

**Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências**

**ESTUDO DOS GENES ENVOLVIDOS NA DEFESA
ANTIOXIDANTE DE TRIPANOSOMATÍDEOS E
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FUNCIONAL DAS
ENZIMAS TRIPANOTIONA REDUTASE E TRIPAREDOXINA
PEROXIDASE EM *Trypanosoma rangeli***

Ingrid Thaís Beltrame Botelho

Florianópolis, 2016

Ingrid Thaís Beltrame Botelho

**ESTUDO DOS GENES ENVOLVIDOS NA DEFESA
ANTIOXIDANTE DE TRIPANOSOMATÍDEOS E
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FUNCIONAL DAS
ENZIMAS TRIPANOTIONA REDUTASE E TRIPAREDOXINA
PEROXIDASE EM *Trypanosoma rangeli***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard

Florianópolis

2016

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

Beltrame Botelho, Ingrid Thais

Estudo dos genes envolvidos na defesa antioxidante de tripanosomatídeos e caracterização molecular e funcional das enzimas Tripanostiona redutase e Triparedoxina peroxidase em *Trypanosoma rangeli* / Ingrid Thais Beltrame Botelho ; orientador, Edmundo Carlos Grisard - Florianópolis, SC, 2016.

236 p.

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

Inclui referências

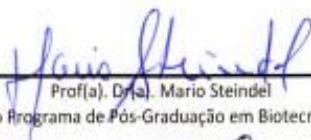
1. Biotecnologia e Biociências. 2. *Trypanosoma rangeli*.
3. Defesa antioxidante. 4. Tripanotiona redutase. 5. Triparedoxina peroxidase. I. Grisard, Edmundo Carlos. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

"Estudo dos genes envolvidos na defesa antioxidante de tripanosomatídeos e caracterização molecular e funcional das enzimas tripanotrioxina redutase e tripanredoxina peroxidase em *Trypanosoma rangeli*"

Por

Ingrid Thais Beltrame Botelho

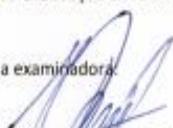
Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (24/PPGBTC/2016) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.



Prof(a). Dr(a). Mario Steindel

Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

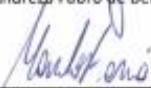
Banca examinadora



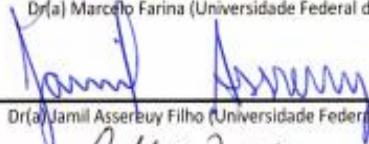
Dr(a) Edmundo Carlos Grisard (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



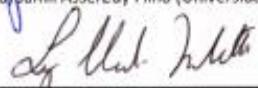
Dr(a) Andreza Fabro de Bem (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Marcelo Farina (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Jamil Assereuy Filho (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Luiz Claudio Miletto (Universidade do Estado de Santa Catarina)



Dr(a) Fernanda Ramos Gadelha (Universidade Estadual de Campinas)

Florianópolis, 05 de Setembro de 2016.

“Quando amamos e somos amados encontramos a força que precisamos pra não desistir.”

Dedico este trabalho a quem me amparou e me deu todas as condições para que ele se realizasse, meu esposo Maurício, minha mãe Loiva e minha amiga Roseli. Também aqueles que me deram o ânimo nos piores momentos, dando sorrisos, abraços ou simplesmente existindo, meus filhos João Gabriel e Isadora.

AGRADECIMENTOS

A Deus hoje e sempre, pela minha vida, pela vida dos meus filhos e pela vida dos que tornaram possível este trabalho. A Deus, pela força recebida nos momentos mais difíceis e angustiantes, o amor transformador de um sorriso quando tudo parecia perdido e pelas palavras vindas de quem menos se esperava de conforto e credibilidade. Obrigada Senhor, porque És bom e eterna é a sua misericórdia!

A minha família que esteve comigo em todos os momentos, me entendendo e me trazendo a realidade quando precisava. Maurício, mãe, João Gabriel e Isadora mil vezes obrigada. Sem vocês eu realmente não conseguiria.

Mãe, obrigada pela força e pelos financiamentos sem fim. Você sempre foi um grande exemplo pra mim. Obrigada pelas milhares de orações e centenas de velas acendidas, pelo carinho a distância e por confiar em mim.

Meu amor, Maurício, os anos passam e você sempre me dando força, as vezes literalmente me empurrando. Obrigada por não permitir que eu desistisse quando não acreditava mais em mim. Obrigada pelo carinho, pelos abraços e pelos puxões de orelha também, mas principalmente, obrigada pelos nossos filhos que são o melhor de nós. Você é um pai maravilhoso e esteve presente em todos os momentos em que estive ausente.

João Gabriel, você é o meu milagre, veio ao mundo pra me ensinar a ter mais paciência, mais disponibilidade. Você é o meu TUDO e espero que aprendas que sim, temos que estudar muito para conseguir o que queremos na vida e, principalmente, conseguir dar o melhor a quem amamos. Te amo mais que o infinito!

Isadora, o melhor presente que recebi nestes últimos anos! Uma surpresa, uma bênção e, pra quem conhece minha história, mais um milagre na minha vida. Foste verdadeiramente minha fonte de energia. Teu sorriso, teu cheiro e teu UPAAAA, foram muitas vezes o verdadeiro motivo de eu conseguir levantar e continuar. Te amo mais que tudo!

A Roseli, minha amiga, babá, “faz tudo” você tornou meus dias menos doloridos ao saber que meus maiores tesouros eram bem cuidados e amados. Você que ouvia e me dava forças toda vez que chegava em casa e dizia: Hoje não deu certo! Eternamente grata! Esse trabalho é a prova que: Agora deu certo!

Ao Professor Edmundo que mais uma vez confiou em mim aceitando-me como orientanda e me manteve calma em todos os momentos de desespero intelectual e pessoal. Foste e és para mim um exemplo. E, para lembrares, agradeço a Deus por teres nascido e seres meu orientador! Obrigada!

A Professora Patrícia Stoco pela amizade, força, e disponibilidade em estar comigo, fazer comigo, discutir resultados e muitas vezes simplesmente me ouvir. Aprendi a te respeitar e, com certeza, não conheço ninguém mais competente, mais comprometida e mais inteligente que você! Foi um verdadeiro prazer estar ao seu lado e espero muito poder continuar contando com você e com sua amizade. Gratidão eterna!

A UNISUL, representada pelo Professor Hércules Nunes de Araújo, Diretor do Campus Pedra Branca, por confiar em mim e pela licença sem a qual não teria conseguido.

A todas os colegas de trabalho na UNISUL, pela força e respeito dispensados a minha pessoa. Sou muito feliz por participar deste grupo!

A Professora Silvane Murta pela gentileza em ceder o antissoro anti-TcTRed.

A Professora Fernanda Gadelha e Eduardo Peloso pela gentileza em ceder os antissoro anti-triparedoxina (citossólica e mitocondrial) e contribuir com os testes de análise de síntese de H_2O_2 e NADPH.

A Professora Andreza Fabro de Bem pelas contribuições junto aos experimentos de indução de estresse e por ceder as sondas DCFDA e DHR.

Ao Professor Mário Steindel pelas constantes sugestões. És um grande exemplo de profissionalismo e não erra uma! Suas frases são inesquecíveis e memoráveis.

Aos amigos Ibeth e Jair, exemplos de profissionalismo, de organização. Obrigada por todas as discussões, pelas sugestões e, principalmente por literalmente me segurarem e não deixarem que eu fugisse. Mesmo de longe se preocupavam e me mantinham atenta no meu verdadeiro objetivo, me mantinham no foco. Gratidão eterna!

A minha grande amiga Iriane Eger, pelas constantes contribuições e emissões de energias! Você é um exemplo pra mim, amiga! Muito obrigado mesmo!

A Carine, que apareceu como um anjo na minha vida, me ajudou muitoooooo, me ouviu muitoooooo e me fez lembrar que meu potencial nunca deixou de existir, apenas permiti que ele não aparecesse. Obrigada, minha querida, você é extremamente competente e vai fazer um lindo trabalho. Conte comigo sempre!

As amigas Aline e Carol por compartilharem comigo sua amizade e me aceitarem prontamente no grupo, discutirem comigo seus resultados e me ajudarem a construir um novo projeto.

A Greyce e Ana, a dupla infalível! Vocês são ótimas, deixavam meus dias mais felizes pelas risadas e causos e ainda compartilhavam comigo minhas neuras e angústias. Além disso, supercompetentes e comprometidas, me deram muitas dicas. Ana, muito obrigado pelos tripes de *T. cruzi*!

A Aninha, um exemplo de dedicação, obrigada pela transfecção e cuidados com meus parasitos! Pela paciência e pela disponibilidade nos ensaios de interação parasito/células. Você é excelente!

A Milene pelo auxílio e discussões de protocolos, principalmente os relacionados aos ensaios de atividade da tripanotona.

A todo o pessoal do Laboratório, Laís, Carime, Tati (adoro seus cookies!), Danna, Vagner pelas discussões nos seminários e, principalmente pelo apoio que sempre me deram.

A CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho.

“Depois de algum tempo você aprende a diferença...

E começa a aceitar suas derrotas com a cabeça erguida e olhos adiante, com a graça de um adulto e não com a tristeza de uma criança. E aprende a construir todas as suas estradas no hoje, porque o terreno do amanhã é incerto demais para os planos, e o futuro tem o costume de cair em meio ao vão. Aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias. E o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida. Aprende que as circunstâncias e os ambientes tem influência sobre nós, mas nós somos responsáveis por nós mesmos. Começa a aprender que não se deve comparar com os outros, mas com o melhor que pode ser. Descobre que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser, e que o tempo é curto. Aprende que não importa aonde já chegou, mas onde está indo, mas se você não sabe para onde ir, qualquer caminho serve. Aprende que, ou você controla seus atos ou eles o controlarão, e que ser flexível não significa ser fraco ou não ter personalidade, pois não importa quão delicada e frágil seja uma situação, sempre existem dois lados. Aprende que heróis são pessoas que fizeram o que era necessário fazer, enfrentando as consequências. Aprende que paciência requer muita prática.

E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais.”

William Shakespeare

RESUMO

Trypanosoma rangeli é um parasito hemoflagelado pertencente à Ordem Kinetoplastea, grupo ancestral de protistas que contém grande diversidade de espécies, entre elas organismos de vida livre e parasitos com distintos mecanismos de resposta ao estresse oxidativo. Um dos objetivos deste trabalho foi caracterizar *in silico* enzimas envolvidas direta ou indiretamente na defesa antioxidante de *T. rangeli*, além de compará-las a suas ortólogas junto a diferentes espécies de Kinetoplastídeos. Dos genes analisados, não foram identificados em *T. rangeli*: cisteína sintase, ornitina decarboxilase, glutamilespermidina sintase e ascorbato peroxidase, embora o primeiro e o último tenham sido identificados como pseudogenes. Todos os genes foram identificados em *Bodo saltans*, sugerindo que os mecanismos antioxidantes evoluíram antes do aparecimento do parasitismo nesse grupo. De forma geral, observou-se que a variabilidade de enzimas no sistema antioxidante a nível genômico entre tripanosomatídeos relaciona-se a adaptações específicas ao parasitismo em ampla gama de hospedeiros e sua transmissão pelos vetores e não somente ao isolamento geográfico. Entre as enzimas analisadas, duas destacam-se em relação a infectividade e virulência em tripanosomatídeos patogênicos, a tripanotiona redutase (TRed) e triparedoxina peroxidase em suas isoformas citosólica (TRPxcit) e mitocondrial (TRPxmit). O gene da *TrTRed* possui uma ORF de 1.473 pb (~490 aa/ 53 kDa) estando presente em cópia única no genoma haploide de *T. rangeli*. A análise da proteína predita da *TrTRed* revelou a presença de dois domínios relacionados à ação oxidoreductase. O gene da *TrTRPxcit* apresentou-se com 549 pb gerando uma proteína com 182 aminoácidos (~ 20 kDa), enquanto para *TrTRPxmit* a ORF possui 681pb que prediz uma sequência de 266 aminoácidos (~25 kDa). A análise das sequências aminoacídicas deduzidas da *TrTRPxcit* e *TrTRPxmit* revelou a presença dos domínios VCP e ICP, respectivamente, além das cisteínas peroxidásica (Cp) e de resolução (Cr). A análise da expressão gênica e proteica de *TrTRed*, *TrTRPxcit* e *TrTRPxmit* revelou ausência de expressão significativa estágio-específica, porém a expressão da TRed é significativamente maior em *T. cruzi* do que em *T. rangeli*. O estresse oxidativo gerado pela adição de H₂O₂ não induziu alterações significativas na expressão de nenhuma proteína analisada. A presença de antioxidantes como N-acetilcisteína (NAC) e glutatona reduzida (GSH) no meio induziu a proliferação de epimastigotas *in vitro*, mas não alterou o perfil de expressão da *TrTRed*.

ao longo do tempo. A síntese de NADPH foi reduzida e a produção endógena de H_2O_2 é maior em *T. rangeli* quando comparada a *T. cruzi*. Estudos enzimáticos em extratos de *T. rangeli* mostraram maior atividade da TRed em epimastigotas do que em tripomastigotas. A superexpressão da proteína *TrTRed* não influenciou o crescimento ou o processo de diferenciação em tripomastigotas *in vitro* e os parasitos transfectados (TRed+) mostraram aumento na resistência ao estresse induzido pelo H_2O_2 . Conclui-se que o *T. rangeli* apresenta uma maquinaria de defesa antioxidante semelhante ao *T. brucei* e ao *T. cruzi* em função de presença/ausência de genes e quanto à similaridade nas sequências, respectivamente. Além disso, a *TrTRed* parece não ser a principal envolvida na resposta do *T. rangeli* ao ambiente oxidante em células do hospedeiro vertebrado, mas possui papel crucial durante a infecção do hospedeiro invertebrado.

Palavras chaves: *Trypanosoma rangeli*; defesa antioxidante; Tripanotiona redutase; Triparedoxina peroxidase.

ABSTRACT

Trypanosoma rangeli belongs to the Order Kinetoplastea, an ancestral group of protists containing a variety of free-living and parasitic species with distinct mechanisms of antioxidant defence. In this study we have characterized *in silico* the enzymes directly or indirectly involved on the *T. rangeli* response to oxidative stress and to comparatively characterize to its orthologs on other kinetoplastids. Ornithine decarboxylase, glutamyl spermidin synthase were not found on the *T. rangeli* genome while cysteine synthase and ascorbate peroxidase were found as pseudogenes. Since all genes related to antioxidant defence were found on *Bodo saltans* we hypothesize that such mechanism has evolved prior the parasitic lifestyle. As a rule, we have observed that genomic variability among the antioxidant system genes from trypanosomatids are related to specific adaptations to a parasitic lifestyle between distinct hosts and vectors instead of geographical isolation. Among the studied enzymes, the trypanothion reductase (TRed) and the cytosolic (TRPxcit) and mitochondrial (TRPxmit) forms of trypanothione peroxidase are related to virulence and infectivity. The *T. rangeli* TRed (*TrTRed*) is a single-copy gene and has an ORF of 1,473 bp (~490 aa/ 53 kDa) and the predicted *TrTRed* proteins revealed two oxidoreductase-related domains. The *TrTRPxcit* gene is 549 bp long coding to a 182 aa protein (~ 20 kDa) while the *TrTRPxmit* is 681 bp long, predicting to 266 aa protein (~25 kDa). Both *TrTRPxcit* and *TrTRPxmit* proteins revealed the presence of the VCP and ICP domains, respectively, along the peroxidatic cysteine (Cp) and resolving cysteine (Cr). The transcription and expression profiles of *TrTRed*, *TrTRPxcit* and *TrTRPxmit* revealed the no stage-specific differences, but was significantly higher in *T. cruzi* than *T. rangeli*. No differences on expression were observed for any of the analyzed genes when parasites were exposed to an H₂O₂-induced stress. Addition of antioxidants such as NAC and GSH on the culture media induced proliferation of epimastigotes *in vitro*, not altering the *TrTRed* expression overtime. NADPH generation is lower and production of endogenous H₂O₂ is higher in *T. rangeli* Choachí strain than in *T. cruzi* Y strain epimastigotes. Enzymatic assays revealed an increased activity of TRed

on *T. rangeli* epimastigotes than trypomastigotes. Overexpression of *TrTRed* has no influence on the growth or on the *in vitro* differentiation to trypomastigotes, but transfectants revealed an increased resistance to a H₂O₂-induced stress. Based on the presence/absence of genes and on the sequence similarity, the *T. rangeli* antioxidant machinery is related to *T. brucei* and to *T. cruzi*, respectively. Also, *TrTRed* seems not to be the main enzyme involved on the *T. rangeli* response to the oxidative stress on the mammalian host, but having crucial relevance on the infection of the insect vectors.

Key words: *Trypanosoma rangeli*; antioxidant defence; Trypanothione reductase; Tryparedoxin peroxidase.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa – aminoácidos
AB – Alamar Blue
ANOVA – análise de variância
APx – Ascorbato peroxidase
ASC - ascorbato
ATP – adenosina trifosfato
BLAST – do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*
BSA – soro albumina bovina (do inglês *Bovine Serum Albumin*)
BZ – Benzonidazol
cDNA – DNA complementar
CI₅₀ – concentração que inibe 50% dos parasitos
Cp – cisteína peroxidásica
Cr – cisteína de resolução
C_T – Cycle threshold
DCFH-DA - 2',7' - Diclorodihidrofluoresceína
DHA - Dehidroascorbato
DMEM – do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DNA – ácido desoxirribonucleico (do inglês *Deoxyribonucleic Acid*)
dNTP – desoxinucleotídeo trifosfatado (do inglês *Deoxynucleotide Triphosphate*)
DP – desvio padrão
DTT - ditioltreitol
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
ERNs – espécies reativas de nitrogênio
EROs – espécies reativas de oxigênio
ExpPASy tools – do inglês *Expert Protein Analysis System*
FeSOD - Ferro superóxido dismutase
G418 – antibiótico Geneticin
G6PDH – Glicose 6-fosfato desidrogenase
GSH – glutationa reduzida
GS – glutationa sintetase
GPx – glutationa peroxidase
HClO - ácido hipocloroso
HEPES - *N*-(2-hidroxiethyl)piperazina-*N'*-(2-ácido etanosulfônico)
Igs - imunoglobulinas
IPTG – isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
LB – meio Luria-Bertani
LIT - do inglês *Liver Infusion Tryptose*

LPS - lipopolissacarídeo bacteriano bruto
min – minuto(s)
mRNA – RNA mensageiro
MOI - do inglês *Multiplicity of infection*
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NCBI – do inglês *National Center for Biotechnology Information*
NFX – Nifurtimox
Ni₂₊-NTA – Resina de ácido nitriloacético com níquel
NO – óxido nítrico
NOSi - enzima óxido nítrico induzida
ORF – quadro aberto de leitura (do inglês *Open Reading Frame*)
pb – pares de bases
PBS – tampão salina fosfato, pH 7,4 (do inglês *Phosphate Buffered Saline*)
PCR – reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)
pH – potencial hidrogeniônico
PMA – Forbol-12-miristato- 13-acetato (do inglês *Phorbol Myristate Acetate*)
pmol – picomol
PPP- Via da Pentose Fosfato (do inglês *Pentose Phosphate Pathway*)
PVDF – fluoreto de polivinilideno (do inglês *Polyvinylidene Fluoride*)
PXs - peroxiredoxinas
qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa por matrizes arrays (PCR em tempo real)
RNA – ácido ribonucléico (do inglês *Ribonucleic Acid*)
RPMI – do inglês *Roswell Park Memorial Institute*
SBF – soro bovino fetal
SDS-PAGE – do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
SNAP – do inglês *S-nitroso-N-acetilpenicilamina*
SpS – Espermidina Sintase
Tb – *Trypanosoma brucei*
Tc – *Trypanosoma cruzi*
Tg – *Trypanosoma grayi*
THP-1 – linhagem de macrófagos humanos derivados de leucemia monocítica aguda
TPX – triparedoxina
Tr – *Trypanosoma rangeli*
TRPx – Triparedoxina peroxidase
TRPxcit – Triparedoxina peroxidase citosólica

TRPxmit – Triparedoxina peroxidase mitocondrial
T(S)₂ – Tripanotiona dissulfeto
T(SH)₂ – Tripanotiona Reduzida (dihidrotripanotiona)
TRed – Tripanotiona redutase
*Tr*TRed+ - parasitos de *T. rangeli* superexpressando a proteína
homóloga tripanotiona redutase
*Tr*WT - parasitos de *T. rangeli* selvagens
UV - ultravioleta
Wt – do inglês *wild type* - selvagem
X-gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo

LISTA DE SÍMBOLOS

°C – graus Celcius
cm – centímetro
 g – força da gravidade
 g – grama
HO[•] - radical hidroxil
HNO₂ - ácido nitroso
H₂O₂ - peróxido de hidrogênio
Kb - kilobases
kDa – kilodalton
KV – kilovolt
M – Molar
mA – miliampere
mg – miligrama
ml – mililitro
mM – milimolar
μg – micrograma
μl – microlitro
μm – micrômetro
μM - micromolar
ng – nanograma
NaCl – Cloreto de sódio
N₂O₃ - óxido nitroso
•NO – óxido nítrico
NO₂⁻ - nitritos
NO₃⁻ - nitratos
O₂^{•-} - radical superóxido
ONOO⁻ - peroxinitrito
U – unidade
V – Volt

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mapa das Américas Central e do Sul, mostrando a sobreposição geográfica da distribuição da doença de Chagas humana (sombreado) e os registros de ocorrência comprovada do <i>Trypanosoma rangeli</i> em humanos, triatomíneos ou animais silvestres (●).....	2
Figura 2: Ciclo biológico do <i>Trypanosoma rangeli</i> no hospedeiro invertebrado.....	3
Figura 3: Principais ERO e ERN que apresentam citotoxicidade contra o parasito <i>T. cruzi</i> e suas principais vias de síntese.....	9
Figura 4: Genes envolvidos na defesa antioxidante de kinetoplastídeos e seus mecanismos de ação na síntese de precursores envolvidos na degradação de EROs e ERNs.	22
Figura 5: Genes envolvidos na defesa antioxidante encontrados como cópias completas no genoma de <i>Trypanosoma rangeli</i>	29
Figura 6: Análise filogenética molecular das sequências de aminoácidos das enzimas de kinetoplastídeos relacionadas as vias de biossíntese de cisteína e glutationa.	44
Figura 7: Análise filogenética molecular das sequências de aminoácidos das enzimas de kinetoplastídeos relacionadas as vias de biossíntese de espermidina.	51
Figura 8: Análise filogenética molecular das sequências de aminoácidos das enzimas de kinetoplastídeos relacionadas as vias de biossíntese de tripanotiona.	62
Figura 9: Análise filogenética molecular da proteína Tripanotiona redutase (TRed) em Kinetoplastídeos. <i>s.</i>	66
Figura 10: Análise filogenética molecular das sequências de aminoácidos das enzimas Triparedoxinas peroxidases de kinetoplastídeos.	77
Figura 11: Análise filogenética molecular das sequências de aminoácidos das enzimas Glutationas peroxidases de kinetoplastídeos..	86
Figura 12: Análise filogenética molecular das sequências de aminoácidos das enzimas Ascorbato peroxidases de kinetoplastídeos.	91
Figura 13: Análise filogenética molecular das sequências de aminoácidos das enzimas Ferro Superóxido Dismutases de kinetoplastídeos.....	101

Figura 14: Produção de NADPH pela via das pentoses é menor em epimastigotas de <i>T. rangeli</i> que em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> nas mesmas condições.....	119
Figura 15: Detecção da atividade enzimática da enzima tripanotona redutase em extratos proteicos de epimastigotas e tripomastigotas de <i>T. rangeli</i> e <i>T. cruzi</i>	122
Figura 16: Eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídio revelando os produtos de amplificação de 25 ng/μl de DNA obtidos pela reação de PCR.	123
Figura 17: Eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídio revelando os produtos de amplificação de 25 ng/ μl das cepas SC58 e Choachí de <i>T. rangeli</i> e cepa Y de <i>T. cruzi</i> obtidos pela reação de PCR.	125
Figura 18: Perfil da abundância relativa de mRNA dos genes <i>TrTRed</i> , <i>TrTRPxcit</i> e <i>TrTRPXmit</i> nas formas epimastigotas e tripomastigotas de <i>Trypanosoma rangeli</i> utilizando como genes de referência a média dos genes GAPDH e RNA60S.	126
Figura 19: Análise da expressão das proteínas: a) tripanotona redutase (TRed), b) Triparedoxina peroxidase mitocondrial (TRPXmit) e c) Triparedoxina peroxidase citosólica (TRPxcit) em extratos protéicos solúveis de diferentes estágios de vida de <i>T. rangeli</i> cepa Choachí e <i>T. cruzi</i> cepa Y.....	129
Figura 20: Oxidação da sonda DCFH-DA pós-tratamento dos parasitos <i>T. rangeli</i> e <i>T. cruzi</i> com o agente estressor H ₂ O ₂	131
Figura 21: Análise da expressão em epimastigotas de <i>T. rangeli</i> das proteínas: a) Tripanotona redutase (TRed), b) Triparedoxina peroxidase citosólica (TRPXmit) e c) Triparedoxina peroxidase citosólica (TRPxcit) em extratos protéicos solúveis após indução de estresse oxidativo com 67 μM de H ₂ O ₂ em diferentes tempos.	133
Figura 22: O tratamento com N-acetilcisteína altera perfil de crescimento de epimastigotas de <i>T. rangeli</i> . (A) Análise comparative da curva de crescimento <i>in vitro</i> de <i>T. rangeli</i> submetido ao tratamento com os antioxidantes GSH e NAC nas concentrações de 1 e 2,5 mM.. (B) Análise por <i>wester blot</i> da expressão de <i>TrTRed</i> em extrato solúvel de <i>T. rangeli</i> com diferentes tratamentos nos dias 1, 3 e 5 revelados pelo anticorpo anti- <i>TcTRed</i>	135
Figura 23: Plasmídeo pLEXSY-2Neo (Jena Bioscience) utilizado para ligação ao inserto do gene <i>TrTRed</i> e posteriormente transfectado no parasito <i>T. rangeli</i> . Retângulo de número 1 demonstra local de inserção do gene <i>TrTRed</i> entre os sítios de restrição das enzimas <i>Bgl</i> II e <i>Kpn</i> I.	144

Figura 24: Análise da superexpressão do gene TRed em epimastigota de <i>T. rangeli</i> . a) <i>Western blot</i> para análise da expressão da proteína TrTRed em epimastigotas de <i>T. rangeli</i> selvagem (WT) e transfectado (TRed ⁺) utilizando os anticorpo anti- HisTag, anti TcTRed e como normalizador o anti- α Tubulina. b) Análise densitométrica das bandas do <i>Western blot</i> utilizando anti-TcTRed e normalizador anti- α tubulina.	149
Figura 25: Detecção da atividade enzimática da enzima tripanotiona redutase (TRed) em extratos proteicos de epimastigotas <i>T. rangeli</i> Selvagem (Wt) x Transfectado (TRed+).	150
Figura 26: Análise comparativa do crescimento da cepa TrTRed+ em relação a cepa Wt de <i>T. rangeli</i> .	151
Figura 27: Percentual de diferenciação em tripomastigotas <i>in vitro</i> da cepa selvagem (TrWt) em comparação com a cepa transfectada (TrTRed+) de <i>T. rangeli</i> .	152
Figura 28: Tripanotiona redutase homóloga superexpressa por <i>Trypanosoma rangeli</i> tem localização citoplasmática. Imunolocalização dos sítios de expressão da rTrTRed em epimastigotas de <i>T. rangeli</i> (TrTRed+) por RIFI utilizando o anticorpo anti His-tag. <i>T. rangeli</i> não transfectados (Wt) foram usados como controle.	153
Figura 29: Superexpressão da proteína homóloga TrTRed por epimastigotas de <i>Trypanosoma rangeli</i> aumenta a sobrevivência do parasito induzido ao estresse oxidativo por H ₂ O ₂ .	154
Figura 30: Porcentagem de células THP-1 infectadas ao longo do tempo por <i>T. rangeli</i> selvagem (TrWt) e superexepressando a proteína TRed (TrTRed+) resultantes do ensaio de interação parasito célula. Tempo T0 após uma hora de interação, demais tempos contados a partir de T0.	156
Figura 31: Imagens resultantes do ensaio de interação parasito-célula após coloração Giemsa.	157

ÍNDICE DE TABELAS e EQUAÇÕES

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos preditos de genes envolvidos no sistema antioxidante de <i>Trypanosoma rangeli</i> e porcentagem de identidade com diferentes espécies do gênero <i>Trypanosoma</i>	31
Tabela 2: Número de cópias dos genes envolvidos na defesa antioxidantes em diferentes Kinetoplastídeos.	32
Tabela 3: Características gerais dos genes da cisteína sintase (CS) em diferentes espécies de Kinetoplastídeos.	34
Tabela 4: Características gerais dos genes da Cistationina- β -sntase (C β S) em diferentes espécies de Kinetoplastídeos.	36
Tabela 5: Características gerais dos genes da gamma-glutamilcisteína sintetase (γ -GcS) em diferentes espécies de Kinetoplastídeos.	40
Tabela 6: Características gerais dos genes da glutationa sintetase (GS) em diferentes espécies de Kinetoplastídeos.	41
Tabela 7: Características gerais dos genes da Espermidina Sintetase (SpdS) em diferentes espécies de Kinetoplastídeos.	46
Tabela 8: Características gerais dos genes da Ornitina Descarboxilase (ODC) em diferentes espécies de Kinetoplastídeos.	49
Tabela 9: Características gerais dos genes da Tripanotiona sintetase (TS) em diferentes espécies de Kinetoplastídeos.	55
Tabela 10: Características gerais dos genes da Glutationaespermidina Sintase (GspS) em diferentes espécies de Kinetoplastídeos.....	57
Tabela 11: Características gerais dos genes que apresentam apenas o domínio CHAP1 em diferentes espécies de Kinetoplastídeos.....	59
Tabela 12: Características gerais dos genes que apresentam apenas o domínio CHAP2 em diferentes espécies de Kinetoplastídeos.....	60
Tabela 13: Características gerais dos genes da Tripanotiona redutase (TRed) em diferentes espécies de Kinetoplastídeos.	64
Tabela 14: Características gerais dos genes da Triparedoxina peroxidase (TRPx) em diferentes espécies de Kinetoplastídeos.	69
Tabela 15: Características gerais dos genes da Glutationa peroxidase (GPx) em diferentes espécies de Kinetoplastídeos.....	80
Tabela 16: Características gerais dos genes da Ascorbato peroxidase (APx) em diferentes espécies de Kinetoplastídeos.....	88
Tabela 17: Características gerais dos genes da Ferro Superóxido Dismutase (FeSOD) em diferentes espécies de Kinetoplastídeos.	93
Tabela 18: Sequências dos oligonucleotídeos para os genes da triparedoxina peroxidase citosólica (<i>Tr</i> TRPcit), triparedoxina peroxidase	

mitocondrial (*TrTRPmit*) e tripanotiona redutase (*TrTRed*) utilizados em PCR. 112

Tabela 19: Sequências dos oligonucleotídeos para os genes da triparedoxina peroxidase citosólica (*TrTRPcit*), triparedoxina peroxidase mitocondrial (*TrTRPmit*) e tripanotiona redutase (*TrTRed*) a serem utilizados para qPCR com o tamanho aproximado dos transcritos esperados, assim como sequência dos genes de referência. 115

Tabela 20: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação via PCR dos genes da triparedoxina peroxidase citosólica (*TrTRPcit*), triparedoxina peroxidase mitocondrial (*TrTRPmit*) e tripanotiona redutase (*TrTRed*). Em negrito, sítios de restrição das enzimas *Bgl* II e *Kpn* I (*TrTRed* e *TrTRPxmit*) e *Sla* I e *Kpn* I (*TrTRPxcit*). 141

Equação 1: Lei de Lambert-Beer: 108

Equação 2: Cálculo para determinar atividade da enzima Tripanotiona redutase (TRed). 110

Equação 3: Cálculo para determinação da eficiência da qPCR. 116

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Trypanosoma rangeli</i>	1
1.2 DEFESAS DOS HOSPEDEIROS CONTRA A INFECÇÃO PELO <i>T. rangeli</i>	6
1.2.1 Hospedeiro invertebrado	6
1.2.2 A resposta antioxidante do hospedeiro mamífero	8
1.3 SISTEMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTE EM TRIPANOSOMATÍDEOS.....	11
2 JUSTIFICATIVA.....	15
3 OBJETIVOS	17
3.1 OBJETIVO GERAL:	17
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4 CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO <i>IN SILICO</i> DE ENZIMAS ENVOLVIDAS NA DEFESA ANTIOXIDANTE DE <i>Trypanosoma rangeli</i> E COMPARAÇÃO COM ORTÓLOGOS EM KINETOPLASTÍDEOS.....	19
4.1 OBJETIVO DO CAPÍTULO	21
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.2.1. Identificação <i>in silico</i> dos principais genes envolvidos na defesa antioxidante de <i>Trypanosoma rangeli</i> e outros kinetoplastídeos.....	21
4.2.2 Caracterização das Sequências.....	23
4.2.3 Análises filogenéticas.....	24
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.3.1 Precursores do tiol <i>Tripanotiona</i>	32
4.3.1.1 Biossíntese de Cisteína	32
4.3.1.2 Biossíntese de Glutathione.....	39
4.3.1.3 Síntese e/ou Captação das Poliaminas Putrescina e Espermidina.....	45

4.3.2 Síntese e redução da Tripanotiona	52
4.3.2.1 Síntese	52
4.3.2.2 Redução	63
4.3.3 Peroxidases	67
4.3.3.1 Triparedoxina Peroxidase (TRPx)	67
4.3.3.2 Glutationa peroxidase (GPx)	78
4.3.3.3 Ascorbato Peroxidase (APX)	87
4.3.3.4 Superóxido Dismutase (SOD)	93
4.3.4 Evolução da defesa antioxidante	102
5 CAPÍTULO II - ESTUDO DOS GENES TRIPANOTIONA	
REDUTASE (TRed) E TRIPAREDOXINA PEROXIDASE (TRPx)	
DE <i>Trypanosoma rangeli</i> - ANÁLISES DA EXPRESSÃO GÊNICA	
E PROTÉICA	
	105
5.1 OBJETIVOS DO CAPÍTULO	107
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS	107
5.2.1 Considerações Éticas e de Biossegurança	107
5.2.2 Parasitos	107
5.2.2.1 Diferenciação in vitro para obtenção de formas tripomastigotas	107
5.2.3 Determinação da Produção de NADPH Através da Medida da Atividade das Enzimas Glicose 6-Fosfato Desidrogenase (G6PD) e 6- Fosfoglucanato Desidrogenase (6PGD) Da Via Das Pentoses	108
5.2.4 Determinação do Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) Produzido e Liberado por <i>T. rangeli</i>	109
5.2.5 Ensaio de atividade enzimática da Tripanotiona redutase	109
5.2.6 Extração de DNA e RNA de <i>T. rangeli</i>	110
5.2.6.1 Tratamento com DNase	111
5.2.6.2 Transcrição reversa (RT-PCR)	111
5.2.7 Amplificação Dos Genes	111
5.2.7.1 Desenho dos iniciadores para PCR	111
5.2.7.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR):	112

5.2.8 Suscetibilidade ao Estresse.....	113
5.2.8.1 Detecção intracelular de espécies reativas de oxigênio (H_2O_2) através de sonda fluorescente DCFH-DA	113
5.2.8.2 Experimentos de indução de estresse oxidativo.....	114
5.2.9 Avaliação da expressão gênica e proteica das enzimas triparedoxina peroxidase citosólica e mitocondrial e da tripanotiona redutase de <i>T. rangeli</i>	114
5.2.9.1 Desenho dos iniciadores para qPCR	114
5.2.9.2 Reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR).....	115
5.2.9.3 Análise dos resultados da qPCR e estatística dos resultados	116
5.2.9.4 Extração de proteínas totais de <i>Trypanosoma rangeli</i>	116
5.2.9.5 Dosagem de proteínas	117
5.2.9.6 Western Blot	117
5.2.9.7 Análise densitométrica da intensidade das bandas dos genes e das proteínas.....	118
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	119
5.3.1 Avaliação da produção de NADPH pela via das pentoses em epimastigotas de <i>Trypanosoma rangeli</i> e determinação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) mitocondrial liberado.	119
5.3.2 Níveis de atividade da enzima tripanotiona redutase (TrTRed) em diferentes fases do ciclo de vida de <i>Trypanosoma rangeli</i>	121
5.3.3 Amplificação e clonagem dos fragmentos gênicos codificadores das proteínas de interesse tripanotiona redutase (TrTRed) e triparedoxina peroxidase (citosólica e mitocondrial) em <i>Trypanosoma rangeli</i> via reação em cadeia da polimerase (PCR)	122
5.3.4 Quantificação relativa dos genes <i>TRed</i> , <i>TRPXcit</i> e <i>TRPXmit</i> por PCR em tempo real (qPCR).....	124
5.3.5 Detecção da expressão das proteínas <i>TRed</i> , <i>TRPXmit</i> e <i>TRPXcit</i> em diferentes estágios de vida de <i>Trypanosoma rangeli</i> por Western Blot.....	127
NÍVEIS DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS <i>TrTRPXcit</i> , <i>TrTRPXmit</i> E <i>TrTRed</i> DURANTE ESTRESSE OXIDATIVO PROVOCADO POR PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H_2O_2)	130

5.3.6 Avaliação da presença de peróxido de hidrogênio intracelular, por análise de produção de fluorescência a partir de sonda DCFH-DA ao longo do tempo e por concentração do estressor..... 130

5.3.7 Detecção e análise da expressão das proteínas TRed, TRPXmit e TRPXcit por Western blot em epimastigotas de *T. rangeli* induzidos ao estresse oxidativo por H₂O₂..... 131

5.3.8 Efeito de antioxidantes no crescimento de *T. rangeli* e na expressão proteica de TrTRed 134

6 CAPÍTULO III - POSSÍVEIS EFEITOS DA SUPEREXPRESSÃO DA ENZIMA trtred NO PERFIL DE SENSIBILIDADE AO ESTRESSE OXIDATIVO E NA SOBREVIVÊNCIA DE *Trypanosoma rangeli* EM CÉLULAS THP-1 IN VITRO.137

6.1 OBJETIVO DO CAPÍTULO 139

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS 139

6.2.1 Aspectos éticos e de biossegurança..... 139

6.2.2 Parasitos 139

6.2.2.1 Diferenciação in vitro para obtenção de formas tripomastigotas 139

6.2.3 Extração de DNA de *T. rangeli* 140

6.2.4 Amplificação dos Genes..... 140

6.2.4.1 Desenho dos iniciadores para PCR..... 140

6.2.4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR): 141

6.2.5 Purificação e Clonagem dos Produtos de PCR..... 142

6.2.6 Sequenciamento do DNA..... 142

6.2.6.1 Análise da qualidade e identidade das sequências gênicas obtidas por sequenciamento..... 143

6.2.7 Clonagem em vetor de expressão pLEXY-NEO2 para superexpressão da proteína TRed..... 143

6.2.8 Transfecção dos parasitos..... 144

6.2.9 Avaliação comparativa das curvas de crescimento e porcentagem de diferenciação in vitro entre a linhagem transfectada (TRed+) e controle não transfectado (Wt)..... 145

6.2.10 Suscetibilidade de epimastigotas de <i>T. rangeli</i> transfectados (TRed+) ao estresse oxidativo <i>in vitro</i> para cálculo do IC ₅₀	145
6.2.11 Citolocalização da proteína TrTRed expressa por <i>T. rangeli</i> por ensaio de imunofluorescência indireta (RIFI)	146
6.2.12 Ensaio de interação parasito/célula hospedeira <i>in vitro</i>	147
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	149
6.3.1 Transfecção e Expressão Homóloga	149
6.3.2 Citolocalização da proteína rTrTRed expressa por <i>T. rangeli</i> por ensaio de imunofluorescência indireta (RIFI)	152
6.3.3 Suscetibilidade de epimastigotas de <i>T. rangeli</i> transfectados (TRed+) ao estresse oxidativo <i>in vitro</i> para cálculo do IC ₅₀	153
6.3.4 Interação parasito célula.....	155
7 DISCUSSÃO	159
8 CONCLUSÕES	163
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	165
APÊNDICE.....	195

INTRODUÇÃO

1.1 *Trypanosoma rangeli*

O *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920, é um protozoário flagelado pertencente à Ordem Kinetoplastea, Família Trypanosomatidae, da qual também fazem parte parasitos causadores de doenças humanas como o *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas e o *Trypanosoma brucei*, agente etiológico da doença do sono.

O *T. rangeli* apresenta uma distribuição geográfica ao longo das Américas Central e do Sul, possuindo extensa área de sobreposição com o *T. cruzi* (Figura 1) (MILES et al., 1983; STEINDEL, et al., 1992; GURGEL-GONÇALVES et al., 2004; MAIA DA SILVA et al., 2009; GRISARD; STEINDEL, 2011). Estas duas espécies também possuem estreita relação quanto a seu ciclo de vida, compartilhando hospedeiros invertebrados e mamíferos (GUHL; VALLEJO, 2003; VARGAS 2008). Os distintos estágios do ciclo de vida destes parasitos apresentam diferenças intra e interespecíficas quanto à morfologia, capacidades replicativa e infectivas e características bioquímicas (GRISARD et al., 2010).

Entre os hospedeiros invertebrados do *T. rangeli* destacam-se ninfas e adultos de triatomíneos dos gêneros *Rhodnius*, *Panstrongylus* e *Triatoma* (D'ALESSANDRO, 1976; TOVAR; URDANETA-MORALES; TEJERO, 1989; GARCIA et al., 2012). Espécies silvestres do gênero *Rhodnius* são seus principais vetores, destacando-se o *R. brethesi* e o *R. prolixus* (STEINDEL et al., 1991; COURA et al., 1996; MACHADO et al., 2001; De STEFANIE MARQUES et al., 2006; GUARNERI; SILVA-CARDOSO; ATELLA, 2012). As diferentes espécies do gênero *Rhodnius* revelam um padrão de co-evolução com cepas do *T. rangeli* de constituição gênica distintas denominadas KP1(+) e KP1(-). Estas cepas apresentam um padrão distinto de infectividade e de desenvolvimento nas glândulas salivares às diferentes espécies de *Rhodnius* spp., revelando padrões variáveis de transmissão a seus hospedeiros vertebrados de acordo com as diferentes regiões geográficas (VALLEJO et al. 2003; 2009).



Figura 1: Mapa das Américas Central e do Sul, mostrando a sobreposição geográfica da distribuição da doença de Chagas humana (sombreado) e os registros de ocorrência comprovada do *Trypanosoma rangeli* em humanos, triatomíneos ou animais silvestres (●).

Fonte: Grisard, Steindel (2011).

O curso da infecção pelo *T. rangeli* no inseto vetor é bem conhecido e descrito na literatura, inclusive no que se refere às respostas inatas dos insetos quando da infecção por este tripanosoma. Entretanto, muitos fatores que mediam essa infecção ainda permanecem não explicados (AZAMBUJA; RATCLIFFE; GARCIA, 2005; GARCIA et al., 2009; 2012; GUARNERI; SILVA-CARDOSO; ATELLA, 2012).

Nos hospedeiros invertebrados o *T. rangeli* tem seu ciclo de vida caracterizado em três diferentes órgãos dos triatomíneos: intestino, hemocele e glândulas salivares (Figura 2).

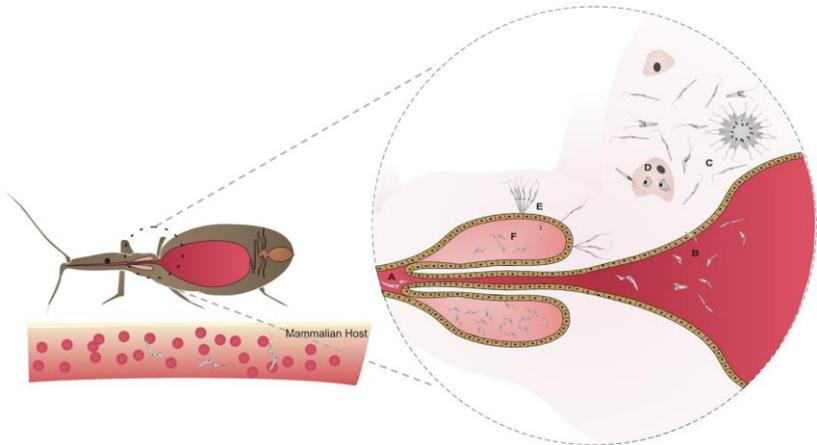


Figura 2: Ciclo biológico do *Trypanosoma rangeli* no hospedeiro invertebrado. (A) Ingestão das formas tripomastigotas durante o repasto sanguíneo do triatomíneo; (B) Formas epimastigotas curtas no intestino médio do triatomíneo se dividem e podem invadir a hemocele ou seguir até a ampola retal, onde alguns se diferenciam em tripomastigotas e podem ser excretados junto a fezes e urina; (C) na hemocele dividem-se de forma livre como epimastigotas longos ou (D) podem invadir hemócitos onde a multiplicação não é certa. (E) Invasão das glândulas salivares pelos epimastigotas de forma longa e (F) diferenciação para formas infectantes (tripomastigotas metacíclicas), as quais são inoculadas com a saliva durante o repasto sanguíneo (F).

Fonte: Stoco et al. (2014).

A infecção do vetor inicia pela ingestão de formas tripomastigotas presentes no sangue de mamíferos infectados. No intestino do vetor os parasitos iniciam sua transformação em formas epimastigotas replicativas (que podem ser curtas ou longas) (Figura 2) que interagem com o epitélio intestinal e são capazes de atravessá-lo por via intracelular, alcançando a hemocele. Segundo Eicher e Schaub (2002) a passagem através da parede intestinal é facilitada, pois *T. rangeli* parece interferir no desenvolvimento da microbiota de *R. prolixus*, o que, no entanto, para Garcia e colaboradores (2012) é uma observação que merece ser melhor investigada.

A taxa de invasão da hemocele é de aproximadamente 10% e está diretamente relacionada a fatores inerentes ao parasito assim como à espécie do triatomíneo (GARCIA et al., 2012; GUARNERI; SILVA-CARDOSO; ATELLA, 2012). Assim, observa-se que cepas cujo genótipo é classificado como KP1 (-) se encontram associadas com maior

prevalência a *Rhodnius pallescens*, *R. colombiensis* e *R. ecuadoriensis*, já cepas pertencentes ao genótipo KP1(+) a *R. prolixus*, *R. robustus*, *R. neglectus*, indicando uma relação de maior susceptibilidade à infecção por cepas do parasito das espécies vetoras locais e, por conseguinte a ocorrência de processos coevolutivos entre os genótipos dos parasitos e os vetores (URREA, et al., 2005, 2011; VALLEJO et al., 2015). Assim como em *T. cruzi*, formas tripomastigotas infectivas de *T. rangeli* podem ser observadas nas fezes de triatomíneos infectados, entretanto, pela baixa quantidade de parasitos e pela reduzida porcentagem de formas tripomastigotas, esta via de infecção é considerada como sendo epidemiologicamente não relevante (De STEFANIE MARQUES et al., 2006; VALLEJO; GUHL; SCHAUB, 2009; GRISARD; ROMANHA; STEINDEL, 2011).

Durante sua permanência na hemocele o *T. rangeli* multiplica-se livremente (como formas longas), sendo também observado dentro de hemócitos, especialmente plasmócitos, dentro dos quais não é observada a divisão do parasito (Figura 2D). Os epimastigotas são capazes de invadir as glândulas salivares (Figura 2E) (OLIVEIRA; SOUZA, 2003; MENEZES; PALAU; ZUÑIGA, 2004; GUARNERI; SILVA-CARDOSO; ATELLA, 2012) onde diferenciam-se em formas tripomastigotas metacíclicas infectantes (MEIRELLES, et al., 2005; FERREIRA et al., 2010; FERREIRA, 2013; GARCIA et al., 2012). Este processo de diferenciação constitui uma etapa essencial do ciclo de vida do *T. rangeli* e denomina-se metaciclogênese.

A metaciclogênese envolve modificações na estrutura nuclear, remodelamento da cromatina e estabilidade diferencial do mRNA que resulta em expressão diferencial de proteínas (PARODI-TALICE et al., 2007), mudanças na morfologia celular, na capacidade de proliferação e na infectividade (PRESTES, 2013). Os fatores responsáveis pelo desencadeamento deste processo em *T. rangeli* ainda não foram elucidados, porém, de forma análoga ao *T. cruzi*, acredita-se que o estresse nutricional e a adesão ao substrato estão entre estes fatores (BAYER-SANTOS et al., 2013).

A transmissão das formas tripomastigotas metacíclicas aos hospedeiros vertebrados ocorre durante o repasto sanguíneo. Entre os hospedeiros vertebrados relatam-se cerca de vinte gêneros pertencentes a cinco diferentes ordens de mamíferos entre elas quirópteros, carnívoros e principalmente roedores e marsupiais, além de primatas (GRISARD et al., 1999; MAIA DA SILVA et al., 2008; ESTEVES, 2009).

A infecção humana por *T. rangeli* já foi constatada em sete países sul-americanos, entre eles o Brasil, podendo ocorrer de forma

concomitante a infecção por *T. cruzi* com quem compartilha cerca de 60% de sua constituição antigênica (COURA et al., 1996; RAMIREZ et al., 1998; D'ALESSANDRO; SARAVIA, 1999; YVES, 2002; GUHL; VALLEJO, 2003; SNOEIJER et al., 2004; SOUZA et al., 2008; VARGAS, 2008).

Ao contrário de seu ciclo nos hospedeiros invertebrados, o ciclo de *T. rangeli* nos hospedeiros mamíferos permanece inconclusivo. A infecção é variável em termos temporais e é assintomática, entretanto pouco se sabe sobre as peculiaridades da interação entre *T. rangeli* e estes hospedeiros (CALZADA, 2006).

Após a infecção, uma parasitemia baixa, usualmente sub-patente, e de curta duração pode persistir em média por duas semanas (AÑEZ; VELANDIA; RODRÍGUEZ, 1985). Entretanto, a presença do *T. rangeli* já foi detectada através de hemocultura alguns meses após a infecção em camundongos experimentalmente infectados (STEINDEL, 1993; MORALES, 2012). Além disso, ninfas alimentadas em camundongos infectados a mais de 30 dias, tornaram-se positivas para *T. rangeli* sugerindo fortemente a existência de um ciclo de desenvolvimento deste parasito no hospedeiro mamífero (Ferreira, 2013). Estes períodos patentes observados em infecções experimentais são variáveis de acordo com a espécie do mamífero infectado e sua idade, bem como com a cepa de *T. rangeli* utilizada nos experimentos (URDANETA-MORALES; TEJERO, 1986).

Apesar dos relatos acima, ainda não há consenso quanto à capacidade e aos locais de multiplicação de *T. rangeli* no hospedeiro mamífero. Entretanto, formas intracelulares denominadas “amastigota-like” foram observadas em cortes histológicos de coração, de fígado e de baço de camundongos submetidos à infecção experimental com uma única cepa do parasito, não tendo sido observados sinais de replicação (URDANETA-MORALES; TEJERO, 1986; OSÓRIO et al., 1995; EGER-MANGRICH et al., 2001; SCHLINDWEIN, 2014). Urdaneta-Morales e Tejero (1986) e Osório e colaboradores (1995) utilizaram a cepa Perro-82 de *T. rangeli*, entretanto seus resultados não foram alcançados com outras cepas do parasito, podendo tratar-se de uma contaminação laboratorial da cepa com *T. cruzi*.

Ainda que não possua uma forma intracelular, o *T. brucei*, consegue manter a infecção através de intensa multiplicação na corrente sanguínea do hospedeiro mamífero utilizando um sistema de evasão da resposta imune (STIJLEMANS et al., 2016). Entretanto, Prestes (2013) estudando a proteína Polo like quinase de *T. rangeli*, marcador molecular

de citocinese com forte associação com as taxas de multiplicação *in vitro* neste parasito, observou que a mesma não é expressa em tripomastigotas, inferindo que estas formas do *T. rangeli* não devem, portanto, realizar divisão celular (PRESTES et al., no prelo). Desta forma, a identificação de fatores relacionados à manutenção da infecção do hospedeiro mamífero pelo *T. rangeli* se fazem necessários para elucidar o ciclo de vida destes parasitos.

1.2 DEFESAS DOS HOSPEDEIROS CONTRA A INFECÇÃO PELO *T. rangeli*

1.2.1 Hospedeiro invertebrado

Após serem ingeridos durante o repasto sanguíneo, os tripanosomatídeos iniciam uma série de interações com seus insetos vetores (GUARNERI; SILVA-CARDOSO; ATELLA, 2012). Muitas dessas interações podem não apresentar efeitos deletérios em longo prazo à homeostase do vetor, entretanto, algumas podem drasticamente afetar sua fisiologia e o levar à morte.

A presença do parasito desencadeia a resposta imune do vetor que é voltada principalmente para as formas epimastigotas curtas (MELLO et al., 1999; GOMES et al., 1999; 2002). As formas epimastigotas longas de *T. rangeli* parecem lidar de forma distinta com a resposta imunológica do inseto, sendo capazes de se multiplicar e manter a infecção do vetor (GUARNERI; SILVA-CARDOSO; ATELLA, 2012). Dentre os mecanismos que são ativados durante a infecção estão a cascata da pró-fenoloxidase (MELLO et al., 1995), a fagocitose com formação de nódulos de hemócitos (MELLO et al., 1995), a aglutinação (PEREIRA; ANDRADE; RIBEIRO, et al., 1981; MELLO et al., 1995; RATCLIFFE et al., 1996) e a produção de eicosanóides (GARCIA et al., 2012) e radicais livres (WHITEN et al., 2001). De forma isolada ou em conjunto, estes processos constituem barreiras biológicas à progressão da infecção pelo *T. rangeli*, possuindo influência na capacidade vetorial dos triatomíneos (GARCIA et al., 2009).

Uma vez no trato intestinal do triatomíneo, *T. rangeli* está exposto a espécies reativas de oxigênio (EROs) e a espécies reativas nitrogênio (ERNs), as quais são produzidas pelo epitélio em resposta à presença do parasito e que parecem atuar na proteção do intestino contra a infecção por tripanosomas (HAO et al., 2001; HAO; KASUMBA; AKSOY, 2003; WHITTEN et al., 2007; PIACENZA et al., 2008; 2009a; 2009b; 2013;

CONSENTINO-GOMES; ROCCO-MACHADO; MEYER-FERNANDES, 2014). Estas moléculas podem ser produzidas durante a digestão da hemoglobina no intestino anterior do inseto vetor, pelo epitélio intestinal (GUARNERI; SILVA-CARDOSO; ATELLA, 2012) ou como bioproduto do metabolismo aeróbico do próprio parasito (FINZI et al., 2004; CONSENTINO-GOMES; ROCCO-MACHADO; MEYER-FERNANDES, 2014).

Ao alimentarem moscas tsé-tsé (*Glossina* sp.) com alimento contendo moléculas antioxidantes, Macleod e colaboradores (2007) concluíram que EROs e ERNs servem como proteção do intestino contra a infecção pelo *T. brucei* ao constatarem uma maior proporção de insetos infectados dentre os que foram tratados com as moléculas antioxidantes. Em *T. rangeli*, experimento semelhante foi conduzido por Consentino-Gomes; Rocco-Machado e Meyer-Fernandes (2014), tendo apontado um aumento no estresse oxidativo no intestino pelo aumento da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e diminuição da ação da catalase e glutatona peroxidase (GPx) dos insetos infectados por este parasito, o que contribui para o controle da proliferação do mesmo. Entretanto, ao alimentarem os insetos com compostos antioxidantes a proliferação aumentou 50%. Nogueira, Saraiva e Sultano (2015) demonstraram que moléculas oxidantes e pró-oxidantes no interior do trato intestinal dos vetores funcionam como ativadores da proliferação das formas epimastigotas, enquanto que a presença de moléculas antioxidantes são responsáveis por ativar o processo de diferenciação de *T. cruzi* no intestino posterior de *R. prolixus*.

Whitten e colaboradores (2001) descreveram que a produção de óxido nítrico e radical superóxido pelo vetor *R. prolixus* durante a infecção por *T. rangeli* é estimulada principalmente por epimastigotas de forma curta e tem características de ser um fenômeno cepa-dependente. Além disso, quando inibidores da NADPH oxidase (N-Etilmaleimida) e da enzima óxido nítrico sintase induzível - NOS (S-metil isotiourea sulfonamida) foram injetados no *R. prolixus*, estes morreram após a infecção por *T. rangeli* (cepas H14 e Choachi) comparando-se com os controles não tratados (WHITTEN et al., 2001). Whitten e colaboradores (2007) acompanharam *R. prolixus* desafiados com *T. cruzi*, *T. rangeli* e lipopolissacarídeo bacteriano bruto (LPS) quanto as alterações específicas na expressão do gene da NOS e a sua produção nos tecidos desta espécie. Reações mais pronunciadas foram evidenciadas para LPS na gordura corporal e hemócitos, enquanto tecidos do trato digestivo foram mais responsivos às infecções por *T. cruzi* e *T. rangeli*. Isto sugere

que a resposta imune mediada por *NO é, neste inseto, patógeno-específica e tem a expressão modificada, tanto a nível transcricional como proteico (GARCIA et al., 2009; GAZOS-LOPES et al., 2012).

Segundo Guarneri; Silva-Cardoso; Atella (2012), não foram descritos até o momento mecanismos de defesa que sejam desencadeados pela presença do *T. rangeli* nas glândulas salivares de triatomíneos, apesar dos efeitos deletérios que o parasito causa nestes órgãos. Entre os prejuízos à função das glândulas salivares do inseto destaca-se a inibição da expressão completa de seu maquinário anti-hemostático (GARCIA et al., 2009). Esta inibição afeta o comportamento alimentar do inseto levando a um aumento significativo no número de picadas e redução da habilidade do inseto em ingerir sangue do hospedeiro vertebrado, consequentemente aumentando as chances de transmissão pelo *T. rangeli* (AÑEZ; EAST, 1984).

1.2.2 A resposta antioxidante do hospedeiro mamífero

É amplamente descrito na literatura que o hospedeiro mamífero responde à infecção pelo *T. cruzi* através de uma ativação policlonal linfocitária e hiperprodução de imunoglobulinas (IG) (JORGE; CASTRO, 2000), além de induzir a produção de citocinas inflamatórias (TNF α e IFN γ) e de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que tem atividade tripanocida em macrófagos infectados (SOUZA; CARVALHO; BARRIAS, 2010; MACHADO et al., 2012).

As ERO, principalmente o radical superóxido (O₂⁻), são produzidas continuamente por 60 a 90 minutos durante a internalização do parasito na fagocitose, uma vez que o *T. cruzi* ao ligar-se ao macrófago ativa a proteína de membrana NADPH oxidase (ALVAREZ et al., 2011; PIACENZA et al., 2013).

Paiva e Bozza (2014) postulam que as ERO atuam de forma direta ao causar danos oxidativos a biocompostos dos patógenos ou, indiretamente, através de mecanismos não oxidativos como o estímulo ao reconhecimento de receptores de sinalização, autofagia, formação de rede extracelular de neutrófilos e resposta dos linfócitos T (PAIVA; BOZZA, 2014).

As ERN como o óxido nítrico (*NO) também são importantes no controle da replicação dos parasitas *in vivo*. O *NO pode, diretamente ou indiretamente, modular a maquinaria leucocitária através de diversos mecanismos como a geração dos radicais livres peroxinitrito e superóxido que apresentam efeitos microbicidas (GUITIERREZ et al., 2009;

ALVAREZ et al., 2011). Camundongos infectados com *T. cruzi* e tratados com inibidores da enzima óxido nítrico induzida (NOSi) tornam-se mais susceptíveis à infecção pela inibição da atividade tripanocida de macrófagos ativadas, apresentando maior parasitemia e incorrendo em maior mortalidade (JORGE; CASTRO, 2000).

Uma das formas de ação do $\cdot\text{NO}$ é causar modificações nas proteínas que contêm cisteína e/ou pela ligação a metaloproteínas que mediam processos metabólicos cruciais. Foi reportada a ação de $\cdot\text{NO}$ ou de doadores de $\cdot\text{NO}$ na inibição da atividade catalítica de cruzipaina, proteína que desempenha papel essencial em diferentes processos do ciclo biológico do *T. cruzi* tais como crescimento, diferenciação e sobrevivência no organismo hospedeiro (VENTURINI et al. 2000; GUTIERREZ et al., 2009).

Piacenza e colaboradores (2013) sumarizaram as ERO e ERN com ação citotóxica contra o *T. cruzi*, indicando o modo como são formadas, assim como as principais proteínas relacionadas à atividade antioxidante em *T. cruzi* (Figura 3).

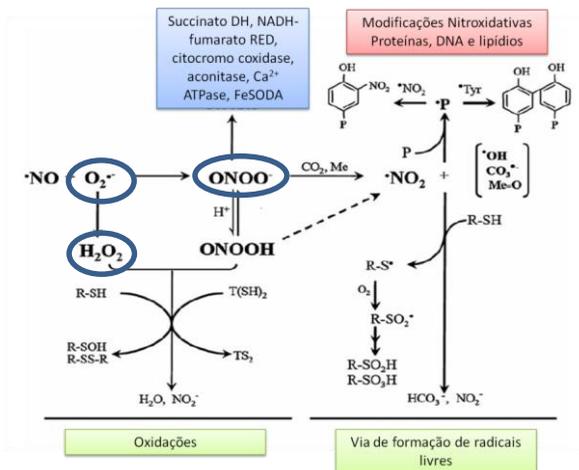


Figura 3: Principais ERO e ERN que apresentam citotoxicidade contra o parasito *T. cruzi* e suas principais vias de síntese.

Fonte: Piacenza e colaboradores (2013)

De acordo com a figura 3, observa-se que as principais espécies oxidantes do hospedeiro envolvidas na defesa contra o *T. cruzi* são o H_2O_2 e o ONOO^- . Durante a fagocitose as enzimas oxidases NAD(P)H associadas à membrana são ativadas resultando na produção de

superóxido ($O_2^{\cdot-}$). O $O_2^{\cdot-}$ pode então dismutar-se em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou reagir com óxido nítrico derivado da iNOS (-NO) em uma reação controlada de difusão para originar ONOO⁻ (ALVAREZ et al., 2011; BARTESAGHI; ROMERO; RADÍ, 2011; PIACENZA et al., 2008; 2013).

Embora o H_2O_2 seja pouco reativo frente às moléculas orgânicas na ausência de metais de transição, exerce papel importante no estresse oxidativo por ser capaz de transpor as membranas celulares e, ao se ligar a metais como Cu^{1+} e Fe^{2+} , dar origem ao radical HO• (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). O H_2O_2 oxida proteínas que apresentem resíduos de metionina ou grupos tiol muito reativos, como a glutatona, por exemplo (PAIVA; BOZZA, 2014). O H_2O_2 é gerado *in vivo* pela dismutação do ânion-radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) por enzimas oxidases ou pela β -oxidação de ácidos graxos (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

O óxido nítrico *NO não é suficientemente reativo para induzir dano diretamente ao DNA, mas pode reagir com o radical ânion superóxido $O_2^{\cdot-}$ produzido pelos fagócitos gerando peroxinitrito¹ (ONOO⁻) (PIACENZA et al., 2009; 2013; BARTESAGHI; ROMERO; RADÍ, 2011). O ONOO⁻ é um oxidante muito potente por ter meia vida menor que um segundo em sistemas biológicos (DENICOLA et al., 1993; PIACENZA et al., 2013 ; BARTESAGHI; ROMERO; RADÍ, 2011). O ONOO⁻ pode sofrer reações secundárias formando agentes capazes de nitrar aminoácidos aromáticos, a exemplo da tirosina gerando nitrotirosina, assim como as bases do DNA, em particular a guanina (BARREIROS; DAVID; DAVID et al., 2006; PIACENZA et al., 2008; 2009; BARTESAGHI; ROMERO; RADÍ, 2011).

Vale ressaltar que o estresse oxidativo não é determinado pela simples produção de ERO e/ou ERN, mas pela incapacidade da célula ou organismo em produzir quantidade suficiente de antioxidantes para neutralizá-las (BARTESAGHI; ROMERO; RADÍ, 2011). Assim sendo, o estresse oxidativo é definido como o desbalanço entre as espécies reativas e os mecanismos celulares para detoxificação que levam a danos nas células devido aos efeitos tóxicos destes componentes as proteínas, os lipídeos e o DNA.

¹ O termo peroxinitrito refere-se tanto ao ânion peroxinitrito (ONOO⁻) como ao ácido peroxinitroso (ONOOH). De acordo com BARTESAGHI et al. (2011) a IUPAC recomenda o uso da terminologia oxoperoxinitrato.

1.3 SISTEMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTE EM TRIPANOSOMATÍDEOS

As EROs e ERNs são parte integrante e crucial do sistema imune dos hospedeiros invertebrados e vertebrados contra a infecção por tripanosomatídeos.

Ainda que o *R. prolixus* possua um eficiente sistema de defesa contra organismos patogênicos, o *T. rangeli* desenvolveu mecanismos para multiplicar-se e sobreviver neste seu principal vetor. Em especial, o parasito desenvolveu mecanismos para lidar com as respostas do sistema de defesa durante a passagem do intestino para a hemocele, permitindo sua chegada às glândulas salivares do inseto (AÑEZ, 1984; GARCIA et al., 2009; 2012; GUARNERI; SILVA-CARDOSO; ATELLA, 2012; FERREIRA, 2013).

No hospedeiro vertebrado, uma vez fagocitados, parasitos como o *T. cruzi* precisam sobreviver ao “burst” respiratório utilizando mecanismos de resistência ao poder oxidante ou escapar do fagossomo para sobreviver (PAIVA; BOZZA, 2014). Entretanto, protozoários parasitos intracelulares têm uma longa co-evolução com seus hospedeiros vertebrados e, em geral, estabelecem infecções crônicas. Assim sendo, fica evidente que potentes mecanismos de defesa tem se desenvolvido nestes parasitos, dentre os quais, podemos citar a inibição da atividade fagocítica e/ou a produção de enzimas com potencial antioxidante (WHITTEN et al., 2001; 2007; GARCIA et al., 2012).

Em relação a parasitos com capacidade de invadir e replicar em diferentes tipos celulares como *Toxoplasma gondii*, *T. cruzi* e *Leishmania* sp., a produção de antioxidantes está entre os mecanismos mais estudados (LEIRIÃO; RODRIGUES; ALBUQUERQUE, 2004; DENKERS; BUTCHER, 2005; GREGORY; OLIVIER, 2005; GUTIERREZ et al., 2009). Entretanto, poucos são os trabalhos que caracterizam algum componente do sistema antioxidante em *T. rangeli* (ROMERO et al., 2014; STOCO et al., 2014; LÜCKEMEYER, 2014).

De acordo com Peluffo e colaboradores (2004) e Piacenza e colaboradores (2008), os níveis das defesas antioxidantes de parasitos como *T. cruzi* no início da invasão de macrófagos podem permitir a sobrevivência do patógeno, favorecendo a sua fuga do vacúolo e o estabelecimento da infecção. O *T. cruzi*, assim como outros tripanosomatídeos, apresenta capacidade limitada em lidar com esse estresse oxidativo, sendo esta área de grande interesse para fins terapêuticos (ALVAREZ et al., 2011).

Os membros da Ordem Kinetoplastida apresentam um mecanismo de detoxificação diferente daquele encontrado no hospedeiro vertebrado, o qual utiliza glutationa peroxidase dependente de selênio e catalase (PELOSO et al., 2011; 2012 PIACENZA et al., 2013). Em kinetoplastídeos estas enzimas não estão presentes e o sistema antioxidante é formado por um número expressivo de moléculas enzimáticas e não enzimáticas com atividade redox que utilizam um sistema antioxidante dependente do tiol tripanotiona (T(S)₂) (TURRENS, 2004; PELOSO et al., 2011). O tiol em questão deriva da conjugação de duas moléculas do tripeptídeo glutationa (GSH) com uma molécula de espermidina para formar o ditiol N,N-bis (glutationil)-espermidina, conhecido como tripanotiona ou T(S)₂ (FAIRLAMB et al., 2005). A enzima tripanotiona sintetase é restrita a tripanosomatídeos (FINZI, 2004), sendo responsável por catalisar a conjugação sequencial da glutationa a molécula de espermidina em reações dependentes de ATP.

O metabolismo de EROs dependente de tripanotiona envolvendo uma única cascata de enzimas foi proposto primeiramente em *Crithidia fasciculata*, um tripanosomatídeo de inseto (NOGOCEKE et al., 1997; PELOSO et al., 2012). Posteriormente comprovou-se sua presença em outras espécies da família Trypanosomatidae como *T. brucei rhodesiense* (EL-SAYED et al., 1995), *Leishmania infantum* (CASTRO et al., 2002), *T. brucei brucei*, *T. cruzi*, *L. major* e *L. donovani*, revistos em Krauth-Siegel, Comini e Schlecker (2007).

Por apresentar aspectos únicos quando comparado ao mecanismo antioxidante dos mamíferos, as proteínas deste sistema centrado na T(S)₂ são apontadas como potenciais alvos para o desenvolvimento seletivo de fármacos (PELOSO et al., 2011; 2012).

As enzimas antioxidantes parecem atuar de forma sequencial em diferentes compartimentos sub-celulares de tripanosomatídeos, promovendo a detoxificação das EROs (PIACENZA et al., 2013). O fluxo de equivalentes reduzidos da tripanotiona T(SH)₂ pode ser transferido a triparedoxina (TPX) ou a glutationa (GSH), as quais podem transferir elétrons para as peroxidases (PELOSO et al., 2012).

De acordo com Piacenza e colaboradores (2013), cinco peroxidases foram identificadas em *T. cruzi*: duas peroxiredoxinas (PXs): triparedoxina peroxidase citosólica (*TcTRPxcit*) e triparedoxina peroxidase mitocondrial (*TcTRPxmit*) que detoxificam eficientemente o H₂O₂, hidroperóxidos de cadeia curta (WILKINSON et al., 2000) e peroxinitrito (PIACENZA et al., 2008); duas glutationas peroxidases não dependentes de selênio (GPXI no citosol e glicosomo e GPXII no retículo endoplasmático) que conferem resistência a hidroperóxidos de

fosfolipídios e ácidos graxos (WILKINSON et al., 2002a; 2002b) e uma hemoperoxidase dependente de ascorbato (APX) no retículo endoplasmático que degrada H_2O_2 (WILKINSON et al., 2003). Além destas, cita-se ainda em outros tripanosomatídeos as enzimas ferro-superóxido dismutase (FeSOD) e glutathiona peroxidase dependente de cisteína (GPx) (PIACENZA et al., 2007; PELOSO et al., 2012).

O doador final para todos os sistemas enzimáticos é o NADPH derivado da via da pentose fosfato (PPP) que segundo Allmann e colaboradores (2013) é a única fonte de elétrons para a redução da tripanotona. O NADPH é o produto de duas reações enzimáticas da via da pentose fosfato catalisadas pelas enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e 6-fosfogluconato desidrogenase que se apresentam, respectivamente, no citosol e glissosomo em tripanosomas (IGOILLO-ESTEVE et al., 2007).

Os equivalentes redutores são canalizados através dos sistemas redox da tripanotona ($T(S)_2$), da glutathiona (GSH), ascorbato (ASC) e /ou triparedoxina (TRX) (CARNIERI; MORENO; DOCAMPO, 1993; IRIGOIN et al., 2008; KRAUTH-SIEGEL; COMINI, 2008; PIACENZA et al., 2013). No retículo endoplasmático o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é metabolizado pela hemoperoxidase dependente de ascorbato (APX) usando ascorbato (ASC) como doador de elétrons. A dehidroascorbato (DHA) produzida durante a redução do peróxido de hidrogênio catalisado pela enzima ascorbato peroxidase (WILKINSON et al., 2000), reage diretamente com a $T(SH)_2$. O H_2O_2 na presença de metais com atividade redox pode iniciar reações de lipoperoxidação que geram hidroperóxidos orgânicos (LOOH), que são substratos da glutathiona peroxidase II. A $T(SH)_2$ reduz a glutathiona oxidada (GSSG) a GSH, enquanto a tripanotona redutase (TRed) reduz a tripanotona oxidada (TS_2) (PIACENZA et al., 2013)

Na mitocôndria a cadeia transportadora de elétrons é a principal fonte de produção do superóxido ($O_2^{\cdot-}$). A isoforma mitocondrial da FeSODA catalisa a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 . Quando o $\cdot NO$ derivado do hospedeiro atinge a mitocôndria, há uma inibição da respiração mitocondrial e forma o peroxinitrito ONOO-. A peroxiredoxina mitocondrial (MPX), encontrada na membrana externa do cinetoplasto em *T. cruzi* e outros tripanosomatídeos, decompõe cataliticamente H_2O_2 e/ou ONOO- (GUPTA; WEN; GARG, 2009; PIACENZA et al., 2013). No citosol as enzimas antioxidantes incluem a peroxiredoxina citosólica (CPX), FeSODB, e GPX-I (PIACENZA et al., 2008). Peloso e colaboradores (2016), pela primeira vez detectaram a presença de

triparedoxina mitocondrial também no citosol, propondo inclusive mudança de nomenclatura desta enzima para TcMPx (Mitochondria/cytosolic tryparedoxin peroxidase).

2 JUSTIFICATIVA

O *T. rangeli* é um protozoário estreitamente relacionado ao *T. cruzi*, com o qual compartilha extensa distribuição geográfica, vetores e composição antigênica. Conhecer e comparar as espécies que compartilham hospedeiros e que podem ser filogeneticamente relacionadas permite o entendimento da história evolutiva das mesmas e do grupo a que pertencem.

T. rangeli possui ação patogênica junto a seus vetores e é considerado não patogênico para seus hospedeiros vertebrados. Além disso, ao contrário do observado para *T. cruzi*, dados a cerca da capacidade proliferativa de *T. rangeli* e de sua manutenção junto aos hospedeiros vertebrados continuam inconclusivos.

Dentre os genes anotados no recém concluído genoma de *T. rangeli* (STOCO et al., 2014), ou no genoma de *T. cruzi* (EL-SAYED et al., 2005), atenção especial foi dada aos genes envolvidos ou tendo possível função no estabelecimento de infecção, virulência e patogênese (MARTINEZ et al., 1995), como os genes de proteínas do sistema antioxidante (PIACENZA et al., 2013).

Fatores de virulência, em especial, tem sido amplamente relacionados a efetiva expressão e ação de enzimas do sistema antioxidante em Tripanosomatídeos. Buscas nos principais bancos de dados revelaram escassez de informações a cerca deste sistema em *T. rangeli*, o que estimulou nossa pesquisa.

Em tripanosomatídeos o mais importante sistema de detoxificação é baseado no tiol de baixa massa molecular tripanotiona ($T(S)_2$), que mantém o ambiente intracelular reduzido pela ação da enzima tripanotiona redutase (TRed). Além desta, o sistema antioxidante em tripanosomatídeos também apresenta, entre outras, a enzima triparedoxina peroxidase (TRPx) encontrada no citosol (TRPxcit) e na mitocôndria (TRPxmit) que utiliza a triparedoxina (uma tiol-dissulfeto oxidoreductase) como doador de elétrons e reduz substratos como o peróxido de hidrogênio e peroxinitrito, principais oxidantes gerados durante o processo de infecção em *T. rangeli*.

Assim sendo, este estudo se torna um modelo interessante dentro do grupo evolutivo do gênero *Trypanosoma* ampliando o entendimento sobre interações parasito-hospedeiro, possíveis mecanismos de virulência e sobrevivência intracelular.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

Caracterizar molecularmente as principais enzimas envolvidas no sistema de defesa antioxidante de *Trypanosoma rangeli* comparando-as a outros tripanosomatídeos, assim como caracterizar funcionalmente as enzimas tripanotiona redutase (*TrTRed*) e triparedoxina peroxidase (*TrTRPx*) em diferentes estágios de vida do parasito e em situações de estresse induzido.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a síntese de NADPH e H_2O_2 por epimastigotas de *T. rangeli* como fontes, respectivamente, de equivalentes reduzidos e de estresse oxidativo.
- Caracterizar *in silico* as enzimas envolvidas direta e indiretamente na defesa antioxidante de *T. rangeli* em nível genômico e proteômico comparando-as com outros kinetoplastídeos.
- Determinar os níveis e padrão de expressão dos genes que codificam as enzima tripanotiona redutase (*TrTRed*) e triparedoxina peroxidase (citossólica e mitocondrial) em diferentes estágios do ciclo de vida de *T. rangeli*.
- Avaliar os níveis de expressão das proteínas *TrTRed*, *TrTRPx*_{cit} e *TrTRPx*_{mit} em diferentes estágios do ciclo de vida de *T. rangeli*.
- Identificar possíveis alterações nos níveis de expressão das proteínas *TrTRed*, *TrTRPx*_{cit} e *TrTRPx*_{mit} durante estresse oxidativo induzido com exposição dos parasitos ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2).
- Determinar níveis de atividade enzimática da enzima tripanotiona redutase (*TrTRed*) em diferentes fases do ciclo de vida de *T. rangeli* e em parasitos superexpressando esta enzima.
- Determinar se o aumento de expressão da enzimas *TrTRed* afeta o perfil de sensibilidade ao estresse oxidativo e favorece a sobrevivência dos parasitos nas células hospedeiras *in vitro*.

4 CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DE ENZIMAS
ENVOLVIDAS NA DEFESA ANTIOXIDANTE DE
Trypanosoma rangeli E COMPARAÇÃO COM
ORTÓLOGOS EM KINETOPLASTIDEOS

4.1 OBJETIVO DO CAPÍTULO

Caracterizar *in silico* as enzimas envolvidas direta e indiretamente na defesa antioxidante de *T. rangeli* em nível genômico e proteômico comparando-as com ortólogas em Kinetoplastídeos.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Identificação *in silico* dos principais genes envolvidos na defesa antioxidante de *Trypanosoma rangeli* e outros kinetoplastídeos.

Devido a função central da tripanotona no sistema antioxidante (Figura 4), primeiramente buscamos identificar e caracterizar genes que codificam as enzimas relacionadas à síntese de precursores deste tiol, sendo: 1) biossíntese de cisteína (Cisteína sintase- CS (EC 2.5.1.47) e Cistationina β sintase – C β S (EC 4.2.1.22)); 2) síntese de glutationa (γ -Glutamilcisteína sintetase - γ GcS (EC 6.3.2.2) e Glutationa sintetase – GS (EC 6.3.2.3)); 3) síntese da poliamina espermidina (ornitina descarboxilase – ODC (EC 4.1.1.17) e espermidina sintase – SpdS (EC 2.5.1.16)); 4) síntese da tripanotona (Tripanotona sintetase – TS (EC 1.8.1.12) e Glutamilespermidina sintase – GspS (EC 3.5.1.78)). Além destes, foram identificados e caracterizados genes cujos produtos estão diretamente relacionados a cascata de detoxificação: Tripanotona reductase (TRed - EC 1.8.1.12), Superóxido Dismutase (SOD - EC 1.15.1.1), Ascorbato peroxidase (APx - EC 1.11.1.11), Glutationa peroxidase (GPx - EC 1.11.1.9) e Triparedoxina peroxidase (TRPx - EC 1.11.1.15).

A busca pelos genes selecionados foi inicialmente realizada pela anotação de cada gene em sequências anotadas em banco de dados do genoma de *T. rangeli*. O banco de dados em questão compreende sequências genômicas oriundas do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e do TriTryp (TriTrypDB.org - <http://tritrypdb.org/tritrypdb/>) (STOCO et al., 2014). As sequências não identificadas em *T. rangeli* tiveram sequências de *L. major* e *T. cruzi* usadas nas comparações. A identidade das proteínas foi confirmada pela análise a partir do BLAST (BlastP) contra o banco de dados UniProtKB/Swiss-Prot usando e-value de 1e-10 e curadas manualmente.

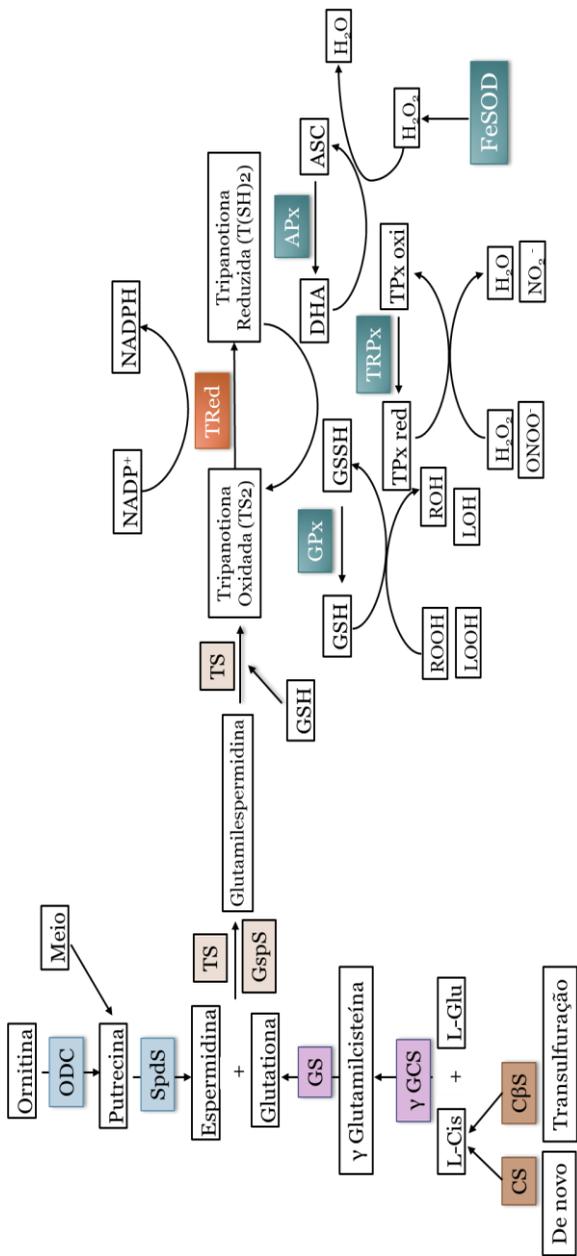


Figura 4: Genes envolvidos na defesa antioxidante de kinetoplastídeos e seus mecanismos de ação na síntese de precursors envolvidos na degradação de EROs e ERNs. Via da biossíntese de cisteína (Cisteína sintase - CS e Cistionina β sintase - CβS) assinaladas em marrom; via da síntese de glutatona (γ-Glutamilsisteína sintetase - γGcS e Glutaciona sintetase - GS) assinaladas em lilás; via de síntese da poliamina espermidina (ornitina descarboxilase - ODC e espermidina sintetase - SpdS) em azul claro; via de síntese da tripanotona (Tripanotona sintetase - TS e Glutamilspermidina sintetase - GspS) em rosa. Genes cujos produtos estão diretamente relacionados a cascata de detoxificação: Tripanotona reductase (TRed) em vermelho, Superóxido Dismutase (SOD), Glutaciona peroxidase (GPx), Tripanotona peroxidase (TPx) e Tripanotona peroxidase (TRPx) em azul escuro.

Em seguida genes ortólogos e parálogos foram selecionados nos bancos de dados do TriTrypDB e/ou Genbank usando o OrthoMCL (LI; STOECKERT; ROOS, 2003), sendo determinado o número de cópias de cada um dos genes ortólogos. As seguintes espécies foram incluídas nas buscas: *T. cruzi* CL-Brener (Esmeraldo and non-Esmeraldo) (EL-SAYED et al., 2005), *T. brucei* TREU927 (BERRIMAN et al., 2005), *T. grayi* ANR4 [30], *T. evansi* STIB805 (CARNES et al., 2015), *T. vivax* Y486 (JACKSON et al., 2012), *Leishmania infantum* clone JPCM5 (MCAN/ES/98/LLM-877) (PEACOCK et al., 2007), *Leishmania major* Friedlin (IVENS et al., 2005), *Leishmania tarentolae* Parrot-TarII (RAYMOND et al., 2012), *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2903, *Crithidia fasciculata* Cf-C1, *Angomonas deanei* ATCC 30255 (MOTTA et al., 2013), *Strigomonas culicis* ATCC 30268 (MOTTA et al., 2013), *Endotrypanum monterogeii* LV88, *Leptomonas seymouri* ATCC 30220 (KRAEVA et al., 2015), *Phytomonas* sp. EM1 (PORCEL et al., 2014) e *Bodo saltans* (JACKSON, 2015).

4.2.2 Caracterização das Sequências

Os parâmetros físicos-químicos de cada um dos genes analisados foram caracterizados utilizando-se o pacote de programas ExPASy tools (*Expert Protein Analysis System*) (<http://expasy.org>). Através do software ProtParam foram preditos o peso molecular (pm) e ponto isoelétrico (pI) de cada uma das proteínas analisadas baseando-se nas suas sequências de aminoácidos.

A presença de peptídeo sinal ou sequência de endereçamento mitocondrial e de sítio de clivagem foram identificados nas sequências aminoacídicas usando os programas SignalP (PETERSEN et al., 2011), Phobius (KALL; KROGH; SONNHAMMER, 2004) e PrediSi (HILLER et al, 2004) baseados em sequências de eucariotos e sem modificação dos parâmetros padrões. Resultados foram considerados válidos quando, no mínimo, dois programas apresentavam correspondência quanto às regiões identificadas.

A localização celular de cada proteína de interesse foi predita pelos programas iPSORT (BANNAI et al., 2002), TargetP (EMANUELSSON et al., 2000), SecretomeP (BENDTSEN et al., 2004), Mitoprot (CLAROS; VINCENS, 1996), PTS1 (NEUBERGER et al., 2003), LOCTREE (GOLDBERG; HAMP; ROST, 2012) e ESLPred2 (GARG; RAGHAVA, 2008) usando parâmetros padrões e modelos para “*non-plant*” e eucariotos. Da mesma que o realizado para a predição de

peptídeos sinais, foram considerados válidas as predições de localização celular que, no mínimo, foram assinaladas de forma concordante por dois programas distintos.

A caracterização funcional e a busca por domínios conservados foram realizadas através dos programas *Conserved Domains Search Service* (NCBI), *InterPro* (EMBL-EBI) and *Prosit*e (Expasy).

Na tabela 1 (Apêndice 11) estão elencados os programas utilizados nas diferentes fases da análise *in silico* dos genes envolvidos na defesa antioxidante das espécies supracitadas, assim como a identificação dos respectivos endereços eletrônicos.

4.2.3 Análises filogenéticas

As sequências aminoacídicas dos respectivos genes das diferentes espécies foram alinhadas utilizando-se o software *Clustal Omega* (SIEVERS; HIGGINS, 2014). A distância evolutiva e as árvores filogenéticas foram calculadas utilizando-se o programa MEGA 6.0 (KUMAR; TAMURA; NEI, 1993; TAMURA et al., 2013). O modelo de substituição para cada gene foi definido através da análise de BIC (*Bayesian Information Criterion*), considerando o menor valor obtido como o modelo aceito. A história evolutiva para cada gene foi reconstruído utilizando o método de Máxima Verossimilhança baseando-se no modelo LG - *Le Gascuel* (Le; Gascuel, 2008). Para todas as análises, as árvores com maior valor de log foram mostradas. Foi aplicado um *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1995) de 1.000 réplicas e apenas os agrupamentos com *bootstrap* maior que 80 foram apresentados. Árvores iniciais para procura heurística foram obtidas automaticamente pela aplicação dos algoritmos Neighbor-Join e BioNJ. Algoritmos para a distância entre pares foram estimados usando-se modelos selecionados e, posteriormente utilizamos as topologias com maior valor de Log. A distribuição Gama discreta foi utilizada para modelar diferenças nas taxas evolutivas entre sítios (5 categorias) e todos os sítios foram utilizados nas análises. As árvores geradas foram desenhadas por escala, com comprimento dos ramos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas (número de substituições por sítio) utilizadas para inferir a árvore filogenética.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os Kinetoplastida são membros de uma grupo ancestral de protistas que apresenta desde espécies de vida livre a parasitos de plantas e animais invertebrados e vertebrados. Entre estes estão os gêneros *Leishmania*, *Endotrypanum* e *Trypanosoma*, representantes dixênicos de parasitos de vertebrados, incluindo importantes patógenos humanos. Parasitos dixênicos de plantas como os do gênero *Phytomonas* e parasitos monoxênicos representados por parasitos de insetos dos gêneros *Strigomonas*, *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Leptomonas* e *Angomonas* (SIMPSON; STEVENS; LUKES, 2006; MASLOV et al., 2013). Tal diversidade é reflexo da existência de mecanismos adaptativos, entre estes os relacionados a capacidade de responder ao estresse proveniente de metabólitos endógenos ou exógenos, como EROs e ERNs.

A capacidade de tripanosomatídeos como *T. cruzi*, *T. rangeli* e *Leishmania* spp. em infectar, diferenciar-se e multiplicar-se em seus hospedeiros, assim como lidar com o sistema de defesa dos mesmos está relacionado diretamente ao sucesso de sobrevivência destes parasitos e o estabelecimento da infecção (PIACENZA et al., 2009b; ALVAREZ et al., 2011). Além de serem expostos continuamente a ambientes oxidantes durante seus ciclos de vida, os parasitos também produzem EROs e ERNs endógeno, como subprodutos de seu metabolismo aeróbico (FINZI et al., 2004; COSENTINO-GOMES; ROCCO-MACHADO; MEYER-FERNANDES, 2014).

A presença de mecanismos que tornam o parasito capaz de resistir aos efeitos potencialmente letais do ataque proveniente de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio é essencial neste momento. Sendo assim, a manutenção de um repertório de genes que codifiquem proteínas envolvidas em mecanismos de defesa antioxidante são chaves para a sobrevivência do parasito.

Atualmente, segundo Arias e colaboradores (2013), existe um entendimento geral sobre os mecanismos responsáveis por esta resistência, mas a caracterização dos vários componentes do metabolismo redox está longe de ser completada.

Na maior parte dos organismos eucarióticos, as enzimas catalase e glutationa peroxidase dependente de selênio formam a frente de defesa contra os danos mediados pelo desequilíbrio entre espécies reativas e enzimas detoxificantes. No entanto, os membros da família Trypanosomatidae não possuem estas enzimas (CASTRO; TOMÁS, 2008; PIACENZA et al., 2013). Nestes organismos o metabolismo de

hidroperóxidos é dependente da constante redução do tiol tripanotona pela tripanotona redutase (TRed). O ambiente reduzido, por sua vez, é base para a ação de enzimas como a Ferro superóxido dismutase (FeSOD), glutatona peroxidase (GPx), triparedoxina peroxidase (TRPx) e ascorbato peroxidase (APx) na detoxificação de EROs e ERN.

Para *T. rangeli* os resultados originais aqui descritos representam a caracterização de enzimas relacionadas ao sistema antioxidante neste parasito e podem servir de inferência para o entendimento da incapacidade deste parasito em sobreviver no interior das células em seu hospedeiro vertebrado, onde o estresse oxidativo é contínuo.

Neste capítulo relacionam-se os dados relativos a caracterização em nível gênico e proteico das principais enzimas direta ou indiretamente envolvidas na detoxificação de EROs e ERNs em *T. rangeli*. Além disso, considerando diferenças evolutivas e biológicas entre os tripanosomatídeos parasitos e não parasitos e a recente disponibilidade de dados de seus genomas, realizamos uma análise comparativa de genes ortólogos relacionados ao sistema antioxidante. Desta forma, propomos um modelo para a evolução deste mecanismo em tripanosomatídeos que invadem ou não células durante seu ciclo nos hospedeiros vertebrados.

As relações de homologia entre os genes do sistema antioxidante de diferentes espécies de Kinetoplastídeos foi realizada como base para determinação de uma ancestralidade comum entre as espécies de tripanosomatídeos. Para Fitch (2000), o estudo da filogenia a partir de genes ortólogos, que divergem a partir de um evento de especiação, representa exatamente a filogenia de seus organismos.

Os genes ortólogos são componentes essenciais de diversas análises e aplicações no campo da genômica comparativa, como por exemplo, a reconstrução das relações evolutivas entre espécies, os testes de modelos evolutivos para genomas, as inferências sobre propriedades funcionais de genes, a identificação de genes taxonomicamente restritos e a anotação de genomas (MENEZES-NETO, 2012).

Além dos parâmetros físicos e químicos dos genes, a análise da sequência para predição de peptídeo sinal foi realizada uma vez que a presença deste motivo, encontrado geralmente na extremidade N-terminal de proteínas, influencia a função biológica de uma proteína ao ser um fator determinante da sua localização subcelular (MENEZES-NETO, 2012; SOUZA; MENEZES-NETO; BRITO, 2013).

A presença de um peptídeo sinal na sequência codificadora é responsável em organismos procariotos pela translocação da proteínas através da membrana plasmática ou, em organismos eucariotos, através da membrana do Retículo Endoplasmático Rugoso - RER. A partir do

RER as proteínas podem seguir para compartimentos como: Complexo de Golgi, retículo endoplasmático, lisossomos, vacúolo digestivo, vesículas secretórias (proteínas que são destinadas ao meio extracelular) e diferentes membranas plasmáticas (MENEZES-NETO, 2012). A ausência de um peptídeo sinal, por sua vez, indica uma localização citoplasmática, nuclear ou, em casos mais raros, que o transporte desta proteína para outros compartimentos é feito através de um via independente de peptídeo sinal (NICKEL, 2003). Em tripanosomas grande parte das proteínas mitocondriais parecem não possuir tais peptídeos sinais, incluindo as proteínas que tem sua importação à mitocôndria comprovada (ZHANG et al., 2010).

O peptídeo sinal ou sequência sinal é formado por 15-60 resíduos de aminoácidos na qual identifica-se uma porção central hidrofóbica flanqueada na sua extremidade C-terminal por uma região polar onde se encontra o seu sítio de clivagem (MENEZES-NETO, 2012). Geralmente, o peptídeo sinal se localiza na extremidade N-terminal de proteínas e em muitos casos inicia a translocação através de membrana do RER ao mesmo tempo em que a proteína é traduzida por ribossomos (SHAN; WALTER, 2005), entretanto há casos em que o peptídeo sinal é encontrado em regiões mais centrais da proteína ou mesmo em sua extremidade C-terminal (KUTAY; AHNERT-HILGERL; HARTMANN, 1995).

Segundo Menezes-Neto (2012), apesar da constante evolução das metodologias de predição gênica, os modelos preditos podem apresentar erros, principalmente na extremidade N-terminal da região codificante em função da dificuldade de se identificar o correto códon de iniciação da transcrição (geralmente uma Metionina), o que pode gerar predições negativas do peptídeo sinal. Este viés resulta da própria natureza do peptídeo sinal, o qual deve obedecer a certas restrições estruturais e composicionais (EMANUELSSON et al., 2007). A imprecisão destes modelos dificulta as análises subsequentes que forem dependentes da estrutura primária de proteínas como, por exemplo, a predição de peptídeos sinal e, conseqüentemente a sua localização subcelular. Desta forma, optou-se aqui pela análise em diferentes programas de predição, sendo considerada a localização predita pela maioria deles em nossas análises. Os métodos escolhidos utilizam diferentes técnicas computacionais (SVM, rede neural artificial, Modelos de Markov, entre outros) e características para a predição da localização subcelular tais como composição aminoácídica (MitPred, Predotar, PSORTII), propriedades físico-químicas (Predotar e LOCTree), peptídeos sinais na

região N-Terminal (TargetP, iPSORT, PredSL) e ocorrência de domínios no programa Pfam (MITOPred).³¹ Através da utilização de diferentes programas e algoritmos buscamos reduzir o acúmulo de erros de anotação que poderiam ter consequências negativas significativas ao provocar a recuperação de informações equivocadas para estes genes, principalmente os com possível localização mitocondrial.

A identificação de peptídeos sinal nas sequências analisadas também pode ser útil, uma vez que estes motivos são amplamente utilizadas como filtro em estratégias de vacinologia, uma vez que alvos clássicos da resposta imune humoral são geralmente proteínas secretadas ou proteínas da superfície celular (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2012; JOHN; JOHN; KHOLIA, 2012; SEIB; ZHAO; RAPPUOLI, 2012; SANTANA, 2014).

Todos os genes analisados (Figura 4), envolvidos direta ou indiretamente na defesa antioxidante de tripanosomatídeos e já bem caracterizados em espécies como *T. cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania* spp., foram identificados em *T. rangeli*, com exceção dos genes da ascorbato peroxidase (APX), (STOCO et al., 2014) e cisteína sintase (CS) (ROMERO et al., 2014), identificados como pseudogenes (Figura 5). Além destes, os genes da ornitina descarboxilase (ODC) (STOCO et al., 2014) e glutamilespermidina sintase (GspS), não foram encontrados no genoma do *T. rangeli* (Tabela 1). A tabela 1 também lista os principais parâmetros físico-químicos preditos dos genes ortólogos identificados no genoma de *T. rangeli*.

De forma geral, os genes analisados apresentam-se em *T. rangeli* com número no genoma similar ao *T. brucei* (Tabela 2).

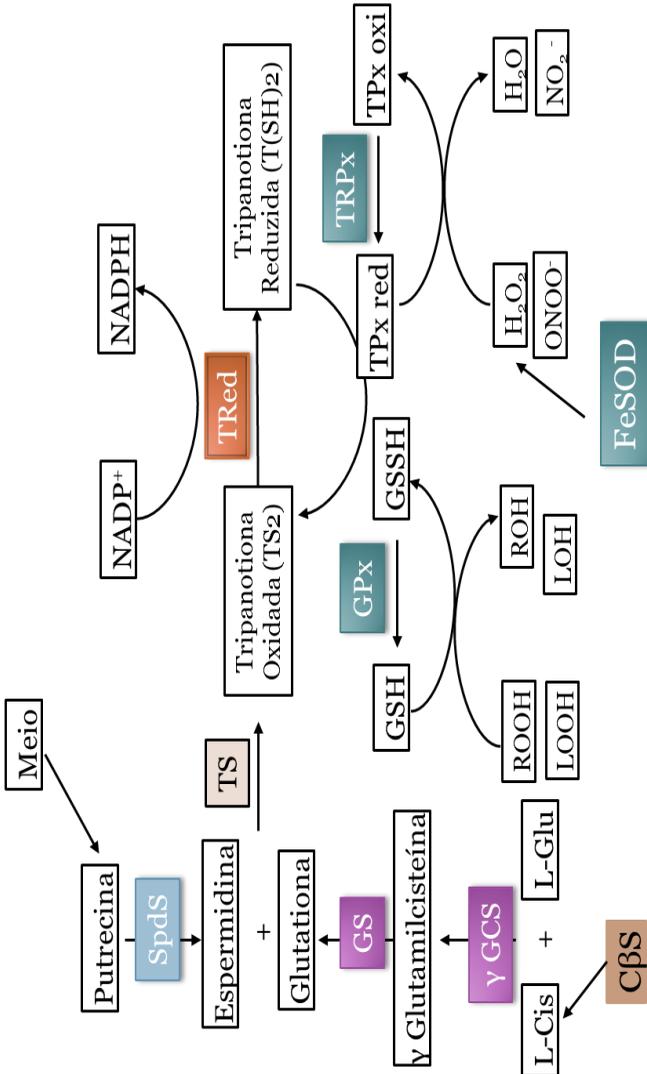


Figura 5: Genes envolvidos na defesa antioxidante encontrados como cópias completas no genoma de *Trypanosoma rangeli*

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos preditos de genes envolvidos no sistema antioxidante de *Trypanosoma rangeli* e porcentagem de identidade com diferentes espécies do gênero *Trypanosoma*.

Gene	N. Acesso	Isoformas	Pb	aa	P.m. kDa	pI	Peptídeo sinal	Seq. endereç.	Citoloc.	% Identidade					
										T. c.	T. b.	T. gr.	L. m.	L. inf.	C. fasc.
Cistationina β sintase	TRSC58_05439		912	303	32,94	5,45	não	não	citosol	84	77,5	76	74,5	73	74,5
	TRSC58_03074		813	270	29,05	6,5	não	não	citosol	75,5	73	76	69,5	69,5	71,5
	TRSC58_07096		912	303	32,94	5,45	não	não	citosol	84	77,5	76	74,5	73	74,5
Espermidina Sintase	TRSC58_01873	não	891	296	32,99	5,88	não	não	citosol	85	74	81	67	68	68
Glutaciona Sintetase	TRSC58_04279	não	1584	527	58,14	5,23	não	não	citosol/secretada	74	57	67	47	47	49
Tripanotiona Sintetase	TRSC58_01995		1935	644	72,78	5,6	não	não	citosol	77	70	76	59	60	59
	TRSC58_02894	não	2031	676	75,46	5,16	não	não	citosol	67	27	59	43	43	47
	TRSC58_03866		720	239	27,03	7,98	não	não	secretada	77	62	65	43	39	43
Tripanotiona Redutase	TRSC58_02517	não	1473	490	53,57	6,33	sim	não	citosol	84	83	82	66	66	68
Ferro Superóxido Dismutase	TRangeli_25:95659_96299	A	688	227	25,6	8,46	não	sim	mitocôndria/secretada	85,5	74,5	81	65	65	68,7
	TRSC58_05576	B	588	195	22	7,3	não	não	citosol	88	80	87	64,5	64,5	73
	TRSC58_00796	C	912	303	35,53	7,37	sim	não	mitocôndria/secretada	90	79,8	85	78,1	78,9	73,5
	TRSC58_02831	"D"	801	266	30,2	8,3	não	não	mitocôndria/secretada	82	73	80,5	57,8	57,5	58
Glutaciona peroxidase	TRSC58_07183	AI	495	164	18,2	8,44	não	não	citosol	77	77	83,33	68,3	69,5	67
	TRSC58_06976	AII	582	193	21,07	8,12	sim	não	secretada/RE						
	TRSC58_01013	B	483	160	17,83	8,6	sim	não	citosol	76	57,6	69,2	50	49,3	53,2
Triparedoxina peroxidase	TRSC58_02563	Cit	549	182	20,57	7,24	não	não	citosol	90,2	85,7	84,5	70,4	71	73
	TRSC58_04568	Mit	681	226	25,59	8,18	não	Sim	mitocôndria	90,2	77,5	86,5	72,7	72,7	75,65
	TRSC58_06481	Mit	459	152	17,12	4,69	não	não	Mitocôndria						

T. c. (*Trypanosoma cruzi* ; T. b. (*Trypanosoma brucei*); T. gr. (*Trypanosoma grayi*); L. m. (*Leishmania major*); L. inf. (*Leishmania infantum*); C. fasc. (*Crithidia fasciculata*)

Tabela 2: Número de cópias dos genes envolvidos na defesa antioxidantes em diferentes Kinetoplastídeos.

Ciclo de Vida		Monoxênico					Heteroxênico													
Vida Livre		Inseto					Inseto/Plantas	Inseto/mamíferos	Inseto/Répteis	Inseto/mamíferos					Inseto/Répteis	Inseto/mamíferos				
Hospedeiros		Com endossimbiontes					Intracelular					Extracelular					?	Intracelular		
Enzimas	Isoformas	<i>B. saltans</i>	<i>A. deanei</i>	<i>S. culicis</i>	<i>C. fasciculata</i>	<i>L. seymouri</i>	<i>Phytomonas</i> sp.	<i>E. monterogeii</i>	<i>L. tarentolae</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. major</i>	<i>L. infantum</i>	<i>T. vivax</i>	<i>T. evansi</i>	<i>T. brucei</i>	<i>T. grayi</i>	<i>T. rangeli</i>	<i>T. cruzi marinkellei</i>	<i>T. cruzi Esmeraldo</i>	<i>T. cruzi Non-Esmeraldo</i>
Cistationina Beta-Sintase	x																			
Cisteína Sintase	x																X			
Gamma glutamicisteína sintetase	x																			
Glutaciona Sintetase	x																			
Ornitina Descarboxilase	x																			
Espermidina Sintase	x																			
Tripanotona Sintetase	x																			
Glutamilespemidina Sintase	x								X	X	X									
Tripanotona redutase	x																			
Triparedoxina peroxidase	cit		6		6					7		6'1f								
	mit																			F
Ferro superóxido dismutase	A																			
	B		6																	
	C			10																
	D																			
Glutaciona peroxidase	A																			
	B																			
Ascorbato peroxidase	x																X			

1 gene
 2 genes
 3 genes
 4 genes
 5 ou mais genes
 ausente
X = Pseudogene
F = fragmento

4.3.1 Precusores do tiol Tripanotiona

4.3.1.1 Biossíntese de Cisteína

A síntese da glutationa (GSH) e da tripanotiona (T[SH]₂), além de outros tióis, depende da disponibilidade de precusores como a cisteína, um aminoácido sulfurado relacionado a diversos processos celulares como a estabilidade, a estrutura e a regulação da atividade catalítica de várias proteínas (LEROUX, 2013; ROMERO et al., 2014).

Duas vias diferentes são descritas para a biossíntese de cisteína, a via de síntese *de novo*, catalisada principalmente pela enzima Cisteína Sintase (CS), e a via de transulfuração reversa (RTS), catalisada pela Cistationina β -Sintase (CβS). Estas vias são compartilhadas entre os eucariotos e são compostas por dois passos (ROMERO et al., 2014).

Bactérias, plantas e alguns tripanosomatídeos podem sintetizar cisteína a partir do aminoácido serina pela via *de novo* uma vez que apresentam o gene da CS (MULLER et al., 2003). Estes dados corroboram com o encontrado em nossas análises *in silico* (Tabelas 2 e 3) nas quais identificamos na maioria dos kinetoplastídeos um gene de cópia única codificando para cisteína sintase (CS), com predição de localização citosólica, sem a presença de peptídeos sinais nas sequências (Tabela 3). Interessantemente, foram observadas quatro e três cópias do gene CS nos tripanosomatídeos monoxênicos *Angomonas deanei* e *Strigomanas culicis*, respectivamente. Sequências codificantes para CS não foram encontradas junto aos genomas de *Phytomonas* sp., *T. brucei*, *T. evansi* e *T. vivax*, sendo encontrada como um pseudogene em *T. rangeli* (Tabela 2). Entre os tripanosomas, *T. cruzi* e *T. grayi* mantiveram esta via intacta, formando um clado distinto na análise filogenética com alto valor de *bootstrap* (Figura 5). Outro clado está representado por todas as espécies de *Leishmania*, *E. monterogeii* e os parasitos monoxênicos *C. fasciculata* e *L. seymouri*.

Romero e colaboradores (2014; 2015) já haviam descrito a ausência da via *de novo* em *T. rangeli*. Sendo assim, a biossíntese da cisteína neste parasito é realizada unicamente a partir da via de transulfuração (RTS) que utiliza metionina como doador de enxofre e envolve uma série de reações enzimáticas espontâneas para obtenção de cisteína.

Genes codificantes para a enzima cistationina-β-sintase (CβS) são observados nos genomas de todos os kinetoplastídeos analisados, embora variações no número de cópias sejam observadas (Tabelas 2 e 4). Em *T.*

rangeli foram identificadas três cópias, enquanto em *T. cruzi* e *A. deanei* cinco cópias foram caracterizadas. *T. grayi* e *S. culicis* apresentam duas cópias de C β S e o restante das espécies analisadas apenas uma cópia deste gene, como em *T. brucei* e os outros tripanosomas africanos. Algumas cópias identificadas como C β S apresentaram-se como sequências incompletas, sem parte das regiões N e/ou C-terminal, sendo portanto excluídas das análises filogenéticas. As sequências utilizadas foram caracterizadas quanto à presença de domínio característico da enzima (domínio de união à enzima piroxidal 5-fosfato – PLP). Duas das cópias observadas no genoma do *T. rangeli* foram idênticas em suas sequências, sendo que uma terceira apresentou 92,5% de identidade com as duas primeiras.

A análise filogenética utilizando as sequências das enzimas C β S revelou um baixo poder de resolução na separação das espécies analisadas, à exceção das espécies de *Leishmania* (Figura 5).

A via RTS foi originalmente demonstrada em mamíferos e fungos, tendo sido posteriormente descrita em *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major* (WALKER; BARRETT, 1997; NOZAKI et al., 1999; NOZAKI et al., 2001; WILLIAMS; WESTROP; COOMBS, 2009; GIORDANA et al., 2014; ROMERO et al., 2014).

T. brucei é considerado auxotrófico para cisteína, necessitando de transportadores eficientes para incorpora-la a partir do meio externo e manter os níveis intracelulares deste aminoácido (MANTA et al., 2013). Os transportadores de aminoácidos pertencem a família das permeases são encontrados em todos os kinetoplastídeos, embora em *T. brucei* estas proteínas carreadoras sejam até 200 vezes mais eficientes que em *T. cruzi* ou *L. major* (CANEPA et al., 2009; MARCIANO; SANTANA; NOWICKI, 2012). Sendo assim, *T. vivax*, *T. evansi* e *T. rangeli* que não apresentam a via *de novo* de síntese de cisteína, necessitam da mesma forma, um eficiente transportador de cisteína para a suplementação deste aminoácido. Em mamíferos, *T. vivax* e *T. evansi* são parasitos extracelulares encontrados no sangue destes hospedeiros, assim como *T. brucei*, entretanto, o ciclo de vida de *T. rangeli* no interior de seu hospedeiro vertebrado ainda não é claro. A ausência de uma das vias de biossíntese de cisteína e de transportadores podem explicar porque *T. rangeli* apresentou oito vezes menos conteúdo de tióis totais quando comparado com *T. cruzi* (ROMERO et al., 2014).

Tabela 3: Características gerais dos genes da cisteína sintase (CS) em diferentes espécies de Kinetoplastídeos.

Organismo	Nº acesso	pb	aa	PM (Da)	p.I	Peptídeo Sinal	Citocalização
<i>Trypanosoma cruzi</i> (Esm.)	TcCLB.507165.50	999	332	35,195	5.78	Não	Citoplasma
<i>Trypanosoma cruzi</i> (Non Esm.)	TcCLB.507793.20	999	332	35,022	6.3	Não	Citoplasma
<i>Trypanosoma cruzi marinkellei</i>	Tc_MARK_7095	999	332	35,138	6.67	Não	Citoplasma
<i>Trypanosoma grayi</i>	Tgr.137.1070	1,002	333	35,506	6.77	Não	Citoplasma
<i>Trypanosoma rangeli</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trypanosoma brucei</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trypanosoma evansi</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trypanosoma vivax</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Leishmania infantum</i>	LinJ.36.3750	1,002	333	35,354	7.02	Não	Citoplasma
<i>Leishmania major</i>	LmjF.36.3590	1,002	333	35,450	7.02	Não	Citoplasma
<i>Leishmania braziliensis</i>	LBRM2903_350048300	1,002	333	35,386	7.2	Não	Citoplasma
<i>Leishmania tarentolae</i>	LtaP36.3680	1,002	333	35,439	7.16	Não	Citoplasma
<i>Crithidia fasciculata</i>	CFAC1_280039500	1,002	333	35,407	6.63	Não	Citoplasma
<i>Leptomonas seymouri</i>	Lsey_0172_0180	1,002	333	35,609	6.99	Não	Citoplasma
<i>Endotrypanum monterogeii</i>	EMOLV88_360042700	1,002	333	35,255	7.42	Não	Citoplasma

Organismo	Nº acesso	pb	aa	PM (Da)	p.I	Peptídeo Sinal	Citocalização
<i>Angomonas deanei</i>	EPY40917	699	232	24,562	5.81	Não	Citoplasma
	EPY29770 *	999	332	35,207	6.47	Não	Citoplasma
	EPY38782 *	999	332	35,207	6.47	Não	Citoplasma
	EPY43401 *	999	332	35,207	6.47	Não	Citoplasma
<i>Strignomonas culicis</i>	EPY31397	999	332	35,368	7.63	Não	Citoplasma
	EPY30317	699	232	24,418	5.96	Não	Citoplasma
	EPY19417	615	204	21,331	5.93	Não	Citoplasma
<i>Phytomonas sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bodo saltans</i>	CUG89794	1,017	338	35,521	6.86	Não	Citoplasma

* Sequências Idênticas; ¹:*Ip*iPSORT; ²TargetP; ³Mitoprot; ⁴ESLPred2; ^{Ph}Phobius; ^{Pr} PrediSi; ^{Sp} SignalP.

Tabela 4: Características gerais dos genes da Cistationina- β -sntase (C β S) em diferentes espécies de Kinetoplastídeos.

Organismo	Nº acesso	pb	aa	PM(Da)	p.I	Peptídeo Sinal	Sequência Peptídeo Sinal	Citocalização	Obs
<i>Trypanosoma cruzi</i> (Esm.)	TcCLB.508241.149	297	99	10,610	8.51	Não	-	Citoplasma	Fragmen- to
	TcCLB.511691.20	1,284	427	47,089	6.84	Sim ^{Pr/Sp}	MRRCGEWQPPSPRNGCFHLLP FLFTLLLLLFMFPIGR	Citoplasma	-
	TcCLB.510381.10	1,284	427	47,089	7.14	Sim ^{Pr/Sp}	MRRSGEWQPPSPRNGCFHHLS FLFTLLLLLFVIPNGR	Citoplasma	-
	TcCLB.511691.10	1,191	396	43,448	7.32	Não	-	Citoplasma	-
	TcCLB.508241.140	1,155	284	42,051	6.76	Não	-	Citoplasma	-
	TcCLB.509149.9	912	303	33,282	5.53	Não	-	Citoplasma	-
<i>Trypanosoma cruzi</i> (Non Esm.)	TcCLB.508177.129	828	275	30,433	5.14	Não	-	Citoplasma	-
	TcCLB.508175.360	1,206	401	44,031	6.52	Não	-	Citoplasma	-
	TcCLB.508177.110	1,155	384	42,092	7.04	Não	-	Citoplasma	-
	TcCLB.506905.50	1,155	384	42,065	6.76	Não	-	Citoplasma	-
	TcCLB.508177.120	1,155	384	42,083	6.76	Não	-	Citoplasma	-
	Tc_MARK_7256	1,143	381	41,743	7.29	Não	-	Citoplasma	-
	Tc_MARK_7962	792	263	29,050	5.48	Não	-	Citoplasma	-

Organismo	Nº acesso	pb	aa	PM(D a)	p.I	Peptídeo Sinal	Sequência Peptídeo Sinal	Citocalização	Obs
<i>Trypanosoma cruzi marinkellei</i>	Tc_MARK_10094	615	205	22,741	8.3	Não	-	Citoplasma	Fragmento
	Tc_MARK_606	1,284	427	46,374	7.79	Não	-	Citoplasma	-
<i>Trypanosoma grayi</i>	Tgr.10.1150	882	293	32,285	6.27	Não	-	Citoplasma	-
	Tgr.2624.1000	438	146	15,834	4.7	Não	-	Citoplasma	Incompleta N-terminal
<i>Trypanosoma rangeli</i>	TRSC58_03074	813	270	29,047	6.5	Não	-	Citoplasma	-
	TRSC58_05439*	912	303	32,944	5.45	Não	-	Citoplasma	-
	TRSC58_07096 *	912	303	32,944	5.46	Não	-	Citoplasma	-
<i>Trypanosoma brucei</i>	Tb11.02.5400	1,089	362	39,465	6.01	Não	-	Citoplasma	-
<i>Trypanosoma evansi</i>	TevSTIB805.11_01.7810	1,089	362	39,465	6.01	Não	-	Citoplasma	-
<i>Trypanosoma vivax</i>	TvY486_1108080	1,122	373	40,678	5.18	Não	-	Citoplasma	-
<i>Leishmania infantum</i>	LinJ.17.0300	1,080	359	39,113	6.02	Não	-	Citoplasma	-
<i>Leishmania major</i>	LmjF.17.0250	1,080	359	39,205	6.25	Não	-	Citoplasma	-
<i>Leishmania braziliensis</i>	LBRM2903_170008100	1,080	359	39,024	6.38	Não	-	Citoplasma	-

Organismo	Nº acesso	pb	aa	PM(D a)	p.I	Peptídeo Sinal	Sequência Peptídeo Sinal	Citocalização	Obs
<i>Leishmania tarentolae</i>	LtaP17.0270	1,080	359	39,079	6.51	Não	-	Citoplasma	-
<i>Crithidia fasciculata</i>	CFAC1_090008300	1,083	360	38,873	5.45	Não	-	Citoplasma	-
<i>Leptomonas seymouri</i>	Lsey 0197 0060	1,083	360	39,313	5.69	Não	-	Citoplasma	-
<i>Endotrypanum monterogeii</i>	EMOLV88_170006700	1,08	359	39,307	5.86	Não	-	Citoplasma	-
<i>Angomonas deanei</i>	EPY36860	1,092	363	40,218	6.68	Não	-	Mitocondrial ^{1:2;4}	-
	EPY38380	1,092	363	40,203	6.68	Não	-	Mitocondrial ^{1:2;3;4}	-
	EPY37551	984	327	36,197	5.90	Não	-	Citoplasma	-
	EPY40351	1,092	363	40,203	6.68	Não	-	Mitocondrial ^{1:2;3;4}	-
	EPY39721	534	177	19,495	5.33	Não	-	Citoplasma	-
<i>Strigomonas culicis</i>	EPY23081	1,068	355	38,692	6.04	Não	-	Citoplasma	-
	EPY29592	897	298	32,580	5.29	Não	-	Citoplasma	N-terminal Incompleta
<i>Phytomonas sp.</i>	CCW63976	1,059	352	38,310	5.51	Não	-	Citoplasma	-
<i>Bodo saltans</i>	CUG92011	1,131	376	40,695	5.90	Não	-	Citoplasma	-

4.3.1.2 Biossíntese de Glutathiona

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo composto de glutamato (Glu), cisteína (Cys) e glicina (Gly) presente em todos os mamíferos, onde participa de várias funções vitais incluindo a defesa antioxidante, detoxificação de xenobióticos, armazenamento de cisteína e a manutenção do balanço redox, dentre outras.

A síntese de glutathiona (GSH) é um processo de duas etapas catalisado pelas enzimas gamma-glutamilcisteína sintetase (γ -GcS) e glutathiona sintetase (GS) (Figura 4). A primeira etapa catalisada pela γ -GcS liga o L-glutamato e a L-cisteína para produzir a γ -glutamilcisteína. Na segunda etapa, a glutathiona sintetase (GS) forma uma ligação entre γ -glutamilcisteína e L-glicina para gerar a GSH (MANTA et al., 2013). Sequências codificantes para ambas as enzimas foram encontradas em todos os genomas analisados (Tabela 5 e 6), demonstrando que se trata de uma via conservada entre os kinetoplastídeos. Em *T. rangeli*, assim como nas outras espécies analisadas, apresentam-se como genes de cópia única, codificando proteínas cuja localização predita é o citosol.

A glutathiona sintetase (GS) está presente em praticamente todos os tecidos vivos, sendo descrita em uma ampla variedade de organismos como fungos (GRANT et al., 1997), plantas (PASTERNAK et al., 2008) e protozoários, sendo sempre associada à uma ação protetora contra danos causados por estresse oxidativo. Pratt, Nguyen e Phillips (2014) descrevem a importância da GS para *T. brucei*.

Ao analisarmos as sequências quanto a presença de domínio e famílias, observamos que todas possuem uma sequência característica da superfamília eu-GS (“*Eukaryotic Glutathione Synthetase*”), assim como motivos indicativos do sítio ativo contendo resíduos envolvidos na ligação da gamma-Glu-Cys a gamma-Glu-Cys-Gly (GSH) para produção da glutathiona, além dos motivos de dimerização e ricos em glicina e alanina, motivos de ligação de ATP, magnésio e glutathiona,. A sequência relacionada a formação de dímeros também foi relatada por Fyfe, Alphey e Hunther (2010).

Tabela 5: Características gerais dos genes da gamma-glutamilcisteína sintetase (γ -GcS) em diferentes espécies de Kinetoplastídeos.

Organismo	Nº acesso	pb	aa	PM (Da)	p-I	Peptídeo Sinal	Sequência Peptídeo Sinal
<i>Trypanosoma cruzi</i> (Esm.)	TcCLB.507625.99	2,082	693	79,667	5.36	Não	Citoplasma
<i>Trypanosoma cruzi</i> (Non Esm.)	TcCLB.507787.100	2,082	693	79,386	5.82	Não	Citoplasma
<i>Trypanosoma cruzi marinkellei</i>	Tc_MARK_5010	2,082	693	79,422	5.88	Não	Citoplasma
<i>Trypanosoma grayi</i>	Tgr.59.1060	2,067	688	79,002	6.48	Não	Citoplasma
<i>Trypanosoma rangeli</i>	TRSC58_05917	2,058	685	78,124	6.35	Não	Citoplasma
<i>Trypanosoma brucei</i>	Tb927.10.12370	2,040	679	77,469	6.47	Não	Citoplasma
<i>Trypanosoma evansi</i>	TevSTIB805.10.12970	2,040	679	77,422	6.54	Não	Citoplasma
<i>Trypanosoma vivax</i>	TvY486_1012070	2,175	724	82,726	6.31	Não	Citoplasma
<i>Leishmania infantum</i>	LinJ.18.1660	2,064	687	78,273	5.67	Não	Citoplasma
<i>Leishmania major</i>	LmjF.18.1660	2,064	687	78,312	6.21	Não	Citoplasma
<i>Leishmania braziliensis</i>	LBRM2903_180023100	2,067	688	77,926	6.21	Não	Citoplasma
<i>Leishmania tarentolae</i>	LtaP18.1640	2,067	688	78,046	5.74	Não	Citoplasma
<i>Crithidia fasciculata</i>	CFAC1_140028900	2,058	685	78,439	6.09	Não	Citoplasma
<i>Leptomonas seymouri</i>	Lsey_0320_0020	2,055	684	78,230	6.75	Não	Citoplasma
<i>Endotrypanum monterogeii</i>	EMOLV88_180020800	2,064	687	78,142	6.33	Não	Citoplasma
<i>Angomonas deanei</i>	EPY26925	2,049	682	77,658	5.8	Não	Citoplasma
<i>Strigomonas culicis</i>	EPY31630	2,049	682	77,766	6.03	Não	Citoplasma

Organismo	Nº acesso	pb	aa	PM (Da)	p.I	Peptídeo Sinal	Sequência Peptídeo Sinal
<i>Phytomonas sp.</i>	CCW64905	2,073	690	79,059	5.7	Não	Citoplasma
<i>Bodo saltans</i>	CUF39705	2,073	690	78,112	5.96	Não	Citoplasma

* Sequências Idênticas; ¹:^{lp}iPSORT; ²TargetP; ³Mitoprot; ⁴ESLPred2; ^{Ph}Phobius; ^{Pr}PrediSi; ^{Sp}SignalP.

Tabela 6: Características gerais dos genes da glutatona sintetase (GS) em diferentes espécies de Kinetoplastídeos.

Organismo	Nº acesso	pb	aa	PM (Da)	p.I	Peptídeo Sinal	Organismo
<i>Trypanosoma cruzi</i> (Esm.)	TcCLB.506659.30	1,608	535	58,776	5.24	Não	Citoplasma
<i>Trypanosoma cruzi</i> (Non Esm.)	TcCLB.508865.10	1,608	535	58,626	5.22	Não	Citoplasma
<i>Trypanosoma cruzi marinkellei</i>	Tc_MARK_8351	1,584	527	58,215	5.23	Não	Citoplasma
<i>Trypanosoma grayi</i>	Tgr.384.1000	1,533	511	56,878	5.65	Não	Citoplasma
<i>Trypanosoma rangeli</i>	TRSC58_04279	1,584	527	58,147	5.23	Não	Citoplasma
<i>Trypanosoma brucei</i>	Tb927.7.4000	1,668	555	61,305	5.96	Não	Citoplasma
<i>Trypanosoma evansi</i>	TevSTIB805.7.4270	1,668	555	61,335	5.96	Não	Citoplasma
<i>Trypanosoma vivax</i>	TvY486_0704000	1,725	574	63,784	6.24	Não	Citoplasma
<i>Leishmania infantum</i>	LinJ.14.0970	1,821	606	67,084	6.14	Não	Citoplasma
<i>Leishmania major</i>	LmjF.14.0910	1,821	606	66,955	6.02	Não	Citoplasma
<i>Leishmania braziliensis</i>	LbrM.14.0880	1,899	632	69,767	5.52	Não	Citoplasma
<i>Leishmania tarentolae</i>	LtaP14.0890	1,812	603	67,208	6.15	Não	Citoplasma
<i>Crithidia fasciculata</i>	CFAC1_110019200	1,875	624	68,721	6.09	Não	Citoplasma

Organismo	Nº acesso	pb	aa	PM (Da)	p.I	Peptídeo Sinal	Organismo
<i>Leptomonas seymouri</i>	Lsey_0341_0030	1,911	636	69,873	8.36	Não	Citoplasma
<i>Endotrypanum monterogei</i>	EMOLV88_140014800	1,887	628	70,348	5.63	Não	Citoplasma
<i>Angomonas deanei</i>	EPY40494+EPY34830	1,611	537	60,986	5.75	Não	Citoplasma
<i>Strigomonas culicis</i>	EPY25666	1,335	444	48,705	5.86	Não	Citoplasma
<i>Phytomonas sp.</i>	CCW64254	1,599	532	59,661	5.81	Não	Citoplasma
<i>Bodo saltans</i>	CUG84905	1,620	539	58,751	5.73	Não	Citoplasma

Sequências Idênticas; ¹IpI PSORT; ²TargetP; ³Mitoprot; ⁴ESLPred2; ^{Ph}Phobius; ^{Pr}PredISI; ^{Sp}SignalP.

As análises filogenéticas dos genes relacionados a biossíntese dos precursores da tripanotona, cisteína e glutatona, revelaram resolução similar. As sequências aminoacídicas da γ -GcS e GS demonstraram nível similar de identidade entre as espécies, respectivamente, 95 e 97%. Análises filogenéticas usando ambas, γ -GcS e GS, mostraram resolução similar. Conforme o esperado, *B. saltans* foi o organismo filogeneticamente mais distante dos demais e, quando assinalado como raiz das árvores (*root*), permitiu uma nítida separação das espécies analisadas em dois grupos principais, sendo um composto por *Trypanosoma* spp. e o outro por *Leishmania* spp. e outros tripanosomatídeos, independentemente do gene analisado (Figura 6). Dentre os tripanosomas, a diferenciação específica foi observada na análise de ambos os genes GS e γ -GcS. No clado composto por *Leishmania* spp. e outros tripanosomatídeos é claro o agrupamento e separação em nível específico para *Leishmania* sp., *E. monterogeei*, *C. fasciculata* e *L. seymouri*. Para a o gene GS não observamos uma resolução que permitisse a separação dos parasitos que albergam endossimbiontes (*S. culicis* e *A. deanei*) e *Phytomonas* sp.

4.3.1.3 Síntese e/ou Captação das Poliaminas Putrescina e Espermidina

A biossíntese de tripanotona depende da síntese de GSH, bem como dos níveis de espermidina, sendo esta uma poliamina sintetizada a partir da putrescina via enzima espermidina sintase (SpdS) (GONZALEZ; HUBER; ALGRANATI, 2001; HEBY; PERSSON; RENTALA, 2007; COLLOTI; ILARI, 2011). A espermidina está envolvida na manutenção do estoque de tripanotona, assim como no crescimento e sobrevivência dos tripanosomatídeos parasitos (ROBERTS et al., 2001; WILLERT, PHILLIPS, 2008; MELOS; ECHEVARRIA, 2012). Soares, Alves e Bechara (2011) assim como Soares e colaboradores (2012) apontam que o estudo da síntese de poliaminas como a espermidina e a putrescina é importante uma vez que as mesmas participam da regulação dos genes que codificam proteínas e enzimas do sistema antioxidante.

A espermidina sintase (SpdS) é outra enzima cuja sequência é bem conservada, apresentando-se como um gene de cópia única na maioria dos kinetoplastídeos analisados (Tabelas 2 e 7). Entretanto, duas cópias foram encontradas para para *T. cruzi* em seus diferentes haplótipos e três cópias em *S. culicis*. Em *T. grayi* três sequências estão anotadas como espermidina sintase, entretanto, ao realizarmos a análise comparativa das mesmas, em uma das sequências (Tgr.1592.1020) não foi possível a identificação dos domínios característicos e na segunda (Tgr.1629.1000), a sequência característica relacionada à família não foi reconhecida pelos programas de predição utilizados. Desta forma, somente consideramos válida para as análises subsequentes uma das sequências (Tgr.197.1050).

A presença do domínio com o sítio catalítico característico desta enzima, assim como a alta similaridade com sequências analisadas e já caracterizadas funcionalmente, sugere sua atividade em *T. rangeli*.

A análise filogenética demonstra uma clara separação dos tripanosomas americanos dos representantes africanos. Embora a duplicação gênica da SpdS só tenha sido observada nos diferentes haplótipos de *T. cruzi*, este parasito ficou agrupado com o *T. rangeli* e, em um ramo distinto, foram agrupados o *T. brucei*, o *T. evansi* e o *T. vivax*. Ainda que seja um tripanosoma restrito ao continente africano, o *T. grayi* não teve sua posição definida de forma clara na árvore (Figura 7).

Tabela 7: Características gerais dos genes da Espermidina Sintetase (SpdS) em diferentes espécies de Kinetoplastídeos.

Organismo	Nº de acesso	pb	aa	PM (Da)	p.I	Peptídeo sinal	Citocalização
<i>Trypanosoma cruzi</i> (Esm.)	TcCLB.503855.20	891	296	33,157	5.08	Não	Citoplasma
	TcCLB.504033.130	891	296	33,172	4.98	Não	Citoplasma
<i>Trypanosoma cruzi</i> (Non Esm.)	TcCLB.510337.40	891	296	33,090	5.21	Não	Citoplasma
	TcCLB.510339.50	891	296	33,033	5.08	Não	Citoplasma
<i>Trypanosoma cruzi marinkellei</i>	Tc_MARK_5885	891	296	33,085	4.88	Não	Citoplasma
	Tc_MARK_7312	891	296	33,084	4.97	Não	Citoplasma
<i>Trypanosoma grayi</i>	Tgr.197.1050	891	296	32,735	5.35	Não	Citoplasma
<i>Trypanosoma rangeli</i>	TRSC58_01873	891	296	32,998	5.88	Não	Citoplasma
<i>Trypanosoma brucei</i>	Tb927.9.7770	897	298	32,927	4.84	Não	Citoplasma
<i>Trypanosoma evansi</i>	TevSTIB805.9.5620	897	298	32,897	4.84	Não	Citoplasma
<i>Trypanosoma vivax</i>	TvY486_0903050	897	298	32,789	4.83	Não	Citoplasma
<i>Leishmania infantum</i>	LinJ.04.0570	903	300	32,927	5.01	Não	Citoplasma
<i>Leishmania major</i>	LnjF.04.0580	903	300	32,884	5.01	Não	Citoplasma
<i>Leishmania braziliensis</i>	LBRM2903_040011400	903	300	33,233	5.05	Não	Citoplasma
<i>Leishmania tarentolae</i>	LtaP04.0570	900	299	32,633	4.79	Não	Citoplasma
<i>Crithidia fasciculata</i>	CFAC1_030014700	903	300	32,878	4.74	Não	Citoplasma

Organismo	Nº de acesso	pb	aa	PM (Da)	p.I	Peptídeo sinal	Citocalização
<i>Leptomonas seymouri</i>	Lsey_0469_0020	903	300	32,986	4.84	Não	Citoplasma
<i>Endotrypanum monterogeii</i>	EMOLV88_040010500	903	300	33,236	4.63	Não	Citoplasma
<i>Angomonas deanei</i>	EPY28083	903	300	33,590	5.28	Não	Citoplasma
<i>Strigomonas culicis</i>	EPY35590	933	310	34,587	5.22	Não	Citoplasma
	EPY27711	933	310	34,587	5.22	Não	Citoplasma
	EPY26094	765	254	27,670	6.58	Não	Citoplasma
<i>Phytomonas sp.</i>	CCW64838	915	304	33,466	4.85	Não	Citoplasma
<i>Bodo saltans</i>	CUG52569	897	298	32,985	5.13	Não	Citoplasma

* Sequências Idênticas; ¹ Ip; iPSORT; ² TargetP; ³ Mitoprot; ⁴ ESLPred2; ^{Ph} Phobius; ^{Pr} PrediSi; ^{Sp} SignalP.

Embora todas as espécies analisadas apresentem capacidade de sintetizar espermidina, esse processo só é possível a partir da manutenção dos níveis de putrescina que, por sua vez, podem ser mantidos por biossíntese ou por captação do meio extracelular (LANDFEAR, 2011). Alguns kinetoplastídeos como *Leishmania* sp. podem tanto sintetizar como importar putrescina (HASNE; ULLMAN, 2005), enquanto *T. brucei* é completamente dependente da biossíntese desta poliamina (HEBY; ROBERTS; ULLMAN, 2003). Por sua vez, a biossíntese da putrescina está relacionada à presença da enzima ornitina descarboxilase (ODC). Assim como *T. cruzi*, *T. grayi* e *T. rangeli* não possuem a enzima ODC (STOCO et al., 2014) e, portanto, são totalmente dependentes do processo de captação do meio extracelular (HASNE et al., 2010) (Tabela 8 e Figura 8). Nas espécies de kinetoplastídeos onde a ODC está presente, apresenta-se como gene de cópia única e com citolocalização predita como citosólica.

Na figura 7 a análise filogenética do gene da ODC demonstra uma separação das espécies de tripanosomas das outras espécies de tripanosomatídeos, como *Leishmania* sp., *E. monterogeii*, *C. fasciculata* e *L. seymouri*. *Phytomonas* sp. e *A. deanei* apresentaram-se em um clado distinto dos demais tripanosomatídeos.

A baixa identidade entre as sequências aminoacídicas de *Trypanosoma* spp. e as outras espécies de kinetoplastídeos (~35%) confirma a hipótese que o gene da ODC tenha sido perdido na linhagem de *Trypanosoma* spp. e, com o passar do tempo nova cópia foi adquirida dos hospedeiros vertebrados por tripanosomas africanos, como sugerem Steglich e Schaeffer (2006). Entretanto, cabe observar que *T. grayi* não adquiriu nova cópia do gene ODC e a ausência desta enzima no tripanosoma de crocodilos sugere que a transferência gênica ocorreu a partir de hospedeiros mamíferos, quando da infecção nesse grupo de animais por um tripanosoma africano ancestral.

A ausência de ODC em *S. culicis* foi avaliada por Alves e colaboradores (2013). Em parasitos monoxênicos, o endosimbionte permite a conversão de agmatina em putrescina. A enzima responsável pela síntese de agmatina é a arginina descarboxilase e encontra-se ausente em todos os tripanosomatídeos, enquanto está presente no genoma de *S. culicis* e *A. deanei*, completando assim a rota biossintética da putrescina (ALVES et al., 2013).

Tabela 8: Características gerais dos genes da Ornitina Descarboxilase (ODC) em diferentes espécies de Kinetoplastídeos.

Organismo	Nº de acesso	pb	aa	PM (Da)	p.I	Pepídeo Sinal	Citocalização	Observação
<i>Trypanosoma cruzi</i> (Esm.)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trypanosoma cruzi</i> (Não Esm.)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trypanosoma cruzi marinkellei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trypanosoma grayi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trypanosoma rangeli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trypanosoma brucei</i>	Tb927.11.13730	1,272	423	46,883	5.46	Não	Citoplasma	-
<i>Trypanosoma evansi</i>	TevSTIB805.11_01.14180	1,338	445	49,177	5,66	Não	Citoplasma	-
<i>Trypanosoma vivax</i>	TvY486_1114550	1,317	438	46,973	4,98	Não	Citoplasma	-
<i>Leishmania infantum</i>	LinJ.12.0100	2,124	707	77,319	5.16	Não	Citoplasma	-
<i>Leishmania major</i>	LmjF.12.0280	2,124	707	77,261	5.81	Não	Citoplasma	-
<i>Leishmania braziliensis</i>	LBRM2903_120008000	2,043	680	74,574	5.89	Não	Citoplasma	-
<i>Leishmania tarentolae</i>	LtaP12.0300	2,199	732	79,721	5.15	Não	Citoplasma	-
<i>Crithidia fasciculata</i>	CFAC1_010008700	2,166	721	78,832	5.23	Não	Citoplasma	-
<i>Leptomonas seymouri</i>	Lsey_0084_0030	2,169	722	78,710	5.22	Não	Citoplasma	-

Organismo	Nº de acesso	pb	aa	PM (Da)	p.I	Pepídeo Sinal	Citocalização	Observação
<i>Endotrypanum monterogeii</i>	EMOLV88_120007700	2,112	703	77,645	5.9	Não	Citoplasma	-
<i>Angomonas deanei</i>	EPY29830	1,674	557	62,123	5.18	Não	Citoplasma	-
<i>Strigomonas culicis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phytomonas sp.</i>	CCW72308	1,065	354	37,563	4.69	Não	Citoplasma	N-terminal Incompleta
<i>Bodo saltans</i>	CUG91552	1,584	527	58,016	5.67	Não	Citoplasma	-

* Sequências Idênticas; ¹: IPIPSORT; ²: TargetP; ³: Mitoprot; ⁴: ESLPred2; ^{Ph}: Phobius; ^{Pr}: PrediSi; ^{Sp}: SignalP.

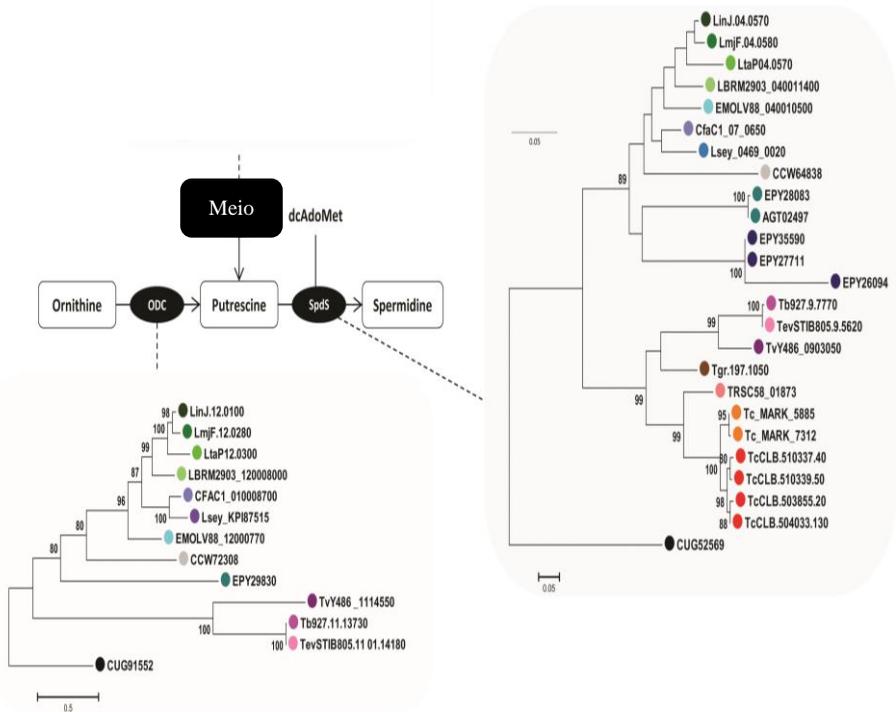


Figura 7: Análise filogenética molecular das sequências de aminoácidos das enzimas de kinetoplastídeos relacionadas as vias de biossíntese de espermidina. O alinhamento das sequências aminoacídicas foi feito a partir do programa Clustal Omega e a história evolutiva inferida pelo método da Máxima Verossimilhança usando o programa MEGA versão 6.0. A filogenia do gene ODC foi construídas utilizando o modelo de substituição de aminoácidos JTT+G e para a SpdS o modelo WAG+G. As árvores estão desenhadas em escala, com o tamanho dos ramos relacionado ao número de substituições por sítio. As análises envolveram 13 sequências para ODC e 24 para SpdS. Valores de bootstrap acima de 80 são mostradas junto aos ramos, correspondendo a porcentagem de árvores nas quais a associação das espécies observada se manteve como indicada (1000 replicatas). As sequências anotadas dos Kinetoplastídeos foram retiradas do TriTrypDB ou NCBI e o número de acesso estão inclusos. * Sequências idênticas identificadas; ● *T. cruzi* (Esm. e Non Esm.); ● *T. cruzi marinkellei*; ● *T. grayi*; ● *T. rangeli*; ● *T. brucei*; ● *T. evansi*; ● *T. vivax*; ● *L. infantum*; ● *L. major*; ● *L. braziliensis*; ● *L. tarentolae*; ● *C. fasciculata*; ● *L. seymouri*; ● *E. monterogeii*; ● *A. deanei*; ● *S. culicis*; ● *Phytomonas* sp.; ● *B. saltans*.

4.3.2 Síntese e redução da Tripanotiona

4.3.2.1 Síntese

Protozoários da Ordem Kinetoplastida apresentam a capacidade de conjugar duas moléculas de glutathiona a uma de espermidina para formar tripanotiona através de uma reação ATP dependente (WANG; BALLATORI, 1998; OZA et al., 2002). Em geral esta reação pode ser catalisada em seus dois passos pela enzima tripanotiona sintetase (TS) ou pela subsequente ação da glutathionilespermidina sintase (GspS) e tripanotiona sintetase (TS).

Em protozoários como *C. fasciculata*, *T. brucei* (COMINI et al., 2005), *T. cruzi* (OZA et al., 2002) e *L. major* (OZA et al., 2003; 2005) a TS é a única enzima utilizada para a síntese T(SH)₂. Flohé (2012) sugere que, por suas funções, esta é a enzima com maior potencial terapêutico de todas as enzimas do sistema tripanotiona já investigadas.

TS e GspS exibem atividade sintetase e amidase (SMITH et al., 1992; OZA et al., 2002), devido a presença de dois domínios distintos. O domínio presente na região N terminal corresponde a atividade amidase e apresenta cisteína e histidina – aminohidrolase/peptidase dependente (CHAP - *cysteine, histidine – dependent amidohydrolases/peptidases*) (pfam05257) (BATEMAN; RAWLINGS, 2003). Na região C-terminal encontra-se o domínio relacionado a função sintetase, similar ao ATP-grasp tipo 2 (CP-ATP-grasp2 - *Circularly permuted ATP-grasp type 2*) (pfam03738).

O domínio C-terminal é responsável por catalisar a adição de duas moléculas de glutathiona (GSH) a espermidina com a hidrólise de dois ATPs. Já o domínio N-terminal é capaz de hidrolisar o composto glutathionilespermidina para gerar espermidina e glutathiona (SOUSA et al., 2014). Esta característica da enzima TS também é citada por Leroux e colaboradores (2013), a qual pode catalisar cinco diferentes reações: hidrólise de ATP e formação da glutathionilespermidina (Gsp) e da tripanotiona (T(SH)₂), bem como realizar a hidrólise dos conjugados para gerar os tióis glutathiona (GSH) e espermidina (Spd).

Tem sido sugerido que as funções biossintéticas e hidrolíticas, aparentemente contrárias, desta enzima podem possibilitar ao parasita responder às flutuações celulares de T [SH]₂ e poliaminas, essencial para a proliferação e diferenciação do mesmo. A essencialidade da TS em *T. brucei* foi caracterizada a partir do silenciamento gênico utilizando-se

RNA de interferência (ARIYANAYAGAM et al., 2005; COMINI et al., 2005).

Ao contrário da GspP, a qual não foi identificada na grande maioria das espécies analisadas, incluindo o *T. rangeli*, sequências codificantes de cópia única de TS foram encontradas em todos os tripanosomatídeos analisados, à exceção a *A. deanei* e *S. culicis* (Tabela 9).

Em *T. rangeli*, assim como nas outras espécies analisadas, as sequências anotadas como TS e confirmadas pela presença dos domínios amidase/sintetase foram preditas como sendo citosólicas. Da mesma forma, Equbal e colaboradores (2014) identificaram a TS em *L. donovani* como sendo um gene de cópia única e exclusivamente citosólica. A presença de TS em *T. brucei*, *T. cruzi*, *L. major* e *L. donovani* como uma proteína monomérica com ~74 kDa foi descrita por Fyfe e colaboradores (2008).

Os genes da GspS foram perdidos na grande maioria das espécies, incluindo *T. rangeli*, *T. evansi*, *T. vivax*, *T. brucei* e *Phytomonas* spp. Pseudogenes de GspS foram identificados em três das quatro espécies de *Leishmania* analisadas, sendo que somente em *L. infantum* apresenta sequência gênica completa (Tabela 10). Embora os domínios característicos tenham sido preditos em ambos os genes, GspS e TS, refletindo a alta similaridade entre as sequências, foi possível separar de forma clara tripanosomas de outros tripanosomatídeos nos dendogramas construídos (Figura 8).

A presença de TS em todos os tripanosomatídeos e a perda da GspS em algumas espécies foi sugerida por Manta e colaboradores (2013). A hipótese defendida por esses autores era a da transferência primária de um endossimbionte com consequente duplicação gênica e geração da GspS e TS. Depois disso, algumas espécies teriam perdido o gene GspS e retido uma única cópia do gene da TS.

Dois outros grupos de sequências estão anotadas junto aos bancos de dados do genoma como tripanotiona sintetase *putative* ou tripanotiona sintetase-like *putative*. Entretanto, nestas sequências foram identificados apenas o domínio amidase CHAP na região N terminal, sendo portanto nomeadas aqui como CHAP1 e CHAP2 (Tabelas 11 e 12 e Figura 8).

O domínio CHAP apresenta-se basicamente na mesma posição em todas as sequências analisadas (TryS, GspS, CHAP1 e CHAP2). As diferenças entre CHAP1 e CHAP2 são relacionadas ao tamanho total das proteínas (CHAP1 tem \pm 250 aa e CHAP2 \pm 650 aa) e a presença de sequência de endereçamento mitocondrial nas sequências denominadas CHAP1. A presença de TS na mitocôndria sugeriria a capacidade desta

organela em sintetizar a T(SH)₂, o que não foi observado por Oza e colaboradores (2005) e Tomas e Castro (2013).

Outra diferença digna de nota é a presença da sequência codificante CHAP1 em todas as espécies analisadas (exceto *Phytomonas* sp.), em contraste com a ausência do gene CHAP2 em *T. brucei*, *T. evansi*, *L. braziliensis* e *Phytomonas* sp. (Tabela 11 e 12) Assim sendo, a possível função da atividade amidase em GspS/TS parece não ser clara e as possíveis funções das enzimas CHAP1 e CHAP2 no metabolismo da tripanotona ou em outra função precisa ser investigada.

Tabela 9: Características gerais dos genes da Tripanotiosa sintetase (TS) em diferentes espécies de Kinetoplastídeos.

Organismo	Nº de acesso	pb	aa	MW (Da)	p.I	Peptídeo Sinal	Citocalização
<i>Trypanosoma cruzi</i> (Esm.)	TcCLB.509099.50	1,944	647	73,567	5.26	Não	Citoplasma
<i>Trypanosoma cruzi</i> (Non Esm.)	TcCLB.509319.90	1,944	647	73,459	5.18	Não	Citoplasma
<i>Trypanosoma cruzi marinkellei</i>	Tc_MARK_9669	1,179	392	44,843	5.1	Não	Citoplasma
<i>Trypanosoma grayi</i>	Tgr.56.1010	1,962	653	74,463	5.93	Não	Citoplasma
<i>Trypanosoma rangeli</i>	TRSC58_01995	1,935	644	72,783	5.6	Não	Citoplasma
<i>Trypanosoma brucei</i>	Tb927.2.4370	1,884	627	71,614	6.06	Não	Citoplasma
	Tb11.v5.0653	1,536	511	58,626	5.49	Não	Citoplasma
<i>Trypanosoma evansi</i>	TevSTIB805.2.2260	1,884	627	71,644	6.06	Não	Citoplasma
<i>Trypanosoma vivax</i>	TvY486_0201160	1,821	607	69,420	6.39	Não	Citoplasma
<i>Leishmania infantum</i>	LinJ.27.1770	1,959	652	74,230	5.7	Não	Citoplasma
<i>Leishmania major</i>	LmjF.27.1870	1,959	652	74,435	5.52	Não	Citoplasma
<i>Leishmania braziliensis</i>	LBRM2903_270026600	1,959	652	74,356	4.99	Não	Citoplasma
<i>Leishmania tarentolae</i>	LtaP27.1940	1,959	652	74,539	5.77	Não	Citoplasma
<i>Crithidia fasciculata</i>	CFAC1_210035400	1,959	652	74,489	4.88	Não	Citoplasma
<i>Leptomonas seymouri</i>	Lsey_0126_0130	1,959	652	74,654	4.85	Não	Citoplasma
<i>Endotrypanum monterogeii</i>	EMOLV88_270023300	1,962	653	74,397	5.48	Não	Citoplasma

Organismo	Nº de acesso	pb	aa	MW (Da)	p.I	Peptídeo Sinal	Citocalização
<i>Angomonas deanei</i>	EPY34052 *	1,971	656	75,341	4.9	Não	Citoplasma
	EPY38556 *	1,971	656	75,341	4.9	Não	Citoplasma
	EPY38422 *	1,971	656	75,341	4.9	Não	Citoplasma
	EPY36386	1,455	484	55,962	4.91	Não	Citoplasma
<i>Strigomonas culicis</i>	EPY29994 *	2,283	760	86,307	5.24	Não	Citoplasma
	EPY27835 *	2,283	760	86,307	5.24	Não	Citoplasma
	EPY29618	1,986	661	74,823	4.9	Não	Citoplasma
<i>Phytomonas sp.</i>	CCW63656	1,950	649	74,063	5.31	Não	Citoplasma
<i>Bodo saltans</i>	CUG92365	1,923	640	71,770	5.19	Não	Citoplasma

* Sequências Idênticas; ¹:^{lp}iPSORT; ²TargetP; ³Mitoprot; ⁴ESLPred2; ^{Ph}Phobius; ^{Pr}PrediSi; ^{Sp}SignalP.

Tabela 10: Características gerais dos genes da Glutationaespermidina Sintase (GspS) em diferentes espécies de Kinetoplastídeos.

Organismo	Nº de acesso	pb	aa	MW (Da)	p.I	Peptídeo Sinal	Citocalização	Observação
<i>Trypanosoma cruzi</i> (Esm.)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trypanosoma cruzi</i> (Non Esm.)	TcCLB.508479.110	2,160	719	81,019	6.01	Não	Citoplasma	-
<i>Trypanosoma cruzi marinkellei</i>	Tc_MARK_5128	2,160	719	81,670	6.01	Não	Citoplasma	-
<i>Trypanosoma grayi</i>	Tgr.369.1080	2,199	732	82,169	5.49	Não	Citoplasma	-
<i>Trypanosoma rangeli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trypanosoma brucei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trypanosoma evansi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trypanosoma vivax</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Leishmania infantum</i>	LinJ.25.2500	2,160	719	80,720	5.56	Não	Citoplasma	-
<i>Leishmania major</i>	LmjF.25.2380	-	-	-	-	-	-	Pseudogene
<i>Leishmania braziliensis</i>	LBRM2903_250033200	-	-	-	-	-	-	Pseudogene
<i>Leishmania tarentolae</i>	LtaP25.2530	-	-	-	-	-	-	Pseudogene
<i>Crithidia fasciculata</i>	CFAC1_230008300	2,160	719	80,321	4.94	Não	Citoplasma	-
<i>Leptomonas seymouri</i>	Lsey_0121_0070	2,160	719	80,745	5.25	Não	Citoplasma	-
<i>Endotrypanum monterogeii</i>	EMOLV88_250029700	2,160	719	80,641	5.31	Não	Citoplasma	-
<i>Angomonas deanei</i>	EPY43680	2,142	713	79,923	5.09	Não	Citoplasma	-

Organismo	Nº de acesso	pb	aa	MW (Da)	p.I	Peptídeo Sinal	Citocalização	Observação
<i>Angomonas deanei</i>	EPY32029	1,668	555	62,452	5.01	Não	Citoplasma	-
<i>Strigomonas culicis</i>	EPY37109	2,196	731	82,525	5.26	Não	Citoplasma	-
	EPY31990	2,196	731	82,620	5.26	Não	Citoplasma	-
	EPY27864	2,376	791	89,572	5.41	Sim ^{Ph:lp}	Via de secreção _{2;4}	-
<i>Phytomonas sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bodo saltans</i>	CUG44379	2,637	878	97,363	6.51	Não	Citoplasma	-

* Sequências Idênticas; ¹: lp; ²TargetP; ³Mitoprot; ⁴ESLPred2; ^{Ph}Phobius; ^{Pr}PrediSi; ^{Sp}SignalP.

Tabela 11: Características gerais dos genes que apresentam apenas o domínio CHAP1 em diferentes espécies de Kinetoplastídeos.

Organismo	Nº de acesso	pb	aa	PM (Da)	p.I	Peptíde o Sinal	Sequência PS	Citocalização
<i>Trypanosoma cruzi</i> (Esm.)	TcCLB.504427.10	711	236	27,253	8.01	Não	-	Mitocondrial ^{1;3}
<i>Trypanosoma cruzi</i> (Non Esm.)	TcCLB.509331.134	711	236	27,159	8	Não	-	Mitocondrial ^{1;3}
<i>Trypanosoma cruzi marinkellei</i>	Tc_MARK_9312	759	252	29,264	8.55	Não	-	Citoplasma
<i>Trypanosoma grayi</i>	Tgr.139.1010	702	233	26,450	7.13	Não	-	Citoplasma
<i>Trypanosoma rangeli</i>	TRSC58_03866	720	239	27,031	7.98	Não	-	Citoplasma
<i>Trypanosoma brucei</i>	TB927.8.2410*	714	237	26,885	7.45	Não	-	Citoplasma
<i>Trypanosoma evansi</i>	TevSTIB805.8.2350	714	237	26,829	7.45	Não	-	Citoplasma
<i>Trypanosoma vivax</i>	TvY486_0801870	714	237	26,615	8.32	Não	-	Citoplasma
<i>Leishmania infantum</i>	LinJ.23.0500	978	325	36,023	9.12	Não	-	Citoplasma
<i>Leishmania major</i>	LmjF.23.0460	798	265	29,292	9.07	Não	-	Citoplasma
<i>Leishmania braziliensis</i>	LBRM2903_230010800	762	253	28,416	8.62	Não	-	Mitocondrial ^{2;3}
<i>Leishmania tarentolae</i>	LtaP23.0540	1,146	381	42,160	9.71	Não	-	Mitocondrial ^{1;2;3}
<i>Crithidia fasciculata</i>	CFAC1_150012500	894	297	32,543	7.9	Não	-	Citoplasma
<i>Leptomonas seymouri</i>	Lsey_0354_0100	750	249	27,867	8.83	Não	-	Citoplasma

Organismo	Nº de acesso	pb	aa	PM (Da)	p.I	Peptídeo Sinal	Sequência PS	Citocalização
<i>Endotrypanum monterogeii</i>	EMOLV88_230009000	255	84	9,675	8.48	Não	-	Citoplasma
<i>Angomonas deanei</i>	EPY42305	675	224	26,204	8.38	Não	-	Via de secreção ^{2,4}
	EPY38174	585	194	22,693	8.19	Não	-	Citoplasma
<i>Strigomonas culicis</i>	EPY21260	732	243	28,413	8.46	Não	-	Mitocondrial ^{2,3}
<i>Phytomonas sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bodo saltans</i>	CUF51256	915	304	33,767	6.75	Sim ^{Ph:Sp}	MSLSSLAFLLSKLLS TGRQQ	Via de secreção ^{2,4}

* Sequências Idênticas; ¹: IPIPSORT; ²: TargetP; ³: Mitoprot; ⁴: ESLPred2; ^{Ph}: Phobius; ^{Pr}: PrediSi; ^{Sp}: SignalP.

Tabela 12: Características gerais dos genes que apresentam apenas o domínio CHAP2 em diferentes espécies de Kinetoplastídeos.

Organismo	Nº de acesso	pb	aa	MW (Da)	p.I	Peptídeo Sinal	Citocalização	Observação
<i>Trypanosoma cruzi</i> (Esm.)	TcCLB.504147.280	2,001	666	74,981	6,05	Não	Citoplasma	-
<i>Trypanosoma cruzi</i> (Non Esm.)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trypanosoma cruzi marinkellei</i>	Tc_MARK_2272	2,001	666	75,208	6,05	Não	Citoplasma	-
<i>Trypanosoma grayi</i>	Tgr.38.1020	2,001	666	75,208	6,05	Não	Citoplasma	-
<i>Trypanosoma rangeli</i>	TRSC58_02894	2,031	676	75,46	5,16	Não	Citoplasma	-

Organismo	Nº de acesso	pb	aa	MW (Da)	p.I	Peptídeo Sinal	Citlocalização	Observação
<i>Trypanosoma brucei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trypanosoma evansi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trypanosoma vivax</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Leishmania infantum</i>	LinJ.36.4510	2,250	749	82,639	6,04	Não	Citoplasma	-
<i>Leishmania major</i>	LmjF.36.4300	2,250	749	82,661	6,07	Não	Citoplasma	-
<i>Leishmania braziliensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Leishmania tarentolae</i>	LtaP05.0720	726	241	30,857	5,22	Não	Citoplasma	N-terminal Incompleta
	LtaP36.4440	2,259	752	83,247	5,37	Não	Citoplasma	-
<i>Crithidia fasciculata</i>	CFAC1_280048200	2,256	751	83,089	5,22	Não	Citoplasma	-
<i>Leptomonas seymouri</i>	Lsey_0050_0120	2,265	754	84,05	4,86	Não	Citoplasma	-
<i>Endotrypanum montergeii</i>	EMOLV88_360074300	2,232	743	81,88	5,7	Não	Citoplasma	-
<i>Angomonas deanei</i>	EPY43784	2,100	699	78,556	5.33	Não	Citoplasma	-
<i>Strigomonas culicis</i>	EPY27168	2,181	726	80,689	5.14	Não	Citoplasma	-
	EPY37184	2,181	726	80,673	5.14	Não	Citoplasma	-
<i>Phytomonas sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bodo saltans</i>	CUG92365	1,923	630	70,148	5.27	Não	Citoplasma	-

* Sequências Idênticas; ¹ IPIPSORT; ² TargetP; ³ Mitoprot; ⁴ ESLPred2; ^{Ph} Phobius; ^{Pr} PrediSi; ^{Sp} SignalP.

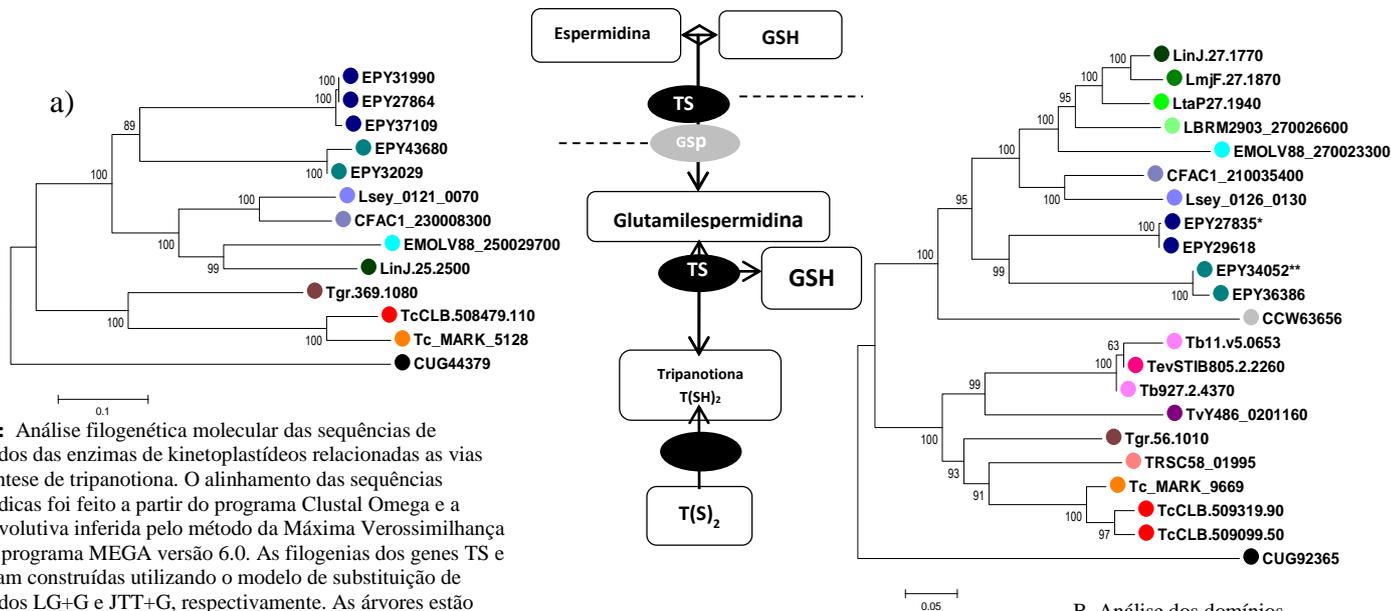
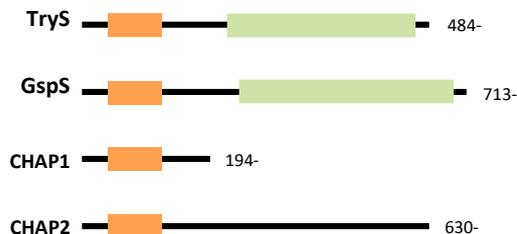


Figura 8: Análise filogenética molecular das seqüências de aminoácidos das enzimas de kinetoplastídeos relacionadas às vias de biossíntese de tripanotona. O alinhamento das seqüências aminoacídicas foi feito a partir do programa Clustal Omega e a história evolutiva inferida pelo método da Máxima Verossimilhança usando o programa MEGA versão 6.0. As filogenias dos genes TS e GspS foram construídas utilizando o modelo de substituição de aminoácidos LG+G e JTT+G, respectivamente. As árvores estão desenhadas em escala, com o tamanho dos ramos relacionados ao número de substituições por sítio. As análises envolveram 22 seqüências para TS e 16 para GspS. Valores de bootstrap maiores que 80 são mostradas junto aos ramos, correspondendo a porcentagem de árvores nas quais a associação das espécies observada se manteve como indicada (1000 replicatas). As seqüências anotadas dos Kinetoplastídeos foram retiradas do TriTrypDB ou NCBI e o número de acesso estão inclusos. * Seqüências idênticas identificadas; ● *T. cruzi* (Esm. e Non Esm.); ● *T. cruzi marinkellei*; ● *T. grayi*; ● *T. rangeli*; ● *T. brucei*; ● *T. evansi*; ● *T. vivax*; ● *L. infantum*; ● *L. major*; ● *L. braziliensis*; ● *L. tarentolae*; ● *C. fasciculata*; ● *L. seymouri*; ● *E. monterogeii*; ● *A. deanei*; ● *S. culicis*; ● *Phytomonas* sp.; ● *B. saltans*

B. Análise dos domínios conservados de seqüências anotadas como TryS nos bancos de dados dos genomas de kinetoplastídeos. Figuras estão em escala e representam o tamanho médio das proteínas preditas entre as espécies. Números a direita representam o menor e o maior tamanho de cada gene.



4.3.2.2 Redução

Após a síntese, a tripanotiona é mantida em seu estado reduzido ($T(SH)_2$) pela flavoenzima NADPH-dependente tripanotiona redutase (TRed). Esta enzima é um homodímero com dois sítios ativos, importante no controle do ciclo redox, sendo comum a todos os tripanosomatídeos parasitos (Tabela 13). Ainda que a TRed tenha sido indicada como essencial aos tripanosomatídeos, sendo relacionada à virulência e à capacidade de resistência ao estresse oxidativo, apenas uma cópia deste gene foi encontrado no genoma das espécies analisadas (Tabela 2 e 13), (TAYLOR et al., 1994; KRIEGER et al., 2000, PIACENZA et al., 2009). As espécies que albergam endossimbiontes, *A. deanei* e *S. culicis*, foram as exceções em relação ao número de cópias do gene TRed possuindo, respectivamente, três e duas cópias.

Foram identificados dois domínios característicos nas sequências de TRed: Pyr Redox (*Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductases*) relacionado a ação oxidoreductase e Pyr Redox *dimerization*, o qual permite a formação da estrutura dimérica essencial para sua atividade. Todas as espécies possuem os dois domínios nas suas sequências de TRed, entretanto, em espécies com múltiplas cópias, foi possível identificar nas cópias extras a presença de apenas um dos dois domínios requeridos para a atividade (Pyr Redox *dimerization*).

A tripanotiona redutase mostrou-se altamente conservada em tamanho e sequência nos diferentes tripanosomatídeos analisados, corroborando com dados da literatura (SULLIVAN; WALSH, 1991; MITTAL et al., 2005; CASTRO-PINTO et al., 2008).

A análise filogenética (Figura 9) permite a observação a separação de dois grupos com altos valores de *bootstrap*, um deles contendo exclusivamente as espécies do gênero *Trypanosoma*.

Tabela 13: Características gerais dos genes da Tripanotiona redutase (TRed) em diferentes espécies de Kinetoplastídeos.

Organismo	Nº de acesso	pb	aa	PM (Da)	p.I	Peptídeo Sinal	Sequência PS	Citocalização	Observação
<i>Trypanosoma cruzi</i> (Esm.)	TcCLB.504507.5	1,164	388	42,540	6.41	Não	-	Citoplasma	Sem pfam02852 – domínio de dimerização
<i>Trypanosoma cruzi</i> (Non Esm.)	TcCLB.503555.30	1,479	492	53,870	6.85	Não	-	Citoplasma	-
<i>Trypanosoma cruzi marinkellei</i>	Tc_MARK_3549	1,479	492	64,282	7.1	Sim ^{Ph:lp}	MMSKIFDLV VIGAGSGGL EAAWNAAT LYKK	Citoplasma	-
<i>Trypanosoma grayi</i>	Tgr.67.1140	1,479	492	53,333	6.74	Não	-	Citoplasma	-
<i>Trypanosoma rangeli</i>	TRSC58_02517	1,473	490	53,575	6.33	Não	-	Citoplasma	-
<i>Trypanosoma brucei</i>	Tb927_10_10390	1,479	492	53,157	6.68	Não	-	Citoplasma	-
<i>Trypanosoma evansi</i>	TevSTIB805.10.10980	1,479	492	53,157	6.68	Não	-	Citoplasma	-
<i>Trypanosoma vivax</i>	TvY486_1010290	1,479	492	53,805	7.02	Não	-	Citoplasma	-
<i>Leishmania infantum</i>	LinJ.05.0350	1,476	491	53,027	6.2	Não	-	Citoplasma	-
<i>Leishmania major</i>	LmjF.05.0350	1,476	491	53,145	6.1	Não	-	Citoplasma	-
<i>Leishmania braziliensis</i>	LBRM2903_050008500	1,476	491	53,266	6.82	Não	-	Citoplasma	-
<i>Leishmania tarentolae</i>	LtaP05.0360	1,476	491	53,107	5.66	Não	-	Citoplasma	-

Organismo	Nº de acesso	pb	aa	PM (Da)	p.I	Peptídeo Sinal	Sequência PS	Citocalização	Observação
<i>Crithidia fasciculata</i>	CFAC1_020010000	1,476	491	53,244	6.03	Não	-	Citoplasma	-
<i>Leptomonas seymouri</i>	Lsey_0286_0030	1,476	491	53,132	6.51	Não	-	Citoplasma	-
<i>Endotrypanum monterogei</i>	EMOLV88_050008100	1,476	491	53,318	6.2	Não	-	Citoplasma	-
<i>Angomonas deanei</i>	EPY41297	1,473	489	53,025	6.09	Não	-	Citoplasma	-
	EPY40572	1,413	471	50,900	5.99	Não	-	Citoplasma	-
	EPY27277	1,125	374	40,146	6.08	Não	-	Citoplasma	Sem pfam02852 – domínio de dimerização
<i>Strigomonas culicis</i>	EPY21381	1,476	491	52,906	6	Não	-	Citoplasma	-
	EPY27840	633	210	22,555	6.95	Não	-	Citoplasma	Sem pfam00070- domínio de ligação NADH
<i>Phytomonas sp.</i>	CCW64445	1,476	491	53,177	6.11	Não	-	Citoplasma	-
<i>Bodo saltans</i>	CUG84655	1,485	494	53,325	5.76	Não	-	Citoplasma	-

* Sequências Idênticas; ¹lp|PSORT; ²TargetP; ³Mitoprot; ⁴ESLPred2; ^{Ph}Phobius; ^{Pr}PrediSi; ^{Sp}SignalP.

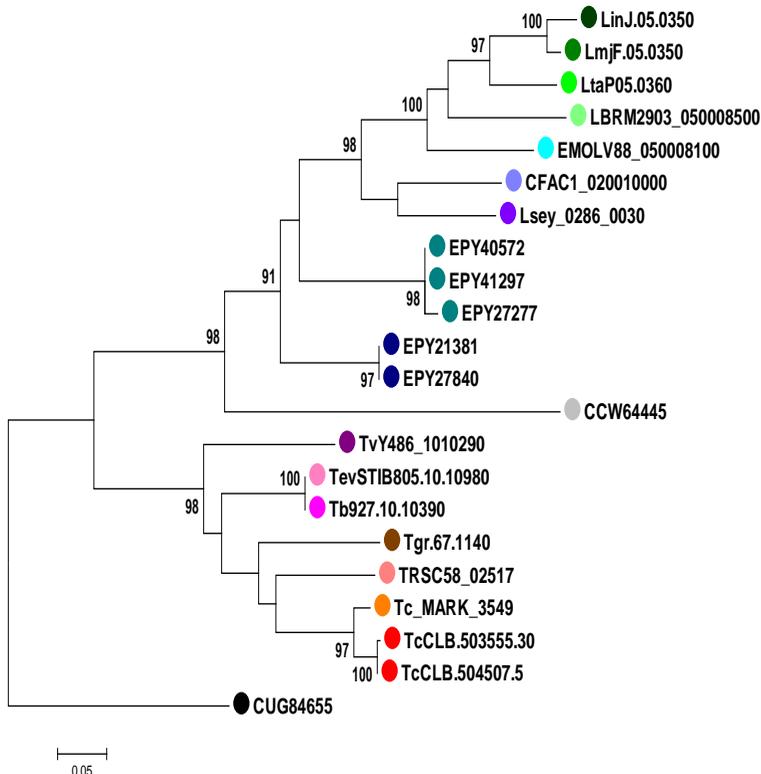


Figura 9: Análise filogenética molecular da proteína Tripanotiona reductase (TRed) em Kinetoplastídeos. O alinhamento das sequências aminoacídicas foi feito a partir do programa Clustal Omega e a história evolutiva inferida pelo método da Máxima Verossimilhança usando o programa MEGA versão 6.0. A filogenia da TRed foi construída utilizando o modelo de substituição de aminoácidos LG+G. A árvore está desenhada em escala, com o tamanho dos ramos relacionados ao número de substituições por sítio. A análise envolveu 22 sequências aminoacídicas. Valores de bootstrap maiores que 80 são mostradas junto aos ramos, correspondendo a porcentagem de árvores nas quais a associação das espécies observada se manteve como indicada (1000 replicatas). As sequências anotadas dos Kinetoplastídeos foram retiradas do TriTrypDB ou NCBI e o número de acesso estão inclusos. ● *T. cruzi* (Esm. e Non Esm.); ● *T. cruzi marinkellei*; ● *T. grayi*; ● *T. rangeli*; ● *T. brucei*; ● *T. evansi*; ● *T. vivax*; ● *L. infantum*; ● *L. major*; ● *L. braziliensis*; ● *L. tarentolae*; ● *C. fasciculata*; ● *L. seymouri*; ● *E. monterogeii*; ● *A. deanei*; ● *S. culicis*; ● *Phytomonas* sp.; ● *B. saltans*.

4.3.3 Peroxidasas

De acordo com Peloso e colaboradores (2012), cinco peroxidases foram identificadas em *T. cruzi*, sendo duas peroxidoredoxinas (PXs) - uma triparedoxina peroxidase citosólica (*TcTRPx*cit) e uma triparedoxina peroxidase mitocondrial (*TcTRPx*mit), as quais detoxificam eficientemente o H_2O_2 , hidroperóxidos de cadeia curta (WILKINSON et al., 2000) e peroxinitrito (PIACENZA et al., 2008); duas glutatonas peroxidases não dependentes de selênio (GPxI no citosol e glicossoma e GPxII no retículo endoplasmático) que conferem resistência a hidroperóxidos de fosfolipídios e ácidos graxos (WILKINSON et al., 2002a; 2002b) e uma hemoperoxidase dependente de ascorbato (APX) no retículo endoplasmático que degrada H_2O_2 (WILKINSON et al., 2003). A presença destas peroxidases, entretanto, não é exclusividade de *T. cruzi*, já tendo sido identificadas em vários outros kinetoplastídeos. As diferenças de atividade entre espécies podem estar relacionadas a afinidade destas enzimas por diferentes substratos e variações na sua localização celular (CASTRO; TOMAS, 2008).

4.3.3.1 Triparedoxina Peroxidase (TRPx)

As enzimas triparedoxinas peroxidases (TRPx) pertencem à família das proteínas peroxidoredoxinas cuja função de detoxificação de células nos organismos é aliada às funções de sinalização para proliferação ou processos de diferenciação celular (LEVICK et al., 1998; PIACENZA et al., 2009b). As triparedoxinas peroxidases são consideradas as mais importantes das enzimas envolvidas na detoxificação de peróxidos (TURRENS, 2004; TRUJILLO et al., 2004). As TRPx utilizam o tiol triparedoxina (TPX) (homólogo à tioredoxina) como doador de elétrons na redução de substratos como o H_2O_2 , hidroperóxidos de cadeia curta (WILKSON et al., 2000) e peroxinitrito (PIACENZA et al., 2008).

Neste estudo foram analisadas as duas isoformas dessa enzima que se diferenciam pela localização sub-celular, sendo uma citosólica (TRPxcit) e a outra mitocondrial (TRPxmit). Apresentam-se com número de cópias variável de suas isoformas no genoma em cada uma das espécies analisadas conforme tabela 14.

Todas as sequências preditas como mitocondriais apresentaram aproximadamente 30 aminoácidos na porção N-terminal a mais que as sequências preditas como citoplasmáticas. Esta sequência corresponde a

uma sequência de endereçamento mitocondrial e difere de sequências de peptídeo sinal (GAVEL; NILSSON; VON HEIJNE, 1988; MENEZES-NETO, 2012).

A ocorrência da TRPxcit e da TRPxmit reforça a necessidade celular de proteger-se contra a toxidade gerada pelas EROs e ERNs endógenas e exógenas. As tabelas 2 e 14 demonstram que ambas as isoformas foram encontradas na maioria dos kinetoplastídeos analisados, exceto em *L. seymouri* e *T. cruzi marinkellei* que não apresentaram a isoforma de predição citosólica. Os genes que codificam para a isoforma citosólica, quando presentes, são multicópia, enquanto que para a maioria das espécies, à exceção para *T. rangeli*, *A. deanei* e *S. culicis*, a TRPXmit apresenta-se como cópia única (Tabela 14 e Figura 10). Esta configuração em relação ao número de cópias no genoma das diferentes isoformas da TRPx já havia sido citada por Castro e Tomás (2008) que concluíram que as peroxiredoxinas mitocondriais são codificadas por genes de cópia única enquanto a forma citosólica pode formar agrupamentos (*arrays*) com genes fortemente relacionados dentro do mesmo *locus* cromossômico.

Tabela 14: Características gerais dos genes da Triparedoxina peroxidase (TRPx) em diferentes espécies de Kinetoplastídeos.

Organismo	Nº de acesso	Isoforma	pb	aa	PM (Da)	p.I	Peptídeo Sinal	Sequência Peptídeo Sinal	Citocalização
<i>Trypanosoma cruzi</i> (Esm.)	TcCLB.509775.40	A	702	233	26,140	8.85	Não	-	Mitocondrial ^{1;2;3}
	TcCLBEs.511737.3	B	372	123	13,863	5.1	Não	-	Citoplasma
	TcCLB.507039.10	B1	342	113	12,733	6.24	Não	-	Citoplasma
	TcCLB.511715.10	B2	624	207	23,354	7.65	Não	-	Citoplasma
	TcCLB.511545.120	C	909	302	35,549	7.65	Sim ^{Ph/Ip}	MRRSAFSTGVVPAI AATLSPAALQA	Mitocondrial ^{2;3;4}
	TcCLB.511735.60	D	1,035	344	29,644	8.58	Não	-	Citoplasma
<i>Trypanosoma cruzi</i> (Non Esm.)	TcCLB.507061.30	A	702	233	26,202	8.85	Não	-	Mitocondrial ^{1;2;3;4}
	TcCLB.508445.20	B1	624	207	23,354	7.25	Não	-	Citoplasma
	TcCLB.511019.90	B2	588	195	21,906	7.19	Não	-	Citoplasma
	TcCLB.506819.30	C	909	302	35,627	7.37	Sim ^{Ph/Ip}	MRRSAFSTGVVPAI AAILSPA	Mitocondrial ^{2;3/} Via de secreção ^{1;4}
	TcCLB.511521.30	D	1,038	345	38,947	8.41	Não	-	Citoplasma
<i>Trypanosoma cruzi marinkellei</i>	Tc_MARK_8923	A	702	233	26,177	8.59	Não	-	Mitocondrial ^{1;2;3;4}
	Tc_MARK_3418	C	909	302	35,582	7.37	Sim ^{Ph/Ip}	MRRSAFSTGAVPAI AATVSPAALQA	Mitocondrial ^{2;3;4}
	Tc_MARK_2024	D	924	307	34,320	8.48	Não	-	Mitocondrial ^{1;2;3;4}
<i>Trypanosoma grayi</i>	Tgr.136.1010	A	708	235	26,143	8.7	Sim ^{Ph/Pr/Ip}	MLRRAAAAAGLCA ATRGVAlM	Mitocondrial ^{2;3;4}
	Tgr.28.1260	B1	624	207	23,537	8.74	Não	-	Citoplasma

Organismo	Nº de acesso	Isoforma	pb	aa	PM (Da)	p.I	Peptídeo Sinal	Sequência Peptídeo Sinal	Citocalização
	Tgr.305.1070	B2	342	113	12,667	7.04	Não	-	Citoplasma
	Tgr.311.1030	C	918	305	35,790	7.63	Sim ^{Ph/Pr/Ip}	MRRSAFSTSVLPAA AAAATTA	Mitocondrial ^{2;3;4}
	Tgr.27.1060	D	801	266	29,536	7.61	Não	-	Mitocondrial ^{2;3;4}
<i>Trypanosoma rangeli</i>	TRangeli_25:95659_96299	A	684	227	25,615	8.46	Não	-	Citoplasma
	TRSC58_05576	B	588	195	22,035	7.3	Não	-	Citoplasma
	TRSC58_00796	C	912	303	35,536	7.37	Não	-	Mitocondrial ^{2;3}
	TRSC58_02831	D	801	266	30,265	8.3	Não	-	Mitocondrial ^{2;3}
<i>Trypanosoma brucei</i>	Tb927_5_3350	A	717	238	26,824	8.36	Não	-	Mitocondrial ^{2;3}
	Tb927_11_15910	B1	597	198	22,048	6.07	Não	-	Citoplasma
	Tb927_11_15020	B2	627	208	23,280	7.32	Não	-	Citoplasma
	Tb927_11_15820	C	930	309	36,048	6.94	Sim ^{Ph/Ip}	MRRVASFAGTIPLV SLVKG	Mitocondrial ^{2;3/} Via de secreção ^{1;4}
	Tb927_6_4030	D	792	263	29,653	7.05	Não	-	Mitocondrial ^{1;2;3}
<i>Trypanosoma evansi</i>	TevSTIB805.5.3850	A	717	238	26,874	8.76	Não	-	Mitocondrial ^{1;2;3}
	TevSTIB805.11_01.15550	B	627	208	23,344	7.32	Não	-	Citoplasma
	TevSTIB805.11_01.16460	B	597	198	22,048	6.07	Não	-	Citoplasma
	TevSTIB805.11_01.16370	C	930	309	36,031	7.33	Sim ^{Ph/Ip}	MRRVASFAGTIPLV SLVKG	Via de secreção ^{1;2;4}
	TevSTIB805.6.4160	D	792	263	29,715	7.5	Não	-	Mitocondrial ^{1;2;3}

Organismo	Nº de acesso	Isoforma	pb	aa	PM (Da)	p.I	Peptídeo Sinal	Sequência Peptídeo Sinal	Citocalização
<i>Trypanosoma vivax</i>	TvY486_0502810	A	333	110	12,645	4.81	Não	-	Citoplasma
	TvY486_1115840	B	627	208	23,556	8.98	Não	-	Citoplasma
	TvY486_1116720	B	597	198	22,319	7.76	Não	-	Citoplasma
	TvY486_1116640	C	912	303	35,574	6.9	Sim ^{Ph/tp}	MRRATALSPCALPS ISLTSLGVA	Mitocondrial ^{3;4/} Via de secreção ^{1;2}
	TvY486_0603500	D	792	263	29,573	7.58	Não	-	Mitocondrial ^{2;3}
<i>Leishmania infantum</i>	LinJ.08.0300	A	693	230	26,210	8.46	Não	-	Mitocondrial ^{1;2;3}
	LinJ.32.1910	B1	588	195	21,527	6.49	Não	-	Citoplasma
	LinJ.32.1920	B2	627	208	23,048	8.24	Não	-	Citoplasma
	LinJ.32.2770	C	807	268	30,33	6.59	Não	-	Citoplasma
	LinJ.30.2780	D	807	268	30,341	6.42	Não	-	Mitocondrial ^{2;3}
<i>Leishmania major</i>	LmjF.08.0290	A	693	230	26,074	6.75	Não	-	Mitocondrial ^{2;3}
	LmjF.32.1820	B1	588	195	21,558	6.11	Não	-	Citoplasma
	LmjF.32.1830	B2	627	208	22,979	7.73	Não	-	Citoplasma
	LmjF.32.2630	C	813	270	32,444	6.59	Não	-	Citoplasma
	LmjF.30.2770	D	807	268	30,329	6.14	Não	-	Mitocondrial ^{2;3}
<i>Leishmania braziliensis</i>	LBRM2903_080008200	A	693	230	26,11	8.83	Não	-	Mitocondrial ^{2;4}
	LBRM2903_320026400	B	588	195	21,661	6.86	Não	-	Citoplasma
	LBRM2903_320026500	B	627	208	23,127	7.8	Não	-	Citoplasma

Organismo	Nº de acesso	Isoforma	pb	aa	PM (Da)	p.I	Peptídeo Sinal	Sequência Peptídeo Sinal	Citocalização
	LBRM2903_320036200	C	942	313	36,603	8.03	Sim ^{Ph/Pr/lp}	MLRRAYTPTACAT GVLGSVVG TSEA	Via de secreção ^{1;4}
	LBRM2903_300033900	D	807	268	30,01	6.09	Não	-	Mitocondrial ^{2;3}
<i>Leishmania tarentolae</i>	LtaP08.0280	A	693	230	26,355	7.63	Não		Mitocondrial ^{2;3}
	LtaP32.1940	B	822	273	30,452	7.83	Sim ^{Ph/Pr/Sp1} _P	MFMRDYTTFCVSP HLLLLLFFPPSS	Via de secreção ^{1;2;4}
	LtaP32.1950	B	1,005	334	37,256	8.95	No		Mitocondrial ^{1;2;3}
	LtaP32.2820	C	942	313	36,565	7.32	Sim ^{Ph/Pr/lp}	MFRRAYTPSVC AA GVLGSVVGASA	Via de secreção ^{1;4}
	LtaP30.2760	D	807	268	30,514	6.42	Não		Mitocondrial ^{2;3}
<i>Crithidia fasciculata</i>	CfaC1_25_0490	A	690	229	25,791	7.59	Não		Mitocondrial ^{1;2;3}
	CfaC1_32_2360	B1	627	208	23,047	7.25	Não	-	Citoplasma
	CfaC1_32_2350	B2	588	195	21,937	6.39	Não	-	Citoplasma
	CfaC1_32_3280	C	945	314	36,750	7.78	Não	-	Mitocondrial ^{2;3}
	CfaC1_29_3040	D	798	265	30,133	7.01	Não	-	Mitocondrial ^{1;2;3}
<i>Leptomonas seymouri</i>	Lsey_0003_0400	A	690	229	25,860	7.58	Não	-	Mitocondrial ^{2;3;4}
	Lsey_0001_0100	B	588	195	21,996	6.88	Não	-	Citoplasma
	Lsey_0010_0090	C	945	314	36,893	8.17	Sim ^{Ph/Pr/lp}	MLRRAFAPSV CATG LLGTTVG	Mitocondrial ^{2;4}
	Lsey_0209_0230	D	798	265	30,22	6.99	Não	-	Citoplasma
<i>Endotrypanum monterogeii</i>	EMOLV88_080005700	A	693	230	26,229	8	Não	-	Mitocondrial ^{1;2;3}
	EMOLV88_320022000	B	528	175	19,247	6.67	Não	-	Citoplasma

Organismo	Nº de acesso	Isoforma	pb	aa	PM (Da)	p.I	Peptídeo Sinal	Sequência Peptídeo Sinal	Citocalização
	EMOLV88_320022100	B	321	106	11,774	7.97	Não	-	Citoplasma
	EMOLV88_000013300	B	627	208	22,96	6.78	Não	-	Citoplasma
	EMOLV88_320030200	C	813	270	32,386	7.3	Não	-	Citoplasma
	EMOLV88_300033200	D	807	268	30,126	6.5	Não	-	Mitocondrial ^{2;3}
<i>Angomonas deanei</i>	EPY41230	A	675	224	25,651	8.96	Não	-	Mitocondrial ^{2;3;4}
	EPY36804	A	636	211	24,195	8.29	Não	-	Citoplasma
	EPY42865	A	330	109	12,532	6.72	Não	-	Citoplasma
	EPY39764	B	627	208	23,273	7.11	Não	-	Citoplasma
	EPY43256*	B	600	199	23,097	6.30	Não	-	Citoplasma
	EPY40729*	B	600	199	23,097	6.31	Não	-	Citoplasma
	EPY41971*	B	600	199	23,097	6.32	Não	-	Citoplasma
	EPY39824	B	582	193	22,519	6.06	Não	-	Citoplasma
	EPY39051	B	555	184	20,344	9.17	Não	-	Via de secreção ^{2;4}
	EPY37688	C	915	304	35,412	6.50	Não	-	Mitocondrial ^{1;2;3}
<i>Angomonas deanei</i>	EPY32173	C	903	300	34,305	8.85	Não	-	Mitocondrial ^{1;2;3}
	EPY27087	C	591	196	22,945	5.38	Não	-	Citoplasma
	EPY38358	C	591	196	22,929	5.39	Não	-	Citoplasma
	EPY28019*	D	801	266	30,154	6.36	Não	-	Mitocondrial ^{1;2;3}
	EPY38911*	D	801	266	30,154	6.37	Não	-	Mitocondrial ^{1;2;4}

Organismo	Nº de acesso	Isoforma	pb	aa	PM (Da)	p.I	Peptídeo Sinal	Sequência Peptídeo Sinal	Citocalização
	EPY43349	D	609	202	22,833	5.65	Não	-	Citoplasma
<i>Strigomonas culicis</i>	EPY29539	A	681	226	25,465	8.19	Não	-	Mitocondrial ^{2:3:4}
	EPY35980	A	402	133	15,183	6.40	Não	-	Citoplasma
	EPY24387	B	624	207	23,350	8.67	Não	-	Citoplasma
	EPY20367*	B	582	193	22,362	5.44	Não	-	Citoplasma
	EPY31732*	B	582	193	22,362	5.45	Não	-	Citoplasma
	EPY28372*	B	582	193	22,362	5.46	Não	-	Citoplasma
	EPY22649*	B	582	193	22,362	5.47	Não	-	Citoplasma
	EPY28528	B	588	195	21,751	6.23	Não	-	Citoplasma
	EPY14969*	B	711	236	26,351	6.75	Sim ^{Ph/Pr/Sp}	MTRHISLSLSLSLSLSLSRC	Via de secreção ^{2:4}
	EPY27400*	B	711	236	26,351	6.76	Sim ^{Ph/Pr/Sp}	MTRHISLSLSLSLSLSLSRC	Via de secreção ^{2:5}
<i>Strigomonas culicis</i>	EPY19550	B	570	189	21,842	5.46	Não	-	Citoplasma
	EPY27997*	B	501	166	19,262	5.67	Não	-	Citoplasma
	EPY36076*	B	501	166	19,262	5.68	Não	-	Citoplasma
	EPY25764	C	906	301	34,901	7.62	Sim ^{Ph/Pr/Ip}	MLRRLAAAPSRALVPAAVATSLTAAAR	Mitocondrial ^{2:3:4}
	EPY34271	C	813	270	31,868	6.25	Não	-	Citoplasma
	<i>Phytomonas sp.</i>	CCW60212	A	702	233	26,873	8.43	Não	-
CCW62833		B	603	200	21,803	5.88	Não	-	Citoplasma

Organismo	Nº de acesso	Isoforma	pb	aa	PM (Da)	p.I	Peptídeo Sinal	Sequência Peptídeo Sinal	Citocalização
	CCW60383	C	915	304	35,779	6.83	Não		Mitocondrial ^{2;3;4}
	CCW61570	D	819	272	31,028	5.86	Não	-	Citoplasma
<i>Bodo saltans</i>	CUG89033	A	699	232	25,887	8.39	Sim ^{Ph/Pr/Ip}	MRTIARSASAVSFA GLILGSCA	Mitocondrial ^{2;3;4}
	CUG89036	A	675	225	25,167	7.02	Não	-	Mitocondrial ^{1;2;3;4}
	CUF58200	B	582	193	21,327	5.95	Não	-	Citoplasma
<i>Bodo saltans</i>	CUG93491	C	894	297	35,004	7.73	Sim ^{Ph/Ip}	MLRRASPITSAAV AGAIVA	Mitocondrial ^{2;3/} Via de secreção ^{1;4}
	CUF85097	D	846	281	31,153	7.13	Não	-	Mitocondrial ^{1;2;3}

Sequências Idênticas; ¹:IpiPSORT; ²TargetP; ³Mitoprot; ⁴ESLPred2; ^{Ph}Phobius; ^{Pr}PrediSi; ^{Sp}SignalP.

Análises filogenéticas usando as sequências aminoacídicas das diferentes espécies de kinetoplastídeos foram claramente separadas em dois grupos contendo, respectivamente, as sequências com predição citosólica (TRPxcit) e o outro contendo as sequências preditas como mitocondriais (TRPXmit) (Figura 10). As sequências agrupadas no clado citosólico mostraram alta similaridade entre si (> 62,12%) .

Na busca pela presença de domínios conservados foram caracterizadas, tanto para TRPxcit quanto para TRPXmit domínios típicos da superfamília *Thioredoxin-like* e da família das peroxiredoxinas 2-Cys (PRX_Typ2cys) típicas. Todas as sequências tiveram as cisteínas peroxidásicas e de resolução (Cp e Cr) identificadas no domínio conservado PRX_Typ2cys (cd0301). A Cp recebe este nome por relacionar-se com o sítio ativo envolvido na redução dos peróxidos. Já a Cr, localiza-se em geral em motivo que difere entre as TRPxcit (VCP) e TRPXmit (VIPC), estando relacionada a formação de ponte dissulfeto com a Cp de outro monômero (JÖNSSON; LOWTHER, 2007; PIÑEYRO et al., 2011).

Em *A. deanei* (EPY41265) a Cp não foi detectada por análises de Blast, podendo provavelmente tratar-se de sequência incompleta. A Cr foi identificada em todas as sequências, estando junto ao domínio VCP nas TRPxcit e no domínio VIPC nas TRPXmit. A presença de ambos resíduos de cisteína nas sequências analisadas incluem-nas na família das peroxiredoxinas 2-Cys- típicas.

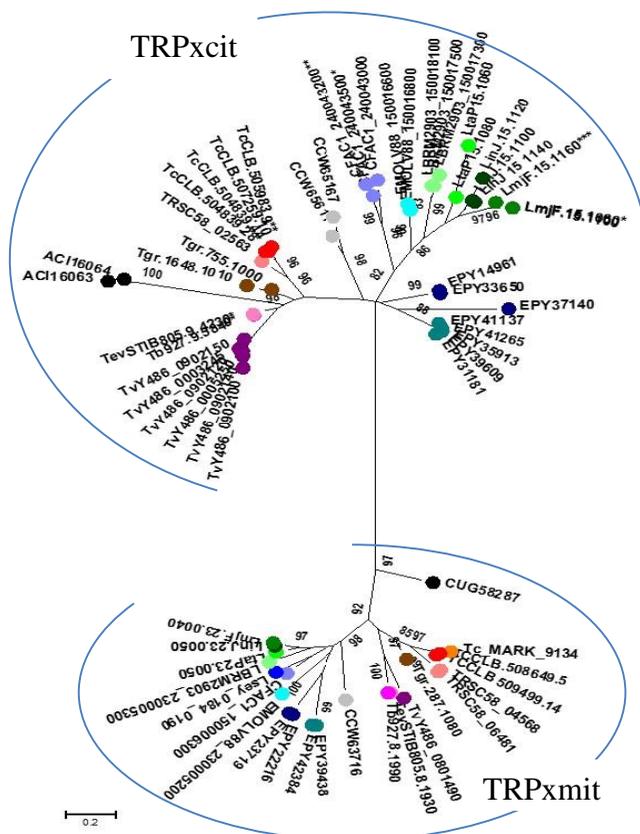


Figura 10: Análise filogenética molecular das sequências de aminoácidos das enzimas Triparedoxinas peroxidases de kinetoplastídeos. O alinhamento das sequências aminoácídicas foi feito a partir do programa Clustal Omega e a história evolutiva inferida pelo método da Máxima Verossimilhança usando o programa MEGA versão 6.0. A filogenia dos genes TRPx foi construída utilizando o modelo de substituição de aminoácidos LG+G. As árvores estão desenhadas em escala, com o tamanho dos ramos relacionados ao número de substituições por sítio. As análises envolveram 72 sequências aminoácídicas. Valores de bootstrap acima de 80 são mostradas junto aos ramos, correspondendo a porcentagem de árvores nas quais a associação das espécies observada se manteve como indicada (1000 replicatas). As sequências anotadas dos Kinetoplastídeos foram retiradas do TriTrypDB ou NCBI e o número de acesso estão inclusos. * Sequências idênticas identificadas ● *T. cruzi* (Esm. e Non Esm.); ● *T. cruzi marinkellei*; ● *T. grayi*; ● *T. rangeli*; ● *T. brucei*; ● *T. evansi*; ● *T. vivax*; ● *L. infantum*; ● *L. major*; ● *L. braziliensis*; ● *L. tarentolae*; ● *C. fasciculata*; ● *L. seymouri*; ● *E. monterogeei*; ● *A. deanei*; ● *S. culicis*; ● *Phytomonas* sp.; ● *B. saltans*.

4.3.3.2 *Glutathione peroxidase (GPx)*

Na maioria dos eucariontes as peroxidases dependentes do tiol glutathione exercem funções chave no metabolismo de peróxidos. Inicialmente estas enzimas foram consideradas ausentes (FLOHÉ; HECHT; STEINERT, 1999) em tripanosomatídeos, até sua caracterização em *C. fasciculata* e posteriormente em *T. cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania* sp. (TETAUD; FAIRLAMB, 1998; WILKINSON et al., 2000; KÖNIG; FAIRLAMB, 2007).

Estas enzimas recebem diferentes nomenclaturas na literatura, sendo *GPX-like* não selênio-dependente (CASTRO; TOMAS, 2008), *GPX-like* (PATEL et al., 2010), GPX-tipo triparedoxina peroxidase (SCHLECKER et al., 2005), peroxidase dependente de triparedoxina (TDPx) (ALPHEY; KONIG; FAIRLAMB, 2008) ou simplesmente GPx (NAVROT et al., 2006). Todos estes autores também descrevem isoformas distintas para esta enzima, incluindo a isoforma I ou A e a isoforma II ou B. A isoforma I ou A é algumas vezes subdividida em AI, AII e AIII. Entretanto o uso desta classificação não está bem estabelecida. Alguns autores aplicam a classificação baseada na similaridade da sequência e outros de acordo com a localização celular.

Considerando as descrições existentes na literatura e os níveis de similaridade entre as sequências, identificamos genes pertencentes as isoformas A (GPxA) e B (GPxB). Todas as espécies analisadas apresentaram GPxA (Tabela 15), mas a GPxB não foi encontrada em *Phytomonas* sp. e *T. vivax*. Os subgrupos I, II e III descritos para a isoforma A não foram identificados em nossas análises.

Ao analisarmos o número de cópias gênicas, a similaridade e a organização genômica foi possível entender que existe uma variação destas isoformas entre as espécies de tripanosomatídeos. Foram identificados de um a três genes por espécie para a isoforma A (Tabelas 2 e 15). A organização cromossômica dos mesmos indicou sintenia entre ortólogos e parálogos, correspondendo a cópias concatenadas (*in tandem*) de GPxA. Em *Leishmania* spp. foram observadas esta variação de uma a três cópias e a sintenia entre as espécies. A única exceção foi *L. tarentolae* (LtaP26.1520) que apresentou apenas uma única sequência curta e não sintênica.

Em relação a citolocalização das sequências analisadas, a maioria das GPxB foram preditas como citoplasmáticas. As sequências classificadas como GPxA foram preditas como citoplasmáticas ou mitocondriais. Baseando-se neste critério, nós definimos dois grupos

distintos nas sequências GPxA analisadas: GPxAI cujas sequências são preditas como citosólicas e GPxAII com sequências de endereçamento mitocondrial ou peptídeo sinal para retículo endoplasmático (Tabela 15).

Além das sequências classificadas como GPxA e GPxB, foram identificadas outro conjunto de sequências nomeadas de GPxC que incluem sequências de *E. monterogeei*, *L. braziliensis*, *L. seymouri*, *C. fasciculata* e *Phytomonas* sp. (Tabela 15).

Em *T. cruzi* as diferentes localizações celulares se relacionam com a afinidade ao agente redutor e ao alvo a ser metabolizado (WILKINSON *et al.*, 2002a; SCHLECKER *et al.*, 2007; CASTRO E TOMAS, 2008). A TcGPxI é citosólica e tem como agente redutor principal a triparedoxina, estando envolvida com a metabolização de ampla variedade de hidroperóxidos. A TcGPxI apresenta grande similaridade ao grupo PHGPX que inclui GPX de plantas e mamíferos e que não possuem todos os resíduos encontrados em outras GPX como a cGPx que contribuem com a ligação com a glutationa (FLOHÉ *et al.*, 1999; CASTRO; TOMAS, 2008).

A TcGPxII é encontrada no retículo endoplasmático e usa como fonte redutora apenas glutationa, estando relacionada a proteção contra a peroxidação lipídica.

Independentemente de uma localização celular específica, a classificação das GPxA nos três diferentes grupos (I, II e III) segundo Castro e Tomas (2008) esta baseada na afinidade de ligação ao agente redutor e ao substrato. Algumas isoformas podem se ligar a triparedoxina enquanto outras a glutationa, bem como algumas isoformas podem usar como substrato o H₂O₂ e/ou hidroperóxidos lipídicos. Embora existam estes critérios de classificação aplicados para espécies individualmente na literatura, não foi possível observar uma correlação entre eles para as isoformas quando diferentes espécies foram analisadas conjuntamente.

Alphey, Konig e Fairlamb (2008) descreveram em *L. major* a isoforma AI (TDPX1) como uma proteína citoplasmática e as isoformas AII e AIII (TDPX2 e TDPX3) como proteínas mitocondriais devido a presença de peptídeo sinal da região N-terminal. A TDPX3 também possui um peptídeo de marcação glicosomal (SKI) na porção C-terminal (KONIG; FAIRLAMB, 2007).

Tabela 15: Características gerais dos genes da Glutathiona peroxidase (GPx) em diferentes espécies de Kinetoplastídeos.

Organismo	Número de acesso	Isoforma	pb	aa	PM (Da)	p.I	Peptídeo Sinal	Sequência Peptídeo Sinal	Citotocalização
<i>Trypanosoma cruzi</i> (Esm.)	TcCLB.503899.110	A	495	164	18,292	8.05	Não	-	Citoplasma
	TcCLB.503899.119	A	534	177	19,727	9.28	Não	-	Citoplasma
	TcCLB.503899.130	A	537	178	19,596	5.91	Não	-	Citoplasma
	TcCLB.511543.60	B	678	225	24,451	8.4	Não	-	Citoplasma
<i>Trypanosoma cruzi</i> (Não Esm.)	TcCLB.507515.10	A	537	178	19,586	5.91	Não	-	Citoplasma
	TcCLB.507515.4	A	345	114	12,574	9.8	Não	-	Citoplasma
	TcCLB.511019.99	B	483	160	17,499	8.2	Não	-	Citoplasma
<i>Trypanosoma cruzi marinkellei</i>	Tc_MARK_1053	A	969	322	36,032	8.78	Não	-	Citoplasma
	Tc_MARK_3409	B	681	226	24,963	8.76	Não	-	Citoplasma
<i>Trypanosoma grayi</i>	Tgr.304.1010	A	216	71	7,799	9.25	Não	-	Citoplasma
	Tgr.165.1020	A	444	147	16,575	9.05	Não	-	Citoplasma
	Tgr.165.1000	A	522	173	19,247	9.27	Não	-	Citoplasma
	Tgr.305.1080	B	432	143	15,940	8.65	Não	-	Citoplasma
<i>Trypanosoma rangeli</i>	TRSC58_07183	A	495	164	18,215	8.44	Não	-	Citoplasma
	TRSC58_06976	A	582	193	21,079	8.12	Sim ^{Ph/Pr/S} _p	MLLWVCCDS LAVLLLGLVLS VVG TG	Via de secreção ^{2:4}
	TRSC58_06112	A	216	71	7,789	10.16	Não	-	Citoplasma

Organismo	Número de acesso	Isoforma	pb	aa	PM (Da)	p.I	Peptídeo Sinal	Sequência Peptídeo Sinal	Citocalização
	TRSC58_01013	B	483	160	17,832	8.6	Não	-	Citoplasma
<i>Trypanosoma brucei</i>	Tb927.7.1120	A	501	166	18,588	6.27	Não	-	Citoplasma
	Tb927.7.1130	A	510	169	18,874	8.43	Não	-	Citoplasma
	Tb927.7.1140	A	531	176	19,656	9.28	Não	-	Citoplasma
	TB927.11.15920	B	471	156	17,341	8.41	Não	-	Citoplasma
<i>Trypanosoma evansi</i>	TevSTIB805.7.1100	A	501	166	18,602	6.27	Não	-	Citoplasma
	TevSTIB805.7.1110	A	510	169	18,830	8.04	Não	-	Citoplasma
	TevSTIB805.7.1120	A	531	176	19,699	9.28	Não	-	Citoplasma
	TevSTIB805.11_01.16470	B	471	156	17,341	8.41	Não	-	Citoplasma
<i>Trypanosoma vivax</i>	TvY486_0700940	A	516	171	18,992	7.95	Não	-	Citoplasma
	TvY486_0700950	A	531	176	19,452	8.45	Não	-	Citoplasma
	TvY486_0700960	A	162	53	6,236	12.6	Não	-	Citoplasma
<i>Leishmania infantum</i>	LinJ.26.0780	A	525	174	19,416	7.53	Não	-	Citoplasma
	LinJ.26.0770	A	552	183	20,376	8.77	Não	-	Mitochondrial ^{2,3}
	LinJ.36.3160	B	459	152	17,06	9.28	Não	-	Citoplasma
<i>Leishmania major</i>	LmjF.26.0800	A	552	183	20,214	8.57	Não	-	Citoplasma
	LmjF.26.0810	A	573	190	20,943	8.13	Não	-	Citoplasma
	LmjF.26.0820	A	525	174	19,324	7.53	Não	-	Citoplasma

Organismo	Número de acesso	Isoforma	pb	aa	PM (Da)	p.I	Peptídeo Sinal	Sequência Peptídeo Sinal	Citocalização
	LmjF.36.3010	B	459	152	16,942	8.09	Não	-	Citoplasma
<i>Leishmania braziliensis</i>	LBRM2903_260013000	A	228	75	8,298	7.51	Não	-	Citoplasma
	LBRM2903_260013100	A	519	172	19,216	7.91	Não	-	Citoplasma
	LBRM2903_350040900	B	483	160	17,741	9	Não	-	Citoplasma
	LBRM2903_260012900	C	1,071	356	38,129	4.41	Não	-	Citoplasma
<i>Leishmania tarentolae</i>	LtaP26.1520	A	249	82	9,082	6.5	Não	-	Citoplasma
	LtaP36.3080	B	765	254	28,127	8.99	Sim ^{Ph/Pr/S} _p	MSALLHALPLL LMLLLLHVHTF C	Via de secreção ^{2;4}
<i>Crithidia fasciculata</i>	CFAC1_290014200	A	516	171	18,909	7.19	Não	-	Citoplasma
	CFAC1_290014100	A	564	187	20,402	8.08	Sim ^{Ph/Pr}	-	Citoplasma
	CFAC1_290014300	A	492	163	18,155	6.14	Não	-	Citoplasma
	CFAC1_280032700	B	459	152	17,073	8.59	Não	-	Citoplasma
	CFAC1_290014000	C	1,026	341	36,052	4.49	Não	-	Citoplasma
<i>Leptomonas seymouri</i>	Lsey_0155_0170	C	1,008	335	35,566	4.5	Não	-	Citoplasma
	Lsey_0882_0010	A	327	108	11,646	4.9	Não	-	Citoplasma
	Lsey_0047_0330	B	459	152	17,023	8.36	Não	-	Citoplasma

Organismo	Número de acesso	Isoforma	pb	aa	PM (Da)	p.I	Peptídeo Sinal	Sequência Peptídeo Sinal	Citocalização
<i>Endotrypanum monteroeii</i>	EMOLV88_260011900	C	841	281	30,704	5.02	Não	-	Citoplasma
	EMOLV88_260012000	A	549	182	20,022	8.45	Não	-	Mitocondrial ^{2,3}
	EMOLV88_260012100	A	507	168	18,823	6.87	Não	-	Citoplasma
	EMOLV88_360036400	B	459	152	17,211	8.1	Não	-	Citoplasma
<i>Angomonas deanei</i>	EPY39380	B	459	152	17,167	8.82	Não	-	Citoplasma
	EPY28722	A	537	178	19,531	9.05	Não	-	Citoplasma
	EPY40196	A	444	147	15,887	8.40	Não	-	Citoplasma
	EPY30453	A	540	179	19,81	6.31	Não	-	Citoplasma
	EPY36704	A	540	179	19,734	6.60	Não	-	Citoplasma
	EPY38376	A	540	179	19,749	6.22	Não	-	Citoplasma
	EPY24747*	B	459	152	17,197	8.82	Não	-	Citoplasma
	EPY43121*	B	459	152	17,197	8.83	Não	-	Citoplasma
EPY39830	A	486	161	17,981	5.41	Não	-	Citoplasma	
<i>Strigomonas culicis</i>	EPY35717	A	498	165	18,228	6.95	Não	-	Citoplasma
	EPY18946*	A	594	197	21,626	8.72	Não	-	Via de secreção ^{2,4}
	EPY24421*	A	594	197	21,626	8.73	Não	-	Via de secreção ^{2; 5}

Organismo	Número de acesso	Isoforma	pb	aa	PM (Da)	p.I	Peptídeo Sinal	Sequência Peptídeo Sinal	Citocalização
	EPY26076	A	486	161	18,115	5.34	Não	-	Citoplasma
	EPY24336*	B	459	152	17,126	8.73	Não	-	Citoplasma
	EPY30257*	B	459	152	17,126	8.74	Não	-	Citoplasma
	EPY28568*	B	459	152	17,126	8.74	Não	-	Citoplasma
<i>Phytomonas sp.</i>	CCW64125	A	543	180	20,061	7.68	Não	-	Citoplasma
	CCW64124	C	705	234	26,018	5.14	Não	-	Citoplasma
<i>Bodo saltans</i>	CUF18931	A	555	184	20,410	6.61	Não	-	Citoplasma
	CUF18175	A	549	182	20,488	8.43	Não	-	Mitocondrial ^{2,3}
	CUG30906	A	549	182	20,511	8.13	Não	-	Mitocondrial ^{2,4}
	CUF18152	A	297	98	10,854	5.22	Não	-	Citoplasma
	CUG94197	B	477	158	17,237	6.88	Não	-	Citoplasma

* Sequências Idênticas; ¹:*IP*IPSORT; ²TargetP; ³Mitoprot; ⁴ESLPred2; ^{Ph}Phobius; ^{Pr} PrediSi; ^{Sp} SignalP

A análise do alinhamento indicou uma forte conservação entre as sequências dentro da mesma espécie, havendo em alguns casos apenas diferença nas regiões N e C-terminais, como já proposto por Wilkinson e colaboradores (2002 a;b). Entretanto, as diferenças nas regiões citadas não puderam ser identificadas como únicas ou especificamente relacionadas a uma isoforma em particular.

Todas as sequências GPx analisadas apresentaram o domínio completo GSH peroxidase (pfam00255), no qual foi possível identificar todos os resíduos catalíticos característicos e conservados deste gene (C, Q e W).

A análise filogenética usando todas as sequências GPx de tripanosomatídeos encontradas nos bancos de dados revelou a divisão em dois ramos distintos, caracterizando as isoformas GPxA e GPxB (Figura 11). Não houve uma clara separação dos subgrupos da GPxA, assim como as separações em ramos não foram sempre em nível de espécie. Sequência ortólogas em espécies relacionadas (*T. brucei* e *T. evansi*/ *T. cruzi* e *T. cruzi marinkellei*) foram agrupadas mais próximas que as sequências parálogas.

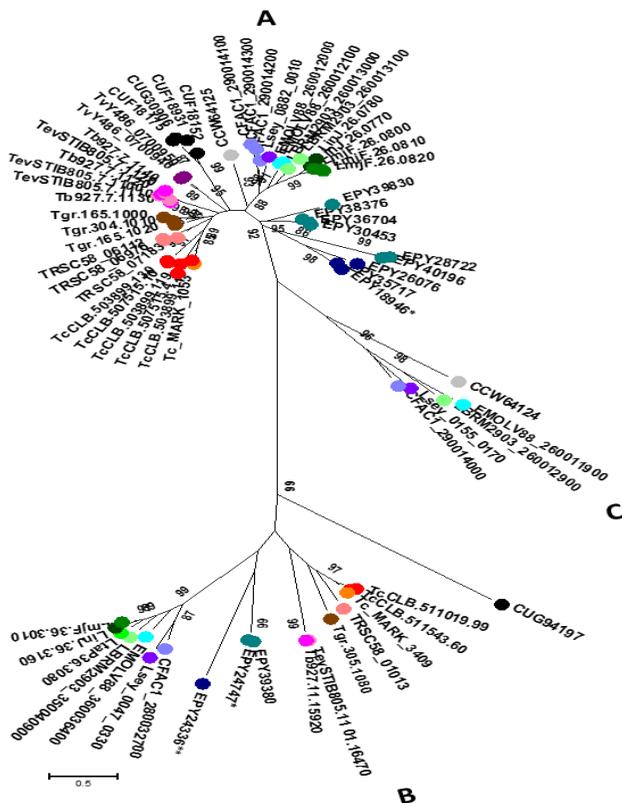


Figura 11: Análise filogenética molecular das sequências de aminoácidos das enzimas Glutathionas peroxidases de kinetoplastídeos. O alinhamento das sequências aminoacídicas foi feito a partir do programa Clustal Omega e a história evolutiva inferida pelo método da Máxima Verossimilhança usando o programa MEGA versão 6.0. A filogenia dos genes GPx foi construída utilizando o modelo de substituição de aminoácidos WAG+G. As árvores estão desenhadas em escala, com o tamanho dos ramos relacionados ao número de substituições por sítio. As análises envolveram 71 sequências aminoacídicas. Valores de bootstrap acima de 80 são mostradas junto aos ramos, correspondendo a porcentagem de árvores nas quais a associação das espécies observada se manteve como indicada (1000 replicatas). As sequências anotadas dos Kinetoplastídeos foram retiradas do TriTrypDB ou NCBI e o número de acesso estão inclusos. * Sequências idênticas identificadas ● *T. cruzi* (Esm. e Non Esm.); ● *T. cruzi marinkellei*; ● *T. gray*; ● *T. rangeli*; ● *T. brucei*; ● *T. evansi*; ● *T. vivax*; ● *L. infantum*; ● *L. major*; ● *L. braziliensis*; ● *L. tarentolae*; ● *C. fasciculata*; ● *L. seymouri*; ● *E. monterogeii*; ● *A. deanei*; ● *S. culicis*; ● *Phytomonas* sp.; ● *B. saltans*.

4.3.3.3 *Ascorbato Peroxidase (APX)*

A terceira das peroxidases é a hemoperoxidase dependente de ascorbato, bem caracterizada em microrganismos fotossintéticos e plantas. Em tripanosomas como *T. cruzi* a APx relaciona-se com a decomposição exclusiva do H_2O_2 e usa o ascorbato como fonte dos equivalentes reduzidos. A dehidroascorbato (DHA) produzida durante a redução do peróxido de hidrogênio catalizado pela enzima ascorbato peroxidase (WILKINSON et al., 2000), reage diretamente com a T(SH)₂ (KRAUTH-SIEGEL; LUDEMANN, 1996). A descoberta e caracterização desta enzima em *T. cruzi* (WILKINSON et al, 2002c) e em *Leishmania* sp. (parasitos intracelulares) e a ausência em parasitos extracelulares como *T. brucei*, sugere que este tipo de resposta antioxidante se relacione ao ciclo de vida intracelular.

Foram identificadas sequências codificadoras de APx em outros tripanosomatídeos que não são parasitos intracelulares, incluindo o kinetoplastida de vida livre *B. saltans*, tripanosomatídeos monoxênicos e em *T. grayi*, um parasito extracelular de crocodilos (Tabela 16). Não foram identificados genes ortólogos da APx em *Phytomonas* sp., *T. brucei* e espécies relacionadas como *T. evansi* e *T. vivax*, assim como somente um pseudogene foi encontrado no genoma de *T. rangeli* (Tabela 2 e 16). Desta forma, a enzima APx parece não ser uma aquisição adaptativa de parasitas intracelulares, mas sim um gene provavelmente incorporado por eventos endosimbiontes.

As sequências foram encontradas, em geral, como cópias simples nos genomas, com exceção para *A. deanei* e *S. culicis* onde, respectivamente, três e duas ORF foram relacionadas a ascorbato peroxidase. Quanto a citolocalização, as sequências analisadas foram preditas, em sua maioria como mitocondriais, apresentando ou não na região N-terminal sinal de endereçamento para a mitocôndria (Tabela 16).

Tabela 16: Características gerais dos genes da Ascorbato peroxidase (APx) em diferentes espécies de Kinetoplastídeos.

Organismo	Nº de acesso	pb	aa	PM (Da)	p.I	Peptídeo Sinal	Sequência Peptídeo sinal	Citocalização
<i>Trypanosoma cruzi</i> (Esm.)	TcCLB.503745.30	987	328	36,502	7.74	Sim ^{Ph/Pr}	MAFCFGSFFSKYAS SKSGSQARYRF LHSSAKIAAGATGA LLGGATVALC	Mitocondrial ^{1;2;3}
<i>Trypanosoma cruzi</i> (Não Esm.)	TcCLB.506193.60	987	328	36,561	7.74	Sim ^{Ph/Pr}	MVFCFGSFFSKYAS SKSGFQARYRF LHSSAKIAAGATGA LLGGATVALC	Mitocondrial ^{1;2;3}
<i>Trypanosoma cruzi marinkellei</i>	Tc_MARK_3376	987	328	36,656	8.02	Não		Mitocondrial ^{1;2;3}
<i>Trypanosoma grayi</i>	Tgr.259.1010	987	328	36,335	8.35	Sim ^{Ph/Pr}	MFSRVGLFFARRVA VRAAAQHGYFR FRRLTGVVGGATA AAFLGSATA	Mitocondrial ^{1;2;3;4}
<i>Trypanosoma rangeli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trypanosoma brucei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trypanosoma evansi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trypanosoma vivax</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Leishmania infantum</i>	LinJ.34.0070	912	303	33,711	7.79	Sim ^{Ph/Pr}	MSGTSRRAKGLFTG IAVGTFVSGAM FVSCASA	Via de Secreção ^{2;4}

Organismo	Nº de acesso	pb	aa	PM (Da)	p.I	Peptídeo Sinal	Sequência Peptídeo sinal	Citocalização
<i>Leishmania major</i>	LmjF.34.0070	912	303	33,873	6.85	Sim ^{Ph/Pr}	MSGTSRRAKGLFTG IAVGTFVSGAM FVSCASA	Via de Secreção ^{2;4}
<i>Leishmania braziliensis</i>	LBRM2903_20000 8300	978	325	36,193	8.31	Sim ^{Ph/Pr}	MFRCSVRLGQRVL PRFVPSMTGT SRRAKGLFAGIAAG SFVSGAMIVSCA SFGSRA	Mitocondrial ^{1;2;3;} 4
<i>Leishmania tarentolae</i>	LtaP34.0100	927	323	36,174	6.7	Não	-	Mitocondrial ^{1;2;3;} 4
<i>Crithidia fasciculata</i>	CfaC1_33_1480	981	326	36,043	7.07	Sim ^{Ph/Pr}	MFRCASIRLGQRLL PRAALRFSPGV RRAAGLFLAGLAAG TAVGG	Mitocondrial ^{1;2;3}
<i>Leptomonas seymouri</i>	Lsey_0078_0210	981	326	36,057	7.47	Não	-	Mitocondrial ^{1;2;3}
<i>Endotrypanum monterogeii</i>	EMOLV88_34000 6000	978	325	36,220	6.77	Sim ^{Ph/Pr}	MFRCASACLGQRV LPRFVLSVSV SWRAKSLFTGITAG TFLSGAALVSC SS	Mitocondrial ^{1;2;3}
<i>Angomonas deanei</i>	EPY32972	800	267	29,518	8.11	Não	-	Mitocondrial ^{1;2;3}
	EPY43626	819	272	29,833	8.77	Não	-	Citoplasma
	EPY41709	618	206	22,648	9.19	Não	-	Mitocondrial ^{1;2;3;} 4

Organismo	Nº de acesso	pb	aa	PM (Da)	p.I	Peptídeo Sinal	Sequência Peptídeo sinal	Citocalização
<i>Strigomonas culicis</i>	EPY37063	1.050	349	38,835	8.79	Não	-	Mitocondrial ^{1;2;3;} 4
	EPY27158	642	213	23,778	6.73	Não	-	Citoplasma
<i>Phytomonas sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bodo saltans</i>	CUE67095	969	322	35,743	8.49	Não	-	Mitocondrial ^{2;3;4}

* Sequências Idênticas; ¹:*ip*PSORT; ²*TargetP*; ³*Mitoprot*; ⁴*ESLPred2*; ^{Ph}*Phobius*; ^{Pr}*PrediSi*; ^{Sp}*SignalP*

A análise filogenética dos genes da ascorbato peroxidase demonstra (Figura 12) demonstrou de forma clara a divisão dos ramos entre *Trypanosoma* spp. e *Leishmania* spp. e outros kinetoplastídeos.

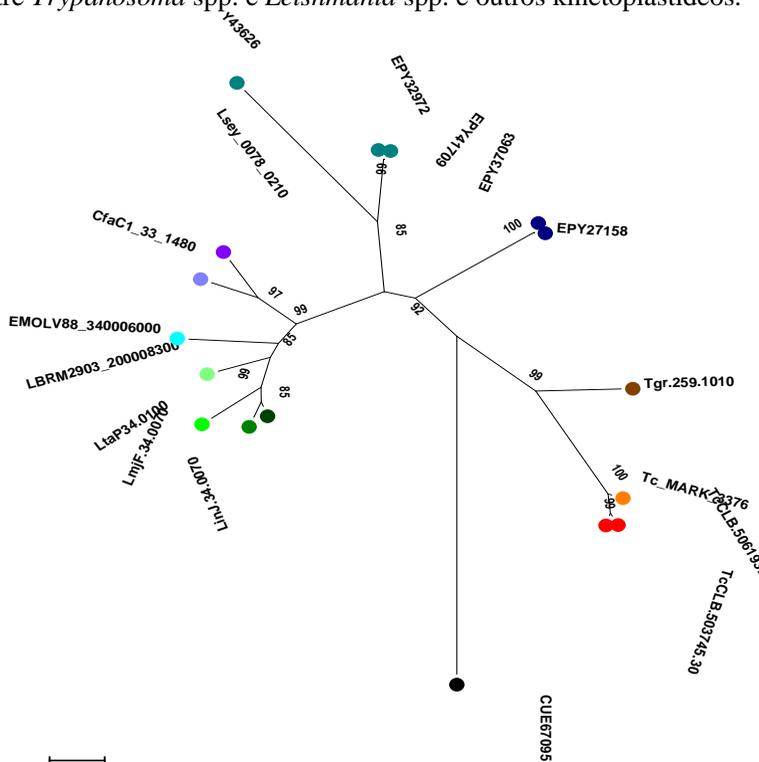


Figura 12: Análise filogenética molecular das sequências de aminoácidos das enzimas Ascorbato peroxidases de kinetoplastídeos. O alinhamento das sequências aminoácídicas foi feito a partir do programa Clustal Omega e a história evolutiva inferida pelo método da Máxima Verossimilhança usando o programa MEGA versão 6.0. A filogenia dos genes APx foi construída utilizando o modelo de substituição de aminoácidos WAG+G. As árvores estão desenhadas em escala, com o tamanho dos ramos relacionados ao número de substituições por sítio. As análises envolveram 17 sequências aminoácídicas. Valores de bootstrap acima de 80 são mostradas junto aos ramos, correspondendo a porcentagem de árvores nas quais a associação das espécies observada se manteve como indicada (1000 replicatas). As sequências anotadas dos Kinetoplastídeos foram retiradas do TriTrypDB ou NCBI e o número de acesso estão incluídos. * Sequências idênticas identificadas **●** *T. cruzi* (Esm. e Non Esm.); **●** *T. cruzi marinkellei*; **●** *T. grayi*; **●** *T. rangeli*; **●** *T. brucei*; **●** *T. evansi*; **●** *T. vivax*; **●** *L. infantum*; **●** *L. major*; **●** *L. braziliensis*; **●** *L. tarentolae*; **●** *C. fasciculata*; **●** *L. seymourei*; **●** *E. monterogeii*; **●** *A. deanei*; **●** *S. culicis*; **●** *Phytomonas* sp.; **●** *B. saltans*.

4.3.3.4 Superóxido Dismutase (SOD)

As superóxido dismutases (SOD) são um grupo de metaloproteínas com forte poder antioxidante que eliminam radicais superóxido pela dismutação em H_2O_2 e oxigênio molecular. A presença desta enzima em todas as espécies analisadas não é surpresa, uma vez que está relacionada ao processo de respiração celular em organismos aeróbios (MATEO et al., 2008; SHENG et al., 2014). As SOD podem ser encontradas como homodímero ou homotetrameros e exibem alta similaridade em suas sequências e estrutura (DUFERNEZ et al., 2006), o que sugere a presença de um ancestral comum (WINTJENS et al., 2004).

As enzimas superóxido dismutases encontradas, até o momento, em tripanosomatídeos apresentam afinidade pelo metal ferro (Fe) sendo, portanto, denominadas Ferro Superóxido Dismutases (DUFERNEZ et al., 2006). Este grupo de enzimas está restrita a protozoários, procariontes e cloroplastos (IRIGOIN et al., 2008). Isoformas distintas são descritas em kinetoplastídeos e, novamente, a nomenclatura é bastante variável. Na maioria das vezes as isoformas são reportadas e nomeadas como A, B (ou 1 e 2) e C. Uma quinta isoforma foi encontrada em *T. brucei* (Tb927.6.4030) (DUFERNEZ et al., 2006), e sequências ortólogas a ela foram encontradas em todos os kinetoplastídeos analisados aqui, exceto *S. culicis* (Tabela 17), sendo descrita como FeSOD-D.

Com base na análise de domínios, todas as sequências analisadas foram incluídas na família Ferro/Mangânese superóxido dismutase.

No mínimo uma cópia de cada isoforma foi identificada para todas as espécies analisadas, exceto para *S. culicis* (FeSOD-D) e *T. cruzi marinkellei* (FeSOD-B) (Tabela 17). FeSOD-B foi encontrada como duas cópias na maioria das espécies, provavelmente representando as isoformas B1 e B2.

Quanto a localização celular, as FeSOD-A, FeSOD-C e FeSOD-D foram preditas como sendo mitocondriais. A FeSOD-D também foi identificada como sendo uma proteína do retículo endoplasmático ou secretada devido a ausência de peptídeo sinal identificável. As isoformas FeSOD-B1 e B2 foram reportadas como sendo de localização citoplasmática (Tabela 17).

Tabela 17: Características gerais dos genes da Ferro Superóxido Dismutase (FeSOD) em diferentes espécies de Kinetoplastídeos.

Organismo	Nº de Acesso	Isoforma	pb	aa	PM (Da)	p.I	Peptídeo Sinal	Sequência Peptideo Sinal	Citocalização
<i>Trypanosoma cruzi</i> (Esm.)	TcCLB.509775.40	A	702	233	26,140	8.85	Não	-	Mitocondrial ^{1;2;3}
	TcCLBEs.511737.3	B	372	123	13,863	5.1	Não	-	Citoplasma
	TcCLB.507039.10	B1	342	113	12,733	6.24	Não	-	Citoplasma
	TcCLB.511715.10	B2	624	207	23,354	7.65	Não	-	Citoplasma
	TcCLB.511545.120	C	909	302	35,549	7.65	Sim ^{Ph/Ip}	MRRSAFSTGVVP AIAATLSPAALQA	Mitocondrial ^{2;3;4}
	TcCLB.511735.60	D	1,035	344	29,644	8.58	Não	-	Citoplasma
<i>Trypanosoma cruzi</i> (Non Esm.)	TcCLB.507061.30	A	702	233	26,202	8.85	Não	-	Mitocondrial ^{1;2;3;4}
	TcCLB.508445.20	B1	624	207	23,354	7.25	Não	-	Citoplasma
	TcCLB.511019.90	B2	588	195	21,906	7.19	Não	-	Citoplasma
	TcCLB.506819.30	C	909	302	35,627	7.37	Sim ^{Ph/Ip}	MRRSAFSTGVVP AIAAILSPAA	Mitocondrial ^{2;3/} Via de secreção ^{1;4}
	TcCLB.511521.30	D	1,038	345	38,947	8.41	Não	-	Citoplasma
<i>Trypanosoma cruzi marinkellei</i>	Tc_MARK_8923	A	702	233	26,177	8.59	Não	-	Mitocondrial ^{1;2;3;4}
	Tc_MARK_3418	C	909	302	35,582	7.37	Sim ^{Ph/Ip}	MRRSAFSTGAVP AIAATVSPAALQ A	Mitocondrial ^{2;3;4}
	Tc_MARK_2024	D	924	307	34,320	8.48	Não	-	Mitocondrial ^{1;2;3;4}

Organismo	Nº de Acesso	Isoforma	pb	aa	PM (Da)	p.I	Peptídeo Sinal	Sequência Peptídeo Sinal	Citocalização
<i>Trypanosoma grayi</i>	Tgr.136.1010	A	708	235	26,143	8.7	Sim ^{Ph/Pr/Ip}	MLRRAAAAAGL CAATRGVAlM	Mitocondrial ^{2;3;4}
	Tgr.28.1260	B1	624	207	23,537	8.74	Não	-	Citoplasma
	Tgr.305.1070	B2	342	113	12,667	7.04	Não	-	Citoplasma
	Tgr.311.1030	C	918	305	35,790	7.63	Sim ^{Ph/Pr/Ip}	MRRSAFSTSVLP AAAAAATTAAA	Mitocondrial ^{2;3;4}
	Tgr.27.1060	D	801	266	29,536	7.61	Não	-	Mitocondrial ^{2;3;4}
<i>Trypanosoma rangeli</i>	TRangeli_25:95659_96299	A	684	227	25,615	8.46	Não	-	Citoplasma
	TRSC58_05576	B	588	195	22,035	7.3	Não	-	Citoplasma
	TRSC58_00796	C	912	303	35,536	7.37	Não	-	Mitocondrial ^{2;3}
	TRSC58_02831	D	801	266	30,265	8.3	Não	-	Mitocondrial ^{2;3}
<i>Trypanosoma brucei</i>	Tb927_5_3350	A	717	238	26,824	8.36	Não	-	Mitocondrial ^{2;3}
	Tb927_11_15910	B1	597	198	22,048	6.07	Não	-	Citoplasma
	Tb927_11_15020	B2	627	208	23,280	7.32	Não	-	Citoplasma
	Tb927_11_15820	C	930	309	36,048	6.94	Sim ^{Ph/Ip}	MRRVAFAGTIPL VSLVKG	Mitocondrial ^{2;3/} Via de secreção ^{1;4}
	Tb927_6_4030	D	792	263	29,653	7.05	Não	-	Mitocondrial ^{1;2;3}
<i>Trypanosoma evansi</i>	TevSTIB805.5.3850	A	717	238	26,874	8.76	Não	-	Mitocondrial ^{1;2;3}
	TevSTIB805.11_01.15550	B	627	208	23,344	7.32	Não	-	Citoplasma
	TevSTIB805.11_01.16460	B	597	198	22,048	6.07	Não	-	Citoplasma

Organismo	Nº de Acesso	Isoforma	pb	aa	PM (Da)	p.I	Peptídeo Sinal	Sequência Peptídeo Sinal	Citocalização
	TevSTIB805.11_01.16370	C	930	309	36,031	7.33	Sim ^{Ph/Ip}	MRRVASFAGTIPLVSLVKG	Via de secreção _{1;2;4}
	TevSTIB805.6.4160	D	792	263	29,715	7.5	Não		Mitocondrial _{1;2;3}
<i>Trypanosoma vivax</i>	TvY486_0502810	A	333	110	12,645	4.81	Não	-	Citoplasma
	TvY486_1115840	B	627	208	23,556	8.98	Não	-	Citoplasma
	TvY486_1116720	B	597	198	22,319	7.76	Não	-	Citoplasma
	TvY486_1116640	C	912	303	35,574	6.9	Sim ^{Ph/Ip}	MRRATALSPCALPSISLTSLGVA	Mitocondrial ^{3;4} Via de secreção _{1;2}
	TvY486_0603500	D	792	263	29,573	7.58	Não	-	Mitocondrial _{2;3}
<i>Leishmania infantum</i>	LinJ.08.0300	A	693	230	26,210	8.46	Não	-	Mitocondrial _{1;2;3}
	LinJ.32.1910	B1	588	195	21,527	6.49	Não	-	Citoplasma
	LinJ.32.1920	B2	627	208	23,048	8.24	Não	-	Citoplasma
	LinJ.32.2770	C	807	268	30,33	6.59	Não	-	Citoplasma
	LinJ.30.2780	D	807	268	30,341	6.42	Não	-	Mitocondrial _{2;3}
<i>Leishmania major</i>	LmjF.08.0290	A	693	230	26,074	6.75	Não	-	Mitocondrial _{2;3}
	LmjF.32.1820	B1	588	195	21,558	6.11	Não	-	Citoplasma
	LmjF.32.1830	B2	627	208	22,979	7.73	Não	-	Citoplasma
	LmjF.32.2630	C	813	270	32,444	6.59	Não	-	Citoplasma
	LmjF.30.2770	D	807	268	30,329	6.14	Não		Mitocondrial _{2;3}
<i>Leishmania braziliensis</i>	LBRM2903_080008200	A	693	230	26,11	8.83	Não		Mitocondrial _{2;4}

Organismo	Nº de Acesso	Isoforma	pb	aa	PM (Da)	p.I	Peptídeo Sinal	Sequência Peptídeo Sinal	Citocalização
	LBRM2903_320026400	B	588	195	21,661	6.86	Não	-	Citoplasma
	LBRM2903_320026500	B	627	208	23,127	7.8	Não	-	Citoplasma
	LBRM2903_320036200	C	942	313	36,603	8.03	Sim ^{Ph/Pr/Ip}	MLRRAYTPTACA TGVLGSVVGTS A	Via de secreção ^{1;4}
	LBRM2903_300033900	D	807	268	30,01	6.09	Não	-	Mitocondrial ^{2;3}
<i>Leishmania tarentolae</i>	LtaP08.0280	A	693	230	26,355	7.63	Não		Mitocondrial ^{2;3}
	LtaP32.1940	B	822	273	30,452	7.83	Sim ^{Ph/Pr/Sp/Ip}	MFMRDYTTFCVS PHLLLLLFFPPSS	Via de secreção ^{1;2;4}
	LtaP32.1950	B	1,005	334	37,256	8.95	No		Mitocondrial ^{1;2;3}
	LtaP32.2820	C	942	313	36,565	7.32	Sim ^{Ph/Pr/Ip}	MFRRAYTPSVCA AGVLGSVVGASA	Via de secreção ^{1;4}
	LtaP30.2760	D	807	268	30,514	6.42	Não		Mitocondrial ^{2;3}
<i>Crithidia fasciculata</i>	CfaC1_25_0490	A	690	229	25,791	7.59	Não		Mitocondrial ^{1;2;3}
	CfaC1_32_2360	B1	627	208	23,047	7.25	Não	-	Citoplasma
	CfaC1_32_2350	B2	588	195	21,937	6.39	Não	-	Citoplasma
	CfaC1_32_3280	C	945	314	36,750	7.78	Não	-	Mitocondrial ^{2;3}
	CfaC1_29_3040	D	798	265	30,133	7.01	Não	-	Mitocondrial ^{1;2;3}
<i>Leptomonas seymouri</i>	Lsey_0003_0400	A	690	229	25,860	7.58	Não	-	Mitocondrial ^{2;3;4}
	Lsey_0001_0100	B	588	195	21,996	6.88	Não	-	Citoplasma

Organismo	Nº de Acesso	Isoforma	pb	aa	PM (Da)	p.I	Peptídeo Sinal	Sequência Peptídeo Sinal	Citocalização
	Lsey_0010_0090	C	945	314	36,893	8.17	Sim ^{Ph/Pr/Ip}	MLRRAFAPSVCA TGLLGTTVG	Mitocondrial ^{2,4}
	Lsey_0209_0230	D	798	265	30,22	6.99	Não	-	Citoplasma
<i>Endotrypanum monterogeii</i>	EMOLV88_080005700	A	693	230	26,229	8	Não	-	Mitocondrial ^{1;2;3}
	EMOLV88_320022000	B	528	175	19,247	6.67	Não	-	Citoplasma
	EMOLV88_320022100	B	321	106	11,774	7.97	Não	-	Citoplasma
	EMOLV88_000013300	B	627	208	22,96	6.78	Não	-	Citoplasma
	EMOLV88_320030200	C	813	270	32,386	7.3	Não	-	Citoplasma
	EMOLV88_300033200	D	807	268	30,126	6.5	Não	-	Mitocondrial ^{2;3}
<i>Angomonas deanei</i>	EPY41230	A	675	224	25,651	8.96	Não	-	Mitocondrial ^{2;3;4}
	EPY36804	A	636	211	24,195	8.29	Não	-	Citoplasma
	EPY42865	A	330	109	12,532	6.72	Não	-	Citoplasma
	EPY39764	B	627	208	23,273	7.11	Não	-	Citoplasma
	EPY43256*	B	600	199	23,097	6.30	Não	-	Citoplasma
	EPY40729*	B	600	199	23,097	6.31	Não	-	Citoplasma
	EPY41971*	B	600	199	23,097	6.32	Não	-	Citoplasma
	EPY39824	B	582	193	22,519	6.06	Não	-	Citoplasma
	EPY39051	B	555	184	20,344	9.17	Não	-	Via de secreção ^{2,4}
EPY37688	C	915	304	35,412	6.50	Não	-	Mitocondrial ^{1;2;3}	

Organismo	Nº de Acesso	Isoforma	pb	aa	PM (Da)	p.I	Peptídeo Sinal	Sequência Peptídeo Sinal	Citocalização
	EPY32173	C	903	300	34,305	8.85	Não	-	Mitocondrial 1;2;3
	EPY27087	C	591	196	22,945	5.38	Não	-	Citoplasma
	EPY38358	C	591	196	22,929	5.39	Não	-	Citoplasma
	EPY28019*	D	801	266	30,154	6.36	Não	-	Mitocondrial 1;2;3
	EPY38911*	D	801	266	30,154	6.37	Não	-	Mitocondrial 1;2;4
	EPY43349	D	609	202	22,833	5.65	Não	-	Citoplasma
<i>Strigomonas culicis</i>	EPY29539	A	681	226	25,465	8.19	Não	-	Mitocondrial 2;3;4
	EPY35980	A	402	133	15,183	6.40	Não	-	Citoplasma
	EPY24387	B	624	207	23,350	8.67	Não	-	Citoplasma
	EPY20367*	B	582	193	22,362	5.44	Não	-	Citoplasma
	EPY31732*	B	582	193	22,362	5.45	Não	-	Citoplasma
	EPY28372*	B	582	193	22,362	5.46	Não	-	Citoplasma
	EPY22649*	B	582	193	22,362	5.47	Não	-	Citoplasma
	EPY28528	B	588	195	21,751	6.23	Não	-	Citoplasma
	EPY14969*	B	711	236	26,351	6.75	Sim ^{Ph/Pr/Sp}	MTRHISLSLSLS LSLSLRC	Via de secreção 2;4
	EPY27400*	B	711	236	26,351	6.76	Sim ^{Ph/Pr/Sp}	MTRHISLSLSLS LSLSLRC	Via de secreção 2;5
	EPY19550	B	570	189	21,842	5.46	Não	-	Citoplasma
EPY27997*	B	501	166	19,262	5.67	Não	-	Citoplasma	

Organismo	Nº de Acesso	Isoforma	pb	aa	PM (Da)	p.I	Peptídeo Sinal	Sequência Peptídeo Sinal	Citocalização
	EPY36076*	B	501	166	19,262	5.68	Não	-	Citoplasma
	EPY25764	C	906	301	34,901	7.62	Sim ^{Ph/Pr/Ip}	MLRRLAAAPSRA LVPAAVATSLTA AAR	Mitocondrial ^{2;3;4}
	EPY34271	C	813	270	31,868	6.25	Não	-	Citoplasma
<i>Phytomonas sp.</i>	CCW60212	A	702	233	26,873	8.43	Não	-	Mitocondrial ^{1;2;3;4}
	CCW62833	B	603	200	21,803	5.88	Não	-	Citoplasma
	CCW60383	C	915	304	35,779	6.83	Não	-	Mitocondrial ^{2;3;4}
	CCW61570	D	819	272	31,028	5.86	Não	-	Citoplasma
<i>Bodo saltans</i>	CUG89033	A	699	232	25,887	8.39	Sim ^{Ph/Pr/Ip}	MRTIARSASAVSF AGLILGSCA	Mitocondrial ^{2;3;4}
	CUG89036	A	675	225	25,167	7.02	Não	-	Mitocondrial ^{1;2;3;4}
	CUF58200	B	582	193	21,327	5.95	Não	-	Citoplasma
	CUG93491	C	894	297	35,004	7.73	Sim ^{Ph/Ip}	MLRRASPITTSAA VAGAIVA	Mitocondrial ^{2;3/} Via de secreção ⁴
	CUF85097	D	846	281	31,153	7.13	Não	-	Mitocondrial ^{1;2;3}

Em *T. brucei* a diferenciação das FeSOD-B1 e B2 foi baseada na presença de resíduos distintos na região C-terminal da sequência: LKS (em *TbSODB1*) e SDL em (*TbSODB2*) que, por sua vez se assemelham a um peptídeo sinal SKL para peroxissomo que também é encontrado na grande maioria das enzimas glicossomais (DUFERNEZ et al., 2006). Não foi possível identificarmos estas sequências sinalizadoras para peroxissomo/glicossomo em todas as sequências agrupadas como FeSODB, uma vez que este sinal na região carboxi-terminal é facilmente degenerado (SOMMER; WANG, 1994), ou mesmo pela qualidade das montagens dos genomas analisados até o momento.

A presença desta classe de enzimas em diferentes compartimentos celulares reforça sua importância na detoxificação de ânions superóxidos produzidos em distintos processos metabólicos (SOMMER; WANG, 1994). Quanto mais efetiva for a ação contra as possíveis modificações intracelulares de EROs, mantendo o ambiente intracelular reduzido mais importante é a enzima, podendo ser considerada um potencial fator de virulência por permitir maior sobrevivência do parasito no interior da célula. Para Dufernez e colaboradores (2006) a SOD é provavelmente sintetizada no citoplasma e pode então permanecer lá ou ser transportada para outras organelas como já identificado em *T. brucei*.

Uma vez que não existe um consenso de nomenclatura destas enzimas, sugerimos classificar as FeSOD de tripanosomatídeos em: FeSOD-A, FeSOD-C e FeSOD-D para proteínas preditas como mitocondriais, FeSOD-B1 apenas as sequências preditas como citosólicas e FeSOD-B2 aquelas com a presença de sequências sinalizadoras para peroxissomo/glicossomo (SQL ou SDL).

Na análise filogenética quatro clados são claramente observados: A, B, C e D (Figura 13). Em cada clado foi possível identificar uma clara separação das espécies pertencentes ao clado formado pelas espécies de *Trypanosoma*. Um conjunto distinto de sequências de *S. culicis* e *A. deanei* foram agrupadas junto as sequências da FeSOB-B.

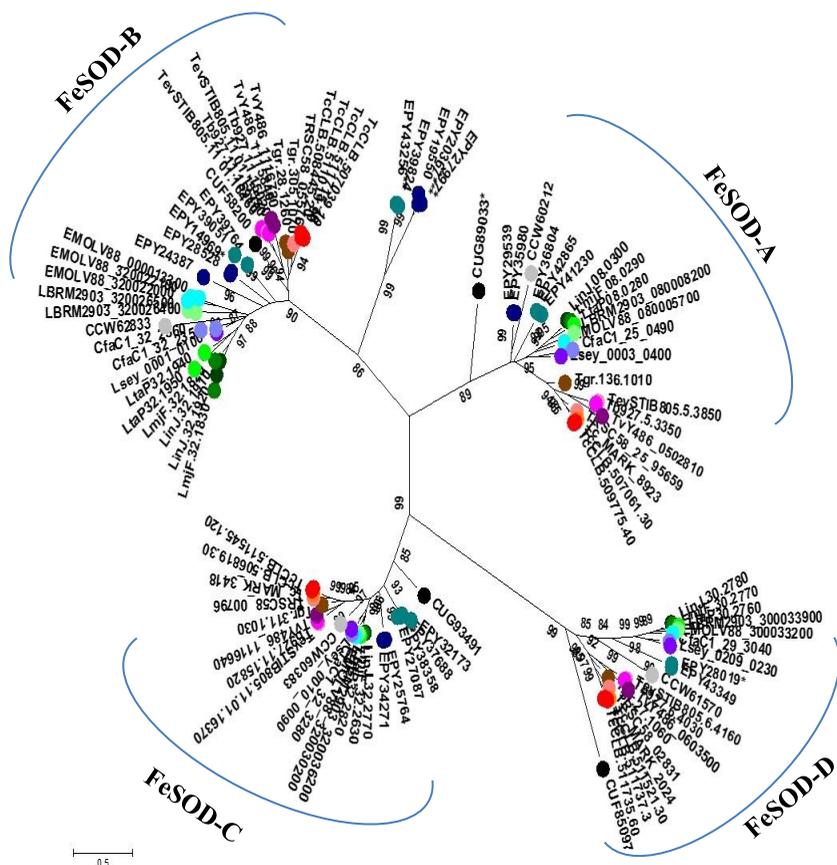


Figura 13: Análise filogenética molecular das sequências de aminoácidos das enzimas Ferro Superóxido Dismutases de kinetoplastídeos. O alinhamento das sequências aminoácídicas foi feito a partir do programa Clustal Omega e a história evolutiva inferida pelo método da Máxima Verossimilhança usando o programa MEGA versão 6.0. A filogenia dos genes APx foi construída utilizando o modelo de substituição de aminoácidos LG+G. As árvores estão desenhadas em escala, com o tamanho dos ramos relacionados ao número de substituições por sítio. As análises envolveram 105 sequências aminoácídicas. Valores de bootstrap acima de 80 são mostradas junto aos ramos, correspondendo a porcentagem de árvores nas quais a associação das espécies observada se manteve como indicada (1000 replicatas). As sequências anotadas dos Kinetoplastídeos foram retiradas do TriTrypDB ou NCBI e o número de acesso estão incluídos. * Sequências idênticas identificadas: ● *T. cruzi* (Esm. and Non Esm.); ● *T. cruzi marinkellei*; ● *T. gray*; ● *T. rangeli*; ● *T. brucei*; ● *T. evansi*; ● *T. vivax*; ● *L. infantum*; ● *L. major*; ● *L. braziliensis*; ● *L. tarentolae*; ● *C. fasciculata*; ● *L. seymouri*; ● *E. monterogeii*; ● *A. deanei*; ● *S. culicis*; ● *Phytomonas* sp.; ● *B. saltans*.

4.3.4 Evolução da defesa antioxidante

Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são continuamente sintetizadas como subprodutos do metabolismo de organismo aeróbios, além de serem também geradas como forma de defesa no interior de hospedeiros afim de eliminar parasitos (TURRENS, 2004; IRIGOIN et al., 2008; PAIVA; BOZA, 2014). Desta forma, todos os protozoários kinetoplastídeos parasitos necessitam eliminar continuamente as espécies oxidantes por ele produzidas, além de se defenderem das EROs e ERNs usadas pelo sistema imune como principais armas de defesa (MULLER et al., 2003; PAIVA; BOZA, 2014).

A presença de mecanismos que tornam o parasito capaz de resistir aos efeitos potencialmente letais do ataque proveniente de espécies oxidantes, como um conjunto de enzimas antioxidantes é portanto essencial e esperado nestes organismos, principalmente os parasitos.

A identificação de sequências de todos os genes analisados, relacionados direta ou indiretamente ao processo de detoxificação no ancestral dos tripanosomatídeos, protozoário de vida livre *B. saltans*, sugere que os mecanismos de defesa antioxidantes são uma adaptação anterior a este grupo de protozoários.

A maioria dos parasitos monoxênicos e todas as *Leishmania* sp. analisadas apresentaram poucas diferenças no número de cópias gênicas em relação ao *B. saltans* (Tabela 2). Entretanto, parasitos que albergam endossimbiontes como *A. deanei* e *S. culicis* apresentam alto número de cópias na maioria dos genes analisados. Esta característica também foi observada por Motta e colaboradores (2013) e é consistente com o alto número de regiões codificantes de genes (CDS) preditas como parciais no genoma destes parasitos, 16.957 e 12.157, respectivamente. Estes números de CDS são menores do que os preditos para *B. saltans* (18.936) (JACKSON et al., 2016), mas superior a todos os outros parasitos analisados. Basicamente em todas as análises feitas *A. deanei* e *S. culicis* não foram agrupados com outros parasitos monoxênicos incluídos nas análises como *C. fasciculata* e *L. seymouri*. Estes dois últimos apresentaram-se mais relacionados aos parasitos heteroxênicos *E. monterogeii* e *Leishmania* sp.

A redução genômica é esperada e observada em considerável número de parasitos como os tripanosomatídeos que parecem ter tido uma redução física no tamanho de seus genomas e na densidade gênica comparando com o parasito de vida livre *B. saltans* (JACKSON et al., 2016). Entre as espécies de tripanosomatídeos incluídas em nossas análises observou-se diferenças relacionadas a ausência de alguns genes

envolvidos na defesa antioxidante principalmente em *Phytomonas* sp. e no gênero *Trypanosoma*, indicando aparente redução nos genes desta via durante a diversificação dos tripanosomatídeos. A perda de genes como CS, GspS e APx parece ser um ponto comum em parasitos extracelulares, incluindo *Phytomonas* sp., *T. brucei*, *T. vivax*, *T. evansi* (Tabela 2). A exceção foi *T. grayi* que é um tripanosoma africano parasito extracelular de crocodilos e fortemente relacionado aos tripanosomas parasitos de crocodilos na América do Sul (KELLY et al., 2014). *T. grayi* é transmitido pela mosca tsetse via contaminação com metacíclicos infectivos presentes nas fezes. Assim como *T. cruzi*, a via de transmissão inclui *T. grayi* na seção Stercoraria. Neste contexto verificamos uma clara diferença entre os componentes do sistema antioxidante dos tripanosomas das seções Stercoraria e Salivaria. Como citado acima, os tripanosomas extracelulares da seção Stercoraria não possuem alguns genes e os parasitos Salivaria apresentaram alto número de cópias do gene para CβS e ausência do gene para a ODC. Interessantemente, *T. rangeli* que é um parasito cujo ciclo de vida no hospedeiro vertebrado ainda não é conhecido e é transmitido principalmente durante o repasto sanguíneo e eventualmente pelas fezes do triatomíneo, tem algumas enzimas ausentes como nos parasitos Salivaria e outras características mais relacionadas aos Stercoraria, como *T. cruzi*.

Todas as enzimas identificadas em *T. rangeli* mostraram maior similaridade com as ortólogas de *T. cruzi* do que de *T. grayi*. Entretanto, se compararmos o sistema antioxidante como um todo, incluindo enzimas presentes e ausentes, *T. cruzi* está mais intimamente relacionado ao africano *T. grayi* do que ao sul americano *T. rangeli*. Esta situação reforça que a presença de uma via específica em cada parasita não foi resultado de isolamento geográfico, mas baseia-se principalmente em diferenças na capacidade de parasitar, como a transmissão.

Outra singular característica de *T. rangeli* está relacionada a grande quantidade de pseudogenes em seu genoma, também apontada por Stoco e colaboradores (2014). No mínimo dois genes relacionados a defesa antioxidante em *T. rangeli* são pseudogenes: CS e APx. Ambos, apresentam codons de parada prematuros que antecedem os domínios específicos, sendo experimentalmente demonstrado pela inatividade da CS em *T. rangeli* (ROMERO et al., 2014). Deste modo, nossas análises demonstram que a evolução da defesa antioxidante em tripanosomatídeos compreende eventos evolução recentes e a perda ou adição de um gene pode acontecer em diferentes épocas na evolução dos kinetoplastida.

5 CAPÍTULO II

ESTUDO DOS GENES TRIPANOTIONA REDUTASE (TRed) E TRIPAREDOXINA PEROXIDASE (TRP_x) DE *Trypanosoma* *rangeli* - ANÁLISES DA EXPRESSÃO GÊNICA E PROTÉICA

5.1 OBJETIVOS DO CAPÍTULO

- Determinar os níveis e padrão de expressão dos genes que codificam as enzima tripanotiona redutase (*TrTRed*) e Triparedoxina peroxidase (citossólica e mitocondrial) em diferentes estágios do ciclo de vida de *T. rangeli*.
- Avaliar os níveis de expressão da proteína *TrTRed* e Triparedoxina peroxidase (citossólica e mitocondrial) em diferentes estágios do ciclo de vida de *T. rangeli*.
- Identificar possíveis modificações nos níveis de expressão das proteínas *TrTRed*, *TrTRPxcit* e *TrTRPxmit* durante estresse oxidativo induzido com exposição dos parasitos ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Considerações Éticas e de Biossegurança

As atividades abaixo foram desenvolvidas em dependências incluídas no certificado de Qualidade em Biossegurança da UFSC (CQB 101/99 publicado no D.O.U. nº 34-E de 22/02/1999, Seção 3, página 01) expedido pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio).

5.2.2 Parasitos

A cepa Choachí de *T. rangeli*, assim como a cepa Y de *T. cruzi* foram submetidas a passagens cíclicas triatomíneo-camundongo-triatomíneo e re-isolada por hemocultivo. Formas epimastigotas foram cultivadas a 27°C em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) suplementado com 10% de soro bovino fetal, 10 µg de estreptomomicina/ml e 10 unidades de penicilina/ml e mantidas por repiques semanais. Todas as culturas foram testadas para a presença de *Mycoplasma* sp. através de PCR. As cepas utilizadas encontram-se depositadas no criobanco do Laboratório de Protozoologia (MIP/CCB/UFSC).

5.2.2.1 Diferenciação *in vitro* para obtenção de formas tripomastigotas

As formas tripomastigotas de cultura de *T. rangeli* foram obtidas a partir da cultura de 120 X 10⁶ epimastigotas em fase exponencial de crescimento em meio DMEM pH 8,0 (Meio Engle Modificado por Dulbecco) (Sigma-Aldrich) suplementado com 5% de soro bovino fetal

(SBF) , 1 g/l de glicose e 6 mM de L-glutamina, conforme descrito por Koerich e colaboradores (2002) com modificações descritas por Stoco (2010). Os epimastigotas foram coletados (3.000 x g por 10 minutos), lavados duas vezes com PBS (tampão salina fosfato pH 7,4) e transferidos para garrafas de cultura celular de 45 cm² sem aeração, contendo o meio de diferenciação. Foram então mantidos por oito dias em estufa a 27°C. Após este período os parasitos foram coletados por centrifugação (3500 x g por 10 minutos) e a porcentagem de tripomastigotas foi determinada através de contagem e análise morfológica de 100 parasitos em lâmina corada com Giemsa (Merck). Foram realizados, no mínimo, três experimentos independentes para coleta de parasitos para extração de RNA e proteínas.

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

5.2.3 Determinação da Produção de NADPH Através da Medida da Atividade das Enzimas Glicose 6-Fosfato Desidrogenase (G6PD) e 6-Fosfogluconato Desidrogenase (6PGD) Da Via Das Pentoses

A produção de NADPH pela via das pentoses foi determinada como previamente descrito em Mielniczki-Pereira e colaboradores (2007). Os ensaios foram realizados nas dependências do Instituto de Biologia, Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pelos Professores Dr^a. Fernanda Gadelha e Dr. Eduardo Peloso. Resumidamente, os parasitos (5 x 10⁷ /ml) foram coletados por centrifugação e ressuspendidos em PBS (pH 7,4) na presença de inibidor de protease e então adicionados ao tampão da reação contendo 50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 2 mM MgCl₂, 250 µM NADP⁺, 1 mM glicose-6-fosfato e 1 mM 6-fosfogluconato. A reação foi monitorada espectrofotometricamente por 10 minutos a 340 nm pela produção de NADPH assumindo-se o coeficiente de extinção molar de 6.220. A lei de Lambert-Beer foi utilizada para os cálculos finais.

Equação 1: Lei de Lambert-Beer:

$$C = (ABS_{\text{final}} - ABS_{\text{inicial}} \times \text{diluição}) / \text{coeficiente de extinção do NADPH}$$

Os valores da média e desvio padrão de três experimentos independentes feitos em duplicatas foram analisados estatisticamente pelo teste *t* de Student com **p* > 0,05.

5.2.4 Determinação do Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) Produzido e Liberado por *T. rangeli*

Parasitas (5×10^7 parasitos/ml) foram incubados em PBS na presença de 5 mM succinato, 40 μ M digitonina, 1 U/ml de *horseradish* peroxidase (HRP - Sigma) e 25 μ M Amplex™ Red (*10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazine*) (Molecular Probes®). A fluorescência foi monitorada em espectrofotômetro Hitachi F2500 sob agitação constante nos comprimentos de onda de excitação de 563 nm e de emissão de 587 nm. A correlação quantitativa entre a fluorescência e o H₂O₂ liberado pelas células foi determinada de acordo com o descrito em Barros e colaboradores (2004). O experimento foi realizado em triplicatas biológicas com duplicatas técnicas. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste *t* de Student com *p* < 0,05.

Este experimento foi realizado nas dependências do Instituto de Biologia, Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pelos Professores Dr^a. Fernanda Gadelha e Dr. Eduardo Peloso.

5.2.5 Ensaio de atividade enzimática da Tripanotiona redutase

Os ensaios enzimáticos da tripanotiona redutase de *T. rangeli* foram realizados a partir da oxidação de NADPH dependente de tripanotiona (FAIRLAMB et al., 1995). O sistema de ensaio padrão (200 μ L) consistiu de tampão contendo 20 mM de Hepes pH 7,4, 30 mM de NaCl, 0,1 mM de EDTA, 150 μ M de NADPH e a reação foi iniciada pela adição de 15 μ M tripanotiona dissulfeto (T(S)₂). Os ensaios foram feitos em quintuplicatas em placa de 96 poços. Os controles negativos adicionados a placa foram: reagentes sem NADPH (CN NADPH), reagentes sem a enzima (CN enzima) e reagentes sem a tripanotiona (CN T(S)₂). Como controle positivo utilizou-se a proteína recombinante tripanotiona redutase de *T. cruzi* (EGER, 2010). Alterações na absorbância foram monitoradas pela leitura do consumo de NADPH no leitor de microplaca TECAN a 340nm a 27°C por 3 minutos (registros a cada 30 segundos, utilizando o delta de absorbância). Uma unidade de

atividade (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a conversão de 1 μmol de NADPH a NADP^+ por minuto a 27°C . Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol}/\text{min.}/\text{mg}$ de proteína. Os valores de referência usados foram Coeficiente de Extinção Molar NADPH $\epsilon\text{M} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} = 6.22 \times 10^{-3} \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1} = 6.22 \times 10^{-3} \text{ L}/\mu\text{mol}/\text{cm} = 6.22 \times 10^{-3} \text{ ml}/\text{nmol}$ se assumir pathlength de 1 cm.

Equação 2: Cálculo para determinar atividade da enzima Tripanotona redutase (TRed).

$$\mu\text{mol}/\text{min.}/\text{mg} = (\Delta\text{A}_{\text{amostra}} - \Delta\text{A}_{\text{branco}}) \times (\text{Volume da amostra em ml}) / \epsilon\mu\text{M} \times (\text{volume da amostra em ml})/\text{mg proteína}$$

5.2.6 Extração de DNA e RNA de *T. rangeli*

Para a extração do DNA total, formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli* foram submetidas ao método do fenol clorofórmio descrito por Sambrook, Fritch; Maniatis (2001). Após a extração o DNA foi solubilizado em tampão TE (EDTA 1 mM pH 8,0, Tris-HCl 10 mM pH 8,0) e sua concentração e pureza avaliadas através de espectrofotometria a 260 e 280 nm em equipamento BioPhotometer® (Eppendorf). As amostras também foram visualizadas em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), para avaliação da integridade do DNA extraído e presença de RNA. As amostras de DNA foram armazenadas à -20°C .

Para a extração de RNA total os parasitos foram coletados e centrifugados a $3.500 \times g$ por 10 min, lavados duas vezes com PBS pH 7,4, homogeneizados vigorosamente em 1 ml do reagente Trizol® (Invitrogen) e armazenados a -80°C até realização da extração de RNA total.

Após o descongelamento, as amostras foram mantidas por 5 minutos a temperatura ambiente e então se adicionou às mesmas 200 μl de clorofórmio 98% (Merck). As amostras foram agitadas por 15 segundos, mantidas a temperatura ambiente por 2 minutos e centrifugadas a $12.000 \times g$ por 15 minutos a 4°C . A fase aquosa resultante foi transferida para um novo tubo onde adicionou-se 500 μl de isopropanol (Merck). Nova centrifugação foi realizada a $12.000 \times g$ por 20 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 1 ml de etanol 75%

gelado e então centrifugado a $12.000 \times g$ por 5 minutos a 4°C . O sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento contendo o RNA total foi seco invertendo-se os tubos sobre papel por aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente. O RNA total foi então solubilizado em $20 \mu\text{l}$ de água ultrapura livre de nucleases e armazenado a -80°C .

As amostras obtidas tiveram sua concentração e pureza avaliadas em um espectrofotômetro Pico100 (*Picodrop Spectrophotometer*), observando-se as relações de absorvância $260/280 \text{ nm}$ e $260/230 \text{ nm}$.

5.2.6.1 *Tratamento com DNase*

Com o objetivo de purificar as amostras de RNA de qualquer DNA contaminante, as mesmas foram submetidas a tratamento com DNase I (Thermo Scientific) na razão de uma unidade por μg de RNA extraído. A reação ocorreu durante 30 min a 37°C , na presença de tampão recomendado pelo fabricante. A enzima DNase I foi inativada pela adição de $1 \mu\text{l}$ de EDTA (50 mM) e aquecimento a 65°C por 10 minutos.

5.2.6.2 *Transcrição reversa (RT-PCR)*

A partir das amostras tratadas com DNase, $1,5 \mu\text{g}$ de RNA foram submetidos a uma reação de transcrição reversa. A RT-PCR foi realizada a 37°C por 50 minutos na presença de 200 unidades da enzima transcriptase reversa M-MLV RT (Invitrogen), $500 \mu\text{M}$ de dNTP (Invitrogen), 25 pmoles do iniciador OligodT, 10 mM de DTT (Invitrogen) e 40 unidades do inibidor de ribonucleases RNaseOUT™ (Invitrogen), em tampão recomendado pelo fabricante. A inativação da reação foi realizada a 70°C por 15 minutos. O DNA complementar (cDNA) obtido foi armazenado a -20°C .

5.2.7 **Amplificação Dos Genes**

5.2.7.1 *Desenho dos iniciadores para PCR*

A sequência completa da janela de leitura dos genes *TrTRed*, *TrTRPxcit* e *TrTRPxmit*, foram obtidas a partir do banco de dados do Projeto Genoma do *T. rangeli* (www.rangeli.incc.br e TriTryp). Os iniciadores foram desenhados a partir da sequência dos genes alvos

utilizando-se o programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) respeitando-se recomendações previamente descritas (UDVARDI; CZECHOWSKI; SCHEIBLE, 2008). A ausência de dímeros e grampos entre os pares de iniciadores foi confirmada pelo programa *Primer Select* do pacote DNASTAR[®] (Lasergene) e Fast PCR². Na sequência dos iniciadores foram inseridos os sítios de restrição das enzimas³ *Bgl* II e *Kpn* I (*TrTRRed* e *TrTRPxmit*) e *Sla* I e *Kpn* I (*TrTRPxcit*) para facilitar clonagem em vetor de expressão pLEXSYNeo 2 (Jena Bioscience), em destaque na tabela 18.

Tabela 18: Sequências dos oligonucleotídeos para os genes da triparedoxina peroxidase citosólica (*TrTRPcit*), triparedoxina peroxidase mitocondrial (*TrTRPmit*) e tripanotiona redutase (*TrTRRed*) utilizados em PCR.

<i>Nome</i>	Sequência 5' → 3'	Tamanho Transcrito (pb)
<i>TrTRRed</i>	AGATCTATGAAAGCCTTTGATTGGTTG GGTACCAGCCTCTAGAGCCGTTTCCG	1460
<i>TrTRPxcit</i>	CTCGAGATGGCGTTGATGCCCAACG GGTACCAGCTACGGCATTGAAGTACTCC	546
<i>TrTRPxmit</i>	AGATCTATGTTCCGTCGTATGACTG GGTACCGCTTGCCTTTTCAGGC	633

Fonte: Elaborada pela autora, 2015.

5.2.7.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR):

O DNA genômico extraído conforme o descrito no item 5.1.6 foi utilizado como molde para amplificar, via PCR, os fragmentos dos genes de interesse utilizando os iniciadores desenhados e identificados na Tabela 18.

As reações ocorreram na presença de uma unidade da enzima *Taq* DNA polimerase em seu tampão (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂, 200 μM de dNTP (Invitrogen), 10 pmoles dos iniciadores e 25 ng de DNA genômico da cepa Choachí de *T. rangeli* e da cepa Y de *T. cruzi*. Em cada

² O manual, licença e arquivos de instalação estão disponíveis na Internet em: <http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/programs/fastpcr.htm> ou a partir de PrimerDigital Ltd: <http://www.primerdigital.com/>

³ Sítios de restrição demonstrados em verde na Tabela 2.

conjunto de reação foi adicionado um controle negativo, composto de todos os reagentes necessários à amplificação, exceto o DNA molde. A amplificação foi realizada em um termociclador Mastercycler® Gradient (Eppendorf), utilizando o seguinte programa: desnaturação inicial a 95°C por 5 min. seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min., anelamento dos iniciadores a 64°C por 1 min. e extensão 72°C por 1 min. e 30 segundos. Ao final dos ciclos, foi realizada extensão final por 5 min. a 72°C.

Todos os procedimentos de pré e pós-amplificação foram realizados em locais diferentes sem compartilhamento de materiais, reagentes e/ou equipamentos. Os produtos de amplificação da PCR foram resolvidos por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, sendo os resultados registrados digitalmente.

5.2.8 Suscetibilidade ao Estresse

A concentração da solução de H₂O₂ utilizada durante os experimentos de indução de estresse foi confirmada antes de cada uma das replicatas em espectrofotômetro a 230 nm utilizando-se como base de cálculo o coeficiente de extinção molar de 81 M⁻¹cm⁻¹ (PENKETH; KLEIN, 1986) e a lei de Lambert-Beer.

5.2.8.1 Detecção intracelular de espécies reativas de oxigênio (H₂O₂) através de sonda fluorescente DCFH-DA

Em placa de 96 poços, epimastigotas de *T. rangeli* e *T. cruzi* (5 × 10⁵ parasitos/poço) foram incubados em 200 µL meio de cultura LIT suplementado com 10% SBF contendo diferentes concentrações (0 – 1.000 µM) de peróxido de hidrogênio (H₂O₂ - Merck). Transcorridos 10 minutos de incubação, 10 µM da sonda DCFH-DA foram adicionados e a intensidade de fluorescência determinada a 27°C em um espectrofluorímetro (Infinite M200, TECAN) durante 1 hora (485 nm de excitação e 535 nm de emissão) em intervalos de 5 minutos.

Os resultados destes experimentos, feitos em duplicata biológicas e quadriplicatas técnicas, foram expressos em intensidade de fluorescência por tempo (segundos) e analisados estatisticamente pelo teste da análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Bonferroni (*p > 0,05).

5.2.8.2 Experimentos de indução de estresse oxidativo

Parasitas sob a forma epimastigota em fase exponencial (50×10^6 células) foram coletados após contagem em câmara de Neubauer, centrifugados ($3.000 \times g$ por 10 minutos) e lavados por duas vezes em PBS estéril pH 7,4. Após as lavagens foram ressuspensos em meio LIT 10% SBF e submetidos ao agente oxidante H_2O_2 na concentração final de $67 \mu M$ por 30, 60 ou 90 minutos, além de também receberem a dose determinada de forma gradual a cada 20 minutos por uma hora. Depois do tratamento foram centrifugados e lavados por duas vezes com PBS pH 7,4 e armazenados a $-20^\circ C$ para extração de proteínas que foram avaliadas por *Western blot*. A concentração final de H_2O_2 utilizada foi baseada em experimentos anteriores que determinaram a sensibilidade de *T. rangeli* a este oxidante (IC_{50}) (ROMERO et al., 2014).

5.2.9 Avaliação da expressão gênica e proteica das enzimas triparedoxina peroxidase citosólica e mitocondrial e da tripanotonia redutase de *T. rangeli*

5.2.9.1 Desenho dos iniciadores para qPCR

As sequências completas dos genes *TrTRed*, *TrTRPxcit* e *TrTRPxmit*, bem como dos genes de referência escolhidos para o PCR em tempo real, GAPDH e RNA60S (PRESTES, 2013), foram obtidas a partir do banco de dados do Projeto Genoma do *T. rangeli* (www.rangeli.lncc.br, TriTryp e Genbank). O desenho dos iniciadores foi realizado conforme o já descrito no item 5.2.7.1. A sequência dos iniciadores e o tamanho previsto dos transcritos estão elencados na tabela 19.

Tabela 19: Sequências dos oligonucleotídeos para os genes da triparedoxina peroxidase citosólica (*TrTRPcit*), triparedoxina peroxidase mitocondrial (*TrTRPmit*) e tripanotiona redutase (*TrTRed*) a serem utilizados para qPCR com o tamanho aproximado dos transcritos esperados, assim como sequência dos genes de referência.

<i>Iniciador</i>	Sequência 5' → 3'	Tamanho do Transcrito (pb)
<i>qTrTRed</i>	CGAAAGACTGATCACACCCG CGAGTGCCGTCTTCTCTATTCCTC	216
<i>qTrTRPxcit</i>	CCAACGGCACCTTCAAGAAG CCATAGAGCAGGCAAGCACC	171
<i>qTrTRPxmit</i>	TCGTACATCACGGTGAATG GGCTTCATTGTTGGTTGACC	141
GAPDH	GCG ACA CCA GCA TCA AAG AG CTG TGC TCA CAA GTT CCT CG	-
RNA60S	CGA TGA AGC TCA AGT GGA CC CGG TTG TAC TTG ACG GGA AC	-

Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

5.2.9.2 Reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR)

O cDNA (item 5.2.6.2) foi submetido ao PCR em tempo real para amplificação e quantificação relativa dos transcritos dos genes *TrTRPxcit*, *TrTRPxmit* e *TrTRed* sendo diluído duas vezes em água ultrapura livre de nucleases. As reações foram realizadas em placas de 96 poços AB-C (Axygen) com volume final de 10 µl na presença do reagente *Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix* (Thermo Scientific), de acordo com as orientações do fabricante e 0,2 µM dos iniciadores (Tabela 12). As placas foram cobertas por selante óptico *MicroAmp® Optical Adhesive Film* (Applied Biosystems) e então analisadas em equipamento *ABI Prism® 7900HT Sequence Detection System* (Applied Biosystems) do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB–UFSC). As reações tiveram inicialmente uma etapa de desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos contendo etapa de desnaturação a 95°C por 15 segundos e uma etapa de ligação dos iniciadores (61°C por 1 minuto para TRed e TRPxmit e 64°C para TRPxcit). Ao final, foi incluída uma etapa para obtenção da curva de dissociação (95°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos e, novamente, 95°C por 15 segundos). Em cada placa foi adicionado um controle negativo para cada par de iniciadores,

composto por todos os reagentes necessários à amplificação, com exceção do DNA molde.

A eficiência da qPCR para cada par de iniciadores foi calculada conforme Prestes (2013), através da diluição seriada 1:2 de amostras de DNA genômico e de misturas de cDNA (cinco pontos). A inclinação da reta, obtida a partir da função entre o C_q (ciclo de quantificação) e cada ponto da diluição, será aplicado à equação:

Equação 3: Cálculo para determinação da eficiência da qPCR.

$$E = 10^{-1/\text{slope}} - 1$$

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

5.2.9.3 Análise dos resultados da qPCR e estatística dos resultados

Os experimentos de qPCR foram realizados em triplicata biológica e em duplicata técnica, sendo posteriormente analisados pelo software SDS 2.4 (Applied Biosystems). Para avaliar a variação relativa nos níveis de cada transcrito entre as amostras analisadas, foi utilizado o método da quantificação relativa (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

As análises estatísticas, bem como a confecção dos gráficos (valor QR no eixo x e amostras no eixo y), foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.0. O teste estatístico t de Student (*Mann Whithney*) foi utilizado com valores p menores que 0,05 sendo considerados estatisticamente significantes.

5.2.9.4 Extração de proteínas totais de Trypanosoma rangeli

Para extração de proteínas foram utilizados sedimentos de *T. rangeli* sob as diferentes formas do ciclo de vida, assim como parasitos sob a forma epimastigota após a indução de estresse por H₂O₂ e parasitos transfectados e superexpressando a proteína TrTRed. O sedimento de parasitas, em banho de gelo, foi acrescido de tampão de lise contendo 0,25 M de sucrose, 0,25% de Triton X-100, 10 mM de EDTA e de um coquetel de inibidores de proteases (2 mM de AEBSF, 0,3 μM de Aprotinina, 116

μM de Bestatina, 14 μM de E-64, 1 μM de Leupeptin e 1 mM de EDTA - P2714- Sigma-Aldrich). Após rápida ruptura mecânica por pipetamento e agitação, as amostras foram centrifugadas a 4°C por 30 minutos a 12.000 x g. O sobrenadante resultante da centrifugação com as proteínas totais foi separado, alíquotado e armazenado à -20°C até o uso.

5.2.9.5 Dosagem de proteínas

A quantificação das proteínas totais do *T. rangeli* foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Como padrão utilizou-se curva de albumina de soro bovino (BSA) em triplicatas nas concentrações: 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 5,0, 6,0 e 8,0 μg de BSA por poço. Para a dosagem das proteínas foram utilizados 4 μl das proteínas concentradas e diluições de cinco ou dez vezes. Após pipetar as amostras na placa, 196 μl do reagente de Bradford (100 mg Coomassie Brilliant Blue G250; 50 ml etanol 95% e 100 ml ácido fosfórico 85%) foram adicionados a cada poço. A placa foi mantida à temperatura ambiente por 5 min. e posteriormente submetida à leitura a 595 nm em multileitora Infinite M200 (Tecan) A concentração das proteínas foi calculada com base na curva padrão de BSA.

5.2.9.6 Western Blot

Extratos proteicos totais contendo 50 μg de proteínas de *T. rangeli* e *T. cruzi* nas diversas condições a serem analisadas foram solubilizados em tampão de amostra desnaturante (20% glicerol, 0,5% azul de bromofenol, 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 4,4% SDS, 2% β -mercaptoetanol), aquecidos a 95°C durante 5 minutos e resolvidos em eletroforese em géis SDS-PAGE. Em seguida foram transferidos, durante 2 horas a 100 V, para membranas de nitrocelulose Hybond-ECL[®] (GE Healthcare). Após confirmação da transferência das proteínas pela coloração com Ponceau 1%, as membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5% diluído em tampão de *blotting* (25mM Tris HCl ph 7,4, 150mM NaCl, 0,1% Tween 20) *overnight* a 4°C ou por 1 hora sob agitação em temperatura ambiente. Após a retirada do excesso do agente bloqueador através de cinco lavagens de 5 minutos com tampão de *blotting*, adicionou-se às membranas uma solução do mesmo tampão contendo leite desnatado a 2% e o anticorpo primário. Os antissoros policlonais foram desenvolvidos contra cada proteína de interesse, sendo gentilmente cedidos pelas

Professoras Dr^a. Silvane Murta/ CPqRR/Fiocruz Minas (anti *Tc*TRed – 1:500 e anti *Tc*TRPxcit 1:2000) e Dr^a. Fernanda Ramos Gadelha do Instituto de Biologia, Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) (antissoros anti *Tc*TRPxcit 1:2.500 e *Tc*TRPXmit 1:500). As membranas foram mantidas em contato com os antissoros primários por 60 a 90 minutos a temperatura ambiente sob agitação branda.

A ligação do anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (para cauda de histidina e α -tubulina) ou anti-IgG de coelho (para tripanotona redutase e triparedoxinas peroxidases) conjugados à peroxidase (Sigma Aldrich) foi feita após mais cinco lavagens das membranas, em uma diluição de 1:10.000. Para finalizar, as membranas foram lavadas e reveladas através da utilização do reagente *Pierce*[®] *ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Fisher Scientific), em filmes radiográficos IBF Medix (Indústria Brasileira de Filmes). Após a exposição, os filmes foram revelados utilizando o processador automatizado de filmes SRX-101A (Konica Minolta Medical & Graphic) ou as membranas foram reveladas no equipamento Molecular Imager[®] Gel Doc[™] (BioRad).

5.2.9.7 *Análise densitométrica da intensidade das bandas dos genes e das proteínas*

Para análise densitométrica das bandas os filmes foram digitalizados e as imagens foram diretamente analisadas através do programa *Image J*. A normalização foi feita com base na quantidade do sinal das bandas da α -tubulina.

5.2.9.8 *Efeito de antioxidantes no crescimento de T. rangeli e na expressão proteica de TRed*

Epimastigotas (2×10^6 /ml) foram crescidos em meio LIT suplementado com 10% de soro bovino fetal por 15 dias a 27 °C na presença de duas diferentes concentrações (1 e 2.5 mM) dos antioxidantes glutationa reduzida (GSH) ou N-acetilcisteína (NAC) (Sigma-Aldrich). Os experimentos foram feitos em triplicatas, sendo os parasitos contados todos os dias em câmara de Neubauer. Amostras dos parasitos foram coletadas nos dias 1, 3, 5, 7, 9 e 11 para análise da expressão da TRed através de *western blot* usando anti-rTcTRed e anti β -tubulina, conforme item 5.2.9.6.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Avaliação da produção de NADPH pela via das pentoses em epimastigotas de *Trypanosoma rangeli* e determinação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) mitocondrial liberado.

O NADPH advindo da via das pentoses é a principal fonte de elétrons utilizados no processo de redução da tripanotona pela enzima tripanotona redutase, a qual permite de forma direta ou indireta a atividade antioxidante em tripanosomatídeos.

A medida combinada da atividade das enzimas G6PDH e 6PGD, que são encontradas tanto no citosol como no glicossomo em tripanosomas, permitiu a determinação da produção em epimastigotas de *T. rangeli* de $1,1 \pm 0,05$ nmol NADPH / 10^7 cels. min. Em epimastigotas de *T. cruzi* nas mesmas condições os valores são significativamente maiores (* $p < 0,05$) $2,13 \pm 0,09$ nmol NADPH / 10^7 cels. min. (Figura 14).

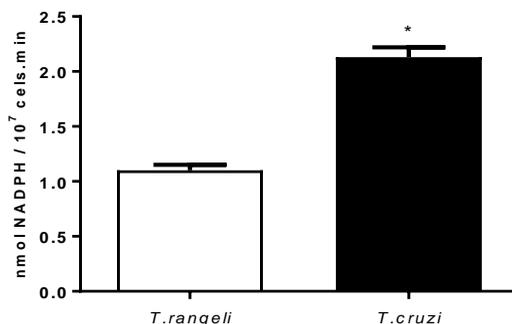


Figura 14: Produção de NADPH pela via das pentoses é menor em epimastigotas de *T. rangeli* que em epimastigotas de *T. cruzi* nas mesmas condições. 10^7 células foram incubadas em 50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100, 2 mM MgCl₂, 250 μ M NADP⁺ e 1 mM glicose-6-fosfato and 1 mM 6-fosfogluconato para medida da atividade das enzimas glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD) e 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGD) em espectrofotômetro. Os valores correspondem a média e desvio padrão de três experimentos independentes feitos em duplicatas. Análise estatística por teste *t* de Student (* $p < 0,05$).

As enzimas da via PPP nos diferentes estágios de vida de *T. cruzi* foram analisadas por Maugeri e Cazzulo (2004) que observaram expressão aumentada das mesmas principalmente na forma

tripomastigota (metacíclica e sanguínea), provável adaptação à exposição ao estresse oxidativo verificado no hospedeiro mamífero.

Ambientes altamente oxidativos demandam aumento na síntese de NADPH (GARCIA et al., 2009) pelo parasito como fonte primária de equivalentes reduzidos para reações de oxidação-redução envolvidas na proteção contra a toxicidade a EROs (IGOILLO-ESTEVE et al., 2007; LEROUX et al., 2010). Desta forma, para *T. rangeli* uma pequena síntese de NADPH em epimastigota quando comparado a *T. cruzi* a princípio é inconsistente com a necessidade nesta etapa da vida deste parasito, onde o mesmo entra em contato direto com diferentes ambientes altamente oxidativos. Entretanto, outras enzimas são citadas na literatura como corresponsáveis pela manutenção do ambiente reduzido, além das desidrogenases da via PPP (LEROUX et al., 2010) como a glutamato desidrogenase (BARDERI et al., 1998) e a enzima málica (CANNATA et al., 1979). Nestas outras vias as fontes de carbono utilizadas no metabolismo energético diferem de acordo com a biodisponibilidade no local e hospedeiro (MARTINEZ, 2008). Assim, *T. cruzi* e *T. brucei* dependem da enzima málica para produção de NADPH em ambientes onde a glicose está ausente ou escassa como intestino dos insetos vetores e no interior das células hospedeiras. Nestes ambientes o aminoácido prolina é a fonte utilizada em detrimento da glicose (HELLEMOND et al., 2005; LEROUX et al., 2010; ALLMANN et al., 2013).

Os papéis relativos as enzimas da via PPP e as reações alternativas para proporcionar quantidade adequada de NADPH não foram investigados até o momento em *T. rangeli*.

Considerando o envolvimento central do NADPH na resposta antioxidante e a diferença observada na produção deste entre duas espécies que diferem quanto à patogenia tanto em seus hospedeiros mamíferos quanto invertebrados, investigamos também a liberação de H_2O_2 mitocondrial por estes parasitos utilizando células permeabilizadas por digitonina e utilizando succinato para permitir o consumo de oxigênio. A cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias é a principal geradora de EROs, incluindo H_2O_2 que facilmente se difunde através da membrana e interage com seus componentes (COSENTINO-GOMES et al., 2009).

A produção endógena de H_2O_2 por epimastigotas de *T. rangeli* foi de $14,2 \pm 1,6$ pmoles de $H_2O_2 / 10^7$ cels. min., uma produção considerada alta quando comparada a de *T. cruzi* (aproximadamente 8 pmoles de $H_2O_2 / 10^8$ células) (PELOSO et al., 2011). Esse resultado pode estar relacionado em *T. cruzi* a presença de um sistema de eliminação adicional de H_2O_2 associado a presença de elevados níveis de redução de ascorbato

e atividade enzimática da ascorbato peroxidase, aparentemente ausente em *T. rangeli* (TEMPERTON et al., 1998). Outra explicação seria uma capacidade menor em metabolizar o H_2O_2 por parte do *T. rangeli* ou mesmo a expressão diferenciada das enzimas superóxido dismutase, fato este que ainda não foi investigado neste parasito.

Quando a geração de EROs excede a capacidade antioxidante da mitocôndria, o estresse oxidativo pode levar ao dano mitocondrial caso as enzimas antioxidantes não entrem em ação (ANDREWS, 2012; DHIMAN et al., 2013).

A ação do H_2O_2 como causador de danos celulares, assim como de outras EROs, tem sido revista por pesquisadores como Paiva e colaboradores (2012) e Goes e colaboradores (2016) que demonstraram que o estresse oxidativo pode melhorar a capacidade infectiva de *T. cruzi*. Trabalhos futuros precisam ser desenvolvidos para elucidar a função de EROs durante a infecção por *T. rangeli*.

5.3.2 Níveis de atividade da enzima tripanotiona redutase (*TrTRed*) em diferentes fases do ciclo de vida de *Trypanosoma rangeli*

A enzima TRed em *T. rangeli* mostrou atividade tanto em epimastigotas (3,11 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína) como em tripomastigotas (1,98 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína). A diferença entre as fases de vida deste parasito foram estatisticamente significantes, demonstrando maior atividade nas formas replicativas. Em *T. cruzi* os resultados foram contrários, sendo esta enzima mais ativa nas formas tripomastigotas (2,74 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína) do que em epimastigotas (1,71 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína), sendo a diferença entre as fases replicativa e infectiva não significativa (Figura 15).

Para *T. rangeli* estes resultados de atividade relacionam-se de forma direta com a maior expressão gênica na fase proliferativa deste parasito e, corroboram com nossa hipótese inicial de que este parasito tem poder de resposta menor na fase em que mais sofre os efeitos do estresse oxidativo e nitrosativo, ou seja, na fase infectiva ou tripomastigota.

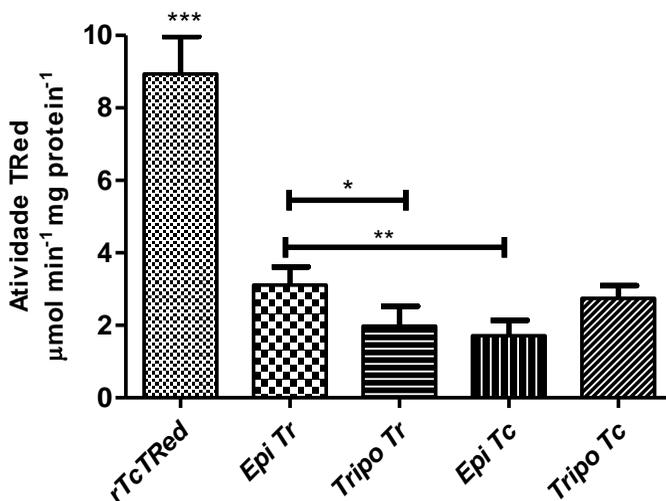


Figura 15: Detecção da atividade enzimática da enzima tripanotiona redutase em extratos proteicos de epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli* e *T. cruzi*. A enzima recombinante de *T. cruzi* (rTcTRed) foi usada como controle positivo. Os resultados representam a média e desvio padrão de 3 experimentos feitos em triplicatas analisados estatisticamente utilizando-se análise de variância de uma via (ANOVA) seguido de teste de comparação múltipla de Bonferroni (* $p < 0,05$).

5.3.3 Amplificação e clonagem dos fragmentos gênicos codificadores das proteínas de interesse tripanotiona redutase (*TrTRed*) e triparedoxina peroxidase (citossólica e mitocondrial) em *Trypanosoma rangeli* via reação em cadeia da polimerase (PCR)

A amplificação dos três genes, *TrTRPmit*, *TrTRPcit* e *TrTRed*, foi realizada através de PCR que foi primeiramente padronizada avaliando-se diferentes concentrações de DNA (10 ng e 25 ng) e diferentes temperaturas de ligação dos iniciadores através do uso de gradiente de temperatura. O resultado das PCR foi observado após uma eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio, sendo que o aumento na concentração de DNA na reação permitiu uma melhora na amplificação revelada pela intensidade das bandas específicas obtidas. Assim sendo, procedeu-se para as amplificações posteriores utilizando-se 25 ng de DNA.

Os iniciadores desenhados visando a amplificação dos genes *TrTRPxcit*, *TrTRPxmit* e *TrTRRed* de *T. rangeli* mostraram-se específicos, apresentando os produtos de amplificação como bandas únicas em gel de agarose com tamanhos próximos aos esperados teóricos de 549 pb para *TrTRPxcit*, 681 pb para *TrTRPxmit* e 1.473 pb para *TrTRRed*. Apenas o iniciador *TrTRPxcit* foi capaz de gerar produtos de amplificação a partir de DNA genômico de *T. cruzi* (Figura 16).

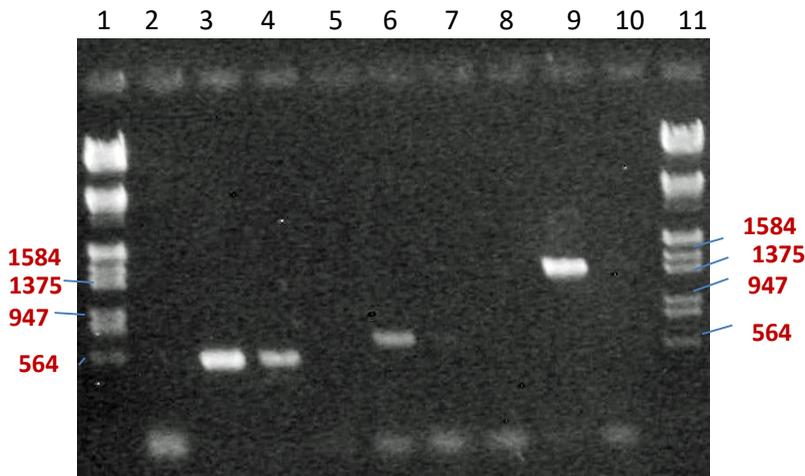


Figura 16: Eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídio revelando os produtos de amplificação de 25 ng/ μ l de DNA obtidos pela reação de PCR. 1. Padrão de peso molecular (DNA do fago lambda digerido com as enzimas de restrição *Hind* III e *Eco*RI), 2. Controle negativo da reação (Sem adição de DNA) com iniciadores p*TrTRPxcit* Fow e Rev 3. Cepa Choachí com iniciadores p*TrTRPxcit* Fow e Rev, 4. Cepa Y de *T. cruzi* com iniciadores p*TrTRPxcit* Fow e Rev., 5. Controle negativo da reação (Sem adição de DNA) com iniciadores p*TrTRPxmit* Fow e Rev 6. Cepa Choachí com iniciadores p*TrTRPxmit* Fow e Rev., 7. Cepa Y de *T. cruzi* com iniciadores p*TrTRPxmit* Fow e Rev., 8. Controle negativo da reação (Sem adição de DNA) com iniciadores p*TrTRRed* Fow e Rev , 9. Cepa Choachí com iniciadores p*TrTRRed* Fow e Rev 10. Cepa Y de *T. cruzi* com iniciadores p*TrTRRed* Fow e Rev., 11. Padrão de peso molecular (DNA do fago lambda digerido com as enzimas de restrição *Hind* III e *Eco*RI)

DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS E PADRÃO DE EXPRESSÃO DOS GENES QUE CODIFICAM AS ENZIMAS TRIPAREDOXINA PEROXIDASE CITOSÓLICA E MITOCONDRIAL (*TrTRPxcit* e *TrTRPxmit*) E TRIPANOTONA REDUTASE (*TrTRed*) EM *Trypanosoma rangeli*.

Os tripanosomatídeos parasitas apresentam em seu ciclo digenético mudanças morfológicas complexas que são determinantes na capacidade adaptativa dos mesmos aos ambientes distintos de seus hospedeiros invertebrados e vertebrados. Cada estágio de diferenciação expressa um padrão de proteínas específicas envolvidas no processo de adaptação ao novo ambiente onde o parasito deve lidar com a geração exógena e endógena de EROs e ERNs para garantir a sua infecção (DÍAZ; SOLARI; GONZÁLEZ, 2011; PELOSO et al., 2012).

Conforme já descrito por diferentes autores, existe uma relação direta entre o sucesso da infecção e a efetividade do sistema antioxidante, uma vez que proteínas desse sistema estão entre as mais expressas durante a diferenciação de epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos em *T. cruzi* (ATWOOD et al., 2005; PINEYRO et al., 2008; PIACENZA et al., 2009 a, b; GRETES; POOLE; KARPLUS, 2012). Esse aumento na expressão permite ao parasita lidar com um ambiente altamente oxidativo no interior dos macrófagos (ATWOOD et al., 2005). González-Pino e colaboradores (1999) demonstraram também para *T. cruzi* uma expressão diferencial do genoma do parasita nas diferentes fases do seu ciclo de vida e também ao longo da curva de proliferação.

5.3.4 Quantificação relativa dos genes TRed , TRPXcit e TRPXmit por PCR em tempo real (qPCR)

A quantificação relativa de transcritos por qPCR requer a comparação com genes de referência cujo níveis de transcrição se mantenham estáveis durante todos os estágios de diferenciação celular. Assim sendo, foram selecionados dois genes de referência que comumente são utilizados para tripanosomatídeos, o GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase) e o RNA60S (RNA ribossômico 60S) cujas sequências foram obtidas no banco de dados do projeto genoma do *T. rangeli*.

Os iniciadores desenhados foram primeiramente avaliados qualitativamente a partir de uma PCR convencional utilizando como molde o DNA genômico de *T. rangeli* (cepa Choachí) e fragmentos no

tamanho esperado foram obtidos para todos os genes sem a presença de dímeros (Figura 17).



Figura 17: Eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídio revelando os produtos de amplificação de 25 ng/ μ l das cepas SC58 e Choachí de *T. rangeli* e cepa Y de *T. cruzi* obtidos pela reação de PCR. **1.** Padrão de peso molecular (DNA de pUC 18 digerido com *Hae*III). **2.** Controle negativo sem DNA com iniciadores *TrTRPxcit* Fow e Rev. **3.** DNA da cepa Y de *T. cruzi* com iniciadores *qTrTRPxcit* Fow e Rev., **4.** DNA da cepa Choachí com iniciadores *qTrTRPxcit* Fow e Rev. **5.** DNA da cepa SC58 com iniciadores *qTrTRPxcit* Fow e Rev., **6.** Controle negativo sem DNA com iniciadores *qTrTRPxmit* Fow e Rev., **7.** DNA da cepa Y de *T. cruzi* com iniciadores *qTrTRPxmit* Fow e Rev., **8.** DNA da cepa Choachí com iniciadores *qTrTRPxmit* Fow e Rev., **9.** DNA da cepa SC58 com iniciadores *qTrTRPxmit* Fow e Rev., **10.** Controle negativo sem DNA com iniciadores *qTrTRRed* Fow e Rev. **11.** DNA da cepa Y de *T. cruzi* com iniciadores *qTrTRRed* Fow e Rev., **12.** DNA da cepa Choachí com iniciadores *qTrTRRed* Fow e Rev., **13.** DNA da cepa SC58 com iniciadores *qTrTRPxcit* Fow e Rev., **14.** Vazio **15.** Padrão de peso molecular (DNA de pUC 18 digerido com *Hae*III).

Observa-se nos resultados obtidos através de qPCR (Figura 18) uma redução global nos níveis de transcritos dos genes codificantes para as enzimas triparedoxina peroxidase citosólica e mitocondrial (*TrTRPxcit* e *TrTRPxmit*) e tripanotona redutase (*TrTRRed*) na forma tripomastigota de *T. rangeli* em relação a forma epimastigota. Esta diferença foi significativa somente para o gene *TrTRRed* ($p < 0,05$).

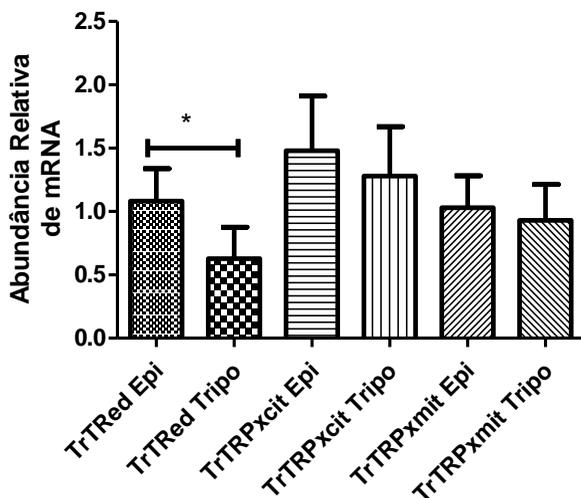


Figura 18: Perfil da abundância relativa de mRNA dos genes *TrTRed*, *TrTRPxcit* e *TrTRPXmit* nas formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma rangeli* utilizando como genes de referência a média dos genes GAPDH e RNA60S. Os dados representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, realizados em duplicata e analisados estatisticamente por pares pelo teste *T- Mann Whitney* seguida (* $p < 0,05$).

A regulação aparentemente negativa da transcrição entre a forma replicativa e infectiva deste parasito foi também observada em outros tripanosomatídeos, como *T. brucei*, *T. cruzi* e o próprio *T. rangeli* (FERREIRA et al., 2008; LÜCKEMEYER, 2014).

O controle da expressão gênica a nível transcricional é uma importante resposta ao estresse oxidativo na maioria dos organismos (FINZI et al., 2004). Em tripanosomatídeos, entretanto, as concentrações de transcritos são em geral maiores, não havendo uma correlação direta dos níveis de transcritos com níveis de expressão proteica devido a ausência de controle específico durante a transcrição (KRAMER, 2012). Nestes organismos longas unidades policistrônicas são transcritas constitutivamente devido, provavelmente aos poucos promotores identificados e a expressão diferencial se deve, principalmente as mudanças pós-transcricionais (FINZI et al., 2004; NOGUEIRA et al., 2009; KAMER, 2012) Esse fato se torna evidente quando se faz a análise em células que superexpressavam a proteína TRPxcit em *T. cruzi*. Observou-se um grande aumento de mRNA (158%) para as células

transformadas com o vetor pTEX-TXNPx, sem o acompanhamento do aumento de produção da proteína TXNPx, evidenciado por *western blot* (NOGUEIRA et al., 2009). Este tipo de regulação ocorre devido à necessidade de rápida adaptação dos tripanosomatídeos a variados ambientes tanto em seus hospedeiros mamíferos quanto triatomíneos (KRAMER, 2012).

DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS E PADRÃO DE EXPRESSÃO PROTEICA DAS ENZIMAS TRIPAREDOXINA PEROXIDASE CITOSÓLICA E MITOCONDRIAL (*TrTRPxcit* e *TrTRPxmit*) E TRIPANOTIONA REDUTASE (*TrTRed*) EM *Trypanosoma rangeli*.

5.3.5 Detecção da expressão das proteínas TRed, TRPXmit e TRPXcit em diferentes estágios de vida de *Trypanosoma rangeli* por *Western Blot*

Utilizando o antissoro policlonal anti-*TcTRed* em ensaios de *Western blot* com extratos proteicos de *T. rangeli* e de *T. cruzi* detectou-se a presença de uma banda de ± 53 kDa, tamanho compatível à proteína TRed (Figura 19 a).

A abundância relativa da proteína *TrTRed* avaliada por *western blot* em epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli* não demonstrou diferenças significativas (Figura 19 a). A ausência de expressão estágio-específica da TRed também foi observada em *T. cruzi* (*TcTRed*). Apesar das diferenças não terem sido significativas entre os diferentes estágios de vida em ambas as espécies, altos níveis de expressão de TRed são observados de forma significativa em *T. cruzi* quando comparado com *T. rangeli*.

Ao analisarmos a expressão da proteína triparedoxina peroxidase mitocondrial de formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli* e *T. cruzi* observamos uma pequena diferença no peso molecular das proteínas entre *T. rangeli* e *T. cruzi* (Figura 19 b). Em *T. rangeli* as bandas visualizadas correspondem em ambos os estágios de vida a aproximadamente 28 kDa, enquanto para *T. cruzi* observa-se bandas com tamanho em torno de 25 kDa.

A análise da expressão da triparedoxina peroxidase citosólica em *T. rangeli* revelou banda de aproximadamente 21 kDa tanto em epimastigotas como em tripomastigotas para ambas as espécies (Figura 19 c). Não houve diferença significativa no padrão de expressão desta proteína entre as diferentes fases de vida dos parasitos analisados.

Um padrão de multibandas observado para as triparedoxinas (dados não mostrados) é condizente com a capacidade desta enzima formar dímeros e até mesmos decâmeros, embora somente observamos as bandas relacionadas às suas formas reduzidas monoméricas e oxidadas homodiméricas (FLOHÉ et al., 2002; MONTEMARTINI et al., 1999; GUERRERO et al., 2000; WILKINSON et al., 2000; PIÑEYRO et al., 2008; 2011). Lopez e colaboradores (2000) encontraram apenas uma banda polipeptídica de 21 kDa correspondente à proteína nativa *TcTRPxcit* (NOGUEIRA et al., 2009).

Não observamos em *T. rangeli* um aumento na expressão dos genes estudados na forma infectiva deste parasito, ao contrário do observado por Irigoín e colaboradores (2008) em *T. cruzi*. Atwood e colaboradores (2005) através do proteoma das formas de desenvolvimento do *T. cruzi* mostraram que a transição de epimastigota para tripomastigota metacíclico foi acompanhada do elevado nível de expressão das proteínas triparedoxina peroxidase mitocondrial, ascorbato peroxidase, ferro-superóxido dismutase, triparedoxina (substrato da TRPx) e tripanotiona sintase. Segundo Irigoín e colaboradores (2008), isto pode ser interpretado como uma pré-adaptação do parasita para a infecção no hospedeiro mamífero a ambientes onde ele pode ser exposto a EROs e ERNs, como aqueles gerados por células do sistema imune.

Diferente do *T. cruzi*, que enfrenta o estresse oxidativo no hospedeiro mamífero e dentro do trato digestivo do vetor triatomíneos, o *T. rangeli* é ainda exposto a estresses oxidativo e nitrosativo na hemolinfa e nas glândulas salivares nos triatomíneos (AZAMBUJA; RATCLIFFE; GARCIA, 2005). Sendo assim, a alta expressão das enzimas antioxidantes na fase de epimastigota era esperada e foi observada em nossos experimentos.

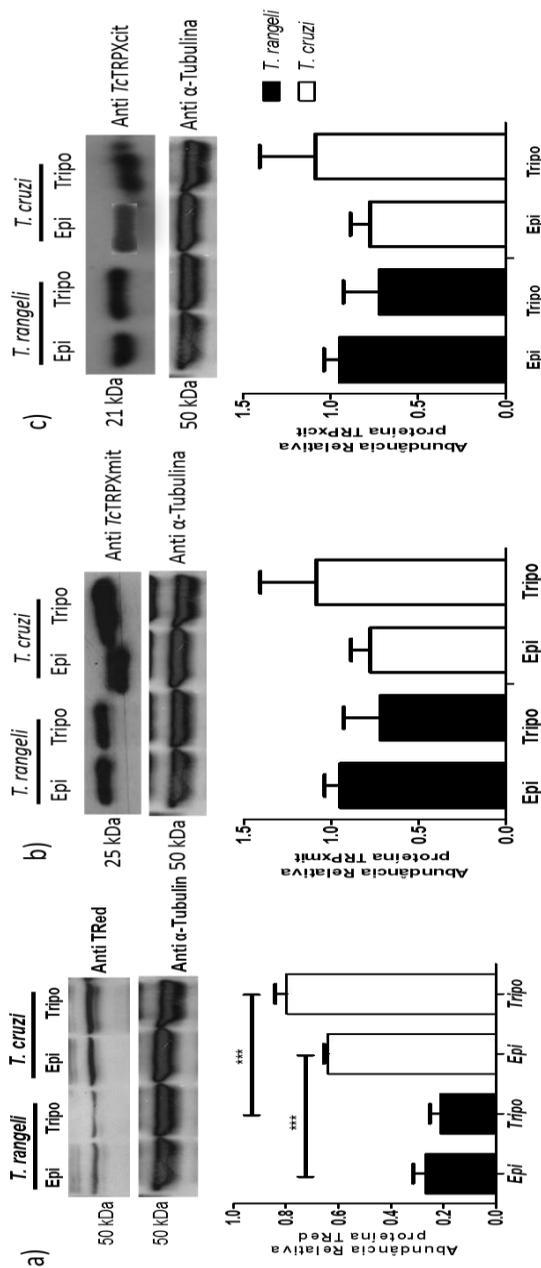


Figura 19: Análise da expressão das proteínas: **a)** tripanonina redutase (TRRed), **b)** Triparedoxina peroxidase mitocondrial (TRPxcit) e **c)** Triparedoxina peroxidase citosólica (TRPxcit) em extratos protéicos solúveis de diferentes estágios de vida de *T. rangeli* cepa Choachí e *T. cruzi* cepa Y. **Acima:** *Western blot* para detecção da proteína **a)**TRRed em extrato protéico (30 µg/ml) realizado com o antissoro anti-TRRed (1:500) e anti- α tubulina (1:2000); **b)** TRPxcit em extrato protéico (50 µg/ml) realizado com o antissoro anti-TRPxcit (1:500) e anti- α tubulina (1:2000); **c)** TRPxcit em extrato protéico (50 µg/ml) realizado com o antissoro anti-TRPxcit (1:2.500) e anti- α tubulina (1:2000). **Abaixo:** Análise densitométrica das bandas de expressão pelo programa *Image J* das respectivas proteínas. Os dados representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes e foram analisados estatisticamente pela análise de variância em uma via ANOVA seguida por teste de Bonferroni (***) ($p < 0,001$).

NÍVEIS DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS *TrTRP*_{xcit}, *TrTRP*_{xmit} E *TrTRed* DURANTE ESTRESSE OXIDATIVO PROVOCADO POR PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H₂O₂)

5.3.6 Avaliação da presença de peróxido de hidrogênio intracelular, por análise de produção de fluorescência a partir de sonda DCFH-DA ao longo do tempo e por concentração do estressor

A suscetibilidade de *T. rangeli* ao estresse oxidativo gerado por H₂O₂ foi primeiramente avaliado por ROMERO e colaboradores (2014) em formas epimastigotas. Este parasita mostrou-se mais sensível ao estresse oxidativo que *T. cruzi*, tendo um IC₅₀ de 53 µM, resultado significativamente menor ($p < 0,05$) ao IC₅₀ de epimastigotas de *T. cruzi* que é de 188,3 µM.

Antes de avaliarmos a possível ação do H₂O₂ na modulação da enzima antioxidante TRed em *T. rangeli*, foi realizado ensaio para confirmar a presença deste agente estressor no interior celular através do uso da sonda fluorescente 2'-7' diclorofluoresceína (DCFH-DA) conforme Wang e Joseph (1999). Não foi possível definir ou distinguir a fonte geradora de EROs quantificada, se pela biossíntese ou pela difusão do meio onde se encontra em diferentes concentrações, entretanto sabe-se que o composto fluorogênico DCFH-DA se liga rapidamente com espécies oxidantes, formando o composto fluorescente DCFA (MYHRE et al., 2003; PAL et al., 2012). Curva padrão para o H₂O₂ foi realizada e utilizada como controle.

A figura 20 demonstra que o estresse oxidativo gerado por concentrações abaixo de 125 µM de H₂O₂ não induziu mudanças na emissão de fluorescência entre parasitos tratados e não tratados. Entretanto, concentrações iguais ou superiores a 125 µM de H₂O₂ demonstraram efetiva ação no interior do parasito ao modificarem de forma significativa a fluorescência emitida tanto em *T. rangeli* como em *T. cruzi* quando comparados aos mesmos parasitos não tratados. Além disso, observa-se, como esperado, que houve um aumento na fluorescência nestas mesmas concentrações ao longo do tempo, principalmente nos primeiros 20 minutos, provavelmente devido a velocidade de difusão do meio extra para o meio intracelular deste composto.

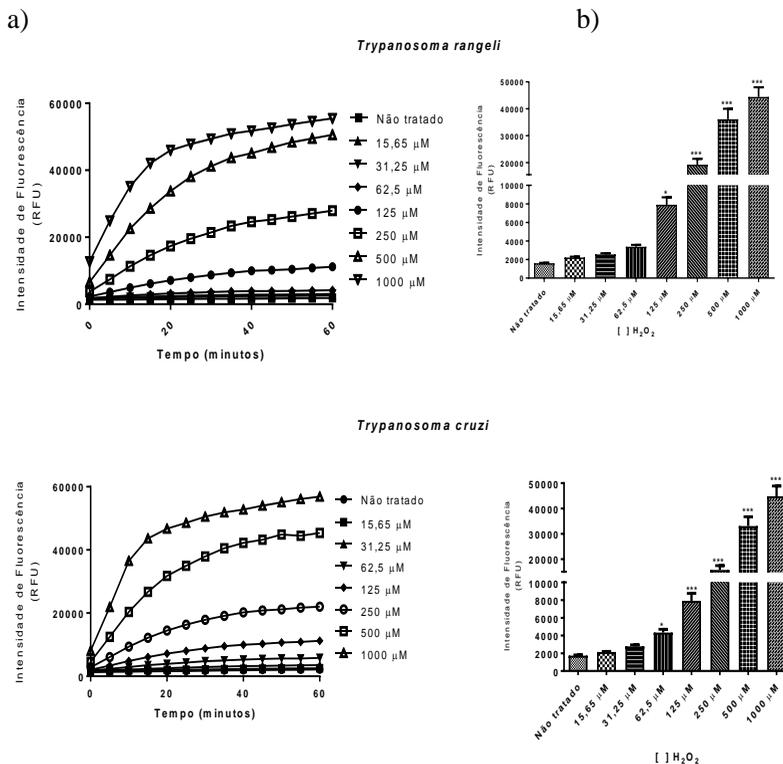


Figura 20: Oxidação da sonda DCFH-DA pós-tratamento dos parasitos *T. rangeli* e *T. cruzi* com o agente estressor H₂O₂. A formação de DCF foi detectada a 27°C em leitor de fluorescência TECAN M200 durante 60 minutos nos comprimentos de onda λ_{ex} = 485 nm e λ_{em} = 590 nm. Resultados expressos são médias de 2 experimentos independentes e quadruplicatas técnicas. Diferenças significativas foram detectadas pela análise estatística ANOVA de uma via seguido por teste de Bonferroni (* $p < 0,05$). a) Intensidade de fluorescência ao longo do tempo. b) Intensidade de fluorescência em diferentes concentrações de µM de H₂O₂.

5.3.7 Detecção e análise da expressão das proteínas TRed, TRPXmit e TRPXcit por *Western blot* em epimastigotas de *T. rangeli* induzidos ao estresse oxidativo por H₂O₂

Baseando-se em experimentos desenvolvidos por Romero et al (2014), onde estabeleceu-se o IC₅₀ para H₂O₂, epimastigotas de *T. rangeli* foram mantidos em contato com 67 µM de H₂O₂ por diferentes tempos, demonstrando uma aparente modulação para cima da expressão da TRed

(Figura 21a) após 60 minutos de contato com o agente estressor quando comparado ao controle T0 que não recebeu o H_2O_2 . Da mesma forma, uma diminuição na expressão desta proteína foi observada após 90 minutos de exposição em relação ao T0. A análise densitométrica e posterior análise estatística no programa *GraphPad* dos dados de três experimentos independentes constatou que a variação na expressão da proteína TRed nos diferentes tempos de indução não foram significativas considerando o normalizador.

As figuras 21 b e 21 c demonstram, respectivamente a expressão das proteínas *TrTRPxcit* e *TrTRPxmit* após a indução de estresse com 67 μM de H_2O_2 e, embora de maneira menos significativa que em TRed, observou-se um pequeno aumento da expressão após 60 minutos de exposição, com posterior redução aos 90 minutos e quando o estresse foi em fluxos de 20 minutos por 1 hora. A análise densitométrica e posterior análise estatística constatou que não houve variação significativa na expressão de ambas as proteínas nos diferentes tempos de indução.

Embora o ambiente oxidativo *in vivo* seja significativamente diferente do proposto em condições de cultura ou *in vitro* (WYLLIE; VICKER; FAIRLAMB, 2008), os experimentos de indução de estresse se fazem importantes para investigar possíveis alterações nos padrões de expressão das proteínas de interesse.

Romero e colaboradores (2014) demonstraram através de ensaios utilizando H_2O_2 que *T. rangeli* demonstrou maior susceptibilidade a este agente estressor quando comparado a *T. cruzi* e *T. brucei*. Estudos prévios, entretanto demonstram oscilações do IC_{50} para H_2O_2 em diferentes cepas de *T. cruzi*, variando de 98 a 190 μM (FINZI et al., 2004; MIELNICZKI-PEREIRA et al., 2007).

A menor resistência se deve, entre outros, a redução de tióis, entre estes a tripanotiona, que precisa ser reduzida para degradação de peróxidos. A diminuição do tiol tripanotiona em *T. rangeli* se deve a presença de apenas uma via de biossíntese de cisteína do mesmo, a via de transsulfuração reversa (RTS), o contrário do observado em *T. cruzi*, o qual também possui a via de síntese *de novo*.

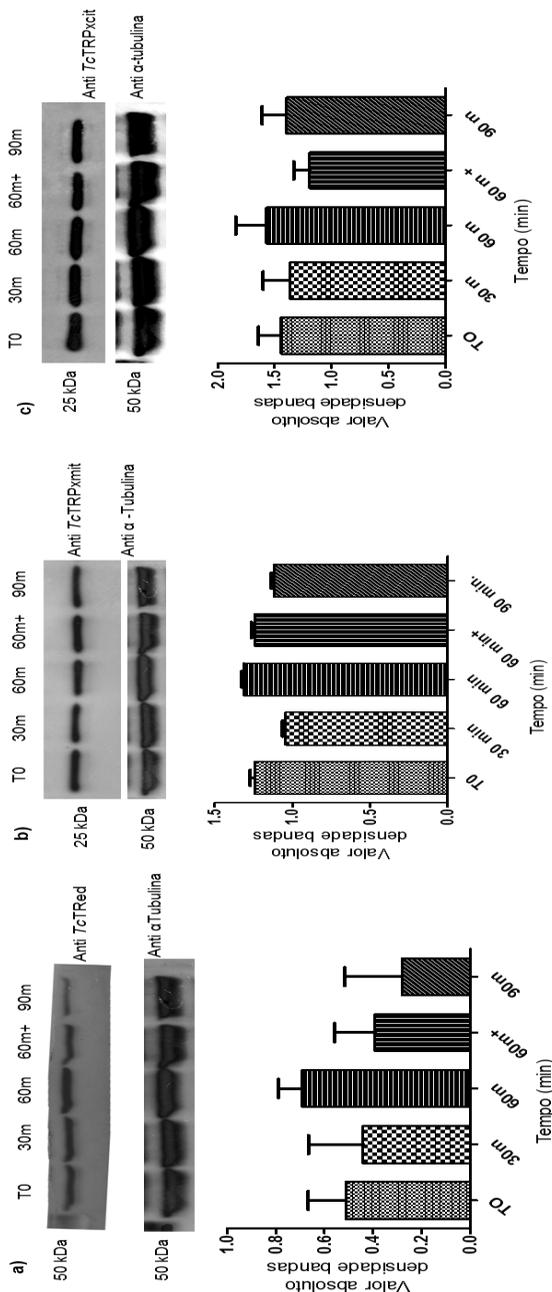


Figura 21: Análise da expressão em epimastigotas de *T. rangeli* das proteínas: **a)** Tripanotona redutase (TRRed), **b)** Triparedoxina peroxidase citosólica (TRPxmit) e **c)** Triparedoxina peroxidase citosólica (TRPxct) em extratos protéicos solúveis após indução de estresse oxidativo com $67 \mu\text{M}$ de H_2O_2 em diferentes tempos. 60m^+ indica a adição de forma gradual a cada 20 minutos de H_2O_2 para concentração final de $67 \mu\text{M}$. **a) Acima:** Western blot para detecção da proteína **a)TRRed** em extrato proteico ($30 \mu\text{g/ml}$) realizado com o antissoro anti-*TcTRed* (1:500) e anti- α -tubulina (1:2000); **b) TRPxmit** em extrato proteico ($50 \mu\text{g/ml}$) realizado com o antissoro anti-*TcTRPxmit* (1:500) e anti- α -tubulina (1:2000); **c) TRPxct** em extrato proteico ($50 \mu\text{g/ml}$) realizado com o antissoro anti-*TcTRPxct* (1:2.500) e anti- α -tubulina (1:2000). **Abaixo:** Análise densitométrica das bandas de expressão pelo programa *Image J* das respectivas proteínas. Os dados representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes e foram analisados estatisticamente pela análise de variância em uma via ANOVA seguida por teste de Bonferroni (* $p < 0,05$).

5.3.8 Efeito de antioxidantes no crescimento de *T. rangeli* e na expressão proteica de TrTRed

A presença de antioxidantes aumentou o crescimento *in vitro* de epimastigotas de *T. rangeli* (Figura 22). Ambos os tratamentos, com NAC (1 mM e 2,5 mM) induziram um significativo crescimento dos parasitos entre os dias 3 e 7 ($p < 0,001$). Parasitas crescidos na presença de 1 mM de NAC atingiram o maior número de parasitos no 5º dia de cultura ($5,8 \times 10^7$ parasitos/ ml). Os parasitos tratados com GSH (1 mM e 2,5 mM) também ampliaram a taxa de crescimento entre o 5º e 12º dia ($p < 0,01$). Apesar das significativas diferenças observadas no crescimento dos parasitos na presença de antioxidantes, o ambiente reduzido não determinou mudanças no perfil de expressão da TrTRed nos dias avaliados (Figura 22 b).

A N -acetilcisteína (NAC) tem sido amplamente utilizada como molécula antioxidante em experimentos *in vivo* e *in vitro*, sendo um poderoso eliminador do ácido hipocloroso (H-OCI) ao reagir com o radical hidroxila e com o H_2O_2 (ARUOMA et al., 1989; ROSSATO et al., 2014). A GSH é o principal tiol antioxidante intracelular em mamíferos, protegendo estas células do estresse induzido por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROMÃO et al. 1999). Nossos resultados demonstraram que a presença desses antioxidantes (NAC e GSH) elevou o perfil de crescimento de epimastigotas em meio LIT. Dados contrários foram observados para *T. cruzi* na presença dos mesmos antioxidantes que prejudicaram drasticamente a proliferação de epimastigotas (NOGUEIRA et al., 2015), enquanto a presença do pró-oxidante *heme* estimulou a proliferação nesta espécie.

Assim sendo, *T. rangeli* parece necessitar de um ambiente reduzido para proliferar-se como epimastigota, enquanto o *T. cruzi* requer um ambiente oxidado. Ambos os parasitos desenvolvem-se em triatomíneos, embora diferenças relacionadas ao ciclo biológico destes parasitos nestes hospedeiros possam explicar as diferenças encontradas. Epimastigotas de *T. cruzi* multiplicam-se e colonizam todo o intestino (cujo ambiente é oxidativo), enquanto epimastigotas de *T. rangeli* rapidamente atravessam o epitélio intestinal e invadem a hemocele. Na hemolinfa de *R. prolixus* foi descrito a presença de concentração 10 vezes superior de urato que no plasma humano (SOUSA et al., 1997; GRAÇA-SOUZA et al., 2006). O urato é considerado o mais importante antioxidante no plasma humano. Desta forma, o efeito de antioxidantes como NAC e GSH em culturas de *T. rangeli* estimula a capacidade de crescimento ao simular a função do urato na hemolinfa.

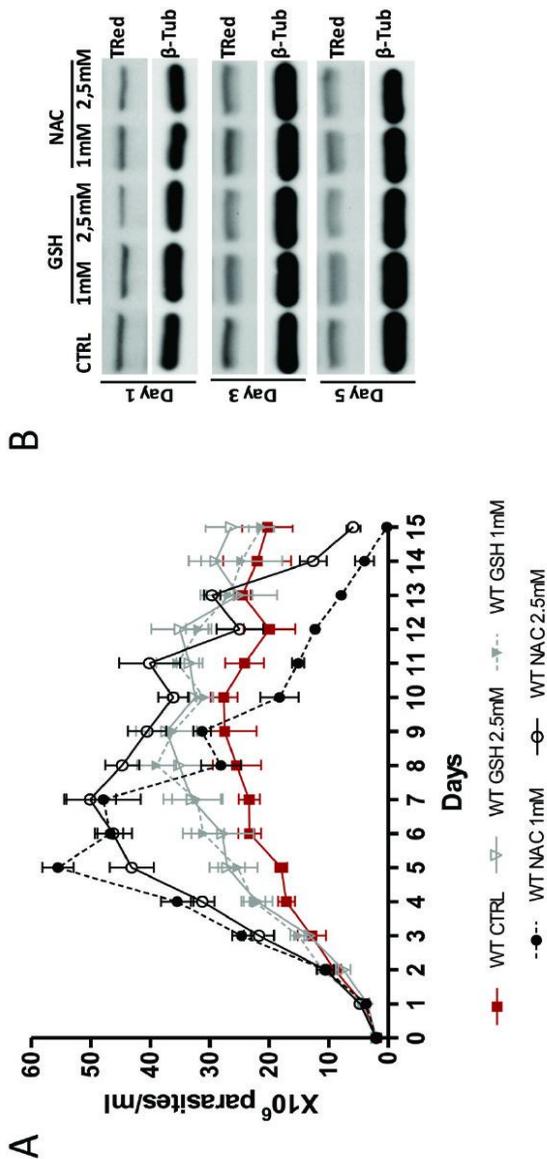


Figura 22: O tratamento com N-acetilcisteína altera perfil de crescimento de epimastigotas de *T. rangeli*. (A) Análise comparativa da curva de crescimento *in vitro* de *T. rangeli* submetido ao tratamento com os antioxidantes GSH e NAC nas concentrações de 1 e 2,5 mM. Os dados representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes e foram analisados estatisticamente pela análise de variância em duas vias ANOVA com teste *post hoc* de Bonferroni (* $p < 0,05$). (B) Análise por *western blot* da expressão de TrTRED em extrato solúvel de *T. rangeli* com diferentes tratamentos nos dias 1, 3 e 5 revelados pelo anticorpo anti-TrTRED. A detecção da α -tubulin serviu como controle durante a normalização na análise densitométrica pelo *Image J*.

6 CAPÍTULO III

POSSÍVEIS EFEITOS DA SUPEREXPRESSÃO DA ENZIMA *Tt*TRED NO PERFIL DE SENSIBILIDADE AO ESTRESSE OXIDATIVO E NA SOBREVIVÊNCIA DE *Trypanosoma rangeli* EM CÉLULAS THP-1 *IN VITRO*.

6.1 OBJETIVO DO CAPÍTULO

- Determinar se o aumento na expressão da enzima *TrTRed* afeta o perfil de sensibilidade ao estresse oxidativo e favorece a sobrevivência dos parasitos de *T. rangeli* nas células hospedeiras THP-1 *in vitro*.

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1 Aspectos éticos e de biossegurança

Conforme item 5.2.1 foram seguidos todos os preceitos legais para o desenvolvimento e manipulação dos organismos geneticamente modificados.

6.2.2 Parasitos

Os parasitos e respectivas cepas estão indicadas junto ao item 5.2.2, assim como características sobre seu cultivo ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

6.2.2.1 Diferenciação *in vitro* para obtenção de formas tripomastigotas

As formas tripomastigotas de cultura de *T. rangeli* foram obtidas a partir da cultura de 120×10^6 epimastigotas em fase exponencial de crescimento em meio DMEM pH 8,0 (Meio Engle Modificado por Dulbecco) (Sigma-Aldrich) suplementado com 5% de soro bovino fetal (SBF), 1 g/l de glicose e 6 mM de L-glutamina, conforme descrito por Koerich e colaboradores (2002) com modificações descritas por Stoco (2010). Os epimastigotas foram coletados ($3.000 \times g$ por 10 minutos), lavados duas vezes com PBS (tampão salina fosfato pH 7,4) e transferidos para garrafas de cultura celular de 45 cm² sem aeração, contendo o meio de diferenciação. Foram então mantidos por oito dias em estufa a 27°C. Após este período os parasitos foram coletados por centrifugação ($3.500 \times g$ por 10 minutos) e a porcentagem de tripomastigotas foi determinada através de contagem e análise morfológica de 100 parasitos em lâmina corada com Giemsa (Merck). Foram realizados, no mínimo, três experimentos independentes para coleta de parasitos para extração de RNA e proteínas.

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

6.2.3 Extração de DNA de *T. rangeli*

Para a extração do DNA total, formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli* foram submetidas ao método do fenol clorofórmio descrito por Sambrook, Fritch; Maniatis (2001). Após a extração o DNA foi solubilizado em tampão TE (EDTA 1 mM pH 8,0, Tris-HCl 10 mM pH 8,0) e sua concentração e pureza avaliadas através de espectrofotometria a 260 e 280 nm em equipamento BioPhotometer® (Eppendorf). As amostras também foram visualizadas em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio (1 µg/ml), para avaliação da integridade do DNA extraído e presença de RNA. As amostras de DNA foram armazenadas à -20°C.

As amostras obtidas tiveram sua concentração e pureza avaliadas em um espectrofotômetro Pico100 (Picodrop Spectrophotometer), observando-se as relações de absorvância 260/280 nm e 260/230 nm.

6.2.4 Amplificação dos Genes

6.2.4.1 Desenho dos iniciadores para PCR

A sequência completa da janela de leitura dos genes *TrTRed*, *TrTRPxcit* e *TrTRPxmit*, foram obtidas a partir do banco de dados do Projeto Genoma do *T. rangeli* (www.rangeli.lncc.br e TriTryp). Os iniciadores foram desenhados a partir da sequência dos genes alvos utilizando-se o programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) respeitando-se recomendações previamente descritas (UDVARDI; CZECHOWSKI; SCHEIBLE, 2008). A ausência de dímeros e grampos entre os pares de iniciadores foi confirmada pelo programa *Primer Select* do pacote DNASTAR® (Lasergene) e Fast PCR⁴.

Na sequência dos iniciadores foram inseridos os sítios de restrição das enzimas⁵ *Bgl* II e *Kpn* I (*TrTRed* e *TrTRPxmit*) e *Sla* I e *Kpn* I

⁴ O manual, licença e arquivos de instalação estão disponíveis na Internet em: <http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/programs/fastpcr.htm> ou a partir de PrimerDigital Ltd: <http://www.primerdigital.com/>

⁵ Sítios de restrição demonstrados em verde na Tabela 2.

(*TrTRPxcit*) para facilitar clonagem em vetor de expressão pLEXSYNeo 2 (Jena Bioscience), em destaque na tabela 20.

Tabela 20: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação via PCR dos genes da triparedoxina peroxidase citosólica (*TrTRPcit*), triparedoxina peroxidase mitocondrial (*TrTRPmit*) e tripanotiona redutase (*TrTRRed*). Em negrito, sítios de restrição das enzimas *Bgl* II e *Kpn* I (*TrTRRed* e *TrTRPxcit*) e *Sla* I e *Kpn* I (*TrTRPxcit*).

Nome	Sequência 5' → 3'	Tamanho Transcrito (pb)
<i>TrTRRed</i>	AGATCT ATGAAAGCCTTTGATTTGGTTG GGTACC AGCCTCTAGAGCCGTTCCG	1460
<i>TrTRPxcit</i>	CTCGAG ATGGCGTTGATGCCCAACG GGTACC AGCTACGGCATTGAAGTACTCC	546
<i>TrTRPxcit</i>	AGATCT ATGTTCCGTCGTATGACTG GGTACC GCTTGCCTTTTCAGGC	633

6.2.4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR):

O DNA genômico extraído conforme o descrito no item 5.2.6 foi utilizado como molde para amplificar, via PCR, os fragmentos dos genes de interesse utilizando os iniciadores desenhados e identificados na Tabela 1.

As reações ocorreram na presença de 1 unidade da enzima *Taq* DNA polimerase em seu tampão apropriado (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂, 200 μM de dNTP (Invitrogen), 10 pmoles dos iniciadores e 25 ng de DNA genômico da cepa Choachí de *T. rangeli*. Em cada conjunto de reação foi adicionado um controle negativo, composto de todos os reagentes necessários à amplificação, exceto o DNA molde. A amplificação foi realizada em um termociclador Mastercycler® Gradient (Eppendorf), utilizando o seguinte programa: desnaturação inicial a 95°C por 5 min. seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento dos iniciadores a 64°C por 1 min. e extensão 72°C por 1 minuto e 30 segundos. Ao final dos ciclos, foi realizada extensão final por 5 minutos a 72°C.

Todos os procedimentos de pré e pós-amplificação foram realizados em locais diferentes, não compartilhando materiais, reagentes e/ou equipamentos. Os produtos de amplificação da PCR foram resolvidos por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, sendo os resultados registrados digitalmente.

6.2.5 Purificação e Clonagem dos Produtos de PCR

Depois de amplificados, os produtos de PCR dos genes *TrTRPxcit*, *TrTRPxmIt* e *TrTRed* foram resolvidos em gel de agarose de baixo ponto de fusão a 1%, cortados do gel e purificados utilizando o kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare). O DNA purificado foi então utilizado para ligação em vetor *pGEM-T easy® Vector* (Promega), segundo especificações do fabricante.

Os produtos de ligação foram utilizados na transformação por choque térmico de células cálcio competentes de *Escherichia coli* DH5- α que foram crescidas em meio LB (Meio Luria Bertani) ágar suplementado com ampicilina (100 μ g/ml). A seleção de clones contendo o plasmídeo com o inserto desejado foi feita a partir de uma PCR diretamente das colônias selecionadas, utilizando os iniciadores específicos para cada gene estudado. As colônias positivas foram crescidas *overnight* e os plasmídeos recombinantes selecionados foram então extraídos através do procedimento padrão de lise alcalina, denominado *mini-prep*, conforme descrito por Sambrook, Fritch e Maniatis (2001).

6.2.6 Sequenciamento do DNA

O sequenciamento foi realizado utilizando-se os plasmídeos purificados em um equipamento automático Abi3500 (Life Technologies) após reação de sequenciamento realizada utilizando-se o kit BigDYE 3.1 (Life Technologies), segundo orientações do fabricante.

As reações de sequenciamento foram realizadas na presença de 5 pmol dos iniciadores M13-F (5' – CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC – 3') e M13-R (5' – TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C – 3'), dirigidos ao vetor *pGEM-T easy®* ou dos iniciadores P1442 F (5'-CCG ACT GCA ACA AGG TGT AG-3') e A264- R (5'-CAT CTA TAG AGA AGT ACA CGT AAA AG-3') quando do sequenciamento de produtos clonados no vetor pLEXSY Neo-2®. As reações de sequenciamento contaram com as seguintes etapas: desnaturação inicial (95°C por 25 segundos), seguida de 35 ciclos com etapas de desnaturação (95°C por 15 segundos), ligação dos iniciadores (50°C por 20 segundos) e extensão da cadeia de DNA (60°C por 4 minutos). Os produtos dessas reações foram precipitados com etanol 100% e 125 mM de EDTA para a retirada dos nucleotídeos e iniciadores não incorporados, sendo subsequentemente eletroinjetados.

6.2.6.1 Análise da qualidade e identidade das sequências gênicas obtidas por sequenciamento

Primeiramente, as sequências geradas foram analisadas quanto à sua qualidade utilizando-se o pacote *Phred/Phrap/Consed* (<http://www.phrap.org>). Neste pacote cada nucleotídeo sequenciado recebe um valor de qualidade dado pela fórmula $q = -10 \log_{10}(p)$ onde q e p são, respectivamente, o valor de qualidade e a probabilidade de erro de uma determinada base. As sequências nucleotídicas que não apresentaram um valor mínimo de qualidade ($Phred \geq 20 = <1$ erro a cada 100 bases) foram descartadas e novamente sequenciadas. A confirmação da identidade dos fragmentos foi realizada através da ferramenta *blastx* (ALTSCHUL et al., 1990) do programa BLAST utilizando-se base de dados não redundante, disponível no GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e no Trityp (<http://TriTrypDB.org>) (ASLETT et al., 2010).

6.2.7 Clonagem em vetor de expressão pLEXY-NEO2 para superexpressão da proteína TRed

A superexpressão da proteína *TrTRed* por *T. rangeli* teve como base o plasmídeo pLEXY-NEO2 *TrTRed*. Os produtos de PCR foram usados primeiramente para clonagem no vetor pGemT-easy conforme item 6.2.5. Colônias selecionadas foram crescidas, conforme o mesmo item para extração dos plasmídeos por lise alcalina (SAMBROOK; FRITCH; MANIATIS, 2001). Os plasmídeos foram então digeridos com as enzimas contidas nos iniciadores (Tabela 20 e Figura 23). Após a digestão os produtos da mesma, assim como o produto da digestão do vetor pLEXY-NEO2 foram resolvidos em gel de agarose 1%, sendo as bandas de tamanho adequado excisadas do gel e purificadas utilizando-se o kit *GFX™ PCR DNA and Gel BandPurification* (GE Healthcare) de acordo com as especificações do fabricante.

A ligação do transcrito *TrTRed* ao vetor ocorreu na presença de três unidades da enzima T4 DNA ligase (BioLabs) em tampão próprio do fabricante durante 48 horas a 4°C. Os produtos de ligação foram utilizados para transformação de células cálcio competentes de *E. coli* DH5 α , nas mesmas condições descritas no item 6.2.5. Após a seleção dos clones contendo os insertos desejados, através de PCR diretamente das colônias, os clones positivos foram crescidos em meio LB suplementados com ampicilina 100 μ g/ml, durante 18 a 20 horas a 37°C e submetidos à

extração do DNA plasmidial com o kit *PureYield™ Plasmid Midiprep System* (Promega). Novo sequenciamento foi realizado para confirmação da inserção na correta janela de leitura do gene conforme item 6.2.6

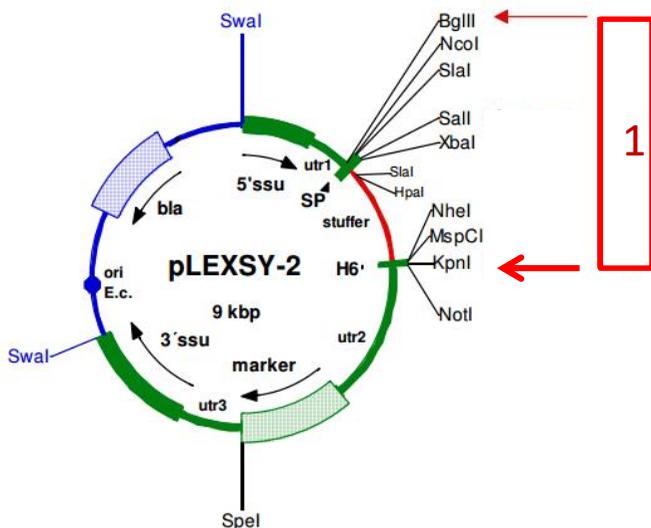


Figura 23: Plasmídeo pLEXY-2Neo (Jena Bioscience) utilizado para ligação ao inserto do gene *TrTRed* e posteriormente transfectado no parasito *T. rangeli*. Retângulo de número 1 demonstra local de inserção do gene *TrTRed* entre os sítios de restrição das enzimas *Bgl* II e *Kpn*I.

Fonte: Adaptado Manual pLEXYcon2 Expression Kit (Jena Bioscience)⁶

6.2.8 Transfecção dos parasitos

Os ensaios de transfecção foram realizados utilizando o kit *Basic Parasite Starter Nucleofector* (Lonza) conforme as instruções do fabricante. Basicamente, 50×10^6 parasitos foram lavados duas vezes em PBS pH 7,4, adicionados de 100 μ l do tampão de eletroporação do kit e, no mínimo, 10 μ g do DNA plasmidial. Todo o volume desta suspensão foi transferido para cubetas de eletroporação de 0,4 centímetros (cm) de abertura e submetido à eletroporação no aparelho *Nucleofector*[®] (Lonza) em condições elétricas estabelecidas pelo programa U-33. Após um único

⁶ Disponível em: <http://www.jenabioscience.com/images/ae3a4f50f1/EGE-1300.pdf>

pulso, os parasitos foram transferidos para tubos contendo 2 ml de meio NNN-LIT. Após 48 horas a 27°C, as culturas foram acrescidas de G-418 (Geneticin) (Sigma Aldrich) em uma concentração inicial de 25 µg/ml. Os parasitos foram então mantidos em fase exponencial de crescimento a 27°C através de repiques semanais em meio LIT suplementado com 10% SBF e crescentes concentrações de G418 (25, 50, 100, 200 e 300 µg/ml).

Após a transfecção dos parasitos, a eficiência da mesma foi constatada através da técnica de *Western blot* (conforme item 5.2.9.6) utilizando o anticorpo primário contra cauda de histidina (anti HisTag) que confirmou a expressão de proteínas contendo uma região rica em histidinas, correspondente, neste caso, a cauda de seis histidinas conferida pelo vetor.

6.2.9 Avaliação comparativa das curvas de crescimento e porcentagem de diferenciação *in vitro* entre a linhagem transfectada (TRed+) e controle não transfectado (Wt)

Formas epimastigotas de culturas em fase exponencial de crescimento foram ajustadas para uma concentração de 4×10^6 parasitos/ml em 5 ml de meio LIT acrescido de 10% de SBF. Diariamente, durante 16 dias os parasitos foram contados em câmara de Neubauer. O experimento foi realizado em triplicata biológica e duplicata técnica. A análise estatística foi realizada utilizando o teste *t* de *Student* no programa GraphPad Prism 5.0.

A diferenciação *in vitro* foi realizada conforme item 6.2.2.1, sendo o meio DMEN acrescido de 300µg/ml de G418 para a linhagem transfectada pLEXSYS-NEO2TrTRed.

6.2.10 Suscetibilidade de epimastigotas de *T. rangeli* transfectados (TRed+) ao estresse oxidativo *in vitro* para cálculo do IC₅₀

A suscetibilidade dos parasitos ao H₂O₂ foi avaliada utilizando o método Alamar blue (AB) como descrito em Ráz e colaboradores (1997) e Decuypere e colaboradores (2012) com modificações sugeridas por Romero e colaboradores (2014).

De forma resumida, 5×10^5 epimastigotas de *T. rangeli* (Wt e TRed+) e *T. cruzi* foram incubados em placa de 96 poços por 48 h a 27°C com 200 µL meio de cultura contendo diferentes concentrações dos agentes estressores a serem testados (15,62 µM, 31,25 µM, 62,5 µM, 125

μM , 250 μM , 500 μM e 1000 μM). Após 24 h de incubação, 20 μL do reagente alamar blue -AB (Invitrogen) foram adicionados a cada poço. A viabilidade dos parasitos foi avaliada após as 48 h de cultivo em leitor de fluorescência TECAN M200 a 600 nm. Em cada placa foram incluídos controles com parasitos não tratados e poços apenas com os regentes, sem parasitos.

O cálculo do IC_{50} foi realizado por análise de regressão sigmoidal (com variável slope) usando o programa GraphPad Prism v.5.0. Estes experimentos foram feitos em triplicatas biológicas e quadriplicatas técnicas.

6.2.11 Citolocalização da proteína TrTRed expressa por *T. rangeli* por ensaio de imunofluorescência indireta (RIFI)

Para os ensaios de RIFI foram utilizadas formas epimastigotas de *T. rangeli* da cepa Choachí selvagem (Wt) e transfectada com a proteína TrTRed (TRed+). Os parasitos foram coletados após centrifugação a 3.500 x g (10 minutos) e duas lavagens com PBS pH 7,4, tendo sua concentração ajustada para 1×10^6 células/ml. Dessa suspensão, 50 μl foram depositados sobre uma lamínula circular (diâmetro de 13 mm) em placa de poliestireno de 24 cavidades. Foram utilizados 20 minutos para a adesão dos parasitos, seguidos da fixação com paraformaldeído a 4% diluído em PBS pH 7,4 durante cinco minutos. As lamínulas foram, então, submetidas a três lavagens de cinco minutos cada em PBS pH 7,4, sob leve agitação, sendo que as etapas subsequentes foram também intercaladas com lavagens nessas condições. A permeabilização dos parasitos, quando necessária, foi realizada com o detergente Triton X-100 a 0,1% em PBS. Os sítios inespecíficos foram bloqueados em solução de bloqueio (5% leite desnatado diluído em albumina de soro bovino – BSA a 2%. O anticorpo primário utilizado foi o anti-HisTag diluído 1:100 em solução de bloqueio 0,5%, sendo então adicionado sobre as lamínulas permanecendo em contato como antígeno durante 90 minutos a temperatura ambiente. O anticorpo secundário Alexa fluor 594 (IgG anti camundongo) diluído 1:1000 foi utilizado diluído em solução de bloqueio a 2% e mantidos sobre as lamínulas por 15 minutos protegidos da luz.

Após três lavagens de 5 minutos em PBS-Tween 0,1%, as lamínulas foram coradas com 1 $\mu\text{g/ml}$ de DAPI por 5 minutos, lavadas novamente e montadas com o reagente *Hydromount* (National Diagnostics) sobre lâminas de microscopia. As análises foram realizadas em microscópio de fluorescência Olympus – Bx40-FL (Olympus) e registradas digitalmente.

6.2.12 Ensaios de interação parasito/célula hospedeira *in vitro*

Os ensaios cinéticos de interação de formas de *T. rangeli* superexpressando a proteína TrTRed (TRed+) foram realizados como descrito por Romero, Saraiva e Walker (2005), com algumas modificações citadas em Marin-Coelho (2013), utilizando a cepa Y de *T. cruzi* como controle. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica e técnica através do cultivo de monocamadas celulares da linhagem THP-1, em placas de cultivo celular de seis poços.

As células da linhagem monocítica THP-1 (ATCC#TIB-202) foram inicialmente cultivadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ em garrafas de cultura de 75 cm² em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) (HiMedia Laboratories) pH 7,4 suplementado com 10% de SBF, 12,5 mM de HEPES (Gibco), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco), 2 mM de Glutamax[®] (Gibco), 1mM de piruvato de sódio (Gibco) (Meio RPMI completo). As células foram mantidas na densidade de 3 x 10⁵ células/ml por repiques semanais.

Para os experimentos de interação as células THP-1 foram coletadas no 3° ou 4° dia de crescimento, quantificadas e ajustadas para a densidade desejada após lavagem em PBS e contagem em câmara de Neubauer utilizando o azul de Trypan para identificação das células viáveis. Em seguida, foram induzidas à diferenciação em fagócitos aderentes semelhantes a macrófagos conforme Schwende e colaboradores (1996). Em placas de 24 poços 1,5 x 10⁵ células foram cultivadas por 72 h no meio RPMI completo acrescido de Forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) (Sigma-Aldrich) na concentração de 50 µg/ml em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ e só então utilizadas nos ensaios de interação com *T. rangeli*.

Monocamadas celulares não confluentes de células THP-1 foram cultivadas sobre lamínulas de vidro (22 x 22 mm) nas quais foram adicionadas formas tripomastigotas da cepa selvagem e da cepa transfectada pLEXY-NEO2TrTRed em um MOI⁷ (razão parasito:célula) de 25:1. Células e parasitos foram então mantidos por 1 h em estufa a 37°C com 5% CO₂. Transcorrido este tempo de interação, as células foram lavadas duas vezes com PBS estéril para remoção dos parasitos não aderentes e mantidas em meio RPMI nas mesmas condições acima por tempos distintos para serem então analisadas. Os tempos escolhidos para nossos objetivos foram o tempo zero (T0) (após a 1h de

⁷ Do inglês *Multiplicity of infection*.

interação), tempo dois (T2), quatro (T4), seis (T6) e tempo vinte e quatro (T24). Decorrido os tempos, as réplicas técnicas foram coradas pelo método Giemsa, montadas em lâminas com o reagente *Entellan*[®] (Merck) e então levadas ao microscópio. Para a determinação do número de células infectadas foram contadas de maneira aleatória 200 células por lamínula para cada um dos tempos, cepas e espécie utilizadas.

A análise estatística foi através de Anova de duas vias, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, considerando diferenças estatisticamente significativas se $p < 0,05$.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Transfecção e Expressão Homóloga

Para investigar o papel da TRed em *T. rangeli* foi realizada a superexpressão deste gene. Os ensaios de transfecção dos parasitos foram realizados conforme o descrito no item 6.2.8 do Materiais e Métodos. Após 24 horas a seleção dos parasitos transfectados iniciou com a adição de G-418 (25 µg/ml) no meio de cultivo. A concentração do antibiótico foi aumentada a medida que os parasitos mostravam-se estáveis e com boa mobilidade durante os repiques semanais chegando a 300 µg/ml de G-418, o que indicou a estabilidade e eficiência do processo.

A transfecção também foi confirmada através de *Western blot* utilizando os anticorpos monoclonal anti-His tag e policlonal anti *TcTRed* (Figura 24a). A análise densitométrica, após a normalização com anticorpo anti- α tubulina, mostrou um aumento significativo (***) de aproximadamente cinco vezes na intensidade do polipeptídeo *TrTRed* da população transfectada de epimastigotas de *T. rangeli*, em relação a não transfectada (Figura 24b).

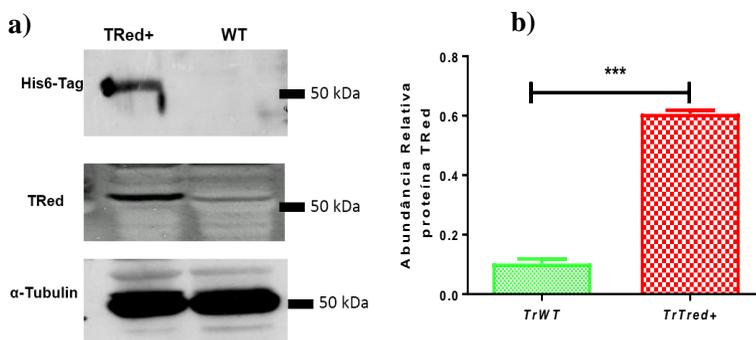


Figura 24: Análise da superexpressão do gene TRed em epimastigota de *T. rangeli*. a) *Western blot* para análise da expressão da proteína *TrTRed* em epimastigotas de *T. rangeli* selvagem (WT) e transfectado (TRed⁺) utilizando os anticorpo anti- HisTag, anti *TcTRed* e como normalizador o anti- α Tubulina. b) Análise densitométrica das bandas do *Western blot* utilizando anti-*TcTRed* e normalizador anti- α tubulina. Os resultados representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes analisados estatisticamente utilizando-se teste de *t – Student* (***) $p < 0,001$.

Estudos enzimáticos utilizando extratos de formas epimastigotas de *T. rangeli* transfectadas com o gene homólogo da TRed (Figura 25) mostraram atividade desta proteína aumentada em 1,3 vezes (4,08

$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína) em comparação com epimastigotas selvagens ($3,11 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína) (* $p < 0,05$).

Kelly e colaboradores (1993) obtiveram a partir da transfecção do gene da TRed em *T. cruzi* e *L. donovani*, respectivamente, uma atividade enzimática 10 e 14 vezes maior que a dos controles não transfectados. Tovar e Fairlamb (1996, 1998) demonstraram um aumento de quatro vezes nos níveis da TRed e em sua atividade também em *T. cruzi*.

A diferença na atividade de proteínas superexpressas entre as espécies citadas pode estar relacionada aos diferentes níveis de expressão basal da TRed nas mesmas.

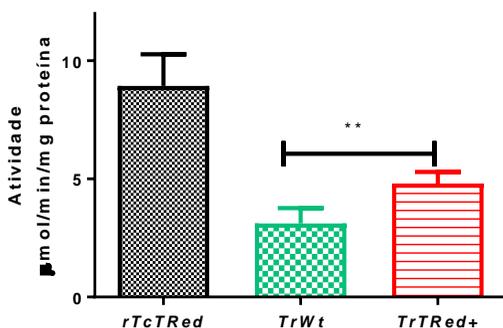


Figura 25: Detecção da atividade enzimática da enzima tripanotona redutase (TRed) em extratos proteicos de epimastigotas *T. rangeli* Selvagem (Wt) x Transfectado (TRed+). A enzima recombinante de *T. cruzi* (rTcTRed) foi usada como controle positivo. Os resultados representam média e desvio padrão de três experimentos feitos em triplicatas analisados estatisticamente utilizando-se análise de variância de uma via (ANOVA) seguido de teste de comparação múltipla de Bonferroni (* $p < 0,05$).

O crescimento comparativo *in vitro* da cepa de *T. rangeli* transfectada TrTRed+ em relação a cepa selvagem (Wt) (Figura 26) foi acompanhado por 16 dias apresentando número máximo de parasitos no 5º dia de acompanhamento para ambas as cepas ($4,3 \times 10^7$ parasitos/ml para *T. rangeli* Wt e $3,3 \times 10^7$ para *T. rangeli* TrTRed+). As curvas mostram o mesmo perfil até o 6º dia, sendo observado posteriormente um decréscimo contínuo no perfil da cepa selvagem, enquanto a cepa transfectada manteve-se com poucas alterações até o 14º dia. As diferenças entre as curvas não foram consideradas significativas estatisticamente utilizando-se o teste *t-Student*, entretanto, ao analisarmos

as diferenças entre o número de parasitos nos diferentes dias nas curvas pelo teste ANOVA de 2 vias observam-se diferenças significativas entre o 4º e 7º dia e entre o 10º e 15º dia. Desta forma, conclui-se que houve alteração no padrão de crescimento *in vitro*, com ligeiro aumento no crescimento e taxa de sobrevivência dos parasitos TRed+ em relação aos não transfectados (Wt).

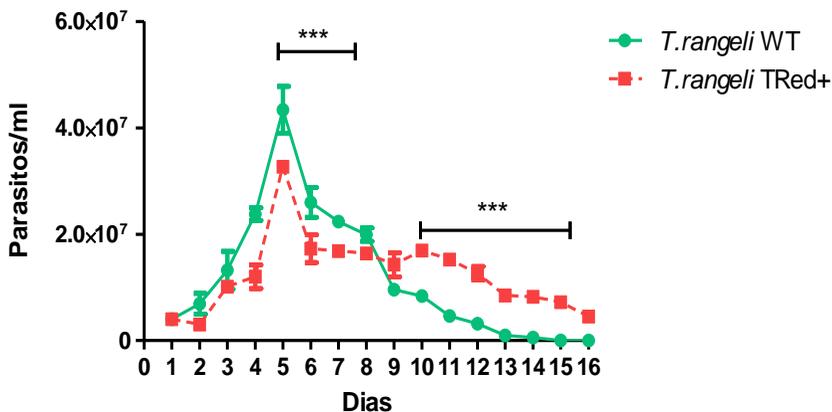


Figura 26: Análise comparativa do crescimento da cepa *Tr*TRed+ em relação a cepa Wt de *T. rangeli*. O número inicial de parasitos foi de 4×10^6 /ml. Os dados representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, realizados em duplicata e analisados estatisticamente pelo teste ANOVA de duas vias seguido de teste de comparação múltipla de Bonferroni (***) $p < 0,001$).

A capacidade de diferenciação dos parasitos transfectados em tripomastigotas metacíclicos foi realizada conforme item 6.2.9 do materiais e métodos e está representada na figura 27. Não foram observadas diferenças significativas nas taxas de diferenciação da cepa Choachi transfectada em relação a selvagem e nem na morfologia do parasito diferenciado. Sendo assim, podemos inferir que a transfecção não incorreu em alterações na capacidade de diferenciação *in vitro* para a forma infectiva em *T. rangeli* TRed.

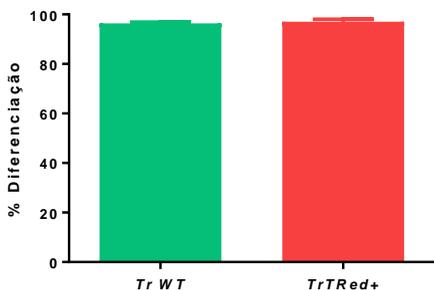


Figura 27: Percentual de diferenciação em tripomastigotas *in vitro* da cepa selvagem (*Tr*WT) em comparação com a cepa transfectada (*Tr*TRed+) de *T. rangeli*. Os dados representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes analisados estatisticamente pelo teste *t* Student (* $p < 0,05$).

6.3.2 Citolocalização da proteína rTrTRed expressa por *T. rangeli* por ensaio de imunofluorescência indireta (RIFI)

A avaliação da localização intracelular de TrTRed em epimastigotas de *T. rangeli* que superexpressam esta enzima através de IFA demonstrou uma fluorescência dispersa por todo o citoplasma do parasita, sugerindo uma localização citosólica (Figura 28).

A localização da TrTRed foi condizente com a encontrada em *T. cruzi* (MEZIANE-CHERIF et al., 1994) e *T. brucei* (SCHLECKER et al., 2005). Na literatura, entretanto, observam-se resultados conflitantes sobre a localização desta proteína. Em *T. cruzi* já foi identificada na mitocôndria e no glicossomo, além da já citada localização citoplasmática (MEZIANE-CHERIF et al., 1994; WILKINSON et al., 2000; 2005). Análises *in silico* das sequências em *T. cruzi* identificaram uma extensão carboxi-terminal com um pequeno peptídeo sinal glicossomal que pode ser responsável pela localização citosólica/glicossomal (SOMMER et al., 1994). Ensaios de imunolocalização em *L. amazonensis* sugerem a presença da TRed também em regiões da bolsa flagelar e em outra estrutura intracelular no final posterior de células promastigotas (CASTRO-PINTO et al., 2008).

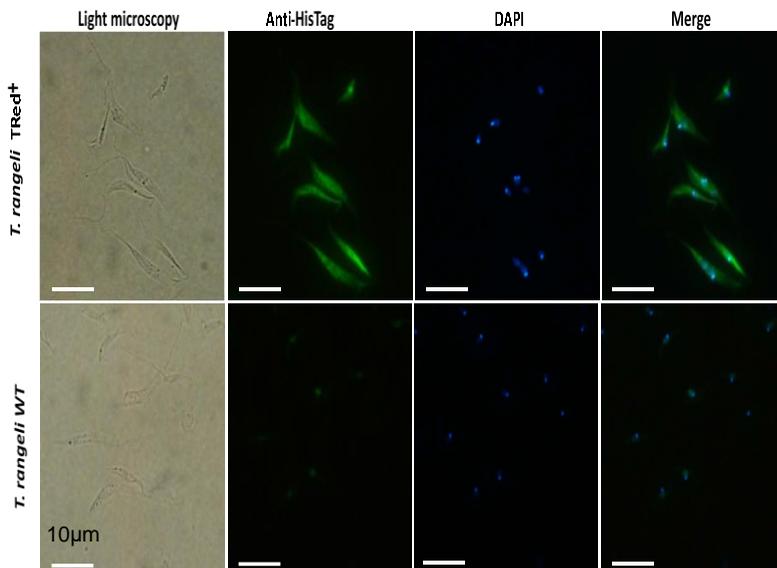


Figura 28: Tripanotona redutase homóloga superexpressa por *Trypanosoma rangeli* tem localização citoplasmática. Imunolocalização dos sítios de expressão da rTrTRed em epimastigotas de *T. rangeli* (TrTRed+) por RIFI utilizando o anticorpo anti His-tag. *T. rangeli* não transfectados (Wt) foram usados como controle. (1) Campo claro – microscópio óptico, (2) Detecção da rTrTRed pelo anticorpo anti-His-tag, (3) coloração por DAPI (4', 6-diamino-2-fenilindol), (4) Merge: sobreposição das imagens 2 e 3. As barras em branco representam 10µm.

6.3.3 Suscetibilidade de epimastigotas de *T. rangeli* transfectados (TRed+) ao estresse oxidativo *in vitro* para cálculo do IC₅₀

Células podem desenvolver resistência ao estresse oxidativo pelo aumento na expressão de genes que codificam enzimas do sistema antioxidante (FINZI et al., 2004; NOGUEIRA et al., 2012). Desta forma procedeu-se experimento com o objetivo de identificar se houve aumento na resistência de *T. rangeli* TrTRed+ para o H₂O₂ através de cálculo do IC₅₀.

O IC₅₀ em resposta ao ambiente oxidante induzido por H₂O₂ de epimastigotas de *T. rangeli* TrTRed+ (37,64) foi 1,29 vezes maior do que para os parasitos não transfectados (Wt) (48,54). Da mesma forma, os

parasitos superexpressando a proteína TRed foram 1,3 vezes mais resistentes ao H_2O_2 que os parasitos selvagens.

A análise dose-resposta indicou uma diferença significativa ($p < 0,001$) na resistência ao H_2O_2 entre *T. rangeli* Wt e TRed+ nas concentrações de 62,5 μM e de 125 μM H_2O_2 , sendo que a viabilidade dos parasitos TRed+ nestas concentrações foi, respectivamente, 12,4 e 13,4 vezes maior quando comparada aos parasitos Wt (Figura 29). Infere-se portanto a importância dessa enzima na resposta do parasito ao estresse oxidativo provocado pelo H_2O_2 *in vitro*.

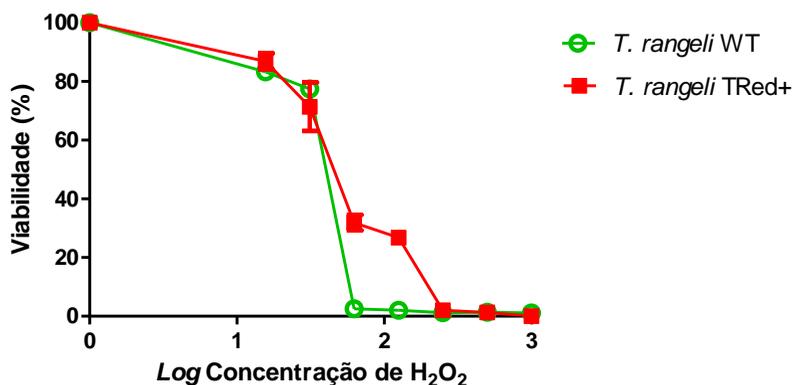


Figura 29: Superexpressão da proteína homóloga *TrTRed* por epimastigotas de *Trypanosoma rangeli* aumenta a sobrevivência do parasito induzido ao estresse oxidativo por H_2O_2 . Curva dose-resposta em epimastigotas de *T. rangeli* tratados com diferentes concentrações de H_2O_2 . Os resultados representam a média \pm DP de três experimentos independentes feitos em triplicatas. As diferenças estatísticas foram analisadas pelo teste ANOVA de duas vias seguido de teste de comparação múltipla de Bonferroni (***) $p < 0,001$.

As espécies reativas de oxigênio, entre estas o H_2O_2 , tem sido identificadas como essenciais na batalha contra os patógenos, sendo sua produção relacionada diretamente a capacidade dos parasitos sintetizarem enzimas antioxidantes como resposta para impedir os danos oxidativos em suas células (ANDREWS, 2012). No entanto, Paiva e colaboradores (2012) e Goes e colaboradores (2016) demonstram que o estresse oxidativo está também relacionado ao aumento no sucesso da infecção pelo protozoário *T. cruzi*. Em outras palavras, o *T. cruzi* parece necessitar do ambiente oxidativo sendo que respostas antioxidantes tendem a suprimir sua capacidade infectiva. Da mesma forma, promastigotas de

Leishmania donovani tratados com doses subletais de H_2O_2 apresentam-se mais virulentos ao infectar macrófagos *ex vivo*, pois sofrem uma reconfiguração metabólica para reposição do *pool* de NADPH para adaptar-se aos desafios oxidativos.

Portanto, trabalhos futuros serão desenvolvidos para elucidar o papel das EROs durante a infecção pelo *T. rangeli*, embora neste trabalho o papel da H_2O_2 parece ser determinante na proteção contra a infecção pelo parasita e a incapacidade de responder a esta relaciona-se diretamente à sua virulência.

6.3.4 Interação parasito célula

No intuito de analisar se a transfecção e, por conseguinte, a maior expressão da enzima *TrTRed* interfere na capacidade de infectar e sobreviver dentro de uma célula fagocítica THP-1, a porcentagem de células infectadas resultantes do ensaio de interação em tempos diferenciados foi verificada (Figura 30). Foi realizada a contagem de 200 células após uma hora de interação nos tempos T0, T2, T4, T6 e T24. Não foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) na porcentagem de células THP-1 infectadas pelas cepas *TrWt* e *TrTRed+* de *T. rangeli* em nenhum dos tempos analisados, e nem entre a cepa transfectada e *T. cruzi* (dados não mostrados).

Uma vez que os parasitos *TrTRed+* mostraram maior resistência ao estresse oxidativo induzido pelo H_2O_2 , foi avaliado se esse aumento poderia modular sua capacidade de infectar e sobreviver dentro de macrófagos ativados (FERRER-SUETA; RADI, 2009).

O ensaio de interação *in vitro* parasito-célula é uma das ferramentas utilizadas para explicar os mecanismos de infecção de *T. cruzi* como o tropismo celular, infectividade e replicação intracelular (DURAN-REHBEIN et al., 2014). Células não epiteliais como monócitos/macrófagos são altamente parasitadas depois de tempos curtos de incubação, fornecendo informações sobre as fases iniciais da infecção por *T. cruzi* e a subsequente resposta imunológica (LEIRIÃO et al., 2004; PIACENZA et al., 2008; 2013)

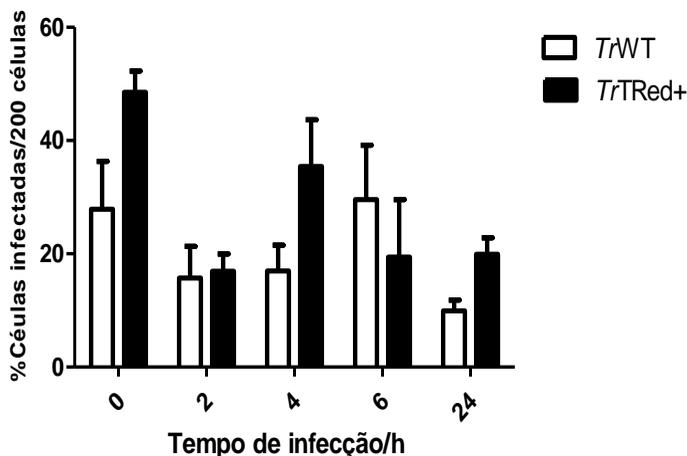


Figura 30: Porcentagem de células THP-1 infectadas ao longo do tempo por *T. rangeli* selvagem (*TrWt*) e superexpressando a proteína TRed (*TrTRed+*) resultantes do ensaio de interação parasito célula. Tempo T0 após uma hora de interação, demais tempos contados a partir de T0. Os dados representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes analisados estatisticamente pela análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido de teste de comparação múltipla de Bonferroni (* $p < 0,05$).

A análise dos experimentos de interação parasito-célula (Figura 31) demonstrou que os parasitos *TrTRed+* parecem ser mais infecciosos nos tempos T0, T4 e T24, entretanto o estudo cinético da interação *in vitro* dos parasitos Wt e *TrTRed+* com células THP-1 derivadas de macrófagos não revelaram nenhuma diferença significativa entre o número de células infectadas nestes tempo para ambas as cepas. Além disso, nenhum sinal de multiplicação intracelular foi evidenciado para as cepas *TrWt* e *TrTRed+*.

Conclui-se portanto que o aumento na expressão da proteína homóloga TRed em *T. rangeli* aumentou sua resistência ao estresse oxidativo, mas não induziu mudanças fenotípicas detectáveis ao interagir *in vitro* com células THP-1.

A capacidade de manter-se no interior do macrófago aumenta a demanda de tripanotona reduzida, uma função da TRed, com consequente redução das EROs e ERNs (DUMAS et al., 1997; LEIRIÃO et al., 2004; PIACENZA et al., 2008; 2013). Assim, podemos inferir que em *T. rangeli* que não superexpressam esta proteína essa proteção não está sendo exercida de maneira eficiente, podendo ser uma das causas que

influenciam a capacidade de sobrevivência deste parasita no hospedeiro vertebrado.

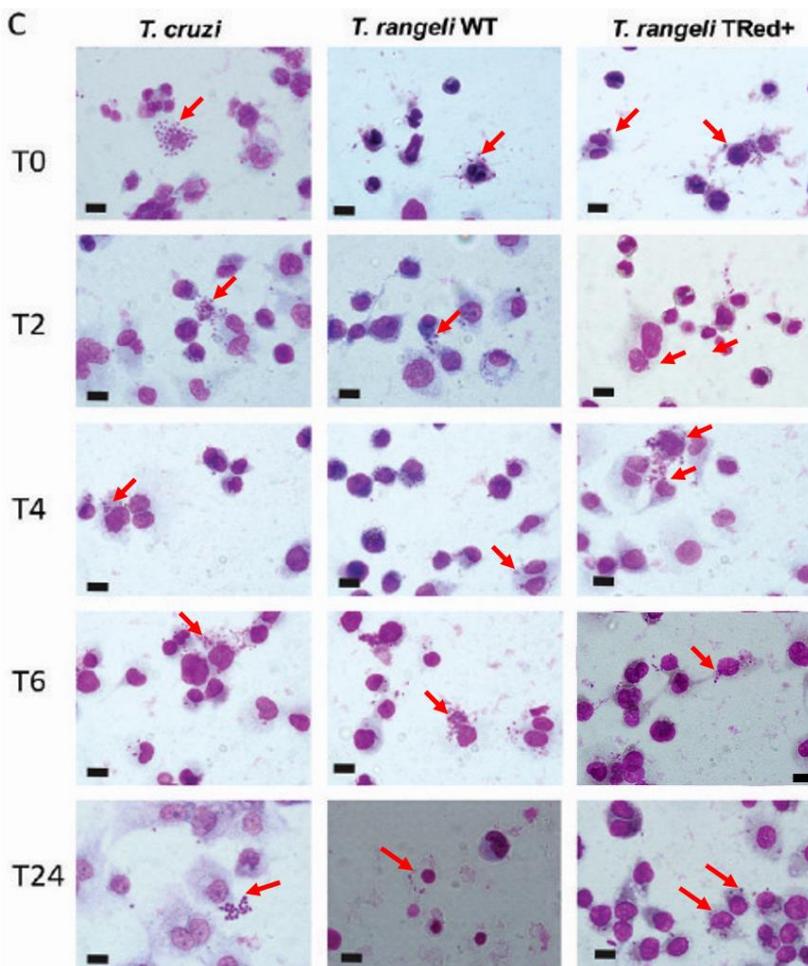


Figura 31: Imagens resultantes do ensaio de interação parasito-célula após coloração Giemsa. Células de origem monocíticas THP-1 foram infectadas com formas tripomastigotas de *T. rangeli* da cepa selvagem (*Tr*Wt) e da cepa transfectada (*Tr*TRed+) (MOI 25:1) em diferentes tempos de infecção T0 (após 1 h de interação), T2, T4, T6 e T24. Barras representam 10 μm.

7 DISCUSSÃO

O *T. rangeli*, assim como outros parasitos dixênicos, apresenta um ciclo de vida complexo que envolve estágios com diferenças morfológicas e funcionais. Desta forma, como mecanismo de sobrevivência, necessita adaptar-se de maneira rápida e eficiente a diferentes ambientes com condições físico-químicas diversas. Nogueira e colaboradores (2015) relatam que observa-se uma estratégia interessante de coevolução entre os parasitos e seus insetos vetores. Entretanto, a capacidade de sobrevivência do parasito depende de uma variedade de mecanismos de escape da resposta imune de seus hospedeiros. Entre as respostas encontradas, o conjunto de moléculas enzimáticas e não enzimáticas que compreendem o sistema antioxidantes destes parasitos é, com certeza, um dos mais estudados, por sua relação direta com a capacidade de sobrevivência, mas também como alvo para o desenvolvimento de drogas antiparasitárias (LEIRIÃO; RODRIGUES; ALBUQUERQUE, 2004; DENKERS; BUTCHER, 2005; GREGORY; OLIVIER, 2005; GUTIERREZ et al., 2009; PAIVA; BOZZA, 2014)

A análise *in silico* dos genes que compõe direta ou indiretamente a maquinaria antioxidante em *T. rangeli* e a posterior comparação com outras espécies de kineoplastídeos, incluindo organismos de vida livre e parasitos com ciclos monoxênicos e dixênicos, demonstrou que em *T. rangeli* os genes identificados demonstraram alta similaridade com seus ortólogos em *T. cruzi*. Esta característica corrobora com Stoco e colaboradores (2014) que já haviam elencado este grau de similaridade durante a comparação do genoma destas duas espécies. Entretanto, assim como *T. brucei* e os outros tripanosomas africanos, exceção a *T. grayi*, *T. rangeli* parece ter perdido alguns genes do repertório antioxidante ou os possuem como pseudogenes, sem atividade comprovada (ROMERO et al., 2014; 2015; STOCO et al., 2014).

A base funcional do sistema antioxidante em tripanosomatídeos é o tiol tripanotiona (T(S)₂) (TURRENS, 2004; FAIRLAMB et al., 2005; PELOSO et al., 2011). O fluxo de equivalentes reduzidos da tripanotiona T(SH)₂, gerados pela enzima tripanotiona redutase (TRed), pode ser levado a triparedoxina (TPX) ou a glutationa (GSH), as quais podem transferir elétrons para as peroxidases como as triparedoxinas peroxidases (TRPx_{cit} e TRPx_{mit}) (PELOSO et al., 2012).

A confirmação da presença (*in silico* e via PCR) das enzimas tripanotiona redutase (TRed) e triparedoxina peroxidase citosólica e mitocondrial (TRPx_{cit} e TRPx_{mit}) em *T. rangeli*, indica que este parasito,

como esperado, possui a capacidade de metabolizar hidroperóxidos e peroxinitritos como outros tripanosomatídeos (IRIGOIN et al., 2008; ALVAREZ et al. 2011; PIACENZA et al., 2012; ARIAS et al., 2013).

Como já definido por vários autores, existe uma relação direta entre o sucesso da infecção e a efetividade do sistema antioxidante, uma vez que proteínas desse sistema estão entre as mais expressas durante a diferenciação de epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos em *T. cruzi* (ATWOOD et al., 2005; PIÑEYRO et al., 2008 e PIACENZA et al., 2009 a,b). Cada estágio de diferenciação expressa um padrão de proteínas específicas envolvidas no processo de adaptação ao novo ambiente (DÍAZ; SOLARI; GONZÁLES, 2011; PELOSO et al., 2012). Esse aumento na expressão capacitaria o parasita para lidar com o ambiente altamente oxidativo no interior dos macrófagos (ATWOOD et al., 2005).

Entretanto, ao contrário do observado em outros tripanosomas como *T. cruzi* e *T. brucei* (ATWOOD et al., 2005; IRIGÓIN et al., 2008), não observamos um aumento na expressão destas enzimas (de forma significativa em TRed) na fase infectiva, mas sim na fase proliferativa, ou apenas uma conservação entre os diferentes estágios (TRPxcit e TRPxmit).

Diferente do *T. cruzi*, que enfrenta o estresse oxidativo no hospedeiro mamífero e dentro do trato digestivo do vetor triatomíneos, *T. rangeli* é exposto ao estresse oxidativo e nitrosativo, também para alcançar hemolinfa e glândulas salivares nos triatomíneos (AZAMBUJA, RATCLIFFE, GARCIA 2005). Sendo assim, a alta expressão das enzimas antioxidantes na fase de epimastigota se explicaria, entretanto a diminuição da fase infectiva demonstra um ponto fraco deste parasito e poderia ser relacionada, junto a incapacidade de multiplicar-se enquanto tripomastigota (PRESTES, 2013) entre outras, a sua incapacidade de manter-se no hospedeiro vertebrado.

T. rangeli sob a forma epimastigota mostrou-se menos resistente a ação *in vivo* do peróxido de hidrogênio quando comparado com *T. cruzi* e *T. brucei*. Associado a esta característica, *T. rangeli* demonstrou menores concentrações de tióis totais (ROMERO et al., 2014), assim como menor produção de NADPH, associada a maior síntese de H₂O₂ endógeno. Estas características associadas demonstram que epimastigotas de *T. rangeli* se comportam de maneira distinta no hospedeiro invertebrado quando comparado com *T. cruzi* (GARCIA et al., 2009; LEROUX et al., 2010).

Quanto a produção de NADPH, assim como em *T. brucei* é provável que dependa também da enzima málica, além da via PPP, em ambientes onde a glicose está ausente ou escassa como intestino dos

insetos vetores e no interior das células hospedeiras (HELLEMOND et al., 2005; LEROUX et al., 2010; ALLMANN et al., 2013).

Um aumento na produção de H_2O_2 pode estar relacionado a ausência de genes ativos de APx em *T. rangeli*, ou expressão diferenciada das isoformas de FeSOD, entretanto podem representar uma forma de adaptação, como a observada em *T. cruzi* (FINZI et al., 2004) e *Leishmania chagasi* (WILSON; ANDERSEN; BRITIGAN, 1994) em experimentos *n vitro*. A exposição a doses subletais de H_2O_2 tornaram estes parasitos mais resistentes a exposição a doses crescentes deste oxidante. Cosentino-Gomes e colaboradores (2009) comentam que o H_2O_2 pode agir como mensageiro intracelular em concentrações subtóxicas, agindo inclusive como estimulante da proliferação celular (FINZI et al., 2004). Além disso autores tem sugerido que o H_2O_2 agindo na transdução de sinais intracelulares está envolvido inclusive na inativação reversível de sítios ativos de várias enzimas, incluindo as fosfatases, proteínas kinases, canais de íons e proteína G (RHEE et al., 2005; TONKS, 2005)

Ações extras de oxidantes como as citadas para o H_2O_2 ainda precisam ser investigadas em *T. rangeli*. O que observamos em nossos resultados, assim como em *L. chagasi* (WILSON; ANDERSEN; BIRTIGAN, 1994).é que a presença deste oxidante relaciona-se diretamente com a perda de viabilidade destes parasitos.

A superexpressão de genes como TRed em *T. rangeli* abrange uma das estratégias para o entendimento da função desta enzima na sobrevivência deste parasito, assim como a produção de parasitos *Knockout* (DUMAS et al., 1997).

O desenvolvimento da resistência ao estresse oxidativo pelo aumento na expressão de genes que codificam enzimas do sistema antioxidante foi obseçada por Finzi e colaboradores (2004) e Nogueira e colaboradores (2012), assim como em *T. rangeli*.

Em *T. rangeli* a superexpressão homóloga permitiu a localização celular da TRed como citosólica, como na maioria dos tripanosoma já analisados (MEZIANE-CHERIF et al., 1994; WILKINSON et al., 2000; 2005; SCHLECKER et al., 2005), embora em *T. brucei* também tenha sido identificada no glicosoma (SOMMER et al., 1994) e em *L. amazonensis* na região de bolsa flagelar (CASTRO-PINTO et al., 2008).

A maior resistência ao estresse oxidativo induzido pelo H_2O_2 em parasitos superexpressando a tripanotiona redutase (*TrTRed+*) levou a questionamentos sobre a possibilidade de modulação de sua capacidade

de infectar e sobreviver dentro de macrófagos ativados *in vitro* (FERRER-SUETA; RADI, 2009), o que não foi evidenciado em nossas análises.

Como a capacidade de manter-se no interior do macrófago aumenta a demanda de tripanotona reduzida, uma função da TRed, com consequente redução das EROs e ERNs (DUMAS et al., 1997; LEIRIÃO et al., 2004; PIACENZA et al., 2008; 2013), observa-se nítida dificuldade de parasitos da cepa Choachi de *T. rangeli* na detoxificação durante sua fase infectiva, podendo ser uma das possíveis causas que influenciam a capacidade de sobrevivência deste parasita no hospedeiro vertebrado.

8 CONCLUSÕES

- *Trypanosoma rangeli* apresenta sistema de detoxificação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio similar ao *T. brucei* sendo a enzima ascorbato peroxidase ausente, entretanto a análise filogenética das sequências aminoacídicas deste genes relaciona fortemente *T. rangeli* ao *T. cruzi*.
- A análise das sequências aminoacídicas deduzidas dos genes analisados revelou a presença dos domínios característicos de cada enzima, sugerindo que as mesmas sejam ativas em *T. rangeli*.
- Devido às dificuldades encontradas na análise dos genes envolvidos no sistema antioxidante de tripanosomatídeos em função de suas anotações, sugere-se mudanças relacionadas a classificação e nomenclatura das isoformas nas enzimas tripanotiona sintetase, glutationa peroxidase e ferro superóxido dismutase.
- As proteínas *TrTRPxcit*, *TrTRPxmit* e *TrTREd* de *T. rangeli* são expressas tanto por formas epimastigotas de cultura como em formas tripomastigotas diferenciadas *in vitro*, não havendo diferenças significativas entre os dois estágios de vida.
- As proteínas *TrTRed*, *TrTRPPxcit* e *TrTRPxmit* de *T. rangeli* não apresentam mudanças siginificativas no perfil de expressão em situação de estresse induzido por H₂O₂ em nenhum dos tempos analisados.
- A enzima TRed mostrou-se ativa nas diferentes formas evolutivas de *T. rangeli*, sendo mais ativa na forma proliferativa, epimastigota, do que na forma tripomastigota deste parasito.
- A transfecção de *T. rangeli* com a proteína homóloga TRed mostrou aumento significativo na expressão e na atividade desta enzima.

- TRed parece não ser a principal enzima envolvida na resposta do *T. rangeli* ao ambiente antioxidante em células do hospedeiro vertebrado, mas tem papel crucial durante a infecção do hospedeiro invertebrado onde a produção contínua de EROs pode limitar a infecção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALPHEY, M.S.; KONIG, J.; FAIRLAMB, A.H. Structural and mechanistic insights into type II trypanosomatid tryparedoxin-dependent peroxidases. **Biochem. J.**, **414**: 375-381, 2008.

ALLMANN, S.; MORAND, P.; EBIKEME, C. et al. Cytosolic NADPH Homeostasis in Glucose-starved Procyclic *Trypanosoma brucei* Relies on Malic Enzyme and the Pentose Phosphate Pathway Fed by Gluconeogenic Flux. **The Journal of Biological Chemistry.**, **288** (25):18494-18505. doi:10.1074/jbc.M113.462978, 2013.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.** **215**: 403-410, 1990.

ALVAREZ, M.N.; PELUFFO, G.; PIACENZA, L., RADI, R. Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.**, 286: 6627– 6640, 2011.

ALVES, J.M.; KLEIN, C.C.; DA SILVA, F.M.; COSTA-MARTINS, A.G.; SERRANO, M.G. et al. Endosymbiosis in trypanosomatids: the genomic cooperation between bacterium and host in the synthesis of essential amino acids is heavily influenced by multiple horizontal gene transfers. **BMC Evol. Biol.**, **13**: 190, 2013.

ANDREWS, N. W. Oxidative stress and intracellular infections: more iron to the fire. **The Journal of Clinical Investigation** **122**: 2352–2354, 2012.

AÑEZ, N.; EAST, J.S. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 II. Its effect on feeding behavior of triatomine bugs. **Acta Trop.**, 47: 93-95, 1984.

AÑEZ, N.; VELANDIA, J.; RODRÍGUEZ, A. M. Estudios sobre *T.rangeli* Tejera, 1920. VIII. Respuestas a las reinfecciones en lós mamíferos. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 80: 149-153, 1985.

ARIAS, D.G. et al. Redox metabolism in *Trypanosoma cruzi*: functional characterization of tryparedoxins revisited. **Free Radic. Biol Med.**, 63: 65-77, 2013.

ARIYANAYAGAM, M. R.; OZA, S. L.; GUTHER, M. L. S.; FAIRLAMB, A. H. Phenotypic analysis of trypanothione synthetase knockdown in the African trypanosome. **Bioch. J.**, **391** (2) 425-432, 2005.

ASLETT et al. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. **Nucl. Acids Res.**, **38** (suppl 1): D457-D462, 2010.

ATWOOD, J.A. 3rd, et al.. The *Trypanosoma cruzi* proteome. **Science**, **309** (5733): 473-6, 2005.

ARUOMA, O.I.; HALLIWELL, B.; HOEY, B.M.; BUTLER, J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. **Free Radical Biology & Medicine** **6**(6):593-7, 1989.

AZAMBUJA, P.; RATCLIFFE, N.A.; GARCIA, E.S. Towards an understanding of the interactions of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* within the reduviide insect host *Rhodnius prolixus*. **An. Acad. Bras. Cienc.**, **77**(3): 397-404, 2005.

BANNAI, H.; TAMADA, Y.; MARUYAMA, O.; NAKAI, K.; MIYANO, S.. Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. **Bioinformatics**, **18**: 298-305, 2002.

BARDERI, P.; CAMPETELLA, O.; FRASCH, A.C.C.; SANTOMÉ, J.A.; HELLMAN, U.; PETERSSON, U.; CAZZULO, J.J. The NADP-linked glutamate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: sequence, genomic organization and expression. **Biochem. J.**, **330**: 951-958, 1998.

BARROS, M.H; BANDY, B.; TAHARA, E.B.; KOWALTOWSKI, A.J. Higher Respiratory Activity Decreases Mitochondrial Reactive Oxygen Release and Increases Life Span in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.** **279** (48): 49883-49888, 2004.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, **29** (1): 113 -23, 2006.

BARTESAGHI, S.; ROMERO, N.; RADI, R. Nitric Oxide and Derived Oxidants. In: **Principles of Free Radical Biomedicine** Vo. 1 Editors K. Pantopoulos, H. M Schipper, Nova Science Publishers, Inc. 2011.

BATEMAN, A.; RAWLINGS, N.D. The CHAP domain: a large family of amidases including GSP amidase and peptidoglycan hydrolases. **Trends in Biochem.Sci.**, **28** (5): 234 – 237, 2003.

BAYER-SANTOS, E. *et al.* Expression and cellular trafficking of GP82 and GP90 glycoproteins during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Parasit Vectors**, **6**: 127, 2013.

BENDTSEN, J. D.; KIEMER, L.; FAUSBOLL, A.; BRUNAK, S. Non-classical protein secretion in bacteria. **BMC Microbiology**, **5**:58, 2005.

BERRIMAN, M.; GHEDIN, E.; HERTZ-FOWLER, C. BLANDIN, G.; RENAULD, H. *et al.* The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. **Science**, **309**: 416-422, 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, **72**: 248-254, 1976.

CALZADA, J.E. *et al.* Human trypanosome infection and the presence of intradomicile *Rhodnius pallescens* in the western border of the Panama Canal, Panama. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **74** (5): 762–5, 2006.

CANEPA, G.E.; BOUVIER, L.A.; MIRANDA, M.R.; UTTARO, A.D.; PEREIRA, C.A. Characterization of *Trypanosoma cruzi* L-cysteine transport mechanisms and their adaptive regulation. **FEMS Microbiol. Lett.**, **292**: 27-32, 2009.

CANNATA, J.J.B.; FRASCH, A.C.C.; CATALDI DE FLOMBAUM, M.A.; SEGURA, E.L.;CAZZULO, J.J. Two forms of malic enzyme with different regulatory properties in *Trypanosoma cruzi*. **Biochem. J.**, **184**: 409-419, 1979.

CARNES, J.; ANUPAMA, A.; BALMER, O.; JACKSON, A.; LEWIS, M. *et al.* Genome and phylogenetic analyses of *Trypanosoma evansi* reveal extensive similarity to *T. brucei* and multiple independent origins for dyskinetoplasty. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, **9**: e3404, 2015.

CARNIERI, E.G.; MORENO, S.N.; DOCAMPO, R. Trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi* different stages. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **61**:79–86, 1993.

- CASTRO, H.; SOUSA, C.; SANTOS, M.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; FLOHE, L.; TOMAS, A.M. Complementary antioxidant defense by Cytoplasm and mitochondrial peroxiredoxins in *Leishmania infantum*. **Free Radic Biol Med.**, 33: 1552-62, 2002.
- CASTRO, H.; TOMÁS, A.M. Peroxidases of trypanosomatids. **Antioxid Redox Signal**, 10:1593-06, 2008.
- CASTRO-PINTO, D.B. *et al.* Cloning and expression of trypanothione reductase from a New World *Leishmania* species. **Arch. Microbiol.**, 189: 375–384, 2008.
- CLAROS, M.G.; VINCENS, P. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. **Eur J. Biochem.** 241: 779-786, 1996.
- COLOTTI, G.; ILARI, A. Polyamine metabolism in *Leishmania*: from arginine to trypanothione. *Amino Acids*, 40 (2): 269 -285, 2011.
- COMINI M., MENGE U., WISSING J., FLOHÉ L. Trypanothione synthesis in *Crithidia* revisited. **J. Biol. Chem.** 280: 6850–6860, 2005.
- COSENTINO-GOMES, D.; RUSSO-ABRAHÃO, T.; FONSECA-DE-SOUZA, A.L.; FERREIRA, C.R.; GALINA, A.; MEYER-FERNANDES, J.R. Modulation of *Trypanosoma rangeli* ecto-phosphatase activity by hydrogen peroxide. **Free Rad. Biol. and Medic.**, 47: 152-158, 2009.
- COSENTINO-GOMES, D., ROCCO-MACHADO, N., MEYER-FERNANDES, J.R. *Rhodnius prolixus*: Modulation of antioxidant defenses by *Trypanosoma rangeli*. **Experim.Parasitol.**, 145: 118-124, 2014.
- COURA, J.R. *et al.* Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 90: 278-279, 1996.
- D' ALESSANDRO, A. Biology of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920. In: LUMSDEN, W. H. R.; EVANS, D. A. **Biology of Kinetoplastida**. Vol. 1. London: Academic Press, 1976. p. 328 – 403.
- D' ALESSANDRO, A.; SARAVIA, N.G. *Trypanosoma rangeli*. In: GILLES HERBERT, M. **Protozoal Disease V**. 2 ed. Oxford University Press, 1999. p. 398-412.

DE STEFANIE MARQUES, D. *et al.* Susceptibility of different triatomine species to *Trypanosoma rangeli* experimental infection. **Vector-Borne Zoon. Dis.**, 6: 50 -6, 2006.

DECUYPERE, S.; VANAERSCHOT, M. *et al.* Molecular mechanisms of drug resistance in natural *Leishmania* populations vary with genetic background. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, 6(2):e1514, 2012.

DENICOLA, A.; RUBBO, H.; RODRIGUEZ, D.; RADÍ, R. Peroxynitrite-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. **Arch. Biochem. Biophys.**, 304: 279–286, 1993.

DENKERS ,E.Y.; BUTCHER BA. Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans. *Trends Parasitol.*, 21(1): 35-41, 2005

DÍAZ, M.L.; SOLARI, A.; GONZÁLEZ, C. I. Differential expression of *Trypanosoma cruzi* I associated with clinical forms of Chagas disease: Overexpression of oxidative stress proteins in acute patient isolate. **J. Prot.**, 74: 1673 – 82, 2011.

DHIMAN, M.; CORONADO, Y. A.; VALLEJO, C. K. *et al.* Innate Immune Responses and Antioxidant/Oxidant Imbalance Are Major Determinants of Human Chagas Disease. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, 7 (8): e2364, 2013.

DUFERNEZ, F., YERNAUX, C.; GERBOD, D.; NOËL, C.; *et al.* The presence of four iron-containing superoxide dismutase isozymes in Trypanosomatidae: Characterization, subcellular localization and phylogenetic origin in *Trypanosoma brucei*. **Free Radic Biol Med** 40: 210-225, 2006.

DUMAS, C. *et al.* Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. **EMBO J.**, 16: 2590-8, 1997.

DURAN-REHBEIN, G.A.; VARGAS-ZAMBRANO, J.C.; CUELLAR, A.; PUERTA, C.J.; GONZALEZ, J.M. Mammalian cellular culture models of *Trypanosoma cruzi* infection: a review of the published literature. **Parasite**, 21: 1-9, 2014.

EGER, I. **Potencial quimioterapêutico de diferentes derivados do ácido gálico para o tratamento da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*: avaliação *in vitro* e *in vivo***. 2010. 105 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biociências)

- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

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

EICHER, S.; SCHAUB, G.A. Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. **Exp. Parasitol.**, 100: 17-27, 2002.

EL-SAYED, N.M *et al.* Comparative genomics of Trypanosomatid parasitic protozoa. **Science**, 309 (5733): 404-9, Jul 15, 2005.

EL-SAYED, N.M.; ALARCON, C. M.; BECK, J.C.; SHEFFIELD, V. C.; DONELSON, J. E. cDNA expressed sequence tags of *Trypanosoma brucei rhodesiense* provide new insights into the biology of the parasite. **Mol. Biochem.Parasitol.**, 73: 75 – 90, 1995.

EMANUELSSON, O.; NIELSEN, H.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. **J. Mol. Biol.**, 300: 1005-1016, 2000.

EMANUELSSON, O. *et al.* Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nature protocols*, 2 (4): 953-71, 2007.

EQUBAL, A.; SUMAN, S.S.; ANWAR, S. *et al.* Stage-Dependent Expression and Up-Regulation of Trypanothione Synthetase in Amphotericin B Resistant *Leishmania donovani*. **PLoS ONE**, 9(6): e97600. 2014.

ESTEVES, P.E.C.C. **Estudo Morfológico do ciclo celular do *Trypanosoma rangeli* em meio de cultura axênico**. 2009. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2009.

FAIRLAMB, A.H; BLACKBURN, P.; ULRICH, P.; CHAIT, B.T.; CERAMI, A. Trypanothione: a novel bis (glutathionyl) spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. **Science**, 227:1485-7, 2005.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, 39:783-791, 1985.

FERREIRA, L.L. **Hospedeiros vertebrados são eficientes reservatórios para a transmissão do *Trypanosoma rangeli* ao inseto vetor**. 2013. 69 p. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

FERREIRA, L. R. P.; DOSSIN, F. D. M.; RAMOS, T. C.; FREYMÜLLER, E.; SCHENKMAN, S. Active transcription and ultrastructural changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences.**, **80** (1): 157-166, 2008.

FERREIRA, L.L.; LORENZO, M.G.; ELLIOT, S.L.; GUARNERI, A.A. A standardizable protocol for infection of *Rhodnius prolixus* with *Trypanosoma rangeli*, which mimics natural infections and reveals physiological effects of infection upon the insect. **J. Invertebr. Pathol.**, **105** (1): 91 – 97, 2010.

FERRER-SUETA, G.; RADÍ, R. Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. **ACS Chem. Biol.** **4**, 161–177, 2009.

FINZI, J.K. *et al.* *Trypanosoma cruzi* response to the oxidative stress generated by hydrogen peroxide. **Mol. Bioch. Parasit.**, 133:37-43, 2004.

FITCH, W. M. Homology. **Trends in Genetics**, 16(5): 227-231, 2000.

FLOHÉ, L. The trypanothione system and its implications in the therapy of trypanosomatid diseases. **Intern. J. Med. Microb.**, **302**: 216– 220, 2012.

FLOHÉ, L.; HECHT, H.J.; STEINERT, P. Glutathione and trypanothione in parasitic hydroperoxide metabolism. **Free Radic Biol Med** **27**: 966–984, 1999.

FLOHÉ, L.; STEINERT, P.; HECHT, H.J.; HOFMANN, B. Tryparedoxin and tryparedoxin peroxidase. **Methods Enzymol.**, 347: 244-58, 2002.

FYFE, P.K.; ALPHEY, M.S.; HUNTER, W.N. Structure of *Trypanosoma brucei* glutathione synthetase: Domain and loop alterations in the catalytic cycle of a highly conserved enzyme. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **170** (2-3): 93-99, 2010.

FYFE, P.K.; OZA, S.L.; FAIRLAMB, A.H.; HUNTER, W.N. Leishmania trypanothione synthetase-amidase structure reveals a basis for regulation of conflicting synthetic and hydrolytic activities. **J. Biol. Chem.**, **283**(25):17672-80, 2008.

GARCIA, E.S. *et al.* Parasite-mediated interactions within the insect vector: *Trypanosoma rangeli* strategies. **Parasites & Vectors**, **5**: 105, 2012.

GARCIA, E.S. *et al.* *Trypanosoma rangeli*: a new perspective for studying the modulation of immune reactions of *Rhodnius prolixus*. **Parasites & Vectors**, **2** (33): 1 – 10, 2009.

GAVEL, Y.; NILSSON, L.; VON HEIJNE, G. Mitochondrial targeting sequences why “non-amphiphilic” peptides may still be amphiphilic. **FEBS letters**, **235**(1): 173-177, 1988.

GAZOS-LOPES, F.; MESQUITA, R.D.; SILVA-CARDOSO, L.; SENNA, R.; SILVEIRA, A.B. *et al.* Glycoinositolphospholipids from Trypanosomatids Subvert Nitric Oxide Production in *Rhodnius prolixus* Salivary Glands. **PLoS ONE** **7**(10): e47285, 2012.

GIORDANA, L.; MANTILLA, B.S.; SANTANA, M.; SILBER, A.M.; NOWICKI, C. Cystathionine γ -lyase, an enzyme related to the reverse transsulfuration pathway, is functional in *Leishmania* spp. **J. Eukaryot. Microbiol.**, **61**:204–213, 2014.

GOES, G. R.; ROCHA, P. S.; DINIZ, A. R. S.; AGUIAR, P. H. N.; MACHADO, C. R.; VIEIRA, L. Q. *Trypanosoma cruzi* Needs a Signal Provided by Reactive Oxygen Species to Infect Macrophages. **PLOS Negl. Trop. I Dis.**, **10**: e0004555, 2016.

GOLDBERG, T.; HAMP, T.; ROST, B. LocTree2 predicts localization for all domains of life. **Bioinformatics**, **28**: i458-i465, 2012.

GOMES, S.A.O. *et al.* Effects of gamma irradiation on the development of *Trypanosoma rangeli* in the vector *Rhodnius prolixus*. **J. Invertebr. Pathol.**, **79**, 86-92, 2002.

GOMES, S.A.O. *et al.* *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*: *in vivo* and *in vitro* experiments. **J. Invertebr. Pathol.**, **73**: 289-293, 1999.

GONZALEZ, N., HUBER, A.; ALGRANATI, I.D. Spermidine is essential for normal proliferation of trypanosomatid protozoa. **FEBS Lett.**, **508**: 323-326, 2001.

GONZÁLEZ-PINO, M.J.; RANGEL-ALDAO, R.; SLEZYNGER, T.C. Expression of alpha- and betatubulin genes during growth of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **DNA Cell Biol.**, **18**: 449-55, 1999.

GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. A guide to *in silico* vaccine discovery for eukaryotic pathogens. **Briefings in Bioinformatics**, 24 out. 2012.

GRAÇA-SOUZA A.V.; MAYA-MONTEIRO, C.; PAIVA-SILVA, G.O.; BRAZ G.R.C.; PAES, M.C.; SORGINE, M.H.; OLIVEIRA, M.F.; OLIVEIRA, P.L. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. **Insect Bioch. and Mol. Biol.**, **36**: 322–335, 2006.

GRANT, C.M, et al. Glutathione synthetase is dispensable for growth under both normal and oxidative stress conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* due to an accumulation of the dipeptide gamma-glutamylcysteine. **Mol. Biol. Cell**, **8** (9):1699-707, 1997.

GREGORY, D.J.; OLIVIER, M.. Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite. **Leishmania Parasitology** 130 (Suppl.): S27-35, 2005.

GRETES, M.; POOLE, L.B.; KARPLUS, P.A. Peroxiredoxins in Parasites. **Antioxidants & Redox Sign.**, **17** (4): 608 - 33, 2012.

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

GRISARD, E.C. et al. Transcriptomic analyses of the avirulent protozoan parasite *Trypanosoma rangeli*. **Mol. Bioch. Parasitol.**, **174**: 18-25, 2010.

GRISARD, E.C.; ROMANHA, A.J.; STEINDEL, M. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. Em: NEVES, D.P., Ed. Parasitologia Humana. Atheneu. 2011.

GUARNERI, A. A. ; SILVA-CARDOSO, L. ; ATELLA, G. . Interação Parasito-Vetor (trypanosomatídeos). In: Silva-Neto, M. A. C.; Winter, C.;

Termignoni, C.. (Org.). **Tópicos avançados em entomologia molecular**. 1ed. Rio de Janeiro: INCT - EM, 2012. cap. 13, p. 1-37.

GUERRERO S.A. et al. His-tagged tryparedoxin peroxidase of *Trypanosoma cruzi* as a tool for drug screening. **Appl Microbiol Biotechnol.**, **53**: 410-4, 2000.

GUHL, F.; VALLEJO, G. A. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: an updated review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **98** (4): 435- 442, Jun. 2003.

GUPTA, S.; WEN, J.; GARG, N. J.. Oxidative Stress in Chagas Disease. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, 2009: 1 – 8, 2009.

GURGEL-GONÇALVES, R. *et al.* Enzootic Transmission of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in the Federal District of Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, **46**: 323 - 330, 2004.

GUTIERREZ, F. *et al.* The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, **104** (Suppl.I): 236 -45, July 2009.

HASNE, M.P.; ULLMAN, B. Identification and characterization of a polyamine permease from the protozoan parasite *Leishmania major*. **J. Biol. Chem.**, **280**: 15188-15194, 2005.

HASNE, M.P.; COPPENS, I.; SOYSA, R.; ULLMAN, B. A high-affinity putrescine-cadaverine transporter from *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Microbiol.**, **76**: 78-91, 2010.

HAO, Z. *et al.* Tsetse immune responses and trypanosome transmission: implications for the development of tsetse-based strategies to reduce trypanosomiasis. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, **98**: 12648-12653. 2001.

HAO, Z.G.; KASUMBA, I.; AKSOY, S. Proventriculus (cardia) plays a crucial role in immunity in tsetse fly (Diptera: Glossinidae). **Insect Biochem. Mol. Biol.**, **33**: 1155-1164, 2003.

HEBY, O.; PERSSON, L.; RENTALA, M. Targeting the polyamine biosynthetic enzymes: a promising approach to therapy of African sleeping sickness, Chagas' disease, and leishmaniasis. **Amino Acids**, **33**: 359-366, 2007.

- HEBY, O.; ROBERTS, S.C.; ULLMAN, B. Polyamine biosynthetic enzymes as drug targets in parasitic protozoa. **Biochem. Soc. Trans.**, **31**: 415-419, 2003.
- HELLEMOND, J.J.V.; OPPERDOES, F.R.; TIELENS, A.G.M. The extraordinary mitochondrion and unusual citric acid cycle in *Trypanosoma brucei*. **Biochem.Soc. Transac.**, **33**: 967-971, 2005.
- HILLER, K.; GROTE, A.; SCHEER, M.; MUNCH, R.; JAHN, D.. PrediSi: prediction of signal peptides and their cleavage positions. **Nucleic Acids Res.**, **32**: W375-379, 2004.
- IGOILLO-ESTEVE, M. et al . The pentose phosphate pathway in *Trypanosoma cruzi*: a potential target for the chemotherapy of Chagas disease. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, Rio de Janeiro , 79 (4): 649-663, 2007 .
- IRIGOÍN, F.; CIBILS, L.; COMINI, M.A.; WILKINSON, S.R.; FLOHÉ, L.; RADI, R. Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. **Free Radic Biol Med.**, **45**: 733-42, 2008.
- IVENS, A.C.; PEACOCK, C.S.; WORTHEY, E.A.; MURPHY, L.; AGGARWAL, G. et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**, **309**: 436-442, 2005.
- JACKSON, A.P.. Genome evolution in trypanosomatid parasites. **Parasitology**, **142** (Suppl 1): S40-56, 2015.
- JACKSON, A.P.; BERRY, A.; ASLETT, M.; ALLISON, H.C.; BURTON, P. et al. Antigenic diversity is generated by distinct evolutionary mechanisms in African trypanosome species. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **109**: 3416-3421, 2012.
- JACKSON, A.P.; OTTO, T.D.; ASLETT, M.; ARMSTRONG, S.D.; BRINGAUD, F. et al. Kinetoplastid Phylogenomics Reveals the Evolutionary Innovations Associated with the Origins of Parasitism. **Curr. Biol.**, **26**: 161-172, 2016.
- JOHN, L.; JOHN, G. J.; KHOLIA, T. A Reverse Vaccinology Approach for the Identification of Potential Vaccine Candidates from *Leishmania* spp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 21 mar. 2012.

JÖNSSON, T.J.; LOWTHER, W.T. The peroxiredoxin repair proteins.

Subcell. Biochem., **44**: 115-41, 2007.

JORGE, T.C.A.; CASTRO, S. L. *Doenças de Chagas: manual para experimentação animal*. Rio de Janeiro, RJ, Brasil: FIOCRUZ. 2000. 368 p. Antropologia e Saúde collection. ISBN 85-85676-75-2.

KALL, L.; KROGH, A.; SONNHAMMER, E.L. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. **J. Mol. Biol.**, **338**: 1027-1036, 2004.

KELLY, S.; IVENS, A.; MANNA, P.T.; GIBSON, W.; FIELD, M.C. A draft genome for the African crocodylian trypanosome *Trypanosoma grayi*. **Scientific Data 1**: 140024, 2014.

KELLY, J.M.; TAYLOR, M.C.; SMITH, K.; HUNTER, K.J.; FAIRLAMB, A.H. Phenotype of recombinant *Leishmania donovani* and *Trypanosoma cruzi* which over-express trypanothione reductase. Sensitivity towards agents that are thought to induce oxidative stress. **Eur. J. Biochem.**, **218**: 29-37, 1993.

KOERICH, L. B. et al. Differentiation of *Trypanosoma rangeli*: High production of infective trypomastigote forms *in vitro*. **P. Research.**, **88**: 21-5, 2002.

KONIG, J.; FAIRLAMB, A.H. A comparative study of type I and type II trypanedoxin peroxidases in *Leishmania major*. **FEBS J.**, **274** (21), 5643-58, 2007.

KRAEVA, N.; BUTENKO, A.; HLAVACOVA, J.; KOSTYGOV, A.; MYSKOVA, J. et al. *Leptomonas seymouri*: Adaptations to the Dixenous Life Cycle Analyzed by Genome Sequencing, Transcriptome Profiling and Co-infection with *Leishmania donovani*. **PLoS Pathog.**, **11**: e1005127, 2015.

KRAMER, S. Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: The case of kinetoplastids. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **181**: 61– 72, 2012.

KRAUTH-SIEGEL, R.L.; COMINI, M.A. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. **Biochim Biophys Acta**, **1780**:1236-48, 2008.

- KRAUTH-SIEGEL, R.L.; COMINI, M.A.; SCHLECKER, T.. The trypanothione system. *In: Peroxiredoxin Systems*, edited by FLOHÉ, L. and HARRIS, JR. New York: Springer, 2007, pp. 231–251.
- KRAUTH-SIEGEL, R.L.; LUDEMANN, H. Reduction of dehydroascorbate by trypanothione. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **80**: 203-208, 1996.
- KRIEGER, S. *et al.* Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. **Mol Microbiol.**, **35**: 542-52, 2000.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. **MEGA**: Molecular evolutionary genetic analysis. Version 1.02. Institute of Molecular Evolutionary Genetics, The Pennsylvania State University, University Park; 1993.
- KUTAY, U.; AHNERT-HILGERL, G.; HARTMANN, E. Transport route for synaptobrevin via a novel pathway of insertion into the endoplasmic reticulum membrane. **EMBO Journal**, **14** (2): 217-223, 1995.
- LANDFEAR, S.M. Nutrient transport and pathogenesis in selected parasitic protozoa. **Eukaryot. Cell**, **10**: 483-493, 2011.
- LE, S.Q.; GASCUEL, O. An improved general amino acid replacement matrix. **Mol. Biol. Evol.**, **25**: 1307-1320, 2008.
- LEIRIÃO, P.; RODRIGUES, C.D.; ALBUQUERQUE, S.S.; MOTA, M.M. Survival of protozoan intracellular parasites in host cells. **EMBO Rep.**, **5**: 1142-1114, 2004.
- LEROUX, A.L.; HAANSTRA, J. R.; BAKKER, B. M.; KRAUTH-SIEGEL, R. L. Dissecting the catalytic mechanism of *Trypanosoma brucei* trypanothione synthetase by kinetic analysis and computational modelling. **J. Biol. Chem.** **288**: 23751-23764. 2013.
- LEROUX, A.E.; MAUGERI, D.A.; OPPERDOES, F.R.; CAZZULO, J.J.; NOWICKI, C. Comparative studies on the biochemical properties of the malic enzymes from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. **FEMS Microbiol. Lett.**, **314**:25-33, 2010.

LEVICK, M.P.; TETAUD, E.; FAIRLAMB, A.H.; BLACKWELL, J.M.. Identification and characterisation of a functional peroxidoxin from *Leishmania major*. **Mol Biochem Parasitol.**, 96: 125-37, 1998.

LI, L.; STOECKERT, C.J. JR.; ROOS, D.S. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. **Genome Res.**, **13**: 2178-2189, 2003.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, 25 (4): 402-8, 2001.

LOPEZ, J.A.; CARVALHO, T.U.; DE SOUZA, W.; FLOHÉ, L. *et al.* Evidence for a trypanothione-dependent peroxidase system in *Trypanosoma cruzi*. **Free Radic Biol Med.**, **28**:767-72, 2000.

LÜCKEMEYER, D. D. **AVALIAÇÃO DO PERFIL PROTEICO DE *Trypanosoma rangeli* DURANTE O PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR *in vitro***.2014. 247 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biociências) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

MACHADO, F.S. *et al.* Current Understanding of Immunity to *Trypanosoma cruzi* Infection and Pathogenesis of Chagas Disease. **Semin. Immunopathol.**, 34(6): 753–770, 2012. doi:10.1007/s00281-012-0351-7.

MACHADO, P.E. *et al.* Differential susceptibility of triatomines of the genus *Rhodnius* to *Trypanosoma rangeli* strains from different geographical origins. **Int. J. Parasitol.**, 31: 631-633, 2001.

MACLEOD, E.T.; MAUDLIN, J.; DARBY, A.C.; WELBURN, S.C. Antioxidants promote establishment of trypanosome infections in tsetse. **Parasitology**, 134 (Pt 6): 827-3, Jun. 2007.

MAIA DA SILVA, F. *et al.* Infection rates and genotypes of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* infecting free-ranging *Saguinus bicolor* (Callitrichidae), a critically endangered primate of the Amazon Rainforest. **Acta Trop.**, 107 (2): 168-173, 2008.

MAIA DA SILVA, F. *et al.* *Trypanosoma rangeli* isolates of bats from Central Brazil: Genotyping and phylogenetic analysis enable description of

a new lineage using spliced-leader gene sequence. **Acta Tropic.**, 109 (3): 199 – 207, 2009.

MANTA, B.; COMINI, M.; MEDEIROS, A.; HUGO, M.; TRUJILLO, M. et al. Trypanothione: a unique bis-glutathionyl derivative in trypanosomatids. **Biochim. Biophys. Acta**, **1830**: 3199-3216, 2013.

MARCIANO, D.; SANTANA, M.; NOWICKI, C. Functional characterization of enzymes involved in cysteine biosynthesis and H(2)S production in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **185**: 114-120, 2012.

MARIN-COELHO, C. **Caracterização da Oligopeptidase B (OpB) de *Trypanosoma rangeli***. 2013. 90p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

MARTINEZ, J. *et al.* Genes for cysteine proteinases from *Trypanosoma rangeli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 129 (2-3): 135–41, 1995.

MASLOV, D.A.; VOTYPKA, J.; YURCHENKO, V.; LUKES, J.. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed. **Trends Parasitol.**, **29**: 43-52, 2013.

MATEO, H.; MARÍN, C.; PÉREZ-CORDÓN, G.; SÁNCHEZ-MORENO, M. Purification and biochemical characterization of four iron superoxide dismutases in *Trypanosoma cruzi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, **103** (3): 271 – 6, May, 2008.

MAUGERI, D.; CAZZULO, J.J. The pentose phosphate pathway in *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiol. Lett.**, **234**: 117-123, 2004.

MEIRELLES, R.M.S., HENRIQUES-PONS, A., SOARES, M.J., STEINDEL, M. Penetration of the salivary glands of *Rhodnius domesticus* Neiva & Pinto, 1923 (Hemiptera: Reduviidae) by *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 (Protozoa: Kinetoplastida). **Parasitol. Res.**, **97**, 259-269, 2005.

MELOS, J.L.R. ECHEVARRIA, A. sistemas enzimáticos de tripanosomatídeos como potenciais alvos quimioterápicos. **Rev. Virtual Quim.**, **4** (4), 374-392, 2012.

MELLO, C.B.; GARCIA, E.S.; RATCLIFFE, N.A.; AZAMBUJA, P. *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: Interplay with hemolymph components of *Rhodnius prolixus*. **J. Inverteb. Pathol.** 65: 261-268. 1995.

MELLO, C.B.; NIGAM; GARCIA, E.S.; AZAMBUJA, P.; NEWTON, R.P.; RATCLIFFE, N.A. Studies on a Haemolymph Lectin Isolated from *Rhodnius prolixus* and Its Interaction with *Trypanosoma rangeli*. **Exp. Parasitol.**, 91: 289–296, 1999.

MENESES, A.J.; PALAU, M.T.; ZUÑIGA, C.A. *Trypanosoma rangeli*: lo que se conoce y El impacto de su presencia. **Medunab.**, v. 7, n. 21, p. 166 – 171, 2004.

MENEZES-NETO, A. **Aprimoramento da anotação N-terminal de proteínas através da predição de peptídeo sinal em proteínas ortólogas e desenvolvimento de uma ferramenta automática para a identificação de grupos ortólogos contendo erros de anotação.** 92 fl. 2012. Tese (doutorado) para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. 2012.

MEZIANE-CHERIF, D. et al. *Trypanosoma cruzi*: immunolocalization of trypanothione reductase. **Exp. Parasitol.**, 79:536–541, 1994.

MIELNICZKI-PEREIRA, A.A.; CHIAVEGATTO, C.M.; LÓPEZ, J.A.; COLLI, W.; ALVES, M.J.; GADELHA, F.R.. *Trypanosoma cruzi* strains, Tulahuen 2 and Y, besides the difference in resistance to oxidative stress, display differential glucose-6-phosphate and 6- Phosphogluconate dehydrogenases activities. **Acta Tropica**, 101: 54–60, 2007.

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

MITTAL, M.K.; MISRA, S.; OWAIS, M.; GOYAL, N. Expression, purification, and characterization of *Leishmania donovani* trypanothione reductase in *Escherichia coli*. **Prot. Express. Purif.**, 40: 279-286, 2005.

MONTEMARTINI, M.; KALISZ, H.M.; HECHT, H.J.; STEINERT, P.; FLOHE, L. Activation of active-site cysteine residues in the peroxiredoxin-type tryparedoxin peroxidase of *Crithidia fasciculata*. **Eur J Biochem.**, 264: 516-24, 1999.

- MORALES, S. V. **Estudo da resposta inflamatória durante a infecção por *Trypanosoma rangeli***. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biologia), Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.
- MOTTA, M.C.; MARTINS, A.C.; DE SOUZA, S.S.; CATTAPRETA, C.M.; SILVA, R. et al. Predicting the proteins of *Angomonas deanei*, *Strigomonas culicis* and their respective endosymbionts reveals new aspects of the trypanosomatidae family. **PLoS One**, **8**: e60209, 2013.
- MULLER, S.; LIEBAU, E.; WALTER, R.D.; KRAUTH-SIEGEL, R.L. Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. **Trends Parasitol.**, **19**: 320-328. (2003).
- MYHRE, O.; ANDERSEN, J.M.; AARNES, H.; FONNUM, F. Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. **Biochemical Pharmacology.**, **65**(10):1575–1582, 2003.
- NAVROT, N.; COLLIN, V.; GUALBERTO, J.; GELHAYE, E.; HIRASAWA, M. et al. Plant glutathione peroxidases are functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stresses. **Plant Physiol.**, **142**: 1364-1379, 2006.
- NEUBERGER, G.; MAURER-STROH, S.; EISENHABER, B.; HARTIG, A.; EISENHABER, F. Motif refinement of the peroxisomal targeting signal 1 and evaluation of taxon-specific differences. **J. Mol. Biol.**, **328**(3):567-79, 2003.
- NICKEL, W. The mystery of nonclassical protein secretion. **Europ. J. Bioch.**, **270** (10): 2109-2119, 2003.
- NOGOCEKE, E.; GOMMEL, D.U.; KIESS, M.; KALISZ, H.M.; FLOHÉ, L. A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothione-mediated peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata*. **Biol Chem.**, **378**: 827-36, 1997.
- NOGUEIRA, F.B.; RUIZ, J.C.; ROBELLO, C.; ROMANHA, A.J.; MURTA, S.M. Molecular characterization of cytosolic and mitochondrial tryparedoxin peroxidase in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. **Parasitol. Res.**, **104**: 835-44, 2009.

NOGUEIRA, N. P.; SARAIVA, F. M. S.; SULTANO, P. E. *et al.*, Proliferation and Differentiation of *Trypanosoma cruzi* inside Its Vector Have a New Trigger: Redox Status. **PLoS ONE** **10**(2): 1 - 16, 2015.

NOZAKI, T.; ASAI, T.; SANCHEZ, L.B.; KOBAYASHI, S.; NAKAZAWA, M.; TAKEUCHI, T. Characterization of the gene encoding serine acetyltransferase, a regulated enzyme of cysteine biosynthesis from the protist parasites *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. Regulation and possible function of the cysteine biosynthetic pathway in *Entamoeba*. **J. Biol. Chem.**, **274**(45): 32445–32452, 1999.

NOZAKI, T.; SHIGETA, Y.; SAITO-NAKANO, Y.; IMADA, M.; KRUGER, W.D. Characterization of transsulfuration and cysteine biosynthetic pathways in the protozoan hemoflagellate, *Trypanosoma cruzi*. Isolation and molecular characterization of cystathionine beta-synthase and serine acetyltransferase from *Trypanosoma*. **J. Biol. Chem.**, **276**(9):6516–6523, 2001.

OLIVEIRA, M.A de.; SOUZA, W. de. Further morphological studies on the behavior of *Trypanosoma rangeli* in the hemocytes of *Rhodnius prolixus*. **Parasitology Intern.**, **52** (4): 299 – 307, 2003.

OSÓRIO, Y.; TRAVI, B. L.; PALMA, G. I.; SARAIVA, N. G. Infectivity of *Trypanosoma rangeli* in a promonocytic mammalian cell line. **J Parasitol**, **81** (5): 687-93, 1995.

OZA S. L., ARIYANAYAGAM M. R., AITCHESON N., FAIRLAMB A. H. Properties of trypanothione synthetase from *Trypanosoma brucei*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **131**: 25-33, 2003.

OZA S. L., TETAUD E., ARIYANAYAGAM M. R., WARNON S. S., FAIRLAMB A. H. A single enzyme catalyses formation of trypanothione from glutathione and spermidine in *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.**, **277**: 35853–35861, 2002.

OZA S. L., SHAW M. P., WYLLIE S., FAIRLAMB A. H. Trypanothione biosynthesis in *Leishmania major*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **139**: 107–116, 2005.

PAIVA, C.N.; BOZZA, M.T. Are Reactive Oxygen Species Always Detrimental to Pathogens? **Antioxidants & Redox Signaling**, **20** (6): 1001–12, 2014.

PAIVA, C. N.; FEIJÓ, D. F.; DUTRA, F. F.; CARNEIRO, V. C.; et al. Oxidative stress fuels *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, **122** (7): 2531–2542, 2012.

PAL, A. K.; BELLO, D.; BUDHLALL, B.; ROGERS, E. Screening for Oxidative Stress Elicited by Engineered Nanomaterials: Evaluation of Acellular DCFH Assay. **Dose Response**, **10**(3): 308–330, 2012.

PARODI-TALICE, A. *et al.* Proteomic analysis of metacyclic trypomastigotes undergoing *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **J Mass Spectrom.**, **42** (11): 1422-32, Nov. 2007.

PASTERNAK, T.; RUDAS, V.; POTTERS, G.; JANSEN, M.A.K.. Morphogenic effects of abiotic stress: reorientation of growth in *Arabidopsis thaliana* seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, **53**: 299-314, 2005.

PATEL, S.; HUSSAIN, S.; HARRIS, R.; SARDIWAL, S.; KELLY, J.M. et al. Structural insights into the catalytic mechanism of *Trypanosoma cruzi* GPXI (glutathione peroxidase-like enzyme I). **Biochem. J.**, **425**: 513-522, 2010.

PEACOCK, C.S.; SEEGER, K.; HARRIS, D.; MURPHY, L.; RUIZ, J.C. et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nat. Genet.**, **39**: 839-847, 2007.

PELOSO, E. F. *et al.* Role of *Trypanosoma cruzi* peroxiredoxins in mitochondrial bioenergetics. **J Bioenerg Biomembr.**, **43**: 419-24, 2011.

PELOSO, E. F. *et al.* Tryparedoxin peroxidases and superoxide dismutases expression as well as ROS release are related to *Trypanosoma cruzi* epimastigotes growth phases. **Arch Biochem Biophys.**, **520** (2): 117-22, Apr 15, 2012.

PELOSO, E.F.; DIAS, L.; QUEIROZ, R.M.; LEME, A.F.; PEREIRA, C.N.; CARNIELLI, C.M.; WERNECK, C.C.; SOUSA, M.V.; RICART, C.A.; GADELHA, F.R. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial tryparedoxin peroxidase is located throughout the cell and its pull down provides one step towards the understanding of its mechanism of action. **Biochim. Biophys Acta.**, **1864**(1):1-10, 2016.

PELUFFO, G. *et al.* L-arginine metabolism during interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells. **Trends Parasitol.**, 20 (8): 363-9, Aug 2004.

PENKETH, P.G.; KLEIN, R.A. Hydrogen peroxide metabolism in *Trypanosoma brucei*. **Mol. Biochem.Parasitol.**, 20: 111-121, 1986.

PEREIRA, M.E.A.; ANDRADE, A.F.B.; RIBEIRO, J.M.C. Lectins of distinct specificity in *Rhodnius prolixus* interact selectively with *Trypanosoma cruzi*. **Science**, 211: 597-600, 1981.

PETERSEN, T.N.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nat. Methods**, 8: 785-786, 2011.

PIACENZA, L.; ALVAREZ, M.N.; PELUFFO, G.; RADI, R. Fighting the oxidative assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to infection. **Curr. Opin. Microbiol.**, 12: 415-21, 2009a.

PIACENZA, L. *et al.* Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of *Trypanosoma cruzi* virulence. **Int. J. Parasitol**, 39: 1455-64. 2009b.

PIACENZA, L. *et al.* Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression. **Biochem. J.**, 403: 323–334, 2007.

PIACENZA, L. *et al.* Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. **Biochem. J.**, 410 (2): 359-68, 2008.

PIACENZA, L. *et al.* *Trypanosoma cruzi* Antioxidant Enzymes as Virulence Factors in Chagas Disease. **Antioxidants & Redox Signaling.**, 19(7): 723-734, September 1, 2013.

PIÑEYRO, M.D.; ARCARI, T.; ROBELLO, C.; RADI, R.; TRUJILLO, M.. Tryparedoxin peroxidases from *Trypanosoma cruzi*: high efficiency in the catalytic elimination of hydrogen peroxide and peroxynitrite. **Arch. Biochem. Biophys.**, 507: 287-95, 2011.

PIÑEYRO, M.D.; PARODI-TALICE, A.; ARCARI, T.; ROBELLO, C. Peroxiredoxins from *Trypanosoma cruzi*: virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease? **Gene**, **408**: 45-50, 2008.

PORCEL, B.M.; DENOEUDE, F.; OPPERDOES, F.; NOEL, B.; MADOU, M.A. et al. The streamlined genome of *Phytomonas* spp. relative to human pathogenic kinetoplastids reveals a parasite tailored for plants. **PLoS Genet.**, **10**: e1004007, 2014.

PRATT, C.; NGUYEN, S.; PHILLIPS, M. A. Genetic Validation of *Trypanosoma brucei* Glutathione Synthetase as an Essential Enzyme. **Eukaryotic Cell.**, **13**(5):614-624, 2014.

PRESTES, E. **Marcadores moleculares e morfológicos da citocinese em *Trypanosoma rangeli***. 2013. 123 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

RAYMOND, F.; BOISVERT, S.; ROY, G.; RITT, J.F.; LEGARE, D. et al. Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. **Nucleic. Acids Res.**, **40**: 1131-1147, 2012.

RAMIREZ, L.E. et al. Primeira evidência de *Trypanosoma rangeli* no Sudoeste do Brasil, região endêmica para a doença de Chagas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.31, p. 99-102, 1998.

RATCLIFFE, N.A.; NIGAM, Y.; MELLO, C.B.; GARCIA, E.; AZAMBUJA, P. *Trypanosoma cruzi* and erythrocyte agglutinins: A comparative study of occurrence and properties in the gut and hemolymph of *Rhodnius prolixus*. **Exp. Parasitol.**, **83**: 83-93, 1996.

RÄZ, B.; ITEN, M.; GREITHER-BÜHLER, Y.; KAMINSKY, R.; BRUN, R. The Alamar Blue assay to determine drug sensitivity of African trypanosomes (*T.b. rhodesiense* and *T.b. gambiense*) *in vitro*. **Acta Trop.**, **68**(2): 139–147, 1997.

RHEE, S. G.; KANG, S. W.; JEONG, W.; CHANG, T. S.; YANG, K. S.; WOO, H. A. Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. **Curr. Opin. Cell Biol.**, **17**:183–189; 2005.

ROBERTS, S.C.; JIANG, Y.; JARDIM, A.; CARTER, N.S. *et al.* Genetic analysis of spermidine synthase from *Leishmania donovani*. *Mol.Bioch. Parasitol.*, 115: 217–226, 2001.

ROMÃO, P.R.; FONSECA, S.G.; HOTHERSALL, J.S.; NORONHA-DUTRA, A.A.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Glutathione protects macrophages and *Leishmania major* against nitric oxide-mediated cytotoxicity. **Parasitology**, **118**: 559–566, 1999.

ROMERO I. C.; SARAIVA N.; WALKER J. Selective Action Of Fluoroquinolones Against Intracellular Amastigotes Of *Leishmania (Viannia) panamensis* *in vitro*. **J. Parasitol**, 91: 1474-1479, 2005.

ROMERO, I. *et al.* Transsulfuration is an active pathway for cysteine biosynthesis in *Trypanosoma rangeli*. **Parasites & Vectors**, 7:197, 2014.

ROMERO, I.; TÉLLEZ, J.; ROMANHA, A.J.; STEINDEL, M.; GRISARD, E.C. Upregulation of Cysteine Synthase and Cystathionine β -Synthase Contributes to *Leishmania braziliensis* Survival under Oxidative Stress. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(8):4770-4781, 2015.

ROSSATO, F. A.; ZECCHIN, K. G.; LA GUARDIA, P. G.; ORTEGA, R. M.; ALBERICI, L. C.; COSTA, R. A. P.; CATHARINO, R. R.; GRANER, E.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A.E. Fatty acid synthase inhibitors induce apoptosis in non tumorigenic melan-a cells associated with inhibition of mitochondrial respiration. **PLoS One**, **9**(6): e101060, 2014.

SAMBROOK, J.; FRITCH, E.F. & MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, Vol. 3. 2ed. New York; Cold Spring Harbor; 2001.

SCHLECKER, T.; SCHMIDT, A.; DIRDJAJA, N.; VONCKEN, F.; CLAYTON, C.; KRAUTH-SIEGEL, R.L.. Substrate specificity, localization, and essential role of the glutathione peroxidase-type trypanothione peroxidases in *Trypanosoma brucei*. **J. Biol. Chem.**, 280: 14385–94, 2005.

SCHWENDE, H.; FITZKE, E.; AMBS, P.; DIETER, P. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. **Journal of Leukocyte Biology** **59**: 555-561, 1996.

SEIB, K. L.; ZHAO, X.; RAPPUOLI, R. Developing vaccines in the era of genomics: a decade of reverse vaccinology. **Clinical microbiology and**

infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, **18** (5): 109-16, 2012.

SCHLECKER, T.; COMINI, M.A.; MELCHERS, J.; RUPPERT, T.; KRAUTH-SIEGEL, R.L. Catalytic mechanism of the glutathione peroxidase-type trypanothione peroxidase of *Trypanosoma brucei*. **Biochem. J.**, **405**: 445–454, 2007.

SHENG, Y.; ABREU, I.A.; CABELLI, D. E. et al., Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases. **Chem. Rev.**, **114**: 3854–3918, 2014.

SIEVERS, F., HIGGINS, D. G. . Clustal Omega. **Curr. Protoc. Bioinform.** **48**:1.25.1-1.25.33, 2014.

SIMPSON, A.G.; STEVENS, J.R.; LUKES, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends Parasitol.**, **22**: 168-174, 2006.

SMITH, K.; NADEAU, K.; BRADLEY, M.; WALSH, C.; FAIRLAMB, A.H. Purification of glutathionylspermidine and trypanothione synthetases from *Crithidia fasciculata*. **Protein Sci.**, **1**: 874-883, 1992.

SOARES, C.O.; ALVES, M.J.M.; BECHARA, E.J.H. 1,4-Diamino-2-butanone, a wide-spectrum microbicide, yields reactive species by metal-catalyzed oxidation. **Free Radic. Biol. Med.**, **50**: 1760–1770, 2011.

SOARES, C.O.; COLLI, W.; BECHARA, E.J.H.; ALVES, M.J.M. 1,4-Diamino-2-butanone, a putrescine analogue, promotes redox imbalance in Trypanosome cruzi and mammalian cells. **Arch. Biochem. Biophys.**, **528**: 103–110, 2012.

SOMMER, J.M.; WANG, C.C. Targeting proteins to the glycosomes of African trypanosomes. **Annu. Rev. Microbiol.**, **48**: 105–138, 1994.

SOUSA, A.F.; GOMES-ALVES, A.G.; BENÍTEZ, D. *et al.*, Genetic and chemical analyses reveal that trypanothione synthetase but not glutathionylspermidine synthetase is essential for *Leishmania infantum*. **Free Radical Biology and Medicine**, **73**: 229–238, 2014.

SOUSA, T. N. DE; MENEZES-NETO, A. DE; BRITO, C. F. A. DE. “Omics” in the study of the major parasitic diseases malaria and schistosomiasis. **Infection, Genetics and Evolution**, **19**: 258–273, 2013.

SOUZA, A.V.G., PETRETSKI, J.H., DEMASI, M., BECHARA, E.J.H., OLIVEIRA, P.L. Urate protects a blood-sucking insect against hemin-induced oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, **22**: 209–214, 1997.

SOUZA, M.A. *et al.* *Trypanosoma rangeli* Tejera 1920, in chronic Chagas' disease patients under ambulatory care at the Evandro Chagas Clinical Research Institute (IPEC-Fiocruz, Brazil). **Parasitol. Res.**, v. 103, n. 3, p. 697 -703, 2008.

SOUZA, W.; DE CARVALHO, T.M.U.; BARRIAS, E.S. Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. **Int. J. Cell Biol.**, 2010: 1–18, 2010.

STEGLICH, C.; SCHAEFFER, S.W. The ornithine decarboxylase gene of *Trypanosoma brucei*: Evidence for horizontal gene transfer from a vertebrate source. **Infect. Genet. Evol.**, **6**: 205-219, 2006.

STEINDEL, M. **Caracterização de cepas de *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi* isoladas de reservatórios e vetores silvestres em Santa Catarina**. 1993. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.

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

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

STEINERT, P. *et al.* Citoplasma localization of the trypanothione peroxidase system in *Crithidia fasciculata*. **Free Radic Biol Med.**, **26**: 844-9, 1999.

STIJLEMANS, B.; CALJON, G.; VAN DEN ABBEELE, J.; VAN GINDERACHTER, J.A.; MAGEZ, S.; DE TREZ, C.. Immune Evasion Strategies of *Trypanosoma brucei* within the Mammalian Host: Progression to Pathogenicity. **Frontiers in Immunology**, **7**:233. 2016

STOCO, P.H. **Caracterização das DNA Topoisomerases II de *Trypanosoma rangeli***. 2010. 163 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

STOCO, P. H.; WAGNER, G.; GERBER, A. *et al.*, Genome of the avirulent human-infective Trypanosome - *Trypanosoma rangeli*. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, 8(9): e3176, 2014.

SULLIVAN, F.X.; WALSH, C.T. Cloning, sequencing, overproduction and purification of trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 44: 145-148, 1991.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Mol.Biol. Evol.**, 30: 2725-2729, 2013.

TAYLOR, M.C.; KELLY, J.M.; CHAMPMAN, C.J.; FAIRLAMB, A.H.; MILES, M.A. The structure, organization, and expression of the *Leishmania donovani* gene encoding trypanothione reductase. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 64:293-301, 1994.

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

TEMPERTON, N.J.; WILKINSON, S.R.; MEYER, D.J.; KELLY, J.M. Overexpression of superoxide dismutase in *Trypanosoma cruzi* results in increased sensitivity to the trypanocidal agents gentian violet and benznidazole. **Mol.Bioch.Parasitol.**, 96:167–176, 1998.

TETAUD, E.; FAIRLAMB, A.H. Cloning, expression and reconstitution of the trypanothione dependent peroxidase system of *Crithidia fasciculata*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 96: 111-23, 1998.

TOMÁS, A.M. ; CASTRO, H. Redox Metabolism in Mitochondria of Trypanosomatids. **Antioxidants & Redox Signaling**. 1 (Sept): 696-707, 2013.

TONKS, N. K. Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling. **Cell**, 121: 667–670; 2005.

TOVAR, J.; CUNNINGHAM, M.L.; SMITH, A.C.; CROFT, S.L.; FAIRLAMB, A.H. Downregulation of *Leishmania donovani* trypanothione

reductase by heterologous expression of a trans-dominant mutant homologue: effect on parasite intracellular survival. **Proc. Natl. Acad. Sci.**,95: 5311–16, 1998.

TOVAR, J.; FAIRLAMB, A.H. Extrachromosomal, homologous expression of trypanothione reductase and its complementary mRNA in *Trypanosoma cruzi*. **Nucleic Acids Res.**, 24: 2942-49, 1996.

TRUJILLO, M.; BUDDE, H.; PINEYRO, M.D.; STEHR, M.; ROBELLO, C.; FLOHE, L.; RADY, R. *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* trypanothione peroxidases catalytically detoxify peroxynitrite via oxidation of fast reacting thiols. **J. Biol. Chem.**, 279: 34175 – 34182, 2004.

TURRENS, J.F. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. **Mol. Aspects of Medicine**, 25: 211-220, 2004.

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

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

URREA, D.; CARRANZA, J.C.; CUBA CUBA, C.; GURGEL-GONÇALVES, R.; GUHL, F.; SCHOFIELD, C.J.; TRIANA, O.; VALLEJO, G.A. Molecular characterisation of *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius ecuadoriensis* in Peru, *R. colombiensis* in Colombia and *R. pallescens* in Panama, supports a co-evolutionary association between parasites and vector. **Infect. Genet. Evol.** 5: 123–129. 2005.

URREA, D.A., HERRERA, C.P., FALLA, A., CARRANZA, J.C., CUBACUBA, C., TRIANA-CHÁVEZ, O., GRISARD, E.C., GUHL, F., VALLEJO, G.A.. Sequence analysis of the spliced leader intergenic region (SL-IR) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) of *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius ecuadoriensis*, *R. colombiensis*, *R. pallescens* and *R. prolixus* suggests a degree of co-evolution between parasites and vectors. **Acta Tropica**, 120: 59-66. 2011.

VALLEJO, G.A.; GUHL, F.; CARRANZA, J.C.; LOZANO L.E.; SÁNCHEZ, J.L.; JARAMILLO, J.C.; GUALTERO, D.; CASTAÑEDA,

N.; SILVA, J.C.; STEINDEL, M., Parity between kinetoplast DNA and mini-exon gene sequences supports either clonal evolution or speciation in *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius colombiensis*, *R. pallescens* and *R. prolixus* in Colombia. **Infect. Genet. Evol.** **3**: 39–45, 2003.

VALLEJO, G. A.; GUHL, F.; SCHAUB, G. A. Triatominae-*Trypanosoma cruzi*/*T. rangeli*: Vector-parasite interactions. **Acta Trop.**, 110 (2 - 3): 137-147, Maio/Jun. 2009.

VALLEJO, G.A.; SUÁREZ, Y.; OLAYA, J.L.; GUTIÉRREZ, S.A.; CARRANZA; J.C. *Trypanosoma rangeli*: un protozoo infectivo y no patógeno para el humano que contribuye al entendimiento de la transmisión vectorial y la infección por *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas. **Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat.** **39**(150):111-122, 2015.

VARGAS, P.A.O. Genes de Cisteíno proteases (Catepsina L-like) de *Trypanosoma rangeli*: polimorfismo, relações filogenéticas e alvos para diagnóstico e genotipagem. 2008. 78 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

VENTURINI, G. *et al.* Nitric oxide inhibits cruzipain, the major papain-like cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 270 (2): 437-41, Apr., 2000.

WALKER, J.; BARRETT, J. Cystathionine beta-synthase and gamma-cystathionase in helminths. **Parasitol Res.**, **77** (8):709–713, 1991.

WANG, W.; BALLATORI, N. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. **Pharmacol. Rev.**, **50**: 335-356, 1998.

WANG, H.; JOSEPH, J.A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. **Free Rad. Biol. Med.**, **27**: 612-616, 1999.

WHITTEN, M.M. *et al.* Differential modulation of *Rhodnius prolixus* nitric oxide activities following challenge with *Trypanosoma rangeli*, *T. cruzi* and bacterial cell wall components. **Insect Biochem Mol Biol.**, **37** (5): 440–452, 2007.

WHITTEN, M.M. *et al.* Role of superoxide and reactive nitrogen intermediates in *Rhodnius prolixus* (Reduviidae) *Trypanosoma rangeli* interactions. **Exp Parasitol.**, **98** (1): 44 – 57, 2001.

WINTJENS, R.; NOE[•], C.; MAY, A. C. W; GERBOD, D. Specificity and Phenetic Relationships of Iron- and Manganese-containing Superoxide Dismutases on the Basis of Structure and Sequence Comparisons. **The Journal of Biological Chemistry**, **279** (10) 9248–9254, March, 2004.

WILKINSON, S.R. *et al.* The *Trypanosoma cruzi* enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin. **J. Biol. Chem.**, **277**: 17062 – 71, 2002a.

WILKINSON, S.R., *et al.* TcGPXII, a glutathione-dependent *Trypanosoma cruzi* peroxidase with substrate specificity restricted to fatty acid and phospholipid hydroperoxides, is localized to the endoplasmic reticulum. **Biochem. J.**, **364**: 787–794, 2002b.

WILKINSON, S.R.; OBADO, S.O.; MAURICIO, I.L.; KELLY, J.M. *Trypanosoma cruzi* expresses a plant-like ascorbate-dependent hemoperoxidase localized to the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 13453-13458, 2002c.

WILKINSON, S.R.; HORN, D.; PRATHALINGAM, S.R.; KELLY, J.M. RNA interference identifies two hydroperoxide metabolizing enzymes that are essential to the bloodstream form of the African trypanosome. **J. Biol. Chem.**, **278**: 31640 – 46, 2003.

WILKINSON, S.R.; PRATHALINGAM, S.R.; TAYLOR, M.C.; HORN, D.; KELLY, J.M. Vitamin C biosynthesis in trypanosomes: a role for the glycosome. **Proc Natl Acad Sci.**, **102**: 11645-50, 2005.

WILKINSON, S.R.; TEMPERTON, N.J.; MONDRAGON, A.; KELLY, J.M. Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*. **J Biol Chem.**, **275**: 8220 – 25, 2000.

WILLERT, E.K.; PHILLIPS, M.A. Regulated Expression of an Essential Allosteric Activator of Polyamine Biosynthesis in African Trypanosomes. **PLoS Pathog.**, **4**(10): e1000183, 2008.

WILLIAMS, R.A.; WESTROP, G.D.; COOMBS, G.H. Two pathways for cysteine biosynthesis in *Leishmania major*. **Biochem. J.**, **420**(3):451–462, 2009.

WILSON, M. E.; ANDERSEN, K. A.; BRITIGAN, B. E. Response of *Leishmania chagasi* promastigotes to oxidant stress. *Infection and Immunity*, 62(11), 5133-5141, 1994.

WYLLIE, S.; VICKERS, T.J.; FAIRLAMB, A.H. Roles of trypanothione S-transferase and tryparedoxin peroxidase in resistance to antimonials. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, 52 (4): 1359 - 65, 2008.

YVES, C. Chagas Disease (American Trypanosomiasis). **Med. J.**, 3 (3): 1-22, 2002.

ZHANG, P.; LIU, B.; KANG, S.W.; SEO, M.S.; RHEE, S.G.; OBEID, L.M. Thioredoxin peroxidase is a novel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of Bcl-2. **J Biol Chem.**, 272: 30615-8, 1997.

ZHANG, X.; CUI, J.; NILSSON, D. et al. The *Trypanosoma brucei* MitoCarta and its regulation and splicing pattern during development. **Nucleic Acids Res.**, **38**(21): 7378 - 7387, 2010.

APÊNDICE

Tabela 1: Programas utilizados nas análises *in silico* dos genes envolvidos na defesa antioxidante de *T. rangeli* e de outros tripanosomatídeos.

Programa	Função	Endereço eletrônico
<i>Clustal Omega</i>	Programa para alinhamentos múltiplos	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo
<i>Mega</i>	Ferramenta integrada para a realização de alinhamento de sequências, inferência de árvores filogenéticas, estimando-se tempos de divergência e taxas de evolução molecular	http://www.megasoftware.net/
<i>Translate Expasy</i>	Predição de sequência aminoacídica a partir da sequência de nucleotídeos (DNA/RNA)	http://web.expasy.org/translate/
<i>ProtParam</i>	Predição de vários parâmetros físicos e químicos a partir de sequência aminoacídica ou ID do Swiss-Prot ou TrEMBL	http://web.expasy.org/protparam/
PSORTII	Predição de localização da proteína na célula eucariótica, através de reconhecimento de sítios específicos	http://psort.hgc.jp/
<i>iPSORT</i>	Identifica peptídeos sinais de localização subcelular como mitocondrial (MTP) ou cloroplasto (CTP)	http://ipsort.hgc.jp/
<i>Phobius</i> ⁸	Preditor de peptídeo sinal e topologia de região transmembrana	http://phobius.sbc.su.se/
<i>Mitoprot</i> ⁹	Calcula se a região N Terminal da proteína apresenta sítio de clivagem e de endereçamento mitocondrial	http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html

⁸ Lukas Käll, Anders Krogh and Erik L. L. Sonnhammer.

Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction--the Phobius web server. *Nucleic Acids Res.*, 35:W429-32, July 2007

⁹ M.G. Claros, P. Vincens. *Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. Eur. J. Biochem.* 241, 779-786 (1996).

<i>Predotar</i>	Preditor de peptídeo sinal na região N-Terminal	https://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html
<i>PTS1</i>	Prediz peptídeos sinais de endereçamento para peroxissomo	http://mendel.imp.ac.at/mendeljsp/sat/pts1/PTS1predictor.jsp
<i>SecretomeP 2.0</i>	Prediz peptídeos sinais que desencadeiam a secreção da proteína	http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/
<i>LocTree</i>	Prediz peptídeos sinais de endereçamento celular	https://www.rostlab.org/services/loctree3/
<i>SignalP 4.1</i>	Preditor de peptídeos sinais e sítios de clivagem	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
<i>TargetP 1.1</i>	Preditor de localização subcelular	http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/
<i>ESLPred2</i>	Preditor de localização subcelular	http://www.imtech.res.in/raghava/eslpred2/submit.html
<i>Octopus</i>	Preditor de peptídeo sinal e topologia de região transmembrana	http://octopus.cbr.su.se/index.php
<i>PrediSi</i>	Preditor de peptídeos sinais	http://www.predisi.de/
<i>Conserved Domains</i>	Procura por domínios conservados	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi
<i>Prosite</i>	Procura por domínios, famílias e sítios funcionais de proteínas	http://prosite.expasy.org/
<i>InterPro</i>	Análise funcional por busca por domínios e famílias	http://www.ebi.ac.uk/interpro/

Fonte: Elaborada pela autora (2015)