

AValiação de Derivados da Cubebina no Processamento de mRNAs da Cepa Bolívia de *Trypanosoma cruzi*.

Erica Sayuri Okuda, Regina Maria Barretto Cicarelli, Mariana Duó Passerini, Márcio Luis Andrade e Silva, Sérgio de Albuquerque. – Farmácia - Farmácia-Bioquímica - Departamento de Ciências Biológicas – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Campus de Araraquara.

A tripanossomíase americana é uma zoonose causada pelo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. A maior parte dos casos de infecção humana, ou de outros vertebrados, é causada pela via vetorial, consequência do contato da pele ou mucosas com as fezes ou urina de insetos hematófagos (triatomíneos) contaminados pelo parasito (SCHUMUNIS, 2000). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) existem entre 16 e 18 milhões de pessoas infectadas nas Américas, onde cerca de 25% da população encontra-se em risco de contrair a doença.

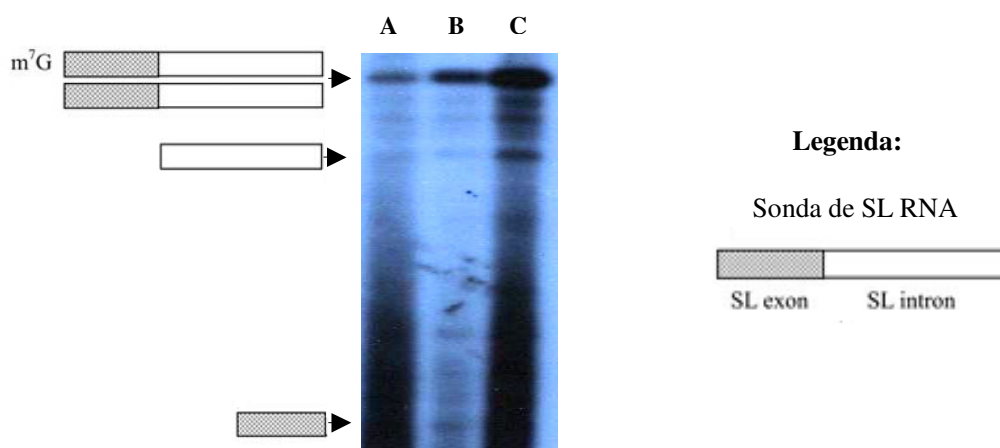
O *T. cruzi* não constitui uma população homogênea. Diferentes cepas circulam na natureza, com grande variação intra-específica em termos de polimorfismo, capacidade infectante, comportamento em relação a diferentes hospedeiros, adaptação a distintas espécies do vetor, capacidade de indução de resposta imune, sensibilidade a agentes químicos, possibilidade de replicação e diferenciação, etc. (CIMERMAN, 1999). A cepa Bolívia foi isolada de triatomíneo e mostrou-se menos sensível ao nifurtimox e ao benzonidazol do que a cepa considerada padrão (Y) (MARTINEZ-DIAZ et al., 2001). Estudos realizados em nosso laboratório mostraram que esta cepa também apresenta diferentes características frente a outras substâncias tripanocidas (BARBOSA et al., 2006).

A expressão da informação genética contida em um segmento de DNA em eucariotos envolve etapas que se iniciam com a síntese de um precursor do RNA mensageiro (pré-mRNA ou transcrito primário), seguido de um processamento de maturação, tornando-o apto para sair do núcleo e ir para o citoplasma sofrer tradução nos ribossomos. No processo de maturação do pré-mRNA, conhecido como *splicing*, os íntrons (regiões intergênicas não codificadoras de polipeptídios) são removidos dos transcritos primários e os éxons (regiões codificadoras), unidos para formar uma sequência contígua especificando um polipeptídeo funcional (BACH 1992; LEHNINGER 1995; DE ROBERTS, 1993). Em tripanosomas e nemátodes esse processo é denominado *trans-splicing*, pois envolve a união de éxons de dois transcritos independentes, um transcrito curto (aproximadamente 39 nucleotídeos), denominado de *spliced leader* (SL) RNA, que é transferido para todo mRNA nuclear, cuja maioria é sintetizada como precursores policistrônicos (AGABIAN, 1990). O *splice leader* está presente em aproximadamente 200 cópias por genoma (DE LANGE et al., 1983 apud MAYER & WINTER, 2005) e sua transcrição origina um pequeno RNA de 135-147 nucleotídeos (MILHAUSEN, 1984 et al. apud MAYER & WINTER, 2005). Outra característica importante do SL RNAs é a presença de uma estrutura 5'cap; a adição de m⁷G é essencial para o metabolismo e processamento do RNA em eucariotos. A transferência da sequência SL para o 5'UTR (*untranslatable regions*) de pré-mRNAs resulta no *capping* do mRNA, que persiste durante a vida do mRNA maduro (TSCHUDI & ULLU, 2002 apud MAYER & WINTER, 2005).

A cubebina, uma substância extraída da semente seca da *Piper cubeba* e das folhas do arbusto *Zanthoxylum naranjillo*, parece proporcionar tratamentos com menos efeitos colaterais que o benzonidazol, conforme testes realizados *in vitro* (em células) e *in vivo* (em camundongos) (CANÇADO, 2003). E em amastigostas, a hinoquinina (derivada da cubebina) apresentou atividade similar ao benzonidazol (SOUZA, 2005). Na tentativa de compreender o mecanismo de ação dessas substâncias, avaliou-se, neste trabalho, a atividade de dois derivados da cubebina (hinoquinina – HQ e 6,6'- dinitrohinoquinina – DNH) na síntese e no processamento dos RNAs mensageiros da cepa Bolívia de *T. cruzi*, que aparentemente é uma cepa bastante resistente a ação de substâncias. Conforme demonstrado pelo grupo anteriormente (AMBRÓSIO et al., 2004), o sistema de células permeáveis serve como um modelo para verificar a ação de substâncias em tripanosomas, auxiliando na investigação da síntese, processamento e regulação dos mRNAs desses parasitos. Nesse sistema, estes são tratados com lisolecitina, que torna suas células permeáveis a nucleotídeos trifosfatados e outras moléculas pequenas, permitindo a síntese ativa de seus RNAs, utilizando o “pool” de proteínas e macromoléculas do próprio parasito.

Assim, para a avaliação da ação das substâncias na síntese e processamento dos RNAs do parasito, utilizou-se o sistema de células permeáveis; após a permeabilização da membrana do *T. cruzi* com o detergente (lisolecitina), adicionou-se 1 mM de HQ ou de DNH mais os componentes necessários à reação de transcrição e *trans-splicing*, e entre eles $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP, que permite identificar os RNAs recém-sintetizados durante a reação. Os RNAs obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de poliácridamida 10% e revelados por auto-radiografia, observando-se aumento de intensidade das bandas de RNA nas reações com as substâncias, sendo que este aumento foi maior para HQ.

Paralelamente, uma sequência conhecida de SL DNA foi clonada em vetor pBS, o qual foi linearizado com a enzima de restrição *Eco* RI para reação de transcrição *in vitro*, obtendo-se uma sonda anti-sentido de SL RNA. Esta sonda foi hibridizada com os RNAs obtidos na reação de células permeáveis e os RNAs não híbridos foram degradados com RNases A e T1 (Reação de proteção com RNases A e T1). Os RNAs hibridizados (dupla-fita) então obtidos foram submetidos aos mesmos métodos de revelação mencionados anteriormente (eletroforese em gel de poliácridamida 10% e revelados por auto-radiografia). A figura a seguir, obtida do filme de raio-X, apresenta o mesmo perfil de bandas para o controle (sem adição das substâncias) (A) e para as reações com as substâncias, DNH e HQ (B e C, respectivamente). Estas bandas apresentaram-se mais intensas com a adição de DNH e HQ, sendo que com HQ este efeito foi maior.



HQ e DNH parecem não interferir diretamente no mecanismo de *trans-splicing* da cepa Bolívia de *T. cruzi*, pois as bandas observadas na reação de proteção referem-se ao SL íntron e éxon, resultantes da reação de processamento e também a banda dupla (indicada pela seta) observada na

reação de proteção indica a presença de SL éxon+íntron metilado e não metilado, demonstrando que houve a adição do *capping* (adição de uma estrutura 5'cap - m7G), essencial para o processamento do RNA em eucariotos. Entretanto, observa-se que ambas as substâncias estão provocando alguma modificação no metabolismo do parasito, promovendo um aumento na síntese de RNAs (aumento da intensidade das bandas), provavelmente na tentativa de suprir alguma dano causado na sua maquinaria metabólica celular.

Referências Bibliográficas

SCHUMUNIS, G.A. A tripanossomíase Americana e seu impacto na saúde pública das Américas. In BRENER, Z. & ANDRADE, Z. (eds). **Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 1-3, 2000.

CIMERMAN, B. **Parasitologia Humana e seus fundamentos gerais**. São Paulo: Atheneu, 1999. Cap. 11, p. 85-97.

MARTINEZ-DIAZ, R.A.; ESCARIO, J.A.; NOGAL-RUIZ, J.J.; GOMEZ-BARRIO, A. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 53-59, 2001.

BARBOSA, C.F.; OKUDA, E.S.; CHUNG, M.C.; FERREIRA, E.I.; CICARELLI, R.M.B. "Trypanosoma cruzi: rapid evaluation test for the prodrug hydroxymethylnitrofurazone activity in the processing of the messenger RNAs". **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 2006.

BACH, M. Corte de intrones y empalme de exones. **Investigación y Ciencia**, mayo, p. 606-7, 1992.

LENINGHER, A.L. **Princípios de Bioquímica**, ed. 25, p. 644-670, 1995.

DE ROBERTS, E.D.P. **Bases da Biologia Celular e Molecular**, ed. 11, p. 227-241, 1993.

AGABIAN, N. Trans-splicing of nuclear pre-mRNAs. **Cell**, v. 61,1157-1160, 1990.

MAYER, M.G.; WINTER, L.M.F. Pre-mRNA *trans*-splicing: from kinetoplastids to mammals, an easy language for life diversity. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100 (5), p. 501-513, 2005.

CANÇADO, S. J. B. Ataque ao parasita - Descobertas genéticas e novas drogas combatem o Trypanosoma, causador da doença de Chagas. Revista Pesquisa Fapesp. São Paulo, ed. 85, mar.2003.

SOUZA, V.A. et al. Trypanocidal activity of (-)-cubebin derivatives against free amastigote forms of Trypanosoma cruzi. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.15, p.303-307, 2005.

AMBRÓSIO, D.L.; BARBOSA, C.F.; VIANNA, V.F.; CICARELLI, R.M.B. *Trypanosoma cruzi*: Establishment of Permeable Cells for RNA Processing Analysis with Drugs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, vol 99, 2004.

Bolsa: CNPq / PIBIC.