

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIOCIÊNCIAS

Elisa Beatriz Prestes

**MARCADORES MOLECULARES E MORFOLÓGICOS DA
CITOCINESE EM *Trypanosoma rangeli***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard

Florianópolis, SC
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Prestes, Elisa Beatriz
Marcadores moleculares e morfológicos da citocinese em
Trypanosoma rangeli [dissertação] / Elisa Beatriz Prestes ;
orientador, Edmundo Carlos Grisard - Florianópolis, SC,
2013.
123 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Trypanosoma rangeli.
3. Citocinese. 4. Polo-like quinase. I. Grisard, Edmundo
Carlos. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.
III. Título.

“Marcadores Moleculares e Morfológicos da Citocinese em *Trypanosoma rangeli*”

por

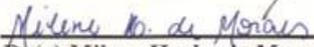
Elisa Beatriz Prestes

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 02/PPGBTC/2013) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

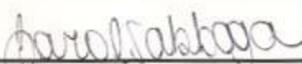
Banca Examinadora:



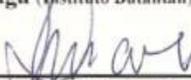
Prof(a) Dr(a) Edmundo Carlos Grisard (MIP/CCB/UFSC)



Dr(a) Milene Hoehr de Moraes (Pós-Doc/BTC/UFSC)



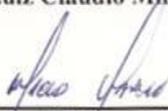
Prof(a) Dr(a) Maria Carolina Quartim Barbosa Elias-Sabbaga (Instituto Butantan)



Prof(a) Dr(a) Daniel Santos Mansur (MIP/CCB/UFSC)



Prof(a) Dr(a) Luiz Claudio Miletto (CAV/UFSC)



Prof(a). Dr(a). Marcelo Maraschin
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Florianópolis, 01 de março de 2013.

AGRADECIMENTOS

Certa vez ouvi alguém dizer que sua parte favorita em teses e dissertações era a seção de Agradecimentos, pois é o único momento em que aparece a pessoa por trás do trabalho. Mas como na verdade por trás de um trabalho destes nunca há uma pessoa só, dedico este espaço a cada uma das pessoas que tiveram sua parte neste estudo, me fazendo vivenciar a noção do quanto as interações sociais são importantes para a realização de uma boa Ciência. Por via de colaborações diretas, de memoráveis convivências, ou de ambos, todos aqui mencionados merecem meus sinceros agradecimentos.

Agradeço à minha família, meus pais, Newton e Rejane, e minha irmã Isabel, pelo amor, apoio e encorajamento, em todos os momentos da minha vida e, particularmente, diante de importantes decisões. Muito obrigada pela valiosa presença, sempre, e pela dedicação para que eu alcançasse mais este objetivo.

Ao Professor Edmundo pela orientação e pelos ensinamentos ao longo destes seis anos. Obrigada pela confiança e por ter proporcionado tantas oportunidades para meu desenvolvimento na pesquisa científica, em diferentes projetos no laboratório e, especialmente, nesta dissertação de Mestrado.

À Pati, querida “desorientadora”, por tantas ideias e sugestões, pelas incríveis fotos no microscópio confocal e, principalmente, pelo admirável exemplo. Obrigada pelo carinho e, não poderia esquecer, pelos deliciosos doces da panificadora e pela Sobremesa!

Ao Guilherme, pelo amor e companheirismo, compartilhando os bons momentos e enfrentando junto as “crises” do Mestrado (como, por exemplo, uma apresentação oral em congresso). E, é claro, também pelos desenhos em Corel desta dissertação. Obrigada, meu amor.

À galera da Proto, Pati, Milene, Débora, Glauber, Thaynara, Carime, Laís, Ingrid, Mariel, Ibeth, Jair, Natália, Ninna, Gilmar, Ana Paula, Vagner, Celina, companheiros de RU Aline, Carol, Greicy, Maiko e Gustavo, também companheiros de rodízios de pizza. Obrigada pela amizade, por todas as boas conversas, científicas ou simplesmente “à toa”, e pelas ajudas indispensáveis, desde o básico “cuida desse gel pra mim?” até a discussão de resultados importantes. Vocês foram como uma família no ambiente de trabalho.

Ao povo do LIDI, às parceiras do show do Paul McCartney, Paula, Nicole, Nika, Renata e Puka, e também à Lívia, Fernanda, Daniel Filho, Magno e Cris, pelos momentos de descontração, conversas sobre

os mais variados assuntos e tantos almoços no RU. Obrigada por me acolherem no lab de vocês e ajudarem em muitos aspectos no desenvolvimento deste Mestrado.

Aos professores Mário, André, Daniel e Fernando por conversas esclarecedoras, normalmente realizadas no corredor do MIP durante o café da tarde. Obrigada pela ativa participação em meu desenvolvimento profissional.

Àqueles que, com uma gentil participação, contribuíram enormemente para a realização deste trabalho: à Maria Carolina, por esclarecer as dúvidas com as equações do ciclo celular; à Débora, por cuidar dos parasitos; ao Rafa, pela ajuda com o desenho de iniciadores e com as estratégias de análise dos resultados de qPCR; ao “citometrista” Magno, pelas análises de citometria de fluxo e ensinamentos neste campo; ao Chris de Graffenried por enviar da Áustria o anticorpo anti-*TbPLK* para uma mestrandia brasileira; à Cissa, por “turbinar” a velocidade dos experimentos no final do Mestrado; e à Darlene, pelo envio da *TcTRACK* em plasmídeo de expressão.

Ao pessoal do I Simpósio de Integração das Pós-graduações do CCB, pelas contribuições advindas de fora desta área de conhecimento e pela parceria durante toda a organização do evento.

Aos colegas do LVA e LIA, pela boa convivência, dicas científicas e concessão de espaços em seus labs para alguns experimentos.

Ao pessoal do LAMEB, Vanessa, Bibiana e Denis, pela aquisição dos dados de qPCR e pela paciência com as minhas correrias com estes experimentos.

Aos integrantes da banca avaliadora deste trabalho, Milene, Maria Carolina, Daniel e Luiz Miletto, pela disposição e aceite do convite.

E, por fim, aos órgãos de fomento à pesquisa CNPq, CAPES e FINEP, cujo incentivo financeiro foi indispensável para a realização deste Mestrado.

Meus agradecimentos a todos vocês que, de diferentes maneiras, participaram do desenvolvimento desta Dissertação, me incentivando e contribuindo para minha formação neste período. Este trabalho é em parte seu também, espero que lhes agrade a leitura.

*“Se quiser ir rápido, vá sozinho.
Se quiser ir longe, vá em grupo.”*

Provérbio Africano

RESUMO

O *Trypanosoma rangeli* é um protozoário que, embora estreitamente relacionado ao *T. cruzi*, não é considerado patogênico para o hospedeiro mamífero, no qual sua capacidade de multiplicação é desconhecida. Uma vez que diversos estudos já abordaram esta questão, sem resultados consensuais, o objetivo deste estudo foi investigar marcadores moleculares e estruturais da divisão celular no *T. rangeli*, como uma estratégia para detectar a multiplicação celular mesmo sem visualização direta do processo. O ciclo celular *in vitro* das formas epimastigotas proliferativas da cepa Choachí foi estudado, sendo sua duração total calculada em 26,2 horas, sendo 11,91 horas na fase G1, 6,13 horas na fase S, 3,88 horas na fase G2, 1,13 horas na mitose (M) e, por fim, 3,15 horas na citocinese (C). Esta progressão no ciclo pôde ser acompanhada também por citometria de fluxo, por meio da avaliação do conteúdo de DNA, gerando histogramas com um pico referente a parasitos em G1 e outro a parasitos em G2/M/C. Como potenciais marcadores moleculares, foram escolhidos os transcritos para as proteínas Aurora quinase 1, Polo-like quinase, MOB1 e TRACK, as quais já foram associadas à citocinese de outros tripanosomatídeos. Os níveis de transcritos para essas proteínas foram avaliados em epimastigotas em fase exponencial de crescimento por PCR quantitativa em tempo real (qPCR), sendo comparados a parasitos com taxas de multiplicação sabidamente reduzidas – epimastigotas em fase estacionária ou tratados com hidroxíureia – e a parasitos cuja capacidade de multiplicação é desconhecida – os tripomastigotas. Os transcritos para Aurora quinase 1 e, principalmente, Polo-like quinase estiveram fortemente associados a parasitos com altas taxas de divisão celular, ao passo que os transcritos para MOB1 e TRACK tiveram uma variação independente. Em todos os ensaios, Polo-like quinase demonstrou ser o mais promissor marcador molecular da citocinese, apresentando significantes reduções em sua abundância relativa de transcritos nas formas com baixas taxas de multiplicação celular, além de ser detectada como uma proteína de cerca de 70 kDa apenas nas formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento. Assim, este estudo demonstrou o potencial da metodologia de qPCR utilizando Polo-like quinase como marcador molecular, bem como da citometria de fluxo, para estudar o comportamento do *T. rangeli* em seu hospedeiro mamífero, abrindo novas perspectivas para a compreensão do ciclo biológico deste parasito.

Palavras-chave: *Trypanosoma rangeli*, citocinese, Polo-like quinase.

ABSTRACT

Trypanosoma rangeli is a protozoan parasite closely related to *T. cruzi* but considered to be non-pathogenic to the mammalian host, in which its ability to proliferate is unknown. Since several studies have addressed this issue without consensual results, the objective of this study was to investigate structural and molecular markers of cell division in *T. rangeli*, as a strategy to detect cell multiplication even when direct visualization of this process is not possible. The in vitro cell cycle of strain Choachí proliferative epimastigote forms was studied and revealed a duplication time of 26.2 hours, of which 11.91 hours consist in G1 phase, 6.13 hours in S phase, 3.88 hours in G2 phase, 1.13 hours in mitosis (M) and 3.15 hours in cytokinesis (C). This progression in the cell cycle was also followed by flow cytometry through the evaluation of DNA content, generating histograms with two peaks, the first referring to parasites in G1 and the second to parasites in G2/M/C. The transcripts for proteins Aurora kinase 1, Polo-like kinase, MOB1 and TRACK, which have been previously associated with cytokinesis in other trypanosomatids, were chosen as potential molecular markers. The transcript levels for these proteins were evaluated in exponential growth phase epimastigotes through real time quantitative PCR (qPCR) and compared to parasites with known reduced multiplication rates – stationary phase epimastigotes and parasites treated with hydroxyurea – and to parasites whose ability to multiply is unknown – trypomastigotes. The transcripts for Aurora kinase 1 and specially Polo-like kinase were strongly associated with parasites with high cell division rates, whereas the transcripts for MOB1 and TRACK varied independently. Polo-like kinase was the most promising molecular marker for cytokinesis, presenting a significant reduction in its transcripts relative abundance in parasites with low multiplication rates, being also detected as an approximately 70 kDa protein only in exponential growth phase epimastigotes. Therefore, this study has demonstrated the potential of the qPCR methodology using Polo-like kinase as a molecular marker, as well as the flow cytometry methodology, to study the behavior of *T. rangeli* in its mammal host, opening new perspectives to the comprehension of its biological cycle.

Key words: *Trypanosoma rangeli*, cytokinesis, Polo-like kinase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. *Trypanosoma rangeli*.** **A**, formas epimastigotas, proliferativas, encontradas no triatomíneo e, **B**, formas tripomastigotas, infectantes, encontradas no triatomíneo e no mamífero. As barras representam 5 μm 25
- Figura 2. Ciclo biológico do *Trypanosoma rangeli*.** Durante o repasto sanguíneo do triatomíneo, ocorre a ingestão de tripomastigotas, que no trato digestivo se diferenciam em epimastigotas. Os epimastigotas aderem ao epitélio intestinal e alcançam a hemolinfa – as setas curvas indicam as formas proliferativas. Estes parasitos então invadem as glândulas salivares e diferenciam-se nas formas infectantes (tripomastigotas metacíclicos), as quais são inoculadas com a saliva durante a hematofagia. Uma vez no sangue do mamífero, é desconhecido o ciclo do *T. rangeli*. Fonte: GRISARD; STEINDEL, 2011 (adaptado). 27
- Figura 3. Estruturas internas de um tripanosomatídeo (*Trypanosoma cruzi*).** Em destaque, as estruturas únicas que precisam ser duplicadas no processo de divisão celular: complexo de Golgi, mitocôndria com cinetoplasto e axonema (flagelo). O corpo basal não está representado, mas localiza-se na base do flagelo. Fonte: DE SOUZA, 2008 (adaptado). 34
- Figura 4. Processo de divisão celular em um tripanosomatídeo (*Trypanosoma cruzi*).** As principais estruturas encontram-se duplicadas e o parasito está prestes a sofrer citocinese. **N** = núcleo, **K** = cinetoplasto, **BB** = corpo basal, **F** = flagelo. Fonte: ELIAS *et al.*, 2007 (adaptado). 35
- Figura 5. Proteínas envolvidas na regulação da citocinese em tripanosomatídeos.** Etapas da divisão celular de tripanosomatídeos representando os pontos em que atuam as proteínas Aurora quinase 1 (AUK1), Polo-like quinase (PLK), MOB1 e TRACK. 45
- Figura 6. Esquema representativo da metodologia utilizada neste trabalho.** 64
- Figura 7. Curva de crescimento *in vitro* do *Trypanosoma rangeli*.** Epimastigotas ($4-5 \times 10^6/\text{ml}$) da cepa Choachí foram contados em

intervalos de 12 horas até 60 horas. Os resultados representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes..... 65

Figura 8. Padrões morfológicos em uma cultura de epimastigotas de *Trypanosoma rangeli*. As imagens foram obtidas por microscopia confocal. **Fase:** contraste de fase; **FCaBP:** marcação do flagelo com anticorpo monoclonal anti-FCaBP; **DAPI:** marcação do DNA nuclear e do kDNA; **S:** sobreposição das imagens. **N = Núcleo, K = Cinetoplasto, F = Flagelo.** As barras em branco representam 5 µm. 66

Figura 9. Percentagem de padrões morfológicos em uma cultura de epimastigotas de *Trypanosoma rangeli*. No total, foram analisados 575 parasitos em fase de crescimento exponencial (cerca de 20 horas de cultivo). Os resultados representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes. **N = Núcleo, K = Cinetoplasto, F = Flagelo.**..... 67

Figura 10. Detecção de bromodeoxiuridina (BrdU) incorporada ao DNA em síntese de *Trypanosoma rangeli*. As imagens foram obtidas por microscopia confocal. **Fase:** contraste de fase; **BrdU:** marcação com anticorpo monoclonal anti-BrdU (Molecular Probes); **DAPI:** marcação do DNA nuclear e do kDNA; **S:** sobreposição das imagens. As barras em branco representam 5 µm. 68

Figura 11. Domínios das proteínas Aurora quinase 1 (*TrAUK1*), Polo-like quinase (*TrPLK*), MOB1 e TRACK de *Trypanosoma rangeli*. Imagens geradas pela ferramenta *blastp* do programa BLAST do GenBank. **RF = orientação da janela de leitura; Superfamilies = superfamílias; Multi-domains = domínios múltiplos; Specific hits = motivos específicos.** Os domínios descritos nas imagens são: **PKc_like superfamily = domínio catalítico de proteína quinase; S_TKc = domínio catalítico de serina/treonina quinase; POLO_box = domínio característico de Polo-like quinases; Mob1_phocain = domínio característico de proteínas MOB1; WD40/ WD40 superfamily = dipeptídeo WD (triptofano/aspartato) repetido 40 vezes; COG2319 = outra nomenclatura para a repetição WD40.** Fonte: GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank)..... 71

Figura 12. Amplificação dos fragmentos dos genes codificadores para Aurora quinase 1, Polo-like quinase, MOB1, TRACK,

GAPDH, HGPRT e RNA60S. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado por brometo de etídio revelando os produtos de amplificação dos fragmentos gênicos de *Aurora 1* (88pb), *Polo-like* (111pb), *MOB1*(112pb), *TRACK* (83pb), *GAPDH* (102pb), *HGPRT* (137pb) e *RNA60S* (113pb). 100pb **PTM** = Padrão de Tamanho Molecular com intervalos de 100 pares de bases (Promega)..... 73

Figura 13. Comparação entre formas epimastigotas de *Trypanosoma rangeli* tratadas e não tratadas com hidroxureia (HU) quanto ao conteúdo de DNA. Imagens resultantes da análise por citometria de fluxo. Os gráficos superiores representam a granulose das células em função do tamanho em parasitos vivos (A) e fixados com metanol (B). Os histogramas apresentam o número de células em função do conteúdo de DNA, marcado com iodeto de propídio, em parasitos em fase exponencial de crescimento (C) e epimastigotas tratados com HU (D). **SSC** = *Side Scatter*, **FSC** = *Forward Scatter*, **PerCP-CyTM5.5** = filtro para detecção de emissão em 482 nm..... 77

Figura 14. Níveis de transcritos de Aurora quinase 1, Polo-like quinase, MOB1 e TRACK em formas epimastigotas de *Trypanosoma rangeli* tratadas e não tratadas com hidroxureia (HU). Quantificação relativa realizada utilizando como genes de referência *GAPDH* e *RNA60S*. Os resultados foram obtidos por ensaios de qPCR e representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, realizados em duplicata. O sinal ** indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$), teste *t* de Student não-pareado. **Controle** = epimastigotas em fase exponencial de crescimento, **HU** = epimastigotas tratados com HU. **QR** = Quantificação Relativa..... 78

Figura 15. Progressão do ciclo celular sincronizado do *Trypanosoma rangeli* após liberação da hidroxureia (HU). Os histogramas apresentam o número de células em função do conteúdo de DNA, marcado com iodeto de propídio (filtro PerCP-CyTM5.5). A primeira coluna (Controle) apresenta a progressão do ciclo celular em epimastigotas não tratados com HU, e as colunas I, II e III representam três experimentos independentes onde a progressão do ciclo foi acompanhada após liberação da HU. A percentagem de células em G1,

S e G2 foi calculada através de zonas de análise e está indicada em cada histograma..... 79

Figura 16. Cinética dos níveis de transcritos de Aurora quinase 1, Polo-like quinase, MOB1 e TRACK durante o ciclo celular de *Trypanosoma rangeli*. Parasitos sincronizados com hidroxiiureia (HU), transferidos para meio de cultura livre deste composto e coletados após diferentes tempos de crescimento. Quantificação relativa realizada utilizando os genes de referência *GAPDH* e *RNA60S*. **A**, experimento I; **B**, experimento II; **C**, experimento III. **QR** = Quantificação Relativa.. 82

Figura 17. Níveis de transcritos de Aurora quinase 1, Polo-like quinase, MOB1 e TRACK em formas epimastigotas de *Trypanosoma rangeli* em fase de crescimento exponencial (Log) e estacionária (Estac.). Quantificação relativa realizada utilizando os genes de referência *GAPDH*, *HGPRT* e *RNA60S*. Os resultados foram obtidos por ensaios de qPCR e representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, realizados em duplicata. Os sinais * ($p < 0,05$) e ** ($p < 0,01$) indicam diferenças estatisticamente significantes, teste *t* de Student não-pareado. **QR** = Quantificação Relativa. 85

Figura 18. Diferenciação *in vitro* do *Trypanosoma rangeli*. Acompanhamento realizado nos dias 2, 4, 6 e 8 após transferência para meio DMEM de diferenciação. As colunas representam a proporção entre epimastigotas e tripomastigotas em cada dia. Os resultados representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes..... 86

Figura 19. Níveis de transcritos de Aurora quinase 1, Polo-like quinase, MOB1 e TRACK durante a diferenciação celular para formas tripomastigotas de *Trypanosoma rangeli*. Quantificação relativa realizada utilizando os genes de referência *GAPDH*, *HGPRT* e *RNA60S*. Os dias representados indicam o tempo decorrido a partir da transferência dos parasitos para meio DMEM de diferenciação. Os resultados foram obtidos por ensaios de qPCR e representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, realizados em duplicata. O sinal * indica diferença estatisticamente significativa ($p <$

0,05), ANOVA de uma via para dados repetidos, seguida do teste de Bonferroni. **QR** = Quantificação Relativa..... 87

Figura 20. Comparação entre tripomastigotas de cultura de *Trypanosoma rangeli*. Os histogramas apresentam o número de células em função do conteúdo de DNA, marcado com iodeto de propídio (filtro PerCP-Cy™5.5). **A**, tripomastigotas obtidos no oitavo dia de diferenciação *in vitro*; **B**, tripomastigotas de oitavo dia purificados em coluna CM-celulose..... 88

Figura 21. Níveis de transcritos de Aurora quinase 1, Polo-like quinase, MOB1 e TRACK em epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma rangeli*. Quantificação relativa realizada utilizando os genes de referência *GAPDH*, *HGPRT* e *RNA60S*. Os resultados foram obtidos por ensaios de qPCR e representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, realizados em duplicata. O sinal ** indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$), teste *t* de Student não-pareado. **Epi** = epimastigotas em fase exponencial de crescimento, **Tripo** = tripomastigotas purificados em coluna CM-celulose. **QR** = Quantificação Relativa. 89

Figura 22. Avaliação da expressão de Polo-like quinase em extratos protéicos de epimastigotas (Epi) e tripomastigotas (Tripo) de *Trypanosoma rangeli*. Resultado obtido por *Western blot*, utilizando o soro policlonal anti-*TbPLK* purificado por afinidade. Padrão de tamanho molecular: *Protein Precision Plus Dual Color* (Bio-Rad). A normalização da quantidade de proteína foi realizada através da detecção de α -tubulina (parte inferior da figura)..... 90

Figura 23. Avaliação da expressão de Polo-like quinase em extratos protéicos de diferentes formas do *Trypanosoma rangeli*. Resultado obtido por *Western blot*, utilizando o soro policlonal anti-*TbPLK* purificado por afinidade. **Dias da diferenciação** = parasitos no segundo, quarto, sexto e oitavo dias após transferência para meio DMEM, **Epi HU** = formas epimastigotas tratadas com hidroxíureia (HU), **Epi CTRL** = formas epimastigotas controle não tratadas com HU, **Tripo purif.** = tripomastigotas purificados por coluna CM-celulose. Padrão de tamanho molecular: *Protein Precision Plus Dual Color* (Bio-Rad). A

normalização da quantidade de proteína foi realizada através da detecção de α -tubulina (parte inferior da figura)..... 91

Figura 24. Análise de tripomastigotas sanguíneos de *Trypanosoma rangeli* por citometria de fluxo. Os histogramas apresentam o número de células em função do conteúdo de DNA, marcado com iodeto de propídio (filtro PerCP-CyTM5.5). **A**, parasitos coletados no quinto dia após infecção (d.p.i.) de camundongos BALB/c; **B**, parasitos coletados no sétimo d.p.i. 93

Figura 25. Níveis de transcritos de Aurora quinase 1, Polo-like quinase, MOB1 e TRACK em epimastigotas e tripomastigotas sanguíneos de *Trypanosoma rangeli*. Quantificação relativa realizada utilizando os genes de referência *GAPDH*, *HGPRT* e *RNA60S*. Os resultados foram obtidos por ensaios de qPCR e representam a média e o desvio padrão de dois experimentos independentes, realizados em duplicata. O sinal *** indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0005$), teste *t* de Student não-pareado. **Epi** = epimastigotas em fase exponencial de crescimento, **Tripo** = tripomastigotas sanguíneos de fase aguda (segundo e quinto d.p.i.). **QR** = Quantificação Relativa. 94

Figura 26. Representação esquemática das alterações morfológicas durante o ciclo celular *in vitro* do *Trypanosoma rangeli*. Células 1N 1K 1F encontram-se nas fases G1/S, células 1N 1K 2F estão em G2, células 1N 2K 2F, em fase M (mitose) e, por fim, células 2N 2K 2F estão na fase C (citocinese). A duração de cada fase está representada. **N** = núcleo, **K** = cinetoplasto; **F** = flagelo. 95

Figura 27. Representação esquemática dos resultados obtidos para os níveis de transcritos para Polo-like quinase durante o ciclo celular e a diferenciação de *Trypanosoma rangeli*. **HU** = parasitos tratados com hidroxíureia, **Estac.** = parasitos em fase de crescimento estacionária, **N** = núcleo, **K** = cinetoplasto, **F** = flagelo..... 110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos iniciadores escolhidos para os genes alvo (<i>Aurora quinase 1 – AUK1</i> , <i>Polo-like quinase - PLK</i> , <i>MOB1</i> e <i>TRACK</i>) e genes de referência (<i>GAPDH</i> , <i>HGPRT</i> e <i>RNA 60S</i>), e tamanho dos produtos amplificados por cada par de iniciadores.	55
Tabela 2. Duração de cada fase do ciclo celular de <i>Trypanosoma rangeli</i>. Os cálculos foram realizados de acordo com as equações (1) e (2). Tempo total de duplicação = 26,2 horas.	70
Tabela 3. Proporção de cada fase do ciclo celular em <i>Trypanosoma rangeli</i> , <i>T. cruzi</i> e <i>T. brucei</i>	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AUK – Aurora quinase
BLAST – do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*
BrdU – 5-bromo-2'-deoxiuridina
BSA – Soro Albumina Bovina, do inglês *Bovine Serum Albumin*
CM-celulose – Carboximetil celulose
CPC – do inglês *Chromosomal Passenger Complex*
C_q – Ciclo de Quantificação
DAPI – 4'-6'-diamidino-2-fenilindol
DMEM – do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
dNTP – Desoxinucleotídeo trifosfatado
DTT – Ditioneitol
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
FAZ – Zona de Aderência Flagelar, do inglês *Flagellar Attachment Zone*
FCaBP – Proteína Flagelar de Ligação de Cálcio, do inglês *Flagellum Calcium-Binding Protein*
GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HGPRF – Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase
HU – Hidroxiureia
IgG – Imunoglobulina G
kDa – Kilodalton
kDNA – DNA do cinetoplasto
LB – Meio Luria Bertani
LIT – do inglês *Liver Infusion Tryptose*
MOB – do inglês *Mps One Binder*
pb – Pares de bases
PBS – Tampão Salina Fosfato, do inglês *Phosphate Buffered Saline*
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*
PLK – Polo-like quinase
PVDF – Fluoreto de polivinilideno, do inglês *Polyvinylidene Fluoride*
qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real, do inglês *Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction*
RNAi – RNA de interferência
mRNA – RNA mensageiro
rRNA – RNA ribossomal
SBF – Soro Bovino Fetal
SDS – Sódio dodecil sulfato

SDS-PAGE – do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

TRACK – Receptor para C-quinase Ativada de Tripanosomas, do inglês *Trypanosome Receptor for Activated C-Kinase*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	25
1.1 <i>Trypanosoma rangeli</i>	25
1.2 Controle da expressão gênica em tripanosomatídeos	31
1.3 Ciclo celular de tripanosomatídeos.....	33
1.3.1 Citocinese em tripanosomatídeos	37
1.3.2 Aurora quinases (AUK).....	38
1.3.3 Polo-like quinases (PLK).....	40
1.3.4 <i>Mps One Binder</i> (MOB).....	42
1.3.5 Receptor para C-quinase Ativada de Tripanosomas (TRACK)	43
2. OBJETIVOS.....	47
2.1 Objetivo Geral	47
2.2 Objetivos Específicos.....	47
3. MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1 Parasitos	49
3.1.1 Cultivo	49
3.1.2 Diferenciação.....	49
3.1.3 Purificação de formas tripomastigotas de cultura.....	50
3.2 Análise do ciclo celular	50
3.2.1 Sincronização	50
3.2.2 Citometria de fluxo.....	51
3.2.3 Curva de crescimento	51
3.2.4 Incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU)	52
3.2.5 Imunofluorescência indireta	53
3.2.6 Equações do ciclo celular	53
3.3 Marcadores moleculares do ciclo celular: DNA	54
3.3.1 Análise <i>in silico</i> e escolha de iniciadores	54
3.3.2 Extração de DNA	56
3.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	56

3.3.4	Clonagem	57
3.3.5	Sequenciamento e análise dos genes	57
3.4	Marcadores moleculares do ciclo celular: RNA.....	58
3.4.1	Extração de RNA total	58
3.4.2	Tratamento com DNase.....	59
3.4.3	Transcrição reversa (RT-PCR).....	59
3.4.4	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real (qPCR)	60
3.4.5	Análise dos resultados e estatística	60
3.5	Marcadores moleculares do ciclo celular: Proteína	61
3.5.1	<i>Western blot</i>	61
3.6	Ensaio <i>in vivo</i>.....	62
3.6.1	Aspectos éticos no uso de animais	62
3.6.2	Infecção de camundongos com tripomastigotas.....	62
3.6.3	Purificação de tripomastigotas sanguíneos.....	63
4.	RESULTADOS	65
4.1	Ciclo celular <i>in vitro</i> do <i>Trypanosoma rangeli</i>	65
4.2	Marcadores moleculares da citocinese em <i>Trypanosoma rangeli</i>	70
4.2.1	Análise <i>in silico</i>	70
4.2.2	Validação dos iniciadores para qPCR	73
4.3	Epimastigotas	75
4.4	Tripomastigotas de cultura	85
4.5	Tripomastigotas sanguíneos	92
5.	DISCUSSÃO	95
6.	CONCLUSÕES.....	109
	REFERÊNCIAS.....	111

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Trypanosoma rangeli*

O *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* (Tejera, 1920) é um protozoário hemoflagelado pertencente à Família Trypanosomatidae, da Ordem Kinetoplastida. Organismos pertencentes a este grupo incluem também o *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, o *Trypanosoma brucei*, responsável pela doença do sono no continente africano, e diferentes espécies do gênero *Leishmania*, associadas aos diferentes tipos de leishmanioses. Além destes, tripanosomatídeos de importância veterinária incluem, por exemplo, o *Trypanosoma evansi*, responsável pela doença denominada como “mal das cadeiras” ou “surra” em equinos, e o *Trypanosoma vivax*, agente da tripanosomíase bovina. Divergentes dos demais eucariotos em uma série de aspectos estruturais e moleculares, os Kinetoplastida são caracterizados principalmente pela presença do cinetoplasto, estrutura na região terminal da única mitocôndria destes protozoários. A posição do cinetoplasto em relação ao núcleo varia ao longo do ciclo de vida de cada protozoário, sendo importante para a identificação de suas formas biológicas.

O *T. rangeli* apresenta duas formas biológicas bem definidas: a forma epimastigota proliferativa, com 45 a 56 μm de comprimento, incluindo o flagelo livre, na qual o cinetoplasto localiza-se anteriormente ao núcleo (**Figura 1A**) e a forma tripomastigota infectante, cujo cinetoplasto é posterior ao núcleo (**Figura 1B**), com comprimento de 26 a 35 μm (CUBA CUBA, 1998).

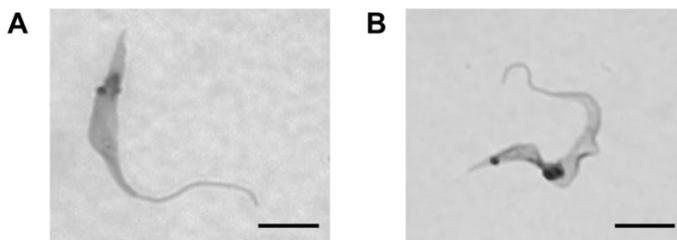


Figura 1. *Trypanosoma rangeli*. **A**, formas epimastigotas, proliferativas, encontradas no triatomíneo e, **B**, formas tripomastigotas, infectantes, encontradas no triatomíneo e no mamífero. As barras representam 5 μm .

Estreitamente relacionado ao *T. cruzi* em relação ao ciclo vital, o *T. rangeli* é capaz de infectar insetos triatomíneos, mamíferos silvestres e domésticos, assim como seres humanos (GRISARD *et al.*, 1999). No entanto, o *T. rangeli* não é considerado patogênico para o hospedeiro mamífero, ainda que uma extensa variedade de espécies pertencentes às Ordens Edentata, Marsupialia, Carnivora, Rodentia e Primata, já tenham sido descritas como possíveis reservatórios naturais para este parasito (D'ALESSANDRO; SARAVIA, 1999).

Além dos hospedeiros, o *T. rangeli* e o *T. cruzi* também têm em comum a distribuição geográfica ao longo das Américas Central e do Sul, apresentando uma extensa área de sobreposição (GRISARD; STEINDEL, 2011). Somada ao fato de que estes parasitos compartilham cerca de 60% de sua constituição antigênica solúvel (AFCHAIN *et al.*, 1979), o que determina uma reação imunológica cruzada (GUHL *et al.*, 1985), a coexistência do *T. rangeli* com o *T. cruzi* apresenta importantes implicações epidemiológicas. Há registros da ocorrência de infecções mistas nos triatomíneos e hospedeiros mamíferos (GUHL; VALLEJO, 2003), inclusive em seres humanos, o que dificulta o diagnóstico sorológico da doença de Chagas, especialmente durante a fase crônica (GRISARD *et al.*, 1999). É possível, ainda, que os elevados títulos de anticorpos gerados após infecções por *T. rangeli* sejam equivocadamente considerados como indicativos de uma infecção por *T. cruzi*, resultando em diagnósticos falso-positivos da doença de Chagas (GUHL; MARINKELLE, 1982).

Assim, o estudo comparativo do *T. rangeli* no contexto da doença de Chagas e de seu agente etiológico, na busca de metodologias de identificação específica e visando compreender mecanismos de patogenicidade, torna-se extremamente importante dos pontos de vista epidemiológico, terapêutico, econômico e social (STOCO, 2010). Por outro lado, para que se possa traçar um paralelo entre *T. rangeli* e *T. cruzi* que permita tais investigações, importantes aspectos ainda desconhecidos acerca da própria biologia do *T. rangeli* precisam ser elucidados.

O ciclo biológico do *T. rangeli* apresenta diferenças marcantes em relação ao ciclo do *T. cruzi*, tanto no triatomíneo como no mamífero. A primeira característica que se destaca é o fato do *T. rangeli* ser transmitido ao hospedeiro mamífero pela picada do triatomíneo, isto é, através da saliva pela via inoculativa (D'ALESSANDRO; SARAVIA, 1999). Há estudos em laboratório que demonstram ser possível infectar camundongos com as fezes do triatomíneo, mas esta não é a principal via de transmissão do parasito (GRISARD; STEINDEL, 2011).

Os triatomíneos infectados pelo *T. rangeli* em sua grande maioria pertencem ao gênero *Rhodnius*, sendo que a suscetibilidade e o nível de infecção variam conforme a espécie do triatomíneo e a cepa do parasito (GUHL; VALLEJO, 2003). O ciclo do *T. rangeli* neste hospedeiro tem início com a ingestão de formas tripomastigotas presentes no sangue do mamífero durante a hematofagia. Uma vez no trato digestivo do triatomíneo, alguns parasitos diferenciam-se em formas epimastigotas que, aderindo ao epitélio do intestino médio, o atravessam e alcançam a hemocele. Na hemolinfa, os epimastigotas multiplicam-se livremente e, então, migram para a glândula salivar do inseto, invadindo-a e diferenciando-se em formas tripomastigotas metacíclicas, sendo estas as formas infectantes do parasito transmitidas ao hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo (**Figura 2**).

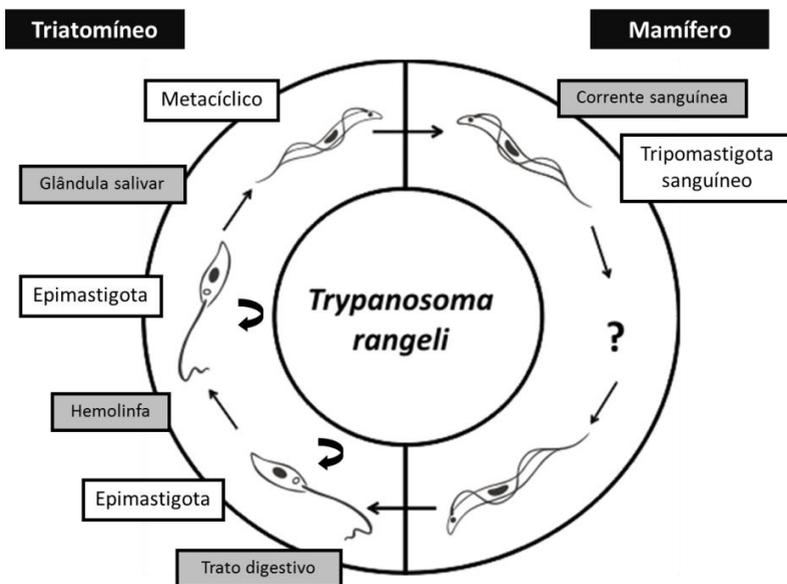


Figura 2. Ciclo biológico do *Trypanosoma rangeli*. Durante o repasto sanguíneo do triatomíneo, ocorre a ingestão de tripomastigotas, que no trato digestivo se diferenciam em epimastigotas. Os epimastigotas aderem ao epitélio intestinal e alcançam a hemolinfa – as setas curvas indicam as formas proliferativas. Estes parasitos então invadem as glândulas salivares e diferenciam-se nas formas infectantes (tripomastigotas metacíclicas), as quais são inoculadas com a saliva durante a hematofagia. Uma vez no sangue do mamífero, é desconhecido o ciclo do *T. rangeli*. Fonte: GRISARD; STEINDEL, 2011 (adaptado).

O processo de diferenciação celular que ocorre nas glândulas salivares do triatomíneo é denominado metaciclologênese e constitui uma etapa essencial do ciclo de vida do *T. rangeli*. A metaciclologênese envolve mudanças coordenadas no metabolismo e na morfologia do parasito para que formas epimastigotas, proliferativas e incapazes de infectar o mamífero, tornem-se formas infectantes que não se multiplicam, os tripomastigotas metacíclicos (STOCO, 2010). Essa mudança de forma, acompanhada pela ativação ou repressão de vias metabólicas e por alterações ultraestruturais correlatas (VICKERMAN, 1985), está associada a características biológicas intrínsecas do parasito bem como às modificações físico-químicas de seu ambiente.

O curso da infecção por *T. rangeli* no triatomíneo é bastante conhecido, tendo sido descritos, inclusive, mecanismos pelos quais este parasito torna-se patogênico para o inseto vetor (GUHL; VALLEJO, 2003). Altos níveis de infecção por *T. rangeli* impedem a realização da ecdise e frequentemente levam à mortalidade de triatomíneos, especialmente no estágio de ninfa (GREWAL, 1957). Outras complicações, tais como alterações na coloração da hemolinfa (GREWAL, 1957) e a redução na quantidade de simbioses intestinais (VALLEJO; GUHL; SCHAUB, 2009) também podem incorrer em danos para o triatomíneo.

Em contrapartida, inexistem evidências de patogenicidade ocasionada pelo *T. rangeli* no hospedeiro mamífero. De fato, o ciclo do *T. rangeli* neste hospedeiro é até hoje pouco conhecido e bastante controverso, uma vez que não há consenso quanto a sua capacidade de multiplicação no mamífero. Embora haja indícios de que o *T. rangeli* seja capaz de se dividir no hospedeiro mamífero, tais como a detecção de níveis de parasitemia em camundongos até sete vezes maiores que o inóculo original de parasitos (URDANETA-MORALES; TEJERO, 1985), há divergências quanto ao local desta replicação, a qual poderia ser intracelular, da mesma forma que o *T. cruzi*, ou extracelular, como o *T. brucei*.

Os dados na literatura acerca da proliferação do *T. rangeli* em mamíferos são escassos, possivelmente devido à parasitemia normalmente baixa e de curta duração produzida por este parasito nestes hospedeiros (AÑEZ *et al.*, 1985). Observa-se que, normalmente, a parasitemia é crescente até o quarto dia após a infecção, persistindo em média por duas semanas (AÑEZ, 1981). Entretanto, a presença do *T. rangeli* já foi detectada através de hemocultura alguns meses após a infecção em camundongos experimentalmente infectados (STEINDEL,

1993; PAREDES; PAREDES, 1949), sugerindo períodos patentes variáveis de acordo com a espécie do mamífero infectado (BRAGA *et al.*, 1998) e sua idade, bem como com a cepa de *T. rangeli* utilizada (URDANETA-MORALES; TEJERO, 1985).

No que diz respeito à proliferação extracelular do *T. rangeli*, pesquisadores buscaram indícios que evidenciassem sua replicação na circulação sanguínea do hospedeiro mamífero. Formas tripomastigotas aparentemente em divisão binária, apresentando dois núcleos e dois cinetoplastos, foram descritas por Grewal (1956) e Molyneux (1973), enquanto Herbig-Sandreuter (1957), mesmo sem visualizar estes parasitos, sugeriu serem estas as formas proliferativas do *T. rangeli* no mamífero. Contudo, posteriormente foi aventada a possibilidade de que parasitos atípicos, ou ainda em transição morfológica e recém-inoculados pelo inseto vetor, tenham sido inadvertidamente considerados como formas de fato em divisão celular (AÑEZ, 1981).

Utilizando experimentos *in vitro* como uma nova abordagem para a questão, Tanoura e colaboradores (1999) avaliaram o comportamento de formas tripomastigotas em contato com culturas de fibroblastos, demonstrando que estes parasitos sobrevivem por até três semanas sem proliferarem. A visualização destes parasitos por microscopia eletrônica indica que seu cinetoplasto adquire o formato de bastonete característico de tripomastigotas de *T. cruzi*, os quais não se multiplicam. Estes resultados fortalecem a hipótese de que, mesmo sem se dividir, o *T. rangeli* seria capaz de sobreviver por longos períodos no sangue, corroborando as observações de que o parasito de fato persiste por bastante tempo na circulação de humanos (ZELEDÓN, 1954) e gambás (AÑEZ, 1981), ainda que em pequenos números.

Em relação a uma possível multiplicação intracelular por parte do *T. rangeli*, a controvérsia é ainda maior. O primeiro e mais extenso estudo histopatológico, no qual cortes seriados foram realizados em mais de cem camundongos, não revelou quaisquer indícios de formas intracelulares do *T. rangeli* ou de alterações patológicas no decorrer do período de infecção (HERBIG-SANDREUTER, 1957). Estudos mais recentes demonstraram que a infecção de camundongos por *T. rangeli* produz uma resposta inflamatória com infiltrados mononucleares no fígado (MORALES, 2012), cérebro e músculo esquelético (ZUÑIGA *et al.*, 1997), mas sem indicativos de necrose.

Por outro lado, Urdaneta-Morales e Tejero (1986) utilizando a cepa Dog-82 de *T. rangeli* observaram ninhos de formas intracelulares, denominadas “amastigota-like”, em seções do coração, fígado e baço de camundongos. Muitos destes amastigota-like apresentaram núcleo e

cinetoplasto em divisão binária, mas nenhuma forma sanguínea em multiplicação foi visualizada. Este mesmo grupo relatou que a cepa Dog-82 se multiplicou primariamente em tecido conectivo, posteriormente invadindo fígado, baço, pulmões, medula óssea e, finalmente, o coração, o qual foi intensamente parasitado, ainda que por um curto período de tempo (DE SCORZA *et al.*, 1986). Os estudos conduzidos por este grupo de pesquisa oferecem os únicos relatos de formas intracelulares de *T. rangeli* observadas *in vivo*, podendo ser devidos ao uso de cepas não caracterizadas adequadamente, de forma que não é possível descartar que tenha havido contaminação laboratorial com o *T. cruzi*.

Em ensaios de interação *in vitro*, Osorio e colaboradores (1995) demonstraram que o *T. rangeli* (cepa San Agustín e o clone Ub66-5b) adota uma forma amastigota-like característica dentro de células promonocíticas U937. Embora não tenham apresentado indícios de divisão, estas formas mantiveram-se viáveis após a alimentação de triatomíneos *R. prolixus* com células infectadas. Antes disso, foi estudada a interação de *T. rangeli* com células HeLa e células de sarcoma de cães, mas sem observação de formas intracelulares (MOLYNEUX, 1973). Em contraste, parasitos da cepa colombiana C23 não só se diferenciaram em formas amastigota-like, como aumentaram em número no interior de células Vero e J774 após o oitavo dia de infecção, apontando para uma possível multiplicação intracelular desta cepa (ZUÑIGA *et al.*, 1997).

Além destes, o estudo de diferentes cepas de *T. rangeli* (Choachí, Macias e SC-58) em ensaios de interação com linhagens celulares não-fagocíticas (Vero), fagocíticas (J774) e até mesmo macrófagos murinos, apresentaram baixas taxas de infecção, com um pequeno número de formas intracelulares por célula (EGER-MANGRICH *et al.*, 2001). Embora tenham sido observados parasitos amastigota-like dentro de células Vero e J774 até 144 horas após a infecção, nenhuma evidência de multiplicação intracelular foi observada.

Diante destes controversos resultados, muitas questões ainda hoje permeiam o estudo da proliferação do *T. rangeli* no hospedeiro mamífero. Caso a multiplicação de fato aconteça, ainda não se sabe em quais tecidos ocorre e de que forma, se intra ou extracelular. A elucidação de aspectos fundamentais da divisão celular do *T. rangeli* no hospedeiro mamífero poderia explicar, dentre outros aspectos, sua aparente falta de virulência (CUBA CUBA, 1998). Entretanto, as tentativas de se estudar o ciclo deste parasito no hospedeiro mamífero buscando a observação de formas intracelulares e/ou proliferativas têm

mostrado resultados inconclusivos, ainda que sugestivos. Uma forma alternativa para se estudar o ciclo celular do *T. rangeli* no hospedeiro mamífero, portanto, é a utilização de marcadores moleculares e celulares de divisão celular, os quais permitiriam a detecção de multiplicação ainda que não haja visualização direta do processo. Assim, este estudo consistiu na busca por marcadores moleculares diferencialmente expressos ao longo do ciclo de tripanosomatídeos, que pudessem ser inequivocamente associados à divisão celular e, desta forma, utilizados para investigar a multiplicação do *T. rangeli* no hospedeiro mamífero.

1.2 Controle da expressão gênica em tripanosomatídeos

A progressão do ciclo celular demanda uma refinada regulação da expressão de centenas de moléculas distintas, para que estejam disponíveis na célula no momento certo de cada evento do ciclo. Na maior parte dos eucariotos, isso é assegurado principalmente por um meticuloso controle transcricional, em que genes individuais são transcritos de acordo com a sinalização enviada. Nos tripanosomatídeos, entretanto, a regulação da expressão gênica neste nível é praticamente inexistente, levantando questões sobre quais mecanismos estariam envolvidos na modulação de proteínas do ciclo celular (ARCHER *et al.*, 2011).

Os genes dos tripanosomatídeos estão organizados em grandes arranjos unidirecionais que são transcritos de maneira policistrônica, sendo posteriormente clivados e processados em RNA mensageiros (mRNA) individuais maduros através de *trans-splicing* e poliadenilação. Estes dois eventos encontram-se intrinsecamente vinculados, sendo que o *trans-splicing* consiste na inserção de uma molécula de RNA de 39 nucleotídeos, conhecida por *Spliced Leader* (SL-RNA), a qual adiciona uma capa de sete metilguaninas (m7G) na extremidade 5' (CAMPBELL; THOMAS; STURM, 2003). A poliadenilação promove a adição de adeninas na extremidade 3', ocorrendo a uma distância fixa (cerca de 100-400 nucleotídeos, dependendo da espécie) montante ao sítio do sinal de *trans-splicing* (CLAYTON, 2002).

Este mecanismo incomum de geração de mRNA dificulta enormemente a regulação individual da expressão gênica em nível de transcrição. Apesar disso, tripanosomatídeos são dotados de uma impressionante habilidade para se adaptar aos ambientes contrastantes de seus hospedeiros, coordenando intensas mudanças morfológicas e metabólicas durante o seu ciclo biológico. Portanto, a expressão

diferencial de genes é indispensável para sua sobrevivência, sendo alcançada principalmente através de mecanismos que combinam o controle pós-transcricional, a regulação traducional e a proteólise seletiva (CLAYTON; SHAPIRA, 2007).

A síntese constitutiva do transcriptoma e a seleção das mensagens certas apenas na etapa de maturação do mRNA provavelmente permitem ao parasito uma rápida mudança na expressão de moléculas para se adaptar a um novo ambiente e sobreviver. Embora haja um custo metabólico associado à permanente degradação de uma considerável fração do transcriptoma, os tripanosomatídeos escapam da necessidade de produzir fatores de transcrição específicos, bem como de possuir sequências-alvo para estes fatores no genoma (GOMEZ *et al.*, 2010).

O controle nos níveis de mRNA e proteína durante o ciclo celular devem estar em consonância para assegurar que certos elementos-chave na replicação do DNA, na duplicação de organelas e na divisão celular sejam finamente regulados. Isto é particularmente importante quando se tratam de elementos cuja expressão ectópica no ciclo celular pode comprometer todo este processo (ARCHER *et al.*, 2009).

Os eventos regulatórios que afetam a abundância de mRNA têm recebido considerável atenção, sendo que a degradação diferencial destas moléculas e sua estabilidade na célula são os principais mecanismos estudados. Por exemplo, foi demonstrado em *T. brucei* que uma proteína ligante de RNA, PUF9, é capaz de estabilizar determinados transcritos durante algumas fases do ciclo celular (ARCHER *et al.*, 2009). A abundância relativa de mRNA estágio-específicos, por sua vez, possivelmente estaria vinculada a sequências presentes nas regiões UTR (do inglês *Untranslated Regions*) do genoma (GOMEZ *et al.*, 2010).

Além disso, observou-se que o comprimento da cauda poli(A) influencia a eficiência de tradução de alguns mRNA (PAYS *et al.*, 1993). A eficiência do *splicing* também pode ser manipulada, conforme já evidenciado pela presença de nucleotídeos específicos em regiões intergênicas de *L. mexicana*, os quais são posteriormente removidos (BROOKS *et al.*, 2001). Seja por estes mecanismos ou por outros ainda desconhecidos, um grande número de genes é diferencialmente expresso durante o ciclo celular de tripanosomatídeos (ARCHER *et al.*, 2009).

1.3 Ciclo celular de tripanosomatídeos

O ciclo celular de uma célula eucariótica é um processo complexo que envolve coordenadas alterações morfológicas e moleculares sequenciais para a duplicação de organelas e subsequente divisão celular. Exigente do ponto de vista metabólico, o ciclo celular apresenta uma sofisticada regulação e é constantemente monitorado pela célula, especialmente em momentos específicos, conhecidos por pontos de controle.

Tipicamente, o ciclo celular consiste em quatro fases bem definidas: **G1**, a primeira fase de intervalo, na qual a célula se prepara para um novo ciclo de replicação e divisão, garantindo a disponibilidade de nutrientes; **S**, em que ocorre a replicação do DNA; **G2**, a segunda fase de intervalo com novos pontos de controle; e **M**, quando afinal ocorre a divisão celular, ou citocinese. Células que não estejam a ponto de ingressar em um ciclo celular encontram-se na fase **G0**, da qual podem partir imediatamente para a fase **G1**, se necessário.

Muitos mecanismos associados à replicação celular são altamente conservados entre as células eucarióticas, apresentando-se praticamente idênticos mesmo entre leveduras e mamíferos, organismos onde o ciclo celular é mais estudado. Tripanosomatídeos, entretanto, se destacam por características que os tornam singulares entre os eucariotos, como a capacidade de duplicar e segregar organelas de cópia única (VAUGHAN; GULL, 2008), fazendo de seu ciclo celular um objeto de estudo fascinante. Além disso, as significativas diferenças entre os tripanosomatídeos e seus hospedeiros mamíferos quanto à regulação do ciclo celular possibilitariam a exploração desta via almejando o desenvolvimento de novos medicamentos antiparasitários (HAMMARTON, 2007).

Além do núcleo, as estruturas de cópia única que precisam ser corretamente duplicadas e segregadas antes da divisão celular de tripanosomatídeos incluem um único complexo de Golgi (HE *et al.*, 2004), bem como uma única mitocôndria cujo cinetoplasto contém o kDNA, arranjos circulares concatenados de DNA que compõem os minicírculos e maxicírculos. Os tripanosomatídeos apresentam também um único corpo basal, intrinsecamente conectado ao cinetoplasto, do qual emerge o flagelo (**Figura 3**). O citoesqueleto destes organismos é caracterizado pela presença de microtúbulos subpeliculares, entre os quais, durante o ciclo celular, são inseridos novos microtúbulos que

permitem o aumento do volume celular para a divisão (SHERWIN; GULL, 1989b).

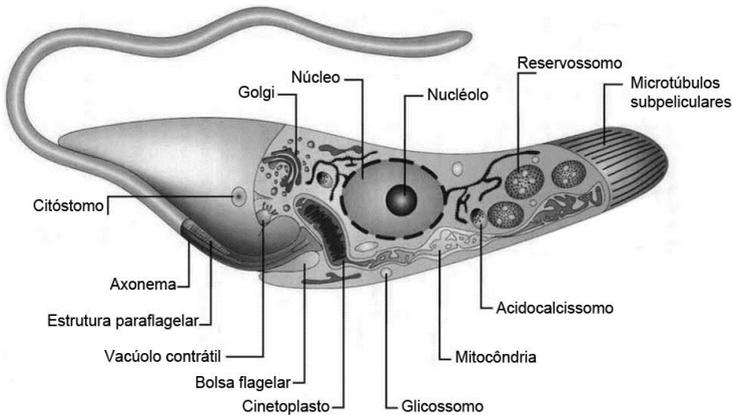


Figura 3. Estruturas internas de um tripanosomatídeo (*Trypanosoma cruzi*). Em destaque, as estruturas únicas que precisam ser duplicadas no processo de divisão celular: complexo de Golgi, mitocôndria com cinetoplasto e axonema (flagelo). O corpo basal não está representado, mas localiza-se na base do flagelo. Fonte: DE SOUZA, 2008 (adaptado).

O corpo basal dos tripanosomatídeos contém dois centríolos e é a primeira organela a sofrer duplicação. A partir dele emerge um novo flagelo, cujo crescimento é constante ao longo de todo o ciclo (SHERWIN; GULL, 1989a). O complexo de Golgi, situado entre o núcleo e o bolso flagelar, é o próximo a ser duplicado, e neste momento complexos de Golgi menores também aparecem na célula (DE GRAFFENRIED; HO; WARREN, 2008). Em seguida ocorre a replicação do bilobo, uma enigmática estrutura do citoesqueleto localizada próxima ao bolso flagelar, aparentemente associada à biogênese do complexo de Golgi (ESSON *et al.*, 2012). A duplicação e segregação do cinetoplasto, a seguir, são mediadas pelos corpos basais em separação. Por fim, a divisão do núcleo é sucedida pela citocinese, gerando duas células-filha com o mesmo complemento de organelas (SHERWIN; GULL, 1989a). Este processo de divisão celular encontra-se representado na **Figura 4**.

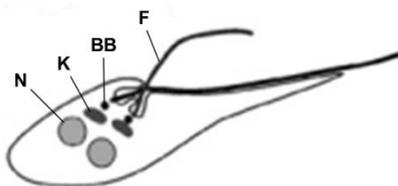


Figura 4. Representação esquemática do processo de divisão celular em um tripanosomatídeo (*Trypanosoma cruzi*). As principais estruturas encontram-se duplicadas e o parasito está prestes a sofrer citocinese. **N** = núcleo, **K** = cinetoplasto, **BB** = corpo basal, **F** = flagelo. Fonte: ELIAS *et al.*, 2007 (adaptado).

A progressão do ciclo celular de tripanosomatídeos pode ser monitorada através de coloração do DNA, sendo que células com um cinetoplasto e um núcleo (1N 1K) encontram-se na fase G1/S, células com dois cinetoplastos e um núcleo (1N 2K) estão em fase G2/M, e indivíduos com dois cinetoplastos e dois núcleos (2N 2K) estão prestes a sofrer citocinese (ROTUREAU; SUBOTA; BASTIN, 2011). Esta progressão do ciclo denota um fato peculiar em tripanosomatídeos, que é a existência de duas fases S ligeiramente distintas para o DNA nuclear e para o DNA do cinetoplasto.

Neste aspecto, cada tripanosomatídeo apresenta um comportamento em particular. Em *T. brucei*, o início da replicação do kDNA é anterior à replicação do DNA nuclear, e sua síntese é também finalizada antes (WOODWARD; GULL, 1990). Em *T. cruzi*, da mesma forma, o cinetoplasto sofre divisão antes do núcleo, embora a replicação do kDNA provavelmente comece após o início da fase S nuclear (ELIAS *et al.*, 2007). É interessante notar que, em *T. cruzi*, o novo flagelo emerge do antigo bolso flagelar apenas após a finalização da fase S nuclear (ELIAS *et al.*, 2007). Em *L. major*, da mesma forma que em *T. brucei* e em *T. cruzi*, a divisão do cinetoplasto é finalizada antes da divisão do núcleo (AMBIT *et al.*, 2011). Por outro lado, um estudo com *L. donovani* sugere que a divisão nuclear precede a divisão do cinetoplasto, gerando células com dois núcleos e apenas um cinetoplasto (MINOCHA *et al.*, 2011). Por fim, em *L. mexicana* a replicação do DNA nuclear e do kDNA aparentemente ocorrem simultaneamente (WHEELER; GLUENZ; GULL, 2011).

A replicação destes dois tipos de DNA em tripanosomatídeos tem intrigantes peculiaridades. Quanto à duplicação e segregação do DNA

nuclear, nestes organismos o envelope nuclear não é desfeito em nenhum momento do ciclo, nem tampouco ocorre condensação dos cromossomos (SOLARI, 1980; HAMMARTON, 2007). Além disso, a existência de uma fase S específica para o kDNA contrasta com a replicação do DNA mitocondrial de células de mamíferos, cuja síntese é contínua durante o ciclo celular (WOODWARD; GULL, 1990). Embora a duplicação do kDNA ocorra apenas uma vez no ciclo, o mecanismo que controla seu número de cópias permanece desconhecido (LI, 2012).

De fato, muitos mecanismos regulatórios do ciclo celular de tripanosomatídeos ainda são pouco compreendidos. Os pontos de controle do ciclo presentes nestes organismos são incomuns e envolvem moduladores específicos, alguns dos quais ortólogos funcionais, mas não estruturais, daqueles de outros eucariotos (LI, 2012). As vias de sinalização que conduzem a transição entre diferentes fases do ciclo celular, tais como G1/S, G2/M e mitose/citocinese, recém começam a ser elucidadas.

Ciclina (CYC) e quinases dependentes de ciclina (CDK) são moléculas-chave para o ciclo celular de eucariotos, e homólogos conservados destas proteínas são encontrados em tripanosomatídeos. As CDK de tripanosomatídeos são denominadas quinases relacionadas à Cdc2 (CRK) e, da mesma forma que ciclina, já foram identificadas nos genomas destes parasitos (FARR; GULL, 2012). Em *T. brucei*, um complexo de CYC2 com CRK1 já foi implicado na regulação da progressão G1/S (TU; WANG, 2005), ao passo que complexos entre CYC2, CRK3 e CYC6 parecem estar associados à transição G2/M (VAN HELLEMOND *et al.*, 2000).

Por outro lado, a transição entre mitose e citocinese possivelmente apresenta pontos de controle bastante distintos, uma vez que estes dois eventos parecem estar desacoplados em tripanosomatídeos. Foi demonstrado que a inibição da mitose não afeta a citocinese, gerando células contendo 0N 1K denominadas “zóides”, da mesma forma que a inibição da citocinese não impede a mitose, resultando em parasitos com múltiplas organelas (PLOUBIDOU *et al.*, 1999).

A aparente independência da citocinese em relação ao restante do ciclo a torna uma interessante etapa a ser estudada. Sendo o passo final do processo de divisão celular, a citocinese assegura a geração de uma nova célula e, portanto, confirma a ocorrência de multiplicação celular. Além disso, promove uma série de alterações no citoesqueleto e na membrana plasmática, permitindo sua fácil distinção das demais etapas do ciclo celular (HAMMARTON, MONNERAT, MOTTRAM, 2007).

Assim, os potenciais marcadores moleculares e celulares de divisão celular em *T. rangeli* foram buscados no âmbito da regulação da citocinese como evidência da multiplicação do parasito.

1.3.1 Citocinese em tripanosomatídeos

A citocinese é a etapa final da divisão celular e requer uma complexa interação entre proteínas regulatórias e componentes do citoesqueleto e da membrana celular, que remodelarão a célula e realizarão sua clivagem. Entre os diversos passos preparatórios para o ingresso na citocinese, a divisão dos corpos basais e do cinetoplasto parecem ser os mais importantes (PLOUBIDOU *et al.*, 1999). Outra estrutura essencial para este evento é o flagelo, que se encontra anexado ao corpo celular em quase toda sua extensão através da zona de aderência flagelar (FAZ, do inglês *Flagellar Attachment Zone*) (KOHL; ROBINSON; BASTIN, 2003).

A citocinese é composta por quatro etapas principais: seleção do sítio de clivagem, sinalização para iniciar clivagem, formação do sulco e abscisão celular. Estas etapas são sequenciais e interdependentes (HAMMARTON; MONNERAT; MOTTRAM, 2007).

A seleção do sítio de clivagem já foi estudada em *T. brucei*, sendo definida essencialmente pela extremidade anterior do flagelo recém-sintetizado e pela FAZ. Como consequência disso, a citocinese tem início a partir da porção anterior da célula (SHERWIN; GULL, 1989a). Uma nova FAZ é estendida ao mesmo tempo em que o novo flagelo cresce, com uma pequena defasagem, e assim fornece a informação estrutural que assegura o correto posicionamento do sulco de clivagem. Na ausência de uma nova FAZ, a qual é gerada a partir do antigo flagelo, a citocinese não ocorre (KOHL; ROBINSON; BASTIN, 2003).

Quanto à sinalização que propicia o início da clivagem, sabe-se que determinados pontos de controle precisam ser inativados, mas apenas poucas moléculas que participam desta regulação já são conhecidas (HAMMARTON; MONNERAT; MOTTRAM, 2007). Algumas destas moléculas estão descritas em mais detalhes nesta seção.

A formação do sulco de clivagem é unidirecional e ocorre ao longo do eixo longitudinal da célula, de sua extremidade anterior para a extremidade posterior. Esta etapa é efetuada pelos microtúbulos do citoesqueleto, com a provável participação de proteínas motoras e cataninas (FARR; GULL, 2012). Curiosamente, a actina não forma um anel de contração nem se associa ao sulco de clivagem nestes

organismos, embora seja indispensável para a citocinese nos demais eucariotos (GARCIA-SALCEDO *et al.*, 2004).

Por fim, a abscisão celular é auxiliada pelos batimentos flagelares rotacionais, e é provável que neste momento haja um intenso remodelamento do citoesqueleto e da membrana plasmática. Assim, a citocinese em tripanosomatídeos não envolve uma contração centrípeta, mas um aparente movimento longitudinal do sulco de clivagem através da célula, que procede de forma helicoidal ao longo da linha do novo flagelo/FAZ, passando entre os dois flagelos e separando a célula em duas (VAUGHAN; GULL, 2003).

Embora a repressão de uma grande variedade de proteínas possa inibir a citocinese, poucas de fato exercem um papel direto neste processo, seja sinalizando o início da citocinese, regulando a formação do sulco de clivagem ou controlando a abscisão celular (HAMMARTON; MONNERAT; MOTTRAM, 2007). Recentemente, contudo, estão sendo descritas moléculas fundamentais no controle da mitose e da iniciação da citocinese.

1.3.2 Aurora quinases (AUK)

Aurora quinases (AUK) são enzimas bastante estudadas no ciclo celular de eucariotos devido à sua implicação em transformações oncogênicas, sendo que atualmente cerca de uma dúzia de inibidores destas enzimas estão sendo avaliados em ensaios clínicos (CHEUNG *et al.*, 2011). Em mamíferos, a família das AUK consiste em três parálogos, Aurora A, B e C, cujos domínios quinase são altamente conservados (CARMENA; EARNSHAW, 2003). Aurora A está implicada na transição G2/M, maturação e separação de centríolos, bem como na formação do fuso mitótico bipolar. Por outro lado, Aurora B promove a condensação dos cromossomos, sua orientação no fuso mitótico, e a abscisão celular ao final da citocinese (VADER; LENS, 2008). Além de uma função na espermatogênese, Aurora C não parece ter um papel essencial em células somáticas (KETTENBACH *et al.*, 2011).

Em *T. brucei*, foram identificadas três AUK homólogas, denominadas *TbAUK1*, *TbAUK2* e *TbAUK3*. Um cuidadoso alinhamento sugere que as três enzimas sejam homólogas da Aurora B de mamíferos (TU *et al.*, 2006). De fato, inexitem no genoma de *T. brucei* proteínas necessárias para uma organização do fuso mediada por centríolos – dentre elas Aurora A –, sugerindo que esta é conduzida pela própria cromatina neste organismo (LI, 2012). Em contrapartida,

proteínas envolvidas nas vias de organização do fuso mediadas pela cromatina – como Aurora B – são expressas por *T. brucei* e essenciais para o desenvolvimento de seu ciclo celular (TU *et al.*, 2006).

Inibições químicas bem como genéticas – por RNA de interferência (RNAi) – das três AUK de *T. brucei* revelaram que apenas uma delas, *TbAUK1*, tem papel relevante no ciclo celular. Em formas procíclicas do parasito, esta proteína está localizada no núcleo e participa ativamente na formação dos fusos mitóticos, bem como na replicação do cinetoplasto e no ingresso na citocinese (TU *et al.*, 2006). Por outro lado, em formas sanguíneas do parasito *TbAUK1* regula a citocinese sem exercer um controle rígido sobre a síntese do DNA nuclear ou a replicação de organelas. Pela primeira vez uma proteína homóloga de Aurora B foi implicada em funções distintas para formas biológicas de um mesmo organismo (LI; WANG, 2006).

A depleção da função de *TbAUK1* na fase S, prófase ou metáfase invariavelmente interrompeu o ciclo celular em metáfase, sugerindo um papel para esta enzima na transição metáfase/anáfase. Uma vez que a anáfase seja alcançada, entretanto, *TbAUK1* não é mais necessária para a progressão da mitose. A partir daí sua função será requerida para a translocação do complexo CPC (do inglês *Chromosomal Passenger Complex*) do núcleo para a extremidade anterior da FAZ, onde terá início a citocinese (LI; UMEYAMA; WANG, 2009). Posteriormente, o CPC acompanhará o movimento do sulco de clivagem entre as duas células-filha (LI, 2012). O CPC de tripanosomatídeos é bastante distinto daquele dos metazoários, sendo composto pela própria AUK1 e por duas outras proteínas denominadas CPC1 e CPC2. Algumas cinesinas também se associam a este complexo durante a formação do fuso mitótico, mas não o acompanham durante a citocinese (LI *et al.*, 2008).

De maneira geral, os estudos com *TbAUK1* demonstraram que, embora a citocinese não esteja sob rígida regulação da mitose em tripanosomatídeos, esta enzima tem um papel importante tanto para completar a mitose como para iniciar a citocinese (FARR; GULL, 2012). Antes disso, a proteína *Polo-like* quinase (PLK) fora identificada como iniciadora da citocinese de tripanosomatídeos, sem aparente envolvimento na mitose (KUMAR; WANG, 2006). Contudo, alterações na PLK de *T. brucei* (*TbPLK*) não têm influência sobre as funções de *TbAUK1*, ao passo que a inibição de *TbAUK1* afeta os níveis de *TbPLK*. Isto sugere que a AUK1 encontra-se à montante na cascata de sinalização da divisão celular, e que a regulação exercida pela PLK ocorre a partir de um ponto mais próximo ao início da citocinese (TU *et al.*, 2006).

A importância da AUK1 no momento crítico entre a conclusão da mitose e a iniciação da citocinese faz desta proteína um marcador molecular promissor para a divisão celular de tripanosomatídeos.

1.3.3 Polo-like quinases (PLK)

Assim como as Aurora quinases, as Polo-like quinases (PLK) também são enzimas já bastante conhecidas. Estas serina/treonina quinases têm um papel crucial tanto na mitose como na citocinese, sendo encontradas em todos os eucariotos. Em mamíferos, a família PLK consiste de quatro membros: PLK1 é de longe a mais estudada, sendo responsável por inúmeras ações durante toda a mitose; PLK2 e PLK3 parecem ter funções durante a intérfase; e PLK4 está envolvida com a duplicação do centríolo (KETTENBACH *et al.*, 2011). Em *Saccharomyces cerevisiae*, a homóloga de PLK é denominada Cdc5 e encontra-se associada ao fuso mitótico e à citocinese neste organismo (SONG; LEE, 2001).

Tripanosomatídeos possuem uma única PLK (GRAHAM; TAIT; HIDE, 1998), altamente conservada. Esta proteína já foi extensamente estudada em *T. brucei*, e recentemente foi detalhado o trajeto que percorre ao longo de todo o ciclo celular deste parasito. Coincidentemente, a ordem de migração da Polo-like quinase de *T. brucei* (*TbPLK*) através das organelas coincide com a sequência em que estas estruturas são duplicadas na célula (IKEDA; DE GRAFFENRIED, 2012).

Os primeiros estudos com *TbPLK* já demonstraram seu papel indispensável para a iniciação da citocinese em *T. brucei*, uma vez que sua inibição por RNAi, mesmo sem afetar a divisão de organelas, bloqueava a divisão celular gerando células com múltiplos núcleos, cinetoplastos, corpos basais e flagelos (KUMAR; WANG, 2006). Este mesmo estudo demonstrou que *TbPLK* é capaz de realizar todas as funções de Cdc5 em *S. cerevisiae* destituídos desta proteína, sugerindo que *TbPLK* é homóloga estrutural e funcionalmente de Cdc5. Ainda assim, a *TbPLK* aparentemente não possui papel relevante nas transições entre G2/M e metáfase-anáfase em *T. brucei*, nem na liberação da anáfase e saída da mitose (KUMAR; WANG, 2006). Dessa forma, foi a primeira vez que se descreveu uma PLK sem função essencial para a mitose.

Além da função, a distribuição celular de *TbPLK* em *T. brucei* também difere muito da distribuição de Cdc5 em *S. cerevisiae* e das

PLK em mamíferos. Enquanto nestes organismos as proteínas se concentram no núcleo, em tripanosomatídeos sua localização é variável e fortemente associada às organelas em duplicação durante o ciclo celular (SONG; LEE, 2001; IKEDA; DE GRAFFENRIED, 2012).

Nas fases iniciais do ciclo, *TbPLK* é encontrada nos corpos basais e permanece associada a estas estruturas enquanto duplicam (IKEDA; DE GRAFFENRIED, 2012). De fato, já havia sido demonstrado que o primeiro evento prejudicado pela baixa expressão de *TbPLK* não seria a citocinese propriamente dita, e sim a duplicação do corpo basal (HAMMARTON *et al.*, 2007). O defeito na replicação desta organela inibiria a segregação do cinetoplasto que, por sua vez, impediria a citocinese.

Após a duplicação do corpo basal, *TbPLK* se move para a região do bolso flagelar, parcialmente coincidindo com o FPC (do inglês *Flagellar Pocket Collar*), inicialmente, e posteriormente com a estrutura do bilobo (IKEDA; DE GRAFFENRIED, 2012). Da mesma forma, *TbPLK* já foi previamente implicada na duplicação do bilobo, o qual por sua vez é importante para a definição do sítio de montagem do novo Golgi (DE GRAFFENRIED; HO; WARREN, 2008).

Antes de partir do bilobo duplicado, *TbPLK* se localiza na sua extremidade anterior. Neste ponto, a proteína parece residir na extremidade crescente da nova FAZ, sugerindo que o bilobo e a FAZ fazem parte de uma mesma estrutura contínua do citoesqueleto. Foi demonstrado que a localização de *TbPLK* na FAZ é assegurada pela presença de dois motivos *Polo-box* na região carboxiterminal da proteína, os quais também regulam a atividade da *TbPLK* via interação com o domínio quinase catalítico na porção aminoterminal (SUN; WANG, 2011; YU; LIU; LI, 2012). O sinal da *TbPLK* permanece na FAZ e acompanha seu crescimento até pouco antes da citocinese, quando desaparece da célula por completo (IKEDA; DE GRAFFENRIED, 2012).

A presença de *TbPLK* na extremidade anterior da FAZ sugere uma função desta proteína na estabilização da junção entre a antiga e a nova FAZ, que se dissociariam após seu desaparecimento (UMEYAMA; WANG, 2008). De fato, foi demonstrado que a inibição de *TbPLK* por RNAi resulta em defeitos na extensão da nova FAZ, destacando o flagelo do corpo celular e prejudicando drasticamente a motilidade das células, a qual é importante também para a conclusão da citocinese (IKEDA; DE GRAFFENRIED, 2012).

Outra função atribuída à *TbPLK* devido a sua localização na FAZ é o recrutamento do complexo CPC para o sítio de iniciação da citocinese. O abrupto desaparecimento de *TbPLK* na célula coincide

com a translocação do CPC para o sulco de clivagem; ou seja, após assegurar o posicionamento do CPC e dar início à citocinese, *TbPLK* pode ser recolhida (UMEYAMA; WANG, 2008). Embora não haja registro da interação direta entre *TbPLK* e *TbAUK1*, é bastante provável que estas duas proteínas cooperem através da regulação de fatores em comum na FAZ para promover a iniciação da citocinese (LI, 2012).

Um interessante aspecto da PLK em tripanosomatídeos é a fina regulação de sua expressão durante o ciclo celular, o que a torna um poderoso marcador molecular deste evento. Sua primeira aparição é durante a fase S, persistindo no decorrer de G2/M até o completo desaparecimento durante a citocinese, de forma que nenhuma célula em G1 apresenta qualquer sinal da presença de PLK.

1.3.4 *Mps One Binder* (MOB)

As *Mps One Binder* (MOB) são proteínas regulatórias conservadas, encontradas em plantas, animais e fungos na forma de MOB1 e MOB2 (HERGOVICH, 2011). As proteínas MOB1 se assemelham às ciclinas, uma vez que ao se ligarem a suas quinases parceiras induzem uma conformação de ativação (MAH; JANG; DESHAIES, 2001).

Em *T. brucei*, uma proteína MOB1 associada à divisão celular foi estudada nas formas procíclicas e nas formas sanguíneas deste parasito, revelando sua importância no posicionamento do sulco de clivagem bem como na conclusão da citocinese. Entretanto, ao contrário do que é observado em outros organismos, aparentemente em tripanosomatídeos MOB1 não tem função relevante para o ingresso na mitose, nem para a transição mitose/citocinese. De fato, esta proteína é excluída do núcleo ao longo do ciclo celular, localizando-se principalmente no citoplasma (HAMMARTON *et al.*, 2005).

A inibição de MOB1 por RNAi nas formas sanguíneas de *T. brucei* resultou na aparição de células pós-mitóticas prestes a iniciar o sulco de clivagem, indicando apenas um atraso na citocinese, possivelmente decorrente de um efeito inibitório sobre a replicação do cinetoplasto. Por outro lado, em procíclicos a inibição de MOB1 gerou o acúmulo de zóides (ON 1K) e outras células anormais, mostrando ter havido um defeito na citocinese, ocasionado pelo mau posicionamento do sulco de clivagem. Uma vez que MOB1 não foi localizada em associação aos corpos basais ou ao próprio sulco de clivagem, seu

recrutamento para o sítio de separação das células possivelmente não é requerido para dar início à citocinese (HAMMARTON *et al.*, 2005).

Embora não haja evidências da regulação direta de MOB1 por TbPLK, aparentemente seu papel na iniciação da citocinese é posterior e complementar ao da PLK (LI, 2012). Assim, pela sua função em dar seguimento à citocinese em tripanosomatídeos, MOB1 figura como um marcador molecular em potencial para a divisão celular nestes organismos.

1.3.5 Receptor para C-quinase Ativada de Tripanosomas (TRACK)

As proteínas RACK1, do inglês *Receptor for Activated C-Kinase I*, são responsáveis pela regulação de uma série de atividades celulares, incluindo crescimento celular e tradução de proteínas, através da interação com a maquinaria ribossomal. Esta proteína é membro da família de proteínas com domínio de repetição triptofano-aspartato (*WD-repeat*) e compartilha forte semelhança com a subunidade beta da proteína G (ADAMS; RON; KIELY, 2011).

Em tripanosomatídeos, proteínas homólogas a RACK1 já foram descritas em *L. major* e em *T. brucei*. Em *L. major* a proteína é conhecida por LACK e a interrupção de seu *locus* gênico alterou a viabilidade e a virulência dos parasitos (KELLY; LOCKSLEY, 2004). Em *T. brucei*, a proteína é denominada TRACK (do inglês *Trypanosome RACK*) e está associada ao processo de divisão celular nas diferentes formas do parasito (ROTHBERG *et al.*, 2006).

A inibição de TRACK por RNAi em formas procíclicas revelou que a citocinese é interrompida a meio caminho da clivagem, não incorrendo na mesma. Estas células continuam a replicar o núcleo, o cinetoplasto e o flagelo, e formam múltiplos sulcos de clivagem parciais. Assim, a citocinese pode iniciar na ausência de TRACK, mas não progride a partir de certo ponto durante a clivagem. Nas formas sanguíneas de *T. brucei*, em contrapartida, quando a expressão de TRACK é inibida a citocinese sequer tem início (ROTHBERG *et al.*, 2006).

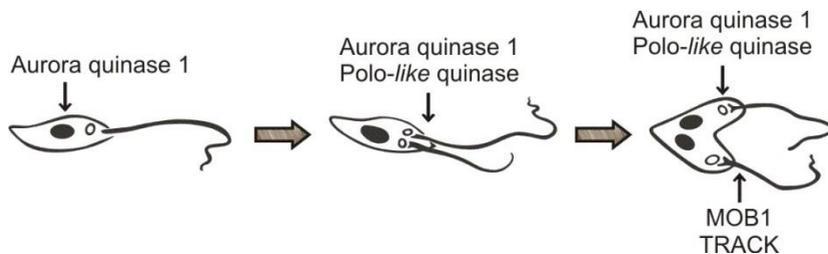
TRACK é expressa ao longo do ciclo biológico de *T. brucei* e distribuída predominantemente na região perinuclear e no citoplasma. No início do ciclo, quando as células ainda têm a conformação 1N 1K ou 1N 2K, TRACK se concentra na região em torno do núcleo,

estendendo-se para o citoplasma. Com o início da divisão nuclear, TRACK continua acompanhando o envelope nuclear e eventualmente circunda cada núcleo separado; uma zona de exclusão entre os núcleos normalmente é vista. Em nenhum momento esta proteína se associa ao retículo endoplasmático, à mitocôndria ou mesmo ao sulco de clivagem de células em divisão (ROTHBERG *et al.*, 2006).

Posteriormente, foi proposta a hipótese de que, além de possuir um papel na divisão celular, a TRACK de *T. brucei* seria responsável pela expressão diferencial de genes neste organismo (REGMI *et al.*, 2008). A associação de homólogas de RACK1 com os ribossomos em eucariotos já é bastante descrita (ADAMS; RON; KIELY, 2011), e demonstrou-se que, da mesma forma, a TRACK de *T. brucei* participa da maquinaria de tradução através da interação com o fator eucariótico de alongação 1A, eEF1A (REGMI *et al.*, 2008).

Considerando ainda que a anisomicina, um inibidor universal da tradução, prejudica a citocinese em tripanosomatídeos, é possível supor que a modulação deste evento da divisão celular por TRACK esteja relacionada também ao seu papel nos ribossomos (REGMI *et al.*, 2008). Neste caso, além de participar na formação do sulco de clivagem, TRACK seria essencial para a tradução contínua de proteínas durante a citocinese. O papel desta proteína na citocinese, manifestado de duas maneiras claramente distintas, a torna uma interessante candidata como marcador molecular da divisão celular em tripanosomatídeos.

Devido a sua participação ativa durante a citocinese através de diferentes mecanismos, os quais se encontram resumidos na **Figura 5**, estas quatro proteínas (AUK1, PLK, MOB1 e TRACK) foram selecionadas como sendo possíveis marcadores moleculares para a divisão celular em *T. rangeli*.



Eventos do ciclo celular

Aurora quinase 1	Fase S	Transição G2/M	Início do Sulco de Clivagem	
Polo-like quinase		Duplicação de Organelas	Início do Sulco de Clivagem	
MOB1			Início do Sulco de Clivagem	Progressão da Citocinese
TRACK				Progressão da Citocinese

Figura 5. Proteínas envolvidas na regulação da citocinese em tripanosomatídeos. Etapas da divisão celular de tripanosomatídeos representando os pontos em que atuam as proteínas Aurora quinase 1 (AUK1), Polo-like quinase (PLK), MOB1 e TRACK.

Considerando que foram detectadas no genoma do *T. rangeli* sequências com homologia aos genes de AUK1, PLK, MOB1 e TRACK, foi hipotetizado que estas proteínas estejam envolvidas no ciclo celular do parasito de forma semelhante ao que já foi observado em *T. brucei*. Assim, o foco deste trabalho foi avaliar se estas proteínas podem constituir marcadores moleculares de divisão celular em *T. rangeli*, associando sua expressão a alterações estruturais no parasito durante o ciclo celular *in vitro*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar marcadores moleculares e estruturais da divisão celular em *Trypanosoma rangeli*.

2.2 Objetivos Específicos

- Estimar a duração de cada fase do ciclo celular durante o crescimento *in vitro* do *T. rangeli*;
- Analisar *in silico* as proteínas Aurora quinase 1 (*TrAUK1*), Polo-like quinase (*TrPLK*), *Mps One Binder 1* (*TrMOB1*) e Receptor para C-quinase Ativada de Tripanosomatídeos (*TrTRACK*) de *T. rangeli*;
- Comparar a variação nos níveis de transcritos destes genes entre parasitos em divisão e parasitos impedidos de dividir, bem como entre formas epimastigotas e tripomastigotas diferenciadas *in vitro*;
- Avaliar a cinética dos níveis de transcritos destes genes durante o crescimento e a diferenciação *in vitro* do *T. rangeli*;
- Estabelecer as possíveis associações entre os níveis de transcritos destes genes e as fases no ciclo celular do *T. rangeli*;
- Avaliar a expressão protéica de *TrPLK* entre formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli*;
- Investigar o potencial dos marcadores moleculares em ensaios *in vivo*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Parasitos

3.1.1 Cultivo

Utilizou-se a cepa Choachí de *T. rangeli*, originalmente isolada de glândulas salivares de *Rhodnius prolixus* naturalmente infectado, capturado na Colômbia (SCHOTTELIUS, 1987). Epimastigotas de *T. rangeli* foram cultivados a 27,5°C em meio LIT (do inglês *Liver Infusion Tryptose*) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 50 U/ml de penicilina e 50 µg/ml de estreptomicina (Cultilab, Campinas), sendo semanalmente submetidos a repiques.

A cepa Y de *T. cruzi*, também utilizada no presente estudo, foi mantida nas mesmas condições para posterior obtenção do extrato protéico. Ambas as cepas encontram-se depositadas no criobanco do Laboratório de Protozoologia (MIP/CCB/UFSC).

3.1.2 Diferenciação

Para obtenção de formas tripomastigotas de cultura de *T. rangeli* seguiu-se o protocolo desenvolvido por Koerich e colaboradores (2002), com as modificações descritas por Stoco (2010). Em fase exponencial de crescimento, 12×10^7 epimastigotas foram coletados (3000 x g por 10 minutos), lavados duas vezes com PBS (tampão salina fosfato pH 7,4) e transferidos para garrafas de cultura celular de 25 cm² sem aeração, contendo 15 ml de meio DMEM pH 8,0 (Sigma-Aldrich, Saint Louis) suplementado com 5% de SBF, 1 g/l de glicose e 6 mM de L-glutamina. As culturas foram mantidas a 27,5°C por oito dias e a percentagem de formas tripomastigotas foi avaliada através de análise morfológica de 100 parasitos em lâmina corada com Giemsa (Merck, Darmstadt). A coleta dos parasitos por centrifugação (3000 x g por 10 minutos) ocorreu quando foram obtidas culturas compostas por 90% ou mais de formas tripomastigotas.

Para os experimentos que consideraram a cinética da diferenciação, os parasitos foram coletados no segundo, quarto, sexto e oitavo dia após transferência para o meio de diferenciação. A contagem dos parasitos foi realizada em câmara de Neubauer e a percentagem de tripomastigotas determinada como anteriormente descrito. Foram realizados três experimentos independentes.

Para a obtenção de extratos protéicos, formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, foram obtidas a partir do sobrenadante de células Vero infectadas, conforme descrito por Eger-Mangrich e colaboradores (2001).

3.1.3 Purificação de formas tripomastigotas de cultura

Três culturas independentes no oitavo dia da diferenciação foram submetidas à purificação de tripomastigotas em resina de troca iônica CM-celulose Servacel[®] (Serva, Heidelberg), conforme descrito por Lanham e Godfrey (1970), com algumas modificações. A resina foi preparada através de tratamento prévio com NaOH 0,5 M e com HCl 0,5 M, nos quais foi submetida a sonicação por dois minutos em aparelho Sonic Dismembrator – modelo 120 (Fisher Scientific, Pittsburgh), amplitude de 40%, e deixada interagir por 30 minutos. Ambos os tratamentos foram sucedidos por lavagens com água deionizada até atingir pH neutro. A resina foi armazenada em tampão PS (100 mM Na₂HPO₄, 5 mM NaH₂PO₄, 72 mM NaCl, pH 7,2), sendo na hora do uso solubilizada em tampão PSG (tampão PS 6:4 água deionizada, suplementado com glicose 5,4%, pH 7,2) e transferida para uma coluna de purificação.

A cultura a ser purificada foi aplicada no topo da coluna e deixada interagir por 10 minutos. Com a liberação do fluxo, a saída dos parasitos foi acompanhada em microscópio óptico e os primeiros 2 ml foram coletados. Os parasitos purificados foram então submetidos à coloração por Giemsa (Merck, Darmstadt) para determinação da porcentagem de formas tripomastigotas.

3.2 Análise do ciclo celular

3.2.1 Sincronização

Culturas de epimastigotas na concentração aproximada de 1×10^7 parasitos/ml foram coletadas por centrifugação (3000 x g por 10 minutos) e acrescidas de 3 ml de meio LIT (10% SBF, 50 U/ml penicilina, 50 µg/ml estreptomomicina) contendo 20 mM de hidroxíureia (HU). Após 24 horas a 27,5°C, os parasitos foram coletados e lavados duas vezes com PBS.

Para os três ensaios independentes de progressão do ciclo celular, os parasitos sincronizados foram transferidos para meio livre de HU e

cultivados a 27,5°C – processo denominado liberação da HU. Os parasitos foram separados em oito tubos de cultura e coletados (3000 x g por 10 minutos) em diferentes tempos após transferência para o meio livre de HU: 2 horas e 30 minutos, 5 horas, 7 horas e 30 minutos, 10 horas, 12 horas, 15 horas, 19 horas e 23 horas.

3.2.2 Citometria de fluxo

Para análise em citometria de fluxo, os parasitos descritos nos itens 3.1.1, 3.1.2, 3.1.3, 3.2.1 e 3.6.3, na concentração aproximada de 6×10^6 /ml, foram coletados (3000 x g por 10 minutos), lavados uma vez com PBS e fixados em banho de gelo por 10 minutos com metanol gelado 50% em PBS. Após solubilização em PBS, foram armazenados em geladeira por no máximo cinco dias, até a leitura do experimento em citômetro de fluxo.

No dia da leitura, as amostras foram tratadas com RNase (Fisher Healthcare, Houston) na concentração final de 50 µg/ml por 20 minutos a 37°C, centrifugadas a 3000 x g por 5 minutos e solubilizadas em PBS. Em seguida, foram transferidas para tubos de citometria e, instantes antes da leitura no equipamento, acrescidas de iodeto de propídio (Sigma-Aldrich, Saint Louis) na concentração final de 4 ng/µl e homogeneizadas.

A análise das amostras foi realizada em equipamento FACSVerse (BD Biosciences, San Jose) do Laboratório de Imunobiologia (LIDI-UFSC), previamente calibrado com a passagem de parasitos vivos e parasitos fixados com metanol, não marcados com iodeto de propídio, para seleção da população de análise. A leitura foi realizada utilizando os canais PerCP-Cy™5.5, além do canal FITC como controle negativo, e em média 30.000 eventos foram adquiridos por amostra.

Os resultados foram analisados utilizando o programa FlowJo 8.6.3 (Tree Star, Ashland) e os gráficos montados como histograma, onde é representado o número de células (ordenada) em função da quantidade de DNA (abscissa). Para calcular a proporção de células em G1 e em G2/M/C, zonas de análise (*gates*) foram desenhadas manualmente sobre cada pico no histograma.

3.2.3 Curva de crescimento

Em três experimentos independentes, epimastigotas em fase exponencial de crescimento ($4-5 \times 10^6$ parasitos/ml) foram separados

em seis tubos contendo 4 ml de meio LIT (10% SBF, 50 U/ml penicilina, 50 µg/ml estreptomicina) e cultivados a 27,5°C. Para obter a curva de crescimento da cepa Choachí de *T. rangeli* nestas condições de cultivo, os parasitos foram contados em câmara de Neubauer em intervalos de 12 horas até atingir 60 horas de crescimento. Foram analisados os tempos de 12 horas, 18 horas (acrescentado na curva para melhor acompanhamento da fase exponencial de crescimento desta cepa), 24 horas, 36 horas, 48 horas e 60 horas.

3.2.4 Incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU)

Parasitos em fase exponencial de crescimento foram mantidos a 27,5°C em meio LIT (10% SBF, 50 U/ml penicilina, 50 µg/ml estreptomicina) contendo 100 mM de bromodeoxiuridina (BrdU – Invitrogen, Carlsbad) por diferentes tempos entre 1 hora e 24 horas. Bromodeoxiuridina é um análogo de timidina incorporado pelo DNA em replicação, durante a divisão celular.

Uma vez que a detecção das células marcadas com BrdU é realizada por imunofluorescência, os parasitos incubados com BrdU foram coletados (3000 x g por 10 minutos) e lavados duas vezes com PBS, sendo posteriormente depositados sobre lamínula circular (diâmetro de 12 mm) em placa de poliestireno de 24 cavidades. Seguindo o protocolo estabelecido por Elias e colaboradores (2007), com pequenas modificações, por 15 minutos os parasitos aderiram à lamínula e, então, foram fixados com metanol gelado por 10 minutos. Após uma lavagem com PBS, os parasitos foram tratados com HCl 1,5 M por 30 minutos a temperatura ambiente para desnaturação do DNA e consequente exposição da BrdU. A interação com o anticorpo anti-BrdU (Molecular Probes, Carlsbad), diluído 1:50 em PBS-BSA 0,5%, foi feita durante 15 horas a 4°C. Após três lavagens com PBS, realizou-se a interação por 15 minutos com o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado ao corante fluorescente Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Carlsbad), diluído 1:1000 em PBS-BSA 0,5%. Três lavagens com PBS precederam e sucederam a marcação por 5 minutos com DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) na concentração de 1 µg/ml e, em seguida, as lamínulas foram montadas em lâminas de microscopia com o meio Hydromount (National Diagnostics, Atlanta). As análises foram inicialmente realizadas em microscópio óptico de fluorescência Olympus – Bx40–FL (Olympus, Tóquio) e as imagens obtidas em microscópio confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar), o

qual encontra-se instalado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC (LCME–UFSC). Os resultados foram registrados digitalmente.

3.2.5 Imunofluorescência indireta

Nos ensaios de imunofluorescência para investigar as mudanças estruturais durante o ciclo celular do *T. rangeli*, seguiu-se o protocolo descrito por Stoco e colaboradores (2012), com pequenas modificações. Formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento da cepa Choachí de *T. rangeli* foram coletadas (3000 x g por 10 minutos) e lavadas duas vezes com PBS e, após 15 minutos de adesão à lamínula, fixadas durante 5 minutos com paraformaldeído 4% em PBS. A lamínula foi submetida a três lavagens (5 minutos) em PBS, sendo todas as etapas subsequentes também intercaladas com lavagens nestas mesmas condições. A permeabilização dos parasitos foi realizada com o detergente NP-40 a 0,5%, por 5 minutos. O bloqueio de sítios inespecíficos na lamínula foi realizado durante 1 hora a temperatura ambiente com solução de PBS-BSA 5%. A seguir, foi realizada a interação por 90 minutos com anticorpo monoclonal dirigido à proteína flagelar de ligação de cálcio (FCaBP, do inglês *Flagellum Calcium-binding Protein*) (SCHENKMAN; DIAZ; NUSSENZWEIG, 1991), diluído 1:50 em PBS-BSA 0,5%. O anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado ao corante fluorescente Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Carlsbad) foi diluído 1:1000 em PBS-BSA 0,5%, sendo mantido sobre a lamínula por 15 minutos. A lamínula foi, então, corada por 5 minutos com 1 µg/ml de DAPI, sendo posteriormente montada com o meio Hydromount (National Diagnostics, Atlanta) em lâminas de microscopia. Conforme descrito anteriormente, as análises foram realizadas em microscópio óptico de fluorescência Olympus – Bx40–FL (Olympus, Tóquio) e as imagens obtidas em microscópio confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar) do LCME–UFSC.

3.2.6 Equações do ciclo celular

A duração de um evento no ciclo celular pode ser determinada pela frequência de células exibindo este evento, quando: i) a posição deste evento no ciclo celular é conhecida, ii) a cultura é verdadeiramente assíncrona, e iii) o tempo de geração é constante. Utilizando a análise de

Williams (1971), a duração das fases G1/S, G2, mitose (M) e citocinese (C) no ciclo celular da cepa Choachí de *T. rangeli* pôde ser estimada a partir da frequência de parasitos na população exibindo os padrões morfológicos associados a cada fase. A equação de Williams (1971) consiste em:

$$x = \frac{\ln(1-y/2)}{-\alpha} \quad (1)$$

Onde x é o tempo cumulativo no ciclo (em horas) necessário para alcançar o fim do estágio em questão, y é a percentagem cumulativa (expressa como fração de 1) de células exibindo padrões morfológicos anteriores e referentes ao estágio em questão, e α é a taxa de crescimento específica, a qual pode ser calculada uma vez que o tempo de duplicação seja conhecido. No total, 575 parasitos foram analisados e classificados de acordo com o padrão morfológico apresentado.

A duração da fase S foi calculada a partir da equação de Stanners e Till (1960):

$$S = \frac{1}{\alpha} \ln[L + e^{\alpha(Z)}] - (Z + t) \quad (2)$$

Sendo que: $\alpha = \ln(2/T)$ e $Z = G2 + M + C$

Onde T é o tempo de geração, t é a duração do período de marcação com BrdU, e L é a proporção de células marcadas (WOODWARD; GULL, 1990).

3.3 Marcadores moleculares do ciclo celular: DNA

3.3.1 Análise *in silico* e escolha de iniciadores

As sequências completas das janelas de leitura dos genes selecionados como marcadores moleculares do ciclo celular (genes alvo), *Aurora quinase 1 (AUK1)*, *Polo-like quinase (PLK)*, *MOB-1* e *TRACK*, bem como dos genes de referência escolhidos a partir da literatura, *GAPDH*, *HGPRT* e *RNA60S*, foram obtidas a partir do banco de dados do Projeto Genoma do *T. rangeli* (www.rangeli.lncc.br), no qual constam sequências adquiridas pelo Laboratório de Protozoologia em parceria com o Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC). Por estarem em fase de publicação, estes dados ainda são restritos.

A análise *in silico* inicial permitiu a predição da sequência aminoacídica destas proteínas e sua comparação com proteínas homólogas de outros tripanosomatídeos, bem como a detecção de domínios específicos através da ferramenta *blastx* do programa BLAST disponível no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank). Sítios para modificações pós-traducionais foram preditos através do programa *MotifScan*, acessível pela plataforma Expasy (www.expasy.org).

Os iniciadores para a realização de qPCR (**Tabela 1**) foram escolhidos através do programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, Carlsbad) respeitando-se recomendações previamente descritas (UDVARDI; CZECHOWSKI; SCHEIBLE, 2008). A ausência de dímeros e grampos entre os pares de iniciadores foi confirmada também pelo programa *Primer Select* do pacote DNASTAR[®] (Lasergene, Madison).

Tabela 1. Sequência dos iniciadores escolhidos para os genes alvo (*Aurora quinase 1* – *AUK1*, *Polo-like quinase* - *PLK*, *MOB1* e *TRACK*) e genes de referência (*GAPDH*, *HGPRT* e *RNA 60S*), e tamanho dos produtos amplificados por cada par de iniciadores.

Gene	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Tamanho do produto (pb)
<i>Aurora quinase 1 (AUK1)</i>	AGCTGAATCGGGTGAAGTGC TGCTGGTGCAGATAGAGGAG	88
<i>Polo-like quinase (PLK)</i>	AAGGCGGAGGTCATTCTCAG ATTCATCCGAGTGCGAGGC	111
<i>MOB1</i>	GCTACGAGTACCTTTGGAAG TCGTCGTTGATTTGCCTCTC	112
<i>TRACK</i>	TGTCGCCCTTTCGAACAACG TGCCGTTCTGCAGATTCCAC	83
<i>GAPDH</i>	GCGACACCAGCATCAAAGAG CTGTGCTCACAAGTTCCTCG	102
<i>HGPRT</i>	TGACATCCGCCACAGCATTG CGAGCAACACAACGGTCTTC	137
<i>RNA 60S</i>	CGATGAAGCTCAAGTGGACC CGGTTGTACTTGACGGGAAC	113

3.3.2 Extração de DNA

Para extração do DNA genômico, formas epimastigotas foram coletadas (3000 x g por 10 minutos), lavadas duas vezes com PBS e solubilizadas em tampão de lise TELT (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 62,5 mM EDTA pH 9,0, 2,5 M LiCl, 4% Triton-X100), sendo homogeneizadas cuidadosamente e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. Após o acréscimo de RNase na concentração final de 2 µg/µl, o lisado foi incubado a 37°C por 1 hora. As etapas subsequentes foram realizadas através do método de fenol-clorofórmio, conforme protocolo padrão (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Ao final, as amostras de DNA foram solubilizadas em tampão TE (EDTA 1 mM pH 8,0, Tris-HCl 10 mM pH 8,0) e sua concentração e pureza avaliadas através de espectrofotometria a 260 e 280 nm em equipamento BioPhotometer® (Eppendorf, Hamburg).

3.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA genômico extraído conforme o descrito acima foi utilizado como molde para amplificar via PCR os fragmentos dos genes selecionados como marcadores moleculares (*AUK1*, *PLK*, *MOBI* e *TRACK*) e genes de referência (*GAPDH*, *HGPRT* e *RNA60S*) utilizando os iniciadores desenhados para a qPCR a fim de verificar sua especificidade.

Cada reação ocorreu na presença de 1 unidade da enzima *Taq* DNA polimerase em seu tampão apropriado (Invitrogen, Carlsbad), 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTP (Invitrogen, Carlsbad), 0,5 µM dos iniciadores e 20 ng de DNA genômico da cepa Choachí de *T. rangeli*. Em cada conjunto de reação foi adicionado um controle negativo, composto de todos os reagentes necessários à amplificação, à exceção do DNA molde. A amplificação foi realizada em um termociclador Mastercycler® Gradient (Eppendorf, Hamburg), iniciando com uma etapa de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos contendo uma etapa de desnaturação (94°C por 45 segundos), uma etapa de ligação dos iniciadores (60°C por 30 segundos) e uma etapa de alongação do DNA pela polimerase (72°C por 1 minuto). Ao término destes ciclos, as amostras foram submetidas a uma extensão final da cadeia de DNA a 72°C por 10 minutos. Os produtos de amplificação da

PCR foram resolvidos por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, sendo os resultados registrados digitalmente.

3.3.4 Clonagem

Devido ao seu baixo peso molecular, as bandas referentes aos fragmentos dos genes *AUK1*, *PLK*, *MOBI* e *TRACK* amplificados via PCR foram excisadas do gel e purificadas utilizando o kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare, Buckinghamshire), sendo o DNA purificado clonado através do kit *pGEM-T easy® Vector* (Promega, Madison), ambos segundo as especificações do fabricante. Os produtos de ligação foram então utilizados na transformação por eletroporação a 2,5 KV de células eletrocompetentes *Escherichia coli* DH5- α em aparelho MicroPulser® (BioRad, Richmond). A seleção dos clones recombinantes foi baseada na coloração azul/branco das colônias crescidas em meio LB (Luria Bertani) ágar suplementado com ampicilina (100 μ g/ml), 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo (X-Gal, 20 μ g/ml) e isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) na concentração final de 40 μ g/ml. Dentre estes clones, a presença do inserto foi verificada através de uma PCR diretamente das colônias selecionadas, utilizando os iniciadores específicos para cada gene nas condições descritas anteriormente. Os plasmídeos recombinantes selecionados foram extraídos através do procedimento padrão de lise alcalina, denominado *mini-prep*, conforme descrito por Sambrook e Russell (2001).

Uma vez que neste processo houve a geração e manipulação de organismos geneticamente modificados (OGM), é importante salientar que o Laboratório de Protozoologia está inserido no certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB 101/99) da UFSC, estando apto a desenvolver estudos que envolvam a geração e a manipulação de OGM em regime de contenção.

3.3.5 Sequenciamento e análise dos genes

Com o objetivo de confirmar a identidade dos fragmentos clonados, cada inserto teve as duas fitas do DNA sequenciadas utilizando-se o kit *DYEnamic® ET Dye Terminator* (GE Healthcare, Buckinghamshire), conforme as instruções do fabricante. A leitura das bases foi realizada em um equipamento *MegaBACE 1000® DNA Analysis System* (GE Healthcare, Buckinghamshire).

As reações de sequenciamento foram realizadas na presença de 5 pmol dos iniciadores M13-F (5' – CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC – 3') e M13-R (5' – TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C – 3'), dirigidos ao vetor *pGEM-T easy*[®], utilizando aproximadamente 800 ng do DNA plasmidial. As reações de sequenciamento contaram com as seguintes etapas: desnaturação inicial (95°C por 25 segundos), seguida de 35 ciclos com etapas de desnaturação (95°C por 15 segundos), ligação dos iniciadores (50°C por 20 segundos) e extensão da cadeia de DNA (60°C por 90 segundos). Os produtos dessas reações foram precipitados com isopropanol 70% para a retirada dos nucleotídeos e iniciadores não incorporados, sendo subsequentemente eletroinjetados a 2 KV por 120 segundos e eletroeluídos por 150 minutos a 9 KV.

A análise das sequências obtidas foi realizada com o apoio do Laboratório de Bioinformática (UFSC). O agrupamento das sequências contíguas e a determinação de sua qualidade foram realizados utilizando o pacote *Phred/Phrap/Consed* (www.phrap.org). A confirmação da identidade do fragmento obtido foi realizada através da ferramenta *blastx* do programa BLAST disponível no GenBank.

3.4 Marcadores moleculares do ciclo celular: RNA

3.4.1 Extração de RNA total

Parasitas dos experimentos descritos nos itens 3.1.1, 3.1.2, 3.1.3, 3.2.1 e 3.6.3 foram coletados (3000 x g por 10 minutos), lavados duas vezes com PBS e homogeneizados vigorosamente em 1 ml do reagente Trizol[®] (Invitrogen, Carlsbad). As amostras foram armazenadas a -80°C por no máximo um mês antes da realização da extração de RNA total.

Após o descongelamento, as amostras foram mantidas por 5 minutos a temperatura ambiente antes da extração de RNA total. Em seguida, adicionou-se 200 µl de clorofórmio 98% (Merck, Darmstadt) às amostras, as quais foram agitadas por 15 segundos, mantidas a temperatura ambiente por 2 minutos e, então, centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa resultante foi transferida para um tubo novo, onde foi acrescida de 500 µl de isopropanol (Merck, Darmstadt) e novamente submetida à centrifugação a 12.000 x g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 1 ml de etanol 75%, gelado, através de centrifugação a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C. Novamente, o sobrenadante foi descartado e o sedimento

contendo o RNA total foi seco, invertendo-se os tubos sobre papel por aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente. O RNA total foi então solubilizado em 20 µl de água ultrapura livre de nucleases e armazenado a -80°C.

As amostras obtidas tiveram sua concentração e pureza avaliadas em um espectrofotômetro BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg), observando-se as relações de absorbância 260/280 nm e 260/230 nm. Além disso, as amostras foram visualizadas em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio (1 µg/ml), para avaliação da integridade do RNA.

3.4.2 Tratamento com DNase

A fim de eliminar qualquer DNA contaminante inadvertidamente purificado durante o processo de extração de RNA, as amostras de RNA (1 µg ou 5 µg, conforme a concentração inicial disponível) foram submetidas a tratamento com DNase (Invitrogen, Carlsbad), na razão de 1 unidade por µg de RNA extraído. A reação foi realizada durante 15 minutos a temperatura ambiente, na presença de tampão recomendado pelo fabricante. A inativação da enzima ocorreu com a adição de EDTA na concentração final de 2,5 mM e aquecimento a 65°C por 10 minutos.

3.4.3 Transcrição reversa (RT-PCR)

A partir das amostras tratadas com DNase, 200 ng ou 1 µg de RNA (conforme concentração inicial disponível) foram submetidos a uma reação de transcrição reversa. A RT-PCR foi conduzida a 37°C por 50 minutos na presença de 200 unidades da enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen, Carlsbad), 200 µM de dNTP (Invitrogen, Carlsbad), 10 pmoles do iniciador OligodT-Anchor direcionado à cauda poli(A) (5'-GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA CT₁₆-3'), 10 mM de DTT (Invitrogen, Carlsbad) e 40 unidades do inibidor de ribonucleases RNaseOUT™ (Invitrogen, Carlsbad), em tampão recomendado pelo fabricante. A inativação da reação ocorreu por 15 minutos a 70°C. O DNA complementar (cDNA) obtido foi armazenado a -20°C.

3.4.4 Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real (qPCR)

Para utilização como molde na qPCR, o cDNA foi diluído cinco vezes em água ultrapura livre de nucleases. As reações ocorreram na presença do reagente *Maxima[®] SYBR Green/ROX qPCR Master Mix* (Thermo Scientific, Pittsburgh), de acordo com as orientações do fabricante, e 0,5 μM dos iniciadores de cada par descrito na **Tabela 1**, sendo montadas em placas de 96 poços AB-C (Axygen, Union City), em volume final de 10 μl . As placas, cobertas por selante óptico *MicroAmp[®] Optical Adhesive Film* (Applied Biosystems, Carlsbad), foram analisadas em equipamento ABI Prism[®] 7900HT *Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Carlsbad) do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB–UFSC). As reações tiveram início com uma etapa de desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos contendo uma etapa de desnaturação (95°C por 15 segundos) e uma etapa de ligação dos iniciadores (60°C por 1 minuto). Ao final, foi incluída uma etapa para obtenção da curva de dissociação (95°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos e, novamente, 95°C por 15 segundos). Em cada placa adicionou-se um controle negativo para cada par de iniciadores, composto por todos os reagentes necessários à amplificação, à exceção do DNA molde.

A eficiência da qPCR com cada par de iniciadores foi calculada através da diluição seriada 1:2 de amostras de DNA genômico e de misturas de cDNA (cinco pontos). A inclinação da reta, obtida a partir da função entre o C_q (ciclo de quantificação) e cada ponto da diluição, foi aplicada à equação:

$$E = 10^{-1/\text{slope}} - 1 \quad (3)$$

Onde E representa a eficiência da qPCR e slope é o valor de inclinação da reta. O valor de E é obtido como fração de uma unidade.

3.4.5 Análise dos resultados e estatística

Os experimentos de qPCR foram realizados em triplicata biológica e em duplicata técnica, sendo posteriormente analisados pelo software SDS 2.4 (Applied Biosystems, Carlsbad). Para avaliar a variação relativa nos níveis de cada transcrito entre as amostras analisadas, utilizou-se o método da quantificação relativa (LIVAK;

SCHMITTGEN, 2001), comparando o C_q apresentado para cada gene alvo à média dos C_q de dois ou três genes de referência (*GAPDH*, *HGPRT* e *RNA60S*), escolhendo-se aqueles com menor variância interna. Os cálculos necessários para obtenção dos valores de abundância relativa foram realizados em planilha do Excel (Microsoft Office), através das seguintes equações:

$$\Delta Cq = Cq (\text{gene alvo}) - Cq (\text{gene de referência}) \quad (4)$$

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq (\text{amostra}) - \Delta Cq (\text{calibrador}) \quad (5)$$

$$QR = 2^{-\Delta\Delta Cq} \quad (6)$$

Onde o *calibrador* é a amostra a partir da qual as demais serão comparadas e QR é o valor de quantificação relativa. O valor de QR médio do *calibrador* é sempre próximo a 1.

As análises estatísticas, bem como a confecção dos gráficos (valor QR no eixo x e amostras no eixo y), foram realizadas no programa Prism 5.0 (GraphPad). Foram utilizados os testes estatísticos t de Student não-pareado, quando as comparações foram realizadas entre duas amostras, e Análise de Variância (ANOVA) de uma via para dados repetidos, seguida do teste de Bonferroni, no caso da cinética de diferenciação dos parasitos. Valores p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

3.5 Marcadores moleculares do ciclo celular: Proteína

3.5.1 Western blot

Extratos protéicos totais foram obtidos através da adição de tampão de lise (50 mM NaCl, 200 mM Tris-HCl pH 8,0, 1% Triton X-100) aquecido a 80°C. Após homogeneização em vórtex e centrifugação a 12.000 x g por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi coletado e a concentração dos extratos protéicos foi estimada através de microdosagem pelo método de Bradford (1976).

Cerca de 30 μg de cada extrato foram misturados ao tampão de amostra SDS-PAGE (20% glicerol, 0,5% azul de bromofenol, 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 4,4% SDS e 2% β -mercaptoetanol), aquecidos a 95°C por 5 minutos e resolvidos por eletroforese em gel SDS-PAGE 10%. As amostras foram subsequentemente transferidas para membranas de PVDF (BioRad, Richmond) por 90 minutos a 100 V em módulo de transferência *Mini Trans-Blot*[®] *Cell* (BioRad, Richmond), com imersão

em tampão de transferência (192 mM glicina, 25 mM Tris, 20% metanol).

Após a transferência, as membranas foram bloqueadas em solução contendo gelatina a 5% dissolvida em PBS-Tween 1%. A interação com o soro policlonal, purificado por afinidade, dirigido à enzima Polo-like quinase de *T. brucei*, anti-TbPLK (DE GRAFFENRIED; HO; WARREN, 2006), diluído 1:500 em gelatina 2% dissolvida em PBS-Tween 1%, ocorreu a temperatura ambiente por 12 horas sob agitação branda. O anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (Zymax, Invitrogen, Carlsbad) foi utilizado na diluição de 1:5000 e mantido sobre a membrana por 1 hora. Entre cada etapa as membranas foram lavadas cinco vezes por 5 minutos com PBS-Tween 1%.

A observação dos resultados foi realizada através da exposição das membranas, adicionadas do reagente *Pierce*[®] *ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Fisher Scientific, Rockford), a filmes radiográficos IBF Medix (Indústria Brasileira de Filmes, Rio de Janeiro). Após a exposição, os filmes foram revelados utilizando o processador automatizado de filmes SRX-101A (Konica Minolta Medical & Graphic, INC – China).

3.6 Ensaios *in vivo*

3.6.1 Aspectos éticos no uso de animais

Foram utilizados camundongos fêmeas BALB/c provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP/UFSC) em caixas contendo serragem, com disponibilidade de água e ração *ad libitum*. Os procedimentos foram realizados observando-se os Princípios Éticos para o Uso de Animais de Laboratório, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, tendo sido aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais da UFSC (Processo CEUA: 23080.025618/2009-81).

3.6.2 Infecção de camundongos com tripomastigotas

Tripomastigotas da cepa Choachí de *T. rangeli* diferenciados em cultura foram contados em câmara de Neubauer, coletados (3000 x g por 10 minutos) e adicionados de 650 µl de meio DMEM de diferenciação (5% SBF, 1 g/l glicose, 6 mM L-glutamina, pH 8,0).

Três camundongos BALB/c foram inoculados pela via intraperitoneal com 200 μl dessa suspensão (aproximadamente 1×10^7 parasitos) e sacrificados por punção cardíaca no segundo, quinto e sétimo dia pós-infecção, sob anestesia com xilazina e cetamina. Cerca de 1 ml de sangue foi coletado por animal em tubo contendo 70 μl de citrato de sódio.

Para determinação da parasitemia, antes da realização de punção cardíaca, 5 μl de sangue foram retirados da veia caudal e depositados sobre lâmina, sendo cobertos por lamínula 22 mm x 22 mm (fator de correção 26,645). Foram contados 50 campos por lamínula.

3.6.3 Purificação de tripomastigotas sanguíneos

Ao sangue coletado em tubo foi adicionado tampão de lise de hemácias (37 mM NH_4Cl , 300 μM EDTA, 2,5 mM NaHCO_3) na proporção de 1:1, sendo mantido sob agitação branda a temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas em baixa rotação (10 x g) por 5 minutos para separação das células sanguíneas. O sobrenadante (contendo os parasitos) foi separado em novo tubo. Este procedimento foi realizado três vezes, com acréscimo de tampão de lise de hemácias quando necessário.

Para a coleta dos parasitos, as amostras foram centrifugadas a 3000 x g por 5 minutos e lavadas uma vez com PBS. Cada amostra foi dividida em dois tubos: um seguiu para análise em citometria de fluxo, realizada no mesmo dia; o outro, para extração de RNA. Ambos os procedimentos foram realizados conforme descrito anteriormente nesta metodologia.

No intuito de facilitar a compreensão da metodologia utilizada neste estudo, o esquema na **Figura 6** resume a sequência das etapas realizadas.

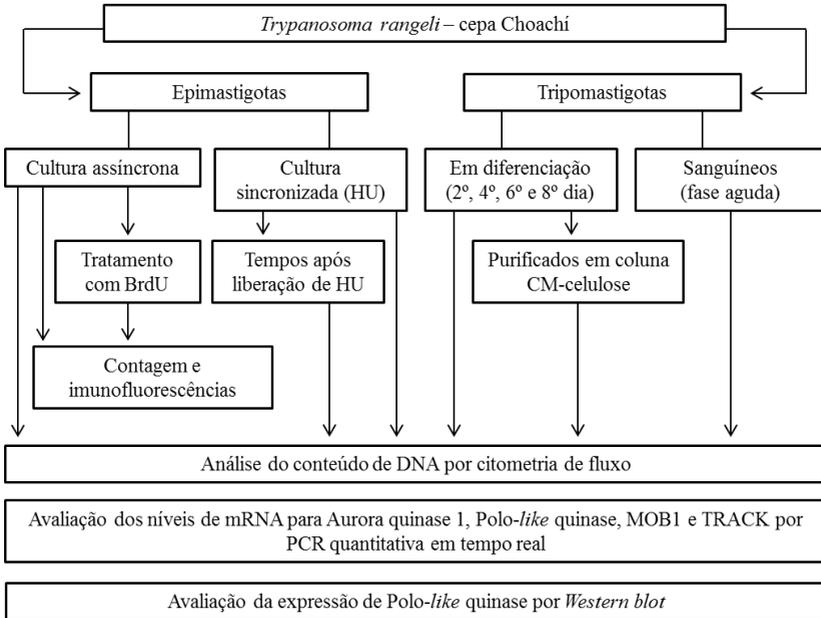


Figura 6. Esquema representativo da metodologia utilizada neste trabalho.

4. RESULTADOS

4.1 Ciclo celular *in vitro* do *Trypanosoma rangeli*

Com o intuito de estimar a duração de cada uma das fases do ciclo celular *in vitro* do *T. rangeli*, o primeiro passo deste trabalho consistiu no estabelecimento de sua curva de crescimento em cultura (**Figura 7**). Formas epimastigotas foram contadas em intervalos de 12 horas, sendo acrescentada uma nova contagem às 18 horas de crescimento para o melhor acompanhamento da fase exponencial da curva.

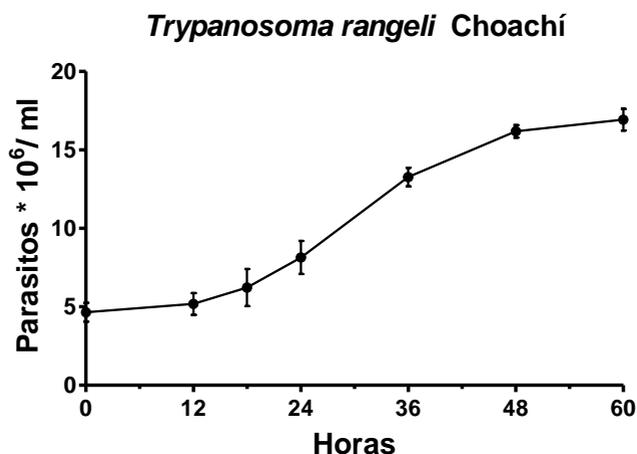


Figura 7. Curva de crescimento *in vitro* do *Trypanosoma rangeli*. Epimastigotas ($4-5 \times 10^6/\text{ml}$) da cepa Choachí foram contados em intervalos de 12 horas até 60 horas. Os resultados representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes.

O tempo de duplicação da cepa Choachí de *T. rangeli*, nestas condições de crescimento, foi estimado em aproximadamente 26,2 horas. Aplicando este valor à equação (1) descrita em Materiais e Métodos (seção 3.2.6), a taxa de crescimento específica foi calculada em 0,026 por hora.

A marcação do DNA e do flagelo de parasitos em fase exponencial de crescimento, através de imunofluorescência utilizando DAPI e um anticorpo monoclonal dirigido à proteína FCaBP, revelou células com diferentes padrões morfológicos (**Figura 8**). A maioria das

células continham um núcleo, um cinetoplasto e um flagelo (1N 1K 1F), mas também foram observadas células contendo 1N 1K 2F, 1N 2K 2F e 2N 2K 2F.

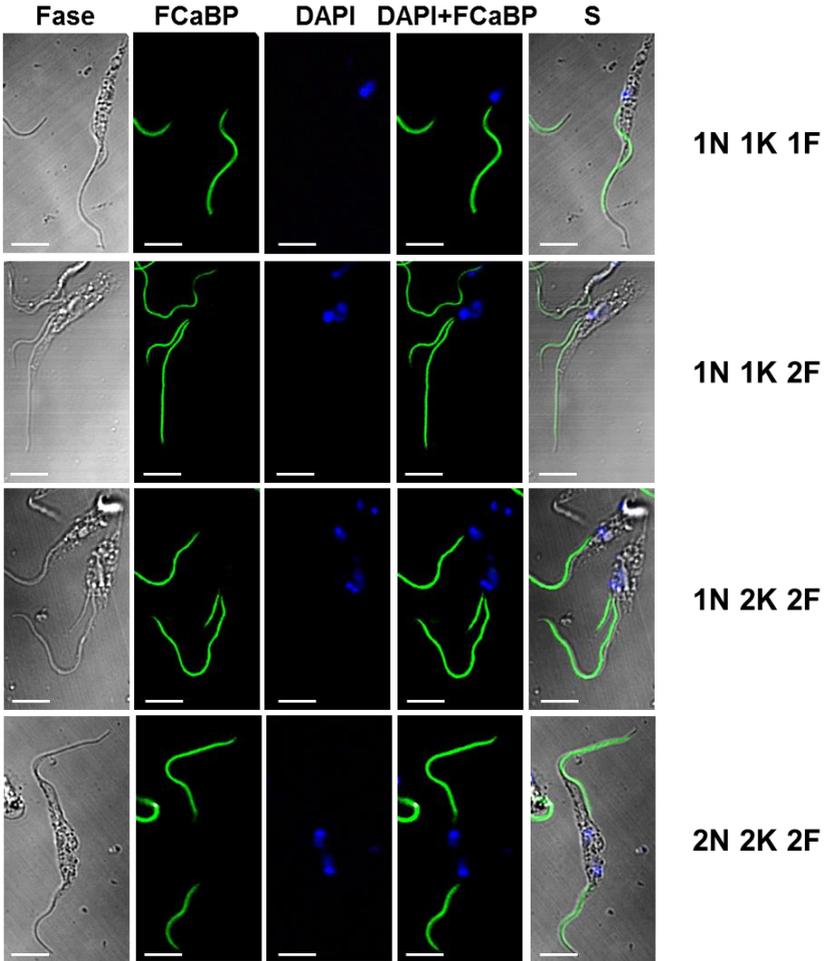


Figura 8. Padrões morfológicos em uma cultura de epimastigotas de *Trypanosoma rangeli*. As imagens foram obtidas por microscopia confocal. **Fase:** contraste de fase; **FCaBP:** marcação do flagelo com anticorpo monoclonal anti-FCaBP; **DAPI:** marcação do DNA nuclear e do kDNA; **S:** sobreposição das imagens. **N = Núcleo, K = Cinetoplasto, F = Flagelo.** As barras em branco representam 5 μ m.

Eventualmente células contendo 2N 1K 2F também foram visualizadas, mas, devido à sua proporção ínfima em relação aos demais padrões morfológicos, foram consideradas formas que escapam à progressão natural do ciclo, não sendo, portanto, incluídas nos estudos subsequentes. Assim, a percentagem de cada padrão morfológico foi calculada e os resultados estão apresentados na **Figura 9**.

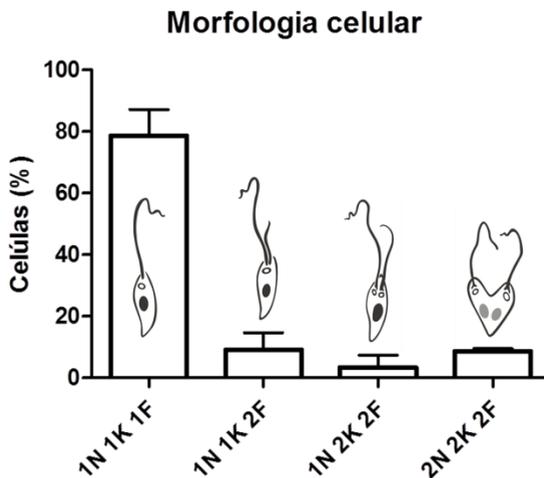


Figura 9. Percentagem de padrões morfológicos em uma cultura de epimastigotas de *Trypanosoma rangeli*. No total, foram analisados 575 parasitos em fase de crescimento exponencial (cerca de 20 horas de cultivo). Os resultados representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes. **N** = Núcleo, **K** = Cinetoplasto, **F** = Flagelo.

Estes padrões representam diferentes fases durante o ciclo celular e, assim, puderam ser utilizados para avaliar a duração de cada uma dessas fases, uma vez que o tempo de geração do *T. rangeli* é constante – isto é, não há reprodução sexuada conhecida – e as culturas utilizadas para a determinação da curva de crescimento e para as imunofluorescências não estavam sincronizadas. Quanto à posição de cada uma das fases no ciclo celular, foi considerada a ordem de eventos previamente estabelecida para *T. cruzi* (ELIAS *et al.*, 2007): células 1N 1K 1F estão em G1/S/G2, células 1N 1K 2F encontram-se na fase G2, células 1N 2K 2F estão em mitose (M) e células 2N 2K 2F estão prestes a sofrer citocinese (C).

Aplicando à equação (1), descrita por Williams (1971), os valores percentuais cumulativos relativos a cada padrão morfológico, foi possível calcular o tempo de duração para cada uma das fases do ciclo celular do parasito. Assim, o tempo médio de duração estimado para as fases G1/S /G2 do ciclo celular do *T. rangeli* foi de 21,92 horas, das quais 2,88 horas compõem a fase G2, e para as fases M e C foi de 1,13 horas e 3,15 horas, respectivamente. A soma destes valores totaliza 26,2 horas, completando um ciclo de divisão celular do *T. rangeli*.

Uma vez que apenas pela morfologia da célula não é possível separar parasitos na fase G1 daqueles que estão em fase S, tampouco definir toda a extensão da fase G2, foi necessário utilizar uma metodologia capaz de diferenciá-los. Para tanto se utilizou bromodeoxiuridina (BrdU), um análogo de timidina que é incorporado ao DNA em síntese e passível de detecção por imunofluorescência. Epimastigotas em fase exponencial de crescimento foram cultivados em meio contendo BrdU por diferentes tempos (1 hora a 24 horas) e a marcação das células foi avaliada por imunofluorescência (**Figura 10**). É importante ressaltar que o cultivo com BrdU não interferiu na curva de crescimento dos parasitos.

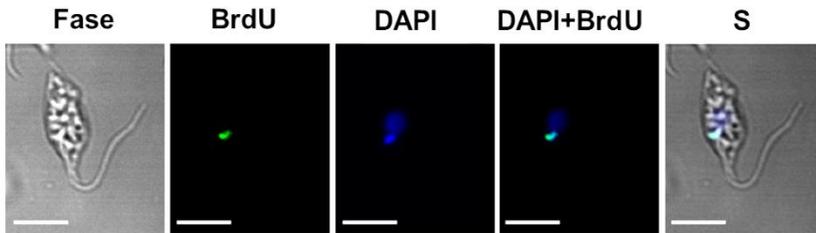


Figura 10. Detecção de bromodeoxiuridina (BrdU) incorporada ao DNA em síntese de *Trypanosoma rangeli*. As imagens foram obtidas por microscopia confocal. **Fase:** contraste de fase; **BrdU:** marcação com anticorpo monoclonal anti-BrdU (Molecular Probes); **DAPI:** marcação do DNA nuclear e do kDNA; **S:** sobreposição das imagens. As barras em branco representam 5 μm .

Ao se incorporar ao DNA recém-sintetizado, a BrdU permite a detecção de células em fase S. No caso dos tripanosomatídeos em que há duas fases S, uma para o DNA nuclear e outra para o kDNA, a marcação por BrdU possibilitaria a distinção entre ambas. No entanto, ainda que o período de interação com o anticorpo anti-BrdU tenha sido longo, nenhuma marcação forte pôde ser observada no núcleo dos

parasitos, de forma que, teoricamente, apenas a fase S do kDNA poderia ser analisada. Por outro lado, nas poucas vezes em que foi detectado um fraco sinal no núcleo, o cinetoplasto também se apresentou marcado, sugerindo que as duas fases S provavelmente são distinguíveis apenas por um curto período de tempo. Dessa forma, os resultados referentes à marcação no kDNA foram utilizados para uma estimativa aproximada da duração da fase S em *T. rangeli*.

Contudo, antes de estimar a duração da fase S foi necessário determinar a extensão completa da fase G2. A análise dos padrões morfológicos havia permitido calcular um tempo de pelo menos 2,88 horas para esta fase, onde se encontram parasitos 1N 1K 2F. Para calcular o tempo decorrido entre o final da fase S e a duplicação do flagelo, então, analisou-se o menor tempo necessário para que células com dois flagelos aparecessem marcadas com BrdU. Uma vez que estas células foram observadas logo após 1 hora de exposição à BrdU, é possível inferir que a duração total da fase G2 é de 3,88 horas. Sendo assim, as fases iniciais G1/S têm duração conjunta de 18,04 horas – isto é, quase 70% da duração de todo o ciclo celular. É interessante notar que células 2N 2K 2F marcadas com BrdU também puderam ser observadas nas primeiras horas de exposição ao análogo de timidina, levantando a hipótese de que os parasitos podem ingressar em um novo ciclo celular mesmo antes de completar a citocinese.

Conhecendo a duração das fases G2, M e C, além do tempo de exposição à BrdU, a partir da proporção de células marcadas foi possível calcular a duração da fase S utilizando a equação (2) de Stanners e Till (1960), seção 3.2.6. Diferentes tempos de exposição entre 1 hora e 8 horas, com suas respectivas percentagens de células marcadas, foram utilizados para estimar a duração da fase S, totalizando 600 células analisadas. O intervalo de 1-8 horas de exposição foi escolhido por ter apresentado uma proporção semelhante de células marcadas ao longo de diferentes experimentos; períodos mais longos de incorporação com BrdU contaram com grande variabilidade na razão entre células marcadas e não marcadas.

Assim, a duração da fase S da cepa Choachí de *T. rangeli* foi estimada em $6,13 \pm 0,65$ horas. As $11,91 \pm 0,65$ horas restantes, portanto, pertencem à fase G1. Com estes resultados, os quais se encontram resumidos na **Tabela 2**, a duração de cada fase do ciclo celular de *T. rangeli* pôde ser estimada.

Tabela 2. Duração de cada fase do ciclo celular de *Trypanosoma rangeli*. Os cálculos foram realizados de acordo com as equações (1) e (2). Tempo total de duplicação = 26,2 horas.

Fase	Padrão morfológico	Proporção do ciclo celular	Horas
G1	1N 1K 1F	46%	11,91
S	1N 1K 1F	23%	6,13
G2	1N 1K 2F	15%	3,88
Mitose	1N 2K 2F	4%	1,13
Citocinese	2N 2K 2F	12%	3,15

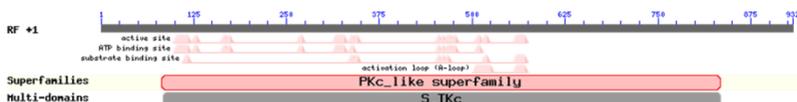
4.2 Marcadores moleculares da citocinese em *Trypanosoma rangeli*

4.2.1 Análise *in silico*

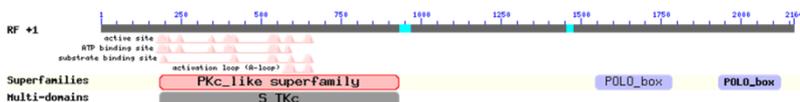
Os genes codificadores para as proteínas Aurora quinase 1 (AUK1), Polo-*like* quinase (PLK), *Mps One Binder* 1 (MOB1) e Receptor para C-quinase Ativada de Tripanosomatídeos (TRACK) foram inicialmente buscados via *blast* no banco de dados do Projeto Genoma do *T. rangeli*. Uma vez obtida a sequência da janela de leitura de cada gene, sua sequência aminoacídica foi predita e utilizada para a busca de domínios e comparação com as proteínas em outros tripanosomatídeos através da ferramenta *blastp* do programa BLAST, disponível no GenBank. Além disso, o programa *MotifScan* foi utilizado para predizer sítios para modificações pós-traducionais.

As imagens geradas pelo próprio GenBank, indicando os domínios de cada proteína, encontram-se reunidas na **Figura 11**.

Aurora quinase 1



Polo-like quinase



MOB1



TRACK

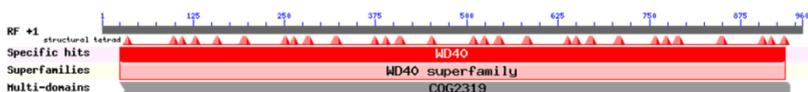


Figura 11. Domínios das proteínas Aurora quinase 1 (*TrAUK1*), Polo-like quinase (*TrPLK*), MOB1 e TRACK de *Trypanosoma rangeli*. Imagens geradas pela ferramenta *blastp* do programa BLAST do GenBank. *RF* = orientação da janela de leitura; *Superfamilies* = superfamílias; *Multi-domains* = domínios múltiplos; *Specific hits* = motivos específicos. Os domínios descritos nas imagens são: **PKc_like superfamily** = domínio catalítico de proteína quinase; **S_TKc** = domínio catalítico de serina/treonina quinase; **POLO_box** = domínio característico de Polo-like quinases; **Mob1_phocein** = domínio característico de proteínas MOB1; **WD40/ WD40 superfamily** = dipeptídeo WD (triptofano/aspartato) repetido 40 vezes; **COG2319** = outra nomenclatura para a repetição WD40. Fonte: GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank).

A proteína *TrAUK1* apresenta tamanho aproximado de 35 kDa e identidade de 90% com a *AUK1* de *T. cruzi* (GenBank: XM_809753.1) e de 82% com a de *T. brucei* (GenBank: CBH17821.1). Os domínios encontrados nesta proteína através de *blastp* correspondem à sequência catalítica de proteínas serina/treonina quinases. De acordo com as análises realizadas pelo programa *MotifScan*, *TrAUK1* apresenta previstos em sua sequência aminoacídica 11 sítios para fosforilações, quatro sítios para miristoilações e um sítio para amididação.

TrPLK, aparentemente a proteína mais distinta em relação a suas homólogas nos demais tripanosomatídeos, tem identidade de apenas 78% com a *TcPLK* de *T. cruzi* (GenBank: XP_816295.1) e de 61% com a *TbPLK* de *T. brucei* (GenBank: CAA74301.1). Entretanto, com seus aproximados 82 kDa, a *TrPLK* também apresenta dois motivos Polo-*box* característicos de sua família, bem como o domínio catalítico de serina/treonina quinase. Quanto a possíveis modificações pós-traducionais, *TrPLK* apresenta seis sítios para glicosilações e miristoilações, além de 24 sítios para fosforilações.

Por sua vez, a *MOB1* de *T. rangeli* apresenta os mais altos valores de identidade com suas homólogas em *T. cruzi* (GenBank: XP_819607.1) e *T. brucei* (GenBank: XP_846181.1): 96% e 93%, respectivamente. Esta proteína é também a menor, com cerca de 27 kDa. O domínio característico de proteínas *MOB1* foi encontrado, embora detalhes a seu respeito ainda não estejam bem estabelecidos. Seis sítios para fosforilações, bem como um sítio para miristoilação e para glicosilação, foram encontradas em sua sequência aminoácídica deduzida.

Por fim, a *TRACK* de *T. rangeli* é 93% idêntica à *TRACK* de *T. cruzi* (GenBank: XP_817733.1) e 86% à de *T. brucei* (GenBank: XP_829201.1), tendo tamanho aproximado de 35 kDa. Além disso, o domínio *WD-repeat* de receptores para C-quinase ativada está presente em sua sequência aminoácídica deduzida, bem como estão previstos 11 sítios para fosforilações, cinco sítios para miristoilações e um sítio para glicosilação.

Uma vez confirmadas como proteínas do ciclo celular homólogas àquelas já descritas em outros tripanosomatídeos, as janelas de leitura dos genes *AUK1*, *PLK*, *MOB1* e *TRACK* de *T. rangeli* foram utilizadas para a busca de iniciadores para PCR quantitativa em tempo real (qPCR). A quantificação relativa de transcritos por qPCR requer a comparação com genes de referência, isto é, genes cujos níveis de transcrição se mantenham estáveis entre diferentes tratamentos e estágios no ciclo de vida. Como não há apenas um gene de referência universal, especialmente no caso de tripanosomatídeos, iniciadores para qPCR foram escolhidos em três possíveis genes de referência comumente descritos na literatura: *GAPDH*, referente à proteína gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; *HGPRT*, referente à hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase; e *RNA60S*, codificante para a subunidade ribossomal 60S. As sequências destes genes também foram obtidas no banco de dados do Projeto Genoma do *T. rangeli*.

Os iniciadores escolhidos, descritos na **Tabela 1**, são seqüências de 20 nucleotídeos em regiões próximas à extremidade 3' de cada janela de leitura, devido ao sentido de polimerização da enzima transcriptase reversa. Com o intuito de realizar simultaneamente as reações com os genes-alvo e os genes de referência, a temperatura de ligação de todos os iniciadores foi aproximada em 60°C.

4.2.2 Validação dos iniciadores para qPCR

Os iniciadores foram inicialmente testados a partir de uma PCR convencional utilizando como molde o DNA genômico da cepa Choachí de *T. rangeli*, e fragmentos no tamanho esperado foram obtidos para todos os genes (**Figura 12**). Embora fragmentos inespecíficos acima de 300 pb possam ser observados para os genes de Aurora quinase 1 e Polo-like quinase, estes são considerados produtos grandes demais para uma amplificação adequada por qPCR e, portanto, dificilmente interferem nos resultados. Diante disto e da ausência de dímeros, os iniciadores foram considerados apropriados para a utilização em reações de qPCR.

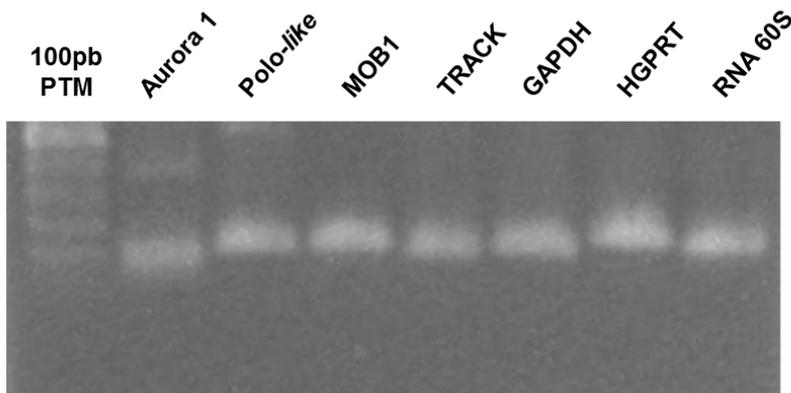


Figura 12. Amplificação dos fragmentos dos genes codificadores para Aurora quinase 1, Polo-like quinase, MOB1, TRACK, GAPDH, HGPRT e RNA60S. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado por brometo de etídio revelando os produtos de amplificação dos fragmentos gênicos de *Aurora 1* (88pb), *Polo-like* (111pb), *MOB1*(112pb), *TRACK* (83pb), *GAPDH* (102pb), *HGPRT* (137pb) e *RNA60S* (113pb). 100pb **PTM** = Padrão de Tamanho Molecular com intervalos de 100 pares de bases (Promega).

Com o objetivo de verificar a identidade dos fragmentos amplificados dos genes codificadores para Aurora quinase 1, Polo-like quinase, MOB1 e TRACK, estes foram clonados no vetor *pGEM-T easy*[®], transformados em células *Escherichia coli* e, então, sequenciados. O sequenciamento confirmou que os fragmentos de fato pertencem a estes genes associados ao ciclo celular de tripanosomatídeos. Além disso, a análise por *blastx* revelou que os fragmentos dos genes de Aurora quinase 1 e de MOB1, embora compostos por poucos pares de bases, já permitem o reconhecimento dos domínios característicos de proteína quinase e de proteína MOB1, respectivamente.

O passo seguinte consistiu na validação dos iniciadores para as análises por qPCR, tanto para os genes-alvo (*AUK1*, *PLK*, *MOB1* e *TRACK*) quanto para os genes de referência (*GAPDH*, *HGPRT* e *RNA60S*). Para tanto, foram montadas reações com cinco pontos de diluição seriada 1:2 do DNA genômico, bem como de misturas de cDNA, da cepa Choachí de *T. rangeli*. Para cada um dos sete genes, o C_q (ciclo de quantificação) de cada ponto na curva em função de sua diluição gerou uma reta, cuja inclinação foi aplicada à equação (3) (seção 3.4.4) para obtenção do valor de eficiência da reação. Assim, a eficiência média da qPCR com cada par de iniciadores foi calculada em aproximadamente 97% para *AUK1*, 94% para *PLK*, 97% para *MOB1*, 96% para *TRACK*, 99% para *GAPDH*, 95% para *HGPRT* e 96% para *RNA60S*.

Embora o cálculo de quantificação relativa (QR) expresso na equação (6) (seção 3.4.5) considere uma eficiência de 100% para as reações, ele pode ser aplicado para reações onde as eficiências são próximas a 100%. Além disso, este cálculo exige eficiências semelhantes – com no máximo 10 pontos percentuais de diferença – entre os pares de iniciadores dos genes-alvo e dos genes de referência. Considerando que os resultados obtidos para os iniciadores dos genes deste estudo estão em consonância com os requerimentos para aplicação da equação (6), este foi o método utilizado para todas as análises por qPCR.

Cada ensaio de qPCR deve contar com a presença de um controle negativo para cada par de iniciadores, onde são acrescentados todos os reagentes necessários à reação, exceto o cDNA molde. Nas reações descritas neste estudo, em nenhum momento detectou-se amplificação de DNA nos controles negativos. Particularmente quando o sistema de detecção da qPCR é por agentes ligantes de DNA – neste caso, *SYBR Green* –, outro passo importante para a certificação de que não há

contaminação com produtos inespecíficos é a observação da curva de dissociação. Incluída como etapa final na qPCR, esta curva avalia a temperatura em que se dissociam os fragmentos de DNA dupla fita presentes na reação. A representação da curva de dissociação é um gráfico, onde cada pico indica uma temperatura onde houve dissociação de DNA. As curvas de dissociação para todas as análises aqui descritas apresentaram apenas um pico, em temperaturas próximas a 80°C, confirmando a ausência de dímeros e de outros produtos inespecíficos.

Em vista disso, os ensaios de qPCR possibilitaram avaliar os níveis de transcritos de todos os genes selecionados como marcadores moleculares da citocinese em tripanosomatídeos, bem como dos genes de referência. Complementando os resultados obtidos na qPCR, a avaliação do conteúdo de DNA dos parasitos por citometria de fluxo permitiu situá-los nas diferentes fases do ciclo celular – G1, S e G2/M/C. Assim, a análise de cada marcador da citocinese foi respaldada por componentes moleculares e morfológicos, tanto nas diferentes formas biológicas como nos diferentes estágios durante o ciclo celular *in vitro* do *T. rangeli*.

4.3 Epimastigotas

A hidroxiureia (HU) é utilizada para a sincronização de células devido à sua capacidade de inibir a enzima ribonucleotídeo redutase, responsável pela síntese de desoxirribonucleotídeos. Dessa forma, epimastigotas de *T. rangeli* tratados com HU são impedidos de replicar o DNA a partir do momento em que ingressariam na fase S. Uma vez liberados da HU, retomam o ciclo celular em sincronia a partir desta fase.

Inicialmente, o tratamento de epimastigotas com HU foi realizado apenas para estancar o processo de divisão celular, visando sua comparação com epimastigotas não tratados em fase exponencial de crescimento. Com isso, o comportamento de cada marcador molecular pôde ser avaliado entre formas incapacitadas de se dividir e formas com altas taxas de divisão celular.

Antes de realizar os ensaios de qPCR, todavia, a eficiência da sincronização com HU foi certificada através da contagem de parasitos na cultura tratada após 24 horas de exposição ao composto e comparação com cultura controle, sendo que em geral a cultura controle contou com aproximadamente o dobro de parasitos – ainda que ambas

tenham partido do mesmo número inicial de parasitos. Além disso, os parasitos tratados e não tratados com HU foram analisados quanto ao seu conteúdo de DNA por citometria de fluxo (**Figura 13**). Com o intuito de calibrar o citômetro de fluxo e delimitar as zonas de análise (*gates*) para o estudo das formas epimastigotas de *T. rangeli*, primeiramente foram analisados parasitos vivos (**Figura 13A**) e fixados com metanol 50% (**Figura 13B**). Os gráficos representam a granulosidade da célula em função de seu tamanho, referidos respectivamente por SSC (do inglês *Side Scatter*) e FSC (do inglês *Forward Scatter*).

A seguir, foram analisadas as amostras de parasitos tratados e não tratados com HU, ambos marcados com iodeto de propídio. O histograma gerado pelo citômetro de fluxo indica dois picos nítidos para os parasitos em fase exponencial de crescimento (**Figura 13C**), demonstrando que há aproximadamente a mesma quantidade de células em G1 e em G2/M/C – doravante apresentadas apenas como G2. Entre os dois picos há um intervalo que representa os parasitos em fase S, apresentando quantidades intermediárias de conteúdo de DNA. Por outro lado, uma vez que os parasitos tratados com HU são impedidos de continuar o ciclo celular a partir da fase S, o pico referente à fase G1 é muito mais pronunciado que o pico referente à fase G2 (**Figura 13D**). Mais precisamente, 76,5% das células se encontram em G1, enquanto apenas 21,7% estão em G2 – os 1,8% restantes estão na fase S. Estes resultados confirmam a eficiência do tratamento com HU em reduzir drasticamente o número de células em divisão.

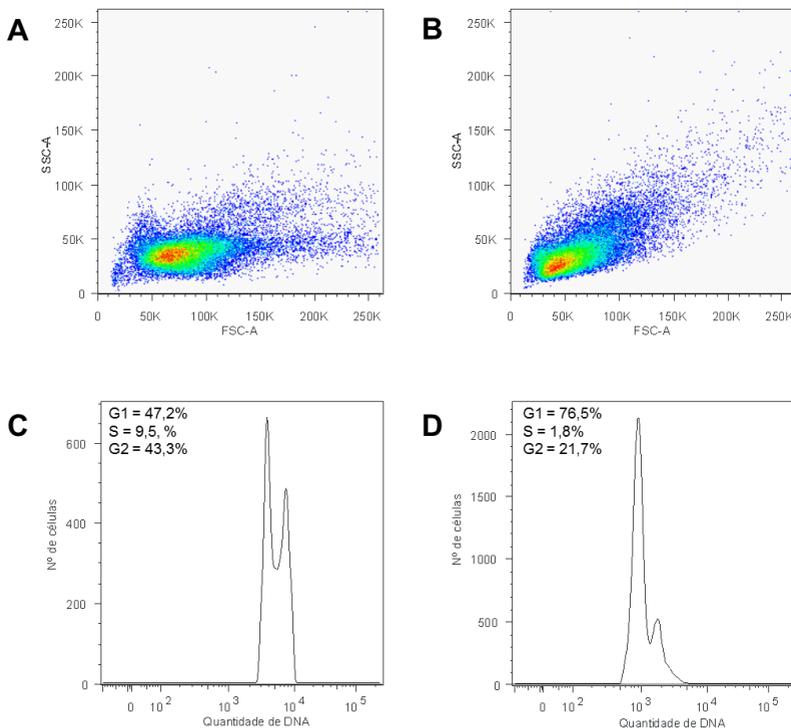


Figura 13. Comparação entre formas epimastigotas de *Trypanosoma rangeli* tratadas e não tratadas com hidroxiureia (HU) quanto ao conteúdo de DNA. Imagens resultantes da análise por citometria de fluxo. Os gráficos superiores representam a granulose das células em função do tamanho em parasitos vivos (A) e fixados com metanol (B). Os histogramas apresentam o número de células em função do conteúdo de DNA, marcado com iodeto de propídio, em parasitos em fase exponencial de crescimento (C) e epimastigotas tratados com HU (D). SSC = Side Scatter, FSC = Forward Scatter, PerCP-CyTM5.5 = filtro para detecção de emissão em 482 nm.

Dessa forma, epimastigotas tratados com HU foram comparados a epimastigotas em fase exponencial de crescimento quanto aos níveis de transcritos para as proteínas associadas ao ciclo celular – Aurora quinase 1, Polo-like quinase, MOB1 e TRACK (Figura 14).

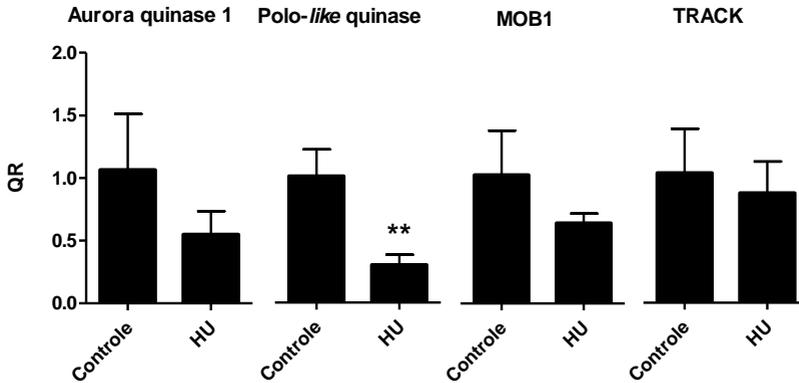


Figura 14. Níveis de transcritos de Aurora quinase 1, Polo-like quinase, MOB1 e TRACK em formas epimastigotas de *Trypanosoma rangeli* tratadas e não tratadas com hidroxiureia (HU). Quantificação relativa realizada utilizando como genes de referência *GAPDH* e *RNA60S*. Os resultados foram obtidos por ensaios de qPCR e representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, realizados em duplicata. O sinal ** indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$), teste *t* de Student não-pareado. **Controle** = epimastigotas em fase exponencial de crescimento, **HU** = epimastigotas tratados com HU. **QR** = Quantificação Relativa.

Há uma redução nos níveis de transcritos de todos os genes nos parasitos sincronizados com HU, sendo significativa ($p < 0,01$) a observada para o gene para Polo-like quinase. Embora não tenham apresentado significância estatística pelo teste *t* de Student, devido ao alto desvio padrão obtido para os controles, a diminuição nos níveis de Aurora quinase 1 e MOB1 também deve ser observada. Por outro lado, os níveis de TRACK nas duas condições estudadas sugerem que sua transcrição não sofreu alterações.

Estes resultados incentivaram a investigação da variação dos níveis de transcritos destes marcadores moleculares ao longo do crescimento de *T. rangeli* em cultura. Para tanto, epimastigotas sincronizados com HU foram liberados para um meio livre deste composto e retirados após diferentes tempos: 2 horas e 30 minutos, 5 horas, 7 horas e 30 minutos, 10 horas, 12 horas, 15 horas, 19 horas e 23 horas. Embora estes parasitos estivessem sincronizados e, portanto, sejam diferentes de uma cultura assíncrona, os tempos após liberação da HU foram escolhidos de acordo com os cálculos preliminares para a

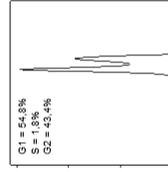
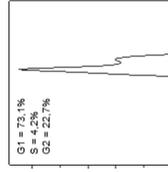
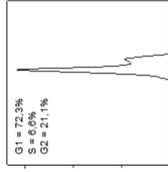
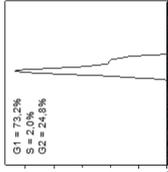
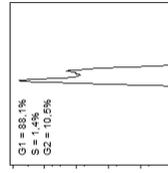
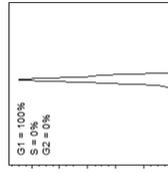
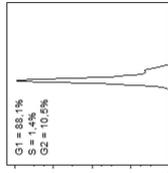
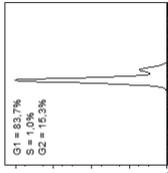
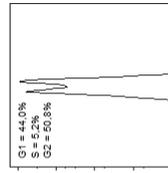
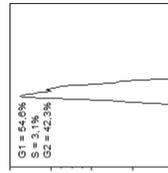
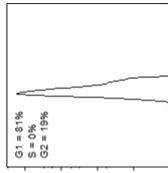
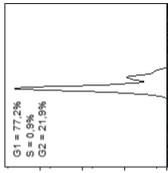
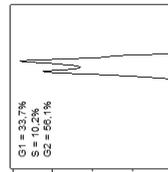
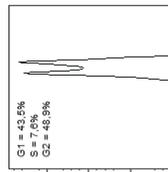
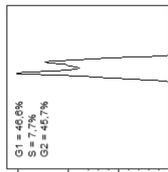
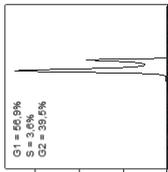
duração de cada estágio do ciclo celular de *T. rangeli*. Assim, considerando que os parasitos liberados da HU ingressem no ciclo celular a partir da fase S, aqueles retirados nos tempos 2h30, 5h e 7h30 deveriam estar ainda nesta fase. Os parasitos retirados após 10 horas da liberação da HU deveriam estar em fase G2 e, após 12 horas, na transição G2/M. Por fim, o tempo de 15h conteria células concluindo a citocinese, isto é, na fase C. Os pontos de 19h e 23h foram acrescentados como margem de erro para o cálculo da duração de cada fase, bem como para a detecção de parasitos novamente em fase G1.

Os parasitos coletados em cada tempo após a liberação da HU foram analisados quanto ao seu conteúdo de DNA através de citometria de fluxo (**Figura 15**), bem como quanto à cinética dos níveis de transcritos para Aurora quinase 1, Polo-like quinase, MOB1 e TRACK (**Figura 16**). Uma vez que foram obtidos a partir das mesmas amostras, os resultados da qPCR corroboram aqueles obtidos através de citometria de fluxo. Uma cultura sem adição de HU foi também retirada nos diferentes tempos e utilizada como controle na citometria de fluxo. Dessa forma, foi possível avaliar a variação nos níveis de cada transcrito de acordo com as alterações no conteúdo de DNA indicando as transições entre as fases do ciclo celular. Três experimentos independentes foram conduzidos utilizando duplicatas técnicas, sendo denominados doravante de I, II e III por motivos didáticos.

Figura 15. Progressão do ciclo celular sincronizado do *Trypanosoma rangeli* após liberação da hidroxiureia (HU). Os histogramas apresentam o número de células em função do conteúdo de DNA, marcado com iodeto de propídio (filtro PerCP-CyTM5.5). A primeira coluna (Controle) apresenta a progressão do ciclo celular em epimastigotas não tratados com HU, e as colunas I, II e III representam três experimentos independentes onde a progressão do ciclo foi acompanhada após liberação da HU. A percentagem de células em G1, S e G2 foi calculada através de zonas de análise e está indicada em cada histograma.

Controle

2h30

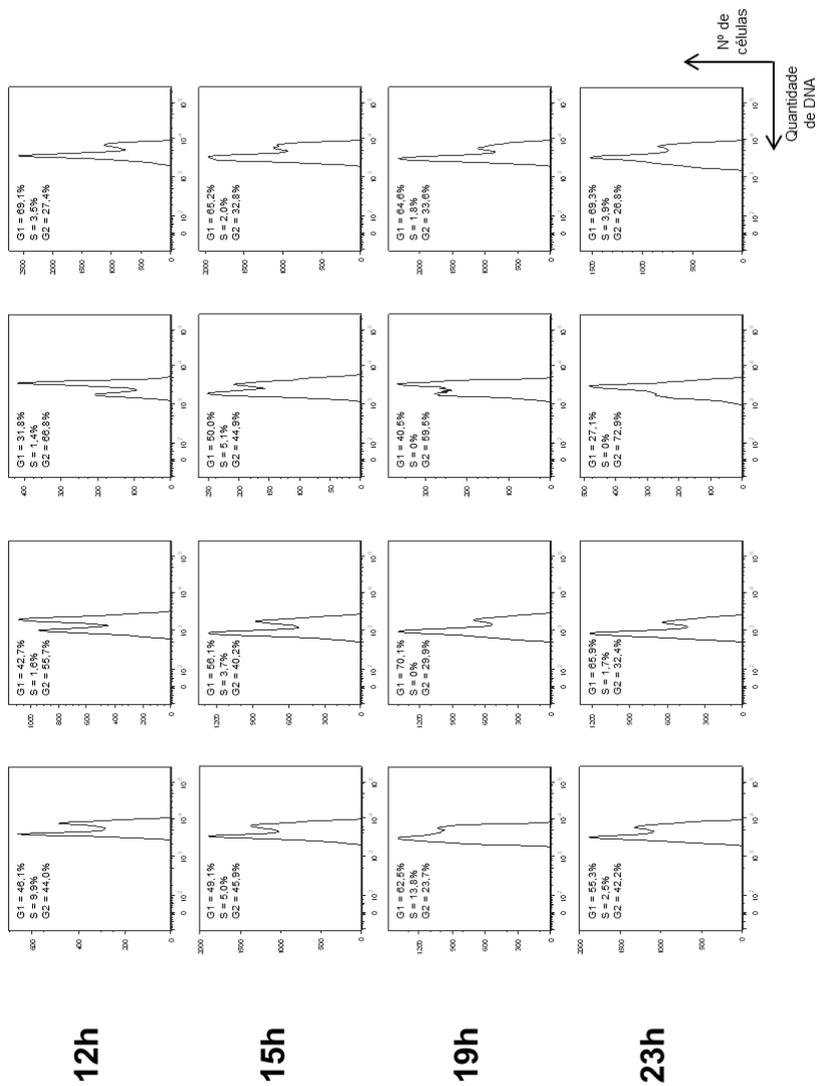


← N° de células
 ← Quantidade de DNA

III

II

I



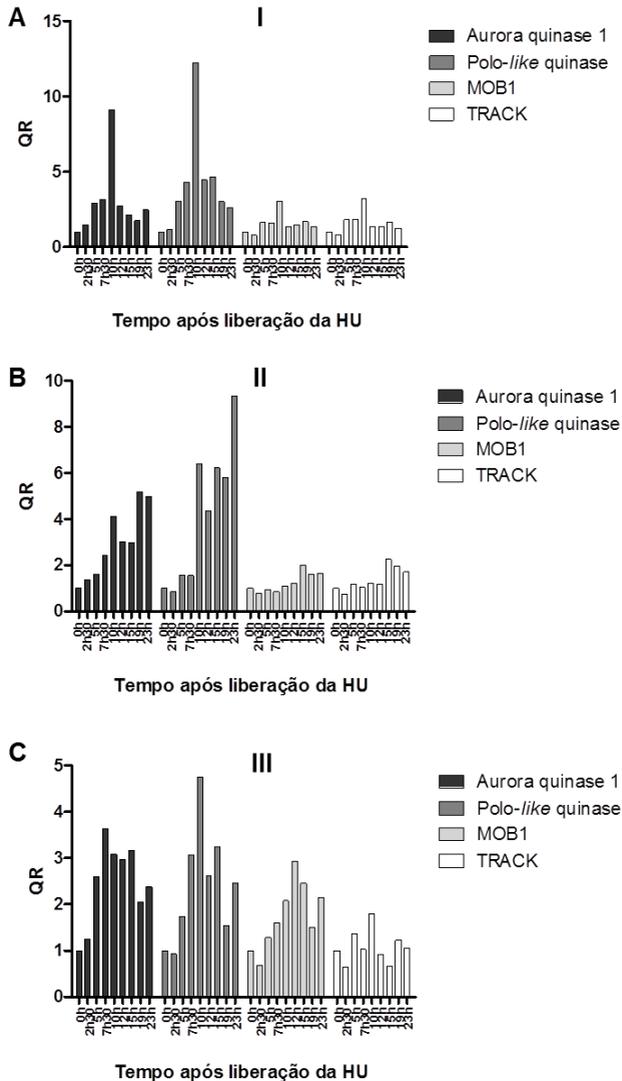


Figura 16. Cinética dos níveis de transcritos de *Aurora quinase 1*, *Polo-like quinase*, *MOB1* e *TRACK* durante o ciclo celular de *Trypanosoma rangeli*. Parasitos sincronizados com hidróxiureia (HU), transferidos para meio de cultura livre deste composto e coletados após diferentes tempos de crescimento. Quantificação relativa realizada utilizando os genes de referência *GAPDH* e *RNA60S*. **A**, experimento I; **B**, experimento II; **C**, experimento III. **QR** = Quantificação Relativa.

No experimento I, os níveis de transcritos de todos os genes apresentaram um pico em 10 horas após a liberação de HU (**Figura 15A**). No caso de Aurora quinase 1 e Polo-*like* quinase, este pico refletiu respectivamente uma quantidade de transcritos cinco e 10 vezes maior do que a quantidade detectada após apenas 2 horas e meia da liberação da HU. Coincidentemente, os resultados da citometria de fluxo apontaram um grande aumento no número de células na fase G2 às 10 horas após a liberação da HU. De fato, o número de células nesta fase aumentou a partir de 10 horas e persistiu até o tempo de 12 horas. A partir das 15 horas, a cultura adquiriu novamente o perfil de uma cultura assíncrona.

Embora durante todo o ciclo as culturas dos três experimentos tenham apresentado um perfil relativamente diferente, foi principalmente a partir de 10 horas que adquiriram um comportamento particular e se distinguiram umas das outras. Duas horas e meia após a liberação da HU os parasitos ainda apresentaram uma quantidade maior de parasitos em fase G1, similarmente aos parasitos retratados na **Figura 13D**. Após 5 horas e 7 horas e meia da liberação da HU apenas um pico foi claramente visível, talvez com um segundo pico pouco destacado. É provavelmente nesse período que ocorre a síntese do DNA da maior parte das células, com quantidades intermediárias de DNA unindo os picos referentes às fases G1 e G2.

No experimento II, um padrão semelhante se estendeu até o tempo de 10 horas, sendo que o pico pronunciado dos parasitos em fase G2 surgiu apenas após 12 horas da liberação da HU. Além disso, uma intrigante característica do experimento II foi o aparecimento de um grande número de células em G2 também nos tempos de 19 horas e 23 horas. Entretanto, é interessante notar como a progressão do ciclo é refletida nos níveis de transcritos dos genes de proteínas associadas à divisão celular, particularmente Polo-*like* quinase (**Figura 15B**). Seus níveis começaram a elevar às 10 horas, mas foram ainda mais altos às 12 horas e assim persistiram até 23 horas, onde se pode notar um aumento de mais de 10 vezes em relação ao primeiro horário após liberação da HU. Os níveis de Aurora quinase 1 também apresentaram certa flutuação, com níveis mais elevados justamente às 12, 19 e 23 horas da liberação da HU. Por outro lado, os níveis de MOB1 e TRACK tiveram uma variação menos pronunciada, apresentando a maior quantidade de transcritos – quase três vezes a quantidade detectada para o primeiro horário – às 15 horas.

Por fim, no experimento III a variação na quantidade de transcritos ao longo do tempo após a liberação da HU foi evidente para

todos os genes avaliados (**Figura 15C**). Curiosamente, no entanto, os aumentos detectados nos níveis dos transcritos não ultrapassaram a marca de cinco vezes; isto é, o maior pico pertence a *Polo-like* quinase no tempo de 10 horas, o qual representa cinco vezes a quantidade de transcritos detectados no primeiro horário. A maior quantidade de transcritos para MOB1 também foi detectada às 10 horas, enquanto que para Aurora quinase 1 e TRACK os mais altos níveis foram observados respectivamente após 7 horas e meia e 12 horas da liberação da HU. Estas elevações pouco pronunciadas nos níveis de transcritos de todos os genes possivelmente estão associadas à relativamente pequena variação no perfil da cultura após os diferentes tempos da liberação da HU. Ao contrário do que foi observado nos experimentos I e II, no experimento III em nenhum momento o pico referente a parasitos em G2 esteve maior que o pico dos parasitos em G1 – no tempo de 10 horas, todavia, aparecem quase equivalentes. Além disso, a partir de 12 horas o perfil é praticamente idêntico até o final do experimento, apontando para uma possível perda de sincronização dos parasitos.

Epimastigotas não sincronizados com HU foram também retirados em diferentes tempos após serem acrescidos de meio de cultura. Os resultados mostram que os parasitos seguem uma multiplicação contínua, uma vez que em todos os histogramas os picos das fases G1 e G2 apresentam-se quase equivalentes. É interessante notar que, também para os parasitos não sincronizados, o tempo de 10 horas pareceu ser o auge de parasitos na fase G2.

De acordo com a curva de crescimento estabelecida para a cepa Choachí de *T. rangeli*, em torno de 60 horas de cultivo a cultura começaria a entrar em fase estacionária. Assim, no intuito de verificar os níveis de transcritos de Aurora quinase 1, *Polo-like* quinase, MOB1 e TRACK em epimastigotas naturalmente com baixas taxas de multiplicação, parasitos com aproximadamente sete dias de cultivo sem troca de meio de cultura foram analisados em comparação com parasitos em fase exponencial de crescimento (**Figura 17**).

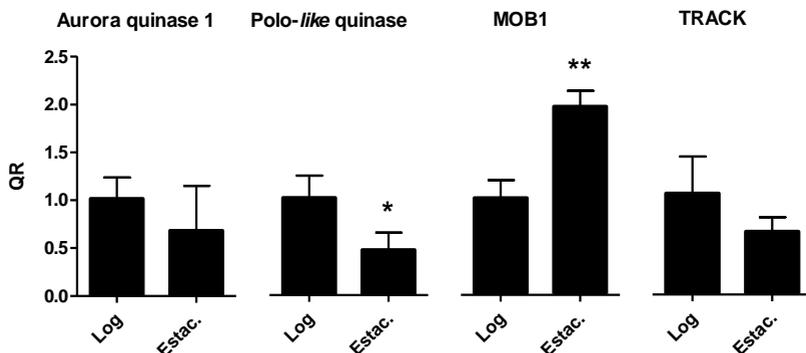


Figura 17. Níveis de transcritos de Aurora quinase 1, Polo-like quinase, MOB1 e TRACK em formas epimastigotas de *Trypanosoma rangeli* em fase de crescimento exponencial (Log) e estacionária (Estac.). Quantificação relativa realizada utilizando os genes de referência *GAPDH*, *HGPRT* e *RNA60S*. Os resultados foram obtidos por ensaios de qPCR e representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, realizados em duplicata. Os sinais * ($p < 0,05$) e ** ($p < 0,01$) indicam diferenças estatisticamente significantes, teste *t* de Student não-pareado. QR = Quantificação Relativa.

Novamente, Polo-like quinase apresentou uma redução significativa ($p < 0,05$) nos níveis de transcritos da fase exponencial de crescimento para a fase estacionária, corroborando os resultados obtidos após tratamento com HU. Da mesma forma, Aurora quinase 1 e TRACK tiveram redução em seus níveis de transcritos quando a taxa de multiplicação celular diminuiu. Por outro lado, MOB1 apresentou níveis significativamente mais altos ($p < 0,01$) nos epimastigotas em fase estacionária. Ainda assim, é interessante notar que para três dos quatro genes se repete o padrão observado em comparação com parasitos tratados com HU, mostrando que a repressão natural da divisão celular também influencia os níveis de transcritos.

4.4 Tripomastigotas de cultura

Evidenciada uma associação entre a progressão do ciclo celular e os níveis de transcritos, particularmente significativa para a Polo-like quinase, o passo seguinte consistiu em comparar formas epimastigotas a tripomastigotas de cultura. Epimastigotas são formas sabidamente proliferativas, ao passo que há fortes indicativos de que tripomastigotas de cultura são incapazes de se dividir.

O processo de diferenciação *in vitro* necessário para obter formas tripomastigotas tem duração de oito dias. A observação de culturas no segundo, quarto, sexto e oitavo dia da diferenciação em relação à quantidade de parasitos em cultura, bem como à razão entre epimastigotas e tripomastigotas, torna evidentes algumas características do processo (**Figura 18**). Nos primeiros dias, a maior parte dos parasitos ainda possui morfologia de epimastigota, isto é, o cinetoplasto anterior ao núcleo. A partir do quarto dia, todavia, a percentagem de tripomastigotas aumenta progressivamente até alcançar aproximadamente 95% do total de parasitos na cultura. Além disso, é também a partir do quarto dia que o crescimento dos parasitos parece estagnar, apontando uma correlação com o aumento na quantidade de tripomastigotas e sugerindo sua incapacidade de realizar divisão *in vitro*.

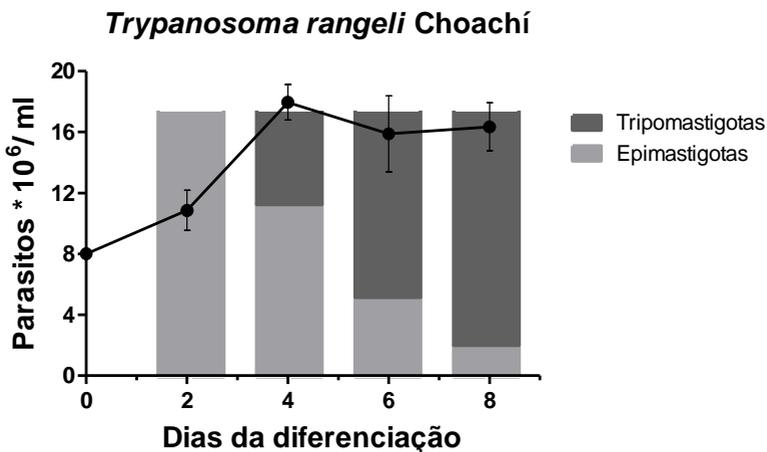


Figura 18. Diferenciação *in vitro* do *Trypanosoma rangeli*. Acompanhamento realizado nos dias 2, 4, 6 e 8 após transferência para meio DMEM de diferenciação. As colunas representam a proporção entre epimastigotas e tripomastigotas em cada dia. Os resultados representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes.

A cinética da diferenciação celular foi avaliada também quanto aos níveis de transcritos para Aurora quinase 1, Polo-like quinase, MOB1 e TRACK (**Figura 19**). É nítida a redução em Aurora quinase 1 e Polo-like quinase a partir do quarto dia da diferenciação, aumentando um pouco no oitavo dia. De fato, a única redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) ocorreu nos níveis de transcritos para Aurora

quinase 1 entre o segundo e o sexto dia da diferenciação. Os níveis de transcritos de TRACK decrescem sutilmente do segundo ao oitavo dia, ao passo que os de MOB1 flutuam ao longo dos quatro dias.

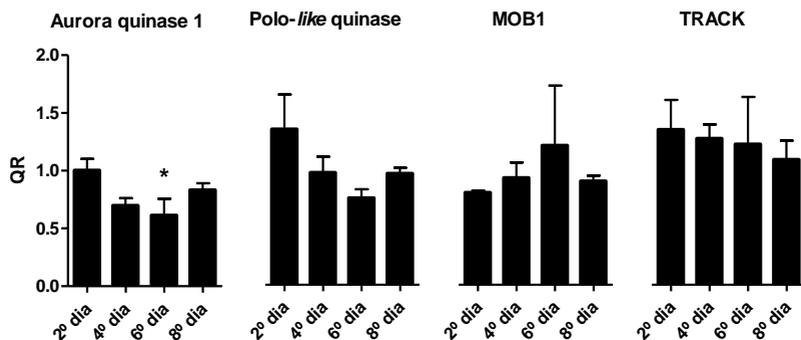


Figura 19. Níveis de transcritos de Aurora quinase 1, Polo-like quinase, MOB1 e TRACK durante a diferenciação celular para formas tripomastigotas de *Trypanosoma rangeli*. Quantificação relativa realizada utilizando os genes de referência *GAPDH*, *HGPRT* e *RNA60S*. Os dias representados indicam o tempo decorrido a partir da transferência dos parasitos para meio DMEM de diferenciação. Os resultados foram obtidos por ensaios de qPCR e representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, realizados em duplicata. O sinal * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), ANOVA de uma via para dados repetidos, seguida do teste de Bonferroni. QR = Quantificação Relativa.

Uma vez que mesmo em culturas do oitavo dia após a diferenciação ainda há uma quantidade relevante de epimastigotas, estes parasitos foram submetidos à purificação em coluna CM-celulose. Após este processo, foram obtidas amostras compostas 99% e 100% por tripomastigotas. As culturas de antes e depois da purificação foram analisadas por citometria de fluxo quanto ao conteúdo de DNA (**Figura 20**).

É interessante notar que o perfil da cultura de tripomastigotas antes da purificação (**Figura 20A**) já se assemelha ao perfil de epimastigotas sincronizados com HU. A pequena proporção de células em fase G2 corrobora os resultados obtidos pela contagem de parasitos, pois indica baixas taxas de divisão celular. Além disso, como esta cultura é composta também por uma pequena proporção de epimastigotas, é possível que estes interfiram no resultado do histograma. Para confirmar esta hipótese, tripomastigotas purificados

em coluna CM-celulose foram também analisados por citometria de fluxo (**Figura 20B**), revelando uma redução quase completa do pico referente aos parasitos em G2. Em conjunto, estes resultados demonstram que se há algum tipo de multiplicação celular em culturas de tripomastigotas, esta deve ocorrer a taxas imperceptíveis pelas metodologias utilizadas.

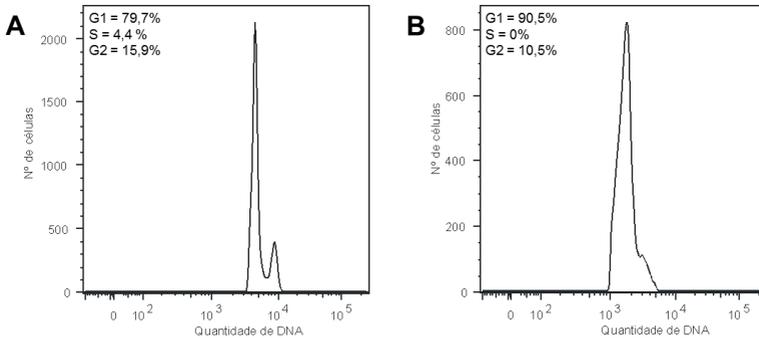


Figura 20. Comparação entre tripomastigotas de cultura de *Trypanosoma rangeli*. Os histogramas apresentam o número de células em função do conteúdo de DNA, marcado com iodeto de propídio (filtro PerCP-CyTM5.5). **A**, tripomastigotas obtidos no oitavo dia de diferenciação *in vitro*; **B**, tripomastigotas de oitavo dia purificados em coluna CM-celulose.

Os tripomastigotas purificados em coluna CM-celulose foram então comparados a epimastigotas em fase exponencial de crescimento quanto aos níveis de transcritos para Aurora quinase 1, Polo-*like* quinase, MOB1 e TRACK (**Figura 21**). Tanto Aurora quinase 1 como Polo-*like* quinase tiveram seus níveis de transcritos reduzidos significativamente ($p < 0,01$) nas formas tripomastigotas purificadas. Os transcritos para TRACK também sofreram uma diminuição, enquanto aqueles para MOB1 aumentaram.

A essa altura, é possível observar que os transcritos para Aurora quinase 1 e para Polo-*like* quinase sofrem notáveis variações conforme as taxas de multiplicação de *T. rangeli*. Os transcritos para Polo-*like* quinase, especialmente, têm alta abundância relativa em parasitos em crescimento exponencial, decaindo significativamente em parasitos onde a proliferação celular é reduzida ou considerada ausente.

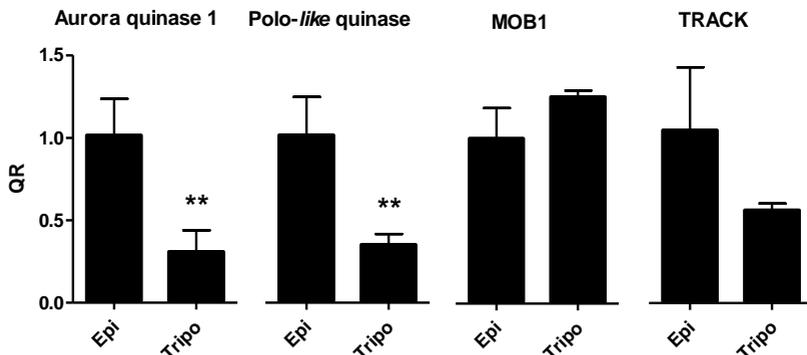


Figura 21. Níveis de transcritos de Aurora quinase 1, Polo-like quinase, MOB1 e TRACK em epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma rangeli*. Quantificação relativa realizada utilizando os genes de referência *GAPDH*, *HGPRT* e *RNA60S*. Os resultados foram obtidos por ensaios de qPCR e representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, realizados em duplicata. O sinal ** indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$), teste *t* de Student não-pareado. **Epi** = epimastigotas em fase exponencial de crescimento, **Tripo** = tripomastigotas purificados em colona CM-celulose. **QR** = Quantificação Relativa.

Uma vez que os níveis de transcritos não refletem diretamente a quantidade de proteínas, decidiu-se investigar a variação de Polo-like quinase entre as diferentes formas do *T. rangeli* também em níveis protéicos. Para tanto, foi utilizado um soro policlonal purificado por afinidade dirigido à Polo-like quinase de *T. brucei*, *TbPLK*, gentilmente concedido pelo Dr. Chris de Graffenried (Universidade de Viena). Considerando que a identidade protéica entre *TbPLK* e *TrPLK* é de 61%, o reconhecimento de *TrPLK* em ensaios de imunofluorescência e/ou *Western blot* utilizando-se um soro policlonal anti-*TbPLK* poderia ser esperado. Assim, inicialmente a expressão da *TrPLK* de *T. rangeli* foi comparada entre formas epimastigotas e tripomastigotas (**Figura 22**).

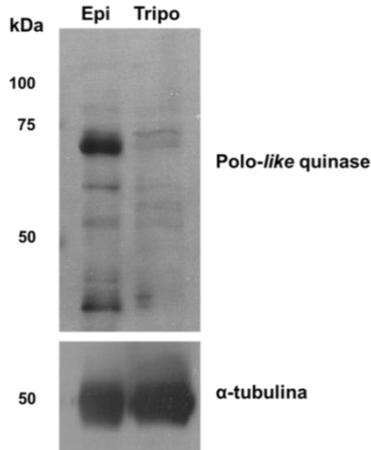


Figura 22. Avaliação da expressão de Polo-like quinase em extratos protéicos de epimastigotas (Epi) e tripomastigotas (Tripo) de *Trypanosoma rangeli*. Resultado obtido por *Western blot*, utilizando o soro policlonal anti-*TbPLK* purificado por afinidade. Padrão de tamanho molecular: *Protein Precision Plus Dual Color* (Bio-Rad). A normalização da quantidade de proteína foi realizada através da detecção de α -tubulina (parte inferior da figura).

Ainda que o soro policlonal dirigido à *TbPLK* tenha reconhecido algumas bandas nos extratos protéicos de *T. rangeli*, o sinal mais forte foi detectado na altura de 70 kDa apenas no extrato de epimastigotas. Considerando o tamanho aproximado de 82 kDa predito para a *TrPLK*, a proteína mais pesada detectada ainda é cerca de 10 kDa menor. Mesmo assim, é interessante notar que esta proteína de 70 kDa não é reconhecida no extrato de formas tripomastigotas de *T. rangeli*. Considerando que a proteína de 70 kDa seja *TrPLK*, então estes resultados seguem o padrão daqueles obtidos por qPCR para seus níveis de transcrito, sugerindo que a expressão de Polo-like quinase é maior em epimastigotas.

No intuito de estender a investigação da expressão de *TrPLK* entre as diferentes formas do *T. rangeli*, seu reconhecimento pelo anticorpo anti-*TbPLK* foi avaliado também em extratos protéicos de parasitos em diferenciação (segundo, quarto, sexto e oitavo dias), em epimastigotas tratados e não tratados com HU e em tripomastigotas purificados por coluna CM-celulose (**Figura 23**).

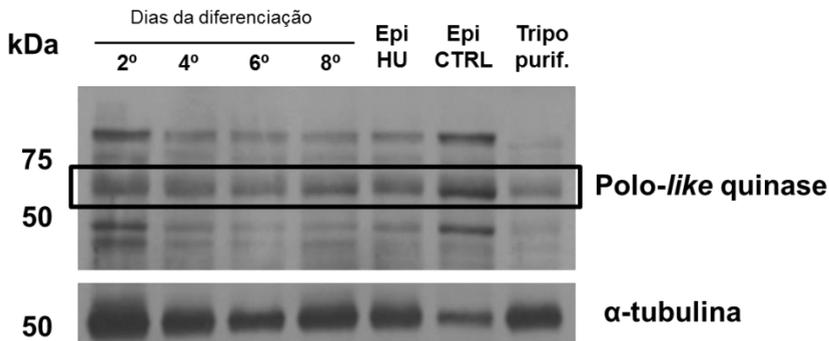


Figura 23. Avaliação da expressão de Polo-like quinase em extratos protéicos de diferentes formas do *Trypanosoma rangeli*. Resultado obtido por *Western blot*, utilizando o soro policlonal anti-*TbPLK* purificado por afinidade. **Dias da diferenciação** = parasitos no segundo, quarto, sexto e oitavo dias após transferência para meio DMEM, **Epi HU** = formas epimastigotas tratadas com hidroxioureia (HU), **Epi CTRL** = formas epimastigotas controle não tratadas com HU, **Tripo purif.** = tripomastigotas purificados por coluna CM-celulose. Padrão de tamanho molecular: *Protein Precision Plus Dual Color* (Bio-Rad). A normalização da quantidade de proteína foi realizada através da detecção de α -tubulina (parte inferior da figura).

Embora tenha havido bastante variação na quantidade de proteínas aplicadas para cada amostra no gel conforme revelado pela detecção de α -tubulina, é possível notar que apenas nas formas epimastigotas não tratadas com HU a banda de aproximadamente 70 kDa foi detectada com forte intensidade. Nas demais formas, um vestígio desta banda pode ser igualmente observado. Curiosamente, este *Western blot* em particular revelou a detecção de uma proteína maior que 75 kDa (possivelmente na faixa de 80 kDa), com maior intensidade nos extratos de epimastigotas não tratados com HU e nos parasitos do segundo dia da diferenciação. Esta proteína, entretanto, não foi detectada em outros ensaios. Assim, considerando apenas a proteína de cerca de 70 kDa, a qual foi reconhecida em todos os *Western blot* realizados com o soro anti-*TbPLK*, estes resultados complementam os dados obtidos por qPCR.

Ensaio de imunofluorescência também foram conduzidos utilizando-se o soro anti-*TbPLK*, mas infelizmente nenhum sinal foi detectado após numerosas tentativas utilizando diferentes metodologias e diluições do anticorpo. Da mesma forma, uma análise por espectrometria de massas da região do gel de poliacrilamida onde a

banda foi detectada por *Western blot* não foi sensível o suficiente para detectar quaisquer proteínas ali presentes. Estes resultados reforçam a necessidade de maiores estudos utilizando, por exemplo, anticorpos monoclonais dirigidos à PLK de *T. rangeli*.

Apesar disso, é notável que haja o forte reconhecimento de uma proteína no extrato de *T. rangeli* pelo soro anti-TbPLK em consonância com os dados de qPCR obtidos para os níveis de transcrito para Polo-like quinase. Se a proteína detectada por *Western blot* for confirmada como sendo a Polo-like quinase de *T. rangeli*, então a qPCR se comprova como uma valorosa ferramenta para investigar esta proteína.

4.5 Tripomastigotas sanguíneos

Por fim, embora o foco deste trabalho tenha sido o estudo de marcadores moleculares da citocinese em parasitos cultivados *in vitro*, ensaios preliminares com parasitos *in vivo* foram realizados como forma de validação das metodologias relatadas para o estudo do ciclo do *T. rangeli* em seu hospedeiro mamífero. Para tanto, tripomastigotas sanguíneos foram obtidos no segundo, no quinto e no sétimo dia após a inoculação de parasitos em camundongos BALB/c. A parasitemia nestes dias foi, respectivamente, $1,7 \times 10^6$ parasitos, $6,4 \times 10^5$ parasitos e 1×10^5 parasitos por ml, indicando a fase aguda de infecção.

Quando analisados por citometria de fluxo, os tripomastigotas sanguíneos do quinto dia e do sétimo dia após a infecção revelaram apenas um pico, possivelmente referente a parasitos na fase G1 (**Figura 24**).

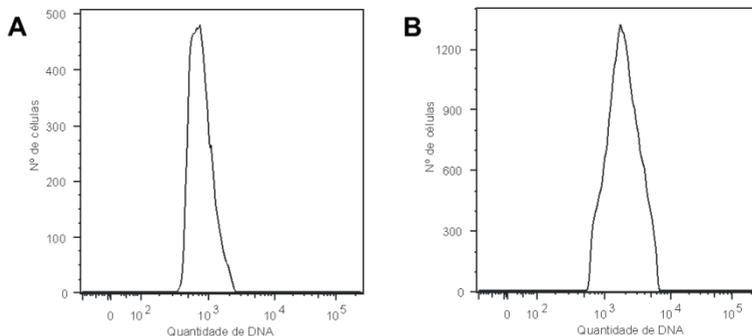


Figura 24. Análise de tripomastigotas sanguíneos de *Trypanosoma rangeli* por citometria de fluxo. Os histogramas apresentam o número de células em função do conteúdo de DNA, marcado com iodeto de propídio (filtro PerCP-Cy™5.5). **A**, parasitos coletados no quinto dia após infecção (d.p.i.) de camundongos BALB/c; **B**, parasitos coletados no sétimo d.p.i.

Apesar de o iodeto de propídio marcar qualquer tipo de DNA, o processo de coleta destes parasitos foi conduzido de forma a reduzir a contaminação por células do sangue. Além disso, as distintas dimensões entre parasitos e células do sangue permitem a delimitação de zonas de análise através de citometria de fluxo. Ainda que não se possa excluir completamente a possibilidade de interferência de células sanguíneas nos dados obtidos, a presença de um único pico sugere fortemente que não haja formas tripomastigotas em fase G2 no sangue circulante. Os parasitos coletados no segundo dia após a infecção (d.p.i.) não puderam ser analisados por citometria de fluxo, possivelmente devido ao armazenamento de dois dias a 4°C; as amostras do quinto e sétimo d.p.i. foram analisadas no dia da coleta.

Considerando a especificidade dos iniciadores para qPCR previamente demonstrada, o RNA total das amostras de sangue foi extraído, tratado com DNase e submetido à transcrição reversa. À exceção do sétimo d.p.i., possivelmente devido à relativamente baixa parasitemia, todas as amostras renderam uma quantidade de cDNA suficiente para a realização de ensaios de qPCR. Os níveis de transcritos para Aurora quinase 1, Polo-*like* quinase, MOB1 e TRACK foram então avaliados nos tripomastigotas sanguíneos de segundo e quinto d.p.i. em comparação com epimastigotas em fase exponencial de crescimento (**Figura 25**).

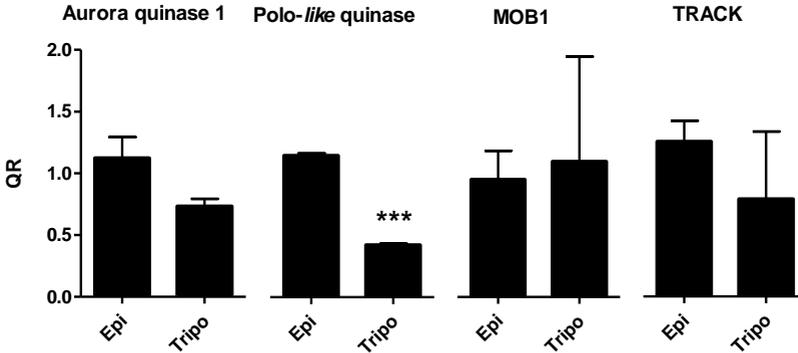


Figura 25. Níveis de transcritos de Aurora quinase 1, Polo-like quinase, MOB1 e TRACK em epimastigotas e tripomastigotas sanguíneos de *Trypanosoma rangeli*. Quantificação relativa realizada utilizando os genes de referência *GAPDH*, *HGPRT* e *RNA60S*. Os resultados foram obtidos por ensaios de qPCR e representam a média e o desvio padrão de dois experimentos independentes, realizados em duplicata. O sinal *** indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0005$), teste *t* de Student não-pareado. **Epi** = epimastigotas em fase exponencial de crescimento, **Tripo** = tripomastigotas sanguíneos de fase aguda (segundo e quinto d.p.i.). **QR** = Quantificação Relativa.

A avaliação em conjunto dos tripomastigotas sanguíneos de fase aguda resultou no aumento do desvio padrão para MOB1 e TRACK, mas também permitiu a aplicação de testes estatísticos que asseguraram a robustez dos dados obtidos para Aurora quinase 1 e, principalmente, para Polo-like quinase, que revelou uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0005$) entre as formas epimastigota e tripomastigota sanguínea. Em consonância com os resultados descritos neste trabalho, os níveis de transcritos para Polo-like quinase mais uma vez se mostraram reduzidos em amostras de parasitos onde as taxas de multiplicação são desconhecidas. Uma vez que neste caso os parasitos em questão são tripomastigotas sanguíneos de fase aguda, este resultado preliminar é bastante intrigante e merece ser investigado futuramente. O importante a se ressaltar neste momento é a validade das metodologias aplicadas, tanto a citometria de fluxo quanto a qPCR, para se estudar o ciclo biológico do *T. rangeli* no hospedeiro mamífero.

5. DISCUSSÃO

O *T. rangeli* é um tripanosoma capaz de infectar humanos nas Américas, sendo que muitas de suas características biológicas e epidemiológicas se sobrepõem àquelas do *T. cruzi*. No entanto, o *T. rangeli* não é considerado patogênico para o hospedeiro mamífero, o que o torna um intrigante organismo a ser estudado, especialmente no contexto da doença de Chagas. Apesar dessas informações já serem bastante difundidas, aspectos básicos do ciclo biológico deste parasito no hospedeiro mamífero permanecem controversos. Em busca de novas ferramentas para o estudo do ciclo celular do *T. rangeli* e objetivando a elucidação de alguns de seus comportamentos biológicos, o presente trabalho gerou contribuições importantes, as quais serão discutidas à luz do que já foi descrito para *T. cruzi*, *T. brucei* e para o próprio *T. rangeli*.

O ciclo celular *in vitro* de *T. cruzi* e *T. brucei* já foi extensivamente estudado, sendo que cada fase teve sua duração calculada e seus eventos morfológicos determinados e ordenados no ciclo (SHERWIN; GULL, 1989a; WOODWARD; GULL, 1990; ELIAS *et al.*, 2007). Os resultados obtidos nestes estudos serviram como base para a investigação do ciclo celular *in vitro* do *T. rangeli*, descrito pela primeira vez neste trabalho e resumido esquematicamente na **Figura 26**. De fato, a ordem dos eventos morfológicos durante o ciclo celular parece ser comum aos três tripanosomas: a duplicação do flagelo, gerando células 1N 1K 2F, é seguida pela segregação do cinetoplasto (1N 2K 2F) e, por fim, ocorre a separação dos núcleos (2N 2K 2F).



Figura 26. Representação esquemática das alterações morfológicas durante o ciclo celular *in vitro* do *Trypanosoma rangeli*. Células 1N 1K 1F encontram-se nas fases G1/S, células 1N 1K 2F estão em G2, células 1N 2K 2F, em fase M (mitose) e, por fim, células 2N 2K 2F estão na fase C (citocinese). A duração de cada fase está representada. **N** = núcleo, **K** = cinetoplasto; **F** = flagelo.

A proporção consideravelmente maior de células 1N 1K 1F em relação aos demais padrões morfológicos foi também observada em *T. brucei* (WOODWARD; GULL, 1990), *T. cruzi* (ELIAS *et al.*, 2007) e até no próprio *T. rangeli* (ESTEVES, 2009). Considerando a pequena proporção de células 1N 2K 2F, detectadas entre as etapas de 1N 1K 2F e 2N 2K 2F, provavelmente a segregação do cinetoplasto ocorre em momento bastante próximo da separação dos núcleos, tanto que em alguns casos excepcionais é possível que a duplicação dos núcleos até preceda a divisão do cinetoplasto, uma vez que eventualmente células 2N 1K 2F foram observadas. Pela sua raridade e por não estarem descritas em *T. cruzi* ou *T. brucei*, mesmo já tendo sido registradas em *L. mexicana* (WHEELER; GLUENZ; GULL, 2011), estas células 2N 1K 2F foram desconsideradas no cálculo da duração das fases, sendo consideradas morfologias que escapam à progressão natural do ciclo celular.

O tempo de duplicação da cepa Choachí de *T. rangeli* foi calculado em 26,2 horas, sendo um pouco mais longo que o tempo de duplicação da cepa Y de *T. cruzi*, estimado em 24 horas (ELIAS *et al.*, 2007), e tendo mais de três vezes a duração do ciclo da cepa 427 de *T. brucei*, calculado em 8,67 horas (WOODWARD; GULL, 1990). A proximidade do *T. rangeli* ao *T. cruzi* quanto ao tempo de duplicação, no mesmo meio de cultura, reforça o compartilhamento de certas características inerentes a estes dois parasitos que se refletem no seu ciclo celular.

Para estimar a duração de cada fase do ciclo celular, as mesmas equações aplicadas neste trabalho haviam sido previamente utilizadas nos estudos com *T. cruzi* e *T. brucei* (WOODWARD; GULL, 1990; ELIAS *et al.*, 2007). Entretanto, algumas distinções precisam ser apontadas, como o cálculo da duração da fase G2. Nos estudos com *T. brucei* a duração desta fase foi estimada através de duas metodologias distintas que consideraram a percentagem de organelas em divisão marcadas com BrdU (WOODWARD; GULL, 1990). Devido à fraca marcação com BrdU no núcleo do *T. rangeli*, porém, a aplicação destas metodologias comprometeu a precisão das estimativas.

Os estudos conduzidos com *T. cruzi* revelaram que a externalização do novo flagelo ocorre apenas durante a fase G2, de forma que o período mais curto necessário para o aparecimento de marcação com BrdU em células contendo dois flagelos corresponderia ao período entre o término da fase S e o crescimento do novo flagelo (ELIAS *et al.*, 2007). Assim, devido à semelhança com *T. cruzi*, estes mesmos pressupostos foram aplicados para estimar a duração da fase G2 em *T. rangeli*: inicialmente, a proporção de células 1N 1K 2F foi

utilizada para calcular uma parte da extensão da fase G2, à qual foi somado o menor tempo necessário para estas células 1N 1K 2F aparecerem marcadas com BrdU. No cálculo da duração da fase G2, Elias e colaboradores (2007) consideraram ainda o tempo necessário para o aparecimento de células 2N 2K 2F marcadas com BrdU, o qual não pôde ser aplicado para *T. rangeli* devido ao fato de que células 2N 2K 2F marcadas foram observadas nas primeiras horas de incorporação do BrdU, sugerindo que uma nova fase S possa ter início antes que a citocinese do ciclo anterior esteja concluída.

Uma vez estimada a duração da fase G2, as durações da fase S e, conseqüentemente, da fase G1, puderam ser calculadas também. Apesar da marcação por BrdU ter sido fraca no núcleo de *T. rangeli*, na maioria das vezes que este apareceu marcado também havia um sinal no cinetoplasto, e vice-versa, sugerindo que as fases S de ambos são distinguíveis apenas por um curto período de tempo e permitindo o cálculo de uma fase S única para ambas as organelas. A marcação simultânea de núcleo e cinetoplasto por BrdU também foi observada na maioria das vezes em *T. cruzi*, para o qual também foi calculada apenas uma fase S (ELIAS *et al.*, 2007).

Embora a permanência de BrdU na célula eventualmente ocasione a inibição alostérica da enzima ribonucleotídeo redutase, impedindo a síntese de DNA (MEUTH; GREEN, 1974), a curva de crescimento até 24 horas de parasitos expostos ao BrdU foi idêntica àquela de parasitos não expostos. De qualquer forma, é possível que a partir de aproximadamente 8 horas tenha início alguma redução na síntese do DNA, pois a proporção de células marcadas com BrdU passou a ser relativamente pequena e altamente variável entre as diferentes amostras e experimentos.

Uma vez que apenas uma fase S foi considerada, calculou-se também apenas uma fase M. As durações desta fase e da fase C foram estimadas exclusivamente a partir da proporção de células apresentando os eventos morfológicos 1N 2K 2F e 2N 2K 2F, respectivamente. No intuito de facilitar a comparação do ciclo de *T. rangeli* com os ciclos de *T. cruzi* e *T. brucei*, a proporção de cada fase no ciclo está representada na **Tabela 3**.

Tabela 3. Proporção de cada fase do ciclo celular em *Trypanosoma rangeli*, *T. cruzi* e *T. brucei*.

Fases	<i>T. rangeli</i>	<i>T. cruzi</i> ¹	<i>T. brucei</i> ²
G1	46%	45%	40%
S	23%	10%	18%
G2	15%	36%	22%
M	4%	1,5%	8%
C	12%	7,5%	12%

¹Dados obtidos de ELIAS *et al.*, 2007.

²Dados obtidos de WOODWARD; GULL, 1990.

É possível notar que, embora os tempos de duplicação de *T. rangeli* e *T. cruzi* sejam semelhantes, as proporções de cada fase do ciclo são distintas nestes parasitos. Destaca-se a princípio a duração da fase S, a qual é quase 2,5 vezes mais longa na cepa Choachí de *T. rangeli* do que na cepa Y de *T. cruzi*. Este resultado é intrigante uma vez que dados preliminares do Projeto Genoma do *T. rangeli* indicam que seu genoma possui cerca de 124 Mb em média (Edmundo Grisard, UFSC, comunicação pessoal), ao passo que o genoma da cepa Y de *T. cruzi* está estimado em 157,5 Mb (SOUZA *et al.*, 2011), de forma que sua duplicação deveria ser mais demorada. Por outro lado, o genoma de *T. brucei* é muito menor (70 Mb) (BERRIMAN *et al.*, 2005), em conformidade com sua fase S mais curta, embora proporcionalmente semelhante à fase S de *T. rangeli*.

À exceção da fase G1, as fases do ciclo celular de *T. rangeli* são na verdade proporcionalmente mais semelhantes às fases do ciclo de *T. brucei*, chegando a ser idênticas no caso da fase C. Isto é bastante intrigante, especialmente levando em consideração outras semelhanças entre *T. rangeli* e *T. brucei*, as quais não são compartilhadas com *T. cruzi*, como a transmissão ao hospedeiro mamífero através da via inoculativa. De fato, ainda é discutida a posição taxonômica do *T. rangeli* entre o grupo Stercoraria, ao qual pertence o *T. cruzi* e outros tripanosomas transmitidos pela via contaminativa, e o grupo Salivaria, onde se encontra o *T. brucei* e outros tripanosomas transmitidos por inoculação. Originalmente incluído no grupo Stercoraria (HOARE, 1968), o *T. rangeli* já foi considerado mais próximo do grupo Salivaria (AÑEZ, 1982) e, atualmente, sua classificação ainda é um dilema (GRISARD, 2002).

Outro aspecto da biologia do *T. rangeli* permeado por controvérsias é sua capacidade de multiplicação no hospedeiro

mamífero, a qual foi endereçada no presente estudo através de diferentes estratégias. As principais abordagens contaram com a análise da progressão do ciclo celular através da citometria de fluxo e com a realização de ensaios de qPCR para a detecção de transcritos associados a proteínas da citocinese que, em conjunto, produziram dados robustos e mostraram-se válidas para futuras aplicações neste campo.

A progressão do ciclo celular em *T. rangeli* pôde ser acompanhada por citometria de fluxo graças à sincronização da cultura por HU. A HU age primariamente como inibidora da enzima ribonucleotídeo redutase, reduzindo a disponibilidade de desoxiribonucleotídeos e, portanto, impedindo a síntese de DNA (ELFORD, 1968). É importante ressaltar, entretanto, que a síntese de RNA e de proteínas não é afetada pela HU (YOUNG; HODAS, 1964). Assim, células tratadas com HU têm seu ciclo celular interrompido antes da fase S, a partir da qual retomam a progressão uma vez que a HU tenha sido removida do meio de cultura.

Um estudo com *T. cruzi* demonstrou que as concentrações de HU necessárias para causar este efeito em tripanosomas (20 mM) são altas, sendo inclusive tóxicas para células de mamíferos. Apesar disso, neste parasito não há toxicidade induzida pela HU, uma vez que não houve divergências na utilização de oxigênio nem no conteúdo de RNA e proteína por célula entre parasitos tratados e não tratados com HU (GALANTI *et al.*, 1994). Assim, a HU inibe a síntese de DNA sem afetar outros processos metabólicos.

Embora a eficiência da sincronização por HU seja influenciada por diversos fatores, incluindo o tempo de duplicação da célula, a quantidade de DNA por célula e a taxa de síntese de DNA, a máxima supressão e concomitante sincronia da síntese do DNA em *T. cruzi* foi alcançada quando se utilizou 20mM de HU por 24 horas (GALANTI *et al.*, 1994). Da mesma forma, estudos conduzidos pelo Laboratório de Protozoologia e uma dissertação de Mestrado (ESTEVES, 2009) demonstraram que a concentração de 20 mM de HU por 24 horas também é ideal para a sincronização do ciclo celular de *T. rangeli*. As contagens em câmara de Neubauer e a análise por citometria de fluxo confirmaram que nesta concentração a HU é capaz de suprimir fortemente a multiplicação dos parasitos.

Uma vez liberados da HU, através da adição de meio de cultura livre deste composto, os parasitos ingressam no ciclo celular a partir da fase S em sincronia. A progressão do ciclo pode então ser acompanhada por citometria de fluxo, através da marcação do DNA com, por exemplo, iodeto de propídio. Células que ainda não duplicaram o DNA,

ou seja, estão em fase G1, emitirão uma determinada quantidade de fluorescência quando marcadas com iodeto de propídio; células que já tiveram seu DNA duplicado e estão, portanto, em fase G2, emitirão o dobro desta quantidade de fluorescência. Assim, formam-se duas populações celulares distinguíveis pela sua quantidade de DNA e representadas por dois picos no histograma, o que permite avaliar a taxa de multiplicação da cultura de células, além da sua progressão no ciclo celular.

Em *T. cruzi*, a liberação da HU após 24 horas de exposição revelou que, em 7 horas, a maior parte da população se encontrava na fase S e, em 12 horas e 26 horas, na fase G2 (GALANTI *et al.*, 1994). Da mesma forma, em *T. rangeli* os parasitos encontraram-se presumidamente na fase S até 7 horas e meia após a liberação da HU, alcançando a fase G2 em torno de 10 horas. No experimento II, inclusive, o pico referente aos parasitos em G2 reapareceu após 19 e 23 horas da liberação da HU. Por outro lado, nos experimentos I e III a partir de 15 horas após a liberação da HU as culturas apresentaram um perfil semelhante ao de culturas não sincronizadas. No caso da cultura controle, a qual não foi tratada com HU, embora seja possível notar uma variação nas proporções de parasitos em G1 e em G2, ambas estão aproximadamente equivalentes em todos os horários analisados.

Ainda que culturas sincronizadas difiram em muitos aspectos de culturas assíncronas, os tempos da progressão do ciclo celular observados após sincronização com HU são aproximadamente equivalentes às durações de cada fase do ciclo estimadas a partir de culturas em crescimento exponencial. Considerando que células sincronizadas estão estagnadas na fase G1, com a liberação da HU e ingresso no ciclo deveriam concluir a fase S cerca de 6 horas depois. A fase G2 se estenderia por aproximadamente 4 horas, à qual se seguiriam uma hora de fase M e mais 3 horas de fase C. Uma vez que na citometria de fluxo estas três fases estão reunidas no pico referente à fase G2, pois nelas o DNA já está duplicado, pode-se dizer que após as 6 horas de fase S, ocorrem 8 horas de fase G2/M/C. Assim, somam-se 14 horas aproximadas para a conclusão do ciclo celular após a liberação da HU, o que de fato foi observado com as culturas sincronizadas, em particular nos experimentos I e III.

Um estudo realizado com a cepa SC-58 de *T. rangeli* revelou que a maior percentagem de células em citocinese (2N 2K 2F) foi observada entre 18 e 20 horas após a liberação da HU (ESTEVES, 2009). Embora o tempo de duplicação da cepa SC-58 não tenha sido calculado, normalmente sua taxa de multiplicação é mais lenta que a da cepa

Choachí, requerendo inclusive maior suplementação do meio de cultura com SBF (Débora Lückemeyer, UFSC, comunicação pessoal). Dessa forma, não surpreende que o ciclo celular da cepa Choachí de *T. rangeli* seja concluído antes que o ciclo da cepa SC-58 após a liberação da HU.

Nas primeiras horas após a remoção da HU, as culturas dos três experimentos conduzidos com a cepa Choachí de *T. rangeli* avançaram no ciclo celular de forma semelhante, tornando-se distintas a partir do ingresso na fase G2. Apesar desta variabilidade, que reflete a plasticidade destes tripanosomas, é notável que se possa identificar um padrão na progressão do ciclo celular em experimentos conduzidos independentemente. Esta observação torna-se ainda mais impressionante quando associada aos resultados de qPCR.

A qPCR é uma poderosa ferramenta para a quantificação de ácidos nucléicos devido à sua combinação de rapidez, sensibilidade e especificidade. No entanto, por causa destas mesmas características uma série de fatores pode interferir nos ensaios e gerar dados pouco confiáveis, de forma que todas as etapas entre a obtenção das amostras e a análise das curvas de amplificação precisam ser cuidadosamente monitoradas. Assim, Bustin e colaboradores (2009) desenvolveram uma lista de itens essenciais a serem conferidos durante a realização de experimentos com qPCR, os quais foram contemplados neste trabalho e encontram-se descritos nas seções de Materiais e Métodos e Resultados.

No caso do *T. rangeli* em particular, a propriedade de sensibilidade da qPCR foi a principal razão de escolha dessa técnica, apesar dos percalços envolvidos em avaliar níveis de mRNA em parasitos cuja transcrição é policistrônica. Apesar de a regulação transcricional ser praticamente inexistente, todavia, o controle pós-transcricional nestes organismos envolve taxas de degradação diferencial dos mRNA, permitindo rápidas e detectáveis mudanças em seus níveis (ARCHER *et al.*, 2011). Portanto, para a interpretação funcional da variação na abundância de mRNA é necessário que haja uma quantificação precisa dos transcritos, e uma normalização interna com válidos genes de referência (BRENNDÖRFER; BOSCHART, 2010).

Quando vários genes de referência são utilizados simultaneamente, a probabilidade de ocorrência de viés na normalização é reduzida (BRENNDÖRFER; BOSCHART, 2010) e, por este motivo, três genes de referência foram escolhidos para os ensaios de qPCR deste estudo: *GAPDH*, *HGPR* e *RNA 60S*. A escolha destes genes em particular teve como base estudos que relataram previamente sua utilização em tripanosomas (NOGUEIRA *et al.*, 2006; REGIS-DA-SILVA *et al.*, 2006; HAANSTRA *et al.*, 2011), associada ao fato de codificarem para

proteínas associadas a diferentes funções. A enzima GAPDH atua na primeira etapa da glicólise, sendo, portanto, vinculada ao metabolismo energético. A enzima HGPRT tem um papel central na geração de purinas através da via da salvação, e a subunidade 60S do RNA ribossomal é associada às taxas de tradução dos parasitos.

As limitadas opções de genes em tripanosomatídeos que possam ser utilizados como referência se devem em grande parte a sua capacidade de assumir distintas formas biológicas. Por causa dos diferentes tamanhos que estas formas adquirem, genes de referência tradicionalmente utilizados, como para α e β -tubulina, apresentam grandes variações nos níveis de transcritos (DA SILVA; BARTHOLOMEU; TEIXEIRA, 2006). Além disso, em tripomastigotas os níveis de transcrição como um todo tendem a ser reduzidos devido ao estresse nutricional (ELIAS *et al.*, 2001), dificultando a avaliação da estabilidade dos genes de referência. Assim, os três genes de referência escolhidos para este estudo foram testados nas diferentes condições analisadas, sendo excluídos aqueles em que houve maior variância interna; por exemplo, os valores obtidos para *HGPRT* nos experimentos em que parasitos foram tratados com HU.

A escolha de três genes de referência conferiu robustez aos dados obtidos, uma vez que o mesmo padrão de níveis relativos de transcritos pôde ser observado quando cada gene de referência foi utilizado isoladamente para os cálculos de quantificação relativa. Dessa forma, confirmou-se a validade de *GAPDH*, *HGPRT* e *RNA60S* para aplicação em ensaios de qPCR com as amostras utilizadas neste estudo.

Em todos os momentos neste trabalho objetivou-se a comparação dos níveis de transcritos para proteínas associadas ao ciclo celular entre formas sabidamente em divisão celular, os epimastigotas em fase exponencial de crescimento, e formas cuja capacidade de divisão encontrava-se reduzida ou ausente, os epimastigotas em fase estacionária, ou tratados com HU, e os tripomastigotas. Apesar da transcrição policitrônica de tripanosomatídeos, alguns estudos apontam níveis de transcritos variáveis durante o ciclo celular, como o de Archer e colaboradores (2011). Isto possivelmente se deve à sofisticada regulação a que cada evento neste processo é submetida, exigindo variações nos níveis de proteínas que precisam ser controladas desde o estágio de mRNA.

Durante a fase S, por exemplo, uma proteína ligante de RNA denominada PUF9 é responsável pela estabilização de transcritos associados a proteínas que coordenarão processos replicativos no início da fase G2 (ARCHER *et al.*, 2009). Por outro lado, os mRNA codificantes

para histonas são rapidamente degradados ao final da fase S, pois não mais serão necessários uma vez que a síntese do DNA esteja concluída (NOE; CIUDAD; CHASIN, 1999). Surpreendentemente, o perfil transcriptômico no decorrer do ciclo celular de *T. brucei* revelou a regulação de pelo menos 430 genes (ARCHER *et al.*, 2011). Dentre estes se encontraram os genes para Aurora quinase 1 e para Polo-*like* quinase, cuja variação durante o ciclo celular também foi observada no presente trabalho com *T. rangeli*.

No caso da Aurora quinase 1, a qual está associada à formação do fuso mitótico e à iniciação da citocinese através do estabelecimento do sulco de clivagem, os picos nos níveis de transcritos foram observados em *T. brucei* ao final da fase S e durante a fase G2 (ARCHER *et al.*, 2011). Da mesma forma, os ensaios de qPCR e citometria de fluxo com parasitos sincronizados de *T. rangeli* mostraram que o pico nos níveis de transcritos para Aurora quinase 1 se deu quando a maior parte dos parasitos estava em G2, cerca de 10 horas após a liberação da HU nos três experimentos e, em particular no experimento II, às 19 e 23 horas.

O mesmo ocorreu com os níveis de transcritos para Polo-*like* quinase em *T. rangeli*, que apresentaram um nítido pico cerca de 10 horas após a liberação da HU, além de outros tempos em que grande parte dos parasitos se encontrava na fase G2 – tais como a partir de 15 horas no experimento II. Esta observação é condizente com as funções atribuídas a Polo-*like* quinase na segregação de organelas e acompanhamento do crescimento da FAZ, processos que têm início ao final da fase S e se estendem durante a fase G2/M (IKEDA; DE GRAFFENRIED, 2012). Por outro lado, apesar de o maior pico ter ocorrido por volta das 10 horas, os níveis de transcritos para Polo-*like* quinase começaram a aumentar logo após a retomada da fase S, entre 5 e 7 horas e meia após a liberação da HU. Em *T. brucei*, os picos de transcritos de Polo-*like* quinase parecem surgir ainda mais cedo – isto é, antes da fase S –, algo inesperado para uma proteína envolvida na regulação da fase G2/M, mas que pode indicar uma preparação adiantada para a produção de proteínas que serão necessárias posteriormente (ARCHER *et al.*, 2011).

Apesar das pequenas diferenças observadas, é notável que os níveis de transcritos para duas proteínas associadas ao ciclo celular apresentem um padrão semelhante de abundância relativa em *T. brucei* e *T. rangeli*, especialmente considerando que a metodologia utilizada no estudo com *T. brucei* foi completamente distinta dos ensaios de qPCR realizados neste estudo com *T. rangeli*. Infelizmente, o estudo com *T.*

brucei (ARCHER *et al.*, 2011) não apresentou qualquer menção acerca dos níveis de transcritos para MOB1 e TRACK.

Embora MOB1 seja uma proteína regulatória do ciclo celular e esteja predominantemente associada ao posicionamento do sulco de clivagem (HAMMARTON *et al.*, 2005), seus níveis de transcritos não estiveram fortemente associados a parasitos em divisão celular. Na verdade, os níveis de transcritos para MOB1 parecem variar de acordo com as taxas de multiplicação celular apenas nos experimentos que avaliaram a progressão do ciclo após a liberação da HU. Nestes, em particular no experimento III, há um aumento importante nos seus níveis de transcritos conforme o ciclo celular avança. No experimento II, seus níveis aumentaram a partir das 15 horas após liberação da HU e persistiram altos até as 23 horas – nestes tempos no experimento II houve uma grande quantidade de parasitos em G2, algo que não foi observado nos experimentos I e III.

De maneira geral, entretanto, o que se observou para os transcritos de MOB1 foi uma flutuação aleatória que sugere que a regulação de MOB1 não é requerida no estágio de mRNA ou, ainda, que esta proteína apresentaria outras funções ao longo do ciclo celular. Infelizmente não há quaisquer relatos na literatura sobre os níveis de mRNA para MOB1 que possam servir de comparação aos resultados obtidos neste estudo. De qualquer forma, a variação nos níveis de transcritos de MOB1 observada em *T. rangeli* a descartou como um possível marcador molecular da citocinese.

No que diz respeito aos níveis de transcritos para TRACK, os resultados de um estudo com *T. brucei* revelaram o oposto do que seria esperado para uma proteína associada à progressão do sulco de clivagem, uma vez que parasitos em rápida divisão apresentaram níveis mais baixos que formas estagnadas em fase G0 (MATTHEWS; GULL, 1998). Além disso, foi relatado que em formas procíclicas replicativas os mRNA para TRACK sequer foram detectados por ensaios de *Northern blot* (WELBURN; MURPHY, 1998). Inclusive em células de mamíferos os altos níveis de transcritos para TRACK foram associados a baixas taxas de multiplicação celular (CHANG *et al.*, 1998). Quanto à expressão protéica, porém, TRACK está presente tanto em formas procíclicas quanto formas sanguíneas de *T. brucei*, e é indispensável para a citocinese (ROTHBERG *et al.*, 2006).

Os níveis de transcritos para TRACK se mostraram associados predominantemente a formas em divisão de *T. rangeli* apenas durante a cinética de crescimento após a liberação da HU. Nas demais comparações os níveis de transcritos para TRACK flutuaram bastante

entre as amostras, resultando em desvios padrões altos que sugerem que a variação nos níveis de omRNA de TRACK não se associa às taxas de multiplicação do *T. rangeli*.

É interessante notar que durante a cinética de diferenciação para tripomastigotas, contudo, os níveis de transcritos para TRACK foram bastante estáveis. De fato, um estudo que avaliou por espectrometria de massas as proteínas expressas durante a diferenciação celular de *T. rangeli* (WAGNER, 2012) revelou que TRACK está presente ao longo de todo este processo (Glauber Wagner, UFSC, comunicação pessoal). Considerando que as taxas de multiplicação são bastante reduzidas conforme o número de tripomastigotas aumenta, a detecção de TRACK nestes momentos reforça sua capacidade de realizar funções além daquelas associadas à citocinese. Por exemplo, funções envolvidas no controle traducional de tripanosomatídeos, uma vez que a TRACK de *T. brucei* já foi encontrada em associação ao fator de alongação eucariótico eEF1A (REGMI *et al.*, 2008). Em conjunto, estes resultados comprometeram a utilização de TRACK como marcador molecular da citocinese em *T. rangeli*.

Considerando apenas os resultados obtidos na cinética de progressão do ciclo celular após a liberação da HU, é possível inferir que os níveis de transcritos para todas as proteínas escolhidas como potenciais marcadores moleculares da citocinese apresentam-se de certa forma associados às taxas de multiplicação do parasito. Entretanto, a partir da observação dos demais ensaios de qPCR, uma proteína em especial se destaca como uma promissora candidata a marcador molecular da citocinese em *T. rangeli*: a Polo-like quinase.

Em todos os experimentos conduzidos, os transcritos para Polo-like quinase estiveram significativamente associados à proliferação celular dos parasitos, apresentando-se relativamente mais altos em parasitos em crescimento exponencial e diminuindo quando a taxa de multiplicação estava reduzida. Foi possível inferir esta associação porque cada ensaio de qPCR que comparou as variações nos níveis de transcritos foi acompanhado por análise em citometria de fluxo, o que forneceu o perfil de cada amostra quanto às taxas de divisão celular. No caso de Polo-like quinase, a utilização de um soro policlonal dirigido à TbPLK (DE GRAFFENRIED; HO; WARREN, 2006) permitiu ainda a obtenção de dados acerca do perfil de expressão dessa proteína em *T. rangeli*.

Nos epimastigotas em fase exponencial de crescimento os níveis de transcritos para Polo-like quinase foram significativamente altos, e também foi forte o sinal na banda à altura de 70 kDa detectada pelo soro

anti-*TbPLK*. Por outro lado, em parasitos sabidamente com redução nas taxas de multiplicação, como epimastigotas em fase estacionária e parasitos tratados com HU, os níveis de transcritos para *Polo-like* quinase caíram drasticamente. Nos parasitos tratados com HU, o forte sinal à altura de 70 kDa também não foi detectado pelo soro anti-*TbPLK* – parasitos em fase estacionária não foram analisados quanto a este aspecto. Em *T. brucei*, a *TbPLK* é detectada tanto nas formas procíclicas como nas formas sanguíneas do parasito, ambas formas proliferativas (UMEYAMA; WANG, 2008). Da mesma forma, seus transcritos também foram detectados em ambas as formas por *Northern blot*, em níveis comparáveis (HUA; WANG, 1994).

A forte associação entre os transcritos para *Polo-like* quinase e as taxas de multiplicação do *T. rangeli* detectada nos experimentos iniciais com epimastigotas permitiu estender esta correlação para avaliar formas do parasito cuja capacidade de divisão ainda é controversa, os tripomastigotas. Os ensaios de qPCR revelaram que os níveis de transcritos para *Polo-like* quinase também foram significativamente reduzidos em tripomastigotas de cultura, nos quais a proteína de 70 kDa não foi detectada. Em parasitos coletados durante a diferenciação celular esta proteína também não pôde ser observada, embora os níveis de transcritos não tenham sofrido alterações significantes. No entanto, esta aparente manutenção nos níveis de transcritos pode se dever ao fato de que a amostra calibradora neste experimento foi a de parasitos no segundo dia da diferenciação, ou seja, parasitos que já haviam sido transferidos para um meio onde a multiplicação celular é reduzida.

Ainda que o tamanho da proteína reconhecida pelo soro anti-*TbPLK* seja cerca de 10 kDa menor que o tamanho esperado para a *Polo-like* quinase de *T. rangeli*, é notável que seu padrão de expressão seja corroborado pelos dados obtidos por qPCR, e vice-versa. Estudos conduzidos com *T. brucei* utilizando este mesmo soro para detecção da *TbPLK* infelizmente não revelam seu tamanho obtido nos ensaios de *Western blot* (HAMMARTON *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2010; UMEYAMA; WANG, 2008; YU; LIU; LI, 2012). No entanto, de Graffenried (comunicação pessoal) escreveu que uma proteína maior que o tamanho esperado foi observada para este parasito, possivelmente devido a fosforilações, e que, além disso, algumas proteínas de tamanho menor também foram detectadas.

Considerando que a proteína detectada no extrato protéico de parasitos em multiplicação trata-se da *Polo-like* quinase de *T. rangeli* e relacionando estes resultados com aqueles obtidos para seus transcritos, sob a ótica deste marcador molecular, tanto em nível de mRNA como

em nível de proteína, é possível inferir que os tripomastigotas de cultura não sofrem divisão celular. Outros dados corroboram esta afirmação, como a própria contagem dos parasitos durante a diferenciação celular, a qual é estabilizada a partir do quarto dia.

Além disso, ensaios de qPCR mostraram que também foram significativamente reduzidos em tripomastigotas os níveis de transcritos para Aurora quinase 1, os quais também estiveram associados a parasitos em multiplicação, ainda que de forma mais sutil que os transcritos para *Polo-like* quinase. Infelizmente, a utilização de Aurora quinase 1 como marcador molecular da citocinese foi prejudicada pela grande variação nos seus níveis de transcritos entre as replicatas biológicas, o que gerou grandes desvios e reduziu sua confiabilidade. Nos experimentos que utilizaram formas tripomastigotas de cultura, contudo, os dados obtidos para os níveis de transcritos de Aurora quinase 1 foram bastante reprodutíveis.

Por fim, a análise das culturas de *T. rangeli* por citometria de fluxo e a obtenção dos histogramas por si só é uma ferramenta valiosa para avaliar a capacidade de multiplicação dos parasitos. Tanto em parasitos tratados com HU como em tripomastigotas de cultura, a proporção de células em fase G1 é muito maior, sugerindo uma pequena taxa de multiplicação celular. Como nas culturas de tripomastigotas há uma pequena quantidade de epimastigotas, foram analisados também tripomastigotas purificados e, dessa vez, apenas um pico foi detectado nos histogramas, sugerindo a presença de apenas parasitos em fase G1.

A possibilidade de delimitar zonas de análise de acordo com o tamanho das células na citometria de fluxo, associada à sua sensibilidade, criou a oportunidade de analisar tripomastigotas obtidos diretamente do sangue de um mamífero infectado, os quais são os verdadeiros responsáveis pela controvérsia acerca da multiplicação celular do *T. rangeli* neste hospedeiro. Assim, um estudo preliminar com tripomastigotas sanguíneos de fase aguda revelou que estes também apresentam apenas um pico no histograma da citometria de fluxo, retratando parasitos na fase G1 que, portanto, não estão se dividindo. Aproveitando a obtenção destas amostras e apostando na sensibilidade da técnica de qPCR, os níveis de todos os transcritos foram avaliados em comparação com epimastigotas em fase exponencial de crescimento. Novamente, os níveis de transcritos para *Polo-like* quinase apresentaram-se bastante reduzidos em relação a parasitos em multiplicação, sugerindo também sob este aspecto que os tripomastigotas sanguíneos não se dividem.

Uma vez que apenas um experimento foi conduzido utilizando formas tripomastigotas sanguíneas, não é recomendável derivar conclusões a partir de seus resultados. Na verdade, o que deve ser considerado é o potencial da metodologia de qPCR, utilizando Polo-like quinase como marcador molecular da citocinese, além da citometria de fluxo, para avaliar o comportamento do *T. rangeli* em seu hospedeiro mamífero. A sensibilidade destas técnicas, somada aos resultados obtidos neste trabalho para parasitos cultivados *in vitro*, abre novas perspectivas para a compreensão do ciclo biológico do *T. rangeli* em sua totalidade, pois permitem avaliar indícios moleculares e estruturais de divisão celular apesar do pequeno número de parasitos encontrados em mamíferos.

6. CONCLUSÕES

- O ciclo celular *in vitro* da cepa Choachí de *Trypanosoma rangeli* tem duração de 26,2 horas, sendo que as primeiras 11,91 horas são dedicadas à fase G1, seguidas por 6,13 horas em fase S, 3,88 horas em fase G2, 1,13 horas em mitose e finalizando com 3,15 horas em citocinese;
- A sequência aminoacídica predita para Aurora quinase 1 (AUK1), Polo-like quinase (PLK), MOB1 e TRACK revelou uma alta identidade com suas homólogas em *T. cruzi* e *T. brucei*, além da presença de domínios característicos essenciais para sua atividade;
- Epimastigotas em fase exponencial de crescimento apresentaram maior abundância relativa de transcritos para Aurora quinase 1 e, principalmente, Polo-like quinase – mas não para MOB1 e TRACK – quando comparados a epimastigotas em fase estacionária, parasitos tratados com HU e tripomastigotas diferenciados *in vitro*;
- Durante a diferenciação celular, os mais altos níveis de transcritos para Aurora quinase 1 e Polo-like quinase estiveram significativamente associados a parasitos com as mais altas taxas de divisão celular, ao passo que MOB1 e TRACK apresentaram uma variação independente da capacidade de multiplicação do parasito;
- O acompanhamento da progressão do ciclo celular de *T. rangeli* revelou que os mais altos níveis de transcritos para todas as proteínas analisadas, em particular Polo-like quinase, coincidem com a maior proporção relativa de parasitos nas fases G2/M/C, cerca de 10 horas após a liberação da HU;
- A Polo-like quinase de *T. rangeli* foi detectada no extrato protéico de formas epimastigotas como uma proteína de aproximadamente 70 kDa, a qual não foi reconhecida em parasitos tratados com HU ou tripomastigotas de cultura;

- Estudos preliminares utilizando tripomastigotas sanguíneos confirmaram o potencial das metodologias de qPCR e de citometria de fluxo para o estudo do ciclo celular do *T. rangeli*, especialmente utilizando Polo-like quinase como marcador molecular.

Assim, este trabalho demonstrou que os níveis de transcritos para Polo-like quinase estão intrinsecamente associados às taxas de divisão celular do *T. rangeli*, sendo mais altos quando a proliferação ocorre em altas taxas e reduzindo conforme estas taxas diminuem (**Figura 27**).

Estes resultados indicam, portanto, que a Polo-like quinase é um marcador molecular em potencial para o estudo do ciclo biológico do *T. rangeli* no hospedeiro mamífero.

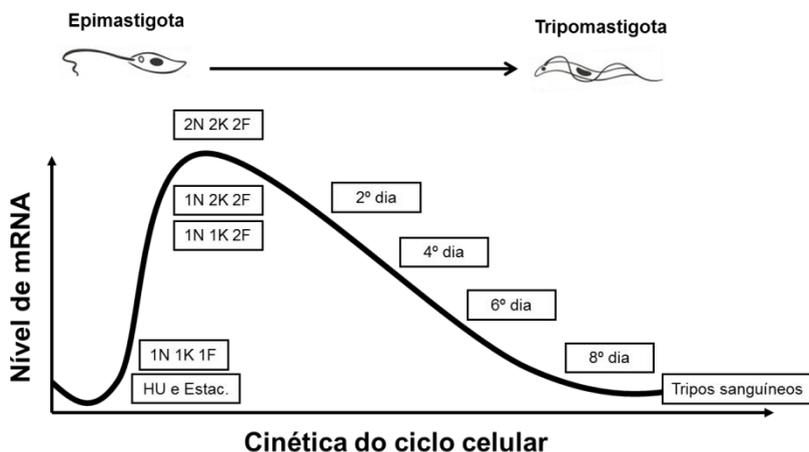


Figura 27. Representação esquemática dos resultados obtidos para os níveis de transcritos para Polo-like quinase durante o ciclo celular e a diferenciação de *Trypanosoma rangeli*. HU = parasitos tratados com hidróxiureia, Estac. = parasitos em fase de crescimento estacionária, N = núcleo, K = cinetoplasto, F = flagelo.

Além disso, foram também elucidados alguns aspectos referentes ao ciclo celular *in vitro* do *T. rangeli*, como a duração de cada fase do ciclo e sua progressão sincronizada. Juntos, estes resultados abrem novas perspectivas para a compreensão da biologia deste tripanosoma.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, D. R.; RON, D.; KIELY, P. A. RACK1, A multifaceted scaffolding protein: Structure and function. **Cell Commun Signal**, v. 9, p. 22, 2011.
- AFCHAIN, D.; LE RAY, D.; FRUIT, J.; CAPRON, A. Antigenic make-up of *Trypanosoma cruzi* culture forms: identification of a specific component. **J Parasitol**, v. 65, n. 4, p. 507-14, 1979.
- AMBIT, A.; WOODS, K. L.; CULL, B.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Morphological events during the cell cycle of *Leishmania major*. **Eukaryot Cell**, v. 10, n. 11, p. 1429-38, 2011.
- AÑEZ, N. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. I – Deposition, migration and growth of *T. rangeli* in two mammals. In: **Parasitological Topics**. Kansas: Allen Press, 1981. p. 19-26.
- AÑEZ, N. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. IV – A reconsideration of its systematic position. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 77, n. 4, p. 405-15, 1982.
- AÑEZ, N.; VELANDIA, J.; RODRIGUEZ, A. M. Estudios sobre *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. VIII. Respuesta a las infecciones en dos mamíferos. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 2, p. 149-53, 1985.
- ARCHER, S. K.; INCHAUSTEGUI, D.; QUEIROZ, R.; CLAYTON, C. The cell cycle regulated transcriptome of *Trypanosoma brucei*. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. e18425, 2011.
- ARCHER, S. K.; LUU, V. D.; DE QUEIROZ, R. A.; BREMS, S.; CLAYTON, C. *Trypanosoma brucei* PUF9 regulates mRNAs for proteins involved in replicative processes over the cell cycle. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 8, p. e1000565, 2009.
- BERRIMAN, M. *et al.* The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. **Science**, v. 309, p. 416-22, 2005.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, n., p. 248-54, 1976.

BRAGA, M. V.; MEIRELLES MDE, N.; BRAZIL, R. P. Massive experimental inoculation of *Trypanosoma rangeli* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 (Hemiptera, Reduviidae) and *Mus musculus*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 4, p. 555-7, 1998.

BRENNDÖRFER, M.; BOSHART, M. Selection of reference genes for mRNA quantification in *Trypanosoma brucei*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 172, n. 1, p. 52-5, 2010.

BROOKS, D. R.; DENISE, H.; WESTROP, G. D.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. The stage-regulated expression of *Leishmania mexicana* CPB cysteine proteases is mediated by an intergenic sequence element. **J Biol Chem**, v. 276, n. 50, p. 47061-9, 2001.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clin Chem**, v. 55, n. 4, p. 611-22, 2009.

CAMPBELL, D. A.; THOMAS, S.; STURM, N. R. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? **Microbes Infect**, v. 5, n. 13, p. 1231-40, 2003.

CARMENA, M.; EARNSHAW, W. C. The cellular geography of aurora kinases. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 4, n. 11, p. 842-54, 2003.

CHANG, B. Y.; CONROY, K. B.; MACHLEDER, E. M.; CARTWRIGHT, C. A. RACK1, a receptor for activated C kinase and a homolog of the beta subunit of G proteins, inhibits activity of src tyrosine kinases and growth of NIH 3T3 cells. **Mol Cell Biol**, v. 18, n. 6, p. 3245-56, 1998.

CHEUNG, C. H.; COUMAR, M. S.; CHANG, J. Y.; HSIEH, H. P. Aurora kinase inhibitor patents and agents in clinical testing: an update (2009-10). **Expert Opin Ther Pat**, v. 21, n. 6, p. 857-84, 2011.

CLAYTON, C.; SHAPIRA, M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. **Mol Biochem Parasitol**, v. 156, n. 2, p. 93-101, 2007.

CLAYTON, C. E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. **EMBO J**, v. 21, n. 8, p. 1881-8, 2002.

CUBA CUBA, A. Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos del *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 31, n. 2, p. 207-20, 1998.

D'ALESSANDRO, A.; SARAVIA, N. G. *Trypanosoma rangeli*. In: **Protozoal Diseases**. London: Arnold, 1999. p. 398-412.

DA SILVA, R. A.; BARTHOLOMEU, D. C.; TEIXEIRA, S. M. Control mechanisms of tubulin gene expression in *Trypanosoma cruzi*. **Int J Parasitol**, v. 36, n. 1, p. 87-96, 2006.

DE GRAFFENRIED, C. L.; HO, H. H.; WARREN, G. Polo-like kinase is required for Golgi and bilobe biogenesis in *Trypanosoma brucei*. **J Cell Biol**, v. 181, n. 3, p. 431-8, 2008.

DE SCORZA, C.; URDANETA-MORALES, S.; TEJERO, F. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920: preliminary report on histopathology in experimentally infected mice. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 28, n. 5, p. 371-8, 1986.

DE SOUZA, W. Electron microscopy of trypanosomes – A historical view. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 4, p. 313-25, 2008.

EGER-MANGRICH, I.; DE OLIVEIRA, M. A.; GRISARD, E. C.; DE SOUZA, W.; STEINDEL, M. Interaction of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 with different cell lines in vitro. **Parasitol Res**, v. 87, n. 6, p. 505-9, 2001.

ELFORD, H. L. Effect of hydroxyurea on ribonucleotide reductase. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 33, n. 1, p. 129-35, 1968.

ELIAS, M. C.; DA CUNHA, J. P.; DE FARIA, F. P.; MORTARA, R. A.; FREYMULLER, E.; SCHENKMAN, S. Morphological events during the *Trypanosoma cruzi* cell cycle. **Protist**, v. 158, n. 2, p. 147-57, 2007.

ELIAS, M. C.; MARQUES-PORTO, R.; FREYMULLER, E.; SCHENKMAN, S. Transcription rate modulation through the

Trypanosoma cruzi life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation. **Mol Biochem Parasitol**, v. 112, n. 1, p. 79-90, 2001.

ESSON, H. J.; MORRISWOOD, B.; YAVUZ, S.; VIDILASERIS, K.; DONG, G.; WARREN, G. Morphology of the trypanosome bilobe, a novel cytoskeletal structure. **Eukaryot Cell**, v. 11, n. 6, p. 761-72, 2012.

ESTEVEZ, P. E. D. C. C. **Estudo morfológico do ciclo celular do *Trypanosoma rangeli* em meio axênico**. Dissertação de Mestrado, Universidade do Vale do Paraíba, 2009.

FARR, H.; GULL, K. Cytokinesis in trypanosomes. **Cytoskeleton (Hoboken)**, v. 69, n. 11, p. 931-41, 2012.

GALANTI, N.; DVORAK, J. A.; GRENET, J.; MCDANIEL, J. P. Hydroxyurea-induced synchrony of DNA replication in the Kinetoplastida. **Exp Cell Res**, v. 214, n. 1, p. 225-30, 1994.

GARCIA-SALCEDO, J. A.; PEREZ-MORGA, D.; GIJON, P.; DILBECK, V.; PAYS, E.; NOLAN, D. P. A differential role for actin during the life cycle of *Trypanosoma brucei*. **EMBO J**, v. 23, n. 4, p. 780-9, 2004.

GOMEZ, C.; ESTHER RAMIREZ, M.; CALIXTO-GALVEZ, M.; MEDEL, O.; RODRIGUEZ, M. A. Regulation of gene expression in protozoa parasites. **J Biomed Biotechnol**, v. 2010, n., p. 726045, 2010.

GRAHAM, T. M.; TAIT, A.; HIDE, G. Characterisation of a polo-like protein kinase gene homologue from an evolutionary divergent eukaryote, *Trypanosoma brucei*. **Gene**, v. 207, n. 1, p. 71-7, 1998.

GREWAL, M. *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920, in its vertebrate and invertebrate hosts. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 50, n., p. 301-02, 1956.

GREWAL, M. S. Pathogenicity of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 in the invertebrate host. **Exp Parasitol**, v. 6, n. 2, p. 123-30, 1957.

GRISARD, E. C. Salivaria or Stercoraria? The *Trypanosoma rangeli* dilemma. **Kinetoplastid Biol Dis**, v. 1, n. 1, p. 5, 2002.

GRISARD, E. C.; STEINDEL, M. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. In: **Parasitologia Humana**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2011.

GRISARD, E. C.; STEINDEL, M.; GUARNERI, A. A.; EGERMANGRICH, I.; CAMPBELL, D. A.; ROMANHA, A. J. Characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated in Central and South America: an overview. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 2, p. 203-9, 1999.

GUHL, F.; HUDSON, L.; MARINKELLE, C. J.; MORGAN, S. J.; JARAMILLO, C. Antibody response to experimental *Trypanosoma rangeli* infection and its implications for immunodiagnosis of South American trypanosomiasis. **Acta Trop**, v. 42, n. 4, p. 311-8, 1985.

GUHL, F.; MARINKELLE, C. J. Antibodies against *Trypanosoma cruzi* in mice infected with *T. rangeli*. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 76, n. 3, p. 361, 1982.

GUHL, F.; VALLEJO, G. A. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920: an updated review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 435-42, 2003.

HAANSTRA, J. R.; KERKHOVEN, E. J.; VAN TUIJL, A.; BLITS, M.; WURST, M.; VAN NULAND, R.; ALBERT, M. A.; MICHELS, P. A.; BOUWMAN, J.; CLAYTON, C.; WESTERHOFF, H. V.; BAKKER, B. M. A domino effect in drug action: from metabolic assault towards parasite differentiation. **Mol Microbiol**, v. 79, n. 1, p. 94-108, 2011.

HAMMARTON, T. C. Cell cycle regulation in *Trypanosoma brucei*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 153, n. 1, p. 1-8, 2007.

HAMMARTON, T. C.; KRAMER, S.; TETLEY, L.; BOSCHART, M.; MOTTRAM, J. C. *Trypanosoma brucei* Polo-like kinase is essential for basal body duplication, kDNA segregation and cytokinesis. **Mol Microbiol**, v. 65, n. 5, p. 1229-48, 2007.

HAMMARTON, T. C.; LILICO, S. G.; WELBURN, S. C.; MOTTRAM, J. C. *Trypanosoma brucei* MOB1 is required for accurate and efficient cytokinesis but not for exit from mitosis. **Mol Microbiol**, v. 56, n. 1, p. 104-16, 2005.

HAMMARTON, T. C.; MONNERAT, S.; MOTTRAM, J. C. Cytokinesis in trypanosomatids. **Curr Opin Microbiol**, v. 10, n. 6, p. 520-7, 2007.

HE, C. Y.; HO, H. H.; MALSAM, J.; CHALOUNI, C.; WEST, C. M.; ULLU, E.; TOOMRE, D.; WARREN, G. Golgi duplication in *Trypanosoma brucei*. **J Cell Biol**, v. 165, n. 3, p. 313-21, 2004.

HERBIG-SANDREUTER, A. Further studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera 1920. **Acta Trop**, v. 14, n. 3, p. 193-207, 1957.

HERGOVICH, A. MOB control: reviewing a conserved family of kinase regulators. **Cell Signal**, v. 23, n. 9, p. 1433-40, 2011.

HOARE, C. Morphological and taxonomic studies on Mammalian trypanosomes. XI. The Systematic position of *Trypanosoma rangeli*. In: **Medicina Tropical**. Mexico, 1968. p. 276-90.

HUA, S. B.; WANG, C. C. Differential accumulation of a protein kinase homolog in *Trypanosoma brucei*. **J Cell Biochem**, v. 54, n. 1, p. 20-31, 1994.

IKEDA, K. N.; DE GRAFFENRIED, C. L. Polo-like kinase is necessary for flagellum inheritance in *Trypanosoma brucei*. **J Cell Sci**, v. 125, n. Pt 13, p. 3173-84, 2012.

KELLY, B. L.; LOCKSLEY, R. M. The *Leishmania major* LACK antigen with an immunodominant epitope at amino acids 156 to 173 is not required for early Th2 development in BALB/c mice. **Infect Immun**, v. 72, n. 12, p. 6924-31, 2004.

KETTENBACH, A. N.; SCHWEPPE, D. K.; FAHERTY, B. K.; PECHENICK, D.; PLETNEV, A. A.; GERBER, S. A. Quantitative phosphoproteomics identifies substrates and functional modules of Aurora and Polo-like kinase activities in mitotic cells. **Sci Signal**, v. 4, n. 179, p. rs5, 2011.

KOERICH, L. B.; EMMANUELLE-MACHADO, P.; SANTOS, K.; GRISARD, E. C.; STEINDEL, M. Differentiation of *Trypanosoma rangeli*: high production of infective Trypomastigote forms in vitro. **Parasitol Res**, v. 88, n. 1, p. 21-5, 2002.

- KOHL, L.; ROBINSON, D.; BASTIN, P. Novel roles for the flagellum in cell morphogenesis and cytokinesis of trypanosomes. **EMBO J**, v. 22, n. 20, p. 5336-46, 2003.
- KUMAR, P.; WANG, C. C. Dissociation of cytokinesis initiation from mitotic control in a eukaryote. **Eukaryot Cell**, v. 5, n. 1, p. 92-102, 2006.
- LANHAM, S. M.; GODFREY, D. G. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. **Exp Parasitol**, v. 28, n. 3, p. 521-34, 1970.
- LI, Z. Regulation of the cell division cycle in *Trypanosoma brucei*. **Eukaryot Cell**, v. 11, n. 10, p. 1180-90, 2012.
- LI, Z.; LEE, J. H.; CHU, F.; BURLINGAME, A. L.; GUNZL, A.; WANG, C. C. Identification of a novel chromosomal passenger complex and its unique localization during cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. **PLoS One**, v. 3, n. 6, p. e2354, 2008.
- LI, Z.; UMEYAMA, T.; WANG, C. C. The Aurora Kinase in *Trypanosoma brucei* plays distinctive roles in metaphase-anaphase transition and cytokinetic initiation. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 9, p. e1000575, 2009.
- LI, Z.; WANG, C. C. Changing roles of aurora-B kinase in two life cycle stages of *Trypanosoma brucei*. **Eukaryot Cell**, v. 5, n. 7, p. 1026-35, 2006.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, 2001.
- MAH, A. S.; JANG, J.; DESHAIES, R. J. Protein kinase Cdc15 activates the Dbf2-Mob1 kinase complex. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 13, p. 7325-30, 2001.
- MATTHEWS, K. R.; GULL, K. Identification of stage-regulated and differentiation-enriched transcripts during transformation of the African trypanosome from its bloodstream to procyclic form. **Mol Biochem Parasitol**, v. 95, n. 1, p. 81-95, 1998.

MEUTH, M.; GREEN, H. Induction of a deoxycytidineless state in cultured mammalian cells by bromodeoxyuridine. **Cell**, v. 2, n. 2, p. 109-12, 1974.

MINOCHA, N.; KUMAR, D.; RAJANALA, K.; SAHA, S. Kinetoplast morphology and segregation pattern as a marker for cell cycle progression in *Leishmania donovani*. **J Eukaryot Microbiol**, v. 58, n. 3, p. 249-53, 2011.

MOLYNEUX, D. Division of the human trypanosome, *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 67, n. 3, p. 371-2, 1973.

MORALES, S. V. **Estudo da resposta inflamatória durante a infecção por *Trypanosoma rangeli***. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

NOE, V.; CIUDAD, C. J.; CHASIN, L. A. Effect of differential polyadenylation and cell growth phase on dihydrofolate reductase mRNA stability. **J Biol Chem**, v. 274, n. 39, p. 27807-14, 1999.

NOGUEIRA, F. B.; KRIEGER, M. A.; NIRDE, P.; GOLDENBERG, S.; ROMANHA, A. J.; MURTA, S. M. Increased expression of iron-containing superoxide dismutase-A (TcFeSOD-A) enzyme in *Trypanosoma cruzi* population with in vitro-induced resistance to benzimidazole. **Acta Trop**, v. 100, n. 1-2, p. 119-32, 2006.

OSORIO, Y.; TRAVI, B. L.; PALMA, G. I.; SARAVIA, N. G. Infectivity of *Trypanosoma rangeli* in a promonocytic mammalian cell line. **J Parasitol**, v. 81, n. 5, p. 687-93, 1995.

PAREDES, C. H.; PAREDES, R. Un caso de infección humana por *Trypanosoma rangeli*. **Rev Fac Med Bog**, v., n. 18, p. 343-75, 1949.

PAYS, E.; HANOCQ-QUERTIER, J.; HANOCQ, F.; VAN ASSEL, S.; NOLAN, D.; ROLIN, S. Abrupt RNA changes precede the first cell division during the differentiation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms into procyclic forms in vitro. **Mol Biochem Parasitol**, v. 61, n. 1, p. 107-14, 1993.

PLOUBIDOU, A.; ROBINSON, D. R.; DOCHERTY, R. C.; OGBADOYI, E. O.; GULL, K. Evidence for novel cell cycle checkpoints in trypanosomes: kinetoplast segregation and cytokinesis in the absence of mitosis. **J Cell Sci**, v. 112 (Pt 24), n., p. 4641-50, 1999.

REGIS-DA-SILVA, C. G.; FREITAS, J. M.; PASSOS-SILVA, D. G.; FURTADO, C.; AUGUSTO-PINTO, L.; PEREIRA, M. T.; DAROCHA, W. D.; FRANCO, G. R.; MACEDO, A. M.; HOFFMANN, J. S.; CAZAUX, C.; PENA, S. D.; TEIXEIRA, S. M.; MACHADO, C. R. Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Rad51 gene and its role in recombination events associated with the parasite resistance to ionizing radiation. **Mol Biochem Parasitol**, v. 149, n. 2, p. 191-200, 2006.

REGMI, S.; ROTHBERG, K. G.; HUBBARD, J. G.; RUBEN, L. The RACK1 signal anchor protein from *Trypanosoma brucei* associates with eukaryotic elongation factor 1A: a role for translational control in cytokinesis. **Mol Microbiol**, v. 70, n. 3, p. 724-45, 2008.

ROTHBERG, K. G.; BURDETTE, D. L.; PFANNSTIEL, J.; JETTON, N.; SINGH, R.; RUBEN, L. The RACK1 homologue from *Trypanosoma brucei* is required for the onset and progression of cytokinesis. **J Biol Chem**, v. 281, n. 14, p. 9781-90, 2006.

ROTUREAU, B.; SUBOTA, I.; BASTIN, P. Molecular bases of cytoskeleton plasticity during the *Trypanosoma brucei* parasite cycle. **Cell Microbiol**, v. 13, n. 5, p. 705-16, 2011.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor, 2001.

SCHENKMAN, S.; DIAZ, C.; NUSSENZWEIG, V. Attachment of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to receptors at restricted cell surface domains. **Exp Parasitol**, v. 72, n. 1, p. 76-86, 1991.

SCHOTTELIUS, J. Neuraminidase fluorescence test for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **Trop Med Parasitol**, v. 38, n. 4, p. 323-7, 1987.

SHERWIN, T.; GULL, K. The cell division cycle of *Trypanosoma brucei brucei*: timing of event markers and cytoskeletal modulations. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 323, n. 1218, p. 573-88, 1989a.

SHERWIN, T.; GULL, K. Visualization of detyrosination along single microtubules reveals novel mechanisms of assembly during cytoskeletal duplication in trypanosomes. **Cell**, v. 57, n. 2, p. 211-21, 1989b.

SOLARI, A. J. The 3-dimensional fine structure of the mitotic spindle in *Trypanosoma cruzi*. **Chromosoma**, v. 78, n. 2, p. 239-55, 1980.

SONG, S.; LEE, K. S. A novel function of *Saccharomyces cerevisiae* CDC5 in cytokinesis. **J Cell Biol**, v. 152, n. 3, p. 451-69, 2001.

SOUZA, R. T.; LIMA, F. M.; BARROS, R. M.; CORTEZ, D. R.; SANTOS, M. F.; CORDERO, E. M.; RUIZ, J. C.; GOLDENBERG, S.; TEIXEIRA, M. M. G.; FRANCO DA SILVEIRA, J. Genome size, karyotype polymorphism and chromosomal evolution in *Trypanosoma cruzi*. **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. e23042, 2011.

STANNERS, C. P.; TILL, J. E. DNA synthesis in individual L-strain mouse cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 37, n., p. 406-19, 1960.

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, 1993.

STOCO, P. H. **Caracterização das DNA topoisomerasas II de *Trypanosoma rangeli***. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

STOCO, P. H.; ARESI, C.; LUCKEMEYER, D. D.; SPERANDIO, M. M.; SINCERO, T. C.; STEINDEL, M.; MILETTI, L. C.; GRISARD, E. C. *Trypanosoma rangeli* expresses a beta-galactofuranosyl transferase. **Exp Parasitol**, v. 130, n. 3, p. 246-52, 2012.

SUN, L.; WANG, C. C. The structural basis of localizing polo-like kinase to the flagellum attachment zone in *Trypanosoma brucei*. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27303, 2011.

TANOURA, K.; YANAGI, T.; DE GARCIA, V. M.; KANBARA, H. *Trypanosoma rangeli*--in vitro metacyclogenesis and fate of metacyclic trypomastigotes after infection to mice and fibroblast cultures. **J Eukaryot Microbiol**, v. 46, n. 1, p. 43-8, 1999.

TU, X.; KUMAR, P.; LI, Z.; WANG, C. C. An aurora kinase homologue is involved in regulating both mitosis and cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. **J Biol Chem**, v. 281, n. 14, p. 9677-87, 2006.

TU, X.; WANG, C. C. Coupling of posterior cytoskeletal morphogenesis to the G1/S transition in the *Trypanosoma brucei* cell cycle. **Mol Biol Cell**, v. 16, n. 1, p. 97-105, 2005.

UDVARDI, M. K.; CZECHOWSKI, T.; SCHEIBLE, W. R. Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. **Plant Cell**, v. 20, n. 7, p. 1736-7, 2008.

UMEYAMA, T.; WANG, C. C. Polo-like kinase is expressed in S/G2/M phase and associated with the flagellum attachment zone in both procyclic and bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. **Eukaryot Cell**, v. 7, n. 9, p. 1582-90, 2008.

URDANETA-MORALES, S.; TEJERO, F. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920: mouse model for high, sustained parasitemia. **J Parasitol**, v. 71, n. 4, p. 409-14, 1985.

URDANETA-MORALES, S.; TEJERO, F. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920. Intracellular amastigote stages of reproduction in white mice. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 28, n. 3, p. 166-9, 1986.

VADER, G.; LENS, S. M. The Aurora kinase family in cell division and cancer. **Biochim Biophys Acta**, v. 1786, n. 1, p. 60-72, 2008.

VALLEJO, G. A.; GUHL, F.; SCHAUB, G. A. Triatominae-*Trypanosoma cruzi*/*T. rangeli*: Vector-parasite interactions. **Acta Trop**, v. 110, n. 2-3, p. 137-47, 2009.

VAN HELLEMOND, J. J.; NEUVILLE, P.; SCHWARZ, R. T.; MATTHEWS, K. R.; MOTTRAM, J. C. Isolation of *Trypanosoma brucei* CYC2 and CYC3 cyclin genes by rescue of a yeast G(1) cyclin

mutant. Functional characterization of CYC2. **J Biol Chem**, v. 275, n. 12, p. 8315-23, 2000.

VAUGHAN, S.; GULL, K. The trypanosome flagellum. **J Cell Sci**, v. 116, n. Pt 5, p. 757-9, 2003.

VAUGHAN, S.; GULL, K. The structural mechanics of cell division in *Trypanosoma brucei*. **Biochem Soc Trans**, v. 36, n. Pt 3, p. 421-4, 2008.

VICKERMAN, K. Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. **Br Med Bull**, v. 41, n. 2, p. 105-14, 1985.

WAGNER, G. **Análise proteômica de formas tripomastigotas diferenciadas “in vitro” do *Trypanosoma rangeli* e caracterização de antígenos diferenciais ao *Trypanosoma cruzi***. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

WELBURN, S. C.; MURPHY, N. B. Prohibitin and RACK homologues are up-regulated in trypanosomes induced to undergo apoptosis and in naturally occurring terminally differentiated forms. **Cell Death Differ**, v. 5, n. 7, p. 615-22, 1998.

WHEELER, R. J.; GLUENZ, E.; GULL, K. The cell cycle of *Leishmania*: morphogenetic events and their implications for parasite biology. **Mol Microbiol**, v. 79, n. 3, p. 647-62, 2011.

WILLIAMS, F. M. Dynamics of microbial populations. In: **Systems analysis and Simulation Ecology**. New York: Academic Press, 1971.

WOODWARD, R.; GULL, K. Timing of nuclear and kinetoplast DNA replication and early morphological events in the cell cycle of *Trypanosoma brucei*. **J Cell Sci**, v. 95 (Pt 1), n., p. 49-57, 1990.

YOUNG, C. W.; HODAS, S. Hydroxyurea: Inhibitory effect on DNA metabolism. **Science**, v. 146, n. 3648, p. 1172-4, 1964.

YU, Z.; LIU, Y.; LI, Z. Structure-function relationship of the Polo-like kinase in *Trypanosoma brucei*. **J Cell Sci**, v. 125, n. Pt 6, p. 1519-30, 2012.

ZELEDÓN, R. Trypanosomiasis rangeli. **Rev Biol Trop**, v. 2, n. 2, p. 231-68, 1954.

ZUÑIGA, C.; PALAU, T.; PENIN, P.; GAMALLO, C.; DE DIEGO, J. A. Characterization of a *Trypanosoma rangeli* strain of Colombian origin. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 4, p. 523-30, 1997.