta para identificar a função e a possível participação das proteínas hipotéticas na virulência da *E. histolytica*.

O gene da proteína Ras-guanina, referente à EST BH10.22, também teve sua expressão aumentada nas cepas HM1 e CSP reisoladas, resultado que concorda com encontrado por Davis e colaboradores (2007), no qual este gene foi mais expresso na cepa, HM1, mantida virulenta pela passagem em fígado de hamster, quando comparado a uma cepa não virulenta, Rahman. A proteína Ras-guanina participa da sinalização celular (DAVIS et al., 2007) e em células de mamíferos, controlam a ativação de pequenas GTPases (ZHANG et al., 2007).

Outro gene mais expresso nas cepas reisoladas foi o da fosfatase ácida, referente à EST BH4, que também foi encontrado mais expresso em cepas virulentas de *E. histolytica* nos trabalhos de Davis e colaboradores (2007) e Baldeiras-Renteira e colaboradores (2007). A fosfatase ácida já foi descrita em parasitos como *Leishmania mexicana* e *Trypanosoma brucei*, sendo uma enzima essencial para endocitose e reciclagem de membrana (BALDEIRAS-RENTEIRA et al., 2007).

O gene da enzima de transporte de cálcio ligada à membrana plasmática, referente à EST BH11, encontrada com maior expressão nas cepas reisoladas pode estar envolvido no aumento de íons cálcio no trofozoíto e, conseqüentemente maior motilidade do parasito. A motilidade dos trofozoítos tem papel central na patogênese da *E. histolytica*, pois uma alta motilidade permite mudanças morfológicas rápidas e reorganização dos componentes celulares (TAVARES et al., 2005).

Finalmente, o aumento da expressão do gene da proteína similar à cdc-48, referente à EST BH18.36 nas cepas HM1 e CSP reisolada concorda com o resultado apresentado no trabalho de León-Avila e colaboradores (2006), que observaram aumento da expressão deste gene, bem como aumento da proteína após a ativação dos trofozoítos de *E. histolytica* por colágeno tipo I e cálcio. A proteína similar à cdc-

48 apresenta atividade ATPase e participa dos processos de endo e exocitose (LEÓN-AVILA et al. 2006).

Os genes identificados, neste trabalho, como mais expresso nas cepas reisoladas, indicam que há uma alteração no metabolismo deste parasito devido ao ambiente hostil, tecido hepático, no qual foi submetido durante a ativação da virulência. A maior expressão nos genes identificados pode estar associada à resposta ao estresse, aumento na transdução de sinal, regulação de proteínas e trafico vesicular.

A *E. histolytica* é conhecida por seu alto conteúdo de vesículas que contém moléculas agressivas como lisozimas, peptídeos formadores de poros e proteinases. Então o aumento da expressão de genes que codificam proteínas como fosfatase ácida, proteína similar a CDC-48, Ras-guanina e transportadora de cálcio, que são elementos importantes no mecanismo de regulação de endocitose, fusão de lisossomos e reciclagem de membrana, podem resultar em uma aceleração do conteúdo vesicular, bem como aumento da taxa de fagocitose. Esses fatores são relevantes na patogenicidade da ameba.

O único gene que teve o resultado da diferença de expressão entre as cepas HM1 e CSP atenuadas e reisoladas de *E. histolytica* contrário ao esperado, foi o gene da proteína canal de sódio e potássio, referente à EST BH7, que foi encontrado mais expresso nas cepas atenuadas, isso sugere que essa EST foi um resultado falso positivo na apresentação diferencial de RNA e que, provavelmente, esse gene não tem importância na formação do abscesso hepático.

Neste trabalho, os trofozoítos das cepas reisoladas foram mantidos por alguns dias em cultivo para que houvesse maior número de parasitos e ausência de células do hospedeiro, esse procedimento pode ter provocado a perda de transcritos

gênicos específicos do momento de formação do abscesso hepático, bem como ter diminuído a expressão dos genes detectados, embora ainda estejam com a expressão aumentada em relação às cepas atenuadas. O modelo experimental utilizado, também não permite a identificação de transcritos gênicos específicos do momento de invasão do epitélio intestinal. Além disso, a técnica de apresentação de RNA não permite a detecção de todos os transcritos diferencialmente expressos, perde-se, principalmente, os que apresentam pequenas diferenças entre as mostras analisadas.

Para aumentar a confiabilidade dos resultados encontrados neste trabalho, quatro genes mais expressos em trofozoítos provenientes de lesão hepática em hamster, sem passar pelo cultivo, quando comparados com trofozoítos de cultura, tiveram a expressão avaliada na cepa CSP atenuada e reisolada deste estudo. Destes, três tiveram a expressão aumentada na cepa reisolada, o gene da acetiltransferase, o da proteína diaphanos e o da tRNA sintetase.

O gene da acetiltransferase foi mais um dos genes encontrados como mais expresso na cepa virulenta no estudo de Davis e colaboradores (2007), porém a função da acetiltransferase na *E. histolytica* ainda não está bem caracterizada. O gene da proteína diaphanos participa do controle da motilidade do trofozoíto (GANGULY & LOHIA, 2000) a tRNA sintetase já foi descrita em *T. brucei* como enzima importante na viabilidade celular (GARCÍA et al., 2007). O único gene em que não foi encontrada diferença entre as cepas HM1 e CSP atenuadas e reisoladas foi o gene da cisteil proteinase 1, embora já tenha sido descrito a importante participação desta proteína na evasão do sistema imune (MELÉNDEZ-LÓPEZ et al., 2007), o resultado da ausência na diferença de expressão também concorda com o

encontrado por Davis e colaboradores (2007), em que as cepas virulenta e não virulenta de *E. histolytica* apresentaram equivalente expressão deste gene.

Os resultados encontrados indicam que o desenho experimental aplicado neste trabalho foi bem sucedido e que os genes encontrados como mais expressos nas cepas HM1 e CSP reisoladas podem ter funções importantes na formação do abscesso hepático.

Estudos futuros das proteínas codificadas pelos genes selecionados neste trabalho poderão desvendar a função destas na patogenia da amebíase.

7 CONCLUSÃO

A sobrevivência da *E. histolytica* no tecido hepático e na formação do abscesso requer um processo adaptativo marcante, isto exige uma específica regulação gênica. Comparando a expressão gênica de trofozoítos não virulentos (cepa atenuada) e trofozoítos virulentos (cepas reisoladas), através da apresentação diferencial de RNA, foram identificados 11 que apresentaram diferença de expressão entre as cepas estudadas, destes 10 foram mais expressos nas cepas reisoladas e um nas atenuadas. Dentre os genes mais expressos nas cepas reisoladas, seis codificam proteínas hipotéticas e destas, três apresentaram predição para peptídeo sinal, podendo, por tanto, serem secretadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERS, J. P.; MIRELMAN, D. Progress in research on *Entamoeba histolytica* pathogenesis. **Curr Opin Microbiol.**, v. 9, p. 367-373, 2006.

ACUNA-SOTO, R.; MAGUIRE, J. H.; WIRTH D. F. Gender distribution in asymptomatic and invasive amebiasis. **Am J Gastroenterol**, v.95, p. 1277-1283, 2000.

ABRAHAMSEN, M. S.; JOHNSON, R. R.; HATHAWAY, M.; WHITE, M. W. Identification of *Eimeria bovis* merozoite cDNAs using differential mRNA display. **Mol Biochem Parasitol**, v.71, p. 183-191, 1995.

ALI, I. K. M.; MONDAL, U.; ROY, S.; HAQUE, R.; PETRI, W. A.; CLARCK, C. G. Evidence for a link between parasite genotype and outcome of infection with *Entamoeba histolytica*. **J Clin Microbiol**, v. 45, p. 285-9, 2007.

ALI, I. K. M.; SOLAYMANI-MOHAMMADI, S.; AKHTER, J.; ROY, S.; GORRINI, C.; CALDERARO, A.; PARKER, S. K.; HAQUE, R.; PETRI, W. A.; CLARCK, C. G. Tissue invasion by *Entamoeba histolytica*: evidence of genetic selection and/ or DNA reorganization events in organ tropism. **Plos Neglected Trop Dis**, v. 2(4), p. 1-6, 2008.

ANKRI, S., STOLARKI, T. and MIRELMAN, D. Antisense inhibition of Expression of cysteine proteinases does not affect *Entamoeba histolytica* cithopatic or haemolitic activity but inhibits phagocytosis. **Mol Microbiol**, v. 28, p. 777-785, 1998.

BALDERAS-RENTERIA, I.; GARCIA-LAZARO, J. F.; CARRANZA-ROSALES, P.; MORALES-RAMOS, L. H.; GALAN-WONG, L. J.; MUÑOZ-ESPINOSA, L. E. Transcriptional Upregulation of Genes Related to Virulence Activation in *Entamoeba histolytica*. **Arch Med Res**, v. 38, p. 372-379, 2007.

BARWICK, R. S.; UZICANIN, A.; LAREAU, S.; MALAKMADZE, N.; IMNADZE, P.; IOSAVA, M.; NINASHVILI, N.; WILSON, M.; HIGHTOWER, A. W.; JOHNSTON, S.; BISHOP, H.; PETRI, W. A. JR.; JURANEK, D. D. Outbreak of amebiasis in Tbilisi, Republic of Georgia, 1998. **Am J Trop Med Hyg**, v. 67, p. 623-631, 2002.

BAXT, L. A.; SINGH, U. New insights into *Entamoeba histolytica* pathogenesis. **Curr Opin Infect Dis**, v. 21, p. 489-94, 2008.

BENETTON, M. L.; GONCALVES, A. V.; MENEHINI, M. E.; SILVA, E. F.; CARNEIRO, M. Risk factors for infection by the *Entamoeba histolytica*/*E. dispar* complex: an epidemiological study conducted in outpatient clinics in the city of Manaus, Amazon Region, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 99, p. 532-540, 2005.

BOETTNER, D. R.; PETRI, W. A. JR. *Entamoeba histolytica* activates host cell caspases during contact-dependent cell killing. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 289, p. 175-184, 2005.

BRACHA, R., NUCHAMOWITZ, Y., LEIPPE, M. and MIRELMAN, D. Antisense inhibition of amoebapore expression in *Entamoeba histolytica* causes a decrease in amoebic virulence. **Mol Microbiol**, v. 34, p. 463-472, 1999.

BRUCHHAUS, I.; ROEDER, T.; LOTTER, H.; SCHWERDTFEGGER, M.; TANNICH, E. Differential gene expression in *Entamoeba histolytica* isolated from amoebic liver abscess. **Mol Microbiol**, v. 44, p.1063–1072, 2002.

BRUCHHAUS, I.; LOFTUS, B. J.; HALL, N.; TANNICH, E. The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during in vitro cultivation. **Eukaryot Cell**, v. 2, p. 501-509, 2003.

BRUMPT, E. Etude sommaire de l'*Entamoeba dispar* n.sp. amibe akkystes quadrinuclees, parasite de l'homme. **Bull Acad Med, (Paris)**, v. 94, p. 942-952, 1925.

BUSTIN, S. A.; NOLAN, T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. **J Biomol Tech**, v. 15 (3) p. 155-66, 2004.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **J Mol Endocrinol**, v. 25, n. 2, p. 169-193, 2000.

CABALERO, J.; VIVEROS, M.; SALVATIERRA, B. Seroepidemiology of amebiasis in México. **Am J Trop Med Hyg**, v. 50, p. 412-419, 1998.

CALLARD, D.; LESCURE, B., MAZZOLINI, L. A method for the elimination of false positives generated by the mRNA differential display technique. **Biotechniques**, v. 16, n. 6, p. 1096-1103, 1994.

CAMPOS-RODRIGUEZ, R.; JARILLO-LUNA, A. The pathogenicity of *Entamoeba histolytica* is related to the capacity of evading innate immunity. **Parasite Immunol**, v. 27, p. 1-8, 2005.

CHANG, K. C.; KOMM, B.; ARNOLD, N. B.; KORC, M. The application of differential display as a gene profiling tool. **Methods Mol Biol**, v. 383, p. 31-40, 2007.

COSTA, A. F.; GOMES-RUIZ, A. C.; RABELO, E. M. Identification of gender-regulated genes in *Ancylostoma braziliense* by real-time RT-PCR. **Vet Parasitol**, v. 31, p.277-84, 2008.

COUNCILMAN, W. T. AND LAFLEUR, H. A. Bull. **Johns hopkins hosp. Rept**, v. 2, p. 395-548, 1891.

DAVIS, P. H.; SCHULZE, J.; STANLEY, S. L. Transcriptional comparison of two *Entamoeba histolytica* strains with defined virulence phenotypes identifies new virulence factor candidates and key differences in the expression patterns of cysteine proteases, lectin light chains, and calmodulin. **Mol Biochem Parasitol**, v. 151, p. 118-128, 2007.

DIAMOND, L. S.; PHILLIPS, B. P.; BARTGIS, I. L.; The clawed jird (*Meriones unguiculatus*) as an experimental animal for the studies of hepatic amebiasis. **Arch Invest Med**, v. 2, p. 465, 1974.

DIAMOND, L. S.; HARLOW, D. R.; CUNNICK, C., A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 72, p. 431-432, 1978.

DIAMOND, L. S.; CLARK, C. G. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. **J Eukaryot Microbiol**, v. 3, p. 340-344, 1993.

DOBELL, C. **The amoeba living in man**, John Bale, London. 1919.

ESPINOSA-CANTELLANO, M.; MARTINEZ-PALOMO, A. Pathogenesis of intestinal amebiasis: From molecules to disease. **Clin Microbiol Rev**, p. 318-331, 2000.

FENG, Y. M.; GAO, G.; ZHANG, F.; CHEN, H.; WAN, Y. F.; LI, X. Q. Identification of the differentially expressed genes between primary breast cancer and paired lymph node metastasis through combining mRNA differential display and gene microarray. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi.**, v. 86, n. 39, p. 2749-2755, 2006.

FREDERICK, J. R.; PETRI, W. A.; Roles of galactose-/N-acetylgalactosamine-binding lectin of *Entamoeba* in parasite virulence and differentiation. **Glycobiology**, v. 15(12), p. 53R-59R, 2005.

GANGULY, A.; LOHIA, A. The diaphanous protein from *Entamoeba histolytica* controls cell motility and cytokinesis. **Arch of Med Res**, v. 31, p. S137-9, 2000.

GARCÍA, L. T.; LEITE, N. R.; ALFONZO, J. D.; THIEMANN, O. H. Effects of *Trypanosoma brucei* tryptophanyl-tRNA synthetases silencing by RNA interference. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102(6), p. 757-62, 2007.

GOMES, M. A.; MELO, M. N.; PESQUERO, J. L.; SILVA, E. F. Characterization for virulence of an axenic strain of *Entamoeba histolytica*: Evidence for overexpression of two proteins. **Arch Med Res**, v. 28, p. 489-492, 1997.

GOMES, M. A.; PESQUERO, J. B.; FURST, C.; VALLE, P. R.; PESQUERO, J. L.; SILVA, E. F. An improved method to distinguish *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. **Parasitology**, v. 119, p. 359-362, 1999.

HAQUE, R.; HUSTON, C. D.; HUGHES, M.; HOUP, E.; PETRI, W. A. JR. Current Concepts: Amebiasis. **J Med**, v. 348, p.1565-1573, 2003.

HEARD, P. L.; LEWIS, C. S.; CHAUDHURIL, G. *Leishmania mexicana amazonensis*: differential display analysis and cloning of mRNAs from attenuated and infective forms. **J Eukaryot Microbiol**, v. 95, p. 409-415, 1996.

HOARE, C. A. Considerations sur l'étologie de l'amibiase d'après le rapport hôte-Parasite. **Bull Soc Pathol Exot**, v. 54, p. 429-441, 1961.

HUSTON, C. D. Parasite and host contributions to the pathogenesis of amebic colitis. **Trends Parasitol**, v. 20. p.23-26, 2004.

JACKSON, T. F. H. G. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* are distinct species; clinical, epidemiological and serological evidence. **Int J Parasitol**, v. 28, p. 181-186, 1998.

KANG, D.; LAFRANCE, R.; SU, Z.; FISHER, P. B. Reciprocal subtraction differential RNA display: an efficient and rapid procedure for isolating differentially expressed gene sequences. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 95, p. 13788–93, 1998.

KUBISTA, K.; ANDRADE, J. M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONAK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJOBACK, R.; SJOGREEN, B.; STROMBOM, L.; STAHLBERG, A.; ZORIC, N. The real-time polymerase chain reaction, **Mol Aspects Med.**, v. 27, p. 95 – 125, 2006.

LAU, A. O. T.; SACCI, J. B.; AZAD, A. F. Retrieving parasite specific liver stage gene products in *Plasmodium yoelii* infected livers using differential display. **Mol Biochem Parasitol**, v. 111, p. 143–15, 2000.

LEE J. S.; SCALA, S.; MATSUMOTO, Y.; DICKSTEIN, B.; ROBEY, R.; ZHAN, Z.; ALTENBERG, G.; BATES, S. E. Reduced drug accumulation and multidrug resistance in human breast cancer cells without associated P-glycoprotein or MRP overexpression. **J Cell Biochem.**, v. 65, n. 4, p. 513-526, 1997.,

LEIPPE, M. Amoebapores. **Parasitol Today**, v. 13, p. 178-183, 1997.

LEIPPE, M., BAHR, E., TANNICH, E. and HORSTMANN, R. D. Comparison of pore-forming peptides from pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 59, p. 101-109, 1993.

LEÓN-AVILA, G.;HERNÁNDEZ, M.; CAMACHO-NUEZC, M.; JUAN PEDRO LUNA-ARIAS, J. P.; SALAZAR, I.; PÉREZ, A.; MUÑOZ, M. L. *Entamoeba histolytica* up-regulates the CDC48-like protein, an AAA family member, during the activation of trophozoites with collagen type I and calcium. **Mol Biochem Parasitol**, v. 146, P.113–9, 2006.

LI, B. W.; RUSH, A. C.; TAN, J.; WEIL, G. J. Quantitative analysis of gender-regulated transcripts in the filarial nematode *Brugia malayi* by real-time RT-PCR. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 137, n. 2, p. 329-337, 2004.

LIANG, P.; AVERBOUKH, L.; PARDEE, A. B. Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. **Nucleic Acids Res.**, v. 21, n. 14, p. 3269-3275, 1993.

LIANG, P.; PARDEE, A. B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of polymerase chain reaction. **Science**, v. 257, p. 967-971, 1992.

LIANG, P. A decade of differential display. **Biotechniques**, v. 33, p. 338-346, 2002.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOFTUS, B.; ANDERSON, I.; DAVIES, R.; ALSMARK, U. C.; SAMUELSON, J.; AMEDEO, P.; RONCAGLIA, P.; BERRIMAN, M.; HIRT, R. P.; MANN, B. J.; NOZAKI, T.; SUH, B.; POP, M.; DUCHENE, M.; ACKERS, J.; TANNICH, E.; LEIPPE, M.; HOFER, M.; BRUCHHAUS, I.; WILLHOEFT, U.; BHATTACHARYA, A.; CHILLINGWORTH, T.; CHURCHER, C.; HANCE, Z.; HARRIS, B.; HARRIS, D.; JAGELS, K.; MOULE, S.; MUNGALL, K.; ORMOND, D.; SQUARES, R.; WHITEHEAD, S.; QUAIL, M. A.; RABBINOWITSCH, E.; NORBERTCZAK, H.; PRICE, C.; WANG, Z.; GUILLEN, N.; GILCHRIST, C.; STROUP, S. E.; BHATTACHARYA, S.; LOHIA, A.; FOSTER, P. G.; SICHERITZ-PONTEN, T.; WEBER, C.; SINGH, U.; MUKHERJEE, C.; EL-SAYED, N. M.; PETRI, W. A., JR.; CLARK, C. G.; EMBLEY, T. M.; BARRELL, B.; FRASER, C. M.; HALL, N. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. **Nature**, v. 433, p. 865-868, 2005.

LOHIA, A. The cell cycle of *Entamoeba histolytica*. **Mol Cell Biochem**, v. 253, p. 217-222, 2003.

LOPEZ-VANCELL, R., MONTFORT, I. and PEREZ-TAMAYO, R. Galactose-specific adhesin and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica*. **Parasitol Res**, v. 86, p. 226-231, 2000.

LÖSCH, F. Massenhafte entwicklung von amoeben im dickdarm. **Virchows Archiv klinische Medizin**, v. 65, p. 196-211, 1875.

MACFARLANE, R.; BHATTACHARYA, D.; SINGH, U. Genomic DNA microarrays for *Entamoeba histolytica*: applications for use in expression profiling and strain genotyping. **Exp Parasitol**, v. 110, p. 196-202, 2005.

MACFARLANE, R. C.; SINGH, U. Identification of differentially expressed genes in virulent and nonvirulent entamoeba species: potential implications for amebic pathogenesis. **Infection And Immunity**, v. 74, p. 340-51, 2006.

MARTINEZ-PALOMO, A. The pathogenesis of amoebiasis. **Parasitol Today**, v. 3, p.111-118, 1987.

MATZ, M. V.; LUKYANOV, S. A. Different strategies of differential display: areas of application. **Nucleic Acids Res.**, v. 26, n. 24, p. 5537-5543, 1998.

MELÉNDEZ-LÓPEZ, S. G.; HERDMAN, S.; HIRATA, K.; CHOI, M.-H.; CHOE, Y. CRAIK, C.; CAFFREY, C. R.; HANSELL, E.; CHÁVEZ-MUNGUÍA, B.; CHEN, Y. T.; ROUSH, W. R.; MCKERROW, J.; ECKMANN, L.; GUO, J.; STANLEY, JR. S.L.; REED, S. L. Use of Recombinant *Entamoeba histolytica* Cysteine Proteinase 1 (EhCP1) to Identify a Potent Inhibitor of Amebic Invasion in a Human Colonic Model. **Eukaryotic Cell**, 2007.

MEYER, J. N.; VOLZ, D. C., FREEDMAN, J. H.; DI GIULIO, R. T. Differential display of hepatic mRNA from killifish (*Fundulus heteroclitus*) inhabiting a Superfund estuary. **Aquat Toxicol.**, v. 73, n. 4, p. 327-341, 2005.

MICHALSKI, M. L.; WEIL, G. J. Gender-specific gene expression in *Brugia malayi*. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 104, n. 2, p. 247-257, 1999.

MIRANDA, R. R.; CLARA E SILVA, L.; SANTOS, H. A.; RABELO, E. M. Confirmation of sex-specific transcripts from *Ancylostoma caninum* adult worms by semi-quantitative RT-PCR. **Res Vet Sci.**, 2006.

MIRANDA, R. R. C.; COSTA JUNIOR, L. M.; SANTOS, H. A.; CAMPOS, A. K.; RABELO, E. M. L. Identification of specific male and female genes in adult *Ancylostoma caninum*. **Ann N Y Academy Scien**, 2004.

MORAES-SILVA, C.; MONTEIRO, C. D. O, S.; ARAUJO, B. D. O. S, A.; SILVA, J. V.; POVOA, M. M. Determination of *Entamoeba histolytica* infection in patients from Greater

Metropolitan Belem, Para, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antigen detection]. **Cad Saude Publica**, v. 21, p. 969-973, 2005.

NAG, D. K.; AXELROD, J. Identification of yeast meiosis-specific genes by differential display. **Methods**, v. 16, n. 4, p. 423-433, 1998.

OCADIZ, R.; OROZCO, E.; CARRILLO, E.; QUINTAS, L. I.; ORTEGA-LOPEZ, J.; GARCIA-PEREZ, R. M.; SANCHEZ, T.; CASTILLO-JUAREZ, B. A.; GARCIA-RIVERA, G.; RODRIGUEZ, M. A. EhCP112 is an *Entamoeba histolytica* secreted cysteine protease that may be involved in the parasite-virulence. **Cell Microbiol**, v. 7, p. 221-232, 2005.

OLIVEIRA-COSTA, J; RESENDE, J. A.; GIL, F. F.; BUSATTI, H.; FERNANDES, H. C.; MESQUITA, F. A.; GOMES, M. A. Prevalência de *Entamoeba histolytica* e *E. dispar* em amostras fecais de um laboratório privado na grande Belo Horizonte, Minas Gerais. In: XX Congresso Brasileiro de Parasitologia, Recife, 2007.

OLIVOS-GARCIA, A., GONZALEZ-CANTO, A., LOPEZ-VANCELL, R., GARCIA DE LEON MDEL, C., TELLO, E., NEQUIZ-AVENDANO, M., MONTFORT, I. and PEREZ-TAMAYO, R. Amebic cysteine proteinase 2 (EhCP2) plays either a minor or no role in tissue damage in acute experimental amebic liver abscess in hamsters. **Parasitol Res**, v. 90, p. 212-220, 2003.

OUAKAD, M.; CHENIK, M.; BEN ACHOUR-CHENIK, Y.; LOUZIR, H.; DELLAGI, K. Gene expression analysis of wild *Leishmania major* isolates: identification of genes preferentially expressed in amastigotes. **Parasitol Res.**, v. 100, n. 2, p. 255-264, 2007.

PARDINAS, J. R.; COMBATES, N. J.; PROUTY, S. M.; STENN, K. S.; PARIMOO, S. Differential subtraction display: a unified approach for isolation of cDNAs from differentially expressed genes. **ANALYTICAL BIOCHEMISTRY**, v. 257, p. 161–8, 1998.

PATHAK, R. U.; KANUNGO, M. S. Subtractive differential display: a modified differential display technique for isolating differentially expressed genes. **Mol Biol Rep**, v. 34, p. 41–46, 2007.

PETRI, W. A., JR. Pathogenesis of amebiasis. **Curr Opin Microbiol**, v. 5, p. 443-447, 2002.

PINILLA, A. E.; MYRIAM CONSUELO LÓPEZ, M. C.; VIASUS, D. F. Historia del protozoo *Entamoeba histolytica*. **Rev Méd Chile**, v. 136, p. 118-124, 2008.

QUE, X.; REED, S. L. Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. **Clin Microbiol Rev**, 13, 196-206, 2000.

QUNICKE, H. and ROSS, E. I. Uber amöben-enteritis. **Berliner Klinische Wochenschrift**, v. 30, p. 1089-1094, 1893.

RABELO, E. M.; COELHO, P. M.; PENA, S. D. Identification of stage-specific genes in *Schistosoma mansoni*. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 9146, p. 654-657, 2000.

RAJEEVAN, M. S.; RANAMUKHAARACHCHI, D. G.; VERNON, S. D.; UNGER, E. R. Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 443-451, 2001.

SALLES, J. M.; MORAES, L. A.; COSTA-SALLES, M. Hepatic Amebiasis. **Braz J Infect Dis**, v. 7, p. 96-110, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITISCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p.787, 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS, F.R.; PENA, S.D.J.; EPPLEN, J.T. Genetic and population study of a y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. **Hum. Genet.**, v. 90, p. 655-656, 1993.

SARGEAUNT, P. G. (1982). Amoebiasis. **J R Soc Med**, v. 75, p. 920-921.

SCHMITTGEN, T. D. Real-time quantitative PCR. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 383-385, 2001.

SCHMITTGEN, T. D.; ZAKRAJSEK, B. A.; MILLS, A. G.; GORN, V.; SINGER, M. J.; REED, M. W. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. **Anal Biochem.**, v. 285, n. 2, p. 194-204, 2000.

SCHAUDINN, F. Untersuchungen über die Fortpflanzung einiger Rhizopoden. **Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte**, v. 19, p. 547-576, 1903.

SILVA, A. M.; PIRES, E. G.; ABRANTES, E. F.; FERREIRA, L. R.; GAZZINELLI, R. T.; REIS, L. F. Application of the differential display RT-PCR strategy for the identification of inflammation-related mouse genes. **Braz J Med Biol Res.**, v. 32, n. 7, p. 845-852, 1999.

SILVA, E. F. M.; GOMES, M. A. Amebáse: *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba díspar*. In: DAVID PEREIRA NEVES, **Parasitologia Humana**, 11^a ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005. cap. 15, p. 127-141.

STANLEY, S. L., JR. Amoebiasis. **Lancet**, 361, 1025-1034, 2003.

STANLEY, S. L. J. The *Entamoeba histolytica* genome: something old, something new, something borrowed and sex too? **Trends Parasitol**, v. 21, p. 451-453, 2005.

STAUFFER, W.; RAVDIN, J. I. *Entamoeba histolytica*: an update. **Curr Opin Infect Dis**, v. 16, p. 479-485, 2003.

STAUFFER, W.; ABD-ALLA, M.; RAVDIN, J. I. Prevalence and Incidence of *Entamoeba histolytica* Infection in South Africa and Egypt. **Arch of Med Res**, v.37, p. 266-269, 2006.

STURTEVANT, J. Applications of differential-display reverse transcription-PCR to molecular pathogenesis and medical mycology. **Clin Microbiol Rev.**, v. 13, n. 3, p. 408-427, 2000.

TAVARES, P.; RIGOTHIER, M. C.; KHUN, H.; ROUX, P.; HUERRE, M.; GUILLEN, N. Roles of cell adhesion and cytoskeleton activity in *Entamoeba histolytica* pathogenesis: a delicate balance. **Infect Immun**, v. 73, p. 1771-1778, 2005.

VAN HAL, S. J.; STARK, D. J.; FOTEDAR, R.; MARRIOTT, D.; ELLIS, J. T.; HARKNESS, J. L. Amoebiasis: current status in Australia. **Med J Aust**, v.186 p. 412-416, 2007.

VARIYAM, E. P. Luminal host-defense mechanisms against invasive amebiasis. **Trends in Parasitol**, v. 23, p.108-111, 2007.

WEBER, C.; GUIGON, G.; BOUCHIER, C.; FRANGEUL, L.; MOREIRA, S.; SISMEIRO, O.; GOUYETTE, C.; MIRELMAN, D.; COPPEE, J.; GUILLEN, N. Stress by heat shock induces massive down regulation of genes and allows differential allelic expression of the Gal/GalNAc lectin in *Entamoeba histolytica*. **Eukaryot Cell**, v. 5, p. 871-875, 2006.

WELSH, J.; CHADA, K.; DALAL, S. S.; CHENG, R.; RALPH, D.; McCLELLAND M. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. **Nucleic Acids Res**, v. 20, p. 4965-70, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Amoebiasis. *Wkly Epidemiol Rec*, v. 72, p. 97-9, 1997.

ZHAO, S.; OOI, S. L.; PARDEE, A. B. New primer strategy improves precision of differential display. **Biotechniques**, v. 18, n. 5, p. 848-850, 1995.

ZHANG, G.-C.; HOFFMANN, J.; PARELKAR, N. K.; LIU, X.-Y.; MAOA, L.-M.; FIBUCH, E. E.; WANG, J. Q. Cocaine increases Ras-guanine nucleotide-releasing factor 1 protein expression in the rat striatum in vivo. **Neuroscience Letters**, v. 427, P.117–21, 2007.

ZHANG, J. S.; DUNCAN, E. L.; CHANG, A. C.; REDDEL, R. R. Differential display of mRNA. **Mol Biotechnol**, v. 10, n. 2, p. 155-165, 1998.

ZLOBL, T. L. Amebiasis. **Prim Care Update Ob Gyns**, v. 8, p. 65-68, 2001.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Sequências das ESTs obtidas por apresentação diferencial de RNA entre cepas reisoladas e atenuadas de *E. histolytica*

BH 2

ATTGAGTCAGTAAAAAATTGCAATTCAATTAGTTAATTTAAAAAAGAACGAAAAGAAG
AAGACTTAATTTATGATTCAATTTTCTTTATTCCATTAAATAGAAGAATTAATGTTGTTGT
AAAAGAATTATGGAAAAGAGAATTTGGAGTGTTCAAAGTAGACATACATTACCACCAAAT
GCATTAAAAACATAAGTTAATTTAAATACATTATTTTTTTGAACCAGGAATTATTAAAACCTC
AAAAAGA

BH 4

AATCGAATTCCTCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCCAATTCGCAC
CTATAGTGACGTCGTATTACAATCACTGGCCGATCGTNTATACAACGTCGTGACTGGGAA
AACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCACAGCTGGCGT
AATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGACCTGAATGGCGAA
TGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGAC
CGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGACGCCCGCTCCTTTCGCCTTNCTTCCCTTCACTTTCTC
GCACAAGTTCGCCGGACTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGTTCCGA
TATTAGTGCTTNACGGGACCTCGAAAACCCGAAAAGAAAAG

BH 6.2

GCAAAAATAATTTTATAACAATGACTCAACGACACCAACACTAATACTTTATTAACCTTTTT
NTTTTATATAAAATTACATTATAAACATTAATTTTCTCAACAGTATTAATTAACCAGTAA
TCGACATTCCTCGCGGAACGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCAGACGTCGGGCCCAATTC

BH 6.4

AACAATGAAATTTTAAATTATGAAGGAAGCAAAAGAGACATTAGTTTAGTCAAAGTAGTAG
AAACTGTGTGTTGTCAAGATCAATAAAGGTTTTTTGTAGGGTGATTGTAATAAGAAGGAGT
GTTGTAGATTTAATAGTAATACAACAAAGTAGGAAAACCTACTTGTGTGTTATCTAGG

BH 7

TTAGAGAACGAAATGATGATTTATTAATAATAGCAGTAAGAGATTTAAAAGAAATTGAAGC
AGATTGGAAAGTATTAAGTAATATTGAAAATTTTTTTGTTATAATTGGAAATTTACATGAA
GAAACATTATATGAAAAATTTAATATTTATGAAATCAACAACAATAATGATTTTACCAAGTG
ATAGACTTGGAAAAGATGAAAGTGATGTTATAATAATAGCAACAATTGTACAATCAGTAAT
AGAAAAGAAAAAATATTATTAGAAACAGAAAATGAAGTAAAAATGAAATCAACACCTAAA

ATAAAAATACCAATAATTTGTGAAATTGAAAAACAAGAAAGTGCAAGATTTGTTAAGGATT
TTGCAACAAC

BH 10.19

AGCAGAAGACAAAGGGAAAGAAATAATTAAGTTATTAGGAGAAAATAAAAAGAAATTAGTA
GAATTTAAAATGGAAATAAGAAATAAAGAAGAAAAAAGGAAGAACAATAATAAGAACAT
TTGGTATTGAAAATGATATAGAACGACCTATTTTCAGCACAAAACATTGAATTTAAACGACT
TGAAGAAAGACTTCAGTTTGAAAATATTACAACATTATCTCATTATGTTACAAGACAAAAT
CCACGAGTAGTATACTTTGAAAACAATTAACGTAACCTCAACTCATTAAATCAATAAATG
GAAAAGAAAATATTATGTTAATTTGTAGAACAACTAATAGTAACATTTTCTTCGGTACTTA
TTGTCAAAGAAAATAATTAATAATTCATTTGGAATAGATGATCCATCATTCTTTATGTTT
GTTACTAATAAAAAGATTTATATTGTTTTATTAAGAAGTCAGTTAATGGATCAACCTTTA
TGATATCAGATAAAAAGAAAATAAAGTCATAGAAGTTGATAAATGTTTCTCAGTAGCATT
TCAAATAACTAATGCTTTTTATGAATACTAAAGTACTTAAATGTTTCATTTTCTAAAAGTATT
AATTAACCCAGTAATCACTAGTGAATTCGCGGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGGAGA
GCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCG
TAATCATGGTCATAACTGTTTCTGGGGTGAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACACAT
ACGAGGCCGGAAGCATAAGTGAAAGGCTGGGGGTGGCCT

BH 10.22

AAATCATAAGGGCGAATGGGCCGCTCCTGTCCCGGCGCCTGGCGGCCGCGGGATTCCATACT
GGTTATTACTTTAAAATATTGAAATTAATAAAAATGCACAACCATCTATTCAATCTGG
AGGATTTGATATCACTAATATAACACTTGCACATTATATATTGATTGGGTACAATGTCAA
AATATCCTTATTTGTTTAGACATAACCAAGCAATGCAAGAATGGATTGAATCTCATTGGT
TATAATTAATTGTAACGAGGAGAATGAGTATCAACTGAGTATTCAAATAGAAAAGAACAT
CGTAAAACAATGGTTCTTAATAATGAAATTCATTTACTAAAATATAATACAAATTGTGTTT
ATACTCATCCACAAATTATACCATGTAATACTAATATGTTAGTAGGTG

BH 11

AAAACAGAAGGAGCATTATTAATGTATGTAAAAGAAAGAGGAGTGGATTATTTAGAAATTA
GAAAAGAAATGAAAATAATATTTATCAAATGTTTGC

BH 12

TAAAAGAAATAAACAATAAAAACAATACAAAACAAATGAGAGATCATATATATTAAGAATA
ATTTCAATTTTGAAGATATAAATTCACAACAAAATATAACAATACTCAAATACTATAAAAG
AATGAAATAAACAACAATTTGAATAAAAACAACCTTCTTAAACAATGAAAATAAATACATTA
TTAAATATTATCAACCCAGTTATTCATTAATTTGATATTATTTTTATTTAATAACTACTTC
ATTTTCAATTAATGTTTATTTAAAAGATTCAAACCTACAATAATCTCTAATTAATAGAAA
AAAAATGATTATCATAGTATGAATATAATTAATTAACAACCTCATTGTGTTAACATTTT
TTTAGATATATAAATGTAAATAATAACATTTGATATGTAACCTATGAAATTAATAATTT
TTCATGTATTACTTCT

BH 17

ACAATGTGGAAGTCTTGGAGTATTACTTTTAGTAATTA AAAATTTATTAGATGACCAAAGT
 TATACTGATTTTATTTCCTTTTGAATGTGTAGAAGCTATTATTTCATTCTCCTTTATGGTATG
 AAGATTTTCAAGATAACCAGTGGAAACAATTA ACTCATTTTGAACCTTTTTCATTACTAAA
 AAGTCTTTGTTCATCTCCTATTCAAAGGAATGTTATTAGT

BH 18.34

ACTAGGGGAATTAAGTCATGTTCCCTTAGTTAATCGACTTATTCTATAGGTTTCCCCTAACA
 TACCACGCCATGCTTGC GCAGTATTTTCTAGCCAAAATCTCTTTTTTTGATGACATTAAA
 TTCTATCTCGTCATCTGTATTATTTGCTCTTGCCAGTTGGAGGAGATGTATTTCATTTTCT
 GTAGGTGGTACTCTATCTAGAGTGAGGAAATCTAAGGTAGCATTTCCTCTTCATGGTTTA
 TTTCTCTAGT

BH 18.36

ACAATCTCTGCTAAGTCAGCACCAGAGATATTTTCAGTATGTTTCAGCAATCCAGCCTAAAT
 CAACATCTGGTACAACAGGTGAATTTCTTAATTTAGCTTGT

BH 21

CCACCATATTGAGACACTGCCTCTCATAGGCACGGATTTCCACCAGGAAGCTCCAGGGTTTT
 TGCCGTTTTCTGTCTCCACAGGACTGATTACTGATTACAAGTGCATATGGCCAAATGCAAGT
 TTAAAGAAAATTATTGCTTTAAA ACTTATTTGCGTGCATGTGTGTGTGCAGTATGCATGGG
 TACATCAGAGGACAATTTGCAGAAGTCACTTTCCCTCATGCCACTGTGTACATCCTGAGTAT
 TGTACTCACTTCTTCAGGATTGGCGGTGGGAGATTTTAGCACTGAACTATCTCACCCACCC
 CACACCTCGCTTTCTAATTTGTCTTTGGAGGGTTGCACCCAGGTCCTCAGATTTGTAAAG
 GGTAGACTTTACCAGTTGAGCCGTCATCAGCTCCATACTGTAGCTTTTGAAAAAACTTCTA
 GGTGGGCATGGTGGTTCCTGAGGCAGGAGAATTGGGAATTTTGACCACACAGACAGTTTCT
 TTAGACAAAAAAACCTTATTCTATGTCCATATGACACTAAATGAGCCAGATTTCTTCTGTT
 CTCAGAAGATAAGCATGGCTACCCTGTGATTAATACTTGGATGGGGGAACTCCCCAAATTA
 TTTACAATCCTATGGTGTATCTGTAATCATAATAAAGTAGGATGATAATGTGGATTATTT
 TTTTATTATGTCTCTTAAAGTCATCTGAAGATTATACTTTCTGCCATATATTATGGAAATT
 CTGGACTTGATTTCTAATCCTTTTATTTCAGCCAGCTGCTGGGACTGTGGCAACACAGCCAG
 TCTCTGCCTATATTCTACCTTTACCCAGAAGCTAGTAAGCTGGGAACTAAAGTAGTGAAA
 CACAAGCCCAGTCTTAAAATATTAGTACCACGAATCATAGTTCCAAGGAAA ACTGCCTTAT
 TGTTCTATCATAACTGTTTCACACAGATAAAGGA

BH 23

TTGTAAATATCCATTATATTCTTATTGATATATGTGTTGTTAGAATCATTGTGTTGTTAT
 ATGTTATCTTATCTCAACACATATCAATATAAATCAACTACTACCCCAACTTAC

APÊNDICE B – Iniciadores sintetizados a partir das seqüências, depositadas em banco de dados, homologas às ESTs selecionadas como específicas das cepas reisoladas de *E. histolytica*

Nome	Seqüência	Temperatura de anelamento
BH2	Direto 5' AAAAAGAACGAAAAGAAGAAGAC 3'	60°C
	Reverso 5' AATTCCTGGTTCAAAAATAATG 3'	60°C
BH4	Direto 5' GTTATCCAAAGTGCTGAATCG 3'	60°C
	Reverso 5' CCATGGTCATTATATACAGCG 3'	60°C
BH6.2	Direto 5' ACTCCATCTTTACATTTATCTCT 3'	60°C
	Reverso 5' CAACGCACCAACAGTAACAAC 3'	62°C
BH6.4	Direto 5' GGCTTGTTGTGGAAATGATAC 3'	60°C
	Reverso 5' ACTGTGAAAATAAAATGTCTAGG 3'	60°C
BH7	Direto 5' GGTATTTTTATTTAGGTGTTG 3'	60°C
	Reverso 5' GGAAAAGATGAAAGTGATGTTAT 3'	60°C
BH10.19	Direto 5' CAAAGAAAATAGCAGAAGACAAAG 3'	59°C
	Reverso 5' TGTTCTTATTATTTGTTCTTCCTT 3'	59°C
BH10.22	Direto 5' CTTGCACATTATATAGTTGATTGGG 3'	59°C
	Reverso 5' TGATACTCATTCTCCTCATTACAAT 3'	59°C
BH11.14	Direto 5' TGGAAATAAACAGAAGGAGCA 3'	59°C
	Reverso 5' AGTGTGTTTCATTCGCTTTTTAG 3'	58°C
BH17	Direto 5' TCATTCTCCTTTATGGTATGAAGATTTTC 3'	60°C
	Reverso 5' GAATAGGAGATGAACAAAGACTTTTTAG 3'	60°C

BH18.34	Direto 5' CTCGTCATCTGTATTATTTGCTCTTG 3'	59°C
	Reverso 5' GCTACCTTAGATTTCTCACTCTAGATAG 3'	60°C
BH18.36	Direto 5' CTAAGTCAGCACCCAGAGAAAT 3'	59°C
	Reverso 5' TTAAGAAATTCACCTGTTGCA 3'	60°C
BH23	Direto 5' TTGATATATGTGTTGTTAGAATC 3'	60°C
	Reverso 5' GTAAGTTGGGGTAGTAGTTGA 3'	58°C
ACTINA	Direto 5' GGCCTTTCATCCACACCAAT 3'	58°C
	Reverso 5' TGGGCATTAGATAAGCAATCAAAA 3'	59°C

APÊNDICE C – Iniciadores sintetizados a partir das seqüências de genes tidos como mais expressos em trofozoítos de *E. histolytica* provenientes de lesão em fígado de hamster

Nome	Seqüência	Temperatura de anelamento
Acetiltransferase	Direto 5' GATGAACACCACTGCTGAAC 3'	60°C
	Reverso 5' TCTTAGTAAAATCTCGTTCATG 3'	60°C
Tryptofanil tRNA sintetase	Direto 5' CTTCTCCTGCTCGTTGTTTAG 3'	60°C
	Reverso 5' ACAGTTGGTTGAATGAAATTAAG 3'	60°C
Proteína diaphaunos	Direto 5' TGGTATTCCTGCTGTTGCTG 3'	60°C
	Reverso 5' GTTTTAATTCCGTTTTATCTTCAA 3'	58°C
Cisteil proteinase 1	Direto 5' GTGGTGAAGAAAAGGAGAAG 3'	62°C
	Reverso 5' CATGACCCACAATTCCCTTG 3'	60°C

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](#)