

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA**

**CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS DE *Entamoeba histolytica* ISOLADAS DE
DIFERENTES CASOS CLÍNICOS NO BRASIL: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES
POSSIVELMENTE ENVOLVIDOS COM A PATOGENICIDADE**

Michelle Aparecida Ribeiro de Freitas

Belo Horizonte

2007

**CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS DE *Entamoeba histolytica* ISOLADAS
DE DIFERENTES CASOS CLÍNICOS NO BRASIL: ANÁLISE DA
EXPRESSÃO DE GENES POSSIVELMENTE ENVOLVIDOS COM A
PATOGENICIDADE**

Michelle Aparecida Ribeiro de Freitas

**Tese apresentada à Pós-Graduação em
Parasitologia do Instituto de Ciências
Biológicas, Universidade Federal de
Minas Gerais, como requisito parcial
para a obtenção do título de Doutor
em Parasitologia.**

Orientadora: Dra. Maria Aparecida Gomes- Laboratório Amebíase

**Co-orientador: Dr.Egbert Tannich- Inst. de Medicina Tropical
Bernhard Nocht**

**Colaborador: Dr. Jorge Luís Pesquero – Departamento de Biofísica-
UFMG**

Trabalho realizado no Laboratório de Amebíase do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (MG) e no Instituto de Medicina Tropical Bernhard Nocht Institute, Hamburg, Alemanha sob a orientação da Profa. Maria Aparecida Gomes e Dr. Egbert Tannich, com auxílio financeiro da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)/ DAAD

Dedico este trabalho a Dra Márcia Cury, sem o qual nada disso teria sido possível. Márcia, Obrigada por ter acreditado em mim e por ter tornado esse sonho possível.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao programa de Pós-graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, minha gratidão, pela oportunidade de formação e aprendizado, pelas cobranças, pela confiança e pelas facilidades concedidas para realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Cidinha, por todos esses anos de amizade e ensinamentos, por ter me recebido em seu laboratório e me transformado em uma pesquisadora. Eu fui a sua primeira e pra mim, você será sempre a única! Te adoro e jamais esquecerei tudo que fez!

Ao Pesquero, pela amizade, pelo carinho, pelos momentos de descontração e por acreditar na minha capacidade;

Ao Dr. Egbert Tannich pela especial colaboração neste trabalho e pela agradável estadia em Hamburgo;

Ao professor Edward Félix, pela amizade, pelos ensinamentos e pelo carinho;

Aos professores da Pós-Graduação do Departamento de Parasitologia do ICB pelas sugestões, conselhos e ensinamentos.

Ao Joãozinho e a Edna, pelo aprendizado e pelo carinho; sem vocês a realização desse trabalho não seria possível!

A Sumara pela disponibilidade e competência na realização de procedimentos que facilitaram a realização deste trabalho;

Aos colegas e funcionários do Departamento de parasitologia ICB/UFMG pelo apoio e incentivo diários;

Aos meus amigos de laboratório e todos que aqui passaram, Haendel, Jú, Elisa, Rodolfo, Paulinha, Fred, Filipe, Renata, pelos bons momentos, pela convivência e pelo carinho.

A minha amiga e companheira de trabalho, Ângela, por todos os bons momentos e pelas horas de sufoco. Aprendemos muito juntas e não sei se teria conseguido sem você!

As minhas amigas Carina, Adriana, Veruska, por todos os momentos, pelas longas horas de conversa e pelo carinho;

Ao Sílvio Dolabella, pela inestimável amizade e pelos sete anos de convivência e carinho;

A Helen, pela disponibilidade e ajuda imprescindíveis na fase final de minha tese, pelas horas de conversa, pela amizade e carinho;

Aos amigos que conheci na Alemanha, Kathrin, Leandro, Luciano, Taís, Manuela e Henriete, apesar do pouco tempo, estarão guardados sempre em minha lembrança,

Aos meus pais, Paulo César e Nadja, pelos ensinamentos, pela força, incentivo e pelo amor incondicional que sempre nos uniu;

Aos meus irmãos, Paola e Kiko, que mesmo de longe, sempre me apoiaram e me deram muito amor;

Ao meu marido, Alexandre por todo amor e carinho que sempre me deu e principalmente por ter sido um companheiro paciente e sempre incentivador, tornando essa caminhada mais leve;

A todos que contribuíram direta e indiretamente para realização desse trabalho;

E finalmente á Deus, pelo amor, pela força e coragem para enfrentar os momentos difíceis, e por me permitir conhecer pessoas maravilhosas que tornaram mais agradável essa caminhada.

SUMÁRIO

1. Introdução	01
1.1 Amebíase.....	01
1.2 Morfologia e Biologia.....	02
1.3 Histórico e classificação.....	05
1.4 Epidemiologia e prevalência.....	07
1.5 Patogenia e virulência.....	10
1.5.1 O processo invasivo.....	10
1.5.2 Fatores moleculares envolvidos com virulência da ameba.....	11
1.6 Microarray.....	15
1.7 PCR em Tempo Real.....	17
1.8 Supressão por hibridização subtrativa.....	18
2. Justificativa	20
3. Objetivos	21
4. Material e métodos	23
4.1 Cepas de <i>E. histolytica</i>	23
4.2 Axenização das cepas polixênicas.....	24
4.3 Inoculação em fígado de hamster.....	24
4.4 Efeito citopático.....	25
4.5 Atividade de cisteil proteinase.....	26

4.6 Microarray.....	27
4.7 PCR em tempo real.....	32
4.8 Supressão por hibridização subtrativa.....	33
4.9 Clonagem dos cDNAs.....	41
4.10 Sequenciamento.....	43
4.11 RT-PCR.....	44
5. Resultados.....	46
5.1 Inoculação em fígado de hamster.....	46
5.2 Efeito citopático.....	47
5.3 Atividade de cisteil proteinase.....	48
5.4 Microarray.....	49
5.5 PCR em Tempo Real	52
5.6 Supressão por hibridização subtrativa.....	53
5.6.1. Obtenção de populações de cDNAs específicos.....	53
5.7 Clonagem.....	54
5.8 Sequenciamento.....	56
5.9 cDNAs que possivelmente codificam proteínas.....	56

5.10 Análise por RT- PCR.....	58
6. Discussão.....	59
7. Conclusão.....	70
8. Referências bibliográficas.....	71
9. Anexos.....	79

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Cisto e trofozoíto de *Entamoeba histolytica*.....03
- Figura 2-** Seqüências dos adaptadores e iniciadores utilizados na realização da técnica SSH.....35
- Figura 3.** Esquema da técnica SSH.....38
- Figura 4-** Mapa circular do vetor pGEM-T easy e pontos de referência na seqüência.....43
- Figura 5** – Fígados de hamster inoculados com trofozoítos das cepas 452, EGG e DRP de *E. histolytica*.....47
- Figura 6-** Percentagem de monocamadas de células CHO após inoculação com trofozoítos de *E. histolytica* (EGG, DRP, HM1, 32, 452).....48
- Figura 7-** Gráficos de Normalização para os canais verde e vermelho em todos os arrays.....50

Figura 8- Gel de agarose a 0,8% em TBE 1X representando os produtos digeridos com *RsaI*, antes e depois do processo de subtração, respectivamente.....54

Figura 9- Gel de poliacrilamida 5% corado pela prata mostrando os resultados do PCR das colônias de bactérias transformadas com fragmentos selecionados por SSH da cepa EGG.....55

Figura 10- Gel de poliacrilamida 5% corado pela prata, mostrando os produtos de restrição *EcoR1* dos plasmídeos obtidos nas mini preparações das diferentes colônias.....55

Figura 11- Estudo da expressão das quatro proteínas diferencialmente expressas em gel de poliacrilamida 5% mostrando os amplicons gerados pela técnica de RT-PCR para cada uma das proteínas.....58

LISTA DE QUADROS E TABELAS

- Quadro 1-** Cepas de *E. histolytica** e suas formas clínicas.....23
- Quadro 2-** Distribuição das cepas de *E. histolytica* quanto a sua coloração (cye3 e Cye5), nas lâminas de microarray.....28
- Tabela 1-** Desenvolvimento da lesão no fígado de hamster (*Mesocricetus auratus*) inoculados com trofozoítos de *E. histolytica* mantidas em cultivo axênico.....46
- Tabela 2-** Atividade específica de cisteil proteinase (mU/mg) nas diferentes cepas analisadas.....48
- Tabela 3-** Gene diferencialmente expresso nas cepas de *E. histolytica* EGG em comparação com a cepa HM1.....51
- Tabela 4-** Confirmação dos resultados PCR em tempo real.....52
- Tabela 5-** Identificação das possíveis proteínas codificadas pelos cDNAs específicos de cada uma das cepas de *E. histolytica*.....57

Lista de Abreviaturas

BAC	Primer direto e reverso da β - actina
CD	Colite disentérica
cDNA	DNA complementar obtido apartir do mRNA
CHO	Células do ovário de hamster chinês
CP	Cisteil proteinase
cp1,cp2,cp5	Cisteil proteinase 1, cisteil proteinase 2 e 5
CPf	Primer cisteil proteinase forward (direto)
CPr	Primer cisteil proteinase reverso
Cye3	Corante cyanine 3
Cye5	Corante cyanine 5
DEPC	dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	<i>Deoxynucleoside triphosphate</i> : dATP+dGTP+dCTP+dTTP
dUTP	<i>Deoxyuracyle triphosphate</i>
EDTA	<i>Ethyl-enediaminetetraacetic acid</i>
ESTs	<i>Expressed Sequence Tags</i>
Gal/GalNAc	Lectina de superfície amebiana,
IgA	Imunoglobulina da classe A
IgG	Imunoglobulina da classe G
IPTG	Isopropil- β - D- Tiogalactopiranosídeo
KCl	Cloreto de potássio
M	Massa molecular
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
pb	Pares de bases
pH	Potencial hidrogeniônico

PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PM	Peso molecular
SAGE	<i>Serial Analysis of Gene Expression</i>
SSH	<i>Suppression Subtractive Hibridisation</i>
RT-PCR	<i>Transcriptase reversa - Polymerase Chain Reaction</i>
TAE	Tampão Tris acetato EDTA
TBE	Tampão Tris borato EDTA
TE	Tampão Tris EDTA
X-gal	5 bromo-4-cloro-3-indolyl β - galactosídeo
WHO	<i>World Health Organization</i>

RESUMO

A amebíase é uma infecção humana causada pela *Entamoeba histolytica*, um parasita patogênico e invasivo que causa morte de cerca de 100.000 indivíduos por ano, causando principalmente, uma colite fulminante. Um dos aspectos mais interessantes na biologia amebiana é a grande variabilidade no potencial virulento das mesmas. A *E. histolytica* tem uma notável habilidade de destruir tecidos, apresentando assim um comportamento patogênico. Como esse comportamento não se estende por todas as cepas, as bases moleculares do processo de citotoxicidade têm sido muito investigadas. Dados da literatura sugerem que as Cisteil proteinases (CP) tem uma importante contribuição na invasão e destruição de tecidos pela *E. histolytica*.

Este trabalho tem como objetivo a caracterização da virulência em cepas de *E. histolytica* isoladas de diferentes casos clínicos e análise da expressão diferencial de genes possivelmente envolvidos com a virulência, utilizando as técnicas de supressão por hibridização subtrativa (SSH) e microarray.

Para isto, as cepas foram mantidas em cultura axênica e caracterizadas quanto a capacidade de produzir lesão em fígado de hamster, efeito citopático em células CHO e atividade de CP.

A expressão dos genes que codificam a CP das cepas foi analisada através da técnica de microarray, utilizando a cepa HM1 como controle, para esse estudo foram selecionadas duas cepas de *E. histolytica* isoladas de pacientes assintomáticos (452 e 32) e três cepas isoladas de pacientes sintomáticos (EGG, HM1 e DRP). Os resultados do microarray foram confirmados pela técnica de PCR em tempo real. Para a análise da diferença de expressão pela técnica de SSH foram utilizadas a cepa mais virulenta, EGG e a menos virulenta, 452. Esta metodologia combina a hibridização de cDNA com a técnica de PCR e permite a seleção de genes com expressão diferenciada nas amostras analisadas.

Nossos resultados demonstraram que a caracterização das cepas, tanto, *in vivo* quanto *in vitro*, concordavam com os sintomas clínicos dos pacientes de onde as cepas foram obtidas. Foi observada uma grande variação na virulência entre as cinco cepas analisadas, no entanto, nossos resultados demonstraram diferença estatística na expressão apenas no gene CP1, para as cepas EGG e HM1.

Em nossos resultados de subtração identificamos 9 fragmentos de cDNAs, os quais apresentaram alta homologia a genes já previamente seqüenciados do genoma de *E. histolytica*. Mas apenas quatro destes genes foram confirmados pela RT-PCR. Dentre eles estão duas proteínas hipotéticas e uma proteína rica em cisteína, sendo expressos na cepa EGG e a proteína Grainin 2 expressa na cepa 452.

Os resultados do microarray sugerem que as funções de avaliação da virulência realizadas neste estudo têm pouca relação com a expressão de cisteil proteinase. A técnica de SSH foi uma boa ferramenta para identificação rápida de novos genes diferencialmente expressos e a análise desses genes pode expandir a compreensão sobre a patogênese amebiana, identificando genes que podem constituir alternativas como alvo para o desenvolvimento de novos fármacos e novas técnicas de diagnóstico.

ABSTRACT

Amoebiasis is a human infection caused by *Entamoeba histolytica*, an invasive pathogenic parasite that causes the death of 100.000 of people per year, mainly by fulminant colitis. One of the most important aspects of this parasite biology is the great variability in the virulent potential of them. The *E. histolytica* have a notable capacity of destroy tissues, presenting a pathogenic behavior. Because this behavior is not shared by all strains, the molecular basis of the cytotoxicity process had been exhaustively investigated. Data from the literature suggest that the cysteine proteases (CP) have a great importance in the tissues invasion and destruction by the *E. histolytica*.

This work have as main objective the *E. histolytica* strains virulence characterization isolated from different patients and analyses of differential expression of genes that probably are involved in the *E. histolytica* virulence using Suppression subtractive hybridization (SSH) and microarray techniques. To perform this work, the strains were kept in axenic cultures and characterized by their damage capacity in the guinea pig liver, cytopathic effect in CHO cells and CP activity.

The genes expression that codify the CP from studied strains were analyzed by microarray technique, using HM1 strain as control. We selected two strains from asymptomatic patients (452 and 32) and tree strains isolated from symptomatic patients (EGG, HM1 and DRP). The microarray results were confirmed by real time PCR. To analyze the differential expression by SSH technique, we used the most (EGG) and the less (452) virulent strains. This methodology combines the cDNA hybridization with the PCR technique and permits the genes selection with differential expression in the analyzed samples.

Our results demonstrated that strains characterization as *in vivo* as *in vitro*, agreed with the patients clinical symptoms from where the strains

were obtained. We noted a great variation in the virulence among the five analyzed strains, nevertheless, our results showed statistical differences in the expression only in the CP1 gene to EGG and HM1 strains.

Our subtraction results identified nine fragments from cDNAs that represent a high homology in previously sequenced genes from *E. histolytica* genome. However, just four genes were confirmed by RT-PCR. Among them we found two hypothetical proteins, one protein rich in cysteine been expressed in the EGG strains and the Grainin 2 protein expressed in the 452 strain. Results from microarray technique suggest the virulence present a low relation with Cisteil proteases relation. The SSH technique was a great tool to a quick identification of new genes differentially expressed and we believe that analysis of these genes can expand the comprehension about the amebiasis pathogenesis, identifying genes that can constitute new targets to development of drugs and diagnostic techniques.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Amebíase

A *Entamoeba histolytica* é o agente etiológico da amebíase hepática (abscesso amebiano) e da colite amebiana, sendo causadora de infecções humanas em escala global culminando em sofrimento e morte. Anualmente cerca de 50 milhões de pessoas apresentam doença na forma invasiva, resultando em 100.000 óbitos, sendo assim, a segunda causa mais comum de morte por doenças parasitárias em humanos (WHO, 1997).

Em muitas infecções de *E. histolytica* o parasito vive como comensal no intestino, sendo o indivíduo infectado considerado portador assintomático. Os pacientes sintomáticos apresentam formas invasoras, que são responsáveis por alterações intestinais e extraintestinais (Que & Reed, 1997), caracterizadas por uma grande diversidade de quadros clínicos. A amebíase intestinal pode determinar colite não disentérica, colite disentérica, amebomas, apendicite e amebíase extra-intestinal, podendo, algumas vezes, ocorrer infecção de órgãos como pulmão, cérebro, baço, rim e outros.

A colite amebiana não disentérica é característica da forma intermediária da amebíase (Cunha *et al.*, 1977). Nesta, as manifestações clínicas são marcadas por evacuações diarréicas ou não, em alternância com períodos de funcionamento normal do intestino. A colite amebiana disentérica é caracterizada por cólicas intestinais e diarréia muco-sanguinolenta, acompanhadas de tenesmo e tremores de frio. O indivíduo é acometido de diarréia com evacuações freqüentes, chegando a mais de dez vezes por dia, com fezes líquidas e muco-sanguinolentas. As formas agudas, fulminantes de colite disentérica, podem ser resultado da confluência das úlceras com necrose de grandes porções, muitas vezes com contaminação por bactérias do trato intestinal, culminando em perfurações múltiplas.

A apendicite por ameba é decorrente da ulceração ceco-apendicular, seguida de processo inflamatório do apêndice. O ameboma é encontrado no ceco, geralmente em lesão única, resultante da junção de várias úlceras, formada por massas granulomatosas que podem ser confundidas com neoplasias.

A manifestação extraintestinal mais comum da doença ocorre no fígado, onde a *E. histolytica* provoca necrose de expansão lenta, erroneamente chamada de abscesso, pois não há formação de membrana piogênica e de pus. Há sim uma necrose coliquativa do parênquima em consequência da ação enzimática das amebas, com cavidades contendo um líquido amarelado, esverdeado ou amarronzado, pelo pigmento biliar (Silva, 1997). A necrose amebiana do fígado pode provocar dores brandas na base do pulmão e no fígado, hepatomegalia, febre, tosse e dores abdominais (Petri *et al.*, 2002; Stanley, 2003). Esta fase é caracterizada por anorexia, anemia leve, leucocitose sem eosinofilia, altas taxas de eritrócitos, entre outros (Stanley, 2003). Os indivíduos infectados podem apresentar a doença hepática meses ou anos após a infecção, sendo que geralmente não apresentam cistos nas fezes e nem infecção no intestino.

1.2. Morfologia e biologia

A *E. histolytica* apresenta em seu ciclo de vida quatro estágios evolutivos, trofozoítos, pré-cistos, cistos e metacistos. Os cistos e trofozoítos são fases bem definidas do parasito e os pré-cistos e metacistos, fases intermediárias. O pré-cisto é uma forma intermediária entre o trofozoíto e o cisto, são ovais e menores que o trofozoíto e o metacisto é o estágio anterior à formação dos trofozoítos maduros.

Os cistos (fig. 1-A) são esféricos e medem de 8 a 20 μm de diâmetro, apresentam em seu envoltório uma parede refratária, formada de quitina, bastante rígida. Os núcleos variam em número de um a quatro, apresentam vacúolo de glicogênio, corpos cromatóides em forma de bastonetes. O núcleo é vesicular e esférico, sendo regularmente revestido

com grânulos de cromatina, apresentando cariossoma pequeno e situado no centro do núcleo.

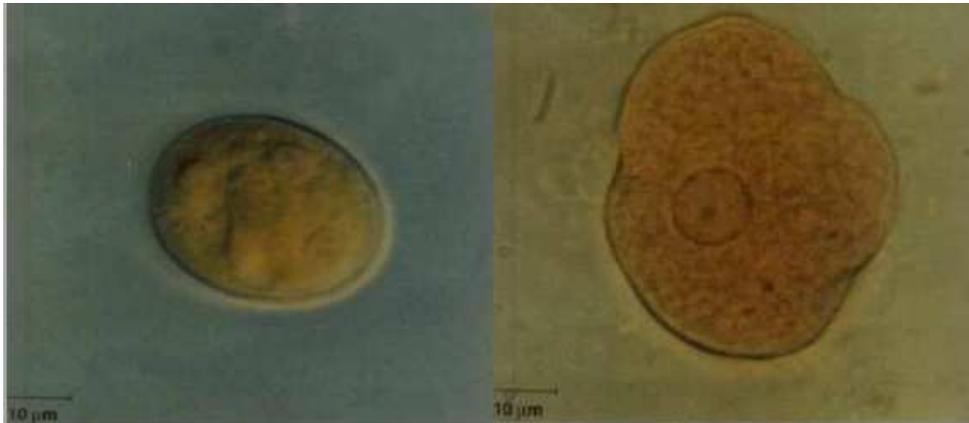


Figura 1- Cisto (A) e trofozoíto (B) de *Entamoeba histolytica*.

O metacisto é uma ameba tetranucleada, liberada pelo cisto por um mecanismo ainda não elucidado, que após uma série de divisões nucleares e citoplasmáticas irá originar quatro e depois oito amebas uninucleadas, denominadas de trofozoítos metacísticos. Os trofozoítos da *E. histolytica* (figura 1- B), ao contrário dos cistos, são móveis, unicelulares e seu tamanho varia entre 10 a 40 µm, podendo chegar a 60 µm nas formas invasivas. Apresentam geralmente um só núcleo, que mede de 4 a 7 µm, com cariossoma também central, membrana nuclear delgada e cromatina uniforme sob a forma de finos grânulos na periferia da carioteca. São pleomórficos e muito ativos na captação de alimentos (fagocitose). O citoplasma é diferenciado em ectoplasma claro e hialino e endoplasma granuloso, contendo vacúolos. Quando isolado de infecções invasivas seu citoplasma pode se apresentar repleto de eritrócitos.

A locomoção das amebas se dá através de pseudópodes e a energia para a constante movimentação provém da conversão anaeróbica da glicose e piruvato para, principalmente, etanol (Stanley, 2003). A ingestão de alimentos se dá por fagocitose e pinocitose (Martinez-Palomo, 1988).

Os estudos sobre a ultraestrutura dos trofozoítos mostraram que a *E. histolytica* não apresenta retículo endoplasmático, complexo de golgi, centríolos, microtúbulos e mitocôndria clássica, sendo a energia derivada de processo fermentativo (Stanley, 2005). Mesmo assim, a *E. histolytica* é considerada uma célula eucariótica, pois apresenta o DNA confinado envolto em uma membrana nuclear. Interessantemente os ribossomos são arrançados em hélices no citoplasma, sendo denominados de corpos cromatóides (Lohia, 2003).

Como alguns protozoários parasitas, a *E. histolytica* tem o ciclo de vida simples e apresenta, como hospedeiro natural, somente o homem e outros primatas (Stanley, 2003). A infecção geralmente começa através da ingestão de cistos junto com água e/ou alimentos contaminados com fezes de humanos. Os cistos sobrevivem à ação do suco gástrico e chegando ao final do intestino delgado ou início do grosso, onde a tensão de oxigênio é baixa, através de uma pequena fenda na parede cística, liberam o metacisto que sofre sucessivas divisões nucleares e citoplasmáticas, dando origem a quatro e depois oito trofozoítos, chamados trofozoítos metacísticos. Estes normalmente residem no intestino grosso, aderidos ao muco colônico e às células epiteliais. A *E. histolytica* geralmente persiste por meses ou anos no intestino como comensais, no entanto, ocasionalmente o parasita penetra na mucosa do intestino, induzindo a colite ou se disseminando para outros órgãos.

Ao contrário de alguns protozoários parasitas, a invasão de tecidos por *E. histolytica* não parece fazer parte do seu ciclo de vida. Nos tecidos, o trofozoíto não se diferencia em cisto e não é transmitido a outros hospedeiros.

Para completar o ciclo normal, os trofozoítos se desprendem da mucosa e caem na luz intestinal, se diferenciando em pré-cistos. O encistamento ocorre no cólon e o ciclo de vida se completa quando o cisto infeccioso é eliminado juntamente com as fezes para o meio ambiente. Os fatores que determinam o encistamento não são bem conhecidos.

Os cistos, dependendo das condições ambientais, permanecem infectantes de semanas a meses (Ravdin, 1988). Os trofozoítos não têm importância na transmissão da amebíase, pois, são destruídos quando expostos a enzimas e ao ácido clorídrico do trato gastrointestinal (Martinez-Palomo, 1988). Os trofozoítos se multiplicam por reprodução assexuada e foram, por um longo tempo, classificados como amitóticos. No entanto, com o projeto genoma da *E. histolytica* descobriu-se que existem genes homólogos àqueles requeridos na mitose de organismos eucariotos, surgindo assim, mais uma questão a ser resolvida na amebíase (Lohia, 2003; Stanley, 2005).

1.3. Histórico e classificação

Lambl, em 1860, registrou pela primeira vez a infecção de humanos por ameba, tendo a encontrado em fezes de uma criança com disenteria. Depois, em 1871, Cunningham isolou esse protozoário das fezes diarréicas de um indivíduo com cólera, na Índia, associando o mesmo a essa enfermidade. Posteriormente, Lösch também encontrou amebas nas fezes de um camponês que apresentava disenteria, diarréia, dor abdominal e febre, e infectou cães com as fezes deste paciente. A autópsia dos cães revelou amebas e um intenso processo ulcerativo no intestino grosso dos mesmos. Estas foram denominadas de *Amoeba coli* (Lösch, 1875).

No século 19, Kartulius e Koch, estudando pacientes com quadro de disenteria tropical, atribuíram essa enfermidade às amebas (Kartulius, 1886; Köch & Graffki, 1887).

A descrição patológica da invasão do intestino e do fígado pelas amebas foi realizada por Councilman e Lafleur, que foram os primeiros pesquisadores a usarem as expressões “abscesso amebiano do fígado” e “disenteria amebiana” (Councilman & Lafleur, 1891).

Os cistos do parasito foram descritos por Quincke e Ross, que atribuíram aos mesmos a forma infectante da *Entamoeba*, além de terem identificado diferentes espécies de amebas que poderiam viver no cólon

humano (Qunicke & Ross, 1893). Em 1903, Schaudinn demonstrou a existência de dois tipos de ameba infectando o homem, uma patogênica e outra não, denominando a forma não patogênica de *Entamoeba coli* e a patogênica de *Entamoeba histolytica*, devido a sua extraordinária habilidade de lisar tecidos (Schaudinn, 1903). No entanto, esta habilidade não se estende a todas as cepas do parasito. Ao contrário, na maioria das infecções o parasito se comporta como não invasivo.

Assim, várias postulações foram feitas para explicar esta variabilidade da virulência amebiana. As três hipóteses mais importantes foram:

- Teoria unicista (Dobell, 1919) - Postula que toda *E. histolytica* seria invasiva, ou seja, capaz de produzir lesões no tecido. Entretanto, algumas amebas pouco invasivas causariam sintomas pouco intensos que passariam despercebidos pelo indivíduo infectado.
- Teoria dualista (Brumpt, 1925) – Postula a existência de duas espécies morfológicamente semelhantes, a *E. dysenteriae*, patogênica, responsável pela forma sintomática da doença e a *E. dispar*, comensal. Esta teoria não foi muito aceita na época, devido a inexistência de métodos para distinguir as espécies.
- Teoria neodualista ou pluralista (Hoare, 1961)- Postula que a *E. histolytica* possui uma variabilidade no seu potencial patogênico e que existem cepas com diferentes graus de virulência, causando desde infecções assintomáticas até formas graves da doença.

Dentre as teorias propostas a pluralista era a mais aceita até o século XX. Depois dessa época a teoria dualista começou a ganhar adeptos, devido a observações feitas por Sargeant e colaboradores que observaram diferenças no perfil enzimático de isolados patogênicos e não patogênicos, sendo correlacionados com a forma clínica e parâmetros biológicos de *E. histolytica* (Sargeant, 1982).

Outros autores estabeleceram diferenças entre isolados patogênicos e não patogênicos, principalmente em nível molecular, levando o comitê de peritos da Organização Mundial de Saúde (WHO, World Health Organization) em 1997, a apoiar a teoria dualista.

Apesar da *E. histolytica* e da *E. dispar* serem morfologicamente idênticas, filogeneticamente relacionadas (aproximadamente 98% do RNA ribossômico-rRNA é idêntico) e apresentarem hospedeiros e estágios de desenvolvimento semelhantes, estas duas espécies são muito diferentes considerando a patogenicidade *in vivo*. Ambas colonizam o intestino humano, mas somente a *E. histolytica* é capaz de causar a doença, sendo a *E. dispar* não patogênica (MacFarlane *et al.*, 2005). Portanto, a maioria dos casos assintomáticos de infecção por amebas tetranucleadas, antes considerados como sendo causados pela *E. histolytica*, são agora atribuídos à *E. dispar* (WHO, 1997). A confirmação da existência da *Entamoeba dispar* é talvez uma das constatações mais importantes atualmente na pesquisa em amebíase.

1.4. Epidemiologia e prevalência

Estimava-se que aproximadamente 10% da população mundial estivesse infectada com *E. dispar* ou *E. histolytica* (Rakel, 1998). Entretanto, estudos epidemiológicos indicam que a maioria dos indivíduos infectados com *E. histolytica/E. dispar* não desenvolvem a doença na forma invasiva. Aproximadamente 90% são assintomáticos, 10% apresentam colites amebianas e 1% desenvolvem o abscesso amebiano no fígado (Gathiram & Jackson, 1985; Walsh, 1986).

A colite amebiana tem sido geralmente reportada em crianças e adultos de ambos os sexos. No entanto o abscesso amebiano é mais prevalente em homens na faixa de 18 a 50 anos. A razão para essas diferenças na taxa de infecção da amebíase hepática não é conhecida, mas especula-se que efeitos hormonais e o alto consumo de álcool sejam possíveis fatores (Stanley, 2003).

A prevalência de *E. histolytica* na população homossexual é alta, variando de 20 a 30% nos homens.

A amebíase possui distribuição cosmopolita, com maior prevalência nas regiões tropicais e subtropicais, onde ocorre com maior gravidade. Essa incidência parece não estar relacionada com os fatores climáticos, mas sim com as precárias condições de higiene e educação sanitária, fruto do subdesenvolvimento dessas regiões. Em regiões subdesenvolvidas, onde as barreiras entre fezes humanas, água e comida são inadequadas, a amebíase constitui um alto risco à saúde. De acordo com a WHO (1997), estima-se que na América existam aproximadamente 95 milhões de infectados, 10 milhões de enfermos e até 30 mil mortes anuais. A amebíase constitui problema de saúde pública no México, Índia, Bangladesh, leste e sul da África, Vietnã e América do Sul (Zlobl, 2001).

Atualmente, a verdadeira prevalência e incidência da *E. histolytica* é especulativa, devido à existência da *E. dispar* e das dificuldades ainda presentes na diferenciação das duas espécies. No México, 15% dos casos de crianças com disenteria aguda estão associados a *E. histolytica* (Gutierrez, 1986), sendo a população deste país a mais atingida pela doença tanto na forma intestinal quanto assintomática (Biagi & Beltran, 1969; Sepulveda, 1976). E, de acordo com Crevenna e colaboradores (1972), o abscesso amebiano no fígado chegou a ocupar o 4º lugar entre as causas de morte na cidade do México.

Nos EUA, muitos dos casos de amebíase, resultaram de imigrantes de áreas endêmicas. Em 1993, 2970 casos de amebíase foram relatados nos EUA, destes 33% de imigrantes vindos do México, América Central e do Sul e 17% vindos da Ásia e Ilhas do Pacífico (Stanley, 2003). Barwick e colaboradores (2002) relataram um surto epidêmico ocorrido recentemente na República da Geórgia, através de contaminação fecal na rede pública de abastecimento de água.

A Ásia é o continente com maior número de pessoas infectadas apresentando 300 milhões de infectados e até 50 mil mortes anuais (WHO,

1997). Em Hue, uma cidade com aproximadamente 1 milhão de pessoas no Vietnã, foram identificados, em um único hospital, 1500 casos de amebíase hepática no intervalo de 5 anos (Pham *et al.*, 1996).

A África apresenta uma alta incidência de amebíase invasiva, apresentando 85 milhões de infectados e até 20 mil mortes por ano (Guerrant, 1986).

O subdesenvolvimento e o clima podem favorecer, mas não determinar a ocorrência de casos mais graves nestas regiões, pois países como o Brasil, subdesenvolvidos e de clima tropical, apresentam prevalência maior de amebíase assintomática. De acordo com Cunha (1975) as formas de colite disentérica são pouco freqüentes no Brasil, havendo predominância da forma de colite não disentérica. Assim, é provável que a *E. dispar* seja mais freqüente que a *E. histolytica* em nosso meio, sendo que a prevalência varia de 4 a 40% dos casos de amebíase (Braga *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2005). No entanto, considerando a alta percentagem de assintomáticos infectados com *E. histolytica* no Brasil (Gomes *et al.*, 1999) as distribuições da *E. dispar* e da *E. histolytica* devem ser determinadas. No sul e sudeste do país, a prevalência de amebíase varia de 2,5 a 11%. Já na região Amazônica, ocorrem casos mais graves da infecção e estes chegam a representar 19% entre os infectados (Araujo *et al.*, 1988).

No hospital universitário Getúlio Vargas de Manaus (AM) foram relatados vários casos de amebíase hepática, sendo maior a predominância dos casos sintomáticos de colite não disentérica (65,2%) que os casos assintomáticos (34,8%). Também em Manaus, Benetton e colaboradores (2005) encontraram uma prevalência de 21,5% de indivíduos infectados por *E. histolytica*/*E. dispar* e destes apenas 1,5% foram por *E. histolytica*. Recentemente, foi encontrada, na grande Belém/PA, uma prevalência de 29,35% de *E. histolytica*, tendo sido demonstrada uma relação significativa entre a presença de *E. histolytica* e o desenvolvimento de diarreia e cólicas intestinais em pacientes residentes nesta cidade (Silva *et al.*, 2005).

1.5. Patogenia e virulência

Há décadas atrás, Walker e Sellards (1913), demonstraram diferenças na resposta individual de voluntários infectados com cistos provenientes de um único paciente com disenteria amebiana. Ocorreram manifestações clínicas, que variaram de assintomáticas a colites disentéricas. Desde então, investigadores têm questionado porque alguns hospedeiros são mais susceptíveis a amebíase que outros. Hoje se sabe que a citotoxicidade observada nas cepas de *E. histolytica* é indiscutivelmente, um evento multifatorial. Várias teorias têm sido propostas para tentar explicar a disparidade entre as diferentes manifestações clínicas. Sabe-se que o potencial patogênico das cepas de *E. histolytica* e a resposta imune dos hospedeiros contribuem para a gravidade da doença. De acordo com Petri (2002), interações entre trofozoítos de *E. histolytica* com glicoproteínas da mucosa intestinal humana e com a microbiota bacteriana residente no intestino também são importantes.

1.5.1. O processo invasivo

A invasão do tecido pela *E. histolytica* se inicia quando lectinas de superfície interagem com resíduos de carboidratos, aderindo-se na mucosa do intestino do hospedeiro. Através de movimentos amebóides os trofozoítos atravessam a mucosa degradando a matriz extracelular (Keene *et al.*, 1986; Reed *et al.*, 1989; Scholze *et al.*, 1986). Depois, atingem a submucosa e deslocam-se longitudinalmente através da mesma. Tal deslocamento gera uma grande zona de necrose liquefativa que acaba por promover o deslocamento da mucosa e o surgimento de uma úlcera. O desprendimento de várias áreas de mucosa normal promove a coalescência de várias úlceras. Mediadores químicos, liberados pelos tecidos normais e necrosados, estimulam a migração principalmente de neutrófilos, macrófagos e linfócitos, que se acumulam nas bordas da lesão dando

início a uma cascata de eventos, que leva a destruição e morte de células do hospedeiro.

1.5.2. Fatores moleculares envolvidos com a virulência da ameba

Utilizando uma ampla variedade de modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*, diferentes tipos de moléculas amebianas têm sido sugeridos como agentes indutores de destruição celular, a saber: adesinas, amebaporos, collagenases, cisteil proteinases (CPS), serino proteinases e fosfatases (Leippe *et al.*, 1993; Lopez-Vancell *et al.*, 2000; Que & Reed, 2000; Tavares *et al.*, 2005). Essas proteínas e outros antígenos de superfície do parasita são potenciais alvos para vacinas.

Gal/GalNac lectina

A lectina de superfície amebiana Gal/GalNac é responsável pelo reconhecimento do açúcar galactose e N-acetyl galactosamina nas células do hospedeiro (Stauffer & Ravdin, 2003). Essa lectina é composta de três subunidades, uma subunidade leve de 31-35 kDa, uma pesada de 170 kDa, ambas ligadas por pontes dissulfeto e uma intermediária de 150 kDa ligada não-covalentemente. A sub-unidade pesada é uma cadeia transmembrana que consiste de um domínio extracelular dividido em três regiões baseadas na sua seqüência de aminoácidos, e um domínio citoplasmático carboxi-terminal formado por 41 aminoácidos. Tem sido demonstrado, *in vitro*, que a cadeia transmembrana participa da aderência do trofozoíto a várias células-alvo (Ankri *et al.*, 1999a; Pacheco *et al.*, 2004).

Outras proteínas que participam da aderência também têm sido identificadas (Huston, 2004), mas a lectina Gal/GalNac tem sido considerada o maior fator de virulência da *E. histolytica*, definindo o momento da invasão (Tavares *et al.*, 2005).

Amebaporos

A partir da década de 80 foi descoberto que a ameba produz um peptídeo capaz de formar canais de íons ou poros em membranas lipídicas e de despolarizar as células alvo, denominado amebaporo. São peptídeos membranolíticos de 77 aminoácidos, massa molecular em torno de 13 kDa, armazenados no interior de grânulos citoplasmáticos dos trofozoítos (Leippe, 1997). Quando liberada ao meio de cultivo tem capacidade de incorporar-se às bicamadas lipídicas, sem a necessidade de um receptor específico, formando poros permeáveis a íons (Lynch *et al.*, 1982).

A inibição da expressão do amebaporo em trofozoítos de *E. histolytica* reduziu expressivamente a capacidade lítica sobre hemácias e células renais de hamster, bem como a capacidade de produzir zonas de necrose liquefativa em hamster (Bracha *et al.*, 1999).

Cisteil proteinases

Outro grupo de proteínas muito estudado nas amebas é o das cisteil proteinases, que são enzimas proteolíticas presentes nos organismos eucariontes. São as principais enzimas encontradas nos lisados de *E. histolytica* e consideradas como um dos fatores mais importantes de virulência (Que & Reed, 2000). Têm sido associadas a citoaderência, hemólise, citotoxicidade, degradação de componentes da matriz extracelular, evasão da resposta imune e aquisição de nutrientes (Ocadiz *et al.*, 2005).

Tais enzimas hidrolizam o colágeno, elastina, fibrinogênio e laminina, eliminando obstáculos mecânicos para que os trofozoítos possam invadir os tecidos. As cisteil proteinases também ativam a via alternativa do complemento através da hidrólise do componente C3. Estas proteinases degradam C3a e C5a, além de IgA e IgG. A escassez de neutrófilos ao redor das zonas de necrose liquefativa pode ser explicada pela hidrólise de C3a e C5a (Que *et al.*, 2002). Outros mecanismos eficazes de evasão e inativação utilizados pelos trofozoítos são a inibição da ativação de macrófagos e da expressão do complexo maior de

histocompatibilidade da classe II (MHC-II) (Huston, 2004). A adição de laminina em cultura de trofozoítos de *E. histolytica* bloqueia a ligação de CPs à matriz extracelular, reduzindo significativamente a formação de lesões hepáticas (Li *et al.*, 1995).

Vários dados experimentais indicam que as CPs parecem ser realmente responsáveis por um número de efeitos considerados importantes para a patogenicidade da *E. histolytica*. Keene e colaboradores (1990) demonstraram, através de estudo citopático, utilizando-se de ZFA-CH₂F, um inibidor específico de CPs, que a patogenicidade da *E. histolytica* está diretamente relacionada à atividade de enzimas desta família. Stanley e colaboradores (2001) também demonstraram que o tratamento com o inibidor de CPs E-64 bloqueou ou reduziu significativamente a formação de abscesso hepático em ratos. Além disso, as CPs ativam a enzima conversora de interleucina 1 (IL-1), estimulando sua produção e contribuindo para o desenvolvimento da resposta inflamatória (Zhang *et al.*, 2000). A inibição da expressão das CPs não afeta o efeito citopático ou a atividade hemolítica dos trofozoítos de *E. histolytica*, mas inibe sua capacidade de fagocitar (Ankri *et al.*, 1998). Esta inibição também interfere no ciclo biológico e no metabolismo do parasito, sugerindo que as CPs tem papel importante na fisiologia e são essenciais para sobrevivência do mesmo (Olivos-Garcia *et al.*, 2003).

Até 2003 apenas 8 genes que codificam para cisteil proteinase tinham sido indentificados (*cp1* a *cp7* e *cp112*)(Bruchhaus *et al.*, 1996b; Garcia-Rivera *et al.*, 1999; Reed *et al.*, 1993). Em 2003, Bruchhaus e colaboradores, encontraram 12 novos genes de CPs em *E. histolytica*, e através de análises de Northern Blot comparativo, avaliaram os 20 genes de CP existentes e detectaram que somente alguns são expressados em culturas de trofozoítos. Sendo os genes que codificam para *cp1*, *cp2* e *cp5*, além de mais altamente expressos, responsáveis por no mínimo 90% da atividade total das cisteil proteinases na cultura de *E. histolytica*.

Os genes *cp2*, *cp3*, *cp4* e *cp6* foram encontrados tanto em *E. histolytica* como em *E. dispar* com uma similaridade de 95% em suas seqüências. Já os genes *cp1* e *cp5* não foram inicialmente, encontrados na *E. dispar* quando analisados pelo método de Southern blot (Bruchhaus *et al.*, 1996a). De acordo com outros autores (Freitas *et al.*, 2004; Wilihoeft *et al.*, 2001), o gene *cp5* na *E. dispar* está altamente degenerado e não contém estruturas do tipo “open reading frame” (ORF), sugerindo que ele esteja não funcional por um considerável período de tempo na evolução das amebas não patogênicas. A localização da *cp5* na superfície da ameba, associada a sua ausência na *E. dispar*, faz com que ela seja uma excelente candidata à molécula chave na capacidade invasiva da *E. histolytica* (Jacobs *et al.*, 1998). De acordo com Ankri (1999a), trofozoítos de amebas transfectadas com DNA antisense do gene que codifica para *cp5* apresentaram uma redução de 90% na atividade total de CPs, o que amenizou o desenvolvimento de lesões hepáticas intensas em fígado de hamsters e reduziu a capacidade de eritrofagocitose amebiana. Uma interessante hipótese para a função primária de todas as CPs pode ser a digestão de nutrientes. Entretanto, a *cp5* e a *cp112*, que são localizadas na superfície e excretadas pela ameba, podem ser importantes na invasão de tecidos do hospedeiro pelo trofozoíto (Que *et al.*, 2002).

Mais recentemente, com a descrição do genoma da ameba, dez novas CPs com N-terminais preditos como ancoras de membranas, foram identificadas na *E. histolytica* (Loftus *et al.*, 2005). Assim, existem mais de 30 genes ligados a CP neste organismo (Sato *et al.*, 2006). Entretanto pouco se sabe a respeito de suas posições na membrana.

Trabalhos recentes têm demonstrado que cepas de *E. histolytica* com diferentes graus de virulência apresentam diferentes níveis de expressão entre cisteil proteinases (Bruchhaus *et al.*, 1996b; MacFarlane & Singh, 2006; Que & Reed, 1997; Tannich, 1998).

A despeito desses e outros estudos, concluímos que muito ainda falta ser elucidado sobre a citotoxicidade amebiana. Estudos de análise da expressão e diferenciação gênica em amebas isoladas de diferentes casos clínicos podem contribuir para uma melhor compreensão da biologia deste parasita. O desenvolvimento de “projetos genoma” proporcionou o avanço no conhecimento do genoma de vários organismos, possibilitando a utilização de técnicas de identificação e quantificação de seqüências gênicas específicas. Além disso, a construção da biblioteca genômica da *E. histolytica* possibilitou a identificação de vários genes que podem ser importantes como fatores de virulência.

Várias metodologias para a análise da expressão diferencial de genes vêm sendo empregadas para identificar genes envolvidos no processo da invasão amebiana. E novas técnicas de expressão diferencial de genes estão sendo descritas como a análise comparativa de ESTs (“Expressed Sequence Tags”), SAGE (“Serial Analysis of Gene Expression”), Geneship, a hibridização subtrativa e o microarray. Para isto utilizaremos no presente trabalho, duas novas técnicas de determinação da expressão diferencial de genes, o microarray e a supressão por hibridização subtrativa (SSH).

1.6. Microarray

O microarray tem revolucionado a era pós-genômica. Esta técnica foi descrita no final da década de 90 e se tornou o método de escolha no monitoramento da expressão gênica de larga escala (Granjeaud *et al.*, 1999). É utilizada para se determinar padrões de expressão diferencial, comparando diferenças nos níveis de RNAm entre células idênticas submetidas a diferentes estímulos ou entre diferentes tipos celulares ou estágios de desenvolvimento. Esta técnica apresenta uma série de características vantajosas, tendo se tornado o método mais comumente usado para comparar padrões de expressão gênica (MacFarlane *et al.*, 2005). O microarray tem sido utilizado em diversas linhas de estudo

incluindo interação parasito-hospedeiro, doenças auto-imunes, investigações de processos celulares, etc. Vários estudos de expressão gênica, empregando o microarray, foram desenvolvidos em células humanas (Loftus *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999), de plantas (Schena *et al.*, 1995), camundongos (Tanaka *et al.*, 2000), animais domésticos (Araújo, 2003) entre outros.

Cada gene representado na lâmina é denominado de elemento e se constitui em uma sonda (probe) de um experimento do microarray. O cDNA obtido a partir do RNAm de duas diferentes amostras é marcado com moléculas repórteres fluorescentes diferentes e empregado na hibridação comparativa na lâmina onde se encontram depositados os fragmentos de genes conhecidos, arranjados em forma de matrizes (spots). Após período de hibridização, a lâmina é iluminada com luz (lazer ou luz branca filtrada) na frequência que excita os corantes (um de cada vez) e o resultado da excitação é digitalizada para formar a imagem do microarray. A imagem é segmentada e a intensidade dos pixels de um determinado grupo de fragmentos do mesmo gene é usado para estimar a quantidade do gene hibridizado em cada spot. Após isso se faz a análise matemático-estatística dos dados gerados utilizando-se um programa de análise das imagens, determinando-se o nível de expressão dos genes.

O microarray é já foi utilizado na análise de genes de parasitas como *Trypanosoma brucei* (El-Sayed *et al.*, 2000), *Trypanosoma cruzi* (Bartholomeu, 2002) e *Entamoeba histolytica* (Debnath *et al.*, 2004; MacFarlane *et al.*, 2005). Macfarlane e colaboradores (2005), utilizaram esta técnica para obter um perfil de expressão gênica comparativa entre *E. histolytica* e *E. dispar*. Amebas expostas a colágeno e cálcio apresentaram baixa expressão dos genes que codificam as proteínas Hsp70, amebaporos e cisteil proteinases. O grupo de Guillen do Instituto Pasteur, desenvolveu um microarray baseado em seqüências de cDNAs de aproximadamente 1300 genes da ameba e têm usado o mesmo no desenvolvimento de um perfil transcripcional de *E. histolytica* durante a invasão hepática. Os

resultados desses experimentos demonstraram o potencial do microarray nos estudos do genoma funcional e a possibilidade da sua aplicação nos estudos dos mecanismos moleculares envolvidos com a patogenicidade (Weber *et al.*, 2006).

1.7. PCR em Tempo Real

O PCR em tempo real é, das técnicas recentes de genética molecular a que mais tem permitido levar esta disciplina para as bancas do Laboratório de análises Clínicas. As suas principais vantagens são a grande rapidez, se executado em equipamentos “*fast-cycling*” e a enorme sensibilidade e especificidade. Com o PCR-em-tempo-real, é possível detectar a existência de um patógeno, ou de um gene humano, quantificar o patógeno, ou o número de cópias do transcrito humano numa dada amostra, bem como caracterizar a presença de mutações/polimorfismos no patógeno ou no genoma do indivíduo em estudo. Outras aplicações especialmente úteis para PCR é a clonagem de um determinado fragmento de DNA que pode ser um gene e o conhecimento do DNA codificante (cDNA) obtido a partir da molécula de RNA, o que permite o estudo da expressão de genes. Além disso, alguns pesquisadores como Davis e colaboradores (2006) e Weber e colaboradores (2006), têm utilizado essa técnica como validação de resultados de técnicas que comparam padrões de expressão gênica como microarray. No presente trabalho utilizaremos esta técnica com o mesmo intuito desses autores, confirmar a diferença de expressão entre os genes analisados no microarray.

1.8. Supressão por hibridização subtrativa

A técnica de supressão por hibridização subtrativa (SSH), começou a ser utilizada em 1996 por Diatchenko e colaboradores, se baseia na identificação de genes que são expressos apenas em células e tecidos de interesse, combinando hibridizações de cDNA com a reação em cadeia da polimerase (PCR). É uma técnica com uso ainda restrito. Tem sido utilizada como importante ferramenta na caracterização de genes diferencialmente expressos em células e tecidos e representa uma importante metodologia para caracterização e entendimento da patogênese ao nível de espécie, podendo ser utilizada para identificação de genes específicos que possam determinar virulência, resistência a drogas, infecciosidade, patogenicidade, entre outros. A SSH possibilita que genes expressos em altos níveis não sejam clonados e que genes específicos de determinadas estruturas, geralmente pouco expressos, sejam selecionados (Diatchenko *et al.*, 1999).

Utilizando-se desta metodologia, Akopyants e colaboradores (1998) estudaram genes diferentemente expressos em cepas patogênicas de *Helicobacter pylori*. Charlab e colaboradores (1999) foram capazes de selecionar e identificar genes específicos de glândulas salivares de *Lutzomyia longipalpis*. Hufton e colaboradores (1999) identificaram genes diferentemente expressos em células cancerosas em comparação com células normais e Spielmann e Beck (2000) isolaram genes estágio-específicos em *Plasmodium falciparum*. Atalay e colaboradores (2002) identificaram genes diferencialmente expressos em células cancerosas em comparação com células normais. Além disso, alguns pesquisadores estudaram, em certos organismos, genes que são expressos mediante determinados estímulos. Desta forma, Kuang e colaboradores (1998) demonstraram a expressão diferencial de genes em células cancerosas (câncer de mama) induzida pela adição de estrógeno. Hao e colaboradores (2001) descreveram genes envolvidos na expressão de peptídeos antimicrobianos em *Glossina morsitans morsitans*. Lockyer e colaboradores

2006 descreveram genes envolvidos com a interação Schistosoma-caramujo, comparando linhagens de caramujo *Biomphalaria glabrata* resistentes e susceptíveis quando expostos a *Schistosoma mansoni* e também uma linhagem de caramujo resistente exposta e não exposta ao Schistosoma.

2. JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, técnicas de genética molecular e novos modelos de estudo de doenças têm esclarecido muito sobre a patogênese da amebíase.

De acordo com a literatura, vários argumentos justificam a patogenicidade da *E. histolytica* e apesar da relevância de cada um dos mecanismos analisados, questões fundamentais sobre a diferença entre *E. histolytica* virulenta e a não virulenta ainda persistem.

Na tentativa de elucidar alguns fatores relacionados com a virulência e a patogenicidade da *E. histolytica*, pretendemos caracterizar, quanto à virulência, algumas cepas deste parasita, isoladas de diferentes casos clínicos, além de analisar possíveis genes diferencialmente expressos, através da técnica SSH e avaliar os níveis de expressão de cisteil proteinases através da técnica de microarray.

Estes estudos podem fornecer informações a respeito da patogênese da amebíase, além de identificar genes que possam constituir alternativas como alvo no desenvolvimento de novos fármacos e novas técnicas de diagnóstico.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Caracterização da virulência de cepas de *E. histolytica* isoladas de diferentes casos clínicos no Brasil e análise da expressão diferencial de genes possivelmente envolvidos com a virulência.

3.2. ESPECÍFICOS

- ◆ Axenizar duas cepas de *E. histolytica*, mantidas em cultivo monoxênico;
- ◆ Avaliar a capacidade dos trofozoítos das diferentes cepas em lesar tecidos “*in vivo*”, através da inoculação em fígado de hamster;
- ◆ Determinar o efeito citopático das diferentes cepas sobre células de ovário de hamster chinês (CHO);
- ◆ Determinar a atividade de cisteil proteinases nas cepas estudadas;
- ◆ Avaliar a expressão diferencial de 36 genes de cisteil proteinases, utilizando o microarray;

- ◆ Validar os resultados obtidos no microarray utilizando a técnica de PCR em tempo real;
- ◆ Isolar genes diferencialmente expressos através da técnica de supressão por hibridização subtrativa; cloná-los e seqüenciá-los;
- ◆ Validar os resultados obtidos na subtração através da técnica de RT-PCR.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Cepas de *E. histolytica*

Foram selecionadas cinco cepas de *E. histolytica* duas mantidas em cultivo monoxênico, em meio TYI-S-33 (Diamond *et al.*, 1978a) contendo aproximadamente 10^6 /mL *Chrithidia fasciculata* no laboratório de amebíase do Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG e três mantidas em cultivo axênico também em meio TYI-S-33 (Diamond *et al.*, 1978a). Estas cepas (quadro 1) foram isoladas e são mantidas no laboratório de amebíase do Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG, com exceção da cepa HM1-USA isolada por De La Torre (1972), no México. O quadro a seguir mostra a relação das cepas de *E. histolytica* utilizadas e a forma clínica apresentada pelo paciente ao isolamento.

Quadro 1

Cepas axênicas de *E. histolytica** e suas formas clínicas

Cepas	Forma clínica
HMI	Colite disentérica
DRP	CD e ameboma
EGG	CD e amebíase hepática
452	Assintomática
32	Assintomática

*Gomes *et al.*, (1999). CD = colite disentérica.

Pelo fato de estas cepas estarem mantidas em cultivo por longo período e por estarem em constante manipulação, fez-se necessária a caracterização da virulência, para procedermos às análises funcionais das CPs.

4.2. Axenização das cepas monoxênicas

Dentre as cepas estudadas somente a EGG e a DRP eram mantidas em cultivo monoxênico, sendo necessária a axenização das mesmas para uso no microarray e para um melhor perfil de comparação.

Para isso foram inoculados 1×10^6 trofozoítos em fígado de hamster em um volume de 0,10 a 0,15 mL. Seis dias após a inoculação, os animais foram sacrificados e abertos para exame macroscópico do fígado, os trofozoítos foram então extraídos do fígado e mantidos em cultura axênica contendo meio TYI-S-33, tratados com antibiótico (ofloxacina 40 μ g/mL) e mantidos com repiques constantes por aproximadamente um mês, até sua total axenização.

4.3. Inoculação em fígado de hamster

As culturas axênicas foram crescidas em 15 mL de meio de cultura TYI-S-33. Os tubos foram transferidos para banho de gelo por 10 minutos. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 7000 \times g por 10 minutos, o meio sobrenadante foi descartado, o sedimento ressuspendido em 1 mL de PBS, feita a contagem em câmara de Neubauer e ajustadas as concentrações desejadas do inóculo. Foram utilizados seis hamsters (*Mesocricetus auratus*) com aproximadamente um mês de idade (cerca de 70 gramas). Os animais foram anestesiados com uma dose de 30 mg/kg de pentobarbital sódico 3% (Hipnol®). A inoculação foi feita diretamente no lobo esquerdo do fígado em um procedimento de laparotomia. O inóculo consistiu de 1×10^6 trofozoítos em um volume de 0,10 a 0,15 mL. Seis dias após a inoculação, os animais foram sacrificados e abertos para exame macroscópico do fígado. Foram determinadas as incidências de animais com lesão e estas foram classificadas em graus de 0 a IV de acordo com Diamond *et. al.* (1974), como descrito a seguir:

Grau 0 - Fígado normal, fibrose no local ou lesão bacteriana menor que 4 mm (ausência de amebas, confirmada por cultivo do fragmento da lesão);

Grau I – Lesão no ponto de inoculação menor que 15 mm de diâmetro;
Grau II – Lesão maior que 15 mm, sem metástase;
Grau III – Lesão no lobo primário, algumas metástases para outras áreas;
Grau IV – Lesão extensa, com metástase, mínimo de 50% do fígado comprometido.

Um fragmento de cada lesão foi macerado em PBS pH 7,2 entre lâmina e lamínula, para verificação microscópica da presença de trofozoítos.

4.4. Efeito citopático

A interação dos trofozoítos com células de ovário de hamster chinês foi determinada pelo método modificado de Bracha e Mirelman (1984). Foram estudados o efeito das cepas HM1, 452, 32, EGG e DRP de *E. histolytica* sobre as células CHO, cultivadas *in vitro* em 50 ml de meio Ham's F-12 com L-glutamina, suplementado com 5% de soro fetal bovino. As células foram semeadas em placas de 20 orifícios em uma concentração aproximada de 1×10^5 células/poço e permaneceram durante 48 horas em estufa à 37°C com 5% de CO₂ para crescerem. As células foram então, lavadas com meio Ham's F-12 sem soro, para remover todo o soro fetal bovino. Os trofozoítos de cada uma das cepas foram contados e colocados sobre as células na concentração de 1×10^5 amebas/poço e levados para estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 50 minutos. Após esse tempo, as placas foram colocadas em banho de gelo por 20 minutos para desprender as amebas aderidas às células. Os trofozoítos foram retirados com auxílio de pipeta Pasteur e as placas foram cuidadosamente lavadas 2 vezes com meio Ham's F-12 gelado, sem soro, fixados com formaldeído 4% em PBS e lavados uma vez com PBS. As células que permaneceram na placa foram coradas com azul de metileno 0,1 M. O excesso de corante foi removido por uma lavagem com borato de sódio 0,01 M e o corante incorporado às células foi extraído com a adição de HCl 0,1 M em cada poço. A quantidade de células CHO aderidas à placa após a incubação com os trofozoítos de *E.*

histolytica foi proporcional à coloração do azul de metileno; sendo que a quantidade de cor extraída das monocamadas de células CHO que não tiveram interação com trofozoítos (incubadas com PBS) e as que interagiram com tripsina serviram como controle (0% e 100% de destruição, respectivamente). A intensidade de cor foi medida pela leitura da intensidade óptica a 660 nm. Os experimentos foram feitos em duplicatas e repetidos cinco vezes. A análise estatística foi realizada através do teste não paramétrico ANOVA ONEWAY, com o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4.5. Atividade cisteil proteinase

Após o cultivo de 72 horas, os trofozoítos foram ajustados a uma concentração de 1×10^6 trofozoítos/mL em meio de cultura. Após centrifugação a 1200xg, o sobrenadante foi descartado, o sedimento colocado em banho de gelo por 10 minutos e em seguida lavado duas vezes com PBS (com centrifugação a 1200xg por 5 minutos) com descarte do sobrenadante. O sedimento foi ressuscitado em 200 μ L de PBS e o rompimento da membrana celular foi realizado por ação mecânica de congelamento e descongelamento. Posteriormente os tubos foram centrifugados a 1200xg por 30 minutos à 4° C. O sobrenadante foi então transferido para outro tubo e a dosagem de proteína total foi realizado pelo kit “BCA protein assay” da Perbio Science.

A atividade cisteil proteinase foi determinada pela associação de 5 μ L do sobrenadante obtido como descrito acima, diluídos em 985 μ L de tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0 contendo EDTA 2 mM e DTT 1 mM, e 10 μ L do peptídeo sintético benziloxycarbonil-L-arginil-L-arginil-p-nitroanilina (Z-Arg-Arg-pNA) 4 mM, que foi usado como substrato (Bruchhaus *et al.*, 1996). A densidade óptica foi determinada a 405 nm e a atividade específica (moles do produto formado/min/mg proteína) calculada através da variação da densidade óptica, considerando-se o coeficiente de extinção como sendo $8,8 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

4.6. Microarray

4.6.1. Produção das lâminas

Neste trabalho foram identificados e comparados 36 genes de cisteil proteinases descritos no site “The Institute for Genomic Research-TIGR” (Tabela 1- Anexos). Os oligonucleotídeos de 60 bases foram desenhados e sintetizados pela companhia Eurogentec (Alemanha). Cada oligonucleotídeo foi impresso em quadruplicatas nas lâminas de vidro (Advalytix Epoxy AD100) a partir de soluções nos quais encontravam-se numa concentração de 50 μ M. As lâminas do microarray foram preparadas na Universidade de Marburg, Alemanha (Genomic Solutions Omnigrid).

4.6.2. Extração do RNA

A extração de RNA total foi realizada utilizando-se sistema Trizol (Life Technologies), seguindo as instruções do fabricante. Após o cultivo por 72 horas, os trofozoítos foram ajustados a uma proporção de 1×10^6 trofozoítos/mL em meio de cultura. Após centrifugação a 1.200xg, o sobrenadante foi descartado, o sedimento colocado em banho de gelo por 10 minutos e em seguida lavado 2 vezes com PBS (com centrifugação a 1200xg por 5 minutos) com descarte do sobrenadante. O sedimento foi então ressuspensionado em 1 mL de Trizol e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Após a lise das células, o RNA foi extraído com 200 μ L de clorofórmio e centrifugado a 10000xg por 15 minutos a 4° C. A fase aquosa foi então coletada e adicionada a 500 μ L de isopropanol, para precipitação do RNA que foi separado por centrifugação a 12.000xg por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com etanol 70% e centrifugado a 7.500xg. O sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento incubado à temperatura ambiente para evaporação de todo etanol. O sedimento foi então ressuspensionado em água tratada com dietilpirocarbonato (água DEPC) e incubado a 55° C por 15 minutos para

inativação de RNAses. Após quantificação, o RNA foi submetido à eletroforese em gel de agarose.

4.6.3. Separação das amostras para microarray

Foram preparados 5 µg do RNA total de cada uma das cepas, estas foram analisadas comparativamente de duas a duas, formando quatro grupos, como mostrado no quadro 2 abaixo:

Quadro 2

Distribuição das cepas de *E. histolytica* quanto a sua coloração (Cye3 e Cye5) nas lâminas de microarray.

Grupo	Fluoróforo	Lâminas	
1	Cy3	EGG	HMI-USA
	Cy5	HMI-USA	EGG
2	Cy3	DRP	HMI-USA
	Cy5	HMI-USA	DRP
3	Cy3	452	HMI-USA
	Cy5	HMI-USA	452
4	Cy3	32	HMI-USA
	Cy5	HMI-USA	32

Cada grupo continha duas cepas e estas foram analisadas em duas lâminas, sendo que para uma das cepas o cDNA foi sintetizado com dUTP marcado com a fluorescência cyanine-5 (Cye5) e para a outra cepa com cyanine-3 (Cye3) enquanto na outra lâmina os cDNAs foram sintetizados com os marcadores invertidos. A análise foi feita por etapas e todas as cepas foram comparadas com a HM1-USA, utilizada como controle.

4.6.4. Síntese de cDNA

A síntese do cDNA foi realizada utilizando-se o kit Atlas Superscript Fluorescent Labeling (TakaRa). Foram utilizadas duas réplicas biológicas incluindo experimentos de troca das colorações (dye swap). Para cada amostra, foram utilizados 5 µg de RNA que foram homogeneizados em 10 µL de água deionizada e 0,4 µL de random hexamer (5 µg/µL de pd(N₆), Pharmacia). A solução foi incubada por 5 minutos a 70°C e depois a 42°C por 3 minutos para equilíbrio da reação. Nesta fase foram adicionados, a cada tubo, uma mistura contendo 4 µL de tampão de síntese de cDNA 5x, 2 µL do mix de dNTP 10 mM, 2 µL de DTT, 1 µL de água deionizada e 1 µL da enzima Powerscript RT 5 U/µL, para cada amostra. Essa mistura foi incubada por 60 minutos a 42°C para que ocorresse a síntese do cDNA, depois a 70°C por 5 minutos para inativação da transcriptase e, posteriormente a mistura foi incubada por 45 minutos a 37°C para o tratamento com 0,2 µL de Rnase H (10 U/µL). Após essa etapa foram adicionados 0,5 µL de EDTA (0,5 M pH 8) para inibição da RNase H e 2 µL de QuickClean resin, utilizada para limpeza dos sais da reação, que, posteriormente, por centrifugação, foram depositados no “spin filter” 0,22 µm. O filtro foi então descartado e ao sedimento foram adicionados 2,2 µL de acetato de sódio 3M. Após homogeneização foram acrescentados 55 µL de etanol 100% gelado (-20° C). A amostra foi então incubada a -20° C por 1 hora ou pernoite. Após esse tempo o tubo contendo a reação foi centrifugado por 20 minutos a 13.000xg a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 200 µL de etanol 70%. Nova centrifugação foi realizada por 10 minutos a 13600xg e o sobrenadante novamente descartado. O tubo contendo o sedimento foi então colocado em uma centrífuga a vácuo por alguns minutos e, após secagem, o sedimento foi dissolvido em 10 µL de fluorescent labeling buffer e incubado por 10 min a 70° C para reação de marcação com as moléculas fluorescentes.

4.6.5. Reação de marcação (Cye – cDNA)

Durante a marcação reversa, empregou-se dNTP modificado, responsável pela ligação à molécula fluorescente Cye3 e Cye5. Posteriormente foi feita a marcação do cDNA com as moléculas fluorescentes empregando-se o kit Cye Mono-Reactive Dye Pack PA25001 da Amersham Biosciences. Após incubação com o tampão Fluorescent Labeling a solução foi dividida em dois tubos, um contendo o cDNA-Cye3 e o outro contendo o cDNA-Cye5 e a cada tubo adicionou-se 10 µL da reação de cyanine-DMSO que foi incubada por 1 hora ao abrigo da luz. Após esse tempo foi acrescentado 2 µL de acetato de sódio 3 M e 50 µL de etanol 100% gelado. Em seguida, incubou-se por 2 horas a -20° C. Após esse tempo a amostra foi centrifugada a 13.000xg a 4° C, o cDNA sedimentado foi ressuscitado em 200 µL de etanol 70% e novamente centrifugado por 10 minutos. O sedimento foi ressuscitado em 100 µL de água deionizada e colocado ao abrigo da luz. A amostra estava assim, marcada e pronta para ser purificada.

4.6.6. Purificação dos Cye-cDNAs

Após a marcação, os Cye-cDNAs foram purificados utilizando-se o kit QIAquick PCR Purification (Qiagen). A purificação se iniciou com a adição do tampão às amostras que posteriormente foram depositadas na coluna QIAquick e centrifugadas. O líquido foi então descartado ficando somente o filtro, que foi lavado três vezes com 600 µL do tampão para eliminação de todo o etanol da etapa anterior. Posteriormente, o filtro foi lavado mais duas vezes com 50 µL de água deionizada a 70°C, incubado ao abrigo da luz e centrifugado.

4.6.7. Pré-hibridização e hibridização

As amostras foram concentradas em filtros para centrífuga Microcon YM-30 (milipore) por 10 minutos a 14000xg num volume final de 20 µL. Ambas amostras foram misturadas (Cye3 e Cye5), adicionadas a 40 µL do

tampão pré-hibridização (5X SSC, 0,1 mg/mL DNA de esperma de salmão, 30% formamida, 0,1% SDS) e desnaturadas a 95°C por 5 minutos. As lâminas foram lavadas com tampão de pré-hibridização (5X SSC, 0,1 % BSA, 0,1% SDS), água e isopropanol. A hibridização foi realizada pernoite a 42°C. Após a hibridização, a lavagem e a secagem das lâminas, foi realizada a leitura das mesmas.

4.6.8. Análise dos resultados do microarray

A análise foi feita utilizando o scanner ScanArray Gx (Perkin Elmer), equipado com dois tubos laser, que permitem a leitura simultânea nos comprimentos de onda 550 e 650 nm, referentes às fluorescências Cy3 e Cy5, respectivamente. Na análise foi utilizado o programa ScanArray, versão 3.0, da Perkin Elmer. A análise da expressão gênica envolveu 4 lâminas, incorporando 2 réplicas biológicas e dye swaps de cada uma das amostras.

Os dados foram inspecionados em busca de vieses espaciais nos canais verdes e vermelhos (background e sinal) e viés intensidade-dependente usando o pacote do ScanArray. Para o cálculo, a média da intensidade dos sinais (pixel) menos background local (pixel) de cada “spot” foi utilizado. “Spots” com baixa intensidade foram eliminados. Para a normalização dos dados foram utilizados dois métodos: Normalização pelos genes totais e normalização pelos genes “housekeeping”. No primeiro método a intensidade do sinal de cada spot da amostra experimental, bem como de cada controle foi totalizado. A soma da amostra experimental sobre a soma do controle dá o fator de normalização. Para a normalização dos genes housekeepings, o cálculo foi feito da mesma forma, tendo como base a intensidade dos spots dos genes housekeeping como controle. Os spots com intensidade (pixels) ≤ 300 foram excluídos da análise dos dados. Os genes com a razão maior que 2 e menor que 0,5 foram considerados como diferencialmente expressos.

4.7 PCR Tempo Real

Para validar os resultados do experimento de microarray, os genes que apresentaram diferença de expressão foram analisados também pela técnica de PCR em Tempo Real. A actina foi utilizada como controle interno e normalização.

A expressão dos genes foi comparada de acordo com o seguinte protocolo: Os cDNAs de cada uma das cepas analisadas foram amplificados utilizando o kit *SYBR GREEN PCR core Reagents* da PE Biosystems (Warrington, UK), mantendo-se as concentrações usuais de reagente num volume final de reação de 15 μ L. Resumidamente, a reação consiste de: 6,65 μ L de água para PCR (SF); 1,5 μ L de tampão (10x *SYBR Green PCR*); 1,2 μ L da mistura de dNTP (200 μ M cada); 1,5 μ L de $MgCl_2$ (25 mM); 3 μ L da mistura de iniciadores CP1 (1,5 pmol de CPf e 1,5 pmol CPr) ou 3 μ L de da mistura de iniciadores BAC (senso e antisenso - 1,5 pmol cada); 0,15 μ L (5 U/ μ L) de enzima AmpliTaq Gold™ e 1 μ L de cDNA de cada uma das cepas. Os controles negativos foram feitos substituindo-se as amostras pelo mesmo volume de água na reação. A reação em tempo real foi realizada no aparelho *ABI Prism 7000 SDS* no seguinte ciclo termal: [estágio 1] um ciclo de 52°C/2 min.; [estágio 2] um ciclo a 95°C/10 min.; [estágio 3] 40 ciclos de 95°C/0,15 min. e 1 minuto na temperatura de anelamento dos iniciadores do gene analisado. Para confirmação do tamanho dos fragmentos amplificados por PCR em Tempo Real foi realizada uma curva de dissociação como parte do programa estabelecido no *ABI Prism 7000 SDS* e os fragmentos amplificados também foram visualizados através de eletroforese em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata. Os iniciadores utilizados nesta reação estão listados na tabela 2 de Anexos.

4.8. Supressão por hibridização subtrativa

A técnica de subtração por hibridização e supressão ou SSH (“Suppression Subtractive Hybridization”), que tem como fundamento a amplificação seletiva de genes diferencialmente expressos, foi utilizada como ferramenta para comparação de duas cepas de *E. histolytica*. Um esquema mostrando como funciona o processo de subtração é apresentado no item 4.8.4. As cepas escolhidas foram a EGG e a 452, por apresentarem maior e menor virulência, respectivamente, através de métodos anteriormente descritos. O procedimento foi realizado de acordo com as instruções presentes no manual do “kit” Clontech PCR-Select cDNA Subtraction.

4.8.1. Obtenção do RNA

A extração de RNA foi realizada utilizando-se sistema Trizol (Life Technologies, EUA), seguindo as instruções do fabricante e semelhante ao descrito no item 4.6.2. As amostras de RNA foram submetidas à ação da enzima Dnase I, para degradação de possíveis traços de DNA.

4.8.2. Síntese e digestão de cDNA

Os cDNAs foram sintetizados a partir de 2 µg de RNA extraídos dos dois tipos de células utilizando-se o *Kit PCR-select cDNA subtraction* (CLONTECH®), de acordo com as instruções do fabricante. Para a síntese dos cDNAs utilizou-se o iniciador de síntese de cDNA (2 µM) e a transcriptase reversa AMV (4 unidades). A síntese da segunda fita foi realizada com a T4 DNA polimerase (6 unidades) de acordo com as instruções do fabricante. O sedimento resultante da produção dos cDNAs foi ressuscitado em 50 µL de água deionizada estéril e digeridos com a enzima de restrição *RsaI* (0,3 unidades) por 1,5 h a 37°C, em tampão RSA I (bis-tris propano-HCl 100 mM pH 7,0 contendo MgCl₂ 100 mM e dititreitól 1 mM). A digestão dos cDNAs gerou fragmentos de até 600 pares de bases

(pb) com extremidades cegas. Embora este procedimento não seja ideal para a obtenção de cDNAs “full-length” específicos, a clivagem destas populações de cDNA em fragmentos menores oferece duas vantagens importantes: primeiro, fragmentos longos poderiam formar extensos emaranhados que dificultariam a formação de híbridos em etapas posteriores da técnica SSH; segundo, a divisão de uma população de cDNA em fragmentos menores poderia proporcionar que genes distintos (derivados de uma mesma família de genes) fossem selecionados, uma vez que possíveis hibridizações cruzadas devido a um elevado grau de homologia interna poderiam eliminá-los do processo final de subtração (DIATCHENKO *et al.*, 1999). Em seguida os cDNAs resultantes das duas reações de síntese foram submetidos a purificação pelo método fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (24:24:1) precipitados com etanol 95% e, finalmente, dissolvidos em água deionizada estéril.

Foram realizados tanto a subtração direta como a reversa, em que se obteve seqüências diferencialmente expressas nas amostras EGG e 452, respectivamente. Dessa forma, na subtração direta o cDNA da amostra EGG foi utilizado como cDNA “tester” (cDNA de interesse, para o qual se procura selecionar genes específicos) e o cDNA da amostra 452 como cDNA “driver” (utilizado como cDNA comparativo para subtrair seqüências homólogas e se obter portanto, as seqüências específicas do cDNA “tester”). Já na subtração reversa, o cDNA utilizado como “tester” foi da amostra 452 e o cDNA considerado como “driver”, o da EGG. Como controle, uma outra subtração foi feita utilizando-se uma mistura de cDNAs de músculo esquelético com DNA ϕ X174/*Hae* III, fornecido pelo kit.

4.8.3. Ligação de adaptadores aos cDNAs

Para realização desta etapa, foi utilizado apenas o produto da digestão com a enzima *RsaI* obtido anteriormente. Um microlitro do produto final da digestão do cDNA de cada uma das amostras EGG e 452 foram diluídos separadamente em 5 μ L de água deionizada estéril. Na subtração direta, 2 μ L do cDNA “tester” (amostra EGG), foram utilizados para ligação, separadamente, aos adaptadores 1 e 2R (figura 2). Para esta reação adicionou-se 2 μ L de tampão de ligação 5X (tris-HCl 250 mM pH 7,8 contendo $MgCl_2$ 50 mM, ditiotretitol 10 mM e albumina de soro bovino (BSA) a 0,25 mg/mL) em volume final de 10 μ L, seguindo-se um período de incubação de cerca de 16 horas a 16°C utilizando-se a enzima T4 DNA ligase (40 unidades). Esta etapa produz duas sub-populações de cDNAs ligadas a um adaptador diferente.

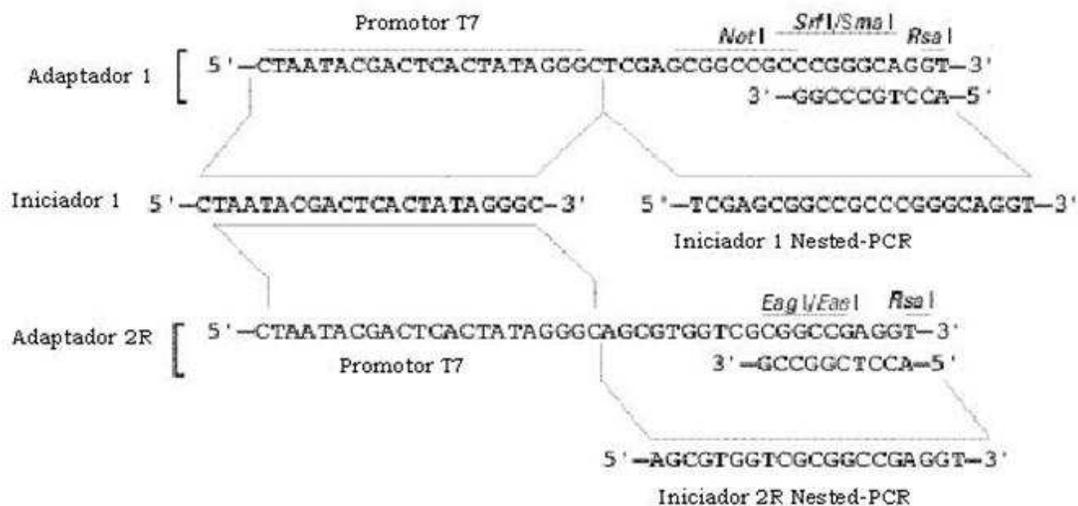


Figura 2. Sequências dos adaptadores e iniciadores utilizados na realização da técnica SSH. Quando os adaptadores são ligados aos cDNAs digeridos pela enzima de restrição *Rsa I*, o sítio de ligação a esta enzima é restaurado (Kit PCR Select cDNA Subtraction – CLONTECH)

Após a ligação, a enzima DNA ligase foi inativada por aquecimento a 72°C durante 5 minutos na presença de EDTA 0,2 M e glicogênio (1 mg/mL). As extremidades destes adaptadores não possuem grupamento fosfato, sendo que apenas uma fita de cada adaptador se liga a uma fita na extremidade 5' do cDNA. Os dois adaptadores (1 e 2R) possuem regiões idênticas ao iniciador P1 (adaptador 1 da figura) e aos iniciadores internos 1 e 2R (nested). Isso permite a criação de sítios de anelamento para esses iniciadores após o preenchimento das extremidades de cada adaptador pela DNA polimerase. Nenhum tipo de adaptador é ligado à população de cDNA da amostra 452 (cDNA "driver"). Para a realização do processo de subtração reverso, o cDNA da amostra 452 digerido com a enzima Rsa I foi igualmente separado em duas sub-populações e ligado aos adaptadores de maneira análoga ao descrito acima. Um microlitro de cada sub-população de cDNA da amostra EGG e 452 ligados aos adaptadores 1 e 2R foram diluídos em 1 mL de água estéril deionizada e estocados a -20°C. Estes cDNAs **não** foram submetidos ao processo de subtração, sendo posteriormente utilizados como molde em reações de PCR.

No processo de subtração controle, foram utilizados cDNA de músculo esquelético e DNA ϕ X174/*Hae* III. Cinco microlitros do DNA ϕ X174/*Hae* III (1,5 ng/ μ L) foram misturados com 1 μ L de cDNA de músculo esquelético (1 μ g/ μ L), obtendo-se o controle a ser utilizado na subtração. Seguindo um procedimento análogo ao descrito anteriormente, 2 μ L do controle foram adicionados em dois tubos, colocando-se, em seguida, o adaptador 1 no primeiro tubo e o adaptador 2R no segundo tubo. Em seguida, foram adicionados 2 μ L de tampão de ligação 5X e 40 U de T4 DNA ligase para um volume final de 10 μ L em cada tubo. Após homogeneização, 2 μ L do conteúdo de cada tubo foram misturados em um terceiro tubo denominado de controle não subtraído. Os tubos foram centrifugados brevemente e incubados a 16°C durante a noite. A reação foi interrompida adicionando-se em cada tubo 1 μ L de solução de

glicogênio/EDTA (0,2 M) e aquecimento a 72 °C durante 5 minutos para inativação da T4 DNA ligase.

4.8.4. Hibridizações

Todo o processo de hibridização foi realizado segundo as instruções descritas no *Kit PCR-select cDNA subtraction* (Clontech®). Na subtração direta, durante a primeira hibridização, 1,5 µL do cDNA “driver” (amostra 452) foram adicionados a cada um dos dois tubos contendo 1,5 µL do cDNA “tester” (amostra EGG) ligados aos adaptadores 1 e 2R. Após adição de 1 µL do tampão de hibridização 4X, as soluções foram cobertas por uma gota de óleo mineral, com posterior desnaturação por 1,5 minutos a 98°C, permitindo-se o re-anelamento por 10 horas a 68°C. Nesse processo, um excesso de cDNA “driver” foi adicionado a cada uma das duas populações de cDNA “tester”. O re-anelamento lento permitiu a produção de 4 tipos de moléculas (**a**, **b**, **c** e **d**) em cada amostra (Figura 3). Nesta etapa, o re-anelamento é mais lento para cDNAs diferencialmente expressos de rara abundância (tipo **a**), quando comparado com os transcritos mais abundantes representados pelo tipo **b**. Moléculas comuns entre cDNAs das populações de interesse e de referência são representados pelas moléculas de tipo **c**. As moléculas tipo **d** são moléculas do cDNA “driver” que hibridizaram com elas mesmas.

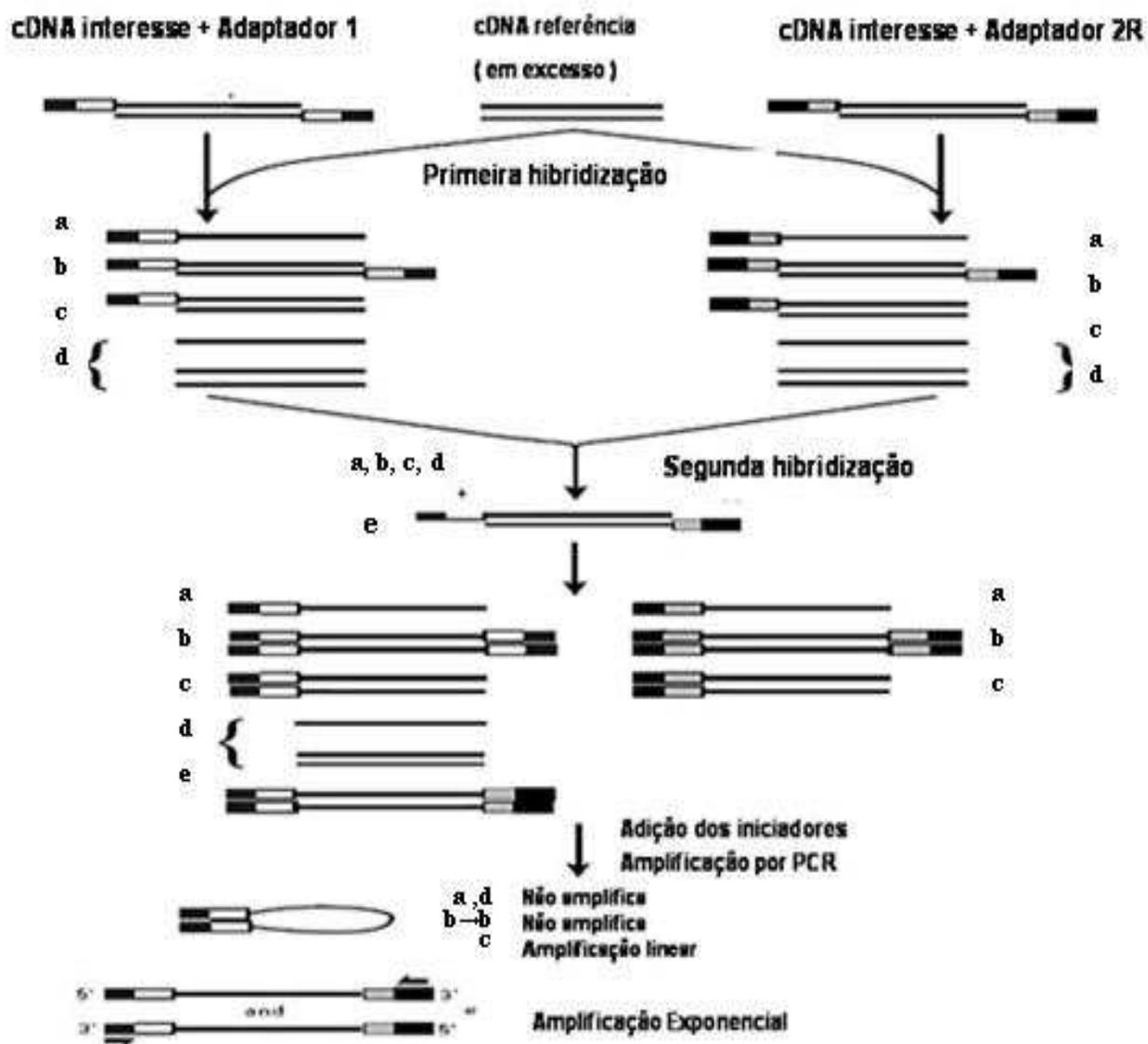


Figura 3. Esquema da técnica SSH. As linhas sólidas representam os cDNAs de interesse ou de referência. As caixas pretas nas extremidades representam a parte externa dos adaptadores 1 e 2R, que contém seqüência idêntica à do iniciador 1. A caixa em branco corresponde à parte interna do adaptador 1, idêntica a seqüência do iniciador interno 1. A caixa em cinza corresponde à parte interna do adaptador 2R, idêntica a seqüência do iniciador interno 2R. (Kit PCR Select cDNA Subtraction – CLONTECH)

Após a primeira hibridização, as duas amostras resultantes foram misturadas sem sofrer desnaturação e 1 µL de cDNA da amostra 452, previamente desnaturado, foi adicionado juntamente com 1 µL de tampão

de hibridização. As amostras foram novamente hibridizadas durante 10 horas a 68°C. O produto final dessa hibridização foi diluído em 200 µL de tampão de diluição (HEPES-HCl 20 mM pH 8,3 contendo NaCl 50 mM e EDTA 0,2 mM), aquecido a 68°C por 7 minutos e estocado a -20°C. Após esta etapa, são produzidos os mesmos tipos de moléculas formados na primeira hibridização, entretanto apenas as moléculas de cDNA de interesse, representados pelas moléculas tipo **a**, podem se reassociar, dando origem a um novo tipo de híbrido (molécula tipo **e**), o qual possui os dois tipos de adaptadores localizados em suas extremidades. Após o preenchimento das extremidades de todas as moléculas pela DNA polimerase, somente as moléculas tipo **e** apresentam os sítios de anelamento para os iniciadores internos 1 e 2R em suas extremidades (Diatchenko *et al.*, 1999).

4.8.5. Amplificações por PCR

Após as reações de hibridizações, as populações de cDNAs (cDNA da amostra EGG e cDNA da amostra 452) obtidas antes e após o processo de subtração foram utilizadas em reações de PCR. Nessa etapa, somente as seqüências com diferentes adaptadores (moléculas tipo **e**) e diferencialmente expressas, são amplificadas exponencialmente. Para isto, 1µL dos cDNAs obtidos foram adicionados separadamente a 24µL de uma mistura para PCR contendo 0,4 µM do iniciador 1, 0,2 mM de cada dNTP e 0,5 µL da enzima Advantage cDNA polimerase Mix 50X (CLONTECH) contendo tris-HCl 40 mM (pH 7,5), KCl 50 mM, (NH₄)SO₄ 25 mM, EDTA 0,1 mM, thesit 0,25% (v/v), glicerol 50% (v/v), Klentaq-1 DNA polimerase e anticorpo TaqStart a 1,1 µg/µL e ainda 2,5 µL de tampão de PCR 10X (tricina-KOH 400 mM pH 9,2, acetato de potássio 150 mM, acetato de magnésio 35 mM e BSA a 37,5µg/mL) fornecidos pelo *Kit* PCR-select cDNA subtraction (CLONTECH®). A reação se processou de acordo com os seguintes passos: ciclo inicial a 75 °C durante 5 minutos para extensão da

fita complementar dos adaptadores 1 e 2R, seguindo-se 27 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos; anelamento a 66 °C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 1,5 minutos. Um ciclo adicional de extensão foi realizado a 68°C durante 7 minutos. Posteriormente 3 µL dos produtos da PCR foram diluídos em 27 µL de água deionizada estéril e estocados a -20°C.

Um microlitro dos produtos da primeira reação de PCR foi utilizado como molde para uma segunda reação de PCR, que foram adicionados separadamente a 24µL de uma mistura para PCR contendo 0,4 µM dos iniciadores internos 1 e 2R, 0,2 mM de cada dNTP e 0,5 µL da enzima Advantage cDNA polimerase Mix 50X (CLONTECH) contendo tris-HCl 40 mM (pH 7,5), KCl 50 mM, (NH₄)SO₄ 25 mM, EDTA 0,1 mM, thesitol 0,25% (v/v), glicerol 50% (v/v), Klentaq-1 DNA polimerase e anticorpo TaqStart a 1,1 µg/µL e ainda 2,5 µL de tampão de PCR 10X (tricina-KOH 400 mM pH 9,2, acetato de potássio 150 mM, acetato de magnésio 35 mM e BSA a 37,5µg/mL) fornecidos pelo *Kit* PCR-select cDNA subtraction (CLONTECH®), seguindo-se

10 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos; anelamento a 68°C durante 30 segundos e extensão a 72 °C durante 1,5 minutos. Cinco microlitros dos produtos de PCR obtidos foram analisados em gel de poliacrilamida 5%, posteriormente corado por nitrato de prata.

Durante essas reações, as moléculas do tipo **a** e **d** não são amplificadas, pois não apresentam sítios de anelamento dos iniciadores. As moléculas tipo **b** possuem extremidades com seqüências invertidas e homólogas que induzem a formação de uma estrutura em grampo, que não permite a amplificação por PCR. As moléculas tipo **c** apresentam apenas um sítio de ligação dos iniciadores e por isso são amplificadas linearmente. Somente as moléculas do tipo **e** possuem os dois sítios de anelamento dos iniciadores, podendo ser amplificadas de forma exponencial (figura 3).

4.9. Clonagem dos cDNAs

4.9.1. Seleção e purificação dos cDNAs diferencialmente expressos

As amostras subtraídas foram aplicadas em gel de agarose “low melt” 0,8%. Após coloração com brometo de etídeo (0,1 µg/mL) e visualização em transluminador de luz ultravioleta, cada banda foi cortada e purificada utilizando o Kit Wizard® SV gel and PCR clean-Up System (Promega), de acordo com instruções do fabricante. Após a purificação as amostras foram estocadas a 4°C.

4.9.2. Reação de ligação

Aproximadamente 4 µL dos produtos obtidos na purificação foram adicionados a 1 µL do vetor pGEM-T Easy Vector (Promega), 1 µL de T4 DNA ligase e 1 µL tampão de T4 DNA ligase (Tris-HCl 30 mM pH 7,8, contendo MgCl₂ 10 mM, ditiotreitól 10 mM e ATP 0,5 mM). O volume foi ajustado para 10 µL com água e a mistura foi incubada a 4°C por 16 horas.

4.9.3. Transformação e plaqueamento das bactérias

Os produtos da reação de ligação foram utilizados para transformação de bactérias competentes, *Escherichia coli* linhagem DH5-α (Invitrogen), de acordo com o método já estabelecido (Hanahan *et al.*, 1991). Estes produtos foram incubados com aproximadamente 100 µL de bactérias competentes em gelo, por 30 minutos, e em seguida submetidos a um choque térmico a 42°C por 30 segundos. As bactérias foram novamente incubadas em gelo por 2 minutos e a seguir foram acrescentados ao incubado 450 µL de meio LB (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5,0 g/L, NaCl 5,0 g/L e pH ajustado para 7,4). Esta mistura foi incubada a 37°C por aproximadamente 1 hora em termomixer (Eppendorf, Alemanha) com agitação.

Foram plaqueados 150 μ L da suspensão de bactérias em placas de Petri contendo ágar a 1,5%, ampicilina 100 μ g/mL, isopropil-beta-D-galactopiranosídeo (IPTG, 200 μ g/mL) e 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-beta-D-galactosídeo (Xgal, 65 μ g/mL) em meio LB com posterior incubação a 37°C durante 16 horas.

4.9.4. Amplificação dos insertos e isolamento do DNA

Dez colônias brancas foram selecionadas e pinçadas das placas com auxílio de palitos de madeira esterilizados, e submetidas diretamente a reações de PCR para confirmação da presença do inserto. Para tal, utilizou-se os iniciadores 1 e 2R que se anelam aos adaptadores ligados às extremidades das seqüências diferencialmente expressas. As reações de PCR se processaram na presença de tampão (Tris-HCl 10 mM pH 9,0, MgCl₂ 1,5 mM, 0,2 mM de dNTPs, Triton X-100 0,1%), 0,1 U de Taq polimerase (Promega) e água Milli-Q para um volume final de 10 μ L. A mistura foi submetida a 25 ciclos compostos dos seguintes passos: desnaturação a 94°C durante 45 segundos, anelamento a 68°C durante 45 segundos e extensão a 72°C durante 1,5 minutos.

Para os clones que apresentaram insertos foi feito o isolamento do DNA plasmidial utilizando-se o *Kit Wizard® Plus SV Minipreps* (DNA Purification System - Promega), a partir de culturas bacterianas crescidas em 4 mL de meio LB contendo ampicilina 100 μ g/mL e incubadas a 37°C por 16 horas. A confirmação do isolamento do plasmídeo e da presença do inserto foi realizada a partir de reações de digestão utilizando a endonuclease de restrição *Eco* R1 (5 U), seguindo instruções do fabricante (Promega). A figura 4 mostra um desenho esquemático do plasmídeo pGEM-T (3015 pb) utilizado como vetor nos experimentos de clonagem. O sítio de ligação do inserto no vetor e o ponto de corte de endonucleases de restrição estão evidenciados nesta figura.

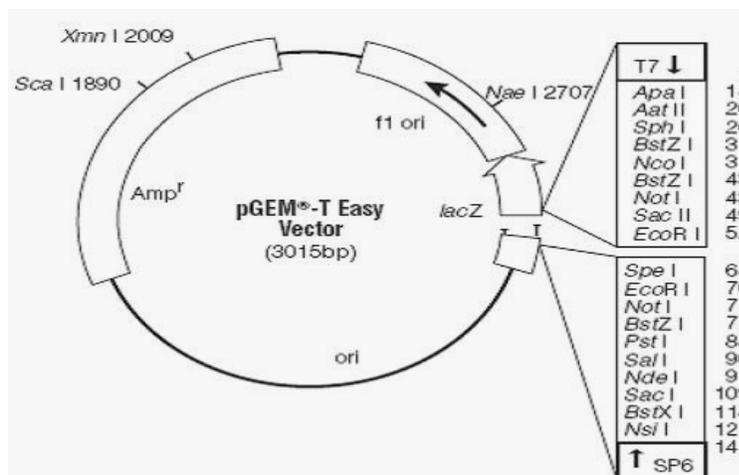


Figura 4- Mapa circular do vetor pGEM-T easy e pontos de referencia na seqüência (PROMEGA).

4.10. Sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas segundo método descrito originalmente por Sanger e colaboradores (1977), utilizando-se o *DYEnamicTMET dye terminator kit MegaBACETM* (Amershan Biosciences, EUA). Em tubos de 0,5 mL, em volume final de 10 µL, foram adicionados os iniciadores a 0,5 µM, direto (5' CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC 3') e reverso (5' TCACACAGGAAACAGCTATGAC 3'), 200 ng de DNA plasmidial, 4 µL de Etkit (premix para sequenciamento) e água ultrapura suficiente para completar o volume. As reações foram realizadas em termociclador (Mastercycler® - Eppendorf) com 30 ciclos a 95 °C por 20 segundos, 50 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Posteriormente, os nucleotídeos não incorporados foram precipitados pela adição de 1 µL de acetato de amônio (7,5 M) e 25 µL de etanol 95% (Merck). Após incubação a 25 °C por 15 minutos, seguido de centrifugação a 4000xg por 45 minutos a 25 °C, o sobrenadante foi descartado e 150 µL de etanol 70% (Merck) adicionado ao sedimento, que foi agitado para ressuspensão, seguido de uma centrifugação a 4000xg por 15 minutos a 25 °C. O sedimento foi ressuspensionado por agitação em vórtex com 10 µL do tampão de ressuspensão contendo 70% de formamida e EDTA 1 mM. Os produtos do

sequenciamento foram submetidos à leitura no sequenciador automático capilar *Mega BACE 1000TM sequencing system* com uma injeção de 2 kv por 100 segundos e corrida de 6 kv por 230 segundos.

4.10.1. Análise das seqüências em bancos de dados

As seqüências foram obtidas em forma de cromatograma e a edição das ambigüidades foi realizada de acordo com os resultados do sequenciamento da fita complementar de cada cDNA.

As seqüências parciais de cDNA assim obtidas foram submetidas a análise de homologia utilizando-se principalmente o servidor BLAST 2.0 (“Basic Local alignment Search Tool”) (Altschul et al., 1990) do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) da biblioteca Nacional de Medicina do NIH (“National Institute of Health”), Maryland, EUA. Foi verificado a existência de seqüências homólogas de DNA (BLASTN) ou homologias entre a possível seqüência de aminoácidos codificada pelos cDNAs das amostras de *E. histolytica* (EGG e 452) e as seqüências de proteínas depositadas nos bancos de dados (BLASTP). As mesmas seqüências foram analisadas também com relação ao banco de dados disponível referente à *E. histolytica* do softer Omniblast do Instituto Sanger. A tradução dos cDNAs e a identificação e possíveis domínios foram realizadas utilizando-se o servidor Scanprosite (<http://ca.expasy.org>).

4.11. RT-PCR

Para obter a confirmação de que os cDNAs subtraídos pela técnica SSH estão realmente presentes em apenas uma das amostras analisadas, foi utilizada a técnica de RT-PCR. Nesse procedimento, foi feita a extração de RNA total das amostras EGG e 452, empregando-se o reagente Trizol (Invitrogen) seguindo-se as instruções do fabricante. Alíquotas contendo de 1,0 a 3,0 µg de RNA total das amostras EGG e 452 foram utilizadas como molde para a produção de cDNA utilizando-se o sistema da Amersham de transcrição reversa (RT).

O RNA total foi então incubado em um volume final de 20 μ L da reação constituída de tampão de primeira fita (tris-HCl 50 mM pH 8,3 contendo KCl 75 mM, MgCl₂ 3mM), 10 μ M de DTT, 2,5 U de ramdon hexamer, 2 U de inibidor de RNase, 0,5 mM dNTPs, 10 U da enzima M-MULV e água-DEPC para completar o volume. A mistura foi submetida à temperatura de 20 °C por 10 minutos, 42 °C por 45 minutos, 95 °C por 5 minutos. Em seguida, foi realizada a PCR utilizando 3 μ L do produto de RT, iniciadores específicos (10 μ M) construídos a partir da seqüência das proteínas em que os fragmentos subtraídos encontraram homologia (Anexo- Tabela 3), tampão (tris-HCl 10 mM pH 9,0 contendo MgCl₂ 1,5 mM, 0,2 mM de dNTPs, triton X-100 0,1%), 0,1 U de Taq DNA polimerase (Promega) e água Milli-Q para um volume final de 10 μ L. A mistura foi submetida a 30 ciclos de 95 °C por 45 segundos, 72 °C por 90 segundos e 1 minuto com a temperatura de anelamento adequada para cada iniciador. Utilizou-se como controle da reação 1 μ L de cada iniciador do gene constitutivo da actina.

Os produtos da amplificação obtidos na PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% e corado pela prata.

5. RESULTADOS

5.1 Inoculação em fígado de hamster

Para caracterização da virulência das cepas estudadas foi avaliada sua capacidade de produzir lesões em fígado de hamster. A tabela a seguir apresenta o resultado da inoculação das diferentes cepas de *E. histolytica* nestes animais.

Tabela 1

Desenvolvimento da lesão no fígado de hamster (*Mesocricetus auratus*) inoculados com trofozoítos de *E. histolytica* mantidas em cultivo axênico*.

Forma clínica	Cepas	Presença de lesão# ***
CD	HMI	Graus I, II e III
CD e Amebíase hepática	EGG	Graus III e IV
CD e Ameboma	DRP	Graus III e IV
Assintomática	452	zero
Assintomática	32	zero

CD= colite disentérica, *Inoculo de $1,0 \times 10^6$ trofozoítos, **Diamond et al. (1974)

Das seis cepas analisadas apenas as cepas 452 e 32 não produziram lesão (grau 0), o restante das cepas apresentou virulência variada. As lesões causadas pelas cepas HM1, EGG e DRP apresentaram graus de virulência de I a IV, com aspecto amarelado e áreas de destruição do parênquima substituídas por necrose. Na maioria dos casos as lesões eram múltiplas, acometendo somente o lobo inoculado (figura 5).



Figura 5 – Fígados de hamster inoculados com trofozoítos das cepas 452, EGG e DRP de *E. histolytica* e os respectivos graus de lesão observados 0, III e IV.

Além da observação macroscópica, foram retirados fragmentos dos fígados lesados, para verificar a presença de trofozoítos. Estes fragmentos foram macerados com PBS e observados ao microscópio ótico, sendo a presença de trofozoítos detectada em todos os exames, com exceção para as cepas 452 e 32.

5.2. Efeito citopático

Caracterizamos as cepas quanto ao efeito citopático pela incubação dos trofozoítos de *E. histolytica* com células do ovário de hamster chinês (CHO).

No gráfico da figura 6 estão representadas as médias da percentagem de monocamadas de células CHO após incubação com os trofozoítos de cada uma das cepas de *E. histolytica*. As cepas HM1, EGG e DRP apresentaram índice de destruição de células CHO igual a 60%, significativamente maior ($p < 0,05$) que as cepas 452 e 32, que foi de 22% (Figura 6). Estes resultados estão em concordância com a forma clínica dos pacientes dos quais foram obtidas as cepas. Concordância também foi observada nos ensaios *in vivo*, onde a cepa EGG isolada de paciente sintomático com abscesso hepático apresentou maior destruição das monocamadas e a 452, isolada de assintomático, o menor índice de destruição.

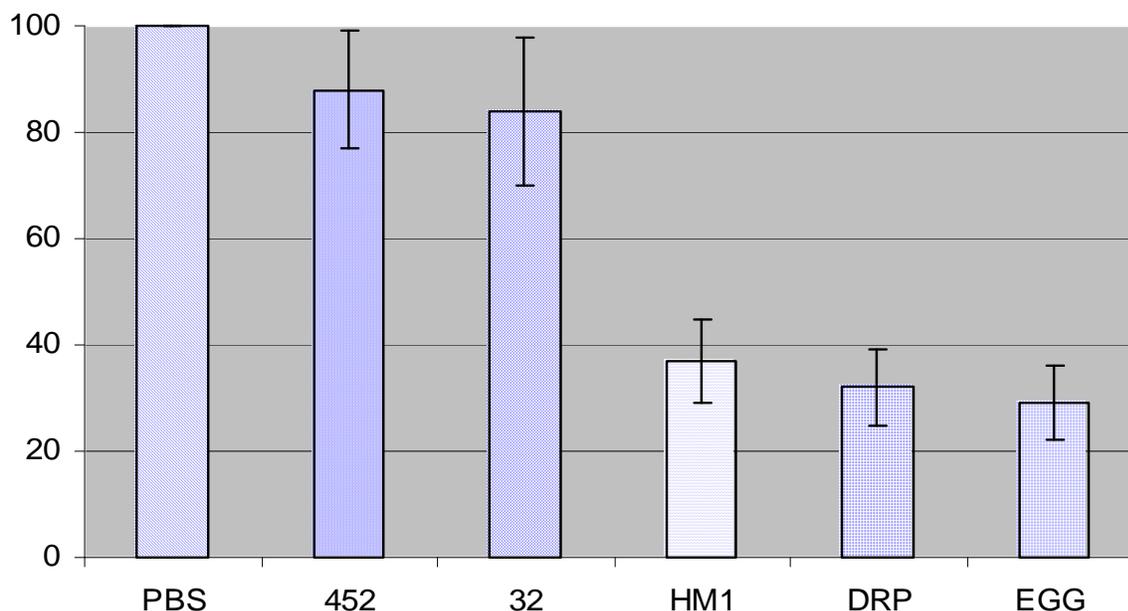


Figura 6. Percentagem de monocamadas de células CHO após incubação com trofozoítos de *E. histolytica*. A análise estatística foi realizada através do teste não paramétrico ANOVA ONEWAY, com o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5.3. Atividade cisteil proteinase

Os níveis de atividade cisteil proteinase encontrados na diferentes cepas estão mostrados na tabela 2.

Tabela 2

Atividade específica de cisteil proteinase (mU/mg) nas diferentes cepas analisadas.

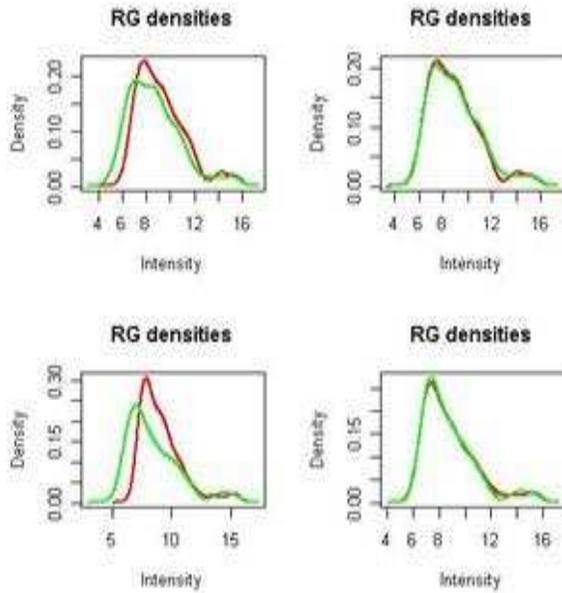
Cepas	Concentração de proteína [mg/ml]	Atividade por volume [mU/ml]	Atividade específica [mU/mg]
EGG	2.7	199	74
DRP	1.9	116	61
32	2.15	157	73
452	3.66	377.5	103

As cepas não apresentaram diferença significativa nos níveis de atividade cisteil proteinase, mostrando que não há correlação entre atividade desta família de enzimas e a virulência da cepa. Esse resultado mostra que a atividade de cisteil proteinase total é grande em cepas de *E. histolytica*; agora resta ver se as CPs que possivelmente estariam relacionadas com a virulência (*cp1*, *cp2*, *cp5*, *cp112*) seriam encontradas em maiores níveis nas cepas EGG, DRP e HM1.

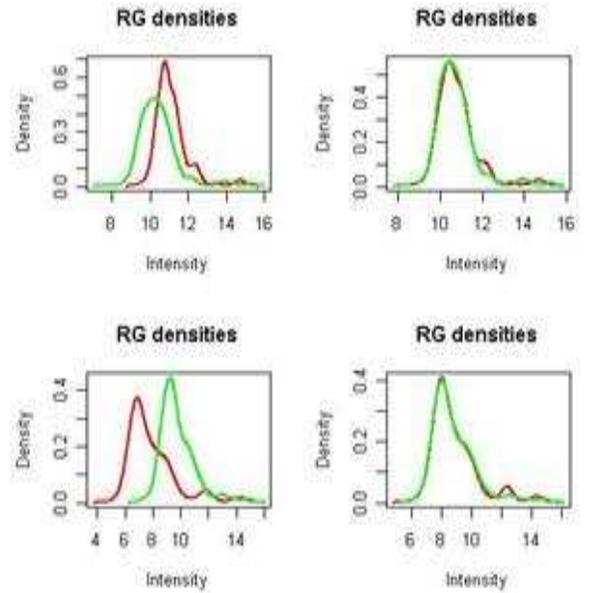
5.4. Microarray

Os RNAs extraídos das cepas de *E. histolytica* foram avaliados e quantificados usando espectrofotômetro para que pudéssemos certificar que os RNAs eram de qualidade e em quantidade suficiente. Para averiguar se houve degradação das amostras, também corremos as amostras em gel de agarose desnaturante. O resultado do gel mostrou para todas as amostras uma banda única sem presença de perfil típico de degradação (foto não incluída). O RNA marcado foi então hibridizado nas lâminas de microarrays, as imagens adquiridas inspecionadas e os spots com qualidade ruins excluídos. Os dados foram extraídos das imagens utilizando o software ScanArray, versão 3.0, da Perkin Elmer. Os resultados de cada uma das lâminas foram então inspecionados para procurar presença de viés espacial, viés de intensidade ou backgrounds excessivamente altos antes e depois da normalização. Como se pode observar na figura 7, a distribuição empírica analisada (smoothed empirical densities) para os canais verde e vermelho em todos os arrays é consideravelmente diferente antes da normalização e tornam-se praticamente iguais após esta, demonstrando a eficácia deste procedimento.

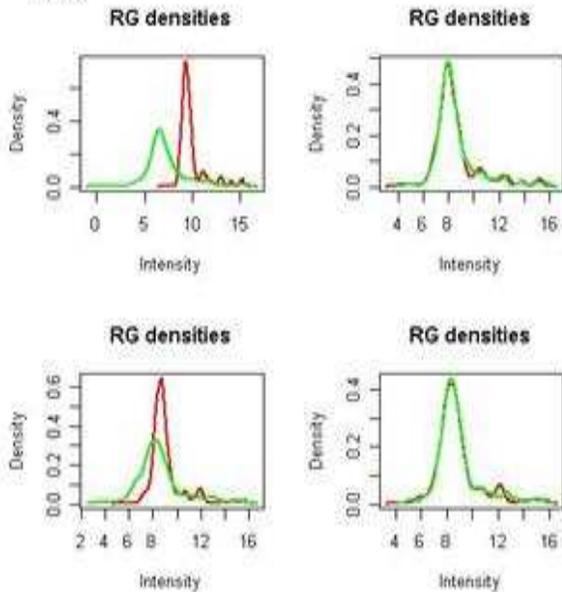
DRP



EGG



452



32

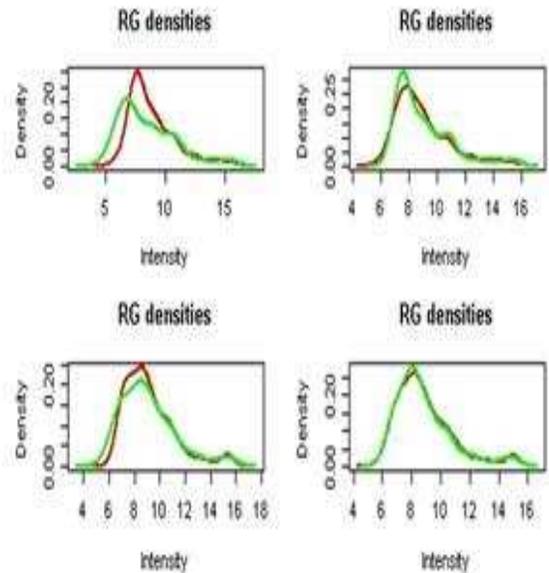


Figura 7– Os gráficos mostram uma distribuição empírica atenuada (smoothed empirical densities) para os canais verde e vermelho em todos os arrays, estes são consideravelmente diferentes antes da normalização e tornam-se praticamente iguais após a mesma.

Os resultados da análise estatística foram resumidos na tabela 3, mostrando os valores da razão da intensidade normalizados. Esses resultados mostram o único gene de *CP* diferencialmente expresso encontrado nesse estudo, o gene *cp1*. Este apresentou uma intensidade de sinal maior na cepa HM1 que na cepa EGG, apresentando log da diferença (fold change) entre as cepas, duas vezes maior na cepa HM1 que na cepa EGG, mostrando uma maior expressão na cepa HM1 quando comparada com a cepa EGG. O transcrito é estatisticamente diferente, apresentando $p < 0.001$.

Outros genes como *cp4* e *cp6* apresentaram uma probabilidade alta de serem diferencialmente expressos entre as cepas DRP e HM1, mas como os resultados foram muito variáveis e não apresentaram diferença maior que dois não foram estatisticamente diferentes.

Tabela 3

Gene diferencialmente expresso nas cepas de *E. histolytica* EGG em comparação com a cepa HM1

Acesso ao gene	Nome do gene	Intensidade do sinal HM1 / cepa de interesse (pixel)	Fold change	p-value
Expressão de HM1 / EGG				
XM_645064	<i>Cp1</i>	7.300 → 3.700	2.0 x decrease(↓)	0.0006

Os genes que codificam para *cp1*, *cp2*, *cp3*, *cp5*, *cp11* e *cp17* foram expressos em todas as cepas analisadas, sendo que os genes que codificam para *cp1*, *cp2* e *cp5* apresentaram os maiores níveis de expressão.

5.5. PCR em tempo real

Os resultados obtidos no microarray foram confirmados pelo PCR em tempo real. A tabela 4 mostra o perfil de expressão dos mRNAs diferencialmente expressas em *E. histolytica*, concordando com o resultado obtido no microarray onde a *cp1* apresentou-se duas vezes menos expressa em EGG que HM1 e na *cp5* não houve diferença de expressão. Além disso, são apresentados na tabela 4 dois outros genes diferencialmente expressos (*sp9-2* e *mp48*) presentes nas lâminas de microarray, que apesar de não terem sido analisados nesse trabalho, são apresentados para validação da semelhança dos resultados entre as duas técnicas.

Tabela 4

Confirmação dos resultados por PCR em tempo real.

Acesso ao gene	Nome do Gene	Dados do PCR em tempo real	
		Expressão relativa (gene/actina)	
		HM1	EGG
	actina	1	1
XM_645845	<i>cp5</i>	0,243	0,239
XM_645064	<i>cp1</i>	0,853	0,426
XM_650130	<i>sp 9-2</i>	0,035	0,098
		HM1	DRP
XM_651374	<i>mp48-1</i>	0,020	0,104

Para o PCR em tempo real a análise foi feita com todos os primers em duplicata. Duas replicas biológicas foram investigadas. A expressão da actina foi normalizada como sendo 1. A expressão relativa dos vários genes foi relacionada a expressão do gene da actina.

A quantificação relativa foi executada pelo software Rotor-Gene, utilizando o método delta delta ct (Livak & Schmittgen, 2001) e a normalização do RT-PCR foi feito com o gene da actina de *E. histolytica*. As curvas de calibração demonstraram 100% de eficiência na PCR em tempo real para todos os amplicons.

5.6. Supressão por hibridização subtrativa

5.6.1. Obtenção de populações de cDNAs específicos

Quatro populações de cDNAs foram produzidas pela técnica SSH como descrito na seção 4.8. Estas populações correspondem aos cDNAs das amostras de *E. histolytica* (cepas EGG e 452) obtidos antes e depois do processo de subtração. Para confirmar a realização do processo de seleção, essas populações de cDNAs foram analisadas em gel de agarose. A diferença no padrão de bandas antes e depois do processo de subtração indica que o processo foi bem sucedido (figura 8). Em um processo de subtração bem sucedido, o padrão de bandas apresentado pelo DNA de uma determinada célula ou tecido antes do processo de subtração deve ser diferente daquele observado após a realização do mesmo. O perfil de bandas obtido após a reação de subtração mostra que para a EGG foram observadas, aproximadamente, seis seqüências (bandas) diferencialmente expressas. Já para a 452 observou-se proximadamente cinco bandas. Os DNAs destas bandas foram purificados conforme descrito na seção 4.9.1 e estocados a 4°C.

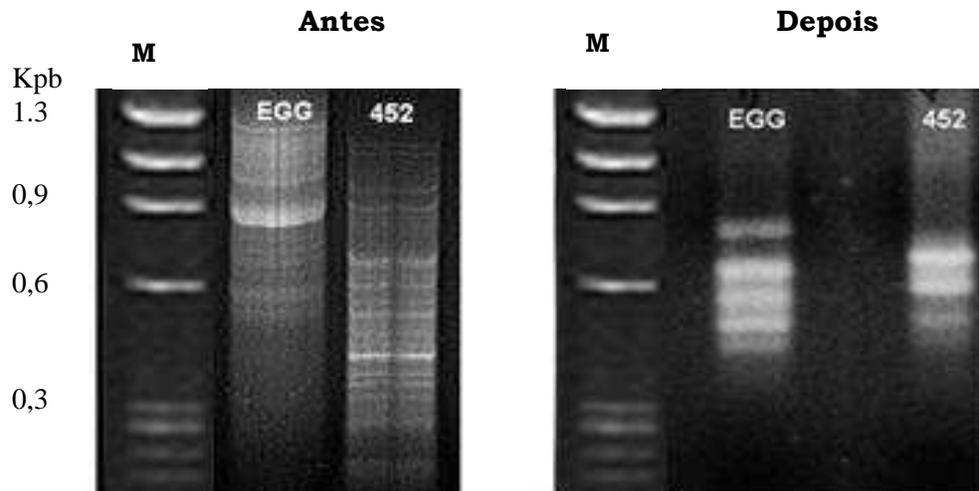


Figura 8 - Gel de agarose/EtBr a 0,8% em TBE 1X mostrando os produtos digeridos com Rsa I, antes e depois do processo de subtração. No segundo quadro são apresentados os produtos da segunda reação de PCR da técnica de SSH, para as cepas EGG e 452. M, Marcador de massa molecular ϕ -X174 DNA/HaeIII. Foram aplicados 10 μ L do produto da PCR de cada amostra e 10 μ L do marcador.

5.7. Clonagem

As seqüências subtraídas foram purificadas e clonadas conforme descrito na seção 4.9.1 4.9.2 e 4.9.3. De cada seqüência clonada foram selecionadas 10 colônias brancas para confirmação da presença do inserto e posterior purificação do DNA plasmidial. A figura 9 mostra os produtos da reação de PCR utilizando os iniciadores 1 e 2R a partir de algumas colônias bacterianas obtidas no processo de clonagem.

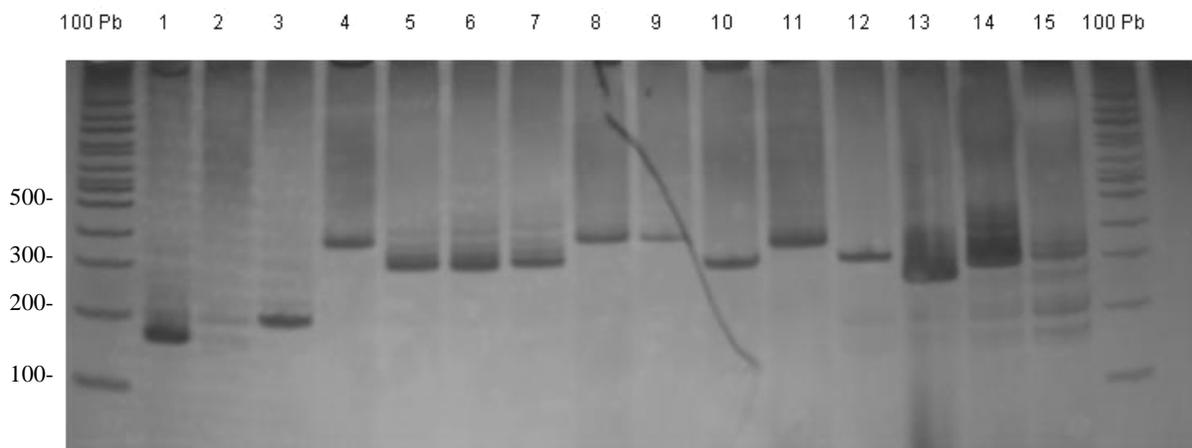


Figura 9- Gel de poliacrilamida 5% corado pela prata mostrando os resultados do PCR das colônias de bactérias transformadas com fragmentos selecionados por SSH da cepa EGG. Marcador 100 pb DNA ladder. Foram aplicados 2 μ L do produto da PCR e 2 μ L do marcador.

Os DNAs plasmidiais foram isolados e os tamanhos dos insertos foram confirmados através de reações de digestão utilizando a endonuclease de restrição *Eco* RI. A figura 10 mostra alguns dos produtos obtidos após a restrição.

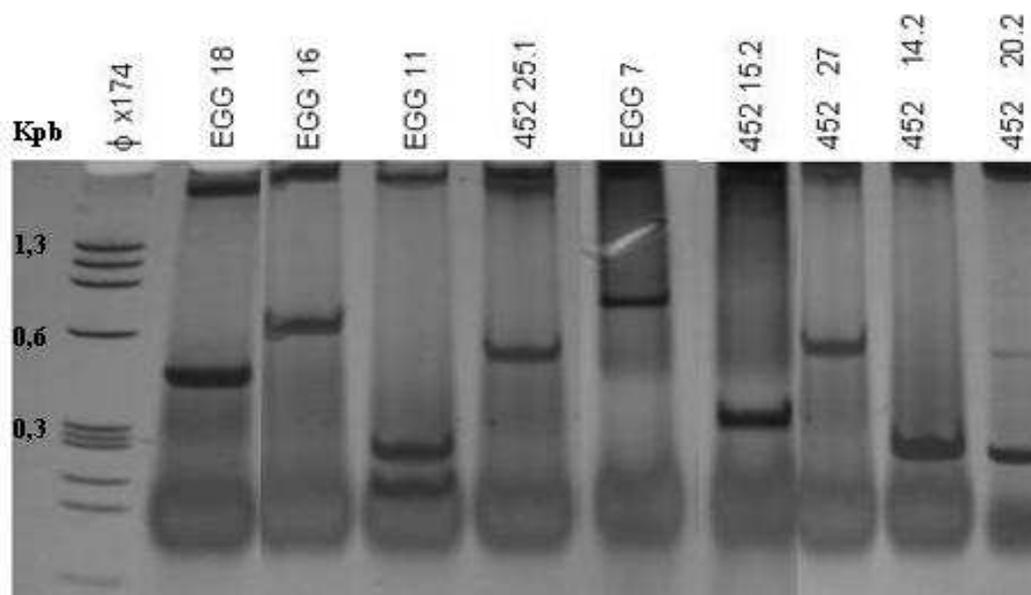


Figura 10- Gel de poliacrilamida 5% corado pela prata, mostrando os produtos de restrição *Eco*R1 dos plasmídeos obtidos nas mini preparações das diferentes colônias. Foram aplicados 2 μ L do produto da PCR e 2 μ L do marcador PM- ϕ -X-174

5.8. Seqüenciamento

Os clones que apresentaram inserto foram avaliados quanto a sua integridade em gel de agarose 1% e encaminhados para reações de sequenciamento no *Mega BACE 1000TM sequencing system*. As seqüências obtidas foram analisadas por comparação com seqüências já descritas em bancos de dados de domínio público. Através da análise das seqüências de nucleotídeos dos cDNAs selecionados, bem como dos possíveis polipeptídios codificados pelos mesmos, foi possível a identificação e caracterização destes cDNAs utilizando-se os servidores OminiBlast do Instituto Sanger e BLASTX do NCBI.

5.9 cDNAs que possivelmente codificam proteínas

Foram obtidas um total de 9 seqüências que mostraram homologia significativa com genes conhecidos de *Entamoeba histolytica* (Loftus *et al.*, 2005). A tabela 5 apresenta a caracterização dos clones obtidos dos fragmentos subtraídos e a identificação das possíveis proteínas correspondentes. As seqüências das proteínas homólogas estão demonstradas na tabela 4 (Anexos).

Tabela 5

Identificação das possíveis proteínas codificadas pelos cDNAs específicos de cada uma das cepas de *E. histolytica*.

Clone	Acesso Genebank	Tamanho (pb)	Proteína homóloga	N° F/N° P*	S (%)	I (%)	e-value
EGG 1	XP_649196.1	286	Família GTPase- Rab 7A	30/622	100	96	1e-11
EGG 2	XP_649888.1	302	Prot. hipotética 263.t00003	100/474	100	100	5e-47
EGG 3	Gb/AAM22200.1	219	Gal/GalNAc lectin heavy subunit	210/1194	100	100	9e-35
EGG 4	XP_655273.1	224	Prot. L21 ribosomal 60S	80/501	100	99	4e-35
EGG 6	XP_654688.1	144	Prot. rica em cisteína	39/425	92	92	2e-11
EGG 9	XP_657103.1	235	Prot. S17 ribosomal 40S	78/354	100	100	1e-31
EGG 13	XP_652703.1	199	Prot. hipotética 108.t00008	59/442	100	100	1e-18
EGG 16	XP_657397.1	272	Fator de iniciação de tradução HM1 eIF-5A	155/408	99	99	1e-79
452 15	XP_650371.1	157	Grainin 2	20/636	100	90	0.006

NF/NP= N° de aa do fragmento/ N° de aa da proteína, **S**= similaridade, **I**= Identidade
e= probabilidade

5.10. Análise por RT-PCR

Para confirmar se os cDNAs selecionados pela técnica de SSH e seqüenciados são exclusivos de uma das cepas de *E. histolytica* estudadas, reações de RT-PCR foram realizadas a partir do RNA total extraído das duas amostras (EGG e 452). Após a obtenção do cDNA, iniciadores específicos construídos baseados na seqüência codificante de cada cDNA selecionado (Anexos-Tabela 3) foram utilizados para amplificar fragmentos de DNA específicos de cada cepa.

Dos 9 genes diferencialmente expressos apenas quatro foram confirmados pela RT-PCR, sendo um da cepa não virulenta 452 (grainin 2) e três da cepa virulenta EGG (Proteínas hipotéticas 1 e 2 e uma proteína rica em cisteína). A figura 11 mostra essa confirmação, onde os cDNAs obtidos pela técnica SSH, correspondentes as três proteínas descritas para EGG estão presentes na cepa EGG e ausentes na 452. O cDNA, obtido pela técnica de SSH, correspondente a grainin 2 está presente na 452 e ausente na EGG. Como controle foram utilizados iniciadores que codificam para um gene de 300 pb da actina.

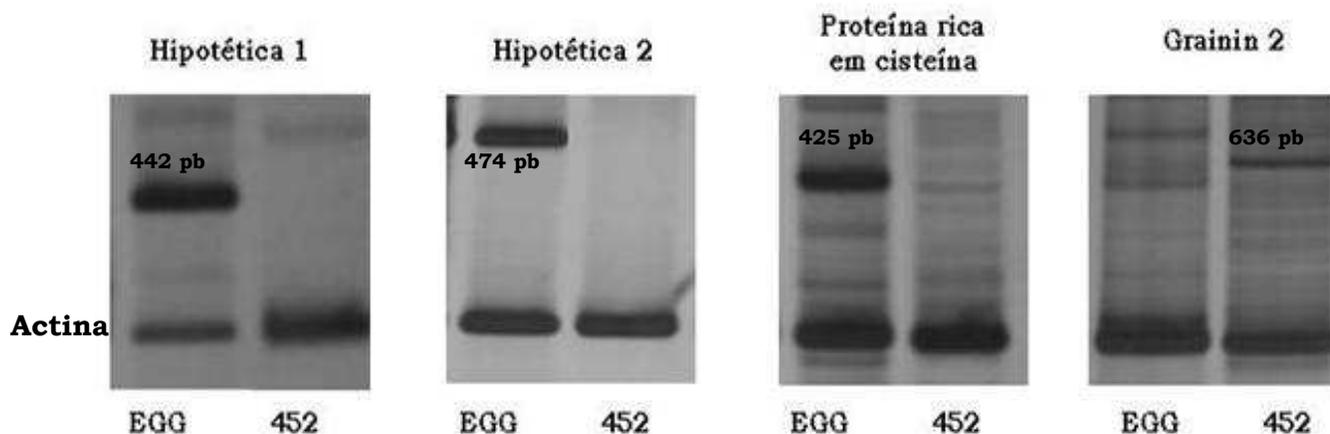


Figura 11- Estudo da expressão dos quatro cDNAs diferencialmente expressos mostrando os amplicons gerados pela técnica de RT-PCR para cada uma das proteínas. Foram aplicadas 5 μ L do produto da PCR de cada amostra e a actina foi utilizada como controle do PCR. Gel de poliacrilamida 5% corado pela prata.

6. DISCUSSÃO

A *E. histolytica* é um organismo intrigante, capaz de causar doença preferencialmente em indivíduos residentes em determinadas regiões. Nas regiões onde a infecção é preferencialmente assintomática entra em cena, a *E. dispar*. Não sabemos se as regiões de confinamento da doença clínica apresentam índices importantes de infecções assintomáticas, seja por *E. dispar* ou *E. histolytica*, pois ainda não estão estabelecidos se as infecções assintomáticas podem evoluir para sintomáticas e como o sistema imune está envolvido no desenvolvimento da doença.

É certo que a *E. histolytica* possui uma excepcional capacidade de lisar tecidos. Capacidade esta, que lhe conferiu o nome. Nesta habilidade lítica devem estar envolvidas enzimas da família das cisteil proteinases (CPs). O conhecimento do perfil destas enzimas em cepas de *E. histolytica* isoladas de diferentes casos clínicos pode fornecer informações importantes a respeito da fisiopatologia da doença. Tentando contribuir neste sentido, avaliamos o perfil de 36 CPs pela técnica de microarray. Nesta técnica a utilização de amostras puras é requerida para que a expressão diferencial de uma determinada proteína seja atribuída ao isolado em questão (Bruchhaus *et al.*, 2003). Utilizamos cinco cepas de *E. histolytica*, duas estavam sendo mantidas em cultivo monoxênico. O passo inicial foi trabalhar na axenização destas cepas. Após algumas tentativas as cepas foram axenizadas. A partir daí iniciamos os trabalhos para avaliar o perfil das CPs das diferentes cepas.

6.1. Caracterização quanto à virulência das cepas de *E. histolytica* estudadas

As metodologias empregadas em estudos de caracterização de qualquer organismo apresentam vantagens e desvantagens em sua utilização. A escolha de uma determinada técnica depende basicamente dos objetivos que se pretende alcançar. Neste trabalho, a escolha das técnicas utilizadas se baseou em dados da literatura que mostravam a aplicabilidade das mesmas na caracterização da virulência da *E. histolytica*.

Em geral, os estudos que incorporam ambos, dados biológicos e moleculares, levam a uma melhor descrição e interpretação da diversidade do organismo do que aqueles que focalizam apenas uma destas características. Na caracterização de nossas cepas associamos aos parâmetros biológicos, parâmetros de biologia molecular e bioquímicos.

As diferenças na virulência entre cepas de *E. histolytica* tem sido amplamente estudadas e vários modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*, vem sendo utilizados para se caracterizar as amebas. Entre eles, a inoculação em fígado de hamster e atividade citopática são amplamente utilizadas (Ankri *et al.*, 1998; Ankri *et al.*, 1999b; Bruchhaus *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 1997; Hellberg *et al.*, 2001) e foram os métodos escolhidos para a caracterização de nossas cepas.

As cepas HM1, EGG, DRP, 452 e 32 são cepas já bem caracterizadas, mas mesmo assim foi necessário repetir os experimentos de caracterização das mesmas, pois, pelo fato destas cepas estarem mantidas em cultivo por longo período e estarem em constante manipulação, pode ter ocorrido diminuição ou perda da virulência das mesmas. Além disso, as cepas EGG e DRP ainda não haviam sido estudadas em cultivo axênico.

O processo de axênização foi bem sucedido e assim foram iniciados os testes de virulência das cepas. Estes resultados mostram que as cinco

cepas analisadas apresentam diferentes graus de virulência, sendo assim, importantes modelos de estudo para procura das bases moleculares do processo de citotoxicidade amebiano.

De acordo com os resultados obtidos na inoculação das mesmas em fígado de hamsters foi encontrada concordância com a forma clínica dos pacientes dos quais se obteve as cepas, confirmando a hipótese que as cepas de ameba provenientes de indivíduos assintomáticos não se apresentam virulentas para animais de experimentação. A mesma concordância nos resultados foi encontrada ao analisarmos o efeito citopático das cepas de *E. histolytica* sobre células do ovário de hamster chinês (CHO), mostrando que a capacidade destas cepas de *E. histolytica* em degradar células concorda com a gravidade dos sintomas clínicos dos indivíduos parasitados pelas respectivas cepas.

6.2. Atividade e expressão de cisteil proteinase e virulência de *E. histolytica*

Um grande número de trabalhos vem sendo publicados recentemente indicando que as cisteil proteinases são de grande importância para a patogenicidade da *E. histolytica*. (Bruchhaus *et al.*, 2002; Leippe *et al.*, 1995; Que & Reed, 2000; Stanley *et al.*, 1995). Até o momento, foram encontrados aproximadamente 30 genes que codificam para cisteil proteinases, mas somente uma pequena parte deles é expresso nas amebas durante o cultivo *in vitro* e muito pouco se sabe sobre os mesmos (Bruchhaus *et al.*, 2003). Estudos da expressão de cisteil proteinase mostram que mais de 90% dos transcritos de cisteil proteinase e 95% das proteinases secretadas pelos trofozoítos *in vitro* são de responsabilidade de apenas 3 genes: *cp1*, *cp2* e *cp5* (Bruchhaus *et al.*, 1996b; Bruchhaus *et al.*, 2003; Davis *et al.*, 2007; Hirata *et al.*, 2007). Até o momento, não se sabe ao certo a verdadeira contribuição dos genes de CP para a virulência da *E. histolytica* e sua expressão nas diferentes cepas.

Na tentativa de contribuir para o conhecimento da função das CPs na virulência da ameba, determinamos a atividade e expressão de CPs em cepas de *E. histolytica* isoladas de diversos casos clínicos, desde assintomáticos até uma forma rara da doença, o ameboma.

Não observamos diferença na atividade de CPs total entre as cepas estudadas, não havendo correlação entre atividade cisteil proteinase e virulência da cepa. Isto pode ter ocorrido porque nesse experimento foi determinada a atividade total de cisteil proteinases. Sabe-se que existem diversos tipos de CPs e somente algumas são relacionadas com a virulência.

Considerando que não houve diferença na atividade de cisteil proteinase total nas cepas de *E. histolytica* verificamos se haveria diferença na expressão de CPs específicas. Dentre estas encontram-se enzimas já estudadas e relacionadas a virulência das amebas como *cp1*, *cp2*, *cp5* e *cp112* (Bruchhaus *et al.*, 1996b; Que *et al.*, 2002). Além dos genes que codificam para estas enzimas, avaliamos a expressão de outros genes de CPs recentemente descritos (Bruchhaus *et al.*, 2003; Loftus *et al.*, 2005). Para tal, utilizamos um microarray contendo 36 “spot” com 60 oligonucleotídeos em cada, codificando para genes de cisteil proteinases obtidos do genoma de *E. histolytica* depositado no banco de dados do Sanger Institute. Foram analisadas duas réplicas biológicas e duas réplicas técnicas (dye swaps) para cada uma das cepas analisadas. Os resultados obtidos nas quatro cepas experimentais (EGG, DRP, 452 e 32) quando comparadas com a cepa controle (HM1-USA) mostram que apenas o gene *cp1* apresentou diferença significativa na expressão entre as cepas HM1 e EGG, sendo essa diferença duas vezes maior em HM1 que em EGG com resultado significativo apresentando $p < 0.001$. A expressão diferencial de *cp1* foi confirmada pelo PCR em tempo real, onde foi observada diferença significativa na expressão de *cp1* da cepa HM1 em comparação com a EGG.

A *cp1* é um gene considerado importante na patogenicidade da *E. histolytica*, por não apresentar um gene homólogo em *E. dispar*, ser liberado em grande quantidade em cultura e constituir um dos genes de CPs mais expressos (Bruchhaus *et al.*, 1996b; Davis *et al.*, 2007). Contrariando essa hipótese, nossos resultados demonstraram que a cepa HM1, menos virulenta que a EGG em todos os ensaios de virulência, apresentou maior nível de expressão de *cp1*.

Recentemente, MacFarlane e Sing (2006), utilizando um microarray baseado em DNA analisaram 2110 genes de *E. histolytica* e encontraram vários genes diferencialmente expressos comparando a cepa HM1 de *E. histolytica* com *E. dispar* e a cepa Rahman de *E. histolytica* (pouco virulenta). Entre eles, o gene *cp1* se mostrou diferencialmente expresso entre a cepa HM1 e a *E. dispar*, mas não foi encontrada diferença entre as cepas HM1 e Rahman. Concordando com resultado encontrado por Davis e colaboradores (2006) que utilizando um array com 6209 genes de *E. histolytica* encontraram 353 genes diferencialmente expressos entre HM1 e Rahman, mas o gene da *cp1* também não mostrou diferença de expressão (Davis *et al.*, 2007). Apesar de termos encontrado diferença de expressão entre as cepas EGG e HM1, quando comparamos a cepa HM1 com as cepas não virulentas encontramos resultado semelhante aos encontrados por MacFarlane e Davis. Além disso, em todos os três trabalhos a *cp1* se mostrou responsável por grande parte da expressão total de cisteil proteinase.

Estes trabalhos reforçam nossa hipótese de que *cp1* não seja um gene relacionado à invasão de tecidos em *E. histolytica*. As cepas 452 e 32 isoladas de casos assintomáticos e avirulentas em todos os ensaios biológicos e bioquímicos, apresentaram níveis semelhantes de expressão de *cp1* com a cepa HM1 e DRP, virulentas.

Ao analisarmos a expressão dos genes verificamos que *cp1*, *cp2*, *cp3*, *cp5*, *cp11* e *cp17* foram expressos em todas as cepas analisadas e os genes que codificam para *cp1*, *cp2* e *cp5* apresentaram os maiores níveis de

expressão, concordando com Bruchhaus e colaboradores (2003) que também encontrou expressão destes genes na cepa HM1 mantida em cultivo axênico e altos níveis de expressão para os três últimos genes.

Os genes *cp1*, *cp2* e *cp5* estão localizados nos vacúolos digestivos da ameba, mas somente o gene da *cp5* é também encontrado na superfície da ameba. Por isso e pelo fato dele ser altamente expresso e estar ausente em *E. dispar* (Freitas *et al.*, 2004; Willhoeft *et al.*, 2001), este gene tem sido considerado como molécula chave na invasão dos tecidos pela *E. histolytica*. Apesar disto, a expressão do gene *cp5* foi similar para todas as cepas de *E. histolytica* estudadas. Estes resultados estão em discordância com a idéia de molécula chave na invasão dos tecidos, já que das cepas estudadas três produziram lesão em animais de experimentação e duas não. O PCR em tempo real confirmou este resultado. Dentre as cepas analisadas não foi observada diferença significativa na expressão do gene *cp5* (dados mostrados apenas para cepa HM1 e EGG)

Estes resultados sugerem que a *cp1* e *cp5* avaliadas neste estudo não estão relacionadas à capacidade de produzir lesão *in vivo* ou destruir tecidos *in vitro*. Outra hipótese a ser aventada diz respeito à manutenção em cultivo das amebas. Talvez em cultivo axênico a expressão diferencial das CPs seja inibida, havendo necessidade do contato da ameba com a célula a ser lesada para induzir a maior expressão dos genes envolvidos com a lesão tecidual. Neste caso pode ter ocorrido um mascaramento da verdadeira função destas enzimas nos estudos de microarray. Outra hipótese a considerar diz respeito ao envolvimento de outra enzima, que não uma CP ativando a *cp5*. Assim, diferenças na expressão desta enzima estariam relacionadas a virulência da cepa, apesar da *cp5* estar em níveis similares entre as amostras comparadas.

Outros genes como *cp4* e *cp6* apresentaram uma probabilidade alta de serem diferencialmente expressos entre as cepas DRP e HM1, mas como os resultados foram muito variáveis e não apresentaram diferença maior que dois não foram estatisticamente diferentes. Talvez estes e outros genes

sejam diferencialmente expressos, se considerarmos que a análise da expressão diferencial de genes mostra o momento do gene estudado. Assim, devemos levar em conta, o meio onde o organismo está sendo mantido, o cultivo axênico no nosso caso. Neste cultivo, a sobrevivência do parasito é segura, se compararmos com as amebas que estão infectando ou invadindo tecidos do hospedeiro. No estado de parasitismo, a sobrevivência da *E. histolytica* é sempre ameaçada ou por substâncias químicas, produtos do metabolismo de outros microorganismos ou produtos da reação de lesão tecidual produzida pela própria ameba. Neste contexto, poderíamos explicar a similaridade de expressão das CPs entre as diferentes cepas. Talvez estas enzimas estejam relacionadas à sobrevivência das amebas nos tecidos.

Outro ponto a ser considerado é a possibilidade das *cp1*, *cp2*, *cp5* e *cp112*, tidas como importantes nos mecanismos de lesão tecidual amebiana, não terem papel determinante, na virulência. Nossos resultados confirmam esta hipótese, já que as cepas HM1, EGG e DRP foram virulentas em todos os ensaios *in vivo* e *in vitro*. Estes ensaios são confiáveis, sendo utilizados há muitos anos e foram capazes de discernir entre as cepas isoladas de indivíduos sintomáticos e assintomáticos. Além disto, os resultados dos ensaios biológicos e bioquímicos corroboraram com a forma clínica dos pacientes dos quais foram isoladas as cepas. Assim, concluímos que estas enzimas poderiam estar relacionadas com outras funções amebianas que não a de invasão dos tecidos já que não se mostram diferencialmente expressas entre as cepas sintomáticas e assintomáticas. Reforçando esta hipótese, Bruchhaus e colaboradores (1996) e Garcia-Rivera e colaboradores (1999) demonstraram que os genes *cp1*, *cp2* e *cp5* além de serem os mais expressos, são responsáveis por no mínimo 90% da atividade total das cisteil proteinases em *E. histolytica*. Sendo assim, os outros genes desta família estariam sendo pouco transcritos, devido talvez as condições de cultivo requererem mais as

proteínas codificadas pelos genes *cp1*, 2 e 5.

6.3. Supressão por hibridização subtrativa

Está claramente demonstrado na literatura que a hibridização subtrativa (SH), e particularmente a supressão por hibridização subtrativa (SSH), está sendo amplamente utilizada como ferramenta para identificação de novas regiões genômicas diferencialmente expressas. A validade desta técnica e seus resultados vêm reforçar o fato que a hibridização subtrativa tem efetiva evidência na identificação de regiões previamente implicadas com a virulência e não há dúvida que esta técnica é capaz de identificar genes relacionados com a patogenicidade, sendo essa aplicação uma das mais interessantes e utilizadas até agora. Alguns autores vem demonstrando esse resultado, entre eles estão Janke e colaboradores (2001) que encontraram 22 genes específicos para cepa patogênica 536 de *Escherichia coli* quando comparada com a cepa não patogênica K12-MG1655 e Akopyants e colaboradores (1998) que estudaram genes diferentemente expressos em cepas patogênicas de *Helicobacter pylori*.

Assim, com o intuito de continuar caracterizando nossas cepas virulentas e avirulentas, foram selecionados, duas cepas de *E. histolytica*, com diferentes perfis de patogenicidade (EGG e 452), para comparação dos genes diferencialmente expressos, através da técnica de SSH. Estas cepas foram escolhidas por terem constituído opostos extremos nos testes de virulência. A caracterização de tais genes pode contribuir para o entendimento de mecanismos de infecciosidade utilizados pelo parasita, além de promover a descoberta de alvos potenciais para o desenvolvimento de drogas contra a amebíase.

Utilizamos trofozoítos provenientes de cultura das amostras que se encontravam criopreservadas em nosso laboratório. Vale lembrar que as duas amostras estudadas foram obtidas de pacientes com amebíase, sendo

a EGG isolada de um indivíduo com amebíase hepática e a cepa 452 isolada de indivíduo assintomático; ambas as cepas são cultivadas em meio axênico. Quando estudadas com relação ao comportamento em hamster, observamos que, ao contrário da cepa EGG, a cepa 452 não foi capaz de infectar esses animais. Observação semelhante foi obtida quando as duas cepas foram avaliadas com relação ao efeito citopático sobre células do ovário de hamster chinês.

Em nossos resultados de subtração identificamos 9 fragmentos de cDNAs, os quais apresentaram alta homologia a genes já previamente seqüenciados do genoma de *E. histolytica* (Loftus *et al.*, 2005). Entre os genes diferencialmente expressos identificados, alguns estão envolvidos com diversos processos fisiológicos incluindo metabolismo, endocitose, biossíntese de proteínas, transdução de sinal e outros com função ainda desconhecida. Apenas quatro destes genes foram confirmados pela RT-PCR como sendo diferencialmente expressos. Dentre eles estão duas proteínas hipotéticas e uma proteína rica em cisteína, sendo expressos na cepa EGG e a proteína grainin 2 expressa na cepa 452.

A grainin 2 foi recentemente descrita por Nickel e colaboradores (2000), como uma proteína ligada ao cálcio com função ainda desconhecida, sendo encontrada nos grânulos de *E. histolytica*. Embora numerosas funções sejam atribuídas por hipótese a esta proteína, a mais plausível pode ser o controle das vias de endocitose e descarga granular dependente da concentração de cálcio. Davis e colaboradores (2006), também encontraram a proteína grainin sendo mais expressa em cepas com reduzida virulência. Bruchhaus e colaboradores (2002) encontraram um baixo nível de expressão de grainin 1 quando comparou a cepa HM1 recém isolada de fígado de hamster com a mesma cepa mantida em cultura por um longo período. Posteriormente Gilchrist e colaboradores (2006) obtiveram uma expressão diminuída de grainin em trofozoítos de HM1 isolados do cólon de camundongos, dado também obtido por Davis e colaboradores (2006), comparando trofozoítos de cólon humano com

trofozoítos mantidos em cultura. Nossos dados confirmam esses resultados e com isso podemos levantar a hipótese que a expressão de grainin 2 pode estar associada com a reduzida virulência, servindo assim como marcador para um baixo potencial patogênico.

Dois fragmentos de cDNAs, obtidos da cepa EGG, apresentaram homologia com genes de *E. histolytica*, depositados no banco de dados do servidor BLAST, que codificam proteínas com funções ainda desconhecidas. Com o sequenciamento do genoma de *E. histolytica* em 2005, Loftus e colaboradores (2005) demonstraram que, dentre os genes codificadores de proteínas do genoma deste parasito, 41% correspondem a proteínas hipotéticas, com funções ainda não caracterizadas. Como essas proteínas têm ainda funções desconhecidas, talvez possam contribuir para o sucesso da invasão tecidual pela ameba ou para sua sobrevivência no tecido lesionado já que foram encontradas na cepa virulenta.

Foi também expressa somente em EGG uma proteína de 447 pb rica em cisteína, possivelmente encontrada dentro de um grupo de 32 proteínas ricas em cisteínas com dominantes contendo repetições CXC.

Outros genes foram subtraídos na técnica de SSH, mas não foram confirmados pela RT-PCR. Dentre estes cDNAs, dois apresentaram alta homologia com proteínas ribossomais, um com proteína Rab7A da família GTPase e um com o fator de iniciação de tradução (EIF 5A), todos são preditos como altamente conservados em células eucariotas.

Após a caracterização funcional desses genes diferencialmente expressos poderemos obter alguns esclarecimentos para entender a nível molecular o funcionamento amebiano. Nossos resultados confirmam estudos anteriores em que a técnica de SSH é citada como uma boa ferramenta para identificação rápida de genes diferencialmente expressos entre cepas de uma mesma espécie. Nesta identificação, encontramos tanto genes conhecidos como outros de função desconhecida, que podem estar relacionados com a patogenicidade do parasita ou com a susceptibilidade do hospedeiro, expandindo assim a compreensão sobre a

patogênese amebiana. Neste contexto, outras ferramentas podem estar sendo utilizadas pelas amebas na invasão dos tecidos, havendo necessidade de outros estudos para confirmar a importância destas proteínas na patogênese da amebíase.

7. CONCLUSÃO

- ◆ Os parâmetros utilizados para caracterização da virulência mostraram-se eficientes para esse tipo de análise, apresentando concordância com a forma clínica dos pacientes dos quais se obteve as cepas;
- ◆ Identificamos fragmentos de cDNAs diferencialmente expressos pela técnica de Supressão por hibridização subtrativa, sendo eles possivelmente envolvidos com diversos processos fisiológicos incluindo metabolismo, endocitose, biossíntese de proteínas, tradução de sinal e outros com função ainda desconhecida; dentre eles alguns foram confirmados pela técnica de RT-PCR, sugerindo a possibilidade do envolvimento dos mesmos na patogênese amebiana;
- ◆ Nossos resultados confirmam que as técnicas de microarray e supressão por hibridização subtrativa (SSH) são boas ferramentas para identificação de genes diferencialmente expressos entre cepas de uma mesma espécie, possibilitando a identificação de genes relacionados com a patogenicidade do parasita, expandindo assim a compreensão sobre a patogênese da doença.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKOPYANTS, N. S., FRADKOV, A., DIATCHENKO, L., HILL, J. E., SIEBERT, P. D., LUKYANOV, S. A., SVERDLOV, E. D. and BERG, D. E. (1998). PCR-based subtractive hybridization and differences in gene content among strains of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 13108-13113.
- ANKRI, S., PADILLA-VACA, F., STOLARSKY, T., KOOLE, L., KATZ, U. and MIRELMAN, D. (1999a). Antisense inhibition of expression of the light subunit (35 kDa) of the Gal/GalNac lectin complex inhibits *Entamoeba histolytica* virulence. *Mol Microbiol*, **33**, 327-337.
- ANKRI, S., STOLARKI, T. and MIRELMAN, D. (1998). Antisense inhibition of Expression of cysteine proteinases does not affect *Entamoeba histolytica* cithopathic or haemolytic activity but inhibits phagocytosis. *Mol. Microbiol.*, **28**, 777-785.
- ANKRI, S., STOLARSKY, T., BRACHA, R., PADILLA-VACA, F. and MIRELMAN, D. (1999b). Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases affects *Entamoeba histolytica*-induced formation of liver abscess in hamsters. *Infect Immun*, **67**, 421-422.
- ARAÚJO, C., ANTAS, M. G., TANABE, M., OKAZAKI, N., KOBAYASHI, M., KANEKO, N., ROBAYASHI, S. and TAKEUCHI, T. (1988). Investigação sobre o significado do imunodiagnóstico da amebiase. . In *Congresso da sociedade Brasileira de Medicina Tropical*.
- ARAÚJO, R. N. (2003). Desenvolvimento de um painel de microarranjos de genes responsáveis pela resposta imune de bovinos e sua utiliza o no estudo da infec o por nematódeos gastrintestinais. In *Departamento de Parasitologia*, Vol. Doutorado pp. 110. Universidade Federal de Minas gerais, Belo Horizonte.
- ATALAY, A., CROOK, T., OZTURK, M. and YULUG, I. G. (2002). Identification of genes induced by BRCA1 in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **299**, 839-846.
- BARTHOLOMEU, D. C. (2002). Expressão Gênica diferencial em *Trypanosoma cruzi*: Genes de tubulina como Modelo de estudo. In *Departamento de Bioq mica e Imunologia*, Vol. Tese de Doutorado pp. 133. UFMG, Belo Horizonte.
- BARWICK, R. S., UZICANIN, A., LAREAU, S., MALAKMADZE, N., IMNADZE, P., IOSAVA, M., NINASHVILI, N., WILSON, M., HIGHTOWER, A. W., JOHNSTON, S., BISHOP, H., PETRI, W. A., JR. and JURANEK, D. D. (2002). Outbreak of amebiasis in Tbilisi, Republic of Georgia, 1998. *Am J Trop Med Hyg*, **67**, 623-631.
- BENETTON, M. L., GONCALVES, A. V., MENEGHINI, M. E., SILVA, E. F. and CARNEIRO, M. (2005). Risk factors for infection by the *Entamoeba histolytica*/E. dispar complex: an epidemiological study conducted in outpatient clinics in the city of Manaus, Amazon Region, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **99**, 532-540.
- BIAGI, F. and BELTRAN, F. (1969). The challenge of amoebiasis: understanding pathogenic mechanism. *Int. Rev. Trop. Med.*, **3**, 219-239.

- BRACHA, R. and MIRELMAN, D. (1984). Virulence of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Effects of bacteria, microaerobic conditions, and metronidazole. *J Exp Med*, **160**, 353-368.
- BRACHA, R., NUHAMOWITZ, Y., LEIPPE, M. and MIRELMAN, D. (1999). Antisense inhibition of amoebapore expression in *Entamoeba histolytica* causes a decrease in amoebic virulence. *Mol Microbiol*, **34**, 463-472.
- BRAGA, L. L., GOMES, M. L., SILVA, M. W., PAIVA, C., SALES, A. and MANN, B. J. (2001). *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infections as detected by monoclonal antibody in an urban slum in Fortaleza, Northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, **34**, 467-471.
- BRUCHHAUS, I., JACOBS, T., DENART, M. and TANNICH, E. (1996a). Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase of *Entamoeba histolytica*: molecular cloning, recombinant expression and inhibition by pyrophosphate analogues. *Biochem J*, **316 (Pt 1)**, 57-63.
- BRUCHHAUS, I., JACOBS, T., LEIPPE, M. and TANNICH, E. (1996b). *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: differences in numbers and expression of cysteine proteinase genes. *Mol Microbiol*, **22**, 255-263.
- BRUCHHAUS, I., LOFTUS, B. J., HALL, N. and TANNICH, E. (2003). The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during in vitro cultivation. *Eukaryot Cell*, **2**, 501-509.
- BRUCHHAUS, I., ROEDER, T., LOTTER, H., SCHWERDTFEGER, M. and TANNICH, E. (2002). Differential gene expression in *Entamoeba histolytica* isolated from amoebic liver abscess. *Mol Microbiol*, **44**, 1063-1072.
- BRUMPT, E. (1925). Etude sommaire de l'*Entamoeba dispar* n.sp. amibe akkystes quadrinuclees, parasite de l'homme. *Bull.Acad. Méd. (Paris)*, **94**, 942-952.
- CHARLAB, R., VALENZUELA, J. G., ROWTON, E. D. and RIBEIRO, J. M. (1999). Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 15155-15160.
- COUNCILMAN, W. T. and LAFLEUR, H. A. (1891). *Bull. Johns Hopkins Hosp. Rept*, **2**, 395-548.
- CREVENNA, P. B., CRUZ DE SOUZA, L. and DEL CARMEM VELASCO, M. (1972). Prevalence of amebic infection in different sexes, ages and social classes of México city by means of indirect hemagglutination. *Rev. Invest. Salud Publica*, **2**, 68-80.
- CUNHA, A. S. (1975). Patogenia da Amebíase. In *Departamento de Clínica médica da faculdade de Medicina da UFMG*, Vol. Concurso para Professor Titular pp. 160. UFMG, Belo Horizonte.
- CUNHA, A. S., SILVA, E. F., RASO, P. and MELLO, S. M. (1977). Patogenia da Amebíase I aspectos clínicos da amebíase no Brasil, com especial referência ao Estudo realizado em três grupos populacionais de três regiões geográficas distintas. *Rev. Inst. Méd. Trop*, **19**, 289-300.
- DAVIS, P., SCHULZE, J. and STANLEY, S. L. J. (2007). Transcriptomic comparison of two *Entamoeba histolytica* strain with defined virulence phenotypes identifies new virulence factor candidates and key differences in the expression patterns of cysteine proteases, lectin, light chains and calmodulin. *Mol Biochem Parasitol*, **151(1)**, 118-128.

- DAVIS, P. H., ZHANG, X., GUO, J., TOWNSEND, R. R. and STANLEY JR, S. (2006). Comparative proteomic analysis of two *Entamoeba histolytica* strains with different virulence phenotypes identifies peroxiredoxin as an important component of amoebic virulence. *Mol Microbiol*, **61**(6), 1523-1532.
- DEBNATH, A., DAS, P., SAJID, M. and MCKERROW, J. H. (2004). Identification of genomic responses to collagen binding by trophozoites of *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis.*, **190**, 448-457.
- DIAMOND, L. S., HARLOW, D. and CUNNICK, C. (1978a). A new medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other entamoeba. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **32**, 431-432.
- DIAMOND, L. S., PHILLIPS, B. P. and BARTIGIS, I. L. (1974b). A comparison of the virulence of nine strains of axenically cultivated *E. histolytica* in hamster liver. *Arch Invest Med*, **5**, 423-426.
- DIATCHENKO, L., LUKYANOV, S., LAU, Y. F. and SIEBERT, P. D. (1999). Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol*, **303**, 349-380.
- DOBELL, C. (Ed.) (1919). *The amoeba living in man*, John Bale, London.
- EL-SAYED, N. M., HEDGE, P., QUACKENBUSH, J., MELVILLE, S. E. and DONELSON, J. E. (2000). The african trypanosome genome. *International Journal of Parasitology*, **30**, 329-345.
- FREITAS, M. A., VIANNA, E. N., MARTINS, A. S., SILVA, E. F., PESQUERO, J. L. and GOMES, M. A. (2004). A single step duplex PCR to distinguish *Entamoeba histolytica* from *Entamoeba dispar*. *Parasitology*, **128**, 625-628.
- GARCIA-RIVERA, G., RODRIGUEZ, M. A., OCADIZ, R., MARTINEZ, L. P. M. C., ARROYO, R., GONZALEZ-ROBLES, A. and OROZCO, E. (1999). *Entamoeba histolytica*: a novel cysteine protease and a an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Mol Microbiol*, **33**, 556-568.
- GATHIRAM, V. and JACKSON, T. F. (1985). Frequency distribution of *Entamoeba histolytica* zymodemes in a rural South African population. *Lancet*, **1**, 719-721.
- GILCHRIST, C. A., HOUP, E., TRAPAZIDZE, N., FEI, Z., CRASTA, O., ASGHARPOUR, A. and AL., E. (2006). Impact of intestinal colonization and invasion on the *Entamoeba histolytica* transcriptome. *Mol Biochem Parasitol*, **147**, 163-176.
- GOMES, M. A., MELO, M. N., PESQUERO, J. L. and SILVA, E. F. (1997). Characterization for virulence of an axenic strain of *Entamoeba histolytica*: evidence for overexpression of two proteins. *Arch Med Res*, **28**, 489-492.
- GOMES, M. A., PESQUERO, J. B., FURST, C., VALLE, P. R., PESQUERO, J. L. and SILVA, E. F. (1999). An improved method to distinguish *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Parasitology*, **119** (Pt 4), 359-362.
- GRANJEAUD, S., BERTUCCI, F. and JORDAN, B. R. (1999). Expression profiling: DNA arrays in many guises. *Bioessays*, **21**, 781-790.
- GUERRANT, R. L. (1986). Amebiasis: introduction, current status, and research questions. *Rev Infect Dis*, **8**, 218-227.
- GUTIERREZ, G. (1986). [Epidemiology and control of amebiasis in Mexico]. *Arch Invest Med (Mex)*, **17 Suppl 1**, 375-383.
- HANAHAN, D., JESSEE, J. and BLOOM, F. R. (1991). Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol*, **204**, 63-113.

- HAO, Z., KASUMBA, I., LEHANE, M. J., GIBSON, W. C., KWON, J. and AKSOY, S. (2001). Tsetse immune responses and trypanosome transmission: implications for the development of tsetse-based strategies to reduce trypanosomiasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 12648-12653.
- HELLBERG, A., NICKEL, R., LOTTER, H., TANNICH, E. and BRUCHHAUS, I. (2001). Overexpression of cysteine proteinase 2 in *Entamoeba histolytica* or *Entamoeba dispar* increases amoeba-induced monolayer destruction in vitro but does not augment amoebic liver abscess formation in gerbils. *Cell Microbiol*, **3**, 13-20.
- HIRATA, K., QUE, X., MELENDEZ-LOPEZ, S. G., DEBNATH, A., MYERS, S., HERDMAN, S., OROZCO, E., BHATTACHARYA, A., MCKERROW, J. and REED, S. L. (2007). A phagocytosis mutant of *Entamoeba histolytica* in less virulent due to deficient proteinase expression and release. *Exp Parasitol*, **115**(2), 192-199.
- HOARE, C. A. (1961). Considerations sur l'etologie de l'amibiase d'apres le rapport hote-Parasite. *Bull Soc. Pathol. Exot.*, **54**, 429-441.
- HUFTON, S. E., MOERKERK, P. T., BRANDWIJK, R., DE BRUINE, A. P., ARENDS, J. W. and HOOGENBOOM, H. R. (1999). A profile of differentially expressed genes in primary colorectal cancer using suppression subtractive hybridization. *FEBS Lett*, **463**, 77-82.
- HUSTON, C. D. (2004). Parasite and host contributions to the pathogenesis of amebic colitis. *Trends Parasitol*, **20**, 23-26.
- JACOBS, T., BRUCHHAUS, I., DANDEKAR, T., TANNICH, E. and LEIPPE, M. (1998). Isolation and molecular characterization of a surface-bound proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Mol Microbiol*, **27**, 269-276.
- JANKE, B., DOBRINDT, U., HACKER, J. and BLUM-OEHLER, G. (2001). A subtractive hybridisation analysis of genomic differences between the uropathogenic *E. coli* strain 536 and the *E. coli* K-12 strain MG1655. *FEMS Microbiol Lett*, **199**, 61-66.
- KARTULIUS, S. (1886). Zur Aetiologie der Dysenterie in Aegypten. *Arch. F. Path. Anat.*, **105**, 521-531.
- KEENE, W. E., HIDALGO, M. E., OROZCO, E. and MCKERROW, J. H. (1990). *Entamoeba histolytica*: correlation of the cytopathic effect of virulent trophozoites with secretion of a cysteine proteinase. *Exp Parasitol*, **71**, 199-206.
- KEENE, W. E., PETITT, M. G., ALLEN, S. and MCKERROW, J. H. (1986). The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med*, **163**, 536-549.
- KÖCH, R. and GRAFFKI, G. (1887). Bericht über die Thatigkeit der zur Erforschung der cholera im Jahre 1883 nach Egypten und Indien entsandten Kommission. *Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte*.
- KUANG, W. W., THOMPSON, D. A., HOCH, R. V. and WEIGEL, R. J. (1998). Differential screening and suppression subtractive hybridization identified genes differentially expressed in an estrogen receptor-positive breast carcinoma cell line. *Nucleic Acids Res*, **26**, 1116-1123.
- LAMBL, W. (1860). Beobachtungen und studien aus den Gebiete der pathologischen Anatomic Und Histologie Aus dem Franz Josef-Kinder-Spitale in Prag (Loschner & Lambl) I Theil, sect XIII (6). In *Zur Pathologie des Darms*: Dobbell, C, "The Amoebae living in man, 1919". Vol. 365.
- LEIPPE, M. (1997). Amoebapores. *Parasitol Today*, **13**, 178-183.

- LEIPPE, M., BAHR, E., TANNICH, E. and HORSTMANN, R. D. (1993). Comparison of pore-forming peptides from pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol*, **59**, 101-109.
- LEIPPE, M., SIEVERTSEN, H. J., TANNICH, E. and HORSTMANN, R. D. (1995). Spontaneous release of cysteine proteinases but not of pore-forming peptides by viable *Entamoeba histolytica*. *Parasitology*, **111** (Pt 5), 569-574.
- LI, E., YANG, W. G., ZHANG, T. and STANLEY, S. L., JR. (1995). Interaction of laminin with *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases and its effect on amebic pathogenesis. *Infect Immun*, **63**, 4150-4153.
- LIVAK, K. J. and SCHMITTGEN, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and (-Delta delta C(T)) method. *Methods*, **25**, 402-408.
- LOCKYER, A. E., SPINKS, J., NOBLE, L. R., ROLLINSON, D. and JONES, C. S. (2006). Identification of genes involved in interactions between *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* by suppression subtractive hybridization. *Mol Biochem Parasitol*.
- LOFTUS, B., ANDERSON, I., DAVIES, R., ALSMARK, U. C., SAMUELSON, J., AMEDEO, P., RONCAGLIA, P., BERRIMAN, M., HIRT, R. P., MANN, B. J., NOZAKI, T., SUH, B., POP, M., DUCHENE, M., ACKERS, J., TANNICH, E., LEIPPE, M., HOFER, M., BRUCHHAUS, I., WILLHOEFT, U., BHATTACHARYA, A., CHILLINGWORTH, T., CHURCHER, C., HANCE, Z., HARRIS, B., HARRIS, D., JAGELS, K., MOULE, S., MUNGALL, K., ORMOND, D., SQUARES, R., WHITEHEAD, S., QUAIL, M. A., RABBINOWITSCH, E., NORBERTCZAK, H., PRICE, C., WANG, Z., GUILLEN, N., GILCHRIST, C., STROUP, S. E., BHATTACHARYA, S., LOHIA, A., FOSTER, P. G., SICHERITZ-PONTEN, T., WEBER, C., SINGH, U., MUKHERJEE, C., EL-SAYED, N. M., PETRI, W. A., JR., CLARK, C. G., EMBLEY, T. M., BARRELL, B., FRASER, C. M. and HALL, N. (2005). The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature*, **433**, 865-868.
- LOFTUS, S. K., CHEN, Y., GOODEN, G., RYAN, J. F., BIRZNIKES, G., HILLIARD, M., BAXEVANIS, A. D., BITTNER, M., MELTZER, P., TRENT, J. and PAVAN, W. (1999). Informatic selection of a neural crest-melanocyte cDNA set for microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 9277-9280.
- LOHIA, A. (2003). The cell cycle of *Entamoeba histolytica*. *Mol Cell Biochem*, **253**, 217-222.
- LOPEZ-VANCELL, R., MONTFORT, I. and PEREZ-TAMAYO, R. (2000). Galactose-specific adhesin and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Res*, **86**, 226-231.
- LÖSCH, F. (1875). Massenhafte entwicklung von amoeben im dickdarm. *Virchows Archiv klinische Medizin*, **65**, 196-211.
- LYNCH, E. C., ROSEMBERG, I. M. and GITLER, C. (1982). An ion Channel forming protein produced by *Entamoeba histolytica* *Embo J*, **1**(7), 801-804.
- MACFARLANE, R., BHATTACHARYA, D. and SINGH, U. (2005). Genomic DNA microarrays for *Entamoeba histolytica*: applications for use in expression profiling and strain genotyping. *Exp Parasitol*, **110**, 196-202.

- MACFARLANE, R. C. and SINGH, U. (2006). Identification of differentially expressed genes in virulent and nonvirulent *Entamoeba* species: potential implications for amebic pathogenesis. *Infect Immun*, **74**, 340-351.
- MARTINEZ-PALOMO, A. (Ed.) (1988). *Biology of Amebiasis: Progress and Perspectives in the Biology of Parasitism.*, Alan R. Liss, New York.
- NICKEL, R., JACOBS, T., URBAN, B., SCHOLZE, H., BRUHN, H. and LEIPPE, M. (2000). Two novel calcium-binding proteins from cytoplasmic granules of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *FEBS Lett*, **486**, 112-116.
- OCADIZ, R., OROZCO, E., CARRILLO, E., QUINTAS, L. I., ORTEGA-LOPEZ, J., GARCIA-PEREZ, R. M., SANCHEZ, T., CASTILLO-JUAREZ, B. A., GARCIA-RIVERA, G. and RODRIGUEZ, M. A. (2005). EhCP112 is an *Entamoeba histolytica* secreted cysteine protease that may be involved in the parasite-virulence. *Cell Microbiol*, **7**, 221-232.
- OLIVOS-GARCIA, A., GONZALEZ-CANTO, A., LOPEZ-VANCELL, R., GARCIA DE LEON MDEL, C., TELLO, E., NEQUIZ-AVENDANO, M., MONTFORT, I. and PEREZ-TAMAYO, R. (2003). Amebic cysteine proteinase 2 (EhCP2) plays either a minor or no role in tissue damage in acute experimental amebic liver abscess in hamsters. *Parasitol Res*, **90**, 212-220.
- PACHECO, J., SHIBAYAMA, M., CAMPOS, R., BECK, D. L., HOUP, E., PETRI, W. A., JR. and TSUTSUMI, V. (2004). In vitro and in vivo interaction of *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin with various target cells: an immunocytochemical analysis. *Parasitol Int*, **53**, 35-47.
- PETRI, W. A., JR. (2002). Pathogenesis of amebiasis. *Curr Opin Microbiol*, **5**, 443-447.
- PETRI, W. A., JR., HAQUE, R. and MANN, B. J. (2002). The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Annu Rev Microbiol*, **56**, 39-64.
- PHAM, V. L., DUONG, M. H. and PHAN, N. H. (1996). Amebic abscess of the liver: ultrasound guided puncture. *Ann. Chir*, **50**, 340-343.
- QUE, X., BRINEN, L. S., PERKINS, P., HERDMAN, S., HIRATA, K., TORIAN, B. E., RUBIN, H., MCKERROW, J. H. and REED, S. L. (2002). Cysteine proteinases from distinct cellular compartments are recruited to phagocytic vesicles by *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol*, **119**, 23-32.
- QUE, X. and REED, S. L. (1997). The role of extracellular cysteine proteinases in pathogenesis of *Entamoeba histolytica* invasion. *Parasitol Today*, **13**, 190-194.
- QUE, X. and REED, S. L. (2000). Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev*, **13**, 196-206.
- QUNICKE, H. and ROSS, E. I. (1893). Über amöben-enteritis. *Berliner Klinische Wochenschrift*, **30**, 1089-1094.
- RAKEL, R. E. (Ed.) (1998). *Conn's current therapy*.
- RAVDIN, J. I. (1988). Amebiasis Human Infection by *E. histolytica*. *Ed John Wiley e Sons*, 126-149.
- REED, S., BOUVIER, J., POLLACK, A. S., ENGEL, J. C., BROWN, M., HIRATA, K., QUE, X., EAKIN, A., HAGBLUM, P., GILLIN, F. and ET AL. (1993). Cloning of a virulence factor of *Entamoeba histolytica*. Pathogenic strains possess a unique cysteine proteinase gene. *J Clin Invest*, **91**, 1532-1540.
- REED, S. L., KEENE, W. E., MCKERROW, J. H. and GIGLI, I. (1989). Cleavage of C3 by a neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J Immunol*, **143**, 189-195.

- SANGER, F., NICKLEN, S. and COULSON, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**(1), 5463-5467.
- SARGEANT, P. G. (1982). Amoebiasis. *J R Soc Med*, **75**, 920-921.
- SATO, D., TSUKUI, K. N., OKADA, M. and NOZAKI, T. (2006). Two cysteine proteases inhibitors, EhCP1 and 2, localized in distinct compartments, negatively regulate secretion in *Entamoeba histolytica*. *Febs J*, **580**, 5306-5312.
- SCHAUDINN, F. (1903). Untersuchungen über die Fortpflanzung einiger Rhizopoden. *Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte*, **19**, 547-576.
- SCHEINA, D., ROSINA, P., CHEREGATO, C. and COLOMBARI, R. (1995). Lymphomatoid-like contact dermatitis from cobalt naphthenate. *Contact Dermatitis*, **33**, 197-198.
- SCHOLZE, H., OTTE, J. and WERRIES, E. (1986). Cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. II. Identification of the major split position in bovine insulin B-chain. *Mol Biochem Parasitol*, **18**, 113-121.
- SEPULVEDA, B. (1976). [Contribution of Don Miguel F. Jimenez to the study of liver abscess in Mexico]. *Gac Med Mex*, **112**, 259-265.
- SILVA, E. F. (1997). *Entamoeba histolytica*: Isolamento, axenização e caracterização de diferentes cepas através de parâmetros morfológicos, bioquímicos, biológicos e de patogenicidade “in vivo” e “in vitro”. In *Departamento de Parasitologia, ICB*, Vol. Tese de Doutorado pp. 285p. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SILVA, M. C., MONTEIRO CDO, S., ARAUJO BDOS, A., SILVA, J. V. and POVOA, M. M. (2005). [Determination of *Entamoeba histolytica* infection in patients from Greater Metropolitan Belem, Para, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antigen detection]. *Cad Saude Publica*, **21**, 969-973.
- SPIELMANN, T. and BECK, H. P. (2000). Analysis of stage-specific transcription in *Plasmodium falciparum* reveals a set of genes exclusively transcribed in ring stage parasites. *Mol Biochem Parasitol*, **111**, 453-458.
- STANLEY, S. L. (2001). Pathophysiology of amoebiasis. *Trends Parasitol*, **17**, 280-285.
- STANLEY, S. L., JR. (2003). Amoebiasis. *Lancet*, **361**, 1025-1034.
- STANLEY, S. L., JR., ZHANG, T., RUBIN, D. and LI, E. (1995). Role of the *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase in amebic liver abscess formation in severe combined immunodeficient mice. *Infect Immun*, **63**, 1587-1590.
- STANLEY, S. L. J. (2005). The *Entamoeba histolytica* genome: something old, something new, something borrowed and sex too? Review. *Trends Parasitol.*, **21**, 451-453.
- STAUFFER, W. and RAVDIN, J. I. (2003). *Entamoeba histolytica*: an update. *Curr Opin Infect Dis*, **16**, 479-485.
- TANAKA, T. S., JARADAT, S. A., LIM, M. K., KARGUL, G. J., WANG, X., GRAHOVAC, M. J., PANTANO, S., SANO, Y., PIAO, Y., NAGARAJA, R., DOI, H., WOOD, W. H., 3RD, BECKER, K. G. and KO, M. S. (2000). Genome-wide expression profiling of mid-gestation placenta and embryo using a 15,000 mouse developmental cDNA microarray. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 9127-9132.
- TANNICH, E. (1998). Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene Meeting at Manson House, London, 19 February 1998. Amoebic disease. *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*: comparison of molecules considered important for host tissue destruction. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **92**, 593-596.

- TAVARES, P., RIGOTHIER, M. C., KHUN, H., ROUX, P., HUERRE, M. and GUILLEN, N. (2005). Roles of cell adhesion and cytoskeleton activity in *Entamoeba histolytica* pathogenesis: a delicate balance. *Infect Immun*, **73**, 1771-1778.
- WALKER, E. L. and SELLARDS, A. W. (1913). Experimental entamoebic dysentery. *The Phillipine journal of Science, B. Tropical Medicine*, **8**, 253-331.
- WALSH, J. A. (1986). Amebiasis in the world. *Arch Invest Med (Mex)*, **17 Suppl 1**, 385-389.
- WEBER, C., GUIGON, G., BOUCHIER, C., FRANGEUL, L., MOREIRA, S., SISMEIRO, O., GOUYETTE, C., MIRELMAN, D., COPPEE, J. and GUILLEN, N. (2006). Stress by heat shock induces massive down regulation of genes and allows differential allelic expression of the Gal/GalNAc lectin in *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot Cell*, **5(5)**, 871-875.
- WHO (1997). WHO/PAHO/UNESCO report. A consultation with experts on amoebiasis. Mexico City, Mexico 28-29 January, 1997. In *Epidemiol Bull*, Vol. 18 pp. 13-14.
- WILHOFERT, U., CAMPOS-GONGORA, E., TOUZNI, S., BRUCHHAUS, I. and TANNICH, E. (2001). Introns of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Protist*, **152**, 149-156.
- WILHOFERT, U., CAMPOS-GONGORA, E., TOUZNI, S., BRUCHHAUS, I. and TANNICH, E. (2001). Introns of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Protist*, **152**, 149-156.
- YANG, G. P., ROSS, D. T., KUANG, W. W., BROWN, P. O. and WEIGEL, R. J. (1999). Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res*, **27**, 1517-1523.
- ZHANG, Z., WANG, L., SEYDEL, K. B., LI, E., ANKRI, S., MIRELMAN, D. and STANLEY, S. L., JR. (2000). *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases with interleukin-1 beta converting enzyme (ICE) activity cause intestinal inflammation and tissue damage in amoebiasis. *Mol Microbiol*, **37**, 542-548.
- ZLOBL, T. L. (2001). Amebiasis. *Prim. Care Update Ob Gyns*, **8**, 65-68.

9. ANEXOS

Tabela 1. Lista de oligonucleotídeos utilizados nas lâminas do microarray

	Nome da proteína	Posição do spot	No. do acesso	Seqüência de Oligonucleotídeos (5'—3')
1	Actina	A1		CTACATTCCAAAACATGTGGATTACCAAGGAAGAATATGATGAATCTGGACCAGCTATTG
2	cp-1	A6	XM_645064	TCACTGTCATTTTGTATGTTTTATATTGGATATGGGATTGATTTCAATACATGGGTTGCCA
3	cp-2	A7	XM_645550	ATGTTTGCTTTTATTGTGTTACTTGCTATTGCAAGTGCTATTGATTTCAATACATGGGCT
4	cp-3	A8	XM_648162	CAACAACATGTGTGGTATTGGAAGAGATTCTAACTATCCAACCGGAGTCAAGTTAATTTA
5	cp-4	A9	XM_651510	TTCCTCCAAAAGTTCAAACTACTGGTTAACTCATGTTACTCCAAGTGAAGAAGCTTTA
6	cp-5	A10	XM_645845	TGCTGTTAAAATTACTGGACAAAAATTAGTTAGACCAGGAAGTGAAAAAGCACTTATGCG
7	cp-6	A11	XM_652272	ATGTTTGTTTACTCTTTGTTACTCTCATTTCATTGAGCAATGCTATTAGCTTTGATAAA
8	cp-7	B2	XM_652354	AATGTCCAGAAATAAGAATAATCAATGTGGTATTTGCACAGGAATTCATCCCAGTTGG
9	cp-8	B3	XM_650583	ATCAACCTGTAGCAGTATCTATTGATTCCTCACAATAAGTTTTCAATTTTATGAAGGGG
10	cp-9	B10	XM_646598	GTAATAGTTGGGGTGATTGAAAATGGGGAGAAGATGGATATATGAGACTTTATAGAGGAG
11	cp-10	C1	XM_646598	CTTACTCGTGAAGAAAGTGTGGCTATTGCACAAGGAATTCATATAGACAAATCTGATCTT
12	cp-11	C5	XM_648731	CCAATTAATCAAGTGGAACAAGATATTTTGAAGCAACAATTGATGGTATTGAAGCAGCA
13	cp-12	D2	não anotado	CATAAATCGTACCAACAAAGCAGAGTATCTTTATCGTCTCGCCGTCTTCTTAGACAAC
14	cp-13	B1	XM_646489	ACTGTTGATGGTTATGGAGAATGTGATGGACATAAATTCCTTTGGGTAAGAAATTCATGG
15	cp-14	B4	AY156069	GTGGATGTGGAGGAGGATTTGCTGAAGATGTTCTTGATTCTGTAGATGGAATTTATTATG
16	cp-15	B5	XM_651655	CTTGTGGGTCATGTTATTGTGTAAGTAATGCTCTTGCTCTCAATTAATAATGGGCTAATC
17	cp-16	B6	XM_643409	AGAATAGTTATTATTGTGAGGGAGGTAATGCTCTTGCTCTCAATTAATAATGGGCTAATC
18	cp-17	B7	XM_647579	CTGCTAAGTTATCTGCTGACAGTTTATGTGGAATAGGAAATGTGATGGTGAGAATGTTCT
19	cp-18	B8	XM_647373	AAACATCAAGCATTGAGCACACAACAATCATTGATTGTTCAACAATAATGGGTGTAGT
20	cp-19	B9	XM_645308	AGAGAATCACAACGATGTTATTCATGTAAAAGTTCTATCGACTAAATCAATATCTTGT
21	cp-20	B11	XM_645957	ACCATGGATAGTCGTGGTATGTGTTTATGATAAATCTTATCCTTCAATTCAGAAAGATGCT
22	cp-21	E5	XM_647901	CTCAAAGCATTGCGTTAATCTAGAACTCCCGTAGACAAATGTTTATTAGTTCAAAA
23	cp-22	C3	XM_643214	ACATTAATAATGTTCTGCTTGTAAAGCAAATACTACTCTTGATGCAAGAGGAATGTGTGTT
24	cp-23	D7	XM_642921	AAAGAGTATTTGACTATGATGAGAGAGCACAATGCAAAAGGAAGTTCTTATAGAATGGGA
25	cp-24	C2	XM_649361	ACTTTTAAACGTGGGGTATGCAAACTAGAGAGATGGGAGATGGACTTATTGTTTATCTA
26	cp-25	C4	XM_651540	TCAGCATATGTTATTCCTGAAAATAGAATCACTCCAGTTAAAGGACAATTAGCTAGAGGT
27	cp-26	C6	XM_650036	CGTTCAACTTGTTGGTCTTTTGTACTTCTGGTTTCTTAGAGTCTGCCTATAATTCTGAG
28	cp-27	C7	XM_650708	TATCCTCAATAAACATTTACCATTCTGGGGAGGGTATGTTGGAAGTCATTTGAAATTGA*
29	cp-28	C8	XM_649708	TGCACCATTATCAAAGAGAATGAAATAGTATCGACGTTTGAAGTCTGTAGGAAATGT
30	cp-29	C9	XM_646461	ACTTGTGGAGCATTTATTATTAGAGATTCTACTGATGATACTCTTGTTTATGGCAGTCAT
31	cp-30	C10	XM_652181	AATGGTATTAGAAAAGGATTTCTTAAAGAAAATGAATATCTTAGACTATCACCTCAAGCA
32	cp-31	C11	XM_652181	AGAAAGTTCATATAGAGCTTATGGTCTTCGACATAATCTTCTTAACTCAACAGAGTATGT
33	cp-32	D1	XM_649919	GTACCATGTCCATCATCTTTAGGAGGGGATTGTGTTGTACTIONTTTAAATCCATATTCC
34	cp-33	D3	XM_649737	TGCACCATTATCAAAGAGAATGAAATAGTATCGACGTTTGAAGTCTGTAGGAAATGT
35	cp-34	D4	XM_642991	TGGGTGTCGAGATTTAGAAACGATAAATAAGTCATTTGATCCAGATTTTGCTCCTTCATT
36	cp-35	D5	XM_645737	TTAGTTCGTAACGAATTTCAAGGTGATTGTATTAATGACCAACTTAAAGTGAGTGTCAA
37	cp-36	D6	XM_651464	GCTACCATTGGTCTTTTGAACAATCATATAGAGATAATGACTATCACCTCAAGCATATG

Tabela 2 – Lista de iniciadores utilizados no PCR em Tempo Real

	Nome da proteína	No. do acesso	Iniciador 1 (5')	Iniciador 2 (3')
1	<i>cp</i> -A1	XM_645064	TGCATCATCTGTTCAATTCC	CAACACCATATCCAACAGCA
2	<i>cp</i> -A5	XM_645845	GTTGCTGCTGAAGAACTTG	GTACCATAACCAACTACTGC
3	<i>mp</i> 48-1	XM_643678	GGTAATCATCAATTAGCAAG	TTGCTTGTATTTCGTTCTACA
4	<i>sp</i> 9-2	XM_651453	GTTGATGATGCATGTGGATG	TTCAAGACCAGCATGAATTG
5	Actina		AAGCTGCATCAAGCAGTGAA	GGAATGATGGTTGGAAGAGG

Tabela 3 – Lista de iniciadores utilizados no RT- PCR

Nome da proteína	N de acesso no GeneBank	Iniciador 1 (sense)	Iniciador 2 (antisense)
1 Actina		GCTGCATCAAGCAGTGAA	GAATGATGGTTGGAAGAG
2 Grainin 2	XP_649888.1	GTCTTTGTTTGCTATCC	GTTCTTGCACTTTCAGG
3 Rab7- GTPase	XP_650371.1	TGCAGGGAAAAAGATTC	AACAAGGGCAATCAGAC
4 Rib. 60S	XP_655273.1	ACTTCACATTAGCCCAG	TAATAGCAACCATACCG
5 Hip.108.t00008	XP_654688.1	TCAGCATGTGCTCAATC	TTCCATGTCCAATTCTC
6 Hip.263.t00003	XP_657103.1	TGGGTCTCTTCAGACAG	ATAACTTTTCCACCTCC
7 Cisteína	XP_652703.1	TGTCAGGAACACCAATC	CTACAGAACTTTCCTCC
8 Rib 40S- S17	XP_657397.1	GGAGTCAGAACTAAAAC	AGCATTTTGAGAGTAAC
9 Eif – 5A	emb/CAA82856.1	AATGCTGAACATTCTGG	GCTTCAATACCCATAGC
10 Gal/GalNac	Gb/AAM22200.1	GGATTTCTTGTTTGG	AGCATTTTGAGAGTAAC

Tabela 4 – Lista das seqüências das possíveis proteínas codificadas pelos cDNAs específicos de cada uma das cepas de *E. histolytica*

Proteína homóloga	Seqüência das proteínas
Família GTPase-Rab 7A	gctgcagggaaaaagattccttttaaaagtaattattccttggtgattcaggtggtggaaaa acttctttaatgaaccaatgttgaatcataaataatagttctgtctataaagcaactatt ggtgctgacttcttaacaaaagatcctgttggtgataatcatgaagtaacaatgcaaat tgggatactgcccgaatgaacgattccaatcccttggagttgctttctacagaggtgca gattggtgctccttgttatgatgtcaatgacccaaaaacatttgagtctttaaacaac tggagagaagaattccttgttcaagcttcaccaaagaaccaagaccaattccatttgtt gttttaggaaataaagttgatacttatgaaggaagtctgatgctattaagaagaaggct gaacaatggtgttcagaacatttcaatattcctttcttcgaaacttctgctaaaaatgct accaatgtagatgctgctttccaatcaattgcccagctgctattgctcaaaagggact gatactgatatttatgtcatgaaccaagttaatatgcatcagcctgctcctcaagctcaa aagtctgattgccccttgttga
Prot. hipotética 263.t00003	tgggtctcttcagacaggggcaatcagcgccattgataaagagacaaaatatcttgcaga aaatggagacacgatttcacaacgaatggatagaattggagatattgcaggaaaagccgc aatggttcttgaaccagttgcaaggttactaatattggtggaccaggaattagaggaaa atatggacggttagctgtaggagcaatcaatggagcagcgaaggagcgcgctgctatta cttaggtgcacgtggagcagcaagtataactagatcagctacgggggtgtctaaacaata ccaaaaccaagaaggaacgcctgaagagaaagtaagattaatgaaagaagtaataataca aaatgccaaagatgaaggaaagaaactccttgcaaatggagttggtgacttgcaggcaa agctgctactggttgccttttggaaatagaatagtttcaggaggtggaaaagttat
Gal/GalNac lectin heavy subunit	gcaggacaaggacaagttgatccacttggttaatatgctaagaatgacttattcaaaatg atctctgacaagaaaatcaaaagaggaactatggttgtggttaatggacaatgcacttgg tcagaatattaatgcagaaacagaatattgatagaaagaatatttcagttcatactggtgt cttaatagaaataaagactcaaagattacatatagtgctttgaaacttgtttcacttgg ccacattatcatgaattcacaagtaatagtggaagtatcaactactattgatgaactttc aaaggaattagagctaatttaacagaaagatgtgatagagataaatgttcaggattttgt gatgcaatgaatagatgcacatgtccaatgtgttgtgagaatgattgtttctatacatcc tgtgatgtagaaacaggatcatgtattccatggcctaaagctaaaccaaaagcaaaagaa gaatgtccagcaacatgtgtagggttatatgaatgtaaagatccttgaaggatgtgtgtt acaaaatataacgcatccttgtgaacaaaagtgaatgcatggtacatattgtgatgac gataataatctaaaggaagtatgtaaacaaaagctaatgtgaagcagatc
Prot. L21 ribosomal 60S	atgccattatctaacggtagaaatagaagaaccagaaaattatttaagagaccattcaga ggacatggactctcaaacacttcaaccattcttcacacataaaaagttgggtgattatgta acaatcctctgtaattcatctattcaacatggtcttccatacaaaagctttccatggaaag actggacgtggttggaaatgtaataccacatgccattggagttatggttaataaagaagtc aataatagaattgtagttaaaagacttcacattagccagaacatcagaccatctgga tgccaaaagacttccctgaaagaaaggctgctgttgccttagaaagcaaaacatt caattaaagaagaaggaaaaccacttcttccattaccagctaaagagacttccaaaaca ccaagaccagctgaacttattaaaggtgctgatattaagttcactactggttgcctcact aaattcgaagaactttattaa
Proteína rica em cisteína	atgtcaggaacaccaatctgcccacttgtcataagcgtggttatttcaacgaaagattaa ctttcgctggtaaggattatcataaaattgggttgccttcaaatgtacttcatgccataagac acttgaaatcttaagctcgtgagctctgatggcatgccttattgtggttaattgtcatgca caaaaacaaggacttaaggattccaaccaggaaatgttcttacttcatatactggttatg gtggaggaaaaggagaggttgataattctactgttgttgggtggtagaattgctgaggttgc tgcccaagaaggctgaacaaatgagaaatgctccagtcagatcagaacctgctccatct

	gatcttccaaagttctgtccaagttgtggtgccagaataatggaggaaagttctgtag
Prot. S17 ribosomal 40S	ggaggagtcagaactaaaactgttaagagagctgcaagaaatattattgaaaagtactat ccacttttaactcttgatttccataactaataaacatggtggtgatgaagttgctggtggt gaaactaaacgattaagaaataaaaatcgctgggttccattactcatttaatgagaagaatc caaaaagggtccagtttagaggaatctcttccaaacttcaagaagaagaagagaaagaaga gataattatggtccagaaaaatctgaagttaatattgataaaaattactgctgatccagtt actctcaaaatgcttgaatcaattggaatgccaatataaaaaagaactaa
Prot. hipotética 108.t00008	tcagcatgtgctcaatcaagtggatTTTTGGATGCCAACACTATACCgTgTtCaagaaagac ttggagaagttgctatgagattagatgaagttgaagatgaagaaagacatgctcggagatat gattgatgaaaatattaaagatttagaaaatgtgatcacaacacgagaaaagtatattatt ggaagaaaattaacacatttaagatctaaaatgggtggtttaccatacaaaagaaattagccc ttcttagagttatgaagaaaattgttaaaaaacatccaagaaaattcagagctagaatgat tagaagattaagattagaaaagagattcaacgctatttagagatatggcccgtgatgctaag tatgttcttaagtcacatggacatatttcacataaaaacagataccaaaaaaactctcaaga gaattggacatggaa
Fator de iniciação de tradução HM1 eIF-5A	gtaatgctgaacattctggagtatatccatgccaatgctctgctttaaagaaaagggtggtta tggtggtatcaaggggaagaccatgcaaggtttttgaaa tgtcaacttctaagactggaaa acatggacatgctaaagttacttatgctgggttatgatattttcactggaaagagacttgat gattcttgcccatcaactcataatggtgaagtcccagaagtaaagagaactgaatactctc ttggttggtattaatgatggatatgcatcacttcttcttgaaagtggtgaaactagagacga tcttaaactcccagaaggtgaaatgggacaaaagattcaagctgattatgatgatggaaaa gaactcattattgctattcaaaactgctatgggtattgaagcca
Grainin 2	gtctttggttgctatccaagctgctgctgatgcttttgtcaccCAAATgattcaagctgct gttaactctgatccaaatctcaagttccaatgggtggttccattagttgaaagattagatg ctaaagatttacaaaaccttcaatcatgggttatttagtggtgataaggataaatctggaac tcttgaaattggagaattaaagaaagctaaattcccaggaggaattaaagttgacgataaa acaataaagagattaatgagagcttttgatattgatatgtcaggatcaattggattctttg aatccttgctttatggaatttcatgaacctttgtaatgaaacatttaaacactttgatgc tgataaaagtggagctttgatgtcaatgaattaatcaaagctcttccaatgcttggattc aattgcaataagagatcagttgatgtcttattgaaaatgaacgggttcatcattgggatcta agaaagtttcaaagaaccaattcattagtagtctgcttattcttggacaatgcagaagtat ttacaaaagactttcaatatgaagagagaagaaattgataatgctgaattcgataagttc gtaatttagttcttgcactttcagg

