

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE QUÍMICA – CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

“Reação de *trans*-splicing *in vitro* utilizando extrato nuclear livre de células e sequência parcial de alfa tubulina de *Trypanosoma cruzi*”

Lis Velosa Arnosti

Araraquara
2011

LIS VELOSA ARNOSTI

Reação de *trans*-splicing *in vitro* utilizando extrato nuclear livre de células e sequência parcial de alfa tubulina de *Trypanosoma cruzi*

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

Orientadora: Profa. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli

Araraquara
2011

LIS VELOSA ARNOSTI

Reação de *trans*-splicing *in vitro* utilizando extrato nuclear livre de células e sequência parcial de alfa tubulina de *Trypanosoma cruzi*

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

Araraquara, 08 de dezembro de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli (orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Prof. Dr.

Prof. Dr.

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido Danilo, pelo amor e cumplicidade.

Aos meus familiares pela ajuda e incentivo.

A professora Regina, grande visionária deste projeto, o meu muito obrigado pela fé depositada em mim.

A todos os companheiros dos laboratórios de Imunologia e Paternidade.

“Eu sou parte de uma equipe. Então quando venço, não sou apenas eu quem vence. De certa forma termino o trabalho de um grupo enorme de pessoas”.

Airton Senna Da Silva

RESUMO

A família Trypanosomatidae compreende um grande número de protozoários parasitas, incluindo importantes agentes etiológicos de doenças humanas. Entre os causadores de doenças, destaca-se o *Trypanosoma brucei* (responsável pela Doença do Sono) e o *Trypanosoma cruzi* (agente causador da Doença de Chagas). Ambos possuem como mecanismo de processamento dos seus mRNAs o “*trans-splicing*”, que envolve a excisão de *íntrons* e a união dos *éxons* de dois transcritos independentes, o *splice-leader*, e o pré-mRNA acceptor. As reações de *cis* e *trans-splicing in vitro* com extrato nuclear de células HeLa já foram padronizadas e utilizada como modelo em diversos experimentos. Entretanto, em tripanosomas, as únicas referências sobre a reação de *trans-splicing in vitro* são de Vianna et. al., (2001) e Skaked et. al., (2010), com extratos de parasitas preparados de modos diferentes. A reação com células permeáveis do *Trypanosoma cruzi* foi usada como modelo para análise de drogas tripanocidas na reação de *trans-splicing* (Barbosa et. al., 2007); porém, não é um sistema livre de células conforme mencionado acima. Diante disso, este trabalho propõe reproduzir a reação de “*trans-splicing*” *in vitro* com extratos nucleares livre de parasitas utilizando as formas epimastigotas de *T. cruzi* e/ou as formas procíclicas de *T. brucei* e uma sequência parcial de alfa tubulina de *T. cruzi* como pré-mRNA acceptor. A padronização desta reação *in vitro* possibilitará avanços no entendimento da maquinaria do trans-spliceossomo, tornando-se também um modelo interessante para avaliação de mecanismo de ação de drogas tripanocidas.

Palavras-chave: *trans-splicing*, *splice-leader*, Trypanosomatidae, extratos livres de células.

ABSTRACT

Trypanosomatidae family comprises a large number of protozoan parasites, including important etiological agents of neglected human diseases. Among the diseases' agents, *Trypanosoma brucei* (responsible for sleeping sickness) and *Trypanosoma cruzi* (causative agent of Chagas' disease) are the most important parasites. Both have trans-splicing as a mechanism for the processing of its mRNA, which involves the excision of introns and union of exons form two independent transcripts, the splice-leader (SLRNA), and the acceptor pre-mRNA. The reaction of cis-and trans-splicing *in vitro* with nuclear extract of HeLa cells has already been standardized and used as a model in several experiments. However, in trypanosomes, the only references on the reaction of trans-splicing *in vitro* are from Vianna et. al., (2001) and Skaked et. al., (2010), using parasite-free extracts prepared on different methods. For trypanocidal drugs analyze, trans-splicing reaction using *T. cruzi* permeable cells was used as a model (Barbosa et. al., 2007), but this is not the same as free-cell nuclear extract as mentioned above. Thus, this work shows trans-splicing *in vitro* reaction using nuclear extracts either from *T. cruzi* epimastigote forms and/or *T. brucei* procyclic forms reacting with the *T. cruzi* alpHa-tubulin cloned sequence as pre-mRNA acceptor. The standardization of this *in vitro* reaction will be able to promote advances to understanding the trans-spliceosomo machinery, as well as occurred in mammalian cis- and/or trans-splicing, becoming also an interesting model for evaluating trypanocidal drugs interference.

Keywords: trans-splicing, splice-leader, Trypanosomatidae, free-cell extract.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formas evolutivas de <i>T.cruzi</i> .	16
Figura 2: Sinais clínicos da doença de Chagas.	18
Figura 3: Ciclo biológico da transmissão da doença de Chagas.	19
Figura 4: Formas evolutivas de <i>T.brucei</i> .	21
Figura 5: Ciclo biológico da transmissão da Doença do Sono.	22
Figura 6: Estruturas celulares de uma forma epimastigota do <i>Trypanosoma cruzi</i> .	24
Figura 7: Sinalização para reação de “ <i>cis</i> -splicing”.	27
Figura 8: Modelo esquemático do “ <i>cis</i> -splicing”.	28
Figura 9: Mecanismo de “ <i>cis</i> e <i>trans</i> -splicing”.	29
Figura 10: Sinalizações necessárias para que ocorra o “ <i>trans</i> -splicing”.	30
Figura 11: Distâncias entre as sequências que ditam o sítio de adição do SL e poliadenilação.	32
Figura 12: Sequência parcial do gene alfa tubulina de <i>T. cruzi</i> .	38
Figura 13: BLAST da sequência parcial de alfa tubulina de <i>T. cruzi</i> .	38
Figura 14: Sequência do vetor pGEM-T easy Vector (Promega).	41

Figura 15: Extratos nucleares.	48
Figura 16: PCR de colônia.	49
Figura 17: Isolamento de DNA plásmidial.	50
Figura 18: Digestão plasmidial.	51
Figura 19: Purificação plasmidial.	52
Figura 20: Sequência do plasmídeo alfa tubulina de <i>T. cruzi</i> provinda da reação de sequenciamento.	53
Figura 21: Provável sequência do pré-mRNA alfa tubulina provinda da reação de transcrição.	54
Figura 22: 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 23: Reação de transcrição.	55
Figura 24: Sequência do mRNA alfa tubulina maduro provindo da reação de “ <i>trans-splicing in vitro</i> ”.	56
Figura 25: Reações de “ <i>trans-splicing in vitro</i> ” com extrato nuclear de <i>T. cruzi</i> .	57
Figura 26: Reações de “ <i>trans-splicing in vitro</i> ” com extrato nuclear de <i>T. cruzi</i> .	58
Figura 27: Reações de “ <i>trans-splicing in vitro</i> ” com extrato nuclear de <i>T. brucei</i> .	60

Figura 28: Reações de “*trans-splicing in vitro*” com extrato nuclear de *T. brucei*. 62

Figura 29: Reações de “*trans-splicing in vitro*” com 10% de extrato nuclear de *T. brucei* e *T. cruzi*. 63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BP	<i>Branch point</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ETOH	Álcool etílico
gRNA	RNA guia
kDNA	Complexa rede de moléculas circulares (cinetoplasto)
mRNA	RNA mensageiro
NaAc	Acetato de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORFs	Fases de leitura aberta
PAGE	Gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PCR	Reação de polimerase em cadeia

PMSF	<i>P</i> henylmethanesulfonyl fluoride
PNK	Polinucleotídeo quinase
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RNA	Ácido ribonucleico
RNPs	Ribonucleoproteínas
SL	<i>S</i> pliced leader
snRNAs	Pequenos RNAs
UTRs	Regiões não traduzidas
VSGs	Variáveis de superfície

SUMÁRIO

1. Introdução	15
1.1. Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae	15
1.2. Doença de Chagas	15
1.3. Doença do Sono	20
1.4. Biologia Celular e Molecular dos Tripanosomatídeos	23
1.4.1. Processamento do mRNA em tripanosomatídeos	25
1.4.2. Sistemas de “splicing <i>in vitro</i> ”	33
2. Objetivos	34
3. Materiais e Métodos	35
3.1. Cultivo dos parasitas	35
3.2. Preparo dos extratos nucleares e diálise	35
3.3. Fenolização do extrato nuclear	36
3.4. Análise dos extratos nucleares em Gel Page 10% - 7M Uréia	36
3.5. Síntese do pré-mRNA acceptor da reação de “ <i>trans</i> -splicing <i>in vitro</i> ”	37
3.5.1. Escolha da sequência	37
3.5.2. Extração de DNA genômico de <i>T. cruzi</i>	39
3.5.3. PCR	39
3.5.4. Adição de dATP ao inserto	40
3.5.5. Reação de Clonagem	40
3.5.5.1. Reação de ligação	40
3.5.5.2. Preparação de Bactérias Competentes	41
3.5.5.3. Reação de transformação	42
3.5.5.4. PCR de colônia	42
3.6. Preparação do plasmídio alfa tubulina para reação de transcrição	43
3.6.1. Extração de DNA plasmidial	43
3.6.2. Linearização dos plasmídios com a enzima de restrição <i>PstI</i>	44
3.6.3. Purificação do DNA linearizado	44
3.6.4. Reação de sequenciamento	44
3.7. Reação de transcrição com material radioativo	45
3.7.1. Incorporação de radiação no Marcador Molecular	46

3.8. Reação de “ <i>trans</i> -splicing <i>in vitro</i> ”	46
4. Resultados e Discussão	48
4.1. Análise da integridade dos extratos nucleares	48
4.2. Obtenção da sequência parcial de alfa tubulina de <i>T. cruzi</i>	49
4.3. Extração do DNA plasmidial das bactérias transformadas, sequenciamento dos plasmídios e preparo dos plasmídios para reação de transcrição.	49
4.3.1. Extração do DNA Plasmidial	50
4.3.2. Linearização dos plasmídios	50
4.3.3. Purificação dos plasmídios linearizados	51
4.3.4. Reação de Sequenciamento do plasmídio alfa tubulina de <i>T. cruzi</i>	52
4.4. Reação de transcrição	55
4.5. Reações de “ <i>trans</i> -splicing <i>in vitro</i> ”	55
4.5.1. Obtenção da sequência do provável mRNA alfa tubulina maduro	56
4.5.2. Reações de “ <i>trans</i> -splicing <i>in vitro</i> ” com extrato nuclear de <i>T. cruzi</i>	56
4.5.3. Reações de “ <i>trans</i> -splicing <i>in vitro</i> ” com extrato nuclear de <i>T. brucei</i>	59
4.5.4. Reações de “ <i>trans</i> -splicing <i>in vitro</i> ” com 10% de extrato nuclear	63
4.6. Comparação entre as reações com <i>T. cruzi</i> e <i>T. brucei</i>	64
5. Conclusões	66
Referências Bibliográficas	67

INTRODUÇÃO

1. Tripanosomatídeos e Tripanosomíases Humanas

1.1. Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae

A ordem Kinetoplastida é composta por protozoários flagelados que apresentam cinetoplasto, porção de DNA circular presente na mitocôndria única dos parasitas ⁽¹⁾.

A família Trypanosomatidae compreende um grande número de protozoários parasitas, incluindo importantes agentes etiológicos de doenças humanas. Entre os causadores de doenças, destaca-se o *Trypanosoma brucei* (responsável pela Doença do Sono, amplamente presente na África) e o *Trypanosoma cruzi* (agente causador da Doença de Chagas, doença presente nas Américas). Os parasitos citados são transmitidos por insetos vetores sendo capazes de invadir diferentes tipos de tecidos e células, e apresentam diferenças marcantes no curso da infecção causada por eles ⁽²⁾.

1.2. Doença de Chagas

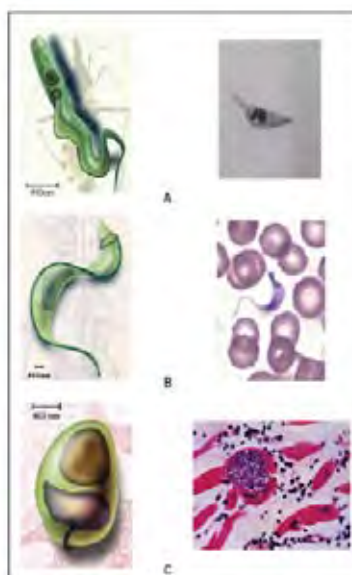
A tripanosomíase americana, esquizotripanose ou doença de Chagas, descoberta e descrita por Carlos Chagas em 1909 é uma zoonose causada pelo hemoflagelado denominado *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi* e transmitido pelo inseto triatomíneo (hemíptero hematófago da família Reduviidae). Esse protozoário pertence ao subfilo Mastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Trypanosoma* ^(3;4;5;1).

O *T. cruzi* apresenta três formas evolutivas: epimastigota, tripomastigota e amastigota (figura 1). A forma epimastigota caracteriza-se por ser alongada, com cinetoplasto justanuclear e anterior ao núcleo com flagelo livre na porção anterior (figura 1A); essa é a forma de reprodução do parasito no vetor ou em meio de cultura ^(3;6;1).

A forma tripomastigota é o estágio infectante do parasita, fusiforme e alongado com o cinetoplasto situado posteriormente ao núcleo e numa posição terminal ou subterminal no corpo celular, emergindo o flagelo da chamada bolsa flagelar, proximalmente ao cinetoplasto (figura 1B). São dotados de grande motilidade e ocorrem na corrente sanguínea do vertebrado e nas porções mais distais do tubo digestivo do vetor, não dispondo de capacidade replicativa ⁽⁷⁾.

A forma amastigota é esférica ou ovalada destituída de mobilidade e que carecem de flagelo livre (figura 1C); é uma forma de replicação no hospedeiro vertebrado, presente no interior de vários tipos de células, mas predominantemente nas fibras musculares estriadas e lisas e no sistema fagocítico mononuclear e em cultura de células ^(7;3;6;1).

Figura 1 - Formas de *T. cruzi*; A, Forma epimastigota; B, tripomastigota; C, amastigota.



Fonte: <<http://www.uta.edu/chagas/html/biolTcru.html>>. Acesso em: 02 nov. 2011.

A descoberta da doença em 1909 por Carlos Chagas, pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz, também identificou o agente causal (*Trypanosoma*) e o vetor (triatomíneo) ^(3;8). Existem mais de 40 espécies de triatomíneos capazes de transmitir o *T. cruzi*. *Triatoma* sp. constitui-se um dos maiores transmissores dessa infecção, pela sua adaptação ao peri-domicílio rural e domicílio de

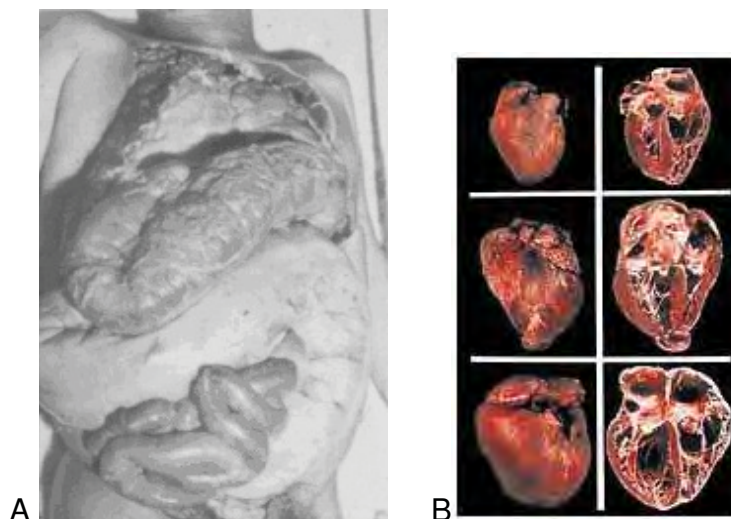
ecossistemas secos da América Central e do Sul. Em seguida são destacados *Rhodnius sp.* e *Panstrongylus sp.* com importância epidemiológica ⁽⁹⁾.

A doença de chagas é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma doença negligenciada e está muito presente nos países mais pobres, a estimativa do número de indivíduos infectados com o *T. cruzi* em áreas endêmicas da América Latina reduziu desde a década de 1980, atingindo 16-18 milhões de pessoas no início da década de 1990, caiu para 11 milhões de infectados. Dados relativamente recentes demonstram a presença de imigrantes provenientes da América Latina infectados pelo *T. cruzi* em diferentes países, com estimativas de 1.067 casos na Austrália entre 2005-2006; 1218, no Canadá; 5.125 na Espanha; e de 56 a 357 mil casos nos Estados Unidos ⁽¹⁰⁾.

Estima-se em dois milhões o número de pacientes crônicos no Brasil – 600 mil com complicações cardíacas ou digestivas que levam a óbito cinco mil pessoas por ano. Em valores absolutos, o número de brasileiros que morrem por doença de Chagas é similar ao dos que morrem por tuberculose e dez vezes superior às mortes causadas por esquistossomose, malária, hanseníase ou leishmaniose. A doença afeta indivíduos em sua faixa etária mais produtiva – dos 30 aos 60 anos – e tem forte impacto na capacidade de trabalho e geração de renda ⁽¹¹⁾.

A doença de Chagas apresenta uma fase aguda e outra crônica, podendo ser sintomática ou assintomática, sendo a última a mais frequente (90-98% dos pacientes). A fase aguda inicia-se através de manifestações locais, quando o *T. cruzi* penetra na conjuntiva (sinal de Romaña) ou na pele (chagoma de inoculação), aparecendo dentro de 4 a 10 dias após a picada do triatomíneo, regredindo em 1 ou 2 meses. Na fase crônica, os pacientes podem apresentar uma forma cardíaca (13%), digestiva (10%) ou formas mistas (8%) ilustradas na figura 2 ^(3;5;4).

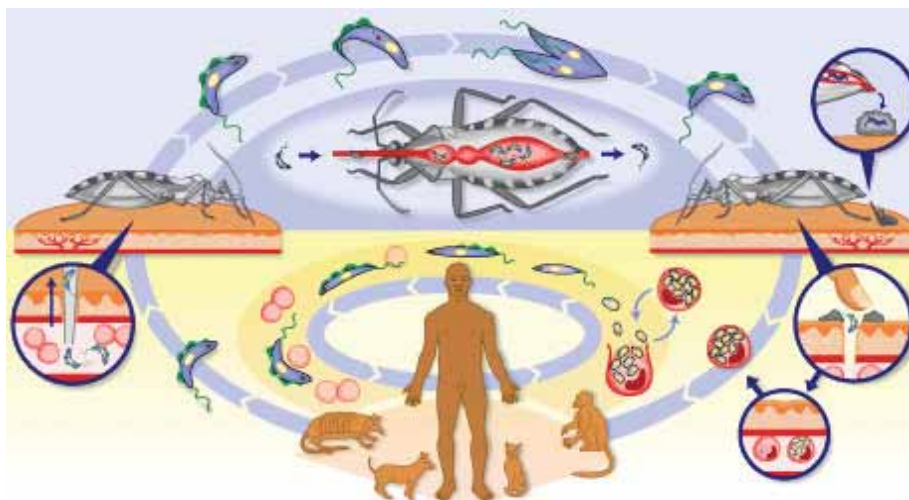
Figura 2 - Sinais clínicos da doença de Chagas. A) Manifestações gastrointestinais (megacólon e megaesôfago). B) Manifestações cardíacas (aumento do volume cardíaco).



Fonte: <<http://pathmicro.med.sc.edu/portuguese/para-port-chapter2.htm>>. Acesso em 02 nov. 2011.

A transmissão do *T. cruzi* ao homem ocorre através da deposição de fezes e urina do triatomíneo infectado sobre a pele danificada e pelas mucosas do hospedeiro no momento do repasto sanguíneo. 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. Ver explicação no texto anterior.



Fonte: <<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm>>. Acesso em 02 nov. 2011.

Além da transmissão vetorial, outro mecanismo responsável por aproximadamente 10% dos casos, é a transfusão sanguínea. O risco de adquirir a infecção após receber uma transfusão de sangue de um doador infectado é de aproximadamente 20%. Este é o principal mecanismo de transmissão em zonas urbanas. O terceiro mais importante mecanismo de transmissão é a congênita, com aproximadamente 5.000 a 18.000 casos por ano e pode ocorrer fora das áreas endêmicas. Outros mecanismos esporádicos de transmissão incluem acidentes de laboratório e transplantes de órgãos ⁽¹²⁾. A via de transmissão oral tem chamado a atenção nos últimos anos, observando-se que entre 1968 e 2000, mais de 50% dos casos da doença de Chagas aguda 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 ⁽¹³⁾.

Atualmente, há somente um medicamento disponível para o tratamento da doença de Chagas, o benzonidazol (Rochagan – grupo de nitroimidazóis). A eficiência desse fármaco varia com a linhagem do parasita, possui efeitos colaterais e deve ser usado com cautela e acompanhamento criterioso ^(6;1). O

nifurtimox (Lampit – grupo de nitrofuranos), medicamento anteriormente comercializado para o tratamento da tripanosomíase americana, foi retirado do mercado devido aos seus efeitos colaterais ⁽¹³⁾.

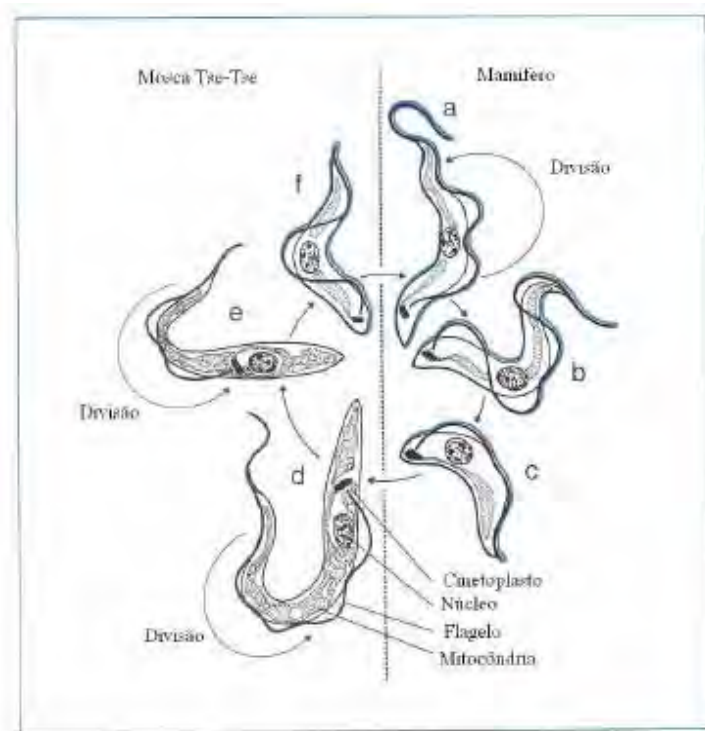
1.3. Doença do Sono

A tripanosomíase africana ou doença do sono é causada por *Trypanosoma brucei gambiense* e *Trypanosoma brucei rhodesiense*, subspécies relacionadas ao *Trypanosoma brucei brucei*. O *T. b. brucei* foi descoberto 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 ^(14;15).

Cerca de 50 milhões de pessoas correm risco de contrair a doença, e muitos casos novos ocorrem a cada ano, porém não se pode comprovar esse número devido à difícil estatística em países em desenvolvimento ^(16;15).

O *T. b. gambiense* é encontrado principalmente no oeste e região central da África, causando a doença do sono crônica ou gambiense, que geralmente é transmitida por moscas do grupo *G. morsitans* que se alimentam de animais silvestres. Por outro lado, o *T. b. rhodesiense* é encontrado no leste da África, causando a doença do sono aguda ou rhodesiense, que é a mais perigosa, pois a doença se desenvolve mais rapidamente; este protozoário geralmente é transmitido por moscas do grupo *G. palpalis* que se alimentam de humanos infectados, porém, porcos e cães também podem servir de reservatório ⁽¹⁴⁾. As diferentes formas do *T. brucei* estão indicadas na figura 4.

Figura 4 - Detalhes das formas apresentadas pelo *T. brucei* durante o ciclo biológico. a, Forma sanguínea delgada; b, forma sanguínea intermediária; c, forma sanguínea larga; d, forma procíclica; e, forma epimastigota; forma metacíclica.

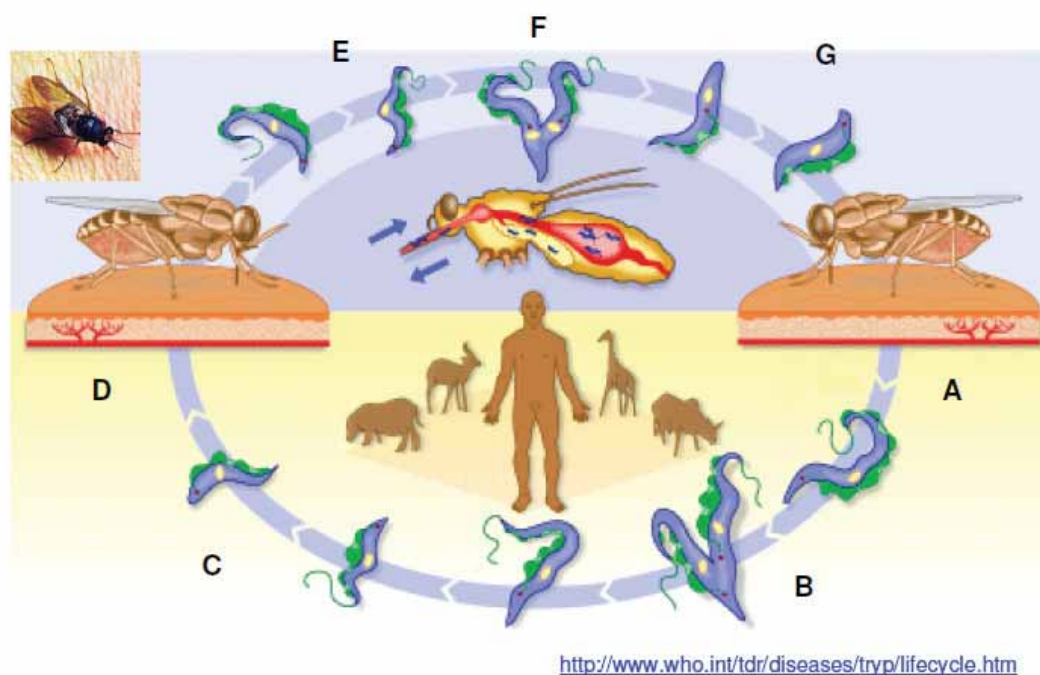


Fonte: <<http://www.ilri.org/InfoServ/Webpub/fulldocs/Illrad90/Trypano.htm>>. Acesso em 10/02/2011.

O ciclo completo da doença (biológico e de transmissão) foi descrito por David Bruce em 1914 (figura 5). 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 diferenciam-se em formas procíclicas (E) e, em seguida, em epimastigotas que se

multiplicam na glândula salivar (F). Em seguida, essas formas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos (G) e o ciclo inicia-se novamente.

Figura 5 - Ciclo biológico da transmissão da Doença do Sono. Ver explicação no texto anterior.



Fonte: <<http://www.who.int/tdr/diseases/trypanosomiasis/lifecycle.htm>>. Acesso em 02 nov. 2011.

A sintomatologia da doença do sono pode ser variada, mas existem dois estágios clínicos que podem ser reconhecidos durante a infecção, o estágio hemolinfático inicial e o estágio encefálico tardio. O primeiro geralmente ocorre após 1-3 semanas após a picada, apresentando episódios de febre com linfadenopatia generalizada, seguidos de sintomas não específicos como vertigens, dores de cabeça, fraqueza generalizada e perda de peso. Vários órgãos podem ser atacados, como fígado, rins, coração, pele, sistema endócrino e olhos. Já no estágio encefálico tardio, observam-se sintomas neurológicos que envolvem

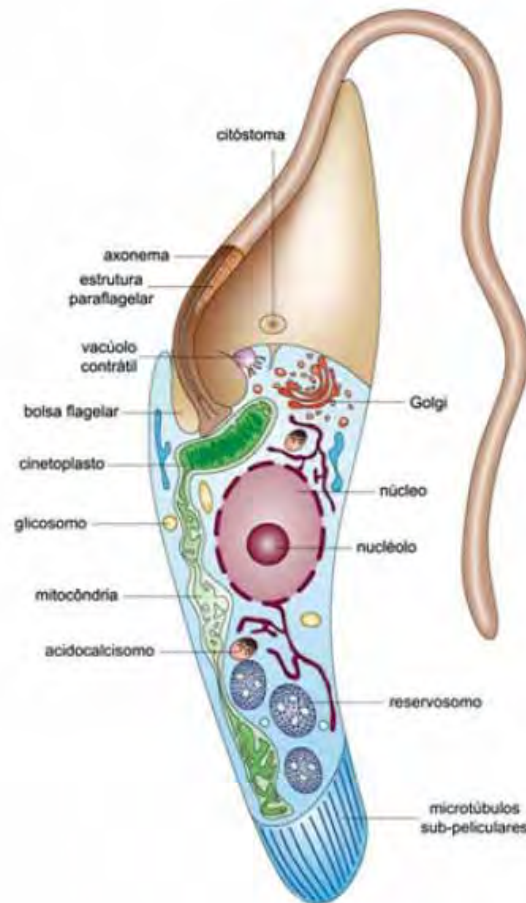
anormalidades psiquiátricas, motoras, sensoriais e distúrbios do sono, podendo causar morte ⁽¹⁷⁾.

O tratamento do estágio inicial é feito com pentamidina (introduzida em 1940), para *T. b. gambiense* e, suramina (introduzida em 1920), para *T. b. rhodesiense*. A fase crônica possui um tratamento mais difícil, pois é necessário que o fármaco atravesse a barreira do SNC (sistema nervoso central). São utilizados o melarprosol (introduzido em 1949), eficiente para ambas as espécies de *T. brucei* e eflortinina (introduzida em 1981), com ação sobre *T. b. gambiense* ^(17;14). Vários esforços estão sendo feitos na busca de uma vacina para a doença do sono, mas, devido à variação antigênica dos parasitos dificilmente será obtida uma vacina eficaz ⁽¹⁴⁾.

1.4. Biologia Celular e Molecular dos Tripanosomatídeos

A figura 6 mostra as principais estruturas celulares presentes nos tripanosomatídeos. Além das organelas comuns em todos os organismos eucariotos, destacamos a presença de uma única mitocôndria, que se ramifica por todo o corpo e uma bolsa flagelar de onde emerge um flagelo que pode ou não se exteriorizar ⁽¹⁾.

Figura 6 - Esquema geral das estruturas celulares da forma epimastigota do *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: < ([http:// www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=13](http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=13)). Acesso em 02 nov. 2011.

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 ⁽¹⁸⁾. 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 peptídios, 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 ^(1;19).

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 ⁽¹⁸⁾. 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 ⁽¹⁸⁾.

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 ⁽¹⁸⁾.

1.4.1. Processamento do mRNA em tripanosomatídeos

Desde 1990, os cientistas observaram que eucariontes têm genomas muito grandes com centenas de milhares de *íntrons* (sequências não codificadoras)

intercalados com *éxons* (sequências codificadoras). 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 relativamente curtos com 50 a 250 pares de bases, enquanto que os *íntrons* são muito maiores e podem chegar a vários milhares de pares de bases.

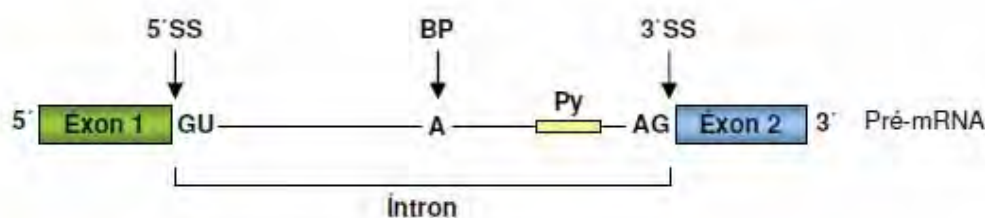
“Splicing” é um evento nuclear complexo de processamento dos RNAs, onde *éxons* diferentes do mRNA de transcritos primários estão unidos. As sequências *intron* são removidas do pré-mRNA e os *éxons* fundidos resultando na formação do RNA mensageiro (mRNA) maduro; posteriormente é adicionado na sua extremidade 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”.

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 ^(20;21;22).

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 ^(20;21). 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 *intron* no início do processamento; para isso são utilizados nucleotídeos que serão responsáveis por

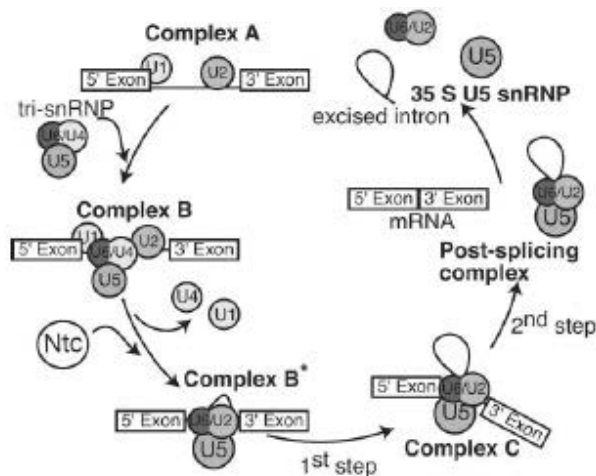
essa sinalização, como o GU no sítio de “splicing” 5’ (sítio de clivagem 5’), AG no sítio de “splicing” 3’ (sítio de clivagem 3’), A do *branch point* (sítio de ligação da extremidade 5’ do *intron* durante o processamento) e o trato de polipirimidinas (reconhecimento do *branch point*, seleção do sítio de *splicing* 3’ e poliadenilação), os quais estão indicados na figura 7.

Figura 7 - 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’.



“*Cis*-splicing” ocorre em duas etapas, sendo que em cada passo observa-se uma reação de transesterificação. O processo inicia-se com a formação do complexo A, resultado da interação entre snRNP U1 e U2 por pareamento dos snRNAs com a região 5’ *splice site* do *intron* e com a sequência *branch point* (BP), respectivamente. Ao complexo A são adicionados U4/U6 di-snRNP e U5 snRNP como um trisnRNP, resultando no 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 o primeiro passo catalítico, U1 é dissociado da região 5’ *splice site* 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, que catalisa o segundo passo do “*splicing*” e, em seguida, o complexo é completamente desorganizado ⁽²³⁾. A figura 8 resume o processamento

Figura 8: Modelo esquemático do *cis*-splicing.



Fonte: Ohi et al., (2005) ⁽²⁴⁾.

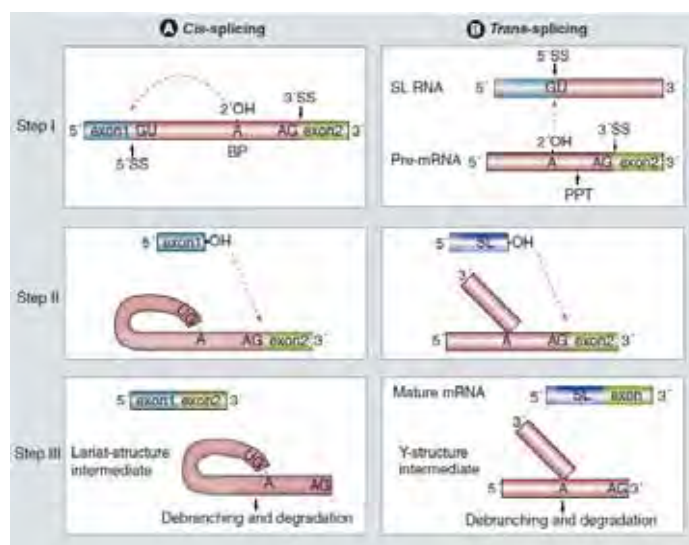
Já o processamento dos pré-mRNAs por “*trans*-splicing” é considerado não usual por estar presente em somente alguns organismos. Esse processamento foi descoberto em 1982, quando foi observado que os mRNAs de *T. brucei* para diferentes glicoproteínas variáveis de superfície (VSGs) possuíam uma sequência comum de 39 nucleotídeos, denominada de *spliced leader* (SL) ⁽²⁵⁾. Mais tarde foi determinado que todos os mRNAs em tripanosomas eram processados por “*trans*-splicing” ⁽²⁶⁾, mas com a exceção do gene da poli-A polimerase ⁽²⁷⁾. Inicialmente, acreditava-se que somente os tripanosomas apresentavam esse processamento, mas mais tarde o mesmo foi observado em nematódeos, trematódeos, euglenóides ⁽²⁸⁾ e, mais recentemente, em cestódeos ⁽²⁹⁾, em *Hydra* do filo Cnidária ⁽³⁰⁾ e em dois membros do subfiló dos Cordatos ^(31,32).

Nesses organismos, os pré-mRNAs são transcritos em unidades policistrônicas, ou seja, um único pré-mRNA contendo a sequência que codifica para proteínas diferentes, intercaladas por *íntrons* ⁽³³⁾. 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” (25;34;35;20;21).

Exceto pela natureza intermolecular, o “*trans*-splicing” apresenta as mesmas etapas do “*cis*-splicing” (dois passos de reação); na primeira etapa, ocorre clivagem no sítio doador do SL gerando 5' SL *exon*; o SL remanescente liga-se à adenosina do *intron* no pré-mRNA aceptor para formar o Y intermediário (correspondente ao “*lariat*” do “*cis*-splicing”). Na segunda etapa, a clivagem no sítio 3' e ligação do *exon* geram os *exon* processados e um Y-*intron* excisado (28). A figura 9 ilustra as principais diferenças entre “*cis*” e “*trans*”-splicing.

Figura 9: 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 splice e a sequência BP estão indicadas. BP: Branch point; PPT: trato de polipirimidinas; SL: Spliced leader ; SS: sítios do splicing.

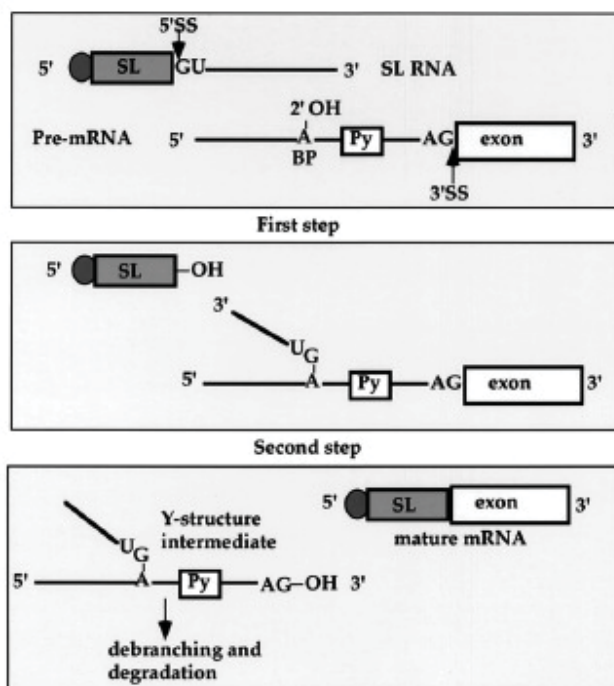


Fonte: Michaelli et al., (2011)⁽³⁶⁾

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 *intron* 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 *intron* durante o

processamento) e o trato de polipirimidinas (reconhecimento do *branch point*, seleção do sítio de *splicing* 3' e poliadenilação), conforme ilustrado na figura 10.

Figura 10 - Representação esquemática das sinalizações necessárias para que ocorra o “*trans-splicing*”. 5'SS: sítio de *splicing* 5' no RNA SL; BP: *branch point*; Py: trato de polipirimidinas; 3'SS: sítio de *splicing* 3'; SL: *spliced leader*; círculo: *cap*.



Fonte: Liang et. al., (2003) ⁽²⁰⁾

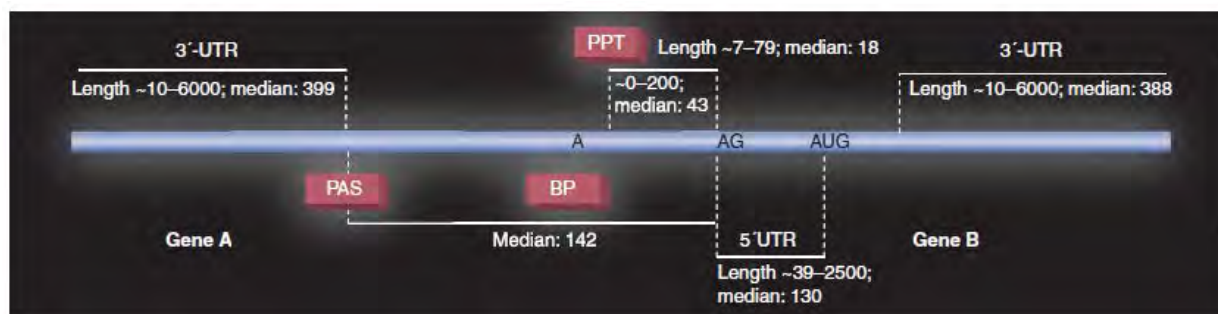
Em tripanosomas, a única sequência promotora definida e caracterizada até o momento é a do gene SL RNA ⁽³⁵⁾, esta sequência promotora é conservada entre as espécies de tripanosomatídeos ^(37;38). O cap 5' do SL RNA é o mais complexo descrito até agora entre os eucariotos e é doado a todas as mRNAs durante o “*trans-splicing*”, tripanosomatídeos possuem uma estrutura complexa denominada ‘cap4’ que inclui 2'-O-ribose metilação nos quatro primeiros nucleotídeos (AACU) e base de metilação na primeira (m_2^6A) e na quarta (m^3U) posições ⁽³⁹⁾. Os primeiros estudos utilizando células permeáveis sugeriram que estas modificações no “cap4” são adicionadas co-transcritucionalmente ⁽³¹⁾ e a máquina que realiza a modificação do “cap4” foi elucidada nos últimos anos ^(40;41);

a modificação total no “cap4” é essencial para a biogênese do SL RNA e “*trans-splicing*” no sistema *in vivo* ^(42;43). O SL RNA é transcrito em um sítio nuclear distinto perto do nucléolo, identificado pela primeira vez em *Trypanosoma cruzi* ⁽⁴⁴⁾. 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 ocorrem neste domínio, que foi chamado SL ribonuclearprotein (RNP) factory ^(45;46;47). As proteínas unidas aos snRNAs (Small nuclear ribonucleic acid) podem ser classificadas em dois grupos: as específicas que estão associadas somente a determinadas snRNPs e sete proteínas Sm. As sete proteínas Sm apresentam-se interligadas, organizando-se em uma estrutura em forma de anel, na região do sítio Sm.

Três estudos recentes foram realizados para obter-se o mapeamento do genoma do SL, dos sítios de adição da poly(A) ^(48;49) e sítios de adição do SL em *T. brucei* ⁽⁵⁰⁾. O estudo de Kolev et al.,(2010) ⁽⁴⁹⁾ levou à identificação de 1.114 novos transcritos não provenientes das anteriormente descritas fases de leitura aberta (ORFs) que são “*trans-splicing*” e poliadenilação ⁽⁴⁹⁾. 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' ^(48;49;50) (figura 11).

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 11).

Figura 11: Distâncias entre as sequências que ditam 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) ⁽³⁶⁾.

O resultado mais surpreendente foi a promiscuidade observada na escolha dos locais além do SL. Por exemplo, Kolev et al.,(2010) ⁽⁴⁹⁾ relatou que 926 genes, que representam 11% de todos os genes identificados, tinham um único sítio, enquanto a maioria dos genes, (62%) tinham entre 2 a 4 sítios e 27% dos genes tiveram cinco ou mais sítios além do SL ⁽⁴⁹⁾.

O estudo observou 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 11); isto não é surpreendente, visto que “*trans*-splicing” e poliadenilação são eventos acoplados ⁽³⁶⁾. 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 11) ⁽³⁶⁾. 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 ⁽⁴⁹⁾ (figura 11).

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 ⁽³⁶⁾. “*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 ⁽⁵⁰⁾.

1.4.2. Sistemas de “splicing *in vitro*”

Reações de “splicing *in vitro*” com células de mamíferos e extratos de leveduras foram estabelecidas há cerca de 25 anos ^(51;52). Ambos os sistemas necessitam de manipulações diferentes; no sistema de mamíferos foram utilizados extratos de células inteiras, e no sistema de leveduras, os extratos nucleares mostraram-se mais eficientes ⁽⁵¹⁾. A reação de “splicing *in vitro*” mostrou-se eficiente com o uso de moléculas de RNA “adaptadas”, que abrigam sequências que são processadas com alta eficiência *in vivo* ^(51;52;53).

O sistema de mamíferos demonstrou que o pré-mRNA não requer em sua sequência o cap 5' e a 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 ⁽⁵⁴⁾. No sistema de “splicing *in vitro*” com leveduras usou-se um pré-mRNA radioativo, onde os produtos do “splicing” e seus intermediários foram prontamente detectados ⁽⁵⁵⁾.

Recentemente, um sistema de “*trans*-splicing *in vitro*” com extratos de células inteiras de *T. brucei* foi criado ⁽⁶²⁾; o substrato usado na reação *in vitro* foi similar ao substrato cujo “*trans*-splicing” foi verificado *in vivo* em parasitas transgênicos expressando essas construções. O substrato-modelo contém os sinais de splicing do gene beta-tubulina fundido à luciferase e o sinal de poliadenilação “upstream” do gene alfa-tubulina. Três ensaios foram criados para monitorar a produção dos produtos da reação de “*trans*-splicing *in vitro*”: ensaio de proteção RNase, RT-PCR e PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR) ⁽⁶²⁾. O SL RNA endógeno do extrato de células inteiras mostrou-se eficiente na reação, como também o uso de grandes quantidades de pré-mRNA sintético (um excesso de 50 vezes sobre SL RNA endógeno no extrato) ⁽⁶²⁾. O SL RNA sintético criado no estudo não pode ser recrutado pela maquinaria do “*trans*-splicing”; isto não foi surpreendente visto que

a falta de modificações completas no 'cap4' também não é tolerada no sistema *in vivo*⁽⁵⁶⁾.

2. Objetivos

Os objetivos deste estudo foram estabelecer os requerimentos necessários para 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* e sequência parcial de alfa tubulina de *T. cruzi* como pré-mRNA acceptor, em que o SL RNA (splice leader) tem origem endógena, isto é, dos próprios extratos nucleares.

3. Materiais e Métodos

3.1. Cultivo dos Parasitas

Formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT pH 7,2 (68,4 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 56,3 mM Na₂HPO₄; 111 mM Dextrose; 0,3% “Liver Infusion Broth”; 0,5% Tryptose; 25 mg/l Haemin; 10% Soro Fetal Bovino) em estufa a 28°C, realizando-se repiques a cada 15 dias.

Formas procíclicas da cepa 427 de *T. brucei* foram cultivadas em meio SDM-79⁽⁵⁷⁾ 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 culturas de *T. cruzi* e *T. brucei* na concentração de 5×10^7 células/ml, conforme o protocolo sugerido por Kovacs et al., (1993)⁽⁵⁸⁾ com as modificações de Vianna e cols. (2001)⁽⁵⁹⁾.

As culturas foram centrifugadas a 5.500 rpm por 10 minutos, os sobrenadantes descartados e os “pellets” ressuspensos em 10 ml de tampão AGK (10 mM Tris-HCL pH 7,9; 1,5 mM MgCl₂; 200 mM KCl; 1 mM PMSF - *PHenylmethanesulfonyl fluoride*; 1 µg/ml Leupeptin; 0,5 mM DTT), repetindo-se a lavagem por três vezes; na terceira vez, os “pellets” foram ressuspensos em 1 ml do tampão AGK e adicionando-se aos tubos as bolinhas de vidro (glass beads), que foram mergulhadas em N₂ líquido por 1 minuto, seguido de choque térmico em banho seco a 38°C até descongelar parcialmente, os tubos foram agitados em vortex por 4 minutos, repetiu-se este passo três vezes para o rompimento das células; Centrifugou-se 30 minutos, 13000 rpm, 4°C, os sobrenadantes foram descartados e o volume dos “pellets” determinados; estes foram ressuspensos 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 de 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; 0,5mM DTT), este foi adicionado gota a gota; os tubos ficaram em agitação suave por 30 minutos a 4°C, centrifugou-se por 30 minutos, 13000rpm, 4°C; os sobrenadantes (extrato nuclear) foram retirados e armazenados a -80°C. Os extratos nucleares foram dialisados por 6 horas a 4°C com 2 a 3 trocas contra tampão E (20 mM Tris-HCL pH 7,9; 20% glicerol; 0,1 M KCL; 0,2 mM EDTA; 0,5 mM DTT; 0,2 mM PMSF), de baixa molaridade de KCl. Os extratos nucleares foram fenolizados e analisados em Gel Page 10% - 7M Uréia corado com solução de prata.

3.3. Fenolização do extrato nuclear

Os extratos nucleares foram submetidos à fenolização com o intuito de averificar a presença dos snRNAs (U1, U2, U4, U5, U6) íntegros em Gel Page 10% - 7M Uréia.

Protocolo da fenolização: para 10% de extrato nuclear adicionou-se 0,5% SDS e H₂O DEPC (0,1% de dietilpirocarbonato, agitou-se por 12 horas e foi autoclavada a 121°C e 1 atm por 15 minutos) q.s.q; adicionou-se fenol-clorofórmio na proporção V/V; os tubos foram agitados em vortex de 3 a 5 minutos; centrifugou-se 1 minuto a 14000 rpm; transferiu-se o sobrenadante para outro tubo; adicionou-se 0,1 M NaAc; ETOH 100% na proporção V/V e misturou-se por inversão; o tubo foi incubado por 30 minutos a -80°C; centrifugou-se por 5 minutos (14000 rpm; 4°C); o sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuspenso em 15 µl de tampão formamida (0,025% xylene cyanol; 0,025% azul bromofenol; formamida deionizada q.s.q); incubou-se a 95°C por 5 minutos e a amostra foi aplicada em gel Page 10% - 7M Uréia.

3.4. Análise dos extratos nucleares em Gel Page 10% - 7M Uréia

As amostras de extratos nucleares foram submetidas à eletroforese em gel Page 10% - 7M Uréia: 7 M uréia; 1% Acrilamida/ bis-acrilamida 40% (40% acrilamida; 1,3% 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 e 1 atm por 15 minutos); 0,1% TEMED e 1% de solução APS 10% (persulfato de amônio); as amostras foram aplicadas no gel com tampão formamida (descrito acima), a eletroforese foi realizada na voltagem 90 V por 2 horas em tampão TBE 1X.

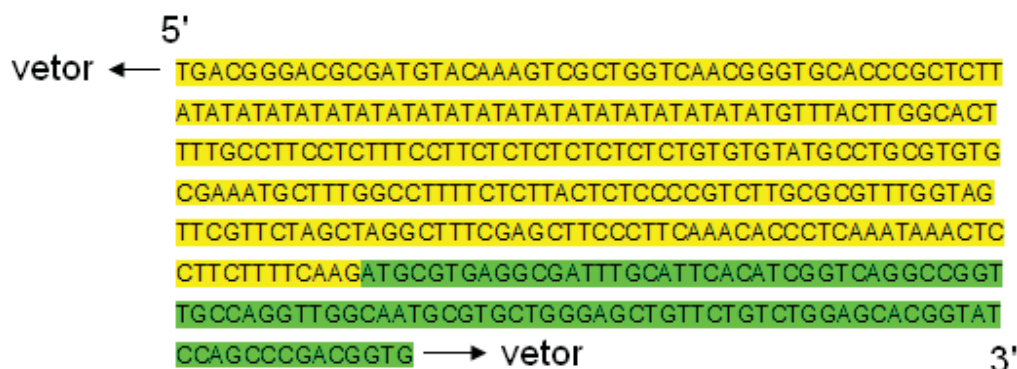
Após a corrida, o gel foi corado com solução de prata, como segue: solução 40% metanol + 10% ácido acético por 30 minutos; solução 10% etanol + 5% ácido acético por 15 minutos; solução 10% etanol + 5% ácido acético por 15 minutos; água destilada por 5 minutos; solução de 12 mM de nitrato de prata por 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 de alfa tubulina de *T. cruzi* (figura 12) de 374 pares de bases, foi selecionada como substrato para a reação de “*trans*-splicing *in vitro*”, escolheu-se esta sequência porque sabidamente é “*trans*-processada” no sistema *in vivo* do parasita. A sequência selecionada contém uma região não codificadora de polipeptídios (*intron*) ligada a uma sequência codificadora de polipeptídios (*éxon*), e os sinalizadores da reação de “*trans*-splicing”: “Branch point”, trato de polipirimidinas 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 XM_797406.1. BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) da sequência está ilustrado na figura 13.

Figura 12 - Sequência parcial do gene alfa tubulina de *T. cruzi* clonada em vetor pGEM-T Easy Vector (Promega) usada como pré-mRNA acceptor da reação de “*trans-splicing in vitro*”. Sequência marcada em amarelo: região intergênica não codificadora de polipeptídios (*ínton*); Sequência marcada em verde: região codificadora de polipeptídios (*éxon*).



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

Figura 13. Ilustração do BLAST da sequência parcial de alfa tubulina de *T. cruzi*.

```
>gb|AF091835.1|AF091835 Trypanosoma cruzi strain CI 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 TGACGGGACGCGATGTACAAAGTCGCTGGTCAAACGGGTGCACCCGCTCTtatatatatat 60
      |||
Sbjct 964 TGACGGGACGCGATGTACAAAGTCGCTGGTCAAACGGGTGCA-CCGCTC-T-TATATA-A- 1018

Query 61 atatatatatatatatatatatatatatatGTTTACTTGGCCTTTTGCCTTCCT-CTTT 119
      |||
Sbjct 1019 ATATATATATATATATATATATATATATATATGTTTACTTGGCCTTTTG-CTTCCTCCTTT 1077

Query 120 CCTTctctctctctctctctctGTGTGTATGCCTGCGTGTGCGAAATGCTTTGGCCTTTTCTCT 179
      |||
Sbjct 1078 CCTTCTCTCTCTCTCTCTGTGTGTATGCCTGCGTGTGCGAAATGCTTTGGCCTTTTCTCT 1137

Query 180 T-ACTCTCCCCGCTCTT-GCGCGTTT-GGTAGTTCGTTCTAGCTAGGCTTTTCGAGCTTCCC 236
      |||
Sbjct 1138 TCACCTCTCCCCGCTCTTCGCGCTTTGGGTAGTTCTCTAGCTAGGCTTTTCGAGCTTCTC 1197

Query 237 TTCAAACACCCCTCAAATAAACTCCTTCTTTTCAAGATGCGTGAGGCGATTTCATTACACA 296
      |||
Sbjct 1198 TTCAAACACCCCTCAAATAAACTCCTTCTTTTCAAGATGCGTGAGGCGATTTCATTACACA 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 02 nov. 2011.

3.5.2. Extração de DNA genômico de *T. cruzi*

O DNA genômico de uma cultura de 50 ml de formas epimastigotas de *T. cruzi* em meio LIT (10^8 - 10^9 parasitas/ml) foi extraído com o reagente DNAzol (Invitrogen), seguindo as especificações do fabricante. A amostra foi analisada após eletroforese em gel de agarose 1% em TAE 1X (Tris-acetato 40 mM pH 8,5; EDTA 2 mM). Adicionou-se tampão de amostra 5X (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0; 0,125% azul de bromofenol; 0,125% xilenocianol; 30% glicerol), e aplicou-se a amostra no gel contendo 0,5 g/ml de brometo de etídio, que foi submetido à voltagem de 100 V em tampão TAE 1X; após a corrida o gel foi visualizado em transiluminador UV.

3.5.3. PCR para amplificação da sequência parcial de alfa tubulina.

A sequência alfa tubulina escolhida como pré-mRNA acceptor da reação de “*trans-splicing in vitro*” foi amplificada por PCR. Adicionou-se em tubos de 0,2 ml: 1,0 µl DNA [100 ng/µl]; 5,0 µl tampão de PCR 10X (Amershan Biociences); 1,5 µl $MgCl_2$ [50 mM]; 1,0 µl dNTP [10 mM]; 1µl primer *forward* [100 ng/µl] (5'-TGA CGG GAC GCG ATG TAC -3'); 1µl primer *reverse* [100 ng/µl] (5'-CAC CGT CGG GCT GGA TAC-3'); 0,5 µl Taq DNA polimerase [5 U/µl] (Amershan Biociences); H_2O q.s.p.50 µl. O tubo foi colocado em termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Perkin Elmer) para amplificação, seguindo o ciclo abaixo:

94 °C – 5 minutos

94 °C – 1 minuto

53 °C – 1 minuto

72 °C – 1 minuto e 40 segundos

} 30X

72 °C – 5 minutos

4 °C ∞

O produto da reação de PCR foi analisado após eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador UV. A banda referente ao produto de PCR foi recortada do gel de agarose e extraída utilizando o *kit QIAquick gel extraction* (Qiagen), seguindo as especificações do fabricante.

3.5.4. Adição de dATP ao inserto

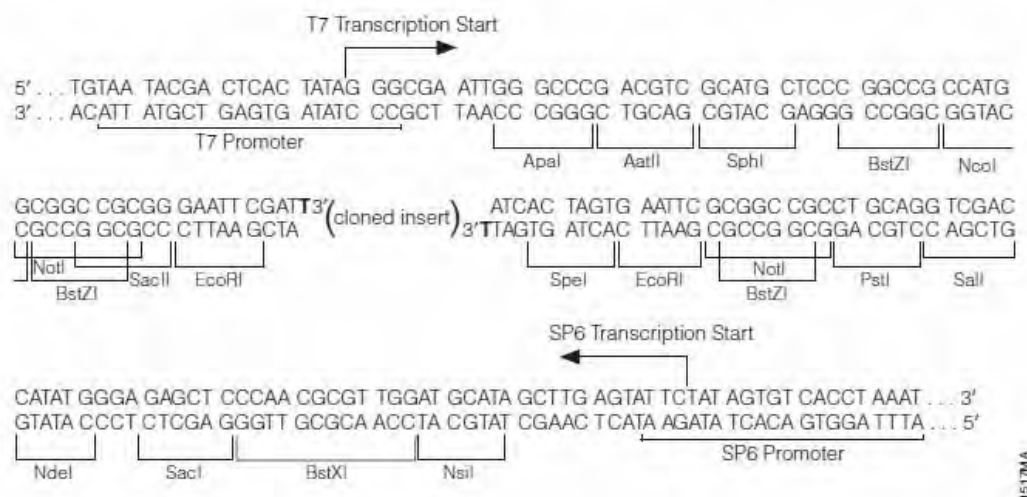
A adição de adenina na extremidade 3' foi necessária para garantir a ligação do inserto ao vetor pGEM-T Easy Vector (Promega). Foram adicionados em tubo 0,2 ml: 7 µl Tampão de PCR 10X; 1 µl dATP [10 mM]; 0,5 µl Taq DNA polimerase [5 U/µl]. A reação foi incubada a 72 °C por 15 minutos em termociclador Gene Amp PCR System 9700.

3.5.5 Reação de Clonagem

3.5.5.1 Reação de ligação para clonagem em pGEM®-T Easy Vector (Promega)

A reação de ligação do inserto com o vetor pGEM-T Easy Vector (figura 14) foi realizada seguindo as especificações do fabricante.

Figura 14 - 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 *PstI* (utilizada neste estudo para linearizar o plasmídio 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 02 nov. 2011.

3.5.5.2. Preparação de Bactérias Competentes

Um pré-inóculo de 5 ml contendo bactérias DH5 α , após crescimento “overnight” (durante toda noite, aproximadamente 16 horas), foi transferido para 50 ml de meio LB (1% triptona; 0,5% extrato de levedura; 1% NaCl; autoclavado a 121 °C/ 1 atm por 30 minutos) incubando-se a 37°C em estufa sob agitação até que atingisse uma densidade óptica a 600 nm de 0,3; a cultura foi centrifugada por 10 minutos a 4°C e 2.500 g e o sedimento ressuspense em 10 ml de solução de CaCl₂ (60 mM CaCl₂; 10 mM MOPS pH 7,0; 15% glicerol; a solução foi esterilizada por filtração em membrana de 0,22 μ m); novamente as bactérias foram centrifugadas por 10 minutos a 4 °C a 2.500 g e o sedimento ressuspense em 10 ml da solução de CaCl₂, sendo mantidas em gelo durante 1 hora; centrifugou-se por 10 minutos a 4°C a 2.500 g e o sedimento foi ressuspense em 200 μ l de

solução de CaCl_2 , sendo a suspensão bacteriana aliquoteada em frações de 50 μl cada congeladas a -80°C .

3.5.5.3. Reação de transformação

Após misturar 2 μl da reação de ligação com 50 μl de solução de CaCl_2 , foram adicionados 50 μl das bactérias DH5 α competentes e incubadas em gelo por 30 minutos; foi realizado um choque térmico a 42°C por 2 minutos, retornando em seguida para o gelo por 2 minutos e à temperatura ambiente por mais 2 minutos; adicionou-se 500 μl de meio SOC (SOB suplementado com 10 mM glicose e 20 mM MgCl_2) e incubou-se a 37°C por 1 hora e 30 minutos sob agitação (150 rpm); as bactérias foram então cultivadas em placas de Petri contendo meio LB ágar (1% triptona; 0,5% extrato de levedura; 1% NaCl; 2% ágar; autoclavado a $121^\circ\text{C}/1\text{ atm}$ por 30 minutos) com 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ampicilina e incubadas a 37°C “overnight”.

3.5.5.4 PCR de colônia transformada

Uma pequena quantidade de bactérias presente em cada colônia foi suspensa em 20 μl de meio LB, separadamente; em tubo de 0,2 ml foram adicionados: 5 μl da suspensão de bactérias; 5 μl Tampão de PCR 10X; 1,5 μl MgCl_2 [50 mM]; 1 μl primer M13 (Integrated DNA Technologies) *forward* [100 ng/ μl] (5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3'); 1 μl primer M13 (Integrated DNA Technologies) *reverse* [100 ng/ μl] (5'-CAG GAA ACA GTC ATG AC'-3'); 1 μl dNTP [10 mM]; 0,5 μl Taq DNA polimerase [5 U/ μl] e H_2O q.s.p. 50 μl . As reações foram colocadas em termociclador *Gene Amp PCR System 9700* seguindo o ciclo abaixo:

94 °C – 5 minutos

94 °C – 1 minuto
53 °C – 1 minuto
72 °C – 1 minuto e 40 segundos

} 30X

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 (15 µl) foi utilizada para fazer o repique em meio líquido.

3.6. Preparação do plasmídio alfa tubulina para reação de transcrição

3.6.1. Extração de DNA plasmidial (miniprep)

As bactérias recombinantes foram repicadas em 5 ml de meio LB contendo antibiótico (50 µg/ml de ampicilina) e incubadas a 37°C, “overnight”, sob agitação. A cultura foi centrifugada removendo-se o sobrenadante; o sedimento foi ressuspenso em 100 µl da Solução I (25 mM de Tris-HCl pH 8,0; 10 mM de EDTA pH 8,0; 50 mM de glicose), adicionou-se 200 µl da Solução II (0,2 M de NaOH; 1% SDS) e misturado por inversão 5X; a mistura foi incubada a temperatura ambiente por 10 minutos; adicionou-se 150 µl da Solução III (3 M de acetato de potássio; 11,5% de ácido acético glacial), misturando por inversão e incubou-se por 5 minutos em gelo; os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi colocado em novo tubo. As amostras foram precipitadas com 1 ml etanol 100% por 10 minutos a –80 °C, seguido de centrifugação por 10 minutos a 4 °C, 10.000 g; o sedimento foi lavado com 500 µl de etanol 70%, centrifugado a 4 °C por 5 minutos, seco e ressuspenso em 100 µl de tampão de RNase (10 mM de Tris-HCl pH 8,0, 15 mM de cloreto de sódio), contendo 1,5 µl de RNase A [20 mg/ml], incubou-se a 37 °C por 1 hora. Em seguida acrescentou-se 100 µl de fenol/clorofórmio, para extração e posterior precipitação do DNA, que foi

ressuspensão em 30 µl água destilada e analisado por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizados em transiluminador UV.

3.6.2. 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.

3.6.3. Purificação do DNA linearizado

Após a linearização, os plasmídios linearizados foram purificados para posterior transcrição, adicionando-se na proporção V/V, fenol-clorofórmio; o tubo foi agitado em vortex por 20 segundos, centrifugou-se 5 minutos em temperatura ambiente a 13000 rpm; a fase superior foi transferida para novo tubo; adicionou-se etanol 100% na proporção 2V/V, 0,1 M acetato de sódio pH 7, misturou-se levemente por inversão; centrifugou-se por 10 minutos em temperatura ambiente a 14000 rpm; o sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 500 µl de etanol 70%; o pellet foi seco a vácuo e ressuspensão em 20 µl de água destilada livre de RNases. A amostra foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador UV.

3.6.4. Reação de Sequenciamento

Para o sequenciamento dos plasmídios, os reagentes a seguir foram adicionados no tubo de 0,2 ml: 4 µl DNA linearizado [400 ng], 2 µl Tampão 5X, 2 µl primer *T7 forward* (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3') ou *reverse SP6* (5'-ATT TAG GTG ACA CTA TAG-3') [1,6 pmol/µl] e 2 µl Big Dye Terminator (Applied Biosystems). Os tubos foram colocados em termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems), seguindo-se o ciclo abaixo:

96 °C – 2 minutos

96 °C – 30 segundos
52 °C – 30 segundos
60 °C – 4 minutos

} 40X

4 °C ∞

Após a PCR, adicionou-se aos tubos 80 µl de isopropanol 75% para precipitar o DNA, deixando à temperatura ambiente por 15 minutos ao abrigo da luz. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos (12.000 g, temperatura ambiente) e o sobrenadante descartado; o sedimento foi lavado com 1 ml de etanol 70%, centrifugando por 5 minutos (12.000 g, temperatura ambiente), seco e ressuspenso em 2 µl de *Loading buffer* (Applied Biosystems). As amostras foram aquecidas a 95°C antes de serem submetidas a eletroforese capilar em analisador genético ABI 3500 (Applied Biosystems).

3.7. Reação de transcrição com material radioativo

O plasmídio alfa tubulina linearizado e purificado foi transcrito com a enzima T7 RNA Polymerase/ Sigma-Aldrich nas seguintes condições: tampão de transcrição 1X (Sigma-Aldrich); 1,4 U/µl RNAsin; 10 mM DTT; 0,015 A/µl Cap (GpppG); 0,1 µg/µl plasmídio alfa tubulina; 0,5 mM ATP; 0,05 mM GTP; 0,5 mM CTP; 0,5 mM UTP; 0,5 mM [α -³²P]-GTP 250 µCi (Perkin Elmer); 2 U/µl T7 RNA polimerase; H₂O DEPC q.s.p.20 µl. A reação foi incubada a 37°C por 1 hora. Adicionou-se à amostra na proporção v/v, tampão formamida, incubou-se a 96°C por 2 minutos seguido de gelo; a amostra foi aplicada em Gel Page 5% - 7M Uréia (eletroforese realizada por 50 minutos, 800 V) e o gel foi exposto ao *PHosphor screen* (expositor capaz de capturar a radiação do gel) para análise no Typhoon (GE Healthcare). Posteriormente o pré-mRNA foi eluído do gel com o tampão de extração (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 300 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,1% SDS), extraído com fenol/clorofórmio/isoamilálcool e precipitado com etanol 100%. A

amostra foi quantificada e armazenada a -80°C na forma de pellet em etanol 100%.

3.7.1. Incorporação de radiação no marcador de peso molecular

O marcador de peso molecular pBR322 DNA-*MspI* Digest (BioLabs), foi utilizado nas análises por eletroforese em Gel Page - 7M Uréia e foi marcado com radiação seguindo-se as especificações do fabricante da enzima T4 Polynucleotide Kinase-T4 PNK (Fermentas); o oligonucleotideo radioativo usado foi “Adenosine 5’-TrypHospHate”, [$g^{-32}P$]-; 6000 Ci/mmol (Perkin Elmer).

3.8. Reação de “*trans-splicing in vitro*”

A reação de “*trans-splicing in vitro*” considerada padrão neste estudo foi feita nas seguintes condições: 2 mM $MgCl_2$; 0,02 M creatin-fosfato; 0,52 mM ATP; 40% extrato nuclear; 400 ng pré-mRNA marcado radioativamente, H_2O DEPC q.s.p.25 μ l. Incubou-se a reação por 1 hora e 30 minutos, a 25°C com extrato nuclear de *T. brucei* e a 28°C com extrato nuclear de *T. cruzi*, adicionando-se, em seguida 2 μ l de proteinase K [20 mg/ml]; 10 μ l SDS 10% e 63 μ l de água DEPC, incubando por 15 minutos a 37°C. Os RNAs foram extraídos com fenol/clorofórmio/isoamilálcool, precipitados com etanol absoluto, adicionando às amostras, na proporção v/v, tampão formamida, aquecendo-se a 96°C por 2 minutos seguido de gelo e aplicou-se em Gel Page 10% - 7M Uréia (eletroforese realizada por 3 horas, 400V). Posteriormente, o gel foi exposto no *PHospHor screen* para análise no Typhoon (GE Healthcare). Como controle em todas as reações de “*trans-splicing in vitro*”, utilizou-se 400 ng pré-mRNA alfa tubulina marcado radiotivamente; H_2O DEPC q.s.p.25 μ l e 2 mM $MgCl_2$ sem adição de extratos nucleares; este controle foi submetido ao mesmo procedimento descrito acima.

A reação de “*trans-splicing*” é dependente de ATP, portanto com o intuito de averiguar a presença de ATP endógeno no extrato nuclear, a reação foi preparada

sem a adição de ATP e creatin-fosfato e os demais reagentes foram adicionados nas mesmas concentrações já descritas ajustando-se a H₂O DEPC q.s.p.25 µl.

Para averiguar os requerimentos necessários para a reação, alguns testes foram realizados nas seguintes condições:

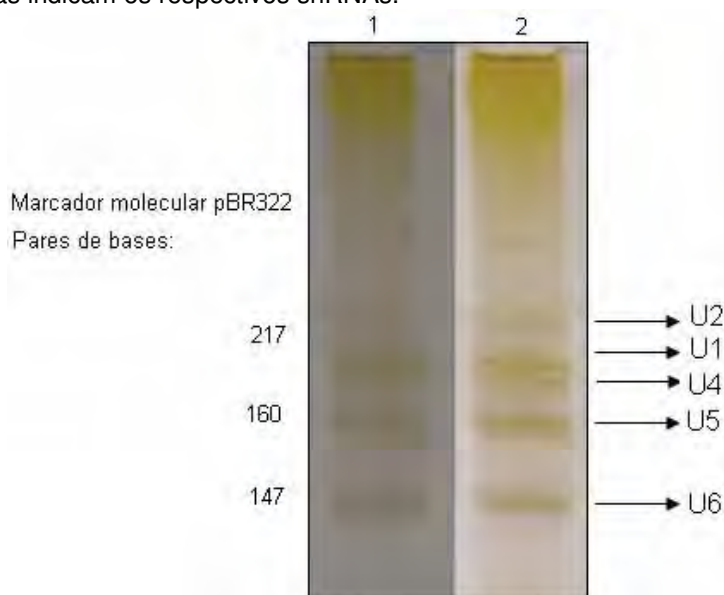
1. Reação com apenas 10% de extrato nuclear, os demais reagentes foram adicionados nas mesmas concentrações já descritas ajustando-se a H₂O DEPC q.s.p.25 µl;
2. Diferentes concentrações de magnésio foram usadas na reação: 0 mM; 1 mM e 3 mM, sendo os demais reagentes adicionados nas mesmas concentrações anteriormente mencionadas, como controle foram realizadas as reações de “*trans-splicing*” com e sem ATP e concentração de magnésio 2 mM (conforme apresentado anteriormente);
3. Como a reação de “*trans-splicing*” é dependente da formação do complexo *trans-spliceossomo* contendo ribonucleoproteínas e outros co-fatores, alguns deles termolábeis, e que protegem o RNA de degradação, um teste foi realizado aquecendo-se os extratos nucleares a 56°C por 30 minutos antes da reação de “*trans-splicing*” propriamente dita;
4. A reação de “*trans-splicing*” foi também avaliada em função do tempo de incubação: 0, 15, 30, 40, 60 e 90 minutos.

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 materiais e métodos. A diferença de molaridade dos tampões C e D descritos no protocolo viabilizaram a extração das ribonucleoproteínas (snRNPs) e demais proteínas e co-fatores do *trans*-spliceossomo presentes no núcleo da célula, que após a fenolização dos extratos nucleares, confirmou a integridade dos snRNAs analisada por eletroforese em PAGE10% - 7M uréia (figura 15); as bandas referentes aos snRNAs (U1, U2, U4, U5 e U6) foram identificadas no gel conforme metodologia descrita por Vianna et. al., (2001) ⁽⁵⁹⁾ e revisada por Ambrosio et. al. (2007) ⁽⁶⁰⁾. A confirmação da integridade dos snRNAs atesta a integridade das ribinucleoproteínas, essenciais para a capacidade catalítica do spliceossomo (anteriormente descrito).

Figura 15 - Gel page10% - 7M uréia corado com solução de prata; 1. Extrato nuclear fenolizado de *T. cruzi*; 2. Extrato nuclear fenolizado de *T. brucei*; Marcador molecular pBR322 DNA-*MspI* Digest (BioLabs). As setas indicam os respectivos snRNAs.



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

4.2. Obtenção da sequência parcial de alfa tubulina de *T. cruzi* codificadora do pré-mRNA escolhido como aceptor da reação de “*trans-splicing in vitro*”

Como descrito nos materiais e métodos, a sequência parcial de alfa tubulina de *T. cruzi* (figura 12) foi amplificada por PCR a partir do DNA genômico total de *T. cruzi*, onde foi posteriormente ligada ao vetor pGEM-T Easy Vector e transformados em bactérias DH5 α competentes. Após a reação de transformação, a confirmação da presença do inserto foi realizada através de PCR de colônia (figura 16), onde se observou em gel de agarose 1% a presença de bandas de aproximadamente 648 pb (274 pb do vetor + 374 pb do inserto) referentes aos insertos clonados, indicando colônias positivas. O posterior isolamento do DNA plasmídico destas bactérias e a reação de sequenciamento dos plasmídios confirmaram que as bactérias DH5 α competentes foram transformadas com sucesso.

Figura 16 - Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio; 1. Marcador molecular O'GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder Plus (#SM1343) - Fermentas; 2 a 7. Produtos de PCR de colônia da reação de clonagem com a sequência parcial de alfa tubulina de *T. cruzi* de 648 pb (274 pb do vetor + 374 pb do inserto).



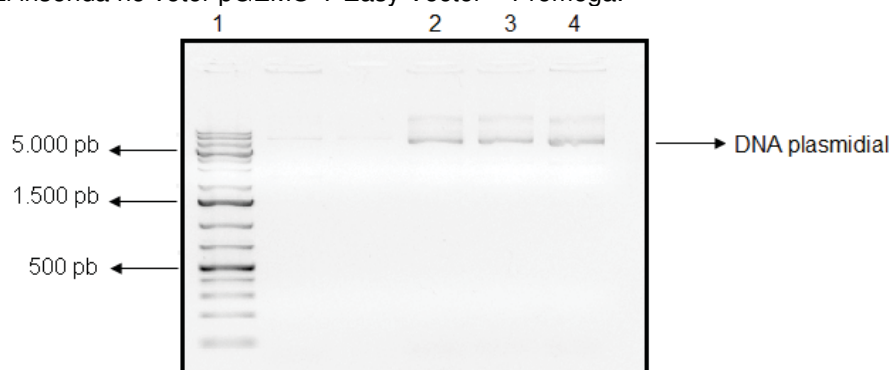
Fonte: Figura elaborada pelo autor.

4.3. Extração do DNA plasmídico das bactérias transformadas, sequenciamento dos plasmídios e preparo dos plasmídios para reação de transcrição.

4.3.1. Extração do DNA Plasmidial

A extração do DNA pasmidial das bactérias transformadas foi realizada conforme descrito em materiais e métodos e as bandas referentes aos plasmídios isolados foram observadas em gel de agarose 1 % como ilustrado na figura 17.

Figura 17 - Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio; 1. Marcador molecular O'GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder Plus (#SM1343) - Fermentas; 2 a 4. Bandas referentes ao DNA plasmidial extraído das bactérias transformadas com a sequência parcial de alfa tubulina de *T. cruzi* inserida no vetor pGEM®-T Easy Vector – Promega.



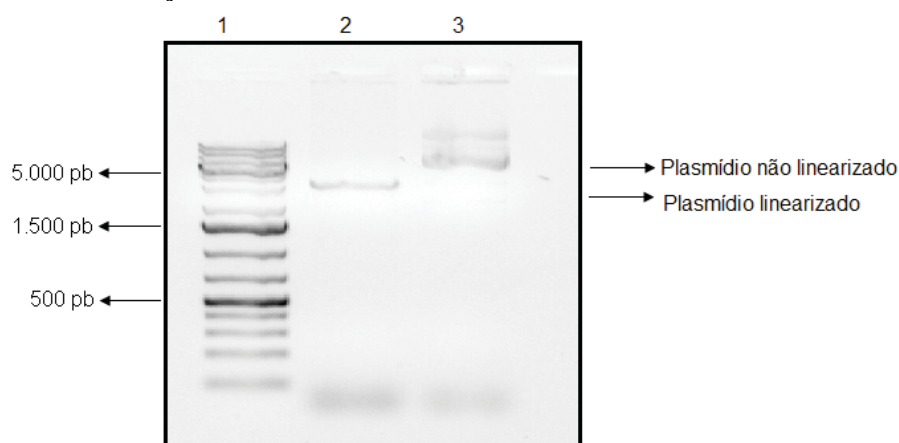
Fonte: Figura elaborada pelo autor.

4.3.2. Linearização dos plasmídios

A reação de linearização do plasmidio alfa tubulina foi realizada com a enzima de restrição *Pst*I (Fermentas); escolheu-se esta enzima pois o vetor pGEM®-T Easy Vector – Promega possui em sua sequência o sítio de restrição da enzima (demonstrado na figura 14) e na sequência do inserto alfa tubulina de *T. cruzi* (figura 12) inserida no vetor não existe o mesmo sítio de restrição; portanto, o plasmídio foi digerido em apenas uma região da sequência, garantindo a linearização do plasmídio sem fragmentá-lo. 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 18) demonstrou a presença de uma única banda de 3.389 pb (3015 pb do vetor + 374 pb do inserto) confirmando a linearização do plasmídio.

Figura 18 - Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio; 1. Marcador molecular O'GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder Plus (#SM1343) - Fermentas; 2. Banda referente ao plasmídio linearizado de aproximadamente 3.389 pb (3015 pb do vetor + 374 pb do inserto); 3. Plasmídio não linearizado controle da reação.

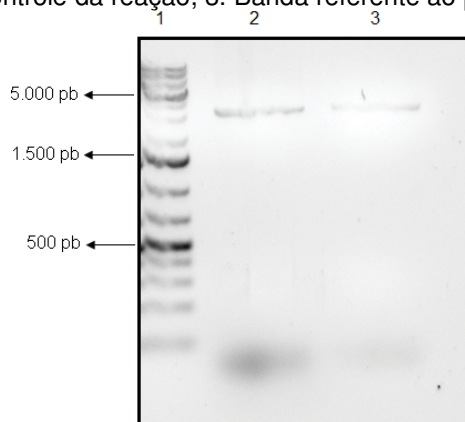


Fonte: Figura elaborada pelo autor.

4.3.3. Purificação dos plasmídios linearizados

Os plasmídios linearizados foram purificados para viabilizar a reação de transcrição. A análise da reação de purificação realizada por eletroforese em gel de agarose 1% esta representada na figura 19.

Figura 19 - Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio; 1. Marcador molecular O'GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder Plus (#SM1343) - Fermentas; 2. Banda referente ao plasmídio linearizado não purificado controle da reação; 3. Banda referente ao plasmídio purificado.



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

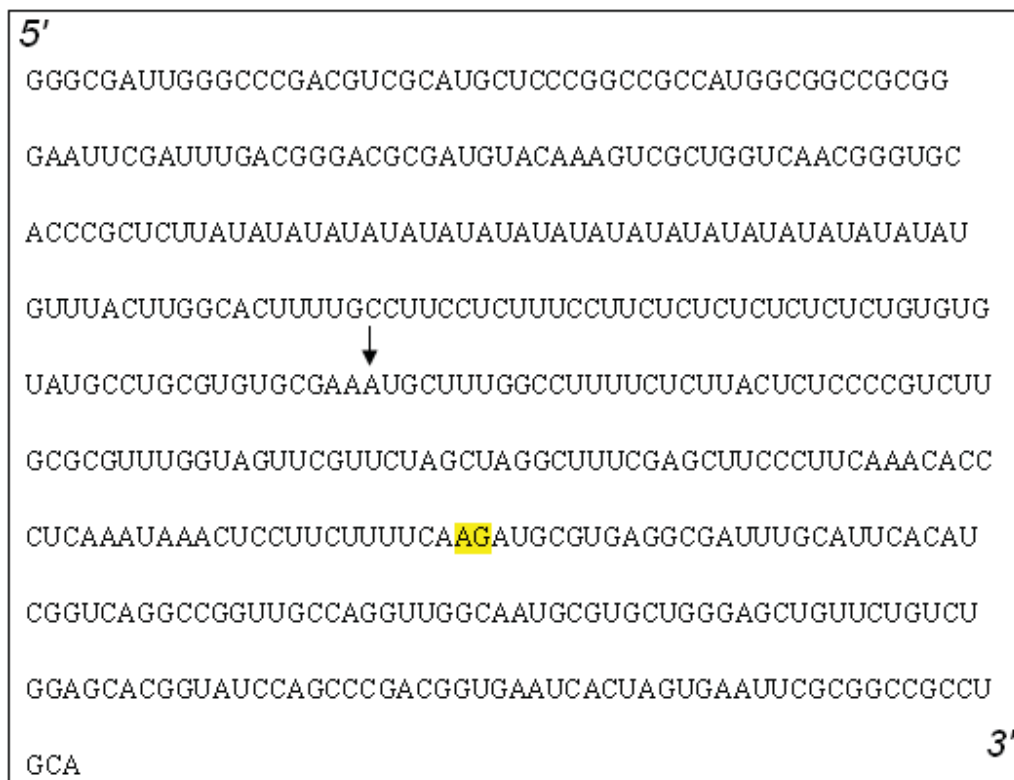
4.3.4. Reação de Sequenciamento do plasmídio alfa tubulina de *T. cruzi*

A reação de sequenciamento do plasmídio alfa tubulina de *T. cruzi* confirmou a clonagem do inserto e a obtenção da sequência também possibilitou a localização correta da sequência promotora da enzima T7 RNA Polimerase, como também do sítio de restrição da enzima *Pst*I presentes no vetor pGEM®-T Easy Vector (Promega). A localização destas sequências possibilitou a construção, através da bioinformática, do provável transcrito primário a ser sintetizado na reação de transcrição com a enzima T7 RNA polimerase. A figura 20 demonstra a sequência do plasmídio, está assinalado na figura o nucleotídeo referente ao início da transcrição e o local que termina a síntese do pré-mRNA, uma vez que o plasmídio foi linearizado com a enzima de digestão *Pst*I antes da reação de transcrição, conforme anteriormente referido.

5' **TGTAATACGACTCACTATAGGG**CGATTGGGCCCACGTCGCATGCTCCCGG
Promotor T7 RNA Polimerase
 CCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTTCGATT (TGACGGGACGCGATGTACAA
 AGTCGCTGGTCAACGGGTGCACCCGCTCTTATATATATATATATATATATAT
 ATATATATATATATATGTTTACTTGGCACTTTTGCCTTCCTCTTTCTCTCTCT
 CTCTCTCTGTGTGATGCCTGCGTGTGCGAAATGCTTTGGCCTTTTCTCTTAC
 TCTCCCCGTCTTGC GCGTTTGGTAGTTCGTTCTAGCTAGGCTTTCGAGCTTCC
 CTTCAAACACCCTCAAATAAACTCCTTCTTTTCAAGATGCGTGAGGCGATTTG
 CATTACATCGGTCAGGCCGGTTGCCAGGTGGCAATGCGTGCTGGGAGCT
 GTTCTGTCTGGAGCACGGTATCCAGCCCGACGGTG) AATCACTAGTGAATT
 ↓
 CGCGGCCGCGCTG**CA**GGTTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATG
PstI
 CATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTC
 ATAGCTGT TTCCTGTGTG AAATTGTTAT 3'

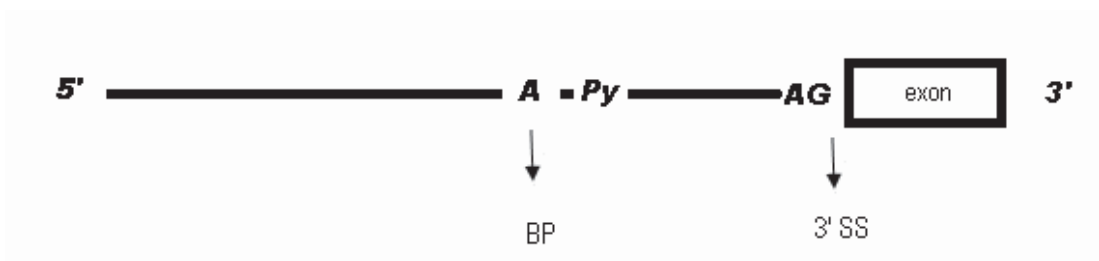
Após a análise do sequenciamento do plasmídio alfa tubulina de *T. cruzi*, foi possível construir, com o auxílio do programa computacional Gene Runner, a provável sequência do pré-mRNA resultante da reação de transcrição com a enzima T7 RNA Polimerase; a sequência de RNA obtida possui 463 pb e está representada na figura 21; este pré-mRNA alfa tubulina, escolhido como aceptor da reação de “*trans*-splicing *in vitro*”, portanto contém em sua sequência todos os sinalizadores da reação de “*trans*-splicing”. A figura 22 ilustra os sinalizadores presentes na sequência do pré-mRNA alfa tubulina.

Figura 21 - Representação esquemática da sequência do pré-mRNA alfa tubulina provida da reação de transcrição. As bases “AG” em destaque demarcam o fim da região não codificadora (*íntron*), a sequência consecutiva restante corresponde à região codificadora de polipeptídios (*éxon*); a seta indica a base “A” referente ao “branch point”.



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

Figura 22 - Representação esquemática do Pré-mRNA alfa tubulina aceptor 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).

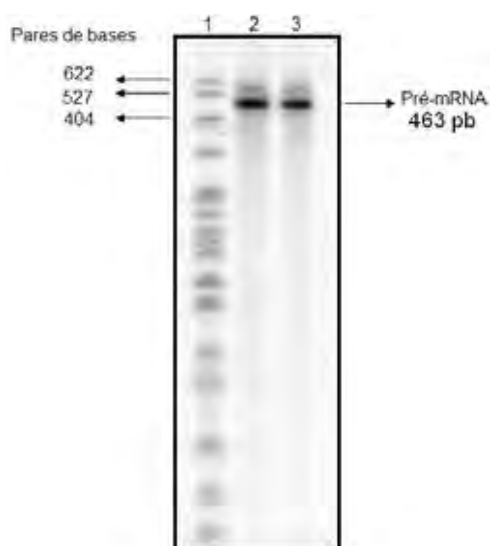


Fonte: Figura elaborada pelo autor.

4.4. Reação de transcrição

A reação de transcrição radioativa feita com a enzima T7 RNA polimerase e o plasmídio alfa tubulina previamente linearizado com a enzima de restrição *Pst*I foi analisada por eletroforese em Gel Page 5% - 7M Uréia e posteriormente o gel foi exposto no *PHosphor screen* para análise no Typhoon (GE Healthcare), onde se observou a presença de uma banda de aproximadamente 463 pb (figura 23), confirmando a síntese do transcrito primário esperado; a banda foi eluída do gel, quantificada e armazenada a – 80 °C.

Figura 23 - Gel Page 5% - 7M Uréia exposto ao *PHosphor screen* e analisado no Typhoon (GE Healthcare); 1. Marcador Molecular pBR322 DNA-*Msp*I Digest (BioLabs); 2 e 3; Bandas referentes ao pré-mRNA alfa tubulina de 463 pb.



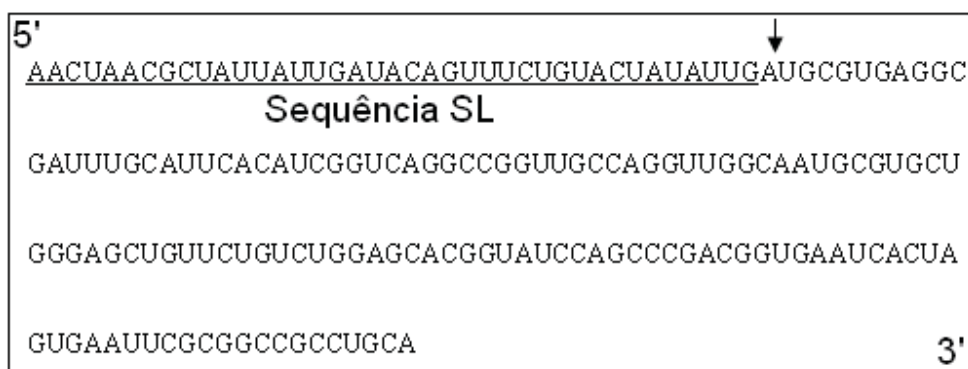
Fonte: Figura elaborada pelo autor.

4.5. Reações de *tras-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 codificadora de 39 nucleotídeos, liga-se ao transcrito primário no AG da região 5’; portanto, com o auxílio do programa computacional Gene Runner, foi possível construir a sequência do mRNA alfa tubulina maduro (figura 24) de 171 pb (39 pb referentes à sequência SL + 132 pb referentes ao éxon alfa tubulina); o número de acesso no GenBank da sequência SL é AF506368.1.

Figura 24 - Representação esquemática da sequência do mRNA alfa tubulina maduro 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 primeiras bases “AU” do éxon. Tamanho: 171 pb (39 pb referentes a sequência SL + 132 pb referentes ao éxon alfa tubulina) do mRNA maduro.

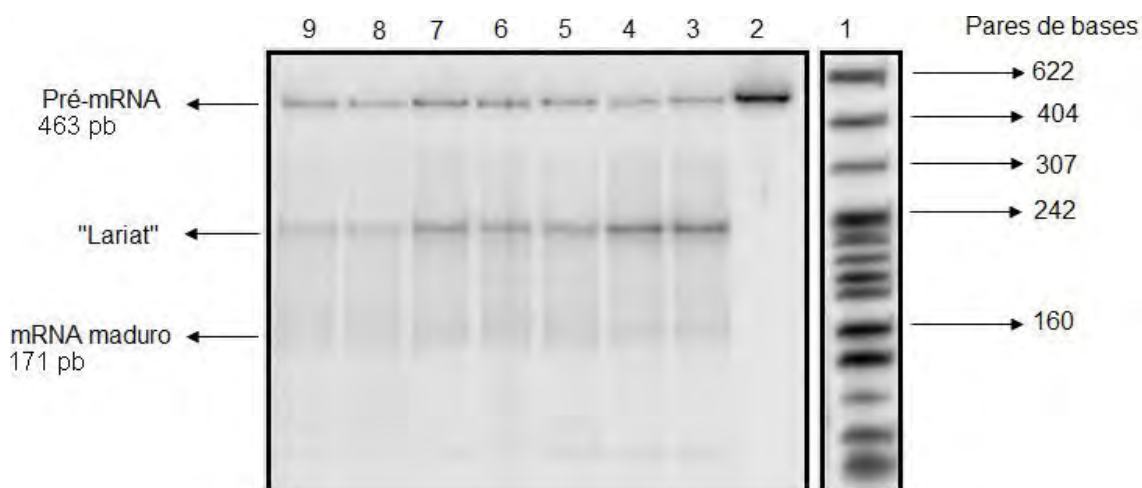


Fonte: Figura elaborada pelo autor.

4.5.2. Reações de “*trans-splicing in vitro*” com extrato nuclear de *T. cruzi*

As várias reações de “*trans-splicing in vitro*” realizadas com extrato nuclear de *T. cruzi* estão apresentadas nas figuras 25 e 26. A figura 25 apresenta os resultados dos testes realizados para averiguar os requerimentos necessários para a reação com extrato nuclear de *T. cruzi*, como também a reação padrão usada neste estudo.

Figura 25 - Gel Page 10% - 7M Uréia exposto ao *PHosphor screen* e analisado no Typhoon (GE Healthcare). 1. Marcador Molecular pBR322 DNA-*MspI* Digest (BioLabs); 2. RNA controle (400 ng pré-mRNA + 2 mM $MgCl_2$) submetido as mesmas condições das reações de “*trans-splicing in vitro*”. Reações de “*trans-splicing in vitro*” com 40% extrato nuclear de *T. cruzi*: 3 e 4. Extrato pré-aquecido (56°C por 30 minutos), sem e com ATP, respectivamente; 5 e 6. Reações com 2 mM $MgCl_2$, sem e com ATP, respectivamente; 7 a 9. Reações com ATP, 3 mM, 1 mM e 0 mM de $MgCl_2$, respectivamente. Detalhes da reação em materiais e métodos. Estão indicados na figura os produtos das reações: o pré-mRNA alfa tubulina (não processado), o “lariat” e o mRNA alfa tubulina maduro.



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

As reações de “*trans-splicing in vitro*” com 40% de extrato nuclear de *T. cruzi* realizadas com diferentes concentrações de $MgCl_2$ (figura 25, colunas 5; 6; 7; 8 e 9) demonstraram que na ausência de $MgCl_2$ e 1 mM, o processamento do mRNA praticamente não ocorreu; reações com 2 mM, 3 mM $MgCl_2$ o processamento do mRNA foi mais evidente (“lariat” e mRNA maduro), demonstrando, como esperado, a necessidade de $MgCl_2$ na reação, sendo a concentração de 2 mM a escolhida para a realização dos experimentos.

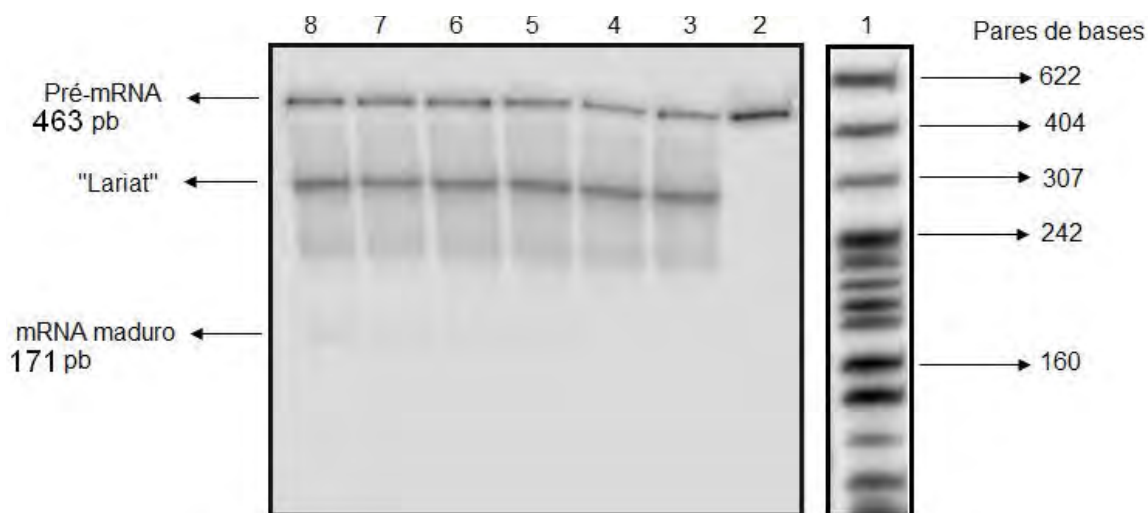
A reação na ausência de ATP (figura 25, coluna 5), mostrou processamento do pré-mRNA similar a da reação com 0,52 mM ATP (figura 25, coluna 6), possivelmente pela presença de ATP endógeno no extrato nuclear.

As reações realizadas com extrato nuclear pré-aquecido a 56°C por 30 minutos (figura 25, colunas 3 e 4) também apresentaram processamento do mRNA com maior concentração (primeira reação de esterificação). Esse resultado demonstrou de modo inesperado que o extrato nuclear de *T. cruzi* manteve-se ativo mesmo após o tratamento. Isso indica que parte do *trans-spliceossomo*

resistiu ao aquecimento. Entretanto, a diferença na concentração de banda do “lariat” sugere que o processamento do pré-mRNA ocorreu principalmente na primeira reação de esterificação, indicando que o aquecimento do extrato, denaturou proteínas do complexo “pós-splicing” (vide figura 8 para melhor entendimento). A banda indicada na figura 25 como “lariat” (estrutura intermediária da reação) não pode ser determinada em pares de bases por comparação com o marcador molecular, pois sua estrutura em forma de “Y” pode ter migração anômala no gel de eletroforese. A banda referente ao mRNA maduro pode ser melhor observada na figura 26.

A figura 26 apresenta o resultado da reação de “*trans-splicing in vitro*” com extrato nuclear de *T. cruzi* avaliada em relação ao tempo de incubação.

Figura 26 - Gel Page 10% - 7M Uréia exposto ao *PHosphor screen* e analisado no Typhoon (GE Healthcare). 1. Marcador Molecular pBR322 DNA-*MspI* Digest (BioLabs); 2. RNA controle (400 ng pré-mRNA e 2 mM MgCl₂) submetido às mesmas condições das reações de “*trans-splicing in vitro*”. Reações de “*trans-splicing in vitro*” com 40% de extrato nuclear de *T. cruzi* em diferentes tempos de incubação: 3. 15 minutos; 4. 30 minutos; 5. 45 minutos; 6. 60 minutos; 7 e 8. 90 minutos, com e sem ATP, respectivamente. Estão indicados na figura os produtos das reações: o pré-mRNA alfa tubulina não processado, o “lariat” e o mRNA alfa tubulina maduro.



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

Observa-se um nítido aumento da concentração do produto da reação (mRNA maduro) em função do tempo de incubação, o que sugere que o pré-

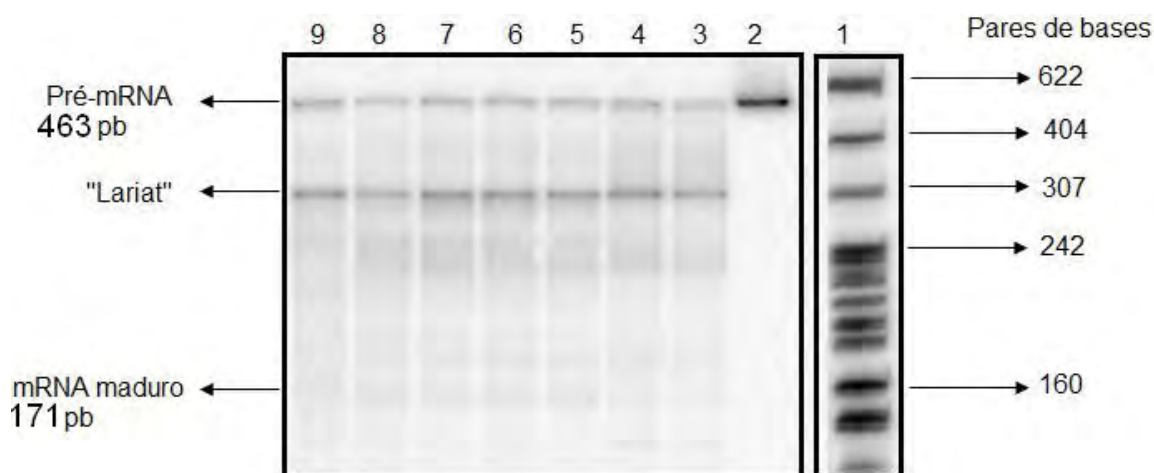
mRNA está sendo processado pelo extrato. O aparecimento do produto mRNA maduro na reação parece ocorrer aos 45 minutos de incubação (figura 26, coluna 5). O tempo de 90 minutos foi estabelecido com base nos protocolos de “*trans-splicing*” com células HeLa. Interessante observar que, como já apresentado anteriormente, o ATP endógeno não parece atuar antes do tempo mínimo de 45 minutos, mas está presente no extrato nuclear, promovendo a primeira reação de esterificação aos 15 minutos (e possivelmente antes desse período). Entretanto, a segunda reação, que promove a formação do mRNA maduro, tarda um tempo maior para ocorrer.

4.5.3. Reações de “*trans-splicing in vitro*” com extrato nuclear de *T. brucei*

As varias reações de “*trans-splicing in vitro*” realizadas com extrato nuclear de *T. brucei* estão apresentadas nas figuras 27 e 28.

A figura 27 apresenta os resultados dos testes realizados para averiguar os requerimentos necessários da reação, como também a reação padrão usada neste estudo.

Figura 27 - Gel Page 10% - 7M Uréia exposto ao *PHosphor screen* e analisado no Typhoon (GE Healthcare). 1. Marcador Molecular pBR322 DNA-*MspI* Digest (BioLabs); 2. RNA controle (400 ng pré-mRNA + 2 mM $MgCl_2$) submetido as mesmas condições das reações de “*trans-splicing in vitro*”. Reações de “*trans-splicing in vitro*” com 40% extrato nuclear de *T. brucei*: 3 e 4. Extrato pré-aquecido (56°C por 30 minutos), sem e com ATP, respectivamente; 5 e 6. Reações com 2 mM $MgCl_2$, sem e com ATP, respectivamente; 7 a 9. Reações com ATP, 3 mM, 1 mM e 0 mM de $MgCl_2$, respectivamente. Detalhes da reação em materiais e métodos. Estão indicados na figura os produtos das reações: o pré-mRNA alfa tubulina (não processado), o “lariat” e o mRNA alfa tubulina maduro.



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

As reações de “*trans-splicing in vitro*” com extrato nuclear de *T. brucei* utilizando diferentes concentrações de $MgCl_2$ (figura 27, colunas 5; 6; 7; 8 e 9) demonstraram que na ausência de $MgCl_2$ e com 1 mM, o processamento do mRNA praticamente não ocorreu; embora com 1 mM já seja possível a visualização do mRNA maduro (figura 27, coluna 8); as reações com 2 mM e 3 mM de $MgCl_2$ demonstram o processamento do mRNA, confirmando como esperado, que a reação é dependente de $MgCl_2$. As reações com 2 mM de $MgCl_2$ apresentaram processamento dos seus mRNAs mais evidente que a reação com 3 mM $MgCl_2$ (presença do mRNA maduro) e, portanto, foi estabelecida a concentração de 2 mM como a concentração ideal.

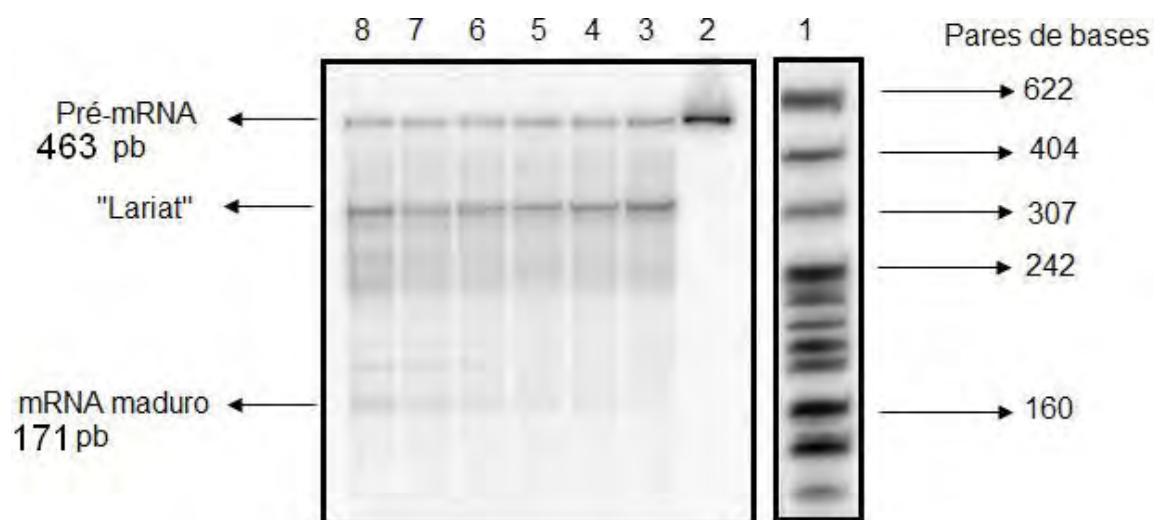
A reação controle realizada sem ATP (figura 27, coluna 5), apresentou processamento do mRNA similar a reação com 0,52 mM de ATP (figura 27, coluna 6), evidenciando a presença de ATP endógeno no extrato nuclear de *T. brucei*, semelhante ao que ocorreu com o extrato nuclear de *T. cruzi*.

Para avaliar o requerimento de $MgCl_2$ apresentaram os mesmos resultados para ambos os extratos nucleares de *T. cruzi* e *T. brucei*; isso não foi surpreendente, devido a similaridade entre os parasitos. Interessante notar também que a banda do mRNA maduro está mais evidente na reação com extrato nuclear de *T. brucei*, embora o pré-mRNA (alfa tubulina) tenha sido clonado a partir da sequência de *T. cruzi*.

As reações de “*trans*-splicing *in vitro*” realizadas com extrato nuclear de *T. brucei* pré-aquecido a 56°C por 30 minutos (figura 27, colunas 3 e 4) não apresentaram processamento total do mRNA, ou seja, similar ao que ocorreu com os experimentos com *T. cruzi*, apenas ocorreu a primeira reação de esterificação (forma do “lariat”), indicando que o aquecimento do extrato, denaturou proteínas do complexo “pós-splicing” (vide figura 8 para melhor entendimento).

A figura 28 apresenta o resultado da reação de “*trans*-splicing *in vitro*” com extrato nuclear de *T. brucei* analisada em relação ao tempo de incubação.

Figura 28 : Gel Page 10% - 7M Uréia exposto ao *PHosphor screen* e analisado no Typhoon (GE Healthcare). 1. Marcador Molecular pBR322 DNA-*MspI* Digest (BioLabs); 2. RNA controle (400 ng pré-mRNA e 2 mM MgCl₂) submetido às mesmas condições das reações de “*trans-splicing in vitro*”. Reações de “*trans-splicing in vitro*” com 40% de extrato nuclear de *T. brucei* em diferentes tempos de incubação: 3. 15 minutos; 4. 30 minutos; 5. 45 minutos; 6. 60 minutos; 7 e 8. 90 minutos, com e sem ATP, respectivamente. Estão indicados na figura os produtos das reações: o pré-mRNA alfa tubulina não processado, o “lariat” e o mRNA alfa tubulina maduro.



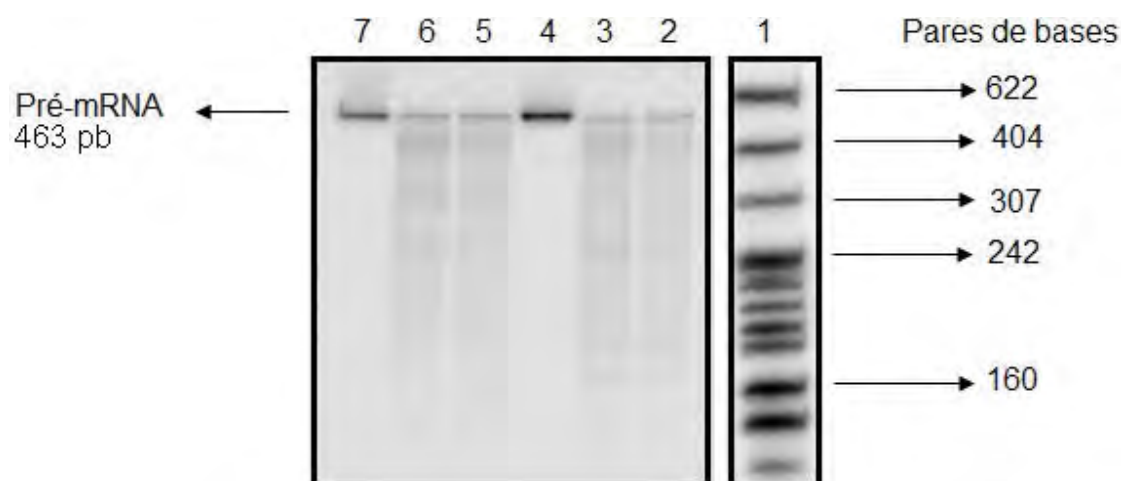
Fonte: Figura elaborada pelo autor

Observa-se na reação um nítido aumento da concentração do produto da reação (mRNA maduro) em função do tempo de incubação, o que sugere que o pré-mRNA está sendo processado pelo extrato de *T. brucei*. O aparecimento do produto mRNA maduro na reação parece iniciar-se já aos 15 minutos de incubação (figura 28, coluna 3), atingindo seu máximo com 90 minutos (figura 28, colunas 7 e 8), em que o produto (mRNA maduro) vai se acumulando. Análogo ao resultado observado para *T. cruzi*, na reação com *T. brucei* o ATP endógeno também está presente no extrato, sendo que neste último caso a banda de mRNA pode ser melhor visualizada (figura 28, coluna 8). Especula-se se há a real necessidade de adicionar ATP à reação de “*trans-splicing in vitro*” nestes modelos, uma vez que o ATP endógeno presente no extrato parece suficiente para o processamento completo do pré-mRNA.

4.5.4. Reações de “*trans*-splicing *in vitro*” com 10% de extrato nuclear

As reações realizadas com apenas 10% de extrato nuclear (*T. cruzi* e *T. brucei*) estão apresentadas na (figura 29), com o intuito de verificar a dependência da concentração do extrato nuclear na reação de “*trans*-splicing *in vitro*”

Figura 29 - Gel Page 10% - 7M Uréia exposto ao *PHosphor screen* e analisado no Typhoon (GE Healthcare). 1. Marcador Molecular pBR322 DNA-*MspI* Digest (BioLabs); 2 e 3. Reações de “*trans*-splicing *in vitro*” com 10% de extrato nuclear de *T. cruzi* sem e com ATP, respectivamente; 4. RNA controle (400 ng pré-mRNA e 2 mM MgCl₂) submetido às mesmas condições das reações de “*trans*-splicing *in vitro*” com extrato nuclear de *T. cruzi*; 5 e 6. Reações de “*trans*-splicing *in vitro*” com 10% de extrato nuclear de *T. brucei* sem e com ATP, respectivamente; 7. RNA controle (400 ng pré-mRNA e 2 mM MgCl₂) submetido às mesmas condições das reações de “*trans*-splicing *in vitro*” com extrato nuclear de *T. brucei*. Detalhes da reação em materiais e métodos.



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

As reações realizadas com 10 % de extrato nuclear (*T. cruzi* e *T. brucei*) não processaram o mRNA , observando-se a degradação do pré-mRNA quando comparado ao controle; este resultado evidencia que, análogo ao que ocorre com “ *cis*-splicing *in vitro*” com células de mamíferos, a reação de “*trans*-splicing” com tripanosomas necessita de 40% de extrato nuclear para o processamento do pré-mRNA. Este resultado, portanto, confirma o estabelecimento das condições experimentais necessárias para a reação de “*trans*-splicing *in vitro*” de tripanosomas utilizando extratos livres de células.

4.6. Comparação entre as reações com *T.cruzi* e *T.brucei*

Conforme apresentado anteriormente, as reações de “*trans-splicing in vitro*” realizadas com os extratos nucleares de *T. cruzi* e *T. brucei* mostraram-se dependentes dos mesmos reagentes adicionados nas mesmas concentrações. A diferença principal observada foi na temperatura de incubação, 25°C para *T. cruzi* e 28 °C para *T. brucei*.

A concentração de MgCl₂ estabelecida como ideal para a reação com ambos os parasitos foi de 2 mM, e a presença do ATP endógeno ficou evidente em ambos os extratos nucleares, sugerindo que não há necessidade de ATP externo para a reação ocorrer “*in vitro*”.

O extrato nuclear de *T. cruzi* mostrou-se mais resistente ao pré-aquecimento do que o extrato nuclear de *T. brucei*, mas ambos após o aquecimento ainda conservaram a primeira reação de transesterificação, ou seja, o aquecimento interfere na formação do complexo “pós-splicing” necessário para o aparecimento do mRNA maduro.

Em relação ao tempo de incubação, as reações com *T. brucei*, apresentaram processamento do pré-mRNA mais rápido (15 minutos) do que as reações com *T. cruzi* (45 minutos), porém ambas padronizadas com tempo de incubação ideal de 90 minutos. A formação do mRNA maduro foi mais evidente com extratos de *T. brucei* do que *T. cruzi*, embora o pré-mRNA tenha sido sintetizado a partir da sequência do *T. cruzi*. Uma das explicações para isso pode ser a necessidade (maior no *T. cruzi*) de cauda de poliA na formação dos seus mRNAs maduros. Em ambos os extratos, o SL endógeno foi suficiente para a eficiência da reação.

O aparecimento de bandas inespecíficas observado nas reações não é surpreendente, e já foi relatado por outros autores ⁽⁶²⁾, onde o autor utilizou um sistema de proteção com RNase após a reação de “*trans-splicing in vitro*”, o que reduziu o aparecimento das bandas inespecíficas, selecionando as bandas de interesse ⁽⁶²⁾.

A padronização desta reação *in vitro* possibilitará avanços no entendimento da maquinaria do *trans*-spliceossomo, à semelhança do que foi observado no “*cis* e *trans*-splicing” com células HeLa, tornando-se também um modelo interessante para avaliação de mecanismo de ação de drogas tripanocidas que não interfeririam nas células do hospedeiro.

Estudos futuros ainda devem ser realizados, com o intuito de padronizar a reação em um sistema a frio, ou seja, sem o uso de material radioativo (projeto em andamento no laboratório da orientadora deste projeto).

5. Conclusões

1. Este trabalho estabeleceu os requerimentos necessários para 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* com a sequência parcial de alfa tubulina de *T. cruzi* como pré-mRNA acceptor. Como esperado, o SL RNA endógeno presentes nos extratos nucleares foi recrutado na reação com eficiência.

O uso de um sintético SL RNA não foi proposto neste trabalho devido ao seu complexo mecanismo de metilação⁽³⁹⁾.

A quantidade de pré-mRNA alfa tubulina necessária na reação deve ser superior ao SL RNA endógeno no extrato.

2. O modelo de reação proposto neste trabalho foi pioneiro, pois os extratos nucleares foram preparados de modo muito similar ao extrato nuclear de células HeLa com as modificações aqui propostas.

3. A proporção de extrato nuclear na reação não deve ser inferior à 40% como preconizado para células HeLa.

Referências

- 1 REY, L. **Parasitologia**: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- 2 McCONVILLE, M. J. et al. Secretory pathway of trypanosomatid parasites. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 66, n. 1, p. 122-54, 2002.
- 3 CHAGAS, C. Nova tripanomíase humana. Estudos sobre morfologia e o ciclo evolutivo do *Trypanosoma Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909.
- 4 BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL NETTO, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- 5 NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. São Paulo: Atheneu, 2000.
- 6 LANA, M.; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. In: NEVES D. P. **Prasitologia humana**. 10. ed. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 73-96.
- 7 CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. **Prasitologia humana e seus fundamentos gerais**. São Paulo: Atheneu, 1999. Cap. 11, p. 85-97.
- 8 CHAGAS, C. A new human disease. Summary of etiological and clinical studies. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 3, p. 219-275, 1911.
- 9 TEIXEIRA, A. R. L. et al. Chagas disease. **Postgrad. Med. J.**, v. 82, p. 788-798, 2006.
- 10 SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. **Mem. do Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 75-85, 2007. Supl. 1.
- 11 INSTITUTO OSWALDO CRUZ. **Centenário da descoberta da doença de Chagas**. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=631&sid=32>>. Acesso em: 24 ago. 2009.
- 12 PRATA, A. Chaga's disease. **Infec. Dis. Clin. North America**, v. 8, p. 61-76, 1994.
- 13 COURA, R. J.; CASTRO, S. L. de. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002.

- 14 COX, F. E. G. History of sleeping sickness (African trypanosomiasis). **Infect. Dis. Clin. of North Am.**, v. 18, p. 231-245, 2004.
- 15 KIRCHHOFF, L. V. et al. Trypanosomes. In: SCHAECHTER, M. **Encyclopedia of Microbiology**. 3rd ed. New York: Academic Press, 2009. p. 744-757.
- 16 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **African trypanosomiasis (sleeping sickness)** 2010. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/>>. Acesso em: 14 fev. 2011.
- 17 KENNEDY, P. G. E. Human African trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges. **J. Clin. Invest.**, v. 113, p. 496-504, 2004.
- 18 FRANCO DA SILVEIRA, J. et al. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- 19 FALASCA, C. A. et al. Chronic myocardial damage in experimental *Trypanosoma. cruzi* infection of a new world primate, *Cebus* sp monkey. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 32, n.3, p. 151-161, 1990.
- 20 LIANG, X. et al. Trans and cis splicing in Trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. **Eukaryot. Cell**, v. 2, n. 5, p. 830-840, 2003.
- 21 MAYER, M. G.; FLOETER-WINTER, L. M. Pre-mRNA trans-splicing: from kinetoplasts to mammals, an easy language for life diversity. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 5, p. 501-513. 2005.
- 22 TYCOWSKI, K. T. et al. 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.
- 23 LAGGERBAUER, B. et al. The human U5 snRNP 52K protein (CD2BP2) 92 interacts with U5-102K (hPrp6), a U4/U6.U5 tri-snRNP bridging protein, but dissociates upon trisnRNP formation. **RNA**, v.11, n. 5, p. 598-608, 2005.
- 24 OHI, M. D. et al. Structural and functional analysis of essential pre-mRNA splicing factor Prp19p. **Mol. Cell Biol.**, v. 25, n. 1, p. 451-460, 2005.
- 25 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.
- 26 AGABIAN, N. Trans-splicing of nuclear pre-mRNAs. **Cell**, v. 61, p. 1157-1160, 1990.
- 27 MAIR, G. et al. A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. **RNA**, v. 6, p. 163-169, 2000.

- 28 ULLU, E.; TSCHUDI, C. Accurate modification of the trypanosome spliced leader cap structure in a homologous cell-free system. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 20365, 1995.
- 29 BREHM, K.; JENSEN, K.; FROSCHE, M. mRNA trans-splicing in the human parasitic cestode *Echinococcus multilocularis*. **J. of Biological Chem.**, v. 275, n. 49, p. 3811-3818, 2000.
- 30 STOVER, N. A.; STEELE, R. E. Trans-spliced leader addition to mRNAs in a cnidarian. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 98, n. 10, p. 5693-5698, 2001.
- 31 VANDENBERGHE, A. E.; MEEDEL, T. H.; HASTINGS, K. E. mRNA 5'-leader trans-splicing in the chordates. **Genes Dev.**, v.15, p. 294-303, 2001.
- 32 GANOT, P. et al. Splicedleader RNA trans-splicing in a chordate, *Oikopleura dioica*, with a compact genome. **Mol. Cell Biol.**, v. 24, p. 7795-7805, 2004.
- 33 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.
- 34 DE LANGE, T. et al. Comparison of the genes coding for the common 5' terminal sequence of messenger RNAs in three trypanosome species. **Nucleic Acids Res.**, v. 12, n. 11, p. 4431- 4443, 1984.
- 35 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.
- 36 MICHAELI, S. Trans-splicing in trypanosomes: machinery and its impact on the parasite transcriptome. **Future Microbiol.**, v. 6, n. 4, p. 459-474, 2011.
- 37 KRAUSE, M.; HIRSH, D. A trans-spliced leader sequence on actin mRNA in *C. elegans*. **Cell**, v. 49, n. 6, p. 753-761, 1987.
- 38 TESSIER, L. H. et al. Short leader sequences may be transferred from small RNAs to pre-mature mRNAs by *trans*-splicing in *Euglena*. **EMBO J.**, v.10, n. 9, p. 2621-2625, 1991.
- 39 RAJKOVIC, A. et al. A spliced leader is present on a subset of mRNAs from the human parasite *Schistosoma mansoni*. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** v. 87, n. 22, p. 8879-8883, 1990.
- 40 ZHANG, H. et al: Spliced leader RNA *trans*-splicing in dinoflagellates. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 104, n. 11, p. 4618-4623, 2007.

- 41 MANDELBOIM, M. et al. On the role of exon and intron sequences in trans-splicing utilization and cap 4 modification of the trypanosomatid *Leptomonas collosoma* SL RNA. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 38, p. 35210-35218, 2002.
- 42 LÜCKE, S. et al. Spliced leader RNA of trypanosomes: *in vivo* mutational analysis reveals extensive and distinct requirements for trans splicing and cap4 formation. **EMBO J.**, v. 15, n. 16, p. 4380-4391, 1996.
- 43 STURM, N. R.; YU, M. C.; CAMPBELL, D. A. Transcription termination and 3'-end processing of the spliced leader RNA in kinetoplastids. **Mol. Cell Biol.** v. 19, n. 2, p. 1595-1604, 1999.
- 44 MOTTRAM, J. et al. Isolation and sequence of four small nuclear U RNA genes of *Trypanosoma brucei* subsp. *brucei*: identification of the U2, U4, and U6 RNA analogs. **Mol. Cell Biol.**, v. 9, n. 3, p. 1212-1223, 1989.
- 45 TSCHUDI, C.; WILLIAMS, S. P.; ULLU, E. Conserved sequences in the U2 snRNA-encoding genes of Kinetoplastida do not include the putative branchpoint recognition region. **Gene**, v. 91, n. 1, p. 71-77, 1990.
- 46 DJIKENG, A. et al. Characterization of a candidate *Trypanosoma brucei* U1 small nuclear RNA gene. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 113, n. 1, p. 109-115, 2001.
- 47 DUNGAN, J. M.; WATKINS, K. P.; AGABIAN, N. Evidence for the presence of a small U5-like RNA in active trans-spliceosomes of *Trypanosoma brucei*. **EMBO J.**, v. 15, n. 15, p. 4016-4029, 1996.
- 48 SIEGEL, T. N. et al. Genome-wide analysis of mRNA abundance in two life-cycle stages of *Trypanosoma brucei* and identification of splicing and polyadenylation sites. **Nucleic Acids Res.**, v. 38, n. 15, p. 4946-4957, 2010.
- 49 KOLEV, N. G. The transcriptome of the human pathogen *Trypanosoma brucei* at single-nucleotide resolution. **PLoS Pathog.**, v. 6, n. 9, 2010.
- 50 NILSSON, D. et al. Spliced leader trapping reveals widespread alternative splicing patterns in the highly dynamic transcriptome of *Trypanosoma brucei*. **PLoS Pathog.**, v. 6, n. 8, 2010.
- 51 XU, Y. X.; BENSHLOMO, H.; MICHAELI, S. The U5 RNA of trypanosomes deviates from the canonical U5 RNA: the *Leptomonas collosoma* U5 RNA and its coding gene. **Proc. Natl Acad. Sci.**, v. 94, n. 16, p. 8473-8478, 1997.

- 52 XU, Y.; LIU, L.; MICHAELI, S. Functional analyses of positions across the 5' splice site of the trypanosomatid spliced leader RNA. Implications for base-pair interaction with U5 and U6 snRNAs. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 36, p. 27883-27892, 2000.
- 53 HANNON, G. J. et al. Interaction of U6 snRNA with a sequence required for function of the nematode SL RNA in *trans*-splicing. **Science**, v. 258, n. 5089, p. 1775-1780, 1992.
- 54 GÜNZL, A. The pre-mRNA splicing machinery of trypanosomes: complex or simplified? **Eukaryot. Cell**, v. 9, n. 8, p. 1159-1170, 2010.
- 55 WANG, P. et al. Sm core variation in spliceosomal small nuclear ribonucleoproteins from *Trypanosoma brucei*. **EMBO J.**, v. 25, n. 19, p. 4513-4523, 2006.
- 56 TKACZ, I. D. et al. Identification of novel snRNA-specific Sm proteins that bind selectively to U2 and U4 snRNAs in *Trypanosoma brucei*. **RNA**, v. 13, n. 1, p. 30-43, 2007.
- 57 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. 289-92, 1979.
- 58 KOVACS, S. et al. Eubacterial components similar to small nuclear ribonucleoproteins and capped RNAs in a cyanobacterium and gram-positive eubacterium. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 1871-78, 1993.
- 59 VIANNA, V. F.; AMBRÓSIO, D. L.; CICALLELLI, R. M. B. Mapeamento de bandas de *trans*-splicing *in vitro* com extratos nucleares de *Trypanosoma cruzi*. **Ver. Ciênc. Farm.**, v. 22, n. 2, p. 295-306, 2001.
- 60 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. **Mem. do Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 1, p. 97-105, 2007.
- 61 BARBOSA, C. F. et al. Rapid test for the evaluation of the activity of the prodrug hydroxymethylnitrofurazone in the processing of *Trypanosoma cruzi* messenger RNAs. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 40, n. 1, p. 33-39, 2007.
- 62 SHAKED, H. et al. Establishment of an *in vitro* *trans*-splicing system in *Trypanosoma brucei* that requires endogenous spliced leader RNA. **Nucleic Acids Res.**, v. 38, n. 10, p. 114, 2010.