



Programa de Pós-Graduação em

BIOTECNOLOGIA

mestrado & doutorado

Juliana Berka Rodrigues

**GERAÇÃO E ANÁLISE DE ETIQUETAS DE SEQÜÊNCIAS
TRANSCRITAS DE *Trypanosoma rangeli* UTILIZANDO
A TÉCNICA ORESTES**

Florianópolis

Dezembro de 2005



Juliana Berka Rodrigues

**GERAÇÃO E ANÁLISE DE ETIQUETAS DE SEQÜÊNCIAS
TRANSCRITAS DE *Trypanosoma rangeli* UTILIZANDO
A TÉCNICA ORESTES**

O presente trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Protozoologia e Bioinformática da Universidade Federal de Santa Catarina, sob a orientação do Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard e co-orientação do Prof. Dr. Mário Steindel, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis

Dezembro de 2005

Rodrigues, Juliana Berka

Geração e análise de etiquetas de seqüências transcritas de *Trypanosoma rangeli* utilizando a técnica ORESTES/ Juliana Berka Rodrigues – Florianópolis 2005. 70p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia.

1. *Trypanosoma rangeli*. 2. ORESTES 3. Transcriptoma

Aos meus pais Heloisa e Ricardo e à
minha afilhada Julia, pelo amor, exemplo
de vida e compreensão nos momentos de
ausência...

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Dr. Edmundo Carlos Grisard e Dr. Mário Steindel, por terem aceitado me orientar, pelos ensinamentos e palavras sábias, atenção, confiança, paciência (que não deve ter sido pouca) e sobretudo pela amizade e agradável convivência.

Ao professor Dr. Carlos José de Carvalho Pinto, pela amizade e agradável convivência durante todos estes anos.

Aos meus pais, Heloisa e Ricardo, por me ajudarem nos momentos mais difíceis com afeto e dedicação, por aceitarem minha opção, e pelo imenso amor capaz de perdoar minhas falhas e me encorajar os momentos de vitória. O meu mais sincero obrigada a vocês que renunciaram aos seus sonhos para que muitas vezes eu pudesse realizar os meus...

Ao amor da minha vida, minha afilhada Julinha, pela alegria contagiante de todos os dias, por aceitar (mesmo sem entender) todas vezes que não pude te dar a atenção que merecias. Obrigada por fazer de mim a madrinha mais feliz! Enfim, obrigada por você existir !!!

À minha avó Lecí, que sempre foi para mim uma segunda mãe. Vó, sem você não estaria aqui, não teria forças para chegar onde cheguei. Obrigada por tantas palavras de conforto, consolo e incentivo. Meus sinceros agradecimentos!

Ao meu namorado Leonardo, que apesar da distância, sempre esteve presente em todos os momentos desta etapa de minha vida. Muito obrigada pelo amor, paciência e compreensão nos momentos de ausência. Te amo!!!

Às minhas irmãs Marcela e Fernanda, obrigada por tudo!

Ao meu querido amigo Leonardo, pela enorme contribuição na purificação dos parasitas e, sobretudo pela amizade. Passamos por muitos momentos difíceis né? Mas valeu! Valeu todo esforço e dedicação! Obrigada!

A minha amiga Patrícia, pela colaboração na realização deste trabalho, desde a construção das bibliotecas até a análise das seqüências. Adorei te conhecer! Você além de grande amiga é uma ótima companheira de trabalho, parceira para experimentos nos fins de semana, feriados, madrugadas... enfim, foi muito divertido! Obrigada amiga!

Ao meu amigo Glauber, pela indispensável ajuda com as análises de bioinformática e momentos de agradável convivência. Obrigada por tudo, pela paciência, mas acima de tudo pela amizade!

À amiga Gianina, pela amizade e grande colaboração na realização deste trabalho!

Às minhas grandes amigas Lê, Mi e Jana, companheiras de festas, risadas, confidências, enfim, obrigada pelos conselhos, apoio, incentivo, mas em especial pela sincera amizade, que vem crescendo cada vez mais. Obrigada!

À amiga Ane, pela amizade, pelos conselhos e pela paciência em ler e corrigir este trabalho.

À todos dos laboratórios de Protozoologia e Bioinformática, inclusive àqueles que hoje não fazem mais parte deste grupo: Ale, Ane, Anita, Beto, Bibi, Ciça, Cris, Dani (ruiva), Dani (morena), Dani (loira), Diogo, Ethel, Fabi, Gi, Glauber, Henrique, Ize, Jana, João, Lê, Leo, Moniquinha, Marcos. Mi, Pati, Pri, Rebeca, Ruy, Sandra, Thais, Tiago e Zé. Obrigada pela agradável convivência durante todo este tempo, pelas risadas nos corredores, pelas críticas, por sempre estarem ao meu lado, pelo incentivo e principalmente pela amizade! Todos vocês foram direta ou indiretamente fundamentais para a realização deste trabalho, desde a ajuda com as culturas (Lê), até o socorro quando me desesperava com os computadores (Beto, Diogo, Zé). Sentirei falta de nossos encontros para fazermos nada, jogarmos conversa fora, ou mesmo jogar imagem e ação dando muitas risadas... Foi muito divertida nossa convivência. Obrigada por tudo!

Às minhas amigas e companheiras de mestrado, Ana, Dayse, Bibi e Adri. pela companhia nesta longa caminhada, cheia de obstáculos e incertezas, desafios e decepções, esperança e amor. A amizade de vocês foi fundamental durante todo este tempo. Muito obrigada pelos momentos que passamos juntas, e sobretudo pelo apoio e incentivo nos momentos difíceis. Adoro vocês!

À todos dos laboratórios de imunologia e virologia aplicada (LIA e LVA) pela agradável convivência!

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, em especial às funcionárias da secretaria Joice e Lígia, pela ajuda e pelos serviços prestados.

Ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente ajudaram para a realização deste trabalho!

A TODOS MEU SINCERO OBRIGADA!

“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos”

Albert Einstein

RESUMO

O *Trypanosoma rangeli* é um protozoário flagelado, pertencente à Ordem Kinetoplastida, capaz de infectar triatomíneos, mamíferos silvestres e domésticos, bem como o homem nas Américas Central e do Sul. Quando comparado a organismos do mesmo gênero, é notória a falta de informações existentes acerca deste parasito, sobretudo a nível molecular. No presente estudo, apresentamos os resultados obtidos a partir da geração e seqüenciamento de 4 bibliotecas de cDNA de formas tripomastigotas da cepa Choachi de *T. rangeli*, utilizando a técnica ORESTES. O seqüenciamento dos clones obtidos resultou na geração de 2.475 ORESTES, das quais 1.295 (52,3%) apresentaram alta qualidade (Phred \geq 15). O agrupamento das seqüências resultou em 758 seqüências não redundantes com tamanho médio de 341pb e conteúdo G+C de 54%. Destas seqüências, apenas 2,5% apresentaram similaridade com seqüências deste parasito, 61,21% com outros tripanosomatídeos e somente 5,28% com outros organismos. Além disso, 31% das ORESTES geradas não apresentaram similaridade com seqüências depositadas nos bancos de dados públicos consultados, as quais podem estar representando genes únicos do *T. rangeli*, os quais ainda não foram caracterizados, genes desconhecidos ou mesmo artefatos da técnica. Estes resultados representam as primeiras seqüências do transcriptoma desta forma evolutiva do parasito.

Palavras-chave: *Trypanosoma rangeli*, ORESTES, transcriptoma.

ABSTRACT

Trypanosoma rangeli is an hemoflagellate protozoan parasite of the Kinetoplastida Order, capable to infect triatomine bugs, sylvatic and domestic mammals, as well as humans, in both Central and South America. Compared to other species of the same genus, little information is available concerning the *T. rangeli* biology, especially at the molecular level. In this study are presented the results of the sequencing of 4 cDNA libraries of trypomastigote forms of the *T. rangeli* Choachi strain through the ORESTES technique. Sequencing of the obtained clones resulted on the generation of 2,475 ORESTES among which, 1,295 (52.3%) were of high quality (Phred \geq 15). Clustering of the obtained sequences resulted in 758 non-redundant sequences of 341bp in average, revealing a G+C content of 54%. Among these sequences, 2.5% showed similarity with *T. rangeli* sequences, 61.21% with other trypanosomatids and only 5.28% with other organisms. Moreover, 31% of the obtained ORESTES revealed no hits with all searched public databases, which may represent unique genes, unknown or non characterized genes or even technique artifacts. The herein described results are the first sequences of the *T. rangeli* trypomastigote transcriptome.

Key-words: *Trypanosoma rangeli*, ORESTES, transcriptome.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Microfotografia da forma tripomastigota sangüínea do *Trypanosoma rangeli* em sangue de camundongo experimentalmente infectado (aumento de 1.000x) 1
- Figura 2: Mapa das Américas Central e do Sul, mostrando a sobreposição geográfica da distribuição da doença de Chagas humana (sombreado) e os registros de ocorrência comprovada do *Trypanosoma rangeli* em humanos, triatomíneos ou animais silvestres (●) (Segundo GRISARD E STEINDEL, 2004a) 3
- Figura 3: Ciclo biológico do *Trypanosoma rangeli* no hospedeiro invertebrado. A – Ingestão das formas tripomastigotas de *T. rangeli* durante o repasto sangüíneo do triatomíneo, B – Formas tripomastigotas e epimastigotas no trato intestinal do triatomíneo, C – Parasitos alcançam a ampola retal e formas epimastigotas e tripomastigotas podem ser excretadas juntamente com as fezes e urina, D – Adesão de formas epimastigotas do parasito ao epitélio intestinal e transposição para a hemocele, onde se multiplicam podendo penetrar em hemócitos, E – Invasão pelo *T. rangeli* das glândulas salivares do triatomíneo e diferenciação para formas infectivas (metatripomastigotas), as quais são inoculadas com a saliva (F) durante o repasto sangüíneo (Segundo GRISARD E STEINDEL, 2004a) 9
- Figura 4: Microfotografia de formas tripomastigotas da cepa Choachi de *Trypanosoma rangeli* obtidas após diferenciação em meio DMEM pH 8,0 e subsequente purificação através da resina CM-celulose (Aumento 1.000 X)..... 34
- Figura 5: Gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídio revelando perfis de ORESTES obtidos a partir de formas tripomastigotas da cepa Choachi do *Trypanosoma rangeli*. LMW e HMW- Padrões de tamanho molecular (pUC18 digerido com HaeIII e Fago lambda digerido com PstI, respectivamente). Canaletas 1 a 8- Perfis obtidos com os iniciadores ORESTES 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 8; canaletas 1* ao 8*- Controles negativos com os respectivos iniciadores 35
- Figura 6: Gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídio revelando o PCR de colônia. LMW e HMW- Padrões de tamanho molecular (pUC18 digerido com HaeIII e Fago lambda digerido com PstI, respectivamente). Canaletas 1 a 8 - Amplificação dos insertos de clones aleatórios utilizando os iniciadores pGEM-F e EXCEL-R; CN - Controle negativo 36

Figura 7: Distribuição das seqüências geradas de acordo com sua extensão (pb), antes (A) e após (B) a retirada das regiões de baixa qualidade e com contaminação de vetor e após a formação dos clusters (C).....	39
Figura 8: Representação gráfica dos bancos de dados confrontados com as ORESTES de <i>Trypanosoma rangeli</i> geradas neste estudo em relação à quantidade de seqüências que apresentaram hits significantes em cada um destes bancos.....	42
Figura 9: Classificação funcional das ORESTES de <i>Trypanosoma rangeli</i> de acordo com as três categorias funcionais do Gene Ontology (A) e a sub-classificação em cada uma destas categorias (B).....	44
Figura 10: Representação gráfica das seqüências não redundantes obtidas a partir de bibliotecas de cDNA de formas tripomastigotas da cepa Choachi do <i>Trypanosoma rangeli</i> que apresentaram similaridade com seqüências depositadas nos bancos de dados confrontados, além das seqüências que não apresentaram entradas (hits) significantes nestes bancos (e-value limite $<10^{-5}$).....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Iniciadores utilizados no presente estudo para a geração dos perfis de ORESTES.....	26
Tabela 2: Tabela representativa dos resultados do seqüenciamento dos clones de cDNA (ORESTES) de formas tripomastigotas da cepa Choachi de <i>Trypanosoma rangeli</i>	37
Tabela 3: Relação dos bancos de dados confrontados com as seqüências geradas neste estudo e o número de seqüências não redundantes que apresentaram entradas (hits) significantes em cada um destes bancos.....	41
Tabela 4: Relação das ORESTES de formas tripomastigotas da cepa Choachi do <i>Trypanosoma rangeli</i> que apresentaram similaridade com seqüências depositadas em bancos de dados públicos, sendo consideradas estatisticamente significantes quando e-value < 10 ⁻⁵	Anexo

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C – graus Celsius

BLAST- *Basic Local Alignment Search Tool*

CAP3 - *Sequence Assembly Program*

CDD - *Conserved Domain Database*

cDNA – DNA complementar à RNA

COG - *Clusters of Orthologous Groups*

DEPC – Dietil Pirocarbonato

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTP – Deoxinucleotídeos trifosfatados:

dATP – 2'- deoxiadenosina 5'- trifosfato

dCTP – 2'- deoxicitidina 5'- trifosfato

dGTP – 2'- deoxiguanosina 5'- trifosfato

dUTP - 2' - deoxiuridina 5'- trifosfato

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

ELISA – ensaio imunoenzimático

EMBL - *European Molecular Biology Laboratory*

EMBOSS - *European Molecular Biology Open Software Suite*

EST - *Expressed Sequence Tags*

GARSA - *Genomic Analysis Resources of Sequence Annotation*

g – força da gravidade

g – grama

GO – *Gene Ontology*

GSS - *Genome Survey Sequences*

HSP - *Heat Schock Protein*

IPTG –isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo

KOG - *Eukaryotic Orthologous Groups*

KV - kilovolts

LB- meio Luria Bertani

LIT – *Liver Infusion Tryptose*

M - moles

mL – mililitro

mM – milimolar

mRNA – RNA mensageiro

ng – nanograma

oligo dT/ poliT – oligonucleotídeo formado pela base timina (T)

ORESTES - ORF + EST

ORF - *Open Reading Frame*

pb – pares de base

PBS - Solução salina tamponada com fosfatos, do inglês Phosphate buffered saline

PCR – reação em cadeia da polimerase

pH – potencial hidrogeniônico

poli A – oligonucleotídeo formado pela base adenina (A)

RNA – ácido ribonucleico

RNase – ribonuclease

rRNA – RNA ribossomal

RT – *Reverse Transcriptase Reaction* (reação de transcrição reversa)

SBF – soro bovino fetal

SMART - *Simple Modular Architecture Research Tool*

SNP - *Single Nucleotide Polymorphism*

Taq – *Thermus aquaticus*

TS- Trans sialidase

UV – ultra violeta

V – volt

X-Gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-Galactose

μ F – microFaraday

μ g – micrograma

μ L – microlitro

Ω - Omhs

SUMÁRIO

	Resumo.....	VII
	Abstract.....	VIII
	Lista de Figuras.....	IX
	Lista de Tabelas.....	XI
	Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	XII
1	Introdução.....	1
2	Objetivos.....	20
2.1	Objetivos Gerais.....	20
2.2	Objetivos Específicos.....	20
3	Materiais e Métodos.....	21
3.1	Parasitas.....	21
3.2	Obtenção e purificação das formas tripomastigotas....	21
3.3	Extração de RNA.....	23
3.3.1	Extração do RNA total.....	23
3.3.2	Extração do RNA mensageiro (mRNA).....	24
3.4	Reação de Transcrição Reversa (RT-PCR).....	25
3.5	Geração dos perfis de ORESTES.....	26
3.6	Construção das bibliotecas de ORESTES.....	27
3.7	Seqüenciamento dos insertos.....	29
3.8	Análise das seqüências obtidas.....	29
4	Resultados e Discussão.....	33
4.1	Obtenção dos parasitos e purificação do mRNA.....	33
4.2	Perfis de ORESTES e construção das bibliotecas de cDNA.....	35
4.3	Seqüenciamento e análise das seqüências obtidas....	37
4.4	Anotação das seqüências.....	45
5	Conclusões.....	56
6	Referências Bibliográficas.....	58
7	Anexo.....	67

1- INTRODUÇÃO

1.1- O Parasito

O *Trypanosoma rangeli*, descrito por Tejera em 1920, é um protozoário flagelado, pertencente à Ordem Kinetoplastida e à Família Trypanosomatidae, sendo capaz de infectar triatomíneos, mamíferos silvestres e domésticos, bem como o homem nas Américas Central e do Sul (Figura 1) (GRISARD et al., 1999).



Figura 1: Microfotografia da forma tripomastigota sangüínea do *Trypanosoma rangeli* em sangue de camundongo experimentalmente infectado e corado por Giemsa (aumento de 1.000x).

Diferentemente das demais espécies pertencentes ao Subgênero Herpetosoma, o *T. rangeli* não apresenta especificidade de hospedeiros, sendo encontrado em uma extensa variedade de reservatórios vertebrados distribuídos em 5 ordens: Edentata, Marsupialia, Carnivora, Rodentia e Primatas (D'ALESSANDRO, 1976; D'ALESSANDRO-BACIGALUPO & SARAIVIA, 1992; D'ALESSANDRO & SARAIVIA, 1999). Além disso, diferentes espécies, incluindo

ratos, camundongos, hamsters, coelhos, cães, morcegos e primatas têm sido experimentalmente infectados com o *T. rangeli* (GUHL & VALLEJO, 2003).

O primeiro caso de infecção humana pelo *T. rangeli* foi evidenciado em 1936 por de Leon, enquanto estudava a doença de Chagas na Guatemala (DE LEON, 1942). Desde então, mais de 2.600 casos de infecção humana já foram descritos, destes 1.144 casos foram descritos na Venezuela, 1.117 na Guatemala, 181 no Panamá, 121 na Colômbia, 61 em El Salvador, 4 na Costa Rica e 2 casos no Peru (D'ALESSANDRO, 1976; D'ALESSANDRO-BACIGALUPO & SARAIVIA, 1992; GRISARD et al., 1999), sendo que no Brasil, os 3 primeiros e únicos casos de infecção humana pelo *T. rangeli*, foram descritos por Coura e colaboradores (1996), onde o parasito foi isolado de pacientes do município de Barcelos no Estado do Amazonas.

A distribuição geográfica deste parasito é sobreposta com a do *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, com o qual compartilha os mesmos reservatórios e vetores. No Brasil, o *T. rangeli* já foi detectado nos Estados do Amazonas, Pará, Rondônia, Alagoas, Bahia, Minas Gerais e Santa Catarina, o que reflete sua ampla distribuição geográfica (Figura 2). As implicações epidemiológicas da coexistência destes dois parasitos residem na ocorrência de infecções únicas ou mistas, tanto nos hospedeiros invertebrados como nos vertebrados (GRISARD et al., 1999; GRISARD & STEINDEL, 2004a).



Figura 2: Mapa das Américas Central e do Sul, mostrando a sobreposição geográfica da distribuição da doença de Chagas humana (sombreado) e os registros de ocorrência comprovada do *Trypanosoma rangeli* em humanos, triatomíneos ou animais silvestres (●) (Segundo GRISARD E STEINDEL, 2004a).

Em Florianópolis, Santa Catarina, a presença do *T. rangeli* foi descrita pela primeira vez por Steindel e colaboradores (1991). Além disso, já foi demonstrada a presença de infecções mistas pelo *T. rangeli* e pelo *T. cruzi* em triatomíneos da espécie *Panstrongylus megistus*, naturalmente infectados na ilha de Santa Catarina (STEINDEL et al., 1992).

Embora o *T. rangeli* não seja considerado patogênico para o hospedeiro vertebrado, a infecção por este parasito induz uma resposta imune humoral, com elevados títulos de anticorpos, os quais determinam uma reatividade cruzada com antígenos do *T. cruzi*, dificultando o diagnóstico sorológico da doença de Chagas, especialmente em sua fase crônica (AFCHAIN et al., 1979; GRISARD et al., 1999; GRISARD & STEINDEL, 2004a). Afchain e colaboradores (1979), analisando formas epimastigotas de cultura do *T. rangeli*, verificaram que este compartilha cerca de 60% de sua constituição antigênica solúvel com o *T. cruzi*, o que explica esta reatividade sorológica cruzada que pode acarretar resultados falso-positivos.

No Brasil, principalmente em bancos de sangue, é elevado o número de descarte de bolsas devido a resultados inconclusivos para o diagnóstico da doença de Chagas. Segundo Silva (2002), na Fundação Pró-Sangue do Hemocentro de São Paulo, o descarte de bolsas de sangue alcançou índices de 2,5% em 1991 e 1992, e de 1,6% em 1993. Destes, mais da metade foram descartados devido a resultados não conclusivos para a presença de *T. cruzi*. Da mesma forma, no hemocentro regional de Uberaba, Minas Gerais, das 34.887 doações realizadas no período de janeiro de 1998 a dezembro de 1999, 177 foram soropositivas e 75 apresentaram resultados inconclusivos para a infecção pelo *T. cruzi*, sendo conseqüentemente descartadas (SILVA, 2002).

Devido às dificuldades de distinção entre o *T. rangeli* e o *T. cruzi* baseado nos critérios morfológicos dos parasitos, à reatividade sorológica cruzada, à ausência de manifestações clínicas na doença de Chagas indeterminada e à característica não patogênica do *T. rangeli* em seus hospedeiros mamíferos, acredita-se que possa estar ocorrendo uma subestimação do número de infecções humanas pelo *T. rangeli* e uma superestimação dos casos de infecção pelo *T. cruzi* em áreas onde estes parasitos coexistem. Entretanto, ainda assim, algumas publicações têm relatado a presença do *T. rangeli* em humanos pelo exame direto, hemocultura ou xenodiagnóstico (COURA et al., 1996; GUHL & VALLEJO, 2003).

Estimativas realizadas em diversos países demonstram que a enfermidade da doença de Chagas causa perdas econômicas significativas. Em zonas endêmicas no Brasil, observou-se que 9,1% das aposentadorias por invalidez recebidas por pessoas de 30 a 50 anos tinham sua origem na doença de Chagas (BRENER et al., 2000). Desta forma, a identificação específica destes dois parasitos, evitando inferências errôneas, torna-se extremamente importante do ponto de vista epidemiológico, terapêutico, econômico e social.

Embora seja possível a transmissão do *T. rangeli* para o hospedeiro vertebrado através das fezes de triatomíneos infectados, a principal via de transmissão é pela picada do triatomíneo infectado, especialmente do gênero *Rhodnius* (D'ALESSANDRO-BACIGALUPO & SARAVIDA, 1992; D'ALESSANDRO & SARAVIDA, 1999), diferentemente do *T. cruzi*, o qual é transmitido principalmente pelas fezes dos triatomíneos infectados (BRENER et al., 2000).

1.2- Ciclo Biológico

Apesar das inúmeras tentativas de elucidar o ciclo biológico do *T. rangeli* em seus hospedeiros vertebrados, pouco se sabe sobre o curso da infecção por este parasito, o qual apresenta parasitemias sangüíneas normalmente muito baixas e de curta duração, aproximadamente 2 a 3 semanas (D' ALESSANDRO & SARAVIA, 1999).

Assim, os dados a respeito da multiplicação do *T. rangeli* no seu hospedeiro vertebrado são escassos e controversos. Observações de formas tripomastigotas sangüíneas que parecem estar em divisão, já foram realizadas em seres humanos e roedores (D' ALESSANDRO & SARAVIA, 1999). Entretanto, segundo estes autores, estas formas podem ser provenientes das glândulas salivares do inseto infectado e não uma consequência da multiplicação do parasito no hospedeiro vertebrado, uma vez que estas observações normalmente ocorrem em indivíduos recentemente infectados.

Em estudos de infecção em camundongos com uma cepa de *T. rangeli* originária da Venezuela, Añez (1981) e Añez e colaboradores (1985) não conseguiram detectar a presença do parasito por xenodiagnóstico ou hemocultura após 50 ou 60 dias de infecção. Entretanto, Steindel (1993) conseguiu demonstrar a presença do *T. rangeli* por hemocultura em camundongos durante um período de sete meses de infecção. Além disso, os parasitos também foram detectados após 13 meses (PAREDES & PAREDES, 1949) e após 18 meses (GROOT et al., 1950; GROOT, 1954) em infecções humanas naturais e em camundongos experimentais utilizando a mesma técnica.

Dentre as inúmeras tentativas de elucidar o ciclo de vida do *T. rangeli* no hospedeiro vertebrado, Scorza e colaboradores (1986) e Urdaneta-Morales e Tejero (1986), observaram numerosas formas intracelulares nos músculos cardíaco e esquelético, fígado, baço e pulmão de camundongos jovens inoculados com a cepa Perro 82. Em ensaios de interação in vitro, realizados por Zuñiga e colaboradores (1997), também foi verificado aumento no número de parasitos intracelulares em tempos mais prolongados de interação, sugerindo a capacidade de multiplicação da cepa C23 de *T. rangeli* em células Vero e promonócitos murinos.

Entretanto, vários outros estudos demonstram que a taxa de infectividade de diferentes cepas deste parasito frente a linhagens celulares distintas (fagocíticas e não fagocíticas) é sempre muito baixa e os parasitos tendem a desaparecer ao longo do tempo de interação, sugerindo a ausência de multiplicação intracelular e sua desintegração, especialmente observada em macrófagos (MOLYNEAUX, 1973; OSORIO et al., 1995; TANOURA et al., 1999; EGER-MANGRICH et al., 2001).

Embora, os dados a respeito da existência de formas intracelulares de *T. rangeli* sejam controversos na literatura, o isolamento repetido do parasito em animais cronicamente infectados e a detecção de parasitemias significativamente mais elevadas que o inóculo realizado sugere fortemente a existência de multiplicação deste flagelado no hospedeiro vertebrado (D'ALESSANDRO & SARAVIA, 1999).

Diferentemente do ciclo biológico no hospedeiro vertebrado, o ciclo biológico do *T. rangeli* no seu hospedeiro invertebrado é bem conhecido e descrito

na literatura. Uma de suas características mais marcantes e que permite distingui-lo do *T. cruzi*, é a capacidade de invasão da hemolinfa e desenvolvimento nas glândulas salivares, sendo esta uma característica ligada à relação cepa e vetor local (D'ALESSANDRO & SARAVIA, 1999; MACHADO et al., 2001). Sabe-se que pelo menos 15 espécies de triatomíneos dos gêneros *Rhodnius* e *Triatoma* são vetores do *T. rangeli* em condições naturais e ou experimentais (D'ALESSANDRO-BACIGALUPO & SARAVIA, 1992).

A infecção do triatomíneo pelo *T. rangeli*, inicia-se através da ingestão de tripomastigotas circulantes no sangue do hospedeiro vertebrado infectado, durante o repasto sangüíneo. No intestino do triatomíneo, alguns parasitos se diferenciam em formas epimastigotas, as quais se aderem ao epitélio do intestino médio, onde são capazes de atravessá-lo, alcançando a hemocele. Após a invasão da hemocele, os parasitos multiplicam-se livremente na hemolinfa e migram para as glândulas salivares onde se diferenciam em formas infectivas (tripomastigotas metacíclicas), as quais são inoculadas no hospedeiro vertebrado durante o repasto sangüíneo do triatomíneo. Por outro lado, os parasitos que não alcançam a hemocele podem passar do intestino do inseto vetor para a ampola retal, onde são excretados com as fezes e urina (Figura 3) (GRISARD et al., 1999; GRISARD & STEINDEL, 2004a).

Embora o *T. rangeli* não seja considerado patogênico para o hospedeiro vertebrado, sua intensa multiplicação na hemolinfa exerce uma ação patogênica para o inseto vetor, caracterizada pela destruição destas células e pela dificuldade de muda e desenvolvimento das ninfas, podendo ocasionar a morte (GUARNERI, 1996).

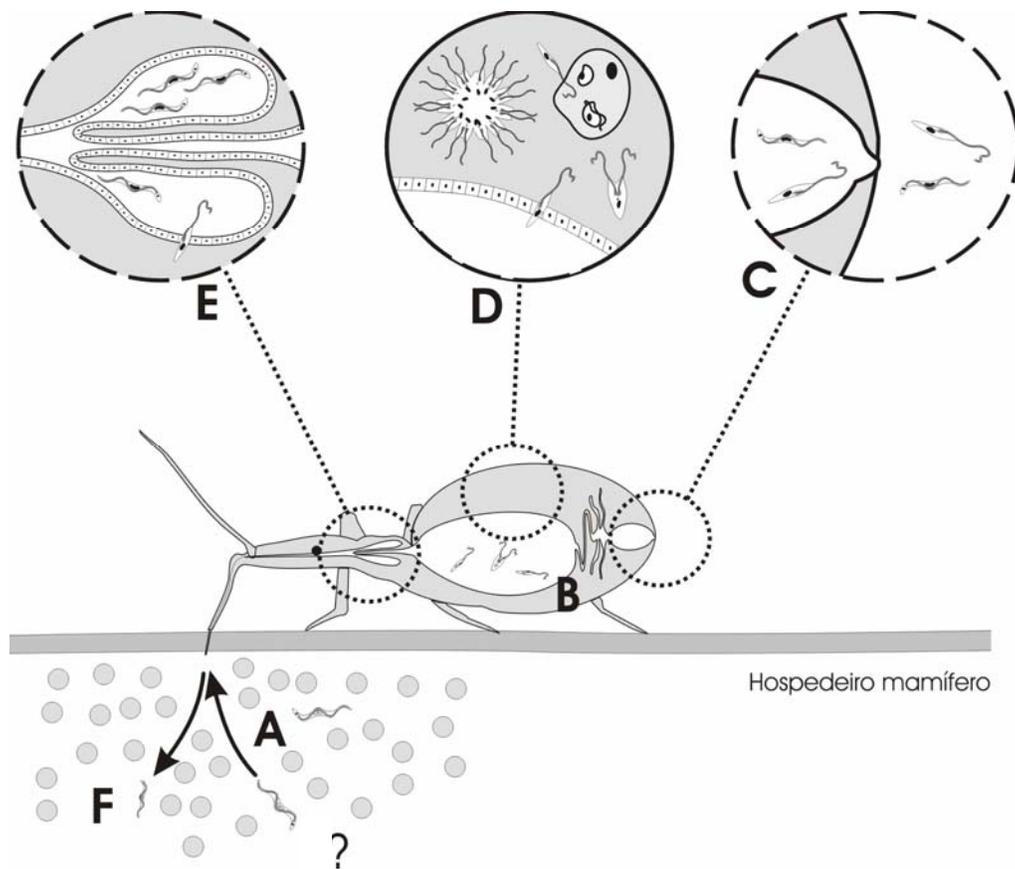


Figura 3: Ciclo biológico do *Trypanosoma rangeli* no hospedeiro invertebrado. A – Ingestão das formas tripomastigotas de *T. rangeli* durante o repasto sangüíneo do triatomíneo, B – Formas tripomastigotas e epimastigotas no trato intestinal do triatomíneo, C – Parasitos alcançam a ampola retal e formas epimastigotas e tripomastigotas podem ser excretadas juntamente com as fezes e urina, D – Adesão de formas epimastigotas do parasito ao epitélio intestinal e transposição para a hemocele, onde se multiplicam podendo penetrar em hemócitos, E – Invasão pelo *T. rangeli* das glândulas salivares do triatomíneo e diferenciação para

formas infectivas (metatrimastigotas), as quais são inoculadas com a saliva (F) durante o repasto sangüíneo (Segundo GRISARD E STEINDEL, 2004a).

1.3- Diagnóstico e Diferenciação entre *T. rangeli* e *T. cruzi*

Diferentes métodos podem ser utilizados para diferenciar o *T. cruzi* do *T. rangeli* incluindo métodos biológicos, como a observação do desenvolvimento do parasito nas glândulas salivares dos triatomíneos (D' ALESSANDRO, 1976); morfológicos, como a avaliação da morfologia das formas sangüíneas e de cultivo dos parasitos (VALLEJO et al., 1988); bioquímicos, como a lise das formas de cultura pelo complemento humano, aglutinação dos parasitos com a lectina de germe de trigo (SCHOTTELIUS et al., 1986) e perfil de izoenzimas (MILES et al., 1983); imunológicos, como a imunofluorescência indireta e ELISA com a utilização de anticorpos monoclonais (ANTHONY, CODY & CONSTANTINE, 1981; ACOSTA et al., 1991) e antígenos recombinantes (UMEZAWA et al., 1999); além da reação em cadeia da polimerase (PCR) (MURTHY et al., 1992; COURA et al., 1996; VALLEJO et al., 1999; MACHADO et al., 2000; VARGAS et al., 2000).

Entretanto, o xenodiagnóstico e a hemocultura, testes parasitológicos que permitem a distinção destes parasitos com base nos critérios morfológicos e biológicos, apesar de apresentarem uma boa especificidade, suas sensibilidades dependem do nível da parasitemia dos indivíduos infectados e da susceptibilidade das espécies de triatomíneos utilizados, além de exigirem recursos humanos treinados, da mesma forma que os testes bioquímicos (GUHL et al., 2002).

Anticorpos monoclonais foram propostos para a diferenciação entre o *T. cruzi* e o *T. rangeli*. Entretanto, apesar dos resultados promissores obtidos

utilizando-se camundongos infectados (ANTHONY, CODY & CONSTANTINE, 1981), os mesmos não foram reprodutíveis em ensaios com seres humanos, nos quais não foi possível distinguir estes dois parasitos (O' DALY et al., 1994).

Nos últimos 10 anos, muitas proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos de *T. cruzi* têm sido descritos, testados e utilizados em pesquisas, demonstrando bons resultados (DA SILVEIRA et al., 2001).

Segundo Da Silveira e colaboradores (2001), imunoensaios avaliando os antígenos recombinantes de *T. cruzi* CRA, FRA, Ag39, YcD, Tc24, SAPA e MAP, frente a 1.062 soros de pacientes e indivíduos saudáveis de 4 regiões brasileiras endêmicas para tripanosomíase americana, revelaram 100% de especificidade e 93,3% de sensibilidade. Nenhuma reação cruzada foi observada com um grupo de 40 soros de pacientes com leishmanioses.

Recentemente, Gomes e colaboradores (2001), avaliando um kit de diagnóstico para testes de ELISA contendo os antígenos recombinantes FRA (antígeno repetitivo flagelar) e CRA (antígeno repetitivo citoplasmático), demonstraram 100% de especificidade e sensibilidade. Segundo estes autores, nenhuma reação cruzada foi observada com soros de pacientes com leishmanioses visceral e cutânea, nem com soros de pacientes não chagásicos com outras infecções (sífilis, HTLV, HCV e HBV).

Entretanto, mesmo com a utilização de antígenos recombinantes de *T. cruzi* em kits de diagnóstico, os quais usualmente apresentam uma elevada especificidade no diagnóstico da doença de Chagas, os testes de especificidade levam em consideração a diferenciação entre o *T. cruzi* e outros parasitos responsáveis por doenças tropicais, como os do gênero *Leishmania*. Raramente,

estes kits comerciais são testados a fim de comprovar a inexistência de reação cruzada com o *T. rangeli*, até mesmo pela dificuldade em se obter soros de seres humanos infectados unicamente por este parasito. Assim, apesar dos inúmeros kits de diagnóstico para a doença de Chagas disponíveis no mercado, a reatividade sorológica cruzada com o *T. rangeli* permanece como um fator complicador para o diagnóstico específico.

Por outro lado, a técnica de PCR tem revelado resultados promissores e uma boa especificidade, entretanto a sensibilidade depende de diversos fatores como o nível de parasitemia dos indivíduos infectados, a presença de inibidores da *Taq* DNA polimerase, o elevado custo e o requerimento de recursos humanos e equipamentos especializados, tornando limitada a sua aplicação em laboratórios de diagnóstico de rotina. Com isso, estas metodologias normalmente estão disponíveis apenas em universidades ou institutos de pesquisa (GUHL et al., 2002).

O desenvolvimento da genômica tem permitido o estudo de diversos organismos patogênicos, tendo revelado importantes e mesmo desconhecidos aspectos de suas biologias. Estes estudos, apesar de usualmente não apontarem direta ou imediatamente respostas aos anseios da comunidade científica, fornecem uma base importante para o desenvolvimento de estudos biológicos.

1.4- Projetos Genomas de Parasitos

Os projetos genomas de parasitos tiveram seu início entre 1993 e 1994, quando muitos consórcios para o mapeamento e seqüenciamento de genomas de tamanho médio foram estabelecidos. O principal objetivo destes projetos é

umentar drasticamente o conhecimento da biologia molecular dos parasitos, os quais são patógenos para uma grande parte da população mundial. Cerca de 50 espécies de protozoários e metazoários afetam 75% da população mundial causando aproximadamente 3 milhões de mortes ao ano (COX, 2002). Neste sentido, a compreensão do genoma destes organismos pode resultar no desenvolvimento de novas ferramentas para o diagnóstico, redução da morbidade e controle de doenças (DEGRAVE et al., 2001).

Adicionalmente, o estudo da biologia molecular dos parasitos, pode ajudar no esclarecimento da evolução (molecular) dos organismos eucarióticos (DEGRAVE et al., 2001).

Hoje, estão em andamento os projetos genomas de diversos parasitos, sendo que alguns destes já foram finalizados como o do *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium y. yoelii*, *Cryptosporidium parvum*, *C. hominis*, *Brugia malayi* e, mais recentemente, *Leishmania major*, *T. brucei* e *T. cruzi* (COPPEL & BLACK, 2005; EL-SAYED et al., 2005; BERRIMAN et al., 2005; IVENS et al., 2005).

Entretanto, apesar da grande disponibilidade de seqüências do genoma de diversos organismos em bancos de dados, apenas 105 seqüências nucleotídicas e 44 protéicas do *T. rangeli* estão atualmente depositadas no GenBank (NCBI)¹, o que representa um número muito baixo em relação aos demais organismos, inclusive em relação a outros parasitos da mesma família como o *T. vivax* e o *T. congolense*, cujos projetos genoma estão em andamento (HERTZ-FOWLER & BERRIMAN, 2004), além do *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major*, os quais já possuem seu

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

genoma completo seqüenciado (EL-SAYED et al., 2005a; BERRIMAN et al., 2005; IVENS et al., 2005).

O tamanho dos genomas haplóides dos TryTrips (*T. brucei*, *L. major* e *T. cruzi*) contêm entre 25 e 55 megabases distribuídas em 11 a 36 cromossomos, geralmente diplóides, nos quais estão presentes aproximadamente 8.100, 8.800 e 12.000 genes que codificam proteínas, respectivamente (EL-SAYED et al., 2005b).

O cariótipo molecular de cepas de *T. rangeli* isoladas de distintos vetores, reservatórios e regiões geográficas (América Central e do Sul), foi avaliado através da eletroforese CHEF (*contour-clamped homogeneous electric field*) por Toaldo e colaboradores (2001). Estes pesquisadores verificaram a existência de um cariótipo único para cada uma das cepas de *T. rangeli* estudadas, sendo a variabilidade caracterizada por diferenças no número (16 a 24) e tamanho (390Kb a 3.130Kb) das bandas cromossomais. Entretanto, apesar da clara individualidade apresentada por diferentes cepas do *T. rangeli*, uma maior similaridade foi observada entre cepas da mesma região geográfica, conforme evidenciado pela diferença entre as cepas do sul do Brasil em relação às cepas da Colombia, Venezuela e Honduras (TOALDO et al., 2001).

O *T. rangeli*, assim como os demais representantes da Ordem Kinetoplastida, apresenta algumas peculiaridades biológicas, que os distingue dos demais organismos eucariotos. Estes parasitos possuem o genoma de sua única mitocôndria, denominada de cinetoplasto, composto por moléculas concatenadas de DNA circular, os maxi e os minicírculos, os quais são denominados de kDNA (VICKERMAN, 1976).

Outra característica marcante é que, além de produzirem transcritos geralmente policistrônicos e sem íntrons, os tripanosomatídeos realizam o processo de trans-splicing, onde uma seqüência curta e conservada de RNA chamada de *spliced-leader* ou mini-exon, é adicionada à extremidade 5' de todos os RNA mensageiros (mRNA) de forma pós-transcricional. Adicionalmente, os tripanosomatídeos realizam uma extensa edição do RNA mitocondrial para formar mRNA funcionais e a RNA polimerase I é a enzima responsável pela transcrição de genes que codificam para proteínas (TEIXEIRA & Da ROCHA, 2003).

Evidências demonstram que o mRNA do *T. cruzi* pode ser estocado no citoplasma sem ser traduzido, sugerindo que a mobilização do mRNA para os polissomos seja um mecanismo de regulação gênica pós-transcricional em tripanosomatídeos (ÁVILA et al., 2003).

Após o seqüenciamento do genoma de diversos organismos, surgiu uma nova abordagem que permite estudar os genes expressos de um determinado genoma, o transcriptoma, o qual tem mostrado que para cada tipo de célula e condição ambiental existem diferenças de expressão gênica. A evolução desta abordagem tem resultado do desenvolvimento de uma variedade de técnicas, que permitem identificar os genes expressos em diferentes condições fisiológicas, bem como relacionar esta informação com a obtida por outras abordagens através da bioinformática.

1.5- Técnicas para o Estudo da Expressão Gênica

Diferentes técnicas moleculares têm sido utilizadas com o intuito de gerar dados sobre a expressão gênica de diversos organismos, incluindo tripanosomatídeos, em diferentes situações fisiológicas ou patológicas. Estas tecnologias podem ser aplicadas em grande escala, tornando possível a análise simultânea da expressão de milhares de genes (VERDUN et al., 1998).

Uma dessas técnicas, baseada no seqüenciamento parcial de moléculas de DNA complementar (cDNA) ao mRNA, produz as chamadas etiquetas de seqüências expressas ou EST (do inglês *Expressed Sequence Tags*). Esta técnica representa, em termos de seqüenciamento, uma ferramenta muito útil para o mapeamento físico de genomas com a vantagem de ser direcionada à genes transcritos. As seqüências geradas por esta técnica são usualmente depositadas no banco de dados de ESTs do GenBank, denominado dbEST, sendo de grande utilidade para a descoberta de genes novos com o auxílio de ferramentas de bioinformática (VERDUN et al., 1998).

Entretanto, uma tecnologia recentemente desenvolvida no Brasil, baseia-se no seqüenciamento parcial de cDNA e tem como principal diferença em relação à técnica de EST, a utilização de iniciadores aleatórios sob condições de baixa stringência. Pelo fato de não usar iniciadores complementares às extremidades do cDNA (como ocorre com os EST), esta técnica permite uma amplificação preferencial da porção central dos transcritos em detrimento das porções 5' e 3' (DIAS NETO et al., 2000). Esta tecnologia denominada ORESTES origina-se da junção de ORF + EST, onde ORF refere-se às janelas abertas de leitura (do inglês

Open Reading Frame). Por definição, ORF são as seqüências compreendidas entre os códons de iniciação e terminação, onde se liga toda a maquinaria de transcrição em um mRNA, sendo portanto altamente informativas, permitindo a análise das seqüências gênicas que potencialmente serão traduzidas em proteínas (DIAS NETO et al., 2000; ZAHA et al., 2003).

Uma preocupação na utilização destas técnicas é a presença das regiões transcritas, porém não-traduzidas denominadas *untranslated regions* (UTR), as quais estão presentes nas extremidades 5' e 3' dos transcritos com função regulatória mas não codificante (NOZAKI & CROSS, 1995). Desta forma, o seqüenciamento de EST deve considerar a presença destas regiões, as quais podem ser relativamente longas, porém não representando um problema direto quando se utiliza a técnica ORESTES. O seqüenciamento em larga escala de EST pode gerar muitas seqüências das UTR, deixando de fora as regiões codificantes de interesse, o que pode representar um grande problema quando o objetivo do trabalho for a descoberta de novas regiões codificantes. Adicionalmente, a técnica ORESTES tem uma inclinação para a amplificação de transcritos raros, os quais por outras técnicas, como a geração de EST, dificilmente são detectados sem uma prévia normalização da biblioteca (DIAS NETO et al., 2000).

Sakabe e colaboradores (2003), compararam a técnica de EST e ORESTES quanto à detecção de variantes de processamento do mRNA (splicing) raros, incluindo a detecção do uso alternativo dos exons ou uso alternativo de códons ou AEU (do inglês *alternative exon usage*), os quais afetam a estrutura da proteína correspondente. Através deste estudo, os autores demonstraram mais uma vez que perfis de ORESTES são mais eficientes na geração de seqüências

de transcritos raros em relação aos convencionais EST. Sendo assim, o estudo do seqüenciamento de cDNA utilizando a técnica ORESTES torna possível a descoberta de proteínas espécie-específicas que podem tornar-se alvos potenciais no desenvolvimento de vacinas e novos fármacos, bem como no diagnóstico de algumas doenças.

Adicionalmente, de Souza e colaboradores (2000) geraram 250.000 ORESTES derivadas de uma variedade de tumores humanos sendo que o agrupamento destas seqüências resultou em 81.429 seqüências contíguas, das quais 1.181 seqüências apresentaram similaridade com o cromossomo 22 humano. Além disso, através destas seqüências foi possível identificar 48 novos transcritos para este cromossomo, os quais ainda não tinham sido definidos por outras técnicas.

Camargo e colaboradores (2001) demonstraram a contribuição de 700.000 ORESTES na definição do transcriptoma humano, constatando a possibilidade de geração de dados a partir de quantidades muito pequenas do material biológico inicial (devido ao processo de amplificação), além de complementar as seqüências obtidas pela técnica de EST, permitindo a extensão dos transcritos.

Verjovski-Almeida e colaboradores (2003) geraram aproximadamente 125.000 ORESTES a partir de diferentes estágios de desenvolvimento do *S. mansoni* (adultos macho e fêmea, ovos, miracídio, esporocistos, cercária e esquistossômulo), sendo que 77% das seqüências geradas, quando comparadas com bancos de dados, revelaram-se fragmentos novos para este parasito.

Esses resultados demonstram que a metodologia ORESTES pode efetivamente complementar os correntes esforços para a definição do transcriptoma de diversos organismos.

A disponibilidade de informações a respeito de genomas, associada à projetos transcriptoma e proteoma, tem revolucionado a pesquisa no campo da parasitologia. Conforme aumenta o número de espécies seqüenciadas, análises comparativas e filogenéticas têm melhorado a qualidade da anotação e predição de genes (COPPEL & BLACK, 2005).

O conhecimento atual do transcriptoma do *T. rangeli* está limitado a um estudo realizado recentemente em nosso laboratório por Snoeijer e colaboradores (2004), onde foram geradas 656 EST a partir de 3 bibliotecas normalizadas de formas epimastigotas da cepa Choachi, das quais 386 apresentaram similaridade com seqüências de tripanosomatídeos, sendo que destas 168 foram similares à seqüências de *T. cruzi* e apenas 20 foram similares à seqüências de *T. rangeli*. Mais de 37% das EST geradas consideradas válidas não apresentaram similaridade com seqüências depositadas nos bancos de dados e podem estar representando genes específicos de *T. rangeli*, genes desconhecidos ou as regiões das extremidades 3' e 5' não traduzidas (UTR).

Desta forma, devido à escassez de dados a respeito do genoma do *T. rangeli*, à sua capacidade de infectar humanos, à falta de informações a respeito do curso da infecção no hospedeiro vertebrado, à ocorrência de infecções únicas ou mistas e à reatividade sorológica cruzada com o *T. cruzi*, o estudo da expressão gênica do *T. rangeli* poderá contribuir para o esclarecimento da biologia deste parasito.

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo Geral

Gerar e analisar etiquetas de seqüências transcritas da cepa Choachi de *Trypanosoma rangeli*, utilizando a técnica ORESTES.

3.2- Objetivos Específicos

- Gerar ORESTES de formas tripomastigotas da cepa Choachi de *T. rangeli*.
- Analisar comparativamente através de ferramentas de bioinformática as ORESTES obtidas, utilizando seqüências nucleotídicas e protéicas obtidas em bancos de dados públicos.
- Identificar ORESTES espécie-específicas através da análise comparativa intra- e inter-específica, utilizando genomas de organismos filogeneticamente próximos.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Parasitos

Neste estudo foi utilizada a cepa Choachi de *T. rangeli* originalmente isolada de glândulas salivares de *Rhodnius prolixus* naturalmente infectado, capturado na Colômbia (SCOTHELLIUS, 1987). Os parasitos foram cultivados à 27°C, mantidos através de repiques semanais em meio LIT suplementado com 15% de soro bovino fetal (SBF), sendo rotineiramente submetidos a passagens sucessivas por camundongo/triatomíneo/camundongo. Esta cepa encontra-se depositada no criobanco do Laboratório de Protozoologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina (MIP/CCB/UFSC).

3.2- Obtenção e purificação das formas tripomastigotas

As formas tripomastigotas de cultura foram obtidas utilizando-se o protocolo descrito por Koerich e colaboradores (2002). Resumidamente, os parasitos de cultura em fase exponencial de crescimento em meio LIT foram lavados duas vezes em tampão salina fosfato - PBS (NaCl 0,14M; KCl 0,003M; Na₂HPO₄ 0,01M; KH₂PO₄ 0,002M) estéril pH 7,4 a 1.500 x g por 10 minutos, e cultivados em meio DMEM[®] (Sigma, São Paulo) pH 8,0 acrescido de 10% de SBF na concentração de 5x10⁶ parasitos/mL. Após 7 dias de incubação a 27°C, a porcentagem de formas tripomastigotas foi determinada através da contagem aleatória de 200 parasitos em esfregaços corados com Giemsa.

A purificação das formas tripomastigotas foi realizada utilizando-se uma coluna troca catiônica de CM-celulose (Servacel[®], Heidelberg), a qual foi ativada conforme as instruções do fabricante. Inicialmente 10g de resina foram eluídas em 500 mL de NaOH 0,5M e homogeneizadas através de ultra-som por 2 minutos utilizando o equipamento *Sonic Dismembrator* 60 (Fisher Scientific[®]) na potência 4. A resina permaneceu interagindo com esta solução por 30 minutos, sendo em seguida lavada com água bidestilada até atingir pH 7. Após as lavagens, a resina foi eluída em 500 mL de HCl 0,5M e novamente homogeneizada por 2 minutos na potência 4, permanecendo nesta solução por 30 minutos, sendo em seguida lavada com água bidestilada. Após atingir pH 7, a resina foi então eluída em tampão PSG pH 7,2 (NaCl 0,073M; Na₂HPO₄ 0,1M; NaH₂PO₄.H₂O 0,006M) contendo 2% de glicose .

A coluna de cromatografia foi montada utilizando-se uma seringa plástica estéril de 60mL, contendo lã de vidro em seu fundo a fim de evitar a perda excessiva de resina. Um volume de 10 mL de resina ativada, conforme descrito anteriormente, foi transferida para a coluna e deixada em repouso por 15 minutos para o empacotamento da mesma por força da gravidade. Depois de empacotada, o fluxo do tampão PSG pH 7,2 foi ajustado para 20 gotas por minuto e 100 mL deste tampão foram passados através da coluna para equilibrar a resina.

A suspensão de parasitos diferenciados foi aplicada no topo da coluna, sendo o fluxo interrompido nos 15 minutos iniciais com o intuito de permitir a interação dos parasitos com a resina. As alíquotas foram coletadas em volumes de 3mL e observadas ao microscópio óptico para acompanhar a saída de

parasitos. Após a purificação, a determinação da porcentagem de tripomastigotas purificados foi realizada através da análise e contagem aleatória de 200 parasitos em esfregaços corados por Giemsa.

Os tripomastigotas coletados foram lavados 2 vezes em PBS pH 7,4 e imediatamente submetidos à extração de RNA conforme o descrito a seguir.

3.3- Extração de RNA:

3.3.1- Extração do RNA total:

Para a extração do RNA total 2×10^8 parasitos foram homogeneizados vigorosamente em 1mL do reagente Trizol[®] (Invitrogen, Carlsbad) e incubados por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram agitadas por 15 segundos com 200 μ L de clorofórmio 98% (Merck, Darmstadt), incubadas por 3 minutos e centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos. A fase aquosa resultante da centrifugação foi transferida para um novo tubo onde foi adicionado 500 μ L de isopropanol 98% (Merck) e a fase orgânica foi desprezada. Após 10 minutos de incubação as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000 x g. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 1mL de etanol 75% (Merck), sendo homogeneizado e centrifugado a 7.500 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado contendo o RNA total foi seco, invertendo os tubos sobre papel absorvente por aproximadamente 10 minutos. Após a secagem, o RNA foi eluído em 200 μ L de água ultrapura livre de RNAses. Todas as incubações foram realizadas em gelo para evitar a degradação do RNA.

A dosagem das amostras, bem como a verificação da qualidade das mesmas, foram feitas no espectrofotômetro BioPhotometer[®] (Eppendorf, Hamburg) realizando-se a leitura em 260nm.

Para a obtenção de materiais e soluções livres de RNase, os mesmos foram tratados com água contendo 0,1% de Dietil pirocarbonato (DEPC) por 30 minutos, sendo posteriormente autoclavados para esterilização e inativação do DEPC.

3.3.2- Extração do RNA mensageiro (mRNA):

A extração do mRNA foi realizada com o kit *μMACs mRNA Isolation* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach), conforme as especificações do fabricante. O RNA total obtido conforme descrito anteriormente, foi adicionado de 1mL de tampão de lise e misturado vigorosamente durante 3 minutos. Em seguida, foram adicionados 50μL de uma solução contendo oligonucleotídeos poli-T associados à micropartículas metálicas (Oligo (dT) MicroBeads) à amostra visando a hibridização com a cauda poli-A do mRNA. Esta mistura foi então passada através de uma coluna contendo um campo de separação magnética, onde os mRNA ligados às micropartículas metálicas permaneceram retidos. A coluna foi lavada 2x com 100μL de tampão de lise (Lysis/Binding Buffer) para a remoção de proteínas e DNA, sendo em seguida lavada mais 4x com 100μL tampão de lavagem para remover o rRNA (RNA ribossomal) e algum possível DNA contaminante. A eluição do mRNA da coluna foi realizada com água ultrapura livre de RNases previamente aquecida à 65°C.

A dosagem das amostras e a verificação da qualidade das mesmas, foram feitas no espectrofotômetro *BioPhotometer*[®] (Eppendorf) realizando-se a leitura em 260nm. Após a dosagem, o mRNA foi imediatamente utilizado na reação de transcrição reversa (item 3.4) ou alternativamente mantido à -80°C até a sua utilização.

3.4- Reação de Transcrição Reversa (RT-PCR):

Amostras de mRNA purificado foram aquecidas a 65°C por 5 minutos e então sujeitas à transcrição reversa à 37°C por 1h e 30 minutos. Cada reação ocorreu na presença de 60 unidades da enzima transcriptase reversa SuperScript II[®] (Invitrogen), 2mM de uma mistura de dNTPs (Invitrogen), 1,5 μL de um iniciador randômico selecionado ao acaso na concentração de 15 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$, 30ng de mRNA purificado, na presença de 0,6 μL do tampão da enzima em um volume final de 3,5 μL . Foram utilizados 7 iniciadores randômicos (Tabela 1), um para cada reação.

As seqüências dos iniciadores abaixo descritos foram gentilmente cedidas pelo Dr. Emmanuel Dias Neto do Laboratório de Neurociências (LIM-27) do Instituto de Psiquiatria da Universidade de São Paulo (USP), sendo que sua eficácia na geração de perfis de ORESTES já havia sido anteriormente comprovada (de De SOUZA et al., 2000; CAMARGO et al., 2001). Para cada reação utilizando um único iniciador distinto, foi utilizado um controle negativo que consistia de todos os componentes da transcrição reversa à exceção do mRNA, o qual foi substituído por igual volume de água tratada por DEPC.

Tabela 1: Iniciadores utilizados no presente estudo para a geração dos perfis de ORESTES.

Nome	Seqüência (5'- 3')
ORESTES 1	GTG GGT TGA CCG TGG CTT
ORESTES 2	ACT GCG AAG GGG CTT CTT
ORESTES 3	TAA AGC CAA ACC CCC GAC
ORESTES 4	CCA GCC CCA GAC ACG GAC
ORESTES 5	TGT CTT TCC CTG CTG CTC
ORESTES 6	TGC CTG CAG TCT TCC CGC
ORESTES 8	TCC CTC TCC TCC CAC CTC

3.5- Geração dos perfis de ORESTES:

Após a síntese de cDNA simples fita pela RT-PCR, este foi amplificado pela reação de PCR na presença dos mesmos iniciadores utilizados na transcrição reversa. A reação ocorreu na presença de 1U da enzima Taq DNA polimerase (Labtrade, São Paulo), 2mM de uma mistura de dNTPs (Invitrogen), 1,5 µL do iniciador (15pmol/µL) e 2µL de cDNA, na presença do tampão da enzima, em um volume final de 28,5µL de reação.

A amplificação foi realizada em um termociclador Mastercycler[®] Gradient (Eppendorf) utilizando-se diferentes ciclos com condições térmicas distintas, iniciando por uma desnaturação inicial de 75°C por 5 minutos, seguida por 16 ciclos com temperatura de desnaturação de 94°C por 30 segundos, temperaturas

de ligação dos iniciadores variando de 52°C a 45°C (com reduções progressivas de 1°C a cada 2 ciclos), e extensão a 72°C por 1 minuto; seguido por 26 ciclos com temperatura de desnaturação de 94°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, seguido por uma temperatura de ligação dos iniciadores de 48°C por 1 minuto e extensão 72°C por mais 1 minuto. Ao término destes ciclos, as amostras foram submetidas a uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

Estas condições térmicas foram determinadas a fim de favorecer a amplificação dos transcritos raros. Um controle negativo para cada reação foi incluído, na presença dos mesmos componentes, à exceção do cDNA molde, o qual foi substituído por água ultrapura. Após a amplificação, os produtos gerados foram resolvidos em géis de agarose 1% e corados pelo brometo de etídeo. A visualização das amostras foi realizada com o auxílio de um transiluminador MacroVue UV 20[®] (Hoefer Pharmacia Biotech, San Francisco) e os resultados fotografados.

3.6- Construção das bibliotecas de ORESTES:

Com a utilização do kit pGEM-T[®] *Easy Vector* (Promega, Madison), os perfis de ORESTES foram clonados segundo as especificações do fabricante. Os produtos de ligação foram então utilizados na transformação de células eletrocompetentes XL1-Blue (*Escherichia coli*) nas seguintes condições elétricas: 2,5KV, 25µF e 200Ω. A seleção dos clones recombinantes foi baseada na coloração azul/branco das colônias crescidas em meio LB Ágar suplementado

com X-Gal e IPTG. Para cada placa contendo 10 mL de meio LB ágar foram adicionados 50 μ L de X-Gal (20mg/ μ L) e 100 μ L de IPTG (200mg/mL).

As colônias positivas foram então crescidas durante 20 horas à 37°C em placas de 96 orifícios com 125 μ L de meio LB contendo ampicilina (100 μ g/mL), onde posteriormente foi adicionado 100 μ L de glicerol 50% para o congelamento e estocagem das mesmas a -20°C.

A comprovação da presença dos insertos e o tamanho dos mesmos nos plasmídeos recombinantes foi realizada para cada biblioteca através do PCR de colônia (amplificando 30 clones aleatórios por placa), utilizando os iniciadores pGEM-F (5' – ACG CCA AGC TAT TTA GGT GAC ACT ATA –3') e EXCEL-R (5' – GTT GTA AAA CGA CGG CCA GTG AAT–3'), os quais são direcionados para regiões do vetor próximas ao sítio de clonagem. A reação de PCR ocorreu na presença de 10 pmol de cada iniciador, 2 mM de uma mistura de dNTPs (Invitrogen), 1U da Taq DNA polimerase (Labtrade), 1 μ L de tampão da enzima, 1,5mM de cloreto de magnésio, aproximadamente 1 μ L de cada amostra e água ultrapura em um volume final de 10 μ L. Para esta amplificação foram utilizadas as seguintes condições térmicas: 94°C por 5 minutos para a desnaturação inicial, seguidos de 30 ciclos com desnaturação de 94°C por 1 minuto, ligação dos iniciadores a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, seguida por uma extensão final de 72°C por 5 minutos após o término dos 35 ciclos.

Após a comprovação da presença dos insertos as colônias transformantes foram cultivadas em placas de 96 orifícios contendo 1 mL de meio acrescido de ampicilina na concentração de 100 μ g/mL. As placas foram vedadas com adesivo

plástico perfurado com uma agulha em cada poço para facilitar a oxigenação, sendo posteriormente incubadas em estufa bacteriológica durante 20 horas à 37°C sob agitação de 100rpm. Decorrido o tempo de crescimento, os plasmídeos recombinantes foram extraídos através de um processo padrão de lise alcalina (mini-prep) conforme descrito por Sambrook e Russel (2001).

3.7- Seqüenciamento dos insertos:

Para seqüenciar as ORESTES obtidas foi utilizado o Kit DYEnamic[®] ET Dye Terminator (GE Healthcare / Amersham Biosciences, Buckinghamshire), conforme as instruções do fabricante, sendo o seqüenciamento realizado em um equipamento MegaBace 1000[®] DNA Analysis System (GE Healthcare / Amersham Biosciences).

A reação de seqüenciamento foi realizada na presença de 5,0 pmol do iniciador pGEM-F ou EXCEL-R e 500ng a 1.000ng do DNA plasmidial, nas seguintes condições térmicas: 95°C por 25 segundos, seguidos de 35 ciclos com desnaturação de 95°C por 15 segundos, ligação dos iniciadores a 50°C por 20 segundos e extensão a 60°C por 90 segundos.

Posteriormente, os produtos seqüenciados foram precipitados com isopropanol 70% (Merck) para a retirada dos nucleotídeos e iniciadores não incorporados na reação. Os produtos purificados foram eletroinjetados com 2KV por 100 segundos e eletroeluídos por 140 minutos a 7KV.

3.8- Análise das seqüências obtidas:

A análise das seqüências foi realizada através da plataforma de análise e anotação genômica denominada *Genomic Analysis Resources of Sequence Annotation* - GARSA (DÁVILA et al., 2005), a qual foi desenvolvida em uma parceria entre a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e o Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). A plataforma GARSA é disponibilizada através da página do consórcio BiowebDB¹.

Através deste sistema, as seqüências obtidas foram primeiramente submetidas a uma avaliação de qualidade pelo programa Phred ($\text{Phred} \geq 15$), do pacote Phred/Phrap/Consed (EWING & GREEN, 1998; EWING et al., 1998), sendo consideradas válidas para fins de análise, seqüências de tamanho igual ou maior que 100 nucleotídeos. As seqüências válidas foram posteriormente agrupadas pelo programa CAP3 (*Sequence Assembly Program*) (HUANG & MADAN, 1999), formando os chamados clusters, a fim de reduzir a redundância dos dados obtidos com a formação de seqüências consenso. A estimativa do conteúdo de bases C+G foi realizada através do programa Gecce do pacote EMBOSS (*European Molecular Biology Open Software Suite*) (RICE, LONGDEN & BLEASBY, 2000).

As seqüências não redundantes foram confrontadas com seqüências depositadas em diversos bancos de dados públicos, os quais estão reunidos na

¹ <http://www.biowebdb.org>

plataforma de análise e anotação genômica GARSA, dentre os quais os bancos nr, nt e EST do GenBank (NCBI)¹; Kineto, Minicircles, Uniprot-TrEMBL e Uniprot-Sprot do EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*)²; banco de domínios conservados CDD (*Conserved Domain Database*)³ e SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*)⁴; banco de ortólogos COG (*Clusters of Orthologous Groups*)¹ e KOG (*Eukaryotic Orthologous Groups*)¹; InterPro⁵; banco de elementos repetitivos RepBASE⁶; banco de dados do genoma de *Mus musculus*¹; Cyanobacteria¹ e *E. coli*¹, além do Gene Ontology⁷, um consórcio que permite a classificação das seqüências em categorias funcionais.

A busca por similaridade foi realizada através do alinhamento local utilizando diferentes algoritmos da rotina BLAST (ALTSCHUL et al., 1990), visando detectar similaridades com seqüências nucleotídicas (blastn) e protéicas (blastx) de tripanosomatídeos e outros organismos, bem como seqüências estágio-específicas. Outro algoritmo utilizado foi o tblastx, o qual antes de verificar a similaridade realiza a tradução nas seis possíveis fases de leitura de cada seqüência de nucleotídeos, tanto da seqüência pesquisada quanto das presentes nos bancos de dados.

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

² <http://www.embl.org>

³ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

⁴ <http://smart.embl-heidelberg.de/>

⁵ <http://www.ebi.ac.uk/interpro/>

⁶ <http://www.girinst.org/replib/update/index.html>

⁷ <http://www.geneontology.org>

As seqüências geradas que apresentaram baixa ou nenhuma similaridade, com os dados disponíveis nos bancos pesquisados, estando fora do limite estipulado (e-value $<10^{-5}$), foram separadas para posterior análise. Todas as seqüências geradas compõem a base de dados do projeto transcriptoma do *T. rangeli*, o qual já contém EST previamente geradas. Esta base de dados será de acesso restrito até a finalização do projeto e a publicação dos resultados, quando as seqüências geradas serão depositadas no GenBank e disponibilizadas através da página do consórcio BiowebDB¹.

¹ <http://www.biowebdb.org>

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Obtenção dos parasitos e purificação do mRNA:

A forma tripomastigota do *T. rangeli* é a responsável pela infecção e indução da resposta imune no hospedeiro mamífero e, portanto o estudo de sua expressão gênica merece especial atenção, uma vez que através deste estudo proteínas específicas deste parasito podem ser utilizadas para distinguí-lo do *T. cruzi* no diagnóstico sorológico da doença de Chagas.

Estudos a respeito desta forma evolutiva do *T. rangeli* são raros devido às dificuldades de propagação em modelos animais experimentais. Entretanto, recentemente em nosso laboratório Koerich e colaboradores (2002), desenvolveram uma metodologia para diferenciação de formas tripomastigotas de *T. rangeli* em um sistema de cultivo in vitro. Além disso, estudos biológicos realizados pelos mesmos pesquisadores demonstraram que tripomastigotas obtidos de cultura foram infectivos para camundongos, permitindo a obtenção de parasitemias extremamente elevadas.

Utilizando este protocolo obtivemos uma diferenciação em torno 78%, que após a purificação utilizando a resina CM-celulose aumentou para 95% de tripomastigotas da cepa Choachi de *T. rangeli*, comprovando a eficácia desta metodologia (Figura 4).

A partir de 2×10^8 parasitos purificados obtivemos aproximadamente $80 \mu\text{g}$ de RNA total, dos quais foi possível extrair aproximadamente $1,7 \mu\text{g}$ de mRNA, conforme a dosagem em espectrofotômetro a 260nm.

Este kit permitiu a obtenção de mRNA em quantidade e qualidade acima dos obtidos por outras metodologias, com a redução do tempo e dos passos de manipulação, o que é de fundamental importância para evitar a degradação do mRNA.

Utilizando os iniciadores randômicos de ORESTES, foram geradas as fitas de DNA complementar (cDNA), as quais posteriormente foram amplificadas.

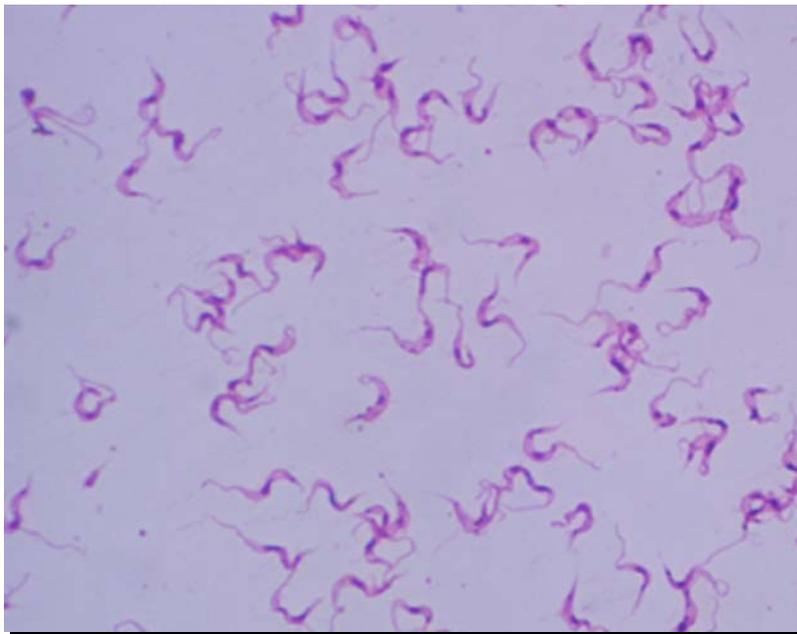


Figura 4: Microfotografia de formas tripomastigotas da cepa Choachi de *Trypanosoma rangeli* obtidas após diferenciação em meio DMEM pH 8,0 e subsequente purificação através da resina CM-celulose (Aumento 1.000 X).

4.2- Perfis de ORESTES e construção das bibliotecas de cDNA

A partir da amplificação do cDNA, utilizando os mesmos iniciadores randômicos utilizados na reação de transcrição reversa, foram obtidos perfis de ORESTES distintos, com produtos de amplificação variando de aproximadamente 200pb a 1.700 pb conforme o demonstrado na figura 5.

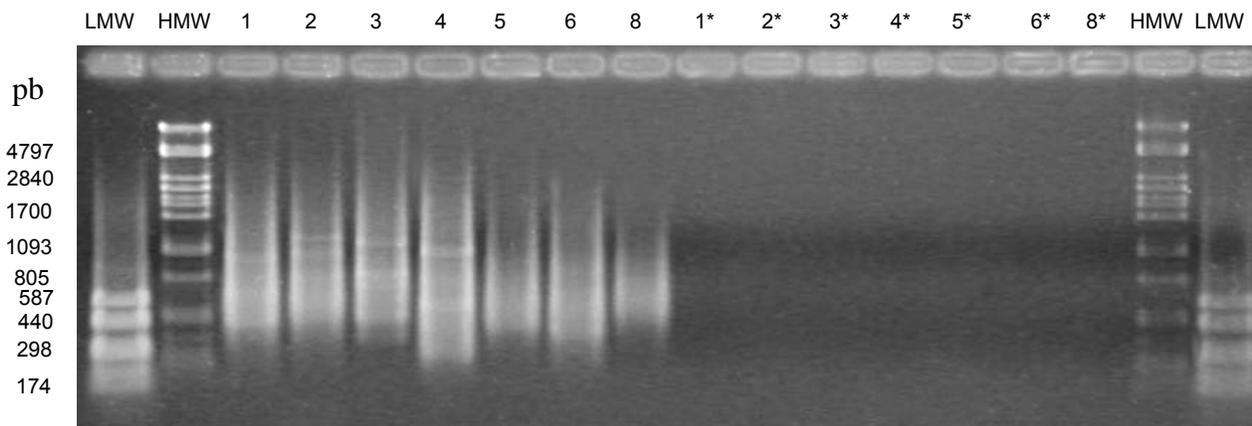


Figura 5: Gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídio revelando perfis de ORESTES obtidos a partir de formas tripomastigotas da cepa Choachi do *Trypanosoma rangeli*. LMW e HMW- Padrões de tamanho molecular (pUC18 digerido com *HaeIII* e Fago lambda digerido com *PstI*, respectivamente). Canaletas 1 a 8- Perfis obtidos com os iniciadores ORESTES 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 8; canaletas 1* a 8*- Controles negativos com os respectivos iniciadores.

Dos sete perfis gerados, somente os perfis 3, 5, 6 e 8 foram selecionados para clonagem, pois apresentaram a formação de poucas bandas proeminentes, o que provavelmente indica a presença de fragmentos mais variados. Somente 1 μ L

destes produtos de amplificação foram utilizados para clonagem conforme o descrito no item 3.6, e a transformação de células eletrocompetentes XL1-Blue foi realizada com 2 μ L de cada ligação.

Ao total, foram construídas 4 bibliotecas de formas tripomastigotas da cepa Choachi do *T. rangeli*, sendo uma biblioteca para cada perfil.

As colônias transformantes foram selecionadas, congeladas e a validação das bibliotecas ocorreu após o PCR de colônia, através do qual se comprovou a presença dos insertos e verificou-se que os mesmos variaram de aproximadamente 150 a 1.200pb. A figura 6 mostra um PCR de colônia de clones representativos de uma das bibliotecas geradas onde os insertos variaram entre 400pb e 800pb.

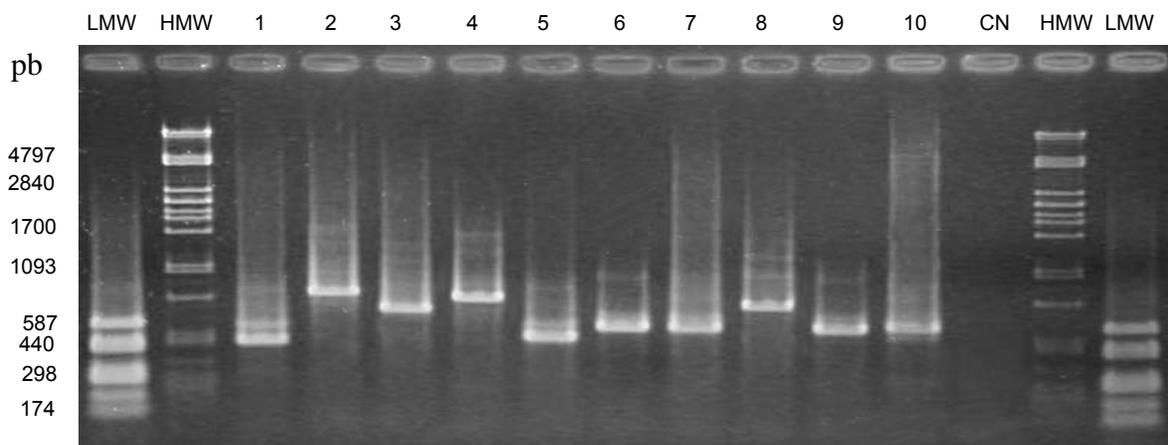


Figura 6: Gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídio revelando o PCR de colônia. LMW e HMW- Padrões de tamanho molecular (pUC18 digerido com *HaeIII* e Fago lambda digerido com *PstI*, respectivamente). Canaletas 1 a 8 - Amplificação dos insertos de clones aleatórios utilizando os iniciadores pGEM-F e EXCEL-R; CN - Controle negativo.

4.3 – Seqüenciamento e análise das seqüências obtidas

O seqüenciamento dos clones obtidos resultou na geração de 2.475 seqüências, das quais 1.295 (52,3%), o que corresponde a 482,48kb, apresentaram tamanho >100pb e uma alta qualidade ($Phred \geq 15$) e 1.180 seqüências (47,7%) foram descartadas por apresentarem baixa qualidade, extensão menor que 100pb e/ou contaminação por seqüências do vetor (Tabela 2). Estes resultados comprovam a eficácia da metodologia de ORESTES utilizada na geração de seqüências.

Tabela 2: Tabela representativa dos resultados do seqüenciamento dos clones de cDNA (ORESTES) de formas tripomastigotas da cepa Choachi de *Trypanosoma rangeli*.

Característica	Total	%*
Clones seqüenciados	2.475	100
Seqüências de alta qualidade	1295	52,3
Seqüências únicas (a)	603	
Seqüências agrupadas em clusters	692	
Clusters formados (b)	155	
Seqüências não redundantes (a+b)	758	
Seqüências descartadas	1.180	47,7

* O percentual é em relação ao número total de clones seqüenciados

O conteúdo G+C varia de acordo com o genoma do organismo, sendo maior nas regiões codificantes em relação às intergênicas no caso dos tripanosomatídeos. A média do conteúdo G+C das ORESTES de *T. rangeli* obtidas neste estudo foi de 54%. Este resultado está de acordo com os obtidos para os genes que codificam proteínas em outras espécies de tripanosomatídeos, sendo mais semelhante ao *T. cruzi*, o qual possui conteúdo de G+C de 53,4% nas regiões codificantes, em detrimento ao *T. brucei* e *L. major*, os quais possuem conteúdo de G+C de 50,9% e 62,5%, respectivamente (EL-SAYED et al., 2005; BERRIMAN et al., 2005; IVENS et al., 2005).

As seqüências geradas variaram de aproximadamente 100pb a 1.000pb, corroborando com os dados do PCR de colônia. Ao serem descartadas as regiões de baixa qualidade e contaminação pelo vetor, as seqüências resultantes variaram de aproximadamente 50pb a 700pb, com um tamanho médio de 197pb. Após serem agrupadas pelo programa CAP3, obtivemos 155 seqüências consenso (*clusters*) formadas por duas ou mais seqüências e 603 seqüências únicas (*singletons*), o que resultou em um total de 764 seqüências não redundantes, sendo que o tamanho destas variou de aproximadamente 100pb a 1.000pb com um tamanho médio de 341pb, conforme o esperado em função do agrupamento das seqüências (Figura 7).

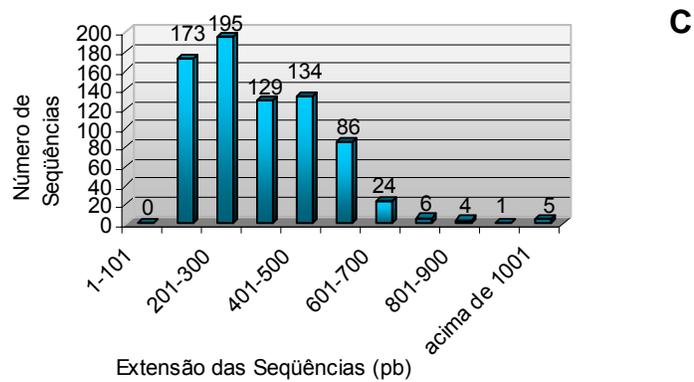
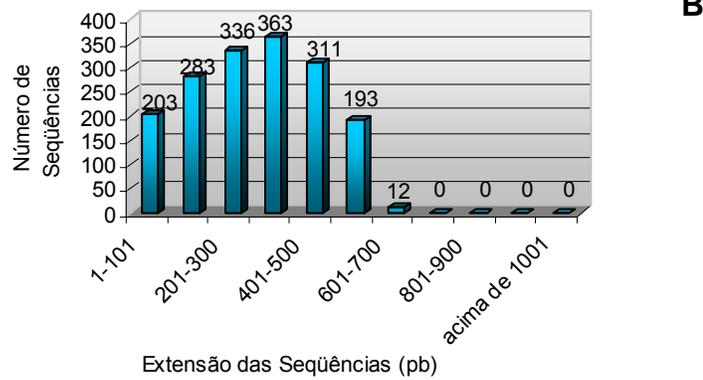
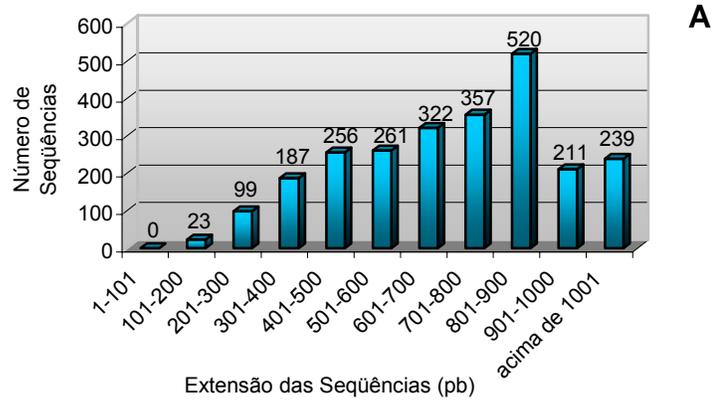


Figura 7: Distribuição das seqüências geradas de acordo com sua extensão (pb), antes (A) e após (B) a retirada das regiões de baixa qualidade e com contaminação de vetor e após a formação dos *clusters* (C).

O número de entradas (*hits*) resultantes da busca por similaridade das ORESTES obtidas com seqüências depositadas em bancos de dados variou de acordo com o banco utilizado. O banco de dados que apresentou hits significantes para um maior número de seqüências foi o nr-NCBI, o qual apresentou hits com e-value $<10^{-5}$ para 448 seqüências, correspondendo a 59,10% das seqüências não redundantes obtidas. Em seguida, está o nt-NCBI com *hits* significantes para 339 seqüências (52,64%), o kinetoplastida-aa com hits para 312 seqüências (41,16%) e o uniprot-trembl com hits para 304 seqüências (40,10%), conforme a figura 8 (Tabela 3).

Muitas seqüências apresentaram similaridade com seqüências depositadas em bancos de dados de domínios conservados e funcionais de proteínas, como o CDD e SMART, sendo este último o que apresentou *hits* significantes para um maior número de seqüências (34,83%). Além disso, um número considerável de hits foi obtido no confronto com bancos de ortólogos como COG e KOG, conforme os dados apresentados na tabela 3.

Tabela 3: Relação dos bancos de dados confrontados com as seqüências geradas neste estudo e o número de seqüências não redundantes que apresentaram entradas (*hits*) significantes em cada um destes bancos.

Bancos de Dados	Nº de seqüências	%*
minicircles-nt	1	0,13%
mus_musculus-nt	2	0,26%
rebase1004	30	3,96%
ecoli.nt	30	3,96%
ecoli.aa	35	4,61%
GO	80	10,55%
COG	140	18,47%
KOG	143	18,86%
uniprot_sprot	147	19,39%
CDD	166	21,90%
dbEST	190	25,06%
SMART	264	34,83%
kinetoplastida-nt	287	37,86%
uniprot_trembl	304	40,10%
kinetoplastida-aa	312	41,16%
nt	399	52,64%
nr	448	59,10%
Sem hits	235	31,00%
Nº de total de clusters	758	100%

* O percentual é em relação ao número total de clusters

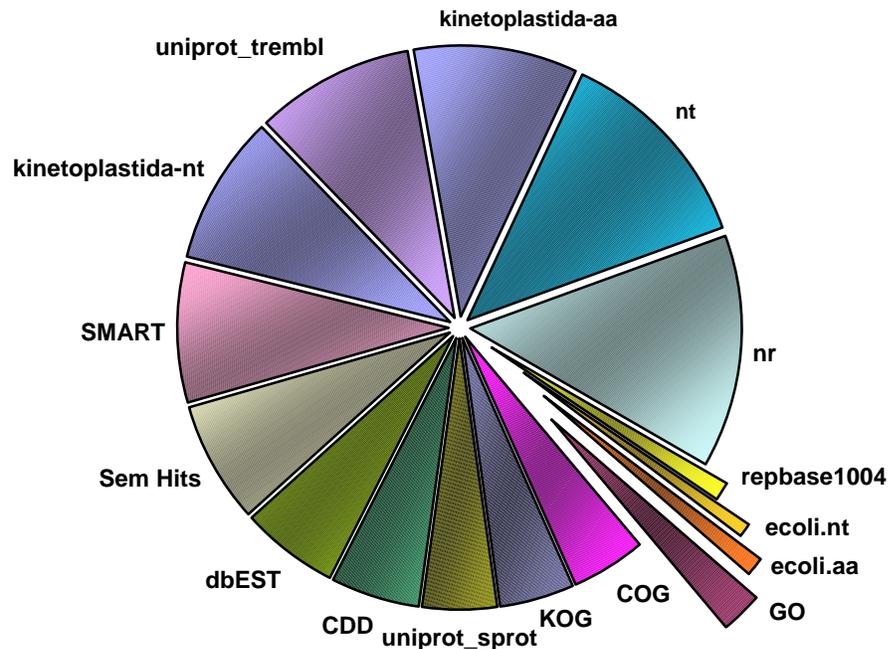


Figura 8: Representação gráfica dos bancos de dados confrontados com as ORESTES de *Trypanosoma rangeli* geradas neste estudo em relação à quantidade de seqüências que apresentaram entradas (*hits*) significantes em cada um destes bancos.

Além da procura por domínios funcionais e conservados nos bancos acima citados utilizando-se o algoritmo BLAST, as seqüências foram confrontadas utilizando-se o programa InterProScan v3.3 com o InterPro, um banco que possui uma documentação integrada sobre famílias de proteínas, domínios e sítios funcionais, o qual agrega informações provenientes dos bancos de dados PROSITE, PRINTS, Pfam e ProDom (APWEILER et al., 2001).

Das 523 seqüências não redundantes que apresentaram similaridade significativa com seqüências depositadas nos bancos de dados confrontados, 139 seqüências (26%) apresentaram entradas no InterPro, o que forneceu uma maior confiabilidade nos resultados obtidos, auxiliando no processo de identificação e interpretação das seqüências.

Apenas 49 (9,37%) das seqüências não redundantes apresentaram entradas com alguma classificação funcional no consórcio Gene Ontology (GO), o qual fornece um vocabulário padronizado para a detecção de produtos gênicos (ASHBURNER et al., 2000). Destas seqüências, 38 (77%) foram classificadas como Função Molecular, 7 (15%) como Componente Celular e apenas 4 (8%) como Processos Biológicos (Figura 9). Segundo ASHBURNER e colaboradores (2000), a Função Molecular neste consórcio é definida como a atividade bioquímica de um produto gênico, sendo que a categoria Componente Celular se refere ao lugar da célula onde o produto do gene é ativo e os Processos Biológicos se referem ao processo no qual o produto gênico está envolvido no metabolismo do organismo.

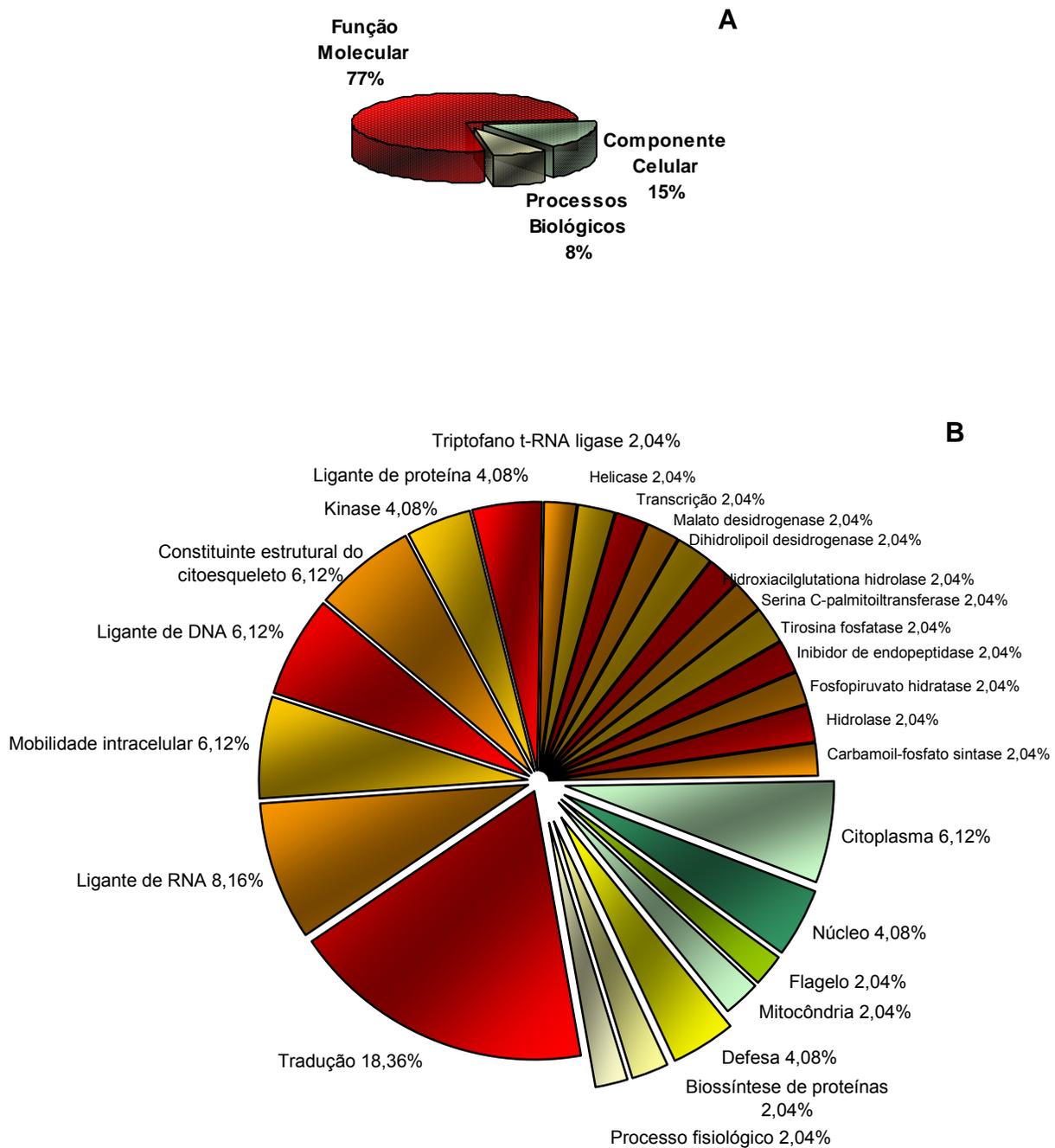


Figura 9: Classificação funcional das ORESTES de *Trypanosoma rangeli* de acordo com as três categorias funcionais do Gene Ontology (A) e a sub-classificação em cada uma destas categorias (B).

Entre as proteínas classificadas na categoria de função molecular, as envolvidas no processo de tradução foram as mais abundantes (18,36%), seguidas pelas proteínas que se ligam ao RNA (8,16%) e ao DNA (6,12%), e posteriormente pelas proteínas envolvidas na mobilidade intracelular (6,12%) e constituintes do citoesqueleto (6,12%), conforme dados da figura 9B.

4.4 – Anotação das seqüências

O conhecimento prévio da proteína e sua função em qualquer outra espécie facilitam o processo de anotação gênica. Entretanto, atualmente grande parte dos genes ainda é anotada como hipotéticos ou hipotéticos conservados, pois não se conhece a função biológica destas seqüências. Por exemplo, a análise do transcriptoma do *P. yoelii*, revelou que das 1.453 EST geradas 33,8% não possuem função conhecida e, portanto foram anotadas como proteínas hipotéticas (WANG et al., 2004).

Das 758 seqüências não redundantes obtidas neste estudo a partir de formas tripomastigotas da cepa Choachi do *T. rangeli*, 235 seqüências (31%) não apresentaram similaridade significativa com as seqüências depositadas nos bancos de dados confrontados, 35 seqüências (5%) apresentaram similaridade significativa com RNA ribossomal e as 488 (64%) restantes foram anotadas de acordo com as seqüências dos bancos de dados com as quais apresentaram maior similaridade, levando em consideração o alinhamento, os valores do e-value e score. Destas seqüências anotadas, 222 (29%) foram anotadas como proteínas hipotéticas e hipotéticas conservadas e 226 (35%) puderam ser especificadas, sendo anotadas de acordo com a proteína correspondente com a qual

apresentaram maior similaridade, as quais então foram classificadas como outras proteínas na figura abaixo e estão citadas na tabela 4 (Figura 10).

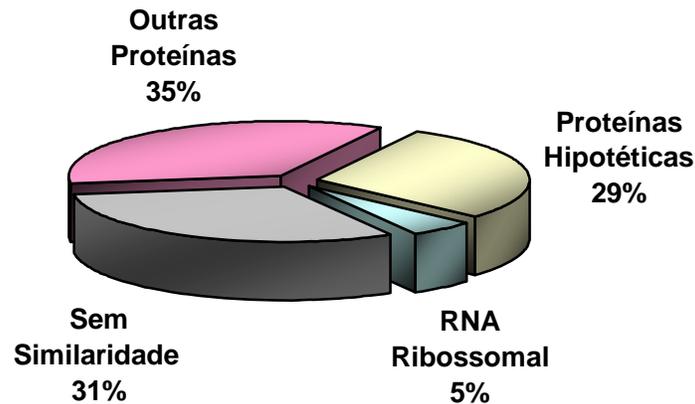


Figura 10: Representação gráfica das seqüências não redundantes obtidas a partir de bibliotecas de cDNA de formas tripomastigotas da cepa Choachi do *Trypanosoma rangeli* que apresentaram similaridade com seqüências depositadas nos bancos de dados confrontados, além das seqüências que não apresentaram entradas (*hits*) significantes nestes bancos (e-value limite $<10^{-5}$).

Uma grande expressão de genes que codificam para moléculas de superfície e proteínas envolvidas na síntese protéica foi observada neste estudo. Estes resultados estão de acordo com outros estudos de expressão gênica realizados em tripanosomatídeos.

Como parte do projeto genoma do *T. cruzi*, VERDUN e colaboradores (1998), geraram 1.949 EST da extremidade 5', a partir de clones de bibliotecas normalizadas de cDNA de formas epimastigotas da cepa CL Brener. As EST que

apresentaram similaridade com seqüências do banco de dados foram agrupadas de acordo com suas prováveis funções biológicas, sendo que as duas categorias maiores formadas estavam relacionadas com a síntese protéica (23,3%) e moléculas da superfície celular (10,8%).

Entre as moléculas de superfície identificadas no presente estudo estão as sialidases e trans-sialidases, outros antígenos de superfície, proteínas associadas ao flagelo, além de glicoproteínas gp63 (Tabela 4 em Anexo).

Recentemente foi demonstrado que acima de 50% do genoma do *T. cruzi* consiste de seqüências repetidas, tais como retro-transposons, repetições teloméricas e genes para grandes famílias de moléculas de superfície, as quais incluem trans-sialidases (TS), mucinas, gp63, e proteínas de superfície associadas à mucina (MASP). Os genes para TS podem ser encontrados em regiões repetitivas sub-teloméricas embora também possam ocorrer em arranjos intracromossômicos (EL-SAYED et al., 2005).

O *T. cruzi* contém 1.430 genes membros da superfamília das trans-sialidases, incluindo 693 pseudogenes, que têm sido classificados em duas maiores subfamílias, uma contendo os genes que codificam para TS enzimaticamente ativas e outra para TS enzimaticamente inativas as quais possuem variável grau de homologia com as TS ativas (EL-SAYED et al., 2005).

De acordo com a identidade das seqüências, peso molecular e função as glicoproteínas de superfície da superfamília das trans-sialidases, podem ser classificadas em 4 grupos. O primeiro grupo inclui a trans-sialidase de *T. cruzi* (TcTS) e sialidase de *T. rangeli* (TrSial). Diferentemente da trans-sialidase de *T. cruzi* que transfere os resíduos de ácido siálico da superfície das células do

hospedeiro para a superfície celular do parasito, a sialidase de *T. rangeli* é uma enzima estritamente hidrolítica que apenas libera os resíduos de ácido siálico da superfície das células do hospedeiro, sem entretanto, transferi-los para a superfície do parasito (AÑEZ-ROJAS et al., 2005).

O segundo grupo da superfamília das trans-sialidases é conhecido como trans-sialidase gp85. Proteínas deste grupo são expressas em formas tripomastigotas e amastigotas do *T. cruzi* e tem sido implicadas na adesão e internalização do parasito nas células do hospedeiro, entretanto sem nenhuma atividade sialidase ou trans-sialidase (AÑEZ-ROJAS et al., 2005). Recentemente, estes autores caracterizaram a ORF de uma proteína expressa em formas epimastigotas do *T. rangeli* com alta identidade a proteínas deste grupo, em detrimento as sialidases pertencentes ao grupo 1 desta superfamília. Embora tenha sido demonstrada a expressão desta proteína por formas epimastigotas do *T. rangeli*, sua função no ciclo de vida deste parasito ainda não foi esclarecida.

Dentre as ORESTES obtidas neste estudo que apresentaram similaridade com seqüências depositadas nos bancos de dados, acima de 15% apresentaram similaridade com sialidases e trans-sialidases (tabela 4), sendo que algumas destas também apresentaram similaridade com a proteína gp85 de *T. cruzi*, a qual ainda não foi relatada em formas tripomastigotas do *T. rangeli*. Um exemplo disto é a seqüência do cluster OJEG204025F01.b, a qual apresentou similaridade com uma gp85-like de *T. cruzi* depositada no banco de seqüências de aminoácidos UniprotTrEMBL, apresentando-se 67% conservada e com 52% de identidade (e-value 4 e-28, escore 124). Entretanto, estudos mais detalhados necessitam ser

realizados a fim de determinar a real similaridade destas trans-sialidases com as gp85 de *T. cruzi*, bem como sua função biológica.

Como encontrado em muitos eucariotos, as peptidases representam aproximadamente 2% dos genes que codificam proteínas nos TriTryps (*T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major*), sendo que algumas delas tem sido identificadas como fatores de virulência, candidatas a vacinas e novos alvos de drogas (IVENS et al., 2005). Neste estudo 3,63% das seqüências obtidas a partir de formas tripomastigotas do *T. rangeli* que apresentaram similaridade nos bancos de dados confrontados corresponderam a peptidases, como a gp63, calpaína cisteína peptidase, rangelipaína, entre outras (Tabela 4).

A família de metaloproteases de superfície gp63 já foi encontrada nos TriTryps e tem sido implicada na virulência, infecção da célula hospedeira e liberação de proteínas de superfície do parasito. Embora *L. major* possua somente 4 genes para gp63 e 2 genes gp63-like, e *T. brucei* possua somente 13, o *T. cruzi* contém mais de 420 genes e pseudogenes. Esses genes parecem estar espalhados pelo genoma, embora algumas vezes ocorram em repetições seriadas (tandem repeats) de clusters. Entretanto, a razão para esta massiva expansão dos genes da família gp63 em *T. cruzi* ainda não foi esclarecida (EL-SAYED et al., 2005).

A dependência dos tripanosomatídeos nas diversas funções dos microtúbulos pode ser exemplificada pela superfamília das kinesinas, composta por proteínas motoras do citoesqueleto que têm papel em uma variedade de processos celulares fundamentais, incluindo a divisão celular, sinal de transdução e dinâmica de microtúbulos (GOLDSTEIN & PHILP, 1999). O genoma de cada um

dos TriTryp, *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major*, codifica para mais de 40 prováveis kinesinas, um número expressivo quando comparado com os 31 do genoma humano (BERRIMAN et al., 2005) e com as 7 seqüências identificadas no presente estudo como prováveis kinesinas (Tabela 4).

O *T. rangeli*, assim como outros membros da Família Trypanosomatidae é um parasito digenético, e como tal apresenta durante o seu ciclo de vida formas evolutivas distintas alternando entre o hospedeiro invertebrado e o vertebrado (GRISARD et al., 1999). A adaptação a estes distintos ambientes exige mudanças na sua morfologia, moléculas de superfície, vias metabólicas e, conseqüentemente, na sua expressão gênica (TEIXEIRA & Da ROCHA, 2003).

Como exemplo de resposta a variações ambientais pode-se citar a expressão de proteínas de choque térmico HSP (*heat shock protein*), as quais são proteínas ubíquas, pertencentes a um grupo de chaperonas e proteases altamente conservadas, essenciais para a viabilidade celular, sendo requeridas por muitas proteínas para alcançar sua conformação nativa (HARTL & HAYER-HARTL, 2002). Neste trabalho, 1,33% das seqüências com similaridade nos bancos de dados foram representadas por proteínas HSP, entre as quais estão HSP 60, HSP 70 e HSP 85 (Tabela 4).

A presença de genes para a HSP70 no genoma do *T. rangeli* já havia sido descrita na literatura, sendo que a sua localização segundo Toaldo e colaboradores (2001), varia de acordo com a cepa do parasito, sendo encontrados em duas bandas cromossomais muito próximas, variando de 950 (cepa Pepita Gonzáles) a 1.200Kb (cepa R-1625), ou em uma única banda cromossomal de 1125Kb e 1050 Kb nas cepas H-14 e SC-61, respectivamente. Entretanto, no *T.*

cruzi, estes genes foram detectados em uma simples banda cromossomal de 1.500Kb, permitindo, portanto a distinção entre estes parasitos através da utilização de sondas de DNA (TOALDO et al., 2001).

Ao compararmos as ORESTES obtidas neste estudo com as obtidas a partir de formas epimastigotas do *T. rangeli* pelo nosso grupo (dados não publicados), diferenças significantes que pudessem estar relacionadas à expressão gênica diferencial estágio-específica não foram observadas.

Isto pode estar refletindo os mecanismos de controle da expressão gênica dos tripanosomatídeos, os quais atuam em muitos níveis de regulação, incluindo vias pós-transcricionais, o que permite a estes parasitos suportarem mudanças ambientais drásticas durante o seu ciclo de vida associadas a transições entre o inseto vetor e o hospedeiro mamífero, exigindo uma instantânea reprogramação e adaptação da expressão gênica.

Desta forma, muitos genes transcritos em formas tripomastigotas não estão necessariamente sendo traduzidos em proteínas neste estágio do desenvolvimento do parasito. Entretanto, embora o estudo dos genes transcritos em formas tripomastigotas através da técnica ORESTES não permita definir se a proteína codificada por este gene é utilizada por esta forma do parasito, a análise do repertório de expressão gênica pode fornecer informações sobre proteínas que possivelmente sejam importantes na próxima fase de desenvolvimento do parasito. Uma vez que pouco se sabe sobre o ciclo deste parasito no hospedeiro vertebrado, informações obtidas através deste estudo podem ser de grande utilidade para futuras investigações.

Um exemplo disso é uma seqüência gerada neste estudo que apresentou similaridade com uma DNA topoisomerase II de *L. major*. Conforme demonstrado por Fragoso e colaboradores (1998), apesar desta proteína ser detectada em formas epimastigotas replicativas e em diferenciação, sendo pouco visível em formas tripomastigotas através de ensaios de western blot, o mRNA codificante para esta proteína foi encontrado tanto em formas epimastigotas quanto tripomastigotas de *T. cruzi* em ensaios de slot blot. Além disso, esta proteína não foi detectada em ensaios de citolocalização por microscopia confocal nas formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Estes resultados sugerem uma regulação negativa desta enzima na forma infectiva do parasito, podendo ser decorrente de uma degradação específica da proteína, ou seqüestro do mRNA em um conjunto de mRNAs não traduzidos pronto para serem traduzidos após a transformação dos tripomastigotas em formas replicativas (FRAGOSO et al., 1998).

As DNA topoisomerasas são enzimas de fundamental importância para o metabolismo dos ácidos nucléicos, capazes de alterar o estado topológico do DNA catalisando mudanças de conformação a partir da clivagem e ligação das fitas de DNA e que participam processos como a replicação, transcrição e recombinação (CHAMPOUX, 2001). Neste sentido, é provável que o gene para esta enzima esteja sendo transcrito em formas tripomastigotas do *T. rangeli* onde possivelmente não seja utilizada, a fim de permitir uma pronta tradução quando o parasito passar por outro estágio de desenvolvimento.

Entretanto, como o ciclo do *T. rangeli* no seu hospedeiro vertebrado ainda não foi elucidado, sendo desconhecida a forma de replicação do parasito neste hospedeiro, não podemos afirmar que as formas tripomastigotas não sejam

replicativas como ocorre em *T. cruzi*. Sendo assim, não podemos descartar a possibilidade da enzima DNA topoisomerase II estar atuando nas formas tripomastigotas do *T. rangeli* e, portanto estudos a fim de avaliar a expressão da enzima são necessários.

Apesar dos correntes esforços para determinar o genoma, o transcriptoma e o proteoma de diversos organismos, muitas seqüências novas (sem similaridade com seqüências depositadas em bancos de dados) têm sido encontradas, demonstrando a necessidade de continuação destes estudos e do desenvolvimento de novos algoritmos a fim de permitir estudos de homologias distantes.

Estudos do transcriptoma das espécies *Schistosoma mansoni* e *S. japonicum*, revelaram a ausência de similaridade com os bancos de dados para 55% e 35% das seqüências geradas, respectivamente (VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2003; HU et al., 2003). O mesmo tem sido observado em tripanosomatídeos, onde das EST geradas a partir de formas amastigotas do *T. cruzi* por Cerqueira e colaboradores (2005), quase 60% não apresentaram similaridade com seqüências depositadas nos bancos de dados. Adicionalmente, das EST geradas a partir de formas epimastigotas do *T. rangeli* por Snoeijer e colaboradores (2004), mais de 37% também não apresentaram similaridade com seqüências depositadas nos bancos.

Das 758 ORESTES não redundantes geradas a partir de formas tripomastigotas do *T. rangeli*, apenas 19 (2,5%) apresentaram similaridade com seqüências deste parasito previamente depositadas nos bancos de dados. Um total de 464 seqüências (61,21%) apresentaram similaridade com seqüências de

outros tripanosomatídeos, sendo que grande parte destas apresentaram maior similaridade com seqüências do *T. cruzi* (423 seqüências) e somente 40 (5,28%) apresentaram similaridade com outros organismos. Sendo assim, 66,5% das seqüências obtidas representam genes descritos para outros organismos, porém desconhecidos para o *T. rangeli*.

Além disso, 31% das ORESTES geradas (235 seqüências) não apresentaram similaridade com seqüências depositadas nos bancos de dados consultados. Estas ORESTES podem estar representando genes unicamente expressos pelo *T. rangeli* (genes espécie-específicos), os quais ainda não foram caracterizados, genes desconhecidos ou ainda um artefato da técnica.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram a aplicabilidade deste tipo de estratégia para gerar novas informações a respeito da expressão gênica dos organismos e a necessidade de estudos genômicos deste parasito. Entretanto, a abordagem utilizada neste trabalho não permite avaliar aspectos da regulação gênica que ocorrem a nível pós-transcricional e pós-traducional. Neste sentido, avaliamos neste trabalho as seqüências transcritas por formas tripomastigotas do *T. rangeli*, o que não significa necessariamente que as proteínas codificadas por estas seqüências estejam sendo expressas.

Este é o primeiro estudo do repertório transcricional de formas tripomastigotas do *T. rangeli*. Cabe salientar que as ORESTES geradas neste estudo serão depositadas no GenBank após a publicação dos resultados, além de ficarem disponíveis para acesso publico no portal BioWebDB¹, o que aumentará

¹ <http://www.biowebdb.org>

drasticamente o número de seqüências do *T. rangeli* disponíveis nos bancos de dados.

Como perspectivas para este trabalho temos a continuidade do projeto transcriptoma do *T. rangeli* (do qual este trabalho faz parte), que visa gerar ORESTES e EST de formas epimastigotas e tripomastigotas das cepas Choachi e SC-58 deste parasito. Até o momento, mais de 8.000 clones já foram produzidos, dos quais 5.162 já foram seqüenciados. Análises preliminares demonstram que através da combinação de ambas as técnicas, EST e ORESTES, um número significativo de regiões codificantes podem ser rapidamente obtidas, tendo sido observado a formação de clusters contendo EST e ORESTES (dados não publicados).

Além disso, seqüências genômicas do *T. rangeli* estão sendo geradas através de GSS (*Genome Survey Sequences*), em um projeto que está sendo realizado em parceria com a FIOCRUZ/RJ. Pretendemos ainda confrontar estas seqüências com o banco de dados curado e anotado pelo consórcio TryTrip, o qual não está disponível, identificar e analisar SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) e microssatélites, além de realizar estudos taxonômicos e filogenéticos do *T. rangeli*.

A comparação destes dados com os de outros organismos, permitirá uma visão geral da biologia de parasitos humanos da Ordem Kinetoplastida, fornecendo importantes informações sobre aspectos biológicos e moleculares da interação parasito-célula, patogenia, identificação de alvos diagnósticos e quimioterápicos, além da filogenia da Ordem como um todo.

5- CONCLUSÕES

- 1- Os iniciadores utilizados mostraram-se eficientes na geração de perfis de ORESTES distintos, com poucas bandas proeminentes.
- 2- A estratégia ORESTES mostrou-se eficaz na geração de seqüências do transcriptoma do *Trypanosoma rangeli*, fornecendo uma boa base de dados para a análise da biologia deste parasito.
- 3- Diferenças significantes que pudessem estar relacionadas à expressão gênica diferencial estágio-específica, não foram observadas, possivelmente devido a regulação pós-transcricional, refletindo os mecanismos de controle da expressão gênica dos tripanosomatídeos, ou à necessidade de um maior número de seqüências.
- 4- A maior parte das seqüências obtidas apresentou similaridade com seqüências de *Trypanosoma cruzi* depositadas nos bancos de dados públicos, confirmando a alta similaridade genética destes dois organismos.
- 5- Mais de 60% das seqüências obtidas apresentaram similaridade com outros organismos e estão sendo pela primeira vez descritas para o *T. rangeli*, o que aumentará significativamente o número de seqüências deste protozoário nos bancos de dados.

- 6- Cerca de um terço das ORESTES geradas não apresentaram similaridade com seqüências depositadas nos bancos de dados consultados, as quais podem estar representando genes unicamente expressos pelo *T. rangeli* (genes espécie-específicos), genes que ainda não foram caracterizados, genes desconhecidos ou ainda artefatos de técnica.

- 7- A geração simultânea de EST e ORESTES revelou ser viável e extremamente poderosa no sentido de revelar o transcriptoma de um determinado organismo, tendo sido observado neste estudo a formação de clusters contendo EST e ORESTES.

- 8- A plataforma de anotação genômica GARSA apresentou-se como uma alternativa fácil e viável para a análise e anotação das seqüências em tempo reduzido, permitindo o êxito do presente estudo.

- 9- Os resultados do presente estudo representam as primeiras seqüências do transcriptoma da forma tripomastigota do *T. rangeli* a serem descritas, tendo revelado a transcrição de importantes genes desta forma evolutiva do parasito.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, L. et al. Trypanosomatid isolates from Honduras: Differentiation between *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 44(6): 676-683. 1991.

AFCHAIN, D. et al. Antigenic make-up of *Trypanosoma cruzi* culture forms: Identification of a specific component. J. Parasitol., 65: 507-514. 1979.

ALTSCHUL, S.F., et al.. Basic local alignment search tool. J Mol Biol, 215(3):403-10. 1990.

AÑEZ, N. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920, 1.-Deposition, Migration and Growth of *T. rangeli* in Two Mammals. In Canning Parasitological Topics, Special Publication of the Society of Protozoologists, Alen Press, Kansas, U.S.A., p19-25. 1981.

AÑEZ, N.; VELANDIA, J.; RODRIGUEZ, A.M. Estudios sobre *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. VIII. Respuesta a las infecciones em dos mamiferos. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 80(2): 149-153. 1985.

AÑEZ-ROJAS, N et al. *Trypanosoma rangeli* expresses a gene of the group II trans-sialidase superfamily. Mol. Biochem. Parasitol., 142(1):133-6. 2005.

ANTHONY, R.L.; CODY, T.S.; CONSTANTINE, N.T. Antigenic diferentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* by means of monoclonal-hybridoma antibodies. Am. J. Trop. Med. Hyg., 30(6): 1192-1197. 1981.

APWEILER, R. et al. The InterPro database, an integrated documentation resource for protein families, domains and functional sites. Nucleic Acids Res. 1;29(1):37-40. 2001.

ASHBURNER et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology. Nat. Genet., 25: 25-29, 2000.

ÁVILA, A.R. et al. Stage-specific gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. Genet. Mol. Res., 2(1): 159-168. 2003.

BERRIMAN, M. et al. The Genome of the african trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*, 309: 416-422. 2005.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETTO, M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 422p. 2000.

Camargo, A. A. et al. The contribution of 700,000 ORF sequence tags to the definition of the human transcriptome. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 98(21):12103-8. 2001.

CERQUEIRA et al. Analysis of expressed sequence tags from *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 100(4):385-9. 2005.

CHAMPOUX, J.J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Review. Annu Rev Biochem.*, 70:369-413. 2001.

COPPEL, R.L.; BLACK, C.G. Parasite genomes. *Review. Int. J. Parasitol.*, 35(5):465-79. 2005.

COURA, J.R. et al. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 90: 278-279. 1996.

COX, F.E.G. History of Human Parasitology. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15: 595–612. 2002.

D’ALESSANDRO, A. Biology of *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920. In: *Biology of Kinetoplastida*. Vol. 1. W.H.R. LUMSDEN & D.A. EVANS (editors). Academic Press. London, 328-403. 1976.

D’ALESSANDRO-BACIGALUPO, A.; SARAVIA, N.G. *Trypanosoma rangeli*. In: *Parasitic Protozoa*. 2nd ed. J.P. KREIER, E J.R. BAKER. Academic Press. London, 1-54. 1992.

DA SILVEIRA, J.F.; UMEZAWA, E.S.; LUQUETTI, A.O. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends Parasitol.*, 17(6): 206-291. 2001.

D'ALESSANDRO, A.; SARAVIA, N.G. *Trypanosoma rangeli*. In: Protozoal Diseases, H. M. GILLES editor. Arnold. 398-412. 1999.

DÁVILA, A.M. et al. GARSAs: Genomic Analysis Resources for Sequence Annotation. Bioinformatics. 2005.

DE LEON, J.R. Nota preliminar acerca de la enfermedad de Chagas em Guatemala. Casos encontrados em el Oriente de la Republica y probable existencia de un nuevo tripanosoma humano. Rev. Cruz Roja Guatemalteca, 9: 131-132. 1942.

De SOUZA, S.J. et al. Identification of human chromosome 22 transcribed sequences with ORF expressed sequence tags. Proc. Natl. Acad. Sci., 97(23):12690-3. 2000.

DEGRAVE, W.M. et al. Parasite genome initiatives. Int. J. Parasitol., 31: 532-536. 2001.

DIAS NETO, E.D. et al. Shotgun sequencing, of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags. Proc. Natl. Acad. Sci., 97: 3491-3496. 2000.

EGER-MANGRICH, I. et al. Interaction of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 with different cell lines in vitro. Parasitol. Res., 87: 505-509. 2001.

EL-SAYED, N. M. et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. Science, 309: 409-415. 2005.

EWING, B. et al. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. Genome Res., 8(3):175-85. 1998.

EWING, B.;GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. Genome Res. 8(3):186-94. 1998.

FERNANDES, O. Análise da estrutura primária do gene de mini-exon em diferentes tripanossomatídeos e sua utilização como marcador molecular. Tese de Doutorado, Instituto Oswaldo Cruz-RJ-Brasil. 268p. 1996.

FRAGOSO, S.P. et al. Expression and cellular localization of *Trypanosoma cruzi* type II DNA topoisomerase. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 94(2):197-204. 1998.

GOLDSTEIN, L.S.; PHILP, A.V. The road less traveled: emerging principles of kinesin motor utilization. *Review. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 15:141-83. 1999.

GOMES, Y.M. et al. Serodiagnosis of Chronic Chagas Infection by Using EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos Kit. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 96(4): 497-501. 2001.

GRISARD, E. C.; STEINDEL, M. Genômica em Parasitologia. In: *Genômica*, Luis Mir (editor). Editora Atheneu, 643-662. 2004b.

GRISARD, E. C.; STEINDEL, M. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*. In: *Parasitologia Humana*, Davis P. Neves (editor). Editora Atheneu, 11^a edição. 2004a, in press.

GRISARD, E.C. et al. Characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated in Central and South America: overview. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94(2): 203-209. 1999.

GROOT, H.; RENJIFO, S.; URIBE, C. Nota preliminar sobre inoculación a um voluntario humano con *Trypanosoma* sp. (*ariari*). *Ann. Soc. Biol. Bog*, 4:99-103. 1950.

GROOT. H. Estudios sobre los tripanosomas humanos (*T. rangeli* y *T. ariari*). *Ann. Soc. Biol. Bog.*, 6: 109-126. 1954.

GUARNERI, A.A. Alguns aspectos da biologia de *Rhodnius domesticus* Neiva & Pinto, 1923. (Hemiptera, Reduviidae) infectados ou não pelo *Trypanosoma rangeli*, em condições de laboratório. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Santa Catarina. 37p. 1996.

GUERREIRO, L. T. A. et al. Exploring the Genome of *Trypanosoma vivax* through GSS and In Silico Comparative Analysis. *OMICS*, 9: 116-128. 2005.

GUHL, F. et al. Molecular Characterization and Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*. Archives of Medical Research, 33:362-370. 2002.

GUHL, F.; VALLEJO, G.A. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920 – Na Updated Review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 98(4): 435-442. 2003.

HARTL, F.U.; HAYER- HARTL,M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. Review. Science, 295(5561):1852-8. 2002.

HERTZ-FOWLER,C.; BERRIMAN, M. Continuing tsetse and *Trypanosoma* genome sequencing projects. Trends Parasitol., 20(7):308-9. 2004.

HU, W. et al. Evolucionary and biomedical implications of a *Schistosoma japonicum* complementary DNA resource. Nature Genetics, 35(2): 139-147. 2003.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. Genome Res., 9(9):868-77. 1999.

IVENS, A. C. et al. The genome of the Kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. Science, 309: 436-442. 2005.

Koerich LB. et al. Differentiation of *Trypanosoma rangeli*: High production of infective trypomastigote forms in vitro. Parasitol. Res., 88: 21-25. 2002.

MACHADO, E.M.M. et al. A Simplified Method for Sample Collection and DNA Isolation for Polymerase Chain Reaction Detection of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in Triatomine Vectors. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 95(6): 863-866. 2000.

MACHADO, P. et al. Differential susceptibility of triatomines of the genus *Rhodnius* to *Trypanosoma rangeli* strains from different geographical origins. Int. J. Parasitol., 31: 632-634. 2001.

MILES, M.A. et al. Vertebrate hosts and vectors of *Trypanosoma rangeli* in the Amazon basin of Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg.,32(6): 1251-1259. 1983.

MOLINEAUX, D. Division of the human trypanosome, *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*. Ann. Trop. Med. Parasitol., 67: 371-372. 1973.

MURTHY, V.K.; DIBBERN, K.M.; CAMPBELL, D.A. PCR amplification of mini-exon genes differentiates *Trypanosoma cruzi* from *Trypanosoma rangeli*. Mol. Cell Probes, 6: 237-243. 1992.

NOZAKI, T.; CROSS, G.A.M. Effects of 3' untranslated and intergenic regions on gene expression in *Trypanosoma cruzi*. Mol. and Biochem. Parasitol., 75: 55-67. 1995.

O' DALY, J.A. et al. Comparison of chagasic and non-chagasic myocardiopathies by ELISA and imunoblotting with antigens of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. Acta Tropica, 56:265-287. 1994.

OSORIO, Y et al. Infectivity of *Trypanosoma rangeli* in a promonocytic mammalian cell line. J. Parasitol., 81: 687-693. 1995.

PAREDES, C.H.; PAREDES, R. Um caso de infecção humana por *Trypanosoma rangeli*. Rev. Fac. Med. Bog., 18:343-375. 1949.

RICE, P; LONGDEN,I; BLEASBY, A. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. Trends Genet. 16(6):276-7.2000.

SAKABE, N.J. et al. ORESTES are enriched in rare exon usage variants affecting the encoded proteins. C.R. Biologies, 326:979-985. 2003.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Vol.1. 3nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. Vol. 2. 2001.

SCHOTTELIUS, J. MARINKELLE, C.J.; GOMEZ-LEIVA, M.A. Comparative investigations of Latin American trypanosomes with lectins and complement lysis test. Trop. Med. Parasitol, 37: 54-58. 1986.

SCHOTTELIUS, J. Neuraminidase fluorescent test for differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. Trop. Med. Parasit., 38: 323-327. 1987.

SCORZA, C.; URDANETA-MORALES, S.; TEJERO, F. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: Preliminary report on histopathology in experimentally infected mice. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 28(5): 371-378. 1986.

SILVA, A.M. Riscos de Transmissão da doença de Chagas por transfusão sanguínea no Estado de Santa Catarina, Brasil, Tese de Doutorado, São Paulo, USP. 2002.

SNOEIJER, C.Q. et al. *Trypanosoma rangeli* Transcriptome Project: Generation and analysis of expressed sequence tags. *Kinetoplastid Biol. Dis.*, 3:1-4. 2004.

STEINDEL, M. Caracterização de cepas de *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi* isoladas de reservatórios e vetores silvestres em Santa Catarina. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais. 164p. 1993.

STEINDEL, M. et al. Presence of *Trypanosoma cruzi* - *Trypanosoma rangeli* mixed infection in naturally infected *Panstrongylus megistus* from Florianópolis, State of Santa Catarina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 87, Suppl.II, 99. 1992.

STEINDEL, M. et al. *Trypanosoma rangeli* (TEJERA, 1920) isolated from a sylvatic rodent (*Echimyus dasythrix*) in Santa Catarina Island, Santa Catarina State: first report of this trypanosome in southern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 86 (1): 73-79. 1991.

TANOURA, K. et al. *Trypanosoma rangeli* – in vitro metacyclogenesis and fate of metacyclic trypomastigotes after infection to mice and fibroblast cultures. *J. Eukaryot Microbiol.*, 46: 43-48. 1999.

TEIXEIRA, S.M.; Da ROCHA, W.D. Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. *Genet. Mol. Res.*, 2(1):148-58. 2003.

TEJERA, E. Un nouveau flagellé de *Rhodnius prolixus*, (*Trypanosoma* ou *Crithidia*) *rangeli* n. sp. *Bullet. Soc. Pathol. Exotique Paris*, 13: 527. 1920.

TOALDO, C.B. et al. Molecular karyotype and chromosomal localization of genes encoding beta-tubulin, cysteine proteinase, hsp 70 and actin in *Trypanosoma rangeli*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 96(1):113-21. Erratum in: Mem Inst Oswaldo Cruz, 96(4):593. 2001.

UMEZAWA, E.S. et al. Evaluation of Recombinant Antigens for Serodiagnosis of Chagas' Disease in South and Central America. J. Clin. Microbiol., 37(5): 1554-1560. 1999.

URDANETA-MORALES, S.; TEJERO, F. *Trypanosoma* (Herpetosoma) rangeli Tejera, 1920: Intracellular amastigote stages of reproduction in white mice. Rev. Inst. Med. Trop., 28: 166-169. 1986.

VALLEJO, G.A. et al. Comportamiento de la infección y diferenciación morfológica entre *Trypanosoma cruzi* y *T. rangeli* em el intestino del vector *Rhodnius prolixus*. Rev. Bras. Biol. 48: 577-587. 1988.

VALLEJO, G.A.; et al. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. Acta Tropica, 72(2): 203-212. 1999.

VARGAS, N. et al. Amplification of a Specific Repetitive DNA Sequence for *Trypanosoma rangeli* Identification and Its Potential Application in Epidemiological Investigations. Exp. Parasitol., 96: 147-159. 2000.

VERDUN, R. E. et al. Gene discovery through expressed sequence tag sequencing in *Trypanosoma cruzi*. Infection and Immunity, 66(11):5393-5398. 1998.

VERJOVSKI-ALMEIDA, S. et al. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. Nature Genetics, 35(2): 148- 157. 2003.

VICKERMAN, K. The Diversity of the Kinetoplastid Flagellates. In: Biology of Kinetoplastida. Vol. 1. W.H.R. Lumsden & D.A. Evans (editors). Academic Press. London, 328-403. 1976.

WANG, Q. et al. Transcriptome of axenic liver stages of *Plasmodium yoelii*. Mol. Biochem. Parasitol., 137(1):161-8. 2004.

ZAHA, A. et al. Técnicas de Biologia Molecular. In: Biologia Molecular Básica, editora: Mercado Aberto, 3ª edição, 346-360. 2003.

ZUÑIGA, C. et al. Characterization of a *Trypanosoma rangeli* strain of colombian origin. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 92: 523-530. 1997.

<<http://www.biowebdb.org>> Acessado em: 17/11/2005.

<<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>> European Bioinformatics Institute. Interpro database. Acessado em: 05/10/2005.

<<http://www.embl.org>> European Molecular Biology Laboratory. Acessado em: 17/11/2005.

< <http://www.geneontology.org> > Gene Ontology Consortium. Acessado em: 05/10/2005.

<<http://www.girinst.org/rebase/update/index.html>> Rebase Update database. Acessado em: 05/10/2005.

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>> National Center for Biotechnology Information. Acessado em: 17/11/2005.

<<http://smart.embl-heidelberg.de>> Simple Modular Architecture Research Tool. Acessado em: 05/10/2005.

ANEXO

Tabela 4: Relação das ORESTES de formas tripomastigotas da cepa Choachi do *Trypanosoma rangeli* que apresentaram similaridade com seqüências depositadas em bancos de dados públicos, sendo consideradas estatisticamente significantes quando e-value < 10⁻⁵.

Cluster	Código de Acesso	Descrição	Organismo	Banco de Dados	p	Escore	Domínios Conservados	Interpro	Nº de seqüências
OJEG204003D05.b	EAN90869	Trans-sialidase, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	1.0e-25	117		x	70
OJEG203001G06.b	TCNA_TRYCR	Sialidase	<i>T. cruzi</i>	uniprot_sprot.fasta	4.0e-15	80	x	x	12
OJEG204025C10.b	EAN96703	Glicoproteína mucina-like, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	7.0e-07	55			6
OJEG203009G03.b	U59297	Proteína regulatória do complemento	<i>T. cruzi</i>	kinetoplastida-nt	9.0e-32	135	x		6
OJEG203003D09.b	AF426022	Glicoproteína de superfície	<i>T. rangeli</i>	nt	6.0e-08	66		x	2
OJEG204025G08.b	EAN99975	Proteína antigênica, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	1.0e-13	77			1
OJEG204030E03.g	AAB97875	Antígeno de Superfície	<i>T. cruzi</i>	kinetoplastida-aa	4.0e-09	55		x	1
OJEG203011G11.b	Q580L2_9TRYP	Proteína paraflagelar rod	<i>T. brucei</i>	uniprot_trembl.fasta	5.0e-37	154	x		2
OJEG204023D11.b	S32016	Proteína associada ao flagelo	<i>T. cruzi</i>	kinetoplastida-aa	5.0e-07	48			1
OJEG204027H11.b	EAN98730	GP63, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	1.0e-13	77	x	x	11
OJEG203005F09.b	EAN94627	Calpaína cisteína peptidase, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	6.0e-27	121		x	3
OJEG204013C07.b	EAN87846	Amino peptidase, putative	<i>T. cruzi</i>	nr	1.0e-18	94			2
OJEG205003F08.b	AAX79407	Metaloprotease pitrilisina-like	<i>T. brucei</i>	kinetoplastida-aa	1.0e-10	60			1
OJEG208001B02.b	L38512	Rangelipaína	<i>T. rangeli</i>	kinetoplastida-nt	3.0e-16	86		x	1
OJEG203005G11.b	XM_806706	Metalopeptidase zinco dependente de ATP, putativa	<i>T. cruzi</i>	nt	4.0e-14	86			1
OJEG203001G01.b	AAR10848	Proteína MP99, complexo de edição do RNA	<i>T. cruzi</i>	kinetoplastida-aa	5.0e-18	85			1
OJEG204007F04.b	AAT75335	Fator de especificidade, clivagem, poliadenilação (CPSF160)	<i>T. cruzi</i>	kinetoplastida-aa	6.0e-43	168			1
OJEG204017H09.b	EAN97830	Fator de splicing 3A, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	2.0e-17	90	x		1
OJEG203005D06.b	AAK53819	Proteína ligante de RNA	<i>T. cruzi</i>	kinetoplastida-aa	2.0e-39	155	x	x	2
OJEG203005E06.b	EAN85425	Endoribonuclease (pb5)	<i>T. cruzi</i>	nr	2.0e-14	80			1
OJEG204009C07.b	Q27335_TRYCR	Proteína ligante de poli-A	<i>T. cruzi</i>	uniprot_trembl.fasta	2.0e-31	135	x	x	1
OJEG203003H03.b	EAN88971	RNA helicase DEAD/H, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	6.0e-88	324	x	x	4
OJEG203011C01.b	EAN82293	DNA helicase DEAD/H recQ, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	1.0e-08	61			1
OJEG203007D12.b	EAN91265	Helicase, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	7.0e-13	75			2
OJEG203005F10.b	Q7YZP2_9TRYP	DNA topoisomerase II	<i>L. panamensis</i>	uniprot_trembl.fasta	3.0e-12	72	x	x	1
OJEG204017A08.b	EAN93144	DNA polimerase teta, putative	<i>T. cruzi</i>	nr	3.0e-07	56			1

Continuação da tabela 4

OJEG204019C11.b	EAN85297	Proteína de reparo de DNA RAD50, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	2.0e-17	90			1
OJEG204023H05.b	EAN99346	RNA polimerase II	<i>T. cruzi</i>	nr	8.0e-27	121			1
OJEG203005C09.b	Q582N2_9TRYP	Proteína ribossomal L4	<i>T. brucei</i>	uniprot_trembl.fasta	7.0e-36	150	x	x	3
OJEG203001H07.b	EAN95216	Proteína ribossomal L13, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	8.0e-11	68			3
OJEG203003H05.b	EAN97983	Proteína ribossomal L22, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	2.0e-36	153	x	x	2
OJEG203003C01.b	Q57VP3_9TRYP	Proteína ribossomal S9, putativa	<i>T. brucei</i>	uniprot_trembl.fasta	1.0e-20	100	x		1
OJEG204021F07.b	EAN93495	Proteína ribossomal S4, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	8.0e-35	147	x	x	1
OJEG203005G02.b	AAM68993	Proteína ribossomal L38	<i>L. major</i>	kinetoplastida-aa	3.0e-28	118	x	x	1
OJEG203011F05.b	EAN83255	Fator de iniciação da tradução IF-2, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	6.0e-33	141	x		1
OJEG203005H11.b	Q69EZ4_TRYCR	Fator de iniciação da tradução 34	<i>T. cruzi</i>	uniprot_trembl.fasta	1.0e-19	97	x	x	1
OJEG204007D06.b	EAN82455	Fator de elongação da tradução 1-beta	<i>T. cruzi</i>	nr	1.0e-15	84	x	x	3
OJEG204007B06.b	S41648	Fator de elongação da tradução eEF-1 gama	<i>T. cruzi</i>	nr	1.0e-15	84	x		1
OJEG208003F08.b	JC5117	Fator de elongação da tradução eEF-1 alfa	<i>T. cruzi</i>	kinetoplastida-aa	4.0e-08	52			1
OJEG204019H11.b	EAN99273	Arginil-tRNA sintetase, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	1.0e-20	100			2
OJEG203005D04.b	EAN98098	Prolil-tRNA sintetase, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	1.0e-07	57			1
OJEG203011H07.b	EAN90826	Triptofanil-tRNA sintetase, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	1.0e-28	127	x	x	1
OJEG203009G07.b	TBB_TRYCR	Tubulina, cadeia beta	<i>T. cruzi</i>	uniprot_sprot.fasta	4.0e-23	105	x	x	3
OJEG208001A09.b	AAA91957	Tubulina, cadeia alfa	<i>T. cruzi</i>	kinetoplastida-aa	2.0e-49	189	x	x	2
OJEG203001D11.b	K02836	Tubulina, cadeia alfa e beta	<i>T. brucei rhodesiense</i>	kinetoplastida-nt	7.0e-25	115			2
OJEG203005D12.b	EAN84736	Tubulina cadeia delta, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	5.0e-24	112			1
OJEG203009D08.b	EAN79778	Dineína cadeia pesada, putativa	<i>T. brucei</i>	nr	2.0e-20	100	x		7
OJEG203013D09.b	EAN86621	Kinesina, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	1.0e-41	170	x	x	7
OJEG203009C12.b	AAR87495	Proteína de choque térmico HSP70	<i>T. rangeli</i>	kinetoplastida-aa	1.0e-29	123	x	x	3
OJEG204017H02.b	CH60_TRYCR	Proteína de choque térmico HSP60	<i>T. cruzi</i>	uniprot_sprot.fasta	3.0e-36	150	x	x	2
OJEG203011H12.b	EAN93041	Proteína de choque térmico HSP85, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	7.0e-42	171	x	x	2
OJEG208003D10.b	EAN87197	Chaperona dependente de ATP, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	4.0e-27	122			1
OJEG208001E10.b	Q583E7_9TRYP	Citocromo c oxidase subunidade VIII	<i>T. brucei</i>	uniprot_trembl.fasta	6.0e-48	190			2
OJEG208001F08.b	EAN88491	Citocromo c oxidase subunidade 10, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	8.0e-17	88			2
OJEG204023H04.b	EAN89655	Citocromo c oxidase subunidade VI, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	1.0e-26	120			1

Continuação da tabela 4

OJEG203013H01.b	AAG00298	Tirosina aminotransferase	<i>T. rangeli</i>	kinetoplastida-aa	1.0e-12	67			1
OJEG204004A11.g	EAO00190	Aciltransferase, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	4.0e-67	255	x		2
OJEG208001A01.b	57WU4_9TRYP	Complexo N-acetiltransferase subunidade ARD1, putativa	<i>T. brucei</i>	uniprot_trembl.fasta	9.0e-10	64			1
OJEG208001H03.b	EAN97318	Diacilglicerol aciltransferase, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	1.0e-10	67			1
OJEG204007G11.b	AAO92019	Serina palmitoiltransferase	<i>L. major</i>	kinetoplastida-aa	2.0e-25	108	x		1
OJEG203005E10.b	CAB62836	Aldose 1-epimerase	<i>L. major</i>	kinetoplastida-aa	5.0e-30	125	x		3
OJEG203003G01.b	AAA21207	Transportadora de hexose	<i>T. cruzi</i>	kinetoplastida-aa	9.0e-19	87	x		1
OJEG203009A02.b	EAN96408	Enzima málica (malato oxidorreductase), putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	4.0e-47	188	x	x	2
OJEG204001F05.b	AF053742	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase glicosomal	<i>T. rangeli</i>	kinetoplastida-nt	1.0e-58	226	x		1
OJEG204025F02.b	EAN82656	Manosil-oligossacarídeo glicosidase, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	9.0e-49	195	x		1
OJEG204025A04.b	Q5TIL4_TRYBB	Precursor da subunidade alfa glicosidase II	<i>T. brucei brucei</i>	uniprot_trembl.fasta	6.0e-32	137	x		1
OJEG204009D04.b	EAN87765	Retrotransposon hot spot (RHS), putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	5.0e-27	122		x	5
OJEG203007C01.b	Q9U128_LEIMA	Ácido lipóico sintetase, mitocondrial	<i>L. major</i>	uniprot_trembl.fasta	1.0e-09	64	x		1
OJEG204007H10.b	Q9NL80_LEIAM	Carbamoil-fosfato sintetase	<i>L. amazonensis</i>	uniprot_trembl.fasta	6.0e-54	210	x	x	3
OJEG204025F07.b	Q9U403_9TRYP	Acil CoA sintetase 2	<i>T. brucei</i>	uniprot_trembl.fasta	2.0e-21	102	x		1
OJEG208001E08.b	AAK16397	Cistationine beta-sintetase	<i>T. cruzi</i>	kinetoplastida-aa	4.0e-19	88			1
OJEG204007G10.b	Q9GT49_TRYCR	Tripanotiona sintetase	<i>T. cruzi</i>	uniprot_trembl.fasta	2.0e-36	152	x		1
OJEG204019G10.b	XP_826602	Sucinil-CoA sintetase subunidade alfa, putativa	<i>T. brucei</i>	nr	1.0e-42	174	x	x	1
OJEG204029A07.b	AAX79975	ATP sintetase	<i>T. brucei brucei</i>	kinetoplastida-aa	2.0e-12	67			3
OJEG204007F05.b	S36607	Proteína kinase	<i>T. brucei</i>	kinetoplastida-aa	5.0e-17	82	x	x	3
OJEG205003E09.b	EAN90534	Serina/treonine proteína kinase, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	4.0e-29	129	x	x	3
OJEG204017F11.b	CAC84772	3-fosfoglicerato kinase	<i>T. cruzi</i>	kinetoplastida-aa	4.0e-39	155	x	x	1
OJEG204019G12.b	AAG12985	Piruvato fosfato dikinase	<i>T. cruzi</i>	kinetoplastida-aa	2.0e-62	233	x		1
OJEG204025A06.b	EAN95883	Receptor de proteína kinase C ativada, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	1.0e-155	549	x	x	1
OJEG203009C10.b	AAX69228	Calreticulina, putativa	<i>T. cruzi</i>	kinetoplastida-aa	5.0e-61	229	x	x	1
OJEG203003B07.b	EAN93852	Reticulon domain protein, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	5.0e-13	75			1
OJEG203007C10.b	XM_812674	Proteína 1 complexo-t, putativa	<i>T. cruzi</i>	nt	2.0e-17	96	x		1
OJEG203009D10.b	EAN98262	mitochondrial processing peptide, putative	<i>T. cruzi</i>	nr	7.0e-20	98			1

Continuação da tabela 4									
OJEG205003E02.b	EAN95469	Proteína ligante-Ran, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	1.0e-48	193	x	x	1
OJEG205003D05.b	XM_801266	Fator de liberação de histamina dependente de IgE, putativa	<i>T. cruzi</i>	nt	1.0e-93	351	x	x	1
OJEG204027B08.b	AAQ01182	Lipofosfolipase	<i>T. brucei</i>	kinetoplastida-aa	2.0e-46	180	x	x	1
OJEG203001G12.b	Q581U6_9TRYP	Hidroxiacilglutationa hidrolase, putativa	<i>T. brucei</i>	uniprot_trembl.fasta	5.0e-42	171	x		1
OJEG204007B03.b	EAN89502	Proteína hidroxiaácido desidrogenase, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	1.0e-16	88	x		1
OJEG204007B08.b	CAA90897	Proteína ligante de cálcio	<i>T. rangeli</i>	nr	2.0e-42	172		x	2
OJEG204007C10.b	P90597	Dihidrolipoil desidrogenase	<i>T. cruzi</i>	kinetoplastida-aa	2.0e-53	202	x	x	1
OJEG204011E08.b	XM_801457	Calmodulina, putativa	<i>T. cruzi</i>	nt	4.0e-08	66			1
OJEG204013A10.b	AAL72636	proteasome regulatory non-ATP-ase	<i>T. brucei</i>	kinetoplastida-aa	3.0e-17	82			2
OJEG204011G09.b	EAN97118	CAS/CSE/importin domain protein, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	8.0e-22	104			1
OJEG204013D05.b	EAN88606	Proteína ubiquitina ligase-like, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	5.0e-15	82			1
OJEG204017H10.b	AN99610	Proteína tirosina fosfatase específica, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	1.0e-24	114	x	x	1
OJEG204017H11.b	EAN94728	Proteína de fusão-vesicular ATPase-like, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	1.0e-07	57			1
OJEG204019C01.b	EAN86898	nucleosome assembly protein-like protein, putative	<i>T. cruzi</i>	nr	1.0e-07	57			1
OJEG204019E03.b	CAB94039	Enolase	<i>L. major</i>	kinetoplastida-aa	7.0e-14	72	x		1
OJEG204023D02.b	EAN96065	Glicoproteína Golgi/Lisossomo, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	2.0e-15	84			1
OJEG204023H11.b	EAN96800	Proteína lipophosphoglycan biosynthetic, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	3.0e-68	259	x	x	1
OJEG204027B04.b	EAN93774	Oxidoreductase, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	1.0e-42	173	x		1
OJEG204030D05.g	EAN94202	Fosfato permease fosfato-repressible, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	5.0e-10	65			3
OJEG204003B01.b	EAN78695	Ciclofilina, putativa	<i>T. brucei</i>	nr	2.0e-25	117			1
OJEG205001B08.b	EAN82938	Proteína R27-2, putativa	<i>T. cruzi</i>	nr	5.0e-35	149	x		1
OJEG204027F11.b	AAS83414	Proteína de reconhecimento de sinal SRP72	<i>T. brucei</i>	kinetoplastida-aa	2.0e-31	130	x		1
OJEG204019A01.b	Q64NE7_BACFR	N-acilglicosamina 2-epimerase	<i>Bacteroides fragilis</i>	uniprot_trembl.fasta	2.0e-12	72	x		1
OJEG203013A01.b	AB175622	RNA ribossomal	<i>T. grosi</i>	kinetoplastida-nt	0.0e+00	997			35
OJEG208001B09.b	EAN88087	Proteína hipotética conservada	<i>T. cruzi</i>	nr	3.0e-59	229	x	x	167
OJEG208001F12.b	XM_810659	Proteína hipotética	<i>T. cruzi</i>	nt	6.0e-07	62			55
TOTAL									523

