

**FERNANDA CRISTINA BORINI MANSUR**

**ESTUDOS COMPARATIVOS DE TÉCNICAS DE ISOLAMENTO DE  
POLISSOMOS EM *Trypanosoma cruzi***

Monografia apresentada à disciplina Biologia Celular como requisito parcial à conclusão do Curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientação: Dr. Samuel Goldenberg, PhD

Co-orientação: Prof. Marco Randi. Ms

**CURITIBA  
2005**

Aos meus pais Fernando e Neide,  
e meu irmão Eduardo,  
com carinho.

## AGRADECIMENTOS

Na execução deste trabalho, diversas pessoas e Instituições deram suas contribuições e merecem nossos sinceros agradecimentos:

Ao diretor do Instituto de Biologia Molecular do Paraná, Doutor Samuel Goldenberg, pela orientação e pela oportunidade de estágio.

Ao Doutor Marco Aurélio Krieger, pelo apoio, paciência e oportunidade de estagiar em seu laboratório.

Ao Doutor Alejandro Correa Dominguez, que teve a idéia do projeto e que sempre esteve ao meu lado. É um prazer trabalhar com ele, que sempre está com um sorriso no rosto e disposto a ajudar, cuja alegria contagia a todos em sua volta.

À Fabíola B. Holetz que sempre me auxiliou quando precisei, principalmente nos dias de maratona de extração de RNA e gradiente.

À Tatiana Passos, à Doutora Daniela Pavoni e ao Doutor Christian Probst, pela colaboração indispensável em algumas etapas do nosso trabalho.

Às pessoas que auxiliaram na confecção do microarranjo.

Ao Nilson e Cassiano, pelo companheirismo e pelo auxílio na preparação de materiais utilizados durante o trabalho.

A todos meus amigos que fazem parte desta grande “família” que constitui o Instituto de Biologia Molecular do Paraná – IBMP.

Aos membros da banca examinadora Dra. Lucia Nan-mei Yim Leone, Juliano Bordignon e Msc. Marco Randi por fazerem parte desta etapa tão importante de minha carreira acadêmica.

Às Instituições e Programas: Universidade Federal do Paraná (UFPR), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), PRONEX, Instituto Oswaldo Cruz, Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP) pelos auxílios concedidos para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>x</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> e a Doença de Chagas.....	1
1.2 Expressão Gênica nos Tripanosomatídeos.....	4
1.3 Análise e Purificação de Polissomos.....	10
1.4 <i>Trypanosoma cruzi</i> e a Genômica Funcional.....	13
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
3.1 Reagentes.....	18
3.2 Meios de Cultura.....	19
3.3 Tampões e Soluções.....	19
3.4 Células.....	21
3.5 Isolamento de RNA total.....	21
3.6 Isolamento de polissomos – pelo método utilizado por Goldenberg <i>et al.</i> (1985).....	22
3.7 Isolamento de polissomos – pelo método utilizado por Brems <i>et al.</i> (2005).....	22
3.8 Obtenção dos perfis das frações polissomais por gradiente de sacarose.....	23
3.9 Repurificação dos RNAs.....	23
3.10 Determinação de quantidade e qualidade dos ácidos nucleicos extraídos.....	23
3.11 Hibridação competitiva em microarranjos de DNA.....	24
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
4.1 Comparações usando gradiente de sacarose.....	31
4.2 Comparações através da técnica de microarranjo.....	34
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>40</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>44</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	-	Ciclo Evolutivo do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	2
FIGURA 2	-	Distribuição Geográfica da Doença de Chagas.....	3
FIGURA 3	-	<i>Trans-splicing</i> e transcrição policistrônica em tripanosomatídeos.....	7
FIGURA 4	-	Análise por Northern blot do gene da metacicloproteína.....	10
FIGURA 5	-	Esquema de um gradiente de sacarose.....	11
FIGURA 6	-	Análise comparativa por microarranjo.....	15
FIGURA 7	-	Etapas da transcrição <i>in vitro</i> .....	25
FIGURA 8	-	Estação de hibridação.....	27
FIGURA 9	-	Representação esquemática das etapas de hibridação competitiva em microarranjos de DNA.....	29
FIGURA 10	-	Aspecto geral da lâmina do microarranjo.....	34
FIGURA 11	-	Arranjo de hibridações.....	35
FIGURA 12	-	Intensidade de fluorescência em uma seção da lâmina de microarranjo.....	35
FIGURA 13	-	Exemplo de normalização dos dados de hibridação.....	36
FIGURA 14	-	Agrupamento hierárquico das sondas numa visão geral.....	37
FIGURA 15	-	“Vista” parcial do agrupamento hierárquico das sondas.....	37
FIGURA 16	-	“Vista” parcial do agrupamento hierárquico das sondas.....	38
FIGURA 17	-	“Vista” parcial do agrupamento hierárquico das sondas.....	38
TABELA 1	-	Diferenças entre os protocolos comparados.....	30
TABELA 2	-	Contagem do número de sondas.....	39
GRÁFICO 1	-	Perfil de polissomos obtidos pelo protocolo de Goldenberg <i>et al.</i> (1985) sem adição de EDTA.....	32
GRÁFICO 2	-	Perfil de polissomos obtidos pelo protocolo de Brems <i>et al.</i> (2005) sem adição de EDTA.....	32
GRÁFICO 3	-	Perfil de polissomos obtidos pelo protocolo de Goldenberg <i>et al.</i> (1985) com adição de EDTA.....	33
GRÁFICO 4	-	Perfil de polissomos obtidos pelo protocolo de Brems <i>et al.</i> (2005) com adição de EDTA.....	33

## LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA	DNA complementar
dATP	2' - desoxiadenosina 5' - trifosfato
dCTP	2' - desoxicitosina 5' - trifosfato
dGTP	2' - desoxiguanosina 5' - trifosfato
dTTP	2' - desoxitimidina 5' - trifosfato
dUTP	2' - desoxiuracila 5' - trifosfato
dCTP-Cy3	2' - desoxicitosina 5' - trifosfato associado a cianina 3
dCTP-Cy5	2' - desoxicitosina 5' - trifosfato associado a cianina 5
DEPc	dietilpirocarbonato
DNA	ácido desoxiribonucléico
DNase	desoxiribonuclease
dNTPs	desoxiribonucleotídeos
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etileno-diamino-tetracético
g	aceleração da gravidade
HEPES	(N-[2-hidroxietil] piperazino N'-[2-ácido etanosulfônico])
kDNA	DNA do cinetoplasto
LIT	infuso de fígado e triptose ( <i>liver infusion tryptose</i> )
M	molar
mRNA	RNA mensageiro
NKM	solução contendo sódio, potássio e magnésio
nt	nucleotídeos
PCR	reação em cadeia pela polimerase
Pré-mRNA	mRNA primário
RNA	ácido ribonucléico
RNase	ribonuclease
RT	Transcriptase Reversa ( <i>Reverse Transcriptase</i> )

SDS	dodecil sulfato de sódio
SL-RNA	RNA de seqüência <i>spliced leader</i>
SSC	tampão salina-citrato ( <i>standard saline-citrate</i> )
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano

Neste texto empregamos termos estrangeiros para definir estruturas, processos moleculares, métodos, reagentes, entre outros. Mantivemos, nesses casos, sua denominação original por não existir um glossário em português para estes termos.

## RESUMO

Sabe-se que tripanosomatídeos regulam a expressão gênica essencialmente em nível pós-transcricional. Dados sugerem que a estabilidade dos mRNAs e o acesso deles aos polissomos devem ser os mecanismos envolvidos na regulação pós-transcricional. Estudos de expressão gênica em *Trypanosoma cruzi* realizados em nosso laboratório, em nível de genes individuais e genômica, têm demonstrado a importância de usar mRNAs contidos na fração polissomal. Entretanto, estudos de genômica funcional com *T. brucei*, recentemente realizados por BREMS *et al.* (2005), concluíram que não há diferenças significantes entre RNA total e polissomal quando comparados diferentes estágios de desenvolvimento. Estas observações divergentes podem ser devido a diferenças nos protocolos de obtenção de polissomos ou na confecção do microarranjo, entre outras causas. O objetivo desse trabalho é comparar os protocolos de Brems e Goldenberg usados para extração de polissomos de *Trypanosoma cruzi*. As comparações foram feitas por análises dos perfis de sedimentação dos polissomos em gradientes de sacarose e por análises de microarranjo dos mRNAs polissomais. Epimastigotas foram processados de acordo com cada protocolo para obtenção dos polissomos. As comparações dos perfis polissomais utilizando gradientes de sacarose mostraram mais semelhanças do que diferenças entre os procedimentos. Entretanto, alguns picos extras foram observados quando utilizado o protocolo de BREMS *et al.* (2005) na porção não-polissomal. Análises de microarranjo mostraram que 88% dos *spots* refletiram um padrão similar de expressão gênica entre os protocolos. As diferenças observadas devem estar contribuindo minimamente para os resultados divergentes observados nos dois laboratórios, mas não poderiam explicá-los. As similaridades observadas por BREMS *et al.* (2005) entre as duas populações de RNA podem ser devido, principalmente, a diferenças no tipo e confecção do microarranjo.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, polissomos, gradiente de sacarose, microarranjo.

## ABSTRACT

It is now known that trypanosomatids regulate gene expression mainly at the post-transcriptional level. There are data suggesting that mRNA stability and mRNA access to the polysomes might be the mechanisms involved in the post-transcriptional regulation. Gene expression studies in *T. cruzi* done in our laboratory, at the individual gene and at the genome level, have shown the importance of using the mRNA contained in the polysomal fraction. However, functional genomic studies with *T. brucei*, recently carried out by BREMS *et al.* (2005), have concluded that there are not significant differences between total and polysomal RNA when comparing distinct developmental stages. These divergent observations might be due to difference in the protocols for obtaining polysomes or in the microarray manufacturing, among other possible causes. The objective of this work was to compare Brems's and ours protocol for *T. cruzi* polysome isolation. The comparisons were done by polysome sedimentation profiling in sucrose gradients and microarray analysis of the polysomal mRNAs. Epimastigotes were processed according to each protocol to obtain polysomes. Comparison of polysome profiles using sucrose gradient showed more similarities than differences between procedures. However, some extra peaks were observed when using Brems's protocol in the non-polysomal portion of the profile. The microarray analysis showed that 88% of the spots reflect similar pattern of gene expression between protocols. The observed differences might be minimally contributing to, but they could not explain, the divergent results observed in the two laboratories. The similarities observed by BREMS *et al.* (2005) between the two populations of RNA might be mainly due to the differences in microarray type and manufacturing.

Key-words: *Trypanosoma cruzi*, polysomes, sucrose gradient, microarray.

## 1. INTRODUÇÃO

### *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas

*Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da Doença de Chagas (CHAGAS, 1909), uma doença grave que afeta milhões de pessoas na América Latina e contra a qual não existe profilaxia eficiente por vacinação ou tratamento quimioterápico efetivo.

Este parasita pertence ao reino *Protista*, sub-reino *Protozoa*, filo *Sarcomastigophora*, subfilo *Mastigophora*, classe *Zoomastigophora*, ordem *Kinetoplastidae*, subordem *Trypanosomatida*, família *Trypanosomatidae*, gênero *Trypanosoma* e espécie *Trypanosoma cruzi* (LEVINE *et al.*, 1980).

Os membros da família *Trypanosomatidae* têm em comum a presença de cinetoplasto, que representa um compartimento especializado de uma única mitocôndria e contém grande quantidade de DNA (revisto por MASLOV & SIMPSON, 1995), compartimentalização da via glicolítica em glicossomas (revisto por OPPERDOES, 1995) e ainda um único flagelo.

A posição do cinetoplasto em relação ao núcleo é um dos critérios utilizados para definir as formas evolutivas presentes na família *Trypanosomatidae* (HOARE & WALLACE, 1966). Em *T. cruzi*, nas formas epimastigotas, forma longilínea, o cinetoplasto encontra-se em posição anterior ao núcleo e, em análises ultra-estruturais, apresenta-se em forma de bastão. Nas formas tripomastigotas, o cinetoplasto localiza-se em posição posterior ao núcleo, apresenta-se de forma arredondada e os filamentos não estão firmemente empacotados. As formas amastigotas são células arredondadas com um flagelo extremamente curto e o cinetoplasto apresenta ultraestrutura semelhante à de epimastigotas (revisto por DE SOUZA, 1984; SOARES *et al.*, 1989).

*Trypanosoma cruzi* apresenta um ciclo complexo na natureza envolvendo pelo menos três estágios distintos de desenvolvimento e dois hospedeiros. As formas replicativas epimastigotas e amastigotas dos hospedeiros invertebrado e mamífero, respectivamente, alternam-se com as formas infectivas e não-proliferativas tripomastigotas metacíclicas (proveniente do inseto vetor) e tripomastigotas sanguíneas (originária do mamífero infectado) (DE SOUZA, 1984).

No tubo digestivo do inseto vetor, as formas epimastigotas multiplicam-se por fissão binária, aderem-se às porções terminais do intestino e diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicas. Durante o repasto alimentar do inseto, os tripomastigotas metacíclicos são eliminados com as fezes ou urina. Estas formas infectivas, depositadas sobre a pele, são levadas ao ferimento ou a outras portas de entrada, como, por exemplo, mucosas, quando o local da picada é coçado. A seguir, alcançam a corrente sanguínea e podem invadir uma variedade de tipos celulares. No interior das células, diferenciam-se nas formas amastigotas e multiplicam-se. Então, mais uma vez diferenciam-se, agora nas formas tripomastigotas sanguíneas, que rompem as células hospedeiras e ganham novamente a corrente sanguínea. Estes tripomastigotas sanguíneos podem infectar novas células ou serem ingeridas pelo inseto durante sua alimentação, fechando o ciclo (figura 1).

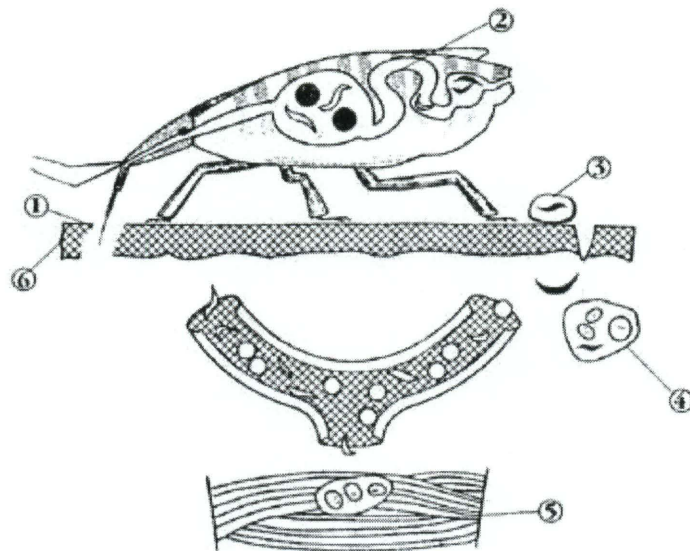


Figura 1 – Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi* (Fonte: CHAGAS, 1909). 1 – Descontinuidade da pele causada pela picada do barbeiro durante repasto sanguíneo. 2 – Intestino do barbeiro. 3 – Fezes com formas tripomastigotas metacíclicas infectivas. 4 – Formas tripomastigota metacíclicas intracelular em hospedeiro mamífero. 5 – Células musculares infectadas com formas amastigotas intracelulares replicativas. 6 – Tecido epitelial do hospedeiro mamífero.

Os vetores do *T. cruzi* são insetos hematófagos da ordem Hemíptera, família *Reduviidae*, subfamília *Triatominae*. Os triatomíneos são conhecidos como “barbeiros”, entre outros nomes

vulgares. Os gêneros de maior importância epidemiológica são *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* (SHERLOCK, 2000; GARCIA e AZAMBUJA, 2000). Entre os hospedeiros definitivos do *T. cruzi* estão mamíferos de pequeno e médio portes, tais como roedores e marsupiais, além de alguns carnívoros e do homem (DIAS, 2000).

A transmissão do parasita pode ainda ser efetuada através de transfusão sanguínea e, com menor frequência, via transmissão congênita (com casos de transmissão congênita na segunda geração – SCHENONE *et al.*, 2001), acidente de laboratório, transmissão oral e transplante de órgãos (DIAS, 2000).

A doença de Chagas é uma das patologias de mais larga distribuição no continente americano e está presente em dezoito países da América, estendendo-se do México ao sul da Argentina (figura 2). A doença afeta 16 a 18 milhões de pessoas e aproximadamente 100 milhões de pessoas, isto é, em torno de 25% da população da América Latina estão expostas ao risco de infecção (<http://www.who.int/ctd/chagas/disease.htm>).

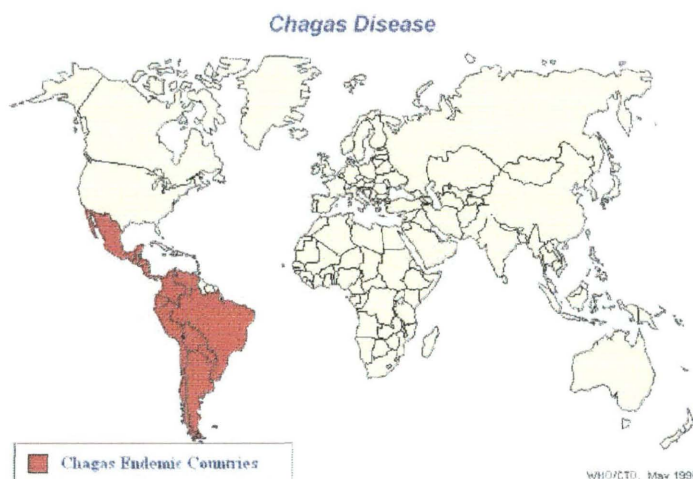


Figura 2 – Distribuição geográfica da Doença de Chagas (os países afetados estão representados em vermelho).

Após a infecção, há um período de incubação que depende da forma de transmissão do *T. cruzi* – aproximadamente uma semana quando a transmissão é vetorial e de 20 dias a 3 meses quando a transmissão é transfusional. A doença de Chagas compreende, basicamente, duas fases: a fase aguda e a fase crônica. As características de cada fase, assim como a evolução para a cura

ou óbito, dependem de diversos fatores ligados ao *T. cruzi* – como cepa, virulência e tamanho do inóculo -, ao homem – idade e sexo – e ambiente (revisto por CANÇADO, 2000).

A fase aguda é normalmente silenciosa. Quando aparente, principalmente em crianças de baixa idade, os sintomas podem ser febre, edemas, cefaléia, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, miocardite, meningoencefalite e cardiopatia aguda. O conjunto e a intensidade dos sintomas são bastante variáveis de caso a caso. A duração da fase aguda varia geralmente entre 4 a 12 semanas e é caracterizada por elevada parasitemia. Não parece haver cura espontânea da infecção aguda em humanos e os tratamentos específicos disponíveis, quando empregados, curam de 30 a 80 % destas infecções (RASSI *et al.*, 2000).

A fase crônica se inicia com a diminuição da parasitemia e dos níveis de imunoglobulinas do tipo IgM e aumento das do tipo IgG. A evolução desta fase é lenta e pode durar toda a vida do paciente. Esta fase crônica pode ser representada por diversas formas clínicas: a indeterminada, a cardíaca ou a digestiva. A forma indeterminada se caracteriza pela ausência de sintomatologia. A morbimortalidade da doença de Chagas está associada às formas cardíaca e digestiva, que constituem evoluções da forma indeterminada em 2 a 5% dos casos. A primeira se caracteriza por uma cardiopatia crônica, cujo aspecto mais importante é a fibrose (ANDRADE *et al.*, 1978), e a segunda, por esofagopatia e colopatia (revisto por DIAS, 2000).

Atualmente, não há vacina desenvolvida para a doença de Chagas. A quimioterapia disponível não é satisfatória. As drogas utilizadas são o benzonidazol e o nifurtimox. Embora o mecanismo de ação destas substâncias não esteja esclarecido, acredita-se que o primeiro aja inibindo a síntese de proteínas e de RNA do parasita e o segundo aja sobre a via de detoxificação de radicais livres. As probabilidades de cura diminuem à medida que a doença vai adquirindo a forma crônica. Estas drogas causam várias reações colaterais indesejáveis que, por vezes, obrigam a interrupção do tratamento (revisto por CANÇADO *et al.*, 2000).

### **Expressão Gênica nos Tripanosomatídeos**

Ao longo de seu ciclo evolutivo, o parasita sofre profundas alterações que, de modo geral, refletem sua adaptação ao meio em que se localizam. Todos os organismos se adaptam a mudanças no ambiente por ajustes na expressão de genes e, desde *Escherichia coli* até o homem,

o controle transcricional parece ser o principal mecanismo de regulação da expressão gênica (LODISH *et al.*, 2000).

*Trypanosoma cruzi*, sendo um organismo digenético, requer uma rápida adaptação aos diferentes ambientes encontrados nos hospedeiros, com diferenças na temperatura, nutrientes e defesas e, portanto, requer maiores mudanças na expressão de seus genes (CLAYTON, 2002). A alternância de tipos funcionalmente e morfológicamente distintos implica que genes distintos são expressos pelos diferentes estágios de diferenciação durante o ciclo de vida do parasita. Genes com padrão de expressão estágio-específico estão certamente relacionados com propriedades biológicas características de cada estágio, como por exemplo, a resistência dos tripomastigotas à lise mediada pela via alternativa do complemento ou ainda genes que podem ter uma expressão transitória específica tanto durante o processo de diferenciação dos parasitas como para responder às alterações de micro-ambiente que o parasita enfrenta durante a alternância de hospedeiros (ÁVILA *et al.*, 2003).

Os tripanosomatídeos, organismos eucariontes que divergiram precocemente, apresentam muitos fatores distintos nos mecanismos de controle de expressão gênica daqueles observados na maioria dos eucariotos. Alguns dos fatores não comuns incluem transcrição policistrônica, *trans-splicing* do pré-mRNA e transcrição de alguns genes codificadores de proteínas pela RNA polimerase I.

Em eucariotos, os genes geralmente são formados por seqüências alternadas de exons (seqüências codificadoras) e introns (seqüências não-codificadoras). O fenômeno de transcrição é, na maioria dos casos, regulado por uma seqüência promotora a montante da região codificadora. Nela, se ligam vários fatores transcricionais, mobilizando e ativando a RNA polimerase II, que estende a transcrição até um sítio terminador. A transcrição é monocistrônica, ou seja, o mRNA traduzido codifica para uma proteína apenas. Ao transcrito primário, é adicionado um resíduo metil-guanosina-trifosfato ( $m^7Gppp$ , ou cap 0) em sua extremidade 5' e uma cauda poli-A em sua extremidade 3'. Pela reação de *cis-splicing*, são removidos os introns deste transcrito e os exons adjacentes são ligados (PROUDFOOT; FURGER; DYE, 2002).

Em contraste, nos tripanosomatídeos não foram encontrados introns e a transcrição da maioria dos genes é policistrônica (JOHNSON *et al.*, 1987; KOOTER *et al.*, 1987). A maioria dos genes em tripanosomatídeos são altamente organizados em tandem, codificando cópias de

genes idênticos ou semelhantes ou clusters de diferentes genes. Estes genes em tandem são separados por espaçadores intergênicos curtos e são transcritos em uma única molécula de RNA policistrônica que, após ser processada, gera uma série de moléculas monocistrônicas capazes de serem traduzidas.

Estudos feitos pioneiramente com os genes das VSG (glicoproteínas de superfície variáveis) mostram que uma seqüência comum é adicionada à extremidade 5' dos transcritos (SUTTON & BOOTHROYD, 1986). A adição desta seqüência nucleotídica comum, denominada mini-exon (ME) ou *spliced leader* (SL), mostrou-se, depois, comum a todos os mRNAs de tripanosomatídeos (WALDER *et al.*, 1986). Esta reação, denominada *trans-splicing*, acrescenta à extremidade 5' dos precursores dos mRNA dos tripanosomatídeos um segmento de 39 nucleotídeos (cuja seqüência é espécie-específica) (LUO *et al.*, 1999) proveniente de um precursor, SL-RNA, de cerca de 135 a 141 nucleotídeos para *Trypanosoma brucei* (SUTTON & BOOTHROYD, 1986) e 110 nucleotídeos para *Trypanosoma cruzi* (ZWIERZYNSKI & BUCK, 1991). A maquinaria envolvida no *trans-splicing* é muito semelhante àquela presente no *cis-splicing* de outros eucariotos (AGABIAN, 1990; VANHAME & PAYS, 1995). O mini-exon fornece a todos os mRNAs uma estrutura com quatro nucleotídeos metilados seguido do resíduo metil-guanosina-trifosfato (cap 4 - análogo cíclico de guanosina tri-fosfatada) presente na extremidade 5' dos mRNAs eucarióticos (LUO *et al.*, 1999). Além disso, na extremidade 3', é adicionada uma cauda poli-A (figura 3).

A adição do mini-exon resulta de uma transesterificação a qual requer um dinucleotídeo conservado AG com um sítio de adição do SL (ULLU; TSCHUDI; GUNZL, 1996; MATTHEWS; TSCHUDI; ULLU, 1994). Experimentos com uma variedade de genes têm mostrado que *trans-splicing* e poliadenilação estão ligadas. Os sinais de *trans-splicing* são normalmente segmentos de pirimidinas ricas em uracila, os quais precedem sítios AG. Não há sinais para poliadenilação. Entretanto, a poliadenilação ocorre a uma distância fixa (~100-400 nucleotídeos, dependendo da espécie) a montante do sinal de *splicing* (LeBOWITZ *et al.*, 1993; MATTHEWS; TSCHUDI; ULLU, 1994).

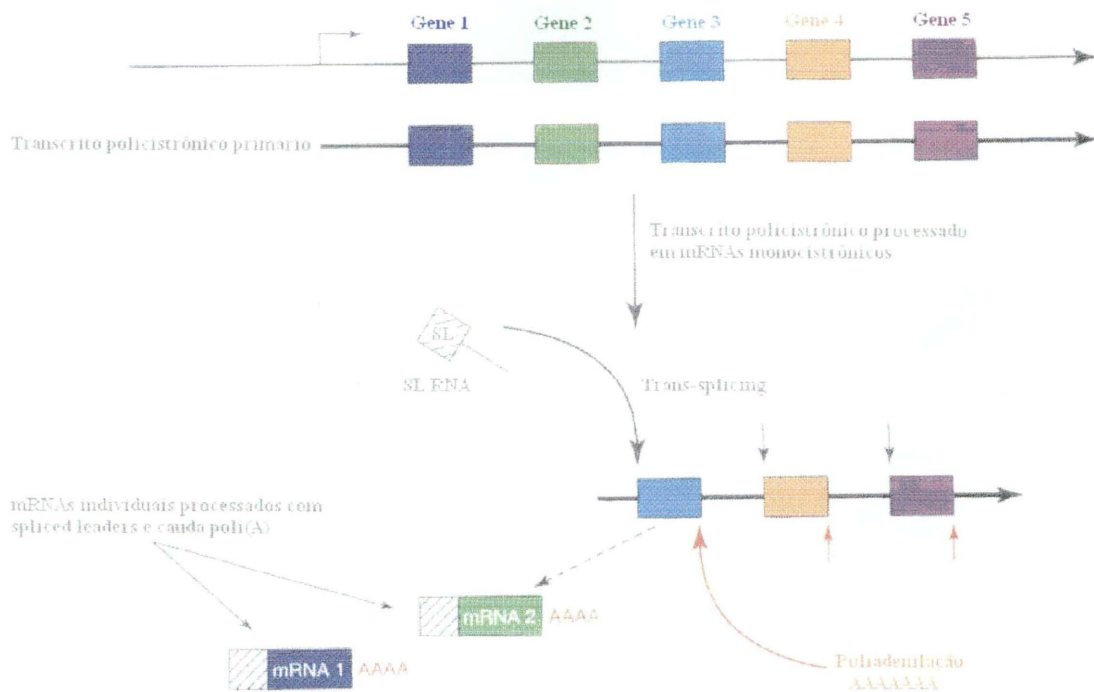


Figura 3 – *Trans-splicing* e transcrição policistrônica em tripanosomatídeos. A transcrição policistrônica dos genes codificadores de proteínas (direção da transcrição indicada por uma seta à direita dos genes) produz um transcrito policistrônico primário. Este transcrito primário sofre, então, *trans-splicing*, ou seja, é adicionado *spliced leader* (SL) (quadrado listrado), originário de um SL-RNA, e uma cauda poli-(A). Estas modificações geram, assim, vários mRNAs maduros monocistrônicos (Modificado de: CAMPBELL *et al.*, 2000).

A transcrição em eucariotos é controlada por, pelo menos, três RNA polimerases que podem ser distinguidas com base em sua sensibilidade à amanitina – uma toxina derivada de fungos. RNA polimerase I, insensível à amanitina, transcreve genes de RNA ribossômico. RNA polimerase II, inibida por baixas concentrações de amanitina, transcreve essencialmente genes codificadores de proteínas. RNA polimerase III, com sensibilidade intermediária à amanitina, transcreve tRNAs, 5S rRNA e outros vários RNAs pequenos nucleares (revisto por LEE & VAN DER PLOEG, 1997).

Os três tipos clássicos de RNA polimerase descritas em eucariotos já foram identificados em tripanosomatídeos (CORNELISSEN *et al.*, 1989; CORNELISSEN *et al.*, 1990) sendo que a maior subunidade de cada enzima já foi clonada e caracterizada (EVERS *et al.*, 1989; JESS *et al.*, 1989; KOCK *et al.*, 1988; SMITH *et al.*, 1989; GRONDAL *et al.*, 1989). Porém, algumas

diferenças foram observadas com relação às subunidades das RNA polimerases (IVENS *et al.*, 2005). A RNA polimerase II das espécies de tripanosomatídeos mostraram peculiaridades em relação a um possível domínio regulador (heptapeptídeos C-terminais) (EVERS *et al.*, 1989). Nos tripanosomatídeos, de modo geral, a RNA polimerase I transcreve os genes ribossomais e alguns genes codificadores de proteínas e a RNA polimerase III, moléculas de RNA nucleolar e de transferência. Os genes do mini-exon são transcritos pela RNA polimerase II (GILLINGER e BELLOFATTO, 2001). Contudo, as polimerases e os promotores associados à transcrição dos genes que codificam proteínas ainda precisam ser melhor investigados (LANDFEAR, 2003).

Pouco se sabe sobre mecanismos de iniciação de transcrição em tripanosomatídeos. A definição de regiões promotoras nos tripanosomatídeos tem sido objeto de muito trabalho e discussão. Nos eucariontes, cada uma das RNA polimerases reconhece e atua em promotores específicos. Fatores de transcrição típicos, como a proteína que se liga à sequência TATA e o fator transcricional TFII B, não foram identificados em nenhum dos membros da família *Trypanosomatidae* (IVENS *et al.*, 2005). Apenas alguns promotores de genes que codificam para proteínas foram funcionalmente identificados em tripanosomatídeos. Os primeiros promotores caracterizados foram os promotores relacionados à transcrição das glicoproteínas majoritárias de superfície do *T. brucei*, prociclina e VSG (PAYS *et al.*, 1990; RUDENKO *et al.*, 1990; ZOMERDIJK *et al.*, 1990). Estes promotores apresentam peculiaridades em relação aos promotores de genes transcritos por RNA polimerase II de eucariotos, pois a RNA polimerase associada aos mesmos não é inibida por  $\alpha$ -amanitina (CLAYTON *et al.*, 1990; KOOTER & BORST, 1984; RUDENKO *et al.*, 1989; ZOMERDIJK *et al.*, 1990). Estes promotores guardam similaridades com promotores dos genes codificadores para os RNAs ribossomais (SHERMAN *et al.*, 1991; BROWN *et al.*, 1992; JANZ & CLAYTON, 1994).

Os mecanismos envolvidos na regulação da expressão gênica em tripanosomatídeos parecem ser distintos dos mecanismos comumente encontrados em eucariotos superiores e permanecem desconhecidos em sua extensão (VANHAME & PAYS, 1995), sendo que a maior parte dos eventos de regulação da expressão gênica parece ocorrer em nível pós-transcricional (TEIXEIRA & DA ROCHA, 2003). O fato de que promotores para RNA polimerase II ainda não tenham sido extensivamente caracterizados em tripanosomatídeos e o fato da transcrição de mRNAs ser essencialmente policistrônica, com o posterior processamento dos transcritos

primários por *trans-splicing*, indica que a regulação da expressão gênica ocorra principalmente (se não exclusivamente) por mecanismos pós-transcricionais (TEIXEIRA & DA ROCHA, 2003). Assim, os mecanismos de regulação podem ocorrer em nível de processamento do transcrito primário, em nível de transporte dos transcritos processados do núcleo para o citoplasma, em nível de estabilidade dos transcritos ou em nível de seleção das seqüências a serem traduzidas.

O controle da estabilidade do mRNA nas diferentes formas do ciclo evolutivo foi evidenciado em tripanosomatídeos através de alguns experimentos utilizando genes repórteres. Esta estabilidade diferencial, de acordo com a forma evolutiva do parasita, pode estar em parte associada à presença de seqüências reguladoras nas regiões não-traduzidas (UTR). Por exemplo, a região 3' UTR do mRNA correspondente ao gene da prociclina aumenta a estabilidade deste transcrito nas formas procíclicas do *T. brucei* (HEHL *et al.*, 1994). Em relação às VSGs, também foi caracterizado um elemento localizado na região 3' não-traduzida, que confere maior estabilidade ao gene repórter nas formas sanguíneas do que nas formas procíclicas do *T. brucei* (BERBEROF; VANHAME; PAYS, 1995). Regiões 3' UTR de outros genes mostraram-se importantes no controle da expressão gênica em tripanosomatídeos, como é o caso da região 3' UTR encontrada no mRNA de amastina e de cruzipaina do *T. cruzi* (TEIXEIRA & DA ROCHA, 1995; TOMÁS & KELLY, 1996; COUGHLIN *et al.*, 2000). Estes resultados comprovam o envolvimento das regiões 3' UTRs no controle pós-transcricional destes genes em tripanosomatídeos. Embora a maior parte destes relatos localizem este tipo de elemento na região 3' UTR, também foi descrita a presença de elementos reguladores na região 5' UTR. No caso da expressão do gene que codifica para a enzima DNA topoisomerase de *Crithidia fasciculata*, foi descrito o envolvimento de duas regiões regulatórias localizadas na porção 5' UTR de seu mRNA. A deleção destas regiões resulta na expressão constitutiva desta enzima durante o ciclo celular de *C. fasciculata* (PASION *et al.*, 1996).

Em *T. cruzi*, evidências de que alguns genes são regulados na etapa de acesso dos RNAs aos ribossomos vêm de trabalhos onde se compara RNA total celular com RNA exclusivamente associados aos polissomos (GOLDENBERG *et al.*, 1985; ÁVILA *et al.*, 2001; DALLAGIOVANNA *et al.*, 2001; FRAGOSO *et al.*, 2003). Análises do tipo "Northern blot", usando o gene da metaciclopinina, um gene expresso especificamente por parasitas de 24h de diferenciação, comparando RNAs totais e polissomais de epimastigotas e células de 24h de

diferenciação, sugerem fortemente que a regulação da expressão de genes se dá em nível de mobilização de sequências de mRNA para os polissomos (figura 4) (ÁVILA *et al.*, 2001). Este tipo de regulação também foi evidenciado para os genes que codificam tubulina, *cblp1*, *Tclmp4* (CARVALHO *et al.*, 1990; DALLAGIOVANNA *et al.*, 2001; FRAGOSO *et al.*, 2003).

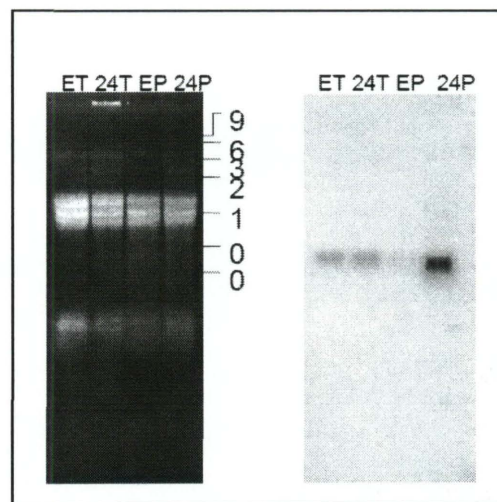


Figura 4 – Análise por Northern blot do gene da metacicligenina de RNAs totais (T) e polissomais (P) de epimastigotas (E) e parasitas de 24h de diferenciação (24h). O resultado mostra que, embora o mRNA da metacicligenina exista em epimastigotas (E), o mesmo só é traduzido (inferido pela presença em polissomos) em parasitas de 24h de diferenciação (ÁVILA *et al.*, 2001).

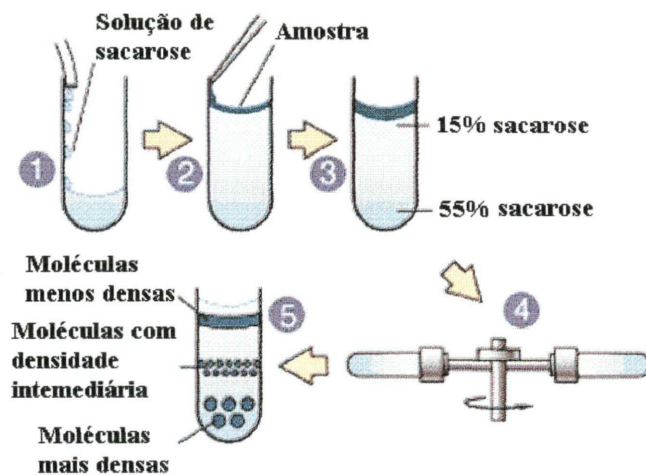
Recentemente, foi feita uma avaliação dos níveis de mRNA das formas de *Trypanosoma cruzi* em diferenciação a partir de uma perspectiva de genômica funcional. O número de sondas diferentes observado na fração de mRNA polissomal foi maior do que o da fração de mRNA total, reforçando a importância da avaliação dos níveis de mRNA polissomal em tripanosomatídeos (PROBST, 2005; PAVONI, 2005).

### **Análises e Purificação de Polissomos**

A centrifugação é um método muito utilizado para separar ou analisar frações ou estruturas celulares, macromoléculas, etc. Podemos acentuar ou refinar os métodos de separação fazendo a centrifugação em um gradiente de concentração. De fato, um dos fatores que influencia a

velocidade de sedimentação é a diferença entre a densidade da partícula e a do solvente. Podemos moldar esta velocidade variando esta diferença de densidade criando um gradiente de concentração. As separações são feitas por centrifugação de uma mistura de partículas ou componentes numa coluna de gradiente de densidade. Durante a centrifugação, as partículas se movem até que sua densidade se iguale à do meio ao redor – figura 5 - (RICKWOOD, 1984).

As variações de densidade são obtidas por variação da concentração de um produto químico em uma solução. Diversos produtos podem ser utilizados para fazer estes gradientes. Eles devem ser muito solúveis em solução aquosa, relativamente inertes, baratos, de fácil manipulação, atóxicos, etc. Evidentemente, nenhum produto reúne todas estas qualidades, tendo que ser levado em conta os contratempos experimentais. A sacarose é frequentemente utilizada, permitindo alcançar densidades elevadas. Este produto tem a vantagem de ser barato, eletricamente neutro e inerte para a maior parte das frações celulares. Sua principal desvantagem é a viscosidade à forte concentração, o que torna sua utilização mais difícil (RICKWOOD, 1984).



[www.freewebs.com/Itaing/DNA\\_sucrose\\_gradient.jpg](http://www.freewebs.com/Itaing/DNA_sucrose_gradient.jpg)

Figura 5 – Esquema de um gradiente de sacarose (modificado). 1 – Preparação de um gradiente de densidade em um tubo de ultracentrífuga; 2 – Aplicação cuidadosa e lenta da amostra sobre o gradiente; 3 – Gradiente de densidade possui concentrações progressivamente menores em direção ao topo do tubo; 4 – Centrifugação; 5 – Após a centrifugação, os componentes mais densos se movem mais rápido em direção ao fundo do tubo e param na densidade da sacarose correspondente à sua.

Gradientes de densidade têm sido usados extensivamente na separação e purificação de uma variedade de materiais biológicos, como ácidos nucleicos, partículas virais e proteínas. A

separação e coeficientes de sedimentação de macromoléculas podem também ser medidas através de gradientes de densidade, comparando com outra macromolécula similar com um coeficiente de sedimentação conhecido. Várias proteínas e ácidos nucleicos estão disponíveis comercialmente para este propósito (YOUNG, 1984).

Gradientes de densidade são tão sensíveis que são capazes de separar macromoléculas que tenham incorporado isótopos pesados, como  $^{13}\text{C}$  ou  $^{15}\text{N}$ , daquelas que contenham o isótopo leve ( $^{12}\text{C}$  ou  $^{14}\text{N}$ ). De fato, gradientes de cloreto de cério ( $\text{CsCl}$ ) foram desenvolvidos na década de 50 para separar DNA marcado do não-marcado depois da exposição de uma população em crescimento de bactérias ao precursor de nucleotídeo contendo  $^{15}\text{N}$ ; este experimento clássico evidenciou a replicação semiconservativa do DNA e confirmou a estrutura de dupla-hélice do DNA (ALBERTS *et al.*, 2002).

Gradientes de densidade são usados também para análise do tamanho dos polissomos através do perfil de sedimentação. Os polissomos irão sedimentar proporcionalmente a sua massa, ou seja, quanto mais ribossomos estiverem ligados a um mRNA, maior sua densidade e, conseqüentemente, maior será seu coeficiente de sedimentação através do gradiente.

Através de análises de gradientes de sedimentação em sacarose de polissomos, pode-se observar a distribuição de proteínas, podendo estar ligadas a alguma subunidade ribossomal em particular ou a polissomos. A partir deste tipo de análises, estudos mostraram que a proteína TcJ6p de *Trypanosoma cruzi*, que possui um domínio DnaJ e é homóloga à co-chaperona Sis1 de levedura, estava intimamente associada às subunidades ribossomais, aos monossomos 80S e polissomos curtos (SALMON; MONTERO-LOMELI; GOLDENBERG, 2001). Outro estudo realizado analisou a Hsp98, proteína mais proeminente durante resposta ao choque térmico de *Neurospora crassa*. Frações microssomais, onde a Hsp98 está enriquecida em células submetidas a choque térmico, foram analisadas em gradientes de sacarose. As análises mostraram que esta proteína está mais concentrada nos polissomos que nos monossomos (VASSILEV; PLESOFKY-VIG; BRAMBL, 1992). Um estudo mais recente analisou o movimento de mRNAs eucarióticos entre polissomos e corpos de processamento citoplasmáticos (*processing-bodies* ou *P-bodies*). Nele, foram apresentadas evidências de que mRNAs em *P-bodies* de leveduras podem retornar à tradução. Análises de sedimentação de polissomos em gradientes de sacarose revelaram uma rápida perda de polissomos durante privação de glicose no meio de

cultura e uma rápida restauração destes quando readicionada glicose (BRENGUES; TEIXEIRA; PARKER, 2005).

### ***Trypanosoma cruzi* e a Genômica Funcional**

A disponibilidade atual de um grande número de sequências de tripanosomatídeos, fruto inicialmente de esforços isolados na caracterização de genes e mais recentemente de consórcios para análise em larga escala, promove a utilização de metodologias de *high throughput* para um entendimento global da expressão gênica. Uma das metodologias é o microarranjo, descrito inicialmente em 1995 por Schena e colaboradores (1995) e, desde então, utilizado intensamente nas mais diversas áreas.

Um arranjo de DNA é usualmente um substrato (membrana de náilon ou nitrocelulose, vidro ou plástico) sobre o qual são depositados diversos DNAs fita simples distintos com seqüências diferentes, denominado geralmente de sonda. Esse DNA é colocado na lâmina de forma a criar estruturas localizadas, denominadas *spots*, que são arranjadas em um padrão regular, semelhante a uma grade. Se a densidade de sondas é muito grande, em uma região muito pequena do substrato, dá-se o nome de microarranjo de DNA.

O material a ser colocado no microarranjo pode ser de diferentes tipos, de acordo com o propósito do mesmo. Atualmente, os tipos mais comumente encontrados de microarranjo são os que contêm como sonda produtos de PCR dupla fita (geralmente, oriundos de bibliotecas de cDNA) ou oligonucleotídeos fita simples. Essas sondas geralmente são complementares a regiões do genoma que codificam proteínas e, portanto, os microarranjos são principalmente focados para a avaliação do transcriptoma codificador de proteínas, embora qualquer tipo de avaliação por hibridização de ácidos nucléicos possa ser implementado.

O microarranjo é colocado em contato com uma solução contendo a amostra complexa de RNA que desejamos estudar, a qual é denominada normalmente de alvo, e essa preparação é deixada sobre controle rigoroso de temperatura para que o pareamento das regiões complementares na sonda e no alvo, que estão ambos em fita simples, possa ocorrer, no fenômeno denominado hibridação. Finalmente, a ocorrência da hibridação é passível de ser

quantificada, pois as moléculas da população alvo são marcadas com a adição de agentes fluorescentes ou radioativos, os quais podem ser captados por dispositivos especializados.

Microarranjos começaram a ser utilizados para estudos em tripanosomatídeos em 2002. DIEHL *et al.* (2002) compararam mRNA total de *T. brucei* de duas formas distintas, a procíclica e a sanguínea, usando um microarranjo de aproximadamente 2.000 produtos de PCR referentes a clones de uma biblioteca de fragmentos genômicos. Apenas 2% das sondas se mostraram diferencialmente expressas e a maioria delas correspondia a genes já descritos.

SAXENA *et al.* (2003) utilizaram microarranjos de aproximadamente 9.200 sequências para avaliar a diferenciação das formas procíclicas para metacíclicas de *Leishmania major*. O material utilizado foi o mRNA total celular e menos que 2% dos genes se mostraram com a expressão alterada no processo de diferenciação.

MINNING *et al.* (2003) realizaram o primeiro trabalho utilizando microarranjos para a análise de *T. cruzi*. O arranjo consistia em 4.400 fragmentos genômicos. O estudo foi realizado com formas tripomastigotas e amastigotas diferenciadas *in vitro*. Menos que 1,5% das sondas se mostraram diferencialmente expressas.

Posteriormente, três trabalhos utilizando *Leishmania* como modelo foram publicados. GUIMOND *et al.* (2003) utilizaram um microarranjo direcionado para genes envolvidos com resistência a drogas, contendo apenas 44 genes. AKOPYANTS *et al.* (2004) utilizaram um microarranjo de aproximadamente 22.000 sondas (metade, genes conhecidos, metade clones genômicos) e avaliaram as diferenças no mRNA total das diferentes formas do ciclo de vida. Apenas 3,2% das sondas mostraram expressão diferencial. ALMEIDA *et al.* (2004) utilizaram um microarranjo de aproximadamente 1.800 sondas originárias de uma biblioteca de cDNA.

BAPTISTA *et al.* (2004) utilizaram microarranjos de 730 sondas para comparar duas cepas distintas de *T. cruzi*: CL Brener e Silvio, através da hibridação de DNA e de RNA. Um total de 68 e 84 sondas se mostrou diferente nas comparações envolvendo DNA e RNA, respectivamente.

Recentemente, BREMS *et al.* (2005) utilizaram uma versão amplificada do microarranjo de DIEHL *et al.* (2002), contendo 24.567 fragmentos genômicos, para estudar diferentes estágios de *Trypanosoma brucei* utilizando populações de RNA total e RNA polissomal para sintetizar os alvos marcados. Uma comparação quantitativa entre mRNA total e RNA associado a polissomos mostrou uma expressão diferenciada em aproximadamente 2% dos genes.

Em nosso laboratório, foi desenvolvido um microarranjo contendo cerca de 4 mil genes de *Trypanosoma cruzi*. Porém, uma análise comparativa dos RNAs polissomais e RNAs totais de epimastigotas em replicação e epimastigotas em diferenciação utilizando microarranjo, mostrou menos de 1% dos mRNAs diferentes quando se analisava a fração RNA total, mas mais de 15% de diferenças quando se analisava RNAs polissomais – figura 6 - (PROBST, 2005).

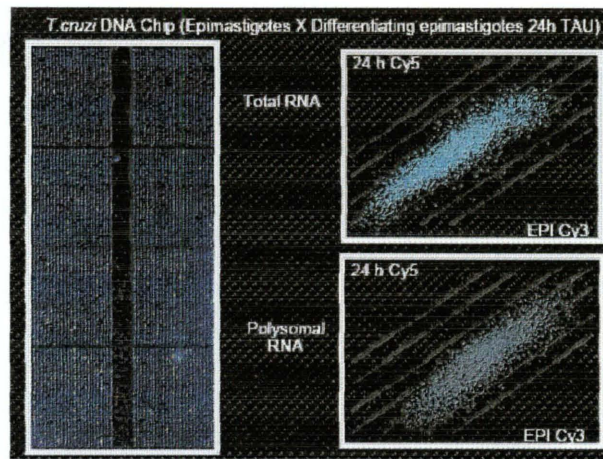


Figura 6 – Análise comparativa por microarranjo dos mRNAs totais e polissomais de epimastigotas e parasitas de 24 horas de diferenciação. O microarranjo (biochip) de *T. cruzi* contém entre 4.000 e 5.000 genes distintos. 18 mRNAs diferentes são observados quando se analisa a fração RNA total enquanto 961 diferenças são observadas quando se analisa RNAs polissomais.

Em organismos nos quais o controle transcricional tem um papel preponderante no controle da expressão gênica, diferenças no transcriptoma são observadas no conjunto total de RNA, como em mamíferos e leveduras.

Como visto anteriormente, estudos em *T. cruzi* indicam que o controle da expressão gênica ocorre pós-transcricionalmente. Caso esta regulação esteja envolvendo a degradação de RNA, isto seria percebido com uma análise da fração total do mRNA. Alguns estudos indicam que o mRNA de vários genes permanece estável no citoplasma e o controle da tradução ocorre através do acesso aos ribossomos – mobilização polissomal. Nestes casos, a comparação entre populações de RNA total de diferentes tipos celulares não revelaria diferenças na expressão gênica.

Os resultados referentes ao mRNA polissomal demonstram a importância da avaliação dessa fração do transcriptoma no estudo da diferenciação de *Trypanosoma cruzi*: na metaciclogênese, o número de genes diferencialmente expressos chega a ser 10 vezes maior em mRNA polissomal do que em mRNA total (PROBST, 2005).

Devido à importância de se estudar a fração polissomal dos RNAs, é necessário ter certeza de sua pureza e qualidade. Basicamente, duas metodologias diferentes de extração de polissomos dedicadas a tripanosomatídeos circulam na comunidade científica e podem levar ao isolamento, juntamente aos polissomos, de RNAs de outras frações. Assim, resultados diferentes podem ser obtidos mesmo quando a pergunta biológica for a mesma. Propomos, então, analisar as duas metodologias de extração de polissomos (BREMS, 2005 e GOLDENBERG, 1985) utilizando análises de perfis em gradientes de sacarose e hibridação competitiva em microarranjos de DNA.

## **2. OBJETIVOS**

### **Objetivos gerais**

Comparar, por diferentes metodologias, os polissomos de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* obtidos com o uso de dois protocolos de extração.

### **Objetivos específicos**

- Comparar os perfis de polissomos extraídos pelos métodos de GOLDENBERG *et al.* (1985) e BREMS *et al.* (2005) usando gradientes de sacarose;
- Comparar as populações de RNAs associados a polissomos extraídos pelos métodos de GOLDENBERG *et al.* (1985) e BREMS *et al.* (2005) usando a tecnologia do microarranjo.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Reagentes

Procedência dos reagentes mais utilizados:

**Ambion:** Kit *Amino Allyl Message Amp<sup>TM</sup> aRNA*.

**Amersham-Pharmacia Biotech:** dCTP-Cy3, dCTP-Cy5, dNTPs, RNase H.

**Corning:** laminas para microarranjo CMT GAPS.

**Cult-lab:** soro fetal bovino.

**Difco:** infuso de fígado, triptose.

**Invitrogen:** EDTA, DTT, fenol, fragmento *Klenow* da DNA polimerase I, *Random Primer Solution*, Tris, sacarose, RNase OUT<sup>TM</sup>.

**Merck:** cloreto de lítio, clorofórmio, etanol absoluto, cloreto de potássio, cloreto de magnésio, cloreto de sódio, fosfato dibásico de sódio, glicose, SDS.

**Microbiológica:** hemina.

**Millipore:** colunas *microcon 30* (*Microcon<sup>®</sup> Amicon Bioseparations*).

**Promega:** DNase RQ1 (livre de atividade tipo RNase), *ImProm-II<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase*.

**Qiagen:** RNeasy<sup>®</sup>, RNase-free DNase set.

**Sigma:**  $\beta$ -mercaptoetanol, cicloheximida, DNA de esperma de salmão, heparina, HEPES, NP-40.

**USB:** Isotiocianato de guanidina.

### 3.2. Meios de Cultura

<b>Meio LIT (<i>Liver Infusion Tryptose</i>)</b>	<b>g/L</b>
Infuso de fígado.....	5,0
NaCl.....	4,4
KCl.....	0,4
Glicose.....	2,2
Triptose.....	5,0
Fosfato Dibásico de Sódio.....	11,56
Extrato de Levedura.....	15,0
Hemina.....	0,02
Soro Fetal Bovino.....	10%

### 3.3. Tampões e Soluções

**Colchão de sacarose:** Sacarose 2 M em tampão de lise hipotônico (acrescido de  $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM, cicloheximida 10 mg/mL, heparina 20 U/mL).

**NKM:** NaCl 140 mM, KCl 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, HEPES 10 mM pH 7,4.

**Solução de Denhardt (50x):** albumina bovina sérica - BSA (fração V) 1% (p/v), polivinilpirrolidona 1% (p/v), ficoll 400 1% (p/v).

**Solução de hibridação:** SSC 6X; solução de Denhardt 5 X, DNA esperma de salmão Tipo III (0,1 mg/mL) fragmentado por ultra-som e desnaturado, SDS 1%.

**Solução de hibridação para microarranjos de DNA (a 42°C):** SSC 6 X; Denhardt's 5 X, DNA esperma de salmão Tipo III (0,1 mg/mL) fragmentado por ultra-som e desnaturado 0,25 mg/mL, SDS 0,5% (p/v), formamida 50% (v/v).

**Solução de ressuspensão de polissomos:** Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 10 mM, NaCl 100 mM, SDS 0,5%.

**Solução para lavagem média estringência:** SSC 0,5X, SDS 0,01% (p/v).

**Solução pós-lavagem:** SSC 0,06 X.

**SSC (*standard saline-citrate*) (20x):** NaCl 3 M, Citrato de sódio 0,3 M pH 7,0.

**Tampão de lise hipotônico:** Tris-HCl 10 mM pH 7,6, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 10 mM, β-mercaptoetanol 5 mM, cicloheximida 10 µg/mL, heparina 20 µg/mL, PMSF 1 mM.

**Tampão de lise para RNA total:** isotiocianato de guanidina 5 M, EDTA 10 mM, Tris-HCl pH 7,5 50 mM e β-mercaptoetanol 8%.

**Tampão de polissomos:** NaCl 120 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, cicloheximida 100µg/mL, heparina 10 mg/mL.

**Tampão de ressuspensão de RNA total:** Tris-HCl pH 7,5 10 mM, EDTA 1 mM e SDS 0,1% (água para completar 50 mL).

### 3.4. Células

Formas replicativas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* clone Dm28c (GOLDENBERG *et al.*, 1984; CONTRERAS *et al.*, 1988) foram crescidos e mantidos em cultura axênica em meio LIT (CAMARGO, 1964), incubadas a 28°C, com passagens a cada três dias. Parasitas foram isolados por centrifugação e processados.

### 3.5. Isolamento de RNA total

Para a obtenção de RNA total, cerca de  $5 \times 10^9$  células foram sedimentadas a 8.000 x g por 15 minutos a 10°C e lavadas em tampão NKM por duas vezes. As células foram lisadas com cerca de 5 mL de tampão de lise de RNA total. Imediatamente após a lise, foram adicionados sete volumes de cloreto de lítio 4 M e a mistura foi incubada a 4°C por 16 horas.

Decorrido este tempo, os extratos celulares foram centrifugados a 10.000 x g por 15 minutos a 4°C. Os sedimentos foram lavados com cerca de 50 mL de cloreto de lítio 3 M, centrifugados a 10.000 x g por 15 minutos a 4°C e este processo foi repetido mais uma vez. Após essas lavagens, os sedimentos foram ressuspensos em cerca de 5 mL de tampão de ressuspensão de RNA total. A amostra foi submetida a um congelamento rápido (banho de gelo seco) e, logo após, o descongelamento foi feito através de incubações no banho-maria a 37°C, intercalados por forte agitação.

A extração foi realizada com igual volume de fenol saturado e, posteriormente, com fenol/clorofórmio. Finalmente, foi efetuada uma extração com clorofórmio/álcool isoamílico e, logo após, a fase aquosa foi precipitada com 10% do volume de acetato de sódio 3 M e um volume de isopropanol e armazenada a -70°C.

### **3.6. Isolamento de polissomos – pelo método utilizado por GOLDENBERG *et al.* (1985)**

As células foram incubadas em cicloheximida (concentração final de 10 µg/mL) durante 10 minutos em gelo. Os parasitas foram centrifugados a 8.000 x g por 5 minutos a 10°C e lavados duas vezes em solução NKM (acrescido de cicloheximida). Metade das células foi congelada para posterior extração de polissomos. A lise celular foi efetuada com aproximadamente 5 x 10<sup>9</sup> células em 20 mL de tampão de lise hipotônico. Após homogeneização, foi adicionado NP-40 (detergente) a uma concentração final de 1%. A lise celular foi monitorada em microscópio ótico e interrompida pela adição de colchão de sacarose 2 M numa concentração final de 0,25 M.

O lisado celular foi submetido a dois ciclos de centrifugação: um a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C e, posteriormente, a 10.000 x g por 30 minutos a 4°C para remoção de debris e organelas. Em tubos de ultracentrífuga (rotor SW40), foram adicionados 2 mL de colchão de sacarose 2 M e, sobre ele, 9 mL da fração pós-mitocondrial e centrifugados a 192.000 x g por 2 horas a 4°C. Imediatamente após o término da centrifugação, foi coletada a fração polissomal desprezando o colchão de sacarose por inversão. O pellet foi ressuspensão com 500 µL de tampão de lise (para análise por gradientes de sacarose) ou com o Kit RNeasy (Qiagen®) para seu posterior processamento.

### **3.7. Isolamento de polissomos – pelo método utilizado por BREMS *et al.* (2005)**

Para este procedimento, foram utilizadas 5 x 10<sup>9</sup> células e, a elas, foi adicionado cicloheximida (100 µg/mL). Logo após, estas foram coletadas por centrifugação a 2.000 x g por 5 minutos a 4°C e lavadas duas vezes em tampão de polissomos. Metade das células foi congelada para posterior extração de polissomos. As células foram então ressuspensas em 10 mL de tampão de polissomos e lisadas pela adição de NP-40 a uma concentração final de 1%. A suspensão de células foi homogeneizada e o lisado foi centrifugado a 10.000 x g por 4 minutos a 4°C para remover debris e organelas. O pellet de polissomos foi obtido por ultracentrifugação a 75.000 x g por 35 minutos a 4°C na ultracentrífuga (rotor SW40). O pellet foi ressuspensão com 500 µL de

tampão de lise (para análise por gradientes de sacarose) ou com o Kit RNeasy (Qiagen®) para seu posterior processamento.

### **3.8. Obtenção dos perfis das frações polissomais por gradiente de sacarose**

O pellet enriquecido em polissomos obtidos pelos métodos utilizados neste trabalho foi ressuspenso em 500 µL de tampão de lise e aplicado delicadamente sobre um gradiente de sacarose exponencial (15-55%). Os gradientes foram, então, centrifugados por 2 horas a 192.000 x g a 10°C na ultracentrífuga (rotor SW40). Os gradientes de sacarose foram coletados a uma velocidade de 1 mL por minuto e analisados espectrofotometricamente (254 nm) em um sistema ISCO FOXY JR. de gradiente de densidade programável.

### **3.9. Repurificação dos RNAs**

Os RNAs totais e polissomais foram re-purificados utilizando o Kit RNeasy (Qiagen®) seguindo o protocolo “*Animal Cells P*” com o passo adicional de tratamento com DNase na própria coluna (RNase-free DNase set – Qiagen), conforme recomendações do fabricante.

### **3.10. Determinação de quantidade e qualidade dos ácidos nucleicos extraídos**

A quantidade de RNA foi determinada através da medida da absorbância a 260 nm, considerando que o valor da absorbância igual a 1 equivale a 40 µg/mL de RNA. A qualidade dos ácidos nucleicos foi determinada pela razão entre a absorbância a 260 e a 280 nm.

### 3.11. Hibridação competitiva em microarranjos de DNA

#### ➤ Arquitetura do microarranjo

Foi utilizado o *biochip* versão 4 produzida no Instituto de Biologia Molecular do Paraná. Este possui mais de 6000 sondas, as quais representam aproximadamente 5000 genes diferentes de *Trypanosoma cruzi*.

As sondas, assim como os controles externos e internos, estão dispostas em 16 setores de 20 colunas e 20 linhas, num total de 6.400 posições disponíveis. Em cada lâmina, estes setores aparecem repetidos três vezes. Em 6.198 destas posições, foram depositados produtos de PCR, a saber:

- 3.552 sondas individuais, amplificadas de DNA genômico de *T. cruzi*, oriundas da segunda versão do microarranjo, obtidas a partir dos dados de EST de *T. cruzi* disponíveis no Genbank no ano de 2000.
- 2.354 sondas individuais, amplificadas de insertos em vetor Topo T-A (*Invitrogen*), referentes à biblioteca de EST de epimastigotas, epimastigotas em estresse nutricional, epimastigotas aderidos em 24 horas de diferenciação e tripomastigotas metacíclicos, produzida no IBMP (PICCHI & PROBST, *em preparação*).
- 144 sondas referentes a 12 genes selecionados como controles de hibridação, por apresentarem uma intensidade de sinal muito forte nos primeiros experimentos feitos. (n=8 a 20 sondas por gene, em número variável).
- 134 sondas referentes a genes selecionados, incluídos por serem de interesse às linhas de pesquisa de outros grupos do IBMP ou colaboradores.
- 4 sondas referentes ao genoma do endossimbionte de *Crithidia deanei*, utilizados como controles negativos de DNA.
- 10 produtos da amplificação do gene Q do bacteriófago  $\lambda$ Q, usado como controle negativo ou positivo externo, caso adicionado o mRNA do gene à preparação do material hibridado.

➤ **Amplificação das amostras de RNA (transcrição *in vitro*)**

Dado que a quantidade de amostra de RNA é muito reduzida, optamos por amplificá-la utilizando um sistema de transcrição *in vitro*. Para isso, é necessário uma primeira etapa de síntese de cDNA. Após isso, o cDNA obtido é transcrito e o RNA, agora, é denominado cRNA.

As etapas da amplificação do RNA foram realizadas utilizando o kit *Amino Allyl Message Amp™ aRNA Amplification* (Ambion Inc., Austin, TX, EUA), conforme recomendações do fabricante. O esquema abaixo resume as etapas desta reação (figura 7).

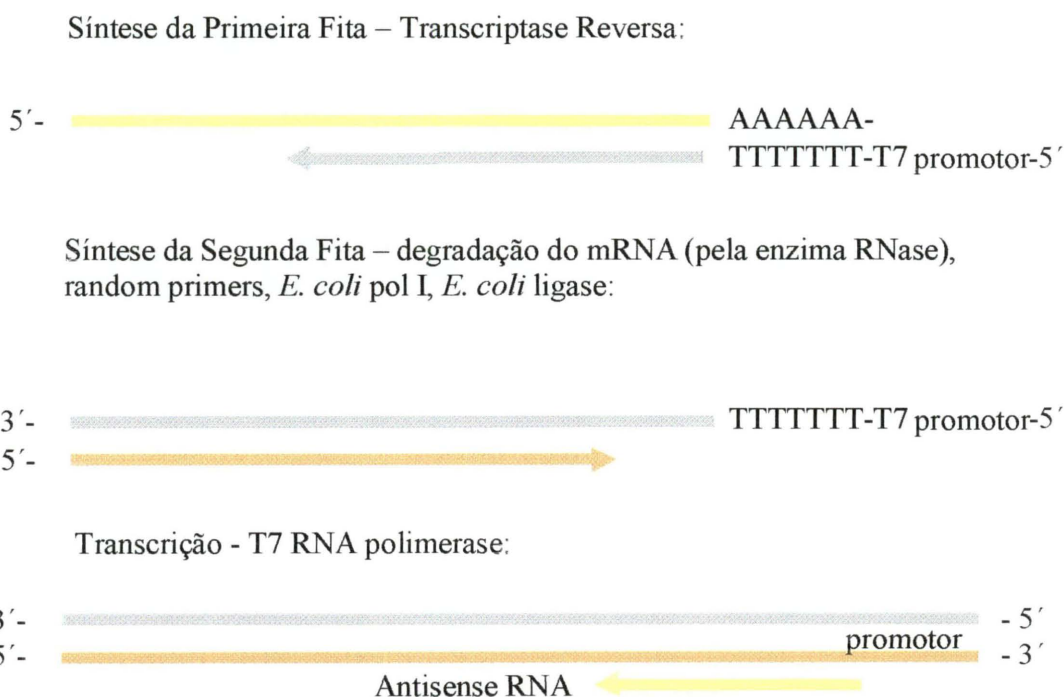


Figura 7 – Transcrição *in vitro* (para obtenção de cRNA).

➤ **Conversão de cRNAs para cDNAs e marcação com fluoróforos**

Para transcrição reversa, foram adicionados 2000 pmol de Random primer (Invitrogen) para 3,0 µg de cRNA purificado e ressuspenso em água RNase free. A reação é incubada a 70°C por 10 minutos e colocada em gelo para então adicionar os reagentes da primeira fita de cDNA, utilizando o kit *Improm-II Reverse Transcriptase* da Promega. Para tanto, foi feito um mix com

tampão Impro-II 5X, MgCl<sub>2</sub> 25mM, dNTPs, RNase OUT e 2U de transcriptase reversa (Promega), e foi incubado a 42°C por 2 horas.

Para purificação da primeira fita, o RNA foi degradado pela adição de 15 µL de NaOH 0,1 N e incubada a 70°C por 10 minutos. Após retirar da incubação, as amostras foram colocadas em gelo por alguns segundos e foi adicionado 15 µL de HCl 0,1 N para neutralizar a solução. Para a concentração das amostras, 400 µL de água ultra-pura e a reação da primeira fita foram depositados em colunas de microcon 30 (Microcon<sup>®</sup> Amicon Bioseparations, Millipore) e submetidos à centrifugação a 14.000 x g por 8 minutos. Os concentrados foram coletados em tubos de microcentrífuga e, posteriormente, desnaturados a 95°C por 5 minutos e imediatamente resfriados em gelo.

Para a síntese da segunda fita, foram acrescentados: 20 µL *Random Primer Solutions*, 5 µL de mistura de dNTPs (dATP, dGTP, dTTP 1,2 mM cada, dCTP 0,6 mM), 1 µL da enzima Klenow (*Bioprime DNA Labeling System*) e 2 µL do fluoróforo dCTP-Cy-3 ou dCTP-Cy-5 (Amersham – Pharmacia Biotech) – os dCTPs são adicionados no escuro. Esta reação é incubada a 37°C por 2 horas e, após este período, a reação foi purificada e concentrada em coluna microcon 30 (a fim de retirar os *dyes* não incorporados), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante.

#### ➤ **Hibridação dos microarranjos de DNA**

Após concentrar as amostras, foi acrescentado 100µL de solução de hibridação. As amostras foram então desnaturadas a 95°C por 5 minutos e transferidas imediatamente para o gelo.

As lâminas com as sondas foram acopladas à estação de hibridação (*GeneTAC HybStation – PerkinElmer*) (figura 8), na qual todo o processo de hibridação e de lavagens pós-hibridação é automático. Assim, o tempo de hibridação é de 16 horas à temperatura de 42°C. As lavagens pós-hibridação foram realizadas em tampões com concentrações decrescentes de sal, à temperatura ambiente (solução para lavagem de média estringência por 5 minutos; solução pós-lavagem por 5 minutos). Uma lavagem extra foi feita manualmente utilizando a solução pós-lavagem.

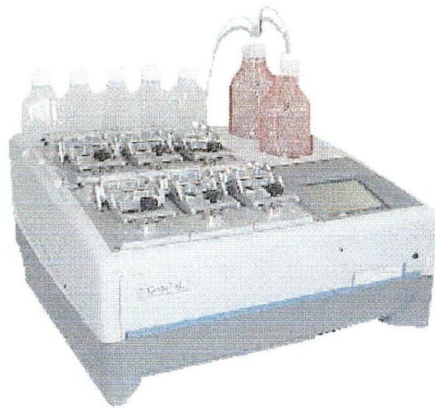


Figura 8 – Estação de hibridação *GeneTAC HybStation* – *PerkinElmer*

#### ➤ **Leitura e análises dos sinais obtidos**

Após a hibridação, as lâminas foram secas por centrifugação e submetidas à detecção de fluorescência em um scanner óptico *Affymetrix 428 Array Scanner*.

Os sinais foram obtidos pela medida da intensidade de fluorescência gerada em cada um dos *spots* e captada nos canais verdes – excitação do fluoróforo *Cy-3* em 532nm – e nos canais vermelhos – excitação do fluoróforo *Cy-5* em 635nm – do *scanner* óptico. Os dados das hibridações foram transformados em imagens com o auxílio do programa *Jaguar 2.0* (*Affymetrix*).

A partir desses sinais são criadas imagens 16-bits em formato TIFF (*tag image file format*). Cada uma dessas imagens representa a leitura dos sinais obtidos em um dos comprimentos de onda utilizados.

As imagens criadas pela leitura dos sinais obtidos são analisadas pelo *software Spot* (BUCKLEY & YANG, 2000; YANG, BUCKLEY & SPEED, 2001). Após isso, os dados devem ser normalizados, com o objetivo de tornar os dados fidedignos, reduzindo os erros associados à variação sistemática presente nas diferentes etapas que constituem o experimento. Entre as várias alternativas disponíveis, a normalização global não-linear foi a escolhida para este trabalho. Esta normalização possui duas premissas:

- As concentrações relativas das moléculas de RNA mensageiro em uma condição biológica e em outra não variam. E, se houver variação, ela é simétrica. Apesar desta premissa não ser verdadeira para todos os casos, ela representa uma solução conservadora, pois maximiza a semelhança entre as duas amostras.
- As fontes de heterogeneidade não são homogêneas, ou seja, apresentam diferentes intensidades de acordo com uma segunda variável. Portanto, as amostras devem ser normalizadas por diferentes medidas.

Os *softwares* R (IHAKA & GENTLEMAN, 1996; DUDOIT & YANG, 2003; DUDOIT, GENTLEMAN e QUACKENBUSH, 2003) e LIMMA (SMITH, 2004) são empregados para a realização desta normalização global não-linear e para a extração dos valores de *background*. Após a normalização intra-microarranjo, é feita a normalização inter-microarranjo, a qual serve para ajustar possíveis diferenças na intensidade média de cada lâmina. Para essa normalização, foi utilizado o método de normalização por quartiles (BOLSTAD *et al.*, 2003), implementado no *software* LIMMA, o qual consiste em equalizar as curvas de distribuição de intensidade das sondas de todos os microarranjos de um experimento.

O agrupamento de amostras permite identificar quais são as relações gerais dentre elas, podendo ajudar na determinação de amostras cujo padrão seja distinto da norma, além de estabelecer uma maneira simplificada de se quantificar a diferença entre as amostras.

O agrupamento de genes permite identificar conjuntos de genes cujos níveis de expressão variam de forma correlata, o que pode significar mecanismos comuns de relação da expressão gênica. O agrupamento hierárquico e o processo de visualização foram obtidos pelo *software* *TreeView*, disponível em <http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>.

Uma representação esquemática dos procedimentos de hibridação competitiva pode ser visualizada na figura 9.

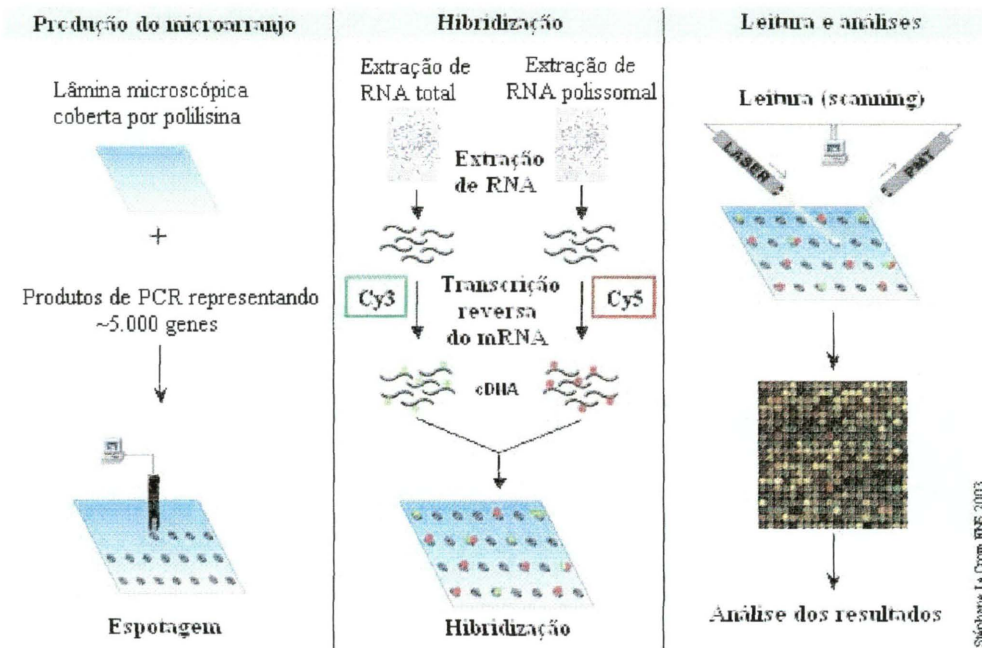


Figura 9 – Representação esquemática das etapas da hibridação competitiva em microarrayo de DNA (modificado).

#### 4. RESULTADOS

Os polissomos, alvos desse estudo, foram obtidos de duas maneiras utilizando as formas epimastigotas de *T. cruzi*. Por um lado, foi seguido o protocolo utilizado em nosso laboratório (GOLDENBERG, 1985) e, por outro lado, o protocolo usado por BREMS *et al.* (2005).

As duas metodologias de extração de polissomos apresentam algumas diferenças. A composição dos tampões utilizados e a concentração de sais são variáveis quando comparados os protocolos. O tampão utilizado no protocolo de GOLDENBERG *et al.* (1985) é hipotônico, visto a baixa concentração de sais. Já o tampão utilizado por BREMS *et al.* (2005) não apresenta esta característica, uma vez que utiliza 120 mM de cloreto de sódio (tabela 1). Além disso, uma vez feita a lise, pode-se observar ao microscópio ótico que os parasitas lisados pelo protocolo de GOLDENBERG (1985) se mostram mais intactos (dado não mostrado), com um aspecto típico de “fantasmas” em comparação aos parasitas lisados pelo protocolo de BREMS (2005).

Para a sedimentação dos polissomos, o protocolo de GOLDENBERG (1985) utiliza um colchão de sacarose 2 M, ausente no protocolo de BREMS (2005). Além disso, a velocidade de ultracentrifugação é muito maior pelo protocolo de Goldenberg e o tempo é mais longo (tabela 1). Após a extração dos polissomos através das duas técnicas, os mesmos foram analisados em gradientes de sedimentação em sacarose e em microarranjos de DNA.

		Protocolo por Goldenberg	Protocolo por Brems
		CONCENTRAÇÃO FINAL	CONCENTRAÇÃO FINAL
COMPOSIÇÃO DO TAMPÃO	Tris-HCl pH 7,5	10 mM	20 mM
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM	2 mM
	NaCl	10 mM	120 mM
	β-mercaptoetanol	5 mM	—
	Cicloheximida	10 µg/mL	100 µg/mL
	Heparina	20 µg/mL	10 mg/mL
	DTT	—	1 mM
	PMSF	1 mM	1 mM
COLCHÃO DE SACAROSE 2 M	SIM	NÃO	
VELOCIDADE DE ULTRACENTRIFUGAÇÃO	192.000 x g	75.000 x g	
TEMPO DE ULTRACENTRIFUGAÇÃO	2 h	35 min	

Tabela 1 – Diferenças entre o protocolo de GOLDENBERG *et al.* (1985) e o de BREMS *et al.* (2005).

## **Comparações usando gradientes de sacarose**

Os polissomos foram aplicados sobre gradientes de sacarose exponenciais (15-55%) e ultracentrifugados por duas horas. Após isso, os gradientes foram fracionados, coletados e analisados por espectrofotometria a 254 nm pelo sistema ISCO de gradiente de densidade programável. Para cada protocolo, foi feito um gradiente controle, onde foi adicionado EDTA, um agente quelante de cátions bivalentes que provoca a dissociação dos polissomos.

As análises comparativas entre os diferentes protocolos foram realizadas a partir dos gráficos obtidos (gráficos 1, 2, 3, 4). Este experimento foi realizado três vezes com resultados muito semelhantes.

Utilizando o protocolo de GOLDENBERG *et al.* (1985) sem adição de EDTA, observamos um pico que corresponde aos monossomos e dois menores anteriores que correspondem às subunidades 40S e 60S, respectivamente. É possível diferenciar claramente picos de polissomos com 2 a 10 ribossomos (gráfico 1).

Utilizando o protocolo de BREMS *et al.* (2005) sem adição de EDTA, observamos que o pico de monossomos é proporcionalmente maior em relação àquele obtido no gráfico 1. Além disso, podemos observar que há pelo menos um pico adjacente aos picos das subunidades ribossomais. Polissomos contendo de 2 a 10 ribossomos foram facilmente observados com a utilização de este protocolo (gráfico 2).

A adição de EDTA às frações obtidas por ambos protocolos eliminou os picos correspondentes aos polissomos (gráficos 3 e 4). Em consequência, as subunidades 40S e 60S que formavam os polissomos se concentram em dois picos maiores, e praticamente indistinguíveis, na parte leve do gradiente quando comparado com o observado não adicionando o EDTA.

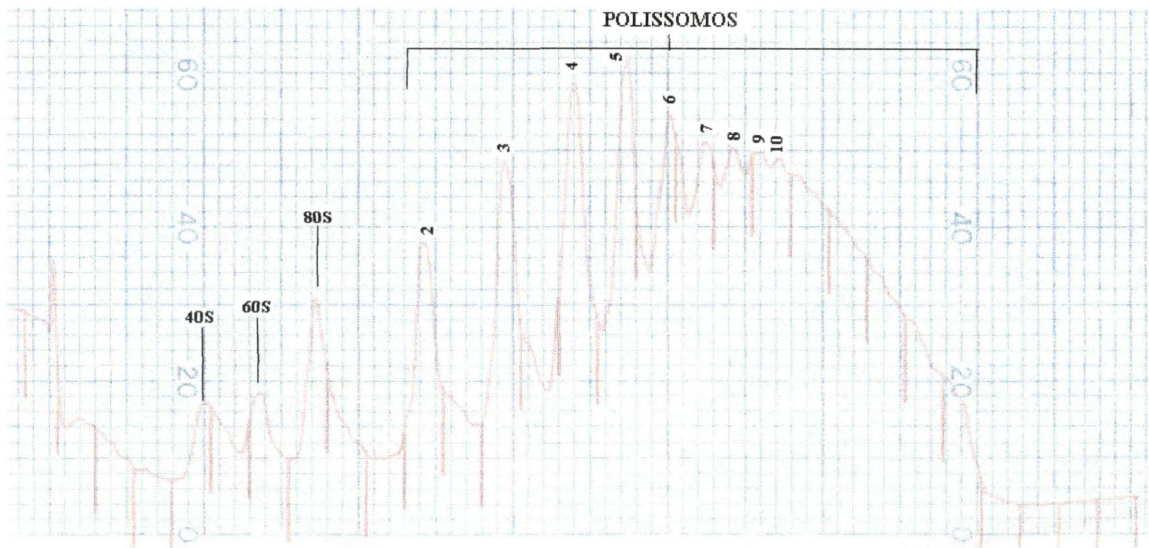


Gráfico 1 – Gráfico representando o perfil de polissomos obtidos pelo protocolo usado por GOLDENBERG *et al.* (1985) sem adição de EDTA. Estão indicados os picos referentes às subunidades 40S e 60S e os monossomos (80S). Os números (2 a 10) representam o número de ribossomos associados ao mRNA.

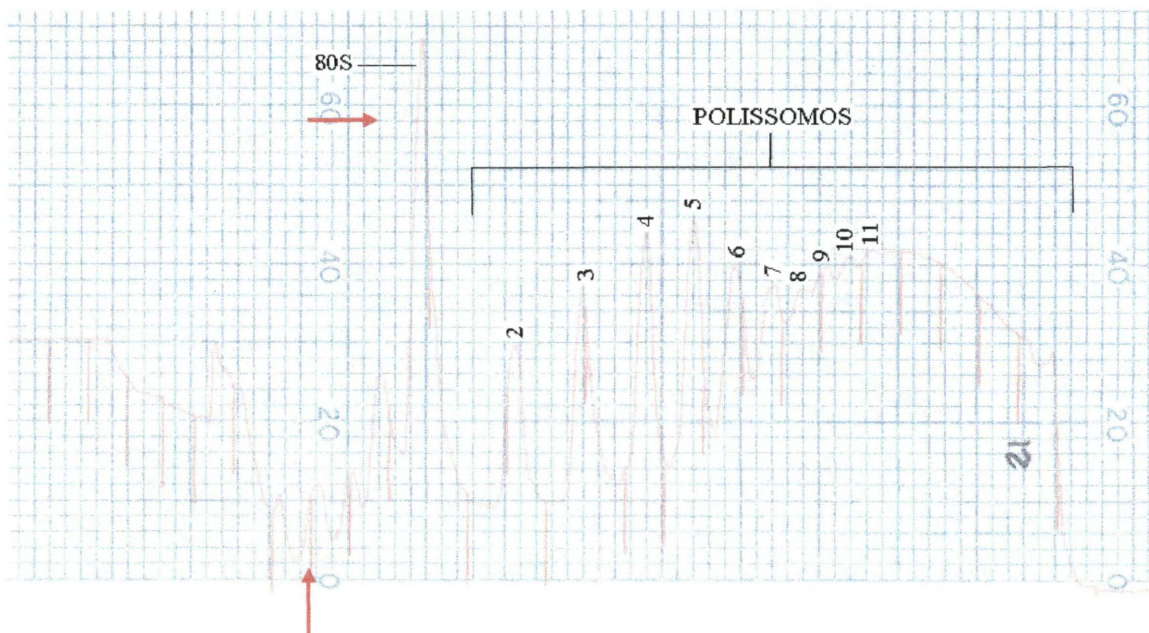


Gráfico 2 – Gráfico representando o perfil de polissomos obtidos pelo protocolo usado por BREMS *et al.* (2005) sem adição de EDTA. As setas indicam as diferenças com relação ao protocolo de GOLDENBERG *et al.* (1985).

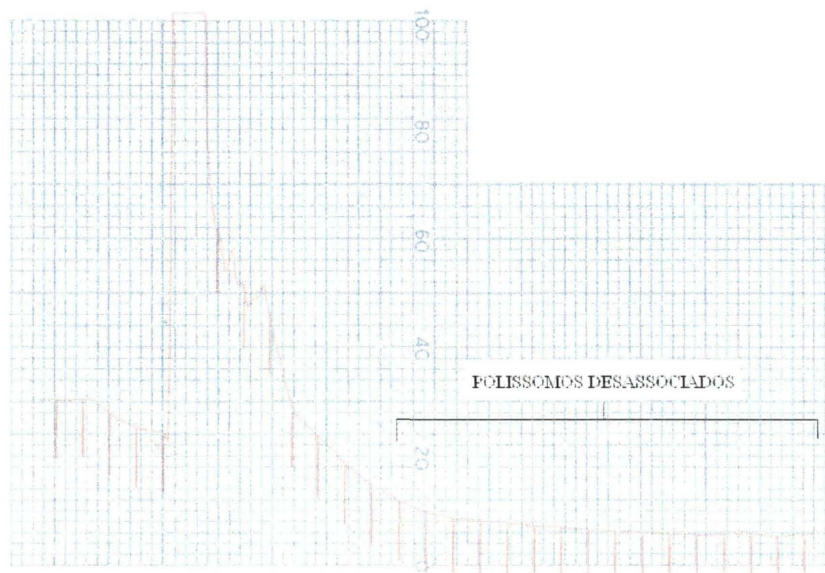


Gráfico 3 – Gráfico representando o perfil de polissomos obtidos pelo protocolo usado por GOLDENBERG *et al.* (1985) com adição de EDTA. Observa-se que os polissomos desaparecem, uma vez que o EDTA dissocia as subunidades ribossômicas. Com isso, as subunidades dissociadas dos polissomos se acumulam e os picos que correspondem às subunidades 40S e 60S ficam maiores, e praticamente indistinguíveis, do que os observados sem tratamento de EDTA.

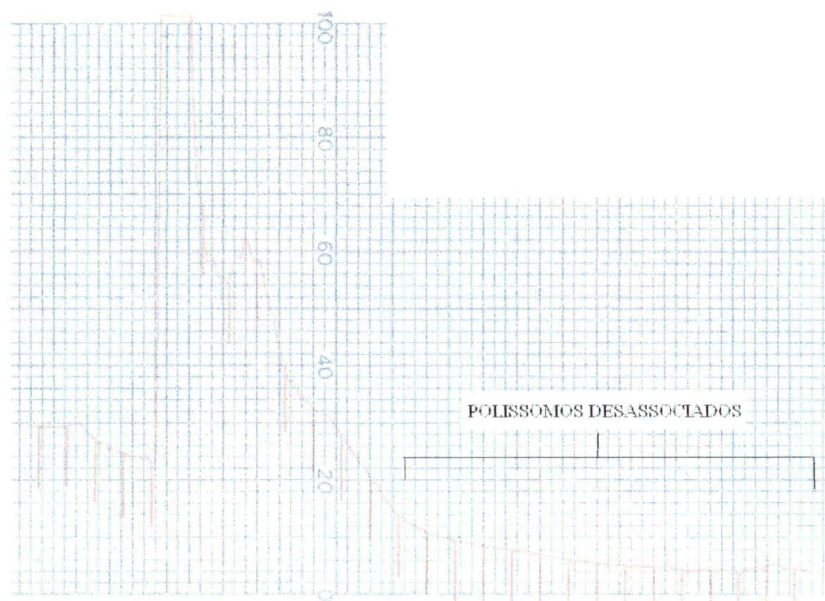


Gráfico 4 – Gráfico representando o perfil de polissomos obtidos pelo protocolo usado por BREMS *et al.* (2005) com adição de EDTA. O perfil é semelhante ao do gráfico 3.

## Comparações através da técnica de microarranjo

Para as hibridações realizadas, foi utilizado o microarranjo versão 4 produzida no Instituto de Biologia Molecular do Paraná. A arquitetura do microarranjo (versão 4.0) utilizado nas hibridações pode ser observada na figura 10.

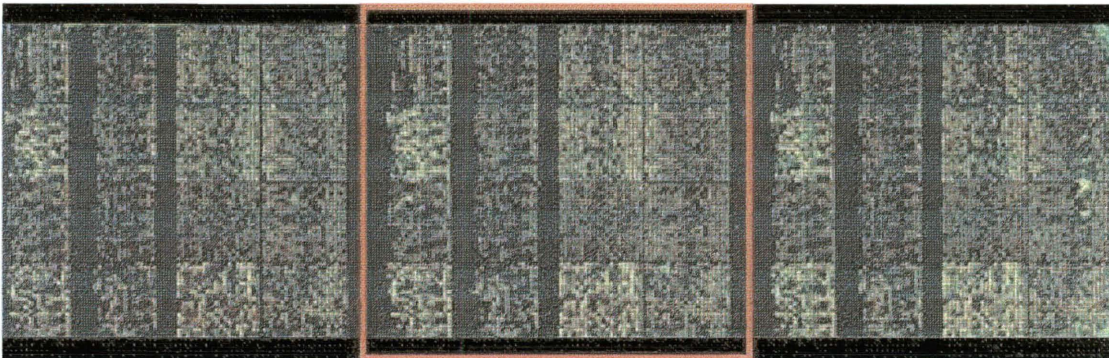


Figura 10 – Aspecto geral da lâmina do microarranjo, com as três réplicas de sua unidade básica com aproximadamente 6.000 sondas carimbadas, após hibridação com amostras de DNA genômico de *Trypanosoma cruzi*. Em destaque, está a unidade básica do microarranjo, com 6.198 sondas carimbadas, distribuídas em 16 setores, cada um com aproximadamente 400 *spots*.

Devido à complexidade e redundância da montagem atual do genoma de *T. cruzi*, é possível fazer somente uma estimativa dos genes distintos que são reconhecidos por essas sondas. Nossas estimativas atuais demonstram um número aproximado de 4.500 genes.

Para realizar os ensaios de marcação e hibridação competitiva, os RNAs foram extraídos de epimastigotas de *T. cruzi*. Foram utilizados RNAs totais, RNAs polissomais obtidos pelo protocolo de GOLDENBERG *et al.* (1985) e RNAs polissomais obtidos pelo protocolo de BREMS *et al.* (2005). Estes RNAs foram, então, amplificados através de reações de transcrição *in vitro*. Somente após esta reação, foram gerados os cDNAs marcados com fluoróforos.

As lâminas com as sondas de *Trypanosoma cruzi* foram submetidas a ensaios de hibridação, com as amostras marcadas com os fluoróforos, dCTP-Cy-3 e dCTP-Cy-5. Os experimentos foram realizados duas vezes com amostras provenientes dos mesmos parasitas, porém obtidos de extrações independentes. O RNA total foi utilizado neste trabalho apenas como uma referência para obter, assim, as diferenças entre os polissomais.

As hibridações competitivas foram feitas da seguinte maneira:

a. cDNA derivado de RNAs associados a polissomos de epimastigotas pelo protocolo de GOLDENBERG *et al.* (1985) (marcação com Cy-5) e cDNA derivado de RNA total (marcação com Cy-3), e;

b. cDNA derivado de RNAs associados a polissomos de epimastigotas pelo protocolo de BREMS *et al.* (2005) (marcação com Cy-5) e cDNA derivado de RNA total (marcação com Cy-3).

A figura 11 mostra um esquema representativo das hibridações.

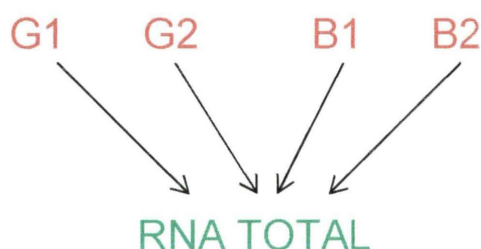


Figura 11 – Arranjo de hibridações. Cada flecha representa uma hibridação; as amostras de RNA total foram marcadas com Cy3 (ponta da flecha) e as amostras de RNA polissomal, com Cy5 (base da flecha). G1 e G2 – RNA polissomal obtido pelo protocolo de GOLDENBERG *et al.* (1985); B1 e B2 - RNA polissomal obtido pelo protocolo de BREMS *et al.* (2005).

Uma representação gráfica da intensidade do sinal emitido por cada fluoróforo pode ser vista na figura 12, sendo que a cor está associada à intensidade da fluorescência. A fluorescência mais fraca corresponde a uma cor azul e, conforme ela vai ficando mais intensa, as cores associadas são o verde, o amarelo, o vermelho e o branco (indicativo de saturação do sinal).

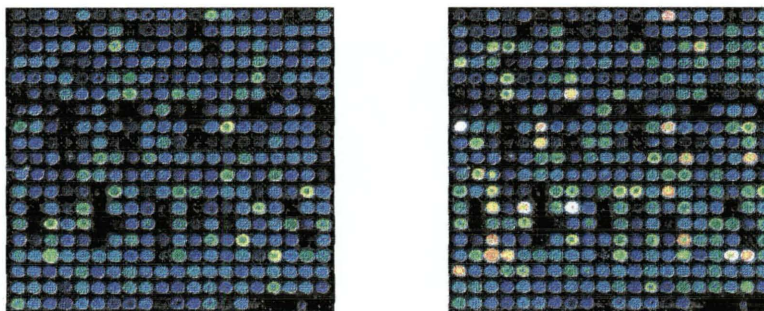


Figura 12 – Intensidade de fluorescência em uma seção da lâmina de microarranjo. Esquerda: imagem da intensidade do Cy3; Direita: imagem da intensidade do Cy5.

As imagens resultantes da leitura dos sinais obtidos foram analisadas usando o *software Spot* (BUCKLEY & YANG, 2000; YANG, BUCKLEY e SPEED, 2001). Os valores obtidos foram, então, tratados e normalizados pelo *software R* e *LIMMA* (figura 13).

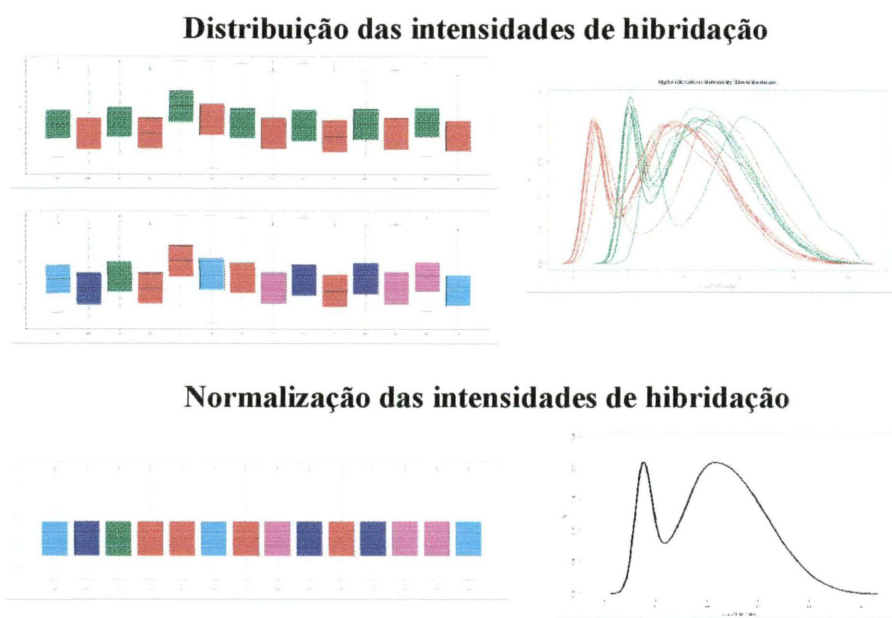


Figura 13 – Exemplo de normalização dos dados de hibridação (PAVONI, 2005).

Os dados normalizados foram clusterizados hierarquicamente. Nos diagramas de clusterização, a cor amarela foi arbitrariamente atribuída para o fluoróforo *Cy-5* e para o *Cy-3*, a cor foi azul. Assim, nos diagramas de clusterização a seguir, a cor amarela indica que o RNA que hibrida com essa sonda está mais representado na amostra de RNA polissomal utilizada. A cor azul indica que o RNA que hibrida com essa sonda está mais representado na amostra de RNA total utilizada e a cor preta indica que estão igualmente representados em ambas amostras de RNA.

Como resultado das hibridações, obtivemos o perfil geral dos *clusters* (figura 14). De cima para baixo temos a primeira réplica de Brems, a segunda réplica de Brems, a primeira réplica de Goldenberg (IBMP 1) e a segunda réplica de Goldenberg (IBMP 2).

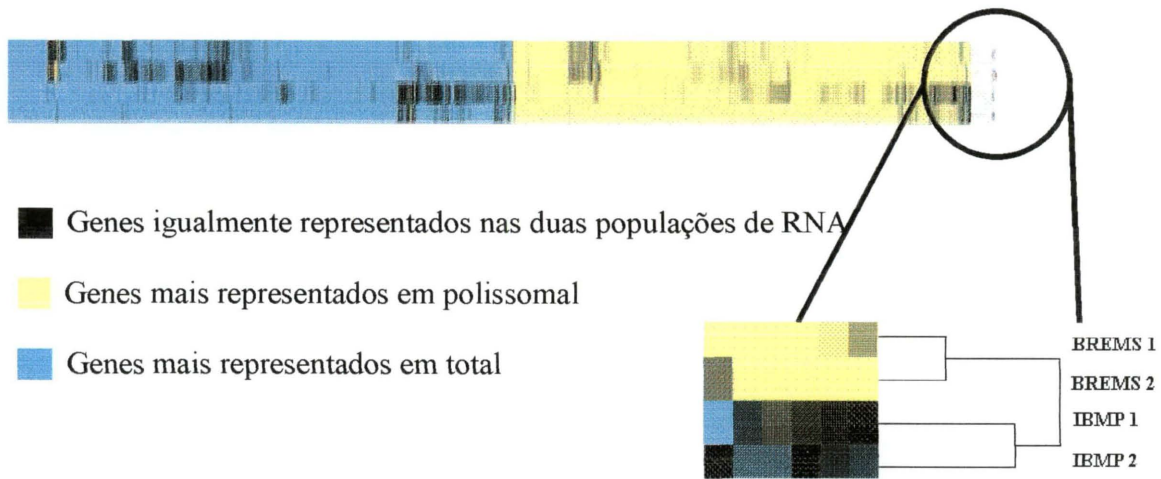


Figura 14 – Agrupamento hierárquico das sondas por ambos protocolos numa visão geral.

Através das análises das imagens da hibridação competitiva do microarranjo de *Trypanosoma cruzi*, um dendograma foi obtido das análises de clusterização (figura 14 a 17 - direita). Este mostra que as réplicas dos experimentos são mais semelhantes entre si do que entre os protocolos. Porém, em termos gerais, não existem maiores diferenças dos perfis utilizando as diferentes metodologias.

Após a análise geral, pudemos observar alguns *clusters* de genes que apresentavam divergências entre os métodos de isolamento (figuras 15 a 17).

Os mRNAs correspondentes a um grupo de genes apresentam-se mais representados na fração polissomal com o protocolo de Goldenberg. Porém, com o protocolo de Brems, observamos que os RNAs dos genes desse *cluster* estão, em sua maioria, igualmente representados tanto na fração total quanto na polissomal (figura 15).

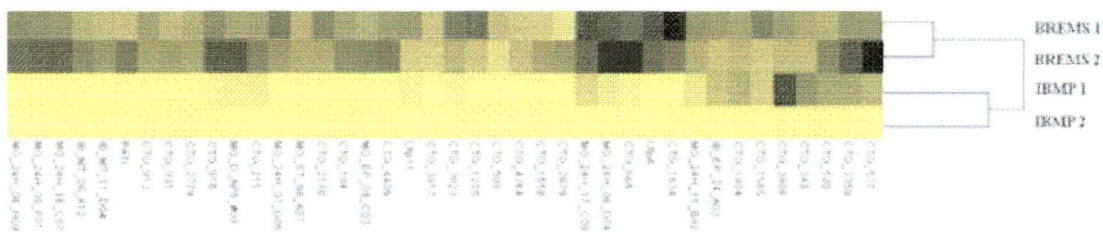


Figura 15 – “Vista” parcial do agrupamento hierárquico das sondas no protocolo utilizado por BREMS *et al* (2005) e no protocolo utilizado em nosso laboratório (Goldenberg, 1985).

Os mRNAs correspondentes a alguns genes estão mais representados na fração total para um protocolo e na fração polissomal para o outro protocolo. Porém, o número de genes onde isso ocorre é muito pequeno em relação ao número total de genes (Figura 16).

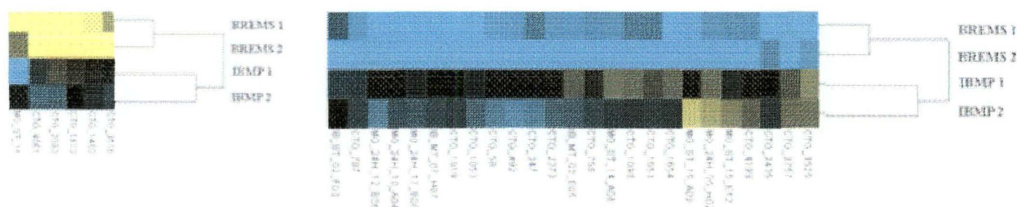


Figura 16 – “Vista” parcial do agrupamento hierárquico das sondas no protocolo utilizado por BREMS *et al* (2005) e no protocolo utilizado em nosso laboratório (Goldenberg, 1985).

Na figura 17, os mRNAs correspondentes a alguns genes estão mais representados na fração total para o protocolo de Goldenberg. Porém, utilizando o protocolo de Brems, esses genes são detectados também na fração polissomal.

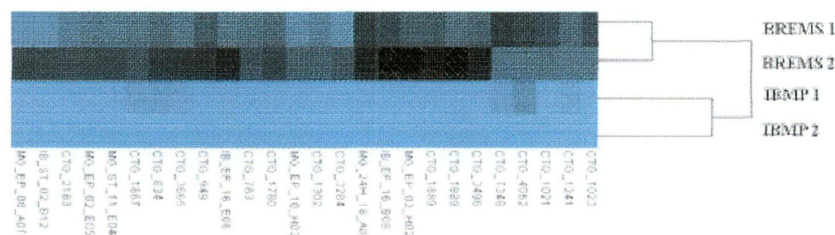


Figura 17 – “Vista” parcial do agrupamento hierárquico das sondas no protocolo utilizado por BREMS *et al* (2005) e no protocolo utilizado em nosso laboratório (Goldenberg, 1985).

Depois da obtenção dos agrupamentos hierárquicos, foi realizada uma contagem das sondas onde os mRNAs correspondentes estavam igualmente expressos em ambos protocolos, mais expressos no protocolo de Brems e mais expressas no protocolo de Goldenberg (IBMP) – tabela 2. O “resto” corresponde ao número de sondas cujos mRNAs apresentaram comportamento diferente dentro das réplicas (entre Brems 1 e 2 ou entre IBMP 1 e 2). Três limites foram usados para considerar uma sonda igualmente ou diferencialmente expressa. Visto que na maioria dos trabalhos se considera um *fold change* de 2 (variação igual a 100%), no presente trabalho, foi

considerado o limite de 75%, ou seja, uma sonda foi considerada igualmente expressa em Brems e IBMP se tivesse um valor de sinal com margem de 75% para mais ou para menos. Para o limite estabelecido, foram obtidas aproximadamente 5.500 sondas igualmente expressas entre os protocolos, ou seja, este valor corresponde a 88% das sondas. Um número pequeno de sondas (1%) apresentou-se mais expressa no protocolo de Brems e um número menor ainda (0,6%) no protocolo de Goldenberg. As inconsistências entre as réplicas representaram 10% das sondas.

<b>Contagem</b>			
	<b>50%</b>	<b>75%</b>	<b>100%</b>
<b>Igual</b>	4062	5641	6021
<b>Up Brems</b>	248	72	37
<b>Up IBMP</b>	233	35	7
<b>Resto</b>	1857	652	335

Tabela 2 – Contagem do número de sondas onde os mRNAs correspondentes estavam igualmente expressas em ambos protocolos, mais expressas no protocolo de Brems, mais expressos no protocolo de Goldenberg (IBMP) e as inconsistências entre as réplicas (resto). As contagens foram feitas utilizando três valores como limite para considerar as sondas igualmente expressas ou não. Em destaque, está o limite considerado para as análises.

## 5. DISCUSSÃO

Sendo eucariotos que divergiram precocemente, os tripanosomatídeos têm atraído a atenção dos parasitologistas, não somente por sua relevância médica, mas também porque eles apresentam muitas características distintas nos mecanismos e no controle da expressão gênica. Algumas das características não comuns encontradas nesses organismos incluem transcrição policistrônica, *trans-splicing* do pré-mRNA e transcrição de genes codificadores de proteínas pela RNA polimerase I (TEIXEIRA & ROCHA, 2003).

A regulação da expressão gênica é uma etapa crucial para a manutenção da homeostase celular. O controle da expressão gênica pode ocorrer em várias etapas e, na maioria dos organismos, acredita-se que o controle na iniciação da transcrição gênica é a forma predominante de regulação da maioria dos genes. Assim, nos organismos onde este controle tem um papel preponderante, diferenças no transcriptoma são observadas no conjunto total de RNA, como em mamíferos e leveduras (VILLARD, 2004). Outros controles podem atuar mais tardiamente na via de DNA para proteína para modular a quantidade de produtos gênicos. Estudos em tripanosomatídeos indicam que o controle da expressão gênica ocorre pós-transcricionalmente, o qual opera depois que a RNA polimerase tenha se ligado no promotor do gene e começado a síntese de RNA. Caso esta regulação esteja envolvendo a degradação de RNA, isto seria percebido com uma análise da fração total do mRNA. Alguns estudos indicam que o mRNA de vários genes permanece estável no citoplasma e o controle da tradução ocorre através do acesso aos ribossomos – mobilização polissomal. Nestes casos, a comparação entre populações de RNA total de diferentes tipos celulares não revelaria diferenças na expressão gênica. Ilustrando esta regulação polissomal, tem-se o gene que codifica uma proteína com domínios de ligação à quitina (DALLAGIOVANNA *et al.*, 2001) e o gene da metacicloenina (ÁVILA *et al.*, 2001). Os resultados referentes ao mRNA polissomal demonstram a importância da avaliação dessa fração do transcriptoma no estudo da diferenciação de *Trypanosoma cruzi*: na metacicloênese, o número de genes diferencialmente expressos chega a ser 10 vezes maior em mRNA polissomal do que em mRNA total (PROBST, 2005).

Dada a importância da fração polissomal em tripanosomatídeos, o presente trabalho comparou as duas metodologias de extração de polissomos, utilizando diferentes técnicas de análises, como gradientes de sacarose e hibridação competitiva em microarranjos de DNA. Diferentes metodologias utilizadas para o isolamento de polissomos podem estar extraindo juntamente RNAs provenientes de outras frações. Conseqüentemente, análises como genômica funcional podem estar levando a resultados divergentes.

Uma das diferenças entre os protocolos é a utilização de um tampão hipotônico no protocolo de Goldenberg e de um não-hipotônico no de Brems. Além disso, é utilizado um colchão de sacarose no protocolo de Goldenberg, ausente no de Brems. Porém, quando analisamos os protocolos por gradientes de sacarose utilizando EDTA, observamos que as frações correspondentes aos polissomos desaparecem, ou seja, os dois protocolos resultam em uma fração enriquecida em polissomos. Embora o protocolo de Goldenberg utilize colchão de sacarose, a falta deste no protocolo de Brems estaria sendo compensada pela menor velocidade de ultracentrifugação e o tempo reduzido, fazendo com que apenas as moléculas mais pesadas desçam.

As comparações usando gradientes de sacarose não mostraram diferenças maiores. Porém, os gráficos obtidos pelo protocolo de Brems mostraram um número maior de picos antes dos monossomos. Estes podem corresponder às subunidades dos ribossomos da mitocôndria, já que os valores de coeficiente de sedimentação de uma partícula ribossomal mitocondrial se encontram, dependendo das condições, entre 17,5S e 60S em tripanosomatídeos (TITTAWELLA *et al.*, 2003). Além disso, os monossomos que contaminam a fração polissomal é proporcionalmente maior quando utilizado o protocolo de Brems. Uma lise mais forte pode estar sendo realizada ao utilizar o protocolo de Brems e, conseqüentemente, há um rompimento da membrana de organelas como a mitocôndria, uma vez que observações ao microscópio ótico após a lise mostram parasitas mais destruídos (dado não mostrado). Assim, estes podem ser indícios de contaminação, comprometendo a pureza do RNA polissomal e, conseqüentemente, análises como a genômica funcional.

Uma outra abordagem foi utilizada para analisar as pequenas diferenças encontradas entre os protocolos observadas nos perfis obtidos em gradientes de sacarose. Para comparar as frações polissomais obtidas por ambas metodologias, a técnica do microarranjo foi aplicada. As análises

mostraram algumas diferenças entre os protocolos e as réplicas (figuras 15 a 17). Porém, quando feita uma contagem dos genes que estavam se comportando igualmente entre os diferentes protocolos, mais de 5.000 sondas foram encontradas (tabela 2).

Trabalhos realizados em nosso laboratório têm demonstrado o fenômeno de mobilização polissomal em estudos de alguns genes, como a metacicloproteína (ÁVILA *et al.*, 2001), *cblp1* (DALLAGIOVANNA *et al.*, 2001), *Tclmp4* (FRAGOSO *et al.*, 2003) e em nível genômico, em grande escala (PROBST, 2005) e em menor escala (PAVONI, 2005). Porém, no trabalho de BREMS *et al.* (2005), de onde foi retirado um dos protocolos para este trabalho, não foi observado este fenômeno nas cepas analisadas de *Trypanosoma brucei*. Assim, levantou-se a hipótese de que as diferentes metodologias utilizadas para extração de polissomos poderiam estar levando a diferenças nos resultados observados pelos dois grupos de pesquisa. Este trabalho demonstrou que os diferentes protocolos de extração de polissomos não estariam levando a resultados diferentes ou pelo menos não seria a única fonte de variação. Outros fatores, portanto, estariam envolvidos, como, por exemplo, diferenças entre os organismos, uso de formas de desenvolvimento diferentes e diferenças na confecção do microarranjo.

Levando em consideração as diferenças entre os organismos, trabalhos recentes, comparando os genomas, mostram a alta proximidade entre *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma cruzi*. Um alinhamento das seqüências de aminoácidos de uma grande amostra de três clusters de genes ortólogos (que define o *core* do proteoma dos *TriTryp*) revelou 57% de identidade entre *T. brucei* e *T. cruzi*, refletindo relações filogenéticas muito próximas e esperadas (EL-SAYED *et al.*, 2005). Os tripanosomatídeos possuem diversas semelhanças biológicas e o controle da expressão gênica é, muito provavelmente, uma delas. Estudos realizados em regulação da expressão gênica revelam características comuns entre as duas espécies. Os mecanismos de regulação descritos para *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma cruzi* são os mesmos (CLAYTON, 2002). Ambos organismos possuem transcrição de mRNAs essencialmente policistrônica (JOHNSON *et al.*, 1987; KOOTER *et al.*, 1987), posterior processamento dos transcritos primários por *trans-splicing* (SUTTON & BOOTHROYD, 1986), indicando que a regulação da expressão gênica ocorra pós-transcricionalmente (LODISH *et al.*, 2000). Ainda que as semelhanças entre os tripanosomatídeos pareçam ser maiores que as diferenças, não podemos descartar a possibilidade

de que as diferenças nos resultados de nosso laboratório e de BREMS *et al.* (2005) sejam causadas, pelo menos parcialmente, por diferenças biológicas inerentes a cada organismo.

Também deve ser considerado que as formas comparadas no trabalho de Brems representam etapas bem definidas do ciclo de *T. brucei*. Entretanto, nosso grupo avaliou a expressão diferencial em mRNA total e polissomal entre as quatro formas distintas de *T. cruzi* (PAVONI, 2005) e entre as formas intermediárias (PROBST, 2005).

Uma outra fonte de diferenças entre os resultados de BREMS *et al.* (2005) e os resultados obtidos em nosso laboratório, e talvez a mais importante, pode ser reflexo do tipo de microarranjo utilizado nos dois trabalhos. Em BREMS *et al.* (2005), foi utilizado um microarranjo genômico, enquanto em nosso laboratório foi utilizado um microarranjo de cDNA. O microarranjo utilizado no trabalho de BREMS *et al.* (2005) é formado por sondas obtidas a partir de fragmentos de DNA genômico de 1,8 a 2,5 kb, os quais apresentaram sistematicamente um número menor de genes diferencialmente expressos nos trabalhos de genômica funcional de tripanosomatídeos, quando comparados com os de cDNA, como é o caso de nosso microarranjo. A desvantagem do microarranjo genômico em análises de genômica funcional é que no microarranjo genômico estão representados segmentos de DNA repetidos, seqüências intergênicas e até mais de um gene por segmento.

Embora algumas poucas diferenças possam ser observadas a partir dos resultados obtidos, podemos concluir que os polissomos obtidos pelos dois protocolos mostraram-se semelhantes. As divergências nos resultados de genômica funcional entre o nosso laboratório e o trabalho de BREMS *et al.* (2005) são, provavelmente, um fenômeno multifatorial, onde os protocolos de extração de polissomos têm uma contribuição mínima.

Um maior número de réplicas biológicas e experimentais, assim como uma comparação direta dos RNAs polissomais obtidos por ambos protocolos utilizando microarranjo, está sendo planejado. Seria interessante realizar comparações entre os protocolos utilizando outras formas evolutivas e outras condições, para talvez esclarecer um dos aspectos que poderiam estar levando a diferenças nos resultados.

## REFERÊNCIAS

- Agabian, N. (1990). **Trans-splicing of nuclear pre-mRNAs**. *Cell*, 61: 1157-1160.
- Akopyants, N. S.; Matlib, R. S.; Bukanova, E. N.; Smeds, M. R.; Brownstein, B. H.; Stormo, G. D.; Beverley, S. M. (2004). **Expression profiling using random genomic DNA microarrays identifies differentially expressed genes associated with three major developmental stages of the protozoan parasite *Leishmania major***. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 136 (1): 71-86.
- Alberts, B.; Johson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. (eds.). **Molecular biology of the cell**. 4<sup>a</sup> ed. New York: Garland Science, 2002. p. 469-546.
- Almeida, R.; Ferguson, M. A.; Schenkman, S.; Travassos, L. R. (2004). **Lytic anti-alpha-galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas disease recognize novel O-linked oligosaccharides on mucin-like glycosil-phosphatidylinositol-anchored glycoproteins of *Trypanosoma cruzi***. *Biochemistry Journal*, 304: 793-802.
- Andrade, Z. A.; Andrade, S. G.; Oliveira, G. B.; Alonso, D. R. (1978). **Histopathology of the conducting tissue of the heart in Chagas' myocarditis**. *Amer Heart J.*, 95: 316-324.
- Ávila, A. R., Yamada-Ogatta, S. F., da Silva Monteiro, V., Krieger, M. A., Nakamura, C. V., de Souza, W., Goldenberg, S. (2001). **Cloning and characterization of the metacylogenin gene, wich is specifically expressed during *Trypanosoma cruzi* metacylogenesis**. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 117: 169-177.
- Ávila, A. R., Dallagiovanna, B., Yamada-Ogatta, S. F., Monteiro-Goes, V., Fragoso, S. P., Krieger, M. A., Goldenberg, S. (2003). **Stage-specific gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacylogenesis**. *Genet. Mol. Res.*, 2 (1): 159-168.
- Baptista, C. S.; Vencio, R. Z.; Abdala, S.; Valadares, M. P.; Martins, C.; Bragança Pereira, C. A.; Zingales, B. (2004). **DNA microarrays for comparative genomics and analysis of gene expression in *Trypanosoma cruzi***. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 138 (2): 183-194.
- Beare, R.; Buckley, M. (2004). **Spot: cDNA microarray image analysis users guide**. Disponível em <<http://spot.cmis.csiro.au/spot/doc/Spot.pdf>>.

- Berberof, M.; Vanhame, L. & Pays, E. (1995). ***Trypanosoma brucei*: a preferential splicing at the inverted polyadenylation site of the VSG mRNA provides further evidence for coupling between trans-splicing and polyadenylation.** Exp. Parasitol., 80: 563-567.
- Bolstad, B. M.; Irrizary, R. A.; Astrand, M.; Speed, T. P. (2003). **A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias.** Bioinformatics, 19 (2): 144-148.
- Brems, S., Guilbride, D. L., Gundlesdodjir-Planck, D., Busold, C., Luu, V., Schanne, M., Hoheisel, J., Clayton, C. (2005). **The transcriptome of *Trypanosoma brucei* lister 427 and TREU 927 bloodstream and procyclic trypomastigotes.** Mol. Biochemical Parasitol., 139: 163-172.
- Bregues, M.; Teixeira, D.; Parker, R. (2005). **Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies.** Science, 310: 486-489.
- Brown, S. D.; Huang, J. & Van der Ploeg, L. H. (1992). **The promoter for the procyclic acidic repetitive protein (PARP) genes of *Trypanosoma brucei* shares features with RNA polymerase I promoters.** Mol. Cell Biol., 12: 2644-2652.
- Buckley, M.; Yang, J. (2000). **Spot user's manual.** Disponível em: <http://spot.cmis.csiro.au/spot/spotmanual.php>.
- Camargo, E. P. (1964). **Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*.** Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 6: 93-100.
- Campbell, D. A.; Sturm, N. R.; Yu, M. C. (2000). **Transcription of the kinetoplastid spliced leader RNA gene.** Parasitol. Today, 16 (2): 78-82.
- Cançado, J. R. Tratamento etiológico da doença de Chagas pelo benzonidazol. In: Brener, Z.; Andrade, Z.; Barral Neto, M. (eds.). **O *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas.** 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- Carvalho, E. F.; de Castro, F. T.; Rondinelli, E.; Soares, C. M. & Carvalho, J. F. (1990). **HSP 70 gene expression in *Trypanosoma cruzi* is regulated at different levels.** J. Cell. Physiol., 143 (3): 439-44.

- Chagas, C. (1909). **Nova tripanosomiase humana**: estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* gen.n.sp., agente etiológico de nova entidade mórbida no homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 1: 159-218.
- Clayton, C. E.; Fueri, J. P.; Itzhaki, J. E.; Bellofatto, V.; Sherman, D. R.; Wisdom, G. S.; Vijayasathy, S.; Mowatt, M. R. (1990). **Transcription of the procyclic acidic repetitive protein genes of *Trypanosoma brucei***. Mol Cell Biol., 10(6): 3036-47.
- Clayton, C. E. (2002). **Life without transcription control? From fly to man and back again**. EMBO J., 21 (8): 1881-1888.
- Contreras, V. T.; Araujo-Jorge, T. C.; Bonaldo, M. C.; Thomas, N.; Barbosa, H. S.; Meirelles, M. N. L. & Goldenberg, S. (1988). **Biological aspects of the Dm28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 83 (1): 123-133.
- Cornelissen, A. W.; Evers, R.; Grondal, E. J.; Hammer, A.; Jess, W. & J, K. ö. (1989). **Transcription and RNA polymerases in *Trypanosoma brucei***. Acta Leiden., 58: 75-96.
- Cornelissen, A. W., Backes, S.; Evers, R.; Grondal, E. J.; Jess, W. & J, K. ö. (1990). **Transcription analysis in *Trypanosoma brucei***. Biochem. Soc. Trans., 18: 710-714.
- Coughlin, B. C.; Teixeira, S. M.; Kirchhoff, L. V. & Donelson, J. E. (2000). **Amastin mRNA abundance in *Trypanosoma cruzi* is controlled by a 3'-untranslated region position-dependent cis-element and an untranslated region-binding protein**. J. Biol. Chem., 275 (16): 12051-12060.
- Dallagiovanna, B.; Planazet-Menut, C.; Ogatta, S. F.; Ávila, A. R.; Krieger, M. A. & Goldenberg, S. (2001). ***Trypanosoma cruzi*: a gene family encoding chitin-binding-like proteins is posttranscriptionally regulated during metacyclogenesis**. Exp. Parasitol., 99 (1): 7-16.
- De Souza, W. (1984). **Cell biology of *Trypanosoma cruzi***. Int. Ver. Citol., 86: 197-283.
- Dias, J. C. P. Epidemiologia. In: Brener, Z.; Andrade, Z.; Barral Neto, M. (eds.). **O *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p 48-74.

- Diehl, S.; Diehl, F.; El-Sayed, N. M.; Clayton, C.; Hoheisel, J. D. (2002). **Analysis of stage-specific gene expression in the bloodstream and the procyclic form of *Trypanosoma brucei* using a genomic DNA-microarray.** Mol. Biochem. Parasitol., 123 (2): 115-23.
- Dudoit, S.; Gentleman, R. C.; Quackenbush, J. (2003). **Open source software for the analysis of microarray data.** Biotechniques Supplements, Microarrays and Cancer: research and applications, p. 45-51.
- Dudoit, S.; Yang, Y. H. (2003). Bioconductor R packages for exploratory analysis and normalization of cDNA microarray data. In: Parmigiani, G.; Garret, E. S.; Irizarry, R. A.; Zeger, S. L. (eds.) **The analysis of Gene Expression Data: methods and software.** New York: Springer, p. 73-101.
- El-Sayed, N. M.; Myler, P. J.; Blandin, G.; Berriman, M.; Crabtree, J.; Aggarwal, G. (2005). **Comparative genomics of trypanosomatid parasitic Protozoa.** Science, 309: 404-409.
- Evers, R.; Hammer, A.; Köck, J.; Jess, W.; Borst, P.; Mémet, S. & Cornelissen, A. W. (1989). ***Trypanosoma brucei* contains two RNA polymerase II largest subunit genes with an altered C-terminal domain.** Cell, 56: 585-597.
- Fragoso, S. P.; Plazanet-Menut, C.; Carreira, M. A.; Motta, M. C.; Dallagiovana, B.; Krieger, M. A.; Goldenberg, S. (2003). **Cloning and characterization of a gene encoding a putative protein associated with U3 small nucleolar ribonucleoprotein in *Trypanosoma cruzi*.** Mol Biochem Parasitol., 126(1):113-7.
- Garcia, E. S.; & Azambuja, P. Fisiologia de Triatomíneos: desenvolvimento, reprodução e interação com *Trypanosoma cruzi*. In: Brener, Z.; Andrade, Z.; Barral Neto, M. (eds.). **O *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas.** 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p 41-47.
- Gillinger, G.; Bellofatto, V. (2001). **Trypanosome spliced leader RNA genes contains the first identified RNA polymerase II promoter in these organisms.** Nucleic. Acids Res., 29: 1556-1564.
- Goldenberg, S.; Contreras, V. T.; Salles, J. M.; Bonaldo, M. C.; Lima Franco, M. P. A.; Linss, J.; Lafaille, J.; Valle, D. & Morel, C. M. (1984). **Facts and hypothesis on *Trypanosoma cruzi* differentiation.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 79 (suppl): 39-44.

- Goldenberg, S., Salles, J. M., Contreras, V. T., Lima Franco, M. P. A., Katzin, A. M., Colli, W., Morel, C. (1985). **Characterization of messenger RNA from epimastigotes and metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi***. FEBS, 180(2): 265-270.
- Grondal, E. J.; Evers, R.; Kosubek, K. & Cornelissen, A. W. (1989). **Characterization of the RNA polymerases of *Trypanosoma brucei*: trypanosomal mRNAs are composed of transcripts derived from both RNA polymerase II and III**. EMBO J., 8: 3383-3389.
- Guimond, C.; Trudel, N.; Brochu, C.; Marquis, N.; El Fadili, A.; Peytavi, R. *et al.* (2003). **Modulation of gene expression in *Leishmania* drug resistant mutants as determined by targeted DNA microarrays**. Nucleic Acids Research, 31 (20): 5886-5896.
- Hehl, A.; Vassella, E.; Braun, R. & Roditi, I. (1994). **A conserved stem-loop structure in the 3' untranslated region of procyclin mRNAs regulates expression in *Trypanosoma brucei***. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 370-374.
- Hoare, C. A. & Wallace, F. G. (1966). **Developmental stages of trypanosomatid flagellate: a new terminology**. Nature (London), 212: 1385-1386.
- Ihaka, R.; Gentleman, R. C. (1996). **A language for data analysis and graphics**. Journal of Computational and Graphical Statistics, 5 (3): 299-314.
- Ivens, A. C.; Peacock, C. S.; Wortley, E. A.; Murphy, L.; Aggarwal, G.; Berriman, M.; Sisk, E.; Rajandream, M. A.; Adlem, E.; Aert, R.; Anupama, A.; Apostolou, Z.; Attipoe, P.; Bason, N.; Bauser, C.; Beck, A.; Beverley, S. M.; Bianchetti, G.; Borzym, K.; Bothe, G. *et al.* (2005). **The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major***. Science, 309 (5733): 436-42.
- Janz, L. & Clayton, C. (1994). **The PARP and rRNA promoters of *Trypanosoma brucei* are composed of dissimilar sequence elements that are functionally interchangeable**. Mol. Cell Biol., 14: 5804-5811.
- Jess, W.; Hammer, A. & Cornelissen, A. W. (1989). **Complete sequence of the gene encoding the largest subunit of RNA polymerase I of *Trypanosoma brucei***. FEBS, 249 (1): 123-128.

- Jonhson, P. J.; Kooter, J. M., & Borst, P. (1987). **Inactivation of transcription by UV irradiation of *T. brucei* provides evidence for a multicistronic transcription unit including a VSG gene.** *Cell*, 51: 273-81.
- Kock, J.; Evers, R. and Cornelissen, A. W. C. (1988). **Structure and sequence of the gene for the largest subunit of trypanosomal RNA polymerase III.** *Nucleic Acids Res.* 16: 8753–8772.
- Kooter, J. M. & Borst, P. (1984). **Alpha-amanitin-insensitive transcription of variant surface glycoprotein genes provides further evidence for discontinuous transcription in trypanosomes.** *Nucleic. Acids. Res.*, 12: 9457-9472.
- Kooter, J. M., Van der Spek, H. J., Wagter, R., d'Oliveira, C. E., Van der Hoeven, F., Jonson, P. J., and Borst, P. (1987). **The anatomy and transcription of a telomeric expression site for variant-specific surface antigens in *T. brucei*.** *Cell*, 51 (2): 261-72.
- Landfear, S. M. (2003). **Trypanosomatid transcription factors: waiting for Godot.** *PNAS*, 100 (1): 7-9.
- LeBowitz, J. H.; Smith, H. Q.; Rusche, L. & Beverley, S. M. (1993). **Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*.** *Genes Developt.*, 7: 996-1007.
- Lee, M. G.; Van der Ploeg, L. H. T. (1997). **Transcription of protein-coding genes in trypanosomes by RNA polymerase I.** *Annu. Rev. Microbiol.*, 51: 463-89.
- Levine, N. D.; Corliss, J. O.; Cox, F. E. G.; Deroux, G.; Grain, J.; Honigberg, B. M.; Leedale, G. F.; Loeblich, A. R.; Lom, F.; Lynn, D.; Merinfeld, E. G.; Page, F. C.; Poljansky, G.; Sprague, V.; Vavra, J. & Wallace, F. G. (1980). **A newly revised classification of the Protozoa.** *J. Protozool.*, 27: 37-58.
- Lodish, H.; Berk, A.; Lawrence Zipursky, S.; Matsudaira, P.; Baltimore, D. & Darnell, J. (2000). **In: *Molecular Cell Biology*. 4<sup>a</sup> ed. W. H. Freeman and Company.**
- Luo, S.; Marchesini, N.; Moreno, S. N. & Docampo, R. (1999). **A plant-like vacuolar H(+)-pyrophosphatase in *Plasmodium falciparum*.** *FEBS*, 431: 318-385.

- Maslov, D. A. & Simpson, L. (1995). **Evolution of parasitism in kinetoplastid protozoa.** *Parasitol. Today*, 11 (1): 30-32.
- Matthews, K. R.; Tschudi, C. & Ullu, E. A. (1994). **A common polypirimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNAs in trypanosomes.** *Genes Develop.*, 8: 491-501.
- Minning, T. A.; Bua, J.; Garcia, G. A.; McGraw, R. A.; Tarleton, R. L. (2003). **Microarray profiling of gene expression during trypomastigote to amastigote transition in *Trypanosoma cruzi*.** *Molecular and Biochemical Parasitology*, 131 (1): 55-64.
- Opperdoes, F. R. (1995). Carbohydrate and energy metabolism in aerobic Protozoa. *In*: Marr, J. & Müller, M. (eds.) **Biochemistry and Molecular Biology of Parasites.** Academic Press, Harcourt Brace & Company, Publishers.
- Pasion, S. G.; Hines, J. C.; Xiu, O.; Mahmood, R. & Ray, D. S. (1996). **Sequences within the 5' untranslated region regulate the levels of a kinetoplastid DNA topoisomerase mRNA during the cell cycle.** *Mol. Cell. Biol.*, 16 (2): 6724-6735.
- Pavoni, D. P. (2005). **Caracterização por genômica funcional das formas infectivas do *Trypanosoma cruzi*.** Curitiba, 2005. 150 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP), Instituto Oswaldo Cruz.
- Pays, E.; Coquelet, H.; Tebabi, P.; Pays, A.; Jefferies, D.; Steinert, M.; Koenig, E.; Williams, R. O.; Roditi, I. (1990). ***Trypanosoma brucei*: constitutive activity of the VSG and procyclin gene promoters.** *EMBO J.*, 9 (10): 3145-51.
- Probst, C. M. (2005). **Descrição da metaciclo gênese de *Trypanosoma cruzi* pelo uso de microarranjos de DNA.** Curitiba, 2005. 174 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP), Instituto Oswaldo Cruz.
- Proudfoot, N. J.; Furger, A., Dye, M. J. (2002). **Integrating mRNA processing with transcription.** *Cell* 108: 501-512.

- Rassi, A.; Rassi, Jr. A.; Rassi, G. G. (2000). Forma aguda. *In*: Brener, Z.; Andrade, Z. A.; Barral Netto, M. (eds) ***Trypanosoma cruzi e doença de Chagas***, 2<sup>a</sup>. Edição. Guanabara Koogan Editora, Rio de Janeiro, p. 231-245.
- Rickwood, D. The theory and practice of centrifugation. *In*: Rickwood, D. (ed.) **Centrifugation: a practical approach**. 2<sup>a</sup> ed. Oxford: IRL PRESS, 1984.
- Rudenko, G.; Bishop, D.; Gottesdiener, K. & Van der Ploeg, L. H. (1989). **Alpha-amanitin resistant transcription of protein coding genes in insect and bloodstream form *Trypanosoma brucei***. EMBO J., 8: 4259-4263.
- Rudenko, G.; Le Blancq, S.; Smith, J.; Lee, M. G.; Rattray, A.; Van der Ploeg, L. H. (1990). **Procyclic acidic repetitive protein (PARP) genes located in an unusually small alpha-amanitin-resistant transcription unit: PARP promoter activity assayed by transient DNA transfection of *Trypanosoma brucei***. Mol Cell Biol., 10(7):3492-504.
- Salmon, D.; Montero-Lomeli, M.; Goldenberg, S. (2001). **A DnaJ-like protein homologous to the yeast co-chaperone Sis1 (TcJ6p) is involved in initiation of translation in *Trypanosoma cruzi***. J. Biol Chem., 276(47): 43970-9.
- Saxena, A.; Worthey, E. A.; Yan, S.; Leland, A.; Stuart, K. D.; Myler, P. J. (2003). **Evaluation of differential gene expression in *Leishmania major* Friedlin procyclics and metacyclics using DNA microarray analysis**. Molecular and Biochemical Parasitology, 129 (1): 103-114.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R., Brown, P. O. (1995). **Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray**. Science 270: 467-470.
- Schenone, H.; Gaggero, M.; Sapunar, J. *et al.* (2001). **Congenital Chagas disease of second generation in Santiago, Chile**. Report of two cases. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 43 (4): 231-232. ISSN 0036-4665.
- Sherlock, I. A. Vetores. *In*: Brener, Z.; Andrade, Z.; Barral Netto, M. (eds.). ***Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas***. 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p 21-40.

- Sherman, D. R.; Janz, L.; Hug, M. & Clayton, C. (1991). **Anatomy of the PARP gene promoter of *Trypanosoma brucei***. EMBO J., 10: 3379-3386.
- Smith, J. L.; Levin, J. R.; Ingles, C. J.; and Agabian, N. (1989). **In trypanosomes the homolog of the largest subunit of RNA polymerase II is encoded by two genes and has a highly unusual c-terminal domain structure**. Cell, 56:815-827.
- Smith, G. K. (2004). **Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments**. Statistical applications in Genetics and Molecular Biology, v. 3, n. 1, art. 3.
- Soares, M. J.; Souto-Padron, T.; Bonaldo, M. C.; Goldenberg, S. & De Souza, W. (1989). **A steriological study of the differentiation process in *Trypanosoma cruzi***. Parasitology Research., 75: 522-527.
- Sutton, R. E.; and Boothroyd, J. C. (1986). **Evidence for trans-splicing in trypanosomes**. Cell, 47: 527-535.
- Teixeira, S. M.; Kirchhoff, L. V. & Donelson, J. E. (1995). **Post-transcriptional elements regulating expression of mRNAs from the amastin/tuzin gene cluster of *Trypanosoma cruzi***. J. Biol. Chem., 270 (38): 22586-22594.
- Teixeira, S. M., da Rocha, W. D. (2003). **Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae**. Genetic. Mol. Res. 2(1): 148-158.
- Tittawella, I.; Yasmin, L.; Baranov, V. (2003). **Mitochondrial ribosomes in a trypanosome**. Bioch. Biophys. Research Communications, 307: 578-583.
- Tomás, A. M. & Kelly, J. M. (1996). **Stage-regulated expression of cruzipain, the major cysteine protease of *Trypanosoma cruzi* is independent of the level of RNA**. Mol. Biochem. Parasitol., 76: 91-103.
- Ullu, E.; Tschudi, C.; Gunzl, A. (1996). **Trans-splicing in trypanosomatid protozoa**. In: Smith, D. f.; Parsons, M. (eds.), **Molecular biology of parasitic protozoa**. IRL Press, New York, p. 115-133.

- Vanhamme, L. and Pays, E. (1995). **Control of gene expression in trypanosomes.** *Microbiol. Rev.* 59: 223-240.
- Vassilev, A. O.; Plesofsky-Vig, N.; Brambl, R. (1992). **Isolation, partial amino acid sequence, and cellular distribution of heat-shock protein hsp98 from *Neurospora crassa*.** *Biochim Biophys Acta.*, 1156(1):1-6.
- Villard, J. (2004). **Transcription regulation and human diseases.** *Swiss Med. Wkly.*, 134 (39-40): 571-9.
- Walder, J. A.; Eder, P. S.; Engman, D. M.; Brentano, S. T.; Walder, R. Y.; Knutzon, D. S.; Dorfman, D. M. & Donelson, J. E. (1986). **The 35-nucleotide spliced leader sequence is common to all trypanosome messenger RNA's.** *Science*, 233: 569-571.
- Yang, J.; Buckley, M.; Speed, T. (2001). **Analysis of cDNA microarray images.** *Briefings in Bioinformatics*, 2 (4): 341-349.
- Young, B. D. Measurement of sedimentation coefficients and computer simulation of rate-zonal separations. *In*: Rickwood, D. (ed.) **Centrifugation: a practical approach.** 2<sup>a</sup> ed. Oxford: IRL PRESS, 1984.
- Zomerdijk, J. C.; Ouellette, M.; ten Asbroek, A. L.; Kieft, R.; Bommer, A. M.; Clayton, C. E.; Borst, P. (1990). **The promoter for a variant surface glycoprotein gene expression site in *Trypanosoma brucei*.** *EMBO J.*, 9(9):2791-801.
- Zwierdijk, T. A. & Buck, G. A. (1991). **RNA-protein complexes mediate *in vitro* capping of the spliced-leader primary transcript and U-RNAs in *Trypanosoma cruzi*.** *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 5626-5630.