

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS-CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

KAIO CÉSAR SIMIANO TAVARES

BIOSSÍNTESE DE SELENOCISTEÍNA EM *Trypanosoma evansi*

LAGES, SC

2011

KAIO CÉSAR SIMIANO TAVARES

BIOSSÍNTESE DE SELENOCISTEÍNA EM *Trypanosoma evansi*

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal como requisito para obtenção de título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Milette

LAGES, SC

2011

KAIO CÉSAR SIMIANO TAVARES

Biossíntese de selenocisteína em *Trypanosoma evansi*

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciência Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV-UDESC), como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Banca Examinadora:

Professor Dr. Luiz Claudio Miletti, Orientador

Professor Dr. Otavio Henrique Thiemann
Universidade de São Paulo

Professor Dr. Carlos André da Veiga Lima Rosa
Universidade do Estado de Santa Catarina

Lages, SC, 25 de fevereiro de 2011.

Dedico este trabalho às pessoas
mais importantes da minha vida:
meus pais, Adalberto e Maria
Helena, minha irmã, Amanda, e
minha noiva, Simony.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, criador de todas as coisas, pela vida e pela oportunidade de poder a cada dia aprender mais;

Agradeço aos meus pais, Adalberto e Maria Helena, pelo amor incondicional, pelos mais valiosos ensinamentos, por abrir meus olhos para o mundo e me guiar sempre pelo caminho do bem, com os mais belos exemplos. À minha irmã, Amanda, pelo seu amor, sua amizade e ternura e também a todos os meus familiares;

Agradeço à minha noiva, Simony, por estar sempre ao meu lado, me dando apoio para continuar, pelos momentos felizes, por esse amor infinito que eu sei que poderei contar para sempre; e também aos seus pais, Altamiro e Solange, por me receber sempre em Florianópolis com grande carinho;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Claudio Miletti, pelos ensinamentos e por sempre abrir todas as portas para que eu pudesse trilhar o meu caminho. Agradeço também por sua amizade e confiança, que sempre pude contar durante todo o período em que trabalhamos juntos;

Agradeço aos meus amigos do laboratório, em especial a Cissa, Lari, Dani, Lí, Carol E., Carol R., Sandra, Bibi (obrigado pela ajuda em muitos dos resultados) e todos os demais pelo companheirismo, amizade, ensinamentos. Sentirei muita falta de todos vocês;

Agradeço ao Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard e em especial à Aline, Patrícia, Débora e Gláuber do laboratório de Protozoologia da UFSC pela fundamental colaboração em muitos dos resultados deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemann e à Fernanda Costa, do IFSC, pela concessão do anticorpo anti-SPS utilizado neste trabalho;

À Prof^a. Dra. Silvia Gonzalez Monteiro e ao Aleksandro, da UFSM, pela concessão da cepa de *T. evansi* utilizada no laboratório;

Agradeço especialmente aos animais que cederam sua vida para a realização deste trabalho;

À todos os funcionários e professores da UDESC, pelos ensinamentos e discussões;

Enfim, agradeço à todos que passaram pela minha vida e de alguma forma contribuíram para minha formação.

Muito Obrigado!!

LISTA DE ABREVIATURAS

SECIS	Selenocysteine Insertion Sequence
SPS	Selenofosfato Sintetase
SerRS	Seril-tRNA Sintetase
PSTK	Fosfoseril-tRNA Quinase
SepSecS	O-fosfoseril-tRNA ^{Ser [Sec]} ;tRNA ^{Sec} Sintase
EF-Sec	Fator de Elongação Específico para Selenocisteína
SBP2	SECIS Binding Protein 2
cDNA	DNA complementar
kDNA	DNA do cinetoplasto
gRNA	RNA guia
APOL1	Apolipoproteína L-1
SRA	Proteína Associada à Resistência ao Soro
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
G6P-DH	Glicose-6-Fosfato Desidrogenase
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
VSGs	Glicoproteínas Variáveis de Superfície
OIE	Organização Internacional de Epizootias
mAECT	Mini-Anion Exchange Centrifugation Technique
DEAE	Dietilaminoetil
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
CATT	Card Agglutination Test
TNF	Fator de Necrose Tumoral
IFN- γ	Interferon-gama
kDa	Kilodantons
Sec	Selenocisteína
GPx	Glutathione-Peroxidase
ORF	Open Reading Frame
UTR	Região Não-Traduzida
mm	Milímetro

ml	Mililitro
M	Molar
μl	Microlitro
μg	Micrograma
nm	Nanômetro
mM	Milimolar
U	Unidades
V	Volts
pb	Pares de Base
ng	Nanograma
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
BLAST	Basic Local Alignment Search
NCBI	National Center for Biotechnology Information
EBI	European Bioinformatics Institute
gDNA	DNA genômico
NBT/BCIP	Nitro blue tetrazolium chloride/ 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
TBE	Tris-Borato-EDTA
SSC	Tampão saline-sodium citrate
PBS	Tampão Fosfato Salino
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindole
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa
pI	Ponto Isoelétrico

RESUMO

TAVARES, Kaio César Simiano. **Biossíntese de selenocisteína em *Trypanosoma evansi***. 2011. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2011.

O *Trypanosoma evansi* é o tripanossomatídeo patogênico de maior distribuição mundial, causador de prejuízos econômicos na África, América do Sul, Europa, Ásia e Oceania. Este protozoário é o agente etiológico da doença conhecida como Surra ou Mal das Cadeiras, que afeta praticamente todas as espécies de mamíferos, com um recente caso em humanos. Uma importante via metabólica descrita em todos os reinos da vida é a incorporação de selênio em proteínas, com função, principalmente, antioxidante. O selênio é utilizado na forma do aminoácido selenocisteína, que é incorporada ao polipeptídeo nascente co-traducionalmente através do códon de parada “UGA”. Para que isto ocorra, são necessárias uma estrutura nucleotídica sinalizadora no RNA mensageiro (SECIS), um RNA transportador específico (tRNA^{Sec}) e um complexo de enzimas que permitem a conversão do selênio em sua forma ativa, monoselenofosfato (SPS), sua aminoacilação no tRNA^{Sec} (SerRS, PSTK, SepSecS) e o acoplamento de estruturas nucleotídicas e protéicas (SECIS, EF-Sec, SBP2) para que o códon UGA seja traduzido em selenocisteína e a mesma seja inserida na proteína. Neste trabalho foi demonstrado que o *T. evansi* expressa os genes *selB* (EF-Sec), *selC* (tRNA^{Sec}), *selD* (SPS) e PSTK. A análise de domínios dos genes *selB*, *selD* e PSTK de *T. evansi* encontrou regiões condizentes com as características funcionais das proteínas formadas. A estrutura secundária predita do tRNA^{Sec} de *T. evansi* compartilha a maioria das características dos tRNA^{Sec} de eucariotos. Através da técnica de Southern Blot, demonstrou-se que os genes *selB*, *selD* e PSTK possuem cópia única no DNA genômico de *T. evansi*. Utilizando-se Western Blot, a proteína SPS foi localizada corretamente no extrato protéico do protozoário, formando uma banda de 43 kDa. Foi realizada também uma imunolocalização da SPS, sendo que a mesma possui localização citoplasmática neste protozoário. O gene de uma selenoproteína exclusiva de tripanossomatídeos, a *selTRYP*, foi amplificado do cDNA e parcialmente sequenciado. Através desses resultados, sugere-se que o *T. evansi* é capaz de utilizar selênio para a

formação de selenoproteínas, e a presença dos genes da via de inserção de selenocisteína pode indicar um potencial futuro alvo terapêutico, visto que recentes dados demonstram um crescimento de cepas resistentes aos medicamentos disponíveis no mercado em vários continentes.

PALAVRAS-CHAVE: *Trypanosoma evansi*, selenocisteína, *selB*, *selC*, *selD*, *selTRYP*, PSTK.

ABSTRACT

Biosynthesis of Selenocysteine in *Trypanosoma evansi*

Trypanosoma evansi is the pathogenic trypanosomatid with the worldwidest distribution, generating economic losses in Africa, South America, Europe, Asia and Oceania. This protozoan is the etiologic agent of the disease know as *Surra* or *Mal das Cadeiras*, wich affects almost all species of mammals, with a recent case in humans. An important metabolic pathway described in all the three kingdoms of life is the incorporation of selenium into proteins, wich mainly has an antioxidant function. Selenium is used in the form of the amino acid selenocysteine, which is incorporated into the nascent polypeptide co-translationally through the stop codon "UGA". Some elements plays a key role into this pathway: a signaling nucleotide structure in the messenger RNA (SECIS), a specifc tRNA (tRNA^{Sec}) and an enzyme complex that allows the conversion of selenium in its active form monoselenophosphate (SPS), its aminoacylation in tRNA^{Sec} (SerRS, PSTK, SepSecS) and the coupling of nucleotidic and proteic structures (SECIS, EF-Sec, SBP2) in the UGA codon to translation and insertion of selenocysteine into the protein. This work demonstrated that *T. evansi* express the genes *selB* (EF-Sec), *selC* (tRNA^{Sec}), *selD* (SPS) and *pstk* in its mRNA. The domains analysis of *T. evansi selB*, *selD* and PSTK genes found regions that are consistent with the predicted proteins functions. The predicted secondary structure of *T. evansi* tRNA^{Sec} shares the most of the characteristics of eukaryotic tRNA^{Sec}. Using Southern Blot, we showed that *selB*, *selD* and *pstk* are single copie genes in *T. evansi* genomic DNA. The SPS proteis was correctly localized in the total protein extract of the parasite, with a 43 kDa band. The same protein has a cytoplasmatic localization in *T. evansi*, as showed by indirect immunofluorescence. The gene of a trypanosomatid exclusive selenoprotein, *selTRYP*, was amplified of the cDNA and sequenced. Through these results, we suggest that *T. evansi* is capable of using selenium for the formation of selenoproteins, and the presence of the *selTRYP*, *selb*, *selc*, *seld* and *pstk* genes may indicate a potential future therapeutic target, since recent data show an increase in the parasite resistance to the commercial available drugs in different continents.

KEY-WORDS: *Trypanosoma evansi*, selenocysteine, *selB*, *selC*, *selD*, *selTRYP*, PSTK.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esfregaço sanguíneo periférico de um camundongo experimentalmente infectado com <i>Trypanosoma evansi</i> , aumento de 1000 X.....	16
Figura 2 - Casos de Surra notificados à OIE no período de julho a dezembro de 2009. Fonte: www.oie.int	19
Figura 3 - Ciclo de vida de do <i>T. evansi</i> . Fonte: Gardner et al., 1988.	20
Figura 4 - Esfregaço sanguíneo periférico de um humano infectado com <i>T. evansi</i> , corado com Giemsa, aumento de 1000 X. A seta indica o local da punção para a confecção do esfregaço. FONTE: Joshi et al., 2005.	23
Figura 5 - Equino infectado por <i>T. evansi</i> apresentando déficit proprioceptivo. Fonte: Rodrigues et al., 2009.	25
Figura 6 - Estrutura consenso da SECIS, com destaque para as 4 bases não Watson-Crick. Fonte: Hatfield e Gladyshev, 2002.	34
Figura 7 - Via de inserção de selenocisteína em procaríotos. Fonte: http://www.uni-frankfurt.de/fb/fb15/institute/inst-3-mol-biowiss/AK-Rother/research.html	35
Figura 8 - Biossíntese de selenocisteína em seu próprio tRNA. Fonte: Xu et al., 2007.....	36
Figura 9 - SECIS de eucariotos tipo I e tipo II. Fonte: Allmang et al., 2009.....	37
Figura 10 - Tradução de Sec, demonstrando o complexo formado entre SECIS-SBP2-EF-Sec e a interação com o ribossomo (cinza). Ver no texto maiores detalhes. Fonte: Donovan e Copeland, 2010. Modificado por Tavares, 2010.	39
Figura 11 - Biossíntese de Sec em procaríotos em (1) (utilizando a via de <i>selA</i>) e em arqueobactérias e eucariotos (2) (utilizando a via PSTK- SepSecS. Fonte: Yuan et al, 2006. Modificado por Tavares, 2011.....	39
Figura 12 - (A) Tradução de selenocisteína em bactérias; (B) tradução de selenocisteína em arqueobactérias; (C) tradução de selenocisteína em eucariotos. Fonte: Berry, 2005.	40
Figura 13 - (A) Amplificação por RT-PCR de LmSell1 (linha 2) e LinfSell1 (linha 3). (B) Estruturas secundárias previstas para SECIS. (C) Incorporação de ⁷⁵ Se por <i>Leishmania</i> , em 12 kDa possivelmente está a selenoproteína LmSell ou LinfSell. Fonte: Cassago et al., 2006. .	41
Figura 14 - (A) Eletroforese em gel de agarose 1 % de gDNA de <i>T. evansi</i> . 1- Marcador de massa molecular; 2- gDNA. (B) Eletroforese em gel de agarose 1% de RNA total de <i>T. evansi</i> . 1- RNA total de <i>T. evansi</i>	56
Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose 1% da ORF de <i>selB</i> . 1- Marcador de massa molecular; 2- Produto de PCR de <i>selB</i> , apresentando um tamanho de 1968 pb.	57
Figura 16 - Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína EF-Sec de <i>T. evansi</i> , <i>T. gambiense</i> , <i>T. brucei</i> , <i>T. cruzi</i> , <i>Mus musculus</i> e <i>Homo sapiens</i> utilizando o programa ClustalX. As regiões sobrepostas por (*) são totalmente conservadas, as sobrepostas por (:) são parcialmente conservadas.....	59
Figura 17 - Eletroforese em gel de agarose 2% da ORF de <i>selC</i> . 1- Marcador de massa molecular; 2- produto de PCR de <i>selC</i> , apresentando um tamanho de 88 pb.	60
Figura 18 - Alinhamento das sequências nucleotídicas de tRNA ^{Sec} de <i>T. evansi</i> , <i>T. brucei</i> , <i>T.</i>	

<i>cruzi</i> , <i>Leishmania major</i> e camundongos utilizando-se o programa ClustalX. As regiões sobrepostas por (*) são totalmente conservadas, as sobrepostas por (:) são parcialmente conservadas.....	61
Figura 19 - Estrutura secundária do tRNA ^{Sec} de <i>T. evansi</i> elaborada com o programa ARAGORN. As flechas destacam o anticódon TCA e o braço extra alongado característicos do tRNA específico de selenocisteína.....	61
Figura 20 - Eletroforese em gel de agarose 1% da ORF de <i>selD</i> . 1- Marcador de massa molecular; 2- produto de PCR de <i>selD</i> , apresentando um tamanho de 1182 pb.	62
Figura 21 - Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína SPS de <i>T. evansi</i> , <i>T. brucei</i> , <i>T. cruzi</i> , <i>L. major</i> , <i>Mus musculus</i> e <i>Homo sapiens</i> utilizando o programa ClustalX. As regiões sobrepostas por (*) são totalmente conservadas, as sobrepostas por (:) são parcialmente conservadas.....	64
Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose 1% da ORF de PSTK. 1- Marcador de massa molecular; 2- produto de PCR de PSTK, apresentando um tamanho de 1083 pb.....	65
Figura 23 – Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína PSTK de <i>T. evansi</i> , <i>Mus musculus</i> , <i>Homo sapiens</i> , <i>Methanococcus jannaschii</i> e <i>Methanopyrus kandleri</i> utilizando o programa ClustalX. As regiões sobrepostas por (*) são totalmente conservadas, as sobrepostas por (:) são parcialmente conservadas.	66
Figura 24 - Eletroforese em gel de agarose 1% da ORF de <i>selTRYP</i> . 1- Marcador de massa molecular; 2- produto de PCR de <i>selTRYP</i> , apresentando um tamanho de 2340 pb.....	67
Figura 25 – Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína <i>selTRYP</i> de <i>T. evansi</i> e <i>T. brucei</i> . A seta indica o motivo CxxU, característico de selenoproteínas.....	68
Figura 26 - Gel de agarose 1 % utilizado para transferência para membrana de nylon na técnica de Southern Blot. O marcador de peso molecular, as enzimas utilizadas para a digestão do gDNA de <i>T. evansi</i> bem como os produtos de PCR de cada um dos genes estão identificados.	69
. Figura 27 Mapas de Restrição de (A) <i>selb</i> , (B) <i>seld</i> e (C) <i>psk</i> . FONTE http://tools.neb.com/NEBcutter2/	70
Figura 28 - Southern Blot do gene <i>selB</i> de <i>T. evansi</i> . O marcador de peso molecular, as enzimas de restrição utilizadas e o controle negativo estão indicados.	71
Figura 29 - Southern Blot do gene <i>selD</i> de <i>T. evansi</i> . O marcador de peso molecular, as enzimas de restrição utilizadas e o controle negativo estão indicados.	72
Figura 30 - Southern Blot do gene PSTK de <i>T. evansi</i> . O marcador de peso molecular, as enzimas de restrição utilizadas e os controles negativos estão indicados.	72
Figura 31 - Imunofluorescência indireta da proteína SPS de <i>T. evansi</i> . (1) Luz branca; (2) colocação com DAPI; (3) grânulos citoplasmáticos indicando a localização da SPS; (4) Sobreposição das imagens 2 e 3.	73
Figura 32 - Western Blot da proteína SPS de <i>T. evansi</i> . 1- BenchMark Protein Ladder (<i>Invitrogen</i> [®]); 2- Extrato protéico de <i>T. evansi</i>	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Principais genes de selenoproteínas e selenoproteínas descritos em humanos e protozoários da Ordem Kinetoplastida.....	32
Tabela 2 - Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação das ORFs dos genes <i>selB</i> , <i>selC</i> , <i>selD</i> , PSTK e <i>selTRYP</i> do DNA genômico e cDNA de <i>Trypanosoma evansi</i> . Os sítios para as enzimas de restrição <i>XhoI</i> (primers reverse-R) e <i>NdeI</i> (primers forward- F) estão destacados.	48
Tabela 3 - Enzimas de restrição utilizadas na técnica de Southern Blot para a clivagem de gDNA de <i>Trypanosoma evansi</i> . Para cada gene foi utilizada pelo menos uma enzima que clivou e uma que não clivou sua sequência.....	52

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS.....	13
2 INTRODUÇÃO.....	16
2.1 <i>TRYPANOSOMA EVANSI</i>	16
2.1.1 Aspectos gerais e distribuição.....	16
2.1.2 Ciclo de vida e transmissão	19
2.1.3 Mal das Cadeiras ou Surra.....	21
2.1.4 Resposta Imune	26
2.1.5 Diagnóstico	26
2.1.6 Tratamento	28
2.2 SELÊNIO E SELENOPROTEÍNAS	30
2.2.2 Selenoproteínas	30
2.2.3 Biossíntese de selenocisteína em Procariotos.....	33
2.2.4 Biossíntese de selenocisteína em Eucariotos	35
2.2.5 Selenoproteínas em Kinetoplastida	40
3 OBJETIVOS	43
3.1 OBJETIVOS GERAIS	43
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
4.1 OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DE <i>TRYPANOSOMA EVANSI</i>	44
4.1.1 Comitê de ética.....	44
4.1.2 Amplificação do número de parasitos	44
4.1.3 Purificação do <i>Trypanosoma evansi</i> do sangue.....	44
4.1.3.1 Centrifugação em gradiente de Percoll®	45
4.1.3.2 Cromatografia de troca iônica em DEAE-Celulose	45
4.2 AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DAS ORFS DOS GENES <i>SELB</i> , <i>SELC</i> , <i>SELD</i> , <i>PSTK</i> E <i>SELTRYP</i>	46
4.2.1 Extração de DNA genômico	46
4.2.2 Extração de RNA total.....	46
4.2.3 Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR)	47
4.2.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	47
4.2.5 Eletroforese e Clonagem das ORFs dos gene <i>selB</i> , <i>selC</i> , <i>selD</i> , <i>PSTK</i> e <i>selTRYP</i> em pGEM-T Easy®	49
4.2.6 Sequenciamento dos clones <i>selB</i> pGEM, <i>selC</i> pGEM, <i>selD</i> pGEM, <i>PSTK</i> pGEM e <i>selTRYP</i> pGEM.....	50

4.3 SOUTHERN BLOT DOS GENES <i>SELB</i> , <i>SELD</i> E <i>PSTK</i> DE <i>TRYPANOSOMA EVANSI</i>	51
4.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA SELENOFOSFATO SINTETASE	53
4.4.1 Preparo das lâminas	53
4.4.2 Imunolocalização	53
4.5 WESTERN BLOT PARA SELENOFOSFATO SINTETASE	54
4.5.1 Extração de proteínas de <i>Trypanosoma evansi</i>	54
4.5.2 SDS-PAGE e transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose	54
4.5.3 Procedimento do Blot	55
5 RESULTADOS	56
5.1 AMPLIFICAÇÃO E OBTENÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DOS GENES <i>SELB</i> , <i>SELC</i> , <i>SELD</i> , <i>PSTK</i> E <i>SELTRYP</i> DE <i>TRYPANOSOMA EVANSI</i>	56
5.1.1 gDNA e RNA	56
5.1.2 <i>selB</i>	56
5.1.3 <i>selC</i>	60
5.1.4 <i>selD</i>	62
5.1.5 <i>PSTK</i>	65
5.1.6 <i>selTRYP</i>	67
5.2 SOUTHERN BLOT DOS GENES <i>SELB</i> , <i>SELD</i> E <i>PSTK</i> DE <i>TRYPANOSOMA EVANSI</i>	69
5.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA DA PROTEÍNA SELENOFOSFATO SINTETASE DE <i>TRYPANOSOMA EVANSI</i>	73
5.4 WESTERN BLOT PARA A ENZIMA SELENOFOSFATO SINTETASE DE <i>TRYPANOSOMA EVANSI</i>	73
6 DISCUSSÃO	75
7 CONCLUSÕES	79
8 REFERÊNCIAS	80

2 INTRODUÇÃO

2.1 *Trypanosoma evansi*

2.1.1 Aspectos gerais e distribuição

O *Trypanosoma evansi* é um protozoário pertencente ao Filo Euglenozoa, Ordem Kinetoplastida. Foi descrito pela primeira vez em 1880 por Griffith Evans, um médico veterinário do exército do Reino Unido que, ao examinar ao microscópio lâminas com o sangue de equinos acometidos na Índia, observou o protozoário. Evans comprovou sua hipótese ao inocular o sangue de animais doentes em animais saudáveis e após seis dias observar os protozoários no sangue dos equinos inoculados (Fallis, 1986).

Este protozoário possui um corpo alongado, com comprimento variando entre 14-33 μm e largura entre 1,5-2,2 μm , extremidades afiladas, um flagelo terminal, um núcleo central e uma membrana ondulante que permeia toda a extensão do parasito (Figura 1) (Brun et al., 1998; Silva, 2002). O cinetoplasto pode ou não estar presente, dependendo da origem da cepa. Cepas brasileiras não possuem cinetoplasto (Ventura et al., 2002), e as que possuem apresentam-no incompleto, sem os maxicírculos (Borst et al., 1987).

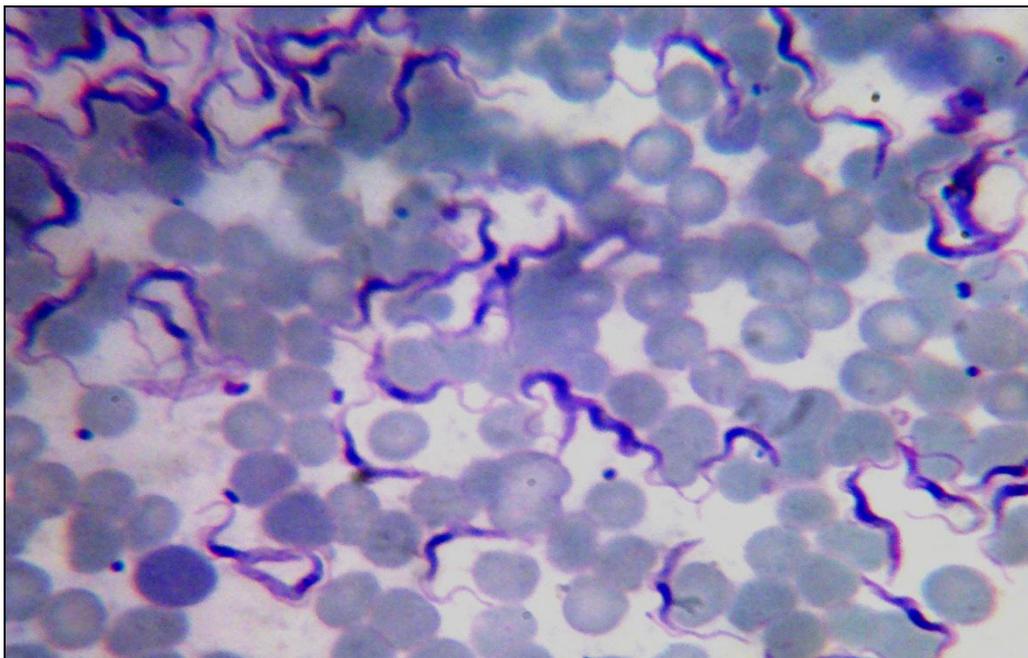


Figura 1 - Esfregaço sanguíneo periférico de um camundongo experimentalmente infectado com *Trypanosoma evansi*, aumento de 1000 X.

O *Trypanosoma evansi* tem origem africana, e trabalhos indicam que ele surgiu a partir da perda parcial ou total do DNA mitocondrial, ou cinetoplasto, do *Trypanosoma brucei*, causador da doença do sono em humanos. O cinetoplasto (kDNA) é uma rede de DNA circular com replicação independente adicional ao DNA nuclear. Ele é composto por maxicírculos e minicírculos, que complementarmente expressam o RNA mitocondrial e RNA ribossômico. Os maxicírculos expressam proteínas geralmente componentes de complexos respiratórios, mas para que essa expressão ocorra, são necessárias certas inserções ou deleções que são comandadas por RNAs guias (gRNAs), produtos da transcrição dos minicírculos e também maxicírculos (Liu et al., 2005).

O *Trypanosoma brucei* possui dois estágios: no vetor, moscas do gênero *Glossina* tsé-tsé, apresenta-se na forma procíclica, a qual tem a capacidade de sobreviver no inseto e realizar recombinação do kDNA; nos hospedeiros mamíferos possui uma morfologia mais alongada, que causa a doença, chamada de forma tripomastigota. Quando os parasitos estão na forma procíclica, possuem um intenso metabolismo mitocondrial, apresentando uma organela bem desenvolvida e totalmente ativa. Já quando estão no hospedeiro vertebrado, na forma tripomastigota, a obtenção de energia é apenas por glicólise, e o metabolismo mitocondrial encontra-se diminuído (Besteiro et al., 2005). Segundo revisaram Lun e colaboradores (2010) e Jensen e colaboradores (2010), o *Trypanosoma evansi* teve origem a partir de uma mutação do *Trypanosoma brucei* a qual causou a perda da heterogeneidade e problemas na replicação dos minicírculos, conseqüentemente, uma gradual diminuição na capacidade de expressar as proteínas dos maxicírculos foi sendo gerada até que os mesmos se tornaram ausentes ou sem função. Essa perda do kDNA tornou inviável a sobrevivência do parasito nas moscas tsé-tsé, pois as proteínas mitocondriais são essenciais para a sobrevivência no inseto. Desta forma, a ausência de cinetoplasto bloqueou a forma procíclica, mantendo os tripanossomatídeos exclusivamente na forma tripomastigota, única encontrada no *Trypanosoma evansi*. Essa ausência do cinetoplasto conferiu ao *Trypanosoma evansi* a perda da dependência do vetor tsé-tsé para completar seu ciclo, e visto que as moscas do gênero *Glossina* possuem uma distribuição limitada a certas regiões da África, este protozoário pôde avançar para outras regiões através de transmissão exclusivamente mecânica (Lun e Desser, 1995), sendo considerado atualmente o tripanossomatídeo patogênico com maior distribuição mundial (Losos, 1980).

Outra espécie que se originou nesse processo de perda do cinetoplasto do *Trypanosoma brucei* foi o *Trypanosoma equiperdum* (Lun et al., 2010; Jensen et al., 2010). *T. evansi* e *T.*

equiperdum são indistinguíveis ultraestruturalmente e possuem características biológicas, bioquímicas e moleculares muito semelhantes (Brun et al., 1998). Apesar disso, as doenças causadas por estes protozoários apresentam marcadas diferenças, principalmente quanto à via de transmissão (prioritariamente venérea para *T. equiperdum*), a localização dos protozoários (raramente o *T. equiperdum* pode ser encontrado no sangue) e até no tratamento, visto que em muitos casos a dourina, doença causada por *T. equiperdum*, não possui tratamento (Hoare, 1972; Gillingwater et al., 2007). Controversamente, considerando todas as semelhanças morfológicas, bioquímicas e moleculares, não há uma explicação para as diferenças na patogênese entre esses protozoários e *T. brucei*, apesar de todos teoricamente possuírem uma origem comum (Lun et al., 2010).

A doença causada pela infecção por *T. evansi* é mundialmente conhecida por “Surra”, e na América Latina pode ser também chamada de “Mal das Cadeiras”. Desde a primeira descrição feita por Evans na Índia em 1880, foram relatados casos de tripanossomíase por *T. evansi* em praticamente todos os continentes. Atualmente, a Surra é de notificação obrigatória para a OIE (*World Organization for Animal Health*) (Figura 2). A doença é endêmica na África, com casos descritos no Egito (Amer et al., 2011), Marrocos (Atarhouch et al., 2003), Sudão (Musa et al., 1994; Elamin et al., 1998), Mauritânia (Dia et al., 1997), Quênia (Ngaira et al., 2003; Njiru et al., 2004), Chade (Delafosse e Doutoum, 2004) e Etiópia (Zelege e Bekele, 2001). Vários países asiáticos também apresentaram recentes surtos de *T. evansi*: Índia (Laha e Sasmal, 2008), Israel (Berlin et al., 2010), Paquistão (Shahgzad et al., 2010), China (Lun et al., 1993), Tailândia (Pholpark et al., 1999) e Filipinas (Dargantes et al., 2009). Na Europa, foram detectados casos na Espanha (Gutierrez et al., 2000) e França (Desquesnes et al., 2008). Animais soropositivos foram identificados na Oceania, em Papua Nova Guiné por Reid e Copeman (2000). Na América do Sul, o *T. evansi* é endêmico em algumas regiões. Segundo Dávila e Silva (2000), há casos no Brasil, Bolívia, Colômbia, Guiana Francesa, Peru, Suriname, Venezuela e Argentina.

Estima-se que a chegada do *T. evansi* na América do Sul tenha ocorrido no final no século XIX com a importação de cavalos da Espanha (Hoare, 1972; Santos et al., 1992). No Brasil, já foram relatados casos de infecção natural no Rio Grande do Sul (Colpo et al., 2005; Conrado et al., 2005; Franciscato et al., 2007), Mato Grosso do Sul (Moreira e Machado, 1985; Brandão et al., 2002), Santa Catarina (Da Silva et al., 2008a), Paraná (Kubiak e Molfi, 1954) e no Pantanal, onde a doença é endêmica, com recorrentes casos (Silva et al., 2002).

Os tripanossomatídeos africanos da seção Salivaria, a qual pertence o *T. evansi*, possuem uma interessante ferramenta para evadir as defesas do hospedeiro, a expressão das

glicoproteínas variáveis de superfície, ou *variant surface glycoproteins* (VSGs). Toda a superfície do protozoário (aproximadamente 95%) é recoberta por esses dímeros, que possuem a propriedade de se alterar, “enganando” o sistema imune humoral do hospedeiro (Pays et al., 2004). O genoma desses tripanossomatídeos possui centenas de genes que codificam para diferentes VSGs, e apenas um é expresso por vez. As VSGs são traduzidas com um domínio N- terminal que é variável e um domínio C-terminal que é altamente conservado e possui uma sequência para âncoras de GPI (glicofosfatidilinositol) que as sustentam na superfície do parasito (Carrington et al., 1991). Quando os protozoários mudam sua cobertura de VSGs ocorrem os picos de parasitemia, observados na forma crônica da doença.

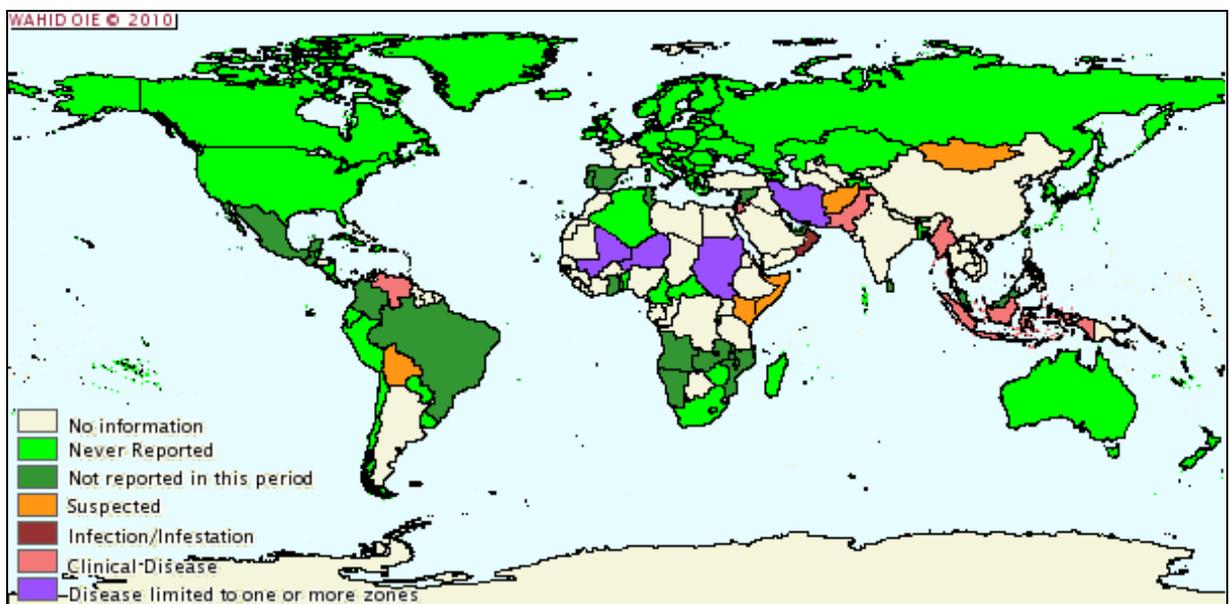


Figura 2 - Casos de Surra notificados à OIE no período de julho a dezembro de 2009. Fonte: www.oie.int

2.1.2 Ciclo de vida e transmissão

O ciclo de vida do *T. evansi* consiste da transmissão exclusivamente mecânica do protozoário de um hospedeiro infectado para outro não infectado (Figura 3). Os vetores são principalmente moscas tsé-tsé do gênero *Glossina* (na África), insetos hematófagos (*Tabanus sp.*, *Stomoxys sp.*) e também morcegos (*Desmodus rotundus*) (Hoare, 1972; Losos, 1986). Nestes vetores, o parasito não desenvolve nenhuma fase do ciclo (Silva et al., 2002).

Para que a transmissão seja realizada com sucesso, a alimentação do vetor no hospedeiro infectado deve ser interrompida, fazendo com que o inseto procure outro

hospedeiro não infectado e inocule o parasito no mesmo. Em moscas do gênero *Stomoxys*, a sobrevivência do parasito no aparelho bucal é de 480 minutos (Sumba et al., 1998). Deve haver uma alta densidade de vetores e animais com alta parasitemia. Segundo um modelo matemático de transmissão por tabanídeos proposto por Desquesnes e colaboradores (2009), para que ocorram frequentes surtos em uma determinada população, a prevalência de animais infectados deve estar em torno de 10 a 15% do total. De acordo com o autor, nesse modelo novos surtos podem acontecer em períodos de 3 a 5 anos. Condições estressantes como alterações climáticas e alimentares podem iniciar os casos.

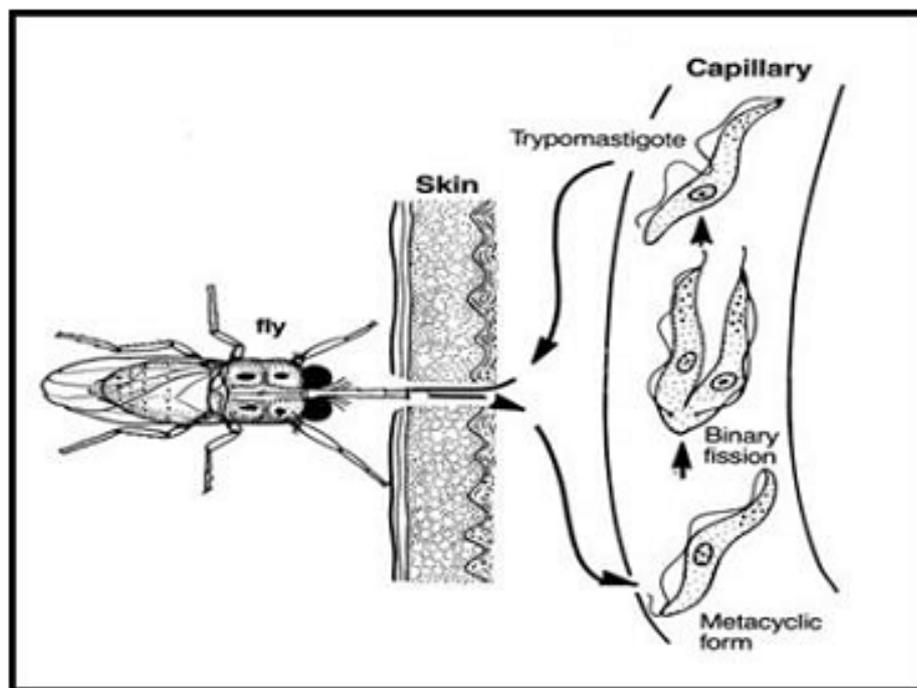


Figura 3 - Ciclo de vida de do *T. evansi*. Fonte: Gardner et al., 1988.

Diferente dos outros tripanossomatídeos que possuem vários estágios no seu ciclo de vida (Hoare, 1972), o *T. evansi* é monomórfico, ou seja, permanece sempre na forma tripomastigota, provavelmente devido a ausência parcial ou total do cinetoplasto (Borst et al., 1987), que impede a sobrevivência por longos períodos no vetor. Na circulação do hospedeiro, o *T. evansi* divide-se assexuadamente por fissão binária. O tempo de geração demonstrado em meio de cultura é de aproximadamente 11 horas (Hirumi et al., 1997).

Apesar de não haverem evidências de transmissão venérea de *T. evansi*, Uche & Jones (1992) detectaram-no na mucosa vaginal de coelhas experimentalmente infectadas. Em condições naturais, há relatos de transmissão transplacentária em ruminantes (Ogwu & Nuru, 1981; Paikne & Dhake, 1972; Muraleedharan & Srinivas, 1985) e camundongos

experimentalmente infectados (Sarmah, 1998). A transmissão por via oral já foi comprovada experimentalmente em camundongos, cães (Raina et al., 1985; Bazzoli et al., 2002) e morcegos, que são vetores e reservatórios da doença (Hoare, 1972).

Um elemento essencial na manutenção cíclica da Surra são os animais que servem como reservatórios da doença na natureza. Capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*), coatis (*Nasua nasua*) e morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*) são considerados os principais reservatórios silvestres da doença (Nunes et al., 1993; Silva et al., 2002). Herrera e colaboradores (2004) acompanharam a infecção experimental de coatis por 262 dias, demonstrando que os mesmos desenvolveram uma forma crônica da doença caracterizada por anemia severa e picos recorrentes de parasitemia. Porcos e javalis também são considerados reservatórios do parasito (Reid et al., 1999; Herrera et al., 2008) por não desenvolverem sinais clínicos acentuados, da mesma maneira que ruminantes em geral (Ngeranwa et al., 1993). Geralmente em casos de surtos há a convivência dos animais afetados, dos reservatórios e do vetor em um mesmo ambiente, o que permite a transmissão do *T. evansi*.

2.1.3 Mal das Cadeiras ou Surra

A doença causada pela infecção por *T. evansi* é conhecida como Surra ou Mal das Cadeiras. Por ser o tripanossomatídeo patogênico com maior distribuição mundial (Losos, 1980), é encontrado infectando uma abrangente gama de espécies: equinos, cães, bovinos, ovinos, caprinos, camelos, gatos, pequenos roedores, búfalos, capivaras, coatis, morcegos, coelhos, porcos, javalis e pombos (Silva et al., 2002; Colpo et al., 2005; Pholpark et al., 1999; Atarhouch et al., 2003; Sharma et al., 2000; Herrera et al., 2008; Uche e Jones, 1992; Mandal et al., 2008). Ruminantes e animais silvestres apresentam uma forma crônica da doença, com picos intermitentes de parasitemia, enquanto que principalmente equinos, cães e gatos desenvolvem a forma aguda, que pode levar a morte.

Humanos sempre foram considerados refratários à infecção por *T. evansi*, até que Joshi e colaboradores (2005) relataram o primeiro caso. Um homem de 45 anos, fazendeiro, da região central da Índia, apresentou febre intermitente associada a déficit sensitivo. Foram realizados esfregaços sanguíneos periféricos que demonstraram numerosos tripanossomatídeos em sua circulação (Figura 4). Análises sorológicas e moleculares confirmaram a infecção natural por *T. evansi*. O paciente apresentou picos intermitentes de parasitemia (que chegou a 10^6 /ml) associados a episódios febris durante cinco meses.

Shegokar e colaboradores (2006) realizaram a sorologia de 1806 moradores da mesma localidade na Índia e constataram que 22,7 % da população era soropositiva para *T. evansi*. A infecção por *T. evansi* em humanos não é comum, pois os mesmos possuem em seu plasma sanguíneo uma apolipoproteína ligada a lipoproteínas de alta densidade que é considerada um fator tripanolítico, chamado apolipoproteína L-1 (APOL1). A APOL1 entra no protozoário por endocitose e promove a formação de poros na membrana lisossomal, induzindo o rompimento destes compartimentos e morte celular (Vanhamme et al., 2003). Um dos tripanossomatídeos Africanos que causa a doença do sono em humanos (*Trypanosoma brucei rhodesiense*) expressa uma proteína que confere resistência a APOL1, a proteína associada à resistência ao soro (SRA) (Xong et al., 1998). O *T. evansi* é normalmente susceptível ao plasma humano, como demonstrado por Hawking (1978) e também por Otto e colaboradores (2010) para um isolado brasileiro. Uma análise molecular do gene da APOL1 do paciente indiano demonstrou uma rara mutação nos dois alelos, que levava a formação de dois *stop codons* no meio da fase aberta de leitura do gene, impedindo então a expressão da APOL1 funcional neste paciente, o que provavelmente foi determinante para o desenvolvimento da infecção (Vanhollebeke et al., 2006).

Vários sinais clínicos estão associados com a infecção por *T. evansi*. Os principais são anorexia, perda de peso, febre, sinais neurológicos, ataxia, anemia, sinais oculares e aborto (Kubiak e Molfi, 1954; Silva et al., 1995; Carreira, 2005; Da Silva et al., 2008b).

Os principais sinais neurológicos relatados em infecções por *T. evansi* incluem ataxia, hiperexcitabilidade, andar em círculos e déficit propioceptivo (Figura 5) (Rodrigues et al., 2009). Segundo o mesmo autor, foram encontrados parasitos no parênquima cerebral de equinos naturalmente infectados através de imunohistoquímica, o que pode ter causado as lesões de leucoencefalomalácia assimétrica, encefalite necrotizante, edema, desmielinização e meningite na medula espinhal dos animais analisados. O modo como o protozoário entrou no parênquima cerebral não está elucidado, mas provavelmente a presença dele neste local está associada com as lesões descritas e os sinais clínicos neurológicos característicos da doença. A hipótese de a presença do parasito no sistema nervoso central ser um dos causadores dos sinais clínicos neurológicos é sugerida também por Berlin e colaboradores (2009), que fizeram o primeiro relato *ante-mortem* da presença de DNA de *T. evansi* no cerebelo, cérebro e medula espinhal em equinos naturalmente infectados. A presença de protozoários no sistema nervoso central também foi descrita em bovinos (Tuntasuvan et al., 1997) e veados (Tuntasuvan et al., 2000).



Figura 4 - Esfregaço sanguíneo periférico de um humano infectado com *T. evansi*, corado com Giemsa, aumento de 1000 X. A seta indica o local da punção para a confecção do esfregaço. FONTE: Joshi et al., 2005.

Lesões oculares também podem estar associadas à tripanossomíase em algumas espécies. Cabras experimentalmente infectadas produziram úlcera de córnea e retinocoroidite crônica (Morales et al., 2006). Em gatos, a infecção experimental manifestou edema de pálpebra e opacidade de córnea. E estes sinais podem estar associados à presença de formas tripomastigotas no humor aquoso, verificadas através do preparo de lâminas (Da Silva et al., 2010).

Um dos principais sinais clínicos descritos em infecções por *T. evansi* é a anemia. Praticamente todas as espécies susceptíveis apresentam quadros que variam de leves a graves: cães (Moreira e Machado, 1985; Franciscato, 2007), cabras (Sharma et al., 2000), camelos (Atarhouch et al., 2003), coatis (Herrera et al., 2002; Herrera et al., 2004), cavalos (Herrera et al., 2004) e gatos (Da Silva, 2010b). Herrera e colaboradores (2004) não encontraram anemia em capivaras no Pantanal brasileiro, mesmo estando as mesmas com alta parasitemia. Este achado corrobora o importante papel destes roedores como reservatórios da doença. A anemia descrita em infecções experimentais geralmente é macrocítica hipocrômica (Omer et al., 2007), macrocítica normocrômica (Aquino et al., 1999), normocítica normocrômica (Da Silva et al., 2010b). Após 72h de infecção, Mijares e colaboradores (2009) encontraram uma queda de 49,5% para 33% no hematócrito de ratos experimentalmente infectados, demonstrando haver hemólise. Desde que Jaktar e Purohit (1971) propuseram que a causa da anemia na tripanossomíase não era devido a depressão da medula óssea e sim a destruição de eritrócitos, recentes trabalhos tem objetivado explicar suas causas, elucidando alguns pontos importantes na sua patogenia. A membrana dos eritrócitos de animais infectados apresenta uma maior fragilidade osmótica, tornando-se mais susceptível à lise (Mijares et al., 2009). Associado a

isso, a infecção por *T. evansi* gera um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), acarretando em uma elevação na peroxidação lipídica da membrana dos eritrócitos devido a interação com essas EROs (Wolkmer et al., 2009; Mijares et al. 2009). Omer e colaboradores (2007) comprovaram um aumento da concentração nas enzimas do sistema antioxidante glicose-6-fosfato desidrogenase (G6P-DH) e glutationa-peroxidase (GSH-Px). O aumento da atividade da G6P-DH está relacionado a uma maior atividade da via das pentoses-fosfato, que produz a coenzima NADPH. O NADPH mantém a GSH-Px em sua forma reduzida, para que ela possa atuar como um potente antioxidante. Esses trabalhos demonstram então que a infecção por *T. evansi* está associada a uma alta taxa de peroxidação lipídica associada a uma produção de EROs que aumentam a fragilidade da membrana dos eritrócitos, podendo levar a hemólise e a produção da anemia.

Outro mecanismo para a anemia que pode também estar atuando conjuntamente com o descrito acima é a eritrofagocitose promovida pela enzima sialidase ou neuraminidase. A sialidase hidrolisa glicoconjugados que sustentam o ácido siálico negativamente carregado da membrana dos eritrócitos, causando alterações estruturais na célula facilitando a eritrofagocitose por macrófagos e consequente anemia (Durocher et al., 1975). Nok e colaboradores (2003) caracterizaram a sialidase de *T. evansi*, definindo sua localização superficial, propriedades e capacidade de hidrólise de células vermelhas principalmente em cães, ratos e camundongos. Neste mesmo trabalho, células do tecido nervoso foram expostas à sialidase de *T. evansi* e demonstraram um alto nível de hidrólise de ácido siálico, podendo então este mecanismo também contribuir para a sintomatologia nervosa da Surra. Shehu e colaboradores (2006) dosaram a atividade da sialidase em cabras experimentalmente infectadas por *T. evansi* e encontraram um aumento no número de moléculas de ácido siálico livre concomitante com uma diminuição de ácido siálico na membrana de eritrócitos e aumento da parasitemia.

A formação de imunocomplexos também pode estar envolvida na anemia, pois Assoku (1975) demonstrou que a injeção repetida de extratos protéicos de *T. evansi* em ratos desenvolveu uma anemia hemolítica moderadamente severa. Os imunocomplexos podem ser uma das causas de glomerulonefrite relatada em um caso autóctone de *T. evansi* em um cão no Estado do Rio Grande do Sul (Colpo et al., 2005).



Figura 5 - Equino infectado por *T. evansi* apresentando déficit propioceptivo. Fonte: Rodrigues et al., 2009.

Apesar da patogenia não ser bem compreendida, o aborto pode acontecer em infecções por *T. evansi*. Gutierrez e colaboradores (2006) relataram 5 abortos em 16 camelos, principalmente no terço final da gestação; e Tuntasuvan e colaboradores (2003) em um surto de Surra na Tailândia relataram 42% de aborto em éguas e mulas. Pholpark e colaboradores (1999) descreveram queda significativa na produção de leite de vacas em um surto de tripanossomíase na Tailândia.

Além da ação do *T. evansi* nas células do sistema nervoso central ser sugerida como uma das causas da incoordenação motora característica da doença, Finol e colaboradores (2001) analisaram alterações ultraestruturais em células musculares esqueléticas de camundongos experimentalmente infectados e encontraram várias alterações morfológicas, além de parasitos no citoplasma de células endoteliais. Estas alterações sugerem que as células musculares esqueléticas são um importante alvo da ação destes protozoários. Modificações ultraestruturais nas glândulas adrenais foram encontradas em um trabalho semelhante realizado por Rossi e colaboradores (1999), que também sugere pela primeira vez uma forma intracelular de *T. evansi*.

2.1.4 Resposta Imune

Os principais componentes da resposta imune à infecção por *T. evansi* em camundongos foram estudados por Baral e colaboradores (2007). Segundo os autores, o fator de necrose tumoral (TNF), que é importante na infecção de outros tripanossomatídeos, não influencia na parasitemia ou tempo de sobrevivência dos animais. O interferon-gama (IFN- γ) também não influenciou a parasitemia e o tempo de sobrevivência, mas os animais sem o gene do IFN- γ apresentaram maior chance de desenvolver anemia. Os autores concluíram também que o óxido nítrico, produzido pelo hospedeiro mediante IFN- γ , tem efeito supressivo nas células T do hospedeiro, mas esse efeito não influenciou na parasitemia e tempo de sobrevivência dos camundongos. Interessantemente, neste trabalho os autores observaram o papel da IgM no controle da infecção por *T. evansi*. Os animais foram capazes de controlar a infecção em seu início, onde havia altos níveis de IgM e baixa IgG. A queda dos níveis de IgM e aumento de IgG coincidiu com a perda do controle da infecção. Camundongos deficientes em IgM também não foram capazes de controlar o primeiro pico de parasitemia. Para confirmar esta teoria, camundongos deficientes em IgM foram tratados antes da infecção com IgM e IgG purificados de animais infectados, e apenas os que receberam IgM foram capazes de controlar a infecção, demonstrando assim o papel fundamental da IgM na tripanossomíase por *T. evansi*.

2.1.5 Diagnóstico

Os sinais clínicos da infecção por *T. evansi* são em sua maioria inespecíficos, principalmente no início da doença, sem nenhum sinal patognomônico (Silva et al., 2002). Segundo a Organização Internacional de Epizootias (OIE- *OIE Terrestrial Manual* www.oie.int), vários procedimentos diagnósticos são indicados e as principais técnicas serão discutidas a seguir.

A identificação direta do agente pode ser realizada na fase aguda da doença, através da análise de esfregaço sanguíneo ou de linfonodos em microscópio. A busca por protozoários pode ser realizada analisando-se o material em lâmina e lamínula (busca por parasitos móveis) ou corando-se o esfregaço com Giemsa. As limitações desta técnica são que ela é pouco sensível e em regiões em que há mais de uma espécie de *Trypanosoma spp.* geralmente não é possível diferenciá-las.

Como em muitos casos a tripanossomíase apresenta baixa parasitemia, algumas técnicas de concentração podem ser utilizadas. A primeira delas é a técnica de centrifugação em microhematócrito ou método de Woo (Woo, 1970), na qual o sangue é separado em tubos capilares com anticoagulante e os protozoários podem ser observados na junção entre a camada de células brancas e o plasma. Outra técnica bastante sensível é a *mini-anion exchange centrifugation technique* (mAECT), que consiste na realização de uma cromatografia de troca iônica em DEAE (dietilaminoetil)-Celulose. As células sanguíneas do hospedeiro são mais negativamente carregadas do que os protozoários, fazendo com que, com o uso de tampões com a força iônica adequada, os parasitos sejam eluídos pela coluna enquanto as células do sangue permanecem retidas (Lanham e Godfrey, 1970). Os protozoários devem então ser centrifugados e visualizados em microscópio óptico.

Como o *T. evansi* é altamente infectante para pequenos roedores, a inoculação em animais de laboratórios de sangue suspeito pode ser realizada. A parasitemia deve ser acompanhada a cada 48h através de esfregaço sanguíneo da cauda, e o período pré-patente geralmente é curto (5 dias), variando conforme a patogenicidade da cepa. Alternativamente, uma maior sensibilidade pode ser obtida com a inoculação da camada de células brancas, sendo assim possível detectar até 1,25 parasitos/ml de sangue (Reid et al., 2001).

Um dos mais sensíveis métodos é a detecção específica de DNA de *T. evansi* através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Atualmente o padrão ouro para a identificação do subgênero *Trypanozoon* são os iniciadores NRP ou TBR (Masiga et al., 1992; Moser et al., 1989). Para a identificação da espécie, podem ser utilizados iniciadores específicos para *T. evansi*, como, por exemplo, os que amplificam o gene RoTat 1.2, que é uma VSG exclusiva de *T. evansi*, não presente em *T. brucei* (Claes et al., 2004). Algumas cepas de *T. evansi* provenientes do Quênia não apresentam o gene RoTat 1.2, para estas podem ser utilizados iniciadores que amplificam outra VSG, desenvolvidos por Ngaira e colaboradores (2005). Apesar de ser a técnica mais sensível para o diagnóstico, o resultado pode ser falso negativo em casos em que não é observada parasitemia (Bengaly et al., 2001). Por não serem baseados em DNA do cinetoplasto, que é ausente em grande parte das cepas de *T. evansi*, estes dois últimos iniciadores são capazes de abranger o diagnóstico específico de *T. evansi* para a grande maioria das cepas (Ngaira et al., 2005).

Métodos sorológicos também são bastante empregados na detecção de anticorpos específicos anti- *T. evansi* no soro de animais suspeitos. Podem ser utilizados vários testes, os mais empregados são imunofluorescência indireta, ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) e o CATT (*card agglutination test*). Em cavalos experimentalmente infectados com *T.*

evansi, Wernery e colaboradores (2001) compararam os três métodos, e concluíram que o CATT detectou os antígenos com 7,8 dias pós-infecção, seguido pela imunofluorescência indireta com 15,7 dias e ELISA com 17,4 dias. Os autores também sugerem que deve ser feita uma padronização de valores de *cut-off*, pois em alguns testes animais negativos apresentaram uma certa reatividade. Reações cruzadas podem acontecer entre tripanossomatídeos, principalmente entre os da mesma seção. Os pertencentes à seção *Salivaria*, como *T. evansi*, *T. brucei* e *T. vivax* apresentam reatividade cruzada em diversos testes sorológicos, tanto que antígenos de *T. evansi*, que cresce mais facilmente em camundongos, podem ser utilizados para o diagnóstico sorológico de *T. vivax* (Desquesnes et al., 2001; Camargo et al., 2004). Recentemente, 102 pacientes portadores da doença de Chagas, causada pelo *T. cruzi*, foram submetidos ao ELISA utilizando antígenos de *T. evansi*, e surpreendentemente, 92,6% foram positivos (Desquesnes et al., 2007). Este é um dos poucos estudos que demonstra reatividade cruzada entre tripanossomatídeos de diferentes seções, visto que o *T. cruzi* pertence à seção *Stercoraria*. Segundo os autores, muitos dos dados epidemiológicos baseados apenas em sorologia devem ser melhor examinados, pois animais podem desenvolver uma infecção isolada ou com os dois protozoários conjuntamente, sendo que ferramentas moleculares devem ser empregadas para se obter a real proporção de cada agente que está causando as doenças. Savani e colaboradores (2005) relataram um cão naturalmente infectado por *T. evansi* e *Leishmania chagasi*, alertando também para a reação cruzada que pode ocorrer entre esses dois protozoários.

2.1.6 Tratamento

Os tripanossomatídeos *T. evansi* e *T. vivax* constituem na América do Sul, África e Ásia um risco potencial para 500 milhões de bovinos, 100 milhões de búfalos e 12 milhões de camelos (Silva et al., 2002). Estima-se que o custo com *T. evansi* no Pantanal, incluindo gastos com tratamento, pode chegar a 2,4 milhões de dólares com 6462 cavalos afetados por ano (Seidl et al., 1998).

O tratamento para a Surra baseia-se principalmente em quatro drogas: suramina, aceturato de diminazeno, quinapiramina e melarsomina (Brun et al., 1998). Ao contrário dos três primeiros, a melarsomina foi desenvolvida há pouco mais de 20 anos (Raynauld et al., 1989), e é o único composto que apresenta eficácia comprovada em diversas espécies (Payne et al., 1994; *Australian Veterinary Emergency Plan-*

<http://www.animalhealthaustralia.com.au/>). Os grandes problemas são a alta toxicidade destas drogas para o hospedeiro e o surgimento de cepas resistentes, visto que grande parte destes compostos vem sendo utilizados no campo há mais de 40 anos (Silva et al., 2002). Zhang e colaboradores (1993) induziram a formação de resistência ao aceturato de diminazeno, melarsomina e suramina no laboratório, demonstrando que o uso indiscriminado destas drogas pode culminar com uma menor sensibilidade dos protozoários aos tratamentos disponíveis. Recentemente, Gillingwater e colaboradores (2010) observaram que vários compostos derivados de diamidina podem ser eficazes contra *T. evansi*, sendo que identificaram 31 com alta eficácia contra o protozoário e baixa toxicidade para células de ratos em cultura.

Em um surto de Surra em cavalos e mulas na Tailândia, o tratamento com aceturato de diminazeno mostrou-se ineficiente, visto que após a segunda dose, 50% dos cavalos e 25% das mulas permaneceram positivas (Tuntasuvan et al., 2003). A resistência ao aceturato de diminazeno pode estar associada à expressão de um gene, o TeDR40. Witola e colaboradores (2005) demonstraram que este gene tem a expressão aumentada em 1000 vezes em parasitos resistentes. Outro fator envolvido na resistência ao aceturato de diminazeno é o transportador de aminopurinas P2, que carrega a droga para dentro do protozoário. Quando foi realizado o *knock-out* deste gene por RNA de interferência em *T. evansi*, o parasito foi capaz de crescer axenicamente com doses 5,5 vezes maiores do que o máximo recomendado (Witola et al., 2004). Zhou e colaboradores (2004) identificaram cepas pouco sensíveis à suramina e quinapiramina na China, sendo que algumas delas mostraram-se totalmente resistentes às doses curativas dessas drogas. Essa resistência à quinapiramina pode estar associada a duas proteínas, uma de 15,9 e outra de 19,76 kDa (Liao e Shen, 2010). Em uma ampla avaliação sobre a situação atual de resistência as quatro principais drogas correntemente utilizadas, Gillingwater e colaboradores (2007) demonstraram que cepas da Colômbia e do Quênia são resistentes à suramina (a cepa queniana tem uma resistência 200 vezes maior que o padrão), cepas do sudeste da Ásia, Indonésia e Filipinas apresentaram resistência ao aceturato de diminazeno e a cepa colombiana apresentou maior grau de resistência a quinapiramina, seguida por uma brasileira.

2.2 SELÊNIO E SELENOPROTEÍNAS

2.2.1 Aspectos gerais

Em 1818, o cientista sueco Jöns Jacob Berzelius detectou pela primeira vez o elemento selênio em câmaras de chumbo de uma fábrica de ácido sulfúrico, atribuindo-o este nome em homenagem à lua, do grego “selene” (Berzelius, 1818). A partir de 1950, o selênio foi reconhecido como um micronutriente essencial, relacionado a vários benefícios na saúde. Possui atividade antioxidante, antiinflamatória, antiviral, reprodutiva, anticancerígena e na prevenção de doenças cardiovasculares e musculares (revisado por Hatfield e Gladyshev, 2002; Papp et al., 2007). O selênio também foi comprovadamente reconhecido como etiologia de intoxicações em pessoas e animais a partir de 1944, causando doenças através de sua ingestão excessiva, além de ser teratogênico e possivelmente carcinogênico (Yang et al., 1983; Tiwari et al., 2006; Kamble et al., 2009; Flohé, 2009).

O selênio é um elemento essencial para eucariotos e procariotos. Ao contrário de outros elementos que interagem com as proteínas na forma de cofatores, o selênio é contradicionalmente incorporado a determinados polipeptídios como parte do aminoácido Selenocisteína (Sec), que hoje é considerado o 21º aminoácido do código genético (Hatfield e Gladyshev, 2002). As principais selenoproteínas e o modo pelo qual a Sec é incorporada as mesmas serão detalhadas nos próximos itens.

2.2.2 Selenoproteínas

Selenoproteínas são todas as proteínas que possuem selênio em sua composição, na forma do aminoácido selenocisteína. Essas proteínas são essenciais para diversos processos celulares, sendo que a ingestão de baixas quantidades de selênio, resultando em uma deficiência de selenoproteínas, é a etiologia de algumas doenças, como a de Keshan (miocardiopatia que ocorre em regiões na China com o solo deficiente em selênio), a de Kashin-Beck (osteoartrite associada a ingestão de baixas quantidades de selênio), cretinismo endêmico mixedematoso (a deficiência de selênio pode estar associada a deficiências na tireóide que irão acarretar em nanismo e deficiência mental) e infertilidade masculina (Organização Mundial da Saúde - http://whqlibdoc.who.int/publications/1996/9241561734_eng.pdf).

O selenoproteoma humano é constituído de 25 proteínas, muitas destas com função conhecida (Kryukov et al., 2003). A primeira selenoproteína a identificada foi a glutathionaperoxidase 1 (GPx-1), em 1973 por Flohé e colaboradores. As GPx estão relacionadas à redução de peróxido de hidrogênio e outros hidroperóxidos, protegendo as células do estresse oxidativo (Papp et al., 2007). Sete GPx são conhecidas em humanos, sendo que 2 delas possuem cisteína no lugar de selenocisteína. As tioredoxinas-redutases também são selenoproteínas envolvidas em processos de oxirredução que estão presentes em praticamente todos os organismos (Papp et al., 2007). Essas proteínas também podem possivelmente ser inativadas pelo selênio em tumores, funcionando como um mecanismo antitumoral (Ganther, 1999) Arbogast e Ferreiro (2010) discutem o possível papel da selenoproteína N (SelN) na proteção contra espécies reativas de oxigênio (EROs) e controle homeostático do cálcio. A selenoproteína SelW, juntamente com SelN, está envolvida na manutenção e desenvolvimento muscular (Lescure et al., 2009). A Sep15 é uma selenoproteína que pode estar associado ao envelhecimento de proteínas no retículo endoplasmático, envolvida na formação de pontes de sulfeto. Também há a possibilidade desta proteína participar do processo de apoptose, sendo então um importante alvo no câncer (Papp et al., 2007). A selenoproteína P (SelP) contém a maioria do selênio presente no plasma (pode ser utilizada como um biomarcador), e está associada ao transporte deste micronutriente do fígado para diversos tecidos, como o cérebro; além de também atuar como antioxidante (Burk et al., 2002). O grupo das iodotironinas deiodinases (DIOs) constitui uma das principais selenoproteínas do metabolismo, pois as DIOs atuam ativando ou inativando os hormônios da tireóide, T₃ e T₄, que atuam em vários processos, como termogênese, crescimento e desenvolvimento do cérebro (Papp et al., 2007). A selenofosfato sintetase 2 (SPS2) é interessantemente uma selenoproteína que é necessária para a formação das demais, estando envolvida na fosforilação do selênio para que o mesmo possa ser incorporado à selenocisteína (Xu et al., 2007). A selenoproteína K (SelK) possui altos níveis de mRNA no músculo cardíaco e está envolvida na proteção dos danos por estresse oxidativo no coração (Lu et al., 2006). Outras selenoproteínas como SelH, SelO, SelI, SelT e SelV ainda não possuem sua exata função caracterizada, mas a maioria delas possui o motivo CXXU (C= cisteína, U= selenocisteína) que caracteriza uma função antioxidante (Papp et al., 2007). Uma comparação das selenoproteínas descritas anteriormente e sua presença na Ordem Kinetoplastida está descrita na Tabela 1.

Tabela 1 Principais genes de selenoproteínas e selenoproteínas descritos em humanos e protozoários da Ordem Kinetoplastida.

Selenoproteína	Humanos	Ordem Kinetoplastida
Glutationa-peroxidase	Flohé et al., 1973	
Iodotironinas deiodinases	Papp et al., 2007	
LmSel1 e LinfSel1		Cassago et al., 2006
ODD1		Iribar et al., 2003
Selenofosfato sintetase	Xu et al., 2007	Sculaccio et al., 2008
SelK	Lu et al., 2006	Lobanov et al., 2006
SelN	Arbogast e Ferreiro, 2010	
SelP	Burk et al., 2002	
SelT	Papp et al., 2007	Lobanov et al., 2006
SelTryp		Lobanov et al., 2006
SelW	Lescure et al., 2009	
Sep15	Papp et al., 2007	
Tioedoxina-redutase	Ganther, 1999; Papp et al., 2007	

Uma das principais funções das selenoproteínas é a proteção contra as espécies reativas de oxigênio (EROs), atuando como antioxidantes. As EROs são capazes de causar danos às macromoléculas celulares, incluindo DNA, proteínas e lipídeos. Em comparação com o aminoácido cisteína, a selenocisteína possui um selênio substituindo o enxofre da cisteína (Arnér, 2010). Essa simples mudança pode conferir à selenocisteína um potencial entre 10 e 100 vezes maior para reações de oxirredução se comparada à cisteína. Isso pode ser explicado pelo fato de a Sec possuir um pK_a de 5,2 enquanto o da cisteína é de 8,5, então, em condições fisiológicas (pH entre 6,5-7,5), a maioria das moléculas de Sec estarão desprotonadas, portanto, mais propensas a participar de reações de oxirredução (Arnér, 2010). Entretanto, o autor não considera apenas o baixo pK_a da selenocisteína a única causa pela qual ela se mantém expressa na natureza, visto que muitas proteínas homólogas contendo cisteína em vez de Sec mantêm a capacidade antioxidante (Kanzok et al., 2001). Inclusive, algumas selenoproteínas de mamíferos possuem homólogas sem selênio em tripanossomatídeos, mas mantendo a função antioxidante (Hillebrand et al., 2003).

Procariotos e eucariotos possuem variados números de selenoproteínas em sua composição, podendo variar de zero em alguns fungos e plantas até 30 em alguns peixes e algas (Lobanov et al., 2009). Com análises de bioinformática, selenoproteomas de várias

espécies foram identificados, como por exemplo em humanos, roedores, peixes, bactérias, nematóides, insetos, protozoários da Ordem Kinetoplastida (revisados por Lobanov et al., 2009). Interessantemente, descobriu-se que a distribuição das selenoproteínas varia muito conforme a espécie, sendo aparentemente dependente do ambiente em que o organismo vive e da disponibilidade de selênio, visto que algumas plantas superiores perderam toda a maquinaria de inserção de Sec (Lobanov et al., 2007a) enquanto que para o *T. brucei* a inibição de selenoproteínas pode ser fatal (Lobanov et al., 2006).

2.2.3 Biossíntese de selenocisteína em Procariotos

A formação de proteínas contendo selenocisteína em sua constituição passa por uma complexa, e ainda não totalmente elucidada, rota metabólica. Os detalhes desta via em procariotos e eucariotos, bem como os principais elementos atuantes na incorporação co-traducionalmente de Sec às proteínas serão descritos a seguir.

Em procariotos, usando como modelo a enterobactéria *Escherichia coli*, Böck e colaboradores (1991) desvendaram a via metabólica, bem como os 4 principais elementos que a compõe. Poucos anos antes, em 1987, o mesmo grupo publicou um trabalho no qual relataram que a enzima formato-desidrogenase de *E. coli* possui um códon UGA, que é um códon de parada da tradução (“stop-codon”), codificando para um aminoácido nesta proteína, a selenocisteína (Zinoni et al., 1987). Esta descoberta quebrou o dogma de que um códon pode ter apenas uma leitura em um mesmo organismo (Böck, 2000), afirmando que o até então “stop-códon” UGA sinaliza também a inserção de selenocisteína em uma proteína.

O códon UGA é traduzido em selenocisteína por um RNA transportador (tRNA) especializado, o tRNA^{sec}. O tRNA^{sec}, conhecido como *selC* em procariotos, é inicialmente aminoacilado com uma serina, pela enzima seril-tRNA-sintetase, formando o tRNA^{Ser [Sec]}. Esta serina tem um grupamento hidroxil removido de sua cadeia lateral pela enzima selenocisteína-sintase (produto do gene *selA*), tornando-a susceptível à incorporação de monoselenofosfato, formando assim o tRNA carregado com selenocisteína, ou tRNA^{sec} (Böck et al., 1991). A constituição do monoselenofosfato utilizado para a formação do tRNA^{sec} é mediada pela enzima selenofosfato-sintetase, que gera este elemento a partir de selenito e ATP (Veres et al., 1992).

Em bactérias, logo após o códon UGA do mRNA de selenoproteínas, na fase aberta de leitura (ou ORF, do inglês “open reading frame”), encontra-se uma estrutura essencial e

específica de selenoproteínas, e que é determinante para que o códon UGA codifique para selenocisteína: a SECIS (sequência de inserção de selenocisteína, no inglês “SElenoCysteine Insertion Sequence”) (Berry et al., 1991). A SECIS possui uma estrutura secundária em forma de “grampo”, contendo duas hélices e 2 loops, além de um quarteto de bases não-Watson-Crick que são o sítio funcional da estrutura (Figura 6) (Hatfield e Gladyshev, 2002).

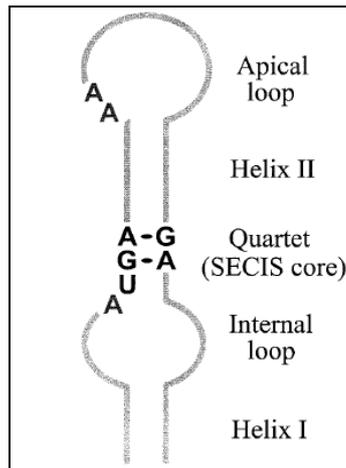


Figura 6 - Estrutura consenso da SECIS, com destaque para as 4 bases não Watson-Crick. Fonte: Hatfield e Gladyshev, 2002.

No momento da tradução de uma selenoproteína, um fator especial de tradução, que também pode ser considerado um fator de alongação EF-Tu, chamado *selB*, liga-se especificamente a SECIS pela sua porção C-terminal e ao tRNA^{sec} com uma alta especificidade (Paleskava et al., 2010), e com esta interação e a quebra de GTP o códon UGA sinaliza a inserção de selenocisteína no polipeptídeo nascente em procariotos (Böck, 2000). A via completa em procariotos está esquematizada na Figura 7.

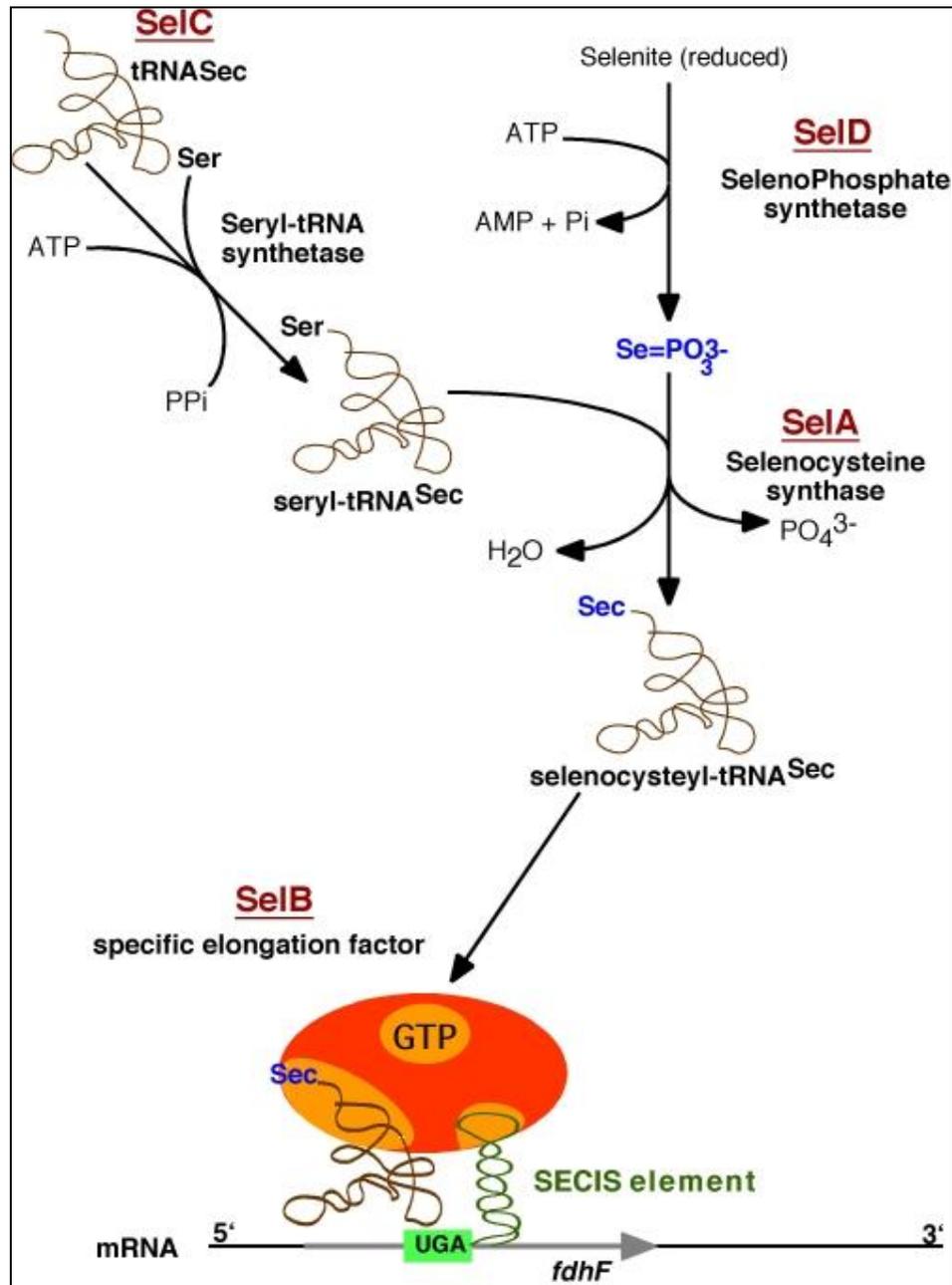


Figura 7 - Via de inserção de selenocisteína em procariotos. Fonte: <http://www.uni-frankfurt.de/fb/fb15/institute/inst-3-mol-biowiss/AK-Rother/research.html>

2.2.4 Biossíntese de selenocisteína em Eucariotos

A enzima selenocisteína-sintase (*selA*), que converte serina em selenocisteína utilizando monoselenofosfato, não é encontrada em eucariotos. Alguns trabalhos demonstraram a existência de uma serina fosforilada no tRNA, formada a partir da fosforilação do tRNA^{Ser} [Sec] (revisado por Allmang et al., 2009). Em 2004, Carlson e colaboradores identificaram e caracterizaram a enzima O-fosfoseril-tRNA^{sec}-quinase (PSTK) em archaea e camundongos, encontrando também um alto grau de conservação em diversas

espécies destes reinos. Este trabalho também relatou a especificidade da PSTK pelo $\text{tRNA}^{\text{Ser}[\text{Sec}]}$, demonstrando então que esta enzima promove a formação de fosfoseril- $\text{tRNA}^{\text{Ser}[\text{Sec}]}$ a partir de $\text{tRNA}^{\text{Ser}[\text{Sec}]}$. A especificidade de fosforilação da PSTK pelo $\text{tRNA}^{\text{Ser}[\text{Sec}]}$ e não pelo $\text{tRNA}^{\text{Ser}[\text{Ser}]}$ é um ponto de controle muito importante, que evita que seja formada Sec no lugar de serina na célula, e foi demonstrada por Chiba e colaboradores (2010), que relataram que a PSTK fosforila apenas $\text{tRNA}^{\text{Ser}[\text{Sec}]}$, e não $\text{tRNA}^{\text{Ser}[\text{Ser}]}$.

O último passo para a formação tRNA carregado com selenocisteína é a conversão do fosfoseril- $\text{tRNA}^{\text{Ser}[\text{Sec}]}$ em tRNA^{Sec} . Esse processo é realizado pela enzima O-fosfoseril- $\text{tRNA}^{\text{Ser}[\text{Sec}]}$: tRNA^{Sec} -sintase (SepSecS), que é uma proteína de 48 kDa que foi originalmente precipitada utilizando anticorpos de pacientes com hepatite auto-imune do tipo I (Gelpi et al., 1992). O monoselenofosfato utilizado pela SepSecS para formar o tRNA^{Sec} é sintetizado pela enzima selenofosfato-sintetase 2 (SPS2) (Xu et al., 2007). Segundo os autores, apenas a SPS2, e não a SPS1, é capaz de sintetizar monoselenofosfato a partir de selenito e ATP *in vitro*. Isto condiz com o fato de a SPS2 ser encontrada no genoma de todos os organismos que sabidamente sintetizam Sec (Allmang et al., 2009) e também que alguns insetos que perderam a via da Sec ainda apresentam a SPS1 (Chapple e Guigo, 2008), podendo estar esta enzima relacionada à outras funções na célula (Lobanov et al., 2008). A biossíntese de Sec em eucariotos está resumida na Figura 8.

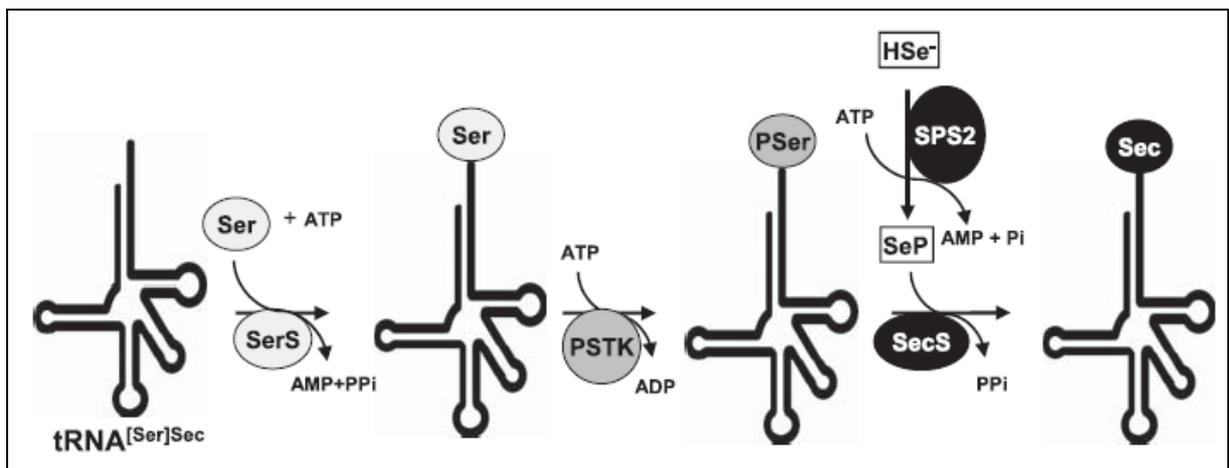


Figura 8 - Biossíntese de selenocisteína em seu próprio tRNA. Fonte: Xu et al., 2007.

O posicionamento da SECIS em archaea e eucariotos é outro ponto de diferença. A localização desta sequência é na região 3' não-traduzida (3'-UTR) do gene (Hatfield e Gladyshev, 2002). Em eucariotos, existem 2 tipos de SECIS, sendo que o tipo II possui uma terceira hélice e um menor loop apical se comparado ao tipo I (Allmang et al., 2009). O tipo

II constitui a maioria das SECIS encontradas (Figura 9).

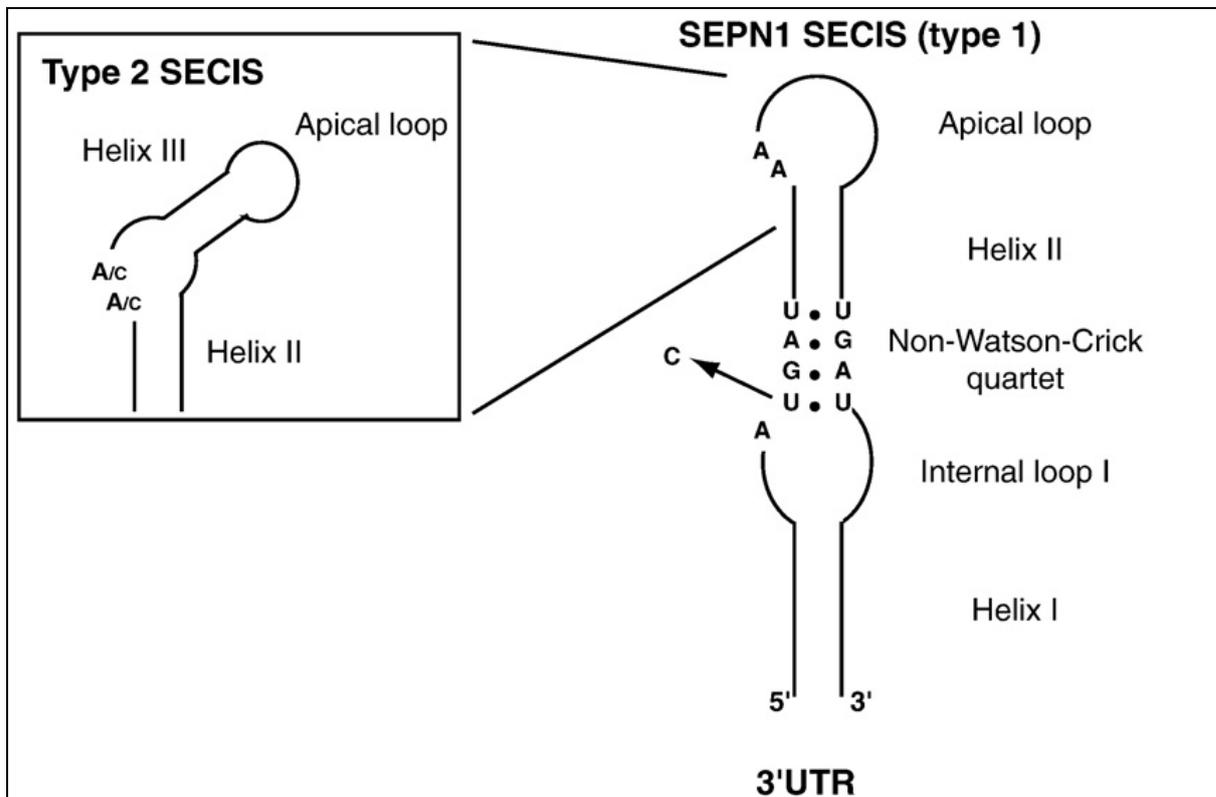


Figura 9 - SECIS de eucariotos tipo I e tipo II. Fonte: Allmang et al., 2009.

O papel feito por *selB* em procariotos é realizado por 2 proteínas em eucariotos: o fator de alongação que liga o tRNA^{Sec} chamado EF-Sec; e uma proteína específica que liga-se a SECIS, a proteína ligante ao SECIS 2 (SBP2). Fagegaltier e colaboradores (2000) identificaram um homólogo a *selB* em camundongos que tinha capacidade de ligar-se ao tRNA^{Sec}, a GTP mas não era capaz de interagir com SECIS. O EF-Sec liga-se ao tRNA^{Sec} e direciona-o para o sítio A do ribossomo. Assim que o ribossomo reconhece o tRNA^{Sec}, o EF-Sec hidrolisa GTP e libera o tRNA^{Sec}, deixando o sítio A livre novamente (Donovan e Copeland, 2010). Ao contrário dos fatores de alongação dos outros aminoácidos, que possuem 3 domínios, o EF-Sec possui um quarto, responsável pela interação com a SBP2 (Fagegaltier et al., 2000).

A SBP2 é o fator de incorporação de selenocisteína mais estudado atualmente (Xu et al., 2007; Allmang et al., 2009). Esta proteína liga-se a SECIS e ao EF-Sec, papel este desempenhado em procariotos apenas por *selB*. Em bactérias, pelo fato de a SECIS estar posicionada logo após o códon UGA, é possível que apenas *selB* faça a ligação em SECIS e também ao tRNA^{Sec}, o que não é possível em eucariotos, visto que o elemento SECIS está

posicionado na 3'-UTR do gene (Donovan e Copeland, 2010). O papel central deste elemento na tradução de selenoproteínas foi demonstrado pela primeira vez por Copeland e colaboradores (2000), relatando que células sem SBP2 paravam totalmente a síntese de selenoproteínas, que era restaurada após a adição da proteína. A SBP2 possui 3 funções: incorporação de Sec à proteína, ligação à SECIS e ligação ao ribossomo; e isso é comprovado pela presença de 3 principais domínios na proteína, sendo que o primeiro possui função desconhecida, o segundo é necessário para incorporação de Sec e ligação à SECIS (chamado de SID), e o terceiro que liga-se com o ribossomo (RBD). No momento da tradução, a afinidade da SPB2 com SECIS induz mudanças conformacionais no RBD, que recruta o SID e promove a ligação a SECIS. A SECIS ligada a SBP2 permite a aproximação do EF-Sec, induzindo mudanças conformacionais em SID que sinaliza ao ribossomo a autorização para que o EF-Sec libere o tRNA^{Sec} no sítio A ribossomal. Após, ocorre a hidrólise de GTP que permite o desligamento do tRNA^{Sec} e do EF-Sec, não sendo conhecido o destino da SBP2 (Figura 10) (revisado por Donovan e Copeland, 2010). Um modelo proposto para a liberação de SBP2 seria através da proteína ribossomal L30, que compete com SBP2 pela ligação à SECIS (Papp et al., 2007). Estudos demonstram que uma terceira proteína, a SECp43, aumenta a interação entre EF-Sec e SBP2 *in vivo* (Small-Howard et al., 2006).

As principais diferenças entre as vias de biossíntese e tradução de selenoproteínas em procariontos, arqueobactérias e eucariotos estão ilustradas nas Figuras 11 e 12.

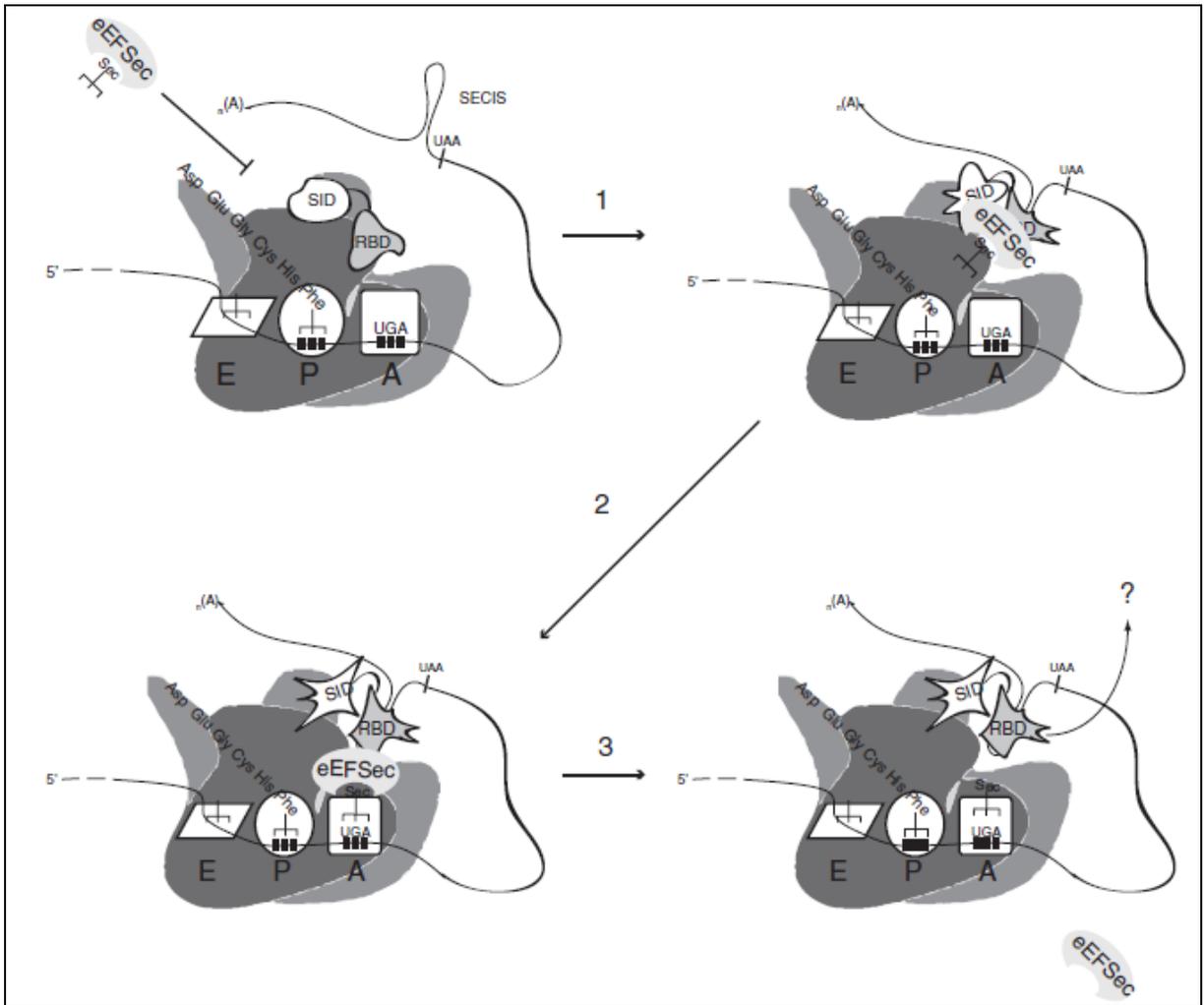


Figura 10 - Tradução de Sec, demonstrando o complexo formado entre SECIS-SBP2-EF-Sec e a interação com o ribossomo (cinza). Ver no texto maiores detalhes. Fonte: Donovan e Copeland, 2010. Modificado por Tavares, 2010.

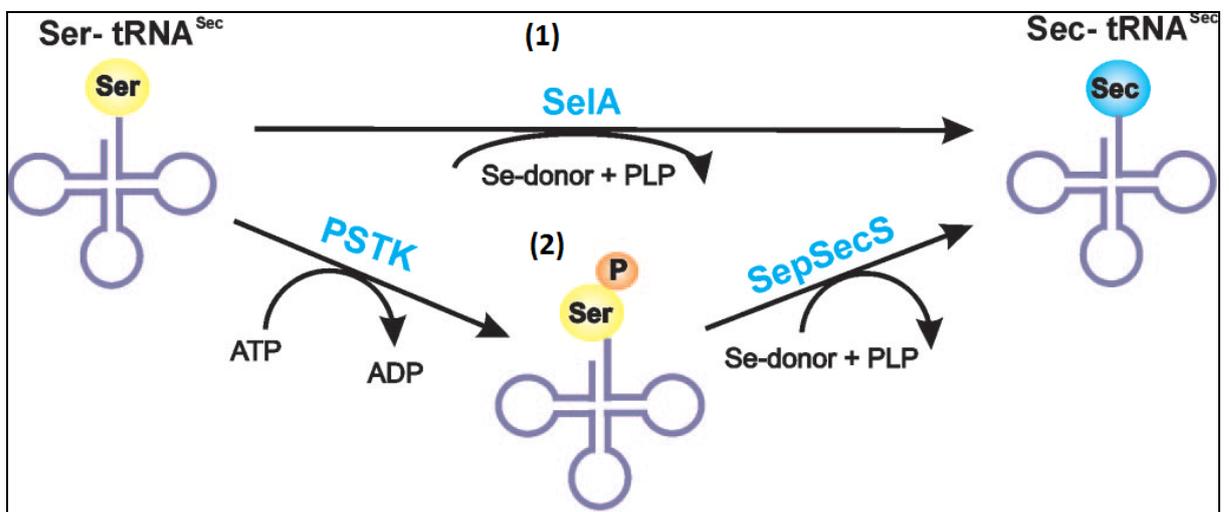


Figura 11 - Biossíntese de Sec em procaríotos em (1) (utilizando a via de *selA*) e em arqueobactérias e eucariotos (2) (utilizando a via PSTK- SepSecS. Fonte: Yuan et al, 2006. Modificado por Tavares, 2011.

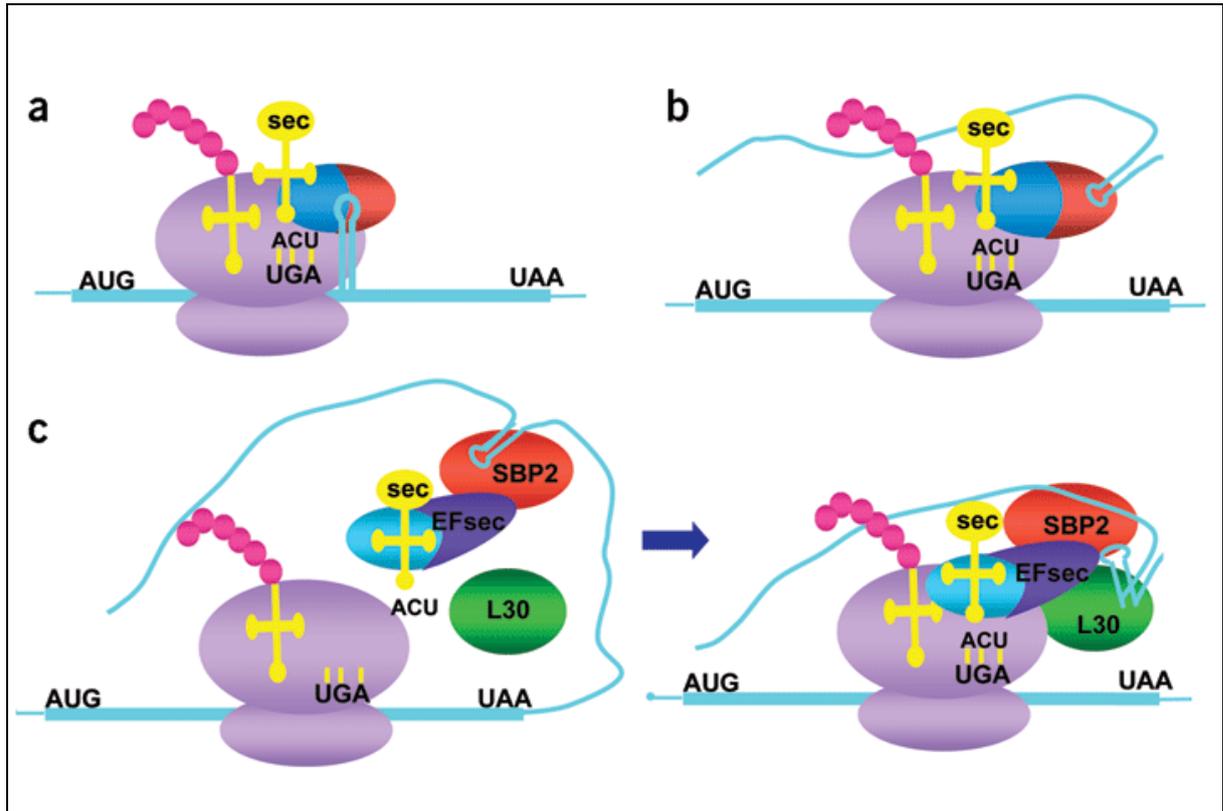


Figura 12 - (A) Tradução de selenocisteína em bactérias; (B) tradução de selenocisteína em arqueobactérias; (C) tradução de selenocisteína em eucariotos. Fonte: Berry, 2005.

2.2.5 Selenoproteínas em Kinetoplastida

O *Trypanosoma evansi* pertence à ordem Kinetoplastida, cujos integrantes são conhecidos como eucariotos inferiores. Poucos trabalhos visam elucidar a utilização de selenocisteína por protozoários desta ordem. O primeiro gene de selenoproteína de Kinetoplastida foi relatado em 2003, a ODD1 em *Leishmania major* (Iribar et al., 2003). Cassago e colaboradores (2006) através de buscas nos genomas de *Leishmania major*, *Leishmania infantum*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma congolensis*, *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma vivax* encontraram pela primeira vez homólogos para SPS2, EF-Sec, PSTK e SECp43, essenciais para a maquinaria de inserção de selenocisteína. Também identificaram possíveis genes homólogos à GPx e SelR em *L. major* e *T. brucei* e SelX em *T. brucei*. Os autores também reportaram a existência de um gene para uma possível selenoproteína de *L. major* e *L. infantum*, nomeada LmSel1 e LinfSel1, respectivamente, juntamente com a SECIS correspondente. A possível selenoproteína incorporou ^{75}Se formando uma banda de tamanho esperado em um experimento com células em cultura (Figura 13). Geslain e colaboradores

(2006) demonstraram que a enzima seril-tRNA sintetase é funcional em *Trypanosoma spp.*, surpreendentemente aminoacilando o tRNA^{Sec} com uma eficiência 8 vezes maior que o tRNA^{Ser}. Interessantemente, também foi demonstrado que o silenciamento do gene da seril-tRNA sintetase promove uma parada no crescimento das células em cultura.

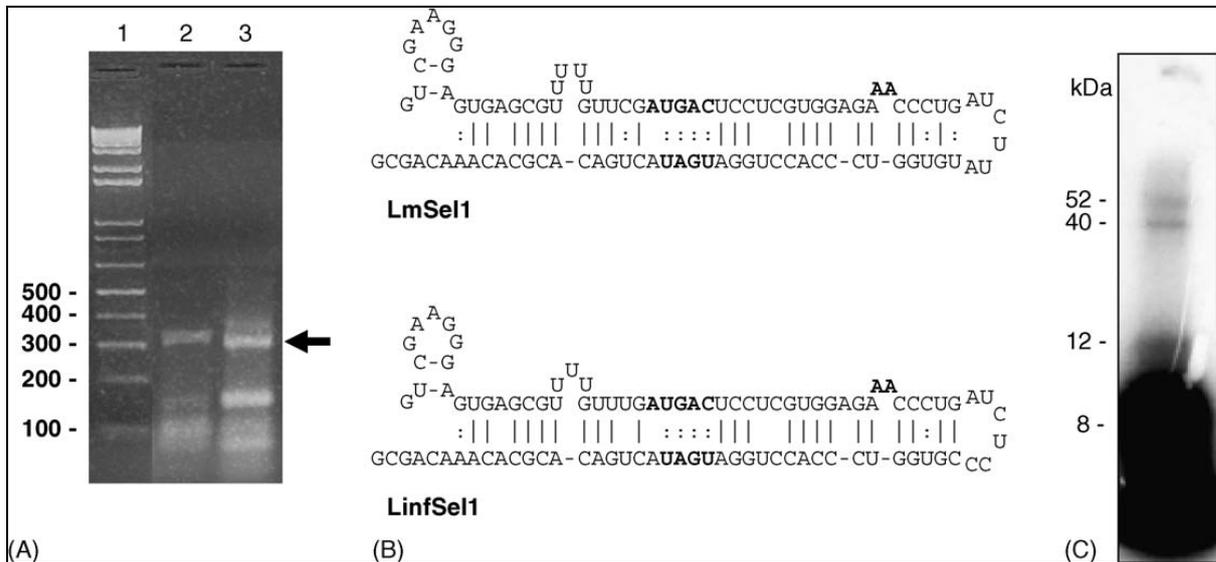


Figura 13 - (A) Amplificação por RT-PCR de LmSel1 (linha 2) e LinfSel1 (linha 3). (B) Estruturas secundárias preditas para SECIS. (C) Incorporação de ⁷⁵Se por *Leishmania*, em 12 kDa possivelmente está a selenoproteína LmSel1 ou LinfSel1. Fonte: Cassago et al., 2006.

Lobanov e colaboradores (2006) em uma busca por selenoproteínas no genoma de *Trypanosoma spp.* e *Leishmania spp.* identificaram 3 selenoproteínas: SelK, SelT e SelTryp. SelK e SelT são homólogas às encontradas em mamíferos, mas SelTryp demonstrou ser exclusiva de tripanossomatídeos. Esta proteína apresenta o motivo CxxU, que é característico de selenoproteínas envolvidas em reações de oxirredução. Em um experimento de incorporação de ⁷⁵Se por células de *T. cruzi*, os autores demonstraram a presença apenas de uma banda referente à SelK, mas Aeby e colaboradores (2009) encontraram bandas com pesos correspondentes às 3 selenoproteínas. A inibição de compostos contendo selênio em cultura por auranofina (composto derivado do ouro), em *T. brucei*, gerou morte dos protozoários tanto na forma procíclica (encontrada em insetos) quanto na forma sanguínea (Lobanov et al., 2006), o que contrasta com os resultados encontrados por Aeby e colaboradores (2009), que utilizando células procíclicas com os genes para PSTK e SepSecS silenciados não encontraram diferenças no crescimento comparando com células normais.

Os resultados obtidos por Lobanov e colaboradores (2006) sugerem que selenoproteínas podem ser um futuro alvo para medicamentos, o que é reforçado pela descoberta da SelTryp, que é exclusiva da ordem Kinetoplastida. Esses resultados são

reforçados pelo fato de que proteínas que participam da via metabólica de selenoproteínas terem sido demonstradamente ativas em *Trypanosoma spp.* como por exemplo a SPS2 (Sculaccio et al., 2008) que é essencial nessa rota e a presença do tRNA^{Sec} (Cassago et al., 2006) com sua aminoacilação com serina pela seril-tRNA sintetase (Geslain et al., 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Demonstrar a presença de componentes da biossíntese e incorporação de selenocisteína em *Trypanosoma evansi*, bem como a presença do gene de uma selenoproteína exclusiva de tripanossomatídeos neste protozoário.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Amplificar, clonar e sequenciar os genes *selB*, *selC*, *selD*, *selTRYP* e PSTK a partir do DNA genômico e do cDNA de *T. evansi*;
- Realizar a predição da estrutura secundária do tRNA^{Sec} e a análise de domínios dos genes sequenciados utilizando softwares específicos;
- Determinar o número de cópias dos genes *selB*, *selD* e PSTK no DNA genômico de *T. evansi*;
- Determinar a presença na proteína SPS no extrato protéico de *T. evansi*;
- Imunolocalizar a proteína SPS no *T. evansi*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DE *Trypanosoma evansi*

4.1.1 Comitê de ética

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal do CAV-UDESC

4.1.2 Amplificação do número de parasitos

O número de parasitos necessários para a realização dos experimentos foi gerado a partir da inoculação de um rato (*Rattus norvegicus*) com 10^5 tripomastigotas de um isolado de *Trypanosoma evansi* (Colpo, 2005) gentilmente cedido pela Professora Dra. Silvia Gonzalez Monteiro, do Laboratório de Parasitologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria. O animal foi acompanhado diariamente com a realização de esfregaço periférico da cauda corado com Panótico Rápido®. A lâmina era analisada duas vezes ao dia em microscópio óptico no aumento de 1000 vezes, e o número de parasitos por campo determinado.

No terceiro dia após a inoculação, quando a parasitemia alcançou 100 parasitos por campo (aproximadamente 10^9 parasitos/ml), o animal foi anestesiado em câmara com éter e foi realizado deslocamento crânio-cervical para a insensibilização do mesmo. Em seguida foi procedida a abertura do tórax e punção cardíaca de 10 ml de sangue utilizando-se uma seringa descartável de 10 ml e agulha estéril 25 X 7 mm.

4.1.3 Purificação do *Trypanosoma evansi* do sangue

A separação do *Trypanosoma evansi* do sangue foi realizada em duas etapas. A primeira foi a centrifugação em gradiente de Percoll® (*GE Healthcare*), para que ocorra o fracionamento dos parasitos e da camada de células brancas (fase superior) das hemácias (fase inferior). A próxima etapa foi a cromatografia de troca iônica utilizando-se a resina de

dietilaminoetil-celulose (DEAE-Celulose), em que ocorreu a separação das células brancas sanguíneas dos parasitos através de sua carga elétrica superficial.

4.1.3.1 Centrifugação em gradiente de Percoll[®]

O sangue coletado foi aliqotado em volumes de 1 ml em microtubos para centrífuga de 2 ml e misturado na proporção 1:1 com Percoll[®] tamponado com HEPES pH 7,4 contendo 8,5% de sacarose e 2,5% de D-glicose (Grab & Bwayo, 1982). Os microtubos foram centrifugados por 25 minutos a 16870 x g. O sobrenadante com os parasitos e células brancas foi transferido para um novo tubo e foram realizadas 2 lavagens com PBS-Glicose (0,78 g/L NaH₂PO₄.1H₂O, 13,48 g/L NaH₂PO₄, 4,25 g/L NaCl, 15 g/L D-glicose, pH 8,0) na proporção de 1:3, centrifugando as amostras por 15 minutos a 6000 x g. Ao final, o pellet formado foi eluído em 2 ml de PBS-Glicose para a realização da cromatografia de troca iônica em DEAE-Celulose.

4.1.3.2 Cromatografia de troca iônica em DEAE-Celulose

Para a preparação da resina, 1 volume de DEAE-Celulose (Sigma Aldrich) foi hidratado em 5 volumes de água ultrapura durante 45 minutos. Após, a água (fase superior) foi descartada e 5 ml de resina foram empacotados em uma coluna plástica Poly-Prep Chromatography Column (Biorad[®]). A resina então foi equilibrada com 10 ml de NaOH 0,1M contendo NaCl 0,5M, em seguida com 10 ml de NaCl 0,5M, após com 10 ml de HCl 0,1M contendo NaCl 0,5M e com água ultrapura até que o pH do eluído atingisse o valor 5,0. Em seguida, foram passados pela coluna 10 ml de NaCl 1M e, por fim, 10 ml de PBS-Glicose.

A amostra obtida da centrifugação em gradiente de Percoll[®] foi aplicada na coluna, e em seguida eluída em PBS-Glicose 60%, de acordo com Lanham e Godfrey, 1970. A cada 2 ml de volume eluídos da coluna era realizada análise da viabilidade dos parasitos através de pesquisa direta em lâmina e lamínula e visualização em microscópio óptico no aumento de 400 X.

Cessada a purificação de parasitos, o volume total obtido foi centrifugado durante 15 minutos a 6000 x g, verificando-se a formação de um pellet de *Trypanosoma evansi*. O sobrenadante foi descartado e o pellet eluído em 1 ml de PBS-Glicose. Deste volume, 500 µl

foram destinados à extração de DNA genômico, 100 µl à extração de RNA total, 300 µl à extração de proteínas totais e 100 µl à preparação de lâminas para imunofluorescência indireta. Para as extrações de DNA genômico e proteínas totais, os parasitos foram centrifugados e estocados a -20°C. Para a extração de RNA total os parasitos foram centrifugados e estocados em nitrogênio líquido, e a preparação de lâminas para imunofluorescência indireta foi realizada em seguida, enquanto os parasitos ainda apresentavam-se viáveis.

4.2 AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DAS ORFs DOS GENES *selB*, *selC*, *selD*, *PSTK* E *selTRYP*

4.2.1 Extração de DNA genômico

O pellet de *Trypanosoma evansi* foi ressuscitado em 500 µl de tampão de lise (Tris 10 mM pH 7,4, EDTA 25 mM, SDS 1%) contendo 0,1 µg/µl de proteinase K e mantido a 42°C por 12 horas para a realização da lise celular. Posteriormente foram realizadas 1 lavagem com fenol, uma lavagem com fenol:clorofórmio na proporção 1:1 e uma lavagem com clorofórmio. O DNA foi precipitado com isopropanol e etanol, sendo ao final eluído em água ultrapura e tratado com RNase. O DNA foi avaliado quanto a sua viabilidade através de eletroforese em gel de agarose e quanto à sua concentração em espectrofotômetro, observando-se a absorvância a 260 e 280nm, além das relações 260/280nm e 260/230nm.

4.2.2 Extração de RNA total

O pellet de *Trypanosoma evansi* foi rapidamente retirado do nitrogênio líquido e ressuscitado em 500 µl de Trizol (*Invitrogen*) com um micropipetador, até que toda a massa de parasitos fosse completamente homogeneizada com o reagente. Em seguida adicionou-se 100 µl de clorofórmio e centrigou-se a amostra por 15 minutos a 12000 x g. A fase aquosa foi retirada e misturada com 250 µl de isopropanol, e após uma incubação de 10 minutos a 25°C procedeu-se nova centrifugação por 10 minutos a 12000 x g. O pellet de RNA foi lavado com 500 µl de etanol 75% e por fim eluído em água livre de Rnase. O RNA foi avaliado quanto a sua viabilidade através de eletroforese em gel de agarose e quanto à sua concentração em

espectrofotômetro, observando-se a absorvância a 260 e 280nm, além das relações 260/280nm e 260/230nm.

4.2.3 Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR)

Para a síntese do DNA complementar ou cDNA foi utilizado o kit comercial ProtoScript M-MuLV First Strand cDNA Synthesis[®] (Biolabs[®]), seguindo as recomendações do fabricante. Na primeira fase adicionou-se a um microtubo estéril 6 µl do RNA extraído do *Trypanosoma evansi* e 2 µl de Random Primer Mix, totalizando um volume de 8 µl. Seguiu-se a desnaturação a 75°C por 5 minutos. Na segunda fase adicionou-se ao microtubo 10 µl de M-MuLV Reaction Mix e 2 µl M-MuLV Enzyme Mix, obtendo um volume final de 20 µl. Uma nova incubação foi realizada a 25° por 5 minutos, 42°C por 60 minutos e no final 80°C por 5 minutos. O produto foi eluído em 20 µl de água Milli-Q[®], obtendo um volume de 50 µl, conservado a -20°C até o momento de uso na reação de PCR.

4.2.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As regiões codificandes dos genes *selB*, *selD*, *PSTK* e *selTRYP* foram amplificadas tanto do DNA genômico quanto do cDNA através da PCR. A ORF do gene *selC* foi amplificada do cDNA. Oligonucleotídeos específicos com sítios de clivagem para as enzimas *XhoI* e *NdeI* foram utilizados, com excessão para *selC* (Tabela 2). Os oligonucleotídeos utilizados foram desenhados com base nas sequências dos genes de *Trypanosoma brucei*, visto que as duas espécies possuem a mesma origem e compartilham várias semelhanças (Schnauffer et al., 2002; Jensen et al., 2008; Lun et al., 2010).

Para a ORF do gene *selB*, a reação foi montada utilizando-se 10 µm de cada oligonucleotídeo, 100 ng de DNA ou cDNA, 0,8 mM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 1,25 U de Platinum Taq DNA Polimerase[®] (Invitrogen[®]) juntamente com seu tampão de reação 1x. A reação foi então submetida a uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 25 ciclos com 3 etapas: 95 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 2 minutos. Por fim, ocorreu uma extensão final de 10 minutos a 72 °C.

Tabela 2 - Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação das ORFs dos genes *selB*, *selC*, *selD*, PSTK e *selTRYP* do DNA genômico e cDNA de *Trypanosoma evansi*. Os sítios para as enzimas de restrição *XhoI* (primers reverse-R) e *NdeI* (primers forward- F) estão destacados.

Nome	Sequência	Referência
selBF	GCC <u>CATATG</u> ACAGAAAGTTAATGATGTTGCCTCTG	Rodrigues, 2008
selBR	GCCC <u>TCTGAG</u> CTACTGCTGAAGCTGACTGTG	Rodrigues, 2008
selCF	GCCACGATGAGCTCAGCTGGTGCTG	Rodrigues, 2008
selCR	CACCACAAAGGCCGAATCGAACGGC	Rodrigues, 2008
selDF	ACGTACGT <u>CATATG</u> TCAGAGAAGGAAGGAAAAGTAATAC	Sculaccio et al., 2008
selDR	<u>ATCTGAG</u> CTATCAAATAATCTATCATTACCTTCGCTCCCA	Sculaccio et al., 2008
PSTKF	CC <u>CATATG</u> ACAGTTTGTCTTGTCTACTAA	Evangelista, 2009
PSTKR	CC <u>TCTGAG</u> TTATCAAAGATCTACTAAGGCATGA	Evangelista, 2009
selTRYPF	TATAAAG <u>GATCC</u> ATGGTTTCTGAAGC (<i>BamHI</i>)	Lobanov et al., 2006
selTRYPR	AAGAGTA <u>AAGCTT</u> TACCTGGGTCAGC (<i>HindIII</i>)	Lobanov et al., 2006

Para *selC* foram utilizados 10 µm de cada oligonucleotídeo, 100 ng de cDNA, 0,8 mM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 U de Platinum Taq DNA Polimerase[®] (*Invitrogen*[®]) juntamente com seu tampão de reação 1x. A reação foi então submetida a uma desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguida de 30 ciclos com 3 etapas: 95 °C por 30 segundos, 50 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto. Por fim, ocorreu uma extensão final de 10 minutos a 72 °C.

Para a ORF do gene *selD*, utilizaram-se 25 µm de cada oligonucleotídeo, 100 ng de DNA ou cDNA, 1 mM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 1,25 U de Platinum Taq DNA Polimerase[®] (*Invitrogen*[®]) juntamente com seu tampão de reação 1x. A reação foi então submetida a uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos com 3 etapas: 95 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 1,5 minutos. Por fim, ocorreu uma extensão final de 10 minutos a 72 °C.

Para a ORF de PSTK a reação foi montada utilizando-se 10 µm de cada oligonucleotídeo, 50 ng de DNA ou cDNA, 0,8 mM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 1,25 U de Platinum Taq DNA Polimerase[®] (*Invitrogen*[®]) juntamente com seu tampão de reação 1x. A reação foi então submetida a uma desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguida de 25 ciclos com 3 etapas: 95 °C por 45 segundos, 52 °C por 30 segundos e 72 °C por 1,5 minutos. Por fim, ocorreu uma extensão final de 10 minutos a 72 °C.

Para *selTRYP*, utilizaram-se 10 µm de cada oligonucleotídeo, 100 ng de DNA ou cDNA, 1 mM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 1,25 U de Platinum Taq DNA Polimerase[®]

(*Invitrogen*[®]) juntamente com seu tampão de reação 1x. A reação foi então submetida a uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos com 3 etapas: 95 °C por 30 segundos, 54,7 °C por 30 segundos e 72 °C por 3 minutos. Por fim, ocorreu uma extensão final de 10 minutos a 72 °C.

4.2.5 Eletroforese e Clonagem das ORFs dos gene *selB*, *selC*, *selD*, PSTK e *selTRYP* em pGEM-T Easy[®]

Um gel de agarose na concentração de 1% foi preparado utilizando-se tampão trisborato-EDTA (TBE). Quarenta microlitros de PCR de cada gene foram aplicados no gel e submetidos a 80V por 2 horas. Ao final, o gel foi corado em uma solução de brometo de etídeo 0,5 µg/ml por 30 minutos, exposto a luz UV e fotografado. As bandas com tamanho correspondente a *selB* (1958 pb), *selC* (89 pb), *selD* (1179 pb), PSTK (1083 pb) e *selTRYP* (2340 pb) foram excisadas do gel com o auxílio de uma lâmina de bisturi estéril e o DNA contido em cada banda foi purificado utilizando-se o kit Qiaquick Gel Extraction[®] (*Qiagen*[®]).

Cada gene foi ligado ao plasmídeo pGEM-T Easy[®] (*Promega*[®]), utilizando o seguinte protocolo:

- 5 µl de 2x Rapid Ligation Buffer
- 1 µl do vetor pGEM-T Easy[®] (50ng)
- 3 µl do inserto (produto de PCR purificado)
- 1 µl da enzima T4 DNA ligase (1U)

As reações ocorreram a 4°C por 12 horas.

Para a transformação, foram utilizadas células de *Escherichia coli* DH10B previamente tornadas cálcio-competentes (Sambrook et al., 1989). Aliquotas de 50 µl de células bacterianas foram homogeneizadas com 5 µl da ligação de cada gene em tubos para microcentrífuga de 1,5 ml e incubadas por 30 minutos no gelo. Em seguida, foi realizado um choque térmico a 42 °C por 45 segundos e nova incubação no gelo por 1,5 minutos. Após, foram adicionados 300 µl de meio SOC em cada tubo e os mesmos foram incubados a 37°C sob agitação de 120 rpm por 1 hora. Após esta incubação, 200 µl de cada transformação foram plaqueados em meio LB sólido contendo 100 µg/ml de ampicilina, Xgal e IPTG para que houvesse a formação de colônias azuis (não contêm inserto ligado ao plasmídeo) ou brancas (contêm um inserto ligado ao plasmídeo). As placas foram incubadas a 37 °C por 16

horas.

A comprovação da presença dos insertos e o tamanho dos mesmos foi realizada através da amplificação do inserto por PCR diretamente da colônia de bactérias, utilizando-se iniciadores específicos para o vetor pGEM-T Easy[®], pGEM-F (5'- ACG CCA AGC TAT TTA GGT GAC ACT ATA -3') e EXCEL-R (5'- GTT GTA AAA CGA CGG CCA GTG AAT- 3') (10pmol/reação de cada iniciador), os quais possuem seus sítios de ligação nas extremidades do sítio de clonagem que contém o inserto. Assim, três colônias de cada gene que se apresentaram positivas para a presença de inserto através de PCR (*selBpGEM*, *selCpGEM*, *selDpGEM*, *PSTKpGEM* e *selTRYPPpGEM*) foram selecionadas para a extração de DNA plasmidial, utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep Kit[®] (*Qiagen*[®]), e posterior sequenciamento.

4.2.6 Sequenciamento dos clones *selBpGEM*, *selCpGEM*, *selDpGEM*, *PSTKpGEM* e *selTRYPPpGEM*

O sequenciamento dos clones foi realizado em um equipamento MegaBace 1000[®] DNA Analysis System[®] (*GE/Amersham Biosciences*[®]). As reações de sequenciamento foram preparadas a partir do DNA plasmidial e o Kit DYEnamic[®] ET Dye Terminator (*GE/Amersham Biosciences*[®]) conforme especificações do fabricante. As reações foram realizadas na presença de 5,0 pmol dos iniciadores pGEM-F e EXCEL-R e aproximadamente 800ng de DNA plasmidial, nas seguintes condições térmicas: 95°C por 25 segundos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, ligação dos iniciadores a 55°C por 30 segundos e extensão a 60°C por 80 segundos. Posteriormente, os produtos marcados foram precipitados com isopropanol 70% e etanol absoluto, para retirada dos nucleotídeos e iniciadores não incorporados. Os produtos purificados foram então eletroinjetados a 2KV por 100 segundos e eletroeluídos por 150 minutos a 7KV.

As sequências obtidas foram analisadas quanto à sua qualidade utilizando-se o pacote *Phred/Phrap/Consed* (www.phrap.org) sendo consideradas somente as sequências com qualidade Phred>20. A confirmação da identidade dos fragmentos realizou-se utilizando o programa BLAST (“Basic Local Alignment Search”, disponível em www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) e as sequências dos clones obtidos para um mesmo gene foram alinhadas utilizando-se o programa ClustalW para formação de uma sequência consenso.

A análise da identidade das sequências foi realizada utilizando-se o programa BLAST.

A determinação do ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (em kDa) estimados para as sequências protéicas foi realizada utilizando-se a ferramenta “ProtParam” do Instituto Suíço de Bioinformática (disponível em <http://expasy.org/tools/protparam.html>). O alinhamento das sequências protéicas foi realizado com o programa ClustalX (Thompson et al., 1997), e as sequências utilizadas para comparação estão disponíveis no “National Center for Biotechnology Information”- NCBI- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>. A análise dos domínios foi realizada com os programas “InterProScan” (“European Bioinformatics Institute”- EBI, disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>) e “Conserved Domain Search” (NCBI- disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?>).

4.3 SOUTHERN BLOT DOS GENES *selB*, *selD* E PSTK DE *Trypanosoma evansi*

Para a confirmação da presença e determinação do número de cópias dos genes *selB*, *selD* e PSTK no DNA genômico (gDNA) de *Trypanosoma evansi*, foi realizada a técnica de *Southern Blot*, na qual foram utilizadas sondas específicas para cada um dos genes acima citados.

Para o preparo das sondas, foram realizadas PCRs para *selB*, *selD* e PSTK, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 0,8% e submetidas a 80V por 1 hora. As bandas com o tamanho correspondente foram recortadas do gel e purificadas com o kit Qiaquick Gel Extraction[®] (*Qiagen*[®]). Após a purificação as amostras foram quantificadas utilizando-se espectrofotômetro e aproximadamente 300 ng de cada gene foi marcado com digoxina utilizando-se o kit DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I[®] (*Roche Applied Science*[®]), por um período de 20 horas. Para a comprovação da eficiência de marcação das sondas, diluições sucessivas da sonda de cada gene e de DNA controle do kit variando de 0,01 pg/μl a 1ng/μl foram aplicadas na membrana de nylon positivamente carregada Amershan Hybond N+[®] (*GE Healthcare*[®]), o DNA foi fixado a 80°C por 2 horas e seguiu-se o bloqueio, lavagem com anticorpo anti-digoxigenina-fosfatase alcalina e revelação com NBT/BCIP, todos fornecidos pelo kit. Conforme a intensidade comparada dos spots do DNA controle e das sondas determinou-se a concentração de 90 ng/μl para cada uma. Para as hibridizações subsequentes foram utilizados 25 ng/μl de cada sonda.

Após a obtenção das sequências das ORFs dos genes *selB*, *selD* e PSTK, as mesmas foram analisadas quanto aos sítios internos para enzimas de restrição utilizando-se o programa

NEB Cutter[®] (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>). Em seguida, 3 µg de gDNA de *T. evansi* foram digeridos durante 12 horas a 37°C com enzimas específicas para cada gene (Tabela 3), sendo que para cada um deles foi utilizada pelo menos uma enzima que clivou e outra que não clivou sua sequência.

Tabela 3 - Enzimas de restrição utilizadas na técnica de Southern Blot para a clivagem de gDNA de *Trypanosoma evansi*. Para cada gene foi utilizada pelo menos uma enzima que clivou e uma que não clivou sua sequência.

Gene	Enzimas que clivam sua sequência	Enzimas que não clivam sua sequência
<i>selB</i>	<i>Sall, EcoRI</i>	<i>BamHI, NdeI, NcoI, HindIII</i>
<i>selD</i>	<i>HindIII, NcoI</i>	<i>EcoRI, BamHI, NdeI, Sall</i>
PSTK	<i>BamHI, Sall</i>	<i>EcoRI, NdeI, NcoI, HindIII</i>

O gDNA digerido foi separado através de eletroforese em gel de agarose 1% em tampão tris-borato-EDTA (TBE) por 2 horas a 60V. Em seguida, o gel foi corado em brometo de etídeo e fotografado sob luz UV ao lado de uma régua, para posterior determinação do tamanho dos fragmentos hibridizados. Posteriormente, realizou-se a depuração do gel, mantendo-o em solução de HCl 250 mM por 12 minutos. Após, o gel foi lavado em água ultrapura e foi realizada a desnaturação, mantendo-o em solução NaCl 1,5 M com NaOH 0,5 M por 25 minutos. Seguiu-se nova lavagem com água e posterior neutralização em solução de NaCl 1,5 M com Tris-HCl 0,5 M pH 7,5 por 30 minutos.

O DNA do gel foi transferido para a membrana de nylon carregada positivamente Amershan Hybond N+[®] (*GE Healthcare*[®]) através de capilaridade, utilizando-se tampão SSC em concentrações de 20 e 10X por 12 horas.

Após a transferência, a membrana foi lavada com SSC 6X por 5 minutos e o DNA foi fixado incubando-a a 80°C por 2 horas. Posteriormente, a membrana foi incubada por 30 minutos em solução de pré-hibridização (fornecida pelo kit DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I[®]). Para a realização da hibridização, a sonda foi desnaturada (aquecida a 100°C por 5 minutos e imediatamente resfriada), diluída em solução de hibridização para a concentração de 25 ng/µl e incubada com a membrana por 12 horas a 42°C. As lavagens de estringência foram realizadas em SSC 2X com 0,1% de SDS duas vezes por 5 minutos a temperatura ambiente e posteriormente em SSC 0,5X com 0,1% de SDS por duas vezes a 65°C. As demais etapas foram processadas utilizando-se os reagentes do kit DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I[®] (*Roche Applied Science*[®]).

Primeiramente, procedeu-se o bloqueio por 30 minutos, seguido de incubação com anticorpo anti-digoxigenina-fosfatase alcalina por 20 minutos e a revelação com solução de NBT/BCIP por 4 horas ao abrigo da luz. A reação foi parada adicionando-se tampão Tris-EDTA (0,01 M de Tris-HCl e 0,001M de EDTA). A membrana foi documentada utilizando-se o scanner ImageScanner III[®] (GE[®]). As hibridizações com as sondas para *selB*, *selD* e PSTK foram realizadas utilizando-se a mesma membrana, sendo que após a documentação era realizado o stripping através de incubação em dimetilformamida a 55°C até a remoção da coloração, seguida de lavagem em água ultrapura e 2 lavagens de 15 minutos em NaOH 0,2M com 0,1% de SDS. Por fim, a membrana era mantida em SSC 2X até a realização da próxima hibridização.

4.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA SELENOFOSFATO SINTETASE

A proteína selenofosfato sintetase, sintetizada a partir do gene *selD*, foi imunolocalizada utilizando a técnica de imunofluorescência indireta, que permite visualizar a localização da proteína na célula do protozoário.

4.4.1 Preparo das lâminas

Parasitas purificados por Percoll[®] e cromatografia em DEAE-Celulose foram quantificados por contagem em câmara de Neubauer e ajustados para 1×10^6 parasitos/ml. Foram realizadas duas lavagens com tampão PBS centrifugando as células duas vezes por 8 minutos a 1500 x g. Em seguida, os parasitos foram ressuspensos em paraformaldeído 4% em PBS por 40 minutos a temperatura ambiente, lavados duas vezes em PBS e eluídos novamente em PBS. Os protozoários foram distribuídos em lâminas para imunofluorescência com 10 poços e mantidos por 12 horas em temperatura ambiente. As lâminas foram estocadas a -20°C até sua utilização.

4.4.2 Imunolocalização

Inicialmente, os parasitos foram permeabilizados realizando-se uma lavagem com

Triton X-100 0,5% por 5 minutos. Após a lâmina foi lavada 3 vezes com PBS-Tween 0,1% por 5 minutos. O bloqueio foi realizado em solução PBS-Tween 0,1% com leite em pó 5% por 1 hora, após foram realizadas 3 lavagens com PBS-Tween 0,1% por 5 minutos. A lâmina foi seca e em seguida foi aplicado o anticorpo policlonal anti-selenofosfato sintetase (gentilmente cedido pelo Dr. Otavio Henrique Thiemann) diluído 1:100 em PBS-Tween 0,1% com leite em pó 0,5% e mantido por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente foram realizadas 3 lavagens com PBS-Tween 0,1% por 5 minutos, a lâmina foi seca com papel absorvente e realizou-se a incubação com o anticorpo secundário anti- IgG de camundongos Alexa Fluor[®] (*Invitrogen*[®]) na diluição de 1:1000 por 15 minutos ao abrigo da luz. Foram realizadas 3 lavagens com PBS-Tween 0,1% e em seguida a lâmina foi corada com DAPI para a visualização do material genético na concentração de 1 µg/ml por 5 minutos. A visualização foi realizada em microscópio de imunofluorescência.

4.5 WESTERN BLOT PARA SELENOFOSFATO SINTETASE

4.5.1 Extração de proteínas de *Trypanosoma evansi*

Parasitas foram purificados conforme descrito anteriormente e quantificados em câmara de Neubauer. Aproximadamente 2×10^7 células foram ressuscitadas em solução 7,7 M de uréia, 2,2M de tiouréia e 4,4% de CHAPS. Foi adicionado coquetel de inibidores de proteases (*Invitrogen*[®]) conforme instruções do fabricante. Posteriormente, foram realizados 3 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C e centrifugação a 17000 x g por 50 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, quantificado em espectrofotômetro (Bradford, 1976) e estocado a -20°C até o momento do uso.

4.5.2 SDS-PAGE e transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose

O extrato protéico total de *Trypanosoma evansi* foi separado através de SDS-PAGE (Laemmli, 1970) com gel na concentração de 12%. A corrida foi realizada por 6 horas com a corrente constante de 10 mA. Posteriormente o gel, uma membrana de nitrocelulose (*Biorad*[®]) e 2 folhas de papel filtro (Paper Bridge, *Biorad*[®]) foram mergulhados em tampão de

transferência (5,82 g/L tris, 2,93 g/L glicina, 20% de metanol, 10% SDS, pH 9,2) por 15 minutos. Para a transferência, foi utilizado o equipamento Trans-Blot SD[®] (Biorad[®]), colocando-se primeiramente uma folha de papel filtro, sobre esta o gel SDS-PAGE, sobre o gel a membrana de nitrocelulose e por fim outra folha de papel filtro. O aparato foi mantido por 1 hora a uma corrente constante de 40 mA. Após a transferência a membrana foi corada com Ponceau S por 5 minutos para verificar a qualidade da transferência e descorada com água ultrapura.

4.5.3 Procedimento do Blot

A membrana foi incubada por 1 hora sob agitação em solução 5 % de leite em pó desnatado em TBS (8,76 g/L de NaCl, 6,05 g/L de tris, 0,05% de Tween 20). Posteriormente realizaram-se 3 lavagens de 5 minutos com TBS e incubação com o anticorpo anti-selenofosfato sintetase (gentilmente cedido pelo Dr. Otavio H. Thiemann) diluído 1:500 em TBS por 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida foram realizadas 3 lavagens de 5 minutos com TBS e incubação com anti- IgG de camundongo marcado com fosfatase alcalina (Sigma Aldrich[®]) na diluição de 1:30000 por duas horas em temperatura ambiente. Foram realizadas mais 3 lavagens com TBS e em seguida a membrana foi coberta com a solução reveladora contendo NBT/BCIP (NBT/BCIP Solution, Sigma Aldrich[®]) até o aparecimento das bandas.

5 RESULTADOS

5.1 AMPLIFICAÇÃO E OBTENÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DOS GENES *selB*, *selC*, *selD*, *PSTK* E *selTRYP* DE *Trypanosoma evansi*

5.1.1 gDNA e RNA

Após a purificação dos protozoários por cromatografia em DEAE-Celulose, procedeu-se às extrações de DNA genômico e RNA total, quantificação e eletroforese para verificar a qualidade dos mesmos (Figura 14). A partir do RNA total foi realizada a RT-PCR para a obtenção do cDNA utilizado juntamente com o gDNA na amplificação dos genes.

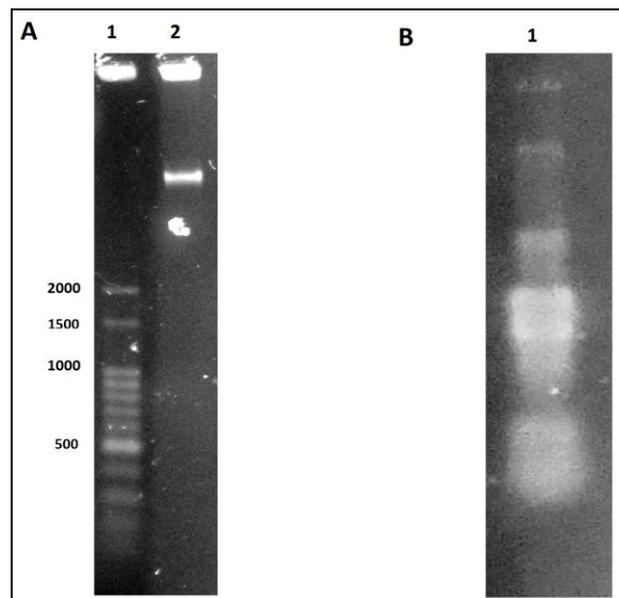


Figura 14 - (A) Eletroforese em gel de agarose 1 % de gDNA de *T. evansi*. 1- Marcador de massa molecular; 2- gDNA. (B) Eletroforese em gel de agarose 1% de RNA total de *T. evansi*. 1- RNA total de *T. evansi*

5.1.2 *selB*

A ORF do gene *selB*, que corresponde ao fator de alongação EF-Sec em eucariotos foi amplificada tanto do gDNA quanto do cDNA de *T. evansi* utilizando a técnica de PCR. O produto de PCR apresentou um tamanho de 1968 pb quando resolvido por eletroforese em gel de agarose a 1% (Figura 15).

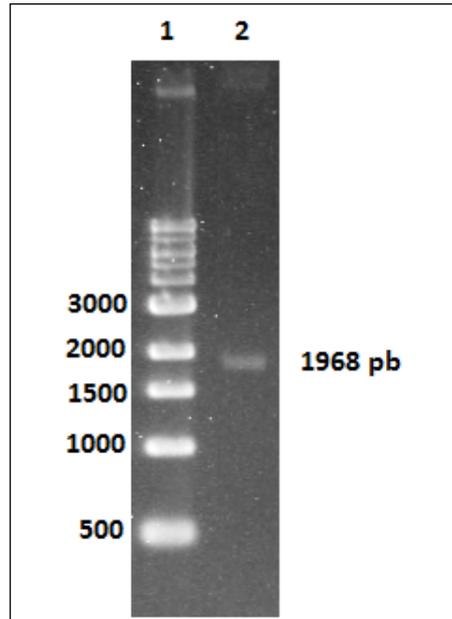


Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose 1% da ORF de *selB*. 1- Marcador de massa molecular; 2- Produto de PCR de *selB*, apresentando um tamanho de 1968 pb.

A identidade da sequência protéica obtida, gerada a partir da sequência nucleotídica, foi confirmada utilizando a ferramenta BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”, disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A sequência foi confirmada como sendo o fator de alongação específico do tRNA de selenocisteína (EF-Sec), com uma identidade de 99% para *T. brucei brucei* e *T. gambiense*, 68% para *T. cruzi*, 50% para *Leishmania infantum*, 40 % para camundongos e 36% para humanos.

Utilizando-se a sequência protéica predita para *selB* (EF-Sec), foram determinados o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (em kDa) estimados para a proteína EF-Sec, utilizando a ferramenta “ProtParam” do Instituto Suíço de Bioinformática (disponível em <http://expasy.org/tools/protparam.html>). A proteína possui um pI de 7,19 e uma massa molecular de 71,7 kDa.

A sequência protéica de EF-Sec foi alinhada com a de humanos, camundongos, *T. brucei brucei*, *T. gambiense* e *T. cruzi* (disponíveis no “National Center for Biotechnology Information”- NCBI- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>) utilizando o programa ClustalX (Thompson et al., 1997) (Figura 16). É possível notar várias regiões conservadas com eucariotos superiores (camundongos e humanos), sinalizadas com um (*) no alinhamento.

A sequência de aminoácidos da proteína EF-Sec de *T. evansi* foi analisada quanto aos domínios presentes pelos programas “InterProScan” (“European Bioinformatics Institute” disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>) e “Conserved Domain Search” (NCBI- disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?>). As regiões

de ligação ao GTP (aminoácidos 11-169); o domínio 2, envolvido na ligação ao tRNA (aminoácidos 247-299); e da barreira β -ribossomal, envolvida no transporte do tRNA ao sítio A do ribossomo (aminoácidos 227-321) caracterizam o fator de alongação e encontram-se bastante conservados entre diversas espécies (Figura 16).

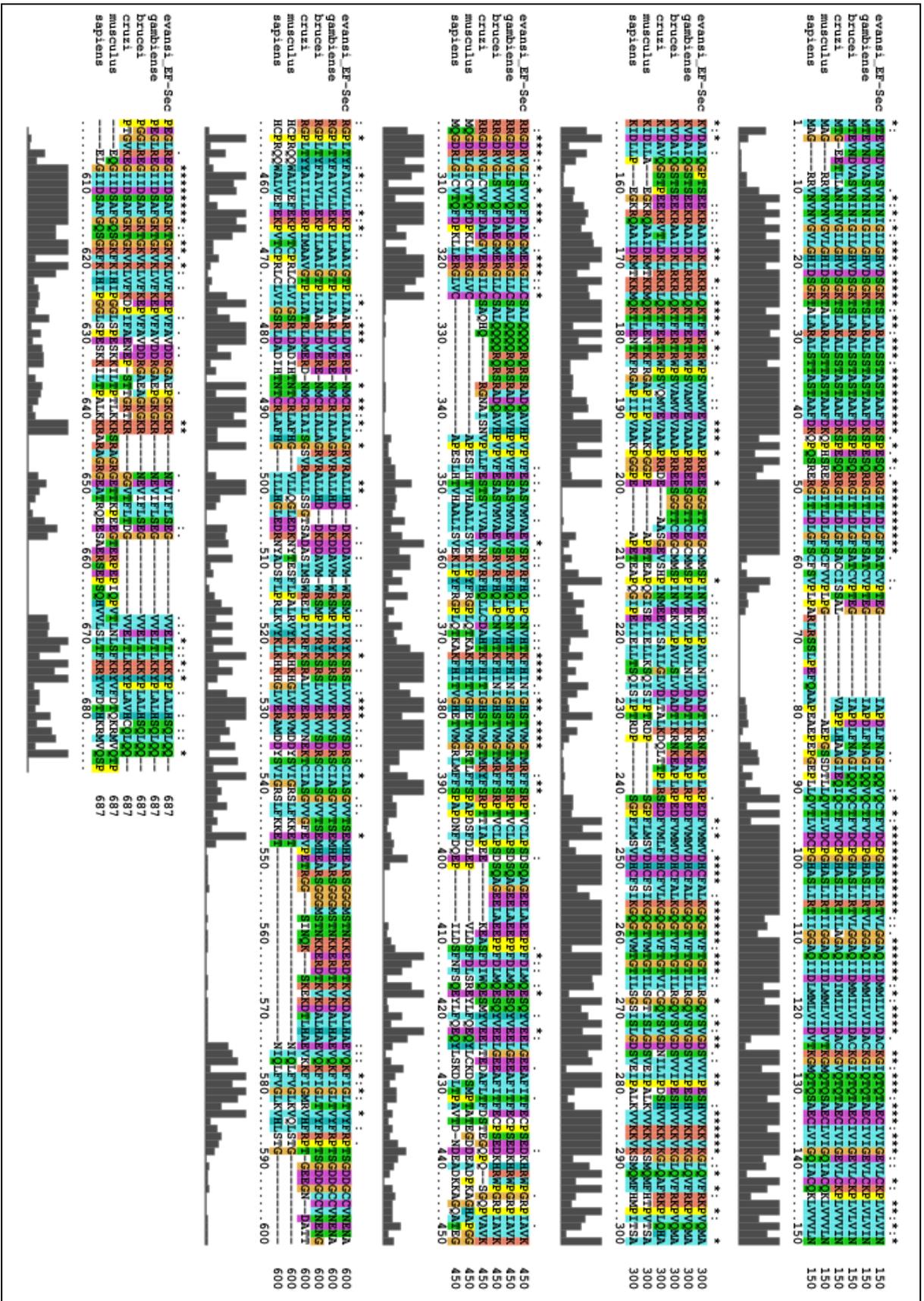


Figura 16 - Alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína EF-Sec de *T. evansi*, *T. gambiense*, *T. brucei*, *T. cruzi*, *Mus musculus* e *Homo sapiens* utilizando o programa ClustalX. As regiões sobrepostas por (*) são totalmente conservadas, as sobrepostas por (:) são parcialmente conservadas.

5.1.3 *selC*

A ORF do gene *selC*, foi amplificada por PCR e resolvida por eletroforese em gel de agarose 2%, formando um amplicom de 88 pb (Figura 17).

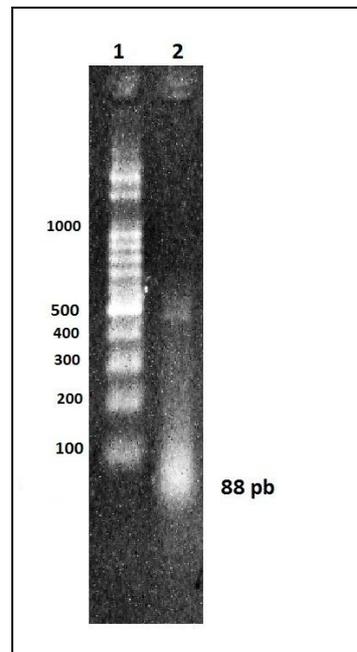


Figura 17 - Eletroforese em gel de agarose 2% da ORF de *selC*. 1- Marcador de massa molecular; 2- produto de PCR de *selC*, apresentando um tamanho de 88 pb.

A identidade da sequência foi confirmada com o BLAST como sendo o tRNA^{Sec}, com uma identidade de 97% com *T. brucei brucei*, *T. brucei gambiense* e *T. cruzi* e 90 % com *Leishmania infantum* e *L. major*.

As sequências disponíveis no NCBI do tRNA^{Sec} para *T. brucei*, *T. cruzi*, *Leishmania major* e camundongos foram alinhadas com a sequência obtida para *T. evansi* (Figura 18), demonstrando regiões conservadas que são essenciais para a formação da estrutura secundária do tRNA^{Sec}, que foi elaborada utilizando-se o programa ARAGORN (disponível em <http://130.235.46.10/ARAGORN/>) (Figura 19).

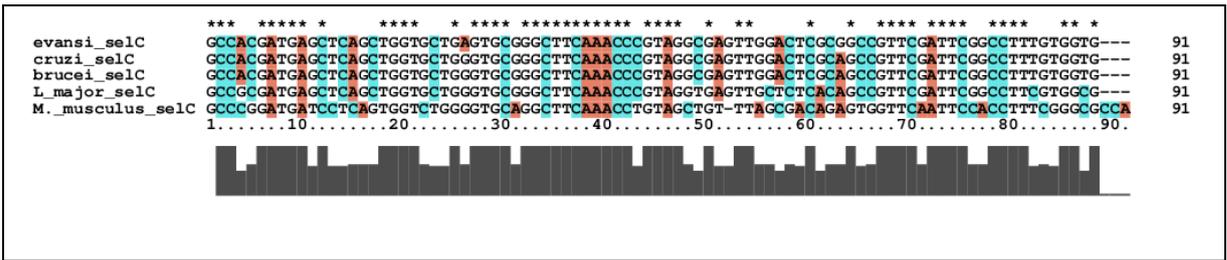


Figura 18 - Alinhamento das seqüências nucleotídicas de tRNA^{Sec} de *T. evansi*, *T. brucei*, *T. cruzi*, *Leishmania major* e camundongos utilizando-se o programa ClustalX. As regiões sobrepostas por (*) são totalmente conservadas, as sobrepostas por (:) são parcialmente conservadas.

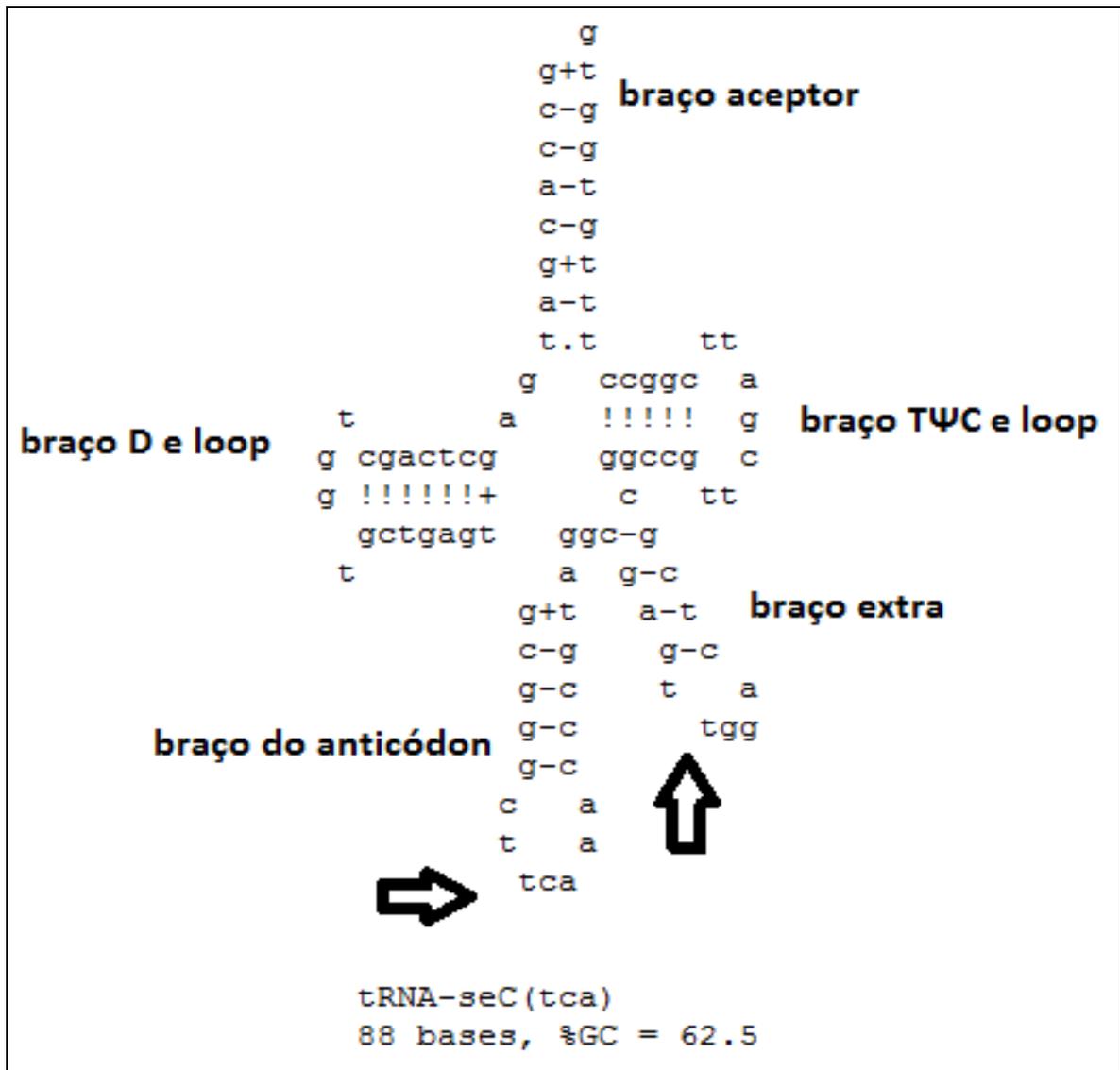


Figura 19 - Estrutura secundária do tRNA^{Sec} de *T. evansi* elaborada com o programa ARAGORN. As flechas destacam o anticódon TCA e o braço extra alongado característicos do tRNA específico de selenocisteína.

5.1.4 *selD*

A ORF do gene *selD* de *T. evansi* formou um amplicom de 1182 pb (Figura 20).

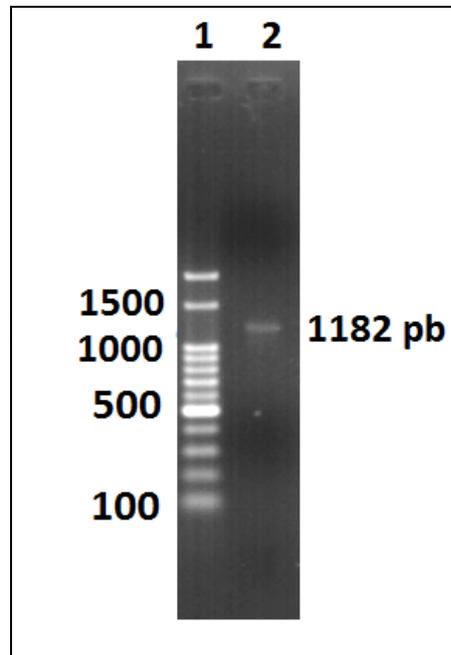


Figura 20 - Eletroforese em gel de agarose 1% da ORF de *selD*. 1- Marcador de massa molecular; 2- produto de PCR de *selD*, apresentando um tamanho de 1182 pb.

A identidade da sequência protéica (traduzida a partir da sequência de nucleotídeos) foi confirmada através de BLAST, que demonstrou uma similaridade de 99% com *T. brucei brucei*, 100% *T. gambiense*, 75% com *T. cruzi* e 67% com *Leishmania major*, 43% com a SPS2 de camundongos e 42% com a de humanos.

Utilizando-se a sequência proteica predita para *selD* (selenofosfato sintetase- SPS), foram determinados o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (em kDa). A proteína possui um pI teórico de 5,46 e uma massa molecular de 43 kDa.

As sequências de SPS de *T. evansi*, *T. brucei*, *T. cruzi*, *L. major*, camundongos e humanos (SPS2 para os dois últimos) foram alinhadas utilizando-se o programa ClutalX (Figura 21). Os protozoários apresentam várias regiões conservadas (indicadas pela mesma cor), e compartilham algumas com os eucariotos superiores (marcadas com *). Na posição 42, todos os parasitos da ordem Kinetoplastida apresentam um resíduo de cisteína, ao contrário dos mamíferos que apresentam uma selenocisteína.

A análise da proteína SPS de *T. evansi* foi pelo programa “InterProScan” revelou a presença de domínios característicos para selenofosfato sintetase. Existem 5 regiões com

função de ligação de ATP (aminoácidos 87-140), e 15 regiões relatados à dimerização da proteína (aminoácidos 87-181 e 285). Também foram encontrados domínios não-específicos AIRS, um N-terminal (aminoácidos 69-170) e outro C-terminal (aminoácidos 198-368); e um domínio Pur-M, que estão associados à ligação de ATP.

5.1.5 PSTK

A ORF do gene PSTK de *T. evansi* foi amplificada por PCR, formando um produto de 1083 pb na eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 22).

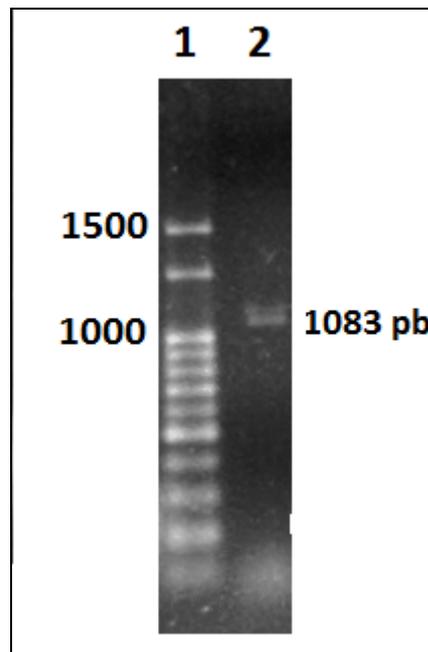


Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose 1% da ORF de PSTK. 1- Marcador de massa molecular; 2- produto de PCR de PSTK, apresentando um tamanho de 1083 pb.

A sequência de aminoácidos predita a partir da sequência nucleotídica da PSTK de *T. evansi* foi submetida ao programa BLAST, e apresentou uma identidade de 99% com uma proteína hipotética de *T. brucei brucei* e *T. brucei gambiense*, 40% com uma proteína hipotética de *T. cruzi*, 28% com a PSTK de *Methanocaldococcus infernus*, 28% com a PSTK de *Callithrix jacchus* e aproximadamente 25% com a PSTK de humanos.

A sequência de *T. evansi* foi considerada hipoteticamente uma PSTK por apresentar uma grande similaridade, principalmente na porção N-terminal, com sequências descritas por Carlson e colaboradores (2004), como demonstra o alinhamento da Figura 23. Também a mesma sequência foi utilizada por Evangelista (2009) em um estudo sobre a enzima em *T. brucei* e *L. major*.

A PSTK de *T. evansi* apresenta um peso molecular de 40 kDa e um PI teórico de 6,42. A análise de domínios revelou que a sequência pertence à superfamília P-loop NTPase, que é caracterizada por possuir um motivo de ligação de ATP ou GTP. Também há regiões características de proteínas quinase, o que condiz com a função executada pela PSTK na

fosforilação do tRNA^{Ser [Sec]}. Todos os domínios característicos da proteína encontram-se na porção N-terminal, entre os aminoácidos 1-164.

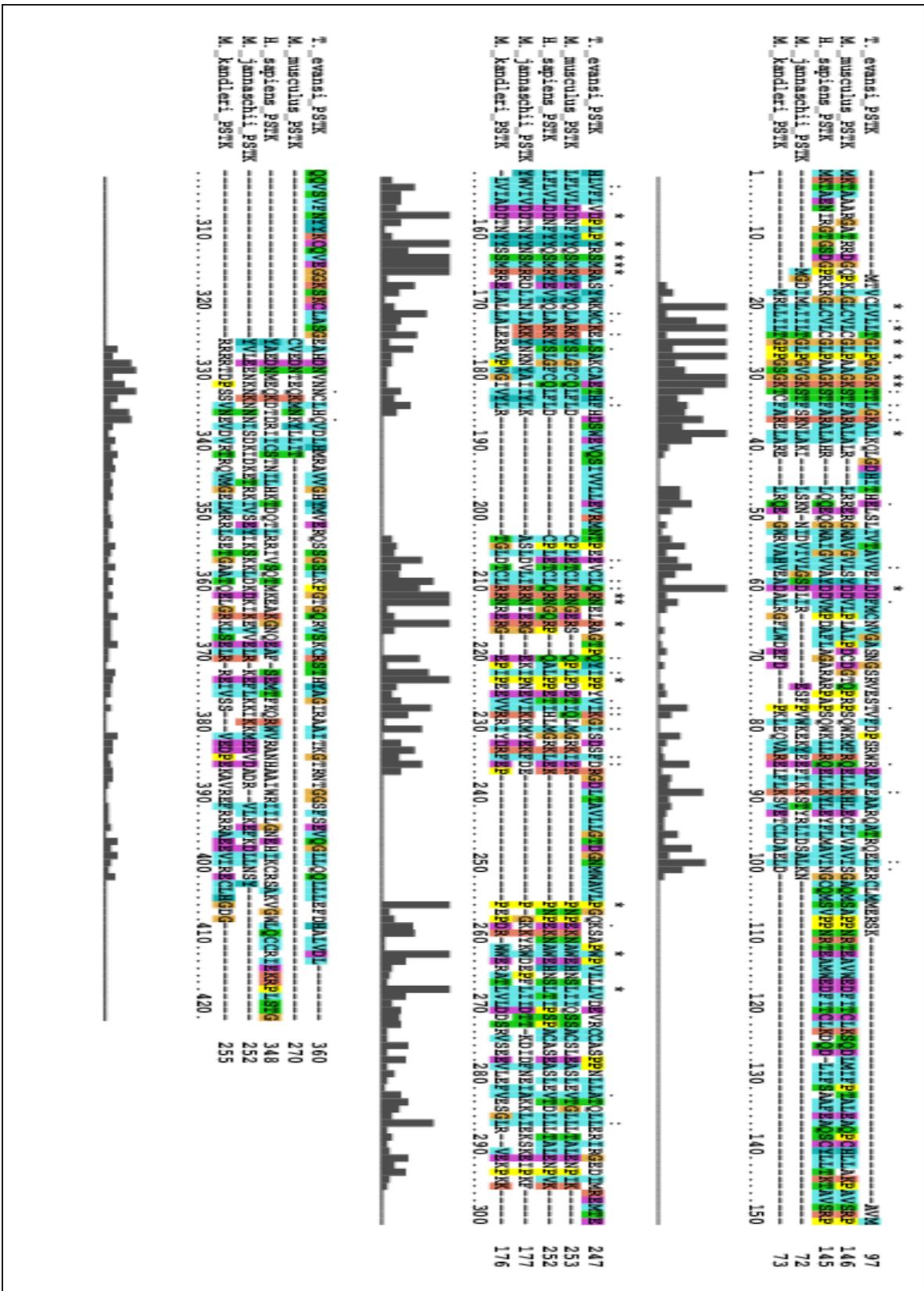


Figura 23 – Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína PSTK de *T. evansi*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Methanococcus jannaschii* e *Methanopyrus kandleri* utilizando o programa ClustalX. As

regiões sobrepostas por (*) são totalmente conservadas, as sobrepostas por (:) são parcialmente conservadas.

5.1.6 *selTRYP*

A ORF do gene *selTRYP* de *T. evansi* foi amplificada por PCR, formando um produto de 2340 pb na eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 24).

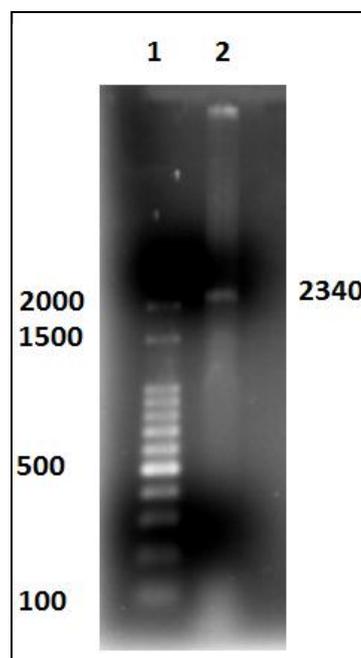


Figura 24 - Eletroforese em gel de agarose 1% da ORF de *selTRYP*. 1- Marcador de massa molecular; 2- produto de PCR de *selTRYP*, apresentando um tamanho de 2340 pb.

A banda foi recortada e purificada do gel de agarose e clonada em pGEM-T-Easy, formando a construção *selTRYP*pGEM, que foi posteriormente sequenciada. Devido à problemas no sequenciamento, não foi possível obter a sequência completa do gene, apenas a região final que contém 772 pb.

A sequência parcial de aminoácidos foi gerada e após uma análise no BLAST obteve 99% de similaridade com a proteína hipotética Tb927.4.3410. Essa proteína foi considerada por Lobanov e colaboradores (2006) como sendo a *selTRYP* de *T. brucei*. A análise da sequência de aminoácidos demonstrou a presença de um domínio Rhodanese (encontrado em algumas desidrogenases e proteínas relacionadas ao estresse) e também está presente o motivo CXXU (em destaque na Figura 25), que é característico de selenoproteínas, e está relacionado a atividade antioxidante.

5.2 SOUTHERN BLOT DOS GENES *selB*, *selD* E PSTK DE *Trypanosoma evansi*

A técnica de southern blot, que consiste na hibridização de sequências específicas no genoma de um determinado organismo, foi utilizada para a confirmação da presença e do número de cópias dos genes *selB*, *selD* e PSTK do genoma do *T. evansi*. O gDNA foi digerido com 6 enzimas de restrição e cada digestão foi resolvida separadamente em eletroforese em gel de agarose 1 %, assim como produtos de PCR de cada um dos genes (Figura 26).

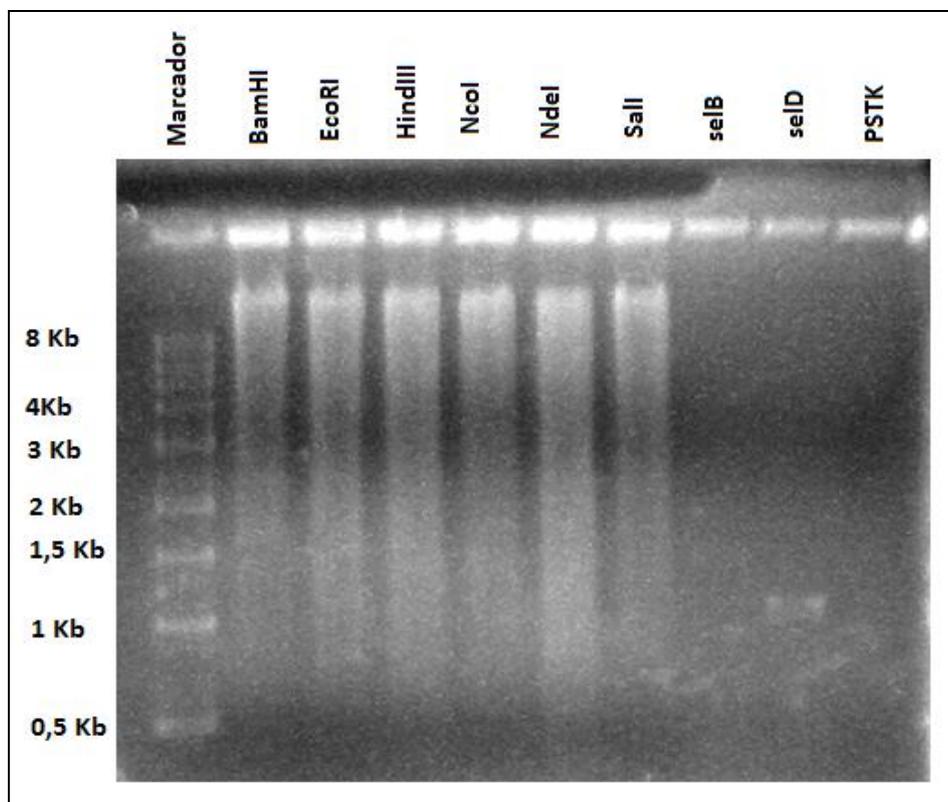


Figura 26 - Gel de agarose 1 % utilizado para transferência para membrana de nylon na técnica de Southern Blot. O marcador de peso molecular, as enzimas utilizadas para a digestão do gDNA de *T. evansi* bem como os produtos de PCR de cada um dos genes estão identificados.

Os DNAs foram então transferidos por capilaridade para uma membrana de nylon, onde ocorreram separadamente as hibridizações com sondas específicas para a ORF de cada um dos três genes. Após cada hibridização, era realizado o “strip” da membrana para remover as marcações do gene anterior. Para cada gene, havia pelo menos uma enzima que não cortava sua sequência e outra que cortava, servindo assim como um controle da reação. Os mapas de restrição para cada um dos genes estão sumarizados na Tabela 3 e na Figura 27

Figura 28, na qual é possível observar 2 bandas no DNA digerido com as enzimas *EcoRI* e *Sall*, que clivam o gene, e 1 banda nas demais enzimas.

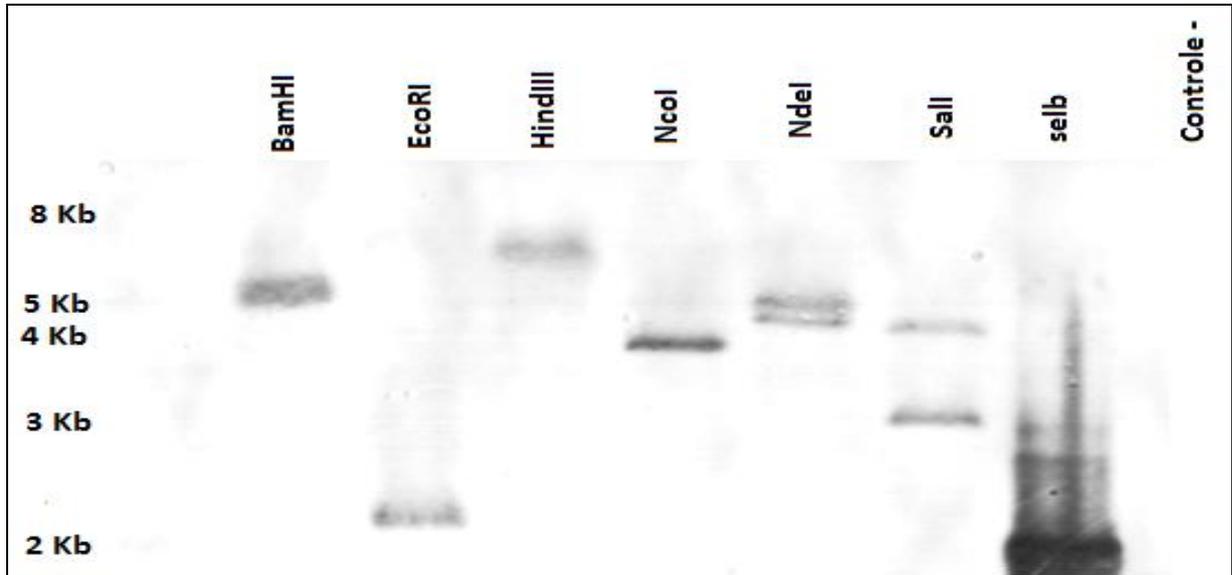


Figura 28 - Southern Blot do gene *selB* de *T. evansi*. O marcador de peso molecular, as enzimas de restrição utilizadas e o controle negativo estão indicados.

O gene *selD*, conforme indica a Figura 29, possui uma cópia única do genoma de *T. evansi*, pois é possível observar 2 bandas no DNA digerido com as enzimas *HindIII* e *NcoI* e 1 banda na digestão com as demais enzimas, com exceção da enzima *NdeI*, onde possivelmente ocorreu uma clivagem inespecífica.

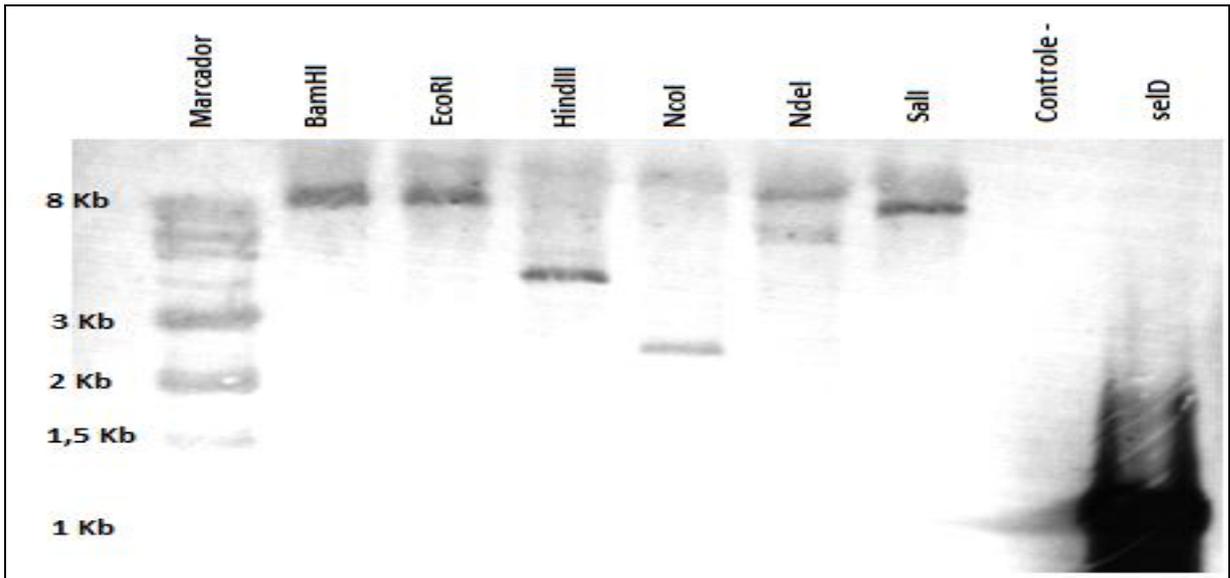


Figura 29 - Southern Blot do gene *selD* de *T. evansi*. O marcador de peso molecular, as enzimas de restrição utilizadas e o controle negativo estão indicados.

O gene PSTK de *T. evansi* também apresenta uma cópia única do genoma deste protozoário, conforme indica a Figura 30. É possível verificar a presença de uma banda única para as enzimas que não clivam o gene (*EcoRI*, *HindIII*, *NcoI* e *NdeI*) e 2 bandas para a enzima *BamHI*, que cliva-o. A enzima *Sall* apresenta um sítio de restrição na sequência, mas o mesmo provavelmente não induziu o corte da sequência pela presença de uma ilha de metilação (dados não apresentados).

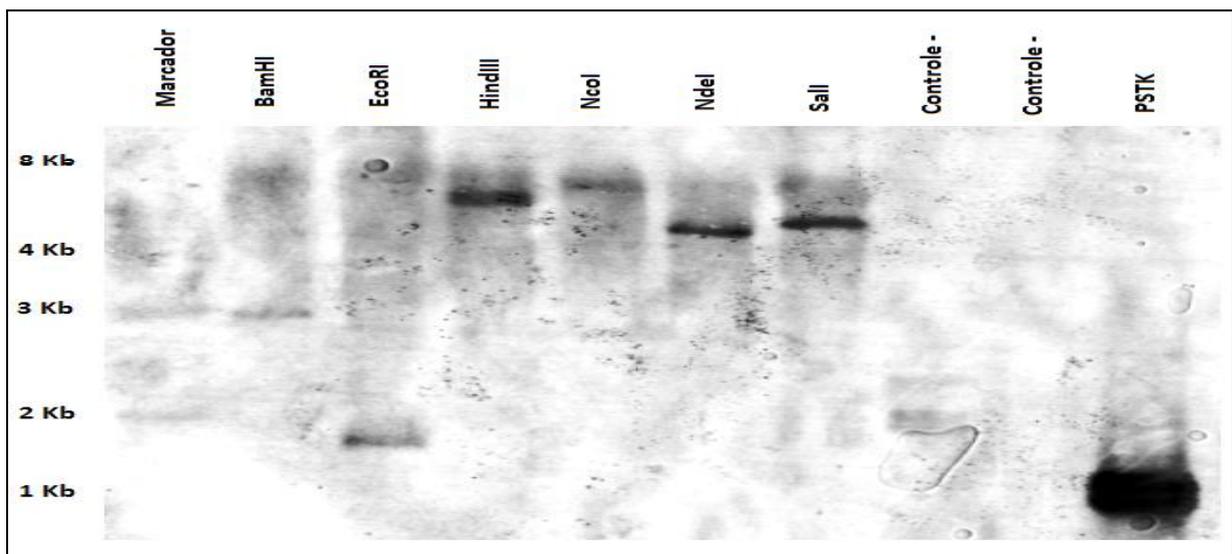


Figura 30 - Southern Blot do gene PSTK de *T. evansi*. O marcador de peso molecular, as enzimas de restrição utilizadas e os controles negativos estão indicados.

5.3 IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA DA PROTEÍNA SELENOFOSFATO SINTETASE DE *Trypanosoma evansi*

A proteína originária da expressão do gene *selD*, selenofosfato sintetase, foi imunolocalizada em células de *T. evansi*. Visto que a sequência de aminoácidos da SPS de *T. brucei brucei* e *T. evansi* apresentou uma similaridade de 99%, foi utilizado um anticorpo anti-SPS de *T. brucei brucei* gentilmente cedido pelo Dr. Otávio H. Thiemann.

Os parasitos foram fixados em paraformaldeído 4% e incubados com o anticorpo anti-SPS e o corante de ácidos nucleicos DAPI. A proteína se apresentou como grânulos localizados no citoplasma do protozoário. Também é possível notar a ausência de cinetoplasto no isolado de *T. evansi* utilizado (Figura 31).

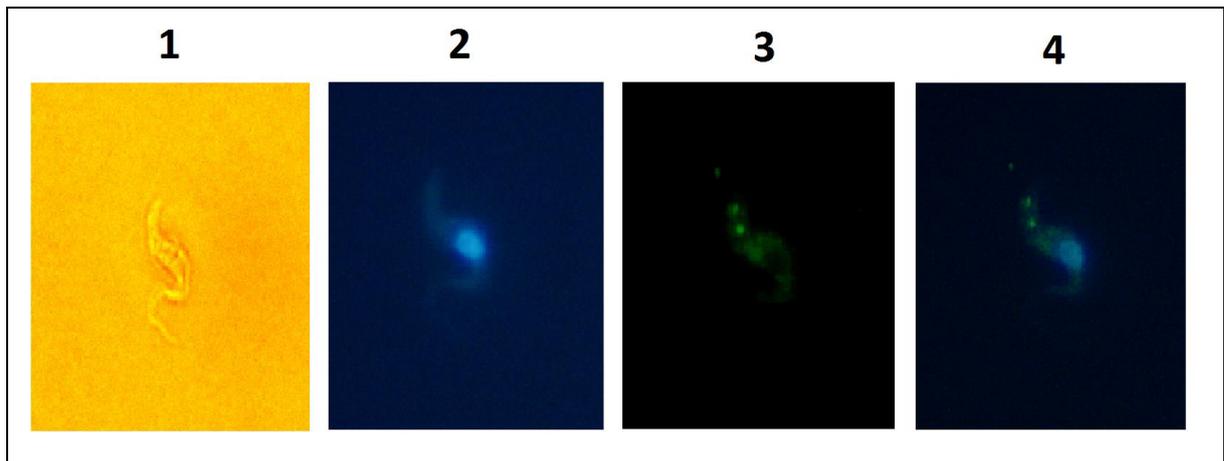


Figura 31 - Imunofluorescência indireta da proteína SPS de *T. evansi*. (1) Luz branca; (2) colocação com DAPI; (3) grânulos citoplasmáticos indicando a localização da SPS; (4) Sobreposição das imagens 2 e 3.

5.4 WESTERN BLOT PARA A ENZIMA SELENOFOSFATO SINTETASE DE *Trypanosoma evansi*

A técnica de Western Blot foi utilizada para a detecção da proteína SPS no extrato protéico total de *T. evansi*, utilizando um anticorpo anti-SPS de *T. brucei brucei* gentilmente cedido pelo Dr. Otávio H. Thiemann.

Células de *T. evansi* foram lisadas e o extrato protéico bruto foi aplicado em um gel SDS-PAGE desnaturante 12 % para a separação das proteínas por peso molecular. As proteínas foram então transferidas para uma membrana de nitrocelulose e incubadas com o anticorpo anti-SPS. A reação demonstrou a formação de uma banda intensa no tamanho

aproximado de 43 kDa (Figura 32).

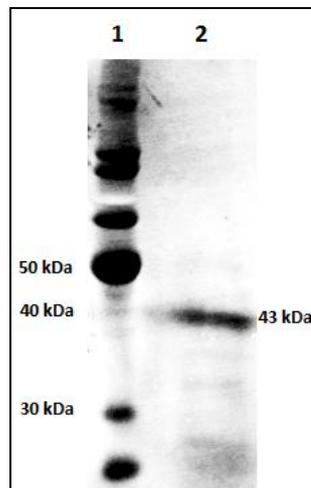


Figura 32 - Western Blot da proteína SPS de *T. evansi*. 1- BenchMark Protein Ladder (*Invitrogen*[®]); 2- Extrato protéico de *T. evansi*.

6 DISCUSSÃO

A via de inserção de selenocisteína é uma rota metabólica que está presente em todos os domínios da vida, com componentes demonstrados nos proteomas de eucariotos, arqueobactérias e procariotos (Lobanov et al., 2009). Uma de suas principais funções é a proteção contra espécies reativas de oxigênio (EROs), os radicais livres, através da promoção de reações de oxirredução com o motivo CXXU (C= cisteína, U= selenocisteína, X= qualquer aminoácido) que caracteriza uma função antioxidante (Papp et al., 2007).

Em eucariotos, para que ocorra a inserção de uma selenocisteína em uma proteína, uma complexa rota envolvendo vários elementos é necessária. Resumidamente, um tRNA específico, o tRNA^{Sec} (codificado pelo gene *selC*) é primeiramente aminoacilado com uma serina que é fosforilada pela enzima PSTK. A enzima SepSecS converte a serina fosforilada em selenocisteína, utilizando monoselenofosfato, que é formado pela reação entre selenito e ATP catalisada pela enzima SPS2, produto do gene *selD*. No momento da tradução, no ribossomo, a estrutura SECIS liga-se à proteína SBP2, que liga-se ao fator EF-Sec (produto do gene *selB*) que direciona o tRNA^{Sec} ao sítio A ribossomal, acoplando-se ao códon UGA e inserindo a selenocisteína no polipeptídeo nascente (Donovan e Copeland, 2010).

Como descrito na revisão bibliográfica, poucos trabalhos buscam elucidar a importância das selenoproteínas em Kinetoplastida, e, no caso do *T. evansi*, não há nenhuma publicação relatada a esta via metabólica. Por este motivo, os resultados obtidos neste trabalho tiveram por objetivo tentar identificar alguns dos componentes desta via metabólica em *T. evansi*.

As ORFs dos genes *selB*, *selC*, *selD*, *selTRYP* e PSTK foram amplificadas com sucesso a partir do DNA genômico e do cDNA, indicando que todos são transcritos em *T. evansi*, apesar de a regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos ocorrer principalmente em nível pós-transcricional (Haile e Papadopoulou, 2007). As sequências de nucleotídeos dos 5 genes apresentaram um alto grau de similaridade com as de *T. brucei*, geralmente acima de 99%, reforçando a hipótese da origem do *T. evansi* ter ocorrido a partir de uma gradual perda do cinetoplasto do *T. brucei* (Jensen et al., 2010; Lun et al., 2010).

A sequência de aminoácidos deduzida de *selB*, que forma o fator de alongação EF-Sec de *T. evansi*, possui uma massa de 71,7 kDa e um ponto isoelétrico de 7,19. A análise de domínios demonstrou que a proteína apresenta requisitos de um fator de alongação, como capacidade de ligação ao GTP, ao tRNA^{Sec} e regiões envolvidas no transporte do tRNA^{Sec} ao

sítio A ribossomal. Essas características são compartilhadas pelos domínios I, II e III do fator de alongação EF-Tu, que reconhece todos os tRNAs com exceção do tRNA^{Sec} (Leibundgut et al., 2005). A região da porção C-terminal compreendida entre os aminoácidos 370-540 apresenta vários resíduos conservados entre tripanossomatídeos e eucariotos superiores, sugerindo que pode corresponder ao domínio IV, que se liga à proteína SBP2, formando um complexo quaternário SECIS-SBP2-EF-Sec-tRNA^{Sec} no momento da tradução (Donovan e Copeland, 2010).

A ORF dogene *selC* de *T. evansi* foi amplificada a partir do cDNA, clonado e sequenciado, originando uma sequência de 88 pb. A sequência apresentou 97% de identidade com os tRNA^{Sec} de *T. brucei* e *T. cruzi*, e um alto grau de conservação também com *Mus musculus*. A análise da estrutura secundária, gerada pelo software ARAGORN, revela que o tRNA^{Sec} de *T. evansi* compartilha a maioria das características dos tRNA^{Sec} de eucariotos, como o braço acceptor com 9 pb, um braço extra de 6 pb, um braço D com 6 pb e um loop de 4 nucleotídeos e o braço do anticódon com 6 pb de comprimento e um loop de 7 nucleotídeos (Itoh et al., 2009). Contrariamente aos eucariotos, que possuem o braço TΨC do tRNA^{Sec} com 4 pb, e semelhantemente aos procariotos, o braço TΨC de *T. evansi* apresentou um comprimento de 5 pb (Itoh et al., 2009). Por ser esta a única divergência com os demais eucariotos, sugere-se que o motivo desta diferença possa ser o erro no sequenciamento de alguma das bases que tenha levado a uma predição errônea do tamanho do braço TΨC do tRNA^{Sec} de *T. evansi*. Porém, por esta estrutura secundária ser apenas uma dedução *in silico* realizada a partir da sequência do gene *selC*, mais estudos são necessários para a confirmação da real estrutura secundária do tRNA^{Sec} de *T. evansi*.

O gene *selD* de *T. evansi* codifica uma proteína com massa molecular de 43 kDa e um pI teórico de 5,46, a proteína selenofosfato sintetase. A análise da sequência de aminoácidos demonstrou que a proteína possui motivos de ligação ao ATP, o que condiz com sua função, que é fosforilar o selenito; e também regiões que tendem à dimerização, como comprovado por Sculaccio e colaboradores (2008) que caracterizaram a SPS de *T. brucei* e *L. major*. Em muitos organismos, como mamíferos e algumas arqueobactérias, a própria selenofosfato sintetase é uma selenoproteína (Stock et al., 2010), o que não é o caso de *T. evansi*. Assim como em *T. brucei* e *L. major* (Sculaccio et al., 2008), a SPS de *T. evansi* possui uma cisteína (C) no lugar da selenocisteína, especificamente no resíduo 42 (demonstrado no alinhamento da Figura 21). Este resíduo parece estar diretamente relacionado à função da proteína, já que proteínas mutantes na qual houve a substituição da cisteína por uma alanina nesta posição perdem sua função (Sculaccio et al., 2008). Existem 2 formas de SPS descritas, mas apenas a

SPS2 parece estar relacionada à incorporação de selenocisteína, visto que apenas o silenciamento de SPS2, e não SPS1, causa perda da incorporação de ^{75}Se em células (Xu et al., 2007).

Os iniciadores para a amplificação do possível gene da PSTK de *T. evansi* foram retirados da dissertação de mestrado de Evangelista (2009), que trabalhou com *T. brucei* e *L. major*. Foi amplificada a fase aberta de leitura de 1083 pb de base que forma uma proteína com 40 kDa e um pI de 6,42. A análise das características da proteína revelam que a mesma pertence à superfamília P-loop NTPase (possuem propriedades de ligação ao ATP ou GTP) e que possui motivos condizentes com a função de quinase, todos na porção N-terminal. Esses dados são semelhantes aos descritos por Carlson e colaboradores (2004), que caracterizaram pela primeira vez a PSTK de mamíferos. Os autores realizaram buscas computacionais por possíveis quinases em genomas de organismos que possuíam e que não possuíam a rota da selenocisteína, e encontraram alguns candidatos. Posteriormente, caracterizaram *in vivo* a proteína PSTK de camundongos. O alinhamento da possível PSTK de *T. evansi* foi realizado com os mesmos organismos utilizados por Carlson e colaboradores (2004) (Figura 23), e possui regiões conservadas, entre elas o domínio de ligação de ATP entre os resíduos 25-32 (sinalizados com *). Sherrer e colaboradores (2008) alinharam sequências de quinases de procariotos e PSTK de arqueobactérias e, comparando com a sequência de *T. evansi*, é possível identificar 3 motivos conservados entre todos: o motivo GxxxxGKT (resíduos 10-17), que forma o P-loop; uma asparagina da posição 45 pertencente ao motivo Walker B, que constitui o sítio ativo das P-loop quinases; e um motivo RNxxR (resíduos 158-162), que possui atividade ATPase e fosfotransferase. Esses três motivos formam o sítio catalítico da enzima, e mutações realizadas em resíduos destes motivos em arqueobactérias levam à formação de enzimas com diminuição de sua atividade (Sherrer et al., 2008).

O número de cópias e a confirmação da presença dos genes *selB*, *selD* e PSTK no gDNA de *T. evansi* foram determinados através da técnica de Southern Blot, utilizando como sonda a ORF de cada gene. Como é possível observar nas Figuras 28, 29 e 30, os genes estão presentes no DNA genômico do protozoário em cópia única, pois houve a formação de uma banda única nas digestões com as enzimas que não digeriam a ORF; e de duas bandas nas digestões com enzimas que digeriam a ORF dos genes em apenas um ponto. Resultados semelhantes foram obtidos em procariotos para *selB* (Kromayer et al., 1996), *selD* em arqueobactérias (Stock et al., 2010) e PSTK em *T. brucei* (Aeby et al., 2010).

Imunoensaios foram realizados para determinar a presença e a localização da SPS em *T. evansi* com um anticorpo anti-SPS de *T. brucei*. Este anticorpo foi utilizado pelo fato de a

sequência de aminoácidos das proteínas dos dois protozoários ter apresentado mais de 99% de similaridade. O Western Blot foi realizado com o extrato protéico total do protozoário e foi possível observar a formação de uma banda intensa de aproximadamente 43 kDa, condizente com o tamanho predito para a SPS de *T. evansi*. A proteína possui localização citoplasmática, provavelmente formando complexos com outras proteínas desta via (Small-Howard et al., 2006).

O sistema antioxidante de tripanossomatídeos é formado principalmente por proteínas homólogas às glutathionas peroxidases, mas com cisteína no lugar de selenocisteína (Schlecker et al., 2005). As peroxidases de *T. brucei* utilizam um sistema de proteínas próprias para a redução de radicais livres, o sistema triparedoxina-tripanotiona (Fairlamb e Cerami, 1992). A substituição de selenocisteína por cisteína nessas proteínas faz com que as mesmas tenham uma diminuição na capacidade redutora, já que a selenocisteína pode entre 10 e 100 vezes mais eficiente do que a cisteína (Armér, 2010). A identificação de uma selenoproteína exclusiva de tripanossomatídeos (*selTRYP*) por Lobanov e colaboradores (2006), que possui o motivo CxxU relacionado à atividade antioxidante, além de outras duas proteínas (*selT* e *selK*), sugere que as selenoproteínas podem contribuir na proteção dos tripanossomatídeos ao ataque por EROs.

Parte da ORF da *selTRYP* foi amplificada, clonada e sequenciada em *T. evansi* neste trabalho. Aliado ao fato da identificação da expressão dos principais componentes da via de inserção de selenocisteína (*selB*, *selC*, *selD* e PSTK) e da identificação e localização celular da SPS neste protozoário, sugere-se que o *T. evansi* possa utilizar selênio e incorporá-lo em proteínas; e sendo a *selTRYP* uma destas possíveis selenoproteínas, seria interessante um aprofundamento dos estudos desta rota metabólica para a identificação de um possível alvo terapêutico, visto que a resistência do *T. evansi* aos medicamentos disponíveis no mercado é crescente.

7 CONCLUSÕES

- O gene *selB* de *T. evansi* é transcrito e apresenta uma ORF de 1986 pb, formando uma proteína com uma massa de 71,7 kDa e um PI de 7,19;
- O gene *selC* de *T. evansi* apresenta uma ORF de 88 pb e forma uma estrutura secundária compatível com o tRNA^{Sec} de eucariotos;
- O gene *selD* de *T. evansi* é transcrito, forma uma ORF de 1182 pb e uma proteína de 43 kDa e pI 5,46;
- O gene PSTK de *T. evansi* é transcrito com uma ORF de 1083 pb formando uma proteína de 40 kDa e pI 6,42;
- O gene *selTRYP* está parcialmente presente no genoma de *T. evansi*;
- Os genes *selB*, *selD* e PSTK apresentaram um perfil na técnica de Southern Blot compatível com uma cópia cada no genoma de *T. evansi*;
- A proteína selenofosfato sintetase possui localização citoplasmática em *T. evansi*;
- A proteína selenofosfato sintetase está presente no extrato protéico total de *T. evansi* formando uma banda de aproximadamente 43 kDa no ensaio de Western Blot.

8 REFERÊNCIAS

- Allmang, C. et al. The selenium to selenoprotein pathway in eukaryotes: more molecular partners than anticipated. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1790, p.1415-1423, 2009.
- Amer, S. et al. Molecular identification and phylogenetic analysis of *Trypanosoma evansi* from dromedary camels (*Camelus dromedarius*) in Egypt, a pilot study. **Acta Tropica**, v.117, p.39-46, 2011.
- Aquino, L. P. C. T. et al. Clinical, parasitological and immunological aspects of experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, n.2, p.255-260, 1999.
- Arbogast, S.; Ferreira, A. Selenoproteins and protection against oxidative stress: selenoprotein N as a novel player at the crossroads of redox signaling and calcium homeostasis. **Antioxidants and Redox Signaling**, v.12, p.893-904, 2010.
- Arnér, E. S. J. Selenoproteins- What unique properties can arise with selenocysteine in place of cysteine? **Experimental Cell Research**, v. 316, p.1296-1303, 2010.
- Assoku, R. K. G. Immunological studies of the mechanism of anaemia in experimental *Trypanosoma evansi* infection in rats. **International Journal for Parasitology**, v.5, n.2, p.137-145, 1975.
- Atarhouch, T. et al. Camel trypanosomosis in Morocco 1: results of a first epidemiological survey. **Veterinary Parasitology**, v.111, p.277-286, 2003.
- Baral, T. N. et al. Control of *Trypanosoma evansi* Infection Is IgM Mediated and Does Not Require a Type I Inflammatory Response. **The Journal of Infectious Diseases**, v.195, p.1513-20, 2007.
- Bengaly, Z. et al. Validation of a polymerase chain reaction assay for monitoring the therapeutic efficacy of diminazene aceturate in trypanosome-infected sheep. **Veterinary Parasitology**, v.96, p.101-113, 2001.
- Berlin, D. et al. Longitudinal study of an outbreak of *Trypanosoma evansi* infection in equids and dromedary camels in Israel. **Veterinary Parasitology**, v.174, p.317-322, 2010.
- Berry, M. J. et al. Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region. **Nature**, v.353, n.6341, p.273-276, 1991.
- Berry, M. J. Knowing when not to stop. **Nature Structural and Molecular Biology**, v.12, p.389-390, 2005.

Berzelius, J. J.; Lettre, M. De Berzelius à M Berthollet sur deux métaux nouveaux, **Ann. Chim. Phys.**, v.7, p. 199–202, 1818.

Besteiro, S. et al. Energy generation in insect stages of *Trypanosoma brucei*: metabolism in flux. **Trends in Parasitology**, n.21, p.185–191, 2005.

Böck, A. et al. Selenoprotein synthesis: an expansion of the genetic code. **Trends in Biochemical Sciences**, v.16, p.463-467, 1991.

Böck, A. Biosynthesis of selenoproteins--an overview. **Biofactors**, v.11, p.77-78, 2000.

Bradford, M. M.; A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

Brandão, L. P. et al. Infecção Natural pelo *Trypanosoma evansi* em cão – Relato de caso. **Clínica Veterinária**, Ano VII, n.6, p.23-26, 2002.

Brun, R. et al. *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). **Veterinary Parasitology**, v.79, p.95-107, 1998.

Burk, R. F. et al. Selenoprotein Metabolism and Function: Evidence for More than One Function for Selenoprotein P. **The Journal of Nutrition**, v.133, p.1517-1520, 2002.

Camargo, R. E. Isolation of two antigens from *Trypanosoma evansi* that are partially responsible for its cross-reactivity with *Trypanosoma vivax*. **Veterinary Parasitology** v.123, p.67–81, 2004.

Carlson BA et al. Identification and characterization of phosphoseryl-tRNA[Ser]Sec kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.101, p.12848–12853, 2004.

Carreira, J.C. **Sanguessugas podem transmitir o mal das cadeiras, doença de equinos que tem grande importância econômica no Brasil**, 2005. On line. Disponível na Internet: <http://www.fiocruz.br/ccs/novidades/abr05/sanguessuga_adr.htm>. Acesso em 22 dez. 2010.

Carrington, M. et al.. Variant specific glycoprotein of *Trypanosoma brucei* consists of two domains each having an independently conserved pattern of cysteine residues. **Journal of Molecular Biology**, v.221, p.823–835, 1991.

Chapple, C .E.; Guigo, R. Relaxation of selective constraints causes independent selenoprotein extinction in insect genomes, **Plos One**, v.3, p. 2968,2008.

Chiba, S. et al. Structural Basis for the Major Role of O-Phosphoseryl-tRNA Kinase in the

UGA-Specific encoding of selenocysteine. **Molecular Cell**, v.39, p.410-420, 2010.

Claes, F. et al. Variable Surface Glycoprotein RoTat 1.2 PCR as a specific diagnostic tool for the detection of *Trypanosoma evansi* infections. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v.3, p.3-9, 2004.

Colpo, C.B. et al. Infecção Natural por *Trypanosoma evansi* em cão no Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p.717-719, 2005.

Conrado, A. C. et al. Infecção natural por *Trypanosoma evansi* em cavalos na região central do Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v.35, n.4, 2005.

Copeland, P. R. et al. A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs. **The EMBO Journal**, v.19, p.306-314, 2000.

Da Silva, A. S. et al. Ocorrência de *Trypanosoma evansi* em bovinos de uma propriedade leiteira no município de Videira - SC, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, n.3, p.373-376, 2008a.

Da Silva, A. S. et al. Aceturato de diminazeno e dipropionato de imidocarb no controle de infecção por *Trypanosoma evansi* em *Rattus norvegicus* infectados experimentalmente. **Ciência Rural**, v.38, n.5, p.1357-1362, 2008b.

Da Silva, A. S. Pathological Findings Associated with Experimental Infection by *Trypanosoma evansi* in Cats. **Journal of Comparative Pathology**, v.142, p.170-176, 2010a.

Da Silva, A. S. et al. Anemia in cats infected by *Trypanosoma evansi*. **Comparative Clinical Pathology**, 2010b. DOI 10.1007/s00580-010-1009-2

Dargantes, A. P. Estimating the impact of *Trypanosoma evansi* infection (Surra) on buffalo population dynamics in southern Philippines using data from cross-sectional surveys. **International Journal for Parasitology**, v.30, n.10, p.1109-1114, 2009.

Dávila, A. M.; Silva, R. A. Animal trypanosomiasis in South America. Current status, partnership, and information technology. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.916, p.199-212, 2000.

Delafosse, A.; Doutoum, A. A. Prevalence of *Trypanosoma evansi* infection and associated risk factors in camels in eastern Chad. **Veterinary Parasitology**, v.119, n.2-3, p.155-164, 2004.

Desquesnes, M. et al. The analysis of the cross-reactions occurring in antibody-ELISA for the detection of trypanosomes can improve identification of the parasite species involved. **Annals**

of **Tropical Medicine and Parasitology**, v.95, p.141–155, 2001.

Desquesnes, M. et al. First outbreak of *Trypanosoma evansi* in camels in metropolitan France. **Veterinary Record**, v.162, n.23, p.750-752, 2008.

Desquesnes, M. et al. Development of a mathematical model for mechanical transmission of trypanosomes and other pathogens of cattle transmitted by tabanids. **International Journal for Parasitology**, v.39, p.333-346, 2009.

Dia, M. L. et al. Some factors affecting the prevalence of *Trypanosoma evansi* in camels in Mauritania. **Veterinary Parasitology**, v.72, n.2, p.111-120, 1997.

Donovan, J.; Copeland, P. R. Threading the Needle: Getting Selenocysteine Into Proteins. **Antioxidants and Redox Signaling**, v.12, n.7, 2010.

Durocher, J. R. et al. Role of sialic acids in erythrocyte survival. **Blood**, v.45, p.11-20, 1975.

Elamin, E. A. et al. Prevalence and infection pattern of *Trypanosoma evansi* in camels in mid-eastern Sudan. **Tropical Animal Health and Production**, v.30, n.2, p.107-114, 1998.

Evangelista, J. P. **Estudos moleculares das enzimas fosfo-seril-tRNA-quinase de *Trypanosoma brucei* e Leishmania major e seril-tRNA sintetase de *Trypanosoma brucei***. São Carlos: Universidade de São Paulo, 2009. 114 p. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

Fagegaltier, D. et al. Structural analysis of new local features in SECIS RNA hairpins. **Nucleic Acids Research**. v.28, p.2679-2689, 2000.

Fairlamb, A. H.; Cerami, A. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. **The Annual Review of Microbiology**, v.46, p. 695-729, 1992

Flohé, L. et al. Glutathione peroxidase: A selenoenzyme. **FEBS letters**, v.32, p.132-134, 1973.

Flohé, L. The labour pains of biochemical selenology: the history of selenoprotein biosynthesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1790, n.11, p.1389-403, 2009.

Herrera, H. M. et al. The role played by sympatric collared peccary (*Tayassu tajacu*), white-lipped peccary (*Tayassu pecari*), and feral pig (*Sus scrofa*) as maintenance hosts for *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma cruzi* in a sylvatic area of Brazil. **Parasitology Research**, v.103, p.619–624, 2008.

Franciscato, C. et al. . Cão naturalmente infectado por *Trypanosoma evansi* em Santa Maria,

RS, Brasil. **Ciência Rural**, v.37, n.1, 2007.

Ganther, H. E. Selenium metabolism, selenoproteins and mechanism of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. **Carcinogenesis**, v.21, p.617–621, 1999.

Gardiner, C.H. et al. **An Atlas of Protozoan Parasites in Animal Tissues**. Agriculture Handbook 651. Unites States Department of Agriculture, Washington, DC, p. 3, 1988.

Gelpi, C. et al. Autoantibodies against a serine RNA–protein complex implicated in cotranslational selenocysteine insertion, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.89, p.9739-9743, 1992.

Gillingwater, K. et al. Establishment of a panel of reference *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma equiperdum* strains for drug screening. **Veterinary Parasitology**, v.148, p.114–121, 2007.

Gillingwater, K. In vitro activity and preliminary toxicity of various diamidine compounds against *Trypanosoma evansi*. **Veterinary Parasitology**, v.169, p.264-272, 2010.

Grab, D. J.; Bwayo, J. J. Isopycnic isolation of African trypanosomes on Percoll gradients formed in situ. **Acta Tropica**, n.39, p.363-366, 1982.

Gutierrez, C. et al. Camel trypanosomosis in the Canary Islands: assessment of seroprevalence and infection rates using the card agglutination test (CATT/T. evansi) and parasite detection tests. **Veterinary Parasitology**, v.130, p.163-168, 2000.

Gutierrez, C. et al. Clinical, Hematological, and Biochemical Findings in an Outbreak of Abortion and Neonatal Mortality Associated with *Trypanosoma evansi* Infection in Dromedary Camels. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1081, p.325-327, 2006.

Haile, S.; Papadopoulou, B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. **Current Opinion in Microbiology**, v.10, n.6, p.569–577, 2007.

Hatfield, D. L.; Gladyshev, V. N. How Selenium Has Altered Our Understanding of the Genetic Code. **Molecular and Cellular Biology**, v.22, n.11, p.3565–3576, 2002.

Hawking F. The resistance of *Trypanosoma congolense*, *T. vivax* and *T. evansi* to human plasma. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, v.72, p.405-7, 1978.

Hillebrand H. et al. A second class of peroxidases linked to the trypanothione metabolism. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278, p.6809-6815, 2003.

Hoare, C. A. **The Trypanosomes of Mammals**. A Zoological Monograph, Blackwell Scientific Publication, 1972.

Iribar, M. B. et al. A processed short transcript of *Leishmania*, ODD1. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.127, p.205–208, 2003.

Itoh, Y. et al. Crystal structure of human selenocysteine tRNA. **Nucleic Acids Research**, v.37, n.18, p.6259-6268, 2009.

Jatkar, P. R.; Purohit, M. S. Pathogenesis of anemia in *Trypanosoma evansi* infection. I. Haematology. **Indian Veterinary Journal**, v.48, p.239–244, 1971.

Jensen, R E. et al. What happens when *Trypanosoma brucei* leaves Africa. **Trends in Parasitology**, n.24, p. 428–431, 2008.

Joshi, P. P. et al. Human trypanosomosis caused by *Trypanosoma evansi* in India: the first case report. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.3, p.491-495, 2005.

Kamble, P. et al. Selenium intoxication with selenite broth resulting in acute renal failure and severe gastritis. **Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation**, v.20, n.1, p.106-111, 2009.

Kanzok, S. M. et al. Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in *Drosophila melanogaster*. **Science**, v.291, p.643-646, 2001.

Kryukov, G.V., et al. Characterization of mammalian selenoproteomes. **Science**, v.300, p.1439–1443, 2003.

Kubiak, G. V. L.; Molfi, A. A Tripanossomíase equina (Mal das Cadeiras). **Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas do Estado do Paraná**, n.33, p.51, 1954.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.5259, p.680-685, 1970.

Laha, R. ; Sasmal, N. K. Endemic status of *Trypanosoma evansi* infection in a horse stable of eastern region of India - a field investigation. **Tropical Animal Health and Production**, v.40, p.357–361, 2008.

Lanham, S. M.; Godfrey, D. G. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other animals using DEAE-cellulose. **Experimental Parasitology**, v.28, p.521-534, 1970.

Leibundgut, M. et al. Selenocysteine tRNA-specific elongation factor SelB is a structural chimera of elongation and initiation factors. **The EMBO Journal**, v.24, p.11–22, 2005.

- Lescure, A. et al. Selenoprotein function and muscle disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1790, p.1569-1574, 2009.
- Liao, D.; Shen, J. Studies of quinapyramine-resistance of *Trypanosoma brucei evansi* in China. **Acta Tropica**, v.116, p.173–177, 2010.
- Liu, B. et al. Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. **Trends in Parasitology**, v.21, p.363–369, 2005.
- Lobanov, A. V. et al. Selenium metabolism in *Trypanosoma*: characterization of selenoproteomes and identification of a Kinetoplastida-specific selenoproteína. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n.14, p. 4012-4024, 2006.
- Lobanov, A. V. et al. Evolutionary dynamics of eukaryotic selenoproteomes: large selenoproteomes may associate with aquatic life and small with terrestrial life. **Genome Biololy**, v.8, 2007.
- Lobanov, A. V. et al. Selenoproteinless animals: selenophosphate synthetase SPS1 functions in a pathway unrelated to selenocysteine biosynthesis. **Protein Science**, v.17, p.176-182, 2008.
- Lobanov, A. V. et al. Eukaryotic selenoproteins and selenoproteomes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1790, p.1424–1428, 2009.
- Losos, G.J. Diseases caused by *Trypanosoma evansi*. A review. **Veterinary Research Communications**, v.4, p.165-81, 1980.
- Lu, C. et al. Identification and characterization of selenoprotein K: an antioxidant in cardiomyocytes. **FEBS letters**, v.580, n.22, 5189-5197, 2006.
- Lun, Z. R. et al. Trypanosomiasis of domestic animals in China. **Parasitology Today**, v.9, n.2, p.41-45, 1993.
- Lun, Z. R.; Desser, S. S. Is the broad range of hosts and geographical distribution of *Trypanosoma evansi* attributable to the loss of maxicircle kinetoplast DNA? **Parasitology Today**, v.11, p.131–133, 1995.
- Lun, Z. R. et al. *Trypanosoma brucei*: two steps to spread out from Africa. **Trends in Parasitology**, v.26, n.9, p.424-427, 2010.
- Mandal, M. et al. First report of establishment of *Trypanosoma evansi* infection in pigeon nestlings (*Columba livia*). **Journal of Parasitology**, v.94, n.6, p.1428-1429, 2008.
- Masiga, D. K. et al. Sensitive detection of trypanosomes in tse-tse flies by DNA

amplification. **International Journal for Parasitology**, v.22, n.909-918, 1992.

Morales, I. et al. Ocular lesions associated with *Trypanosoma evansi* in experimentally infected goats. **Veterinary Parasitology**, v.141, p.325–329, 2006.

Moreira, R. D., Machado, R. Z. Identificação e isolamento do *Trypanosoma equinum* em um cão do município de Camapuã-MS. In: **Encontro De Pesquisas Veterinárias**, 10, 1985, Jaboticabal. Resumos, p.66.

Moser, D. R. et al. Detection of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction. **Parasitology**, v.99, p.57–66, 1989.

Musa, M. M. et al. Efficacy of Cymelarsan in the treatment of natural chronic *Trypanosoma evansi* infection in camels in the Sudan. **Revue D'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux**, v.47, n.4, p.397-400, 1994.

Ngaira, J. M. et al. Evaluation of antigen and antibody rapid detection tests for *Trypanosoma evansi* infection in camels in Kenya. **Veterinary Parasitology**, v.114, n.2, p.131-141, 2003.

Ngaira, J. M. et al. The detection of non-RoTat 1.2 *Trypanosoma evansi*. **Experimental Parasitology**, v.110, p.30–38, 2005.

Ngeranwa J. et al. Pathogenesis of *Trypanosoma (brucei) evansi* in small east African goats. **Research in Veterinary Science**, v.54, p.283-289, 1993.

Njiru, Z. K. et al. Detection of *Trypanosoma evansi* in camels using PCR and CATT/T. *evansi* tests in Kenya. **Veterinary Parasitology**, v.124, n.3-4, p.187-199, 2004.

Nok, A. et al. *Trypanosoma evansi* Sialidase: Surface Localization, Properties and Hydrolysis of Ghost Red Blood Cells and Brain Cells-Implications in Trypanosomiasis. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v.58, p.594-601, 2003.

Nunes, V. L. B. Investigação epidemiológica sobre *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* no Pantanal sul-matogrossense. Estudos de reservatórios. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.2, p.41–44, 1993.

Omer, O. H. et al. Study on the antioxidant status of rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Veterinary Parasitology**, v.145, p.142–145, 2007.

Otto, M. A. et al. Susceptibility of *Trypanosoma evansi* to human blood and plasma in infected mice. **Veterinary Parasitology**, v.168, n.1-2, p.1-4, 2010.

Paleskava, A. et al. Thermodynamic and Kinetic Framework of Selenocysteyl-tRNA^{Sec}

Recognition by Elongation Factor SelB. **The Journal of Biological Chemistry**, v.285, n.5, p. 3014-3020, 2010.

Papp, L. V. et al. From Selenium to Selenoproteins: Synthesis, Identity, and Their Role in Human Health. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.9, n.7, 2007.

Payne, R.C. et al. Efficacy of Cymelarsan in Friesian Holstein calves infected with *Trypanosoma evansi*. **Tropical Animal Health and Production**, v.26, 219-226, 1994.

Pays, E. et al. Antigenic variation in *Trypanosoma brucei*: facts, challenges and mysteries. **Current Opinion in Microbiology**, v.7, p.369–374, 2004.

Pholpark, S. et al. Influence of *Trypanosoma evansi* infection on milk yield of dairy cattle in northeast Thailand. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 42, n. 1, p. 39-44, 1999.

Raina, A. K. et al. Oral transmission of *Trypanosoma evansi* infection in dogs and mice. **Veterinary Parasitology**, v.18, n.1, p.67-69, 1985.

Raynaud, J.P. et al. A review of Cymelarsan - a new treatment proposed for animal trypanosomiasis due to *T. evansi* and other trypanosomes of the *T. brucei* group. **ISCTRC**, 20th Meeting, Mombasa, Kenya, Pub. No. 115. 1989.

Reid, S. A. et al. A possible role for Russa deer (*Cervus timorensi russa*) and wild pigs in spread of *Trypanosoma evansi* from Indonesia to Papua New Guinea. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, p.195–197, 1999.

Reid, S. A.; Copeman, D. B. Surveys in Papua New Guinea to detect the presence of *Trypanosoma evansi* infection. **Australian Veterinary Journal**, v.78, n.12, p.843-845, 2000.

Reid, S. A et al. Evaluation and improvement of parasitological tests for *Trypanosoma evansi* infection. **Veterinary Parasitology**, v.102, p.291–297, 2001.

Rodrigues, A. et al. Neuropathology of Naturally Occurring *Trypanosoma evansi* Infection of Horses. **Veterinary Pathology**, v.46, p.251-258, 2009.

Rodrigues, E. M. **Estudos moleculares das enzimas envolvidas na biossíntese de selenocisteína em *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major***. São Carlos: Universidade de São Paulo, 2008. 153 p. Tese (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

Sambrook, J. et al. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. Nova Iorque: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Santos, A. S.; et al. Origin of the Pantaneiro horse in Brazil. **Archives of Zootechnia**, v.41,

p.371–381, 1992.

Savani, E. S. M. M. et al., Occurrence of co-infection by *Leishmania (Leishmania) chagasi* and *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* in a dog in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, n.7, p.739-741, 2005.

Schlecker, T. et al. Substrate specificity, localization, and essential role of the glutathione peroxidase-type trypanothione peroxidases in *Trypanosoma brucei*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.280, p.14385-14394, 2005.

Schnauffer, A. et al. Natural and induced dyskinetoplastid trypanosomatids: How to live without mitochondrial DNA. **International Journal of Parasitology**, n.32, p.1071–1084, 2002.

Seidl, A. et al. A financial analysis of treatment strategies for *Trypanosoma evansi* in the Brazilian Pantanal. **Preventive Veterinary Medicine**, n.33, p.219–234, 1998.

Shahzad, W. et al. Prevalence and molecular diagnosis of *Trypanosoma evansi* in Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) in different districts of Punjab (Pakistan). **Tropical Animal Health and Production**, v.42, p.1597–1599, 2010.

Sharma, D. K. et al. Haematological changes in experimental trypanosomiasis in Barbari goats. **Small Ruminant Research**, v.38, n.2, p.145-149, 2000.

Shehu, S. A. et al. Role of erythrocyte surface sialic acid in inducing anaemia in Savannah Brown bucks experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Veterinarski Arhiv**, v.76, n.6, p.521-530, 2006.

Sherrer, R. L. et al. Characterization and evolutionary history of an archaeal kinase involved in selenocysteinyl-tRNA formation. **Nucleic Acids Research**, v.36, n.4, p.1247-1259, 2008.

Silva, R. A. M. S. et al. Pathogenesis of *Trypanosoma evansi* in dogs and horses: hematological and clinical aspects. **Ciência Rural**, v.25, p.233-238, 1995.

Silva, R. A. M. S. et al. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax* – **Biologia, Diagnóstico e Controle**. Embrapa, 2002. Online. Disponível na Internet: <<http://www.embrapa.com>> Acesso em 20 dez. 2010.

Small-Howard, A. et al. Supramolecular complexes mediate selenocysteine incorporation in vivo. **Molecular Cell Biology**, v.26, p.2337–2346, 2006.

Stock, T. et al. In vivo requirement of selenophosphate for selenoprotein synthesis in archaea. **Molecular Microbiology**, v.75, n.1, p.149-160, 2010.

Sumba, A. L. et al. Mechanical transmission of *Trypanosoma evansi* and *T. congolense* by *Stomoxys niger* and *S. taeniatus* in a laboratory mouse model. **Medical and Veterinary Entomology**, v.12, p.417-422, 1998.

Thompson, J. D., et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.4876-4882, 1997.

Tiwary, A. K. et al. Comparative toxicosis of sodium selenite and selenomethionine in lambs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.18, n.1, p.61-70, 2006.

Tuntasuvan, D. et al. Chemotherapy of surra in horses and mules with diminazene aceturate. **Veterinary Parasitology**, v.110, p.227-233, 2003.

Tuntasuvan, D. et al. CNS trypanosomiasis in native cattle. **Veterinary Parasitology**, v.73, p.357-363, 1997.

Tuntasuvan, D. et al. Detection of *Trypanosoma evansi* in brains of the naturally infected hog deer by streptavidine-biotin immunohistochemistry. **Veterinary Parasitology**, v.87, p.223-230, 2000.

Uche, U. E.; Jones, T. W. Pathology of experimental *Trypanosoma evansi* infection in rabbits. **Journal of Comparative Pathology**, v.106, p.299-309, 1992.

Vanhamme, L. et al. Apolipoprotein L-1 is the trypanosome lytic factor of human serum. **Nature**, v.422, p.83-87, 2003.

Vanhollebeke, B. et al. Human *Trypanosoma evansi* infection linked to a lack of apolipoprotein L-I. **The New England Journal of Medicine**, v.355, n.25, p.2752-2756, 2006.

Veres, Z. et al. Synthesis of 5- methylaminomethyl-2-selenouridine in tRNAs: 31P NMR studies show the labile selenium donor synthesized by the selD gene product contains selenium bonded to phosphorus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.89, p.2975-2979, 1992.

Wernery, U. et al. Preliminary Evaluation of Diagnostic Tests Using Horses Experimentally Infected with *Trypanosoma evansi*. **The Veterinary Journal**, v.161, p.287-300, 2001.

Witola, W. H. RNA-interference silencing of the adenosine transporter-1 gene in *Trypanosoma evansi* confers resistance to diminazene aceturate. **Experimental Parasitology**, v.107, p.47-57, 2004.

Witola, W. H. et al. Acquired resistance to berenil in a cloned isolate of *Trypanosoma evansi*

is associated with upregulation of a novel gene, TeDR40. **Parasitology**, v.131, p.635–646, 2005.

Woo, P. T. K. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomosis. **Acta Tropica**, v. 27, p. 384–386, 1970.

Xong H. V. et al. A VSG expression site-associated gene confers resistance to human serum in *Trypanosoma rhodesiense*. **Cell**, v.95, p.839-46, 1998.

Xu, X. M., et al. Selenophosphate synthetase 2 is essential for selenoprotein biosynthesis. **Biochemical Journal**, v.404, p.115–120, 2007.

Yang, G. Q. et al. Endemic selenium intoxication of humans in China. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.37, n.5, p.872-881, 1983.

Yuan, J. et al. RNA-dependent conversion of phosphoserine forms selenocysteine in eukaryotes and archaea. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103, n.50, p.18923-18927, 2006.

Zelege, M.; Bekele, T. Effect of season on the productivity of camels (*Camelus dromedaries*) and the prevalence of their major parasites in eastern Ethiopia. **Tropical Animal Health and Production**, v.33, n.4, p.321-329, 2001.

Zhang, Z. Q. et al. In vivo and in vitro sensitivity of *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum* to diminazene, suramin MeCy, quinapyramine and isomethamidium. **Acta Tropica**, v.50, p.101-110, 1992.