

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Padronização da reação de *trans-splicing in vitro* em
tripanosomas utilizando a técnica de RT-PCR**

FERNANDA SILVA POLVERARI

Araraquara
2013

FERNANDA SILVA POLVERARI

**Padronização da reação de *trans-splicing in vitro* em
tripanosomas utilizando a técnica de RT-PCR**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia.

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

Araraquara
2013

FICHA CATALOGRÁFICA

P779p Polverari, Fernanda Silva
Padronização da reação de *trans-splicing in vitro* em tripanosomas utilizando a técnica de RT-PCR / Fernanda Silva Polverari. – Araraquara : [s.n.], 2013
72 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Regina Maria Barretto Cicarelli

1. Biotecnologia. 2. Biologia molecular. 3. Reação em cadeia de polimerase. 4. *Trans-splicing*. I. Título.

DADOS CURRICULARES

Nome: Fernanda Silva Polverari

Nome em citações bibliográficas: POLVERARI, F. S.

Filiação: José Eugênio Polverari e Iaraci das Graças Alves da Silva

Nascimento: 23/07/1983 – Araraquara/SP – Brasil

Endereço profissional: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Rodovia Araraquara-Jaú Km 01, Campus – Araraquara – 14801-902, SP – Brasil. Telefone (16) 3301 6950
URL da home page: <http://www.fcfar.unesp.br/>

E-mail para contato: ferpolverari@gmail.com

Formação acadêmica/ titulação

2011 – 2013 Mestrado em Biotecnologia (Conceito CAPES 4)

Instituto de Química, UNESP, Brasil.

Título: Padronização da reação de *trans-splicing in vitro* em tripanosomas utilizando a técnica de RT-PCR.

Orientadora: Regina Maria Barretto Cicarelli

Bolsista: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico - CNPq

2003 – 2006 Graduação em Ciências Biológicas

Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Brasil.

Título: Avanços do greening nos pomares do Estado de São Paulo e avaliação de sondas não radioativas na detecção de *Candidatus liberibacter asiaticus* e *Candidatus liberibacter americanus* em amostras vegetais.

Orientador: Adilson César Abreu Bernardes

Formação complementar

Curso de extensão universitária em AVANCES EN GENETICA FORENSE: ADN mitocondrial y mezclas en aSTRs. Outubro de 2011/ Carga horária: 16h. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Araraquara, SP.

Curso de extensão universitária em Educação Ambiental na Estação Ecológica de Juréia. Novembro de 2006/ Carga horária: 16h. Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara, SP.

Curso de extensão universitária em Roedores, meio ambiente e saúde pública. Setembro de 2004/ Carga horária: 12h. Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara, SP.

Curso de extensão universitária em Biologia, Ecologia e Conservação do Boto-Cinza. Novembro de 2003/ Carga horária: 12h. Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara, SP.

Produção bibliográfica

Resumos publicados em anais de congresso

POLVERARI, F. S.; CICARELLI, R. M. B. *Trans-splicing* reaction *in vitro* in *Trypanosoma cruzi* with free cells extracts and RT-PCR. In: XLII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2013, Foz do Iguaçu. Anais do XLII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2013. p. 30-30.

BARBOSA, J. H.; BERTATO, A. C.; ROTTA, S.; CARMO, A. U.; POLVERARI, F. S.; CORREA, T. C.; CARMO, M. S. Identificação de THC (Delta-9-Tetrahydrocannabinol) em amostras de *Cannabis sativa* por cromatografia em camada delgada (CCD). In: 17º Encontro de Biólogos do CRBio - 1, 2006, Santos. 17º Encontro de Biólogos do CRBio - 1, 2006.

JESUS JUNIOR, W. C.; TEIXEIRA, D. C.; Santos, Mateus A.; POLVERARI, F. S.; Martins, E. C.; Barros, C. C.; Nagata, T.; Rezende, J. A. Detecção de um vírus da família Tymoviridae em plantas com morte súbita dos citros. In: XXXVIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2005, Brasília. Anais do XXXVIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2005. v. 30. p. 183-183.

Apresentação de trabalho e palestra

POLVERARI, F. S.; CICARELLI, R. M. B. *Trans-splicing* reaction *in vitro* in *Trypanosoma cruzi* with free cells extracts and RT-PCR. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Participação em eventos científicos

XLII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 18 a 21 de maio de 2013. Centro de Convenções do Hotel Rafain Palace, Foz do Iguaçu, PR.

FERNANDA SILVA POLVERARI

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Araraquara, 16 de outubro de 2013.

BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Regina Maria Barretto Cicarelli (Orientadora)
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann
Instituto de Física – USP, São Carlos



Profª Drª Márcia Regina Brochetto Braga
Instituto de Biociências – UNESP, Rio Claro

DEDICATÓRIA

Ao meu filho Rafael, pelo amor mais puro que existe.

A minha mãe Iara e aos meus irmãos, Sabrina e João Victor, pelo apoio e compreensão em todos os momentos.

Em especial a Sonia e Thomaz pelo amor e incentivo, sem vocês nada disso teria acontecido.

AGRADECIMENTOS

À professora **Dra. Regina Cicarelli** pelo incentivo e confiança de desenvolver este trabalho, que foram fundamentais para o meu crescimento científico, profissional e pessoal. O meu muito obrigado por ter me recebido em seu laboratório e compartilhado seus conhecimentos..

À **Lis Arnosti**, pelo trabalho em conjunto, pelos ensinamentos transmitidos que foram de grande importância para a conclusão deste trabalho e pela amizade.

À **Bianca Belon** pelo auxílio nos experimentos, na formatação da dissertação e principalmente pela amizade.

A todos do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular de Parasitos e do Laboratório de Investigação de Paternidade que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, em especial ao **Danilo Braganholi** e **Isabela Brunelli** pela companhia nos inúmeros “cafézinhos”.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

À secretária do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp de Araraquara, **Margarete Rossi Ferreira**, pela gentileza, pela atenção, sempre disposta a ajudar.

A todas as funcionárias: **Wennia, Sandra, Célia, Ana Paula e Cíntia** da Seção Técnica de Pós-Graduação do Instituto de Química da Unesp de Araraquara, pelos prestados e pela atenção.

A todos os funcionários da biblioteca do Instituto de Química da Unesp de Araraquara, pelo auxílio nas correções das referências.

A todas as pessoas que fizeram parte na construção deste trabalho sempre me apoiando.

RESUMO

A família Trypanosomatidae compreende um grande número de protozoários parasitas, incluindo importantes agentes etiológicos de doenças humanas. Entre os causadores de doenças, destacam-se *Trypanosoma brucei* (responsável pela doença do sono), *Trypanosoma cruzi* (agente causador da doença de Chagas) e *Leishmanias* sp (causadoras de leishmanioses). Esses parasitas possuem como mecanismo para formação de seus mRNAs, a reação de *trans-splicing*, que envolve a excisão de íntrons (regiões intergênicas) e a união dos éxons de dois transcritos independentes, SL RNA (*spliced leader*) e pré-mRNA aceptor. Em outro trabalho realizado no laboratório, a reação de *trans-splicing in vitro* foi estabelecida utilizando extratos nucleares (livre de células) de formas epimastigotas de *T. cruzi* e/ou formas procíclicas de *T. brucei* e como pré-mRNA aceptor, a sequência parcial de alfa tubulina (contendo a região intrônica, *splice site* e parte do éxon da alfa tubulina) de *T. cruzi* marcada radioativamente (dados ainda não publicados). O uso de material radioativo é fator limitante, devido a sua alta periculosidade (extremamente nocivo ao homem e ao meio ambiente) e, também, pelo alto custo relativo aos trâmites burocráticos atuais para sua importação. Portanto, neste trabalho reproduziu-se a reação sem o uso de material radioativo, utilizando-se a transcrição reversa/ reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e gel de agarose corado por brometo de etídeo para a análise dos produtos formados. A metodologia permitirá a avaliação da interferência de substâncias tripanocidas, buscando potenciais alvos terapêuticos nas ribonucleoproteínas de parasitas, preservando as células do hospedeiro.

Palavras-chave: Trypanosomatidae. *Trans-splicing*. *Spliced leader*. Transcrição reversa.

ABSTRACT

The Trypanosomatidae family includes a large number of protozoan parasites, with important etiological agents of human diseases. Among the causes of diseases stand out *Trypanosoma brucei* (responsible for sleeping sickness), *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease causative agent) and *Leishmania sp* (causing leishmaniasis). These parasites have a mechanism that forms their mRNAs, the *trans-splicing* reaction, which involves the introns (intergenic regions) excision and two exons union of the independent transcripts, RNA SL (spliced leader) and pre-mRNA acceptor. In another laboratory study, the *trans-splicing in vitro* reaction was established using nuclear extracts (cell-free) from epimastigotes forms of *T. cruzi* and / or procyclic forms of *T. brucei*, and as pre-mRNA acceptor was used the alpha tubulin partial sequence (containing the intronic region, splice site and a radiolabelled part of alpha tubulin exon from *T. cruzi* (unpublished data). The use of radioactive material is a limiting factor, due to its high hazard (extremely harmful to humans and environment), and also by the high cost relative to the current bureaucratic procedures for importation. Therefore, in this work the reaction was reproduced without the use of radioactive material, using the reverse transcription / polymerase chain reaction (RT-PCR) and agarose gel stained with ethidium bromide for analysis of the formed products. The method allows the evaluation of trypanocidal substances interference searching potential therapeutic targets in the parasite ribonucleoprotein, preserving the host cells.

Keywords: Trypanosomatidae. *Trans-splicing*. *Spliced leader*. Reverse transcription.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição mundial da enfermidade 2006-2009	16
Figura 2 -	Formas evolutivas de <i>T. cruzi</i>	17
Figura 3 -	Ciclo biológico da transmissão da doença de Chagas	18
Figura 4 -	Distribuição mundial da Tripanosomíase Africana	21
Figura 5 -	Formas evolutivas de <i>T. brucei</i>	22
Figura 6 -	Ciclo biológico da transmissão da doença do sono	23
Figura 7 -	Formas evolutivas de <i>leishmanias</i> sp.	24
Figura 8 -	Ciclo biológico da transmissão das leishmanioses	25
Figura 9 -	Sinalização para a reação de <i>cis-splicing</i>	29
Figura 10 -	Modelo esquemático do <i>cis-splicing</i>	30
Figura 11 -	Sinalização para a reação de <i>trans-splicing</i>	31
Figura 12 -	Mecanismo de <i>cis</i> e <i>trans-splicing</i>	32
Figura 13 -	Distâncias entre as sequências que determinam o sítio de adição do SL e poliadenilação	34
Figura 14 -	Sequência parcial do gene alfa tubulina de <i>T. cruzi</i> como pré-mRNA acceptor da reação de <i>trans-splicing in vitro</i>	39
Figura 15 -	Ilustração do BLAST da sequência parcial da alfa tubulina de <i>T. cruzi</i>	39

Figura 16 - Representação esquemática da sequência do vetor pGEM-T Easy Vector	40
Figura 17 - Anelamento dos <i>primers</i> SL DIR e Tub REV para a forma processada de α -tubulina em <i>T. cruzi</i> (banda de 129 pb –mRNA)	47
Figura 18 - Anelamento dos <i>primers</i> SL_S e Tub REV para a forma processada de α -tubulina em <i>T. brucei</i> (banda de 124 pb –mRNA)	48
Figura 19 - Anelamento dos <i>primers</i> Tub trans DIR e Tub REV para a forma não processada de α -tubulina (banda de 361 pb –mRNA)	48
Figura 20 - Representação esquemática das regiões de anelamento dos iniciadores empregados na análise da reação de <i>trans-splicing</i>	49
Figura 21 - Gel de poliacrilamida 10% - 7M Uréia corado com solução de prata. Análise da integridade das snRNAs nos extratos nucleares de <i>T. cruzi</i> e <i>T. brucei</i>	50
Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídeo. Produtos da PCR de colônia	51
Figura 23 - Eletroforese em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídeo. Isolamento de DNA plasmidial	52
Figura 24 - Representação esquemática da sequência do plasmídio alfa tubulina de <i>T. cruzi</i> obtida após a reação de sequenciamento	53
Figura 25 - Representação esquemática da sequência do pré-mRNA de alfa tubulina após a reação de transcrição	54
Figura 26 - Representação esquemática do pré-mRNA alfa tubulina acceptor da reação de <i>trans-splicing</i> ilustrando as regiões sinalizadoras da reação de <i>trans-splicing</i> contidas no transcrito primário	54
Figura 27 - Eletroforese em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídeo. Linearização do plasmídio	55
Figura 28 - Eletroforese em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídeo. Purificação do plasmídio	56

- Figura 29 - Representação esquemática da sequência do mRNA alfa tubulina maduro (*T. cruzi*) obtido da reação de *trans-splicing in vitro*. Em destaque na figura a sequência SL adicionada durante a reação na extremidade 5' da região codificadora (éxon) do transcrito primário alfa tubulina 58
- Figura 30 - Análise da reação de RT- PCR com extrato nuclear (EN) de *T. cruzi* por eletroforese em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídeo 60
- Figura 31 - Análise da reação de RT- PCR com extrato nuclear (EN) de *T. cruzi* (controle da reação de *trans-splicing in vitro*) por eletroforese em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídeo 61
- Figura 32 - Análise da reação de RT- PCR com extrato nuclear (EN) de *T. brucei* por eletroforese em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídeo 62
- Figura 33 - Análise da reação de RT- PCR com extrato nuclear (EN) de *T. brucei* (controle da reação de *trans-splicing in vitro*) por eletroforese em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídeo 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resultado da quantificação do pré-mRNA de alfa tubulina de <i>T. cruzi</i> obtido após a reação de transcrição	57
Tabela 2 -	Resultado da quantificação dos produtos das reações de <i>trans-splicing in vitro</i> (mRNA maduro alfa tubulina) obtidos com extrato nuclear de <i>T. cruzi</i> e <i>T. brucei</i> para a realização da RT-PCR	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BP	<i>Branch point</i>
Cap	Capacete do RNA
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ETOH	Álcool etílico
HCl	Ácido clorídrico
KCl	Cloreto de potássio
kDNA	Complexa rede de moléculas circulares (cinetoplasto)
LB	Meio Luria-Bertani
LIT	Meio <i>Liver Infusion Tryptose</i>
M	Molar
Min	Minuto (s)
mRNA	RNA mensageiro
NaOH	Hidróxido de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>

OMS	Organização Mundial da Saúde
PAGE	Gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PCR	Reação da polimerase em cadeia
PMSF	<i>PHenylmethanesulfonyl fluoride</i>
PPT	Trato de polipirimidina
q.s.p.	quantidade suficiente para
RNA	Ácido ribonucléico
RNPs	Ribonucleoproteínas
RT	Transcrição reversa
SDM-79	<i>Semi-Defined Medium-79</i>
SL	<i>Spliced leader</i>
UTRs	Regiões não traduzidas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Tripanosomatídeos e Tripanosomíases	15
1.1.1	Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae	15
1.1.2	<i>Trypanosoma cruzi</i> e doença de Chagas	15
1.1.3	<i>Trypanosoma brucei</i> e doença do sono	20
1.1.4	Leishmanias e leishmanioses	24
1.2	Doenças negligenciadas	26
1.3	Biologia molecular dos tripanosomatídeos	26
1.3.1	Processamento do mRNA em tripanosomatídeos	27
1.3.1.1	<i>Cis-splicing</i>	28
1.3.1.2	<i>Trans-splicing</i>	30
2	OBJETIVOS	35
3	MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1	Cultivo dos parasitas	36
3.2	Preparo dos extratos nucleares e diálise	36
3.3	Fenolização e precipitação dos extratos nucleares	37
3.4	Análise dos extratos nucleares em PAGE 10% - 7M Uréia	37
3.5	Síntese do pré-mRNA acceptor da reação de <i>trans-splicing in vitro</i>	38
3.5.1	Escolha da sequência	38
3.5.2	PCR da colônia transformada	40
3.5.3	Extração de DNA plasmidial (miniprep)	41
3.5.4	Reação de sequenciamento	42
3.6	Preparação do plasmídeo alfa tubulina para reação de transcrição	43
3.6.1	Linearização do plasmídeo com a enzima de restrição <i>Pst</i> I	43
3.6.2	Purificação do DNA linearizado	43
3.7	Reação de transcrição	44
3.8	Reação de <i>trans-splicing in vitro</i>	45
3.9	Reação de RT-PCR	46
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50

4.1	Análise da integridade dos extratos nucleares de <i>T. cruzi</i> e <i>T. brucei</i>	50
4.2	Obtenção da sequência parcial da alfa tubulina de <i>T. cruzi</i> codificadora do pré-mRNA acceptor da reação de <i>trans-splicing in vitro</i>	51
4.2.1	Extração do DNA plasmidial	52
4.2.2	Reação de Sequenciamento	52
4.3	Preparação do plasmídio para a reação de transcrição in vitro	55
4.3.1	Linearização dos plasmídios	55
4.3.2	Purificação dos plasmídios linearizados	56
4.4	Reação da transcrição	56
4.5	Reações de <i>trans-splicing in vitro</i>	57
4.5.1	Obtenção da sequência do mRNA alfa tubulina maduro	57
4.5.2	Reação de <i>trans-splicing in vitro</i> com extrato nuclear de <i>T. cruzi</i> e <i>T. brucei</i>	58
4.6	Reação de RT-PCR para detecção dos produtos	59
5	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

1.1. Tripanosomatídeos e Tripanosomíases

1.1.1 Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae

A ordem Kinetoplastida reúne um grande número de espécies com caracteres muito homogêneos, todas parasitas, e dotadas de um único flagelo. Apresenta uma organela bastante singular, o cinetoplasto, porção de DNA circular presente na mitocôndria única dos parasitas (TEIXEIRA et al., 2006).

A família Trypanosomatidae reúne parasitas que infectam uma variedade de organismos, sendo importantes agentes etiológicos de doenças humanas. Dentre os membros dessa família destacam-se, pela sua importância médica e econômica, os agentes causais das leishmanioses humanas (úlceras de Bauru e calazar), das tripanosomíases humanas (doença de Chagas e doença do sono) e de diversas tripanosomíases de animais domésticos (nagana, surra, durina, mal-de-cadeiras, etc). A família Trypanosomatidae subdivide-se em vários gêneros, sendo mais estudados os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* (REY, 2001).

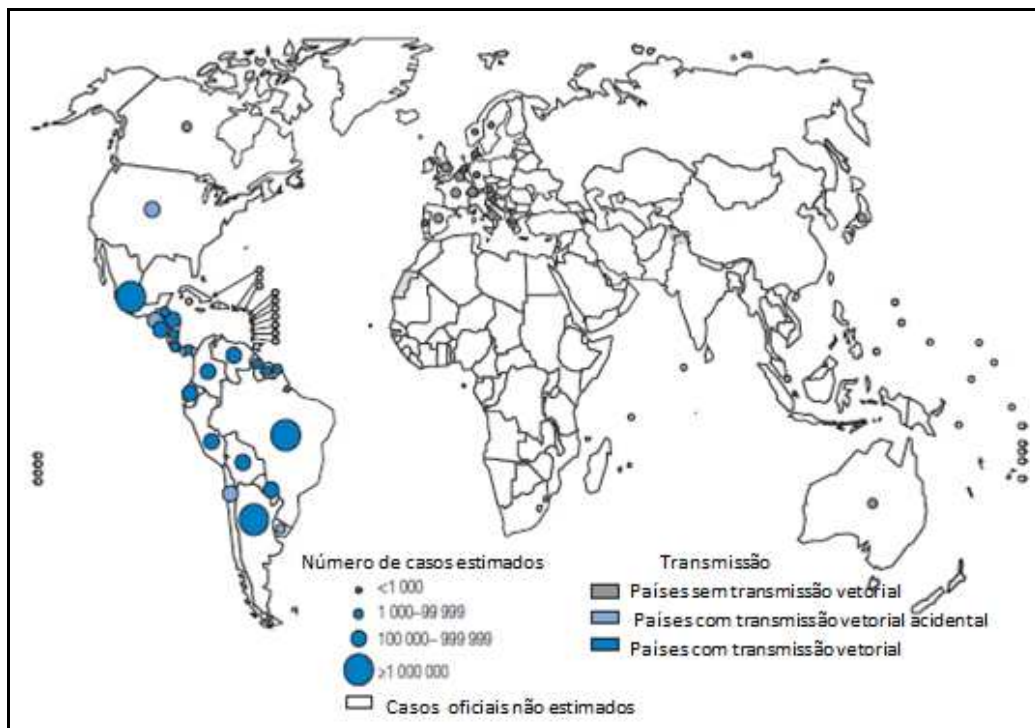
1.1.2 *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas

A tripanosomíase americana ou doença de Chagas é uma zoonose causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, transmitido pelo inseto triatomíneo (inseto hematófago da família Reduviidae), popularmente conhecido como barbeiro. Esse protozoário pertence ao subfilo Mastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Trypanosoma* (BRENER et al., 2000; CHAGAS, 1909; LANA; TAFURI, 2000; REY, 2001). A doença foi descoberta em 1909 por Carlos Chagas, pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz, que também identificou o agente causal (*Trypanosoma*) e o vetor (triatomíneo).

Existem mais de 40 espécies de triatomíneos capazes de transmitir o *T. cruzi*, sendo o gênero *Triatoma* o maior transmissor dessa infecção. Em seguida são destacados os gêneros *Panstrongylus* e *Rhodnius* com grande importância epidemiológica (TEIXEIRA et al., 2006).

O número de pessoas infectadas no mundo é estimado em 10 milhões, e a maioria ocorre na América Latina (Figura 1) - Argentina, Belize, Bolívia, Brasil, Chile, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guatemala, Guiana, Guiana Francesa, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname, Venezuela e Uruguai. Mais de 25 milhões de pessoas estão sob o risco de contraírem a doença. A estimativa em 2008 de pessoas mortas foi maior que 10.000 (WHO, 2010). Movimentos migratórios levaram *T. cruzi* para regiões onde não ocorrem o vetor, como EUA, Canadá, Japão, Austrália, Bélgica, Espanha, França, Itália, Reino Unido, Suíça, Alemanha, Áustria, Croácia, Dinamarca, Holanda, Luxemburgo, Noruega, Portugal, Romênia e Suécia. Nessas regiões a transmissão ocorre por transfusão de sangue, transplante de órgãos, acidentes em laboratórios e também via congênita(COURA; VIÑAS, 2010).

Figura 1 - Distribuição mundial da enfermidade 2006-2009.



Fonte: Modificado de WHO, 2010.

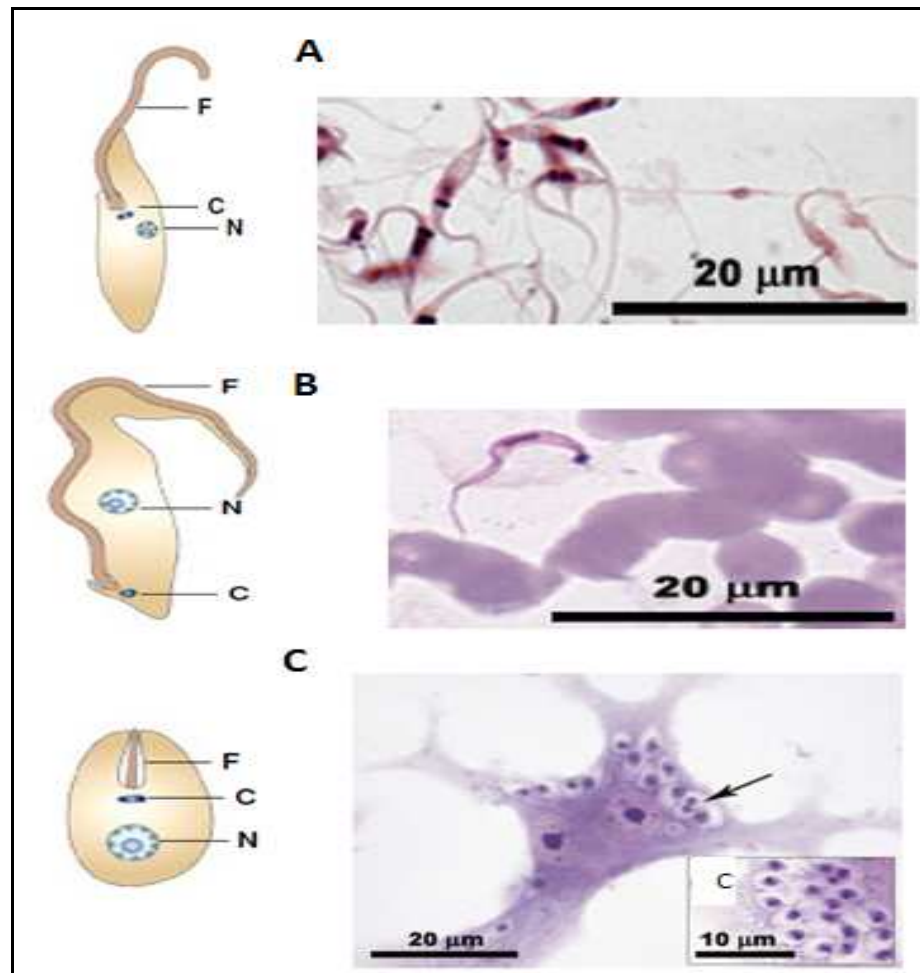
T. cruzi apresenta três principais formas evolutivas: epimastigota, tripomastigota e amastigota (figura 2). A forma epimastigota caracteriza-se por ser alongada, com cinetoplasto justanuclear e anterior ao núcleo, o flagelo surge à frente e próximo ao núcleo e emerge na extremidade anterior do parasita (figura 2A). São as formas replicativas e móveis encontrados no vetor, ocorrendo nas porções iniciais

ou médias do intestino, bem como são as formas de cultivo em meio de cultura (REY, 2001; DIAS, 2005).

A forma tripomastigota assemelha-se à epimastigota, mas com o cinetoplasto posterior ao núcleo, próximo da extremidade posterior do parasita e com flagelo que se estende por toda a célula, tornando-se livre na porção anterior (figura 2B). É a forma infectante do parasita que ocorre na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado e nas porções mais distais do tubo digestivo do vetor, não dispondo de capacidade replicativa (SOUZA, 2000).

A forma amastigota é esférica ou ovalada destituída de mobilidade e que carecem de flagelo livre (figura 2C). É a forma de replicação no hospedeiro vertebrado, presente no interior de vários tipos de células (DE SOUZA, 2000).

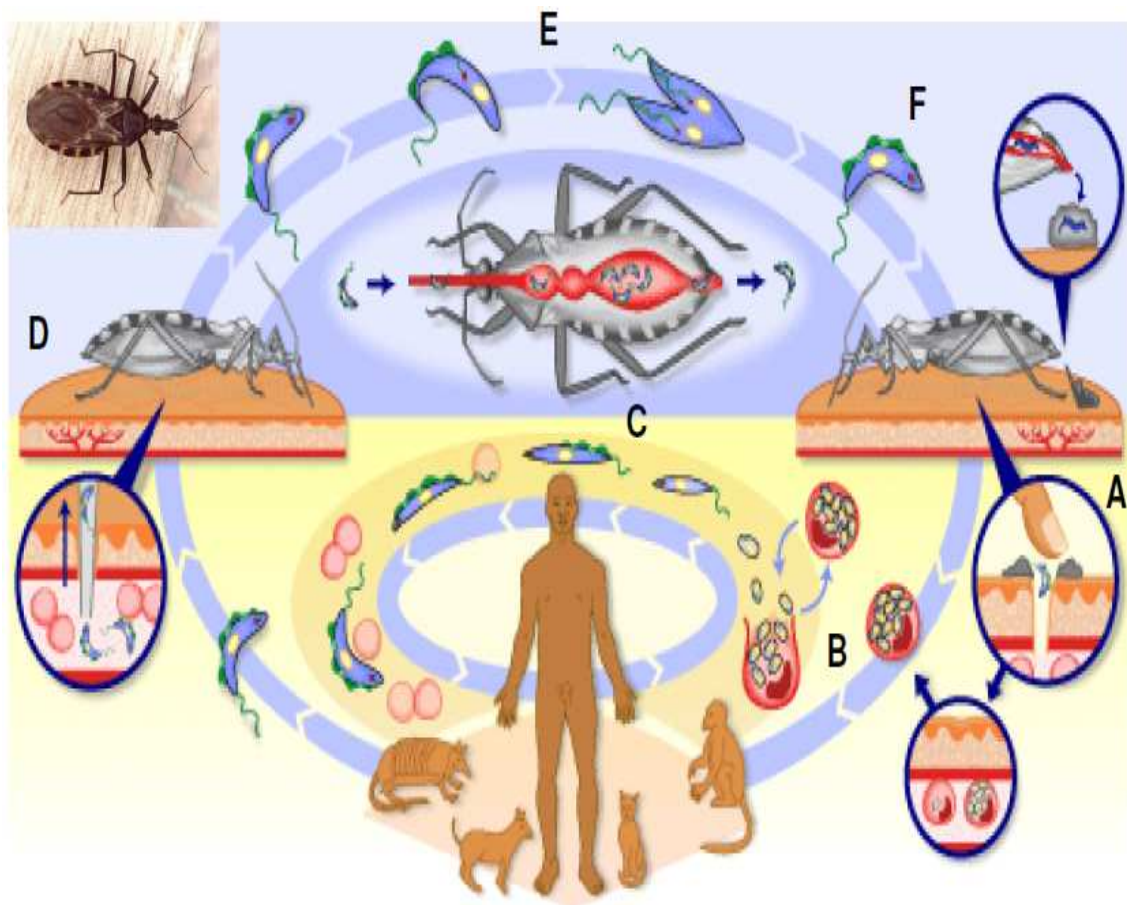
Figura 2 - Morfologia de *T. cruzi*. (A) Forma esquemática de uma epimastigota e formas epimastigotas de *T. cruzi* em meio de cultura; (B) Forma esquemática de uma tripomastigota e formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*; (C) Forma esquemática de uma amastigota e formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi* (seta); N: núcleo, C: cinetoplasto, F: flagelo.



Fonte: Rey, (2001).

O principal mecanismo de transmissão da enfermidade ocorre pelo contato com as excretas de triatomíneos contaminados. O ciclo biológico descrito por Carlos Chagas encontra-se a seguir (figura 3). Durante a picada, o triatomíneo contaminado com *T. cruzi* defeca próximo ao local e as formas tripomastigotas metacíclicas presentes nas fezes atingem a corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado pelo orifício da picada (A). Os parasitas invadem células do sistema fagocítico mononuclear cutâneo e se diferenciam em formas amastigotas, capazes de replicação (B). Essas formas são liberadas na corrente sanguínea, diferenciam-se em formas tripomastigotas que vão se disseminar pelo organismo, atacando músculos e tecidos (C). Um triatomíneo não infectado adquire as formas tripomastigotas ao picar um hospedeiro vertebrado contaminado (D). Essas formas se diferenciam em formas epimastigotas, capazes de multiplicação no intestino posterior do vetor (E). Na ampola retal, os parasitas se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas que são liberadas nas fezes (F).

Figura 3 - Ciclo biológico da transmissão da doença de Chagas.



Além da transmissão vetorial, outros mecanismos de transmissão também apresentam importância epidemiológica, como a transmissão por transfusão sanguínea e congênita, e mais recentemente, as que ocorrem via oral, pela ingestão de alimentos e bebidas contaminados. Mecanismos menos comuns envolvem acidentes de laboratório, manejo de animais infectados, transplante de órgãos e pelo leite materno (*Comunicação/ Instituto Oswaldo Cruz 2012*).

Como o parasito pode ser transmitido por transfusão sanguínea, a migração de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* levou a doença para países onde não ocorria. A doença tornou-se um potencial problema associado à migração de indivíduos contaminados de áreas endêmicas para outros países, como os Estados Unidos, Canadá, Europa oriental, Austrália e Japão (TEIXEIRA et al., 2006).

A via de transmissão oral tem chamado à atenção nos últimos anos, onde mais de 50% dos casos da doença tem sido atribuído a essa via de transmissão, principalmente pelo consumo de caldo de cana-de-açúcar e sucos de bacaba e açaí contaminados pelo parasita quando os triatomíneos contaminados são triturados juntamente com as frutas (YASUDA; CARVALHO, 2012).

Vários pesquisadores têm estudado a importância da transmissão oral da doença de Chagas desde a metade do século 20. Somente nos últimos anos devido ao aparecimento de casos no estado de Santa Catarina em 2005 e vários outros durante os últimos três anos na bacia do Amazonas, principalmente associado ao consumo do fruto de palmeira ou suco de açaí, têm chamado atenção dos pesquisadores. Na metade de março de 2005, uma grande escala de casos agudos da doença foram reportados e associados com o consumo do suco de cana de açúcar no município de Navegantes no estado de Santa Catarina. Desses casos, 25 pessoas foram diagnosticadas positivas e três morreram (PEREIRA et al., 2009).

Os únicos medicamentos disponíveis para o tratamento da doença são nifurtimox (NF) e benzonidazol (BZ). Desde a década de 80, a comercialização de NF foi descontinuada, primeiro no Brasil, depois na Argentina, Chile e Uruguai (COURA; CASTRO, 2002), porém tem sido utilizado na América Central (SOEIRO; DE CASTRO, 2011).

A ação desses medicamentos é muito limitada, a cura depende da fase da doença, da suscetibilidade da linhagem do parasita e das condições fisiológicas do hospedeiro (COURA; CASTRO, 2002). Ambos os medicamentos têm

significantes efeitos colaterais e em alguns casos, isso pode levar à descontinuidade do tratamento (URBINA; DOCAMPO, 2003).

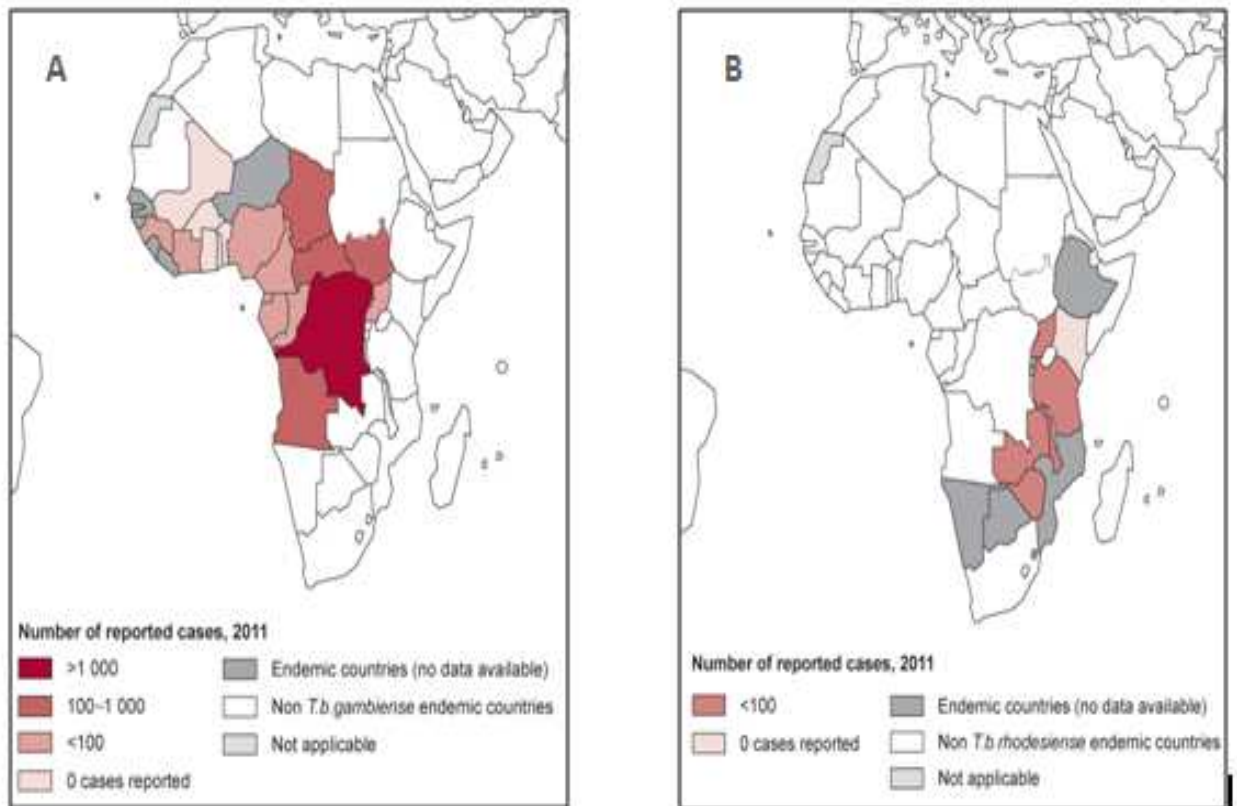
1.1.3 *Trypanosoma brucei* e doença do sono

A tripanosomíase africana ou doença do sono é causada por *Trypanosoma brucei gambiense* e *Trypanosoma brucei rhodesiense*, subespécies relacionadas ao *Trypanosoma brucei brucei*. *T. brucei brucei* foi encontrado por David Bruce em 1894, em animais domésticos, relacionado à doença denominada de nagana. A distribuição desses tripanosomas é exclusiva da África, sendo transmitido por moscas do gênero *Glossina*, mais conhecidas como moscas tsé-tsé (COX, 2004).

A Organização Mundial da Saúde estima que cerca de 70 milhões de pessoas, principalmente as que vivem em zonas rurais da África, correm risco de contrair a doença, e muitos novos casos ocorrem a cada ano, porém não se pode comprovar este número devido a dificuldades na avaliação estatística em países em desenvolvimento (WHO, 2011).

O *T. b. gambiense* é endêmico em 24 países da África Ocidental e Central, causando a doença do sono crônica ou gambiense, e representa 90% dos casos notificados da doença (Figura 4A). Por outro lado, o *T. b. rhodesiense* é endêmico em 13 países do leste da África, causando a doença do sono aguda ou rhodesiense, que é mais perigosa, pois a doença se desenvolve mais rapidamente (Figura 4B). Representa 10% dos casos notificados da doença (COX, 2004).

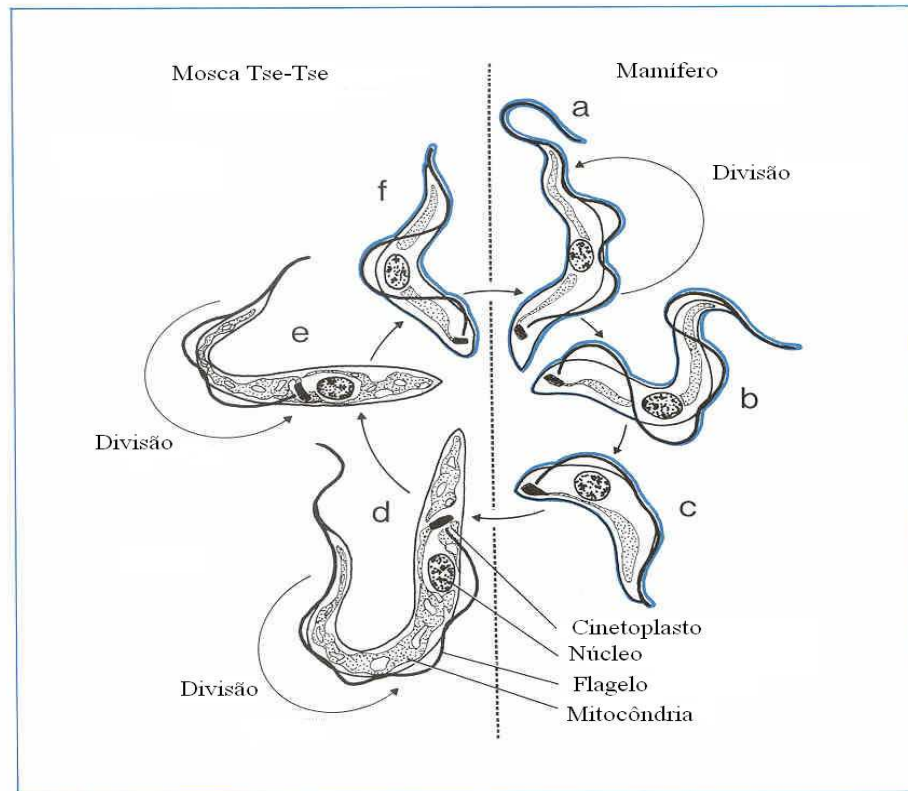
Figura 4 - Distribuição mundial da Tripanosomíase Africana: (A) *Trypanosoma brucei gambiense* e (B) *Trypanosoma brucei rhodesiense*



Fonte: Modificado de WHO, 2011.

Durante o ciclo biológico, o parasito se diferencia em algumas formas e se multiplica por divisão binária, tanto no hospedeiro como no vetor (Figura 5).

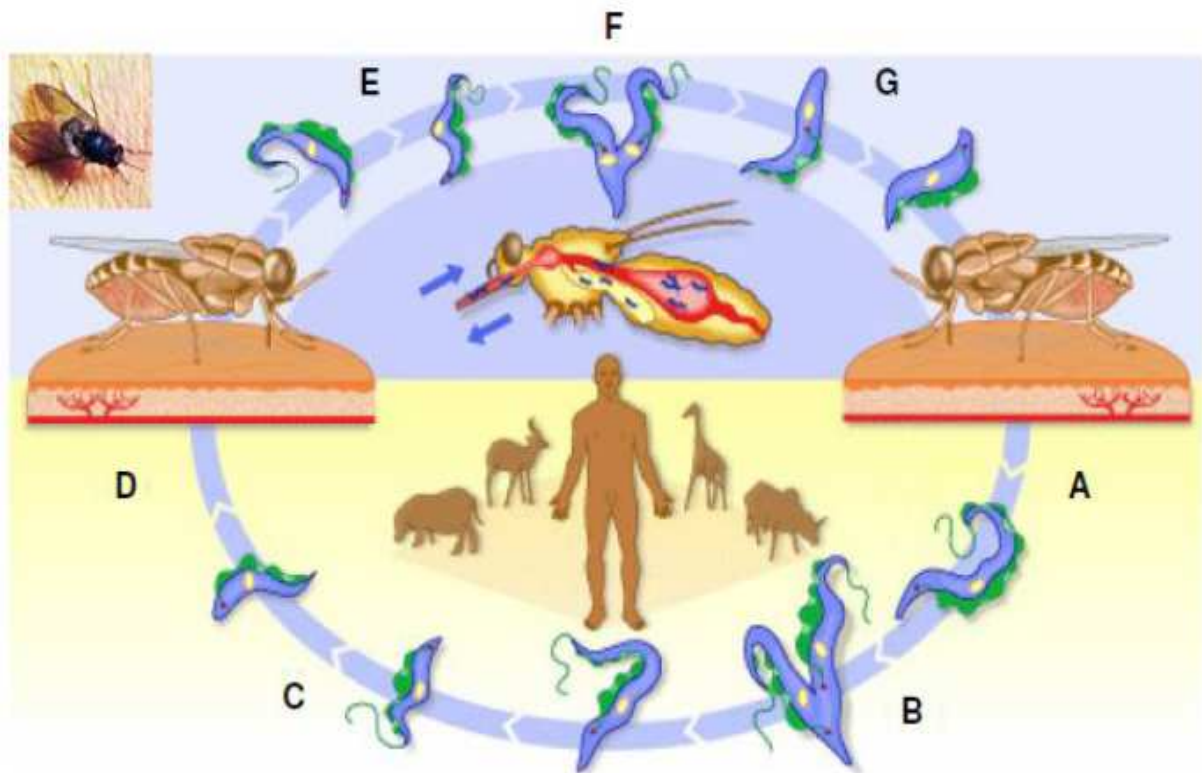
Figura 5 - Detalhes das formas apresentadas pelo *T. brucei* durante o ciclo biológico. a, sanguínea delgada; b, sanguínea intermediária; c, sanguínea larga; d, procíclica; e, epimastigota; f, metacíclica.



Fonte: <<http://www.ilri.org/InfoServ/Webpub/fulldocs/llrad90/Trypano.htm>>. Acesso em 15 jun. 2013.

Durante o ciclo da tripanosomíase africana, a mosca contaminada (*Glossina* sp) injeta formas tripomastigotas metacíclicas (A) durante a picada. O parasito se diferencia em forma tripomastigota sanguínea, que se multiplica na corrente sanguínea (B). Os parasitos se espalham pela corrente sanguínea, podendo atingir o sistema nervoso central. Com a alta parasitemia, essas formas se tornam mais curtas e largas (C). Outra mosca ingere essas formas tripomastigotas, contaminando-se (D). As formas tripomastigotas se diferenciam em formas procíclicas (E) e em seguida em epimastigotas que se multiplicam na glândula salivar (F). Após a multiplicação, essas formas transformam-se em tripomastigotas metacíclicos (G) e o ciclo inicia-se novamente (BRUCE, 1914). O ciclo biológico da transmissão da doença encontra-se esquematizado na Figura 6.

Figura 6 - Ciclo biológico da transmissão da Doença do Sono.



Fonte: Silva (2009, p. 11).

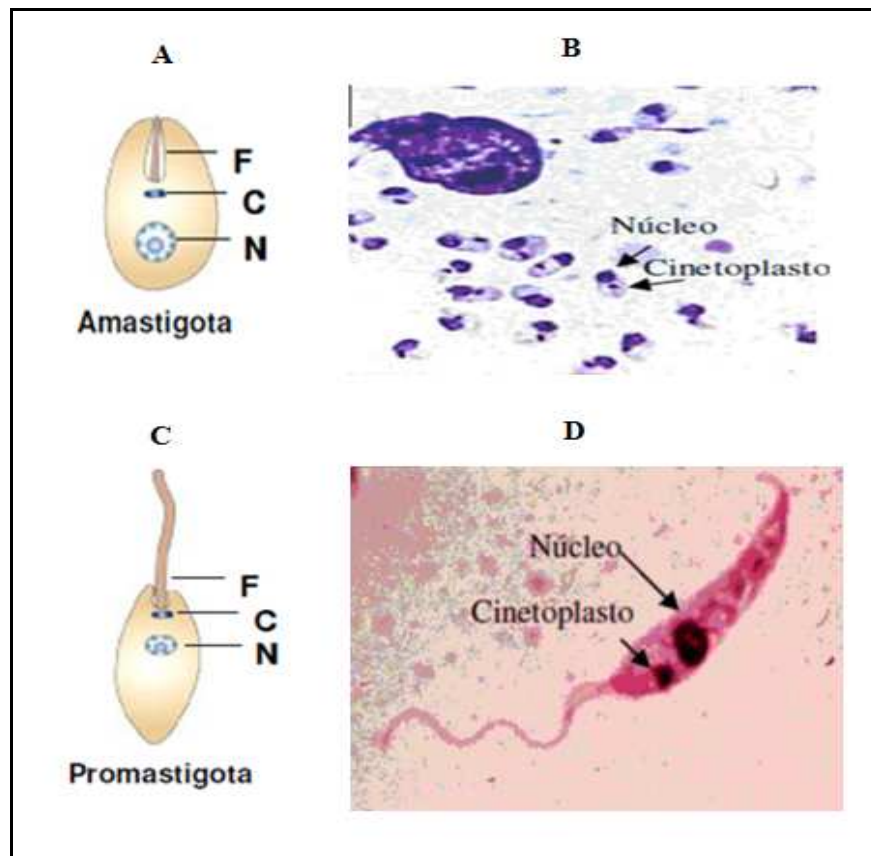
O tratamento da doença do sono está apoiado nos fármacos pentamidina, que foi introduzido no mercado em 1940, exercendo ação contra o *T. b. gambiense* e suramina, que foi introduzida no mercado em 1920, tendo ação contra o *T. b. rhodesiense*; ambos são utilizados para a fase inicial da doença. A fase crônica possui um tratamento mais difícil, pois é necessário que o fármaco atravesse a barreira hematoencefálica (SNC). São utilizados dois fármacos, o melarsoprol (introduzido em 1949), eficiente para ambas as espécies de *T. brucei* e a eflornitina (introduzida em 1981), sendo eficaz somente para o *T. b. gambiense* (KENNEDY, 2004; COX, 2004).

Vários esforços estão sendo feitos na busca de uma vacina para a doença do sono, mas devido à variação antigênica dos parasitas, dificilmente será obtida uma vacina eficaz (COX, 2004).

1.1.4 Leishmanias e leishmanioses

As leishmanioses são causadas por pelo menos 20 diferentes espécies de *Leishmania*, transmitidas por insetos dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. *Leishmania donovani* foi observada em pacientes sofrendo de Kala-azar e foi descrita em 1903 por Leishman e Donovan, simultaneamente, e assim esses parasitos foram classificados como pertencentes ao gênero *Leishmania*. Mais tarde, entre 1904 e 1908, foi observado um parasita semelhante em crianças da região do Mediterrâneo que foi denominado de *Leishmania infantum*. Somente em 1941 foi demonstrada, por Adler e Ber, a transmissão da leishmaniose por flebotomíneos (GREVELINK; LERNER, 1996). A figura 7 descreve as diferentes formas de leishmanias.

Figura 7 - A: Forma esquemática de uma amastigota; B: Amastigotas de *Leishmania* sp. As setas estão indicando o núcleo e cinetoplasto; C: Forma esquemática de uma promastigota; D: Promastigota de *Leishmania* sp. As setas estão indicando o núcleo e cinetoplasto; N: núcleo, C: cinetoplasto, F: flagelo.



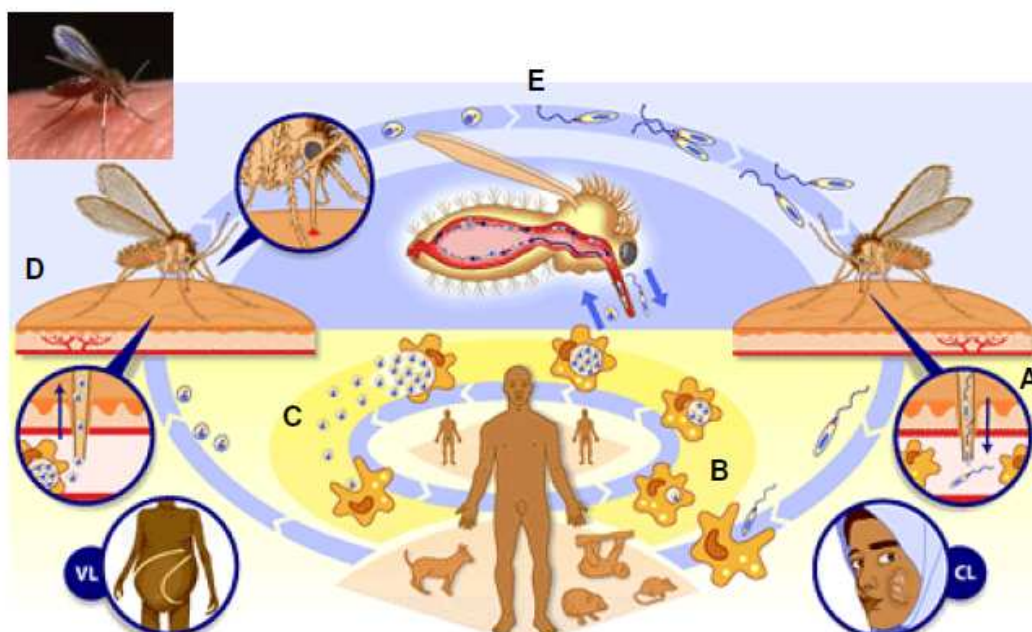
Fonte: Silva (2009, p. 14).

Três principais tipos de leishmaniose podem ser observados, visceral, cutânea ou mucocutânea, que dependem da espécie e do zimodema a que pertence o parasita (PISCOPO; AZZOPARDI, 2006).

As leishmanioses são predominantes em 88 países de quatro continentes. Sabe-se que a cada ano surgem aproximadamente 1,6 milhões de novos casos de leishmaniose, do qual estima-se que 500 mil são do tipo visceral (90% deles ocorrem em Bangladesh, Brasil Etiópia, Índia, Nepal e Sudão) e 1,1 milhão, cutânea (90% deles ocorridos no Afeganistão, Argélia, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita, Sudão e República Árabe da Síria) ou mucocutânea (90% ocorrem no Brasil, Peru e Bolívia) (WHO, 2010).

Durante o ciclo da doença (Figura 8), o flebotomíneo inocula formas promastigotas de leishmania no hospedeiro vertebrado durante a picada (A). Essas formas invadem o sistema mononuclear fagocitário e se diferenciam em amastigotas, capazes de proliferação no interior dessas células (B). Após o rompimento da célula, as formas amastigotas são liberadas e parasitam outras células (C). Outro flebotomíneo infecta-se durante a picada do hospedeiro vertebrado contaminado ao ingerir macrófagos parasitados (D). As formas amastigotas são liberadas após o rompimento dos macrófagos no estômago do vetor, se diferenciam em promastigotas e multiplicam-se (E).

Figura 8 - Ciclo biológico da transmissão das Leishmanioses



No tratamento da leishmaniose visceral é utilizado o fármaco miltefosina, administrado por via oral, sendo hoje a opção mais efetiva e segura de tratamento. Na leishmaniose cutânea, o tratamento pode ser local ou sistêmico, dependendo do tipo de leishmania presente. No tratamento local são utilizados paromomicina-metilbenzetonio e imiquimod. Para o tratamento sistêmico, podem ser utilizadas pentamidina, fluconazol, cetoconazol, miltefosina e alopurinol (PISCOPO; AZZOPARDI, 2006).

1.2 Doenças negligenciadas

As doenças negligenciadas são doenças causadas por agentes infecciosos ou parasitas, consideradas endêmicas em populações de baixa renda, a exemplo da leishmaniose, doença do sono, malária e doença de Chagas, que geram um impacto devastador sobre a humanidade. Como resultado, por se tratarem de doenças que afetam pessoas pobres, não oferece um retorno lucrativo suficiente para que a indústria farmacêutica invista em pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos voltados para as mesmas. Fica claro, portanto, que a crise de falta de medicamentos para doenças negligenciadas não chegou às atuais proporções por falta de conhecimento científico, e nem pela falta de interação entre a pesquisa básica e a pré-clínica. Esta crise é o resultado tanto das insuficientes políticas públicas voltadas para pesquisa e desenvolvimento de medicamentos de interesse nacional dos países em desenvolvimento, quanto da falha de mercado, provocada pelo baixo interesse econômico que esses pacientes representam para a indústria. Associado a esses fatores comente-se a necessidade de formação de recursos humanos qualificados e de muitos estudos sobre a temática (WHO, 2012).

1.3 Biologia molecular dos tripanosomatídeos

Os tripanosomatídeos possuem dois genomas distintos, situados em dois compartimentos celulares bem definidos: o núcleo e a mitocôndria. A mitocôndria alberga uma complexa rede de moléculas circulares de DNA denominada de kDNA. (SILVEIRA, 2000). O kDNA representa cerca de 20-25% do DNA total da célula, e é composto por dois tipos de moléculas circulares, que diferem em tamanho e função, denominadas de minicírculo e maxicírculo. Os minicírculos possuem cerca de 1.400

pb (pares de bases) e estão presentes em 10.000 a 20.000 cópias por célula. O número e tipos de classes de minicírculos podem variar entre as diferentes cepas ou isolados do parasita. As sequências presentes no minicírculo não são traduzidas em peptídeos, mas sequências variáveis são transcritas gerando pequenos RNAs denominados de gRNA (RNA guia), que estão envolvidos no processo de editoração dos mRNAs das enzimas mitocondriais; esse DNA se concentra em uma determinada região da mitocôndria, dando origem a uma estrutura chamada de cinetoplasto, importante na diferenciação das formas em que os parasitas podem ser encontrados durante o ciclo biológico (REY, 2001).

Os maxicírculos possuem cerca de 40.000 pb de tamanho, e o número de cópias por células varia de 20 a 50. Os genes das proteínas mitocondriais e dos rRNAs mitocondriais estão localizados no maxicírculo. Existem no maxicírculo cerca de 15 genes que codificam as proteínas mitocondriais envolvidas na respiração celular. A organização da cromatina dos tripanosomas difere daquela encontrada nos eucariotos complexos e mesmo em outros protistas. Os cromossomos dos tripanosomas não se condensam durante a divisão celular e a segregação dos cromossomos para as células-filhas, durante a divisão celular, ocorre intranuclearmente, sem a dissolução da carioteca ou membrana nuclear (endomitose). A divisão celular nos tripanosomas ocorre através do mecanismo mitótico (SILVEIRA, 2000).

O genoma nuclear dos tripanosomatídeos, tal como ocorre em outros eucariotos, é composto por sequências de DNA que podem ser agrupadas em três classes majoritárias: a) sequências que codificam proteínas, b) sequências que codificam RNAs e c) sequências repetidas, as quais, de maneira geral, não são codificadoras. Deve-se também levar em conta a presença de sequências espaçadoras existentes entre genes codificadores de proteínas ou RNA que podem conter elementos reguladores de transcrição (SILVEIRA, 2000).

1.3.1 Processamento do mRNA em tripanosomatídeos

Desde 1990, os cientistas observaram que eucariotos possuem genomas muito grandes com centenas de milhares de íntrons. A maioria dos genes codificadores de proteínas no genoma humano é composta de vários éxons interrompidos por íntrons. Avanços no conhecimento da genômica e proteômica de

mamíferos confirmaram a necessidade de reprogramação do mRNA usado para obter os produtos dos genes e produção de proteínas e a importância do processamento dos mRNAs, denominado *splicing*, que é um passo essencial da expressão do gene através da remoção de sequências não codificadoras (íntrons) para ligadura juntas das sequências codificantes (éxons). Os éxons são geralmente curtos com 50 a 250 pb, enquanto que os íntrons são muito maiores e podem chegar a vários milhares de pb (revisão em CICARELLI et al., 2012).

Splicing é um evento nuclear de processamento dos RNAs, em que éxons diferentes do mRNA de transcritos primários estão unidos. As sequências intrônicas são removidas do pré-mRNA e os éxons fundidos resultando na formação do RNA mensageiro (mRNA) maduro; posteriormente é adicionado na sua extremidade 5' o cap e poliadenilação em sua extremidade 3' e após estas modificações o mRNA é transportado para fora do núcleo para ser traduzido em proteínas no citoplasma. Quando a reação de *splicing* ocorre dentro de uma única molécula de pré-mRNA, o processo denomina-se *cis-splicing*; quando a reação de *splicing* tem natureza intermolecular, ou seja, duas moléculas distintas de pré-mRNA são unidas para formar um único mRNA maduro, o processo denomina-se *trans-splicing* (LIANG et al., 2003; MAYER; FLOETER-WINTER, 2005; TYCOWSKI et al., 2006).

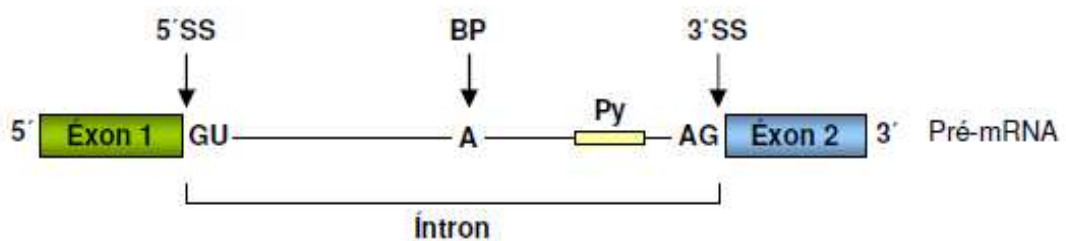
O processamento dos pré-mRNAs por *cis* e *trans-splicing* é catalisado pelo spliceosomo, uma maquinaria de alto peso molecular composta por ribonucleoproteínas (RNPs) e outras proteínas. As ribonucleoproteínas (U1, U2, U4/U6, U5 e SL) se apresentam na forma de complexos de pequenos RNAs (snRNAs) e proteínas, capazes de catálise de RNA (LIANG et al., 2003; MAYER; FLOETER-WINTER, 2005; TYCOWSKI et al., 2006).

1.3.1.1 *Cis-splicing*

Em síntese, no processamento do pré-mRNA por *cis-splicing* os íntrons são removidos e liberados na forma de uma estrutura em laço e os éxons unidos em uma mesma molécula de mRNA (LIANG et al., 2003; MAYER; FLOETER-WINTER, 2005). Para que haja o correto processamento do pré-mRNA é necessário o reconhecimento e pareamento dos sítios corretos de *splicing* 5' e 3' e a definição das extremidades do íntron no início do processamento; para isso são utilizados nucleotídeos que serão responsáveis por essa sinalização, como o GU no sítio de

splicing 5' (sítio de clivagem 5'), AG no sítio de *splicing 3'* (sítio de clivagem 3'), A do *branch point* (sítio de ligação da extremidade 5' do íntron durante o processamento) e o trato de polipirimidinas (reconhecimento do *branch point*, seleção do sítio de *splicing 3'* e poliadenilação), conforme ilustrado na figura 9 (AMBRÓSIO, 2008).

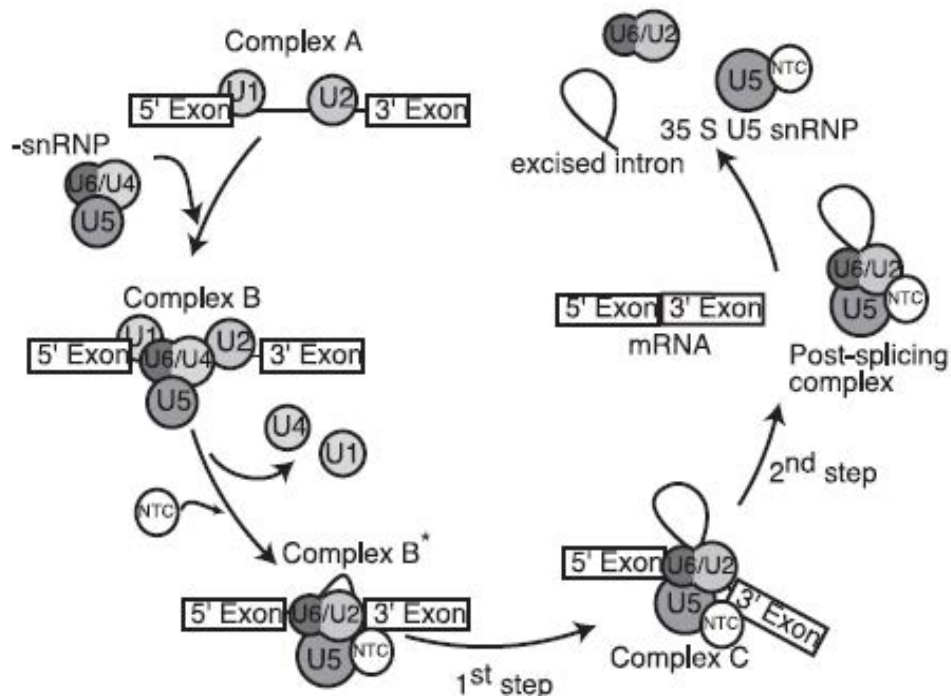
Figura 9 - Sinalização para reação de *cis-splicing*. 5'SS: sítio de *splicing 5'*, BP: *branch point*, Py: trato de polipirimidinas, 3'SS: sítio de *splicing 3'*.



Fonte: Ambrósio, (2008).

Cis-splicing ocorre em duas etapas, sendo que em cada passo observa-se uma reação de transesterificação. A montagem do pré-spliceosomo inicia-se com a formação do complexo A, resultado da ligação de U1 e U2 snRNP ao sítio de *splicing 5'* e ao *branch point* (BP) do pré-mRNA, respectivamente. Ao complexo A são adicionados U4/U6 di-snRNP e U5 snRNP como um trisnRNP, estabelecendo o spliceosomo, denominado de complexo B. Através de uma série de rearranjos, como a saída dos complexos U1 e U4 e incorporação do complexo NTC (*Prp19-associated complex* ou *Nineteen complex*), forma-se um complexo ativo com capacidade catalítica, nomeado de complexo B*. Durante este passo, U1 é dissociado do sítio de *splicing 5'* e U6 liga-se nesta mesma região. O duplex entre U4/U6 snRNAs, gerado pela união de U4/U6 snRNPs, é desfeito e permite o pareamento de bases entre U2-U6. Após este primeiro passo de reação, novos rearranjos ocorrem, levando à formação do complexo C. Após a segunda catálise, o spliceosomo se dissocia e as snRNPs ficam livres para o processamento de outro RNA. A figura 10 resume o processamento (OHI et al., 2005, 2007).

Figura 10: Modelo esquemático do *cis*-splicing.



Fonte: Ohi et al., (2007).

A clivagem do sítio de *splicing* 5' e a formação da estrutura em forma de laço (*lariat*), seguidos pela clivagem do sítio de *splicing* 3' e ligação dos éxons, ocorrem dentro do spliceosomo ativado (OHI et al., 2007).

1.3.1.2 *Trans-splicing*

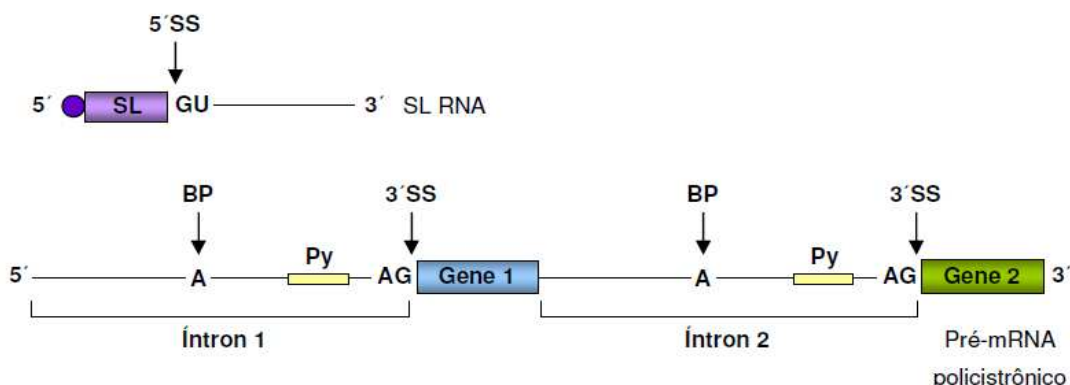
O processamento dos pré-mRNAs por *trans-splicing* é considerado não usual por estar presente em somente alguns organismos. Esse processamento foi descoberto em 1982, quando foi observado que os mRNAs de *T. brucei* para diferentes glicoproteínas variáveis de superfície (VSGs) possuíam uma sequência comum de 39 nucleotídeos, denominada de *spliced leader* (SL) (BOOTHROYD; CROSS, 1982). Mais tarde foi determinado que todos os mRNAs em tripanosomas eram processados por *trans-splicing* (AGABIAN, 1990), mas com a exceção do gene da poli-A polimerase (MAIR et al., 2000). Inicialmente acreditava-se que somente os tripanosomas apresentavam esse processamento, porém, mais tarde, o mesmo foi observado em nematódeos (KRAUSE; HIRSH, 1987), euglenóides (TESSIER et al., 1991), trematodos (RAJKOVIC et al., 1990) e, mais recentemente, em cestódeos

(BREHM; JENSEN; FROSCHE, 2000), em *Hydra* do filo Cnidária (STOVER; STEELE, 2001) e cordados (VANDENBERGHE; MEEDEL; HASTINGS, 2001).

Trans-splicing é uma reação intermolecular de processamento de RNA, na qual estão envolvidas duas moléculas distintas de RNA que serão unidas, formando um RNA mensageiro maduro. Principais componentes desta reação são o pré-mRNA, transcritos de forma policistrônica em tripanosomatídeos e um pequeno RNA, chamado de *spliced leader* (SL) RNA. (SHAKED et al., 2010; MICHAELI, 2011). No processamento por *trans-splicing*, cada sequência codificante é individualizada e unida a outro transcrito independente, o SL, de forma que todo mRNA maduro inicia com a mesma sequência de SL (aproximadamente 39 nucleotídeos) e o *íntron* é liberado na forma de uma estrutura em Y, diferentemente da estrutura em laço observada no *cis-splicing* (MURPHY et al., 1986; LIANG et al., 2003; MAYER; FLOETER-WINTER, 2005).

Para que haja o correto processamento do pré-mRNA é necessário o reconhecimento e pareamento dos sítios corretos de *splicing* 5' e 3' e a definição das extremidades do íntron no início do processamento; para isso são utilizados nucleotídeos que serão responsáveis por essa sinalização, como o GU no sítio de *splicing* 5' (sítio de clivagem 5'), que neste caso encontra-se no SL RNA, AG no sítio de *splicing* 3' (sítio de clivagem 3'), A do *branch point* (sítio de ligação da extremidade 5' do íntron durante o processamento) e o trato de polipirimidinas (reconhecimento do *branch point*, seleção do sítio de *splicing* 3' e poliadenilação), conforme ilustrado na figura 11 (LASDA; BLUMENTHAL, 2011).

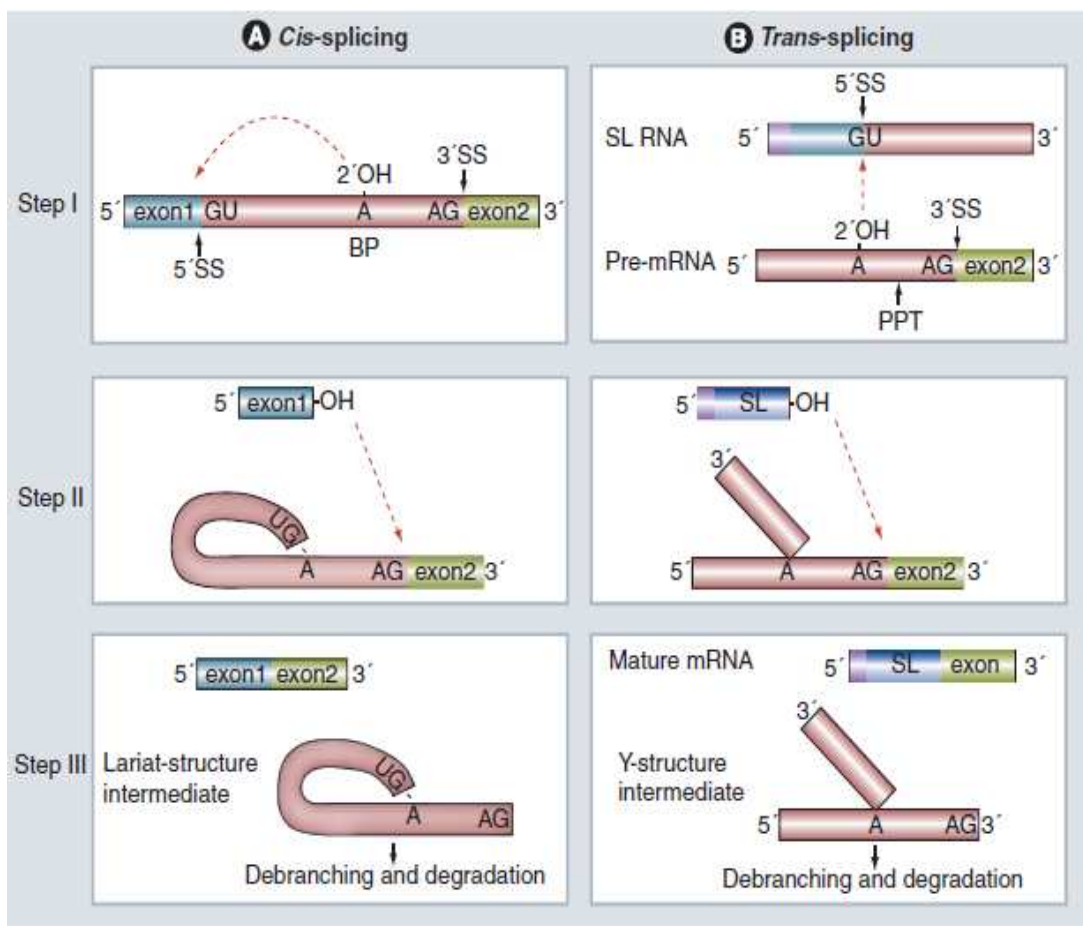
Figura 11 - Sinalização para reação de *trans-splicing*. 5'SS: sítio de *splicing* 5', BP: *branch point*, Py: trato de polipirimidinas, 3'SS: sítio de *splicing* 3', SL: *spliced leader*, círculo: *cap*.



Fonte: Ambrósio, (2008).

Exceto pela natureza intermolecular, o *trans-splicing* apresenta as mesmas etapas do *cis-splicing* (Figura 12), duas reações de transesterificação; na primeira etapa, ocorre clivagem no sítio doador do SL (5'SS), gerando 5' SL éxon; o SL remanescente liga-se à adenosina do íntron no pré-mRNA aceptor para formar o Y intermediário (correspondente ao *lariat* do *cis-splicing*). Na segunda etapa, a clivagem no sítio de splicing 3' e ligação dos éxons geram o RNA maduro e um Y-íntron excisado (MURPHY et al.; 1986; ULLU; TSCHUDI, 1995).

Figura 12 - Mecanismo de *cis* e *trans-splicing*. (A) Representa o mecanismo de *cis-splicing* e (B), o mecanismo de *trans-splicing*. As duas etapas de transesterificação estão indicadas. Os sítios 5' (GU) e 3' (AG) de *splicing* e a sequência BP estão indicadas. BP: *Branch point*; PPT: trato de polipirimidinas; SL: *spliced leader*, SS: sítios de *splicing*.



Fonte: Michaelli et al., (2011)

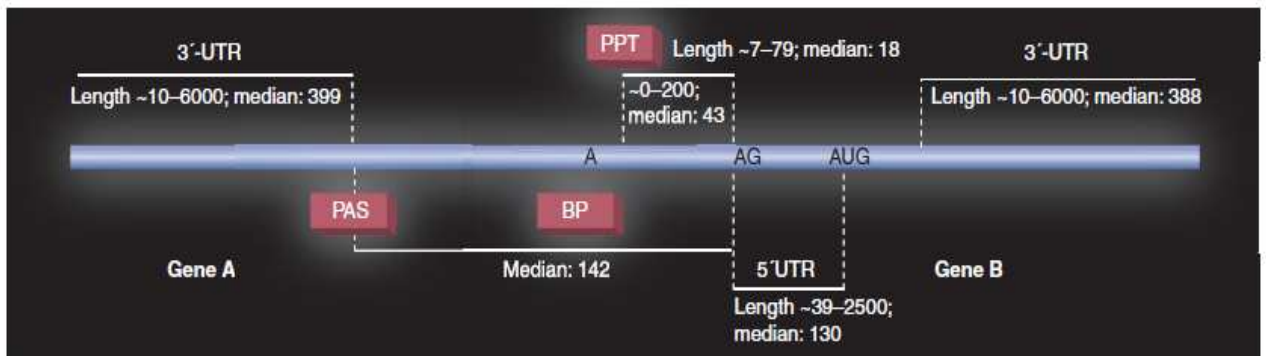
Em tripanosomas, a única sequência promotora definida e caracterizada até o momento é a do gene SL RNA (MURPHY et al., 1986), sendo esta sequência promotora conservada entre as espécies de tripanosomatídeos (KRAUSE; HIRSH, 1987; TESSIER et al., 1991). O cap 5' do SL RNA apresenta uma estrutura

complexa denominada de *cap4* por possuir uma 7-metilguanossina ligada a quatro nucleotídeos modificados (RAJKOVIC et al., 1990).

Os primeiros estudos utilizando células permeáveis sugeriram que estas modificações no *cap4* são adicionadas co-transcricionalmente e a maquinaria que realiza estas modificações foi elucidada nos últimos anos (ZHANG et al., 2007; MANDELBOIM et al., 2002). Verificou-se que a modificação total no *cap4* é essencial para a biogênese do SL RNA e para que a reação de *trans-splicing* ocorra (LÜCKE et al., 1996; MAIR et al., 2000). O SL RNA é transcrito em um sítio nuclear distinto perto do nucléolo, identificado pela primeira vez em *Trypanosoma cruzi* (DOSSIN; SCHENKMAN; 2005). Além disso, as proteínas Sm foram mostradas concentrar-se neste local, aumentando a possibilidade de que a transcrição do SL RNA, a modificação e montagem dele com suas proteínas de ligação ocorram neste domínio, que foi chamado SL *ribonuclearprotein* (RNP) *factory* (BITON et al.; 2006; HURY et al.; 2009; TKACZ et al.; 2010).

Três estudos recentes foram realizados para obter-se o mapeamento do genoma do SL, dos sítios de adição da poly(A) (KOLEV et al., 2010; SIEGEL et al., 2010) e sítios de adição do SL em *T. brucei* (NILSSON et al., 2010). O estudo de Kolev et al.,(2010) levou à identificação de 1.114 novos transcritos não originários a partir de ORFs (fases de leitura aberta), que são *trans-splicing* e poliadenilação (KOLEV et al., 2010). Juntos, os três estudos identificaram o processamento alternativo dessas transcrições, em ambas as extremidades, 5' ou, em um maior número de casos, na extremidade 3' (KOLEV et al., 2010; SIEGEL et al., 2010). O tamanho médio encontrado das regiões não traduzidas 5' (UTRs) foi de 130 nucleotídeos , e para as regiões 3' (UTRs) foi encontrado o tamanho médio de 400 nucleotídeos (Figura 13).

Figura 13: Distâncias entre as sequências que determinam o sítio de adição do SL e poliadenilação. A: Adenina ; BP: *Branch point*; G: Guanina; PAS: sítios de adição da Poly(A); PPT: trato de polipirimidinas; UTR: regiões não traduzidas.



Fonte: Micaelli et al., (2011)

O estudo mostrou também que a distância média entre o sítio de *splicing* AG e o sítio de adição da poli (A) é de aproximadamente 142 nucleotídeos (figura 13); isto não é surpreendente, visto que *trans-splicing* e poliadenilação são eventos acoplados. O trato de polipirimidinas (PPT) é muito crítico para a escolha do sítio de adição da sequência SL, sua distância média do sítio de *splicing* AG foi considerada de aproximadamente de 50 nucleotídeos, embora uma distância máxima de aproximadamente 200 nucleotídeos também foi observada (Figura 13) (MICHAELI, 2011). Heterogeneidade também foi encontrada no tamanho do PPT em si; o tamanho mediano é de 18 nucleotídeos, mas tamanhos maiores com cerca de 80 nucleotídeos também foram observados (KOLEV et al., 2010).

A variação da distância observada entre estes sítios pode refletir em sítios de regulação. Esta heterogeneidade envolve *trans-splicing* alternativo, especialmente entre os 2 ciclos de hospedeiros do parasita (MICHAELI, 2011). *Trans-splicing* alternativo pode contribuir para a adaptação durante os ciclos do parasita entre os hospedeiros e criar a expressão diferencial do SL, por exemplo, a proteína alvo para diferentes compartimentos celulares (NILSSON et al., 2010).

A reação de *cis-splicing in vitro* usando extrato nuclear de células HeLa já foi padronizada e utilizada como modelo de estudo em diversos experimentos (LUHRMAN 1998; CICARELLI et al.1998). Recentemente, foi padronizada no laboratório a reação de *trans-splicing in vitro* utilizando extratos nucleares (livre de células) de formas epimastigotas de *T. cruzi* e/ou de formas procíclicas de *T. brucei* como fonte de SL RNA e spliceossomo e, como pré-mRNA acceptor, a sequência parcial da alfa tubulina (contendo a região intrônica, sítio de *splicing* e parte do éxon

da alfa tubulina) de *T. cruzi*, sintetizada *in vitro* e marcada radioativamente. As bandas referentes aos produtos da reação de *trans-splicing* foram mapeadas em gel de poliacrilamida denaturante (dados ainda não publicados).

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo reproduzir a reação de *trans-splicing in vitro* em tripanosomas sem o uso de material radioativo, analisando-se as bandas referentes aos produtos da reação por RT-PCR (transcriptase reversa – PCR) em gel de agarose.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultivo dos parasitos

As formas epimastigotas da cepa Y (SILVA; NUSSENZWEIG, 1953) de *T. cruzi* e as formas procíclicas da cepa 427 (CROOS; MANNING, 1973) de *T. brucei*, utilizadas neste trabalho, foram selecionadas por se tratarem de formas não infectantes para os humanos, serem de fácil manutenção em cultura e os resultados obtidos podem orientar experimentos posteriores em formas infectantes.

O cultivo de formas epimastigotas de *T. cruzi* foi realizado em meio LIT - *liver infusion tryptose* (FERNANDES; CASTELLANI, 1966), suplementado com 10% de soro fetal bovino, em estufa a 28°C, realizando-se repiques a cada 15 dias.

As formas procíclicas de *T. brucei* foram cultivadas em meio SDM-79 (BRUN; SCHONENBERGER, 1979), suplementado com 10% de soro fetal bovino, em estufa a 28°C, realizando-se repiques a cada 4 dias.

3.2 Preparo dos extratos nucleares e diálise

Os extratos nucleares foram preparados com ambas as culturas de *T. cruzi* e *T. brucei* na concentração de 5×10^7 células/mL, conforme protocolo sugerido em Arnosti et al. (manuscrito em preparação).

As culturas foram centrifugadas à temperatura ambiente por 10 minutos a 2.800 x g. O precipitado obtido foi ressuspensão em 10 mL de tampão AGK (10 mM Tris-HCL pH 7,9; 1,5 mM MgCl₂; 200 mM KCl) acrescido de inibidores de proteases (1 mM PMSF - *PHenylmethanesulfonyl fluoride*; 1 µg/mL Leupeptin; 0,5 mM DTT) e centrifugado, nas mesmas condições descritas anteriormente, repetindo-se este passo por duas vezes. Em seguida, adicionou-se 1 mL de tampão AGK com inibidores e transferiu-se o precipitado para novo microtubo contendo bolinhas de vidro (glass beads), que foram mergulhados em nitrogênio líquido por 1 minuto, seguido de choque térmico em banho seco a 38°C até descongelar parcialmente; os tubos foram levados ao vórtex durante 4 minutos. Este passo foi repetido três vezes para o rompimento das células, seguindo-se de centrifugação por 4 minutos a 4°C por 30 minutos a 12.000 x g. Os sobrenadantes foram descartados e o precipitado ressuspensão em 0,5 volume de tampão C (20 mM Tris-HCL pH 7,9; 1,5 mM MgCl₂;

25% glicerol; 0,2 mM EDTA; 0,02 M KCL; 0,2 mM PMSF; 0,5 mM DTT) e 0,5 volume do tampão D (20 mM Tris-HCL pH 7,9; 1,5 mM MgCl₂; 25% glicerol; 0,2 mM EDTA; 1,2 M KCL; 0,2 mM PMSF; 0,5 mM DTT), este foi adicionado gota a gota; os tubos ficaram sob agitação suave à 4°C por 30 minutos. Após nova centrifugação (4°C por 30 minutos a 12.000 x g), para obtenção do extrato nuclear, os sobrenadantes foram dializados por 6 horas em tampão E (20mM de Tris-HCl pH7,9; 20% de glicerol; 100mM de KCl; 0,2mM de ETDA; 0,5mM de DTT e 0,2mM de PMSF), de baixa molaridade de KCl. Os extratos nucleares foram fenolizados e analisados em gel de poliacrilamida (PAGE) 10% - 7M Uréia corado com solução de prata.

3.3 Fenolização e precipitação dos extratos nucleares

Os extratos nucleares foram submetidos à fenolização e precipitação com o intuito de averiguar a presença dos snRNAs (U1, U2, U4, U5, U6) íntegros em Gel Page 10% - 7M Uréia (VIANNA et al., 2001; AMBROSIO et al., 2007).

Para 10% de extrato nuclear adicionou-se 5% SDS e H₂O DEPC (0,1% de dietilpirocarbonato, agitação por 12 horas e autoclavação a 121°C por 15 minutos e 1 atm) q.s.p.; adicionou-se fenol-clorofórmio na proporção V:V; os tubos foram agitados em vórtex por 3 a 5 minutos e centrifugados à 4°C por 1 minuto a 18.000 x g. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para novo microtubo, adicionando-se 2,5 V de etanol 100%, 0,1 V de NaAc 3 M pH 7,0 e misturou-se por inversão. As amostras foram incubadas à -80°C por 30 minutos, seguido de centrifugação à 4°C por 5 minutos a 18.000 x g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado (RNAs) ressuspensão em 15 µL de tampão formamida (0,025% xylene cyanol; 0,025% azul bromofenol; formamida deionizada q.s.p.), aquecendo-o por 5 minutos a 95°C. A amostra foi aplicada em PAGE 10% - 7M Uréia.

3.4 Análise dos extratos nucleares em PAGE 10% - 7M Uréia

As amostras de extratos nucleares foram submetidas à eletroforese em PAGE 10% - 7M Uréia: 7 M uréia; 1% Acrilamida+40%bis-acrilamida; TBE 0,5X (para TBE 10X: 890 mM Tris base; 890 mM ácido bórico; 20 mM EDTA; acertar o pH para 8,3 e autoclavar a 121 °C por 15 minutos e 1 atm); 0,1% TE MED e 1% de solução APS 10% (persulfato de amônio); as amostras foram aplicadas no gel com tampão

formamida. A eletroforese foi realizada na voltagem 90 V por 2 horas em tampão TBE 1X.

Após a corrida, o gel foi corado com solução de prata, como segue: solução 40% metanol + 10% ácido acético por 30 minutos; solução 10% etanol + 5% ácido acético por 15 minutos; solução 10% etanol + 5% ácido acético por 15 minutos; água destilada por 5 minutos; solução de 12 mM de nitrato de prata por 20 minutos; água destilada por 1 minuto; solução de 0,28 M de carbonato de sódio + 0,0185% formaldeído por 1 minuto; solução de 0,28 M de carbonato de sódio + 0,0185% formaldeído até o aparecimento das bandas; o gel foi armazenado em solução 5% ácido acético.

3.5. Síntese do pré-mRNA acceptor da reação de *trans-splicing in vitro*

3.5.1 Escolha da sequência

A sequência parcial da alfa tubulina de *T. cruzi* (Figura 14) com 374 pares de bases foi selecionada como pré-mRNA acceptor para a reação de *trans-splicing in vitro*. Escolheu-se essa sequência por ser um gene abundante no parasita e constitutivo. A sequência selecionada contém uma região não codificadora de polipeptídios (ínteron/região intergênica) seguida de uma sequência codificadora de polipeptídios (éxon) e os sinalizadores da reação de *trans-splicing*: *Branch point* (BP), trato de polipirimidinas (Py) e sítio de *splicing* 3' (AG). O número de acesso da sequência completa do gene alfa tubulina no banco de dados NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) é AF091835.1. BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) da sequência está ilustrado na figura 15.

Figura 14 - Sequência parcial do gene alfa tubulina de *T. cruzi* usada como pré-mRNA acceptor da reação de *trans*-splicing *in vitro*. Em amarelo: região intergênica não codificadora de polipeptídios (intron/região intergênica); Em verde: região codificadora de polipeptídios (éxon). Sublinhado: regiões sinalizadoras da reação de *trans*-splicing contidas no transcrito primário. BP: *Branch point*; Py: trato de polipirimidinas; 3'SS: sítio de *splicing* 3' (AG).

```

TGACGGGACGCGATGTACAAAGTCGCTGGTCAACGGGTGCACCCGCTCTTATATATATATATATATA
TATATATATATATATATATATGTTTACTTGGCACTTTTGCCTTCCTCTTCTCTCTCTCTCTGTGTG
TATGCCTGCGTGTGCGAAATGCTTTGGCCTTTTCTTACTCTCCCCGCTTGGCGGTTTGGTAGTTCGTT
      BP      Py
CTAGCTAGGCTTTCGAGCTTCCCTTCAAACACCCTCAAATAAACTCCTTCTTTCAAGATGCGTGAGGCCG
                                     3'SS
ATTGCATTACATCGGTCAGGCCGGTTGCCAGGTTGGCAATGCGTGCTGGGAGCTGTCTGTCTGGA
GCACGGTATCCAGCCCGACGGTG
  
```

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 15 - Ilustração do resultado do BLAST da sequência parcial de alfa tubulina de *T. cruzi*.

```

>|gb|AF091835.1|AF091835 Trypanosoma cruzi strain CL beta tubulin and alpha tubulin genes,
partial cds; and intergenic spacer region, complete sequence
Length=1450

Score = 623 bits (337), Expect = 1e-177
Identities = 366/378 (96%), Gaps = 10/378 (2%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      TGACGGGACGCGATGTACAAAGTCGCTGGTCAACGGGTGCACCCGCTCTtatatatatat 60
Sbjct 964     TGACGGGACGCGATGTACAAAGTCGCTGGTCAACGGGTGCA-CCGCTC-T-TATATA-A- 1018

Query 61     atatatatatatatatatatatatatatatGTTTACTTGGCACTTTTGCCTTCCT-CTTT 119
Sbjct 1019    ATATATATATATATATATATATATATATATATATATATGTTTACTTGGCACTTTTG-CTTCTCCTTT 1077

Query 120    CCTtctctctctctctctctGTGTGTATGCCTGCGTGTGCGAAATGCTTTGGCCTTTTCTCT 179
Sbjct 1078    CCTTCTCTCTCTCTCTGTGTGTATGCCTGCGTGTGCGAAATGCTTTGGCCTTTTCTCT 1137

Query 180    T-ACTCTCCCCGCTTT-GCGCGTTT-GGTAGTTCGTTCTAGCTAGGCTTTCGAGCTTCCC 236
Sbjct 1138    TCACCTCTCCCCGCTTTCGCGCGTTTGGGTAGTTCGTTCTAGCTAGGCTTTCGAGCTTCTC 1197

Query 237    TTCAAACACCCTCAAATAAACTCCTTCTTTTCAAGATGCGTGAGGCGATTTCATTACACA 296
Sbjct 1198    TTCAAACACCCTCAAATAAACTCCTTCTTTTCAAGATGCGTGAGGCGATTTCATTACACA 1257

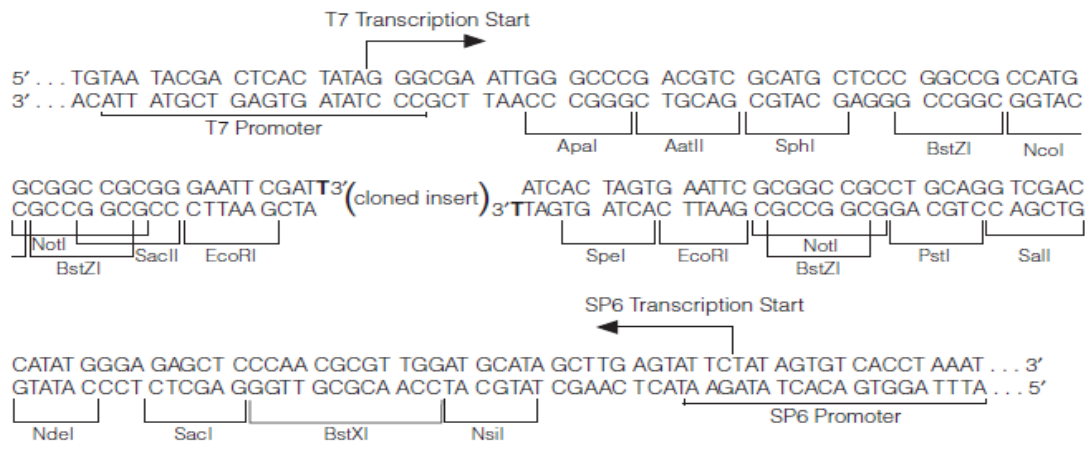
Query 297    TCGGTCAGGCCGGTTGCCAGGTTGGCAATGCGTGCTGGGAGCTGTTCTGTCTGGAGCACG 356
Sbjct 1258    TCGGTCAGGCCGGTTGCCAGGTTGGCAATGCGTGCTGGGAGCTGTTCTGTCTGGAGCACG 1317

Query 357    GTATCCAGCCCGACGGTG 374
Sbjct 1318    GTATCCAGCCCGACGGTG 1335
  
```

Fonte: < <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em 06 jun. 2013.

A sequência alvo, obtida por PCR a partir de DNA genômico de *T. cruzi*, foi clonada no vetor de clonagem pGEM®-T Easy Vector, que possui todas as características necessárias para a obtenção do pré-mRNA. Apresenta uma sequência promotora para a enzima T7 RNA polimerase, que possibilita a reação de transcrição *in vitro* após a linearização do vetor com a enzima *Pst*I (Figura 16).

Figura 16 - Representação esquemática da sequência do vetor pGEM-T Easy Vector, ilustrando a região promotora da enzima T7 RNA polimerase (utilizada neste estudo na transcrição do pré-mRNA); a região onde foi inserido o inserto alfa tubulina e o sítio de restrição da enzima de restrição *Pst*I (utilizada neste estudo para linearizar o plasmídeo após a transformação). O tamanho total do vetor é de 3.015 pares de bases.



Fonte: < http://www.promega.com/products/pcr/pcr-cloning/pgem_t-easy-vector-systems>. Acesso em 10 out. 2012.

3.5.2 PCR de colônia transformada

A clonagem da sequência parcial da alfa tubulina já havia sido realizada no laboratório e os clones positivos foram congelados em glicerol e mantidos no freezer -80 °C.

Uma pequena quantidade destes glicerizados de bactérias *E. coli*, contendo os plasmídios com a sequência da alfa tubulina de *T. cruzi*, foi suspensa em 5mL de meio LB contendo 5 µL de ampicilina (50 µg/mL) e incubadas a 37 °C *overnight* para posterior isolamento de DNA plasmidial. Em tubo de 0,2 mL foram adicionados: 2 µL da suspensão de bactérias; 5 µL *Platinum Buffer* (Invitrogen) 10X; 2 µL MgCl₂ [50 mM]; 1 µL *primer M13 forward* [10 µM] (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'); 1µL *primer M13 reverse* [10 µM] (5'-CAGGAAACAGCTATGAC'-3'); 0,5 µL dNTP [10 mM]; 0,2

μL *Platinum Taq DNA polymerase* [5 U/ μL] (Invitrogen) e H_2O q.s.p.50 μL . As reações foram colocadas em termociclador *Veriti* (*Applied Biosystems by Life Technologies*) seguindo o ciclo abaixo:

94 °C – 2 minutos	}	30 X
94 °C – 45 segundos		
53 °C – 45 segundos		
72 °C – 1 minuto		
72 °C – 5 minutos		
4 °C - ∞		

Os produtos foram analisados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizados em transiluminador UV. O restante da suspensão de bactérias foi utilizado para fazer a extração de DNA plasmidial.

3.5.3 Extração de DNA plasmidial (miniprep)

A cultura de bactéria restante citada anteriormente foi centrifugada à temperatura ambiente por 10 minutos a 2.800 x g, descartando o sobrenadante. Adicionou-se 100 μL da solução I (25 mM de Tris-HCl pH 8,0; 10 mM de EDTA pH 8,0; 50 mM de glicose) e agitou-se em vórtex até ressuspender totalmente o sedimento; adicionou-se 200 μL da solução II (0,4 M de NaOH; 2% SDS). Homogeneizou suavemente por inversão, transferindo-se para novo microtubo de 1,5 mL e incubou-se no gelo por 5 minutos; adicionou-se 200 μL da solução III (3 M de acetato de potássio; 11,5% de ácido acético glacial), misturando suavemente por inversão e incubou-se no gelo por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a temperatura ambiente por 5 minutos a 18000 x g. Foi transferido 400 μL do sobrenadante em novo microtubo e adicionou-se 400 μL fenol/ clorofórmio; os tubos foram levados ao vórtex por 5 segundos e centrifugados a temperatura ambiente por 2 minutos a 18.000 x g. Recuperou-se 350 μL do sobrenadante e transferiu-se para novo microtubo, adicionando-se 1 μL de RNase A [10mg/mL] seguido de incubação à 37 °C por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado 400 μL de clofórmio isoamilálcool (24:1); agitaram-se os tubos em vórtex por 5 segundos e centrifugou-se a temperatura ambiente por 2 minutos a 18.000 x g. Foi transferido 300 μL do

sobrenadante em novo microtubo e as amostras foram precipitadas com 0,1 V de acetato de sódio pH 5,2 e 2,5 V de etanol 100%, misturando-se os tubos suavemente e incubação à -80 °C por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4 °C por 20 minutos a 18.000 x g; o sedimento foi lavado com 1 mL de etanol 70% e centrifugado novamente a 4 °C por 10 minutos a 18.000 x g. O DNA precipitado foi seco, ressuspensão em 30 µL de água Mili-Q e analisado por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizados em transiluminador UV.

3.5.4 Reação de sequenciamento

Para a reação de sequenciamento dos plasmídios, os reagentes a seguir foram adicionados no tubo de 0,2 mL: 4 µL DNA plasmidial [200 ng], 2 µL de tampão do kit *Big Dye Terminator* v. 3.1 (Applied Biosystems by Life Technologies); 2 µL *primer M13 forward* (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') ou 2 µL *primer M13 reverse* (5'-CAGGAAACAGCTATGAC'-3') [1,6 pmol/µL] e 2 µL de *Big Dye Terminator* v. 3.1 (Applied Biosystems by Life Technologies). Os tubos foram colocados em termociclador Veriti (Applied Biosystems by Life Technologies) seguindo o ciclo abaixo:

96 °C – 2 minutos	} 40 X
96 °C – 30 segundos	
53 °C – 30 segundos	
69 °C – 4 minutos	
4 °C - ∞	

O produto da reação de sequenciamento foi purificado e precipitado, através da técnica de purificação e precipitação com etanol/EDTA.

Os tubos foram removidos do termociclador e centrifugados por 1 minuto, as amostras foram transferidas para uma placa de 96 poços, na qual adicionou-se 2,5 µL de EDTA 125mM em cada poço, e adicionou-se 25µL de etanol 100% em cada poço, selou-se a placa e envolveu-a em papel alumínio e misturou-se por inversão, a placa foi incubada à temperatura ambiente e abrigo da luz por 15 minutos, centrifugou-se a 2.500 x g por 30 minutos a 4°C, imediatamente, destampou-se a

placa e inverteu-se para descartar o sobrenadante e centrifugou-a a 180 x g por 15 segundos, adicionou-se 100 µL de etanol 70% em cada poço, selou-se a placa novamente e centrifugou-a a 2.500 x g por 15 minutos a 4°C, inverteu-se a placa para descartar o sobrenadante e centrifugar novamente por 1 minuto a 185 x g com ela invertida, deixou-se secando durante uma noite no escuro.

As amostras foram ressuspensas, em placa utilizando Formamida *HI-DI* conforme o protocolo descrito a seguir: foram adicionados na placa 10 µL de Formamida *HI-DI* (Applied Biosystems), em cada poço. Colocou-se a placa em agitador, durante 1 minuto. Após ser agitada, a placa foi centrifugada a 14.000 x g por 30 segundos. A placa onde a amostra foi aplicada foi submetida a um “spin” e aquecida a 95 °C em termociclador Veriti (Applied Biosystems) com a tampa aberta por 3 minutos. Em seguida, a placa foi colocada em gelo por aproximadamente 3 minutos e submetida à eletroforese capilar, no analisador genético ABI 3500 (Applied Biosystems).

3.6 Preparação do plasmídeo alfa tubulina para reação de transcrição

3.6.1 Linearização dos plasmídios com a enzima de restrição *Pst* I

A reação foi realizada conforme especificações do fabricante da enzima de restrição *Pst*I (Fermentas). A amostra foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador UV.

3.6.2 Purificação do DNA linearizado

Os plasmídios linearizados foram purificados para viabilizar a reação de transcrição. Na purificação adicionou-se na proporção 1:1 (V/V) fenol-clorofórmio; o tubo foi agitado em vórtex por 20 segundos e centrifugou-se a temperatura ambiente por 5 minutos a 18.000 x g, transferindo a fase superior para novo microtubo. Adicionou-se 2,5 V de etanol 100%, 0,1 V de acetato de sódio 3 M pH 7,0 e misturou-se por inversão suavemente. Em seguida, centrifugou-se a temperatura ambiente por 10 minutos a 18.000 x g; o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 500 µL de etanol 70%. O sedimento foi seco a vácuo e ressuspense em 20 µL de água Mili-Q livre de RNAses. A amostra foi analisada por eletroforese em

gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador UV.

3.7 Reação de transcrição

A reação de transcrição foi realizada com a enzima T7 RNA polimerase (Thermo Scientific) e o plasmídeo de alfa tubulina previamente linearizado, nas seguintes condições: tampão de transcrição 1X (Thermo Scientific); 1,4 U/ μ L RNAsin; 10 mM DTT; 0,015 A/ μ l Cap (GpppG); 0,1 μ g/ μ L plasmídeo alfa tubulina. A reação foi incubada à temperatura ambiente por 10 minutos para a ligação do Cap (resíduo de 7-metilguanossina que se une à extremidade 5' do mRNA através de uma ligação 5',5' trifostato). Em seguida, foi adicionado 20 mM MgCl₂; 0,5 mM ATP; 0,05 mM GTP; 0,5 mM CTP; 0,5 mM UTP; 2 U/ μ L T7 RNA polimerase; H₂O DEPC (dietilpirocarbonato - Sigma) q.s.p.20 μ L. A reação foi incubada por 4 horas a 37°C.

Ao final da reação, adicionou-se à amostra 20 μ L de tampão formamida (proporção V:V), incubou-se a 96°C por 2 minutos, seguido de gelo. A amostra foi aplicada em Gel de poliacrilamida 5% - 7 M Uréia e eletroforese realizada por 50 minutos a 800 V. O gel foi corado com brometo de etídeo e analisado em um transiluminador UV.

As bandas referentes aos pré-mRNAs foram excisadas do gel e colocadas em microtubo com 200 μ L tampão de extração TNES (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 300 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,1% SDS), incubando-se à 4 °C *overnight* em homogeneizador para extração. Em seguida, adicionou-se 200 μ L de fenol/clorofórmio/ isoamilálcool (25:24:1), o tubo foi agitado em vórtex por 20 segundos e centrifugou-se a temperatura ambiente por 5 minutos a 18.000 x g. Esta etapa foi repetida uma vez e a fase superior foi transferida para novo microtubo; adicionou-se 200 μ L de n-butanol, o tubo foi agitado em vórtex por 20 segundos e centrifugou-se a temperatura ambiente por 5 minutos a 18.000 x g. A fase superior foi descartada e adicionou-se à fase inferior, 200 μ L clorofórmio/ isoamilálcool (24:1), para nova extração. A fase superior foi transferida para novo microtubo e adicionou-se 2,5 V de etanol 100% e 0,1 V de acetato de sódio 3 M pH 7,0, incubando no freezer -80 °C por 40 minutos para a precipitação. Em seguida, centrifugou-se a 4 °C por 15 minutos a 18.000 x g, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 500

μL de etanol 70%. Foi realizado centrifugação à 4 °C por 15 minutos a 18.000 x g, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco e ressuspenso em 20 μL de H_2O DEPC. As amostras foram quantificadas (ng/ μL) no espectrofotômetro *Epoch* (Biotek), e armazenadas a -80 °C.

3.8 Reação de *trans-splicing in vitro*

A reação de *trans-splicing in vitro* foi realizada nas seguintes condições: 2 mM MgCl_2 ; 0,02 M creatin-fosfato; 0,52 mM ATP; 40% extrato nuclear; 400 ng pré-mRNA, H_2O DEPC q.s.p.25 μL . A reação foi incubada a 25 °C por 1 hora e 30 minutos, com extrato nuclear de *T. brucei* e a 28°C com extrato nuclear de *T. cruzi* adicionando-se, em seguida, 2 μL de proteinase K [20 mg/mL]; 10 μL SDS 10% e 63 μL de água DEPC, incubando a 37 °C por 15 minutos. Os RNAs foram extraídos com fenol/clorofórmio/isoamilálcool (25:24:1), seguido de vórtex por 5 segundos e centrifugação a temperatura ambiente por 5 minutos a 18.000 x g. Posteriormente, transferir a fase superior para novo microtubo e precipitar os RNAs com 1 μL de glicogênio, 10 μL acetato de sódio 3 M pH 7,0 e 250 μL de etanol 100%, incubando-se as amostras a -80 °C por 40 minutos. Em seguida, centrifugou-se a 4 °C por 15 minutos a 18.000 x g, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 500 μL de etanol 70%. Foi realizado centrifugação à 4 °C por 15 minutos a 18.000 x g, o sobrenadante foi descartado cuidadosamente e o sedimento seco e ressuspenso em 20 μL de H_2O DEPC. As amostras foram quantificadas (ng/ μL) no espectrofotômetro *Epoch* (Biotek), e armazenadas a -80 °C.

Como controle para todas as reações de *trans-splicing in vitro*, utilizou-se 400 ng pré-mRNA alfa tubulina; 2 mM MgCl_2 ; 0,02 M creatin-fosfato; 0,52 mM ATP e H_2O DEPC q.s.p.25 μL sem adição de extrato nuclear (EN); este controle foi submetido ao mesmo procedimento descrito acima.

A reação de *trans-splicing* é dependente de ATP; como controle, uma reação foi preparada sem a adição de ATP e creatin-fosfato; os demais reagentes foram adicionados nas mesmas concentrações. Entretanto, deve-se levar em consideração que a presença de ATP endógeno no extrato nuclear já foi relatada anteriormente por Arnosti et al. (manuscrito em preparação).

3.9 Reação de RT-PCR

Para confirmação das reações de *trans-splicing in vitro* com extrato nuclear de *T. cruzi*, os produtos (RNAs) foram submetidos a reação de transcrição reversa seguida por PCR (RT-PCR, do inglês *reverse transcription – polymerase chain reaction*) com oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos para detecção do pré-mRNA e do mRNA maduro. A detecção do mRNA maduro foi realizada com os iniciadores SL DIR *forward* (5'-AACTAACGCTATTATTGATACAG-3') e Tub REV *reverse* (5'-GATACCGTGCTCCAGACAG-3') e a detecção do pré-mRNA foi realizada com os iniciadores Tub trans DIR *forward* (5'-TGACGGGACGCGATGTAC-3') e Tub REV *reverse* (5'-GATACCGTGCTCCAGACAG-3'), que são específicos para a forma não processada. As bandas esperadas são de 129 pb e 361pb, respectivamente.

Para confirmação das reações de *trans-splicing in vitro* com extrato nuclear de *T. brucei* foram utilizados os iniciadores SL_S *forward* (5'-ACGCTATTATTAGAACAG-3') e Tub REV *reverse* (5'-GATACCGTGCTCCAGACAG-3'), para a detecção do mRNA maduro e para a detecção do pré-mRNA, foram utilizados os mesmo iniciadores citados anteriormente. As bandas esperadas são de 124 pb e 361pb, respectivamente.

Para a síntese do cDNA utilizou-se 5 µL de RNA [1µg/µL], produto das respectivas reações de *trans-splicing in vitro* e 1 µL de *primer reverse* Tub REV [10µM], seguido de incubação a 70 °C por 5 minutos e 4 °C por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 4 µL Improm *Buffer* 5X (Promega); 2,4 µL de MgCl₂ [25mM]; 1 µL dNTP [10mM]; 0,5 µL de RNasin [40U/ µL] (Promega); 1 µL transcriptase reversa Improm II [1U/ µL] e H₂O DEPC q.s.p. 20 µl. As reações foram colocadas em termociclador *Veriti* (*Applied Biosystems by Life Technologies*) seguindo o ciclo abaixo:

25 °C – 5 minutos

42 °C – 60 minutos

70 °C – 15 minutos

Para as posteriores reações de PCR foram empregados os iniciadores descritos anteriormente, utilizando-se 3 µL do cDNA; 5 µL *Platinum Buffer*

(Invitrogen) 10X; 1,5 μL MgCl_2 [50 mM]; 1 μL *primer forward e reverse* [10 μM]; 1 μL dNTP [10 mM]; 0,2 μL *Platinum Taq DNA polymerase* [5 U/ μL] (Invitrogen) e H_2O q.s.p. 50 μL . As reações foram colocadas em termociclador *Veriti* (*Applied Biosystems by Life Technologies*), conforme a ciclagem para cada *primer*, descrita abaixo:

SL DIR/ Tub REV e Tub trans DIR/ Tub REV

94 °C – 2 minutos
 94 °C – 30 segundos
 56 °C – 30 segundos
 72 °C – 1 min e 30 seg } 30 X
 72 °C – 5 minutos
 4 °C - ∞

SL_S/ Tub REV

94 °C – 2 minutos
 94 °C – 30 segundos
 48 °C – 30 segundos
 72 °C – 1 min e 30 seg } 30 X
 72 °C – 5 minutos
 4 °C - ∞

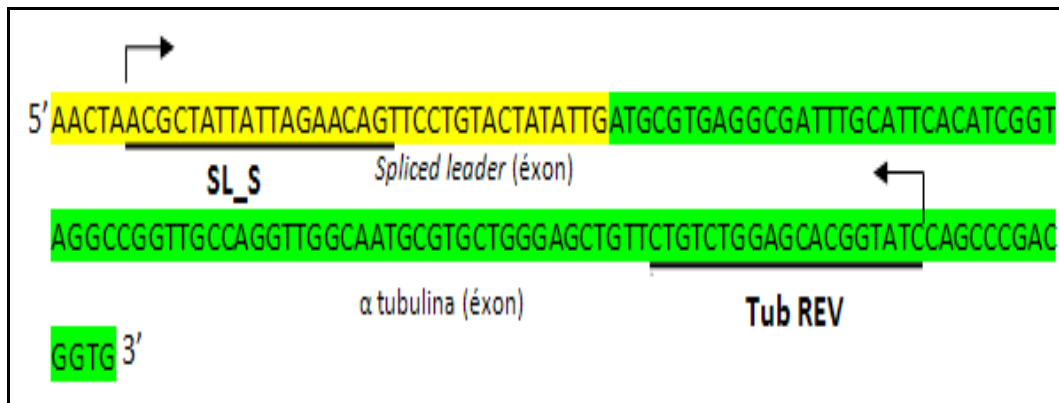
Para demonstrar as regiões em que os *primers* flanqueiam e se anelam ao gene da alfa tubulina processada (mRNA maduro) em *T.cruzi*, foram utilizadas as sequências dos genes AF091835.1 (alfa tubulina) e AF506368.1 (SL RNA), e para o gene da alfa tubulina processada em *T.brucei*, foi utilizada a mesma sequência, somente alterando a sequência do gene SL RNA (EU180642.1), todas obtidas do *GenBank*. Para demonstrar as regiões em que os *primers* se anelam ao gene da alfa tubulina não processada (pré-mRNA), ou seja, contendo a região codificadora (éxon) e não codificadora (íntron, região intergênica) foi utilizada a mesma sequência citada anteriormente (Figuras 17, 18 e 19).

Figura 17 - Anelamento dos *primers* SL DIR e Tub REV para a forma processada de α -tubulina em *T. cruzi* (banda de 129 pb – mRNA). Em amarelo: éxon da sequência do SL RNA de *T. cruzi*; Em verde: éxon da sequência de alfa tubulina de *T. cruzi*.



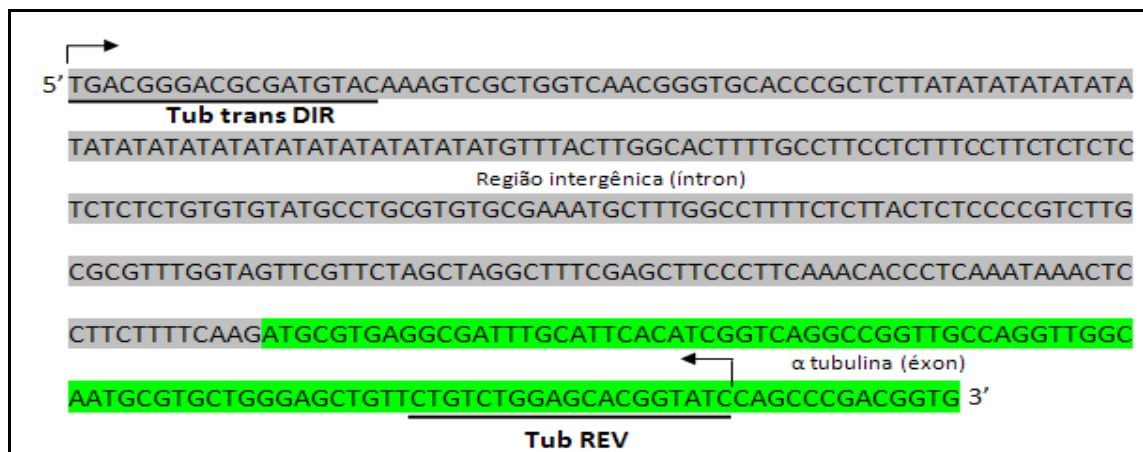
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 18 - Anelamento dos *primers* SL_S e Tub REV para a forma processada de α -tubulina em *T. brucei* (banda de 124 pb – mRNA). Em amarelo: éxon da sequência do SL RNA de *T. brucei*; Em verde: éxon da sequência de alfa tubulina de *T. cruzi*.



Fonte: Elaborado pelo autor

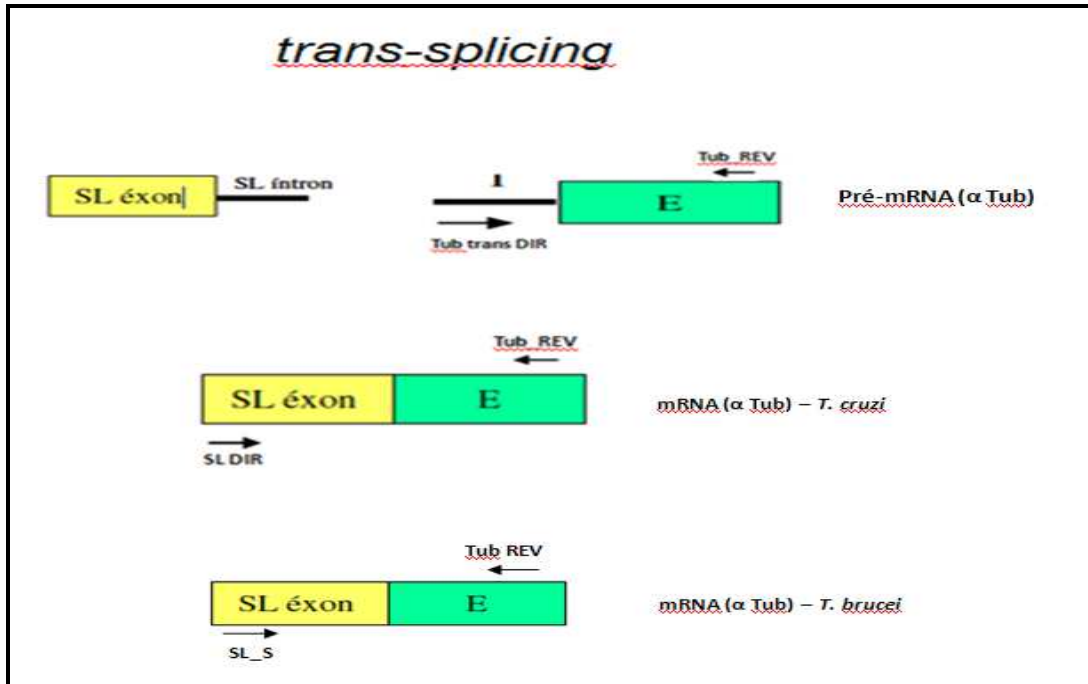
Figura 19 - Anelamento dos *primers* Tub trans DIR e Tub REV para a forma não processada de α -tubulina (banda de 361 pb – pré-mRNA). Em cinza: íntron da sequência de alfa tubulina de *T. cruzi*; Em verde: éxon da sequência de alfa tubulina de *T. cruzi*.



Fonte: Elaborado pelo autor

O diagrama a seguir demonstra esquematicamente os locais de anelamento dos iniciadores empregados na análise das reações de *trans-splicing* - *T. cruzi*/ *T. brucei* (Figura 20).

Figura 20 – Representação esquemática das regiões de anelamento dos iniciadores empregados na análise da reação de *trans-splicing*.



Fonte: Elaborado pelo autor

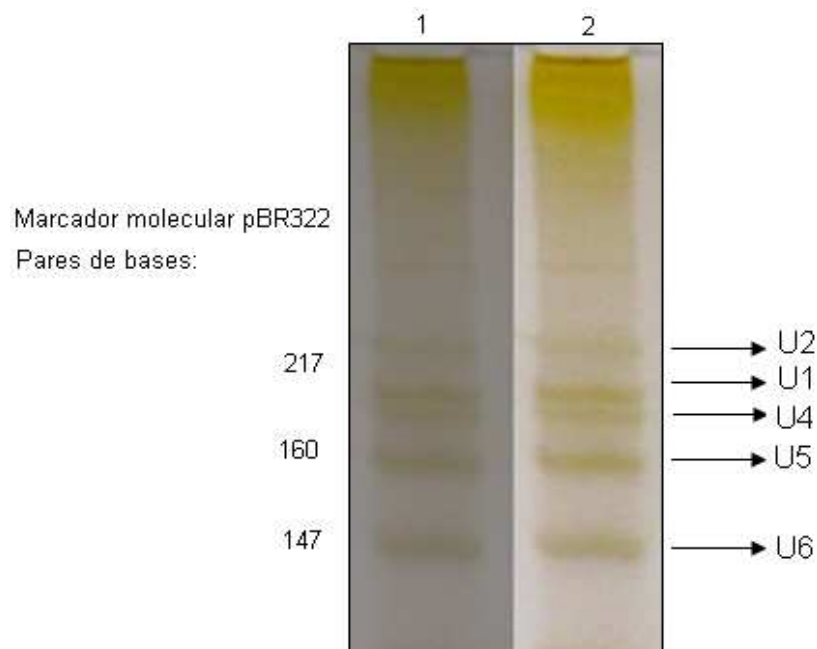
Os produtos das reações de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo e visualizados em transiluminador UV.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise da integridade dos extratos nucleares de *T. cruzi* e *T. brucei*

Os extratos nucleares foram preparados conforme descrição em matérias e métodos. A diferença de molaridade dos tampões C e D descritos anteriormente viabilizaram a extração das ribonucleoproteínas (snRNPs) e demais proteínas e cofatores do spliceossomo presentes no núcleo da célula que, após a fenolização e precipitação dos RNAs presentes nos extratos nucleares, confirmou a integridade dos snRNAs analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% - 7M Uréia (figura 21). As bandas referentes aos snRNAs (U1, U2, U4, U5 e U6) foram identificadas no gel. A confirmação da integridade dos snRNAs (ausência de degradação) é fator essencial para a capacidade catalítica do *trans* spliceossomo.

Figura 21 - Gel de poliacrilamida 10% - 7M uréia corado com solução de prata. Análise da integridade das snRNAs nos extratos nucleares de *T. cruzi* e *T. brucei*. 1: Extrato nuclear de *T. cruzi*; 2: Extrato nuclear de *T. brucei*; Marcador molecular pBR322 DNA-*MspI* Digest (BioLabs). As setas indicam os respectivos snRNAs.

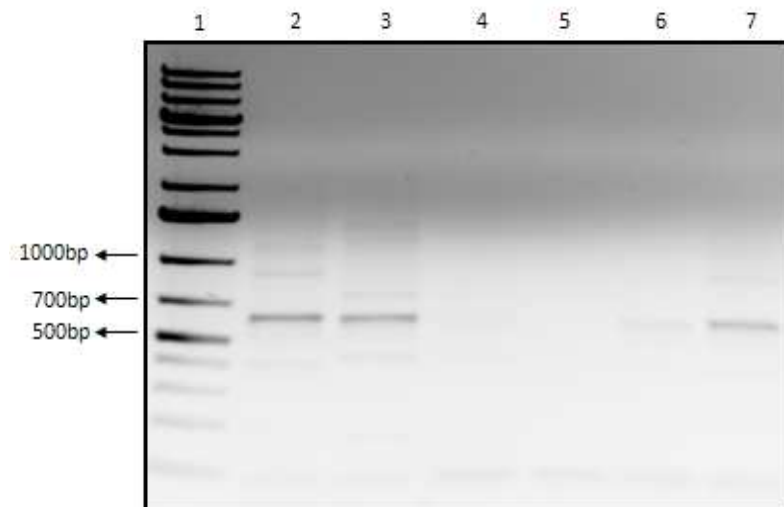


Fonte: Elaborado pelo autor

4.2 Obtenção da sequência parcial da alfa tubulina de *T. cruzi* codificadora do pré-mRNA acceptor da reação de *trans-splicing in vitro*

Como descrito em materiais e métodos, a clonagem da sequência parcial da alfa tubulina de *T. cruzi* foi realizada anteriormente no laboratório e os clones positivos foram congelados em glicerol (dados ainda não publicados). Para a confirmação da presença do inserto foi realizada amplificação por PCR da colônia transformada, onde se observou em gel de agarose 1% a presença de banda de aproximadamente 648 bp (274 bp do vetor + 374 bp inserto) referente ao inserto clonado; os resultados da amplificação de seis clones estão apresentados na figura 22.

Figura 22 - Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. 1. Marcador molecular 1Kb DNA Ladder Plus; 2 a 7. Produtos da PCR de colônia da reação de clonagem com a sequência parcial da alfa tubulina de *T. Cruzii* de 648pb (274pb do vetor + 374pb dp inserto).



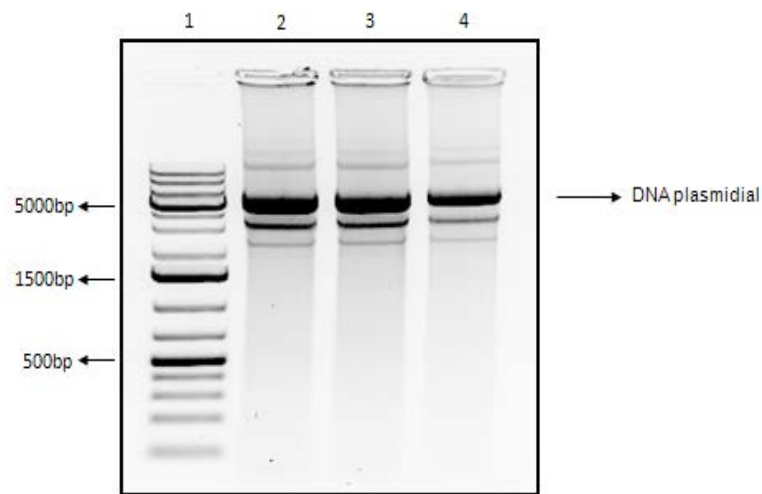
Fonte: Elaborado pelo autor

Após a confirmação da viabilidade das colônias, foi selecionado o clone 2 para posterior isolamento do DNA plasmidial das bactérias transformadas e reação de sequenciamento.

4.2.1 Extração do DNA plasmidial

A extração do DNA plasmidial do clone 2, cuja preparação em triplicata, está ilustrada na figura 23.

Figura 23 - Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. 1. Marcador molecular 1Kb DNA Ladder Plus; 2 a 4. Bandas referentes ao DNA plasmidial extraído das bactérias transformadas com a sequência parcial da alfa tubulina de *T. cruzi* inserida no vetor pGEM®-T Easy Vector – Promega.



Fonte: Elaborado pelo autor

4.2.2 Reação de sequenciamento

A reação de sequenciamento do plasmídeo alfa tubulina de *T. cruzi* confirmou a clonagem do inserto e, possibilitou a localização correta da sequência promotora da enzima T7 RNA Polimerase, como também do sítio de restrição da enzima *Pst* I, ambos presentes no vetor pGEM®-T Easy Vector (Promega). A análise da sequência permitiu a construção, com uso de ferramentas de bionformática, do provável transcrito primário a ser sintetizado na reação de transcrição com a enzima T7 RNA polimerase.

A figura 24 apresenta a sequência do plasmídeo, no qual está assinalado o nucleotídeo referente ao início da transcrição e o local onde termina a síntese do pré-mRNA, uma vez que o plasmídeo deve ser previamente linearizado com a enzima de restrição *Pst* I antes da reação de transcrição.

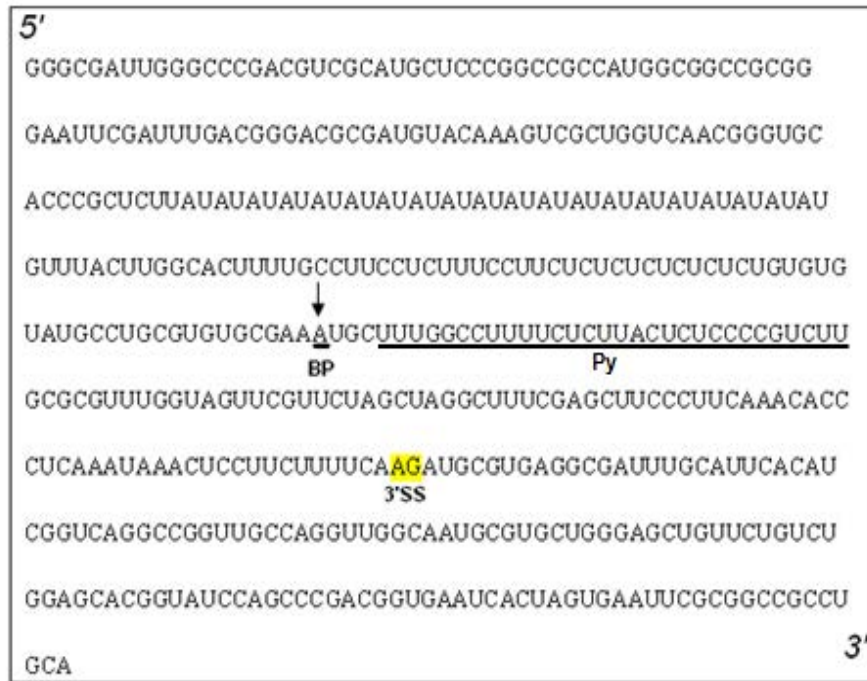
Figura 24 - Representação esquemática da sequência do plasmídeo alfa tubulina de *T. cruzi* obtida após reação de sequenciamento. Em destaque na figura está a região promotora da enzima T7 RNA Polimerase e indicado o início da reação de transcrição; a sequência indicada entre parênteses refere-se ao inserto alfa tubulina inserido no vetor; os nucleotídeos referentes ao sítio de restrição da enzima *Pst*I também estão indicados na figura. A seta vertical indica o término da sequência transcrita.



Fonte: Elaborado pelo autor

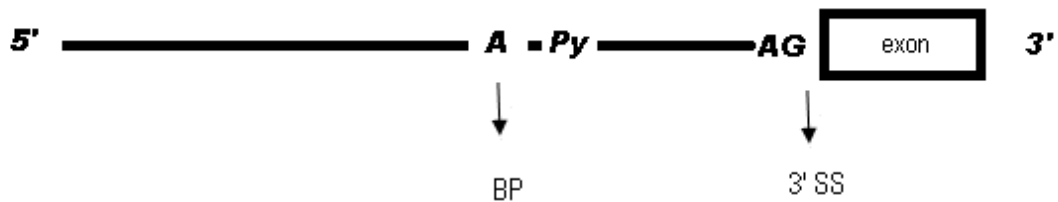
Após a análise do sequenciamento do plasmídeo alfa tubulina de *T. cruzi*, foi possível construir, com auxílio do programa computacional *GeneRunner*, a sequência do pré-mRNA resultante da reação de transcrição com a enzima T7 RNA Polimerase. A sequência de RNA obtida possui 463 pb e está representada na figura 25; este pré-mRNA de alfa tubulina, escolhido como acceptor da reação de *trans-splicing in vitro*, contém em sua sequência todos os sinalizadores da reação de *trans-splicing*: *Branch point*, trato de polipirimidinas e sítio de *splicing* 3', conforme ilustrado na figura 26.

Figura 25 - Representação da sequência do pré-mRNA de alfa tubulina após a reação de transcrição. As bases (AG) em destaque demarcam o fim da região não codificadora (*intron*/região intergência), a sequência consecutiva restante corresponde à região codificadora de polipeptídios (*éxon*); a seta indica a base (A) referente ao *branch point* (BP). Py: trato de plicipirimidinas; 3'SS: sítio de *splicing* 3' (AG).



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 26 - Representação esquemática do pré-mRNA alfa tubulina acceptor da reação de *trans-splicing* ilustrando as regiões sinalizadoras da reação de *trans-splicing* contidas no transcrito primário. BP: *Branch point*, Py: trato de polipirimidinas; 3'SS: sítio de *splicing* 3' (AG).



Fonte: Elaborado pelo autor

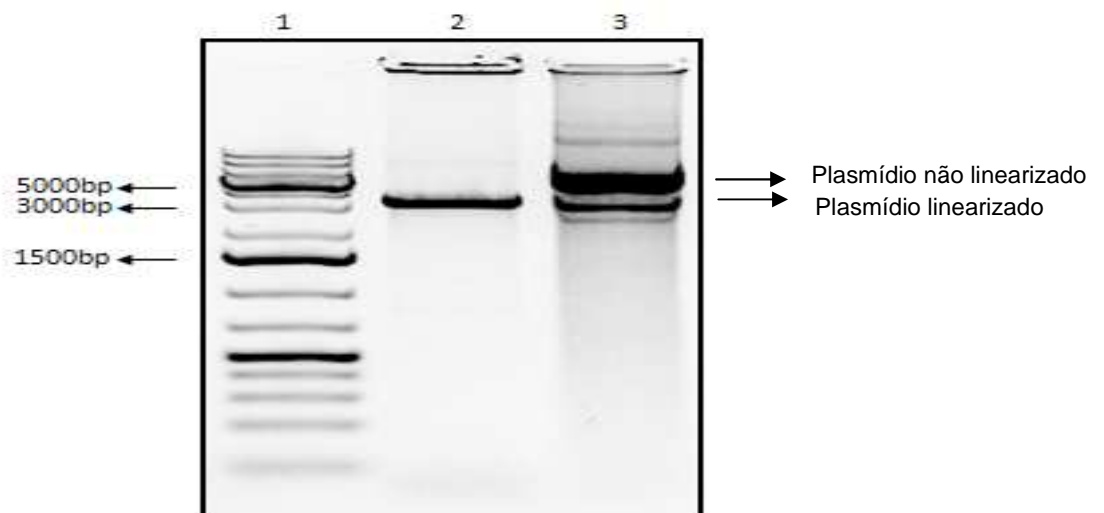
4.3 Preparação do plasmídio para reação de transcrição *in vitro*

4.3.1 Linearização dos plasmídios

Após a confirmação da viabilidade dos clones, os plasmídios (contendo a sequência alfa tubulina de *T. cruzi*) foram linearizados com a enzima de restrição *Pst*I (Fermentas). Escolheu-se esta enzima, pois o vetor pGEM®-T Easy possui em sua sequência o sítio de restrição da enzima (demonstrado na figura 15) e na sequência do inserto da alfa tubulina de *T. cruzi* inserida no vetor não existe o mesmo sítio de restrição. A reação de linearização é imprescindível para possibilitar a reação de transcrição do pré-mRNA no sentido correto.

A análise da reação de linearização realizada por eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 27) demonstrou a presença de uma única banda de 3.389 pb (3.015 pb do vetor + 374 pb do inserto) confirmando a linearização do plasmídio.

Figura 27 - Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio; 1. Marcador molecular 1 Kb DNA Ladderplus; 2. Banda referente ao plasmídio linearizado de aproximadamente 3.389 pb (3.015 pb do vetor + 374 pb do inserto); 3. Plasmídio não linearizado controle da reação.

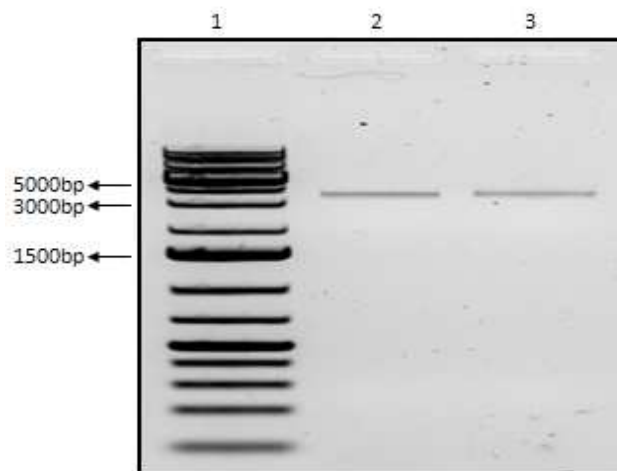


Fonte: Elaborado pelo autor

4.3.2 Purificação dos plasmídios linearizados

Os plasmídios linearizados foram purificados para a reação de transcrição. A análise da reação de purificação realizada por eletroforese em gel de agarose 1% está representada na figura 28.

Figura 28 - Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio; 1. Marcador molecular 1 Kb DNA Ladder Plus; 2. Banda referente ao plasmídio purificado; 3. Banda referente ao plasmídio linearizado não purificado.



Fonte: Elaborado pelo autor

4.4 Reação de transcrição

Para a reação de transcrição ocorrer, adicionou-se inicialmente um inibidor de RNAses, cap (GpppG) e DTT, que auxilia a reação e facilita a ligação do cap (chamado de cap4 por possuir uma 7-metilguanossina ligada a quatro nucleotídeos modificados) à extremidade 5' do pré-mRNA, através de uma ligação incomum 5',5' trifosfato. Em seguida, adicionou-se $MgCl_2$ e ribonucleotídeos trifosfatados (A, U, C e G), permitindo que a enzima T7 RNA polimerase sintetize o pré-mRNA. Em estudos de reações de *splicing in vitro* com células de mamíferos demonstrou-se que o pré-mRNA não requer em sua sequência o cap 5' e cauda de poli (A) na extremidade 3', porém a eficiência da reação é melhorada com a adição destes, provavelmente devido à estabilidade do pré-mRNA (GÜNZL, 2010).

A análise da reação de transcrição foi realizada por eletroforese em PAGE 5% - 7M Uréia, visualizada em transiluminador UV, onde se observou a presença de

uma banda de aproximadamente 463 nucleotídeos , confirmando a síntese do transcrito primário. A banda foi eluída do gel, quantificada e armazenada a – 80 °C.

A tabela 1 apresenta o resultado da quantificação por espectrofotômetro do pré-mRNA obtido após a reação de transcrição.

Tabela 1 – Resultado da quantificação do pré-mRNA de alfa tubulina de *T. cruzi* obtido após a reação de transcrição.

pré-mRNA	Concentração (ng/ µL)
alfa tubulina (<i>T. cruzi</i>)	242

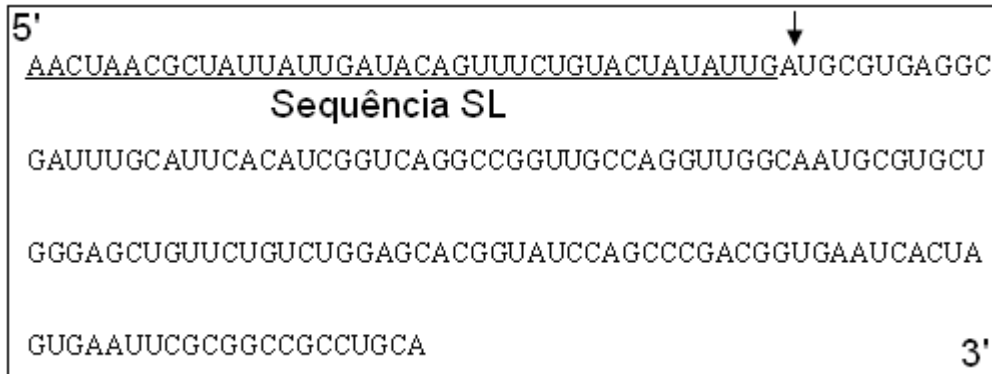
Fonte: Elaborado pelo autor

4.5 Reações de *trans-splicing in vitro*

4.5.1 Obtenção da sequência do mRNA alfa tubulina maduro

Como descrito anteriormente, durante a reação de *trans-splicing* a sequência SL RNA codificadora de 39 nucleotídeos liga-se ao transcrito primário no AG da região 5'; portanto, com o auxílio do programa computacional *GeneRunner*, foi possível construir a sequência do mRNA alfa tubulina maduro de *T. cruzi* (figura 29) de 171 pb (39 pb referente à sequência SL + 132 pb referente ao éxon alfa tubulina). A obtenção da sequência do mRNA alfa tubulina maduro possibilitou o desenho de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos para a reação de RT-PCR.

Figura 29 - Representação esquemática da sequência do mRNA alfa tubulina maduro (*T. cruzi*) obtido da reação de *trans-splicing in vitro*. Em destaque na figura a sequência SL adicionada durante a reação na extremidade 5' da região codificadora (éxon) do transcrito primário alfa tubulina; a seta indica as bases "AU" do éxon. Tamanho: 171 pb do mRNA maduro (39 pb referentes a sequência SL + 132 pb referentes ao éxon alfa tubulina).



Fonte: Elaborado pelo autor

4.5.2 Reação de *trans-splicing in vitro* com extrato nuclear de *T. cruzi* e *T. brucei*

As reações de *trans-splicing in vitro* foram realizadas com 40% de extrato nuclear de *T. cruzi* e *T. brucei* e o tempo de incubação para ambas as reações foi de 90 minutos, conforme padronização de Arnosti (2011).

A principal diferença das duas reações foi a temperatura de incubação, 25 °C para *T. cruzi* e 28 °C para *T. brucei*. Conforme descrito anteriormente, a reação de *trans-splicing* é dependente de ATP e, como controle, a reação foi preparada sem adição de ATP e creatin-fosfato. Outro controle utilizado foi o preparo da reação sem adição de extrato nuclear, ou seja, sem a maquinaria do spliceosomo e, portanto, sem o SL RNA, imprescindíveis para que ocorra a reação de *trans-splicing*.

Após as reações de *trans-splicing in vitro*, os mRNAs obtidos foram tratados com proteinase K, e após precipitação, quantificados.

A seguir, apresenta-se o resultado da quantificação por espectrofotômetro dos mRNAs obtidos nas reações *trans-splicing in vitro*.

Tabela 2 – Resultado da quantificação dos produtos das reações de *trans-splicing in vitro* (mRNA maduro alfa tubulina) obtidos com extrato nuclear de *T. cruzi* e *T. brucei* para a realização da RT-PCR.

mRNA	Concentração (µg/ µL)
Reação de <i>trans-splicing in vitro</i> com extrato nuclear de <i>T. brucei</i> (com ATP)	0,371
Reação de <i>trans-splicing in vitro</i> com extrato nuclear de <i>T. brucei</i> (sem ATP)	0,352
Reação de <i>trans-splicing in vitro</i> com extrato nuclear de <i>T. brucei</i>	0,120
Reação de <i>trans-splicing in vitro</i> com extrato nuclear de <i>T. cruzi</i> (com ATP)	0,363
Reação de <i>trans-splicing in vitro</i> com extrato nuclear de <i>T. cruzi</i> (sem ATP)	0,314
Reação de <i>trans-splicing in vitro</i> com extrato nuclear de <i>T. cruzi</i>	0,140

Fonte: Elaborado pelo autor

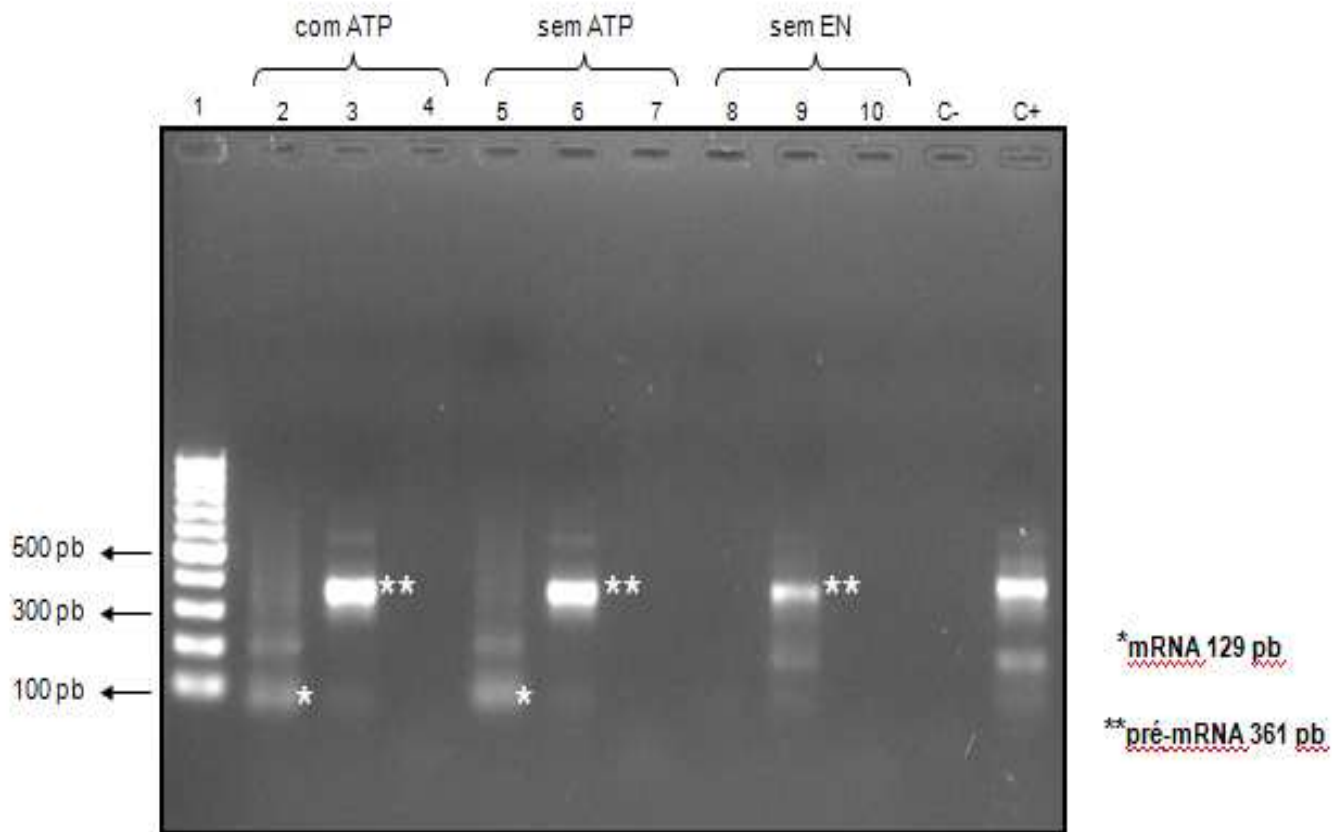
4.6 Reação de RT-PCR para a detecção dos produtos

A confirmação do processamento do mRNA obtido nas reações de *trans-splicing in vitro* com extrato nuclear de *T. cruzi* e *T. brucei* foi realizada pela reação de RT-PCR, conforme descrito em materiais e métodos.

Após a amplificação por PCR, os fragmentos devem apresentar, respectivamente, 129 pb e 124 pb, para mRNAs obtidos nas reações de *trans-splicing in vitro* com extrato nuclear de *T. cruzi* e *T. brucei*. Para a forma não processada, em ambas as reações, são esperados fragmentos de 361 pb.

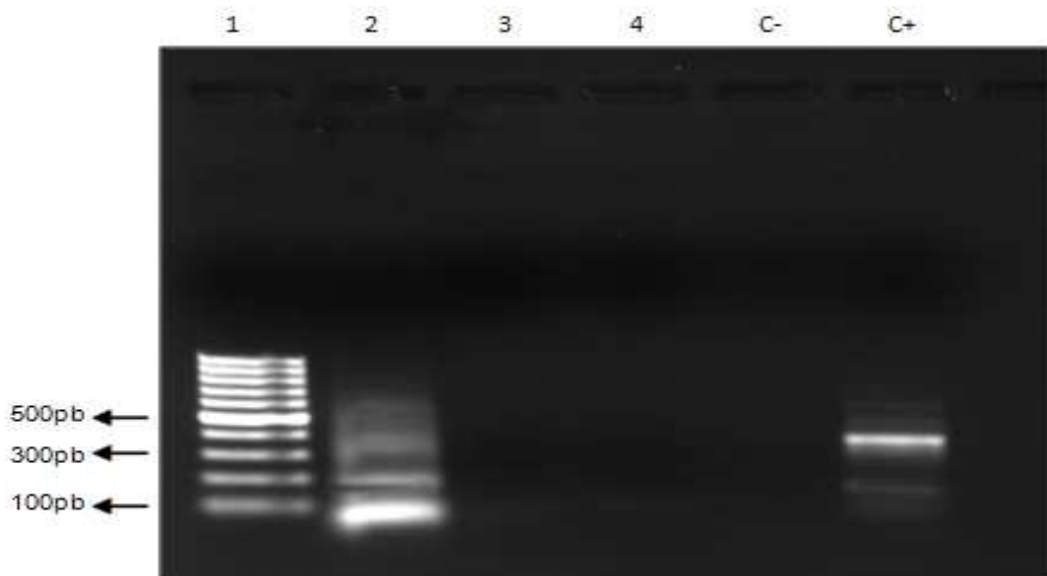
Na figura 30 e 31 estão apresentados os produtos das reações de RT-PCR, obtidos nas reações de *trans-splicing in vitro* com extrato nuclear de *T. cruzi*.

Figura 30 – Análise da reação de RT-PCR com extrato nuclear (EN) de *T. cruzi* por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo; 1. Marcador molecular 100 bp DNA Ladder ; 2, 5, 8 – iniciadores SL DIR + Tub Rev; 3, 6, 9, - iniciadores Tub trans DIR + Tub Rev; 4, 7, 10 – iniciadores SL INV + Tub Rev. Os mRNAs estão indicados com asterico. C+ Controle positivo (pré-mRNA); C- controle negativo.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 31 – Análise da reação de RT-PCR com extrato nuclear (EN) de *T. cruzi* (controle da reação de *trans-splicing in vitro*) por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo; 1. Marcador molecular 100 bp DNA Ladder ; 2 a 4 – iniciadores SL DIR + Tub Rev; (2. Reação de *trans-splicing in vitro* com extrato nuclear; 3. Reação de *trans-splicing in vitro* sem extrato nuclear; 4. Reação de *trans-splicing in vitro* sem pré-mRNA); C- controle negativo; C+ Controle positivo (pré-mRNA).



Fonte: Elaborado pelo autor

Os resultados das reações de RT-PCR apresentados na figura 30 demonstram que ocorreu processamento do mRNA (coluna 2, banda indicada), ainda que a quantidade do produto seja inferior àquela da forma não processada (coluna 3). Entretanto, isto era esperado, visto que há necessidade de um excesso de pré-mRNA (50 vezes mais) nas reações de *trans-splicing in vitro* como já foi relatado (SHAKED et al., 2010).

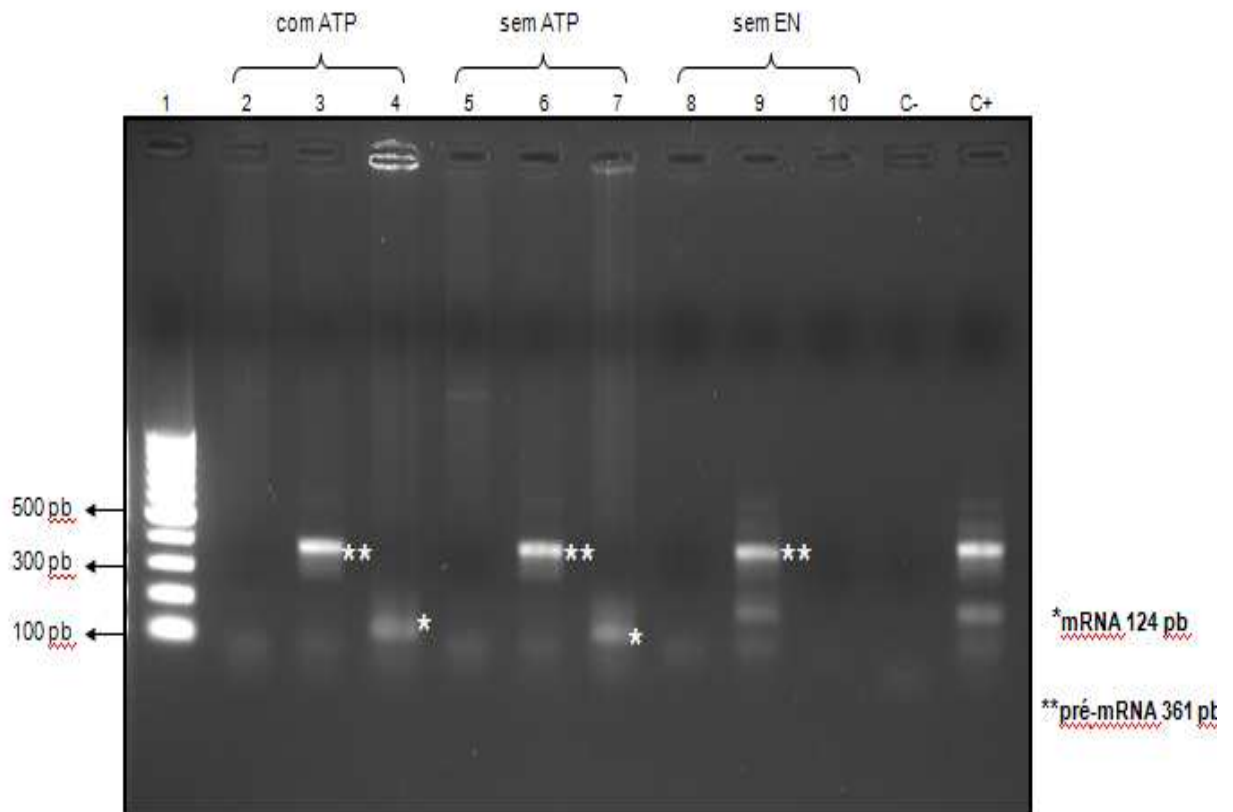
As reações sem ATP apresentaram os mesmos resultados, ou seja, ocorreu a formação de produto (mRNA), indicando a presença de ATP endógeno no extrato nuclear e confirmando achados anteriores da equipe. As reações realizadas sem extrato nuclear (colunas 8 a 10) não apresentaram formação de produto, conforme esperado.

Um outro teste realizado foi a reação de *trans-splicing in vitro*, nas mesmas condições citadas em materiais e métodos, porém sem a adição de pré-mRNA alfa tubulina. Os resultados apresentados na figura 31 demonstram que não ocorreu o processamento para esta reação (coluna 4), indicando que não há presença de pré-mRNA endógeno no extrato nuclear, ou seja, é necessária a adição de pré-mRNA sintético para que ocorra a reação de *trans-splicing in vitro*.

O aparecimento de bandas inespecíficas também já foi relatado anteriormente por outros autores (SHAKED et al., 2010) e que podem ser devidas a anelamentos inespecíficos dos iniciadores e que são visualizadas também no controles.

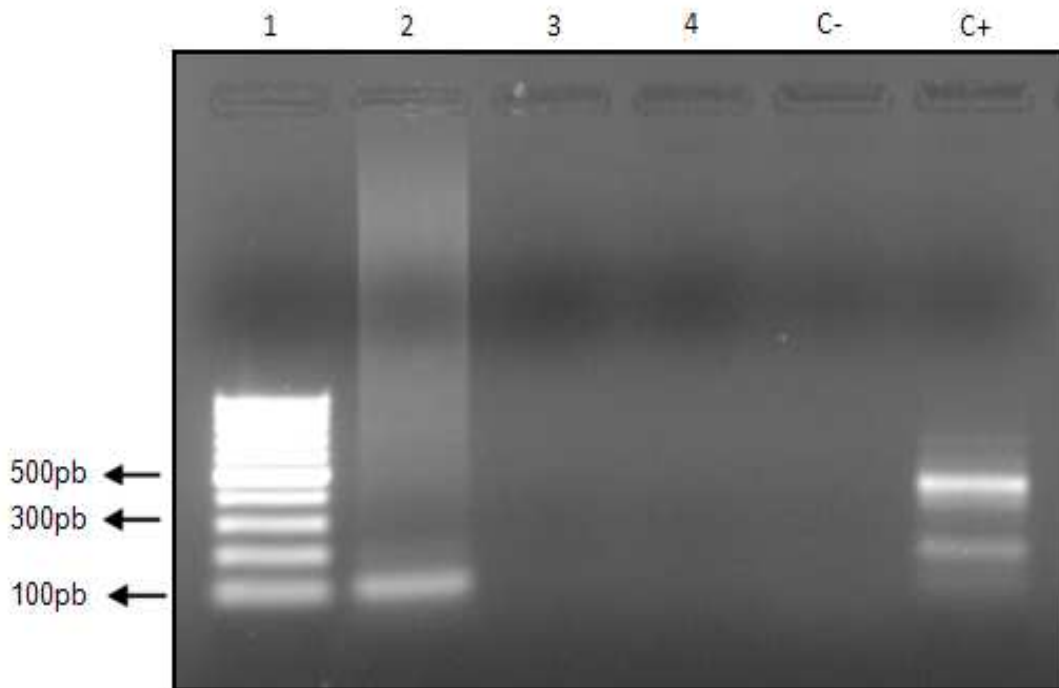
Em relação a *T. brucei*, os resultados foram similares, conforme apresentados na figura 32 e 33.

Figura 32 – Análise da reação de RT-PCR com extrato nuclear (EN) de *T. brucei* por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo; 1. Marcador molecular 100 bp DNA Ladder ; 2, 5, 8 – iniciadores SL_AS + Tub Rev (controle negativo); 3, 6, 9, - iniciadores Tub trans DIR + Tub Rev; 4, 7, 10 – iniciadores SL_S + Tub Rev. Os mRNAs estão indicados com asterico. C+ Controle positivo (pré-mRNA); C- controle negativo.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 33 – Análise da reação de RT-PCR com extrato nuclear (EN) de *T. brucei* (controle da reação de *trans-splicing in vitro*) por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo; 1. Marcador molecular 100 bp DNA Ladder ; 2 a 4 – iniciadores SL_S + Tub Rev; (2. Reação de *trans-splicing in vitro* com extrato nuclear; 3. Reação de *trans-splicing in vitro* sem extrato nuclear; 4. Reação de *trans-splicing in vitro* sem pré-mRNA); C- controle negativo; C+ Controle positivo (pré-mRNA).



Fonte: Elaborado pelo autor

Os resultados das reações de RT-PCR, obtido nas reações de *trans-splicing in vitro* com extrato nuclear de *T. brucei* (figuras 32 e 33) demonstram similaridade com aqueles verificados em *T. cruzi*, confirmando os dados obtidos “in silico”. Interessante ressaltar que extrato nuclear de *T. brucei* foi capaz de processar pré-mRNA de *T. cruzi*.

Shaked et al. (2010) utilizava um sistema de amplificação das bandas recorrendo à reação de proteção com RNase após a reação de *trans-splicing in vitro*, o que reduziu consideravelmente a visualização de bandas inespecíficas e selecionou as bandas de interesse.

Entretanto, esse passo não poderia ser utilizado neste caso, uma vez que se tratam de bandas de DNA. Uma possibilidade seria a clonagem da banda do produto para dupla checagem da análise “in silico”. Também, alguns ajustes na reação de RT-PCR, tais como, aumento da concentração de pré-mRNA acceptor e ciclagem já poderia ser suficiente. Esforços nesse sentido estão realizados neste momento no laboratório.

5 CONCLUSÃO

- ✓ Foi possível padronizar a reação de *trans-splicing in vitro* utilizando a técnica de RT-PCR e extratos nucleares livre de células de formas epimastigotas de *T. cruzi* e/ou de formas procíclicas de *T. brucei* com a sequência parcial de alfa tubulina de *T. cruzi* como pré-mRNA acceptor.
- ✓ SL RNA endógeno presentes nos extratos nucleares foi recrutado na reação com eficiência.
- ✓ Para o aumento da eficiência da reação é necessário um excesso de pré-mRNA alfa tubulina em relação ao SL RNA endógeno no extrato.
- ✓ A padronização desta reação *in vitro*, sem o uso de material radioativo, possibilitará avanços no entendimento da maquinaria do spliceossomo, tornando-se também um modelo interessante para avaliação de mecanismo de ação drogas tripanocidas que não interfeririam nas células do hospedeiro.

REFERÊNCIAS

- AGABIAN, N. Trans-splicing of nuclear pre-mRNAs. **Cell**, v. 61, p. 1157-1160, 1990.
- AMBRÓSIO, D. L. **Caracterização molecular de proteínas que compõem o complexo spliceossomal em tripanosomatídeos**. 2008. 97 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.
- AMBRÓSIO, D. L.; SILVA, M. T. A.; CICALLELLI, R. M. B. Cloning and molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* U2, U4, U5, and U6 small nuclear RNAs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 1, p. 97-105, 2007.
- ARNOSTI, L. V. **Reação de trans-splicing in vitro utilizando extrato nuclear livre de células e sequência parcial de alfa tubulina de *Trypanosoma cruzi***. 2011. 71 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.
- BITON, M.; MANDELBOIM, M.; ARVATZ, G.; MICHAELI, S. RNAi interference of XPO1 and Sm genes and their effect on the spliced leader RNA in *Trypanosoma brucei*. **Molecular Biochemical Parasitology**, v.150, n. 2, p. 132-143, 2006.
- BOOTHROYD, J. C.; CROSS, G. A. Transcripts coding for variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* have a short, identical exon at their 5' end. **Gene**, v. 20, n. 2, p. 281- 289, 1982.
- BREHM, K.; JENSEN, K.; FROSCH, M. mRNA trans-splicing in the human parasitic cestode *Echinococcus multilocularis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 49, p. 3811-3818, 2000.
- BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL, M. N. ***Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- BRUCE, D. Classification of the African trypanosomes pathogenic to man and domestic animals. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 8, p. 1-22, Nov. 1914.
- BRUN, R.; SCHONENBERGER, M. Cultivation and *in vitro* cloning or procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. **Acta Tropica**, v. 36, n. 3, p. 289-292, Sept. 1979.
- CHAGAS, C. Nova tripanomíase humana. Estudos sobre morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. SP., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p.159-218, 1909.
- CICALLELLI, R. M. B.; ARNOSTI, L. V.; TREVELIN, C. C.; SILVA, M. T. A. Tools for trans-splicing drug interference evaluation in kinetoplastid. In: MOHAMMAD, S. (Org.). **Parasitology**. Rijeka: InTech, 2012. v. 1, p. 3-28.
- CICALLELLI, R. M. B.; KHAOUJA, A.; CODONY, C.; ESPUNY, R.; ERITJA, R.; BACH-ELIAS, M. A second-step splicing activity is conserved from yeast to human. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 247, p. 204-206, 1998.
- COX, F. E. G. History of sleeping sickness (African trypanosomiasis). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 18, p. 231-245, 2004.
- COURA, R. J.; CASTRO, S. L. de. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002.
- COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature Outlook**, v. 465, p. S6-S7, 2010.
- CROOS, G. A.; MANNING, J. C. Cultivation of *Trypanosoma brucei* spp. in semi-defined and defined media. **Parasitology**, v. 67, n. 3, p. 315-331, Dec. 1973.

- DE LANGE T.; BERKVEN T. M.; VEERMAN, H. J.; FRASCH, A. C.; BARRY, J. D.; BORST, P. Comparison of the genes coding for the common 5' terminal sequence of messenger RNAs in three trypanosome species. **Nucleic Acids Research**, v. 12, n. 11, p. 4431-4443, 1984.
- DIAS, J. C. P. Epidemiologia. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL NETTO, M. **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 58-60.
- DIAS, J. C. P. Doença de Chagas. In: CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 81-94.
- DIGNAM, J. D.; LBOVITZ, R. B.; ROEDER, R. G. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. **Nucleic Acids Research**, v.11, p.1475-1489, 1983.
- DOSSIN, F. M.; SCHENKMAN, S. Actively transcribing RNA polymerase II concentrates on spliced leader genes in the nucleus of *Trypanosoma cruzi*. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 5, p. 960-970, 2005.
- FERNANDES, J. F.; CASTELLANI, O. Growth characteristics and chemical composition of *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 18, p. 195-202, 1966.
- GESTLAND, R. F.; ATKINS, J. F. **The RNA word**. 1993. Cap. 13, p. 305-308.
- GREVELINK, S. A.; LERNER, E. A. Leishmaniasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 34, n. 2, p. 257-272, Feb. 1996.
- GÜNZL, A. The pré-mRNA splicing machinery of trypanosomes: complex or simplified? **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 8, p. 1159-1170, Aug. 2010.
- HURY, A.; GOLDSCHMIDT, H.; TKACZ, I. D.; MICHAELI, S. Trypanosome spliced-leader-associated RNA (SLA1) localization and implications for spliced-leader RNA biogenesis. **Eukaryotic Cell**, v. 8, n. 1, p. 56-68, 2009.
- INSTITUTO OSWALDO CRUZ. Comunicação. **Portal doença de Chagas**. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=25>>. Acesso em: 15 maio 2013.
- JOHNSON, P. J.; KOOTER, J. M.; BORST, P. Inactivation of transcription by UV irradiation of *T. brucei* provides evidence for a multicistronic transcription unit including a VSG gene. **Cell**, v. 51, p. 273-281, 1987.
- KENNEDY, P. G. E. Human African trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 4, p. 496-504, Feb. 2004.
- KOLEV, N. G.; FRANKLIN, J. B.; CARMÍ, S.; SHI, H.; MICHAELI, S.; TSCHUDI, C. The transcriptome of the human pathogen *Trypanosoma brucei* at single-nucleotide resolution. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 9, p. 1-15, Sept. 2010.
- KRAUSE, M.; HIRSH, D. A trans-spliced leader sequence on actin mRNA in *C. elegans*. **Cell**, v. 49, n. 6, p. 753-761, 1987.
- LANA, M.; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi*. In: NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 10. ed. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 73-96.
- LASDA, E. L.; BLUMENTHAL, T. Trans-splicing. **WIREs RNA**, v. 2, n. 3, p. 417-434, 2011.
- LIANG, X.; HARITAN, A.; ULIEL, S.; MICHAELI, S. Trans and cis splicing in Trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. **Eukaryotic Cell**, v. 2, n. 5, p. 830-840, 2003.
- LÜCKE, S.; XUNG, G. L.; PALFI, Z.; CROSS, M.; BELLOFATTO, V.; BINDEREIF, A. Spliced leader RNA of trypanosomes: *in vivo* mutational analysis reveals extensive and distinct requirements for trans splicing and cap4 formation. **Embo Journal**, v. 15, n. 16, p. 4380-4390, 1996.

LUHRMANN, R. **SnRNP proteins in Small nuclear ribonucleoprotein particles**. Berlin: Springer, 1998. p. 71-99.

MANDELBOIM, M.; ESTRAÑO, C. L.; TSCHUDI, C.; ULLU, E.; MICHAELI, S. On the role of exon and intron sequences in *trans-splicing* utilization and cap 4 modification of the trypanosomatid *Leptomonas collosoma* SL RNA. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 38, p. 35210-35218, 2002.

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

MAYER, M. G.; FLOETER-WINTER, L. M. Pre-mRNA trans-splicing: from kinetoplastids to mammals, an easy language for life diversity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 5, p. 501-513, 2005.

McNALLY, K. P.; AGABIAN, N. *Trypanosoma brucei* spliced-leader RNA methylations are required for trans-splicing *in vivo*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 12, n. 11, p. 4844-4851, 1992.

MICHAELI, S. Trans-splicing in trypanosomes: machinery and its impact on the parasite transcriptome. **Future Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 459-474, 2011.

MURPHY, W. J.; WATKINS, K. P.; AGABIAN, N. Identification of a novel Y branch structure as an intermediate in trypanosome mRNA processing: evidence for trans-splicing. **Cell**, v. 47, p. 517-525, 1986.

NILSSON, D.; GUNASEKERA, K.; MANI, J.; OSTERAS, M.; FARINELLI, L.; BAERLOCHER, L.; RODITI, I.; OCHSENREITER. Spliced leader trapping reveals widespread alternative splicing patterns in the highly dynamic transcriptome of *Trypanosoma brucei*. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 8, p. 1-13, Aug. 2010.

OHI, M. D.; WALL, J. S.; REN, L.; WALZ, T.; GOULD, K. L. Structural characterization of the fission yeast U5.U2/U6 spliceosome complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**, v. 104, n. 9, p. 3195-3200, Feb. 2007

OHI, M. D.; KOOL, C. W. V.; ROSENBERG, J. A.; REN, L.; HIRSCH, J. P.; CHAZIN, W. J.; WALZ, T.; GOULD, K. L. Structural and functional analysis of essential pre-mRNA splicing factor Prp19p. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 1, p. 451-460, Jan. 2005.

PEREIRA, K. S.; SCHMIDT, F. L.; GUARALDO, A. M. A.; FRANCO, R. M. B.; DIAS, V. L.; PASSOS, L. A. C. Chagas' disease as a foodborne illness. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 2, p. 441-446, 2009.

PISCOPO, T. V.; AZZOPARDI, C. M. Leishmaniasis. **Postgraduate Medical Journal**, v. 82, p. 649-657, 2006.

RAJKOVIC, A.; DAVIS, R. E.; SIMONSEN, J. N.; ROTTMAN, F. M. A spliced leader is present on a subset of mRNAs from the human parasite *Schistosoma mansoni*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**, v. 87, n. 22, p. 8879-8883, Nov. 1990.

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

SCHMUÑIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 75-85, 2007.

- SHAKED, H.; WACHTEL, C.; TULINSKI, P.; YAHIA, N. H.; BARDA, O.; DARZYNKIEWICZ, E.; NILSEN, T. W.; MICHAELI, S. Establishment of an *in vitro trans-splicing* system in *Trypanosoma brucei* that requires endogenous spliced leader RNA. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 10, p. 114, Feb. 2010.
- SIEGEL, T. N.; HEKSTRA, D. R.; WANG, X.; DEWELL, S.; CROSS, G. A. Genome-wide analysis of mRNA abundance in two life-cycle stages of *Trypanosoma brucei* and identification of splicing and polyadenylation sites. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n.15, p. 4946-4957, Feb. 2010.
- SILVA, L. H. P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia Clinical Biology**, v. 20, p. 191-208, 1953.
- SILVA, M. T. A. da. **Identificação e caracterização funcional de proteínas específicas do complexo U5 snRNP em Tripanosomatídeos**. 2009. 98 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.
- SILVEIRA, J. F. da. Biologia molecular do *Trypanosoma cruzi*. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL NETTO, M. **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 127-141.
- SOEIRO, M. N. C.; CASTRO, S. L. de. Screening of potential anti-*Trypanosoma cruzi* candidates: *in vitro* and *in vivo* studies. **The Open Medicinal Chemistry Journal**, v. 5, p. 21-30, 2011.
- SOUZA, W. de. O parasita e sua interação com os hospedeiros. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL NETTO, M. **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap. 7, p. 90-94.
- STOVER, N. A.; STEELE, R. E. Trans-spliced leader addition to mRNAs in a cnidarians. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**, v. 98, n. 10, p. 5693-5698, 2001.
- TEIXEIRA, A. R. L.; NITZ, N.; GUIMARO, M. C.; GOMES, C.; SANTOS-BUCH, C. A. Chagas disease. **Postgraduate Medical Journal**, v. 82, p. 788-798, 2006.
- TESSIER, L. H.; KELLER, M.; CHAN, R. L.; FOURNIER, R.; WEIL, J. H.; IMBAULT, P. Short leader sequences may be transferred from small RNAs to pre-mature mRNAs by transsplicing in *Euglena*. **Embo Journal**, v. 10, p. 2621-2625, 1991.
- TKACZ, I. D.; GUPTA, S. K.; VOLKOV, V.; ROMANO, M.; HAHAM, T.; TULINSKI, P.; LEBENTHAL, I.; MICHAELI, S. Analysis of spliceosomal proteins in Trypanosomatids reveals novel functions in mRNA processing. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 36, p. 27982-27999, 2010.
- TYCOWSKI, K. T.; KOLEV, N. G.; CONRAD, N. K.; FOK, V.; STEITZ, J. A. The ever-growing world of small nuclear ribonucleoproteins. In: GESTELAND, R. F. et al. **The RNA world**. 3rd ed. New York: Cold Spring, 2006. p. 327-368.
- ULLU, E.; TSCHUDI, C. Accurate modification of the trypanosome spliced leader cap structure in a homologous cell-free system. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 35, p. 20365-20369, 1995.
- URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 495-501, 2003.
- VANDENBERGHE, A. E.; MEEDEL, T. H.; HASTINGS, K. E. mRNA 5'-leader trans-splicing in the chordates. **Genes & Development**, v. 15, p. 294-303, 2001.
- VIANNA, V. F.; AMBRÓSIO, D. L.; CICARELLI, R. M. B. Mapeamento de bandas de *trans-splicing in vitro* com extratos nucleares de *Trypanosoma cruzi*. **Revista Ciências Farmacêuticas**, v. 22, p. 295-306, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. 2010a. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/index.html>>. Acesso em: 04 maio 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Working to overcome, the global impact of neglected tropical diseases**: first WHO report on neglected tropical diseases. 2010b. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/research/ntd/chagas/en/>>. Acesso em: 20 out. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global health observatory**: human African trypanosomiasis. 2011a. Disponível em: <http://www.who.int/gho/neglected_diseases/human_african_trypanosomiasis/en/index.html>. Acesso em: 14 jan. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World**: distribution of human African trypanosomiasis (*T.b. gambiense*). 2011b. Disponível em: <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/HAT_gambiense_2011_global.png>. Acesso em: 20 ago. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World**: distribution of human African trypanosomiasis (*T.b. rhodesiense*). 2011c. Disponível em: <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/HAT_rhodesiense_2011_global.png>. Acesso em: 20 ago. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease**. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/diseases-topics/chagas/chagas_f1.jpg>. Acesso em: 19 jan. 2013a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/lifecycle.htm>>. Acesso em: 04 maio 2013b.

YASUDA, M. A. S.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of Chagas disease. **Emerging Infections**, v. 54, p. 845-852, 2012.

ZHANG, H.; HOU, Y.; MIRANDA, L.; CAMPBELL, D. A.; STURM, N. R.; GAASTERLAND, T.; LI, S.; Spliced leader RNA *trans*-splicing in dinoflagellates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**, v. 104, n. 10, p. 4618-4623, Mar. 2007.