

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR**

FERNANDA CRISTINA COSTA

**VALIDAÇÃO DA VIA DE BIOSÍNTESE DE SELENOCISTEÍNA E
SELENOPROTEÍNAS EM *TRYPANOSOMA* POR RNA DE
INTERFERÊNCIA**

**SÃO CARLOS – SP
2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR**

FERNANDA CRISTINA COSTA

**VALIDAÇÃO DA VIA DE BIOSÍNTESE DE SELENOCISTEÍNA E
SELENOPROTEÍNAS EM *TRYPANOSOMA* POR RNA DE
INTERFERÊNCIA**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Genética Evolutiva e
Biologia Molecular para obtenção do
título de Doutor em Ciências**

***Orientação: Prof. Dr. Otavio Henrique
Thiemann***

**SÃO CARLOS – SP
2012**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

C837vv

Costa, Fernanda Cristina.

Validação da via de biossíntese de selenocisteína e selenoproteínas em *Trypanosoma* por RNA de interferência / Fernanda Cristina Costa. -- São Carlos : UFSCar, 2012. 147 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Genética e evolução. 2. *Trypanosoma brucei*. 3. Selenocisteína. 4. Selenoproteínas. 5. Estresse. 6. RNA interferente. I. Título.

CDD: 575 (20^a)

**“Validação da via biossíntese de selenocisteína e
selenoproteínas em *Trypanosoma* por RNA de interferência”**

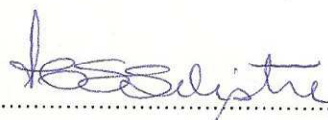
Tese de Doutorado de
Fernanda Cristina Costa

Banca Examinadora:

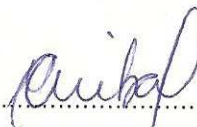
Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemann



Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo



Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal



Profa. Dra. Carla Ribeiro Polycarpo



Prof. Dr. Luiz Claudio Milette



À minha Família.

Agradecimentos

Ao professor Otavio Henrique Thiemann pela orientação desde minha iniciação científica. Pela confiança no meu trabalho, por me apoiar sempre e principalmente pela amizade desenvolvida durante todos esses anos.

Aos professores e funcionários do Departamento de Genética e Evolução, em especial as colegas da secretaria de Pós-Graduação, pela ajuda constante.

Aos professores e funcionários do IFSC, em especial do Grupo de Cristalografia, por todo o suporte, condições e infraestrutura necessárias para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao professor Sergio Schenkman por me receber em seu laboratório para a realização de experimentos de imunofluorescência e FACS e pelas críticas e sugestões para este trabalho.

Aos funcionários, professores e alunos da Biofísica, por tantos empréstimos e ajuda.

Aos colegas da secretaria do grupo, Fernando, Luciana, Mariana, Rejane e Lígia, por resolverem tantos pepinos. Aos técnicos do laboratório pela ajuda imprescindível: Maria, Livia, Bianca, Renata, Humberto, Simone, Augusto e Geraldo e em especial a Susana por cuidar tão bem do lab, pelos sequenciamentos e por estar sempre disposta a conversar e ajudar.

Aos colegas de lab por toda a ajuda e discussão científica, mas também por proporcionarem sempre um ambiente mais divertido de trabalho. César e André (por aprontar todas comigo e contra mim), Jade, Atílio, Renatinha, Fran, Malu, Wan (companheira de uma vida inteira dentro da sala de cultura), Caio, Lari, Flavio, Lis, Marisa, Ricardo, Napo e em especial aos alunos do Prof. Otavio: Daia, Teresa, Tulio, Livia, Ivan, Jaque, Marcos Michel, Isa, B2, Rafa. Aos amigos da sala 14, Vivi, Ana Puhl, Livia, Mamé, Tavin, Udi, nossa sala arrasa.

|

Às minhas queridas alunas de IC, com quem aprendi e aprendo muito, Grasi e Julia.

Ao grupo de amigos que me ajudou tanto e me mostrou que a vida é muito mais fácil quando se está perto de quem amamos: Udi, Teresa (e o Vini), Mamé, Fabio, Bacheга e Fer. Impossível descrever a importância que vocês têm na minha vida.

Aos amigos da bio02, que continuam presentes e sendo muito importantes: Naná, Val, Mamé, Tavin, Dani.

Aos incríveis amigos que fiz na Biomol, Paula, Udi, Hilde e Victor.

Aos ex-membros do laboratório que considero amigos para a vida toda, que me ensinaram, ajudaram e contribuíram muito para esse trabalho e para minha vida: Alexandre e Carol Cassago, Matheus Postigo e Victor Caldas.

À Teresa Cristina e Tulio pela grande amizade e ajuda nesse trabalho.

As amigas de uma vida inteira: Mamé, Lu e Bel só posso dizer que vocês são as irmãs que eu escolhi.

Aos meus irmãos Fabio e Flavio e minhas cunhadas pelo companheirismo e apoio. A toda a minha família, sempre muito unida e reunida.

Aos meus pais João Paulo e Marlene meus agradecimentos vão muito além dessa tese. Toda uma vida de exemplo de união, de educação, dedicação e cidadania, somado a um imenso amor e apoio incondicional em todas as horas.

À FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro.

Muito obrigada, sem vocês esse trabalho não seria possível.

Resumo

Selênio (Se) é um elemento essencial encontrado em selenoproteínas na forma do 21º aminoácido selenocisteína (Sec – U). A incorporação co-traducional de Sec depende de uma complexa via de síntese, de um códon de terminação UGA em fase de leitura e uma estrutura terciária do RNA mensageiro conhecida como elemento SECIS. A maioria das selenoproteínas conhecidas participa de processos de manutenção do estado redox das células, tendo um importante papel no crescimento e proliferação celular. Essas proteínas, bem como os componentes da via de síntese de Sec, estão presentes em membros dos domínios de Bactérias, Arquéais e Eucaria, tendo sido identificada em diversos protozoários, incluindo os kinetoplastidas. Auranofin, um composto de ouro usado como agente antireumático, tem sido descrito como um inibidor de selenoproteínas através de sua ligação com o aminoácido selenocisteína e células de *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major* são altamente sensíveis a este composto, apresentando um LD₅₀ na faixa de nanomolar. Esta evidência indica uma possível dependência destes parasitas por selenoproteínas e conseqüentemente pela sua via de síntese. A selenofosfato sintetase (SELD/SPS2) é a enzima responsável pela síntese de monoselenofosfato a partir de seleneto e ATP, sendo, portanto uma proteína fundamental na síntese de selenocisteína. Sua depleção levou a apoptose celular quando mantidas em condições de estresse. Esse efeito pode ser causado pela conseqüente falta das selenoproteínas ou pelo acúmulo de espécies tóxicas de selênio, como o seleneto. Os protozoários apresentam número reduzido de selenoproteínas e kinetoplastidas apresentam 3, duas homólogas distantes de mamíferos, SelK e SelT, e uma nova proteína exclusiva denominada SelTryp, que não apresentam homologia com nenhuma outra proteína descrita. O papel dessas proteínas não é conhecido, e nós investigamos suas possíveis funções através da inibição de sua expressão. A depleção de TbSelK não mostrou efeito sob condições normais, mas tornou as células mais sensíveis a agentes indutores de estresse de retículo endoplasmático, o que nos permite inferir uma função de manutenção da homeostase dessa organela. A depleção de TbSelT causou uma diminuição no crescimento celular, mas o aumento da sensibilidade aos agentes indutores de estresse não foi tão pronunciada

|

como em TbSelK. Nossos resultados revelam a importância de selenocisteína para parasitas, uma vez que esses organismos enfrentam diversos tipos de estresses para manter a viabilidade e a progressão da doença nos diferentes habitats encontrados ao longo do seu ciclo de vida.

Palavras-chave: *Trypanosoma*. Selenocisteína. Selenoproteína. Estresse. RNA de interferência.

Abstract

Selenium (Se) is an essential element found in selenoproteins as the 21st amino acid (Selenocysteine – Sec). For the Sec incorporation and the related biosynthetic pathway, several elements are required: tRNA^{Sec}, a UGA codon and a Sec insertion sequence (SECIS), a conserved motif downstream of the selenoprotein encoding gene. Selenoproteins generally participate in the cellular redox balance, playing an important role on cell growth and proliferation. These proteins, as well as the the Sec synthesis pathway, are present in members of the Bacteria, Archaea and Eukarya domains, being identified in several protozoa, including the kinetoplastids. Auranofin, a gold-containing antirheumatic drug, is a known selenoproteins inhibitor and *Trypanosoma brucei* and *Leishmania major* cells are sensitive to this compound, with a LD₅₀ in nanomolar range. This indicates a possible dependence of these parasites on selenoproteins. The selenophosphate synthetase (SELD/SPS2) is responsible for the formation of monoselenophosphate from selenide and ATP, being essential for selenoprotein biosynthesis. SPS2 knockdown led to apoptosis under sub-optimal growth conditions. The selenoproteome of these flagellated protozoa consists of distant homologs of the mammalian SelK and SelT, and a novel selenoprotein designated SelTryp, a kinetoplastid-specific protein. The functions of any of these selenoproteins are not known. We have investigated the effect of their downregulation in *T. brucei* to interpret their possible physiological role. The TbSelK depletion shows no effect on growth under optimal conditions, but the cells became more sensitive to endoplasmic reticulum stress agents and oxidative stress, suggesting that SelK is an ER stress-regulated protein and plays an important role in protecting *T. brucei* cells from ER stress agent. The TbSelT gene silencing by RNA interference hampers the parasite survival, but the sensitivity to the agents tested was not as evident as it was for TbSelK, suggesting a role for TbSelT in protection against stress, but not specifically ER stress. Our results show the importance of selenocysteine and selenoproteins to parasite survival.

Key-words: *Trypanosoma*. Selenocysteine. Selenoprotein. Stress. Interference RNA.

Lista de Figuras

- Figura 1 - Representações 2D e 3D dos aminoácidos A1-A2) L-cisteína e B1-B2) L-selenocisteína. Em vermelho é representado o oxigênio, em azul o nitrogênio, em amarelo o enxofre e em laranja o selênio.23
- Figura 2 - Diagrama esquemático da via de síntese de selenocisteína em eucariotos²⁹26
- Figura 3 - Estrutura secundária de (A)tRNAs canônicos, (B) tRNA^{Sec} de bactérias e (C) tRNA^{Sec} de arqueias e eucariotos.....26
- Figura 4 - Estrutura consenso do elemento SECIS em eucariotos. São observados dois tipos de elemento SECIS: I e II. O elemento SECIS tipo II de eucariotos é mostrado na caixa³27
- Figura 5 - Reação catalisada pela enzima selenofosfato sintetase.29
- Figura 6 - Número de publicações científicas envolvendo o estudo de selenoproteínas (2000-2010)²30
- Figura 7 - Exemplos de selenoproteínas humanas e sua variada localização celular⁶⁰32
- Figura 8 - Ciclo de vida do *T. brucei* no hospedeiro intermediário inseto, do lado esquerdo do ciclo e no hospedeiro definitivo homem, do lado direito do ciclo.38
- Figura 9 - Representação esquemática do sistema de RNAi em *T. brucei*¹40
- Figura 10 - Alinhamento da sequência de aminoácidos de SelK. Sec (U) é mostrado em vermelho e o correspondente Cys em azul. Resíduos conservados estão em destaque. ORFs foram preditadas com as seguintes sequências: 4 265 315c000313905.contig1 (*T. conglense*), Tb927.10.v4 (*T. brucei brucei*), 1 585712.c000312726.contig (*T. gambiense*), contig8734 (*T. vivax*), T. cruzi4757, LmjF36.01.20040630.V4.0 (*L.major*), LI0706f02.p1k (*L.infantum*), brazil1129f08.q1k (*L.braziliensis*)⁴44
- Figura 11 - Alinhamento da sequência de aminoácidos de SelT. Sec (U) é mostrado em vermelho e o correspondente Cys em azul. Resíduos conservados estão em destaque. ORFs foram preditadas com as seguintes sequências: tviv326d03.p1k_1 and tviv326d03.p1k_2 (*T.vivax*), gamb21f07.q1k_2 (*T.gambiense*), Tb927.5.860 and Tb927.5.870 (*T.brucei brucei*), congo270d08.q1k_5 and congo270d08.q1k_6 (*T.congolense*), Tc00.1047053505163.60 and Tc00.1047053505163.70 (*T.cruzi*), LmjF35.1110 (*L.major*), LI0881h10.q1k (*L.infantum*), brazil1006d02.p1k and brazil74d01.q1k (*L.braziliensis*)⁴46
- Figura 12 - Alinhamento da sequência de aminoácidos de SelTryp. Sec (U) é mostrado em vermelho e os resíduos conservados estão em destaque. ORFs foram preditadas com as seguintes sequências: Tc00.1047053507485.100 (*T.cruzi*), tviv195d03.q1k_2 (*T.vivax*), Tb927.4.3410 (*T.brucei brucei*), gamb564d12.p1k_15 (*T.gambiense*), congo936h09.q1k_1 (*T.congolense*), LmjF34.0950 (*L.major*), LinJ34.0860 (*L.infantum*). Localização do domínio rodanes, metalo- β -lactamase e motivo CxxU estão indicados⁴49

- Figura 13 - Gráficos da porcentagem de inibição do crescimento de cultura celular de *T. brucei* forma procíclica (A), *T. brucei* forma sanguínea (B) e *L. major* promastigota (C) pelo composto Auranoфин. Os valores de LD₅₀ foram calculados usando a equação da curva representativa, obtida com o programa SigmaPlot. 74
- Figura 14 - Colocalização da proteína TbSPS2/SelD com proteínas citoplasmáticas. A imagem mostra contraste de fase; DAPI (N: núcleo e K: cinetoplasto); TbSPS2; marcador citoplasmático e a sobreposição de imagens (merge). A: marcador citoplasmático: TbEiF2α. B: marcador citoplasmático: TbHSP70. Barra: 5µm. Aumento de 100 vezes. 79
- Figura 15 - Colocalização da proteína TbSelB com proteínas citoplasmáticas. A imagem mostra contraste de fase; DAPI (N: núcleo e K: cinetoplasto); TbSelB; marcador citoplasmático e a sobreposição de imagens (merge). A: marcador citoplasmático: TbEiF2α. B: marcador citoplasmático: TbHSP70. Barra: 5µm. Aumento de 100 vezes. 81
- Figura 16 - Localização celular de proteínas da via de síntese de selenocisteína em *T. brucei* forma procíclica. SPS2 e SelB não são observadas no núcleo. A imagem mostra contraste de fase; DAPI (N: núcleo e K: cinetoplasto); TbSelB; marcador citoplasmático e a sobreposição de imagens (merge). Barra: 5µm. Aumento de 100 vezes. 83
- Figura 17 - Diminuição no crescimento celular após depleção de SPS2. A. Curva de crescimento de *T. brucei* procíclico contendo o plasmídeo p2T7^{TABlue}/SPS2, induzido para RNAi (+tet) ou não (-tet) com tetraciclina. A curva foi iniciada em 5 x 10⁵ células/mL e as células foram diluídas após 4 dias de indução. B. Análise de RT – PCR em gel de agarose 1 %. Superior: oligonucleotídeos de TbSPS2 (531pb). Inferior: TbGAPDH (244pb). (-) sem tetraciclina; (+24) 24 horas após a adição de tetraciclina e (+96) 96 horas após a adição de tetraciclina. C. Curva de crescimento de *T. brucei* forma procíclica não transfectada (2913). Curvas representativas de experimentos múltiplos (n>3). 86
- Figura 18 - Localização de TbSPS2 em células RNAi TbSPS2. Não induzidas (-Tet) na fase G2 (A) e G1 do ciclo celular (B). Induzidas, tratadas por 48 horas com tetraciclina, (+Tet) na fase G1 (C), Mitose (D), G2 (E) e G1 e G2 (F) do ciclo celular (B). Fase: Contraste de Fase; DAPI: corante específico de DNA, evidenciando núcleo e kinetoplasto. TbSPS2: Imunofluorescência da proteína TbSPS2. Todas as imagens foram obtidas com a mesma exposição. Aumento de 100 vezes. 89
- Figura 19 - Depleção de SPS2 causa aumento no número de células zooídes e multinucleadas. (A) Células SPS2 induzidas (+Tet) ou não (-Tet) com tetraciclina, coradas com DAPI e visualizadas em microscópio de fluorescência. (B) Células SPS2 tratadas por 2 e 6 dias com tetraciclina (+Tet) ou não (-Tet) foram coradas com DAPI e o número de núcleos (N) e cinetoplastos (K) quantificados. Barra = 5µm. Aumento de 100 vezes. 93
- Figura 20 - Depleção de SPS2 sob regime de diluição diária não causa alteração no crescimento celular. A. Curva de crescimento de *T. brucei* procíclico contendo plasmídeo p2T7^{TABlue}/SPS2, induzido para RNAi (+Tet) ou não (-Tet). A curva foi iniciada em 1 x 10⁶ células/mL e o meio foi trocado a cada 24 horas e as células novamente diluídas para 1 x 10⁶ células/mL. B. Mesmo experimento Foi realizado com *T. brucei* procíclico não transfectado. Curvas representativas de experimentos múltiplos (n>3). 96

- Figura 21 - Análises de citometria de fluxo de células RNAi de TbSPS2. A. Gráfico de FACS (citometria - Fluorescence Activated Cell Sorter) do conteúdo de DNA de células controle não induzidas (-Tet) e induzidas (+Tet) após 4 dias de indução do RNAi, nas condições de diluição diária (DD) e sob estresse (DT4). Picos correspondente à DNA degradado (C<C1), fase G1 do ciclo celular (C1) e G2 (C2) estão indicados, sendo C a quantidade de DNA da célula. B. Histograma de comparação das porcentagens de células em cada fase. (NI) células RNAi TbSPS2 não induzidas, sem tetraciclina; (I) células RNAi RNAi TbSPS2 induzidas, com tetraciclina..... 97
- Figura 22 - Depleção de TbSPS2 em diferentes regimes de diluição da cultura. A. Curva de crescimento de *T.brucei* forma sanguínea contendo plasmídeo p2T7^{TABlue}/SPS2, induzido para RNAi (+Tet) ou não (-Tet) com tetraciclina. A curva em preto foi iniciada em 1×10^5 células/mL e diluídas diariamente. A curva em vermelho representa curva iniciada em 5×10^4 células/mL, diluída após 4 dias de indução. B. Análise de RT – PCR em gel de agarose 1%. Superior: oligonucleotídeos de TbSPS2 (531pb). Inferior: TbGAPDH (244pb). (-) sem tetraciclina; (+24) 24 horas após a adição de tetraciclina e (+96) 96 horas após a adição de tetraciclina. 99
- Figura 23 - Teste de dosagem de peróxido de hidrogênio em *T. brucei* procíclico. Gráfico de número de células ($\times 10^6$ /mL) a diferentes concentrações: 0. Controle – sem peróxido de hidrogênio. 1. $1\mu\text{M}$ H₂O₂. 10. $10\mu\text{M}$ H₂O₂. 20. $20\mu\text{M}$ H₂O₂. 40. $40\mu\text{M}$ H₂O₂. Tabela: porcentagem de inibição do crescimento da cultura causado pelas diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio. 100
- Figura 24 - Sensibilidade de *T. brucei* RNAi TbSPS2 forma procíclica (A - PCF) e forma sanguínea (B - BSF) e *T. brucei* não transfetado (C) a peróxido de hidrogênio. As células foram diluídas diariamente para 1×10^6 células/mL (PCF) e 1×10^5 células/mL (BSF) na presença (+Tet, linha contínua) e ausência de tetraciclina (-Tet, linha contínua), e na presença (+Tet + H₂O₂, linha pontilhada) e ausência de tetraciclina com H₂O₂ (-Tet +H₂O₂, linha pontilhada). As curvas são representativas de múltiplos experimentos (n≥3)..... 101
- Figura 25 - Depleção de TbSelK em diferentes regimes de diluição da cultura. A. Curva de crescimento de *T.brucei* forma procíclica contendo plasmídeo p2T7^{TABlue}/SelK, induzido para RNAi (+Tet) ou não (-Tet) com tetraciclina. (A) Curva iniciada em 5×10^5 células/mL, diluída após 4 dias de indução. (B) Curva iniciada em 1×10^6 células/mL e diluídas diariamente. Gráfico representativo de experimento repetido 3 vezes. 106
- Figura 26 - Análise de RT – PCR em gel de agarose 1%. Superior: oligonucleotídeos de TbSelK (198pb). Inferior: TbGAPDH (244pb). (2913) cultura não transfetada; (-) sem tetraciclina; (+) com tetraciclina; (SelK) cultura transfetada com plasmídeo p2T7^{TABlue}/SelK; (-) sem tetraciclina; (+48) 48 horas após a adição de tetraciclina e (+72) 72 horas após a adição de tetraciclina. 106
- Figura 27 - Depleção de TbSelT em diferentes regimes de diluição da cultura. A. Curva de crescimento de *T.brucei* forma procíclica contendo plasmídeo p2T7^{TABlue}/SelT induzido para RNAi (+tet) ou não (-tet) com tetraciclina. (A) Curva iniciada em 5×10^5 células/mL, diluída após 4 dias de indução. (B) Curva iniciada em 1×10^6 células/mL e diluídas diariamente. Gráfico representativo de experimento repetido 3 vezes. 107
- Figura 28 - Análise de RT – PCR em gel de agarose 1%. Superior: oligonucleotídeos de TbSelT (183pb). Inferior: TbGAPDH (244pb). (2913) cultura não transfetada; (-) sem

tetraciclina; (+) com tetraciclina; (SelT) cultura transfectada com plasmídeo p2T7^{TABlué}/SelT; (-) sem tetraciclina; (+72) 72 horas após a adição de tetraciclina..... 107

Figura 29 - Depleção de TbSelTryp em diferentes regimes de diluição da cultura. A. Curva de crescimento de *T. brucei* forma procíclica contendo plasmídeo p2T7^{TABlué}/SelTryp induzido para RNAi (+Tet) ou não (-Tet) com tetraciclina. (A) Curva iniciada em 5×10^5 células/mL, diluída após 4 dias de indução. (B) Curva iniciada em 1×10^6 células/mL e diluídas diariamente. Gráfico representativo de experimento repetido 3 vezes. 108

Figura 30 - Análise de RT – PCR em gel de agarose 1%. Superior: oligonucleotídeos de TbSelTryp (182pb). Inferior: TbGAPDH (244pb). (2913) cultura não transfectada; (-) sem tetraciclina; (+) com tetraciclina; (SelTryp) cultura transfectada com plasmídeo p2T7^{TABlué}/SelTryp; (-) sem tetraciclina; (+72) 72 horas após a adição de tetraciclina..... 108

Figura 31 - Células com expressão de TbSelK e TbSelT reduzida (4 dias após a indução do RNAi) apresentam maior sensibilidade à β -mercaptoetanol. Células selvagem (2913), RNAi SelK e RNAi SelT foram mantidas em cultura com adição (+) ou não (-) de tetraciclina por 4 dias. Em seguida foram tratadas com 2,5 mM de β -mercaptoetanol por 4 horas. Os experimentos foram feitos em triplicatas..... 110

Figura 32 - Depleção de TbSelK e TbSelT (4 dias após a indução do RNAi) resulta em maior sensibilidade a tunicamicina. Células selvagem (2913), RNAi SelK e RNAi SelT foram mantidas em cultura com adição (+) ou não (-) de tetraciclina por 4 dias. Em seguida foram tratadas com 10 μ g/mL de tunicamicina por 24 horas. Os experimentos foram feitos em triplicatas..... 110

Figura 33 - Sensibilidade de *T. brucei* forma procíclica (A) selvagem, (B) *T. brucei* RNAi TbSelK e (C) TbSelT a peróxido de hidrogênio. As células foram diluídas diariamente para 1×10^6 células/mL na presença (+Tet, linha contínua) e ausência de tetraciclina (-Tet, linha contínua), e na presença (+Tet + H₂O₂, linha pontilhada) e ausência de tetraciclina com H₂O₂ (-Tet +H₂O₂, linha pontilhada). As curvas são representativas de múltiplos experimentos (n \geq 3). 112

Lista de Abreviaturas

AARS –aminoacil – tRNA sintetase
ATP – adenosina trifosfato
bp – pares de base (*base pairs*)
BSA – albumina sérica bovina
Ca²⁺ – Cálcio
cDNA – DNA complementar
Cys – Cisteína
DAPI – 4,6-diamino-2-fenilindol
DEPC – dietil pirocarbonato
DIOs – deiodinases
DO - densidade ótica
DNA – ácido desoxiribonucléico
dNTP – desoxiribonucleotídeo trifosfato
DMSO –dimetilsulfóxido
dsRNA – RNA de fita dupla (double strand RNA)
DTT – ditioneitol
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
eIF – fator de iniciação de eucariotos (*eukaryotic initiation factor*)
EFSec – fator de alongação de tradução para inserção de selenocisteína em eucariotos
FACS –*Fluorescence Activated Cell Sorter*
g- gravidade
GAPDH –gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GDP – guanosina difosfato
GFP– proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*)
GPxs - glutaciona peroxidases
GTP – guanosina trifosfato
H₂O₂ - peróxido de hidrogênio
Ig – imunoglobulina
IPTG –isopropil-tio-β-D-galactopiranosídeo
K – cinetoplasto
kDa - Quilodaltons
LB – meio Luria-Bertani
mRNA – RNA mensageiro
M – Molar
MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
N - núcleo
O₂ - Oxigênio molecular
OMS - Organização Mundial de Saúde
ORF – fase aberta de leitura (*Open Reading Frame*)

|

pb – pares de base
PBS – tampão fosfato-salina
PCR – reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)
PMS - fenazina metossulfato
PMSF – fluoreto de fenil metil sulfonila
PSTK -O-fosfoseril-tRNA quinase
RE – Retículo Endoplasmático
RNA – Ácido Ribonucléico
RNAi – interferência de RNA (*RNA interference*)
RNS - espécies reativas de nitrogênio (*Reactive Nitrogen Species*)
RT-PCR - reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase
ROS – espécie reativa de oxigênio (*Reactive Oxygen Species*)
SBP2 – proteína ligadora à SECIS (*SECIS Binding Protein*)
SDS -dodecil sulfato de sódio
SDM – meio semi-definido (*semi-defined medium*)
Se – Selênio
Sec – selenocisteína
SECIS – sequência de inserção de selenocisteína (*Selenocysteine Insertion Sequence*)
SFB – soro fetal bovino
SeIA - selenocisteína sintase
SeIB - fator de alongação de tradução para inserção de selenocisteína em procariotos
SeID/ SPS - selenofosfato sintetase
SL – sequência líder (*Spliced leader*)
SepSecS - Sep-tRNA:Sec-tRNA sintase
SerRS – Seril – tRNA sintetase
tRNA – RNA transportador
Trx - tiorredoxina
TRxRs - tiorredoxina redutases
TXN - triparredoxina
UPR – resposta à proteína mal enovelada (*Unfolded Protein Response*)
UTR – região não traduzida (*Untranslated Region*)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Selenocisteína	23
1.1.1	Biossíntese e incorporação em selenoproteínas	25
1.1.2	Selenofosfato Sintetase (SPS2/SelD).....	28
1.2	Selenoproteínas	30
1.3	Protozoários parasitas - <i>Trypanosoma</i>	34
1.3.1	Estresse oxidativo e de retículo endoplasmático em parasitas	35
1.3.2	<i>Trypanosoma brucei</i>	36
1.3.3	Ciclo de Vida	37
1.3.4	Interferência de RNA (RNAi).....	39
1.4	Selenocisteína e Selenoproteínas de Tripanossomatídeos.....	41
1.4.1	Selenoproteína K – SelK	42
1.4.2	Selenoproteína T – SelT.....	45
1.4.3	SelTryp.....	48
1.4.4	Auranofin.....	51
2	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	53
3	MATERIAIS E MÉTODOS	55
3.1	Parasitas	55
3.1.1	<i>Trypanosoma brucei</i> procíclico	55
3.1.2	<i>Trypanosoma brucei</i> forma sanguínea.....	57
3.1.3	<i>Leishmania major</i> , forma promastigota.....	57
3.2	Ensaio de viabilidade celular – Auranofin.....	58
3.2.1	Teste colorimétrico – MTT	58
3.2.2	Cálculo do LD ₅₀	59
3.3	Extração de DNA genômico.....	60
3.4	PCR, Clonagem e Sequenciamento	60
3.5	Imunolocalização.....	61
3.6	RNAi de <i>Trypanosoma brucei</i>	63
3.6.1	Construção do vetor p2T7 ^{TABlue} /gene de interesse	63
3.6.2	Transfecção celular.....	64
3.6.3	Análise fenotípica por curva de crescimento.....	65
3.6.4	Extração de RNA e RT-PCR	65
3.6.5	Análise fenotípica – morfologia e conteúdo de DNA.....	66

3.6.6	Análise fenotípica – ciclo celular	67
3.7	Indução de estresse	67
3.7.1	Estresse Oxidativo – Peróxido de Hidrogênio	67
3.7.2	Estresse de retículo endoplasmático	68
3.8	Produção de anticorpos e Western Blot	68
3.8.1	Peptídeos Sintéticos	68
3.8.2	Expressão e purificação de proteínas recombinantes.....	69
3.8.3	Produção de anticorpos policlonais	71
3.8.4	Preparo de extrato protéico de <i>T. brucei</i>	71
3.8.5	Western blot.....	72
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
4.1	Avaliação da atividade tripanocida - Auranofin	74
4.2	Localização celular de proteínas da via de síntese de selenocisteína	76
4.3	Silenciamento de SPS2/SelD de <i>T. brucei</i>	85
4.3.1	Análise fenotípica por crescimento da linhagem RNAi – forma procíclica.....	85
4.3.2	Imunofluorescência da linhagem RNAi – forma procíclica.....	87
4.3.3	Efeitos do silenciamento de TbSPS2 na morfologia celular.....	91
4.3.4	Análise do efeito do silenciamento de TbSPS2 sobre o crescimento celular (Diluição diária)	95
4.3.5	Efeitos do silenciamento de TbSPS2 no ciclo celular.....	97
4.3.6	Análise fenotípica por crescimento da linhagem RNAi – forma sanguínea	98
4.3.7	Depleção de SPS2 em estresse oxidativo	99
4.4	Selenoproteínas.....	105
4.4.1	Depleção de TbSelK e TbSelT.....	105
4.4.2	Depleção de TbSelTryp	108
4.4.3	Efeito do silenciamento de SelK e SelT em diferentes tipos de estresse	109
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	115
5.1	Perspectivas	121
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	123
	ANEXOS.....	147

1 INTRODUÇÃO

O selênio é um elemento químico raro, sendo apenas o 70º em abundância entre os 88 elementos que ocorrem naturalmente na crosta terrestre⁵. Apesar de sua escassez, tem papel fundamental na vida animal e em particular na de seres humanos⁶. O selênio pode ser incorporado em proteínas na forma de selenometionina e principalmente, na forma do 21º aminoácido, selenocisteína (Sec, U)^{3; 7; 8}. O aminoácido Sec é co-traducionalmente inserido em polipeptídeos crescentes em resposta ao códon UGA, convencionalmente reconhecido como sinal de parada da tradução^{7; 8}. O modo como o ribossomo interpreta o códon UGA como Sec e não como sinal de terminação é resultado de uma maquinaria que envolve RNA e fatores protéicos³. Assim, a síntese e inserção desse aminoácido requerem uma complexa via biossintética. Em bactérias a biossintese de selenocisteína e sua incorporação já foi elucidada, ao passo que nos últimos anos estudos em eucariotos têm possibilitado a identificação de fatores e mecanismos envolvidos nessa via³.

As proteínas que contêm o aminoácido Sec são denominadas selenoproteínas e estão presentes nos três domínios da vida, mas não em todas as espécies de bactérias, arqueas e eucariotos. A deficiência de selênio é associada

com diversas desordens humanas, incluindo câncer, doenças cardiovasculares, infertilidade masculina e supressão do sistema imune. As selenoproteínas são peças importantes em uma variedade de processos biológicos essenciais, atuando como oxidoredutases que protegem e reparam componentes celulares, regulando o estado redox de proteínas^{9; 10}.

Eucariotos e procariotos apresentam selenoproteoma (conjunto de selenoproteínas) muito variável, havendo organismos que não apresentam (plantas superiores e fungos) e outros com um repertório de até 30 selenoproteínas (peixes e algas)⁹. Poucos estudos têm examinado a função de selenoproteínas em patógenos humanos, muitos dos quais, eucariotos ou procariotos, dependem de selenoproteínas para sua sobrevivência. A reatividade única da selenocisteína e a maquinaria especializada para a síntese de selenoproteínas as tornam alvos atraentes para o desenvolvimento de agentes antimicrobianos¹⁰. Além disso, a distribuição evolutiva de Sec em eucariotos é difusa¹¹ e o ambiente em que cada organismo vive e a disponibilidade de selênio parece direcionar a evolução dessa classe de proteínas⁹. Portanto, o estudo da distribuição e função das selenoproteínas pode ajudar no entendimento da evolução dos selenoproteomas e esclarecer as vantagens e desvantagens na utilização de Sec⁹.

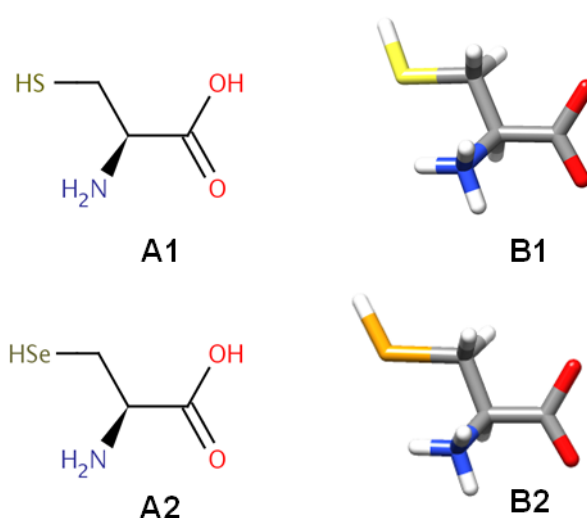
Muitos parasitas eucariotos apresentam alto impacto na saúde humana, e selenoproteínas foram identificadas e sugeridas como um possível alvo para o desenvolvimento de fármacos contra platelmintos e *Plasmodium*^{12; 13; 14}. Em 2006, proteínas da via de síntese de selenocisteína e selenoproteínas foram identificadas em protozoários flagelados da ordem Kinetoplastida^{4; 15} e a função dessas proteínas permanece desconhecida. Nesse contexto, este trabalho aborda o estudo de uma proteína essencial na síntese do aminoácido selenocisteína, a selenofosfato sintetase, e das selenoproteínas encontradas no protozoário parasita *Trypanosoma brucei*.

1.1 Selenocisteína

O elemento selênio foi descoberto em 1817 pelos cientistas suecos J. J. Berzelius e J. G. Gahne em meados de 1950 foi definido como um micronutriente essencial à saúde¹⁶. No início de 1970 sua atividade biológica foi atribuída à incorporação desse elemento na forma de selenocisteína (Sec)¹⁷ e foi estabelecido como um aminoácido em 1986, quando foi descoberto que os genes codificando para glutathione peroxidase de rato¹⁸ e formato desidrogenase de *Escherichia coli*¹⁹ apresentavam um códon TGA em fase¹⁷, levando a descoberta da inserção co-traducional de Sec.

A estrutura química da selenocisteína é similar à da cisteína, diferindo apenas pela substituição do enxofre pelo selênio na cadeia lateral (Figura 1). O efeito combinado das diferenças físico-químicas entre esses elementos, ou seja, o maior raio atômico do selênio em comparação com o enxofre, levando a sua maior polarização e o maior comprimento da ligação Se-Se, determinam as diferenças bioquímicas entre os resíduos de aminoácidos selenocisteína e cisteína encontrados em proteínas²⁰.

Figura 1 - Representações 2D e 3D dos aminoácidos A1-B1) L-cisteína e A2-B2) L-selenocisteína. Em vermelho é representado o oxigênio, em azul o nitrogênio, em amarelo o enxofre e em laranja o selênio.



Fonte: Elaborado pelo autor, usando os programas *Marvin Sketch* e *UCSF Chimera*.

Um único átomo de selênio encontrado em selenoproteínas na forma de Sec é energeticamente muito custoso para ser sintetizado pelo organismo, uma vez que um número grande de fatores celulares é dedicado a redefinir o códon UGA como códon de inserção de Sec, e não como códon de parada²¹. Muitos organismos apresentam versões de proteínas contendo cisteína no lugar de selenocisteína. Não há um modelo que explique a manutenção de selenoproteínas nos genomas em substituição a cisteína²¹. As oxidoredutases que contem cisteína, por exemplo, são mais comuns na natureza do que as selenoproteínas e apesar de sua expressão ser esporádica, análises evolutivas indicam que a taxa de troca entre Cys e Sec é muito baixa²². Isso não deve ser interpretado como uma pressão evolutiva ou vantagem das selenoproteínas, mas ilustra o fato que deve haver diferenças funcionais entre os aminoácidos^{21; 22}.

Uma diferença evidente é o pKa igual a 5,2 para o selenolato da selenocisteína e 8,5 para o tiolato da cisteína. Deste modo, em pH fisiológico, a selenocisteína está desprotonada sendo mais propensa a atuar em reações de oxidorredução, uma das principais funções das selenoproteínas. Porém, muitas proteínas homólogas contendo cisteína no lugar de selenocisteína mantêm a capacidade antioxidante^{21; 23}. Para tal comparação, deve-se levar em consideração o microambiente da estrutura proteica na qual está inserido o aminoácido selenocisteína²¹. Além disso, ao se comparar a eficiência catalítica de reações enzimáticas envolvendo mutantes de selenoproteínas com cisteína no lugar de selenocisteína verificou-se uma eficiência de 10 a 100 vezes menor, não justificando, portanto, o maior gasto energético para a produção de selenocisteína, considerando toda a maquinaria de síntese e incorporação desse aminoácido em proteínas²².

Em 2010 E. S. J. Arnér²¹ levantou a hipótese que a característica que torna uma selenoproteína única em sua função é a maior nucleofilicidade do selênio presente na selenocisteína em comparação ao enxofre da cisteína. Deste modo a selenocisteína, como resíduo catalítico, leva a uma maior taxa de reação com eletrófilos quando comparada à cisteína na mesma posição, sendo que a última atuaria apenas mantendo o equilíbrio redox e não seria capaz de mimetizar a ação da selenocisteína mesmo no microambiente químico de uma proteína.

1.1.1 Biossíntese e incorporação em selenoproteínas

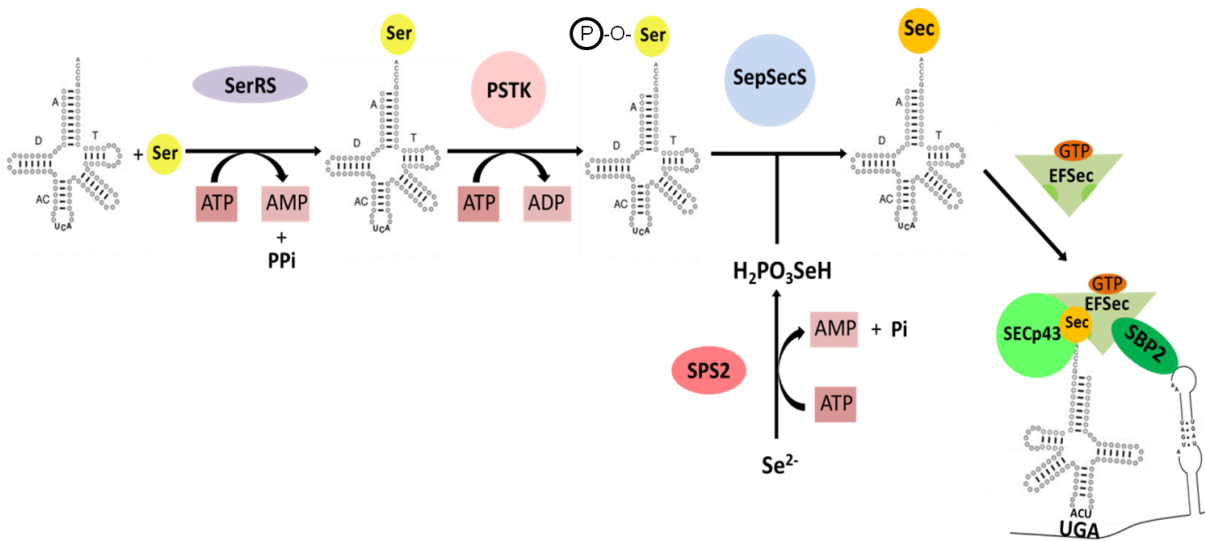
Sec é um aminoácido peculiar uma vez que seu códon de inserção corresponde a um dos códons de parada (UGA). A presença de uma estrutura em grampo, chamada de Sequência de Inserção de Selenocisteína (SECIS, Selenocysteine Insertion Sequence), no RNA mensageiro de selenoproteínas é o sinal de inserção que permite a maquinaria de tradução distinguir o códon UGA entre Sec ou parada. Em bactérias o elemento SECIS está localizado imediatamente após o códon UGA, enquanto em eucariotos e arqueas se localiza na região 3'UTR²⁴. Além disso, Sec não apresenta uma aminoacil – tRNA sintetase (AARS) correspondente²⁴. AARSs são as enzimas responsáveis por fazer a “leitura” do código genético, selecionando o aminoácido correto e esterificando-o ao tRNA cognato. Um requisito para esse processo é a presença de aminoácidos livres na célula e Sec não é sintetizado livre, ocorrendo diretamente no tRNA²⁴, portanto a síntese de Sec é entrelaçada com a formação do Sec-tRNA. Pode-se dividir o processo nos seguintes passos, ilustrados na Figura 2:

1 - Carregamento do tRNA^{Sec} com L-serina, consumindo ATP, em uma reação catalisada pela enzima seril-tRNA sintetase (SerRS)²⁴.

2 - Em bactérias, o Ser-tRNA^{Sec} é diretamente convertido a Sec-tRNA^{Sec} pela ação da enzima selenocisteína sintetase (SelA). Selenofosfato é o doador de selênio e é produzido pela enzima selenofosfato sintetase (SelD)^{25; 26}. Em arqueas e eucariotos ocorre uma fosforilação intermediária catalisada pela enzima O-fosfoseril-tRNA quinase (PSTK). O Ser-tRNA^{Sec} é então fosforilado, formando Sep-tRNA^{Sec} na presença de ATP e magnésio²⁷.

3 - A enzima Sep-tRNA:Sec-tRNA sintase (SepSecS) realiza a última etapa da síntese de selenocisteína: a conversão de Sep-tRNA^{Sec} à Sec-tRNA^{Sec}, removendo o grupo hidroxil da cadeia lateral da serina, formando um intermediário que serve como aceptor de seleno-fosfato, gerando a selenocisteína²⁸. Como em procariotos, o monoselenofosfato é o doador ativo de selênio, obtido a partir de seleneto e ATP em uma reação catalisada pela selenofosfato sintetase, isoforma 2 (SPS2) em eucariotos³.

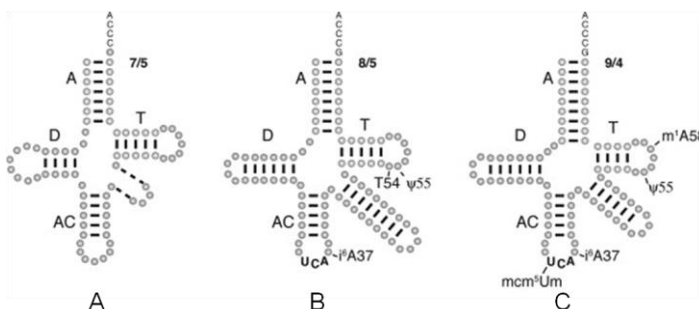
Figura 2 - Diagrama esquemático da via de síntese de selenocisteína em eucariotos.



Fonte: Adaptado de Stock, 2009²⁹.

Com 90 nucleotídeos, o tRNA^{Sec} é um dos maiores tRNA entre os eucariotos. Além dessa, outras características o tornam único: a presença do nucleotídeo modificado 5-metilaminometil-2 selenouridina (mnm5Se2U) na região do anticódon (posição 35) e o maior tamanho do braço D (diidriuridina) e do braço variável quando comparados aos demais tRNAs. Seu braço aceptor apresenta 9 pares de bases e o braço TΨC 4, obtendo-se assim um dobramento 9/4, enquanto nos tRNAs canônicos é 7/5 (Figura 3)³⁰. Com exceção do tRNA^{Sec}, todos os demais tRNAs são levados para o ribossomo pelo EF-TU em bactérias e eEF1A em eucariotos. O tRNA^{Sec} requer um fator de alongamento especializado, conhecido como SelB em bactérias³¹ e EFSec em eucariotos³², que se liga exclusivamente ao tRNA^{Sec}.

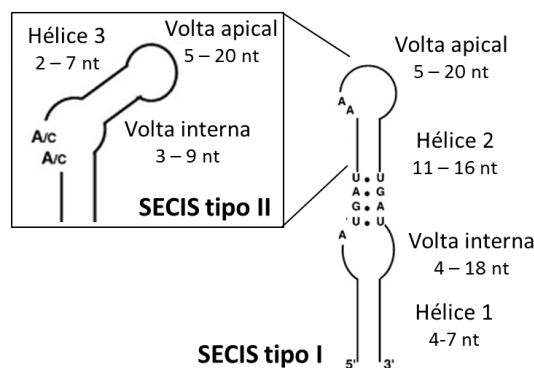
Figura 3 - Estrutura secundária de: A) tRNAs canônicos, B) tRNA^{Sec} de bactérias e C) tRNA^{Sec} de arqueias e eucariotos



Fonte: Elaborado pelo autor, <http://bioinformatica.upf.edu/2009/projectes09/By/trna.html>

O reconhecimento do códon UGA como inserção de selenocisteína e não um códon de parada de tradução requer uma estrutura secundária no mRNA de selenoproteínas na forma de grampo conhecida como SECIS. Essa estrutura apresenta quatro pareamentos não-Watson-Crick consecutivos, 2 voltas e 2 hélices. Em eucariotos são descritos dois tipos de SECIS, que se diferem pela presença de uma terceira hélice e uma volta apical menor no tipo II quando comparado ao tipo I³ (Figura 4).

Figura 4 - Estrutura consenso do elemento SECIS em eucariotos. São observados dois tipos de elemento SECIS: I e II. O elemento SECIS tipo II de eucariotos é mostrado na caixa.



Fonte: Adaptado de Allmang, 2009³.

Em *E. coli*, o elemento SECIS é reconhecido pelo fator de alongamento, SelB, que interage com alta especificidade com o selenocistenil-tRNA^{Sec}³³. A interação com ambos os RNAs (tRNA e mRNA) forma um complexo quaternário estável entre SelB, GTP, selenocistenil-tRNA^{Sec} e o elemento SECIS. A inserção de selenocisteína no polipeptídeo nascente ocorre no sítio A do ribossomo, após a hidrólise de GTP catalisada pela SelB³⁴. O fator de alongamento de eucariotos e arqueas, EFSec, também se liga especificamente ao tRNA^{Sec} e o direciona para o sítio A do ribossomo, mas não é capaz de interagir com SECIS³. A proteína SBP2 (do inglês *SECIS-Binding Protein*) é responsável pela interação entre SECIS e EFSec em eucariotos³⁵. SBP2 foi anotada em muitos genomas, mas sua função só foi caracterizada experimentalmente em ratos, humanos e *Drosophila melanogaster*^{35; 36; 37}. Em arqueias essa proteína não foi identificada e não se sabe como ocorre a interação entre SECIS e EFSec. Estudos recentes demonstraram ainda, que a proteína Secp43 aumenta a interação entre EF-Sec e SBP2 *in vivo*^{3; 38} e que a proteína ribossomal L30 se liga ao elemento SECIS e, portanto, deve estar envolvida no mecanismo de decodificação do códon UGA em eucariotos³. No

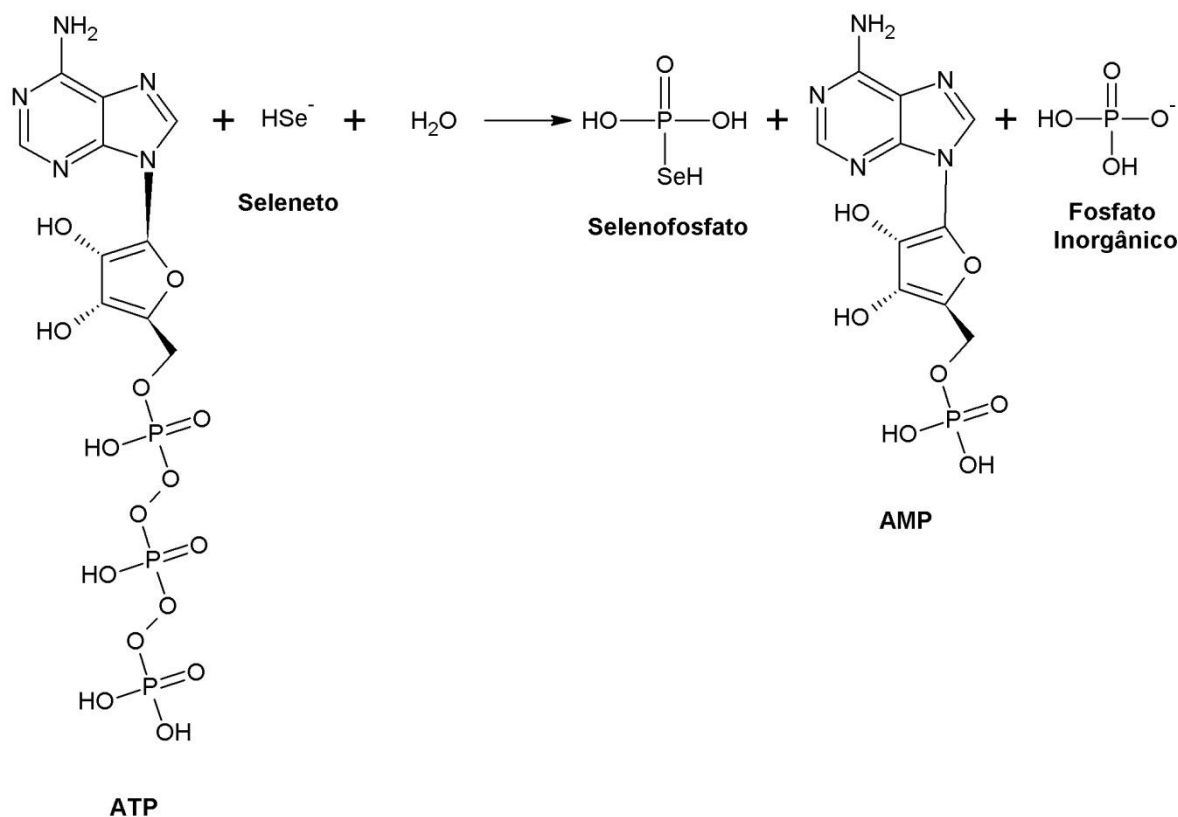
entanto essas proteínas não foram identificadas em todos os eucariotos, indicando diferenças no padrão de incorporação de selenocisteína.

Em eucariotos, o processo de transcrição é compartimentalizado no núcleo e o processo de tradução é citoplasmático. Allmang e colaboradores³, baseados em evidências experimentais³⁸, propuseram a formação de um complexo entre SPS1, Secp43, EF-Sec e selenocisteinil-tRNA^{Sec} e posterior reconhecimento do complexo formado pela SBP2 e o elemento SECIS no núcleo. O complexo final seria, então, exportado ao citoplasma, onde ocorria a incorporação de selenocisteína em uma selenoproteína em biossíntese no ribossomo.

1.1.2 Selenofosfato Sintetase (SPS2/SelD)

A enzima selenofosfato sintetase (SelD, SPS em eucariotos) de *E. coli* foi caracterizada por Leinfelder e colaboradores em 1990³⁹. Ensaios de complementação funcional de cepas de *E. coli* com o gene *selD* deletado demonstraram que a proteína SelD é necessária para a incorporação de selênio no nucleotídeo modificado 5-metilaminometil-2-selenouridina do tRNA^{Sec} e para a biossíntese de selenocisteína³⁹. SelD apresenta uma característica única dentro de sua superfamília de proteínas (aminoimidazol-ribonucleotídeo sintetase, AIRS), já que, enquanto as outras catalisam a hidrólise de ATP a ADP, a SelD consome ambas as ligações fosfoéster de alta energia do ATP⁴⁰, formando AMP. No início da década de 1990, estudos de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) mostraram que um derivado lábil contendo selênio, produto da reação catalisada pela enzima SelD de *E. coli*, era um composto que continha selênio ligado a um grupamento fosfato, o monoselenofosfato²⁶. A reação catalisada pela enzima SelD (EC 2.7.9.3), deste modo, foi proposta como sendo a mostrada na Figura 5. O grupamento fosfato do monoselenofosfato é derivado do γ -fosfato do ATP, enquanto o fosfato inorgânico é derivado do grupamento β -fosfato^{41; 42}. A enzima SelD catalisa a hidrólise do ATP a AMP também na ausência de seleneto, o que sugere que a quebra da ligação β - γ fosfoanidrido deve ser a primeira etapa do mecanismo de reação da enzima, independente da presença do seleneto no sítio ativo⁴³.

Figura 5 - Reação catalisada pela enzima selenofosfato sintetase



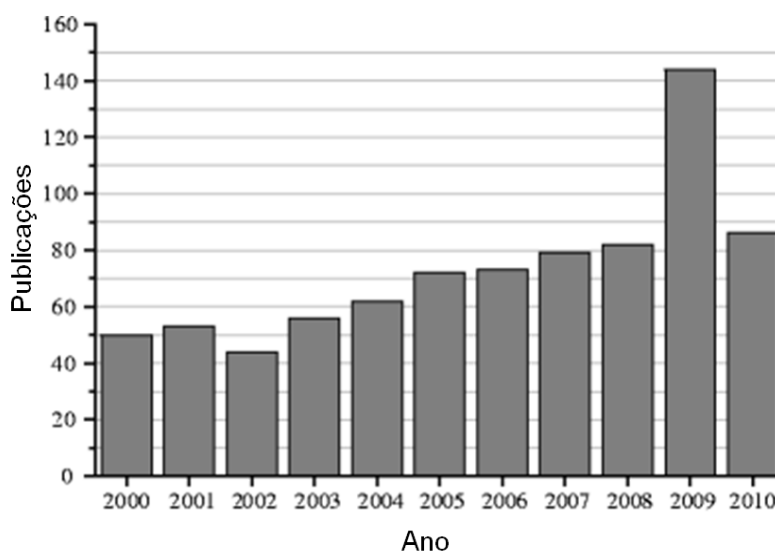
Fonte: Elaborado pelo autor, com o programa *ChemSketch*.

Em eucariotos, existem dois homólogos de selenofosfato sintetase, designados por SPS1 e SPS2. A enzima SPS2 foi identificada em mamíferos^{44; 45} e posteriormente em todos os eucariotos que contém selenoproteínas³. Em alguns eucariotos SPS2 é uma selenoproteína com Sec em seu sítio catalítico, sugerindo uma função de autorregulação, e ainda de regulação da síntese de selenoproteínas como um todo⁴⁶. Foi demonstrado que SPS2 sintetiza selenofosfato *in vitro* ao passo que a SPS1 não⁴⁷. O selenofosfato é o doador ativo de selênio para a síntese de selenocisteína, e estudos feitos por Xu *et al* 2007⁴⁶, mostram que a deleção do gene *sps2* em células de mamíferos (NIH3T3) inibe a expressão de selenoproteínas, enquanto a redução da expressão de SPS1 não afeta as células. Portanto SPS2 é essencial para a síntese de selenoproteínas, enquanto SPS1 teria uma função não relacionada com a via de síntese de selenocisteína^{46; 47}. Corrobora este fato a presença de SPS1 em insetos que não apresentam selenoproteínas e que não são capazes de sintetizar selenocisteína⁴⁸.

1.2 Selenoproteínas

As selenoproteínas têm atraído cada vez mais interesse da comunidade científica nos últimos 10 anos, como se observa pelo crescente número de publicações envolvendo o tópico (Figura 6). Apesar da dificuldade na identificação, o número de famílias tem expandido consideravelmente. No início foram experimentalmente descobertas^{49; 50} e hoje com ferramentas de bioinformática avançadas, muitas selenoproteínas foram identificadas computacionalmente e por comparação entre genomas^{13; 51; 52; 53; 54; 55}. Como reflexo disso, dezenas de famílias de selenoproteínas foram identificadas e os selenoproteomas de algumas espécies já está completamente elucidado^{11; 55; 56}. As famílias de selenoproteínas podem apresentar distribuição filogenética muito variada, sendo que algumas estão presentes apenas em procariotos, enquanto outras são exclusivas de eucariotos. E ainda, algumas apresentam distribuição extremamente restrita, não apresentando homólogos em nenhum outro genoma⁵³.

Figura 6 - Número de publicações científicas envolvendo o estudo de selenoproteínas (2000-2010).



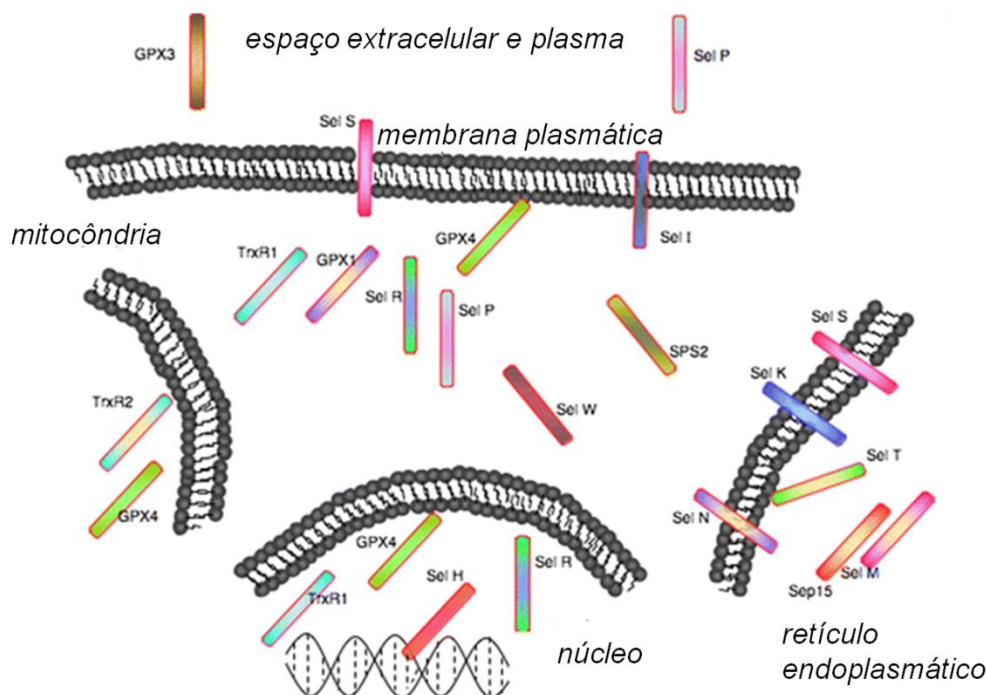
Fonte: Adaptado de Heras, 2011².

Apesar da deficiência de selênio na dieta humana ser uma possibilidade bastante remota devido a sua ampla distribuição geográfica nos solos, alguns casos foram relatados e associados a doenças como de Keshan, uma

miopatia cardíaca¹⁶ e de Kashin-Beck, uma osteoartrite endêmica em certas áreas do Tibete⁵⁷. Além dessas enfermidades, há evidência de que o cretinismo mixedematoso, caracterizado por retardo mental e de crescimento, esteja relacionado à deficiência em selênio e iodo, o que afeta o metabolismo dos hormônios tireoidianos⁵⁸. Deficiência moderada de selênio também tem sido relacionada à várias condições patogênicas, como aumento de risco ao câncer, infertilidade masculina, diminuição da atividade do sistema imune e da função da tireóide, além de várias condições neurológicas, incluindo doenças de Parkinson e Alzheimer⁶. Estudos realizados por Bosl, *et al* 1997⁵⁹, demonstraram a essencialidade de selenoproteínas para os mamíferos, uma vez que a deleção do gene de tRNA de selenocisteína, que controla toda a expressão de selenoproteínas, induziu a letalidade embrionária em camundongos.

O mecanismo molecular preciso da ação do selênio em condições fisiológicas e em algumas patologias ainda é desconhecido¹⁶. Entretanto, sabe-se que sua influência na saúde humana se deve, em grande parte, à sua presença em pelo menos 25 selenoproteínas, compreendendo cinco glutathione peroxidases (GPxs), três tioredoxina redutases (TRxRs), três deiodinases (DIOs) e as selenoproteínas H, I, K, N, O, S, T, W, SelP, SPS2, Sep15, SelM e MsrB1⁵⁶ (Figura 7).

Muitas selenoproteínas com funções parcialmente caracterizadas [SelH, Sell, SelM, SelN, SelS, SelT, SelW, selenoproteína 15-kDa (Sep-15)] são enzimas redox, pois apresentam selenocisteína em seu sítio ativo, o que tem sido associado a tal função, uma vez que Sec é um resíduo altamente reativo com baixo pKa (5.2) e ótimo nucleófilo em pH fisiológico⁶¹. Além disso, muitas possuem um dobramento tipo tioredoxina (Trx) (SelH, SelT, SelV, SelW⁶², SelM e Sep-15⁶³). O enovelamento Trx, descrito como um sanduíche formado por duas folhas $\alpha/\beta/\alpha$, um padrão de estrutura secundária tipo $\beta\alpha\beta\beta\alpha$ e um sítio ativo com motivo conservado CxxC ou CxxS/T é característico de muitas oxidoredutases (Trxs, glutaredoxinas, proteínas disulfide isomerases) envolvidas na regulação de processos redox⁶⁴.

Figura 7 - Exemplos de selenoproteínas humanas e sua variada localização celular.

Fonte: Adaptado de Reeves 2009⁶⁰.

A produção excessiva de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) pode levar a injúrias celulares como danos no DNA, mau envelhecimento proteico e peroxidação lipídica⁶⁵, capaz de modular o estado fisiológico da célula, sendo que o acúmulo pode levar a apoptose⁶⁶. Para se defenderem de possíveis efeitos deletérios de ROS as células mantêm sua capacidade antioxidante através de um conjunto de compostos (glutathiona, vitamina E, entre outros) e enzimas. Duas, das principais enzimas antioxidantes em mamíferos são selenoproteínas: glutathiona peroxidase (GPxs) e tiorredoxina redutase (TrxRs)⁶⁷. A glutathiona peroxidase é a mais abundante e é capaz de reduzir ROS a produtos inofensivos como água, acoplado com a oxidação de glutathiona⁶⁸. A tiorredoxina redutase está envolvida na proteção contra espécies reativas de oxigênio através do controle do estado redox da molécula tiorredoxina, usando NADPH como agente redutor⁶⁸.

A síntese de selenoproteínas em mamíferos depende da proteína SBP2^{16; 69}. Papp e colaboradores⁷⁰ demonstram que a depleção dessa proteína e consequente ausência de selenoproteínas na célula leva a substancial estresse oxidativo, induzindo parada no ciclo celular e danos severos em diversos

compartimentos celulares, como núcleo (dano no DNA), citoplasma (peroxidação lipídica) e retículo endoplasmático (formação de grânulos de estresse)⁷⁰.

Além da proteção antioxidante e regulação redox, as selenoproteínas também estão envolvidas no metabolismo de hormônios da tireóide (deiodinases), síntese de selenocisteína (selenofosfato sintetase)¹⁶, transporte e armazenamento de selênio (SelP)⁷¹ e manutenção da homeostase de proteínas no processo de envelhecimento (SelW)⁷². Algumas selenoproteínas estão localizadas no retículo endoplasmático (em mamíferos: DI2, SelS, M, N, T, K e Sep 15) e apesar de sua atividade catalítica e substrato não terem sido descritos⁶¹, elas parecem estar envolvidas no controle de qualidade do enovelamento de proteínas no RE⁷³, retrotranslocação de proteínas mal enoveladas do RE para o citosol^{74; 75} e regulação da homeostase de cálcio^{76; 77}.

O selenoproteoma de outros mamíferos é muito similar ao de humanos, ratos e camundongos⁹. Já o de peixes é o maior conhecido, contendo 30-37 selenoproteínas, sendo que algumas estão presentes em mais de uma cópia⁹. *Chlamydomonas* e outras algas verdes apresentam selenoproteínas enquanto plantas superiores e fungos não⁷⁸. O alto número de selenoproteínas na alga *Ostreococcus* (26-29)⁷⁹ fundamenta a hipótese de que organismos de habitat aquático possuem selenoproteoma maior devido à maior disponibilidade de selênio na água⁹. No extremo oposto está a redução de selenoproteomas. Os nematódeos apresentam apenas uma selenoproteína, a tiorredoxina redutase (TrxR)⁸⁰, sendo *C. elegans* e *C. briggsae* um interessante caso onde há um único códon UGA para inserção de Sec em todo o genoma⁹. Insetos também representam organismos com reduzido selenoproteoma, ou que perderam selenoproteínas ou apresentam proteínas homólogas contendo Cys⁴⁸. *Drosophila melanogaster* foi o primeiro eucarioto a ter seu selenoproteoma completamente elucidado, apresentando três selenoproteínas. Outros insetos apresentam de 1 a 3, sendo que o besouro *Tribolium castaneum* e o bicho da seda *Bombyx mori* não apresentam nenhuma. Esses insetos também perderam a via de síntese de selenocisteína e a maquinaria de inserção, mas apresentam a proteína SPS1⁴⁸ sendo, portanto, um bom modelo para o estudo da importância do selênio num panorama livre de selenoproteínas.

Os protozoários parasitas também apresentam selenoproteomas reduzidos. Quatro selenoproteínas com possível envolvimento em processos redox foram identificadas em *Plasmodium*¹³, sendo 3 homólogas a selenoproteínas

humanas (SelK, SelT e SelS) e uma proteína que não possui homologia conhecida⁸¹. Kinetoplastidas apresentam três selenoproteínas, sendo duas homólogas a de mamíferos (SelK e SelT) e uma exclusiva de tripanossomatídeos (SelTryp)⁴.

Em eucariotos primitivos a via de síntese de selenocisteína tem sido investigada com o intuito de se estudar sua evolução e utilização, tendo sido identificada em *Spironucleus barkhanus*⁸², *Naegleria gruberi* (manuscrito em processo) e *Trypanosoma*⁴. Entretanto, não se identificou selenoproteínas ou proteínas da via em eucariotos membros de clados antigos, como *Giardia intestinalis* e *Trichomonas vaginalis*⁸², indicando que essa via pode ter sido adquirida tardiamente, após a separação de eucariotos inferiores.

1.3 Protozoários parasitas - *Trypanosoma*

Protozoários parasitas não intestinais são responsáveis por significativa mortalidade e morbidade, estando dez milhões de pessoas em risco de exposição. Considerados juntos, protozoários patogênicos têm um profundo impacto socioeconômico e na saúde no panorama mundial. A falta de tratamentos efetivos aliada à resistência às drogas atuais enfatiza a necessidade de novas terapias e alvos terapêuticos⁸³.

A disponibilidade do genoma completo de muitos protozoários tem facilitado o entendimento de sua biologia, permitindo caracterizar vias pertinentes em seu metabolismo, como o estudo de processos de tradução, regulação da expressão gênica e resposta a estresse. Uma defesa eficaz contra estresse é crítica para sua sobrevivência, pois os parasitas experimentam uma variedade de ambientes adversos ao longo de seu ciclo de vida, tendo que ser capaz de transitar entre diferentes hospedeiros. Para isso precisam responder rapidamente a estresses ambientais, o que lhes garante sobrevivência, além da transmissão, resultando na progressão da doença⁸³.

Os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* compreendem protozoários flagelados, da classe Flagelata, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e pertencem a um grupo basal na árvore filogenética dos eucariotos. Englobam

diversos parasitas como, por exemplo, o gênero *Leishmania*, causador de leishmanioses, o *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas na América Latina e o *Trypanosoma brucei*, causador da Tripanosomíase Africana (Nagana em animais e doença do sono em humanos). Esses protozoários representam um grupo que se distinguem pela presença de uma organela singular denominada cinetoplasto (que dá nome à ordem dos kinetoplastidas). A parede do cinetoplasto representa parte da grande e única mitocôndria e contém uma estrutura de DNA capaz de se autoreplicar (maxi e mini círculos)^{84, 85}.

Estes protistas unicelulares têm um ciclo de vida complexo alternando entre insetos vetores (triatomíneos para *T. cruzi*, mosca tsé-tsé para *T. brucei* e *Phlebotomus* e *Lutzomyia* para *Leishmania*) e o hospedeiro mamífero. Por experimentar diversas condições ambientais necessita de rápidas mudanças na expressão gênica para preencher os requerimentos metabólicos ou morfológicos para sua sobrevivência⁸⁶.

1.3.1 Estresse oxidativo e de retículo endoplasmático em parasitas

Como consequência do metabolismo de oxigênio, todas as células eucarióticas geram espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS). Adicionalmente, algumas células efectoras da resposta imune exploram as propriedades tóxicas de ROS e RNS para combater a invasão de microrganismos através de uma 'explosão oxidativa'. O excesso de ROS, como ânions superóxidos, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), óxido nítrico (NO) e peroxinitrito ($ONOO^-$), criam uma situação de estresse, com potencial dano para o parasita. Portanto, como em outros organismos aeróbios, parasitas precisam se proteger desses ataques através de uma rede antioxidante, que consiste de componentes enzimáticos e não enzimáticos⁸³.

Kinetoplastidas não apresentam glutatona redutase e tioredoxina redutase, mas apresentam um derivado chamado tripanotiona e a correspondente tripanotiona redutase, usada para eliminar H_2O_2 ⁸⁷. Apresentam também um sistema de triparredoxina (TXN), distinto do sistema tioredoxina⁸³. Estudos de nocautes e RNAi de TXN em *T. brucei* mostraram que esse sistema é essencial para aviabilidade e virulência, bem como para a resistência ao estresse oxidativo^{88; 89}.

O estresse oxidativo pode também ser desencadeado indiretamente por condições estressantes no retículo endoplasmático⁹⁰. Esta é uma organela multifuncional onde ocorrem passos importantes de enovelamento e modificação de proteínas, bem como síntese de lipídios, transporte de vesículas, metabolismo de drogas e manutenção da homeostase de cálcio⁹⁰. Para tanto são necessárias algumas condições fisiológicas, como elevado nível de cálcio, ambiente oxidante e a presença de chaperonas. Essa organela é sensível, portanto, a mudanças nos níveis de cálcio, inibição de glicosilação, estresse oxidativo e exposição a agentes redutores, condições que levam a um estresse de retículo endoplasmático, que quando persistente pode induzir a apoptose celular⁹¹. A resposta à proteína não enovelada (UPR – *Unfolded Protein Response*) é um conjunto de vias de sinalização que protegem a célula desse estresse⁹². É descrita como uma resposta transcricional, presente em fungos, metazoários e plantas⁹³ e dada a divergente transcrição em protozoários, não é surpreendente que *Giardia lamblia* e *Trypanosoma brucei* não apresentem tal resposta^{94; 95}. Estudos recentes em *T. brucei* identificaram uma resposta tipo-UPR através da regulação do mRNA quando tratados por longo período e em altas doses de indutores de estresse de RE⁹⁶, como Tunicamicina (inibidor de N-glicosilação), Ditioneitol (DTT – agente redutor) e β -mercaptoetanol (agente redutor). Muitas selenoproteínas de mamíferos estão localizadas no retículo endoplasmático e parecem estar relacionadas com resposta a esse tipo de estresse.

1.3.2 *Trypanosoma brucei*

A Tripanossomose Africana Humana, também conhecida como doença do sono, é uma doença fatal pertencente ao grupo de doenças tropicais negligenciadas. Em 1986 era estimado que 70 milhões de pessoas viviam em risco de serem infectadas e embora progressos com controle da doença tenham sido feitos, o número atual de ocorrência estimado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) de 30.000 casos⁹⁷.

A infecção é causada por duas subespécies de *T. brucei* e transmitida por espécies específicas da mosca do gênero *Glossina*, sendo que sua localização esta correlacionada com distribuição da doença⁹⁸. *T. brucei gambiense* é transmitida

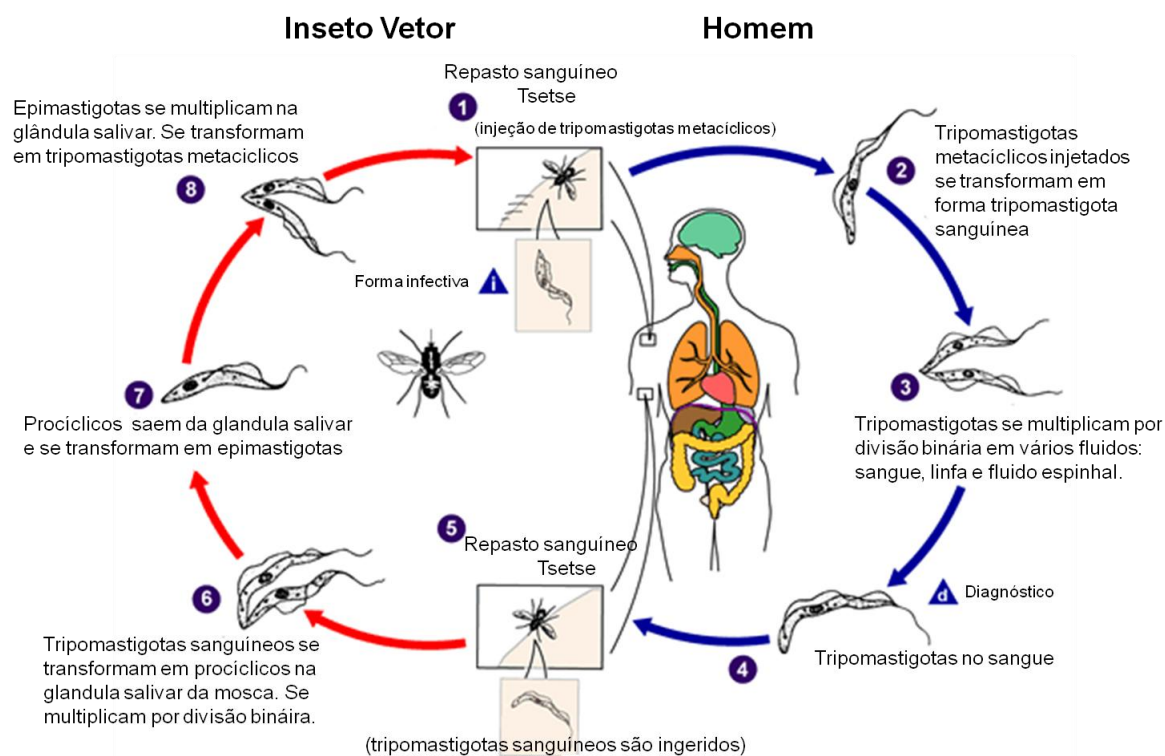
principalmente a humanos pela mosca *Glossina palpalis* que é endêmica no oeste e África central. *T. brucei rhodesiense* é transmitida por *Glossina morsitans* a humanos e animais domésticos (causando a doença conhecida como Nagana), que leva à forma aguda da doença no leste africano⁹⁸. Outra subespécie diretamente relacionada é o *T. brucei brucei*, entretanto esta não é infectiva ao homem e é frequentemente usada como um modelo para a tripanossomíase em animais de laboratório.

1.3.3 Ciclo de Vida

O *T. brucei* apresenta um ciclo de vida digenético, envolvendo formas que se diferem significativamente em muitos aspectos bioquímicos e metabólicos devido aos distintos ambientes em que vivem: no hospedeiro mamífero e no inseto vetor⁹⁹. Quando a mosca pica o hospedeiro, formas tripomastigotas metacíclicas de *T. brucei* presentes nas glândulas salivares são inoculadas na pele e entram na corrente sanguínea do hospedeiro mamífero. Estas formas irão se diferenciar em tripomastigotas sanguíneos, que se dividem por fissão binária no sangue, linfa e espaços extracelulares. Uma característica particular do *T. brucei* é que não existem formas intracelulares. As formas sanguíneas replicativas persistem no hospedeiro mamífero através do processo de variação gênica¹⁰⁰, o que gera a expressão sequencial de distintas glicoproteínas variáveis de superfície (VSGs) ligadas à superfície da membrana. O cinetoplasto está localizado na porção posterior terminal das células e a atividade mitocondrial está reprimida nestas formas, sendo a geração de energia dependente de reações glicolíticas compartmentalizadas em organelas especializadas chamadas de glicossomos¹⁰¹. Tripanossomas proliferam-se na corrente sanguínea na forma *slender*, e a partir de certo número de parasitas presentes são substituídos por formas *stumpy* não proliferativas¹⁰². Este processo possui dois propósitos. Primeiro, o acúmulo de células paradas na divisão limita o aumento no número de parasitas e assim prolonga a chance de sobrevivência do hospedeiro, aumentando a probabilidade da transmissão da doença. Segundo, a parada uniforme de formas *stumpy* na fase G1 do ciclo celular garante que mudanças morfológicas necessárias para a mudança de hospedeiro (transmissão para a mosca tsé-tsé) sejam coordenadas com a reentrada no ciclo celular¹⁰⁰. Após

novo repasto sanguíneo pela tsé-tsé em hospedeiro infectado, formas procíclicas são geradas, sendo estas capazes de proliferar no intestino da mosca. Formas procíclicas expressam proteínas de superfície distintas das formas sanguíneas; as VSGs são substituídas por prociclinas¹⁰³. Após a proliferação no intestino da tsé-tsé, o parasita migra para as glândulas salivares, onde são geradas as formas epimastigotas. Após multiplicação, o parasita se diferencia para uma forma não replicativa (tripomastigota metacíclico), readquirindo a capa de VSG, e é liberado no lúmen da glândula salivar em preparação para transmissão no novo hospedeiro mamífero, completando assim seu ciclo de vida¹⁰⁰. O esquema do ciclo celular está mostrado na Figura 8.

Figura 8 - Ciclo de vida do *T. brucei* no hospedeiro intermediário inseto, do lado esquerdo do ciclo e no hospedeiro definitivo homem, do lado direito do ciclo.



Fonte: Modificado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>.

Em humanos a doença do sono se manifesta com sintomas moderados, incluindo febre, dores de cabeça, dores nas articulações, e posteriormente, os parasitas atravessam a barreira sanguínea cerebral e

estabelecem a infecção cerebral. Nesse segundo estágio, o paciente sofre dores de cabeça severas, perda do sono noturno, desorientação mental, tremores na língua, mãos e pés e sonolência durante o dia, chegando ao estado de coma e morte devido às infecções oportunistas¹⁰⁴. A doença crônica é causada pelo *T. b. gambiense* onde na maioria dos casos o paciente é assintomático por meses ou anos. Quando os sintomas aparecem, os parasitas já infectaram o sistema nervoso central. O contrário acontece na infecção aguda, causada pelo *T. b. rhodesiense*. Neste caso, a doença rapidamente afeta o sistema nervoso central e é fatal em pacientes não tratados¹⁰⁴.

T. brucei é um modelo para estudos de mecanismos envolvendo interações hospedeiro-parasita e aspectos da biologia molecular e celular de protozoários da ordem Kinetoplastidae, sendo possível realizar ensaios como o de interferência de RNA, ferramenta valiosa e versátil para estudos da biologia do parasita, além de estarem disponíveis outras ferramentas genéticas.

1.3.4 Interferência de RNA (RNAi)

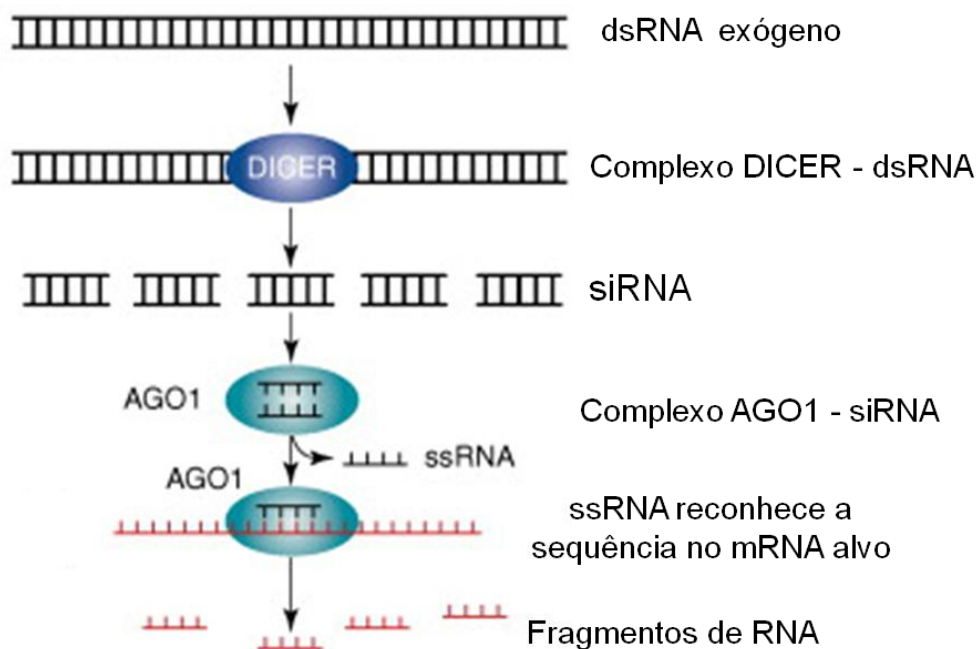
A descoberta que a dupla-fita de RNA desencadeia a inibição da expressão gênica, em um processo denominado RNA de interferência (RNAi), teve um profundo impacto no estudo da biologia de eucariotos, facilitando a análise da função gênica na era pós-genômica¹⁰⁵.

RNAi é um processo de “silenciamento” pós-transcricional da expressão gênica (PTGS), disparado pela presença de RNA dupla fita (dsRNA) cuja sequência é específica ao RNA mensageiro alvo que será degradado. Foi primeiramente descrito em 1998, onde os efeitos inesperados da injeção de moléculas dsRNAs nos vermes nemátodos *Caenorhabditis elegans* induziam o “silenciamento” gênico de maneira gene-específica e alguns animais apresentavam fenótipos mutantes¹⁰⁶. Em *T. brucei* a técnica foi originalmente demonstrada por Gull e colaboradores¹⁰⁷ e por Tschudi e colaboradores¹⁰⁸. Desde então, vários grupos geraram linhagens celulares e plasmídeos que integram estavelmente no genoma e expressam RNA dupla fita (dsRNA) de uma maneira induzível^{109; 110; 111; 112}.

O passo que dispara RNAi é a presença de moléculas de RNA dupla fita (dsRNA), que são clivados pelas enzimas DICERs (ribonucleases da família

RNase III), e fragmentos de siRNA (*small-interfering RNA*) são formados¹¹³. As duas fitas do dsRNA são separadas e incorporadas num complexo efetor que se liga diretamente a uma RNase pertencente a família Argonata, chamada AGO1 ou *Slicer*. O complexo formado chamado RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*) contém um pequeno RNA que serve como guia e então alveja especificamente as sequências complementares de mRNA e as degrada antes da tradução¹. Um esquema de funcionamento da maquinaria de RNAi em *T. brucei* está mostrado na Figura 9.

Figura 9 - Representação esquemática do sistema de RNAi em *T. brucei*.



Fonte: Modificado de Balana-Fouce and Reguera, 2007¹.

Em tripanosomas, o alvo do RNAi é o mRNA citoplasmático e a degradação pode ser ativada por um RNA dupla fita (dsRNA) sintético inserido nas células por eletroporação ou produzido *in vivo* a partir de transgenes transcritos de promotores da RNA polimerase do fago T7. Existem dois tipos de vetores para expressão de dsRNA em *T. brucei*. O primeiro envolve a clonagem de um fragmento de gene de interesse entre dois promotores e terminadores T7 opostos e o segundo

permite a expressão de uma estrutura tipo grampo de cabelo (*hairpin*) do gene de interesse¹¹⁰.

Atualmente, o mecanismo de RNAi constitui uma poderosa ferramenta no estudo da biologia molecular de parasitas tripanossomatídeos, permitindo a interferência específica de genes endógenos. Devido à natureza deste silenciamento (pós-transcricional e dominante), este mecanismo constitui uma técnica particularmente útil para o silenciamento da expressão gênica em organismos diplóides, onde o *knockout* tradicional de genes alvo seria altamente dispendioso (duplo *knockout*) e, no caso de genes essenciais, impossível. Por outro lado, os estudos realizados através deste mecanismo em *T. brucei*, permitem extrapolar os resultados obtidos para outras espécies de tripanossomatídeos, nas quais a maquinaria de silenciamento por RNA de interferência, não é competente.

1.4 Selenocisteína e Selenoproteínas de Tripanossomatídeos

Em Kinetoplastida a via de síntese de selenocisteína não foi explorada até recentemente. Experimentos iniciais de incorporação de selênio radioativo (Se^{75}) indicam a existência de proteínas contendo o isótopo *in vivo* em células de *Trypanosoma*⁴. A existência dessa via em protozoários não é óbvia já que diversos organismos não a possuem, como algumas eubactérias, plantas e fungos. Assim sendo, a via de síntese e incorporação de selenocisteína em Kinetoplastida permaneceu inexplorada. Nosso grupo, através de buscas computacionais e análise de transcritos, identificou homólogos de tRNA^{[Ser]Sec} em espécies de Kinetoplastida que com genoma sequenciado e disponível¹⁵. Estes tRNAs foram avaliados quanto a sua expressão em células de *T. brucei* e possuem todas as características que o assinalam inequivocamente como homólogos de tRNA^{[Ser]Sec} quando comparado com o tRNA^{[Ser]Sec} de *E. coli*¹⁵. Além disso, análises *in silico* permitiram a identificação das enzimas TbSerRS, TbSPS2, TbPSTK, TbSepSecS, e TbEFSec, pertencentes à via de síntese e incorporação de selenocisteínas¹⁵ e análises experimentais demonstram a funcionalidade dessas proteínas. TbSerRS apresenta alta afinidade pelo tRNA^{Sec} (maior até mesmo que a afinidade por tRNA^{Ser})¹¹⁴. Estudos de complementação de função em *E.coli* Seld⁻ e testes de atividade

mostram que TbSPS2 é capaz de sintetizar selenofosfato¹¹⁵, e experimentos em *T. brucei* cujos genes *pstk* e *sepsecs* foram deletados revelaram a dependência sequencial de TbPSTK e TbSepSecS para a formação de Sec-tRNA^{Sec} e que não há via alternativa para tal¹¹⁶. TbEFSec não foi experimentalmente estudada e a proteína ligadora à SECIS (SBP2) não foi encontrada. Portanto o mecanismo de inserção do aminoácido selenocisteína em polipeptídeos não está completamente elucidado em Kinetoplastidae.

A incorporação de selênio radioativo e estudos computacionais permitiram concluir que Kinetoplastidae utilizam selênio através da ocorrência em três selenoproteínas⁴. Duas delas apresentam identidade com famílias de selenoproteínas já descritas: SelK e SelT. A terceira não apresenta proteína homóloga conhecido, representando uma nova família denominada SelTryp⁴.

1.4.1 Selenoproteína K – SelK

SelK é uma pequena proteína (com massa predita de 11kDa e 94 aminoácidos para humanos, acesso n.: Q9Y6D0) transmembrana, contendo um domínio N-terminal curto no lúmen do retículo endoplasmático e C-terminal voltado para o citosol, onde está localizado o resíduo de Sec⁶¹. A cauda citosólica não apresenta estrutura secundária pronunciada, e é rica em glicina (16%), prolina (15%), e outros aminoácidos positivamente carregados, o que seria um provável sítio de ligação para proteínas negativamente carregadas¹¹⁷. Alguns estudos têm sido feitos na tentativa de determinar sua função^{7; 117; 118; 119; 120}, que ainda permanece desconhecida. A super expressão de SelK em cardiomiócitos diminuiu os níveis de ROS e protegeu as células de danos oxidativos⁷. SelK tem sido também associada com resposta a estresse de RE, uma vez que a indução desse estresse, com β -mercaptoetanol e tunicamicina (inibidor de n-glicosilação), aumentou a expressão dessa proteína. Observou-se ainda apoptose em células onde SelK foi silenciada e tratada com agentes indutores de estresse de retículo¹¹⁷. Os últimos estudos relacionaram SelK com a regulação da homeostase no RE, estando ela envolvida na degradação de proteínas mal-enoveladas¹²⁰.

A proteína SelK foi identificada no genoma de Kinetoplastidae, bem como seu elemento SECIS, estando este localizado a 110 pares de base do códon codificante pra Sec em *Leishmania* e aproximadamente 200 pares de base em *Trypanosoma*⁴. O elemento SECIS e a sequência de proteínas (Figura 10) são altamente conservados entre *Trypanosoma* e *Leishmania*⁴. O elemento SECIS de TbSelK se encaixa em todos os requisitos de elementos SECIS de eucariotos. O resíduo de selenocisteína está localizada na segunda ou terceira posição a partir do C-terminal de SelK, sendo um dos últimos aminoácidos, dentro de um domínio comum a proteínas com características redox CXXXU. Predições de localização celular indicam um motivo transmembrana em SelK de Kinetoplastidae, bem como em seu homólogo em humanos, no entanto sua função em protozoários permanece desconhecida⁴.

1.4.2 Selenoproteína T – SelT

A proteína SelT humana contém um domínio catalítico proposto tipo tiorredoxina com um motivo redox CxxU⁶², que detém a atividade biológica da proteína. Sua localização celular foi mostrada como sendo de retículo endoplasmático e complexo de Golgi^{62; 76}. Estudos recentes em células de mamíferos têm relacionado SelT com a adesão celular, equilíbrio do status redox¹²¹ e regulação da homeostase de Ca⁺² em resposta a neuropeptídeos⁷⁶. Sua localização no RE sugere que SelT pode estar envolvida, através de seu domínio tipo tiorredoxina, em mecanismos de proteção celular contra danos oxidativos¹²². Muitos processos biológicos envolvendo RE, como homeostase de Ca⁺², controle de enovelamento de proteínas e resposta a proteínas não enoveladas, são essenciais para a sobrevivência e função celular¹²². A redução da expressão de SelT em fibroblastos resultou numa maior expressão de genes com atividade redox¹²¹, sugerindo que SelT, assim como outras selenoenzimas localizadas no RE (Sep15, SelN, M, K^{61; 77; 123}) poderiam estar envolvidas em mecanismos redox¹²².

A sequência de SelT entre Kinetoplastidae é conservada (Figura 11) e apresenta um motivo conservado tipo-tiorredoxina, CxxU, no meio da proteína. Sua predição de localização celular indica um potencial sinal de exportação⁴.


```

H.sapiens      27 MRVLSQRYP-----DIRTEGENYLPQPIYRHIASFLSVFKLVLIIGLIIIVGKD
G.gallus      27 MRVLSQRYP-----DIRTEGENYLPQPIYRHIASFLSVFKLVLIIGLIIIVGKD
D.rerio      27 TQALYQRYP-----DIRTEGENYLPPLPLYRHIASFLSMFKLLIIGVLIILGKD
C.elegans    113 TTFAKEKYP-----NAPTEGANAPVLWAAAYVAQALSFVKMAVELVLDGGIN
A.thaliana   77 KKMLESVEP-----GLDNVLANYPAPAPKRIKAVVPAQVGVIGLIVGGEQ
O.sativa     121 KRMLETSNP-----GIHVILHNYPPFPKRVLCKLVPILQVGAITITKAGDH
C.reinhardtii 71 MELARRRYP-----GDEVVGTTPYPLPAWVVPVVKALQVVQFGLLGMCLAGDK
D.melanogaster 62 VGLLGEKYP-----QTONNGGNYDPPGLNYYLSKMIIFALKIITIVSVVSAVS
A.gambiae    65 HNLLEKMP-----EITIRGNSNYDPSGVNMLLSKVLVTVKLLIITALMSNYD
T.brucei brucei 118 AESLLSLEPPELREQQKKG-KPFIHFVGVVYVSGAFREFIGNLSTGFSLASIASFFA--
T.gambiense 118 AESLLSLEPPELREQQKKG-KPFIHFVGVVYVSGAFREFIGNLSTGFSLASIASFFA--
T.congolense 122 AEHLLESLPELRRQQRK-KPFIHFVGVVYVSGTIREMIGGLSTGFVLLIIVSMLT--
T.vivax 116 IEELTRRLPPNLQRQKQHGPNPFIYVGI IYPVGLVREMISNLLSAFFVWSLALSFVP--
T.cruzi 125 VHHESRSLPPN-KNQ-----EPIIRKFIKPSVYVSGIVRETIGSFLSLLFIASLIIGTGA--
L.major 236 KQQLQRTLPNAQEVV-----IVGGTYPTPPARALAAKVCSTAFSLASLGVADAG--
L.infantum 235 KQQLQRTLPNAQEVV-----IVGGTYPTPPARALAAKACSTAFSLASLGVADAG--
L.brasiliensis 219 KQQLQRTLVLENAGDVQ-----IVGGTYPTPPARALAAKVCSTAFSLASLGVADAG--

H.sapiens      74 PFAFFGNQAPS-IWQWGOENKRVYACMMVFFLSNMIENQCMSTGAFETILNDVPVWSKLES
G.gallus      74 PFAFFGNQAPS-IWQWGOENKRVYACMMVFFLSNMIENQCMSTGAFETILNDVPVWSKLES
D.rerio      74 PFALCGNQAPG-IWVWGOENKIYACMMVFFFNMIENQCMSTGAFETILNDVPVWSKLES
C.elegans    160 PFEREGLGYFO-FLHAHGKMSSCMLVEMLGNLVEQSLTISTGAFEVYLDNEQIWSKTES
A.thaliana   124 IFPMGHAQPPAWYHSIRANRFGSASTWLLGNFLOSFLOSSGAFVSONGELVFSKLKE
O.sativa     168 IFPRLGVVPPP-WYYSIRANRFGTMTITWLFNGFAQSLOSSGAFEVYONGDLVFSKLAE
C.reinhardtii 118 VFAALGMPVFAWYTNVWASNRFGAAMGVAFVGNMVTNMTONTGAFEVFFNGDLVFSKLAE
D.melanogaster 109 PFTFLGINTPS-WWSHQANKIYACMMIFFLGNMLEAQLISSGAFETILNDVPVWSKLOT
A.gambiae    112 IGRYIGNPFAG-WWQCFNKKLYASMMIFFLGNTLEAQLISSGAFETILNDVPVWSKLET
T.brucei brucei 175 --PFLRGALPPHIAEWTIQHRGMVVGAGFMN-MVASSLLOSSGAFEVYLDGVLVSKLET
T.gambiense 175 --PFLRGALPPHIAEWTIQHRGMVVGAGFMN-MVASSLLOSSGAFEVYLDGVLVSKLET
T.congolense 179 --PFLRGVIPPHIAEWTIQHRYTILCVGFVYN-IISANLLOSSGAFEVYLDGVLVSKLET
T.vivax 174 --SILSIVLFPVTIMARLQSHRTAVIAGFILLN-MVAANLLOSSGAFEVYLDGVLVSKLES
T.cruzi 177 --PYFVGIFPPNVTWVEQNRTMI IAGFMAN-LICGSLOSSGAFEFMDITLIPSKLOQ
L.major 284 --QQLV-FLPPTVLFNIAQQRGMLICAGFLLN-MVGGALGOTGAFEVSLDGELIPSKLOA
L.infantum 283 --QQLV-FLPPTVLFNIAQQRGMLICAGFLLN-MVGGALGOTGAFEVSLDGELIPSKLOA
L.brasiliensis 267 --GQLV-FLPPAALNEIVQQRGMLVGTGELLN-MVGSSTOTGAFEVLDGELIPSKLOA

H.sapiens      133 GHLPSMQQLVQI LDNEYKLN----VHMDSIPHRS-----
G.gallus      133 GHLPSMQQLVQI LDNEYKLN----VHMESMPHRS-----
D.rerio      133 GHLPSMQQLVQI LDNEYKMS----MHMDILPPHQ-----
C.elegans    219 GRVPSPOEFMOTIDAOAVLKGKAPVNTESFGGEFQQT-----
A.thaliana   184 GRFPGEIELRDESSGTVTKP-----FVTGSY-----
O.sativa     227 QREPSFEFLRDLINSRIPDS----LVGKNVKGKSL-----
C.reinhardtii 178 GRMPSVPELISPMQAFFEFGPAG--LHVGGAGASRPGLTGAGMGHPELSGVGAADVGLTG
D.melanogaster 168 GRFPSPPEVLFQI IDNHIQFT----EKVQENPDFVK-----
A.gambiae    171 GRFPSPPEVLFQI IDNHIQFA----NKIEPNPDFVK-----
T.brucei brucei 232 GAVPDAETLADHILROIISG----TAAGRTA-----
T.gambiense 232 GAVPDAETLADHILROIISG----TAAGRTA-----
T.congolense 236 NTVPSAGTLAKHILKRIEA----NAAGTVH-----
T.vivax 231 GVPRAEALAEFIVKRIEA----SAT-----
T.cruzi 234 NKQLSAVDLAETVICALVHA----PE-----
L.major 340 GAVPVAEIRRIVLEKTLLD----KYGDSSEASS-----
L.infantum 339 GAVPVAEIRRIVLEKTLLD----KYGDSSEASS-----
L.brasiliensis 323 GAVPVEVARRIILEKTLLD----KYGDNSARPL-----

```

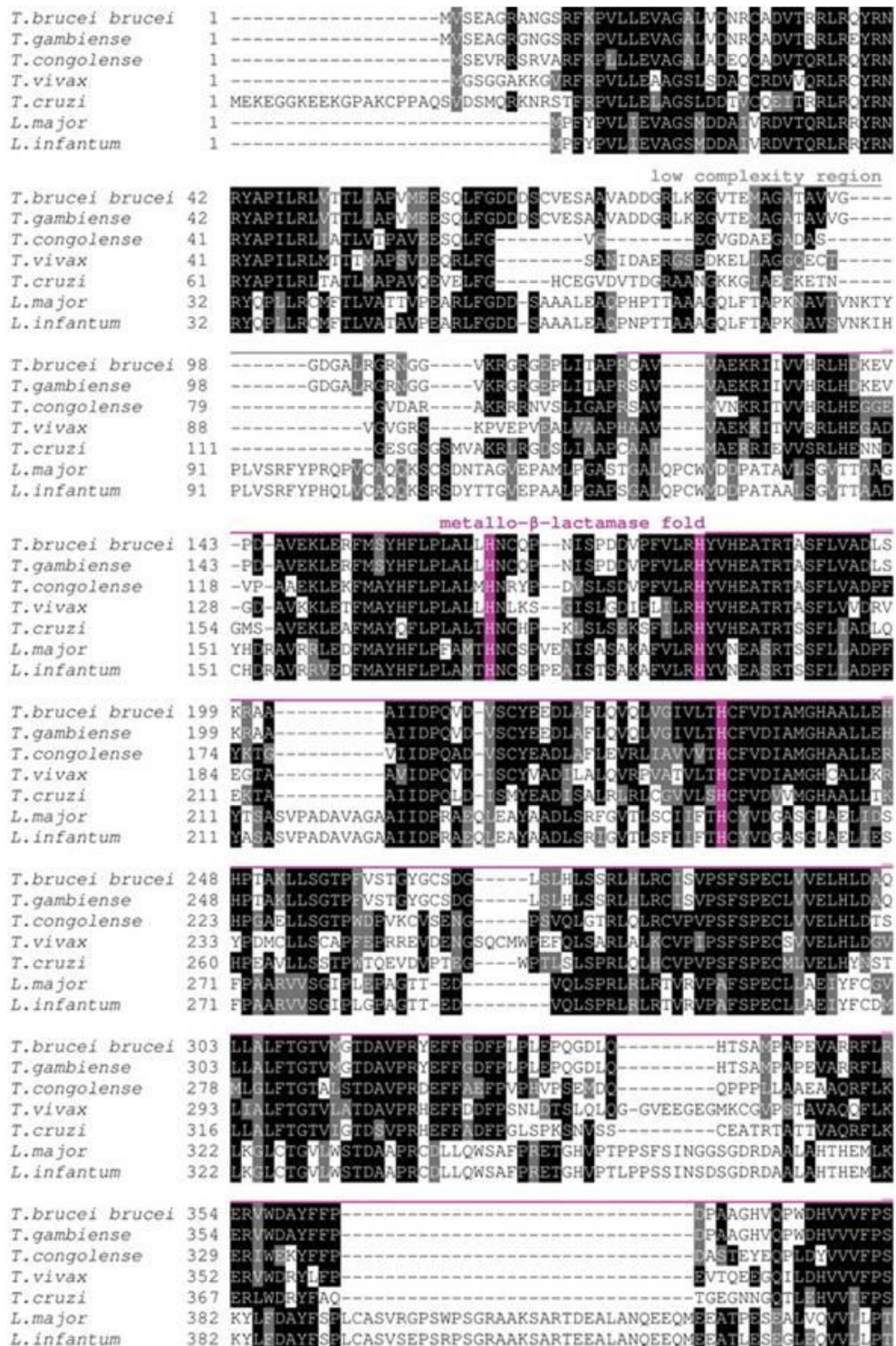
Fonte: Lobanov, V. 2006⁴.

1.4.3 SelTryp

Na fase aberta de leitura de SelTryp, Sec está presente na região C-terminal. Na maioria das selenoproteínas Sec é encontrado em *loops* entre estruturas secundárias, mas também podem ser encontradas no domínio C-terminal (tiorredoxina redutase, SelK, SelS e SelO). Em SelTryp, Sec está localizada no motivo CxxU, que é encontrado em selenoproteínas que desempenham função redox através da formação reversível de ligação selenilsulfeto⁴. A predição para localização celular sugere SelTryp como mitocondrial⁴.

A análise da sequência demonstra baixa identidade apenas com a proteína da família rodanese de *Thermobifida fusca* YX (no. de acesso YP_291141) e predição de um enovelamento tipo metalo- β -lactamase. Pela presença de cisteínas conservadas no domínio rodanese em um loop do sítio ativo essa proteína foi sugerida como pertencente à subfamília YceA⁴. Esse domínio tem sido descrito como transferases de enxofre¹²⁴. As funções das proteínas que contem esse domínio não estão bem caracterizadas, mas foram propostas como reações que envolvem transferência de enxofre, desintoxicação de cianeto, metabolismo de selênio e enxofre e biossíntese de grupos prostéticos em proteínas com ferro-enxofre. O C-terminal de SelTryp não apresenta estrutura secundária, indicando uma cauda flexível contendo Sec.

Figura 12 - Alinhamento da sequência de aminoácidos de SelTryp. Sec (U) é mostrado em vermelho e os resíduos conservados estão em destaque. ORFs foram preditadas com as seguintes sequências: Tc00.1047053507485.100 (*T.cruzi*), tviv195d03.q1k_2 (*T.vivax*), Tb927.4.3410 (*T.brucei brucei*), gamb564d12.p1k_15 (*T.gambiense*), congo936h09.q1k_1 (*T.congolense*), LmjF34.0950 (*L.major*), LinJ34.0860 (*L.infantum*). Localização do domínio rodanes, metalo-β-lactamase e motivo CxxU estão indicados



<i>T. brucei brucei</i>	382	HGGYSNVTHQLDLYWAVHIGDKRMKHSRTVMDKILD-PEKYAQHMLDRPRLPKPL----
<i>T. gambiense</i>	382	HGGYSNVTHQLDLYWAVHIGDKRMKHSRTVMDKILD-PEKYAQHMLDRPRLPKPL----
<i>T. congolense</i>	357	HGGYSNVTHQLDLYWAAHIGDKRMKHSRTVMDKVLDAESYIQHWIRGKPSLPKPE----
<i>T. vivax</i>	380	HGGYSNVTHQLDLYWAVHIGDKRMKHSRTVMDKMLD-DAEYNEHARGKPSLPKPS----
<i>T. cruzi</i>	395	HGGYNNVTHQLDLYWAAHIGDKRMKHSRKMLGKLLD-HESYAAYQERPLPKIF----
<i>L. major</i>	442	HGGYNNVTSQLDLYWAAHIGDLTRMKHSRSVDALETTAEAEARYNRRLLPLPSPSFDT
<i>L. infantum</i>	442	HGGYNNVTSQLDLYWAVYIGDLTRMKHSRAVIDALATTAEAEASYNRRLLPLPSPSFDT
		low complexity domain linker
<i>T. brucei brucei</i>	437	LVSHVREWNLLSVPSAFGGSGEGLRRLRLP-----PPACALTSPCPGF-----
<i>T. gambiense</i>	437	LVSHVREWNLLSVPSAFGGSGEGLRRLRLP-----PPACALTSPCPGF-----
<i>T. congolense</i>	412	LMSHVREWNLLSVPSAFGSGGSLRARRSC-----CPRETCATLSRPE-----
<i>T. vivax</i>	435	LMTHVREWNLLSVPSAFGGSGSKLNARROLI-----RCKACSTRVFPF-----
<i>T. cruzi</i>	450	LFSHVRDYNLLSAPSFAFGGSGARLVSRHSLPSCPLPRFNSVSAASSAATF-----
<i>L. major</i>	502	SRVWHLRQLLALLRFEQRRTCLAQLSADMCHLRYSFDPSSAHSALGDSNASRRQFASF
<i>L. infantum</i>	502	SRVWHLRQLLALLRFEQRRTCLAQLSADMCHLRYSFDPSSAHSALGDSNASRRQFASF
		1st Rhodanese domain
<i>T. brucei brucei</i>	481	----VVVDIRSAADHVTMHLKGSVNVPMTPPAAAYGVKKAELWLCMLKPLQPVVVVCAN
<i>T. gambiense</i>	481	----VVVDIRSAADHVTMHLKGSVNVPMTPPAAAYGVKKAELWLCMLKPLQPVVVVCAN
<i>T. congolense</i>	456	----VVVDIRGAAEHVAMHLKGSVNVPMTPPAAAYGVKKAELWLCMLKPLQPVVVCAE
<i>T. vivax</i>	479	----TVVDVRDADKHVVAHLKGSVNVPMTPPAAAYGVKKAELWLCMLKPLQPIVVVCAQ
<i>T. cruzi</i>	501	----IVVDIRDITDHLAHLKGSVNVPMTPPAAAYGVKKAELWLCMLKPLQPIVVVCRN
<i>L. major</i>	562	SSYVNVLDVRDANDYHALHLCGVNVVPMSPFPVAYGARRAELWLCVIVVFPPIVALCAT
<i>L. infantum</i>	562	SWYVNVLDVRDANDYHALHLCGVNVVPMSPFPVAYGARRAELWLCVIVVFPPIVALCAT
		disordered linker
<i>T. brucei brucei</i>	537	ERCHLARQRLELSPGASVETFTLSELQ----PPCGVHAVDGOEKEVFNRVVDTSLP
<i>T. gambiense</i>	537	ERCHLARQRLELSPGASVETFTLSELQ----PPCGVHAVDGOEKEVFNRVVDTSLP
<i>T. congolense</i>	512	KWCCSQVQRLLALSPGAPVETFTLSELQ----VPCELAIVSAAAECCRREVSVP-LP
<i>T. vivax</i>	535	ECHQPLRQRLLALSPDAPVEVYTDYQLQ----APDAVHPDTHACRNSDCRAKVT-IP
<i>T. cruzi</i>	557	EEFFPLVRRRLELSPGAPVETFTAKELE----SPSSLSAAGAEVRVQGFITKPLP
<i>L. major</i>	622	ECCRVEVSRRLSALSPESRVHVFTLALSDALEFPAEHSSTRGCAATTELPWREVSCDVP
<i>L. infantum</i>	622	EECRAEVSRLSALSPESRVHVFTLALSDALKFPPRHSTRGCAATTELPWREVSCDVP
		2nd Rhodanese domain
<i>T. brucei brucei</i>	592	ATVDSRH-LPRHLTWVFDSTASAO SRLDCYCKLQFIEPAEDTLVLD CRTPYEFR-----N
<i>T. gambiense</i>	592	KVVD SRH-LPRHLTWVFDSTASAO SRLDCYCKLQFIEPAEDTLVLD CRTPYEFR-----N
<i>T. congolense</i>	566	PAVESKY-LPRQLTWVFDLAVAH SRLDCYRKLRLIEPNDGLTLDCRTPYEFRPLRVQN
<i>T. vivax</i>	589	LVESQY-LPEQLTWVCDPAAACSLAC YQELRHIEPGEOTLVLD CRTPYEFR-----N
<i>T. cruzi</i>	611	ESIVSSC-LPRQLTWVSDSASAFRLDNYCQLQYIEPSEDTLVLD CRTSYEFR-----N
<i>L. major</i>	682	TSVSDVFLPRNLLTQRDDALAN--LTSYEDLTA AEPDTRVLDVVRTPYEFK-----N
<i>L. infantum</i>	682	TSVSDVFLPRNLLTQRDDALAN--LTSYEDLTA AEPDTRVLDVVRTPYEFK-----N
		disordered region CxxU
<i>T. brucei brucei</i>	646	GSHTRSVFLSLGDLCHITALLLVAQQLTP-----EADVHCGGWSPSELGRITLDRMYEA
<i>T. gambiense</i>	646	GSHTRSVFLSLGDLCHITALLLVAQQLTP-----EADVHCGGWSPSELGRITLDRMYEA
<i>T. congolense</i>	625	GSHNHSVFLSLGDLQMTSLDFLELQSSP-----SAAGCCNIGSPSELARVMLQRLYEA
<i>T. vivax</i>	643	GSHNYSVHLSLAELCRMTSLDEVAMVESSTLNERGSSPTLCDYGPSTKLSIMLRKLLDEC
<i>T. cruzi</i>	665	GSHKHSVHPLAELQTLTALDTLSLSLNRNTRNKQETPVVDFYTPSPRLQKILEKXLES
<i>L. major</i>	735	GSHQHSVHGLAQLGAMVVEAVEASRSL-----S--QWHCSC--SRRLADAYVRSHTA
<i>L. infantum</i>	735	GSHQHSVHGLAQLGAMVVEAVEASRFL-----S--QWHCGS--SPRLADAYVKIHTA
		disordered region CxxU
<i>T. brucei brucei</i>	700	ALASGLKCRPGCRGIRKIVVYCATGYRSLIAASLMRRAFEAAAS----LDIVVYDVVGGAL
<i>T. gambiense</i>	700	ALASGLKCRPGCRGIRKIVVYCATGYRSLIAASLMRRAFEAAAS----LDIVVYDVVGGAL
<i>T. congolense</i>	679	ALASGKCPFCRQVGRKIVVYCATGYRSLIAASLLRRAFEAAAS----VDISVCDVAGGAL
<i>T. vivax</i>	703	ATACGIRCKKFCYGVNKIVYCAAGYRSLIAASLMRRAFEAAAVP--AIEVYDVVGGAL
<i>T. cruzi</i>	725	FMAENARHRFSFGGIRKIVVYCATGYRSLIAASLLRRAFEAAAT----MFIQVROVGGAL
<i>L. major</i>	786	ALMARLPVWQEAASDVIYVYCAAGYRSLIAASLLORATEASATPAWRKHHSNVSGGAF
<i>L. infantum</i>	786	ALMARLPVWQEAASDVIYVYCAAGYRSLIAASLLORATEASATPAWRKHHSNVSGGAF
		disordered region CxxU
<i>T. brucei brucei</i>	756	QIMQORPDLWTVKDRSIIQVSIIPR
<i>T. gambiense</i>	756	QIMQORPDLWTVKDRSIIQVSIIPR
<i>T. congolense</i>	735	QIMQORPDLWTVKDRSIIQVSIIPR
<i>T. vivax</i>	761	QIMQORPDLWTVKDRSIIQVSIIPR
<i>T. cruzi</i>	781	QIMQORPDLWTVKDRSIIQVSIIPR
<i>L. major</i>	846	QIMQORPDLWTVKDRSIIQVSIIPR
<i>L. infantum</i>	846	QIMQORPDLWTVKDRSIIQVSIIPR

1.4.4 Auranofin

O composto de ouro antireumático auranofin tem sido descrito como um inibidor de selenoproteínas, apresentando potente ação contra tioredoxina redutase de mamíferos^{125; 126; 127}, causando um severo estresse oxidativo através de um desbalanço redox¹²⁸. Devido a alta reatividade com selenol e tiol, é possível que auranofin também se ligue a metabólitos de selênio, como HSe⁻, bloqueando assim toda a via de selenoproteínas¹²⁹. Foi demonstrado que esse composto possui potente ação anti-proliferativa contra parasitas, como *Plasmodium falciparum*¹³⁰ e *Schistosoma mansoni*^{14; 131; 132}. Sua ligação transiente com o sítio de tioredoxina glutaciona redutase de *S. mansoni* através de uma ligação inicial a Sec e posteriormente a Cys foi demonstrada¹³³. Em Kinetoplastidae, sua ação contra a tripanotiona redutase de *Leishmania*, enzima chave na proteção contra estresse oxidativo, ocorre através de ligação com uma cisteína¹³⁴, o que reforça sua ação contra proteínas envolvidas no balanço de estado redox.

As selenoproteínas presentes em tripanossomatídeos (SelK, SelT e SelTryp) apresentam um centro redox putativo, que poderia ser um alvo de ligação do auranofin. Estando o efeito inibitório desse composto relacionado com sua ligação com radicais tiol e selenol, haveria uma dependência desses parasitas a essa classe de proteínas.

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Os enigmas acerca das selenoproteínas são muitos, incluindo sua singular via de síntese, seu papel na natureza, suas propriedades catalíticas e seu curioso padrão de aparição e expressão através da evolução. A importância do átomo de selênio incorporado na forma de selenocisteína e das selenoproteínas presentes em Kinetoplastidas não tem sido explorada até o momento. A identificação de genes que codificam selenoproteínas em protozoários parasitas é interessante do ponto de vista evolutivo, uma vez que selenocisteína tem sido observada nos três domínios de vida, embora a dependência de selênio seja muito variável.

Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo investigar a via de síntese de selenocisteína e a importância desse aminoácido para o parasita através da depleção de uma proteína fundamental para sua síntese e avaliar o papel de cada selenoproteína presente em kinetoplastidas individualmente. Buscou-se determinar a localização celular das proteínas SPS2/SeID e SeIB de *T. brucei*.

Objetivos específicos:

- Determinar a localização celular e possível compartimentalização da via de síntese de selenocisteína;
- Avaliar o efeito da inibição da expressão de TbSPS2 em *T.brucei*;
- Avaliar o efeito da inibição da expressão das selenoproteínas: SelK, SelT e SelTryp de *T.brucei*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Parasitas

3.1.1 Trypanosoma brucei procíclico

A linhagem celular *T. brucei* 2913 (cedida pelo Prof. Dr. David Campbell – UCLA) é portadora de um sistema de promotor tetraciclina/T7. Esta linhagem celular pode ser transfectada com um plasmídeo contendo a sequência de interesse sob regulação do promotor T7, e sua expressão pode ser modulada pela adição de tetraciclina no meio de cultura¹¹². As células foram cultivadas a 28°C em meio SDM79¹³⁵ (Tabela 1) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 50µg/mL de higromicina e 15µg/mL de geneticina.

Tabela 1 - Reagentes usados na preparação de meio SDM79, para cultivo de células *Trypanosoma brucei* forma procíclica.

SDM79 (1litro)	
B-Alanina	2,0g
DL-Alanina	1,09g
L-Arginina	0,44g
L-Asparagina.1 H ₂ O	2,4g
L-Ácido Aspártico	0,11g
L-Cisteína-HCl H ₂ O	0,08g
L-Cistina	0,03g
L- Ácido Glutâmico	0,25g
L-Glutamina	1,64g
Glicina	0,12g
L-Histidina	0,16g
DL-Isoleucina	0,09g
L-Leucina	0,09g
L-Lisina	0,15g
DL-Metionina	0,2g
L-Fenilalanina	0,2g
L-Prolina	6,9g
DL-Serina	0,2g
L-Taurina	0,27g
DL-Treonina	0,1g
L-Triptofano	0,1g
L-Tirosina	0,2g
DL-Valina	0,21g
NaH ₂ PO ₄ .1 H ₂ O	0,53g
MgCl ₂ .6 H ₂ O	3,04g
MgSO ₄ .7 H ₂ O	3,7g
KCl (anidro)	2,98g
CaCl ₂ .2 H ₂ O	0,15g
D-Glucose	0,7g
D-Frutose	0,4g
Sucrose	0,4g
Ácido L-Málico	0,67g
α-Cetoglutarato	0,37g
ÁcidoFumárico	0,055g
ÁcidoSuccínico	0,055g
cis-Aconitato (3 mM Final)	0,522g
Na-Piruvato (1 mM Final)	10 mL (estoque 100 mM)
Vitamina BME (estoque 100X)	2 mL
Penicilina/Estreptomicina (estoque 100x)	10 mL
Phenol Red (estoque 0.5%)	4 mL
H ₂ O milli Q q.s.p.	1 L
pH ajustado para 7,4 com NaOH	
Esterilizado com filtro de 0,22µm	

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.1.2 Trypanosoma brucei forma sanguínea

A cepa LW, *Single Marker* (cedidas pelo Prof. Dr. Sergio Schenkman - UNIFESP) também apresenta possibilidade de modulação de sua expressão gênica pela adição de tetraciclina no meio de cultura, permitindo a realização de experimentos de RNAi¹³⁶. O cultivo dessa cepa foi feito a 37 °C e 5 % de CO₂ em meio HMI9¹³⁷ (Tabela 2) suplementado com 20% (v/v) de soro fetal bovino inativado e 15 µg/mL de geneticina.

Tabela 2 - Reagentes usados na preparação de meio HMI 9 para cultivo de células sanguíneas de *Trypanosoma brucei*.

HMI9 (1 L)	
IMDM (GIBCO Cat.No. 12440)	
Hipoxantina**	10mL
Batocuproino dissulfônico sódico	0,028g
Cisteína	0,182g
Ácido Pirúvico	0,110g
Timidina	0,039g
2-mercaptoetanol	14µL
pH ajustado para 7,4	
Esterilizado com filtro 0,22µm	

**Solução estoque Hipoxantina: 0.4 g de NaOH dissolvidos em 100 mL de água milli-Q e 1,36g de hipoxantina.

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.1.3 Leishmania major, forma promastigota

Formas promastigotas de *Leishmania major* (MHOM/IL/81/Friedlin – cedidas pela Prof. Dr. Angela Kaysel Cruz - USP) foram mantidas a uma temperatura de 28°C e cultivadas em meio M199 (Gibco Laboratories, New York,

NY, USA) suplementado com 10% soro fetal bovino, 10mM adenina, 10mg/mL Penicilina/Estreptomicina, 0,25 % cloreto de hemina, 0,1 % biotina, 1,0M hepes, pH 7,5.

3.2 Ensaios de viabilidade celular – Auranofin

3.2.1 Teste colorimétrico – MTT

O composto Auranofin (Sequoia Research Products Ltd) foi analisado quanto à capacidade de inibição do crescimento celular de *Leishmania major* promastigota e *Trypanosoma brucei*. Uma solução estoque do composto a 10mg/mL em DMSO serviu como base para diferentes diluições feitas diretamente no meio de cultura. Em todos os testes a concentração de DMSO foi mantida inferior a 0,5% v/v, condição atóxica para os parasitas¹³⁸.

Para a quantificação celular foi utilizado um teste colorimétrico, com o reagente MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina], baseado na metodologia de Muelas-Serrano e colaboradores¹³⁹ para formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. O MTT é convertido em um composto de coloração azul escuro (formazan) pela ação de desidrogenases da mitocôndria do parasita, sendo, portanto uma medida de viabilidade celular. Para acelerar a redução do substrato um agente acoplador de elétrons, o PMS (fenazina metossulfato), é adicionado utilizado¹⁴⁰.

Cultura celular em fase logarítmica de crescimento de *L. major* forma promastigota (aproximadamente 5×10^6 cels/mL), *T. brucei* forma sanguínea (5×10^5 cels/mL) e *T. brucei* forma procíclica (5×10^6 cels/mL) foram incubadas em placas de 12 poços (volume final de 2mL por poço) com diferentes concentrações do composto, além do controle negativo (ausência de Auranofin e DMSO). Após 48 horas a cultura foi transferida para placas de 96 poços, onde foi adicionado 10 µL de solução MTT/PMS (2,5 mg/mL de MTT e 0,22 mg/mL de PMS, Sigma-Aldrich) e incubado ao abrigo da luz por 75 minutos a 28 °C. Adicionou-se 100 µL de solução 10% SDS/ 0,01N HCL (dissolve os cristais de formazan formados no meio), e incubou-se por 30 minutos ao abrigo da luz a 16 °C. A leitura da densidade óptica

(DO) foi realizada em espectrofotômetro (Leitor de ELISA – *SpectraMax Plus*, *Molecular Devices*) a 595 nm e os resultados foram obtidos em absorbância.

3.2.2 Cálculo do LD₅₀

O efeito inibitório (LD₅₀) foi expresso como a concentração do composto que causa 50% de redução na viabilidade do parasita em comparação com a cultura idêntica, sem o composto.

A porcentagem de parasitas mortos – % C (citotoxicidade) - é calculada segundo a equação abaixo¹³⁹:

$$\% C = [(G_c - G_p)/G_c] \times 100$$

$$G_c = A_c - A_m$$

$$G_p = A_p - A_{pm}$$

Sendo,

G_c: número de parasitas/mL nos poços controles;

G_p: número de parasitas/mL nas diferentes concentrações do composto;

A_c: absorbância nos poços controle (na ausência do composto);

A_m: absorbância nos poços contendo apenas meio de cultura – “branco”;

A_p: absorbância nos testes, nas diferentes concentrações do composto;

A_{pm}: absorbância nos poços contendo meio de cultura e composto – “branco”;

A citotoxicidade foi calculada para cada concentração do composto e através da análise da curva representativa dos valores de inibição para as diferentes concentrações de composto e a partir da equação obtida foi possível calcular o valor correspondente a 50% de inibição (LD₅₀).

3.3 Extração de DNA genômico

DNA genômico foi extraído de 5×10^8 células de *Trypanosoma brucei*. Os parasitas foram centrifugados por 15 minutos a 2000 rpm, 4 °C e desprezou-se o sobrenadante. Foram feitas seguidas lavagens com 20 mL de PBS (137 mM NaCl, 16 mM Na_2HPO_4 , 3 mM KH_2PO_4 , 3 mM KCl, pH 7,4), sempre seguidas de centrifugação (15 minutos a 2000 rpm). As células foram ressuspensas em 4 mL de tampão de lise (Tris-HCl 0,2 M pH 8,0; EDTA 0,01 M pH 8,0) e adicionou-se 50 µg/mL de Proteinase K e 0,5% v/v de SDS. Os tubos foram invertidos cuidadosamente e incubados a 37 °C durante a noite. Posteriormente foram feitas duas extrações com fenol (adição de 4 mL de fenol seguida de 15 minutos de centrifugação a 2000 rpm a 4 °C) e duas com clorofórmio (adição de 4 mL de clorofórmio seguida de 15 minutos de centrifugação a 2000 rpm a 4 °C) separadamente. O DNA foi precipitado em dois volumes de etanol absoluto gelado, foi lavado com etanol 70 % e ressuspensado em 400 µL de água com 2 µL de RNase (10 mg/mL)¹⁴¹.

3.4 PCR, Clonagem e Sequenciamento

As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas em aparelho DNA *Thermal Cycler* (Perkin Elmer) com: 1 ciclo de 94 °C/3 min, seguidos por 30 ciclos de 94 °C/45 s, 50-60 °C/30 s, 72 °C/1 min, 1 ciclo de 72 °C/ 3 min e 4 °C por tempo indeterminado. As reações continham 100 ng de DNA, 10 pmoles de cada oligonucleotídeo, dNTPs 0,2 mM, MgCl_2 1,5 mM, 1U de *Platinum Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e tampão da enzima *Platinum Taq* DNA polimerase (Invitrogen) 1X. A análise dos produtos de PCR e demais fragmentos de DNA foram feitas em gel de agarose 1 % e, quando necessários, os fragmentos foram purificados com o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega). Os produtos de PCR foram clonados usando o vetor pCR2.1-TOPO (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os demais métodos de análise de manipulação de DNA, preparo de plasmídeos, clonagem, transformação de bactérias foram feitos utilizando técnicas já padronizadas¹⁴². Para o sequenciamento dos

clones, com oligonucleotídeos específicos do vetor, utilizou-se o kit *BigDye-terminator* e do sequenciador automático de *DNA ABI377* (Perkin-Elmer), realizado pela técnica Dr. Susana Andrea Sculaccio. Os eletroferogramas resultantes foram analisados pelo programa *SEQMAN* (Pacote *DNASTAR Lasergene Sequence Analysis Software*).

Tabela 3 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados.

Oligonucleotídeo	Código de Acesso	Sequência(5'-3')
TbSps2/selD	Tb927.10.9410	
TbSelDi 806 (senso)		CGGCTCGAGATGGTGCAACAGATGTGACAGG
TbSelDiRev (anti-senso)		CGCAAGCTTTTAATCATTTACCTTCGCTCCCACCT
TbSelK	Tb927.10.8700	
TbSelK 6 (senso)		TACATTGAGAACGGCAGAAT
TbSelK 269 (anti-senso)		ATTTGTTTCGCATCTCATTTTCC
TbSelT	Tb927.5.860	
TbSelT 9 (senso)		GCGGTTTAATAGAGACCATGTCGTCG
TbSelT 754 (anti-senso)		ACGTCCACACGGTTAAATAC
TbSelTryp	Tb927.4.3410	
TbSelTryp 683 (senso)		TGTACTCACTCACTGCTTCG
TbSelTryp1756 (antisenso)		ACGTCCACACGGTTAAATAC

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.5 Imunolocalização

Parasitas (5×10^6 células) foram centrifugados por 10 minutos a $1500 \times g$, lavados duas vezes com PBS e ressuspensos em 1 mL do mesmo tampão. Aproximadamente 40 μ L da suspensão de parasitas foi adicionada em cada poço de

uma lâmina de 8 poços e incubado por 5 minutos. Após adesão, os parasitas foram fixados com paraformaldeído 2 % gelado em PBS por 20 minutos, permeabilizados com solução de Triton X100 0,1 % em PBS por 3 minutos, bloqueados com solução de BSA 1 % por 30 minutos. Os parasitas foram então incubados com os anticorpos primários de proteínas de localização conhecidas diluídos em PBS-BSA 3 % por 1 h a temperatura ambiente: anti-eiF2 α ¹⁴³ (cedido pela Profa. Dra. Beatriz Amaral de Castilho, da UNIFESP, São Paulo, diluição de 1:150), ou anti-HSP70 ou anti-BiP^{144;}¹⁴⁵ (cedidos pelo Dr. James D. Bangs, da University of Wisconsin-Madison Medical School, USA, diluição de 1:5000), ou anti-aldolase (cedido pelo Dr. Paul A. M. Michels, Université Catholique de Louvain, Bélgica, diluição de 1:400), anti-pol β ¹⁴⁶ (cedidos pelo Prof. Dr. Carlos Renato Machado, UFMG, Minas Gerais, diluição de 1:150), produzidos em coelho. Posteriormente foram incubados com os anticorpos primários das proteínas de estudo diluídos em PBS-BSA 3 % por 1 h a temperatura ambiente: anti-TbSelB, ou anti-TbSPS2 (cedidos pela Dr. Elisandra Marcia Rodrigues, IFSC, USP, São Carlos, diluição de 1:100), produzidos em camundongo. Os parasitas foram então lavados 3 vezes com PBS e incubados por 1 hora a temperatura ambiente com 10 μ g/mL de DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) e anticorpo secundário (na diluição 1:300) Alexa-Fluor 488 (anti-IgG de camundongo) ou Alexa-Fluor 555 (anti-IgG de coelho), ambos Invitrogen, diluídos em PBS-BSA 3 %. Os parasitas foram lavados três vezes com PBS e a lâmina montada com *Vectashield* (*Vector Laboratories*) para preservar a fluorescência. As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência *Nikon Eclipse E600* e imagens (0.2 μ m) adquiridas com uma câmera *Nikon DS Ri1 CCD (Charge-Coupled Device)* acoplada ao microscópio, usando o programa *Nis-Elements Basic BR* (Nikon). Esses experimentos foram realizados no laboratório do Prof. Dr. Sergio Schenkman (UNIFESP) com auxílio da Dr. Teresa Cristina Leandro de Jesus.

3.6 RNAi de *Trypanosoma brucei*

3.6.1 Construção do vetor p2T7^{TABlue}/gene de interesse

Para os experimentos de RNAi, construções foram feitas amplificando por PCR um fragmento do gene de interesse. O gene TbSPS2 foi clonado do nucleotídeo 806 até o fim (fragmento de 373 pb), o gene TbSelK do 6 até 269 (fragmento de 263 pb), o gene TbSelT de 9 até 754 (fragmento de 745 pb) e o gene TbSelTryp de 683 até 1756 (fragmento de 1073 pb). Os oligonucleotídeos utilizados (Tabela 3) foram desenhados segundo sequência depositada no banco de dados TriTrypDB (código de acesso - Tabela 3) e todas as sequências foram analisadas usando o *software RNAi*¹⁴⁷, que avalia possíveis alvos secundários no genoma de *T. brucei*. Segundo o resultado do software, os fragmentos utilizados alvejariam somente o gene de interesse.

O vetor p2T7^{TABlue} possui promotor e terminador T7 opostos que flanqueiam o gene de interesse e promotores induzidos por Tetraciclina (Tet). A integração do vetor em uma região não transcrita (rDNA) do genoma de *T. brucei* resulta no estabelecimento de uma linhagem celular estável e a adição de Tet leva a indução da transcrição, produzindo dupla fita de RNA (dsRNA), dando início ao processo de RNAi, com a consequente degradação do RNA mensageiro alvo. Apresenta sítios de restrição para a enzima *Eam* 1105I flanqueando o gene *lacZ*, sendo que a digestão com essa enzima deixa uma extremidade poli-T proeminente, além de liberar o gene *lacZ*, permitindo a clonagem direta dos produtos de PCR. O vetor clivado e os produtos de PCR (SPS2/SelD, SelK, SelT e SelTryp) foram ligados por reação com a enzima T4 DNA Ligase (*New England BioLabs*) de acordo com as instruções do fabricante e posteriormente transformados em bactérias *E. coli* competentes DH5 α .

Para confirmação da inserção dos genes no vetor foram realizados experimentos de PCR de colônia e posteriormente sequenciamento com oligonucleotídeos sintetizados com base na sequência do vetor (<http://trypanofan.path.cam.ac.uk>). O DNA plasmidial foi clivado com a enzima de restrição *Not* I para linearização do vetor. A reação de clivagem foi seguida por precipitação com etanol para transfecção no parasita.

3.6.2 Transfecção celular

O conteúdo total de uma cultura saudável de formas procíclicas e em fase de crescimento logarítmico (aproximadamente 1×10^7 cels/mL) foi centrifugado a 1500 xg por 10 minutos. O precipitado de células foi lavado com tampão Cytomix¹⁴⁸ (KCl 120 mM, Hepes 25 mM, EGTA 2 mM, K_2HPO_4/KH_2PO_4 10 mM, $MgCl_2$ 5 mM, $CaCl_2$ 0,15 mM, Glucose 0,5 %, Hipoxantina 1 mM, BSA 100 μ g/mL, pH 7,6) e ressuspendido em 450 μ L do mesmo tampão. O volume foi transferido para uma cubeta de eletroporação de 4 mm (em gelo), juntamente com 10 μ g de plasmídeo linearizado. Foram feitos dois pulsos de 1,6 kV, 25 μ F, com intervalo de 10 segundo sem eletroporador (BioRad Gene Pulser). Posteriormente as células foram diluídas em 10 mL de meio SDM79 contendo 50 μ g/mL de higromicina e 15 μ g/mL de geneticina. Após 24 horas adicionou-se fleomicina (2,5 μ g/mL) para seleção de transfectantes estáveis, uma vez que o plasmídeo p2T7 confere resistência a este antibiótico. Diluição em série da cultura foi realizada em duas placas de 24 poços (iniciando-se com a cultura sem diluição na primeira linha e seguindo-se com diluições de 1:2 nas linhas seguintes), usando meio condicionado (pelo crescimento de 2 a 3 dias com *T. brucei*) e antibióticos (geneticina, higromicina e fleomicina nas concentrações já especificadas), com volume final de 0,5 mL por poço. Ao atingir densidade de 4×10^6 cels/mL as células selecionadas foram repicadas normalmente e mantidas em cultura, ou congeladas a -80°C em meio contendo 10 % de glicerol.

Para as transfecções na forma sanguínea (linhagem *single marker*) também foram usadas células em fase de crescimento logarítmico (5×10^6 cels/mL), como descrito acima. Os parasitas foram eletroporados, diluídos em 10 mL de meio HMI9 suplementado com geneticina (2,5 μ g/mL) e distribuídos em placa de 24 poços, com volume de 0,5 mL/poço. A seleção foi aplicada 24 horas após a eletroporação adicionando o mesmo volume de meio acrescido de fleomicina (5 μ g/mL). Ao atingir densidade de 2×10^6 cels/mL foram repicadas e mantidas em cultura, ou congeladas a -80°C em meio contendo 10 % de glicerol.

3.6.3 Análise fenotípica por curva de crescimento

Foram realizados repiques dos clones obtidos com o intuito de se obter células saudáveis e na fase de crescimento logarítmico. Uma vez atingida esta fase a cultura foi dividida em duas, em uma delas adicionou-se tetraciclina (1 µg/mL), e a outra foi mantida sem tetraciclina (controle). As densidades celulares foram determinadas diariamente em Câmara de Neubauer.

3.6.4 Extração de RNA e RT-PCR

RNA total foi extraído com *TRizol LS Reagent* (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Em geral, 1×10^8 parasitas foram precipitados e ressuspensos em 1 mL de Trizol, homogeneizados e centrifugados (a 12000 xg por 15 minutos, a 4°C) para que os restos celulares se depositassem no fundo do tubo. Em seguida foram adicionados 200 µL de clorofórmio às amostras e centrifugou-se novamente (a 12000 xg por 15 minutos, a 4 °C). A fase aquosa foi separada e o RNA precipitado com isopropanol e lavado com etanol 70 %. Ao final do processo o RNA foi ressuspensão em 100 µl de água tratada com DEPC e armazenado a -80 °C. A quantificação foi feita por espectrofotometria, utilizando-se o equipamento *NanoDrop* (Thermo Scientific) e as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose em condições desnaturantes. Todos os RNAs utilizados foram tratados com DNase I, livre de RNase (Fermentas) segundo as instruções do fabricante.

RNA total (5 µg) e oligonucleotídeo dT (5'- TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTn – 3') foram utilizados para síntese de cDNA, utilizando a enzima *SuperScript II* (Invitrogen), segundo as especificações do fabricante. A reação de PCR foi realizada com os oligonucleotídeos específicos para o gene de interesse (Tabela 4), utilizando 1 µL do cDNA recém sintetizado, segundo instruções da *Platinum Taq DNA Polimerase* (Invitrogen). Foram realizadas reações com diferentes números de ciclos (25 a 35 ciclos), sendo, portanto, um RT-PCR semi-quantitativo. A análise dos produtos de PCR foi feita em gel de agarose 2 % corado com brometo de etídio.

Tabela 4 - Oligonucleotídeos usados para RT-PCR.

Oligonucleotídeo (posição no gene)	Sequência (5´ - 3´)
TbSPS2 For (211) TbSPS2 Rev (742)	ATTGTGAAACTGCAGCACAAAGGATGAGACC CAGCGTTATATAGTTCTTCAATCTCCTCCGAG
TbGAPDH For (206) TbGAPDH Rev (450)	CCTCGGGAATGAGATTGATGTCGTTGCTGT CACATACTCCACACCAAGCTTTCCC
TbSELK For (39) TbSELK Rev (237)	GGGCTTCAGCCTTGTTGATA CGACTCTTTCGGTAGCGTGT
TbSELT For (588) TbSELT Rev (771)	GTGGGAGCGGGATTTATGAT CTCGTTCCTGCTGCTGTACC
TbSELTRYP For (2101) TbSELTRYP Rev (2283)	CTTGCATCCGGTCTCAAGT ACGTTGTTGCATCACCTGAA

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.6.5 Análise fenotípica – morfologia e conteúdo de DNA

Para a análise da morfologia celular, os parasitas (linhagem RNAi TbSPS2) foram examinados em diferentes intervalos de tempo após a indução do RNAi, por microscopia de contraste de fase e fluorescência utilizando células fixadas e coradas com DAPI.

Aproximadamente 1×10^7 células de cada tratamento foram centrifugadas, lavadas duas vezes com tampão PBS, ressuspensas em 1 mL do mesmo tampão e adicionou-se aproximadamente 40µL da suspensão de parasitas por poço em uma lâminade 8 poços. Após 5 minutos de incubação, o excesso foi retirado e os parasitas aderidos foram fixados com solução gelada de paraformaldeído 2 % por 20 minutos. Lavou-se com PBS (3 vezes) e as células foram permeabilizadas com solução de Triton X100 0,1 % em PBS por 3 minutos. Solução de DAPI (10 µg/mL em PBS) foi adicionada e incubada por 1 hora protegida da luz. Os parasitas foram lavados três vezes com PBS e a lâmina montada com *Vectashield Mounting Medium (Vector laboratories)*. A morfologia das células e o conteúdo de DNA foram observados em microscópio de fluorescência (*Nikon Eclipse E600*) em contraste de fase e em filtro ultravioleta. A porcentagem dos fenótipos foi estimada para 150 células observadas em cada diferente tratamento.

3.6.6 Análise fenotípica – ciclo celular

Para as análises de ciclo celular em citômetro defluxo, as amostras foram preparadas como descrito na literatura¹⁴⁹. Os parasitas na forma procíclica linhagem RNAi TbSPS2 (1×10^6) foram centrifugados a 1500 xg por 10 minutos, lavados com PBS, ressuspensos em 70% metanol (em PBS) e incubados a 4 °C durante a noite. No dia seguinte as células foram novamente centrifugadas, lavadas com PBS e ressuspendidas em 1 mL de PBS contendo 10 µg/mL de iodeto de propídeo e 10 µg/mL de RNase A (livre de DNase), e incubadas a 37 °C por 45 minutos. As amostras foram processadas no citômetro de fluxo *BD FACSCalibur* usando o detector FL2. Os dados foram analisados com o auxílio do programa *CellQuest*. Esses experimentos foram realizados no laboratório do Prof. Dr. Sergio Schenkman (UNIFESP) com auxílio da Dr. Teresa Cristina Leandro de Jesus.

3.7 **Indução de estresse**

3.7.1 Estresse Oxidativo – Peróxido de Hidrogênio

Primeiramente foi feito um teste para dosar a tolerância de *T. Brucei* forma procíclica ao peróxido de hidrogênio. O teste foi feito incubando-se parasitas na fase de crescimento exponencial (aproximadamente 5×10^6 cels/mL) com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (1, 10, 20 e 40 µM) durante 48 horas e as células foram posteriormente contadas em Câmara de Neubauer. Depois de estabelecida a concentração onde a inibição do crescimento celular foi menor que 10 %, curvas de crescimento de indução de RNAi foram refeitas. Nestas, os parasitas foram diluídos e 7 µM de peróxido de hidrogênio foi adicionado à cultura diariamente. O mesmo foi feito para *T. brucei* forma sanguínea, no entanto usando concentração de 50 µM de peróxido de hidrogênio, como já descrita na literatura¹⁵⁰.

3.7.2 Estresse de retículo endoplasmático

Foram utilizados três agentes já descritos como indutores de estresse de retículo endoplasmático. Tunicamicina (Sigma Aldrich), um antibiótico natural, que pode induzir estresse de RE inibindo os primeiros passos da síntese de ligações de N-oligossacarídeos^{90; 95; 117}. Ditioneitol (DTT) (Sigma Aldrich) e β -mercaptoetanol, (Sigma Aldrich) agentes redutores, que formam um ambiente redutor e bloqueiam assim a formação de pontes dissulfeto, induzindo estresse de RE^{117; 151}.

Foi realizado um teste preliminar com diferentes concentrações dos agentes indutores de estresse (1,25; 2,5; 5; 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ para Tunicamicina e 1; 2,5; 5 e 10 mM para DTT e β -mercaptoetanol) em *T. brucei* forma procíclica, cepa 2913 (culturas em fase logarítmica de crescimento, 1×10^6 células/mL), incubados por 2, 4, 6, 12 e 24 horas para avaliar a tolerância dos parasitas. Posteriormente, as células da linhagem RNAi TbSelK e TbSelT após 4 dias de indução (com adição de tetraciclina e repique diários) foram incubadas com 10 $\mu\text{g/mL}$ de Tunicamicina por 24 horas e 2,5 mM de β -mercaptoetanol por 4 horas.

3.8 **Produção de anticorpos e Western Blot**

3.8.1 Peptídeos Sintéticos

Peptídeos sintéticos foram desenhados com auxílio do programa *DNA Star* com a ferramenta que prediz regiões imunogênicas na proteína de interesse, e foram sintetizados (Invitrogen) a partir da sequência de aminoácidos de cada selenoproteína de *T. brucei*, como descrito a seguir:

Proteína	Peptídeo
<i>TbSELK</i>	GRRPADDHPRSV
<i>TbSELT</i>	TNVDNEATDYSSHR
<i>TbSELTRYPS</i>	LRGRNGGVKRGGRGE

Estes peptídeos foram posteriormente acoplados com a proteína mckLH conforme instruções do fabricante do kit *Mariculture Keyhole Limpet*

Hemocyanin – *Imject*® *mcKLH* (Pierce). EDC (hidrocloro de 1-etil-3-[dimetilaminopropil] carbodiimida) que reage com grupos carboxil e amino para formar uma ligação amida, foi utilizado para acoplar os peptídeos com a proteína *mcKLH*.

Os peptídeos (2mg) foram ressuspensos em 0,5 mL de Tampão de Conjugação (Pierce) e adicionados à solução de *mcKLH* (10 mg/mL) e 50 µL de solução de EDC (10 mg/mL). A mistura foi incubada por 2 horas à 16 °C. Posteriormente, o conjugado foi purificado em coluna DEAE - Sepharose (*Thermo Scientific*) para remover o EDC não ligado e o EDTA. A coluna foi previamente equilibrada com tampão PBS e toda a reação de ligação peptídeo - *mcKLH* foi aplicada na coluna. Dez alíquotas de 0,5 mL de PBS foram adicionadas e coletadas separadamente.

A proteína *mcKLH* (*Keyhole Limpet Hemocyanin*, do molusco *Megathura crenulata*), apresenta alta massa molecular, formando agregados de 350 a 390 KDa, é uma das mais usadas como carreadora para a produção de anticorpos de peptídeos por ser altamente imunogênica. Já os peptídeos sintéticos apresentam entre 1,3 e 1,6 KDa, diferença esta que dificulta a análise do resultado do acoplamento. Para tanto a absorvância das frações foi medida a 280 nm, e um gel nativo foi feito com as frações que apresentaram pico de absorção. Todas as frações com absorvância detectada e banda visível no gel nativo tiveram a concentração de proteína estimada pelo método de Bradford¹⁵² e foram utilizadas para injeções em camundongos para produção de anticorpos policlonais.

3.8.2 Expressão e purificação de proteínas recombinantes

TbSELK, *TbSELT* e *TbSELTryp* foram clonadas em vetor expressão (pET28 e pET29) e tiveram sua sequência confirmada, os vetores foram então transformados em células competentes *E. coli* BL21 (DE3) e as colônias analisadas quanto à expressão heteróloga das proteínas de interesse. As proteínas *TbSELK* e *TbSELT* clonadas em vetor pET28a foram expressas, porém na fração insolúvel. A *TbSELTryp* não foi expressa. Esses experimentos foram realizados pela aluna de doutorado Jaqueline P. Evangelista. Para obtenção de anticorpos policlonais,

bactérias BL21 DE3 contendo os plasmídeos pET28a/SelK e pET28a/SelT foram utilizadas.

As colônias que tiveram sua expressão confirmada foram transferidas para 5 mL de meio LB (triptona 1 %, NaCl 0,5 %, extrato de levedura 1 %) estéril contendo o antibiótico de seleção kanamicina (25 µg/mL) e foram incubadas sob agitação constante de 200 rpm a 37 °C durante 16 horas. Após esse período a suspensão de bactérias foi diluída em 1 L do mesmo meio, incubada a 37 °C sob agitação de 200 rpm até atingir densidade ótica de 0,6 a 600 nm. A expressão das proteínas foi realizada após a adição do indutor IPTG (concentração final de 1 mM) por 4 horas nas mesmas condições. Terminado o período de indução, as culturas foram centrifugadas por 15 minutos a 6000 rpm e 4 °C. As células coletadas foram homogeneizadas em 5 mL de tampão (20 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8,0) com lisozima (concentração final de 10 µg/mL) e incubadas por 30 minutos em gelo. Em seguida, foram lisadas através de congelamento em Nitrogênio líquido e descongelamento a 42 °C (6 repetições), seguido de 6 pulsos de ultrassom (aproximadamente 110 Watts). Nova centrifugação foi feita (30 minutos a 14000 rpm a 4 °C) e o precipitado foi então homogeneizado em tampão (20 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8,0) contendo uréia (8 M). O homogeneizado foi mantido sob agitação por 2 horas para total desnaturação das proteínas insolúveis e novamente centrifugadas (20 minutos a 3000 xg). Através de análise em eletroforese desnaturante (SDS – PAGE 15 %) foi possível observar que as proteínas *TbSELK* e *TbSELT* foram expressas de forma insolúvel. Utilizando-se da fusão com His₆-tag no N-terminal (conferido pelo vetor pET28a), foi possível purificar as proteínas de interesse através de cromatografia de afinidade com metal imobilizado. Dessa forma, as frações insolúveis desnaturadas de *TbSELK* e *TbSELT* foram utilizadas para purificação em 1 mL de resina de níquel (“*Ni-NTA Superflow*” - Qiagen) previamente empacotada e equilibrada com 5 volumes de tampão (20 mM Tris, 300 mM NaCl, 8 M de uréia, pH 8,00) . O clarificado de proteínas insolúveis foi aplicado na coluna e esta foi lavada com 15 volumes de tampão (20 mM Tris, 300 mM NaCl, 8 M de ureia, pH 8,00) contendo 10 mM de imidazol para retirada de proteínas que não se ligam ou se ligam inespecificamente a resina. Foram feitas eluições com 5 volumes seguindo um gradiente de imidazol, nas concentrações de 50, 100, 200 e 500 mM. As frações foram coletadas e analisadas em SDS-PAGE 15 % coradas com Coomassie blue.

As amostras foram dialisadas em tampão (20 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8,00) com 2 M de uréia por 2 horas e posteriormente por 16 horas a 4 °C em tampão sem uréia. Após diálise, a concentração foi estimada pelo método de Bradford¹⁵² e a solução foi concentrada em Centricon (Millipore) até a concentração de 1 mg/mL.

3.8.3 Produção de anticorpos policlonais

Os peptídeos das selenoproteínas conjugados com a proteína mckLH (TbSelK peptídeo, TbSelT peptídeo e TbSelTryp peptídeo) e as proteínas recombinantes purificadas (TbSelK recombinante e TbSelT recombinante) foram inoculadas em camundongos (3 para cada proteína ou peptídeo) por via subcutânea, com 4 aplicações de 100 µg de antígeno em intervalos de 15 dias, seguindo-se a obtenção do soro por punção cardíaca uma semana após a última inoculação. O antígeno foi emulsificado em adjuvante completo de Freund (Sigma) na primeira inoculação, e em adjuvante incompleto nas inoculações subsequentes.

3.8.4 Preparo de extrato protéico de *T. brucei*

Aproximadamente $1,5 \times 10^8$ parasitas foram centrifugados a 1500 xg por 10 minutos, lavados com PBS e ressuspensos em 200 µL de tampão PBS com 1 % SDS e inibidores de proteases (PMSF 1 mM, benzamidina 2 mM, leupeptina 1 µg/mL, pepstatina A 10 µg/mL, aprotinina 4 µg/mL e antipaina 1 µg/mL) e fosfatases (pirofosfato de sódio 10 mM e fluoreto de sódio 1 mM). A suspensão de parasitas foi homogeneizada por agitação em vórtex e a lise feita por congelamento (-80 °C) e descongelamento (37 °C), seguido por nova homogeneização e centrifugação a 10000 xg por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante (extrato) foi armazenado a -80 °C, quantificadas usando o kit *BCA protein assay* (Pierce) e misturadas com tampão de amostra para SDS-PAGE 5X com β-mercaptoetanol e fervidas por 5 minutos. Para a preparação de extrato proteico enriquecido com fração de membrana plasmática, após a separação do sobrenadante (extrato), o precipitado foi ressuspenso em 200 µL do tampão com os inibidores, adicionado de Triton X-100 1 %. Após homogeneização e centrifugação a 14000 rpm por 15 minutos a 4 °C, o

sobrenadante (extrato enriquecido com fração de membrana) foi armazenado a -80 °C. Por fim, a fração insolúvel foi ressuspensa em tampão de amostra para SDS-PAGE 5X com β -mercaptoetanol.

Alternativamente, o extrato total de proteínas foi preparado centrifugando-se $1,5 \times 10^8$ parasitas e ressuspensando-os em tampão PBS, com 1 % SDS e *Complete, EDTA-free Protease Inhibitor* (Roche). As células foram lisadas passando-se a suspensão de parasitas através de agulha, 5-6 vezes. O extrato foi armazenado a -80 °C, quantificado usando o kit *BCA protein assay* (Pierce) e misturadas com tampão de amostra para SDS-PAGE 5X com β -mercaptoetanol e fervidas por 5 minutos.

3.8.5 Western blot

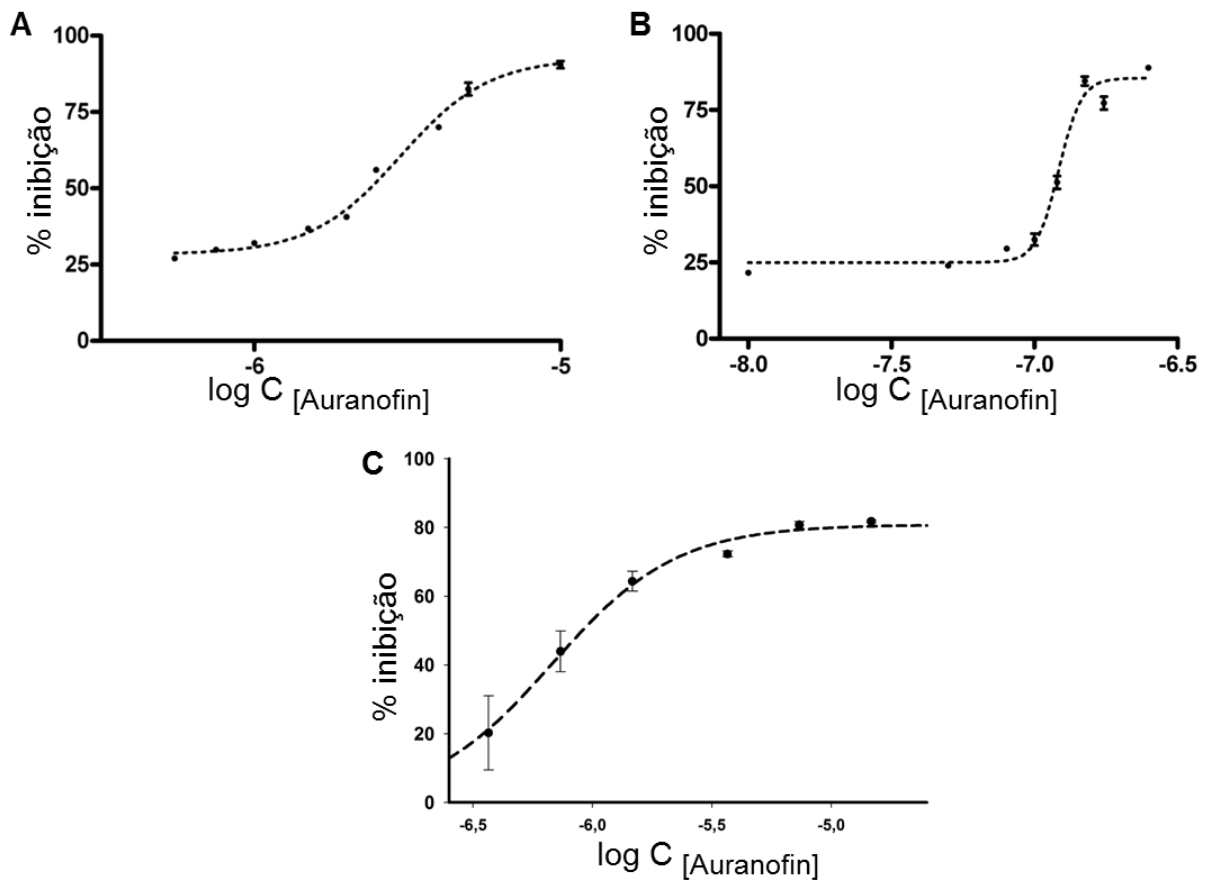
Após a resolução em géis de poli-acrilamida 10 e 15 % (SDS-PAGE), as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose *Hybond ECL* (Amersham Biosciences) usando um tampão Trisbase 500 mM, glicina 1 M, SDS 0,1 %, pH 8,3 e 10 % de metanol. A membrana foi bloqueada com solução de leite desnatado 5 % em PBS-Tween 0,1 % por 1 hora e incubada durante a noite a 4 °C com os anticorpos primários diluídos na mesma solução de bloqueio: anti -TbSelK recombinante, ou anti -TbSelK peptídeo, ou anti -TbSelT recombinante, ou anti -TbSelT peptídeo, ou ou anti -TbSelTryp peptídeo. Em seguida, as membranas foram lavadas com PBS-Tween 0,1 % (três vezes por 10 minutos). Após as lavagens, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-camundongo HRP (Sigma) na diluição 1:5000 (na mesma solução usada para diluição do anticorpo primário) por 1 hora a temperatura ambiente. Foram repetidas as lavagens com PBS-Tween e as membranas foram reveladas com o reagente *ECLTM Western Blotting Analysis System* (Amersham Biosciences), e filmes *HyperfilmTM MP* (Amersham Biosciences) segundo instruções do fabricante.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da atividade tripanocida - Auranofin

Auranofin é um composto de ouro usado atualmente como agente antireumático. Estudos mostram seu efeito antiparasitário, provavelmente devido à inibição de selenoproteínas e outras proteínas envolvidas no metabolismo redox¹³⁴. Para avaliar seu efeito em tripanossomatídeos, os parasitas foram incubados por 48 horas com o composto. Os dados apresentados na Figura 13 mostram a porcentagem de inibição do crescimento de *T.brucei* e *L.major* frente a diferentes concentrações de Auranofin.

Figura 13 - Gráficos da porcentagem de inibição do crescimento de cultura celular de *T. brucei* forma procíclica (A), *T. brucei* forma sanguínea (B) e *L. major* promastigota (C) pelo composto Auranofin. Os valores de LD₅₀ foram calculados usando a equação da curva representativa, obtida com o programa SigmaPlot.



O composto Auranofin mostrou eficiente atividade tripanocida, matando os parasitas em baixa concentração. Apresentou um LD₅₀ para *T. brucei* forma sanguínea de 0,1 µM, enquanto para a forma procíclica 3 µM, indicando uma sensibilidade ao composto 30 vezes maior para a forma sanguínea. O LD₅₀ para *L. major* foi de 1 µM, mostrando também uma alta sensibilidade ao composto.

Auranofin apresenta alta reatividade com grupos tiol e selenol, podendo se ligar a metabólitos de selênio, o que bloquearia toda a via de selenocisteína¹²⁹. É um potente inibidor de selenoenzimas⁴, inibindo a tiorredoxina glutationa redutase de *Schistosoma mansoni* na concentração de nanomolar, através de ligação com a selenocisteína e posterior transferência para cisteína¹³³. O baixo LD₅₀ obtido para *T. brucei* e para *L. major*, além de *T. cruzi* (dados não apresentados), mostra que Auranofin apresenta alto potencial contra Kinetoplastidas. Essa inibição pode ocorrer devido a uma ligação desse composto com os grupos selenol, o que inibiria a atividade das selenoproteínas do parasita (seja por ligação direta com as proteínas ou por ligação com os metabólitos de selênio). O mecanismo de ação em tripanossomatídeos não está elucidado e a ligação de auranofin com grupos tiols não deve ser descartada, uma vez que sua atividade como inibidor de cisteíno-proteases e tripanotiona redutase (através de sua ligação com cisteína) é descrita^{134; 153}. No entanto, sabe-se que é um potente inibidor de enzimas envolvidas com o balanço redox, e todas as selenoproteínas encontradas em tripanosomatídeos apresentam centro redox putativo⁴. Portanto, acredita-se que parte do efeito inibitório do auranofin observado em tripanosomatídeos é devido a sua ligação com grupos selenol, levando a inibição de selenoproteínas e indicando que pode haver uma dependência desses parasitas por essa família de proteínas. Esse dado nos levou a investigar de forma mais direta a utilização de selênio na forma de selenocisteína por Kinetoplastidas, através de experimentos de RNA de interferência de uma enzima fundamental na via de síntese desse aminoácido e posteriormente das selenoproteínas individualmente.

4.2 Localização celular de proteínas da via de síntese de selenocisteína

A localização celular de TbSPS2 observada na imunofluorescência utilizando anticorpo policlonal para *T. brucei* forma procíclica mostra um padrão de grânulos por todo o citoplasma. Para investigarmos melhor essa localização, fizemos dupla marcação de anti-TbSPS2 e proteínas de localização celular conhecidas. Marcadores para citoplasma (proteína TbEiF2 α , TbHSP70), retículo endoplasmático (TbBiP), mitocôndria (TbPol β) e glicossoma (TbAldolase) foram utilizados, mas TbSPS2 colocalizou apenas com marcadores citoplasmáticos (Figura 14).

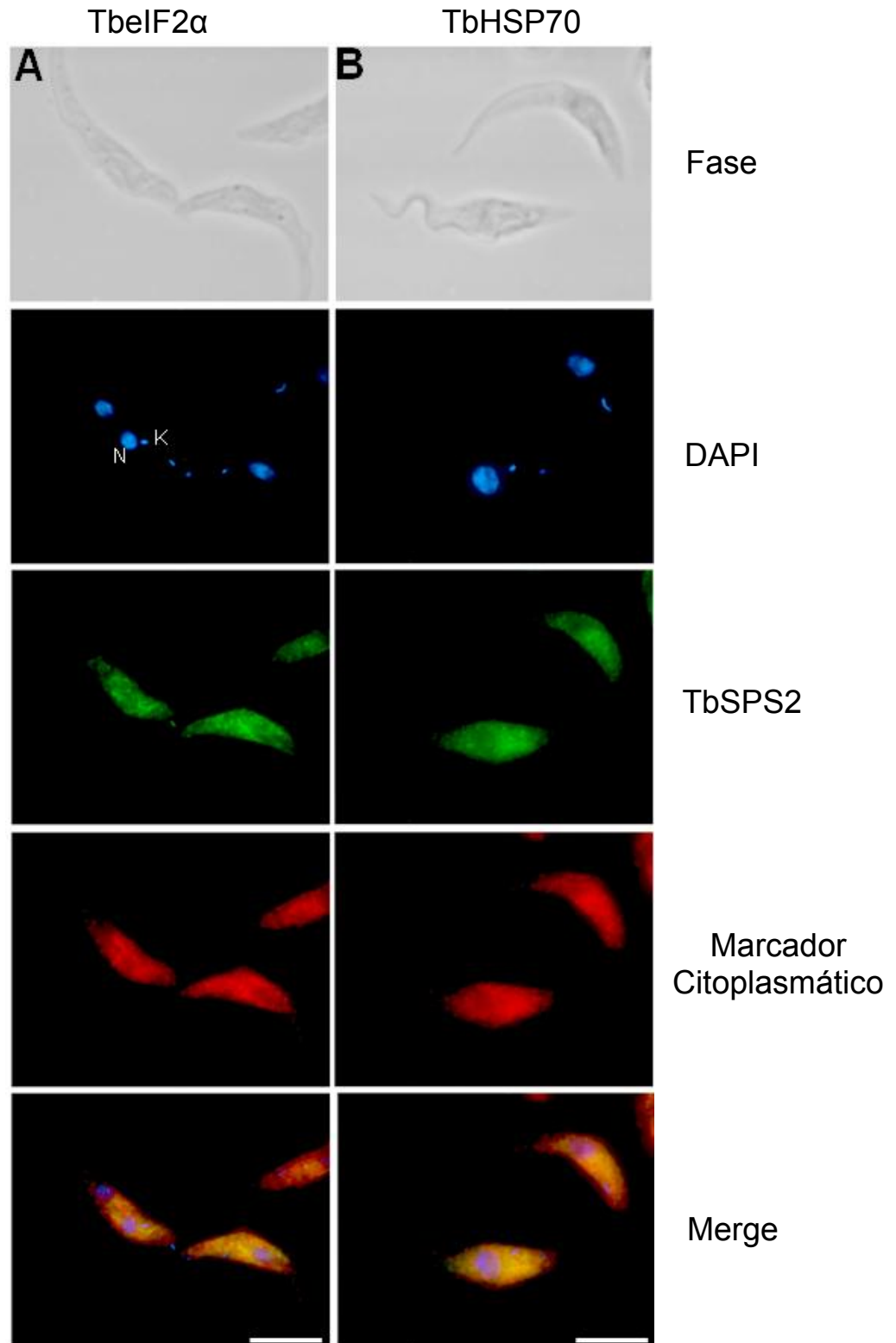
A localização celular do fator de alongamento especializado e específico, TbSelB, também foi avaliada. Anticorpos policlonais contra a proteína recombinante foram utilizados (cedidos pela Dr. Elisandra Márcia Rodrigues) e a colocalização com os mesmos marcadores foi feita. Foi observado o mesmo que o obtido com anti-TbSPS2, uma distribuição em forma de grânulos e de localização citoplasmática (Figura 15).

Estudos de localização celular também foram realizados para a proteína TbPSTK (dados não mostrados, obtidos pelo Dr. Marco Tulio Alves da Silva) e esta apresentou o mesmo padrão observado para as outras proteínas da via estudadas (TbSPS2 e TbSelB), de grânulos distribuídos por todo o citoplasma. Esse dado reforça os dados obtidos, que a via de síntese de selenocisteína está presente no citoplasma das formas procíclicas de *T. brucei*.

Estudos de fluorescência e imunoprecipitação realizados por Small-Howard *et al* 2006 das proteínas da via de síntese de selenocisteína em células de mamíferos descrevem que essas proteínas (juntamente com tRNA, mRNA e ribossomo) formam complexos supramoleculares e ocorrem na célula de maneira compartimentalizada³⁸. Um complexo de proteínas responsável pela síntese do tRNA^{Sec} seria formado no citoplasma, incluindo a proteína SPS e o tRNA^{Sec}. Em seguida esse complexo entraria no núcleo, onde se ligariam com o fator de alongamento EFSec (SelB), a proteína SBP2 e o mRNA, havendo o reconhecimento do elemento SECIS. Posteriormente o complexo seria exportado para o citoplasma, onde, no ribossomo, ocorre a tradução³⁸. Como pode ser observado na Figura 16, as proteínas SPS2 e EFSec/SelB de *T. brucei* não se localizam no núcleo, tornando

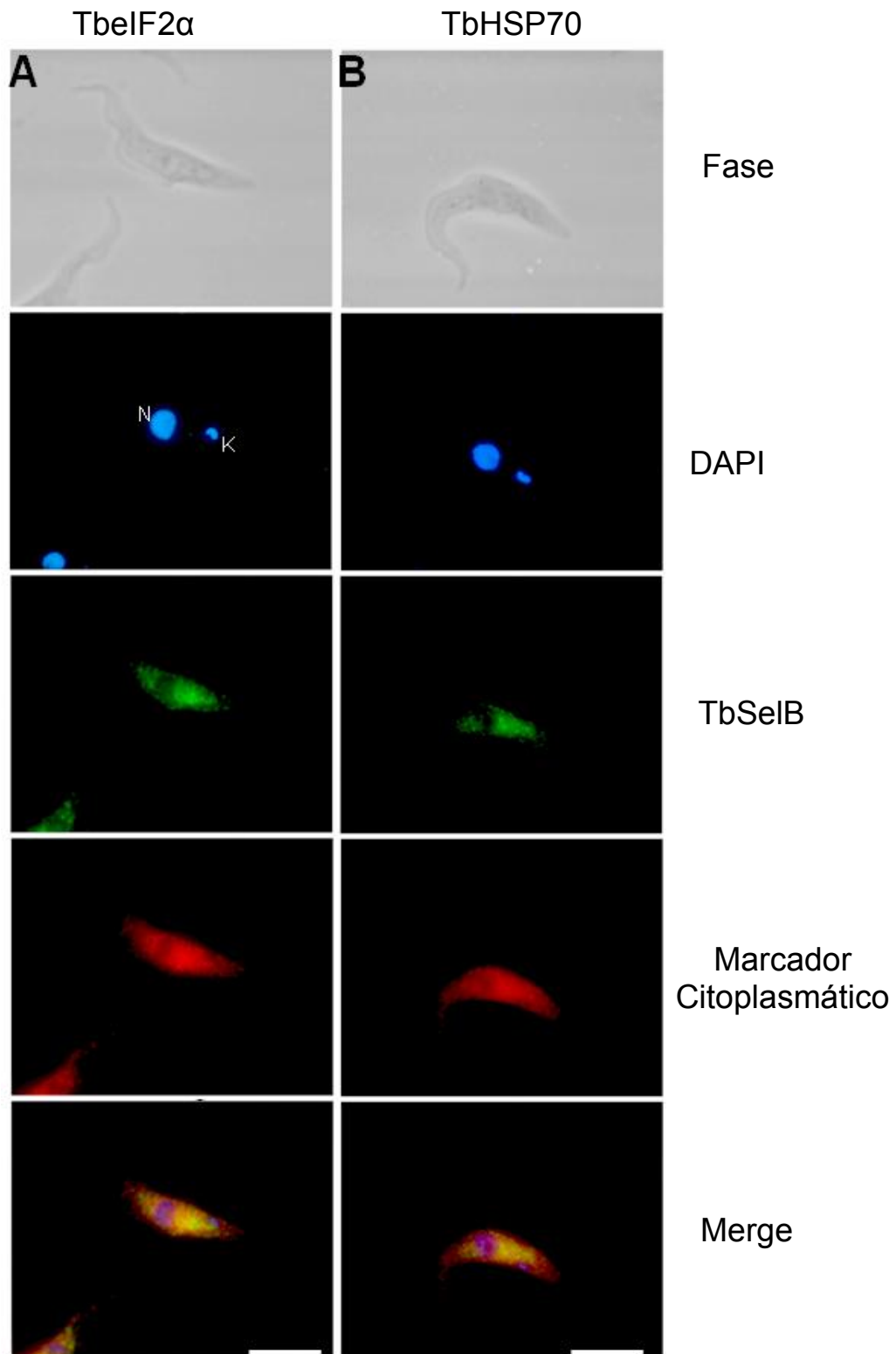
possível inferir que a síntese de selenocisteína e sua incorporação no polipeptídeo nascente ocorrem totalmente no citoplasma. Em mamíferos o reconhecimento do elemento SECIS e posterior recrutamento do EFSec (SelB) e tRNA^{Sec} é feito pela proteína SBP2³⁵ no núcleo, ao passo que em bactérias esse reconhecimento é feito diretamente pelo fator de alongamento (SelB)³³. Em tripanosomatídeos e arqueias a proteína SBP2 não foi identificada, sendo ainda desconhecido como ocorre o reconhecimento do elemento SECIS nesses organismos. Em mamíferos, SBP2 recrutaria o complexo de proteínas com o tRNA^{Sec} para o núcleo, onde ocorreria o reconhecimento do elemento SECIS. A não existência de SBP2 em *Trypanosoma* justificaria, portanto, a não formação do complexo de proteínas da via de síntese do núcleo, ocorrendo toda a síntese e incorporação de Sec de *T. brucei* no citoplasma. Além disso, o fato de termos observado um constante padrão de distribuição das proteínas da via (TbSPS2, TbSelB, TbPSTK, na forma de grânulos citoplasmáticos) indica a possível formação de complexos entre essas proteínas, uma vez que elas agem em conjunto na síntese e incorporação de Sec. O estudo da colocalização das proteínas da via entre si e experimentos de PTP-tag (*Tandem affinity purification*) nos permitirão avaliar a formação desses complexos.

Figura 14 - Colocalização da proteína TbSPS2/SeID com proteínas citoplasmáticas. A imagem mostra contraste de fase; DAPI (N: núcleo e K: cinetoplasto); TbSPS2; marcador citoplasmático e a sobreposição de imagens (merge). A: marcador citoplasmático: TbEiF2 α . B: marcador citoplasmático: TbHSP70. Barra: 5 μ m. Aumento de 100 vezes.



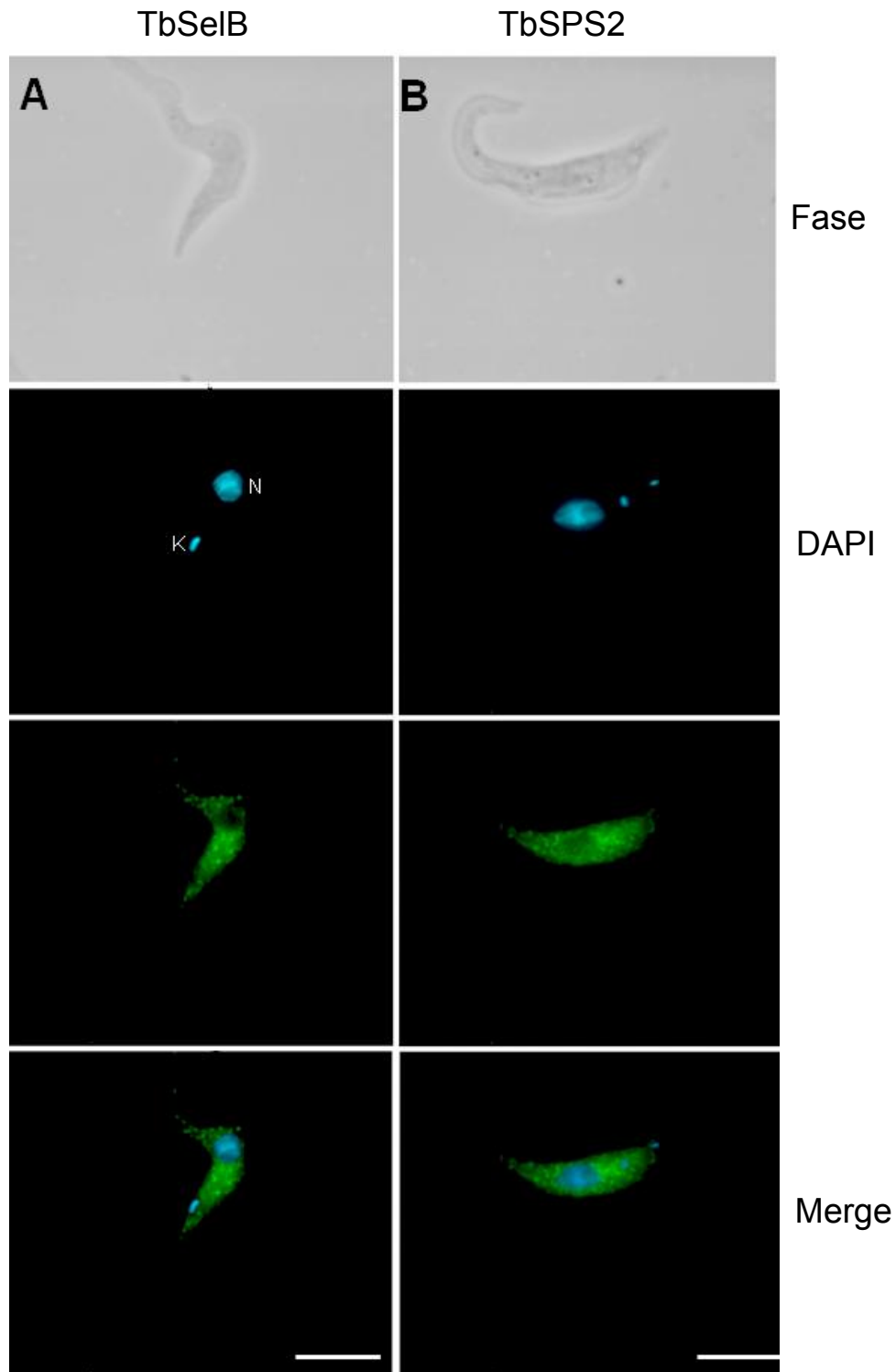
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15 - Colocalização da proteína TbSelB com proteínas citoplasmáticas. A imagem mostra contraste de fase; DAPI (N: núcleo e K: cinetoplasto); TbSelB; marcador citoplasmático e a sobreposição de imagens (merge). A: marcador citoplasmático: TbEiF2 α . B: marcador citoplasmático: TbHSP70. Barra: 5 μ m. Aumento de 100 vezes



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 16 - Localização celular de proteínas da via de síntese de selenocisteína em *T. brucei* forma procíclica. SPS2 e SelB não são observadas no núcleo. A imagem mostra contraste de fase; DAPI (N: núcleo e K: cinetoplasto); TbSelB; marcador citoplasmático e a sobreposição de imagens (merge). Barra: 5µm. Aumento de 100 vezes.



Fonte: Elaborado pelo autor.

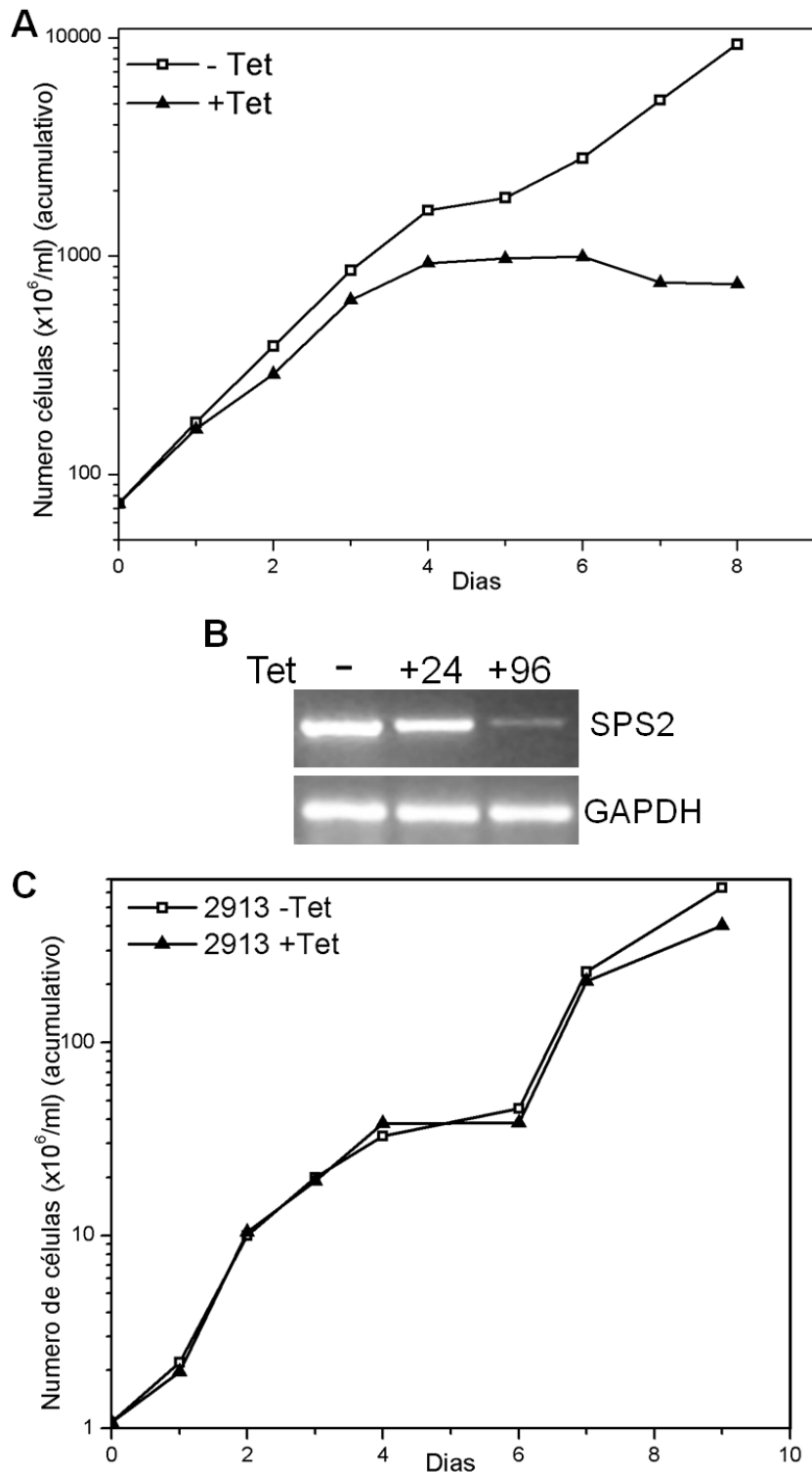
4.3 Silenciamento de SPS2/SeID de *T.brucei*

4.3.1 Análise fenotípica por crescimento da linhagem RNAi – forma procíclica

A análise de crescimento celular foi realizada para linhagem RNAi TbSPS2 e pudemos observar nas células induzidas severa inibição do crescimento após o terceiro dia de indução com tetraciclina (Figura 17A). Nesse experimento as culturas foram diluídas para 5×10^5 células/mL, monitoradas diariamente e ao chegar ao final da fase de crescimento exponencial (aproximadamente 2×10^7 células/mL, quatro dias após o início) foram diluídas novamente para 5×10^5 células/mL, e monitoradas por mais quatro dias (experimento repetido com os diferentes populações clonais). Curvas de crescimento com a linhagem não transfectada também foram realizadas (*T. brucei* forma procíclica, cepa 2913), e o resultado mostra que a tetraciclina não tem efeito no crescimento desses parasitas (Figura 17C).

RT-PCR realizado com RNA total extraído das células RNAi induzidas e não induzidas (2 e 4 dias após a indução) mostrou que, a partir do segundo dia, observa-se diminuição do RNA mensageiro alvo (SPS2 - Tabela 4), indicando sua degradação decorrente do mecanismo de RNAi, ao passo que no controle (GAPDH – Tabela 4) não houve alteração (Figura 17B).

Figura 17 - Diminuição no crescimento celular após depleção de SPS2.A. Curva de crescimento de *T.brucei* procíclico contendo o plasmídeo p2T7^{TABlue}/SPS2, induzido para RNAi (+tet) ou não (-tet) com tetraciclina. A curva foi iniciada em 5×10^5 células/mL e as células foram diluídas após 4 dias de indução. B. Análise de RT – PCR em gel de agarose 1 %. Superior: oligonucleotídeos de TbSPS2 (531pb). Inferior: TbGAPDH (244pb). (-) sem tetraciclina; (+24) 24 horas após a adição de tetraciclina e (+96)96 horas após a adição de tetraciclina. C. Curva de crescimento de *T. brucei* forma procíclica não transfectada (2913). Curvas representativas de experimentos múltiplos (n>3).

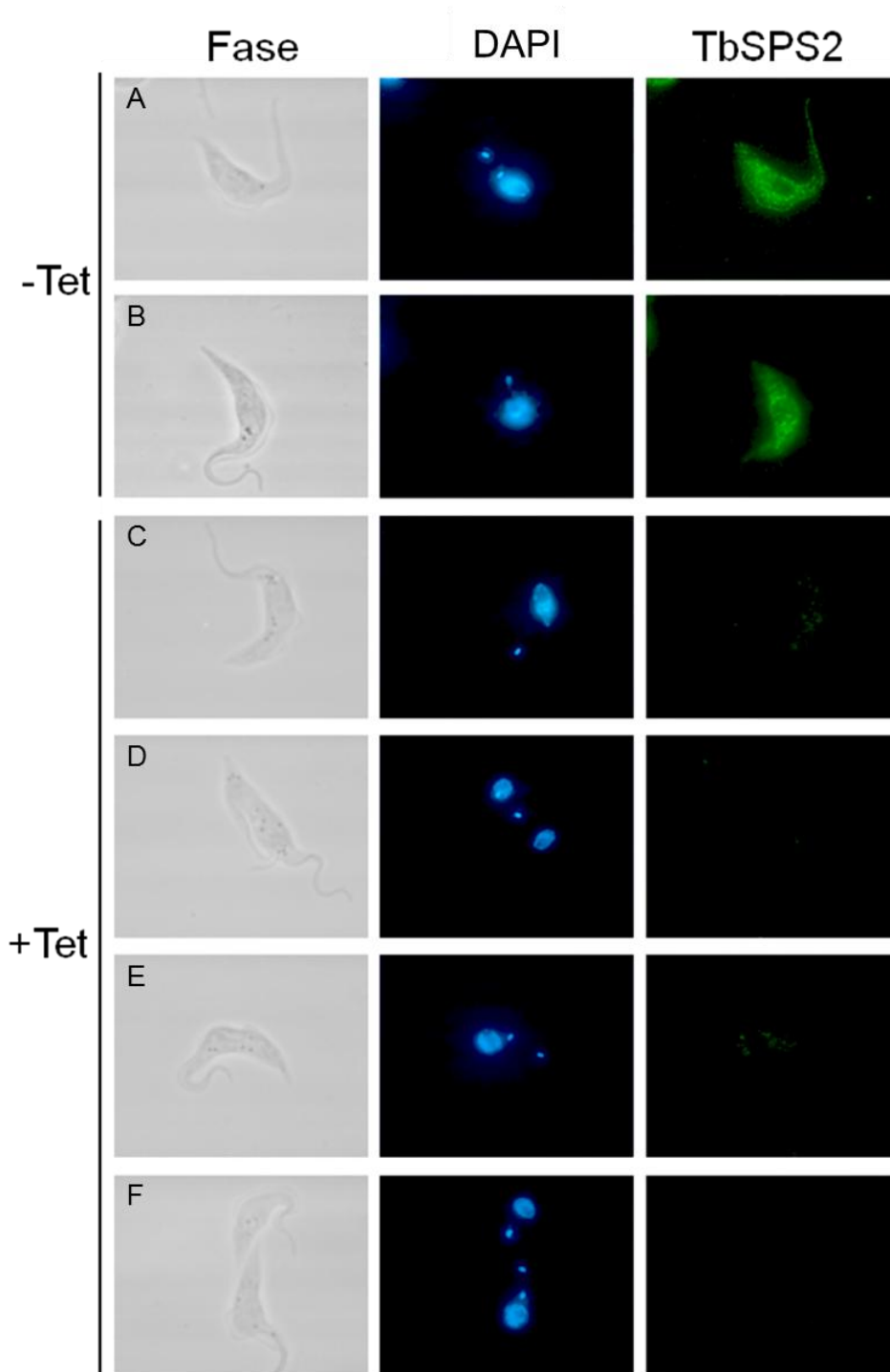


4.3.2 Imunofluorescência da linhagem RNAi – forma procíclica

Para análise da expressão de TbSPS2 após silenciamento, os ensaios de imunofluorescência foram realizados nos clones de RNAi induzidos (48 horas após adição de tetraciclina) e não induzidos (sem tetraciclina). Como pode ser observado na Figura 18, a marcação observada nos clones não induzidos (-Tet) é de grânulos citoplasmáticos, como descrito anteriormente. É possível observar que após 48 horas de indução do RNAi (+Tet) houve diminuição na intensidade da fluorescência, o que ocorre devido à degradação da molécula de RNA mensageiro e consequente diminuição na expressão da proteína.

Com isso é possível confirmar a eficiência da técnica de RNAi em diminuir a expressão de SPS2 em *T. brucei* tratado com tetraciclina. E como o controle apresentado no RT-PCR (GAPDH) não sofreu alteração e a adição de tetraciclina em cultura não transfectada com o plasmídeo p2T7^{TAB_{lue}}/SPS2 também não apresentou efeito, podemos assumir que a inibição do crescimento celular é devido à ausência de SPS2 nas células.

Figura 18 - Localização de TbSPS2 em células RNAi TbSPS2. Não induzidas(-Tet) na fase G2 (A) e G1 do ciclo celular (B). Induzidas, tratadas por 48 horas com tetraciclina, (+Tet)na fase G1 (C), Mitose (D), G2 (E) e G1 e G2 (F) do ciclo celular (B). Fase: Contraste de Fase; DAPI: corante específico de DNA, evidenciando núcleo e kinetoplasto. TbSPS2: Imunofluorescência da proteína TbSPS2. Todas as imagens foram obtidas com a mesma exposição. Aumento de 100 vezes.



Fonte: Elaborado pelo autor.

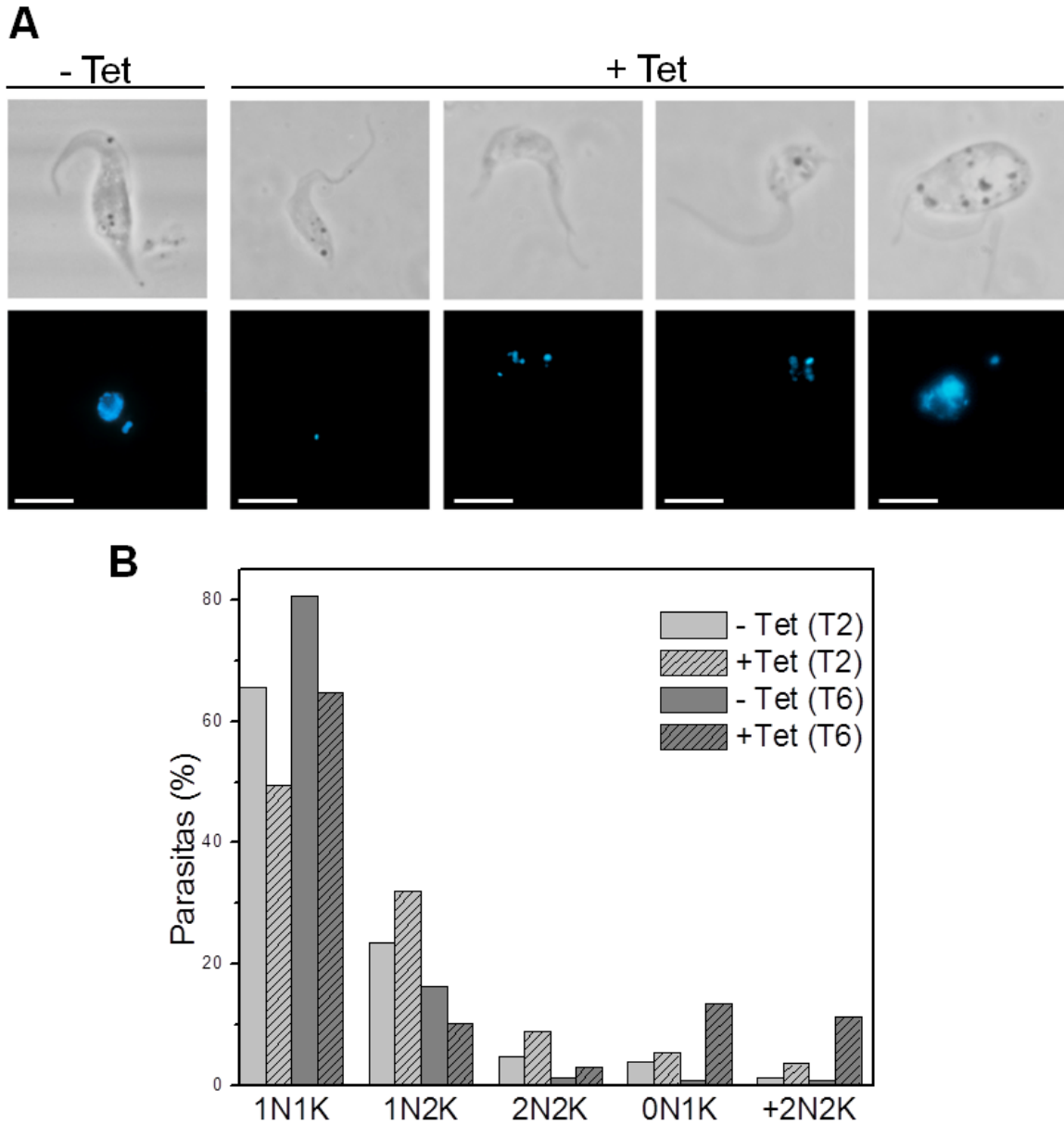
4.3.3 Efeitos do silenciamento de TbSPS2 na morfologia celular

Com o propósito de avaliar o fenótipo e as alterações morfológicas decorrentes do silenciamento de TbSPS2 observou-se as células em microscopia de contraste de fase e as análises do conteúdo de DNA por coloração com DAPI. As células foram estudadas após 2 e 6 dias de indução do RNAi com tetraciclina e a quantificação dos fenótipos encontrados foi realizada através de classificação (com base no número de núcleos e cinetoplastos) e contagem de 150 células observadas em campos contínuos (experimento feito em triplicata).

Na Figura 19A é observa-se uma célula controle (sem diminuição da expressão de TbSPS2, -Tet), com um núcleo e um cinetoplasto (1N1K), mostrando um fenótipo normal. Nas células com diminuição da expressão de TbSPS2 via indução do RNAi, foram observadas alterações na estrutura celular como a retração celular, forma ovóide e a fragmentação ou completa ausência de núcleo (Figura 19A, +Tet).

Pelo gráfico (Figura 19 B) e pela Tabela 5 observam-se diferenças significativas na quantidade dos fenótipos observados após 6 dias de indução, com diminuição de células em fase G1 do ciclo celular (1 núcleo e 1 cinetoplasto, 1N1K) e G2 (1 núcleo e 2 cinetoplastos, 1N2K), aumento na porcentagem de células em mitose (2N2K), um grande número (14%) de células zoóides, com um cinetoplasto e sem núcleo (0N1K) e aumento no número de células com núcleos divididos em múltiplas vesículas (+2N2K). A fragmentação nuclear é uma das características de células em apoptose¹⁵⁴, indicando que a diminuição da expressão de TbSPS2 causou estresse na célula, levando a morte celular por apoptose.

Figura 19 - Depleção de SPS2 causa aumento no número de células zooides e multinucleadas. (A) Células SPS2 induzidas (+Tet) ou não (-Tet) com tetraciclina, coradas com DAPI e visualizadas em microscópio de fluorescência. (B) Células SPS2 tratadas por 2 e 6 dias com tetraciclina (+Tet) ou não (-Tet) foram coradas com DAPI e o número de núcleos (N) e cinetoplastos (K) quantificados. Barra = 5 µm. Aumento de 100 vezes.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 5 - Porcentagem dos fenótipos encontrados nos parasitas selvagens (*T. brucei* forma procíclica, cepa 2913, não transfetado) e linhagem RNAi TbSPS2 induzidos por 2 ou 4 dias com tetraciclina (+Tet) ou não induzidos (-Tet).

<i>Fenótipo (%)</i>	<i>1N1K</i>	<i>1N2K</i>	<i>2N2K</i>	<i>0N1K</i>	<i>+2N2K</i>
2 dias					
Selvagem	72	23	4,4	0,6	
TbSPS2 (-Tet)	66	24	5	4	1
TbSPS2 (+Tet)	50	32	8,6	5,5	3,9
6 dias					
Selvagem	84	13	2,5	0,5	
TbSPS2 (-Tet)	81	16	1,5	0,8	0,7
TbSPS2 (+Tet)	65	10	2,8	14	8,2

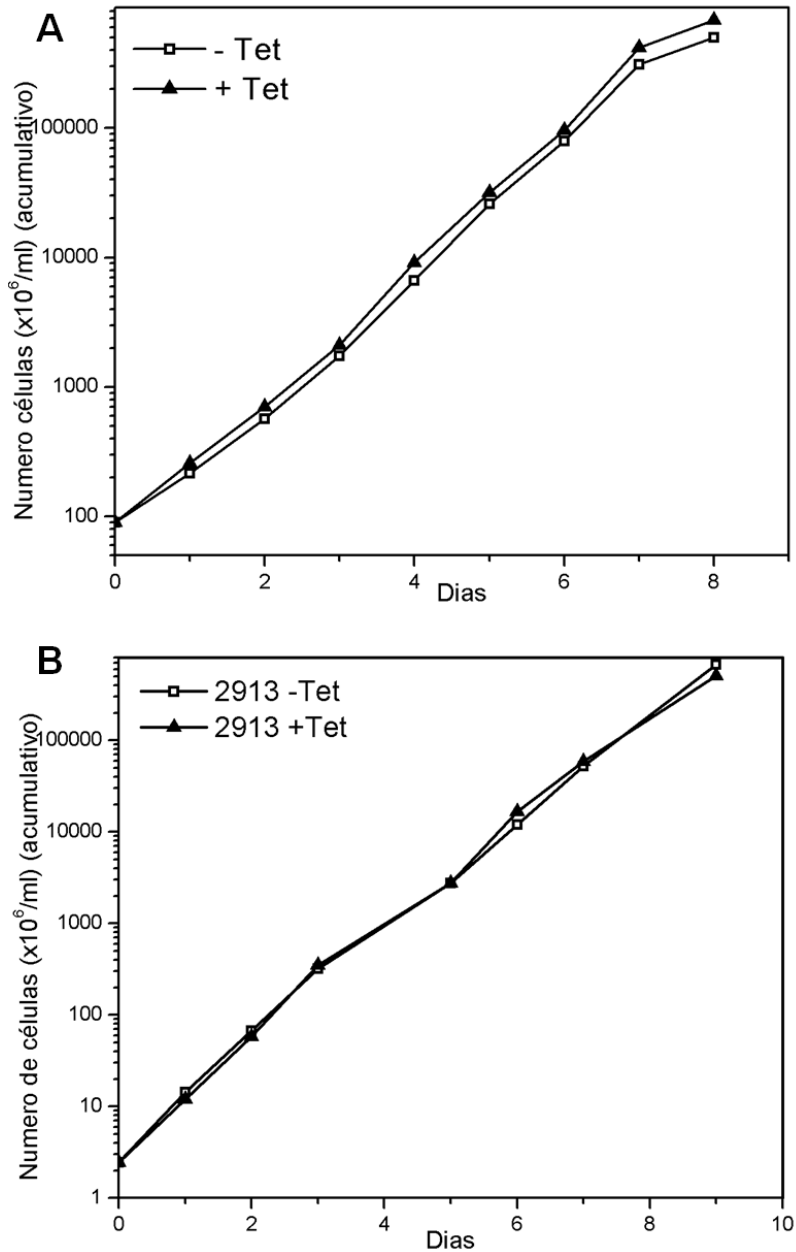
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3.4 Análise do efeito do silenciamento de TbSPS2 sobre o crescimento celular (Diluição diária)

Aeby *et al*, 2009¹¹⁶ obtiveram resultados conflitantes com os nossos, onde a indução do RNA de interferência da proteína TbSPS2 não mostrou efeito no crescimento celular. A curva de crescimento foi então repetida de acordo com a metodologia adotada pelos autores¹¹⁴. Nesse experimento, as células (+Tet e -Tet) foram contadas, diluídas e induzidas diariamente, sempre para a concentração de 1×10^6 células/ml. O resultado desta curva de crescimento com um regime diferente pode ser observado na Figura 20, onde assim como obtido por Aeby *et al*, o silenciamento do gene TbSPS2 não causa alteração no crescimento celular.

Os resultados obtidos com diluição da cultura a cada 4 dias (mantendo a cultura sob condições estressantes) e os resultados com diluição diária são contrastantes e nos permitem sugerir que a ausência da proteína SPS2 traz efeitos para a célula quando essa se encontra sob estresse, uma vez que a manutenção das células em meio por longo período de tempo (sem troca de meio de cultura) pode levar ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), metabólitos e a diminuição de nutrientes disponíveis no meio de cultura, tornando o ambiente inóspito.

Figura 20 - Depleção de SPS2 sob regime de diluição diária não causa alteração no crescimento celular. A. Curva de crescimento de *T.brucei* procíclico contendo o plasmídeo p2T7^{TABlue}/SPS2, induzido para RNAi (+Tet) ou não (-Tet). A curva foi iniciada em 1×10^6 células/mL e o meio foi trocado a cada 24 horas e as células novamente diluídas para 1×10^6 células/mL. B. Mesmo experimento foi realizado com *T. brucei* procíclico não transfectado. Curvas representativas de experimentos múltiplos (n>3).

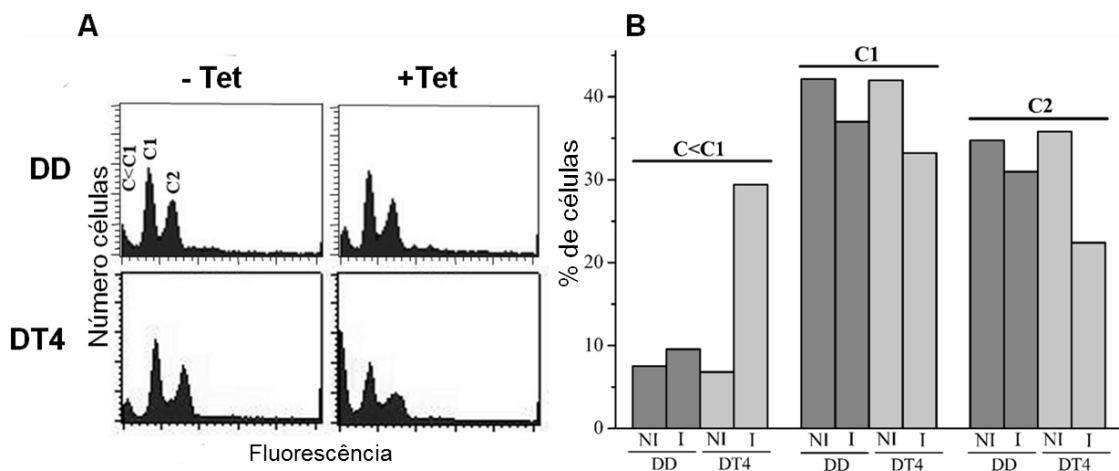


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3.5 Efeitos do silenciamento de TbSPS2 no ciclo celular

Para avaliar se o efeito da diminuição da expressão de TbSPS2 no ciclo celular observado sob condição ótima de crescimento (diluição diária da cultura) era o mesmo que o observado na condição de estresse (com diluição da cultura a cada quatro dias), o conteúdo de DNA das células foi determinado por citometria de fluxo. Os dois regimes foram feitos, de diluição diária (DD) e diluição após 4 dias (DT4), as células então foram coletadas (após 4 dias de manutenção com tetraciclina) e coradas com iodeto de propídio para determinar a quantidade de DNA por célula.

Figura 21 - Análises de citometria de fluxo de células RNAi de TbSPS2. A. Gráfico de FACS (citometria - *Fluorescence Activated Cell Sorter*) do conteúdo de DNA de células controle não induzidas (-Tet) e induzidas (+Tet) após 4 dias de indução do RNAi, nas condições de diluição diária (DD) e sob estresse (DT4). Picos correspondentes a DNA degradado (C<C1), fase G1 do ciclo celular (C1) e G2 (C2) estão indicados, sendo C o conteúdo de DNA da célula. B. Histograma de comparação das porcentagens de células em cada fase. (NI) células RNAi TbSPS2 não induzidas, sem tetraciclina; (I) células RNAi TbSPS2 induzidas, com tetraciclina.



Fonte: Elaborado pelo autor.

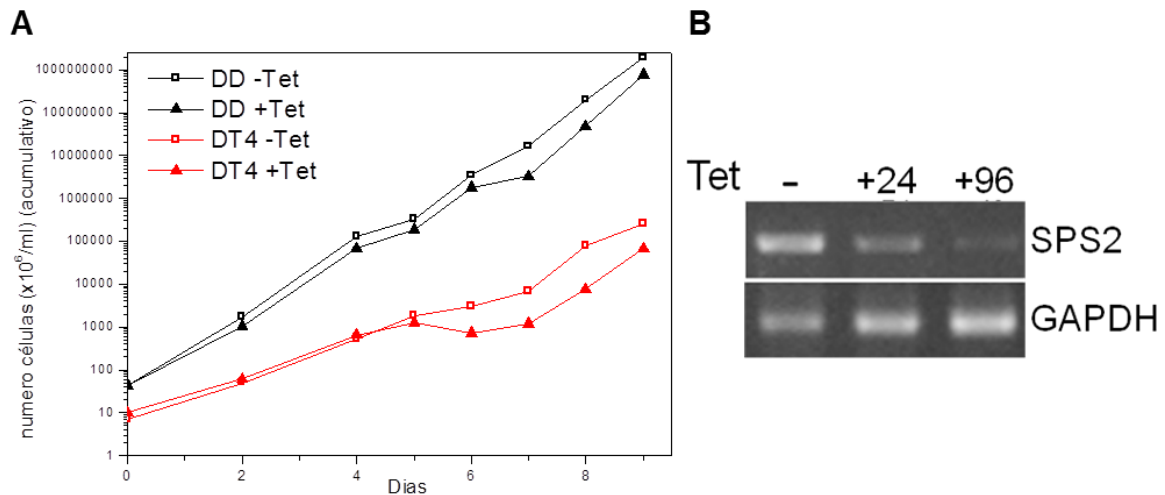
A Figura 21 mostra que a cultura celular de RNAi TbSPS2 induzida sob condição de estresse (com diluição a cada 4 dias) apresentou uma diminuição de células na fase G1 (C1 – 1N1K) e G2 (C2 - 1N2K) do ciclo celular e um aumento de 4 vezes na porcentagem de parasitas com DNA degradado (C < C1, de 7 para 29%). Esse resultado é coerente com o observado ao microscópio, tendo sido visualizado uma grande quantidade de células zoóides e com núcleo degradado em pequenas vesículas (Figura 19). Sob condições ótimas de cultura (com diluição diária) não foi

observada variação significativa no conteúdo de DNA com a indução do RNAi de TbSPS2, diferentemente do fenótipo tipo-apoptose gerado sob condições de estresse.

4.3.6 Análise fenotípica por crescimento da linhagem RNAi – forma sanguínea

O plasmídeo, p2T7/TbSPS2, também foi transfectado na forma sanguínea de *T.brucei*, permitindo a avaliação do efeito da depleção de TbSPS2 nas duas formas de vida do parasita. Na Figura 22A temos a curva de crescimento, em vermelho, obtida através da diluição após 4 dias de indução (induzida – +Tet e não induzida – -Tet), iniciada em 5×10^4 células/mL. Observa-se um retardo no crescimento da cultura induzida a partir do quinto dia de tratamento com tetraciclina. Em preto, temos a curva de crescimento com diluição diária, onde as culturas foram diluídas para 1×10^5 células/mL diariamente. Com esse regime de diluição não houve diferença no crescimento entre as duas culturas. Análises de RT-PCR realizadas com RNA extraído das culturas não induzidas e induzidas (24 e 96 horas após a indução), cuja amplificação foi feita com os pares de oligonucleotídeos descritos para o gene TbSPS2 e TbGAPDH, mostra a diminuição da expressão de TbSPS2, enquanto não se observa alteração na transcrição de TbGAPDH (Figura 22B).

Figura 22 - Depleção de TbSPS2 em diferentes regimes de diluição da cultura. A. Curva de crescimento de *T.brucei* forma sanguínea contendo plasmídeo p2T7^{TABlue}/SPS2, induzido para RNAi (+Tet) ou não (-Tet) com tetraciclina. A curva em preto foi iniciada em 1×10^5 células/mL diluída diariamente. A curva em vermelho representa curva iniciada em 5×10^4 células/mL, diluída após 4 dias de indução. B. Análise de RT – PCR em gel de agarose 1 % da cultura com diluição após 4 dias de indução. O mesmo experimento foi feito para a cultura de diluição diária, onde o mesmo resultado foi obtido. Superior: oligonucleotídeos de TbSPS2 (531pb). Inferior: TbGAPDH (244pb). (-) sem tetraciclina; (+24) 24 horas após a adição de tetraciclina e (+96) 96 horas após a adição de tetraciclina.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Novamente, a diminuição da expressão de TbSPS2 só teve efeito no crescimento da cultura quando mantida sob estresse. Estudos de Aeby *et al* 2009¹⁵⁵ mostram que o nocaute da enzima TbSecSepS (responsável pela conversão de Sep-tRNA^{Sec} à Sec-tRNA^{Sec}) não causa efeito no crescimento da cultura de *T. brucei* forma sanguínea sob condições ótimas de crescimento, indicando que a via de síntese de selenocisteína seria dispensável para os parasitas. Esses dados estão de acordo com os resultados obtidos nesse trabalho em condições ótimas de crescimento da cultura com a via de síntese bloqueada (TbSPS2 silenciada), mas difere quanto a observação do efeito no crescimento da cultura sob condições de estresse.

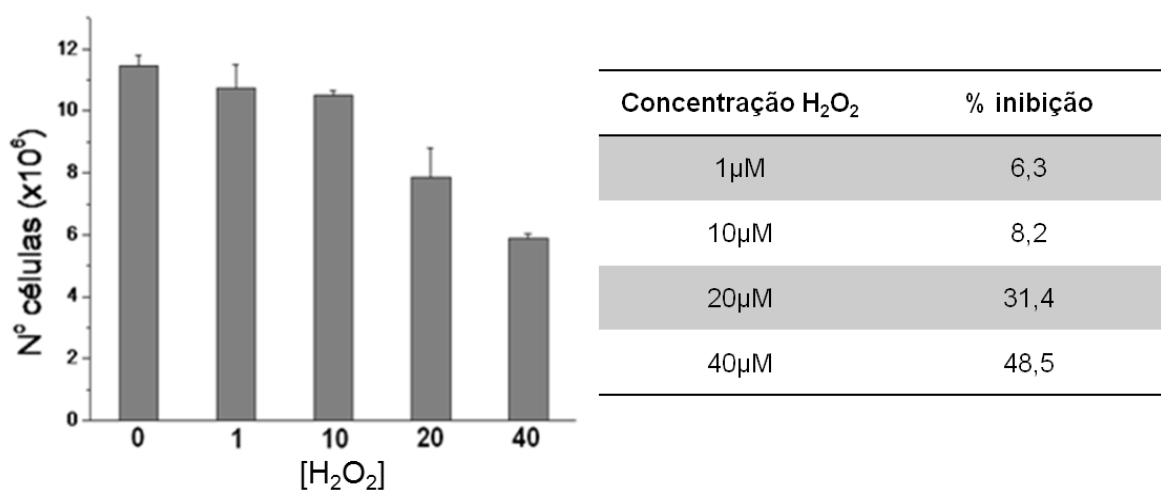
4.3.7 Depleção de SPS2 em estresse oxidativo

O papel das selenoproteínas em vias redox, resultando na proteção contra estresse oxidativo é conhecido em mamíferos⁶⁸. Os resultados obtidos,

sugerindo que TbSPS2 é essencial sob condições de estresse, aliados ao fato de que as três selenoproteínas encontradas em Kinetoplastidas apresentam um motivo comum à selenoproteínas com função redox (CxxU em SelT e SelTryp e CxxxU em SelK)⁴ nos levou a investigar o efeito do estresse oxidativo nas células RNAi de TbSPS2.

O teste de tolerância de *T. brucei* forma procíclica a peróxido de hidrogênio mostrou que, com 10 μM de H_2O_2 , a inibição do crescimento celular foi menor que 10 % (Figura 23). Nos experimentos subsequentes foi utilizado 7 μM de H_2O_2 , concentração esta que não inibe mais de 10 % do crescimento da cultura, mas é causa um estresse oxidativo significativo. Para a forma sanguínea utilizamos uma concentração de peróxido de hidrogênio já descrita na literatura, 50 μM ¹⁵⁰.

Figura 23 - Teste de dosagem de peróxido de hidrogênio em *T. brucei* procíclico. Gráfico de número de células ($\times 10^6/\text{mL}$) a diferentes concentrações: 0. Controle – sem peróxido de hidrogênio. 1. 1 μM H_2O_2 . 10. 10 μM H_2O_2 . 20. 20 μM H_2O_2 . 40. 40 μM H_2O_2 . Tabela: porcentagem de inibição do crescimento da cultura causado pelas diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio.



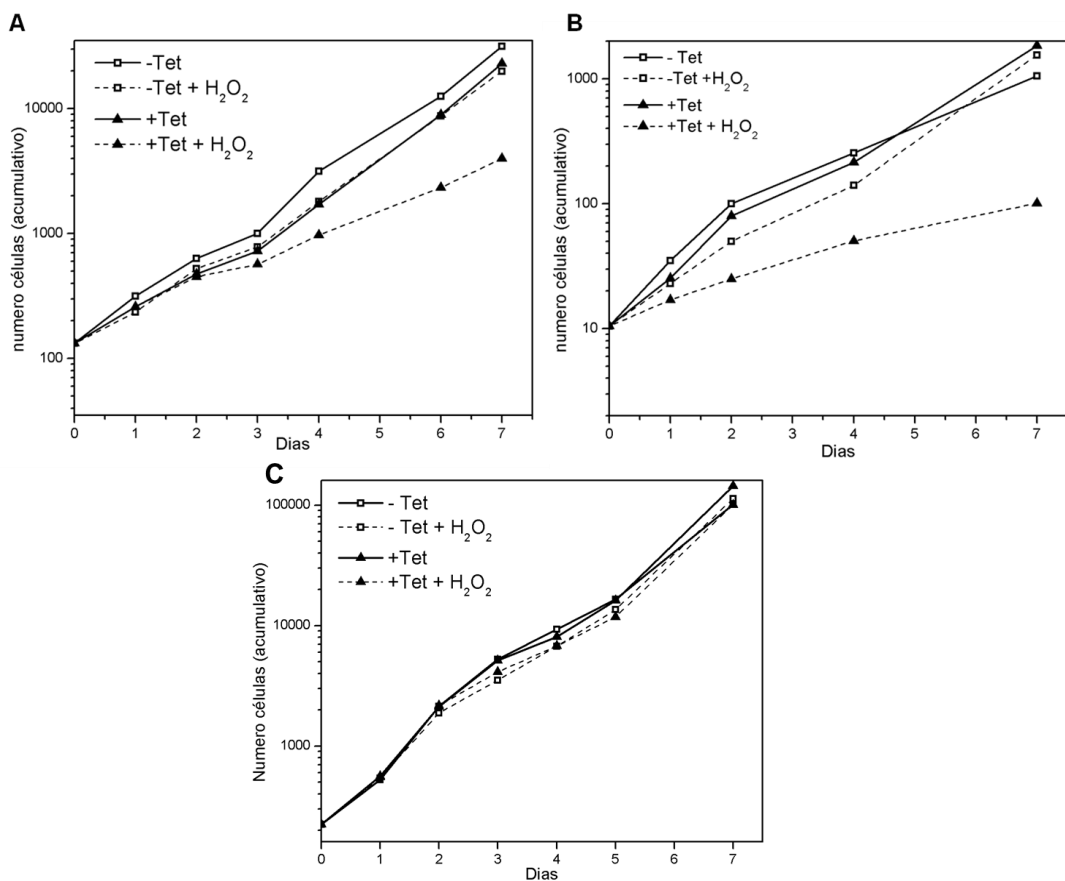
Fonte: Elaborado pelo autor.

Para avaliar se a diferença do efeito observado pelo silenciamento de TbSPS2 em diferentes regimes de troca de meio foi causado por estresse oxidativo, a curva de crescimento de indução com diluição diária foi refeita com adição de peróxido de hidrogênio. Resultados prévios^{116; 155} mostram que *T. brucei* nocaute para a enzima SepSecS não apresenta sensibilidade a estresse oxidativo por 18 horas. Como os resultados de RNAi de TbSPS2 obtidos mostraram efeito a longo

prazo (a partir de 4 dias), a sensibilidade à H_2O_2 foi testada por longo período (7 dias).

Observa-se na Figura 24 que, após 4 e 2 dias (forma procíclica e sanguínea, respectivamente), somente a cultura induzida para RNAi apresentou diminuição no crescimento com a adição de H_2O_2 . Portanto o efeito inibitório observado no crescimento das culturas RNAi com regime de troca de meio a cada 4 dias (Figura 16 e Figura 22) é, de fato, devido a estresse.

Figura 24 - Sensibilidade de *T. brucei* RNAi TbSPS2 forma procíclica (A - PCF) e forma sanguínea (B - BSF) e *T. brucei* não transfetado (C) a peróxido de hidrogênio. As células foram diluídas diariamente para 1×10^6 células/mL (PCF) e 1×10^5 células/mL (BSF) na presença (+Tet, linha contínua) e ausência de tetraciclina (-Tet, linha contínua), e na presença (+Tet + H_2O_2 , linha pontilhada) e ausência de tetraciclina com H_2O_2 (-Tet+ H_2O_2 , linha pontilhada). As curvas são representativas de múltiplos experimentos ($n \geq 3$).



Fonte: Elaborado pelo autor.

SPS2 é a enzima responsável pela síntese de selenofosfato, a forma ativa de selênio na síntese do aminoácido selenocisteína¹¹⁵. Estudos realizados em células de mamíferos e em arqueias demonstraram a essencialidade de SPS2 na síntese de selenoproteínas, havendo redução da expressão de selenoproteínas com sua depleção^{46; 156}. Assumindo que para tripanossomatídeos isso também seja verdadeiro, o RNAi de TbSPS2 levaria à diminuição da expressão das selenoproteínas do parasita.

Os resultados obtidos com a diminuição da expressão de TbSPS2 indicam que as selenoproteínas do parasita só são essenciais em condições de estresse, seja esse estresse induzido por manutenção da cultura por longo período, o que desencadearia diversos tipos de estresse, ou induzido especificamente pelo estresse oxidativo, o que seria justificado pela possível função e motivos redox encontrados nas selenoproteínas. SelK tem sido descrita como uma proteína envolvida em estresse de retículo endoplasmático^{7; 61; 117; 120}, SelT relacionada com a homeostase de cálcio^{61; 62; 76} e SelTryp apresentando motivo redox e com localização celular predita na mitocôndria. Sendo assim, a diminuição dessas proteínas levaria a maior sensibilidade dos parasitas a alterações na homeostase, levando à inibição do crescimento e gerando células com fenótipo tipo-apoptose, células zoóides e degradação do DNA¹⁵⁰.

A indução do fenótipo tipo-apoptose pode ser causado pela falta das três selenoproteínas ao mesmo tempo, ou a falta de apenas uma delas individualmente. O fato de o efeito observado no RNAi sob estresse ser tardio (após 4 dias de indução) sugere que o efeito ocorre após a diminuição dos níveis de selenocisteína e posteriormente das selenoproteínas. Esse resultado é reforçado pelos dados obtidos por Aeby *et al*¹¹⁶, que mostra que, mesmo após 3 dias de indução do RNAi de TbSPS2, a marcação com selênio radioativo ainda apresenta bandas correspondentes a duas selenoproteínas, SelTryp e SelT. É importante salientar que estudos demonstram que a disponibilidade de selênio na célula modula a expressão de selenoproteínas, sendo algumas mais sensíveis a mudanças no *status* de selênio que outras, havendo inclusive uma hierarquia na expressão de selenoproteínas⁴⁶. A depleção de SPS2 levaria a baixos níveis de selenocisteína, podendo reduzir diferentemente os níveis de expressão de cada selenoproteína, o que significaria uma dependência diferenciada de cada uma delas em situações de estresse.

Para avaliar tal efeito, os anticorpos de SelK, SelT e SelTryp de *T. brucei* seriam fundamentais, pois nos permitiriam avaliar a diminuição das selenoproteínas com a depleção de SPS2 e se isso ocorre igualmente para as três ao longo do tempo. No entanto todas as tentativas de obtenção de anticorpos (contra proteína recombinante ou peptídeo) não foram bem sucedidas. Os anticorpos apresentavam-se inespecíficos e/ou sem bandas com tamanho esperado, e a purificação dos anticorpos também não mostrou resultados satisfatórios.

Estudos recentes tem demonstrado incorporação de Cys no códon UGA através da via de incorporação de selenocisteína, regulado pela disponibilidade de SPO₃ e de selênio¹⁵⁷. Com isso, não podemos excluir a possibilidade do RNAi de TbSPS2 não eliminar as selenoproteínas, mas sim apenas a síntese de selenocisteína, o que poderia resultar em proteínas com outro aminoácido no lugar de Sec, o que diminuiria a capacidade redox das selenoproteínas, ou faria com que estas perdessem a funcionalidade. Fato esse que justificaria o efeito observado de células tipo apoptose e inibição do crescimento celular da cultura TbSPS2 RNAi induzida sob estresse.

A síntese de selenofosfato pela SPS2 é feita a partir de seleneto e ATP. A inibição da expressão de SPS2 pode levar a um acúmulo de formas inorgânicas de selênio, como o seleneto e selenato, que podem ser metiladas ou reduzidas a seleneto de hidrogênio, sendo uma das formas mais tóxicas de selênio¹⁵⁸. Estudos descrevem que diferentes formas de selênio (selenito, seleneto, ácido metil selenínico) podem causar quebras no DNA de células de mamíferos¹⁵⁹, havendo um decréscimo na proliferação celular, indução de resposta a estresse de retículo endoplasmático (UPR), levando a apoptose^{160; 161}. Altas concentrações de seleneto podem, inclusive, induzir a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), regulando assim vias de sinalização de apoptose mediadas por ROS¹⁶². Essa característica tem, inclusive, dado ao elemento selênio o *status* de agente antineoplásico¹⁶³. Selenocistina, um produto da oxidação de disseleneto, também foi reportado como indutor de apoptose, via ROS, mediada por danos no DNA¹⁶⁴. Quatro diferentes compostos de Se foram descritos como agentes inibidores do crescimento de *Plasmodium falciparum*, gerando fenótipos tipo apoptose através da produção de ROS e danos na mitocôndria¹⁶⁵.

O efeito causado pelo RNAi de TbSPS2 sob estresse, de inibir o crescimento celular e induzir a formação de células com fenótipo tipo apoptose

(degradação do DNA mostrado pelos dados de citometria de fluxo e células coradas com DAPI), pode ser resultado do acúmulo, a longo prazo, de espécies tóxicas de selênio no ambiente celular, uma vez que esse deixou de ser convertido a selenofosfato. Formas tóxicas de selênio se acumulariam na célula e somado ao estresse induzido (via adição de peróxido de hidrogênio e prolongado cultivo), ROS seriam produzidos em quantidades suficientes para induzir apoptose celular.

4.4 Selenoproteínas

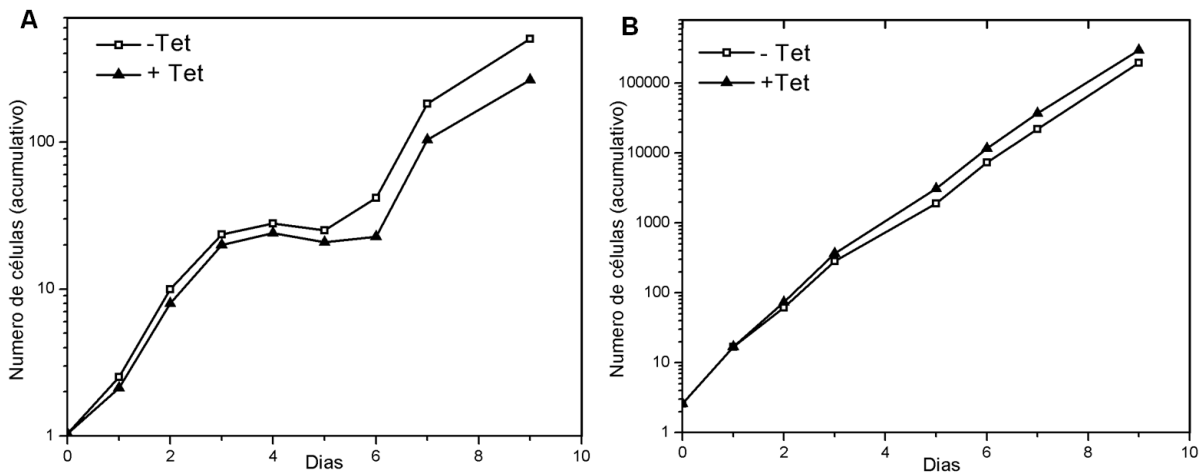
O RNAi de TbSPS2 nos mostra a importância dessa proteína em condições de estresse, indicando sua essencialidade na resposta ao acúmulo de formas tóxicas de selênio ou outra forma de estresse, levando a inibição do crescimento e viabilidade celular. Para acessar a essencialidade de cada selenoproteína, inibimos a expressão das três individualmente através da técnica de interferência de RNA.

4.4.1 Depleção de TbSelK e TbSelT

A análise de crescimento celular foi realizada para linhagem RNAi TbSelK e TbSelT em forma procíclica, seguindo os dois regimes de cultivo descritos para o RNAi de TbSPS2, de diluição diária e a condição estressante de diluição a cada 4 dias.

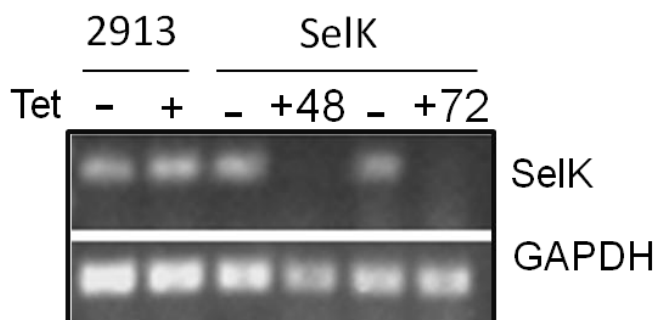
A Figura 25A representa a curva realizada sob condições sub-ótimas para a linhagem RNAi TbSelK, com diluição após 4 dias de indução do RNAi, onde observa-se pequeno retardo no crescimento da cultura induzida. Para a curva com diluição diária não se observou alteração no crescimento devido à redução na expressão de TbSelK (Figura 25B). Reações de RT-PCR realizadas com RNA total extraído das células das culturas selvagens (2913 não transfectada) e RNAi não induzidas e induzidas (2 e 3 dias após a indução) mostraram que, a partir do segundo dia de indução, houve diminuição do RNA mensageiro alvo (SelK), indicando sua degradação decorrente do mecanismo de RNAi, ao passo que no controle (GAPDH) e cultura não transfectada não houve alteração (Figura 26).

Figura 25 - Depleção de TbSelK em diferentes regimes de diluição da cultura. A. Curva de crescimento de *T.brucei* forma procíclica contendo plasmídeo p2T7^{TAB_{blue}}/SelK, induzido para RNAi (+Tet) ou não (-Tet) com tetraciclina. (A) Curva iniciada em 5×10^5 células/mL, diluída após 4 dias de indução. (B) Curva iniciada em 1×10^6 células/mL e diluídas diariamente. Gráfico representativo de experimento repetido 3 vezes.



Fonte: Elaborado pelo autor.

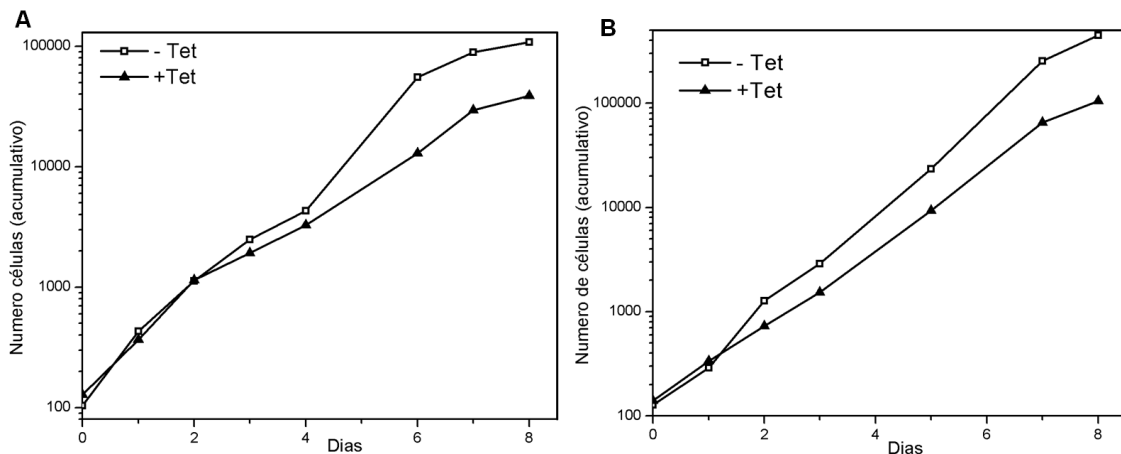
Figura 26 - Análise de RT – PCR em gel de agarose 1 %. Superior: oligonucleotídeos de TbSelK (198pb). Inferior: TbGAPDH (244pb). (2913) cultura não transfectada; (-) sem tetraciclina; (+) com tetraciclina; (SelK) cultura transfectada com plasmídeo p2T7^{TAB_{blue}}/SelK; (-) sem tetraciclina; (+48) 48 horas após a adição de tetraciclina e (+72) 72 horas após a adição de tetraciclina.



Fonte: Elaborado pelo autor.

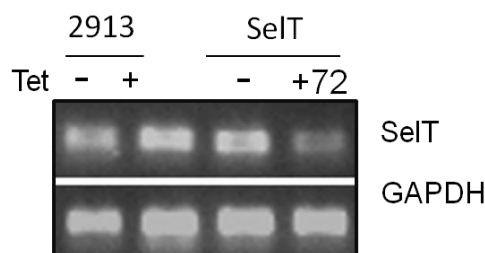
A Figura 27 representa as curvas realizadas para a linhagem RNAi TbSelT, sendo em A sob condições sub-ótimas, com diluição a cada 4 dias e em B a curva de diluição diária. Nos dois casos podemos observar uma diminuição no crescimento da cultura RNAi induzida. RT-PCR realizado com RNA extraído de células selvagens (2913 não transfectada) e RNAi não induzidas e induzidas (3 dias após a indução) mostrou que a partir do terceiro dia de indução houve diminuição do RNA mensageiro alvo (SelT) na cultura RNAi induzida, indicando sua degradação decorrente do mecanismo de RNAi, ao passo que no controle (GAPDH) e cultura não transfectada não houve alteração (Figura 28).

Figura 27. Depleção de TbSelT em diferentes regimes de diluição da cultura. A. Curva de crescimento de *T.bruceiforma* procíclica contendo plasmídeo p2T7^{TAB_{Blue}}/SelT induzido para RNAi (+tet) ou não (-tet) com tetraciclina. (A) Curva iniciada em 5×10^5 células/mL, diluída após 4 dias de indução. (B) Curva iniciada em 1×10^6 células/mL e diluídas diariamente. Gráfico representativo de experimento repetido 3 vezes.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 28 - Análise de RT – PCR em gel de agarose 1 %. Superior: oligonucleotídeos de TbSelT (183pb). Inferior: TbGAPDH (244pb). (2913) cultura não transfectada; (-) sem tetraciclina; (+) com tetraciclina; (SelT) cultura transfectada com plasmídeo p2T7^{TAB_{Blue}}/SelT; (-) sem tetraciclina; (+72) 72 horas após a adição de tetraciclina.

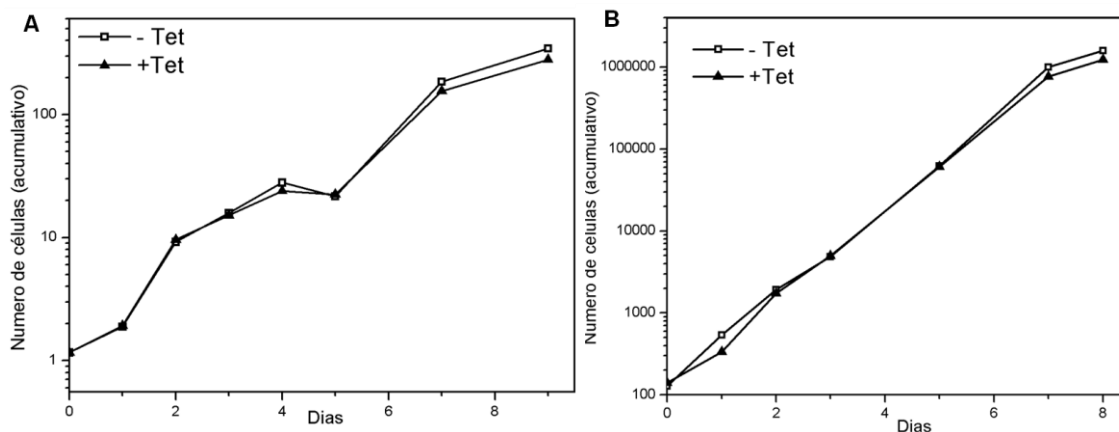


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4.2 Depleção de TbSelTryp

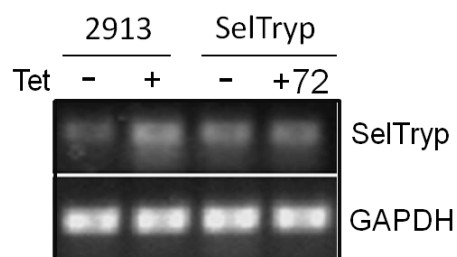
Por fim, a análise de crescimento celular foi realizada para a linhagem RNAi TbSelTryp em *T. brucei* 2913 procíclico. A Figura 29A representa a curva realizada sob condições de estresse, com diluição após 4 dias de indução do RNAi e a Figura 29B a curva de diluição diária. Nos dois casos podemos observar que não houve nenhuma variação no crescimento da cultura induzida de RNAi. No entanto, o RT-PCR realizado com RNA extraído de células selvagens (2913 não transfectada) e RNAi não induzidas e induzidas (3 dias após a indução) mostrou que o tratamento com tetraciclina não resultou em diminuição do RNA mensageiro alvo (SelTryp), indicando a ineficiência do mecanismo de RNAi (Figura 30). Portanto, novas transfecções para obtenção de novas populações clonais deverão ser realizadas.

Figura 29 - Depleção de TbSelTryp em diferentes regimes de diluição da cultura. A. Curva de crescimento de *T. brucei* forma procíclica contendo plasmídeo p2T7^{TABlue}/SelTryp induzido para RNAi (+Tet) ou não (-Tet) com tetraciclina. (A) Curva iniciada em 5×10^5 células/mL, diluída após 4 dias de indução. (B) Curva iniciada em 1×10^6 células/mL e diluídas diariamente. Gráfico representativo de experimento repetido 3 vezes.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 30 Análise de RT – PCR em gel de agarose 1 %. Superior: oligonucleotídeos de TbSelTryp (182pb). Inferior: TbGAPDH (244pb). (2913) cultura não transfectada; (-) sem tetraciclina; (+) com tetraciclina; (SelTryp) cultura transfectada com plasmídeo p2T7^{TABlue}/SelTryp; (-) sem tetraciclina; (+72) 72 horas após a adição de tetraciclina.



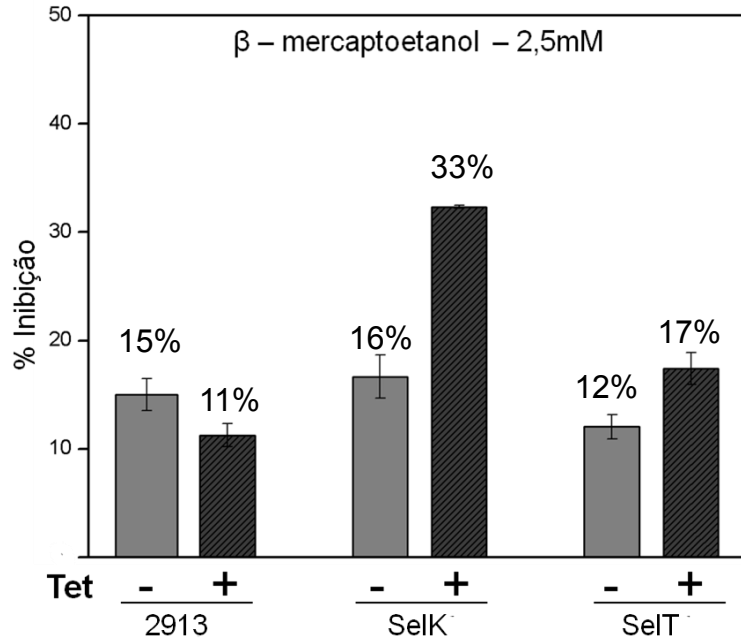
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4.3 Efeito do silenciamento de SelK e SelT em diferentes tipos de estresse

Muitas das selenoproteínas de mamíferos estão localizadas no retículo endoplasmático e, apesar de sua atividade catalítica e substrato não terem sido descritos⁶¹, estas proteínas podem estar envolvidas no controle de qualidade do enovelamento de proteínas no RE⁷³, retrotranslocação de proteínas mal enoveladas do RE para o citosol⁷⁴ e regulação da homeostase de cálcio^{76; 77}. SelK e SelT de mamíferos estão entre as selenoproteínas de retículo. Esses dados nos motivaram a investigar uma possível função de TbSelK e TbSelT em estresse de retículo endoplasmático. Para tanto, agentes indutores de estresse de RE, como Tunicamicina (inibidor de N-glicosilação), Ditioneitol (DTT – agente redutor) e β -mercaptoetanol (agente redutor), foram primeiramente testados em células *T. brucei* formas procíclicas durante 2, 4, 6, 12 e 24 horas de incubação. Após 2 horas de incubação, o tratamento com DTT mostrou uma alta inibição, matando mais de 80% das células, mesmo nas mais baixas concentrações (2,5 e 5 mM). Como as células não transfectadas mostraram alta sensibilidade a DTT, optou-se por não usá-lo nos testes de indução de estresse. Células tratadas com tunicamicina por 24 horas apresentaram uma inibição de em média 25 %, enquanto as tratadas com β -mercaptoetanol por 4 horas apresentaram 15 % de inibição (Figura 31 e Figura 32).

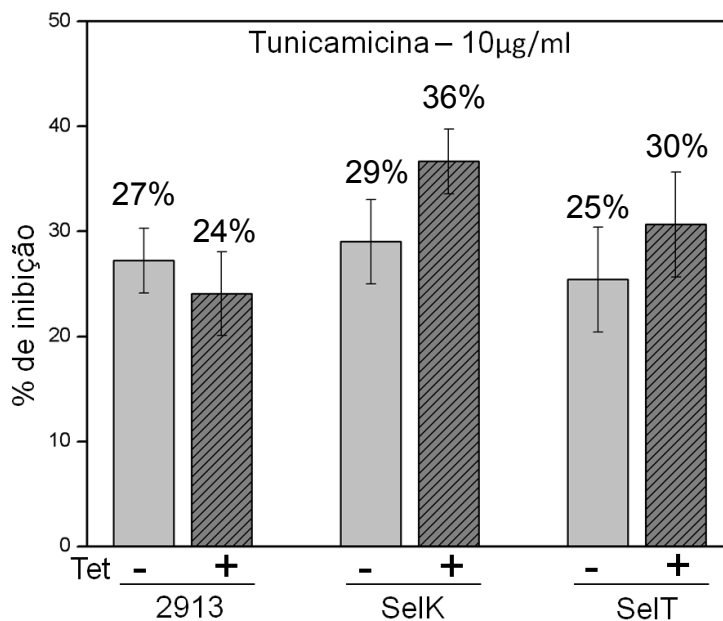
As células RNAi induzidas para TbSelK e TbSelT mostraram uma maior sensibilidade ao tratamento com os dois agentes redutores. A Figura 31 mostra uma maior sensibilidade a β -mercaptoetanol em células TbSelK silenciadas (33 % de inibição, um aumento de quase 2 vezes quando comparado com as células TbSelK RNAi não induzidas). O aumento na sensibilidade a β -mercaptoetanol também foi observado nas células TbSelT RNAi induzidas, embora de forma menos pronunciada que o observado para SelK (1,4 vezes quando comparado com células não induzidas). O tratamento com tunicamicina também resultou em maior sensibilidade das células TbSelK e TbSelT RNAi (Figura 32), tendo sido a inibição 1,3 e 1,2 vezes maior respectivamente (quando comparadas com células transfectadas e RNAi não induzidas).

Figura 31 - Células com expressão de TbSelK e TbSelT reduzida (4 dias após a indução do RNAi) apresentam maior sensibilidade à β -mercaptoetanol. Células selvagem (2913), RNAi SelK e RNAi SelT foram mantidas em cultura com adição (+) ou não (-) de tetraciclina por 4 dias. Em seguida foram tratadas com 2,5 mM de β -mercaptoetanol por 4 horas. Os experimentos foram feitos em triplicatas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 32 - Depleção de TbSelK e TbSelT (4 dias após a indução do RNAi) resulta em maior sensibilidade a tunicamicina. Células selvagem (2913), RNAi SelK e RNAi SelT foram mantidas em cultura com adição (+) ou não (-) de tetraciclina por 4 dias. Em seguida foram tratadas com 10 μ g/mL de tunicamicina por 24 horas. Os experimentos foram feitos em triplicatas.

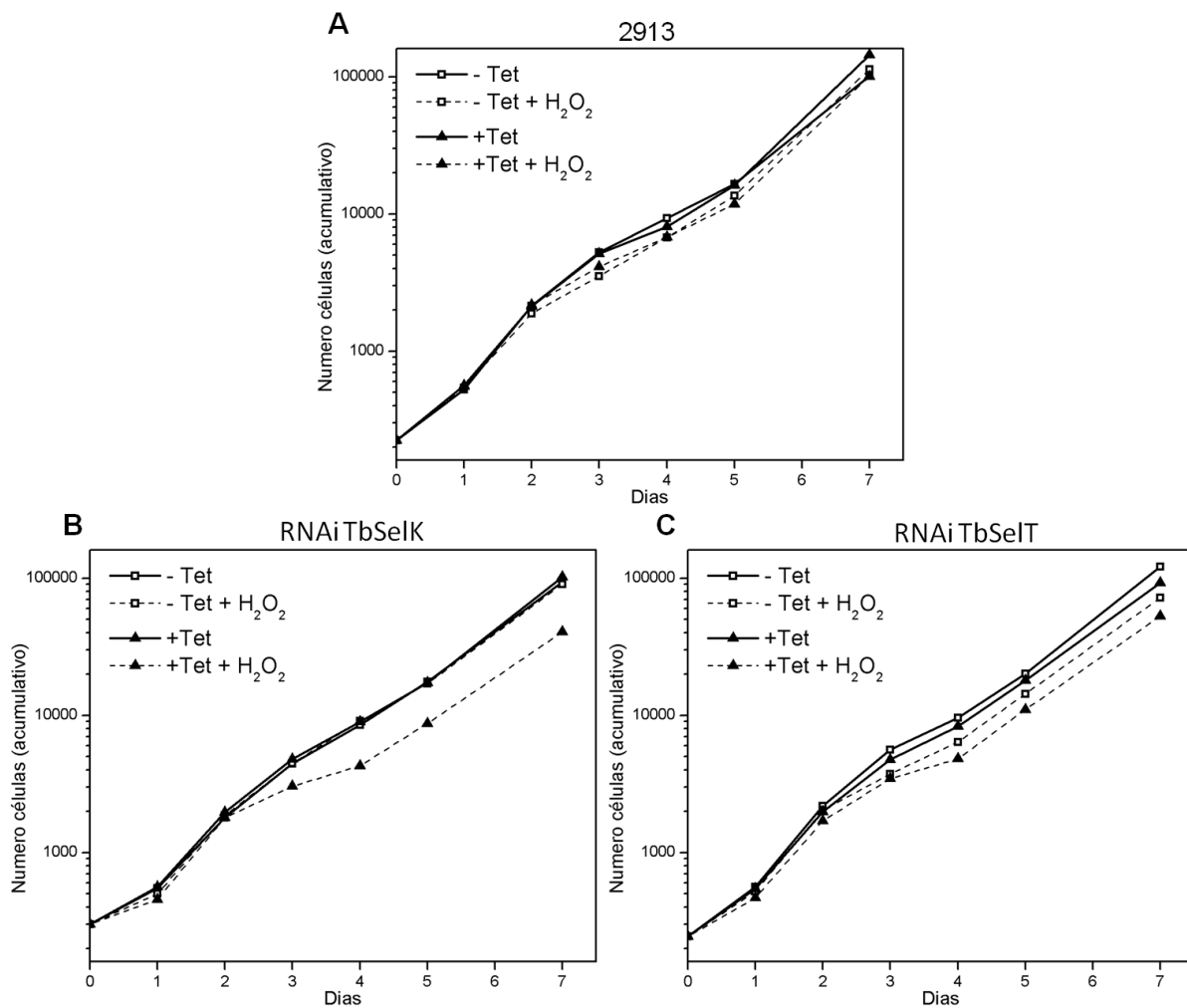


Fonte: Elaborado pelo autor.

Para avaliar se a diminuição da expressão de TbSelK e TbSelT aumentaria a sensibilidade ao tratamento com peróxido de hidrogênio, experimentos similares àqueles feitos para TbSPS2 RNAi foram realizados (curva de crescimento de diluição diária adiciona de H₂O₂). Esse experimento também visa esclarecer se uma única selenoproteína é responsável pelo efeito observado no RNAi de TbSPS2.

A Figura 33B mostra que as células TbSelK RNAi induzidas apresentaram redução do crescimento com a adição de H₂O₂ a partir do terceiro dia de indução do RNAi, indicando uma maior sensibilidade a estresse oxidativo das células TbSelK RNAi induzidas. Já as células RNAi TbSelT exibiram uma inibição pelo peróxido de hidrogênio mesmo nas células não induzidas (Figura 33C), provavelmente devido a vazamento do vetor de RNAi, que mesmo na ausência de tetraciclina produz RNA de dupla fita. Entretanto, é importante notar que a inibição do crescimento em culturas submetidas a estresse oxidativo foi similar a obtidas com o regime de troca de meio a cada 4 dias e troca de meio diária, demonstrando que a redução da expressão de TbSelT não mostrou um significativo aumento na sensibilidade a estresse oxidativo.

Figura 33 - Sensibilidade de *T. bruceiforma* procíclica (A) selvagem, (B) *T. brucei*RNAi TbSelK e (C) TbSelT a peróxido de hidrogênio. As células foram diluídas diariamente para 1×10^6 células/ml na presença (+Tet, linha contínua) e ausência de tetraciclina (-Tet, linha contínua), e na presença (+Tet +H₂O₂, linha pontilhada) e ausência de tetraciclina com H₂O₂ (-Tet+H₂O₂, linha pontilhada). As curvas são representativas de múltiplos experimentos (n≥3).



Fonte: Elaborado pelo autor.

O primeiro estudo feito com SelK humana demonstrou que esta conferiria proteção a altos níveis de ROS na célula, aumentando a resistência da célula a estresse oxidativo⁷. Recentemente, estudos de Du *et al*, 2010 relacionaram SelK com estresse de retículo endoplasmático, uma vez que a indução desta condição por agentes químicos ocasionam um aumento na expressão de SelK e sua depleção não tem efeito significativo sobre as células, entretanto quanto tratadas com tunicamicina, a inibição da expressão desta selenoproteína leva as células à apoptose¹¹⁷.

SelK é uma proteína transmembrana que contém um domínio N-terminal voltado para o lúmen do retículo endoplasmático e uma sequência C-terminal citosólica. A selenocisteína está localizada na terceira posição a partir do C-terminal, e a alta capacidade de redução desse aminoácido atenuaria os níveis de ROS intracelular¹²⁰. Os últimos estudos mostram a interação de SelK com proteínas do sistema de degradação de proteína mal enoveladas e, portanto, estaria envolvida com a manutenção da homeostase do retículo endoplasmático frente a estresse, se ligando a proteínas mal enoveladas e alvejando-as para degradação¹²⁰.

Plasmodium falciparum também apresenta SelK, e estudos recentes mostraram a localização no RE e a mudança nos níveis transcricionais dessa proteína com estresse oxidativo e nitrosativo⁸¹.

Os resultados obtidos por esse trabalho estão, portanto, de acordo com a literatura, onde a depleção de TbSelK aumentou a sensibilidade dessas células ao estresse oxidativo e/ou químico, específico de retículo endoplasmático induzido com tunicamicina ou β -mercaptoetanol. É importante notar que o estresse de RE induz o aumento nos níveis de ROS, e vice-versa, estando, portanto, os dois tipos de estresse ligados¹¹⁷ e reforçando a hipótese de que selenoproteínas atuariam na proteção contra estresse, sendo que a SelK de *T. brucei* desempenharia uma função na homeostase do retículo endoplasmático.

A selenoproteína SelT contém um motivo conservado denominado tipo-tioredoxina, com um domínio CXXU que detém a atividade biológica da proteína¹²². Esse padrão molecular também é encontrado em SelW, -V e -H e confere importante atividade redox à proteína¹⁶⁶. Estudos mostram que a super expressão de SelT aumenta os níveis de Ca^{2+} , e SelT mutantes Sec-Ala apresentam a liberação de Ca^{2+} bloqueado, implicando à SelT uma função na homeostase dos níveis de Ca^{2+} através de um mecanismo redox⁷⁶. SelT tem sido descrita como uma

proteína localizada no retículo endoplasmático, organela responsável pela manutenção dos níveis de Ca^{2+} .

Plasmodium falciparum também apresenta a selenoproteína SelT e estudos de sua super expressão mostraram aumento nos níveis de Ca^{2+} , além de sua localização no retículo endoplasmático. No entanto mudanças nos seus níveis de expressão não foram observadas sob estresse oxidativo ou nitrosativo⁸¹.

Os resultados obtidos por esse trabalho mostram a importância de TbSelT para o parasita uma vez que a diminuição de sua expressão resultou em inibição do crescimento da cultura. Esse efeito foi mais pronunciado sob condições estressantes e resultou em células mais sensíveis a agentes indutores de estresse de retículo, embora de forma menos pronunciada que a observada para TbSelK. O envolvimento dessa proteína com o balanço nos níveis de cálcio pode justificar esse efeito, sendo que um desbalanço nessa homeostase é um dos causadores de estresse em retículo endoplasmático.

A maior sensibilidade de células depletadas de TbSelK a β -mercaptoetanol, um agente redutor, e a tunicamicina, um inibidor de N-glicosilação, agentes que induzem o mal enovelamento de proteínas e consequentemente um estresse de retículo endoplasmático, nos permitem concluir que TbSelK está envolvida em mecanismos de degradação de proteínas mal enoveladas, sendo importante na manutenção da homeostase do retículo. Enquanto o efeito observado de diminuição no crescimento da cultura RNAi TbSelT induzida mesmo em condições ótimas de crescimento, mas ainda maior sob estresse nos indica que TbSelT pode desempenhar uma importante função de homeostase celular, que se torna ainda mais importante sob estresse, como seria o caso da manutenção nos níveis de cálcio.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Nesta tese de doutorado foram apresentados os resultados obtidos no decorrer de cinco anos de trabalho. A técnica de interferência do RNA, entre outras, foram empregadas com o objetivo de avaliar a importância da enzima selenofosfato sintetase e das selenoproteínas, SelK, SelT e SelTryp, de *T. brucei*. As selenoproteínas têm despertado grande interesse científico por suas características antioxidantes, sua peculiar via de síntese e pelas diferenças nas via encontradas em Bactérias, Arquéais e Eucaria, além de questões sobre a evolução dessa via.

Os protozoários parasitas apresentam um reduzido selenoproteoma, composto, por exemplo, de quatro selenoproteínas em *Plasmodium* e três em tripanosomatídeos. É interessante notar que entre esses dois parasitas há um padrão de selenoproteínas, apresentando duas em comum (SelK e SelT) e uma exclusiva de cada grupo, sem homologia com nenhuma outra proteína descrita. Como os dois grupos são parasitas que apresentam diferentes formas de vida ao longo do seu ciclo e sendo uma delas ambientada na corrente sanguínea, ambos são fortemente expostos a fluxos de espécies reativas de oxigênio (ROS), em níveis que podem ser tóxicos para o parasita, e proteínas com potencial redox seriam de

grande importância para a viabilidade, transmissão e progressão celular. A presença de selenoproteínas exclusivas para cada grupo, SelTryp em Kinetoplastidas e PfSel3 em *Plasmodium*, também reforça a similaridade entre os selenoproteomas⁸¹, nos levando a inferir que as selenoproteínas podem ser versáteis, suprindo as necessidades dos organismos de acordo com seu estilo de vida.

A inibição do crescimento celular pelo composto Auranofin foi determinada e este mostrou um LD₅₀ em 48 horas de incubação de 0,1 e 3 µM para *T. brucei* forma sanguínea e procíclica, respectivamente e 1 µM para a forma promastigota de *L. major*. Esse composto é altamente reativo com grupos tiol e selenol^{129; 133; 167} e sua ligação com selenocisteína presente no sítio ativo da proteína tiorredoxina glutatona redutase de *Schistosoma mansoni* foi demonstrada¹³³, sendo um inibidor de selenoproteínas. A alta sensibilidade dos parasitas a esse composto pode não ser exclusivamente devido à ligação com grupos selenol, mas nos levou a especular sobre a importância do conjunto de selenoproteínas para o parasita, uma vez que, se ligando a metabólitos de selênio e selenocisteína, a atividade de todas as selenoproteínas seriam inibidas pelo Auranofin.

Nosso grupo de pesquisa identificou as proteínas pertencentes à via de síntese de selenocisteína em *T. brucei* e, para investigar a localização celular do processo como um todo (síntese e incorporação), ensaios de imunofluorescência foram realizadas para as proteínas TbSPS2 e TbEFSec. As duas foram observadas apenas no citoplasma (colocalizando com proteínas de localização citoplasmática conhecida), em forma de grânulos, dispersos por toda a célula. Esses grânulos podem ser reflexos da formação de complexos supramoleculares. É sabido que as proteínas da via de síntese de selenocisteína interagem entre si durante a síntese do aminoácido no tRNA^{Sec}, e que muitas delas continuam ligadas (entre si e no tRNA^{Sec}) e são necessárias para o reconhecimento do elemento SECIS no RNA mensageiro e finalmente direcionarão o aminoácido para o ribossomo. Portanto, grandes complexos transientes são possíveis durante o processo de síntese e incorporação³⁸. Estudos têm sugerido a compartimentalização desse processo em mamíferos, entre núcleo e citoplasma, o que não foi observado em tripanosomatídeos e havendo duas possíveis explicações: o complexo formado no núcleo é rapidamente exportado para o citoplasma, de modo que não foi possível observá-lo através dos ensaios de imunofluorescência de TbSPS2 e TbEFSec, ou em tripanosomatídeos essa compartimentalização não ocorre, o que poderia ser

explicado pela ausência de SBP2, proteína responsável pelo reconhecimento de SECIS (evento que ocorria no núcleo) e recrutamento das outras proteínas complexadas com o tRNA^{Sec}. Não se sabe ao certo como o reconhecimento do SECIS é feito em organismos que não apresentam SBP2, mas podemos inferir que sem essa proteína todo o processo de síntese e incorporação de selenocisteína ocorra no citoplasma. Para avaliar a formação desses complexos e entender melhor a via de biossíntese de selenocisteína, experimentos de TAP-tag (*Tandem Affinity Purification*) estão sendo feitos em nosso grupo de pesquisa.

A enzima SPS2 é responsável pela síntese de selenofosfato, essencial para a síntese de selenocisteína. Experimentos de RNAi dessa proteína em *T. brucei* forma sanguínea e forma procíclica mostraram sua importância em condições adversas. Na forma procíclica, houve uma pronunciada inibição do crescimento devido à diminuição da expressão de TbSPS2 (avaliada por RT-PCR e imunofluorescência) frente a estresse (com diluição do meio após 4 dias), gerando células com fenótipo tipo-apoptose, com degradação do DNA. Esse efeito foi observado tanto nas imagens dos parasitas corados com DAPI, como nos experimentos de citometria de fluxo com células coradas com iodeto de propídeo, onde um grande pico de células com DNA degradado foi observado. Em condições ótimas de cultivo, o RNAi não causou efeito sobre as células, concordando com o descrito por Aeby *et al*^{116; 155}. O experimento de indução de estresse oxidativo, mostrou-se mais sensível ao tratamento com peróxido de hidrogênio (tanto para a forma sanguínea como para a procíclica) das células nas quais TbSPS2 foi silenciada, reforçando a importância de TbSPS2 em estresse. O mesmo efeito foi relatado para *Drosophila*, sendo as selenoproteínas fundamentais somente sobre condição de estresse, o que explicaria a ausência dessa classe de proteínas em alguns insetos¹¹⁹.

A diminuição da expressão das selenoproteínas individualmente mostrou que TbSelK e TbSelT são importantes para a defesa da célula contra estresse. Células depletadas de TbSelK apresentaram aumento na sensibilidade a β -mercaptoetanol e à tunicamicina, agentes indutores de estresse de retículo endoplasmático, o que nos permite inferir que TbSelK está diretamente envolvida em mecanismos de manutenção da homeostase do retículo. Também observou-se a redução no crescimento dessas células frente ao estresse oxidativo, que pode estar relacionado com o de estresse verificado no retículo, uma vez que os dois tipos de

estresse estão ligados. Células depletadas de TbSelT tiveram uma redução do crescimento em todas as situações testadas, revelando sua importância para o parasita. Entretanto, o aumento da sensibilidade a agentes indutores de estresse de retículo não foi tão pronunciado para as células RNAi TbSelK. Baseado nos dados obtidos juntamente com dados da literatura, que SelT exerceria uma função na homeostase de Ca^{2+} através de um mecanismo redox⁷⁶, podemos inferir que em *T. brucei*, o desbalanço de Ca^{2+} teria um efeito mais tardio no estresse de retículo endoplasmático, sendo TbSelT importante para a célula frente em qualquer situação, mais ainda frente a qualquer tipo de estresse. Uma função de manutenção dos níveis celulares de cálcio estaria de acordo com essa hipótese.

Recentemente foi demonstrado por Dolai *et al*⁹⁰ 2011, que a tunicamicina induz estresse de RE em *Leishmania*, com um rápido acúmulo de ROS, desbalanço nos níveis de Ca^{2+} citosólicos, e despolarização da mitocôndria, levando a degradação de DNA e consequente apoptose. Os resultados obtidos para RNAi de TbSelK e TbSelT e a importante inferência de localização celular de mitocôndria para SelTryp nos levam a inferir que as 3 selenoproteínas estariam envolvidas em mecanismos importantes na homeostase celular, e seriam fundamentais na resposta a estresse. O fenótipo tipo-apoptose observado para células de RNAi TbSPS2 reforçam essa idéia, onde a falta das três proteínas teria levado à apoptose frente ao estresse oxidativo e condições estressantes causadas pela prolongada manutenção da cultura. Assim, a diminuição da expressão de TbSPS2 levaria a diminuição nos níveis de TbSelK, TbSelT e TbSelTryp, proteínas envolvidas na homeostase celular e importantes na resposta a diferentes tipos de estresse. Com um desbalanço na resposta a proteínas mal enoveladas (causada pela ausência de TbSelK), nos níveis de Ca^{2+} (causada pela ausência de TbSelT) e algum mal funcionamento da mitocôndria (causada pela ausência de TbSelTryp, possivelmente) as células entrariam em apoptose. Ao passo que em condições normais, de homeostase, a ausência das selenoproteínas não traria efeito para o parasita. Isso explicaria o fato também de o efeito observado ser tardio, uma vez que para todas essas condições ocorrerem são necessários vários acontecimentos: diminuição de TbSPS2, selenofosfato indisponível, ausência de selenocisteína e por fim, ausência de selenoproteínas na célula. O fato de a inibição das selenoproteínas individualmente não ter resgatado o efeito observado no RNAi de TbSPS2 corroboram a hipótese de que este foi causado pela falta das 3 selenoproteínas, ou da combinação de duas.

Ou ainda, pode ser efeito da ausência de TbSelTryp, que não teve seu RNAi analisado nesse trabalho. É importante salientar que devido a não obtenção de células RNAi positivas para a proteína TbSelTryp, as inferências feitas são apenas especulativas.

A não obtenção de anticorpos anti-selenoproteínas não nos permitiu avaliar a diminuição da expressão de selenoproteínas com o silenciamento de TbSPS2. Estudos demonstram a incorporação de Cys no lugar de Sec dependente da disponibilidade de selênio¹⁵⁷, o que nos leva à possibilidade das proteínas continuarem sendo expressas na ausência de selenocisteína, com um aminoácido diferente no lugar de Sec, acarretando redução ou perda da atividade da proteína. A não incorporação de Se radioativo após depleção da selenocisteína foi demonstrada em *T. brucei* por Aeby *et al*¹¹⁶, mas não foi testado o nível de expressão das selenoproteínas.

Outro efeito causado pela inibição da expressão de SPS2 seria o acúmulo de formas inorgânicas tóxicas de selênio na célula. Como SPS2 é responsável por sintetizar selenofosfato a partir de seleneto, a não utilização deste composto levaria a um aumento nos níveis desse composto tóxico na célula, e é sabido que diferentes formas de selênio podem causar quebras no DNA¹⁵⁹, decréscimo na proliferação celular e indução da resposta ao estresse no retículo endoplasmático (UPR), levando à apoptose^{160; 161}. Altas concentrações de seleneto podem induzir a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), regulando assim vias de sinalização de apoptose mediadas por ROS¹⁶². Portanto, um acúmulo em longo prazo de metabólitos de selênio, aliados ao estresse induzido pelo cultivo prolongado da cultura, ou estresse oxidativo, podem ser responsáveis pelos efeitos observados na cultura com diminuição na expressão de TbSPS2.

É possível que a somatória desses fatores (falta de selenoproteínas, ou selenoproteínas com diminuta ou sem atividade e acúmulo de selênio) seja a causa da inibição do crescimento e fenótipo tipo-apoptose e não apenas um dos fatores isolado.

T. brucei e *T. cruzi* são parasitas que apresentam diferentes habitats ao longo do seu ciclo de vida. Na corrente sanguínea, por exemplo, são expostos a altas doses de ROS e usam diferentes abordagens para resistir a diferentes tipos de estresse encontrados ao longo do seu ciclo de vida. Nesse contexto, proteínas com capacidade de regular a homeostase celular são essenciais para a viabilidade e

progressão do parasita. Selenoproteínas apresentam tais características, e como observado sua importância frente a diferentes tipos de estresse, podem ser importantes no sucesso da infecção e progressão dos parasitas em diferentes condições.

5.1 Perspectivas

Essa tese de doutorado possibilita o planejamento de experimentos adicionais para o estudo das hipóteses ainda não testadas. Para tal finalidade as seguintes abordagens poderão ser empregadas:

- Novas transfecções do plasmídeo p2T7^{TABlue}/SelTryp:

Com os experimentos de silenciamento gênico por RNAi de SelTryp poderemos ter uma identificação do papel de todas as selenoproteínas de kinetoplastidas. Além disso, essa é a única selenoproteína que não apresenta homólogo em outros organismos, sendo um interessante alvo de estudo.

- Novas transfecções do plasmídeo p2T7^{TABlue}/SelTryp-SelK-SelT:

Com os experimentos de silenciamento gênico por RNAi empregando quimeras de fragmentos das três selenoproteínas ou de combinações dois-a-dois poderemos ter um panorama completo do selenoproteoma de kinetoplastidas.

- RNAi de selenoproteínas na forma sanguínea:

As duas formas do parasita apresentam diferentes respostas a estresse. E o RNAi de TbSPS2 não mostrou uma inibição significativa na forma sanguínea como a observada na forma procíclica. A participação dessas selenoproteínas em resposta a estresse na forma sanguínea esclareceria alguns pontos acerca da função dessa família de proteínas. E nos permitiria também realizar experimentos de RNAi *in vivo*.

- RNAi *in vivo*:

O objetivo desse experimento é investigar o efeito da depleção dos transcritos de SPS2, SelT, SelK e SelTryp no parasita durante a infecção em camundongo. Estes experimentos consistem em infectar camundongos com a linhagem RNAi, e induzir a diminuição da expressão da proteína de interesse com adição de doxiciclina na água dos camundongos. Isso nos permitirá avaliar a essencialidade das selenoproteínas na infecção, momento de alto estresse. Uma vez que na corrente sanguínea o parasita passa a enfrentar altas concentrações de ROS. Esta abordagem também permitirá seu emprego na validação de outros alvos moleculares *in vivo*.

- Citotoxicidade de diferentes formas de Se:

Tratar os parasitas com Se (em diferentes formas) nos permitirá avaliar se o efeito do RNAi de TbSPS2 pode ter sido causado pelo acúmulo de formas tóxicas de Se.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 BALANA-FOUCE, R.; REGUERA, R. M. RNA interference in *Trypanosoma brucei*: a high-throughput engine for functional genomics in trypanosomatids? **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 8, p. 348-351, Aug 2007. ISSN 1471-4922. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000248740300003 >. Acesso em: Dez 2011.

2 HERAS, I. L.; PALOMO, M.; MADRID, Y. Selenoproteins: the key factor in selenium essentiality. State of the art analytical techniques for selenoprotein studies. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, n. 6, p. 1717-1727, Jun 2011. ISSN 1618-2642. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000290570200022 >. Acesso em: Dez 2011.

3 ALLMANG, C.; WURTH, L.; KROL, A. The selenium to selenoprotein pathway in eukaryotes: More molecular partners than anticipated. **Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1790, n. 11, p. 1415-1423, Nov 2009. ISSN 0304-4165. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000271454600004 >. Acesso em: Dez 2011.

4 LOBANOV, A. V. et al. Selenium metabolism in *Trypanosoma*: characterization of selenoproteomes and identification of a Kinetoplastida-specific selenoprotein. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 14, p. 4012-4024, 2006. ISSN 0305-1048. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000240583800022 >. Acesso em: Dez 2011.

5 BOYD, R. Selenium stories. **Nature Chemistry**, v. 3, n. 7, p. 570-570, Jul 2011. ISSN 1755-4330. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000291979700017 >. Acesso em: Jan 2012.

6 RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health. **Lancet**, v. 356, n. 9225, p. 233-241, Jul 2000. ISSN 0140-6736. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000088179100037 >. Acesso em: Jan 2012.

7 LU, C. et al. Identification and characterization of selenoprotein K: An antioxidant in cardiomyocytes. **Febs Letters**, v. 580, n. 22, p. 5189-5197, 2006. ISSN 0014-5793. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000241044400012 >. Acesso em: Dez 2011.

8 ATKINS, J. F.; GESTELAND, R. F. Translation: the twenty-first amino acid. **Nature**, v. 407, n. 6803, p. 463-465, 2000. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000089727400030 >. Acesso em: Nov 2011.

9 LOBANOV, A. V.; HATFIELD, D. L.; GLADYSHEV, V. N. Eukaryotic selenoproteins and selenoproteomes. **Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1790, n. 11, p. 1424-1428, Nov 2009. ISSN 0304-4165. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000271454600005 >. Acesso em: Nov 2011.

10 JACKSON-ROSARIO, S. E.; SELF, W. T. Targeting selenium metabolism and selenoproteins: Novel avenues for drug discovery. **Metallomics**, v. 2, n. 2, p. 112-116, 2010. ISSN 1756-5901. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000274397000003 >. Acesso em: Nov 2011.

11 TASKOV, K. et al. Nematode selenoproteome: the use of the selenocysteine insertion system to decode one codon in an animal genome? **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 7, p. 2227-2238, 2005. ISSN 0305-1048. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000228778700021 >. Acesso em: Jan 2012.

12 BONILLA, M. et al. Platyhelminth mitochondrial and cytosolic redox homeostasis is controlled by a single thioredoxin glutathione reductase and dependent on selenium and glutathione. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 26, p. 17898-17907, Jun 2008. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000256949200018 >. Acesso em: Jan 2012.

13 LOBANOV, A. V. et al. The Plasmodium selenoproteome. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 2, p. 496-505, 2006. ISSN 0305-1048. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000235291300020 >. Acesso em: Dez 2011.

14 KUNTZ, A. N. et al. Thioredoxin glutathione reductase from schistosoma mansoni: An essential parasite enzyme and a key drug target. **Plos Medicine**, v. 4, n. 6, p. 1071-1086, Jun 2007. ISSN 1549-1277. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000247476300019 >. Acesso em: Jan 2012.

15 CASSAGO, A. et al. Identification of Leishmania selenoproteins and SECIS element. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 149, n. 2, p. 128-134, Oct 2006. ISSN 0166-6851. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000240776600002 >. Acesso em: Out 2011.

16 PAPP, L. V. et al. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 9, n. 7, p. 775-806, Jul 2007. ISSN 1523-0864. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000246646200001 >. Acesso em: Jan 2012.

17 BOCK, A. et al. Selenocysteine - The 21st amino-acid. **Molecular Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 515-520, Mar 1991. ISSN 0950-382X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1991FD41000001 >. Acesso em: Jan 2012.

18 CHAMBERS, I. et al. The structure of the mouse glutathione-peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the termination codon TGA. **Embo Journal**, v. 5, n. 6, p. 1221-1227, Jun 1986. ISSN 0261-4189. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1986C728700016 >. Acesso em: Dez 2011.

19 ZINONI, F. et al. Nucleotide sequence and expression of the selenocysteine containing polypeptide of formate dehydrogenase (formate hydrogen lyase linked) from *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 13, p. 4650-4654, Jul 1986. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1986C992000016 >. Acesso em: Jan 2012.

20 JOHANSSON, L.; GAFVELIN, G.; ARNER, E. S. J. Selenocysteine in proteins - properties and biotechnological use. **Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1726, n. 1, p. 1-13, Oct 2005. ISSN 0304-4165. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000233156800001 >. Acesso em: Nov 2011.

21 ARNER, E. S. J. Selenoproteins-What unique properties can arise with selenocysteine in place of cysteine? **Experimental Cell Research**, v. 316, n. 8, p. 1296-1303, May 2010. ISSN 0014-4827. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000277817800004 >. Acesso em: Jan 2012.

22 CASTELLANO, S. On the unique function of selenocysteine - Insights from the evolution of selenoproteins. **Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1790, n. 11, p. 1463-1470, Nov 2009. ISSN 0304-4165. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000271454600010 >. Acesso em: Jan 2012.

23 FOMENKO, D. E.; MARINO, S. M.; GLADYSHEV, V. N. Functional diversity of cysteine residues in proteins and unique features of catalytic redox-active cysteines in thiol oxidoreductases. **Molecules and Cells**, v. 26, n. 3, p. 228-235, Sep 2008. ISSN 1016-8478. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000259782200002 >. Acesso em: Jan 2012.

24 PALIOURA, S. et al. Human SepSecS or SLA/LP: selenocysteine formation and autoimmune hepatitis. **Biological Chemistry**, v. 391, n. 7, p. 771-776, Jul 2010. ISSN 1431-6730. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000279573200009 >. Acesso em: Jan 2012.

25 FORCHHAMMER, K. et al. Selenocysteine synthase from Escherichia coli: nucleotide sequence of the gene (SelA) and purification of the protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 10, p. 6318-6323, Apr 1991. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1991FE37300049 >. Acesso em: Jan 2012.

26 GLASS, R. S. et al. Monoselenophosphate synthesis, characterization, and identity with the prokaryotic biological selenium donor, compound sepx. **Biochemistry**, v. 32, n. 47, p. 12555-12559, Nov 1993. ISSN 0006-2960. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1993MJ99000001 >. Acesso em: Jan 2012.

27 CARLSON, B. A. et al. Identification and characterization of phosphoseryl-tRNA(Ser Sec) kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 35, p. 12848-12853, Aug 2004. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000223694700015 >. Acesso em: Dez 2011.

28 SQUIRES, J. E.; BERRY, M. J. Eukaryotic selenoprotein synthesis: mechanistic insight incorporating new factors and new functions for old factors. **IUBMB Life**, v. 60, n. 4, p. 232-235, Apr 2008. ISSN 1521-6543. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000254784600005 >. Acesso em: Dez 2011.

29 STOCK, T.; ROTHER, M. Selenoproteins in Archaea and Gram-positive bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1790, n. 11, p. 1520-1532, Nov 2009. ISSN 0304-4165. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000271454600016 >. Acesso em: Jan 2012.

30 STURCHLER, C. et al. Unique secondary and tertiary structural features of the eukaryotic selenocysteine transfer RNA (Sec). **Nucleic Acids Research**, v. 21, n. 5, p. 1073-1079, Mar 1993. ISSN 0305-1048. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1993KT34300004 >. Acesso em: Jan 2012.

31 FORCHHAMMER, K.; LEINFELDER, W.; BOCK, A. Identification of a novel translation factor necessary for the incorporation of selenocysteine into protein. **Nature**, v. 342, n. 6248, p. 453-456, Nov 1989. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1989CB42600076 >. Acesso em: Jan 2012.

32 FAGEGALTIER, D. et al. Characterization of mSelB, a novel mammalian elongation factor for selenoprotein translation. **Embo Journal**, v. 19, n. 17, p. 4796-4805, Sep 2000. ISSN 0261-4189. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000089275600035 >. Acesso em: Jan 2012.

33 PALESKAVA, A.; KONEVEGA, A. L.; RODNINA, M. V. Thermodynamic and Kinetic Framework of Selenocysteyl-tRNA(Sec) Recognition by Elongation Factor SelB. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 5, Jan 2010. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000273829000016 >. Acesso em: Jan 2012.

34 THANBICHLER, M.; BOCK, A. The function of SECIS RNA in translational control of gene expression in *Escherichia coli*. **Embo Journal**, v. 21, n. 24, p. 6925-6934, Dec 2002. ISSN 0261-4189. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000179952000030 >. Acesso em: Dez 2011.

35 COPELAND, P. R. et al. A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs. **Embo Journal**, v. 19, n. 23, p. 6634-6634, Dec 2000. ISSN 0261-4189. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000165763800035 >. Acesso em: Jan 2012.

36 LESCURE, A. et al. cDNA cloning, expression pattern and RNA binding analysis of human selenocysteine insertion sequence (SECIS) binding protein 2. **Gene**, v. 291, n. 1-2, p. 279-285, May 2002. ISSN 0378-1119. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000176903900029 >. Acesso em: Dez 2011.

37 TAKEUCHI, A. et al. A short motif in Drosophila SECIS Binding Protein 2 provides differential binding affinity to SECIS RNA hairpins. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 7, p. 2126-2141, Apr 2009. ISSN 0305-1048. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000265741600007 >. Acesso em: Jan 2012.

38 SMALL-HOWARD, A. et al. Supramolecular complexes mediate selenocysteine incorporation in vivo. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 6, p. 2337-2346, Mar 2006. ISSN 0270-7306. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000235915400028 >. Acesso em: Dez 2011.

39 LEINFELDER, W. et al. In vitro synthesis of selenocysteinyl-transfer RNA UCA from seryl-transfer RNA UCA – involvement and characterization of the SelD gene product. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 2, p. 543-547, Jan 1990. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1990CK37800009 >. Acesso em: Dez 2011.

40 MATSUMOTO, E. et al. Structure of an N-terminally truncated selenophosphate synthetase from Aquifex aeolicus. **Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 64, p. 453-458, Jun 2008. ISSN 1744-3091. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000256295000003 >. Acesso em: Jan 2012.

41 EHRENREICH, A. et al. Selenoprotein synthesis in *Escherichia coli*: purification and characterization of the enzyme catalyzing selenium activation. **European Journal of Biochemistry**, v. 206, n. 3, p. 767-773, Jun 1992. ISSN 0014-2956. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1992HY40400019 >. Acesso em: Jan 2012.

42 VERES, Z. et al. Selenophosphate: enzyme properties and catalytic reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 14, p. 10597-10603, Apr 1994. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1994NF01700062 >. Acesso em: Jan 2012.

43 WALKER, H.; FERRETTI, J. A.; STADTMAN, T. C. Isotope exchange studies on the *Escherichia coli* selenophosphate synthetase mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 5, p. 2180-2185, Mar 1998. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000072366600045 >. Acesso em: Jan 2012.

44 LOW, S. C.; HARNEY, J. W.; BERRY, M. J. Clotting and functional characterization of human selenophosphate synthetase, an essential component of selenoprotein synthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 37, p. 21659-21664, Sep 1995. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1995RU75700038 >. Acesso em: Jan 2012.

45 KIM, I. Y.; STADTMAN, T. C. Selenophosphate synthetase – Detection in extracts of rats tissues by immunoblot assay and partial purification of the enzyme from archaean *Methanococcus vannielii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 17, p. 7710-7713, Aug 1995. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1995RP74800023 >. Acesso em: Jan 2012.

46 XU, X.-M. et al. Selenophosphate synthetase 2 is essential for selenoprotein biosynthesis. **Biochemical Journal**, v. 404, p. 115-120, May 2007. ISSN 0264-6021. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000246547300013 >. Acesso em: Dez 2011.

47 XU, X.-M. et al. Biosynthesis of selenocysteine on its tRNA in eukaryotes. **Plos Biology**, v. 5, n. 1, p. 96-105, Jan 2007. ISSN 1544-9173. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000245243100010 >. Acesso em: Dez 2011.

48 LOBANOV, A. V.; HATFIELD, D. L.; GLADYSHEV, V. N. Selenoproteinless animals: Selenophosphate synthetase SPS1 functions in a pathway unrelated to selenocysteine biosynthesis. **Protein Science**, v. 17, n. 1, p. 176-182, Jan 2008. ISSN 0961-8368. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000251834500020 >. Acesso em: Jan 2012.

49 STADTMAN, T. C. Selenium dependent enzymes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 49, p. 93-110, 1980. ISSN 0066-4154. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1980JY53700004 >. Acesso em: Jan 2012.

50 AXLEY, M. J.; STADTMAN, T. C. Selenium metabolism and selenium dependent enzymes in microorganisms. **Annual Review of Nutrition**, v. 9, p. 127-137, 1989. ISSN 0199-9885. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1989AF24500007 >. Acesso em: Jan 2012.

51 LESCURE, A. et al. Novel selenoproteins identified in silico and in vivo by using a conserved RNA structural motif. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 53, p. 38147-38154, Dec 1999. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000084528000086 >. Acesso em: Jan 2012.

52 CASTELLANO, S. et al. In silico identification of novel selenoproteins in the *Drosophila melanogaster* genome. **Embo Reports**, v. 2, n. 8, p. 697-702, Aug 2001. ISSN 1469-221X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000170511800014 >. Acesso em: Jan 2012.

53 CHEN, P. et al. In silico identification of silkworm selenoproteomes. **Chinese Science Bulletin**, v. 51, n. 23, p. 2860-2867, Dec 2006. ISSN 1001-6538. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000244136400008 >. Acesso em: Jan 2012.

54 KRYUKOV, G. V.; KRYUKOV, V. M.; GLADYSHEV, V. N. New mammalian selenocysteine-containing proteins identified with an algorithm that searches for selenocysteine insertion sequence elements. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 48, p. 33888-33897, Nov 1999. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000083857500015 >. Acesso em: Jan 2012.

55 KRYUKOV, G. V.; GLADYSHEV, V. N. The prokaryotic selenoproteome. **Embo Reports**, v. 5, n. 5, p. 538-543, May 2004. ISSN 1469-221X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000221669500021 >. Acesso em: Nov 2011.

56 KRYUKOV, G. V. et al. Characterization of mammalian selenoproteomes. **Science**, v. 300, n. 5624, p. 1439-1443, May 2003. ISSN 0036-8075. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000183181800048 >. Acesso em: Dez 2011.

57 MORENO-REYES, R. et al. Kashin-Beck osteoarthropathy in rural Tibet in relation to selenium and iodine status. **New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 16, p. 1112-1120, Oct 1998. ISSN 0028-4793. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000076448200004 >. Acesso em: Jan 2012.

58 VANDERPAS, J. B. et al. Iodine and selenium deficiency associated with cretinism in northern Zaire. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 52, n. 6, p. 1087-1093, Dec 1990. ISSN 0002-9165. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1990EK40600021 >. Acesso em: Jan 2012.

59 BOSL, M. R. et al. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse selenocysteine tRNA gene (Trsp). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 11, p. 5531-5534, May 1997. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1997XB71100011 >. Acesso em: Jan 2012.

60 REEVES, M. A.; HOFFMANN, P. R. The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 15, p. 2457-2478, Aug 2009. ISSN 1420-682X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000268102000004 >. Acesso em: Nov 2011.

61 SHCHEDRINA, V. A. et al. Structure-function relations, physiological roles, and evolution of mammalian ER-resident selenoproteins. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, n. 7, p. 839-849, Apr 2010. ISSN 1523-0864. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000275050200006 >. Acesso em: Jan 2012.

62 DIKIY, A. et al. SelT, SelW, SelH, and Rdx12: genomics and molecular insights into the functions of selenoproteins of a novel thioredoxin-like family. **Biochemistry**, v. 46, n. 23, p. 6871-6882, Jun 2007. ISSN 0006-2960. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000247141700019 >. Acesso em: Jan 2012.

63 FERGUSON, A. D. et al. NMR structures of the selenoproteins Sep15 and SelM reveal redox activity of a new thioredoxin-like family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 6, p. 3536-3543, Feb 2006. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000235128200064 >. Acesso em: Jan 2012.

64 MARTIN, J. L. Thioredoxin: a fold for all reasons. **Structure**, v. 3, n. 3, p. 245-250, Mar 1995. ISSN 0969-2126. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1995QP15600003 >. Acesso em: Jan 2012.

65 POTASHKIN, J. A.; MEREDITH, G. E. The role of oxidative stress in the dysregulation of gene expression and protein metabolism in neurodegenerative disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, n. 1-2, p. 144-151, Jan-Feb 2006. ISSN 1523-0864. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000236964000015 >. Acesso em: Jan 2012.

66 RYTER, S. W. et al. Mechanisms of cell death in oxidative stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 9, n. 1, p. 49-89, Jan 2007. ISSN 1523-0864. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000242288300003 >. Acesso em: Dez 2011.

67 LU, J.; HOLMGREN, A. Selenoproteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 2, p. 723-727, Jan 2009. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000262122900004 >. Acesso em: Dez 2011.

68 ARBOGAST, S.; FERREIRO, A. Selenoproteins and protection against oxidative stress: Selenoprotein N as a novel player at the crossroads of redox signaling and calcium homeostasis. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, n. 7, p. 893-904, Apr 2010. ISSN 1523-0864. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000275050200010 >. Acesso em: Dez 2011.

69 PAPP, L. V. et al. The redox state of SECIS binding protein 2 controls its localization and selenocysteine incorporation function. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 13, p. 4895-4910, Jul 2006. ISSN 0270-7306. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000238507800013 >. Acesso em: Jan 2012.

70 PAPP, L. V. et al. SECIS-Binding Protein 2 promotes cell survival by protecting against oxidative stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, n. 7, p. 797-808, Apr 2010. ISSN 1523-0864. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000275050200002 >. Acesso em: Jan 2012.

71 BURK, R. F.; HILL, K. E. Selenoprotein P-Expression, functions, and roles in mammals. **Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1790, n. 11, p. 1441-1447, Nov 2009. ISSN 0304-4165. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000271454600007 >. Acesso em: Jan 2012.

72 CABREIRO, F. et al. Methionine sulfoxide reductases relevance to aging and protection against oxidative stress. **Understanding and Modulating Aging**, v. 1067, p. 37-44, 2006. ISSN 0077-8923. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000281258500006 >. Acesso em: Jan 2012.

73 LABUNSKYY, V. M.; HATFIELD, D. L.; GLADYSHEV, V. N. The Sep15 protein family: roles in disulfide bond formation and quality control in the endoplasmic reticulum. **IUBMB Life**, v. 59, n. 1, p. 1-5, 2007. ISSN 1521-6543. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000244890900001 >. Acesso em: Jan 2012.

74 LILLEY, B. N.; PLOEGH, H. L. A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. **Nature**, v. 429, n. 6994, p. 834-840, Jun 2004. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000222213000032 >. Acesso em: Jan 2012.

75 YE, Y. H. et al. A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. **Nature**, v. 429, n. 6994, p. 841-847, Jun 2004. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000222213000033 >. Acesso em: Jan 2012.

76 GRUMOLATO, L. et al. Selenoprotein T is a PACAP-regulated gene involved in intracellular Ca(2+) mobilization and neuroendocrine secretion. **Faseb Journal**, v. 22, n. 6, p. 1756-1768, Jun 2008. ISSN 0892-6638. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000256352700016 >. Acesso em: Jan 2012.

77 JURYNEC, M. J. et al. Selenoprotein N is required for ryanodine receptor calcium release channel activity in human and zebrafish muscle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 34, p. 12485-12490, Aug 2008. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000258905700070 >. Acesso em: Jan 2012.

78 NOVOSELOV, S. V. et al. Selenoproteins and selenocysteine insertion system in the model plant cell system, *Chlamydomonas reinhardtii*. **Embo Journal**, v. 21, n. 14, p. 3681-3693, Jul 2002. ISSN 0261-4189. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000176784700013 >. Acesso em: Jan 2012.

79 LOBANOV, A. V. et al. Evolutionary dynamics of eukaryotic selenoproteomes: large selenoproteomes may associate with aquatic life and small with terrestrial life. **Genome Biology**, v. 8, n. 9, 2007. ISSN 1474-760X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000252100800024 >.

80 GLADYSHEV, V. N. et al. Selenocysteine-containing thioredoxin reductase in *C. elegans*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 259, n. 2, p. 244-249, Jun 1999. ISSN 0006-291X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000080912200003 >. Acesso em: Jan 2012.

81 RÖSELER, A. et al. Insight into the selenoproteome of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Antioxidants & Redox Signaling**, 2012. Em processo de publicação. Acesso em: Jan 2012.

82 ROXSTROM-LINDQUIST, K. et al. Large genomic differences between the morphologically indistinguishable diplomonads *Spironucleus barkhanus* and *Spironucleus salmonicida*. **Bmc Genomics**, v. 11, Apr 2010. ISSN 1471-2164. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000277992000002 >. Acesso em: Jan 2012.

83 VONLAUFEN, N. et al. Stress response pathways in protozoan parasites. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 12, p. 2387-2399, Dec 2008. ISSN 1462-5814. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000260730100002 >. Acesso em: Jan 2012.

84 APHASIZHEV, R.; APHASIZHEVA, I. Mitochondrial RNA processing in trypanosomes. **Research in Microbiology**, v. 162, n. 7, p. 655-663, Sep 2011. ISSN 0923-2508. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000295393900001 >. Acesso em: Jan 2012.

85 HAJDUK, S.; OCHSENREITER, T. RNA editing in kinetoplastids. **RNA Biology**, v. 7, n. 2, p. 229-236, Mar-Apr 2010. ISSN 1547-6286. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000282761300018 >. Acesso em: Dez 2011.

86 CASSOLA, A.; DE GAUDENZI, J. G.; FRASCH, A. C. Recruitment of mRNAs to cytoplasmic ribonucleoprotein granules in trypanosomes. **Molecular Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 655-670, Aug 2007. ISSN 0950-382X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000248484000006 >. Acesso em: Jan 2012.

87 KRAUTH-SIEGEL, R. L.; MEIERING, S. K.; SCHMIDT, H. The parasite-specific trypanothione metabolism of trypanosoma and leishmania. **Biological Chemistry**, v. 384, n. 4, p. 539-549, Apr 2003. ISSN 1431-6730. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000182158100006 >. Acesso em: Jan 2012.

88 COMINI, M. A.; KRAUTH-SIEGEL, R. L.; FLOHE, L. Depletion of the thioredoxin homologue tryparedoxin impairs antioxidative defence in African trypanosomes. **Biochemical Journal**, v. 402, p. 43-49, Feb 2007. ISSN 0264-6021. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000244284400005 >. Acesso em: Nov 2011.

89 KRIEGER, S. et al. Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. **Molecular Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 542-552, Feb 2000. ISSN 0950-382X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000085367800005 >. Acesso em: Nov 2011.

90 DOLAI, S. et al. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in Leishmania through Ca(2+)-dependent and caspase-independent mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 15, p. 13638-13646, Apr 2011. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000289282200082 >. Acesso em: Jan 2012.

91 MALHOTRA, J. D.; KAUFMAN, R. J. The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 18, n. 6, p. 716-731, Dec 2007. ISSN 1084-9521. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000253486700002 >. Acesso em: Jan 2012.

92 GOSLINE, S. J. C. et al. Intracellular eukaryotic parasites have a distinct unfolded protein response. **Plos One**, v. 6, n. 4, Apr 29 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000290024700068 >. Acesso em: Jan 2012.

93 BERNALES, S.; PAPA, F. R.; WALTER, P. Intracellular signaling by the unfolded protein response. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 22, p. 487-508, 2006. ISSN 1081-0706. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000242325100020 >. Acesso em: Jan 2012.

94 REINER, D. S.; MCCAFFERY, J. M.; GILLIN, F. D. Reversible interruption of *Giardia lamblia* cyst wall protein transport in a novel regulated secretory pathway. **Cellular Microbiology**, v. 3, n. 7, p. 459-472, Jul 2001. ISSN 1462-5814. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000170439300003 >. Acesso em: Jan 2012.

95 KOUMANDOU, V. L. et al. The trypanosome transcriptome is remodelled during differentiation but displays limited responsiveness within life stages. **Bmc Genomics**, v. 9, Jun 2008. ISSN 1471-2164. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000257741900001 >. Acesso em: Dez 2011.

96 GOLDSHMIDT, H. et al. Persistent ER stress induces the spliced leader RNA silencing pathway (SLS), leading to programmed cell death in *Trypanosoma brucei*. **Plos Pathogens**, v. 6, n. 1, Jan 2010. ISSN 1553-7366. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000274227100022 >. Acesso em: Jan 2012.

97 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **African trypanosomiasis (sleeping sickness)**. WHO: Fact sheets. 259, 2006. Acesso em: Jan 2012.

98 MALVY, D.; CHAPPUIS, F. Sleeping sickness. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 7, p. 986-995, Jul 2011. ISSN 1198-743X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000292390400006 >. Acesso em: Jan 2012.

99 VICKERMAN, K. Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. **British Medical Bulletin**, v. 41, n. 2, p. 105-114, 1985. ISSN 0007-1420. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1985AKS0300002 >. Acesso em: Jan 2012.

100 MATTHEWS, K. R. The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 2, p. 283-290, Jan 2005. ISSN 0021-9533. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000227102400003 >. Acesso em: Jan 2012.

101 PARSONS, M. Glycosomes: parasites and the divergence of peroxisomal purpose. **Molecular Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 717-724, Aug 2004. ISSN 0950-382X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000222722000001 >. Acesso em: Jan 2012.

102 MATTHEWS, K. R.; ELLIS, J. R.; PATEROU, A. Molecular regulation of the life cycle of African trypanosomes. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 1, p. 40-47, Jan 2004. ISSN 1471-4922. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000188226500012 >. Acesso em: Jan 2012.

103 RODITI, I.; LINIGER, M. Dressed for success: the surface coats of insect-borne protozoan parasites. **Trends in Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 128-134, Mar 2002. ISSN 0966-842X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000174204700011 >. Acesso em: Jan 2012.

104 GEHRIG, S.; EFFERTH, T. Development of drug resistance in *Trypanosoma brucei rhodesiense* and *Trypanosoma brucei gambiense*. Treatment of human African trypanosomiasis with natural products (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 22, n. 4, p. 411-419, Oct 2008. ISSN 1107-3756. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000259763500002 >. Acesso em: Jan 2012.

105 KOLEV, N. G.; TSCHUDI, C.; ULLU, E. RNA Interference in protozoan parasites: achievements and challenges. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 9, p. 1156-1163, Sep 2011. ISSN 1535-9778. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000294453000002 >. Acesso em: Jan 2012.

106 FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806-811, Feb 1998. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000072089500057 >. Acesso em: Jan 2012.

107 BASTIN, P.; SHERWIN, T.; GULL, K. Paraflagellar rod is vital for trypanosome motility. **Nature**, v. 391, n. 6667, p. 548-548, Feb 1998. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000071842300036 >. Acesso em: Jan 2012.

108 NGO, H. et al. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 25, p. 14687-14692, Dec 1998. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000077436700020 >. Acesso em: Jan 2012.

109 SHI, H. F. et al. Genetic interference in *Trypanosoma brucei* by heritable and inducible double-stranded RNA. **Rna-a Publication of the Rna Society**, v. 6, n. 7, p. 1069-1076, Jul 2000. ISSN 1355-8382. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000088263700013 >. Acesso em: Dez 2011.

110 WANG, Z. F. et al. Inhibition of *Trypanosoma brucei* gene expression by RNA interference using an integratable vector with opposing T7 promoters. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 51, p. 40174-40179, Dec 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000166039500053 >. Acesso em: Dez 2011.

111 WICKSTEAD, B.; ERSFELD, K.; GULL, K. Targeting of a tetracycline-inducible expression system to the transcriptionally silent minichromosomes of *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 125, n. 1-2, p. 211-216, Nov-Dec 2002. ISSN 0166-6851. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000179862000022 >. Acesso em: Dez 2011.

112 WIRTZ, E.; CLAYTON, C. Inducible gene expression in trypanosomes mediated by a prokaryotic repressor. **Science**, v. 268, n. 5214, p. 1179-1183, May 1995. ISSN 0036-8075. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1995RA60400038 >. Acesso em: Dez 2011.

113 ELBASHIR, S. M. et al. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. **Embo Journal**, v. 20, n. 23, p. 6877-6888, Dec 2001. ISSN 0261-4189. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000172629100032 >. Acesso em: Dez 2011.

114 GESLAIN, R. et al. *Trypanosoma* seryl-tRNA synthetase is a metazoan-like enzyme with high affinity for tRNA^(Sec). **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 50, p. 38217-38225, Dec 2006. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000242709500014 >. Acesso em: Jan 2012.

115 SCULACCIO, S. A. et al. Selenocysteine incorporation in Kinetoplastid: Selenophosphate synthetase (SELD) from *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 162, n. 2, p. 165-171, Dec 2008. ISSN 0166-6851. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000261164700008 >. Acesso em: Dez 2011.

116 AEBY, E. et al. The canonical pathway for selenocysteine insertion is dispensable in Trypanosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 13, p. 5088-5092, Mar 2009. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000264790600026 >. Acesso em: Dez 2011.

117 DU, S. et al. SelK is a novel ER stress-regulated protein and protects HepG2 cells from ER stress agent-induced apoptosis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 502, n. 2, p. 137-143, Oct 2010. ISSN 0003-9861. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000281881700008 >. Acesso em: Dez 2011.

118 HUANG, Z. et al. Selenoprotein K is a novel target of m-calpain, and cleavage is regulated by toll-like receptor-induced calpastatin in macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 40, p. 34830-34838, Oct 2011. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000295406300037 >. Acesso em: Jan 2012.

119 SHCHEDRINA, V. A. et al. Analyses of fruit flies that do not express selenoproteins or express the mouse selenoprotein, methionine sulfoxide reductase B1, reveal a role of selenoproteins in stress resistance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 34, p. 29449-29461, Aug 2011. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000294046600002 >. Acesso em: Jan 2012.

120 SHCHEDRINA, V. A. et al. Selenoprotein K binds multiprotein complexes and is involved in the regulation of endoplasmic reticulum homeostasis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 50, p. 42937-42948, Dec 2011. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://CCC:000298351300015 >. Acesso em: Jan 2012.

121 SENGUPTA, A. et al. Selenoprotein T deficiency alters cell adhesion and elevates selenoprotein W expression in murine fibroblast cells. **Biochemistry and Cell Biology-Biochimie et Biologie Cellulaire**, v. 87, n. 6, p. 953-961, Dec 2009. ISSN 0829-8211. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000272202200014 >. Acesso em: Jan 2012.

122 TANGUY, Y. et al. The PACAP-regulated gene selenoprotein T is highly induced in nervous, endocrine, and metabolic tissues during ontogenetic and regenerative processes. **Endocrinology**, v. 152, n. 11, p. 4322-4335, Nov 2011. ISSN 0013-7227. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000296583900035 >. Acesso em: Jan 2012.

123 REEVES, M. A.; BELLINGER, F. P.; BERRY, M. J. The neuroprotective functions of selenoprotein M and its role in cytosolic calcium regulation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, n. 7, p. 809-818, Apr 2010. ISSN 1523-0864. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000275050200003 >. Acesso em: Jan 2012.

124 BORDO, D.; BORK, P. The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily - Sequence-structure-function relations. **Embo Reports**, v. 3, n. 8, p. 741-746, Aug 2002. ISSN 1469-221X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000177585300013 >. Acesso em: Jan 2012.

125 GROMER, S. et al. Human placenta thioredoxin reductase: isolation of the selenoenzyme, steady state kinetics, and inhibition by therapeutic gold compounds. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 32, p. 20096-20101, Aug 1998. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000075305400028 >. Acesso em: Dez 2011.

126 RIGOBELLO, M. P. et al. Induction of mitochondrial permeability transition by auranofin, a gold(I)-phosphine derivative. **British Journal of Pharmacology**, v. 136, n. 8, p. 1162-1168, Aug 2002. ISSN 0007-1188. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000177471600013 >. Acesso em: Dez 2011.

127 RIGOBELLO, M. P. et al. Gold complexes inhibit mitochondrial thioredoxin reductase: consequences on mitochondrial functions. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, n. 10, p. 1634-1641, Oct 2004. ISSN 0162-0134. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000224599100012 >. Acesso em: Dez 2011.

128 YOO, M. H. et al. Thioredoxin reductase 1 deficiency reverses tumor phenotype and tumorigenicity of lung carcinoma cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 19, p. 13005-13008, May 2006. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000237336600002 >. Acesso em: Jan 2012.

129 JACKSON-ROSARIO, S. et al. Auranofin disrupts selenium metabolism in *Clostridium difficile* by forming a stable Au-Se adduct. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 14, n. 4, p. 507-519, May 2009. ISSN 0949-8257. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000265397800003 >. Acesso em: Fev 2012.

130 SANNELLA, A. R. et al. New uses for old drugs. Auranofin, a clinically established antiarthritic metallodrug, exhibits potent antimalarial effects in vitro: mechanistic and pharmacological implications. **Febs Letters**, v. 582, n. 6, p. 844-847, Mar 2008. ISSN 0014-5793. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000257331400002 >. Acesso em: Fev 2012.

131 ANGELUCCI, F. et al. Inhibition of Schistosoma mansoni Thioredoxin-glutathione Reductase by Auranofin Structural and kinetic aspects. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 42, p. 28977-28985, Oct 2009. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000270678900055 >. Acesso em: Fev 2012.

132 MARTINEZ-GONZALEZ, J. J. et al. In vitro killing action of auranofin on Taenia crassiceps metacestode (cysticerci) and inactivation of thioredoxin-glutathione reductase (TGR). **Parasitology Research**, v. 107, n. 1, p. 227-231, Jun 2010. ISSN 0932-0113. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000278361800032 >. Acesso em: Fev 2012.

133 CAROLI, A. et al. Investigation of a potential mechanism for the inhibition of SmTGR by Auranofin and its implications for Plasmodium falciparum inhibition. **Biochemical and Biophysical Research** v. 417, n. 1, p. 576-581, 2012. Acesso em: Fev 2012.

134 ILARI, A. et al. A gold-containing drug against parasitic polyamine metabolism: the X-ray structure of trypanothione reductase from Leishmania infantum in complex with auranofin reveals a dual mechanism of enzyme inhibition. **Amino Acids**, v. 42, n. 2-3, p. 803-811, Feb 2012. ISSN 0939-4451. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000299506000039 >. Acesso em: Mar 2012.

135 BRUN, R.; SCHONENBERGER, M. Cultivation and *in vitro* cloning of procyclic culture forms of Trypanosoma brucei in a semi defined medium. **Acta Tropica**, v. 36, n. 3, p. 289-292, 1979. ISSN 0001-706X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1979HN60100011 >. Acesso em: Dez 2011.

136 WIRTZ, E. et al. A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in Trypanosoma brucei. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 99, n. 1, p. 89-101, Mar 1999. ISSN 0166-6851. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000079510300009 >. Acesso em: Dez 2011.

137 HESSE, F. et al. A novel cultivation technique for long term maintenance of bloodstream form Trypanosomes *in vitro*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 70, n. 1-2, p. 157-166, Mar 1995. ISSN 0166-6851. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1995QV85700015 >. Acesso em: Nov 2011.

138 ZHAI, L. et al. The antileishmanial activity of novel oxygenated chalcones and their mechanism of action. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 43, n. 6, p. 793-803, Jun 1999. ISSN 0305-7453. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000081222400007 >. Acesso em: Dez 2011

139 MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL-RUIZ, J. J.; GOMEZ-BARRIO, A. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, v. 86, n. 12, p. 999-1002, Dec 2000. ISSN 0932-0113. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000165692500009 >. Acesso em: Nov 2011.

140 BERG, K. et al. The use of a water soluble formazan complex to quantitate the cell number and mitochondrial function of *Leishmania major* promastigotes. **Parasitology Research**, v. 80, n. 3, p. 235-239, Apr 1994. ISSN 0044-3255. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1994NG67600011 >. Acesso em: Nov 2011.

141 ORKIN, S. MOLECULAR-CLONING - A Laboratory manual, 2ND EDITION - SAMBROOK, J, FRITSCH, EF, MANIATIS, T. **Nature**, v. 343, n. 6259, p. 604-605, Feb 15 1990. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1990CN98900049 >. Acesso em: Nov 2011.

142 SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.

143 MORAES, M. C. S. et al. Novel membrane-bound eIF2 alpha kinase in the flagellar pocket of *Trypanosoma brucei*. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 11, p. 1979-1991, Nov 2007. ISSN 1535-9778. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000251410200005 >. Acesso em: Fev 2012.

144 BANGS, J. D. et al. Molecular cloning and cellular localization of a bip homolog in *Trypanosoma brucei*: divergent ER retention signals in a lower eukaryote. **Journal of Cell Science**, v. 105, p. 1101-1113, Aug 1993. ISSN 0021-9533. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1993LV68700024 >. Acesso em: Fev 2012.

145 MCDOWELL, M. A.; RANSOM, D. M.; BANGS, J. D. Glycosylphosphatidylinositol-dependent secretory transport in *Trypanosoma brucei*. **Biochemical Journal**, v. 335, p. 681-689, Nov 1998. ISSN 0264-6021. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000076980300029 >. Acesso em: Fev 2012.

146 LOPES, D. D. O. et al. Biochemical studies with DNA polymerase beta and DNA polymerase beta-PAK of *Trypanosoma cruzi* suggest the involvement of these proteins in mitochondrial DNA maintenance. **DNA Repair**, v. 7, n. 11, p. 1882-1892, Nov 2008. ISSN 1568-7864. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000260949000011 >. Acesso em: Fev 2012.

147 REDMOND, S.; VADIVELU, J.; FIELD, M. C. RNAi: an automated web-based tool for the selection of RNAi targets in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 128, n. 1, p. 115-118, Apr 2003. ISSN 0166-6851. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000182908300017 >. Acesso em: Fev 2012.

148 CLAYTON, C. E. et al. Down-regulating gene expression by RNA interference in *Trypanosoma brucei*. **Rna Silencing: Methods and Protocols**, v. 309, p. 39-59, 2005. ISSN 1064-3745. Disponível em: <<Go to ISI>://CCC:000237546100005 >. Acesso em: Fev 2012.

149 HAMMARTON, T. C. et al. Stage-specific differences in cell cycle control in *Trypanosoma brucei* revealed by RNA interference of a mitotic cyclin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 25, p. 22877-22886, Jun 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000183503900093 >. Acesso em: Jan 2012.

150 MACHADO-SILVA, A. et al. Mismatch repair in *Trypanosoma brucei*: Heterologous expression of MSH2 from *Trypanosoma cruzi* provides new insights into the response to oxidative damage. **Gene**, v. 411, n. 1-2, p. 19-26, Mar 2008. ISSN 0378-1119. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000254596900003 >. Acesso em: Dez 2011.

151 MARCINIAK, S. J. et al. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. **Genes & Development**, v. 18, n. 24, p. 3066-3077, Dec 2004. ISSN 0890-9369. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000225853200009 >. Acesso em: Fev 2012.

152 BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. ISSN 0003-2697. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1976BU74400029 >. Acesso em: Fev 2012.

153 GUNATILLEKE, S. S.; BARRIOS, A. M. Inhibition of lysosomal cysteine proteases by a series of Au(I) complexes: A detailed mechanistic investigation. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 13, p. 3933-3937, Jun 2006. ISSN 0022-2623. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000238446700021 >. Acesso em: Fev 2012.

154 KRYSKO, D. V. et al. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. **Methods**, v. 44, n. 3, p. 205-221, Mar 2008. ISSN 1046-2023. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000254689300003 >. Acesso em: Fev 2012.

155 AEBY, E.; SEIDEL, V.; SCHNEIDER, A. The selenoproteome is dispensable in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 168, n. 2, p. 191-193, Dec 2009. ISSN 0166-6851. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000271126900010 >. Acesso em: Dez 2011.

156 STOCK, T.; SELZER, M.; ROTHER, M. In vivo requirement of selenophosphate for selenoprotein synthesis in archaea. **Molecular Microbiology**, v. 75, n. 1, p. 149-160, Jan 2010. ISSN 0950-382X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000273068500013 >. Acesso em: Jan 2012.

157 XU, X.-M. et al. Targeted insertion of cysteine by decoding UGA codons with mammalian selenocysteine machinery. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 50, p. 21430-21434, Dec 2010. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000285521500040 >. Acesso em: Fev 2012.

158 COMBS, G. F.; COMBS, S. B. The nutritional biochemistry of selenium. **Annual Review of Nutrition**, v. 4, p. 257-280, 1984. ISSN 0199-9885. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1984TC42700012 >. Acesso em: Fev 2012.

159 ZHOU, N. et al. DNA damage-mediated apoptosis induced by selenium compounds. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 32, p. 29532-29537, Aug 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000184507000019 >. Acesso em: Mar 2012.

160 KAECK, M. et al. Differential induction of growth arrest inducible genes by selenium compounds. **Biochemical Pharmacology**, v. 53, n. 7, p. 921-926, Apr 1997. ISSN 0006-2952. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1997WW92000003 >. Acesso em: Mar 2012.

161 ZU, K. et al. Enhanced selenium effect on growth arrest by BiP/GRP78 knockdown in p53-null human prostate cancer cells. **Oncogene**, v. 25, n. 4, p. 546-554, Jan 2006. ISSN 0950-9232. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000234897400006 >. Acesso em: Mar 2012.

162 XU, H. B. et al. The signal transduction in ROS-mediated apoptosis induced by selenium compounds. **Progress in Chemistry**, v. 14, n. 4, p. 305-310, Jul 2002. ISSN 1005-281X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000178090100012 >. Acesso em: Mar 2012.

163 FU, L. et al. Proteomic study on sodium selenite-induced apoptosis of human cervical cancer HeLa cells. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 25, n. 3, p. 130-137, 2011. ISSN 0946-672X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000296598800002 >. Acesso em: Mar 2012.

164 CHEN, T.; WONG, Y.-S. Selenocystine induces reactive oxygen species-mediated apoptosis in human cancer cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 63, n. 2, p. 105-113, Feb 2009. ISSN 0753-3322. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000264042200006 >. Acesso em: Mar 2012.

165 SURADJI, E. W. et al. Selenium-induced apoptosis-like cell death in *Plasmodium falciparum*. **Parasitology**, v. 138, n. 14, p. 1852-1862, Dec 2011. ISSN 0031-1820. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000298284500004 >. Acesso em: Mar 2012.

166 HOLMGREN, A. Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 2, n. 4, p. 811-U209, Win 2000. ISSN 1523-0864. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000207500900019 >. Acesso em: Mar 2012.

167 CAROLI, A. et al. Investigation of a potential mechanism for the inhibition of SmTGR by Auranofin and its implications for *Plasmodium falciparum* inhibition. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 417, n. 1, p. 576-581, Jan 2012. ISSN 0006-291X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000299491600098 >. Acesso em: Mar 2012.

ANEXOS

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular & Biochemical Parasitology



Short communication

Oxidative stress protection of *Trypanosomes* requires selenophosphate synthaseF.C. Costa^a, M.A.V. Oliva^a, T.C.L. de Jesus^b, S. Schenkman^b, O.H. Thiemann^{a,*}^a Laboratory of Protein Crystallography and Structural Biology, Physics Institute of São Carlos, University of São Paulo, Av. Trabalhador São-Carlense 400, PO Box 369, 13566-590 São Carlos, SP, Brazil^b Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo, Rua Botucatu 862, 8º andar, 04023-062 São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 November 2010

Received in revised form 26 April 2011

Accepted 30 April 2011

Available online 23 June 2011

Keywords:

Trypanosoma

Selenocysteine

Selenophosphate synthetase

RNA interference

Oxidative stress

ABSTRACT

Selenoproteins are characterized by the incorporation of at least one amino acid selenocysteine (Sec-U) encoded by in-frame UGA stop codons. These proteins, as well as the components of the Sec synthesis pathway, are present in members of the bacteria, archaea and eukaryote domains. Although not a ubiquitous pathway in all organisms, it was also identified in several protozoa, including the Kinetoplastida. Genetic evidence has indicated that the pathway is non-essential to the survival of *Trypanosoma* growing in non-stressed conditions. By analyzing the effects of RNA interference of the *Trypanosoma brucei* selenophosphate synthetase *SPS2*, we found a requirement under sub-optimal growth conditions. The present work shows that *SPS2* is involved in oxidative stress protection of the parasite and its absence severely hampers the parasite survival in the presence of an oxidizing environment that results in an apoptotic-like phenotype and cell death.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

The amino acid selenocysteine (Sec – U) is present in organisms from all three domains of life (bacteria, archaea and eukarya), and is the main biological form of incorporation of selenium into selenoproteins at an in-frame UGA stop codon [1,2]. Its biosynthesis and subsequent introduction into a protein sequence requires the function of at least four genes in prokaryotes and more than seven in eukaryotes [3,4] in addition to a specific tRNA expressed from the *SELC* gene [5]. Previous studies [6,7] identified the presence of the Sec biosynthesis pathway in Kinetoplastid parasites. The synthesis of selenocysteine requires the highly reactive reduced selenium donor compound, monoselenophosphate [8,9], generated by the enzyme selenophosphate synthetase (*SPS2*), a central enzyme in the pathway and also present in *Leishmania major*, *T. cruzi* and *Trypanosoma brucei* [10].

The protection against oxidative stress has been considered a valid drug target as a consequence of genetic validation on trypanothione-related enzymes [11]. Most known selenoproteins act as oxidoreductases regulating the cellular redox state or are involved in redox related functions [12,13]. Here we present evidence by RNA interference experiments to propose that the selenocysteine synthesis pathway is involved in the oxidative stress protection. Previous work [14,15] has suggested that this pathway is dispensable in *T. brucei* procyclic and blood-

stream life stage forms. Our results extended this observation, indicating that the selenocysteine synthesis pathway is relevant for long-term protection against the exposure to oxidative stress.

The nucleic acid and amino acid sequences of *T. brucei* selenophosphate synthetase (*TbSPS2* accession no. XP.823164) were identified in *T. brucei* genomic databases. The *SPS2* nucleotide sequence showed no significant identity with other *T. brucei* genes as well as with their human and *Escherichia coli* homologues. For RNAi analysis [16], a 1076 bp fragment of *TbSPS2* was amplified by the polymerase chain reaction (PCR) from *T. brucei* 427 procyclic genomic DNA. The PCR product was cloned into the pCR2.1TOPO vector (Invitrogen), sequenced and cloned into the *Eam1105* I sites of a modified version of the p2T7^{TAB}Blue vector [17,18]. This construction was linearized by *Not* I cleavage and transfected into procyclic *T. brucei* 29-13 (PCF) [19] and *T. brucei* single marker bloodstream (BSF) [20] cell-lines by electroporation. The cells were cloned by the limiting dilution technique and selected under 2.5 µg/mL phleomycin to obtain stable cell lines as previously described [21].

To induce the synthesis of the double strand RNA (dsRNA), cells were incubated in medium containing tetracycline (1 µg/mL) and their growth followed by counting in a hemacytometer. Cell cultures were diluted to 5 × 10⁵ cells/mL (PCF) and 5 × 10⁴ cells/mL (BSF) at intervals of four days until reaching the stationary phase. To determine the *TbSPS2* mRNA depletion, total RNA was isolated before and after RNAi induction at different time points. The *TbSPS2* mRNA was estimated by semi-quantitative RT-PCR (RevertAidTM

Abbreviations: *SPS2*, selenophosphate synthetase 2; RNAi, RNA interference.

* Corresponding author. Tel.: +55 16 3373 8089; fax: +55 16 3373 9881.

E-mail address: thiemann@ifsc.usp.br (O.H. Thiemann).

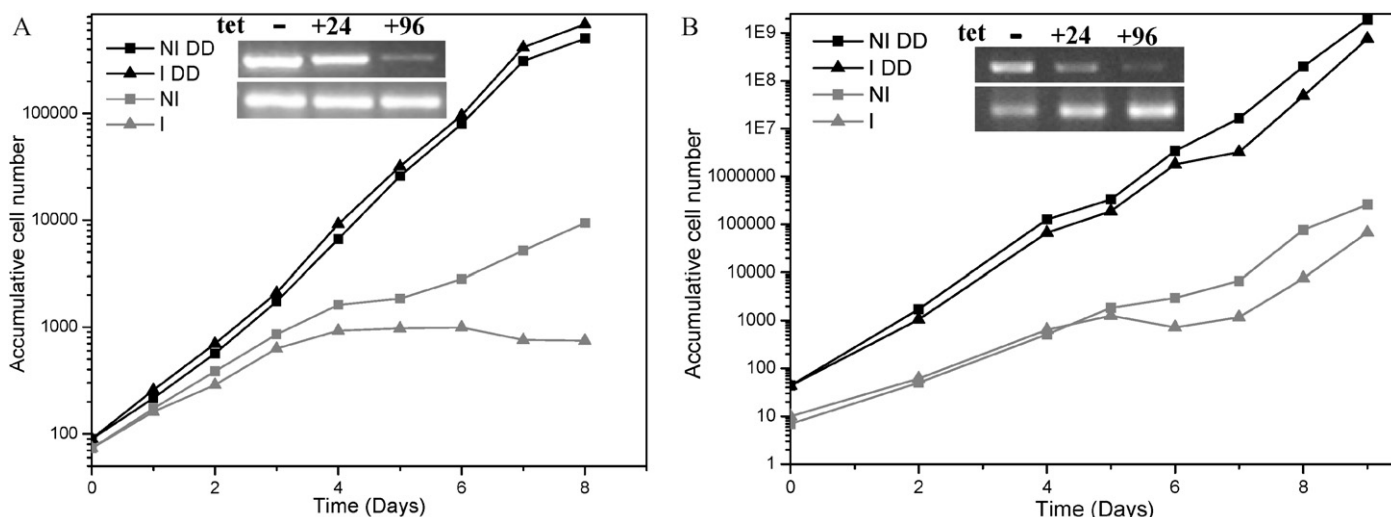


Fig. 1. Effect of SPS2 knockdown only affects *T. brucei* growing in sub-optimal conditions. Knockdown of *TbSPS2* by RNAi was achieved with a specific fragment PCR-amplified from genomic DNA using gene-specific primers (*TbSPS2a* 5'-GCGCTCGAGGACTACACACGGCTTAAGGGTTGCAG-3', *TbSPS2b* 5'-CGCAAGCTTTAATCATTACCTTCGCTCCACCT-3') and cloned into a modified p277^{Tblue} with phleomycin resistance. The recombinant plasmids were linearized to accomplish their integration in the ribosomal repeat spacer of the *T. brucei* genome. PCF 29–13 were cultured at 26 °C in Cunningham's medium supplemented with 10% fetal bovine serum (panel A). BSF, SM strain, were cultivated in HMI-9 medium containing 10% of heat-inactivated fetal bovine serum at 37 °C with 5% CO₂ (Panel B). Cultures were diluted daily (DD, black symbols) to 1×10^6 cells/mL (PCF) and 1×10^5 cells/mL (BSF) or every four-day (D4, gray symbols) to 5×10^5 cells/mL (PCF) and 5×10^4 cells/mL (BSF) in the presence (I) and in the absence of tetracycline (NI). A representative of three experiments is shown. Insets show the semi-quantitative RT-PCR (RevertAidTM M-MuLV Reverse Transcriptase) performed using the sequence specific primers (*TbSPS2c* 5'-ATTGTGAAATGCAGCACAAGGATGAGACC-3', *TbSPS2d* 5'-CAGCGTTATATAGTTCCTCAATCTCCTCCGAG-3') from total RNA isolated using Trizol (Invitrogen) before and after tetracycline addition at the indicated points. It produces a PCR fragments of 531 bp. *T. brucei* glycosomal glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase gene (*gGAPDH*, X59955.1) was used as control with the primer pair *TbGAPDH*a 5'-CCTCGGAATGAGATTGATGCTGTGCTGT-3' and *TbGAPDH*b 5'-CACATACTCCACCAAGCTTTCCC-3' in a standard RT-PCR, resulting in PCR fragments of 244 bp.

M-MuLV Reverse Transcriptase) using sequence-specific primers. The *T. brucei* glycosomal glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (*gGAPDH*, accession no. X59955.1) was used as control. As shown in the insets of Fig. 1A and B, the expression of *TbSPS2* dsRNA led to degradation of the specific mRNA. The unrelated transcript, *TbGAPDH*, remained unaffected in the samples analyzed. The non-induced *T. brucei* cells transfected with *TbSPS2* RNAi construct showed a small reduction of the corresponding mRNA as compared to the non-transfected cells (data not shown). This phenomenon is commonly seen in these experiments due to the expression leakage in the T7 dual-promoter system, which is compatible with the instability observed in the transfected but non-induced cells compared to wild type [22].

When replacing the medium every day, no effect on cell growth was observed following RNAi induction for both PCF and BSF (Fig. 1A and B, black symbols). These results are in agreement with previously published data describing that selenium methionine pathway is dispensable in *T. brucei* [14,15,23]. However, when replacing the medium every 4th day, expression of *TbSPS2* dsRNA resulted in severe growth inhibition of induced PCF and BSF cultures (Fig. 1A and B, gray symbols). These results suggest that *TbSPS2* could be required for cells growing in suboptimal conditions).

Since SPS2 is credited with the central role of providing the selenium donor for the whole pathway, we examined in more detail the RNAi effect of this gene. The cell morphology of *T. brucei* cells shows that the non-induced cells appeared normal (Fig. 2B) while the *TbSPS2* knockdown cells presented no, or fragmented nuclei (Fig. 2A). To examine the DNA content of the non-induced (NI) and induced (I) *TbSPS2* RNAi PCF (1×10^6 cells), were subjected to tetracycline induction under stress conditions (DT4) and in the daily-diluted condition (DD). Flow cytometer analysis of cells stained with propidium iodide revealed that *TbSPS2* cells growing

in stressed conditions had a 37% decrease in the G2 (C2, being C the DNA content) in induced cultures when compared to control cultures (Fig. 2C). More importantly, an almost 4-fold increase in the degraded DNA peak (C < C1) corresponding to dead parasites, from 7% (NI) to 29% (I), was visible. This same peak remains constant in the non-induced (7.5%) and induced (9.6%) cells growth on the daily dilutions condition, as shown in the histogram of Fig. 2B. These results are consistent with an apoptotic-like phenotype generated by the *TbSPS2* knockdown under stressed condition [24].

The known role of selenoproteins in redox pathways resulting in a protection against oxidative stress [25] in mammalian cells and the RNAi experiments results, under stress conditions, led us to test the sensitivity of the *TbSPS2* dsRNA cell lines to the hydrogen peroxide exposure, in both procyclic and bloodstream forms. As described earlier, a short-term exposure to H₂O₂ in standard growth medium that contains β-mercaptoethanol, resulted in no significant culture viability effect [14]. To investigate the long-term oxidative stress effect in *TbSPS2* depleted *T. brucei* cells, daily-diluted growth curves were performed with addition of H₂O₂. After the 4th day of continuous exposure to H₂O₂, only RNAi induced cells (PCF and BSF) presented impaired growth (Fig. 3A and B).

Therefore, the increased sensitivity to oxidative stress induced by H₂O₂ of *TbSPS2* knockdown *T. brucei* cells, demonstrates that selenoproteins are involved in long-term oxidative protection of *Trypanosoma* cells. The exact role of selenium containing proteins in this protective effect requires further investigation. Recently, the involvement of a *Trypanosoma* homologue selenoprotein, SELK, in the stress-regulation and protection of mammalian cells to endoplasmic reticulum stress agent-induced apoptosis has been described [26]. At any rate, the data presented here clearly demonstrate that the selenocysteine pathway in *Trypanosoma* plays a relevant role for the parasite survival.

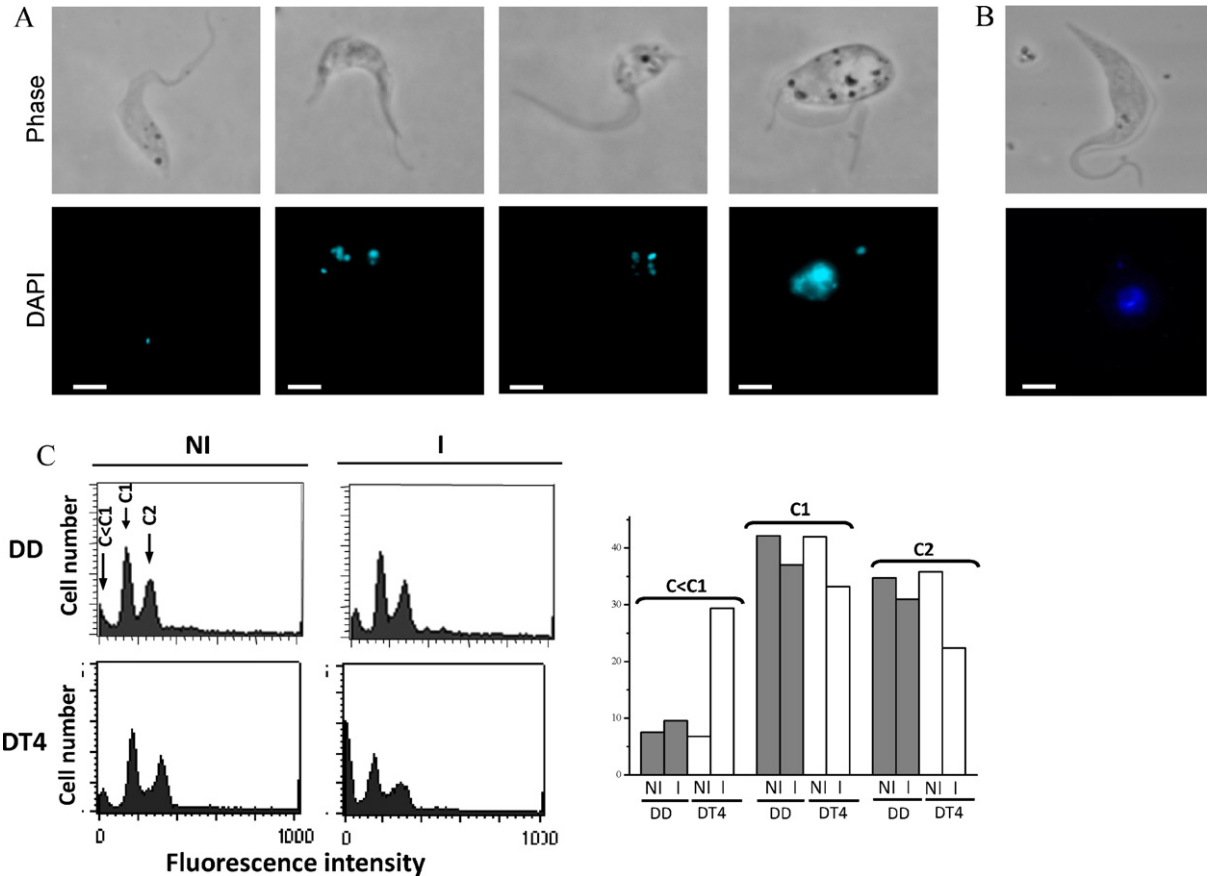


Fig. 2. SPS2 knockdown affects the nucleus morphology in PCF of *T. brucei*. (A) The panel shows examples of PCF 8 days after RNAi induction for SPS2 as observed after fixation with 4% paraformaldehyde in PBS by phase contrast microscope (Phase) and fluorescence after staining with 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Cells exhibited a morphological apoptotic phenotype with abnormal cellular and nuclear morphology. Bars = 2 μm . (B) Non induced cells. Panel (C) show flow cytometer analysis of PCF stained with propidium iodide. Cells (1×10^6) were washed with PBS, resuspended in 500 μL of ice-cold 70% methanol, at 4 $^\circ\text{C}$. The fixed parasites were washed once with PBS and incubated for 20 min at 37 $^\circ\text{C}$ with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of DNase-free RNase A (Roche-Diagnostics). Samples were washed in PBS, resuspended in 500 μL of PBS containing 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ propidium iodide and analyzed using a Becton–Dickinson Excalibur flow cytometer. The data corresponding to 10,000 events was analyzed using the WinMid 2.8 software. At right are shown four FACS distribution graphs of DNA content in control (NI) or after SPS2 RNAi induction (I), at the daily diluted condition (DD) and at the stressed condition, culture diluted every four day (DT4). A peak of degraded DNA (C < C1), G1 (C1) and G2 (C2) peaks are indicated, being C the DNA content of the cells. At left is shown the histogram comparison of the % cell population with C < C1, C1 and C2 DNA content. Not included are the cells in S phase and signal due to cell debris.

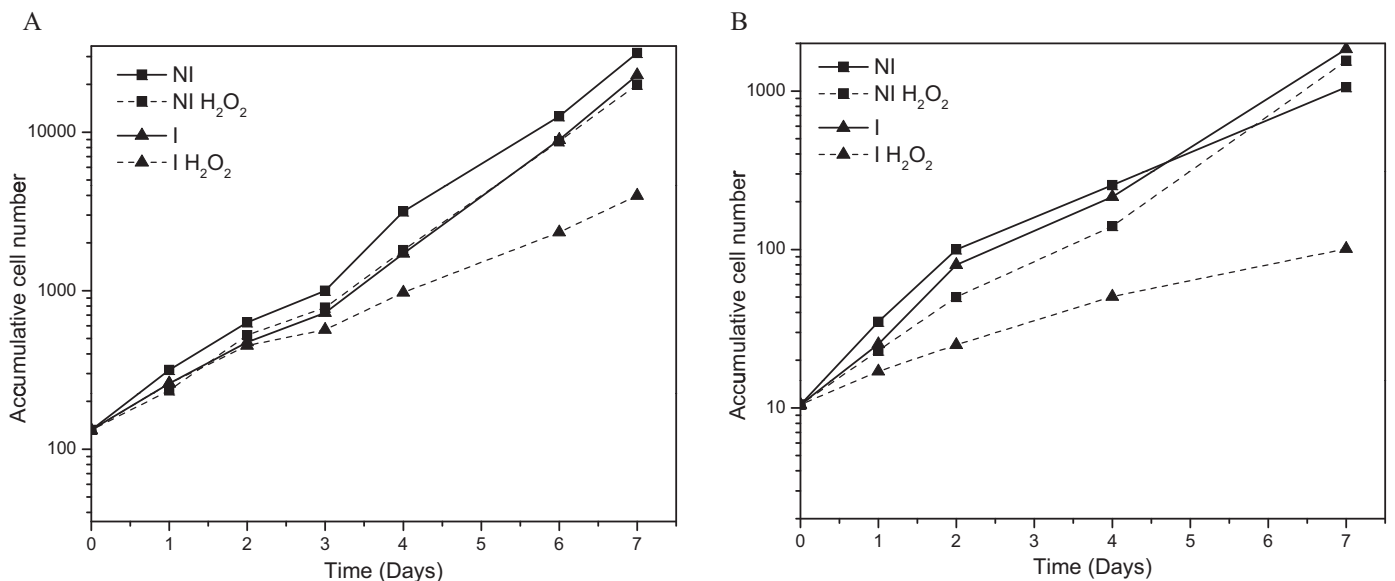


Fig. 3. Sensitivity to after of *TbSPS2* knockdown increases the sensitivity of *T. brucei* to H₂O₂. PCF (panel A) and BSF (panel B) containing the construction for RNAi against *TbSPS2* were daily diluted (DD) to 1×10^6 cells/mL (PCF) and 1×10^5 cells/mL (BSF) in the presence of tetracycline (I, solid), in the absence of tetracycline (NI, solid), in the presence of tetracycline and H₂O₂ (I H₂O₂, dash), in the absence of tetracycline and the presence of H₂O₂ (NI H₂O₂, dash). In PCF tests it was used 5 μM and in BSF tests 50 μM of H₂O₂. Growth curves are representative examples of multiple experiments ($n \geq 3$).

Acknowledgements

This work was supported in part by the research grants: 99/02874-9, 98/14138-2 (FAPESP), 480648/2007-7 (CNPq) to O. H. Thiemann and 07/54621-5 (FAPESP) and 472946/2007-2 (CNPq) to S. Schenkman. We would like to thank the members of the Protein Crystallography and Structural Biology Group (IFSC-USP) for helpful discussions in the course of this work. We would like to express our gratitude also to Dr. Susana A. Sculaccio, José A. L. da Costa, José G. Catarino and Norma B. Saes for technical help during this study.

References

- [1] Donovan J, Copeland PR. Threading the needle: getting selenocysteine into proteins. *Antioxid Redox Sign* 2010;12:881–92.
- [2] Yuan J, O'Donoghue P, Ambrogelly A, et al. Distinct genetic code expansion strategies for selenocysteine and pyrrolysine are reflected in different aminoacyl-tRNA formation systems. *Febs Lett* 2010;584:342–9.
- [3] Driscoll DM, Copeland PR. Mechanism and regulation of selenoprotein synthesis. *Annu Rev Nutr* 2003;23:17–40.
- [4] Allmang C, Wurth L, Krol A. The selenium to selenoprotein pathway in eukaryotes: more molecular partners than anticipated. *Bba-Gen Subjects* 2009;1790:1415–23.
- [5] Leinfelder W, Zehelein E, Mandrandberthelot MA, Bock A. Gene for a novel transfer-Rna species that accepts L-serine and cotranslationally inserts selenocysteine. *Nature* 1988;331:723–5.
- [6] Cassago A, Rodrigues EM, Prieto EL, et al. Identification of Leishmania selenoproteins and SECIS element. *Mol Biochem Parasit* 2006;149:128–34.
- [7] Lobanov AV, Gromer S, Salinas G, Gladyshev VN. Selenium metabolism in Trypanosoma: characterization of selenoproteomes and identification of a Kinetoplastida-specific selenoprotein. *Nucleic Acids Res* 2006;34:4012–24.
- [8] Glass RS, Singh WP, Jung W, Veres Z, Scholz TD, Stadtman TC. Monoselenophosphate-synthesis, characterization and identity with the prokaryotic biological selenium donor compound SEPX. *Biochemistry* 1993;32:12555–9.
- [9] Veres Z, Kim IY, Scholz TD, Stadtman TC. Selenophosphate synthetase-enzyme properties and catalytic reaction. *J Biol Chem* 1994;269:10597–603.
- [10] Sculaccio SA, Rodrigues EM, Cordeiro AT, et al. Selenocysteine incorporation in Kinetoplastid: selenophosphate synthetase (SELD) from Leishmania major and Trypanosoma brucei. *Mol Biochem Parasit* 2008;162:165–71.
- [11] Jaeger T, Flohe L. The thiol-based redox networks of pathogens: unexploited targets in the search for new drugs. *Biofactors* 2006;27:109–20.
- [12] Papp LV, Holmgren A, Khanna KK. Selenium and selenoproteins in health and disease. *Antioxid Redox Sign* 2010;12:793–5.
- [13] Lobanov AV, Hatfield DL, Gladyshev VN. Eukaryotic selenoproteins and selenoproteomes. *Bba-Gen Subjects* 2009;1790:1424–8.
- [14] Aeby E, Seidel V, Schneider A. The selenoproteome is dispensable in blood-stream forms of Trypanosoma brucei. *Mol Biochem Parasit* 2009;168:191–3.
- [15] Aeby E, Palioura S, Pusnik M, et al. The canonical pathway for selenocysteine insertion is dispensable in Trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:5088–92.
- [16] LaCount DJ, Bruse S, Hill KL, Donelson JE. Double-stranded RNA interference in Trypanosoma brucei using head-to-head promoters. *Mol Biochem Parasit* 2000;111:67–76.
- [17] Alibu VP, Storm L, Haile S, Clayton C, Horn D. A doubly inducible system for RNA interference and rapid RNAi plasmid construction in Trypanosoma brucei. *Mol Biochem Parasit* 2005;139:75–82.
- [18] Clayton CE, Estevez AM, Hartmann C, Alibu VP, Field M, Horn D. Down-regulating gene expression by RNA interference in Trypanosoma brucei. *RNA Silencing: Methods and Protocols* 2005;309:39–59.
- [19] Wirtz E, Clayton C. Inducible gene-expression in Trypanosomes mediated by a prokaryotic repressor. *Science* 1995;268:1179–83.
- [20] Wirtz E, Leal S, Ochatt C, Cross GAM. A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in Trypanosoma brucei. *Mol Biochem Parasit* 1999;99:89–101.
- [21] Garcia LT, Leite NR, Alfonzo JD, Thiemann OH. Effects of Trypanosoma brucei tryptophanyl-tRNA synthetases silencing by RNA interference. *Mem I Oswaldo Cruz* 2007;102:757–62.
- [22] Durand-Dubief M, Kohl L, Bastin P. Efficiency and specificity of RNA interference generated by intra- and intermolecular double stranded RNA in Trypanosoma brucei. *Mol Biochem Parasit* 2003;129:11–21.
- [23] Poliak P, Douglas Van Hoewyk DV, Obornik M, et al. Functions and cellular localization of cysteine desulfurase and selenocysteine lyase in Trypanosoma brucei. *FEBS J* 2009;277:383–93.
- [24] Casanova M, Portales P, Blaineau C, Crobu L, Bastien P, Pages M. Inhibition of active nuclear transport is an intrinsic trigger of programmed cell death in trypanosomatids. *Cell Death Differ* 2008;15:1910–20.
- [25] Arbogast S, Ferreiro A. Selenoproteins and protection against oxidative stress: selenoprotein N as a novel player at the crossroads of redox signaling and calcium homeostasis. *Antioxid Redox Sign* 2010;12:893–904.
- [26] Du SQ, Zhou J, Jia Y, Huang KX. SelK is a novel ER stress-regulated protein and protects HepG2 cells from ER stress agent-induced apoptosis. *Arch Biochem Biophys* 2010;502:137–43.

Selenocysteine Biosynthesis and Insertion Machinery in *Naegleria gruberi*

da Silva, M.T.A.^a, Caldas, V.E.A.^{&a}, Costa, F.C.^{a,b}, Silvestre, D. A. M. M.^c and
Thiemann, O.H.^{*a}

^a Laboratory of Protein Crystallography and Structural Biology, IFSC-USP, Av.
Trabalhador SãoCarlense 400, P.O. Box: 369, CEP 13560-970, São Carlos/SP, Brasil.

^b Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos. Rod.
Washington Luís, km 235 - SP-310, CEP 13565-905, São Carlos/SP, Brasil

^c Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Av.
Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255, Cerqueira César, CEP 05403-000 São Paulo/SP,
Brasil.

& **Present Address:** Zernike Institute for Advanced Materials, University of Groningen,
Groningen 9747 AG, The Netherlands.

* **Corresponding author:** Tel.: 55 (16) 3373-8089, Fax: 55 (16) 3373-9881; E-mail:
thiemann@ifsc.usp.br

Abstract

Selenium (Se) is an essential trace element mainly found in selenoproteins as the 21st amino acid (Selenocysteine – Sec – U). Selenoproteins play an important role in growth and proliferation, generally involved in cellular redox balance. Selenocysteine is encoded by an in phase UGA codon when a specific stem-loop structure, designated Sec Insertion Sequence Element (SECIS), located in the 3'-untranslated region (UTR) directs the Sec insertion. The availability of the *Naegleria gruberi* (ATCC 30224) genome sequence, as a model system for the pathogenic *N. fowleri*, allowed the investigation of the Sec-incorporation pathway in this primitive eukaryote. Using bioinformatics tools, we identified gene sequences encoding PSTK (*O*-phosphoseryl-tRNA(Sec) kinase), SepSecS (*O*-phosphoseryl-tRNA: selenocysteinyl-tRNA synthase), SelD/SPS2 (Selenophosphate synthetase), SelB (selenocysteine-specific elongation factor) and a SBP (SECIS binding protein). This findings were confirmed by RT-PCR and sequencing. A potential tRNA^{Ser}_{Sec} (SelC) gene and a selenoprotein candidate homologous to a mitochondrial thioredoxin reductase (TR3) were also identified. This results show that the selenocysteine incorporation machinery is indeed present in *N. gruberi*. Interestingly, SelD/SPS2 is 2.214 bp long and has two distinct domains. The N-terminal region bears sequence identity to predicted Methyltransferase function and the C-terminal region is homologous to prokaryotic SELD (SPS). Phylogenetic reconstructions indicate that the Methyltransferase domain is of eukaryotic origin and the SelD/SPS2 domain as the result of a Horizontal Gene Transfer (HGT) event from bacterial origin. Our results indicate the possibility of novel selenoproteins and selenocysteine pathway characteristics as well as features that may help to elucidate the evolutionary history of this pathway.

Keywords: *Naegleria gruberi*, selenocysteine, selenium, SelD, Horizontal Gene Transfer

1. Introduction

Naegleria gruberi consists of free-living amoebae widely distributed in soil and freshwater habitats throughout the world characteristically undergoing transformation between the amoebae and flagellated forms [1]. It belongs to the Heterolobosea, a major eukaryotic lineage and constitutes a model system for the pathogenic *N. fowleri*. Together with the distantly related Euglenozoa (which include parasitic trypanosomes) and Jakobid flagellates, they are members of the ancient and ecologically diverse group termed “JEH” for Jakobids – Euglenozoa – Heterolobosea [2]. Although the most detailed metabolic and genomic [3] characterization has been carried out in the non-pathogenic *N. gruberi*, the genus is notorious due to the pathogenic and thermophilic *N. fowleri*. This species causes Primary Amoebic Meningoencephalitis (PAM) in humans, which is almost invariably fatal. Cases of PAM are reported worldwide and are related to swimming in warm freshwater, whereby the pathogen invades the brain via olfactory mucosa [Visvesvara, 1990][4].

Selenium is an essential trace element in several organisms, present in proteins as selenocysteine (Sec - U), a rare amino acid that chemically differs from serine or cysteine by a single atom (Se instead of O or S respectively) [5]. Sec is incorporated into selenoproteins at an in-frame UGA stop codon [6] that differentiates from a regular stop-codon by an mRNA stem-loop structure named Selenocysteine Incorporating Sequence (SECIS), located immediately downstream of UGA in bacteria and at the 3'-untranslated region (3'-UTR) of eukaryotic selenoprotein mRNA. Selenocysteine biosynthesis and insertion into selenoproteins require at least four genes in eukaryotes: PSTK (*O*-phosphoseryl-tRNA(Sec) kinase), SepSecS (*O*-phosphoseryl-tRNA:selenocysteinyl-tRNA synthase), SelD (Selenophosphate synthetase), SelB (selenocysteine-specific elongation factor) and SBP (SECIS binding protein) [7,8]. The selC gene product is a selenocysteine specific tRNA that becomes charged with L-serine by seryl-tRNA synthetase [9] prior to its conversion into Sec.

Selenoproteins are present in all domains of life although not present in all organisms. Fungi and plants lack the Sec synthesis pathway and several bacteria have cysteine-containing homologues of selenoproteins in various degrees of substitution [7].

Selenoproteins often escape detection by genome annotators due to the difficulty in identifying the in-frame Sec-coding UGA codons that are normally interpreted as

stop signals. By using bioinformatics tools and subsequent mRNA transcript detection it was possible to identify all enzymes responsible for selenocysteine biosynthesis and insertion (PSTK, SepSecS, SelD/SPS2, SELB, SBP) and a tRNA^{Ser}_{Sec} candidate. A single selenoprotein, homologous to a thioredoxin reductase 3 (TR3) was also identified. The SelD/SPS2 gene appeared as a chimera of a eukaryotic Methyltransferase and a prokaryotic SelD/SPS2 gene, presenting a new example of an interdomain gene fusion [Wolf, 2000]. Given the basal position of the JEH group in the Tree of Life, these findings bring new perspective to the study of the origin and evolution of the selenocysteine incorporation machine and alternative roles for the SelD/SPS2 protein.

2. Materials and methods

2.1. Bioinformatic analysis

The enzymes involved in selenocysteine synthesis and incorporation were identified using the available *N. gruberi* genome sequence (<http://genome.jgi-psf.org/Naegr1/Naegr1.download.html>, accessed in may/2010). We used the Pfam database (<http://pfam.sanger.ac.uk/>, [10]) and the Uniprot database (<http://www.uniprot.org/>, [11]) as sources of domain patterns and primary sequences for searching the *N. gruberi* genome database. The software HMMER [12] was used to build the Hidden Markov Models (HMM) profiles for each domain and finally, we use EXONERATE [13] as a general alignment tool. Given the reduced size of our sequence/profiles database, we were able to set HMMER search parameters for maximum sensitivity (no heuristic filters) and EXONERATE to run only on exhaustive search mode. Hits with E-value below 10^{-4} were selected for manual inspection. The identity of putative SECIS elements was conducted with the SECISearch program [14] using the less stringent search parameters. Putative SECIS-containing open reading frames were further analyzed for the presence of an in-frame UGA stop codon positioned upstream to another stop codon (UGA, UAA or UAG) and the putative SECIS element. The candidate tRNA^{Ser}_{Sec} gene was identified using the tRNAscan software [15] with the COVE and mixed tRNA model options. Candidate tRNA^{Ser}_{Sec} genes were further investigated for the presence of the sequence/structure elements characteristic of these tRNAs [16]. Motifs and domains were scanned with MOTIF

SCAN (<http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN>) and SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) for consistency.

The SelD/SPS2 open reading frame, once identified was used to search sequence databases using the BLAST algorithm for homologues. The length of the sequence called the attention and prompted us to perform separate searches using initially the N- and C- halves of the sequence. These searches revealed the presence of the Methyltransferase-coding domain positioned at the N-terminus of the gene.

2.2. Phylogenetic analysis

The BLAST algorithm implemented in the UniProt database was used to search for homologues to the SelD/SPS2 and Methyltransferase domain sequences. Closely related sequences from Archaea, Bacteria and Eukarya were selected to each domain of *N. gruberi*, resulting in the following 22 SelD/SPS2 homologues (Accession Code): (E1RJH9_METP4) *Methanoplanus petrolearius*, (A6UUY5_META3) *Methanococcus aeolicus*, (D3E7R7_GEOS4) *Geobacillus* sp., (F3M439_9BACL) *Pasteurella dagmatis*, (D9SGR9_GALCS) *Gallionella capsiferriformans*, (SELD_PELPD) *Pelobacter propionicus*, (B8J5H7_ANAD2) *Anaeromyxobacter dehalogenans*, (Q12CQ2_POLSJ) *Polaromonas* sp., (E5U1E5_ALCXX) *Achromobacter xylosoxidans*, (B4R8H0_PHEZH) *Phenylobacterium zucineum*, (Q3IVV9_RHOS4) *Rhodobacter sphaeroides*, (F4CU53_9PSEU) *Pseudonocardia dioxanivorans*, (SPS1_HUMAN) *Homo sapiens*, (SELD_CAEEL) *Caenorhabditis elegans*, (B4LMH5_DROVI) *Drosophila virilis*, (Q4CNK4_TRYCR) *Trypanosoma cruzi*, (Q38A34_9TRYP) *Trypanosoma brucei*, (Q8MXD3_LEIMA) *Leishmania major*, (SPS1_XENLA) *Xenopus laevis*, (Q4RJR9_TETNG) *Tetraodon nigroviridis*, (C3YV42_BRAFL) *Branchiostoma floridae*. From the Methyltransferase domain 26 homologues were selected with higher sequence identity to the *N. gruberi* sequence: (Q4S7N3_TETNG) *Tetraodon nigroviridis*, (E3TE24_ICTPU) *Ictalurus punctatus*, (B8JIF1_DANRE) *Danio rerio*, (B5DFQ6_XENTR) *Xenopus tropicalis*, (AS3MT_RAT) *Rattus norvegicus*, (C3Y413_BRAFL) *Branchiostoma floridae*, (F1PSC9_CANFA) *Canis familiaris*, (Q5R8B3_PONAB) *Pongo abelii*, (AS3MT_MOUSE) *Mus musculus*, (F7DBC7_MACMU) *Macaca mulatta*, (F6Z8K8_HORSE) *Equus caballus*, (C1BLN3_OSMO) *Osmerus mordax*, (A7RZM6_NEMVE) *Nematostella vectensis*,

(F1NCJ8_CHICK) *Gallus gallus*, (F6ZIX6_CIOIN) *Ciona intestinalis*, (Q58DQ0_BOVIN) *Bos taurus*, (Q0VVK3_HUMAN) *Homo sapiens*, (F1S850_PIG) *Sus scrofa*, (F7D0U5_ORNAN) *Ornithorhynchus anatinus*, (B9NQP5_9RHOB) *Rhodobacteraceae bacterium*, (D9SHB5_GALCS) *Gallionella capsiferriformans*, (Q21EK4_SACD2) *Saccharophagus degradans*, (D8U8B0_VOLCA) *Volvox carteri*, (E1ZKG3_9CHLO) *Chlorella variabilis*, (C1N824_MICPC) *Micromonas pusilla* and (B9ELI8_SALSA) *Salmo salar*.

The sequences were aligned using the PSI-Coffee program [17] in the default mode. The resulting alignments were inspected and corrected using the BioEdit version 7.0.0 [18] package to adjust the alignment and delete poorly aligned segments. Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using MEGA5 version 5.05 [19] with the distance method (distance-p) and neighbor-joining algorithm, Maximum Parsimony and Maximum Likelihood methods with the Bootstrap method of replications was used to test the phylogenies.

2.3. Cell cultivation, nucleic acid extraction and RT-PCR

N. gruberi strain NEG-M (ATCC 30224) cells were cultured *in vitro* at 28°C in ATCC 1034 medium supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum. Total RNA was extracted from *N. gruberi* cells using the TRIZOL (Invitrogen) reagent according to the manufacturer instructions.

The PSTK, SecSepS, SelD/SPS2, SELB and SelC transcripts were synthesized from total *N. gruberi* RNA (0,5 µg/µL) by reverse transcriptase reaction with the oligonucleotides oligodT (5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTN-3') using Superscript-RT (Invitrogen) according to the manufacturer instructions. The cDNA was submitted to PCR amplifications with the oligonucleotides PSTKf 5'-CAAGACATTGCTGGCGAGGGT-3', PSTKr 5'-AAATTCTTTCACCTTTTTCATC-3', SepSecSf 5'-CCATGGCAATGAGTTTTGATGGTTTTGAAG-3', SepSecSr 5'-CTCGAGTCATTAACCTTTATTAAGCAAGG-3', SelDf 5'-AAGCTTAATGAATATTCCACTGGGATTG-3', SelDr 5'-CTGCAGCTATTATTGATCCAAAACCTTG-3', Internal_SelDf 5'-GAACCATTATGTGAAGATTAT-3', Internal_SelDr 5'-

GAATTTTCGATTGGGAGAGTTCTGG-3', SBPf 5'-
 ATGGCCGGTTACAATTTGAATTTTC-3', SBPr 5'-
 CTAATTCTTCAAATCAACATTTCC-3', SelB2f 5'-
 CAATCAAAAGAAAGAGGTATTACTCAAG-3', SelB2r 5'-
 GGAAGGGGATCTTTGAATACAACC-3'. The first strand synthesis of the tRNA^{Ser}_{Sec} candidate was obtained with the specific primers tRNA1f 5'-CGCGGGAAAGGAGGAATC-3' and tRNA1r -5' GCGGGGGATGAGTTGGCTG – 3'. All PCR amplifications were carried out in a PTC-100 thermocycler (MJ Research Inc.) with 0.5 U of Taq DNA polymerase (Fermentas) and buffer/reaction conditions according to the manufacturer instructions. PCR cycles were adjusted to each transcript/primer set and as controls to ensure the absence of genomic DNA contaminations, an RNA sample was included for each treated, omitting the addition of Reverse Transcriptase. The resulting amplified products were cloned into the pGEM-T vector and sequenced in a MegaBace automatic sequencer to confirm its identity.

2.4. *N. gruberi SelD/SPS2 functional complementation*

The functional complementation experiments were carried out according Sculaccio and co-workers [20]. Briefly the *Escherichia coli* strain WL400 [21] containing a selD deletion, kindly provided by the Coli Genetic Stock Center (CGSC - Yale University), was converted into the T7 RNA polymerase expressing strain WL400(DE3) by the integration of the λDE3 prophage using Lambda DE3 Lysogenization Kit (Novagen) according to the manufacturer instructions. The resulting *E. coli* WL400(DE3) strain was transformed with the full length *N. gruberi* SelD/SPS2 sequence (position 1 to 2215), the SelD domain (position 961 to 2215) and the methyltransferase domain (position 1 to 1050) cloned into pUC19 vector in frame with galactosidase gene at the *Hind* III and *Pst* I restriction sites. For the detoxification assays a single colony of each *E. coli* WL400(DE3) clone was growth over night and diluted to 0,1 O.D₆₀₀ in LB medium supplemented with 500 μM of sodium selenite. The cultures were incubated at 37°C and aliquots were collected at 90 minutes intervals and spread in LB agar/ampicillin. The number of colony forming units (Cfu) was calculated for each dilution/time point representing the clone viability.

3. Results and discussion

3.1. *Naegleria selenocysteine biosynthesis and insertion pathway*

By using known PSTK (accession numbers A64492 and AAH35344), SepSecS (AAB98603.1 and AF282065), SelD/SPS2 (AAA74748.1), SelB (AAG13375.1), SBP (AAK57518.1) and selenoprotein sequences as well as the tRNAscan program we searched the *N. gruberi* genome sequence for homologues that would evidentiate the presence and composition of the selenocysteine synthesis pathway in this organism. From this analysis we have identified all four homologous proteins involved in the synthesis and incorporation of selenocysteine in *N. gruberi*, whose details are described in Table 1. One selenoprotein candidate, homologous to Thioredoxin reductase 3, and a putative tRNA^{Ser}_{sec} were also identified. RT-PCR and sequencing confirmed that all predicted genes are transcribed, indicating that the selenocysteine synthesis and incorporation machinery is active in this organism (Fig. 1-A). This pathway was identified in putative basal eukaryotes, such as *Trypanosoma brucei* [22,23] and *Spironucleus barkhanus* [23] however, selenoproteins or essential elements for selenocysteine synthesis have not been identified in other primitive eukaryotes, such as *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis* [24]. The somewhat erratic distribution of this pathway along the phylogeny of extant life turns any attempt to set its origin into a serious scientific challenge. Our findings complicated the situation a little bit more, by adding a new player in the game.

Sequence conservation of the enzymes involved in the selenocysteine synthesis pathway of *N. gruberi* varies significantly compared with other organisms. *N. gruberi* PSTK shares 23% sequence identity with the archaea *Methanocaldococcus infernus* (gi 296109685) and only 10% amino acid sequence identity with *Mus musculus* (gi 88014628) homologues. *N. gruberi* SepSecS and SelB exhibits 45% - 36% amino acid identity with *Dictyostelium discoideum* (gi 45358158) and 38% - 36% amino acid identity (267844904 and gi 54607086) with the human orthologues, respectively. The SECIS binding protein (SBP) has very low sequence similarity with its eukaryote homologues, however, the Ribosomal protein L7Ae domain detected SBP in *N. gruberi* and other SBPs shares a sequence identity that ranges from 36% to 49%, as shown in Fig. 1-B.

3.2. *Naegleria* tRNA^{Ser}_{Sec}

A putative tRNA sequence was identified from the tRNAscan search in *N. gruberi* that has the UCA codon, the long variable arm and the unusual pseudopyrimidine site, replacing one base of the traditional UΨC for AΨC [25], but agree in various other aspects of secondary structure (Fig.2-A). The predicted tRNA^{Ser}_{Sec} is 87 nt long, exhibit a 9/4 structure (9 nt in the acceptor stem and 4 nt in the TΨC stem), has a 16 nt long variable arm and a 6 bp D-loop arm. This tRNA has been amplified by RT-PCR from total RNA (Fig. 2-B) and the *in silico* analysis of its secondary structure strongly suggests that *N. gruberi* indeed possesses one functional tRNA^{Ser}_{Sec}.

3.3. *Naegleria Thioredoxin Reductase*.

The search for *N. gruberi* selenoproteins were performed in two steps: initially sequences of known selenoproteins were used to search the *N. gruberi* genome database. The identified ORFs with a UGA stop codon were analysed to verify the presence of the SECIS element in the 3' UTR region using the SECISearch program resulting in one possible selenoprotein with identity to mammalian thioredoxin reductase 3 (TR3). This member has a selenocysteine in the penultimate position inside a conserved tetrapeptide (GCUG) consistent with other mammalian thioredoxin reductases (Fig.3-A). The thioredoxin system is involved in a variety of redox-dependent pathways such as providing reducing equivalents for ribonucleotide reductase (the first step in DNA biosynthesis) and peptide methionine sulfoxide reductase, an antioxidant defense and regulation of the cellular redox state [26]. The SECIS element of *N. gruberi* TR3 is positioned 122bp downstream of the stop codon and can be classified as type II [27] SECIS element with the conserved motif GUGA_AA_GA (Fig. 3-B). RT-PCR amplification experiments reveal that the *N. gruberi* TR3 is transcribed (Fig. 3-C) as a mRNA of the expected size, which was further confirmed by sequencing.

3.4. *Two distinct domains of Naegleria SelD/SPS2*.

Special attention was given to the SelD/SPS2 gene of *N. gruberi*. This gene is central to the Sec metabolism and is also shared by both Bacteria and Eukaryote/Archea lineages. Our analysis revealed that this open reading frame encode a putative protein of 737 amino acids, with two domains (Table 1, Fig. 4-A), longer than homologous SelD and SPS2 sequences previously described [28]. RT-PCR experiments confirmed the presence of the two domains co-transcribed in *N. gruberi* (Fig. 4-B and C).

The C-terminal domain (amino acids positions 390 to 737) has high sequence identity with bacterial and eukaryotic SelD-SPS2, being more closely related to the bacterial homologues, exhibiting 35% of identity with *E. coli* (gi.331642368) and 13% with *Homo sapiens* (gi.15011844) domains, respectively.

The number of amino acid differences per site averaging over all sequence pairs of the alignment in the 22 SelD/SPS2 sequences corresponds to 48% (total of 148 positions). The number of amino acid differences per site between *N. gruberi* SelD/SPS2 domain and all bacteria correspond to 50% and between *N. gruberi* and the eukaryotes is above 70%. These estimates indicate the closer evolutionary proximity between *N. gruberi* SelD/SPS2 to the bacterial homologues.

The SelD/SPS2 evolutionary history was inferred using the maximum likelihood method based on the Whelan and Goldman model (WAG) with a discrete Gamma distribution model for the evolutionary rate differences among sites and a total of 157 positions in the final dataset considered. The resulting phylogenetic tree (Fig 5-A) consistently places *N. gruberi* SelD/SPS2 branching early from the Bacteria clades. The genome of two other primitive eukaryotes, *Spironucleus barkhanus* and *Spironucleus salmonicida* [24], show that the selenophosphate synthase in these organisms also clusters within the bacteria SelD. These results support the proposal that the SelD/SPS2 domain of *N. gruberi* is the result of a horizontal gene transfer (HGT) event from a bacterium.

We were intrigued by the SelD/SPS2 N-terminus domain identity, therefore by performing sequence database searches, using either BLAST or PSI-BLAST programs, we identified this domain as a Methyltransferase homologue, possibly of the arsenite methyltransferase group (EC 2.1.1.137). To further investigate this identity, we inferred the evolutionary history of this sequence domain using the maximum likelihood method based on the Whelan and Goldman model (WAG) with a discrete Gamma distribution

model for the evolutionary rate differences among sites and a total of 545 positions considered in the final dataset. The resulting phylogenetic tree (Fig. 5-B) consistently places *N. gruberi* Methyltransferase domain branching with the Green Algae (*Micromonas pusilla*, *Chlorella variabilis* and *Volvox carteri*) clade.

These results suggest a possible evolutionary scenario where *N. gruberi* ancestor had a full selenocysteine synthesis pathway in place, and due to environmental detoxification pressures, acquired a bacterial SelD copy by HGT due to its higher kinetic efficiency. A posterior methyltransferase gene fusion increased the detoxification efficiency of *N. gruberi* cells. Additionally, it is known that elevated temperatures can induce potentially lethal oxidative stress [Davidson, 1993]. Hence such a protein machinery seems appropriate for an organism that prefers warm and ephemeral environments like small ponds.

The specific function of the methyltransferase domain in *N. gruberi* remains unclear, but methyltransferases capable of binding to S-adenosylmethionine are involved in detoxification processes in certain conditions, such as diet modifications and exposure to xenobiotics [29]. In the selenium metabolism, inorganic Se forms, such as selenite and selenate, are reduced to selenide (H_2Se), in reactions catalyzed by glutathione reductase. It was demonstrated that the methylation of selenide by methyltransferase, using S-adenosylmethionine as methyl donor, produces predominantly $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$ (dimethyl selenide), several fold less toxic than selenide that has the capacity of binding non-specifically to proteins leading to their inactivation. That methylation is important in the detoxification of selenium is also indicated by the observations that toxic levels of selenium produced depletions of S-adenosylmethionine in tissues and that supplemental dietary methionine decreases selenite toxicity [30]. From this analysis we can propose that the fusion event of a Methyltransferase domain with the SelD/SPS2 domain could have detoxifying function in *N. gruberi*.

To test the hypothesis that the Methyltransferase-SelD/SPS2 fusion could increase the detoxification efficiency of *N. gruberi* cells and therefore be a selectable driving force for the HGT-gene fusion event, we performed genetic functional complementation and Se toxicity resistance experiments in *E. coli* cells. *E. coli* DH5 α cells (SelD⁺) reduce the benzyl viologen in the agar overlay plate forming an intense purple color (Fig. 6-A) whereas *E. coli* WL400(DE3) (SelD⁻) fail to reduce the benzyl

viologen (Fig. 6-A), as expected indicating the absence of formate dehydrogenase activity. *N. gruberi* SelD/SPS2 domain alone as well as the full length gene (Methyltransferase-SelD/SPS2 fusion) efficiently complement the lack of SELD of *E. coli* WL400(DE3) confirming the SelD activity (Fig. 6-A) while the methyltransferase domain alone was unable to complement the *E. coli* SelD function (Fig. 6-A). Growth curves of *E. coli* WL400 transformed with the methyltransferase domain conferred resistance to high selenium concentrations in the media (500 μ M of sodium selenite), whereas the negative control show lower Se tolerance (Fig. 6-B). This effect suggests that methyltransferase domain helps the cells in the elimination selenium excess, independent of selenocysteine biosynthesis pathway. *E. coli* WL400(DE3) cells complemented with the SelD/SPS2 full length sequence (Methyltransferase-SelD/SPS2 fusion) present a number of colonies around ten times higher than the methyltransferase domain complementation and five times of SelD/SPS2 domain complementation. It is possible that SelD/SPS2 and Methyltransferase domains act independently and two processes can occur simultaneously: selenium detoxification by the methyltransferase domain and selenocysteine synthesis by the SelD domain, however, the fusion of these two domains into a single protein suggests a synergistic effect that may be advantageous to a free-living organism faced with potentially threatening environments.

Therefore, we suggest that *Naegleria gruberi* SelD/SPS2 is a bifunctional enzyme, responsible for selenophosphate synthesis from selenide in environmental conditions that require selenoproteins, function catalyzed by the SelD domain. Under stress conditions with selenide accumulation, the methyltransferase domain promotes selenium detoxification, through the synthesis of methylated forms of selenium, significantly less toxic and readily eliminated from the cell.

4. Conclusions

The identification of the genes involved in the selenocysteine synthesis pathway, a tRNA^{Ser}_{Sec} candidate and the presence of at least one selenoprotein containing a canonical SECIS element clearly characterize the presence of this pathway in *N. gruberi*. As observed in other organisms, selenoproteins protect the cell during stress conditions and *N. gruberi* survives in environments with dramatic changes of temperature, pH and composition. One mechanism of coping with environmental stress

is the differentiation from the amoeba to the cyst form, but is probable that selenoproteins assist the cell in adverse conditions, mainly in the presence of an oxidative stress. This involvement of the selenoproteins in oxidative stress protection has already been demonstrated in other unicellular eukaryotes [31]. Interestingly, the SelD/SPS2 gene is the result of a gene transfer from prokaryote to eukaryote and posterior gene fusion with a Methyltransferase. Such an interdomain gene fusion, apparently driven by ecological factors, deserves additional investigation and illustrate how the HGT process is an important and widespread phenomenon. The function of *N. gruberi* Methyltransferase domain is not completely determined however, it is clear from our results the involvement of this gene fusion Methyltransferase-SelD/SPS2 in cellular detoxification. Other elements capable of inducing a state of oxidative stress, like temperature or a metabolic boost, also need to be assessed in further studies. We just started to explore the complexity of the selenoproteins/selenocysteine pathways of this multifaceted organism.

Acknowledgements

This work was supported in part by the research grants: 98/14138-2 (FAPESP), 550514/2011-2 (CNPq). The authors thank Dr. Lívia Regina Manzi for technical help with the complementation assays.

References

- [1] Marciano-Cabral F. Biology of *Naegleria* spp. Microbiol Rev 1988;52: 114–33.
- [2] Rodriguez-Ezpeleta N, Brinkmann H, Burger G, Roger AJ, Gray MW, Philippe H, Lang BF. Toward resolving the eukaryotic tree: The phylogenetic positions of jakobids and cercozoans. Curr Biol 2007;17:1420–25.
- [3] Fritz-Laylin LK, Prochnik SE, Ginger ML, Dacks JB, Carpenter ML, Field MC, Kuo A, Paredez A, Chapman J, Pham J, Shu S, Neupane R, Cipriano M, Mancuso J, Tu H, Salamov A, Lindquist E, Shapiro H, Lucas S, Grigoriev IV, Cande WZ, Fulton C, Rokhsar DS, Dawson SC. The Genome of *Naegleria gruberi* Illuminates Early Eukaryotic Versatility. Cell 2010;14:631–42.
- [4] Opperdoes FR, De Jonckheere JF, Tielens AGM. *Naegleria gruberi* metabolism. Inter J Parasitol 2011;41:915–24.

- [5] Squires JE, Berry MJ. Eukaryotic Selenoprotein Synthesis: Mechanistic Insight Incorporating New Factors and New Functions for Old Factors. *IUBMB Life* 2008;60:232–5.
- [6] Atkin JF, Gesteland RF. The twenty-first amino acid. *Nature* 2000;407:463–4.
- [7] Gladyshev NV, Kryukov GV. Evolution of selenocysteine containing proteins: significance of identification and functional characterization of selenoproteins. *Biofactors* 2001;14:87–92.
- [8] Su D, Hohn MJ, Palioura SR, Sherrer L, Yuan J, Söll D, O'Donoghue P. How an Obscure Archaeal Gene Inspired the Discovery of Selenocysteine Biosynthesis in Humans. *IUBMB Life* 2009;61:35–9.
- [9] Rother M, Resch A, Gardner WL, Whitman WB, Böck A. Heterologous expression of archaeal selenoprotein genes directed by the SECIS element located in the 3' non-translated region. *Mol Microbiol* 2001;40:900–8.
- [10] Finn RD, Tate J, Mistry J, Coghill P, Heger A, Pollington JE, Gavin OL, Gunasekaran P, Ceric G, Forslund K, Holm L, Sonnhammer EL, Eddy SR, Bateman A. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 2008;36:281–8.
- [11] Jain E, Bairoch A, Duvaud S, Phan I, Redaschi N, Suzek BE, Martin MJ, McGarvey P, Gasteiger E. Infrastructure for the life sciences: design and implementation of the UniProt website. *BMC Bioinformatics* 2009; 10:136.
- [12] Eddy SR. Profile Hidden Markov Models. *Bioinformatics* 1998;14:755–63.
- [13] Slater GSC, Birney E. Automated generation of heuristics for biological sequence comparison. *BMC Bioinformatics* 2005;6: 31.
- [14] Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigo R, Gladyshev VN. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* 2003;300: 1439–1443.
- [15] Lowe TM, Eddy SR. tRNAscan-SE: A Program for Improved Detection of Transfer RNA Genes in Genomic Sequence. *Nucleic Acids Res* 1997;25:955–64.
- [16] Commans S, Böck, A. Selenocysteine inserting tRNAs: an overview. *FEMS Microbiol Rev* 1999; 23:335–51.
- [17] Di Tommaso P, Moretti S, Xenarios I, Orobitz M, Montanyola A, Chang JM, Taly JF, Notredame C. T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic Acids Res* 2011; 39:13-7.
- [18] Hall T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp. Ser* 1999;41:95–8.

- [19] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 2011;28:2731–9.
- [20] Sculaccio SA, Rodrigues EM, Cordeiro AT, Magalhaes A, Braga AL, Alberto EE, Thiemann O.H. Selenocysteine incorporation in Kinetoplastid: Selenophosphate synthetase (SELD) from *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 2008; 162:165–71.
- [21] Leinfelder W, Forchhammer K, Veprek B, Zehelein E, Böck, A. *In vitro* synthesis of selenocysteinyl-tRNA(UCA) from seryl-tRNA(UCA): involvement and characterization of the selD gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:543–547.
- [22] Cassago A, Rodrigues EM, Prieto EL, Gaston KW, Alfonzo JD, Iribar MP, Berry MJ, Cruz AK, Thiemann OH. Identification of *Leishmania* selenoproteins and SECIS element. *Mol Biochem Parasitol* 2006;149:128–134.
- [23] Lobanov, AV, Gromer S, Salinas G, Gladyshev VN. Selenium metabolism in *Trypanosoma*: characterization of selenoproteomes and identification of a Kinetoplastida-specific selenoprotein. *Nucleic Acids Research* 2006;14:4012–24.
- [24] Roxström-Lindquist K, Jerlström-Hultqvist J, Jørgensen A, Troell K, Svärd SG, Andersson JO. Large genomic differences between the morphologically indistinguishable diplomonads *Spironucleus barkhanus* and *Spironucleus salmonicida*. *BMC Genomics* 2010;11:258–72.
- [25] Söll D, Rajbhandary UL. tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function. New York: Amer Assoc Advancement Science; 1995.
- [26] Rigobello MP, Bindoli A. Mitochondrial Thioredoxin Reductase: Purification, Inhibitor Studies, and Role in Cell Signaling. *Methods Enzymol* 2010;474:110–2010.
- [27] Kryukov GV, Kryukov VM, Gladyshev V. New mammalian selenocysteine containing proteins identified with an algorithm that search for selenocysteine insertion sequence elements. *J Biol Chem* 1999;274: 33888–97.
- [28] Itoh YS, Sekine S, Matsumoto E, Akasaka R, Takemoto C, Shirouzu M, Yokoyama S. Structure of selenophosphate synthetase essential for selenium incorporation into proteins and RNAs. *J Mol Biol* 2009;385:1456–69.
- [29] Combs Jr GF, Combs SB. The nutritional biochemistry of selenium. *Ann Rev Nutr* 1984;4:257-80.
- [30] Hoffman JL. Selenite toxicity, depletion of liver S-adenosyl-methionine and inactivation of methionine adenosyl transferases. *Arch Biochem Biophys* 1977;179:36–40.

[31] Costa FC, Oliva MAV, de Jesus TCL, Schenkman S, Thiemann OH. Oxidative stress protection of Trypanosomes requires selenophosphate synthase 2. *Mol Biochem Parasitol* 2011;180:47– 50.

Figure Legends.

Fig. 1. Selenocysteine synthesis elements present in *Naegleria gruberi*. **A)** Agarose gel electrophoresis (1,5%) of RT-PCR *Naegleria gruberi* selenocysteine synthesis elements. C-, control experiment without the addition of *Naegleria* total RNA. **B)** Multiple alignment of the Ribosomal protein L7Ae domain in different organisms. *Ectocarpus siliculosus* (gi 299470494); *Ailuropoda melanoleuca* (gi 301768491); *Homo sapiens* (gi 301601632).

Fig. 2. Candidate of tRNA^{sec} identified from *Naegleria gruberi* genome searches. **A)** Secondary structure prediction of *Naegleria* tRNA^{sec} candidate indicating all the secondary structure elements: AA and AA', amino acid attachment stem; D and D', D loop; AC and AC', acceptor stem; TψC and TψC', T-pseudouridine-C stem. **B)** Agarose gel (2%) of the RT-PCR of *Naegleria* tRNA^{sec} candidate. C-, control experiment without the addition of *Naegleria* total RNA.

Fig. 3. *Naegleria gruberi* thioredoxin reductase (TR3) characterization. **A)** Multiple alignment of Thioredoxin reductase C-terminal region. That gray box shows the conserved tetrapeptide and the arrow indicate the selenocysteine. *Canis lupus familiaris* (gi 170671714); *Danio rerio* (gi 148277081); *Rattus norvegicus* (gi 296040479); *Homo sapiens* (gi 291045266), **B)** SECIS elements identified in *Naegleria gruberi*, with canonical form and GUGA-type, **C)** Agarose gel (1,5%) of the RT-PCR of *Naegleria* TR3. C-, control experiment without the addition of *Naegleria* total RNA.

Fig. 4. Characterization of *Naegleria* SelD/SPS. **A)** Representation of SelD and methyltransferase domains identified in *Naegleria* SelD/SPS. **B)** Agarose gel electrophoresis (1,5%) of RT-PCR *Naegleria gruberi* SelD/SPS using primers that amplified the SelD/SPS ORF. C-, control experiment without the addition of *Naegleria* total RNA **C)** Agarose gel electrophoresis (1,5%) of RT-PCR *Naegleria gruberi* SelD/SPS using internal primers that amplified the region near the connection between the domains.

Fig. 5. Bootstrap consensus trees of SelD/SPS2 and Methyltransferase sequences. **A)** SelD/SPS2 Neighbor-Joining bootstrap consensus tree showing the association of *N. gruberi* (boxed) sequence with the bacteria branch. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together by the Neighbor-Joining method in the bootstrap test (500 replicates) are shown next to the branches of tree. * Represents bootstrap values above 60% by the Maximum Likelihood method (200 replicates) and ** by the Maximum Parsimony method (200 replicates). **B)** Methyltransferase Maximum Likelihood consensus bootstrap tree showing the association of *N. gruberi* (boxed) sequence with the green algae branch. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together by the Maximum Likelihood method in the bootstrap test (200 replicates) are shown next to the branches of tree. * Represents bootstrap values above 60% by the Neighbor-Joining method (500 replicates) and ** by the Maximum Parsimony method (200 replicates).

Fig. 6. Functional complementation by *Naegleria* SelD gene. **A)** Benzyl viologen assay complementation assay: WL400-pUC19, *E. coli* WL400(DE3) transformed with pUC19 plasmid (negative control); DH5 α -pUC19, *E. coli* DH5 α transformed with pUC19 plasmid (positive control); WL400-SPS/SelD, *E. coli* WL400(DE3) transformed with *Naegleria* full length SelD/methyltransferase in pUC19; WL400-methyltransferase domain, *E. coli* WL400(DE3) transformed with *Naegleria* methyltransferase domain in pUC19; WL400-SelD domain, *E. coli* WL400(DE3) transformed with *Naegleria* SelD domain in pUC19. The purple color indicated the selenoprotein formate dehydrogenase H. **B)** Growth curves carried out with 500 μ M of sodium selenite. Positive control, *E. coli* WL400(DE3) transformed with pUC19 and grown without selenium (WL400-pUC w/o); negative control, *E. coli* WL400 (DE3) transformed with pUC19 grown with selenium (WL400-pUC w); WL400-SPS/SelD, *E. coli* WL400(DE3) transformed with *Naegleria* full length SelD/methyltransferase in pUC19, with selenium; WL400-SelD domain, *E. coli* WL400(DE3) transformed with pUC19 *Naegleria* SelD domain with selenium; WL400-methyltransferase domain, *E. coli* WL400(DE3) transformed with pUC19 *Naegleria* methyltransferase domain with selenium. The growth curves were represented for colonies number (with dilutions adjustments) by time in minutes.

Figure 1.

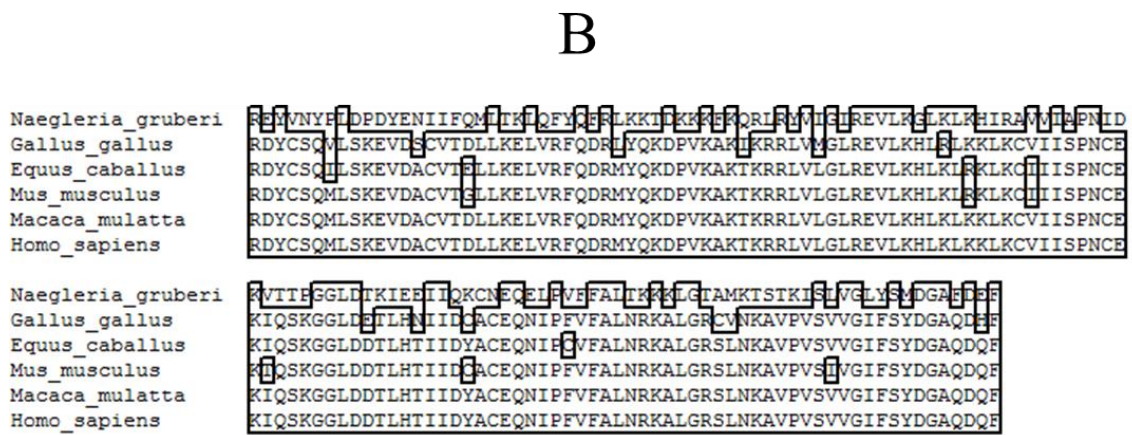
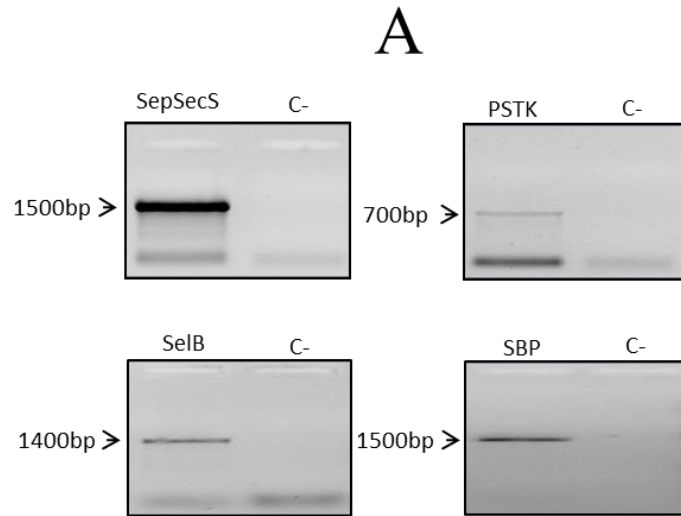


Figure 2.

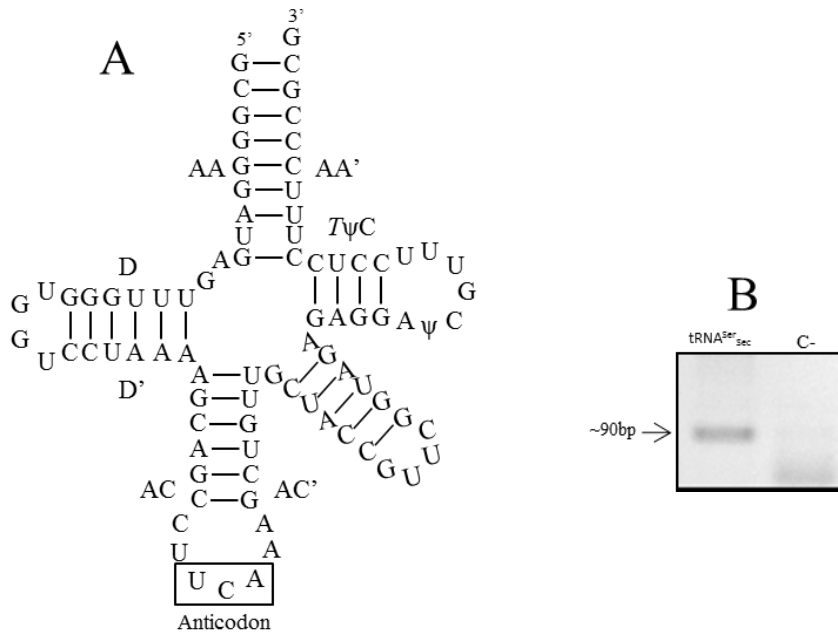


Figure 3.

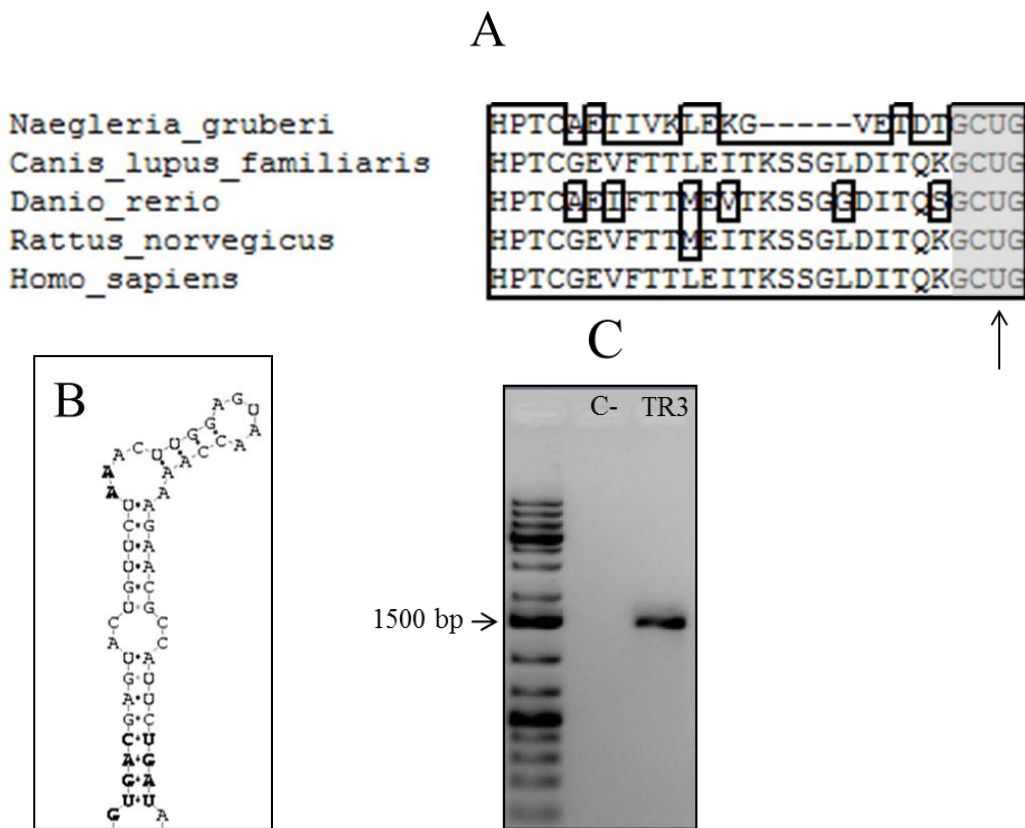


Figure 4.

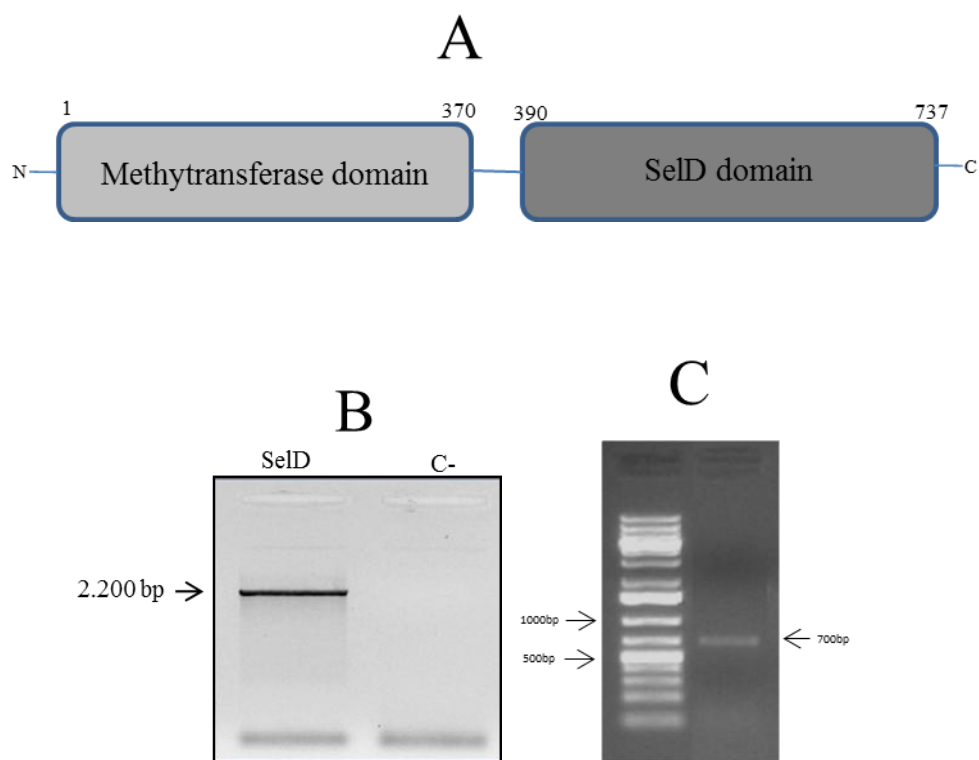


Figure 5A.

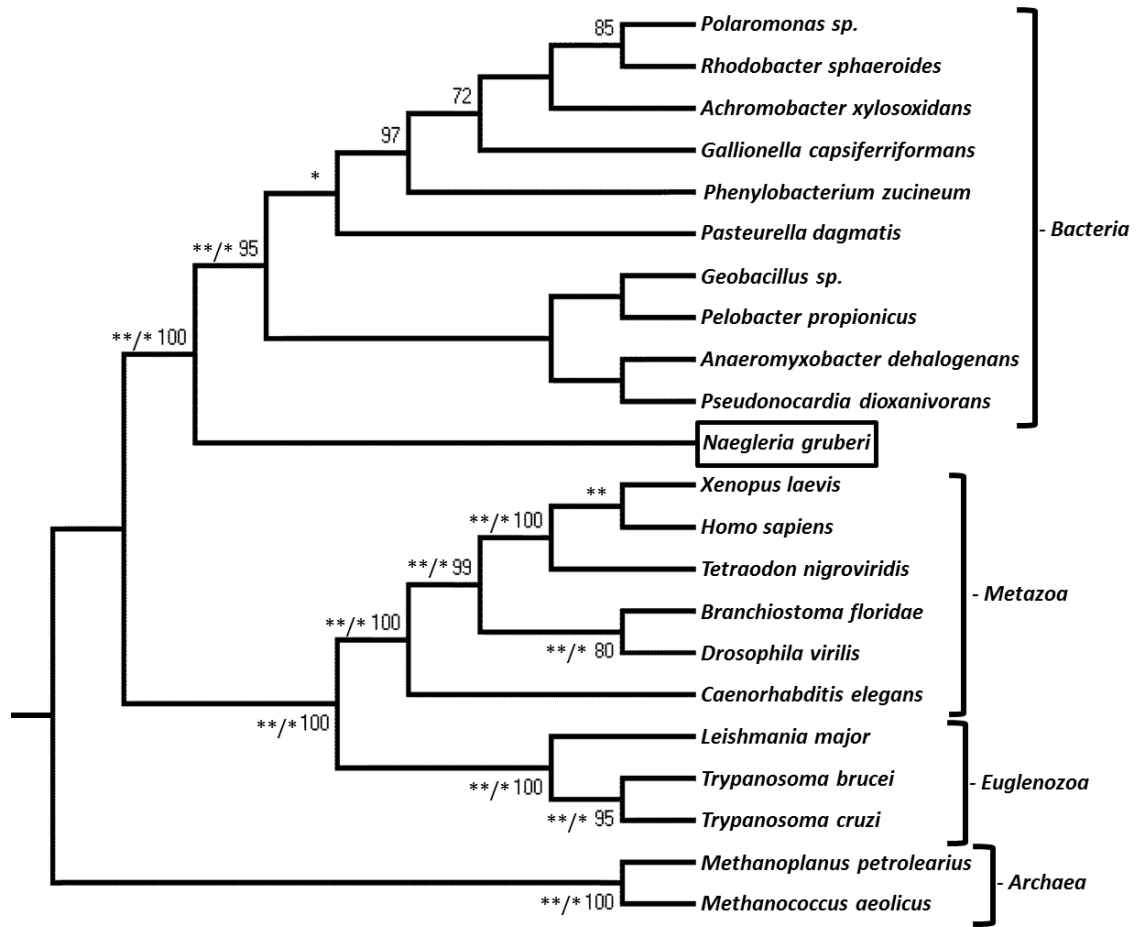


Figure 5B.

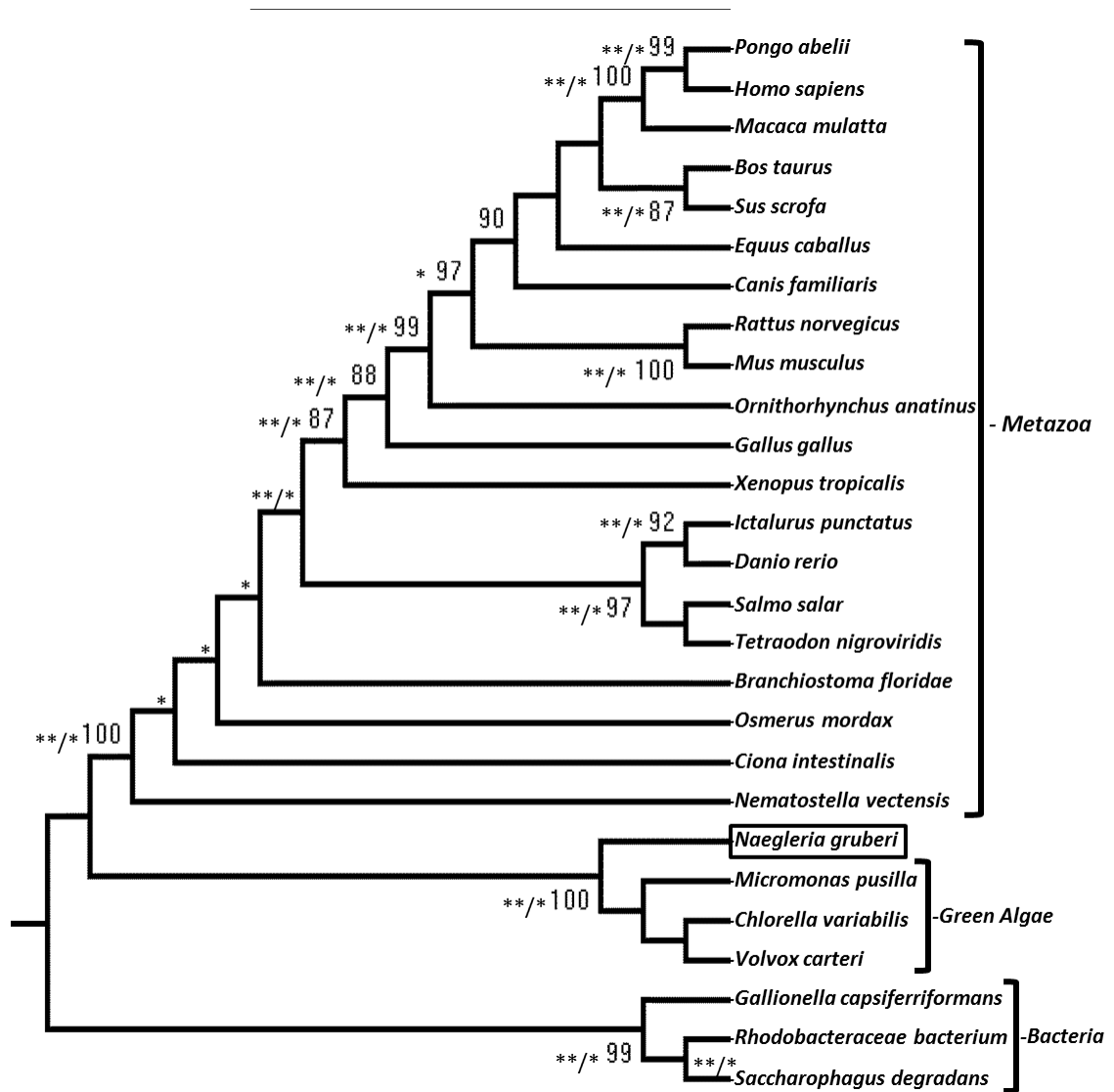


Figure 6.

