

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E  
PARASITOLOGIA**

**CARACTERIZAÇÃO DAS DNA TOPOISOMERASES II DE  
*Trypanosoma rangeli***

**PATRÍCIA HERMES STOCO**

**FLORIANÓPOLIS-SC  
2010**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E  
PARASITOLOGIA**

**CARACTERIZAÇÃO DAS DNA TOPOISOMERASES II DE  
*Trypanosoma rangeli***

**PATRÍCIA HERMES STOCO**

Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia da Universidade Federal  
de Santa Catarina, como requisito  
parcial para a obtenção do título de  
Doutor em Biotecnologia

**Orientador: Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard**

**FLORIANÓPOLIS-SC  
2010**

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da  
Universidade Federal de Santa Catarina

S865 Stoco, Patrícia Hermes

Caracterização das DNA topoisomerasas II  
de *Trypanosoma rangeli* [tese] / Patricia Hermes Stoco ;  
orientador, Edmundo Carlos Grisard. - Florianópolis,  
SC, 2010.

163 p.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências e apêndice

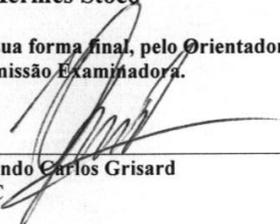
**“CARACTERIZAÇÃO DAS DNA TOPOISOMERASES II DE  
*Trypanosoma rangeli*.”**

POR

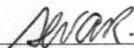
**Patrícia Hermes Stoco**

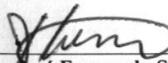
Tese julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e  
membros da Comissão Examinadora.

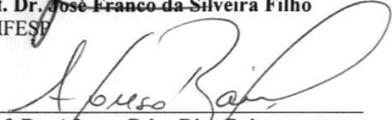
Orientador:

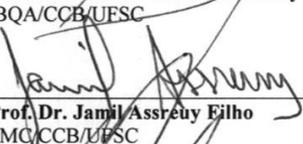
  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard**  
MIP/CCB/UFSC

Comissão Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Alvaro José Romanha**  
Instituto René Rachou, Fiocruz

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. José Franco da Silveira Filho**  
UNIFESP

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy**  
BQA/CCB/UFSC

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Jamil Assreuy Filho**  
FMC/CCB/UFSC

\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard – MIP/CCB/UFSC**  
*Coordenador do Programa de*  
**Pós-Graduação em Biotecnologia/CCB/ UFSC**  
Florianópolis, Março de 2010.



## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Edmundo Carlos Grisard, agradeço novamente a oportunidade e a minha pessoal satisfação neste trabalho. Apesar dos vários anos de laboratório a cada dia vejo que é possível aprender algo novo. Não tenho palavras o suficiente para agradecer, mas de qualquer forma obrigada não só pelos inúmeros ensinamentos, mas sobretudo pelo carinho, confiança e a amizade adquiridos ao longo dos anos.

Aos professores Dr. Mario Steindel e Dr. André Báfica, por toda atenção sempre dedicada, pela sabedoria nos momentos de reflexão, além da amizade e boas risadas.

Ao Dr. Kevin Tyler pela oportunidade, ajuda e paciência no período em que estive em seu laboratório.

Ao Dr. Stenio P. Fragoso e Dr. Henrique B. Ferreira por seus valiosos ensinamentos e auxílio em distintas fases do trabalho.

Aos meus pais, Ademir e Verence, por todo amor, compreensão, carinho, dedicação e, sobretudo pelo inestimável incentivo e confiança em tudo o que eu faço. Muito obrigada pelos bons e maus momentos, pelos choros de felicidade e por tudo que vocês me propiciaram para que um dia eu pudesse estar aqui, deixando os próprios sonhos para que meus realizassem.

Aos meus irmãos, Guilherme e João Luiz, por todo carinho e alegria em cada telefonema e a cada vez que eu chegava em casa.

Ao Carlos, mais uma vez pela compreensão, principalmente por entender os momentos de ausência, as viagens adiadas, os finais de semana e noites sozinho e outros momentos em que eu estava no laboratório. Muito obrigada pelo amor, amizade e carinho.

As minhas queridas amigas Débora e Taty, por toda amizade. Nada se compara as risadas, aos desabafos, aos choros, aos vídeos, as jantãs, as sobremesas e outros bons momentos juntas, assim como a preocupação de vocês com tudo.

A minha amiga Cacá, essencial não só para a realização deste trabalho, mas principalmente pelos momentos de alegria, desabafo e risadas.

A minha amiga e companheira de doutorado Thaís por toda a ajuda e momentos agradáveis.

As minhas queridas ICs: Ize, Elisa, Carol, Kamille, Mayara e Laís pelas inúmeras perguntas que as vezes me deixavam tonta. Pela ajuda em muitos momentos e sobretudo pela oportunidade de poder ensinar um pouco de que aprendi neste tempo.

A todo o pessoal dos laboratórios de Protozoologia. Obrigada pela força, companheirismo, e todos os bons momentos.

Aos colegas e professores dos demais laboratórios LIDI, LVA e LIA pela ajuda.

Aos meus novos amigos da UEA, em Norwich pela amizade e pela ótima convivência principalmente no conhecimento a respeito dos Pubs da cidade.

A todos os colegas e professores do curso de pós graduação em Biotecnologia, pela amizade e ensinamentos.

A Capes, CNPq e FINEP pelo apoio financeiro.

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

**A TODOS MEU SINCERO OBRIGADO!**

## RESUMO

DNA topoisomerasas são enzimas que participam de diversos processos celulares tais como: replicação, transcrição, recombinação e segregação dos cromossomos. Atuando na clivagem transitória de uma fita (tipo I) ou ambas as fitas (tipo II) da molécula de DNA, as topoisomerasas são alvos de agentes bactericidas e de drogas antitumorais e podem ser um importante alvo para quimioterapia de doenças causadas por parasitos. Neste estudo, descrevemos e caracterizamos os genes que codificam as topoisomerasas tipo II de *Trypanosoma rangeli* (*TrTop2*). Os genes *TrTop2* apresentaram um quadro aberto de leitura com 3.696 (*TrTop2mt*) e 4.368 pares de bases (*TrTop2α*), codificando polipeptídios preditos de 1.232 ( $\pm 138,8$  kDa) e 1.456 ( $\pm 164,1$  kDa) aminoácidos, respectivamente. Ambos os genes apresentaram uma alta similaridade da sequência protéica com topoisomerasas ortólogas de outros tripanosomatídeos, sobretudo com *T. cruzi* (96% e 85%). Entre os dois genes a similaridade a nível de aminoácidos foi de 56%, sendo ambos de cópia única no genoma do *T. rangeli*. Anticorpos dirigidos a fragmentos protéicos de ambas as proteínas foram utilizados em ensaios de *western blot* e revelaram bandas de aproximadamente 130 kDa em extratos protéicos totais de *T. rangeli*. Embora com tamanho similar, foram identificadas proteínas distintas quando avaliadas por eletroforese 2D (pI 6,4 e 7,6). Através de géis de poliacrilamida em condições não desnaturantes foi possível determinar que ambas as proteínas nativas formam um complexo protéico de alto peso molecular indicando uma possível interação entre proteínas ou subunidades. Ensaios de imunolocalização com os distintos anticorpos contra DNA topoisomerasas II apontaram diferentes padrões de localização celular, com reconhecimento no núcleo ou no cinetoplasto em formas epimastigotas e em alguns casos dispersa no citoplasma de formas tripomastigotas. A novobiocina, inibidor de topoisomerasas tipo II procarióticas, foi ativo *in vitro* contra o *T. rangeli*. Acima de 300  $\mu\text{g/ml}$  observa-se uma redução no crescimento dos parasitos com alterações morfológicas e estruturais a nível nuclear e do cinetoplasto. Acima de 150  $\mu\text{g/ml}$  observa-se completa inibição da diferenciação celular *in vitro*. Utilizando as proteínas mtHSP70, DHLADH e a DNA topoisomerase II mitocondrial (*TrTop2mt*) como marcadores biológicos, foi observado redução da expressão das mesmas durante a diferenciação do *T. rangeli*, assim como nos tratamentos com novobiocina. Conclui-se que eventos relacionados as DNA topoisomerasas II podem ser essenciais na redução do crescimento e da diferenciação celular do *T. rangeli*. Palavras Chave: DNA Topoisomerasas, Novobiocina, *T. rangeli*

## ABSTRACT

DNA topoisomerases are involved in cellular processes as diverse as replication, transcription, recombination and chromosome segregation. Performing transient cuts on one (type I) or both (type II) DNA strands, topoisomerases are inhibited by antimicrobial and antitumoral agents, revealing their usefulness as targets for chemotherapy of parasitic diseases. In the present study, genes encoding DNA topoisomerases type II (topo II) from *Trypanosoma rangeli* (*TrTop2*) are described and characterized. The *TrTop2* genes revealed open reading frames of 3,696 (*TrTop2mt*) and 4,368 base pairs (*TrTop2α*), codifying predicted proteins of 1,232 ( $\pm 138.8$  kDa) and 1,456 ( $\pm 164.1$  kDa) amino acids, respectively. Aminoacidic sequences of *T. rangeli* topo II presented high similarity with orthologous topoisomerases from other trypanosomatids, mainly with *T. cruzi* (96% and 85%). Both genes are single copies genes in *T. rangeli* genome and revealed 56% of amino acids similarity against each other. Antibodies raised against fragments of both proteins were able to reveal bands of approximately 130 kDa by immunoblot using *T. rangeli* total protein extracts. Although similar in size, these bands represented distinct proteins when examined by 2D electrophoresis (pI 6.4 and 7.6). Both proteins seem to form a complex of high molecular weight as revealed by non-denaturing PAGE, suggesting interaction between proteins or subunits. Immunolocalization assays using distinct antibodies against DNA topoisomerases II showed different patterns of cellular localization, recognizing nucleus or kinetoplast from epimastigotes and sometimes dispersed in cytoplasm from trypomastigotes. Novobiocin, a prokaryotic DNA topoisomerase II inhibitor, was active against *T. rangeli*. Concentrations over 300  $\mu\text{g/ml}$  decreased *in vitro* growth of parasites with morphological and structural changes in nucleus and kinetoplast. Treatments with 150  $\mu\text{g/ml}$  or higher completely inhibited the *in vitro* cellular differentiation process. Using the mtHSP70, DHLADH and mitochondrial DNA topoisomerase II (*TrTop2mt*) protein expression as biological markers, a decrease on their expression during *T. rangeli* cellular differentiation, as well novobiocin treatments were observed. We conclude that DNA topoisomerases related events are essential for proliferation and cellular differentiation of *T. rangeli*. Key words: DNA Topoisomerases, Novobiocin, *T. rangeli*

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Microfotografia da forma tripomastigota sanguínea de *Trypanosoma rangeli* em sangue de camundongo experimentalmente infectado (corado por Giemsa) (aumento de 1.000x).....1
- Figura 2:** Mapa das Américas Central e do Sul, mostrando a sobreposição geográfica da distribuição da doença de Chagas humana (sombreado) e os registros de ocorrência comprovada do *Trypanosoma rangeli* em humanos, triatomíneos ou animais silvestres (●). Fonte: Grisard; Steindel, 2004.....3
- Figura 3:** Ciclo biológico do *Trypanosoma rangeli* no hospedeiro invertebrado. (A) Ingestão das formas tripomastigotas de *T. rangeli* durante o repasto sanguíneo do triatomíneo, (B) Formas tripomastigotas e epimastigotas no trato intestinal do triatomíneo, (C) Parasitos alcançam a ampola retal e formas epimastigotas e tripomastigotas podem ser excretadas juntamente com as fezes e urina, (D) Adesão de formas epimastigotas do parasito ao epitélio intestinal e transposição para a hemocele, onde se multiplicam, (E) Invasão pelo *T. rangeli* das glândulas salivares do triatomíneo e diferenciação para formas infectantes (tripomastigotas metacíclicas), as quais são inoculadas com a saliva, (F) durante o repasto sanguíneo. Fonte: Grisard; Steindel, 2004.....5
- Figura 4:** Reações catalisadas pelas DNA topoisomerases. (A) Reações de superenovelamento negativo ou relaxamento da moléculas de DNA. (B) Formação ou remoção de estruturas em forma de nó. (C) Reações de concatenação e decatenação. Fonte: Bakshi; Shapiro, 2003.....15
- Figura 5:** Representação esquemática do mecanismo de ação geral proposto para as DNA topoisomerases tipo I. A figura ilustra a clivagem de uma única fita do DNA e a passagem da segunda fita pela abertura gerada na clivagem a partir de diversas mudanças conformacionais. (a) mudança conformacional para o ataque nucleofílico da cadeia lateral da tirosina presente no sítio ativo em uma das fitas do DNA; (b) após a clivagem, a tirosina permanece covalentemente ligada ao fosfato na porção 5' (DNA topoisomerases tipo IA) ou 3' (DNA topoisomerases tipo IB); (c) a abertura da enzima permite a passagem da outra fita pelo espaço gerado (d) após a passagem ocorre a religação da fita de DNA clivada; (e;f) a enzima muda novamente de conformação para liberar a fita e completar o ciclo. Fonte: Champoux, 2001.....16
- Figura 6:** Esquema representativo de comparação entre os domínios funcionais das DNA topoisomerases IIA. Fonte: Champoux, 2001.....18
- Figura 7:** Representação esquemática do mecanismo de ação proposto para as DNA topoisomerases tipo IIA. (1 e 2) A enzima se liga a um DNA dupla fita (segmento-G) na região que contém o domínio de clivagem e religação; (3) Uma segunda molécula de DNA dupla fita (segmento-T) se liga a enzima e a ligação de um ATP promove a dimerização dos domínios ATPase, que consequentemente levam a clivagem do segmento G e o

transporte do segmento T pelo espaço gerado; (4) O segmento T fica retido no espaço oposto correspondente a porção carboxi terminal do domínio de clivagem; (5) O segmento G é religado e o segmento T é liberado a partir da mudança conformacional da enzima. Fonte: Berger, 1998.....19

**Figura 8:** Atuação das DNA topoisomerases na replicação. (A) Esquema geral da forquilha de replicação incluindo a maquinaria de replicação envolvida no processo. (B/C) Problemas topológicos associados com a alongação da forquilha de replicação. A barra em azul representa a maquinaria de replicação. Fonte: Champoux, 2001.....22

**Figura 9:** DNA mitocondrial do cinetoplasto (kDNA). (A) Forma tripomastigota sanguínea de *Trypanosoma cruzi* corada com Giemsa. (B) Microfotografia do cinetoplasto. (C) Detalhe da rede complexa de moléculas de DNA circular concatenadas. Fontes: Lindsay, 2008.....27

**Figura 1.1:** Representação esquemática dos fragmentos dos genes *TrTop2mt* e *TrTop2α* de *Trypanosoma rangeli* escolhidos para expressão heteróloga em *Escherichia coli*, com seus respectivos pares de iniciadores e peso molecular estimado.....43

**Figura 1.2:** Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo revelando os produtos de amplificação de 2,3 Kb e 1,1 Kb dos fragmentos dos genes *TrTop2mt* (A) e *TrTop2α* (B) de *Trypanosoma rangeli*, respectivamente. PPM- Padrão de Peso Molecular (Fago lambda/*HindIII*).....52

**Figura 1.3:** Subclonagem do clone genômico de *Trypanosoma rangeli* positivo para o gene *TrTop2mt*. (A) *Southern blot* utilizando como sonda o produto de amplificação dos iniciadores Bc7-Bc14. (B) Representação esquemática do clone purificado, demonstrando a localização de uma porção do gene *TrTop2mt* na extremidade do braço direito do fago lambda, a estratégia de sub-clonagem (sítios para *HindIII* em amarelo) e as estratégias de sequenciamento dos clones resultantes correspondentes ao gene *TrTop2mt*.....53

**Figura 1.4:** Representação esquemática da estratégia de sequenciamento do gene *TrTop2mt*. A barra azul representa o quadro aberto de leitura do gene *TrTop2mt*. As setas verdes indicam os iniciadores utilizados para a obtenção do fragmento; as setas em laranja representam os sítios de restrição relacionados a subclonagem das seqüências e as setas pretas indicam as regiões sequenciadas nos respectivos clones.....57

**Figura 1.5:** Representação esquemática da estratégia de sequenciamento do gene *TrTop2α*. A barra vermelha representa o quadro aberto de leitura do gene *TrTop2α*. As setas verdes indicam os iniciadores utilizados para a obtenção do fragmento e as setas pretas indicam as regiões sequenciadas nos respectivos clones.....58

- Figura 1.6:** Sequência nucleotídica e aminoacídica completa do gene *TrTop2mt* de *Trypanosoma rangeli*.....59
- Figura 1.7:** Sequência nucleotídica e aminoacídica completa do gene *TrTop2α* de *Trypanosoma rangeli*.....60
- Figura 1.8:** (A) Análise da organização do gene *TrTop2mt* de *Trypanosoma rangeli* por *Southern blot*. Os números à esquerda da figura representam os tamanhos das bandas do marcador de peso molecular (DNA ladder 1 kb plus e DNA ladder 100 pb – New England Biolabs). (B) Mapa de restrição do gene *TrTop2mt* apontando os sítios de restrição das enzimas utilizadas. A barra azul representa o quadro aberto de leitura do gene *TrTop2mt* e a barra laranja representa a região condizente a sonda Bc7-14.....61
- Figura 1.9:** Análise da organização do gene *TrTop2α* de *Trypanosoma rangeli* através de dois ensaios de *Southern blot*. Os números à esquerda da figura representam os tamanhos das bandas do marcador de peso molecular (DNA ladder 1 kb plus e DNA ladder 100 pb – New England Biolabs). (A) Análise da organização do gene *TrTop2α* por *Southern blot* utilizando a sonda EXTOPGF/TG4R. (B) Análise da organização do gene *TrTop2α* por *Southern blot* utilizando a sonda TG1F/EXTOPGR. (C). Mapa de restrição do gene *TrTop2mt* apontando os sítios de restrição das enzimas utilizadas. A barra vermelha representa o quadro aberto de leitura do gene *TrTop2α* e as barras em verde representam as regiões condizentes as sondas EXTOPGF/TG4R e TG1F/EXTOPGR.....62
- Figura 1.10:** Comparação das DNA topoisomerases II de *Trypanosoma rangeli* com as subunidades da DNA girase de *Escherichia coli*. (A) *TrTop2mt* e (B) *TrTop2α*.....63
- Figura 1.11:** Árvore filogenética elaborada com as sequências de aminoácidos das DNA topoisomerases tipo II de membros da Ordem Kinetoplastida gerada através do programa MEGA 2.1 pelo método de *Neighbour-joining*. Os losangos em azul representam os genes do grupo *Top2mt* e os losangos em vermelho representam os genes do grupo *Top2α66*
- Figura 1.12:** Árvore filogenética elaborada com as sequências de aminoácidos das DNA topoisomerases tipo II de membros da Ordem Kinetoplastida gerada através do programa MEGA 2.1 pelo método *Minimum evolution*. Os losangos em azul representam os genes do grupo *Top2mt* e os losangos em vermelho representam os genes do grupo *Top2α66*
- Figura 1.13:** Análise da expressão heteróloga das proteínas recombinantes através de gel SDS-PAGE 12% (A) e *western blot* (B), utilizando o anticorpo anti-HisTag. pET14B (Controle sem inserto), pETmtM1 (51,3 kDa), pQEmt12 (12,1 kDa), pETαG1 (40 kDa), pETαG2 (55,3 kDa), pQEα7 (22,7 kDa), e pETαG23 (85,3 kDa).....67
- Figura 1.14:** Análise da expressão heteróloga sob diferentes temperaturas de indução das proteínas recombinantes através de gel SDS-PAGE 12%. 1. Padrão de peso molecular (*Benchmark protein ladder*, Invitrogen); 2.

Fração insolúvel após 16 horas da indução a 15°C; 3. Fração solúvel após 16 horas da indução a 15°C; 4. Fração insolúvel após 4 horas da indução a 27°C; 5. Fração solúvel após 4 horas da indução a 27°C; 6. Fração insolúvel após 4 horas da indução a 37°C; 7. Fração solúvel após 4 horas da indução a 37°C. Em vermelho estão identificadas as melhores condições de expressão para cada proteína.....68

**Figura 1.15:** Resultado da purificação dos fragmentos protéicos recombinantes dos genes *TrTop2mt* e *TrTop2a* em *Escherichia coli*. 1. Padrão de peso molecular (*Benchmark protein ladder*, Invitrogen); 2. Extrato protéico bacteriano após lise celular; 3. Proteínas que não aderiram a resina; 4. Lavagem 1; 5. Lavagem 2; 6. Eluição 1; 7. Eluição 2; 8. Eluição 3; 9. Eluição 4.....69

**Figura 1.16:** Análise da expressão de *TrTop2mt* (A) e *TrTop2a* (B) em extratos protéicos de diferentes espécies da Ordem Kinetoplastida e nas proteínas purificadas através de ensaios de *western blot* utilizando os antissoros contra *TrTop2mt* (pQE<sub>mt</sub>12) e *TrTop2a* (pQE<sub>a</sub>7).....72

**Figura 1.17:** Análise da expressão de *TrTop2mt* (A) e *TrTop2a* (B) em extratos protéicos de formas epimastigotas (Epi) e tripomastigotas (Tripo) de *Trypanosoma rangeli* por *western blot* utilizando os antissoros contra *TrTop2mt* (pQE<sub>mt</sub>12) e *TrTop2a* (pQE<sub>a</sub>7).....72

**Figura 1.18:** Análise da expressão de *TrTop2mt* e *TrTop2a* em extratos protéicos de diferentes espécies da Ordem Kinetoplastida por *western blot* utilizando os antissoros contra *TrTop2mt* (pQE<sub>mt</sub>12), *TrTop2a* (pQE<sub>a</sub>7) e *TrTop2a* (pET<sub>a</sub>G1). TR- Extrato protéico total de *Trypanosoma rangeli*; TC- Extrato protéico total de *Trypanosoma cruzi*; LB- Extrato protéico total de *Leishmania amazonensis*; Neg- Controle utilizando o soro dos camundongos antes da imunização.....73

**Figura 1.19:** Análise da detecção dos antissoros contra *TrTop2mt* (pQE<sub>mt</sub>12), *TrTop2a* (pQE<sub>a</sub>7) e *TrTop2a* (pET<sub>a</sub>G1) frente a extratos protéicos totais do *Trypanosoma rangeli* e os fragmentos protéicos recombinantes purificados.....74

**Figura 1.20:** Análise da expressão de *TrTop2a* em extratos protéicos de diferentes espécies da Ordem Kinetoplastida e na proteína purificada por *western blot* utilizando o anticorpo monoclonal *TrTop2a*10B.....74

**Figura 1.21:** Análise da expressão de *TrTop2mt* e *TrTop2a* em extrato protéico total de formas epimastigotas de *Trypanosoma rangeli* em através de *western blot*, utilizando os antissoros contra *TrTop2mt* (pQE<sub>mt</sub>12) e *TrTop2a* (pQE<sub>a</sub>7) e o anticorpo monoclonal *TrTop2a*10B, realizado a partir de eletroforese unidimensional em condições não desnaturantes.....75

**Figura 1.22:** Eletroforese bidimensional de extrato protéico total de *Trypanosoma rangeli* corado com azul de coomassie R-250. A barra

superior indica a faixa de pH (3-10) utilizada na separação das proteínas. Os círculos azul e vermelho correspondem ao local no gel onde as proteínas *TrTop2mt* e *TrTop2a* foram identificadas por *western blot*, respectivamente.....76

**Figura 1.23:** Análise da expressão de *TrTop2mt* e *TrTop2a* em extrato protéico total de formas epimastigotas de *Trypanosoma rangeli* em através de *western blot* realizado a partir de eletroforese bidimensional. As setas indicam os spots reconhecidos pelos respectivos anticorpos. A barra superior indica a faixa de pH (3-10) utilizada na separação das proteínas..76

**Figura 1.24:** Imunolocalização de *TrTop2mt* e *TrTop2a* em formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma rangeli* através de ensaios de imunofluorescência. (A) Soro Anti-*TcTop2mt*; (B) Soro Anti-*TrTop2mt* (pQE<sub>mt</sub>12); (C) Soro Anti-*TrTop2a* (pQE<sub>a</sub>7); (D) Anticorpo Monoclonal *TrTop2a*10B. As imagens representam microfotografias da expressão da proteína (1), núcleo e cinetoplasto corados com DAPI (2) e a sobreposição das imagens (3). As barras em branco representam 10µm.....78

**Figura 1.25:** Imunolocalização de *TrTop2mt* em *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi* por ensaio de imunofluorescência indireta, utilizando o soro anti-*TcTop2mt*. (A) e (B): Microfotografias mostrando a marcação do núcleo (N) e cinetoplasto (K) com DAPI e (C): Imunolocalização da expressão de *TrTop2mt*. A barra em branco representa 10µm.....79

**Figura 2.1:** Estrutura química do inibidor de DNA topoisomerase - Novobiocina.....102

**Figura 2.2:** Efeito da novobiocina sobre o crescimento de formas epimastigotas da cepa Choachí de *Trypanosoma rangeli* em meio LIT (10% SBF). Cada ponto representa a média de três experimentos independentes e as barras representam os desvios padrões.....105

**Figura 2.3:** Efeito da novobiocina sobre a morfologia e crescimento de formas epimastigotas da cepa Choachí de *Trypanosoma rangeli* em meio LIT (10% SBF). As barras em preto representam 10µm.....106

**Figura 2.4:** Efeito da novobiocina sobre o DNA do núcleo e do cinetoplasto de formas epimastigotas da cepa Choachí de *Trypanosoma rangeli* a partir da coloração com DAPI (1 µg/ml). A barra em branco representa 10µm.107

**Figura 2.5:** Ensaio de imunofluorescência indireta utilizando diferentes anticorpos realizado contra formas epimastigotas da cepa Choachí de *Trypanosoma rangeli* submetidas a distintas concentrações de novobiocina. As barras em branco representam 10µm.....111

**Figura 2.6:** Efeito da novobiocina sobre o crescimento, durante o processo de diferenciação celular da cepa Choachí de *Trypanosoma rangeli* em meio DMEM (5% SBF). Cada ponto representa a média de três experimentos independentes e as barras representam os desvios padrões.....112

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 2.7:</b> Porcentagem de formas tripomastigotas da cepa Choachí de <i>Trypanosoma rangeli</i> cultivadas em meio DMEM (pH 8) na presença (50 µg/ml) ou ausência de novobiocina.....   | 112 |
| <b>Figura 2.8:</b> Efeito da novobiocina sobre o processo de diferenciação celular da cepa Choachí de <i>Trypanosoma rangeli</i> em meio DMEM (5% SBF), evidenciando as alterações morfológicas dos parasitos em esfregaços corados com Giemsa. As barras em branco representam 10µm.....          | 113 |
| <b>Figura 2.9:</b> Ensaio de imunofluorescência indireta utilizando diferentes anticorpos contra formas epimastigotas (dia 2) e tripomastigotas (dia 8) de <i>Trypanosoma rangeli</i> , sem a presença de novobiocina. As barras em branco representam 10µm.....                                   | 116 |
| <b>Figura 2.10:</b> Ensaio de imunofluorescência indireta utilizando diferentes anticorpos no oitavo dia do processo de metaciclogênese de <i>Trypanosoma rangeli</i> sob tratamento com diferentes concentrações de novobiocina (50 µg/ml e 300 µg/ml). As barras em branco representam 10µm..... | 117 |
| <b>Figura 2.11:</b> <i>Western blot</i> utilizando diferentes anticorpos durante o processo de diferenciação celular padrão de <i>Trypanosoma rangeli</i> e sob tratamento com 300 µg/ml de novobiocina.....   | 118 |
| <b>Figura 2.12:</b> Alinhamento parcial das sequências identificadas para o <i>Trypanosoma rangeli</i> com os seus ortólogos no <i>T. cruzi</i> correspondentes aos genes que codificam para mtHSP70 e DHLADH.....   | 119 |

## LISTA DE TABELAS

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabela 1:</b> Exemplos de DNA topoisomerases, classificadas de acordo com sua subfamília. Fonte: Wang, 2002.....   | 14  |
| <b>Tabela 1.1:</b> Relação dos iniciadores utilizados no presente estudo para a amplificação dos genes <i>TrTop2mt</i> e <i>TrTop2a</i> de <i>Trypanosoma rangeli</i> . S- Iniciador Senso; AS- Iniciador Anti-Senso.....                                       | 37  |
| <b>Tabela 1.2:</b> Porcentagens de identidade e similaridade dos genes <i>TrTop2mt</i> (A) e <i>TrTop2a</i> (B) de <i>Trypanosoma rangeli</i> com outras DNA topoisomerases II eucarióticas conforme resultados obtidos através do programa <i>Blastp</i> ..... | 64  |
| <b>Tabela 1.3:</b> Relação dos diferentes anticorpos produzidos conforme o fragmento utilizado na imunização dos camundongos.....   | 69  |
| <b>Tabela 1.4:</b> Identificação do fragmento pQE <sub>mt</sub> 12 correspondente a <i>TrTop2mt</i> de <i>Trypanosoma rangeli</i> por espectrometria de massas (Q4E0W1_TRYCR, massa: 138.828 Da e escore: 131).....   | 70  |
| <b>Tabela 1.5:</b> Identificação do fragmento pQE <sub>a</sub> 7 correspondente a <i>TrTop2a</i> de <i>Trypanosoma rangeli</i> por espectrometria de massas (Q4D8L4_TRYCR, massa: 169.028 Da e escore: 159).....  | 70  |
| <b>Tabela 1.6:</b> Identificação do fragmento pET <sub>a</sub> G1 correspondente a <i>TrTop2a</i> de <i>Trypanosoma rangeli</i> por espectrometria de massas (Q4D8L4_TRYCR, massa: 169.028 Da e escore: 131).....   | 71  |
| <b>Tabela 2.1:</b> Descrição dos anticorpos utilizados nos ensaios de imunofluorescência e <i>western blot</i> , considerando sua origem, tamanho da proteína reconhecida e diluições utilizadas nas diferentes metodologias..                                  | 103 |
| <b>Tabela 2.2:</b> Clusters identificados no banco de sequências transcriptômicas do <i>Trypanosoma rangeli</i> que possuem similaridade com as sequências gênicas da HSP70 mitocondrial e da Dihidrolipoamida desidrogenase....                                | 119 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

- $\mu\text{g}$  – Micrograma  
 $\mu\text{l}$  – Microlitro  
ATP – Adenosina tri-fosfato  
BSA – Soro Albumina Bovina (do inglês *Bovine Serum Albumin*)  
cDNA – DNA complementar  
cm – Centímetros  
Da – Dalton  
DAPI – do inglês *4',6-diamidino-2-phenylindole*  
DMEM – do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*  
DNA – Ácido desoxirribonucléico  
dNTP – Desoxinucleotídeo tri-fosfatado  
ELISA – do inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*  
EST – Etiqueta de Sequência Expressa (do inglês *Expressed Sequence Tag*)  
g – Força da gravidade  
g – Grama  
IPTG – Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo  
J – Joules  
Kb – Kilobases  
kDa – Kilodaltons  
kDNA – DNA mitocondrial do cinetoplasto  
KV – Kilovolt  
LB – Meio Luria-Bertani  
LIT – do inglês *Liver Infusion Tryptose*  
M – Molar  
mg – Miligrama  
ml – Mililitro  
mM – Milimolar  
mRNA – RNA mensageiro  
NLS – Sinal de localização celular (do inglês *Nuclear Localization Signals*)  
nt – Nucleotídeos  
 $^{\circ}\text{C}$  – Graus Celsius  
ORESTES – Etiqueta de sequência expressa do quadro aberto de leitura (do inglês *Open Reading Frame EST*)  
ORF – Quadro aberto de leitura (do inglês *Open Reading Frame*)  
pb – Pares de bases  
PBS – Tampão salina fosfato (do inglês *Phosphate Buffered Saline*)  
PCR – Reação em cadeia da DNA polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)  
pH – Potencial hidrogeniônico  
RNA – Ácido ribonucléico  
RT-PCR – do inglês *Reverse Transcription PCR*  
SBF – Soro bovino fetal  
SDS-PAGE – do inglês *Sodium Dodecil Sulphate – Polyacrilamide Gel Electrophoresis*  
TAC – Complexo de ligação tripartido (do inglês *Tripartite Attachment*)

*Complex)*

TE – Tampão Tris-EDTA

TRITC – Iso-Tiocianato de Tetrametil Rodamina

u.f.p – Unidade Formadora de Placa

V – Volt

v/v – Volume/volume

ng – Nanograma

nm – Nanômetro

pmol – Picomol



## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....                          | 1  |
| <i>Trypanosoma rangeli</i> .....                            | 1  |
| DNA topoisomerases.....                                     | 13 |
| O Papel das DNA topoisomerases em Processos Biológicos..... | 21 |
| Inibidores de DNA topoisomerases.....                       | 24 |
| DNA topoisomerases na Ordem Kinetoplastida.....             | 25 |
| <b>OBJETIVOS</b> .....                                      | 30 |

### CAPÍTULO 1

#### **Caracterização molecular das DNA topoisomerases II de *Trypanosoma rangeli***

|   |    |
|---|----|
| <b>1.1 JUSTIFICATIVA</b> .....  | 32 |
| <b>1.2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....  | 34 |
| 1.2.1 Parasitos.....  | 34 |
| 1.2.2 Diferenciação celular <i>in vitro</i> .....   | 34 |
| 1.2.3 Isolamento do DNA total de <i>T. rangeli</i> .....  | 34 |
| 1.2.4 Isolamento do RNA total de <i>T. rangeli</i> .....  | 35 |
| 1.2.5 Dosagem do DNA e RNA.....   | 36 |
| 1.2.6 Amplificação e clonagem dos fragmentos gênicos das DNA topoisomerases II de <i>T. rangeli</i> .....                   | 36 |
| 1.2.7 Varredura da biblioteca genômica de <i>T. rangeli</i> para obtenção dos genes das DNA topoisomerases II.....          | 38 |
| 1.2.8 Sequenciamento dos genes das DNA topoisomerases II de <i>T. rangeli</i> .....   | 40 |
| 1.2.9 Análise das sequências obtidas.....   | 40 |
| 1.2.10 Caracterização da organização genômica das DNA topoisomerases II de <i>T. rangeli</i> por <i>Southern blot</i> ..... | 41 |
| 1.2.11 Expressão heteróloga e purificação das DNA topoisomerases de <i>T. rangeli</i> .....                                 | 42 |
| 1.2.12 Espectrometria de massas.....  | 44 |
| 1.2.13 Obtenção dos antissoros e anticorpos monoclonais dirigidos às DNA topoisomerases II de <i>T. rangeli</i> .....       | 45 |
| 1.2.14 Estudo da expressão das DNA topoisomerases II por <i>western blot</i> .....  | 48 |
| 1.2.15 Imunolocalização por microscopia óptica.....   | 51 |
| <b>1.3 RESULTADOS</b> .....   | 52 |
| <b>1.4 DISCUSSÃO</b> .....  | 80 |
| <b>1.5 CONCLUSÕES</b> .....   | 97 |

### CAPÍTULO 2

#### **Estudo do papel das DNA topoisomerases II no crescimento e diferenciação do *Trypanosoma rangeli***

|   |     |
|---|-----|
| <b>2.1 JUSTIFICATIVA</b> .....  | 100 |
| <b>2.2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....  | 102 |
| 2.2.1 Avaliação do inibidor de topoisomerase novobiocina sobre formas epimastigotas de <i>T. rangeli</i> .....                | 102 |
| 2.2.2 Avaliação do inibidor de topoisomerase novobiocina sobre o processo de diferenciação celular do <i>T. rangeli</i> ..... | 102 |
| 2.2.3 <i>Western blot</i> .....   | 103 |
| 2.2.4 Imunofluorescência.....   | 104 |

|                                   |     |
|-----------------------------------|-----|
| <b>1.3 RESULTADOS</b> .....       | 105 |
| <b>1.4 DISCUSSÃO</b> .....        | 120 |
| <b>1.5 CONCLUSÕES</b> .....       | 132 |
| <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> ..... | 133 |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....          | 134 |
| <b>APÊNDICE</b> .....             | 157 |

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### *Trypanosoma rangeli*

#### Aspectos gerais

O *Trypanosoma rangeli* é um protozoário flagelado de ciclo heteroxênico, pertencente ao Filo Euglenozoa, Ordem Kinetoplastida, Sub-Ordem Trypanosomatina, Família Trypanosomatidae (figura 1). Foi originalmente descrito por Enrique Tejera em 1920, que observou formas flageladas no conteúdo intestinal de *Rhodnius prolixus* naturalmente infectado na Venezuela (D'ALESSANDRO, 1976).

Este parasito é capaz de infectar não só triatomíneos, mas também mamíferos silvestres e domésticos, incluindo o homem (D'ALESSANDRO-BACIGALUPO; SARAVIA, 1992). Todavia, diferentemente das demais espécies pertencentes ao Subgênero *Herpetosoma*, o *T. rangeli* não apresenta especificidade de hospedeiros, sendo encontrado em uma extensa variedade de reservatórios vertebrados, correspondentes as Ordens Edentata, Marsupialia, Carnivora, Rodentia e Primata (D'ALESSANDRO; SARAVIA, 1999). Experimentalmente, diferentes espécies, que incluem ratos, camundongos, hamsters, coelhos, cães, morcegos e primatas têm sido infectadas com o *T. rangeli*, comprovando sua possível amplitude de hospedeiros (GUHL; VALLEJO, 2003).



**Figura 1:** Microfotografia da forma tripomastigota sanguínea de *Trypanosoma rangeli* em sangue de camundongo experimentalmente infectado (corado por Giemsa) (aumento de 1.000x).

O primeiro caso de infecção humana pelo *T. rangeli* foi evidenciado na Guatemala durante a realização de estudos sobre a doença de Chagas (DE LEON, 1942). Desde então, mais de 2.600 casos já foram

descritos na Venezuela, Guatemala, Panamá, Colômbia, El Salvador, Costa Rica, Peru e Brasil (D´ALESSANDRO-BACIGALUPO; SARAVIA, 1992; GRISARD et al., 1999).

A distribuição geográfica do *T. rangeli* é sobreposta com a do *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas, com o qual compartilha reservatórios e vetores (figura 2). Desta forma, uma das implicações epidemiológicas da coexistência destes dois parasitos reside na ocorrência de infecções únicas ou mistas, tanto nos hospedeiros invertebrados como nos vertebrados (D´ALESSANDRO-BACIGALUPO; SARAVIA, 1992; GRISARD et al., 1999; GUHL; VALLEJO, 2003).

Em Florianópolis, Santa Catarina, STEINDEL e colaboradores descreveram pela primeira vez em 1991 a presença do *T. rangeli*, bem como a ocorrência de infecções mistas com o *T. cruzi* em triatomíneos da espécie *Panstrongylus megistus* naturalmente infectados (STEINDEL et al., 1991; STEINDEL, 1992).

Embora o *T. rangeli* não seja considerado patogênico para o hospedeiro vertebrado, a infecção por este parasito induz uma resposta imune humoral com elevados títulos de anticorpos, os quais determinam uma reatividade cruzada com antígenos do *T. cruzi* e dificultam o diagnóstico sorológico da doença de Chagas, especialmente em sua fase crônica (AFCHAIN et al., 1979; GRISARD et al., 1999). AFCHAIN e colaboradores (1979), analisando formas epimastigotas de cultura do *T. rangeli*, verificaram que este compartilha cerca de 60% de sua constituição antigênica solúvel com o *T. cruzi*, o que explica a reatividade sorológica cruzada e os possíveis resultados falso-positivos.

Devido às dificuldades de distinção entre o *T. rangeli* e o *T. cruzi* com base nos critérios morfológicos, à reatividade sorológica cruzada, à ausência de manifestações clínicas da doença de Chagas indeterminada e à característica não patogênica do *T. rangeli* em seus hospedeiros mamíferos, acredita-se que o número de infecções humanas pelo *T. rangeli* possa estar subestimado e, por conseguinte, uma superestimativa dos casos de infecção pelo *T. cruzi* esteja ocorrendo em áreas onde estes parasitos coexistem.

Diversos impactos sociais e econômicos podem ser desencadeados por esta sobreposição. Como um possível exemplo, observa-se em bancos de sangue no Brasil, um elevado número de descarte de bolsas devido a resultados inconclusivos para o diagnóstico da doença de Chagas (SILVA et al., 2002). Desta forma, a identificação específica destes dois parasitos, evitando inferências errôneas, torna-se extremamente importante do ponto de vista epidemiológico, terapêutico, econômico e social.



**Figura 2:** Mapa das Américas Central e do Sul, mostrando a sobreposição geográfica da distribuição da doença de Chagas humana (sombreado) e os registros de ocorrência comprovada do *Trypanosoma rangeli* em humanos, triatomíneos ou animais silvestres (●). Fonte: Grisard; Steindel, 2004.

Diferentes métodos podem ser empregados para diferenciar *T. cruzi* de *T. rangeli*, incluindo métodos biológicos, como a observação do desenvolvimento do parasito nas glândulas salivares ou fezes dos triatomíneos (D’ALESSANDRO, 1976); morfológicos, como a avaliação diferencial das formas sanguíneas e de cultivo dos parasitos (VALLEJO et al., 1988); bioquímicos, como a lise das formas de cultura pelo complemento humano, aglutinação dos parasitos com a lectina de gérmen de trigo (SCHOTTELIUS; MARINKELLE; GOMEZ-LEIVA, 1986) e perfil de izoenzimas (MILES et al., 1983); imunológicos, como a imunofluorescência indireta e ELISA (do inglês *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) com a utilização de anticorpos monoclonais (ANTHONY; CODY; CONSTANTINE, 1981; ACOSTA et al., 1991) e antígenos recombinantes (UMEZAWA et al., 1999); além da reação em cadeia da polimerase (PCR)

(MURTHY; DIBBERN; CAMPBELL, 1992; COURA et al., 1996; VALLEJO et al., 1999; MACHADO et al., 2000; VARGAS et al., 2000).

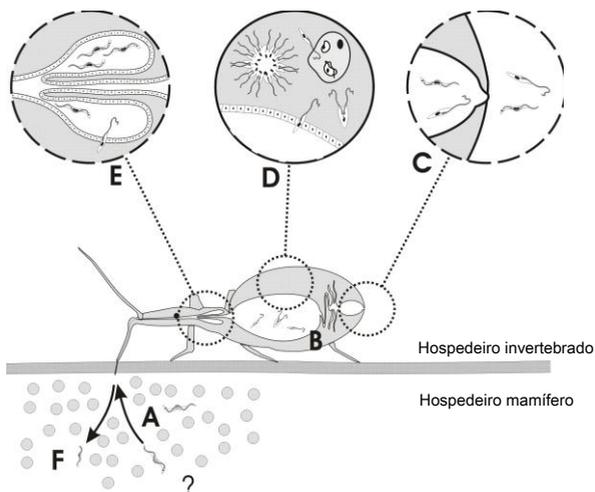
Apesar de alguns métodos apresentarem uma boa especificidade, a sensibilidade depende do nível da parasitemia dos indivíduos infectados, a possível presença de inibidores, bem como o requerimento de recursos humanos e equipamentos especializados tornando os custos elevados (GUHL et al., 2002).

Algumas destas metodologias que permitem a diferenciação entre os dois parasitos levam em consideração o conhecimento existente a respeito do ciclo evolutivo do *T. rangeli* no seu hospedeiro invertebrado. Entre as características mais marcantes e diferenciais em relação ao *T. cruzi* está a capacidade de invasão da hemolinfa e o desenvolvimento das formas infectantes nas glândulas salivares, fazendo com que sua principal via de transmissão seja por inoculação, e não através das fezes de triatomíneos infectados, como ocorre para o *T. cruzi* (D'ALESSANDRO; SARAIVA, 1999; MACHADO et al., 2001).

### Ciclo evolutivo

Basicamente, a infecção do triatomíneo pelo *T. rangeli* se dá através da ingestão de formas tripomastigotas circulantes no sangue do hospedeiro vertebrado infectado, durante o repasto sanguíneo. No intestino do inseto, alguns parasitos se diferenciam em formas epimastigotas (que podem ser curtas ou longas). Estas formas aderem ao epitélio do intestino médio, e são capazes de atravessá-lo, alcançando a hemocele. Após a invasão da hemocele, os parasitos multiplicam-se livremente na hemolinfa e migram para as glândulas salivares onde se diferenciam em formas infectantes, os tripomastigotas metacíclicos. A transmissão ao hospedeiro mamífero acontece através da picada do triatomíneo, especialmente do gênero *Rhodnius*, que inocula as formas infectantes no hospedeiro vertebrado (figura 3). Por outro lado, foi demonstrado experimentalmente através da infecção de camundongos pela inoculação de fezes de triatomíneos infectados, a possibilidade de diferenciação destes parasitos na ampola retal, onde são excretados com as fezes e com a urina (D'ALESSANDRO, 1976; GRISARD; CAMPBELL; ROMANHA, 1999; GUHL; VALLEJO, 2003; GRISARD; STEINDEL, 2004).

Acredita-se que cerca de 30 dias após a infecção, formas epimastigotas e tripomastigotas começam a ser liberadas pelas fezes (D'ALESSANDRO, 1976; STEINDEL, 1993). Entretanto, existem inúmeras evidências que distinguem estas formas tripomastigotas presentes nas fezes dos tripomastigotas metacíclicos derivados da glândula salivar.



**Figura 3:** Ciclo biológico do *Trypanosoma rangeli* no hospedeiro invertebrado. (A) Ingestão das formas tripomastigotas de *T. rangeli* durante o repasto sanguíneo do triatomíneo, (B) Formas tripomastigotas e epimastigotas no trato intestinal do triatomíneo, (C) Parasitos alcançam a ampola retal e formas epimastigotas e tripomastigotas podem ser excretadas juntamente com as fezes e urina, (D) Adesão de formas epimastigotas do parasito ao epitélio intestinal e transposição para a hemocele, onde se multiplicam, (E) Invasão pelo *T. rangeli* das glândulas salivares do triatomíneo e diferenciação para formas infectantes (tripomastigotas metacíclicas), as quais são inoculadas com a saliva, (F) durante o repasto sanguíneo. Fonte: Grisard; Steindel, 2004.

O pleomorfismo do *T. rangeli* dificulta a diferenciação deste parasito em relação a outros tripanosomatídeos baseado na sua morfologia, principalmente a partir de formas epimastigotas. Assim, a presença de flagelados similares ao *T. rangeli* (*T. rangeli-like*) no intestino de alguns triatomíneos, não implica que estas espécies tenham capacidade vetorial. A evidência definitiva consiste na demonstração de tripomastigotas metacíclicos na saliva ou na glândula salivar e sua infectividade para o vertebrado (GUHL; VALLEJO, 2003). Considerando estes fatos, o gênero *Rhodnius* é particularmente susceptível a infecção pelo *T. rangeli* e a transmissão via inoculação já foi demonstrada para 12 espécies deste gênero, a partir de insetos naturalmente ou experimentalmente infectados. Embora, com baixas taxas de infecção nas glândulas salivares, a susceptibilidade de *P. megistus*, *Triatoma infestans*, *T. sordida*, *T. braziliensis* e *T. vitticeps* ao *T. rangeli* também foi apontada (DE STEFANI MARQUEZ et al., 2006).

A intensa multiplicação de epimastigotas na hemolinfa e os eventos relacionados a sobreposição de barreiras celulares podem exercer uma ação patogênica para o inseto vetor, que caracteriza-se pela destruição dos hemócitos, dificuldade de muda e desenvolvimento das ninfas, podendo eventualmente ocasionar a morte (VALLEJO; GUHL; SCHAUB, 2009).

Estudos sobre a evasão do intestino das formas epimastigotas têm proposto diferentes padrões para este evento. DE OLIVEIRA e DE SOUZA (2001) sugeriram que o parasito atravessa o citoplasma das células intestinais, causando dano celular. Porém, estudo anterior havia demonstrado que apesar de atravessar as células por uma rota intracelular, danos celulares não são observados (HECKER; SCHWARZENBACH; RUDIN, 1990).

Com relação a multiplicação celular, frequentemente se encontra em manuscritos o conceito de divisão intracelular nos hemócitos, porém nenhuma evidência desta situação foi apresentada até o momento. Neste mesmo conceito, ainda não está bem estabelecido se as células de defesa nos insetos possuem a capacidade de realizar a fagocitose e matar os parasitos. DE OLIVEIRA et al. (2001), utilizando microscopia eletrônica de transmissão, mostrou que plasmatócitos foram capazes de internalizar formas epimastigotas dos parasitos formando um vacúolo, sem evidências de parasitos em divisão.

Diferentemente do que acontece no hospedeiro invertebrado, pouco se sabe a respeito do curso da infecção por este parasito no hospedeiro vertebrado. Basicamente, não se observa patogenia e os níveis de parasitemia sanguínea normalmente são muito baixos e de curta duração (D'ALESSANDRO; SARAVIA, 1999). Assim, os dados a respeito da multiplicação do *T. rangeli* no seu hospedeiro vertebrado são escassos e bastante controversos.

Em estudos de infecção em camundongos com uma cepa de *T. rangeli* originária da Venezuela, AÑEZ e colaboradores (1985) não conseguiram detectar a presença do parasito por xenodiagnóstico ou hemocultura após 50 ou 60 dias de infecção. Entretanto, STEINDEL (1993) conseguiu demonstrar a presença do *T. rangeli* em hemocultura, a partir de camundongos, sete meses após a infecção. Parasitos também foram detectados após 13 meses (PAREDES; PAREDES, 1949) e após 18 meses (GROOT; RENJIFO; URIBE, 1950; GROOT, 1954) a partir de infecções humanas naturais e de camundongos experimentalmente infectados, utilizando a mesma técnica.

A capacidade de replicação no hospedeiro vertebrado ainda é o ponto mais conflitante nos estudos a respeito do *T. rangeli*. A possível multiplicação intracelular, como no *T. cruzi*, se sobrepõe com a proliferação sanguínea extracelular igualmente ao que ocorre no *T. brucei*. Observações de formas tripomastigotas sanguíneas que pareciam estar em divisão já foram realizadas em seres humanos e roedores (D'ALESSANDRO; SARAVIA, 1999). Entretanto, segundo estes autores, estas formas ainda podem ser provenientes da glândula salivar do inseto infectado e não uma consequência da multiplicação do parasito no hospedeiro vertebrado.

Com relação a evidências de multiplicação intracelular, um extenso estudo histopatológico com mais de cem animais infectados não apresentou qualquer resultado de multiplicação intracelular (HERBIG-SANDREUTER, 1955). Contrariamente, SCORZA e colaboradores (1986) e URDANETA-MORALES e TEJERO (1986) observaram numerosas formas intracelulares do *T. rangeli*, chamadas de “amastigotas-like”, no coração, fígado e baço de camundongos lactantes MMRI inoculados com a cepa venezuelana Perro 82, sendo estas as únicas descrições de formas intracelulares do parasito observadas *in vivo*.

Em ensaios de interação *in vitro*, usando promonócitos humanos (U937) infectados com *T. rangeli* (cepas San Agostin e clone Ub66-5b), foi demonstrada a presença de formas intracelulares, mas sem evidências de multiplicação (OSORIO et al., 1995). Zuñiga e colaboradores (1997) verificaram um aumento no número de parasitos intracelulares em tempos prolongados de interação, sugerindo a capacidade de multiplicação da cepa C23 de *T. rangeli* em células Vero e em promonócitos murinos.

Entretanto, vários outros estudos demonstraram que a taxa de infectividade de diferentes cepas deste parasito frente a linhagens celulares distintas (fagocíticas e não fagocíticas), incluindo macrófagos peritoneais murinos, células Vero e promonócitos murinos J774, é sempre muito baixa e os parasitos tendem a desaparecer ao longo do tempo de interação, sugerindo a ausência de multiplicação intracelular e sua desintegração, especialmente em macrófagos (MOLYNEUX, 1973; TANOURA et al., 1999; EGER-MANGRICH et al., 2001).

Apesar destes dados ainda controversos na literatura, o isolamento repetido do parasito em animais cronicamente infectados e a detecção de parasitemias mais elevadas que o inóculo realizado sugerem a existência de multiplicação ou de um mecanismo de sobrevivência deste flagelado no hospedeiro vertebrado (URDANETA-MORALES; TEJERO, 1985; D'ALESSANDRO; SARAVIA, 1999).

### Diferenciação celular *in vitro*

Grande parte dos estudos relacionados a investigação de processos biológicos necessita do suporte de metodologias específicas para a obtenção das diferentes formas evolutivas do parasito. Durante o seu ciclo evolutivo, o *T. rangeli* alterna entre dois tipos morfológicos principais, epimastigota e tripomastigota, com propriedades características, destacando-se a infectividade para o hospedeiro vertebrado. Neste sentido, várias peculiaridades estão intimamente ligadas ao processo de diferenciação de uma forma para a outra, sendo que o estudo aprofundado deste processo além de aumentar a compreensão de aspectos morfológicos pode levar à identificação de alvos e processos de interesse.

Uma etapa crucial do ciclo de vida do *T. rangeli* é o processo de diferenciação celular, durante o qual mudanças coordenadas no metabolismo e na morfologia ocorrem para efetuar uma transformação onde formas não infectantes e replicativas, os epimastigotas, diferenciam-se em formas infectantes incapazes de se multiplicar, os tripomastigotas metacíclicos.

Nesse sentido, avanços significativos foram alcançados na tentativa de simular as condições naturais que podem levar o parasita a se diferenciar, possibilitando o estudo da reprogramação gênica a que estes organismos são submetidos durante o processo de diferenciação, sobretudo para as formas infectantes. Uma etapa essencial foi o estabelecimento de um meio com condições quimicamente definidas que mimetizam o processo de diferenciação que ocorre no inseto vetor (KOERICH et al., 2002).

A diferenciação de epimastigotas a tripomastigotas metacíclicos envolve alterações físico-químicas que permitem a ocorrência da reprogramação celular que visualmente pode ser acompanhada a partir da análise de modificações morfológicas. Neste sentido, a diferenciação celular em *T. cruzi* e *T. rangeli* em seus vetores está relacionada a características biológicas distintas.

Há várias evidências de fatores intrínsecos do sistema digestivo do inseto vetor estimulam o disparo da diferenciação celular em *T. cruzi*, como: a composição da urina descarregada no saco retal (FRAIDENRAICH et al., 1993); o peptídeo resultante da digestão da globina que pode ser capaz de ativar a enzima adenilciclase parasitária, presente na forma epimastigota (SCHMIDT et al., 1997); o AMP cíclico presente na luz do intestino; a diminuição da concentração dos nutrientes devido ao processo de absorção ou a períodos de falta de alimentação do inseto vetor (KOLLIEN; SCHAUB, 2000); e a adesão das formas epimastigotas a um

substrato (BONALDO et al., 1988). Os fenômenos de adesão e de diferenciação celular são interrompidos se, após um período de estresse nutricional, as condições de nutrição forem restauradas. Deste modo, é possível que o estresse nutricional esteja associado a expressão de proteínas de adesão (FIGUEIREDO; ROSA; SOARES, 2000), sendo este um dos principais fatores que influencia a diferenciação. Normalmente os insetos vetores convivem com longos períodos sem alimentação, ocasionando o estresse nutricional generalizado (KOLLIEN; SCHAUB, 2000). Fisiologicamente, acredita-se que a escassez de nutrientes nesta espécie está associada ao processo de acidificação do conteúdo do reservossomo e de ativação de suas enzimas, com a degradação das proteínas acumuladas nessa organela, o que leva ao seu desaparecimento e a liberação dos seus aminoácidos para o citoplasma (SOARES et al., 1989; URBINA, 1994; SOARES, 1999).

Para o *T. cruzi* é bem estabelecido que o meio de urina artificial de triatomíneos (TAU) e a sua suplementação com prolina induz altas taxas de diferenciação celular de *T. cruzi in vitro* (CONTRERAS et al., 1985). Entretanto, o *T. rangeli* não é capaz de diferenciar e nem mesmo de replicar neste meio. A sua capacidade de crescimento e diferenciação em meio DMEM em pH 8 suplementado com L-glutamina sugere que este aminoácido, assim como as condições de pH estão envolvidas neste processo, e que o *T. rangeli*, diferentemente do *T. cruzi* requer um meio mais rico nutricionalmente do que o *T. cruzi*, para a diferenciação em formas tripomastigotas (KOERICH et al., 2002).

A diferenciação celular do *T. rangeli* ocorre na glândula salivar do triatomíneo. Formas epimastigotas provenientes da hemocele no inseto atravessam a lâmina basal que circunda a glândula salivar e penetram ativamente através do citoplasma das células da glândula. Após atingirem o lúmen, estas formas permanecem aderidas as microvilosidades das células da glândula salivar pelo seus flagelos, enquanto que as formas tripomastigotas metacíclicas são encontradas nadando livremente na saliva (MEIRELLES et al., 2005). A localização do cinetoplasto próxima ao núcleo indica que os epimastigotas começam a diferenciação em tripomastigotas ainda aderidos a microvilosidades das células da glândula salivar.

Neste sentido, a adesão celular também pode ser considerada um importante fator para a diferenciação em *T. rangeli*, bem como ocorre para o *T. cruzi* com um tipo distinto de substrato requerido ainda não conhecido. O cultivo de diferentes cepas de *T. rangeli* em meio DMEM suplementado com diferentes concentrações de extratos de glândula

salivar não induziram significativamente a diferenciação em formas tripomastigotas (EMMANUELLE-MACHADO et al., 2002).

De maneira geral, o processo de diferenciação celular também acarreta modificações no perfil de expressão gênica dos parasitas, e as alterações no padrão de genes expressos podem preceder as alterações morfológicas que ocorrem no processo de diferenciação (CONTRERAS et al., 1985). Para o *T. cruzi*, os níveis de transcrição são reduzidos durante o processo (GOLDENBERG et al., 1985) e vários genes são transitariamente expressos, com um perfil de regulação de sua expressão nitidamente pós-transcricional, sendo alguns caracterizados com regulação através da mobilização diferencial para os polissomos, acarretando em grandes diferenças a nível protéico (ÁVILA et al., 2001; DALLAGIOVANNA et al., 2001; ÁVILA et al., 2003; FRAGOSO et al., 2003).

### Abordagens genômicas, transcriptômicas e proteômicas

Além de estudos biológicos a respeito do seu ciclo evolutivo, vários estudos envolvendo a caracterização antigênica, genética e bioquímica têm sido realizados para o *T. rangeli*. Estudos de genômica, transcriptômica ou proteômica comparativa de diferentes populações de *T. cruzi* e *T. rangeli* têm auxiliado na identificação e caracterização de proteínas que estão envolvidas em pontos chaves do ciclo celular, assim como na indução da resposta imune do hospedeiro, contribuindo diretamente na especificidade do diagnóstico da doença de Chagas bem como no estabelecimento da posição taxonômica do *T. rangeli* (STEVENS et al., 1999).

Neste contexto, comparações dos perfis protéicos totais de *T. rangeli* e *T. cruzi* de acordo com seus estágios morfológicos e fisiológicos (epimastigotas e tripomastigotas) apontam a expressão gênica diferencial durante o ciclo de vida, incluindo algumas proteínas espécie específicas (MEJIA et al., 2004). Este fato também pode ser observado a partir da utilização de diferentes cepas e formas do *T. rangeli* e *T. cruzi*, avaliando-se a reatividade contra soros de pacientes chagásicos que apresentavam distintas formas clínicas da doença (DE MORAES et al., 2008).

Entre os genes de expressão espécie-específicos pode-se relacionar o que codifica para uma mucina-like descrito por ABATE *et al.* (2005), sendo claramente só encontrado em *T. cruzi*. Já, Añez-Rojas e colaboradores (2006) demonstraram que entre os diferentes padrões de proteínas com âncora GPI existentes na membrana plasmática de epimastigotas estavam incluídas proteínas de 90, 85 e 56 kDa para o *T. rangeli*, e de 30, 70 e 100 kDa para o *T. cruzi*.

Outras importantes contribuições foram realizadas com os estudos de algumas sequências conservadas em todos os membros da Ordem Kinetoplastida: o DNA do cinetoplasto (kDNA) (STURM et al., 1989; VALLEJO et al., 1994) e o gene do mini-éxon (spliced-leader ou SL), que gera uma sequência de 39 nucleotídeos adicionada a extremidade 5' de todos os mRNA transcritos (GRISARD; CAMPBELL; ROMANHA, 1999).

O kDNA é uma rede composta de milhares de minicírculos e poucas dúzias de maxicírculos concatenados. Sabe-se que os minicírculos diferem na sequência de nucleotídeos entre as distintas espécies, porém são homogêneos em tamanho e em alguns casos pode haver hibridização cruzada entre sequências de espécies distintas (VALLEJO et al., 1994). Interessantemente, em todos os tripanosomatídeos estudados, pelo menos uma cópia de uma região conservada de ~100–200 nt possui uma sequência não variável de 12 nt (STURM et al., 1989; VALLEJO et al., 1994).

Basicamente, quatro cópias desta região conservada ocorrem nos minicírculos de *T. cruzi*, organizadas a 90° uma da outra. Entretanto, o *T. rangeli* contém três classes distintas de mini-círculos que diferem em tamanho e organização molecular. Os minicírculos KP1 contém uma única região conservada, os KP2 contém duas regiões conservadas localizadas a 180° uma da outra e os KP3 contém quatro regiões conservadas localizadas a 90°, como visto em *T. cruzi* (VALLEJO et al., 1994; GUHL et al., 2002).

VALLEJO et al. (1994) descreveu iniciadores específicos direcionados a estas regiões conservadas dos minicírculos com alta sensibilidade devido ao alto número de minicírculos existentes e possibilitou a amplificação por PCR de todos os tipos de minicírculos existentes para o *T. rangeli*, desencadeando inúmeras pesquisas epidemiológicas baseadas na caracterização das diferentes cepas do parasito.

Utilizando esta ferramenta um estudo conduzido em diferentes países da América Latina determinou que cepas de *T. rangeli* isoladas de *R. prolixus* apresentavam três produtos de amplificação, enquanto que as isoladas de outras espécies de *Rhodnius* spp. apresentavam produtos de amplificação derivados somente dos minicírculos KP2 e KP3. Cepas de *T. rangeli* que apresentavam os minicírculos KP1 (KP1+) ou não (KP1-) foram detectadas no intestino de vários exemplares de *R. colombienses*, mas as cepas KP1(+) não foram capazes de evadir para a hemolinfa e penetrar nas glândulas salivares. Os mesmos autores observaram uma situação similar em *R. prolixus*, onde também foi possível encontrar *T. rangeli* KP1(-) e KP1(+) no intestino, sendo que somente as células

KPI(+) foram observadas na glândula salivar (VALLEJO et al., 2002; URREA et al., 2005).

Estes dados sugerem que algumas espécies de *Rhodnius* spp. são preferencialmente susceptíveis a cepas KPI(+) enquanto outras a cepas KPI(-). Isto posto, cada espécie do gênero *Rhodnius* pode selecionar as subpopulações de parasitos que são capazes de alcançar a glândula salivar e conseqüentemente ser transmitido pela picada através da saliva (MACHADO et al., 2001; GUHL; VALLEJO, 2003).

Estudos no *T. rangeli* sobre o gene do mini-éxon também permitiram dividir as cepas de *T. rangeli* em dois grupos distintos, assim como outros vários marcadores (o gene 5S rDNA, seqüências espaçadoras internas transcritas – ITS e RAPD) (AKSOY et al., 1992; STEINDEL et al., 1994; GRISARD; CAMPBELL; ROMANHA, 1999; BARNABE; BRISSE; TIBAYRENC, 2003; DA SILVA et al., 2004; BELTRAME-BOTELHO et al., 2005).

Um enfoque funcional surgiu na investigação de genes específicos que codificam para algumas proteínas e enzimas do *T. rangeli*. Dentre estes, destacam-se os trabalhos relacionados a família das trans-sialidases (BUSCHIAZZO et al., 1993; PONTES-DE-CARVALHO; TOMLINSON; NUSSENZWEIG, 1993; MEDINA-ACOSTA et al., 1994; BUSCHIAZZO; CAMPETELLA; FRASCH, 1997; SOUSA; LOMBARDO; SALDAÑA, 2005), ao gene da tirosina aminotransferase (BONTEMPI et al., 2000); a proteína de membrana da Ordem Kinetoplastida 11 (KMP-11) (URUENA et al., 2004), a histona H2A (PUERTA et al., 2000; CUERVO; LOPEZ; PUERTA, 2006; PUERTA et al., 2009), o transportador de D-glicose (MILETTI et al., 2006), além do estudo envolvendo os genes que codificam para a beta-tubulina, cisteína proteinase, proteína de choque térmico 70 kDa (HSP 70) e actina em cepas de *T. rangeli* de distintas regiões geográficas (TOALDO et al., 2001).

Apesar destes trabalhos, muito pouco ainda é conhecido com relação a estrutura genética e a expressão gênica no *T. rangeli*. Neste sentido, considerando a finalização dos genomas dos TriTryps (EL-SAYED et al., 2005), três espécies de grande importância no ponto de vista de saúde pública (*T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major*), e com o objetivo de obter uma visão geral do genoma do *T. rangeli*, nosso grupo iniciou, em 2004, a análise do seu transcriptoma (GOLD, <http://www.genomesonline.org>). Este estudo foi baseado na geração de etiquetas de seqüências expressas (do inglês *Expressed Sequence Tags* ou EST) (SNOEIJER et al., 2004) e de etiquetas de seqüências expressas do quadro aberto de leitura (do inglês *Open Reading Frame EST* ou ORESTES) de ambas as formas evolutivas de duas cepas do parasito. Mais de 10.000 seqüências foram geradas e

têm permitido estabelecer uma base de dados confiável para estudos de genes específicos.

Durante a análise das sequências obtidas, observou-se que muitas delas apresentaram similaridade à sequências ainda não caracterizadas para este parasito, dentre as quais as DNA topoisomerases II e III. Além disso, uma grande porcentagem das EST geradas não apresentaram qualquer semelhança com sequências depositadas nos bancos de dados, podendo caracterizar genes específicos, genes desconhecidos ou ainda regiões não transcritas (SNOEIJER et al., 2004).

O encontro de diferentes DNA topoisomerases atraiu muito a atenção pelo fato de ser uma enzima ubíqua de grande importância no metabolismo dos ácidos nucléicos, que embora bem caracterizada para outros membros da Ordem Kinetoplastida (DAS et al., 2004), ainda não existem estudos a seu respeito com relação ao *T. rangeli*.

## **DNA Topoisomerases**

### Aspectos Gerais

Presentes nos mais diversos organismos, incluindo eucariotos e procariotos, as DNA topoisomerases pertencem a uma classe de enzimas heterogêneas capazes de alterar o estado topológico do DNA, catalisando mudanças conformacionais a partir da clivagem e ligação das fitas de DNA sem alterar sua sequência, atuando basicamente no número de vezes que as fitas se entrelaçam entre si (DNA duplex) e no espaço (superenovelamento) (BERGER, 1998; CHAMPOUX, 2001; DAS et al., 2004). Por conseguinte, acabam sendo fundamentais em diversos processos metabólicos, tais como: replicação, transcrição, recombinação e remodelação da cromatina (CHAMPOUX, 2001).

A partir dos diferentes mecanismos de ação envolvendo a quebra transitória de uma ou ambas as fitas da molécula de DNA, surgem respectivamente duas categorias de DNA topoisomerases: as de tipo I e as do tipo II (VOSBERG, 1985; WANG, 1996) (tabela 1). De maneira geral, a clivagem do DNA pelas topoisomerases é acompanhada pela formação de uma ligação fosfodiéster transiente entre um resíduo de tirosina específico da proteína (altamente conservado) e uma das extremidades da fita clivada. Tanto as enzimas de tipo I quanto de tipo II podem ser subdivididas em subfamílias A e B, as quais compartilham aspectos mecânicos, embora variando em suas estruturas.

Nas células, a molécula de DNA apresenta-se geralmente como uma estrutura fechada, incluindo as moléculas de DNA circulares

(plasmídios, genomas bacterianos e de alguns vírus) ou ainda, os genomas de organismos eucarióticos, onde se assume a forma de grandes alças, cujas extremidades são fixadas por macromoléculas às membranas intracelulares. Portanto, independente da situação, a molécula de DNA tende a ser impedida de girar sobre o eixo da própria hélice e, desta forma, possibilita o aparecimento de novas estruturas conformacionais.

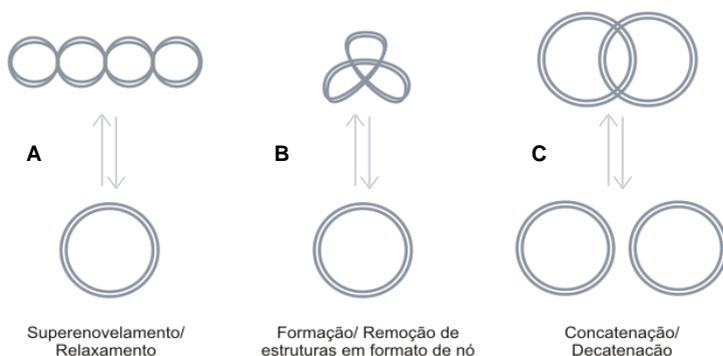
**Tabela 1:** Exemplos de DNA topoisomerases, classificadas de acordo com sua subfamília. Fonte: Wang, 2002.

| Subfamília   | DNA topoisomerases  |
|--|---|
| <b>IA</b>  | DNA topoisomerases I e III bacterianas  |
|  | DNA topoisomerase III de leveduras  |
|  | DNA topoisomerases III $\alpha$ e III $\beta$ de <i>Drosophila melanogaster</i> |
|  | DNA topoisomerases III $\alpha$ e III $\beta$ de mamíferos                      |
| <b>IB</b>  | DNA topoisomerases I eucarióticas   |
|  | DNA topoisomerase I mitocondrial de mamíferos                                   |
|  | DNA topoisomerase de poxvírus   |
| <b>IIA</b>   | DNA girase bacteriana   |
|  | DNA topoisomerase IV bacteriana   |
|  | DNA topoisomerase do fago T4  |
|  | DNA topoisomerase II de levedura  |
|  | DNA topoisomerase II de <i>Drosophila melanogaster</i>                          |
| DNA topoisomerases II $\alpha$ e II $\beta$ de mamíferos |   |
| <b>IIB</b>   | DNA topoisomerase VI de <i>Sulfolobus shibatae</i>                              |

Embora exista uma sobreposição de funções entre as diferentes enzimas existentes numa mesma célula, cada uma das DNA topoisomerases parece otimizada para conduzir seu próprio grupo de manipulações topológicas (figura 4).

Dentre os vários tipos de reações que são catalisadas pelas DNA topoisomerases está a que causa mudanças no grau de superenovelamento do DNA, isto é, esta enzima é capaz de fazer a conversão de moléculas de DNA relaxadas em moléculas superenoveladas (reação executada somente pelas topoisomerases II bacterianas), assim como realizar o relaxamento de moléculas de DNA superenoveladas para sua conformação relaxada (reação catalisada pelas topoisomerases I e II, tanto bacterianas quanto eucarióticas) (figura 4A). As DNA topoisomerases do tipo II podem também catalisar a formação e a dissolução de estruturas em forma de nó (“*knots*”) (figura 4B), bem como a concatenação e decatenação de moléculas de DNA circulares (figura 4C). As DNA topoisomerases do tipo I podem realizar as duas reações descritas

anteriormente somente em moléculas circulares de fita simples ou se a molécula de DNA de fita dupla circular possuir uma das fitas clivadas.



**Figura 4:** Reações catalisadas pelas DNA topoisomerases. (A) Reações de superenovelamento negativo ou relaxamento da moléculas de DNA. (B) Formação ou remoção de estruturas em forma de nó. (C) Reações de concatenação e decatenação. Fonte: Bakshi; Shapiro, 2003.

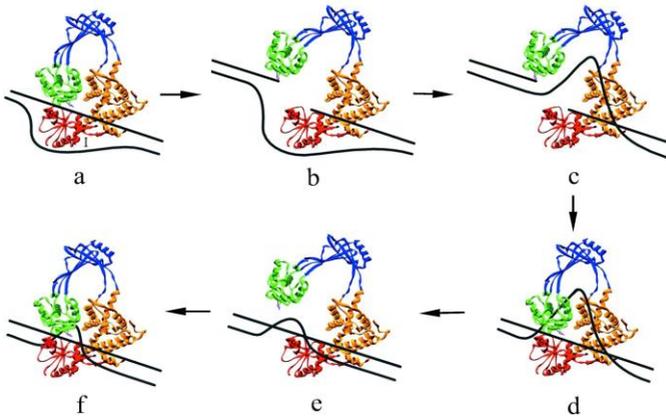
### DNA Topoisomerases do Tipo I

As enzimas de tipo I promovem a clivagem de apenas uma das fitas do DNA e consentem a passagem da outra fita por esta quebra, resultando no aumento ou na diminuição do número de giros da molécula (figura 5). Elas são divididas em 2 subfamílias: IA e IB, que diferem no tipo da ligação feita entre a enzima e o DNA. As DNA topoisomerases IA se ligam a extremidade 5' do DNA clivado, enquanto que as DNA topoisomerases IB se ligam a extremidade 3' (WANG, 1996).

### DNA Topoisomerases do Tipo IA

Todas as enzimas que representam esta subfamília (tabela 1) promovem a clivagem do DNA através da ligação fosfodiéster envolvendo a extremidade 5' da região clivada e um resíduo de tirosina específico da enzima, a partir da exposição de uma região de fita simples de DNA, que serve como substrato. Apesar de não serem dependentes de ATP, todas requerem o íon  $Mg^{2+}$  como cofator. Estas enzimas são monoméricas, com uma única exceção (a girase reversa da bactéria *Methanopyrus kandleri* heterodimérica) (KRAH et al., 1996). Normalmente, só as moléculas de DNA que contêm superenovelamento negativo são substratos para a reação que leva ao relaxamento, embora esta reação não ocorra por completo (WANG, 1998). Estas enzimas são capazes de catalisar

a formação de estruturas em forma de laços em DNA circulares de fita simples, assim como promover a remoção destas estruturas (LIU; DEPEW; WANG, 1976). Além disso, são capazes de promover a concatenação e decatenação de moléculas de DNA de fita simples circulares, assim como para as moléculas de DNA de fita dupla circulares, desde que uma das moléculas apresente uma ruptura em uma das fitas (TSE; WANG, 1980).



**Figura 5:** Representação esquemática do mecanismo de ação geral proposto para as DNA topoisomerases tipo I. A figura ilustra a clivagem de uma única fita do DNA e a passagem da segunda fita pela abertura gerada na clivagem a partir de diversas mudanças conformacionais. **(a)** mudança conformacional para o ataque nucleofílico da cadeia lateral da tirosina presente no sítio ativo em uma das fitas do DNA; **(b)** após a clivagem, a tirosina permanece covalentemente ligada ao fosfato na porção 5' (DNA topoisomerases tipo IA) ou 3' (DNA topoisomerases tipo IB); **(c)** a abertura da enzima permite a passagem da outra fita pelo espaço gerado **(d)** após a passagem ocorre a religação da fita de DNA clivada; **(e;f)** a enzima muda novamente de conformação para liberar a fita e completar o ciclo. Fonte: Champoux, 2001.

As DNA topoisomerases do tipo IA têm como função principal a prevenção do excesso de superenovelamento negativo, relaxando o DNA até que adquira uma topologia adequada para a expressão dos genes. Por outro lado, estas enzimas apresentam uma baixa atividade de relaxamento de superenovelamento positivo, e por este fato não atuam sobre o movimento da forquilha durante a replicação do DNA (CHAMPOUX, 2002).

### DNA Topoisomerases do Tipo IB

As DNA topoisomerases do tipo IB não apresentam homologia de sequência ou de estrutura com outras DNA topoisomerases, sendo funcionalmente distintas dos membros da subfamília IA. Todas as enzimas desta classe são monoméricas e podem promover relaxamento de superenovelamentos positivos e negativos por completo. Consistente com estas propriedades, essas enzimas não requerem a exposição de uma região de fita simples de DNA para realizar o relaxamento. As topoisomerases do tipo IB clivam uma das fitas do DNA e ligam-se covalentemente a extremidade 3' da fita clivada através de um resíduo de tirosina presente no sítio ativo da enzima. Diferentemente das topoisomerases do tipo IA não requerem a ligação de íons metálicos para o relaxamento do DNA (CHAMPOUX, 2002).

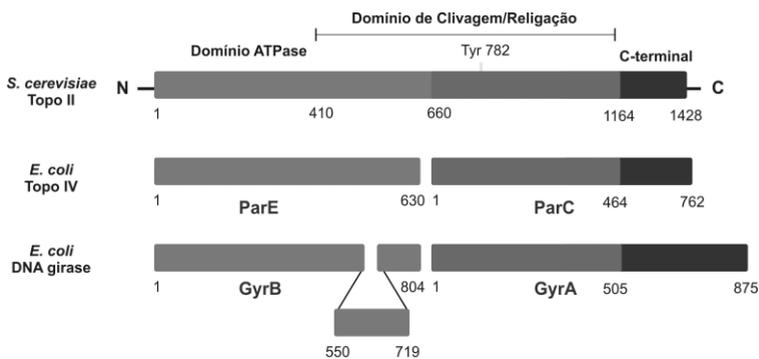
### DNA Topoisomerases do Tipo II

As DNA topoisomerases II clivam ambas as fitas do DNA duplex durante a catálise, permitindo a passagem de um segmento de DNA externo através desta quebra temporária em uma reação dependente de íons  $Mg^{2+}$  e hidrólise de ATP. O aporte energético não é necessário para a reação de clivagem ou religação, mas para o desligamento do DNA e a reciclagem da enzima (OSHEROFF; SHELTON; BRUTLAG, 1983; WANG, 1996; CHAMPOUX, 2001). As DNA topoisomerases II são compostas por mais de uma subunidade. As topoisomerases II bacterianas (DNA girase, topoisomerase IV e topoisomerase VI) são tetrâmeros formados pela associação de duas subunidades distintas, enquanto que as topoisomerases II eucarióticas e de poxyvírus (vírus vaccínia) são homodiméricas. A topoisomerase do bacteriófago T4, por sua vez, é composta de três diferentes subunidades (VOSBERG, 1985; WANG, 1996).

Entre todas as enzimas de tipo II conhecidas, a DNA girase é a única capaz de usar a energia obtida na hidrólise de ATP para introduzir superenovelamento negativo no DNA (GELLERT et al., 1976). Diferentes membros da família de tipo II podem ser distinguidos por sua relativa eficiência nos processos de relaxamento *versus* decatenação ou concatenação, sendo que tais propriedades refletem seus papéis especializados na célula.

### DNA Topoisomerases do Tipo IIA

As topoisomerases II eucarióticas originaram-se a partir da fusão das subunidades da DNA girase A e B. A homologia entre estas enzimas pode ser avaliada através do alinhamento das sequências das DNA topoisomerases do tipo IIA, em relação à DNA girase de *Escherichia coli* (figura 6). Deste alinhamento observa-se que esta subfamília de enzimas apresenta uma estrutura composta basicamente por três domínios. A subunidade B da DNA girase de *E. coli* (GyrB), responsável pela atividade ATPásica, corresponde a subunidade ParE da topoisomerase IV de *E. coli* e a metade da região amino-terminal das enzimas eucarióticas. Já a subunidade A da girase (GyrA), responsável pela atividade de clivagem e religação do DNA, apresenta similaridade com a subunidade ParC da topoisomerase IV de *E. coli* e com a porção central das enzimas eucarióticas. Com exceção de uma pequena região de 170 aminoácidos situada na região terminal de GyrB, todas as DNA topoisomerases do tipo IIA apresentam alta similaridade entre as suas sequências. Entretanto, o terceiro domínio, correspondente a porção carboxi-terminal é espécie específico e só apresenta similaridade de sequência em espécies relacionadas, basicamente restritas a primeira metade deste domínio. A região carboxi-terminal destas enzimas geralmente contém sequências de endereçamento celular, que podem ser nucleares, mitocondriais ou ainda para interação com outras proteínas (ADACHI et al., 1997; MIRSKI; GERLACH; COLE, 1999; SHAIU; HU; HSIEH, 1999).

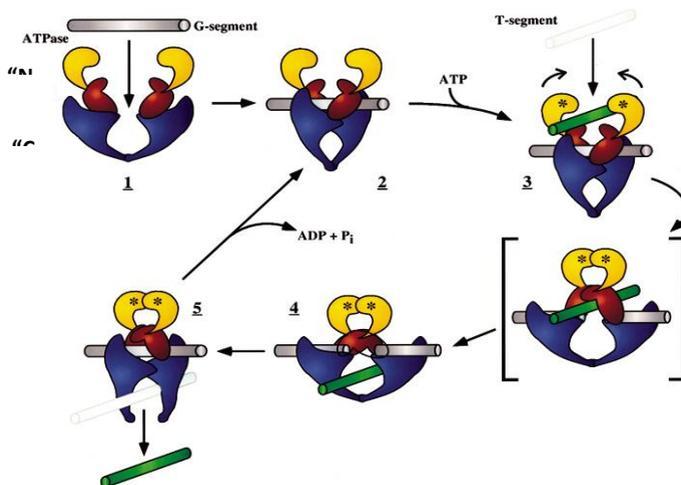


**Figura 6:** Esquema representativo de comparação entre os domínios funcionais das DNA topoisomerases IIA. Fonte: Champoux, 2001.

A região da DNA girase que envolve o segmento de fita dupla do DNA clivado, criando superenovelamento negativo, encontra-se

localizada no domínio carboxi-terminal da GyrA. Vários trabalhos comprovam que a atividade ATPásica nas topoisomerases tipo II reside no seu domínio amino-terminal tanto em GyrB (43 kDa) quanto para a topoisomerase II $\alpha$  humana (52 kDa). Esta mesma análise em seqüências de membros da Ordem Kinetoplastida demonstrou que a região correspondente aos aminoácidos 1-385 tem alto grau de similaridade com o fragmento amino-terminal da enzima humana e é responsável pela atividade ATPásica (SENGUPTA et al., 2005).

A ligação do ATP ao domínio ATPase nestas enzimas normalmente leva a dimerização deste domínio e ao fechamento da porção amino-terminal da proteína. Este movimento inicia uma série de mudanças conformacionais que envolvem posteriormente a passagem e liberação da molécula de DNA. Um diagrama com base no mecanismo de ação da DNA girase e topoisomerase II de levedura baseado em dados de microscopia eletrônica e estrutura tridimensional pode ser observado na figura 7.



**Figura 7:** Representação esquemática do mecanismo de ação proposto para as DNA topoisomerases tipo IIA. (1 e 2) A enzima se liga a um DNA dupla fita (segmento-G) na região que contém o domínio de clivagem e religação; (3) Uma segunda molécula de DNA dupla fita (segmento-T) se liga a enzima e a ligação de um ATP promove a dimerização dos domínios ATPase, que conseqüentemente levam a clivagem do segmento G e o transporte do segmento T pelo espaço gerado; (4) O segmento T fica retido no espaço oposto correspondente a porção carboxi terminal do domínio de clivagem; (5) O segmento G é religado e o segmento T é liberado a partir da mudança conformacional da enzima. Fonte: Berger, 1998.

Resumidamente, na região de contato entre as subunidades A e B, encontra-se o sítio de captura do segmento de DNA dupla fita que será clivado (segmento G). Um segundo segmento (segmento T), que pode ou não fazer parte da molécula clivada, aloja-se então na cavidade denominada “N-gate”, formada por GyrA. A interação da enzima com o DNA que lhe serve de substrato, assim como a ligação de ATP e a sua hidrólise parecem estar diretamente relacionados com mudanças conformacionais na enzima. Especificamente, a ligação de ATP em um dos domínios com atividade ATPase parece levar a dimerização deste domínio, e, conseqüentemente à clivagem do segmento G. As duas fitas do segmento G são clivadas e ocorre a passagem do segundo segmento de dupla fita de DNA (segmento T). Uma vez que o segmento T é transportado, ocorre a religação do segmento G, o que leva a abertura do “C-gate”, facilitando assim a liberação do segmento T da enzima. O ciclo se completa com o rápido fechamento do “C-gate”, e a liberação dos produtos de hidrólise de ATP promove a re-abertura do “N-gate”, o que propicia um novo ciclo de clivagem e transporte de DNA pela topoisomerase.

#### DNA topoisomerases do tipo IIB

O protótipo das enzimas pertencentes à subfamília do tipo IIB é a topoisomerase VI de *Sulfolobus shibatae*, sendo que enzimas similares são encontradas em todos os outros microrganismos do Reino Archea até agora sequenciados (BERGERAT et al., 1997). Da mesma forma que as topoisomerases II bacterianas, estas enzimas são heterotetrâmeros compostos por duas subunidades A e B. Esta enzima é capaz de relaxar o DNA superenovelado positivamente e negativamente, concatenar e decatenar moléculas de DNA circulares na presença de ATP e cátions divalentes.

As seqüências de aminoácidos das duas subunidades da DNA Topoisomerase VI compartilham apenas pequena homologia com as topoisomerases do tipo IIA, contendo os domínios funcionais de hidrólise de ATP, clivagem e religação (BERGERAT et al., 1997). A estrutura geral da subunidade A da topo VI também é distinta de todas as enzimas do tipo IIA e apresenta homologia com a proteína Spo11 de *Saccharomyces cerevisiae*, envolvida na clivagem da dupla fita de DNA durante o processo de recombinação que ocorre na meiose (KEENEY; GIROUX; KLECKNER, 1997). A subunidade B apresenta um domínio de aproximadamente 200 aminoácidos na região amino-terminal homólogo a

família de proteínas chamadas de ATPases tipo-GHKL (BERGERAT et al., 1997; DUTTA; INOUE, 2000).

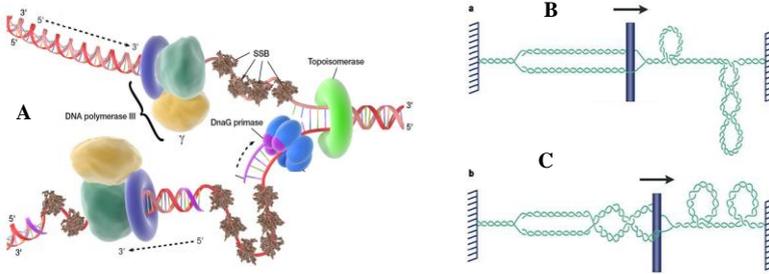
O mecanismo de ação das enzimas do tipo IIB é pouco conhecido, mas sabe-se que uma leve rotação das regiões de ligação e clivagem, promove a justaposição do sítio ativo contendo os pares de resíduos de tirosina com o DNA a ser clivado. A característica mais intrigante destas enzimas é a ausência de uma cavidade equivalente ao espaço descrito para acomodar o segmento que foi transportado nas enzimas de tipo IIA. A relação espacial entre a subunidade B /ATPase e a subunidade A, ainda é desconhecida, mas parece que o domínio B é capaz não só de capturar o DNA a ser clivado, como também de formar uma ponte que mantém a subunidade A ligada (DUTTA; INOUE, 2000).

### **O Papel das DNA Topoisomerases em Processos Biológicos**

#### **Replicação**

As alterações topológicas da molécula de DNA geradas pelo avanço da maquinaria de replicação e o papel das diferentes DNA topoisomerases neste processo dependem da maneira com que a maquinaria se movimenta ao longo do DNA (figura 8A) (LIU; WANG, 1987). A replicação é um dos processos mais conhecidos que geram superenovelamento no DNA. Durante a replicação semiconservativa, se a maquinaria de replicação é impedida de girar ao redor do DNA, um superenovelamento positivo é gerado à frente da forquilha de replicação, enquanto atrás, a forquilha torna-se progressivamente maior (figura 8B) (COOK, 1999). As DNA topoisomerases do tipo II e do tipo IB têm um papel fundamental na remoção deste superenovelamento positivo à frente da maquinaria de replicação devido as suas eficientes atividades de relaxamento (WANG, 1996).

Se for considerado que a maquinaria de replicação pode girar ao redor do eixo do DNA, o superenovelamento positivo gerado a frente da forquilha de replicação pode ser redistribuído para a região atrás desta, levando ao entrelaçamento do par de fitas duplicadas e/ou um superenovelamento positivo nesta região (figura 8C) (WANG, 2002). Neste modelo de replicação, a DNA topoisomerase II também pode agir atrás da forquilha de replicação removendo o entrelaçamento das duplas fitas recém sintetizadas (POSTOW et al., 2001). As topoisomerases do tipo IA podem remover o superenovelamento positivo somente se houver uma região de fita simples clivada, e por este motivo acabam sendo menos necessárias que as topoisomerases do tipo II e IB no processo de alongação do DNA na replicação (WANG, 1996).



**Figura 8:** Atuação das DNA topoisomerases na replicação. (A) Esquema geral da forquilha de replicação incluindo a maquinaria de replicação envolvida no processo. (B/C) Problemas topológicos associados com a elongação da forquilha de replicação. A barra em azul representa a maquinaria de replicação. Fonte: Champoux, 2001.

Estudos em vários organismos suportam as proposições acima. Em *S. cerevisiae*, tanto a topoisomerase do tipo IB quanto do tipo IIA podem promover a etapa de elongação na replicação (KIM; WANG, 1989). Em *Drosophila melanogaster*, a topoisomerase do tipo IB é essencial em todas as etapas do desenvolvimento que estão comprometidas com a proliferação celular (ZHANG et al., 2000). A DNA topoisomerase III de *E. coli* (subfamília IA) pode promover a replicação plasmidial *in vitro*, mas a capacidade de suportar a elongação da cadeia de DNA na replicação é incerta.

### Transcrição

No processo de transcrição diversos eventos podem impedir a maquinaria de transcrição girar ao redor do DNA, como por exemplo: a co-tradução e inserção do peptídeo nascente na membrana celular em procariotos (LYNCH; WANG, 1993). Deste modo, a transcrição em si gera superenovelamento positivo à frente e negativo atrás em relação ao sítio de translocação da RNA polimerase (LIU; WANG, 1987). Em *E. coli*, a DNA girase, é a principal responsável pela remoção do superenovelamento positivo enquanto a topoisomerase I é responsável pela remoção do superenovelamento negativo (WANG, 1996). A suposição de que a DNA girase e a topoisomerase IA regulam o superenovelamento *in vivo* é apoiada na observação de que mutantes *TopA* de *E. coli* não são viáveis a menos que adquiram mutações compensatórias, algumas das quais reduzem o nível de expressão da girase (DINARDO et al., 1982).

Em eucariotos a mobilidade da maquinaria de transcrição pode ser reduzida por sua associação com a membrana nuclear (COOK, 1999) ou

pelo evento de transcrição com tradução simultânea no núcleo (IBORRA; JACKSON; COOK, 2001).

Em leveduras a inativação da topoisomerase I não tem grande influência sobre o crescimento celular podendo haver neste caso um efeito compensatório pela topoisomerase II. Porém, a simultânea inativação das DNA topoisomerases I e II leva a uma grande redução na síntese RNA ribossomal e uma moderada redução na síntese do mRNA (UEMURA; YANAGIDA, 1984; BRILL et al., 1987). Em cultura de linfócitos B, a transcrição de diversos genes pela polimerase II é sensível à inibição da topoisomerase (COLLINS; WEBER; LEVENS, 2001). Uma ligação direta entre a atividade das DNA topoisomerases e o processo de transcrição é difícil de ser estabelecida *in vivo* devido às múltiplas funções da enzima e da complexidade experimental do sistema. Entretanto, experimentos de transcrição *in vitro*, utilizando a holoenzima RNA polimerase II purificada e a cromatina como molde, mostrou que a transcrição é dependente da atividade da topoisomerase II uma vez que sua inibição pelo etoposídeo apresentava efeito negativo direto sobre a transcrição (MONDAL; PARVIN, 2001). Em contraste, a inibição da topoisomerase II não teve efeito na transcrição quando um DNA molde livre de histonas e proteínas acessórias foi utilizado. Este resultado sugere que a topoisomerase II em associação com outros fatores de transcrição modifica a topologia do DNA possibilitando a transcrição (MONDAL; PARVIN, 2001).

### Recombinação

Estudos em *E. coli* demonstraram que as topoisomerases IA em bactérias podem estar envolvidas no processo de recombinação mediado por RecA, atuando na resolução específica de intermediários da recombinação antes da segregação dos cromossomos (ZHU; PONGPECH; DIGATE, 2001). Mutantes para a topoisomerase III de *S. cerevisiae* são viáveis, embora apresentem um complexo fenótipo que inclui lento crescimento, redução na viabilidade, hiper-recombinação entre sequências repetitivas, hiper-sensibilidade a agentes causadores de danos ao DNA e incapacidade de esporular (WALLIS et al., 1989). Em contraste, em *Schizosaccharomyces pombe* esta mesma proteína é essencial para viabilidade, sendo que seus mutantes são incapazes de segregar adequadamente as cromátides irmãs durante a mitose (GOODWIN et al., 1999). Interessantemente, mutações nos genes da família ReaQ, SGS1 ou RQH1, encontrados em *S. cerevisiae* e *S. pombe*, podem suprimir os defeitos causados pela falta da topoisomerase III (MAFTAHİ et al., 1999).

Uma interpretação para essa interação genética, é que as RecQ helicases atuam antes da topoisomerase III em uma mesma via bioquímica e produzem uma estrutura de DNA que requer uma topoisomerase de tipo IA para sua resolução (WU; HICKSON, 2001). Em *S. cerevisiae*, SGS1p e topoisomerasas III também interagem fisicamente, sugerindo de recrutamento para seu sítio de ação (BENNETT; WANG, 2001; FRICKE; KALIRAMAN; BRILL, 2001). Outra topoisomerase envolvida no processo de recombinação é a de tipo II. Estudos em *S. cerevisiae* apontaram que esta enzima se liga covalentemente a extremidade 5' da dupla fita de DNA quebrada nos sítios de alta frequência (“*hot-spots*”) de recombinação durante a meiose (KEENEY, 2001).

### **Inibidores de DNA topoisomerasas**

Considerando todos estes papéis das topoisomerasas no metabolismo do DNA, estas enzimas são importantes alvos bactericidas e de fármacos antitumorais (SCHNEIDER; HSIANG; LIU, 1990; ZHANG; D'ARPA; LIU, 1990; SCHNEIDER; TRAVERS; MUSKHELISHVILI, 2000). Os inibidores de DNA topoisomerasas de maneira geral podem ser divididos em duas classes. Os inibidores da primeira classe atuam através da estabilização do complexo covalente enzima - DNA, enquanto que os inibidores da segunda classe interferem diretamente com as funções catalíticas sem formar complexos covalentes (TOPCU, 2001).

Com relação aos organismos procariotos, vários antibióticos apresentam especificidade para a subunidade GyrA ou para a subunidade GyrB da DNA girase (CHAMPOUX, 2001). A subunidade GyrA é o alvo das quinolonas, como o ácido nalidíxico e seus derivados, entre eles a ofloxacina, a norfloxacina, a perfloxacina e a ciprofloxacina. Já a subunidade GyrB, é inibida pelas coumarinas, sendo que a novobiocina está entre as mais potentes. Esses dois grupos de antibióticos têm diferentes mecanismos de ação. Acredita-se que a novobiocina, embora sem similaridade estrutural com o ATP, compete com este pelo sítio de ligação na enzima. A novobiocina bloqueia o acesso do ATP à enzima sem compartilhar o sítio de ligação ou alterar a conformação da enzima diminuindo assim a afinidade por este cofator (COZZARELLI, 1980). O ácido nalidíxico, por sua vez, bloqueia as atividades envolvidas na reação de quebra e religação das fitas do DNA, que é mediada pela subunidade A.

As consequências do tratamento de células bacterianas com esses agentes são complexas e incluem vários efeitos. O efeito mais marcante é

sobre o superenovelamento do DNA e portanto, em última instância, sobre a própria expressão gênica.

Os inibidores de topoisomerases II eucarióticas também incluem agentes que se ligam, mas não se intercalam ao DNA e aqueles que são fortes agentes intercalantes do DNA. O primeiro grupo é representado pelas as epipodofilotoxinas que incluem o etoposídeo e o tenoposídeo. Já, o segundo grupo, é composto por fármacos como a elipticina, a aminoacridina e adriamicina (LIU et al., 1989). Todos esses inibidores afetam a DNA topoisomerase II de uma maneira específica, formando complexos com o DNA e a enzima durante a reação de clivagem do DNA. Muitos deles, como a adriamicina, a actinomicina D e o etoposídeo, são usados clinicamente para tratar diversos tipos de câncer, devido ao alto nível de DNA topoisomerases em tumores com alta taxa de proliferação.

Pelo fato de estar presente em altos níveis em células de rápida proliferação (CHEESMAN et al., 1994), do mesmo modo que a topoisomerase II é um importante alvo terapêutico para vários antibióticos e antitumorais, as DNA topoisomerases II eucarióticas têm emergido como um alvo ideal para drogas antiparasitárias.

Os mecanismos que geram os efeitos citotóxicos causados pelos inibidores de topoisomerase ainda não estão definidos. Contudo, a interferência no metabolismo do DNA parece ser uma das principais causas da morte celular. A formação do complexo droga -DNA - enzima pode bloquear o movimento da forquilha de replicação, inibindo a síntese e levando a fragmentação do DNA (D'ARPA; BEARDMORE; LIU, 1990; ZHANG; D'ARPA; LIU, 1990).

### **DNA Topoisomerases na Ordem Kinetoplastida**

Em geral, os organismos da Ordem Kinetoplastida são classificados filogeneticamente como eucariotos ancestrais que possuem um DNA diferenciado e não usual tanto no núcleo quanto na sua única mitocôndria, apresentando algumas características peculiares, tais como: seus cromossomos não são condensados durante a mitose, apresentam um único flagelo com axonema, uma complexa estrutura paraxial, mitocôndria única e ramificada contendo uma região alargada com acúmulo de DNA, chamada de cinetoplasto e microtúbulos subpeliculares associados à membrana plasmática (DE SOUZA; MOTTA, 1999).

Dentre as diversas espécies que compõem esta ordem, vários membros são agentes causadores de doenças ao homem, animais e plantas. As doenças mais conhecidas são provocadas por protozoários dos

gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*, dentre as quais pode-se citar a doença de Chagas, a doença do sono e as leishmanioses. Os fármacos atualmente disponíveis para o tratamento das leishmanioses e doenças causadas por *Trypanosoma* spp. são inadequados devido a baixa eficácia e alta toxicidade, além do aumento na prevalência de parasitas resistentes a estes fármacos (FAIRLAMB, 2003). Neste sentido, o desenvolvimento de fármacos antiparasitários modernos está relacionado ao desenho racional de substâncias dirigidas contra alvos específicos (SENGUPTA et al., 2005).

Considerando a existência de fármacos antitopoisomerases com uso clínico aprovado e a potencialidade destas enzimas como alvos terapêuticos nos mais variados grupos patogênicos, o estudo das topoisomerases é de especial interesse no caso dos protozoários pertencentes à Ordem Kinetoplastida, pois em adição a seu papel no metabolismo do DNA nuclear, estas enzimas também têm papel importante na replicação e organização do DNA do cinetoplasto que está ausente em organismos eucariotos superiores (HANKE et al., 2003).

O DNA mitocondrial do cinetoplasto (kDNA) é uma rede complexa de moléculas de DNA circular concatenadas presente na matriz da única mitocôndria da célula, e corresponde a aproximadamente 30% do DNA total dos tripanosomatídeos (figura 9). Este DNA é formado por dois tipos de moléculas: os minicírculos (com tamanho entre 0,5 a 2,5 Kb) e maxicírculos (com tamanho variando entre 20 a 38 Kb). Cerca de 10.000 minicírculos e 50 maxicírculos encontram-se concatenados, e compõem esta extensa rede de kDNA. Os maxicírculos possuem papel semelhante ao DNA mitocondrial de mamíferos e codificam RNA ribossomais e proteínas mitocondriais. Enquanto isso, os minicírculos estão envolvidos na formação de pequenos RNA guias que controlam o processo de edição do mRNA (SIMPSON et al., 2000). Dentre as espécies, os minicírculos são altamente heterogêneos quanto à sequência de nucleotídeos, embora o tamanho destes círculos, dentro da rede de kDNA, seja praticamente idêntico (SHAPIRO; ENGLUND, 1995). Dentre as exceções a esta regra o *T. rangeli* e *Crithidia oncopelti* apresentam classes de minicírculos com diferentes tamanhos (PESTOV et al., 1990; VALLEJO et al., 1994). Estudos em *C. fasciculata* demonstraram que cada minicírculo na rede tem uma média de três moléculas concatenadas. Entretanto, o número de moléculas ligadas, chamado de valência dos minicírculos, pode variar de acordo com a espécie e a fase do ciclo celular (CHEN; ENGLUND; COZZARELLI, 1995; CHEN et al., 1995).



**Figura 9:** DNA mitocondrial do cinetoplasto (kDNA). (A) Forma tripomastigota sanguínea de *Trypanosoma cruzi* corada com Giemsa. (B) Microfotografia do cinetoplasto. (C) Detalhe da rede complexa de moléculas de DNA circular concatenadas. Fontes: Lindsay, 2008.

Estruturalmente, o arranjo do kDNA também varia entre os diferentes protozoários desta família. Nas formas amastigota e epimastigota de *T. cruzi*, assim como em epimastigotas de *T. rangeli* o cinetoplasto se apresenta como um bastão na matriz da única mitocôndria, com o kDNA bastante compactado. Já em formas tripomastigotas destas duas espécies a rede de kDNA torna-se menos compacta e a forma em bastão dá lugar a uma forma arredondada (MEIRELLES et al., 2005). Esta rede em todos os casos está fisicamente ligada ao corpo basal do flagelo por um sistema de filamentos transmembrana chamado de complexo de ligação tripartido - TAC (do inglês *Tripartite Attachment Complex*) (OGBADOYI; ROBINSON; GULL, 2003).

Da mesma forma que o cinetoplasto é uma estrutura totalmente diferenciada, sua replicação também é um processo extremamente complexo. A replicação do kDNA acontece praticamente de forma coordenada com a replicação do DNA nuclear em um processo complexo restrito à fase S do ciclo celular (SHAPIRO; ENGLUND, 1995; HINES; RAY, 1997).

No modelo atual, cada minicírculo covalentemente ligado deve ser individualmente liberado da região central da rede de kDNA. Uma vez livres, eles migram para uma região entre o disco do kDNA e a membrana mitocondrial, próxima ao corpo basal do flagelo. Nesta região, conhecida como zona cinetoflagelar, concentram-se as enzimas necessárias para a replicação do kDNA. Os novos minicírculos sintetizados são então separados na zona cinetoflagelar e migram para um dos dois complexos protéicos situados em pólos opostos da periferia do cinetoplasto, chamados de sítios antipodais. Pelo menos um intervalo em uma das fitas do DNA permanece após o processo de replicação. Esses intervalos permitem distinguir os minicírculos já replicados daqueles que ainda não sofreram replicação, de modo que cada minicírculo seja

replicado somente uma vez por ciclo celular. Estes minicírculos são reintroduzidos na periferia da rede adjacente aos sítios antipodais, e após todos minicírculos terem sido replicados e reintroduzidos os intervalos são reparados. Um modelo sugere que uma rotação do cinetoplasto durante a replicação permite que os novos círculos se distribuam uniformemente pela rede de kDNA (SHLOMAI, 1994; SHAPIRO; ENGLUND, 1995).

Os maxicírculos, que formam um concatenado independente dentro da matriz de minicírculos, permanecem ligados à rede durante o processo replicativo e são sintetizados por um mecanismo conhecido como ciclo-rolante (SHAPIRO, 1993). Durante a replicação, a rede tende a ficar alongada e quando o número de minicírculos é dobrado a rede se divide em duas. O sistema de filamentos TAC é responsável pela segregação das duas redes, através da movimentação do corpo basal que puxa a rede de kDNA para as células filhas (OGBADOYI; ROBINSON; GULL, 2003).

Uma vez que diversas interconversões topológicas do kDNA são necessárias para sua replicação e segregação, incluindo a capacidade de liberação e reincorporação das moléculas de DNA, fica evidente a ação indispensável das DNA topoisomerases e sobretudo das enzimas de tipo II, em vários passos desta via (ENGLUND; MARINI, 1980; SHAPIRO, 1993). Como não existem evidências que enzimas de tipo IIB sejam funcionais em células de mamíferos ou de parasitos da Ordem Kinetoplastida, nestes grupos as enzimas de tipo IIA são referidas apenas como de tipo II (KULIKOWICZ; SHAPIRO, 2006). Além da atividade catalítica, a DNA topoisomerase II parece ter também um papel estrutural de ancoragem dos maxicírculos à membrana mitocondrial e na movimentação dos maxicírculos durante a replicação (SHAPIRO; SHOWALTER, 1994). Essa importância também é ressaltada no trabalho de Wang e Englund (2001), em *T. brucei*, no qual a inibição de uma topoisomerase II via RNA de interferência determinou uma perda progressiva do DNA mitocondrial, observando-se o desaparecimento gradual do cinetoplasto, relacionado à conexão ineficiente dos minicírculos replicados.

As DNA topoisomerases de tipo II mitocondriais têm sido descritas em muitos tripanosomatídeos (DAS et al., 2004) e os genes que codificam estas enzimas podem ser encontrados nos bancos de dados de genoma dos organismos já sequenciados. Investigações específicas destas enzimas foram apresentadas para *T. brucei* (STRAUSS; WANG, 1990), *C. fasciculata* (PACION et al., 1992), *T. cruzi* (FRAGOSO; GOLDENBERG, 1992), *Leishmania donovani* (DAS et al., 2001), *L. infantum* (HANKE et al., 2003) e

*Blastocrithidia culicis* (LOURENCO et al., 2006), apresentando grande similaridade entre eles. No entanto, a exata localização celular destas enzimas é extremamente confusa com relação a sua ocorrência predominante no cinetoplasto, com alguns casos de ocorrência no somente no núcleo (FRAGOSO et al., 1998) ou em ambos os locais (GAZIOVA; LUKES, 2003), acentuando as dúvidas quanto a existência de um ou dois genes responsáveis pela atividade nestes dois locais (NENORTAS; BODLEY; SHAPIRO, 1998).

Em células de mamíferos as enzimas de tipo II são representadas por duas isoformas, topoisomerase II $\alpha$  e II $\beta$ , as quais se localizam no núcleo e possuem papel na mitose e/ou meiose. A atividade de topoisomerase II no genoma mitocondrial de células de mamíferos tem sido descrita só recentemente e parece ser uma forma truncada de uma topoisomerase II $\beta$ . Já, em tripanosomatídeos a situação é oposta, havendo uma topoisomerase II mitocondrial aparentemente bem conhecida, e muito pouco sobre uma atividade nuclear. Em 2006, foram descritos por KULIKOWICZ e SHAPIRO (2006) dois novos genes para DNA topoisomerase II em *T. brucei*, além do mitocondrial já bem caracterizado (*TbrTop2mt*) (STRAUSS; WANG, 1990), sendo um de ação exclusivamente nuclear (*TbrTop2 $\alpha$* ) e o outro evidenciado com um pseudogene (*TbrTop2 $\beta$* ).

Neste trabalho, foi realizada uma busca por ortólogos destes genes no genoma de outras espécies relacionadas e verificou-se pelo menos um gene relacionado em *L. major* e em *T. cruzi*. Assim, um clado com enzimas de membros da Ordem Kinetoplastida com alta similaridade a outras enzimas eucarióticas, e sabidamente nucleares, foi formado em análises filogenéticas, reforçando os resultados apresentados consistentes com uma única enzima dominante em cada compartimento (KULIKOWICZ; SHAPIRO, 2006). Ainda assim, não se pode excluir a interpolação entre as atividades nuclear e mitocondrial, pelo fato de que inúmeros trabalhos apresentam genes do clado mitocondrial com localização nuclear, como no caso do *T. cruzi* (FRAGOSO et al., 1998).

Neste sentido, uma melhor compreensão sobre a ocorrência destas isoformas em tripanosomatídeos é fundamental para o esclarecimento do mecanismo funcional característico das DNA topoisomerasas II de parasitos da Ordem Kinetoplastida, sobretudo em função desta enzima ser um importante alvo para drogas (SENGUPTA et al., 2005).

## OBJETIVOS

### Objetivo Geral:

O objetivo primordial do presente estudo foi caracterizar os genes que codificam as DNA topoisomerasas II (*TrTop2mt* e *TrTop2a*) de *Trypanosoma rangeli* e investigar seus papéis durante o crescimento e diferenciação celular do parasito.

### Objetivos Específicos:

- Amplificar, clonar e obter a sequência completa dos genes das DNA topoisomerasas II de *T. rangeli*;
- Realizar a comparação intra e interespecífica das sequências gênicas obtidas;
- Determinar, através de *Southern blot*, o número de cópias dos genes das DNA topoisomerasas II no genoma do *T. rangeli*;
- Realizar a expressão heteróloga de fragmentos protéticos das DNA topoisomerasas II de *T. rangeli* e purificar os produtos de expressão;
- Produzir antissoros policlonais e/ou monoclonais dirigidos às DNA topoisomerasas II de *T. rangeli*;
- Realizar o estudo cinético da expressão e da citolocalização das DNA topoisomerasas II em *T. rangeli*, através de ensaios de *western blot* e imunofluorescência indireta;
- Detectar e caracterizar as DNA topoisomerasas II de *T. rangeli* por ensaios de eletroforese bidimensional (2D) e espectrometria de massa;
- Determinar o efeito do inibidor de DNA topoisomerasas novobiocina sobre o crescimento e o processo de diferenciação do *T. rangeli*;
- Investigar o papel de diferentes marcadores biológicos no processo de diferenciação celular em *T. rangeli*;

**CAPÍTULO 1**  
**Caracterização molecular das DNA topoisomerases II de**  
*Trypanosoma rangeli*

## 1.1 JUSTIFICATIVA

O *T. rangeli* e o *T. cruzi* são as duas espécies do gênero *Trypanosoma* que infectam humanos nas Américas Central e do Sul (STEVENS et al., 2001). Estes parasitos apresentam sobreposição geográfica comprovada, compartilham hospedeiros, bem como apresentam reatividade sorológica cruzada. Desta forma, o *T. rangeli* possui elevada relevância epidemiológica (GRISARD et al., 1999), podendo levar a um diagnóstico equivocado com elevado custo social e econômico.

Estudos acerca dos diferentes aspectos da biologia do *T. rangeli* se justificam não só pela íntima relação com o *T. cruzi*, mas também para a geração de dados do próprio parasito, o qual ainda é muito pouco estudado. Além disso, a utilização em estudos funcionais pode fazer do *T. rangeli* um modelo interessante dentro do grupo evolutivo que pertence, incluindo as interações parasito-hospedeiro e a investigação de potenciais alvos antiparasitários.

No projeto transcriptoma do *T. rangeli* foram geradas milhares de sequências de formas epimastigotas e tripomastigotas de duas cepas do parasito (SC-58 e Choachí). Algumas sequências cuja avaliação funcional é importante para estudos relacionados não só ao *T. rangeli*, mas para as espécies relacionadas filogeneticamente, foram encontradas dentre o rol de genes expressos nas diferentes formas evolutivas deste parasito (GRISARD et al., 2010, submetido ao Molecular Biochemical Parasitology). Dentre estas, algumas apresentaram similaridade com as DNA topoisomerases II e III.

O encontro de diferentes DNA topoisomerases atraiu muito a atenção pelo fato de ser uma enzima de importância no metabolismo dos ácidos nucleicos, que embora bem caracterizada para outros membros da Ordem Kinetoplastida (DAS et al., 2004), ainda não existem estudos com relação ao *T. rangeli*.

Além disso, a presença da DNA topoisomerase III (tipo I) e duas distintas DNA topoisomerases II (tipo II), ressaltam a necessidade de maiores investigações para uma melhor compreensão sobre a ocorrência destas enzimas e suas diferentes isoformas em tripanosomatídeos. O esclarecimento do mecanismo de ação característico das DNA topoisomerases de parasitos da Ordem Kinetoplastida é fundamental, sobretudo em função desta enzima ser um potencial alvo para o desenvolvimento de novos fármacos terapêuticos. Embora inúmeros trabalhos envolvendo topoisomerases e parasitos possam ser encontrados na literatura, eles abordam pontos específicos, trazendo na maioria das

vezes resultados bastante controversos. Além disso, os estudos envolvendo as DNA topoisomerasas em parasitos também encontram algumas dificuldades como o baixo nível de expressão destas enzimas e a inexistência de um modelo tridimensional para as enzimas deste grupo (DAS et al., 2004).

Devido a proximidade taxonômica do *T. rangeli* às importantes espécies da família, a sua característica não patogênica para o hospedeiro vertebrado, além da possibilidade de manuseio seguro de grande quantidade de biomassa em grandes volumes de cultura e o estabelecido protocolo para a diferenciação *in vitro*, esta espécie pode servir como modelo no estudo das topoisomerasas de tripanosomatídeos. Desta forma, aliado a possibilidade de estudo comparativo com os seus ortólogos descritos na literatura, o presente estudo visa utilizar diferentes abordagens para caracterizar os genes das DNA topoisomerasas destes parasitos e determinar os níveis e os locais de expressão destes genes nas distintas formas do ciclo vital do *T. rangeli*, através de estudos genômicos e funcionais.

## 1.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 1.2.1 Parasitos

Foram utilizadas formas epimastigotas e tripomastigotas de duas diferentes cepas de *T. rangeli*: cepa SC-58, isolada de *Echimys dasytrix* capturado na Ilha de Santa Catarina (STEINDEL et al., 1991), e Choachí, isolada de glândulas salivares de *R. prolixus* naturalmente infectado capturado na Colômbia (SCHOTTELIUS, 1987). Previamente ao estudo, as cepas de *T. rangeli* foram submetidas a passagens cíclicas camundongo-triatomíneo-camundongo.

Os epimastigotas de *T. rangeli* e da cepa Y de *T. cruzi* foram cultivados a 27°C através de repiques semanais em meio LIT (do inglês *Liver Infusion Tryptose*), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 50 unidades/ml de penicilina e 50 µg/ml de estreptomicina (Cultilab, Campinas). Formas promastigotas de *L. amazonensis* cepa 575 foram cultivadas em meio Schneider (Sigma-Aldrich, Saint Louis) suplementado com 10% de SBF a 27°C. Todas as cepas utilizadas encontram-se depositadas no criobanco do Laboratório de Protozoologia (MIP/CCB/UFSC).

### 1.2.2 Diferenciação celular *in vitro*

Formas tripomastigotas de cultura de *T. rangeli* foram obtidas a partir de algumas modificações no protocolo descrito por KOERICH e colaboradores (2002). Inicialmente,  $12 \times 10^7$  epimastigotas em fase exponencial de crescimento em meio LIT foram lavados duas vezes com PBS 1X (Tampão salina fosfato, pH 7,4) e transferidos para garrafas de cultura celular de 25 cm<sup>2</sup> contendo 15 ml de meio DMEM pH 8,0 (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Sigma-Aldrich, Saint Louis) (1 g/l glicose, 6 mM L-glutamina e 5% SBF). O processo de diferenciação foi acompanhado através da quantificação dos parasitos por contagem direta em câmara de Neubauer e da visualização em microscópio óptico após a coloração dos parasitos com Giemsa (Merck, Darmstadt). Os tripomastigotas foram obtidos entre sétimo e oitavo dia de cultivo, sendo coletados por centrifugação quando taxas maiores que 95% de tripomastigotas foram encontradas.

### 1.2.3 Isolamento do DNA total de *T. rangeli*

Formas epimastigotas foram cultivadas em meio LIT até a densidade de  $3 \times 10^7$  células/ml, sendo coletadas ( $1 \times 10^{10}$ ) por

centrifugação a 8.000 x g por 10 minutos a 4°C e, posteriormente, lavados duas vezes por centrifugação (8.000 x g por 10 minutos a 4°C) em PBS 1X. As células precipitadas foram adicionadas de 20 ml de tampão de lise hipotônico (10 mM Tris-HCl pH 7,6; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM NaCl; 5 mM β-mercaptoetanol) e rapidamente lisadas com a adição do detergente Nonidet-40 (NP-40) (Sigma-Aldrich, Saint Louis) na concentração final de 0,5% sob agitação. A lise celular foi monitorada em microscópio óptico e interrompida pela adição da sacarose em tampão de lise hipotônico na concentração final de 250 mM. Os núcleos celulares foram parcialmente purificados através de três ciclos de centrifugação a 800 x g por 10 minutos a 4°C. Essa fração foi então tratada com 10 µg/ml de RNase A livre de DNase I, durante duas horas a 37°C e posteriormente, com proteinase-K 100 µg/ml (Sigma-Aldrich, Saint Louis) por 12 horas em tampão de lise de núcleo (100 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,5% SDS; 10 mM Tris-HCl, pH 7,6). O DNA foi então extraído pelo método de fenol/clorofórmio e dialisado três vezes em TE (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA).

#### **1.2.4 Isolamento do RNA total de *T. rangeli***

Para a extração do RNA total, 5 x 10<sup>8</sup> parasitos foram homogeneizados vigorosamente em 1 ml do reagente Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad) e nele mantidos por cinco minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 200 µl de clorofórmio 98% (Merck, Darmstadt), sendo as amostras agitadas e centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos a temperatura ambiente. A fase aquosa resultante foi transferida para um novo tubo onde foi adicionado 500 µl de isopropanol (Merck, Darmstadt). As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000 x g, sendo então o sobrenadante descartado e o sedimento lavado com 1 ml de etanol 75% a partir de centrifugação a 7.500 x g por cinco minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado contendo o RNA total foi seco, invertendo-se os tubos sobre papel por aproximadamente 10 minutos. O RNA foi então adicionado de 200 µl de água ultra pura livre de RNases. Todas as etapas de incubação e manipulação foram realizadas em gelo a fim de evitar a degradação do RNA.

Para a obtenção de materiais e soluções livres de RNases, os mesmos foram tratados com água contendo 0,1% de dietilpirocarbonato (DEPc) por 30 minutos, sendo posteriormente autoclavados para esterilização e inativação do DEPc.

### 1.2.5 Dosagem do DNA e RNA

As amostras de DNA e RNA obtidas foram dosadas e avaliadas quanto a sua pureza em um espectrofotômetro BioPhotometer® (Eppendorf, Hamburg) observando-se a absorbância a 260 e 280 nm, além das relações 260/280 nm e 260/230 nm. Além disso, as amostras de DNA extraídas foram visualizadas em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio (1 µg/ml) para comparação com padrões de DNA de concentração conhecida.

### 1.2.6 Amplificação e clonagem dos fragmentos gênicos das DNA topoisomerasas II de *T. rangeli*

Os ácidos nucléicos extraídos foram utilizados como moldes para amplificar os genes das DNA topoisomerasas II de *T. rangeli* através de PCR e RT-PCR.

Para tal, foram testados distintos iniciadores, incluindo alguns já descritos na literatura, além de novos iniciadores desenhados a partir de regiões conservadas, detectadas por alinhamentos dos genes homólogos de diferentes espécies de tripanosomatídeos (tabela 1.1).

Estes iniciados foram combinados em pares em reações de PCR contendo: 50 ng do DNA total de *T. rangeli*, 10 pmol de cada um dos dois iniciadores, 200 µM de dNTP, 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad) em seu tampão apropriado. As reações iniciaram-se com uma etapa de desnaturação do DNA a 94°C durante três minutos. Subsequentemente foram realizados 35 ciclos com as etapas de desnaturação (92°C por 30 segundos), ligação dos iniciadores a sequência alvo (54°C-60°C por 30 segundos) e alongamento da cadeia de DNA pela polimerase (72°C por 1-3 minutos), sendo estes passos realizados em um termociclador Mastercycler® Gradient (Eppendorf, Hamburg).

Alguns iniciadores descritos foram utilizados em reações de RT-PCR afim de obter o fragmento necessário a partir do RNA transcrito. Para isto, amostras de RNA total foram sujeitas à transcrição reversa a 37°C por 1 hora. Cada reação ocorreu na presença de 60 unidades da enzima transcriptase reversa SuperScript II® (Invitrogen, Carlsbad), 200 µM de dNTP, 15 pmol/µl do iniciador reverso, 500 ng de mRNA purificado na presença do tampão específico.

Após a síntese de cDNA pela RT-PCR, procedeu-se para a amplificação pela reação de PCR. A reação ocorreu utilizando-se como molde 1 µl de cDNA, sob as mesmas condições descritas anteriormente.

**Tabela 1.1:** Relação dos iniciadores utilizados no presente estudo para a amplificação dos genes *TrTop2mt* e *TrTop2a* de *Trypanosoma rangeli*. S-Iniciador Senso; AS-Iniciador Anti-Senso

| <i>TrTop2mt</i> |    |  |
|-----------------|----|--|
| <b>Bc1</b>      | S  | 5'GGGGGATCCATGACAGACGCTTCCAAGTATCAGAAGCTCAC3'  |
| <b>Bc2</b>      | S  | 5'GGGGGATCCATGACAGACGCTTCCAAGTATCAGAAACTCAC3'  |
| <b>Bc3</b>      | S  | 5'GGGGGATCCATGACAGACGCTTCCAAGTATAAGAAGCTCAC3'  |
| <b>Bc4</b>      | S  | 5'GGGGGATCCATGACAGACGCTTCCAAGTATAAGAAACTCAC3'  |
| <b>Bc6</b>      | S  | 5'AAGATCGTGGACGAAAT 3'                         |
| <b>Bc7</b>      | S  | 5'AAGATCGTGGACGAAATCTGTCTCAA 3'                |
| <b>Bc8</b>      | S  | 5'GGTCGGCACGGCTACGG 3'                         |
| <b>Bc10</b>     | S  | 5'AGGGTCAGTTCGGTTCTCGTCAGC A 3'                |
| <b>Bc12</b>     | S  | 5'TACATTTTCACGAAGCT 3'                         |
| <b>TopMF</b>    | S  | 5'CGACTATGTGCTGCGCAAACCC 3'                    |
| <b>Bc5</b>      | AS | 5'GGGGGATCCATGCGCTTGTGCAGCAGCAGCGCTTCATGTCG3'  |
| <b>Bc9</b>      | AS | 5'CCGTAGCCGTGCCGACC 3'                         |
| <b>Bc11</b>     | AS | 5'TGCTGACGAGAACCGAACTGACCCT 3'                 |
| <b>Bc13</b>     | AS | 5'AGCTTCGTGAAAATGTA 3'                         |
| <b>Bc14</b>     | AS | 5'CCGTTGCACAGCAGCA 3'                          |
| <b>OligoDT</b>  | AS | 5'GACCACGCGTATCGATGTCGAC(T) <sub>16</sub> V 3' |
| <b>Anchor</b>   | AS | 5'GACCACGCGTATCGATGTCGAC 3'                    |
| <i>TrTop2a</i>  |    |  |
| <b>TG1F</b>     | S  | 5'CGTGTGTACAACAATGGTGAGGG 3'                   |
| <b>TG3F</b>     | S  | 5'GGTGGAGATGGCGAACAGC 3'                       |
| <b>ME-L</b>     | S  | 5'CCCGAATTCTGTACTATATTGGT 3'                   |
| <b>TopGF</b>    | S  | 5'GGATCCGAGGAGATTTACCAAAAAGAAAACACAGCAT3'      |
| <b>ExTopGF</b>  | S  | 5'GCCGGATCCCGTGCCTCTTATCCTCACG 3'              |
| <b>TG2R</b>     | AS | 5'CTTCTGCGTTGGATTGACGC 3'                      |
| <b>TG4R</b>     | AS | 5'TCGAATTGACGAAGCTCACCTG 3'                    |
| <b>TG5R</b>     | AS | 5'CCAGCGACTGCTCCCCG 3'                         |
| <b>HPG</b>      | AS | 5'GATGTAGTCAATGACGGGTGTGTTGC 3'                |
| <b>TopGR</b>    | AS | 5'AAGCTTTTAATCACTAAAGTCATAGGAGGAAACC3'         |
| <b>ExTopGR</b>  | AS | 5'GGGAAGCTTCGCTCGCATCCTCACGCAC 3'              |

Todos os produtos de PCR obtidos foram visualizados em géis de agarose corados pelo brometo de etídio (1 µg/ml), e alíquotas de 3-7 µl foram utilizadas para a ligação ao plasmídeo através do kit *pGEM-T Easy Vector*<sup>®</sup> (Promega, Madison). Os produtos de ligação foram utilizados na transformação de células competentes DH5- $\alpha$  (*E. coli*). E, a comprovação

da presença dos insertos nos clones recombinantes foi realizada através da amplificação dos fragmentos esperados diretamente da colônia de bactérias. Os clones positivos tiveram seu DNA plasmidial extraído por lise alcalina (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) para posterior sequenciamento.

## **1.2.7 Varredura da biblioteca genômica de *T. rangeli* para obtenção dos genes da DNA topoisomerase II**

### **1.2.7.1 Construção de biblioteca genômica de *T. rangeli***

Dentre os produtos de PCR obtidos, alguns foram utilizados como sondas na varredura de uma biblioteca genômica de *T. rangeli* construída segundo descrito por Kayser e Murray (1985). Após testes com diferentes concentrações da enzima *Sau3AI* visando determinar a quantidade ideal (unidades) que produziria fragmentos de DNA entre 12 a 20 Kb, 200 µg do DNA genômico foram misturados com 0,5 unidades da enzima *Sau3AI* e 100 µl do respectivo tampão para o volume final de 1 ml. Após uma hora a 37°C a reação foi interrompida com EDTA na concentração final de 20 mM. O DNA digerido foi extraído com uma solução de fenol/clorofórmio, e precipitado com 300 mM de acetato de sódio pH 6,0 em dois volumes de etanol absoluto, sendo armazenado a -20°C por 16 horas. Após centrifugação a 14.000 x g, o DNA foi lavado duas vezes com etanol 70%, e posteriormente adicionado de 200 µl de TE. Este material foi então depositado no topo de um gradiente de NaCl de 5 a 25% e submetido a 65.000 x g por 5 horas a 4°C. O gradiente foi coletado em alíquotas de 250 µl, sendo que 25 µl foram coletados de tubos alternados e analisados em gel de agarose 0,3%. As frações que continham o DNA do tamanho desejado foram adicionadas com um volume de água ultra pura e 1 ml de etanol absoluto. A mistura foi mantida em gelo seco por 10 minutos e centrifugada a 16.000 x g por 15 minutos a 4°C. O sedimento foi lavado duas vezes com etanol 70%, seco e adicionado de 20 µl de TE. Os fragmentos foram ligados ao vetor lambda EMBL3 previamente digerido com a enzima de restrição *Bam*HI. O DNA ligado foi empacotado *in vitro*, usando-se extratos de empacotamento comercial (Stratagene, La Jolla) e, a biblioteca gerada, foi então amplificada em *E. coli* LE392.

### **1.2.7.2 Seleção dos clones da biblioteca genômica de *T. rangeli* contendo seqüências dos genes *TrTop2mt* e *TrTop2a***

Os clones obtidos foram distribuídos em 10 placas de meio LB ágar e réplicas foram feitas em membranas de nitrocelulose (GE

Healthcare, Buckinghamshire). As membranas foram cuidadosamente retiradas das placas e colocadas em solução de desnaturação por 1 minuto. Após desnaturação do DNA, os filtros foram transferidos duas vezes para uma solução de neutralização, onde permaneceram por cinco minutos. Os filtros foram então lavados em SSC 2X por cinco minutos e secos sobre papel de filtro 3MM (Whatman, Buckinghamshire). O DNA foi fixado à membrana através do aquecimento em forno a 80°C durante duas horas e as membranas contendo os ácidos nucleicos foram transferidas para a solução de hibridização por 1 hora a 65°C antes da adição da sonda. Como sondas foram utilizados os produtos de PCR marcados radioativamente por *nick-translation* (RIGBY et al., 1977), utilizando-se fósforo 32 ( $P^{32}$ ) na concentração de  $1 \times 10^6$  cpm.ml<sup>-1</sup> (atividade específica de  $1 \times 10^8$  cpm.μg<sup>-1</sup>). A hibridização procedeu por mais 16 horas e então as membranas foram lavadas por 30 minutos em soluções com concentrações decrescentes de SSC a 65°C (SSC 2 X / SDS 0,1%, SSC 1 X / SDS 0,1% e SSC 0,1 X / SDS 0,1%). Em seguida, as membranas foram expostas a filmes de raios-X Hyperfilm® (GE Healthcare, Buckinghamshire) na presença de tela intensificadora (Dupont Cronex Lighting plus) a -70°C.

Após a análise dos resultados, os clones positivos foram coletados e adicionados de 200 μl de tampão SM (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 8 mM MgSO<sub>4</sub>; 0,01% gelatina). Para completa purificação dos clones de interesse, ou seja, até que todas as u.f.p. presentes na placa de petri fornecerem sinais positivos para hibridização, uma segunda e uma terceira varredura foram executadas da mesma forma. Após a terceira varredura, o DNA de um clone genômico ( $\lambda$ Tm1) foi purificado através de gradiente de cloreto de cézio seguindo-se protocolo padrão (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

### **1.2.7.3 Clonagem do gene *TrTop2mt* a partir de um clone genômico**

Para a obtenção de fragmentos do gene *TrTop2mt* contidos no clone genômico, este foi analisado por *Southern blot* (SOUTHERN, 1975) para a escolha dos fragmentos a serem subclonados. Para tanto, 2 μg de DNA do clone  $\lambda$ Tm1, obtido na varredura da biblioteca genômica, foram digeridos com as enzimas *SalI*, *SacII*, *SmaI*, *HindIII*, *BglII* e *KpnI* em reações contendo 20 unidades das respectivas enzimas e tampão apropriado em um volume final de 40 μl. As reações foram mantidas a 37°C por três horas e submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8%.

Após corado com brometo de etídio e fotografado, o DNA foi transferido para membrana de nylon Hybond-C<sup>®</sup> (GE Healthcare, Buckinghamshire) através de capilaridade. A membrana foi processada utilizando as mesmas sondas e condições de hibridização descritas anteriormente. Após a análise da autorradiografia procedeu-se com a subclonagem de alguns dos fragmentos que tiveram sinal positivo para a sonda. Os fragmentos positivos de tamanhos adequados foram purificados e ligados ao vetor pBluescript sK(+) (Stratagene, La Jolla) o qual foi utilizado na transformação de células competentes TOP10F' (*E. coli*), sendo os clones recombinantes selecionados e os plasmídeos purificados por lise alcalina.

### **1.2.8 Sequenciamento dos genes das DNA topoisomerasas II de *T. rangeli***

O sequenciamento de todos os clones obtidos contendo fragmentos dos genes *TrTop2mt* e *TrTop2a* foi realizado em um equipamento *MegaBace 1000<sup>®</sup> DNA Analysis System* (GE Healthcare, Buckinghamshire), sendo a reação de sequenciamento preparada a partir do Kit *DYEnamic<sup>®</sup> ET Dye Terminator* (GE Healthcare, Buckinghamshire), de acordo com as instruções do fabricante.

Basicamente as reações foram realizadas na presença de 5 pmol dos iniciadores universais M13-F e M13-R e aproximadamente 800 ng de DNA plasmidial, nas seguintes condições térmicas: 95°C por 25 segundos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, ligação dos iniciadores a 55°C por 30 segundos e extensão a 60°C por 80 segundos. Posteriormente, os produtos marcados foram precipitados utilizando-se isopropanol 70% e etanol absoluto, para retirada dos nucleotídeos e iniciadores não incorporados. Os produtos purificados foram eletroinjetados a 2 KV por 120 segundos e eletroeluídos por 150 minutos a 9 KV.

### **1.2.9 Análise das seqüências obtidas**

As análises das seqüências obtidas foram realizadas com o apoio do Laboratório de Bioinformática (MIP/CCB/UFSC).

Após a eletroforese, as seqüências geradas foram analisadas quanto à sua qualidade utilizando-se o pacote *Phred/Phrap/Consed* (<http://www.phrap.org>). A confirmação da identidade dos fragmentos foi realizada através do programa *BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (ALTSCHUL et al., 1997) e as seqüências dos clones obtidos para um mesmo gene foram agrupadas utilizando-se o programa *CAP3* para formação de

uma sequência consenso, a qual, posteriormente, foi comparada através de alinhamentos com o programa *ClustalW* e pelos métodos de *Bootstrapped Minimal Evolution* e *Neighbour-joining* (1.000 replicatas) utilizando o programa *MEGA*, versão 2.1 (<http://www.megasoftware.net>).

As sequências preditas de aminoácidos foram obtidas a partir do programa *Translate* do pacote *Expasy* ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)), e seus preditos tamanhos moleculares e pontos isoeletrícos foram estimados com o programa *ProtParam*. Para a análise da estrutura dos genes foi utilizado o programa *Conserved Domain Search Service* (CD-Search) (MARCHLER-BAUER; BRYANT, 2004) e a busca de sinais de localização celular foi realizada utilizando os programas *SignalP 3.0* (BENDTSEN et al., 2004) e *PSORT II* (NAKAI; HORTON, 1999).

#### **1.2.10 Caracterização da organização genômica das DNA topoisomerasas II de *T. rangeli* por Southern blot**

O DNA genômico de *T. rangeli* (30 µg) foi digerido por completo com diferentes enzimas de restrição (*Sall*, *BglII*, *PstI*, *SacII* e *XhoI*) em reações contendo 60 unidades das respectivas enzimas e seus tampões em um volume final de 40 µl. As reações foram mantidas a 37°C por três horas e os fragmentos resultantes resolvidos em eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TBE a 5 volts/cm. O gel foi processado como descrito no item 1.3.5, entretanto a membrana foi fixada através de luz ultravioleta (Energia 1.200J) em um aparato *UV Cross Linker*<sup>®</sup> (GE Healthcare, Buckinghamshire) e mantida durante 1 hora a 42°C em tampão de hibridização (0,5 M NaCl, 5% agente bloqueador diluído em *ECL Gold Hybridization Buffer*<sup>®</sup>) (GE Healthcare, Buckinghamshire). As sondas correspondentes a cada gene, obtidas através de amplificação por PCR, foram marcadas através do kit *ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System*<sup>®</sup> (GE Healthcare, Buckinghamshire) conforme especificações do fabricante, e foram adicionadas às membranas, permanecendo 16 horas a 42°C sob agitação suave. As membranas foram então lavadas três vezes por 15 minutos em solução 1 a 42°C (SSC 0,5X, 0,4% SDS, 6 M Uréia) e duas vezes de cinco minutos em solução 2 (SSC 2X). Em seguida, a detecção foi realizada através da adição do reagente ECL sobre a membrana durante 1 minuto seguido de exposição a um filme radiográfico para detecção de quimioluminescência, utilizando o processador de filmes SRX-101A (Konica Minolta Medical & Graphic, INC - China).

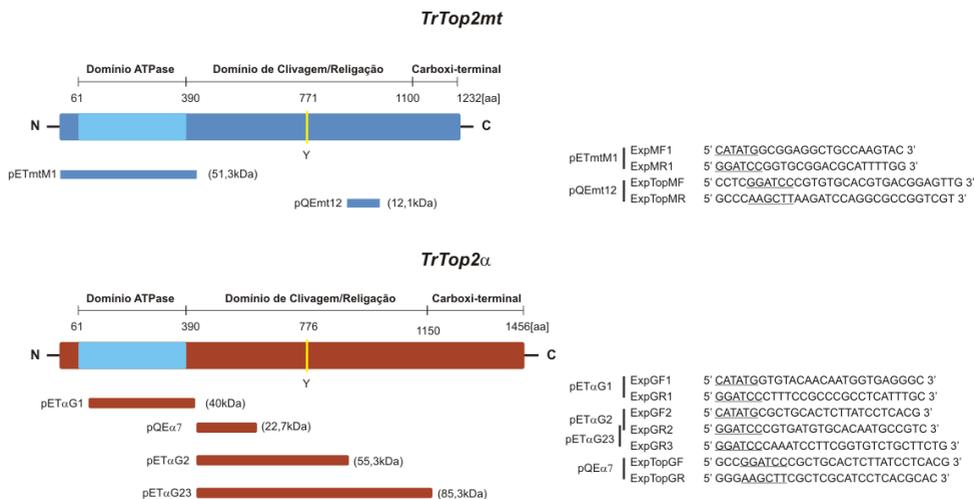
### 1.2.11 Expressão heteróloga e purificação das DNA topoisomerasas de *T. rangeli*

Para expressão heteróloga, fragmentos dos genes *TrTop2a* e *TrTop2mt* foram amplificados por PCR e clonados em vetores de expressão pQE30 (Qiagen, Duesseldorf) e pET14B (Novagen, Darmstadt).

Os produtos de PCR foram obtidos para ambos os genes a partir de diferentes combinações dos iniciadores especificamente desenhados, contendo sítios para enzimas de restrição (figura 1.1). As reações de PCR foram realizadas conforme descrito no item 1.3.6. Uma alíquota de 3 µl do DNA amplificado foi analisada em gel de agarose 1% e os produtos obtidos foram purificados com o sistema *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*<sup>®</sup> (GE Healthcare, Buckinghamshire). Após a purificação, os produtos de PCR e os plasmídeos pQE30 e pET14B foram digeridos com as respectivas enzimas de restrição (*Bam*HI, *Hind*III, *Nde*I), utilizando 60 unidades de cada enzima em tampão apropriado a 37°C por três horas. Os produtos digeridos foram resolvidos em gel de agarose 1%, e os fragmentos de DNA foram purificados conforme o descrito anteriormente. Estes fragmentos foram então ligados, conforme compatibilidade, aos vetores pQE30/*Bam*HI/*Hind*III e pET14B/*Nde*I/*Bam*HI. Após 16 horas a 16°C as reações de ligação foram utilizadas para transformar *E. coli* M15 (pQE30) e BL21 DE3 (pET14B) a partir de eletroporação a 2,5 KV em aparelho *MicroPulser*<sup>®</sup> (BioRad, Richmond). Após uma hora de crescimento em 1 ml de meio SOC as bactérias foram semeadas em placas LB ágar (100 µg/ml ampicilina) e mantidas a 37°C por 18 horas. A seleção dos clones recombinantes foi feita a partir de PCR diretamente das colônias. Um clone positivo para cada fragmento foi selecionado e purificado por lise alcalina para confirmação da orientação do inserto através de sequenciamento.

Para a expressão heteróloga, a colônia selecionada para cada inserto foi utilizada em um pré-inóculo em 10 ml de meio LB (100 µg/ml de ampicilina), mantido a 37°C por 16 horas sob agitação. Uma diluição de 1:100 em 50 ml do mesmo meio foi mantida sob agitação constante a 37°C até atingir uma densidade óptica (D.O.) de 0,6. Neste momento, foi adicionado isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) na concentração final de 0,5-1 mM, prosseguindo-se por mais 3-16 horas a 15°C, 27°C ou 37°C sob agitação. Para cada fragmento protéico foi necessário estabelecer as melhores condições de temperatura, tempo e concentração do indutor que resultasse na maior expressão das proteínas heterólogas.

Os fragmentos protéicos recombinantes obtidos receberam as seguintes denominações conforme o vetor utilizado e a proteína correspondente: pQE $\alpha$ 7, pET $\alpha$ G1, pET $\alpha$ G2 e pET $\alpha$ G23 para *TrTop2 $\alpha$*  (figura 1.1).



**Figura 1.1:** Representação esquemática dos fragmentos dos genes *TrTop2mt* e *TrTop2 $\alpha$*  de *Trypanosoma rangeli* escolhidos para expressão heteróloga em *Escherichia coli*, com seus respectivos pares de iniciadores e peso molecular estimado.

Após determinadas as melhores condições para a expressão de cada clone, a expressão foi realizada em 50 ml de cultura, sendo que em todos os casos, após o período de indução com IPTG, as bactérias foram coletadas por centrifugação a 4.000 x g por 10 minutos a 4°C e lavadas duas vezes em PBS 1X. Para a purificação das proteínas recombinantes, o sedimento foi submetido à lise através da adição de 2 ml de tampão de lise em condições desnaturantes (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 M Uréia) sob agitação a 65°C por 1 hora. O material lisado foi centrifugado a 4°C por 30 minutos a 12.000 x g e o sobrenadante imobilizado em 400  $\mu$ l do suporte Ni-NTA agarose (Qiagen, Duesseldorf), conforme instruções do fabricante. As lavagens do suporte e eluição da proteína foram realizadas utilizando-se o tampão B (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 M Uréia, 10 mM Tris- HCl) em diferentes pHs (lavagens: pH 6,0 e eluição: pH 4,0). O suporte foi lavado 2 vezes com 2 ml do tampão

pH 6,0 e a proteína liberada em 4 etapas de adição de 200 µl do tampão pH 4,0. Para a renaturação da proteína, as eluições foram ajustadas para pH 8,5 e dialisadas duas vezes a 4°C em tampão de diálise (100 mM Tris-HCl, pH 8,5; 500 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 20% glicerol, 5 mM DTT) e por último dialisada mais duas vezes no mesmo tampão contendo glicerol 40%.

Os extratos protéicos bacterianos, assim como as proteínas purificadas e as etapas de purificação foram avaliados em géis SDS-PAGE 12%. Alíquotas contendo 5 µl das amostras foram misturadas a 5 µl de tampão de amostra (20% glicerol, 0,5% azul de bromofenol, 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 4,4% SDS, 2% β-mercaptoetanol). Depois de misturadas ao tampão, as amostras foram submetidas à desnaturação a 95°C por cinco minutos e em seguida a separação eletroforética. A corrida foi realizada no sistema *Mini-PROTEAN® Tetra Cell* (BioRad, Richmond), a 100 V durante 1 hora. O gel foi corado com azul de Coomassie R250, e a imagem do gel foi digitalizada no *Perfection 4990 Scanner®* (Epson, Suwa).

### 1.2.12 Espectrometria de massas

Devido as condições empregadas para a purificação e principalmente para a renaturação das proteínas purificadas, as amostras não puderam ser analisadas diretamente por espectrometria de massas, para a confirmação da identidade dos fragmentos protéicos recombinantes.

Para tanto, as amostras foram precipitadas com ácido tricloroacético 20% diluído em acetona por 16 horas a -20°C e posteriormente adicionadas de 0,1% de ácido fórmico, para remoção do tampão contendo NaCl e glicerol. As amostras acidificadas, foram digeridas com tripsina (10 µg/ml) e analisada em espectrômetro de massas *MALDI-TOF MX* (Waters, Milford) e por *ESI-Q-TOF* (Waters, Milford), a qual permite análises por espectrometria de massas em tandem (MS/MS) e o sequenciamento de peptídeos para identificação de proteínas. A identificação de proteínas foi realizada a partir do espectro de *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF) processado usando o programa *ProteinLynx 2.1* (Waters, Milford) e os dados obtidos através deste foram analisados no programa *MASCOT*, a partir da comparação com seqüências disponíveis em bancos de dados.

Os procedimentos relacionados a espectrometria de massas foram realizados no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio

Grande do Sul, com a colaboração e orientação do Prof. Dr. Henrique B. Ferreira.

### **1.2.13 Obtenção dos antissoros e anticorpos monoclonais dirigidos à DNA topoisomerasas II de *T. rangeli***

#### **1.3.13.1 Animais**

Neste trabalho, foram utilizados camundongos fêmeas BALB/c oriundos do Biotério Central da UFSC. Os procedimentos de produção de antissoros e hibridomas por fusão dos linfócitos foram realizados na observância dos preceitos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, tendo sido aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais da UFSC (Processo CEUA: 23080.025618/2009-81).

#### **1.2.13.2 Imunização dos camundongos com as proteínas *TrTop2a* e *TrTop2mt***

Para a produção de antissoros e anticorpos monoclonais anti *TrTop2a* e *TrTop2mt*, grupos de três camundongos fêmeas foram imunizados por via subcutânea com 50 µg dos fragmentos protéicos purificados. Na imunização foram utilizados os fragmentos isoladamente assim como sua combinação, havendo grupos de camundongos imunizados com os fragmentos pETαG1 e/ou pQEα7 para *TrTop2a* e pETmtM1 e/ou pQEmt12 para *TrTop2mt*.

As imunizações foram realizadas a cada dez dias, sendo as proteínas emulsificadas em adjuvante completo de Freund (v/v) (Sigma-Aldrich, Saint Louis) na primeira inoculação, em adjuvante incompleto de Freund (v/v) (Sigma-Aldrich, Saint Louis) na segunda imunização e com *Alu-Gel S* (Hidróxido de Alumínio 1,3 %) (Serva, Heidelberg) nas outras duas inoculações. Após a terceira imunização, a resposta imunológica dos camundongos foi verificada através da técnica ELISA direto e, os dois camundongos dos grupos imunizados com as combinações pETαG1/pQEα7 e pETmtM1/pQEmt12 que apresentaram a resposta mais elevada contra os respectivos fragmentos protéicos foram selecionados para a fusão celular e produção de anticorpos monoclonais.

Dez dias após a última imunização, foi retirado através de punção retro-orbital aproximadamente 1 ml de sangue de todos os camundongos imunizados para separação do antissoro contendo os diferentes anticorpos anti *TrTop2a* e *TrTop2mt*.

### **1.2.13.3 Avaliação dos soros dos camundongos e dos anticorpos monoclonais por ELISA**

A avaliação dos soros dos camundongos e dos anticorpos monoclonais anti- *TrTop2a* e *TrTop2mt* foi feita por ELISA direto frente aos respectivos fragmentos protéicos. Para tal, microplacas descartáveis de poliestireno com 96 cavidades foram sensibilizadas com 50 ng da proteína purificada diluída em solução tamponada carbonato-bicarbonato 0,5 M, pH 9,6; durante três horas a 37°C. As placas foram lavadas três vezes pela adição de 200 µl de PBS-T (PBS 1X; 0,05% Tween20), e em seguida, seus sítios livres foram bloqueados durante 16 horas a 4°C com 300 µl de PBS-T acrescido de 3% de soro albumina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, Saint Louis). Após três lavagens com PBS-T, o soro dos camundongos ou os sobrenadantes da culturas dos hibridomas foram utilizados como anticorpos primários e mantidos por 1 hora a 37°C, sendo que para os soros foram realizadas diluições seriadas em PBS-T/ 3% BSA, iniciando-se com uma diluição de 1:400. Além disso, controles positivos (anticorpo anti-HisTag 1:10.000 e soros policlonais 1:1.000) e negativos (soro de camundongo não imunizado e somente PBS-T/ 3% BSA) foram adicionados a cada placa. Após a retirada do excesso de anticorpo, foi adicionado 200 µl do anticorpo secundário conjugado polivalente (Anti-IgG murino conjugado à peroxidase) (Sigma-Aldrich, Saint Louis) diluído 1:7500 em PBS-T/ 3% BSA e mantido por 1 hora a 37°C.

A revelação ocorreu através da adição de 100 µl de solução substrato-cromógeno orto-fenilenodiamino (0,4% OPD em 100 mM de solução tampão citrato-fosfato pH 5,0 e 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), e após cinco minutos a reação foi paralisada pela adição de 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 2,5 M. A leitura da densidade óptica foi feita a 492 nm em leitor de microplacas (Bio-Tek, Elx800), e o limite de reatividade adotado foi correspondente a uma absorbância três vezes maior que a média dos controles negativos.

### **1.2.13.4 Obtenção das células esplênicas para produção dos anticorpos monoclonais**

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, embebidos em álcool 70% e os baços foram retirados e macerados em meio RPMI-1640 em ambiente estéril. O material resultante da maceração, excluindo-se as cápsulas de tecido conjuntivo do órgão, foi separado em tubo plástico de 50 ml e mantido em gelo por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e centrifugado duas vezes a 400 x g por 10

minutos a temperatura ambiente. Ao precipitado celular foram adicionados 5 ml de solução de lise (168 mM cloreto de amônio, 10 mM bicarbonato de potássio, 0,1 mM EDTA, pH 7,4) para eliminação dos eritrócitos, durante cinco minutos. Após este período, foram adicionados 45 ml de meio RPMI-1640, para posterior centrifugação nas mesmas condições acima. Após o descarte do sobrenadante, foi adicionado 10 ml de meio de cultura para posterior quantificação dos esplenócitos em câmara de Neubauer, numa diluição 1:2 em azul de tripan a 0,1%.

### **1.2.13.5 Células de Mieloma para produção dos anticorpos monoclonais**

Uma semana antes da fusão celular, as células de mielomas foram descongeladas e transferidas um tubo cônico contendo 15 ml de meio RPMI-1640 acrescido de 10% de SBF (Cultilab, Campinas). As células foram centrifugadas a 800 x g durante cinco minutos a temperatura ambiente, e em seguida, transferidas para uma garrafa de 25 cm<sup>2</sup> a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> a 5% até o crescimento e a transferência para garrafas de 75 cm<sup>2</sup>. No dia da fusão, as células de mielomas foram centrifugadas três vezes a 400 x g por cinco minutos a temperatura ambiente, sendo a cada centrifugação adicionado ao precipitado meio RPMI-1640. Após a última centrifugação, 10 ml de meio RPMI-1640 suplementado com antibióticos (0,1% gentamicina e 1% PSA (Penicilina, estreptomicina e ampicilina)) foi adicionado para posterior quantificação em câmara de Neubauer, numa diluição 1:2 em azul de tripan a 0,1%.

### **1.2.13.6 Obtenção dos hibridomas (Fusão Celular) para produção dos anticorpos monoclonais**

Os mielomas e os esplenócitos foram misturados na proporção de 1:5 e lavados duas vezes com meio RPMI-1640 (1% PSA; 0,1% gentamicina) sendo o sobrenadante retirado. Sobre as células foi então adicionado 1 ml de polietilenoglicol 50%, vagarosamente, sob leve agitação por dois minutos. Em seguida, foram realizados dois passos sucessivos de adição de 1 ml de meio de cultura lentamente por 1 minuto sob leve agitação e mais 7 ml durante dois minutos, sendo as células posteriormente centrifugadas por cinco minutos a 400 x g. Ao precipitado novamente foi adicionado meio RPMI-1640 (1% PSA, 0,1% gentamicina, 20% SBF), sendo o volume ajustado a fim de se obter uma solução final de aproximadamente 2 x 10<sup>6</sup> células/ml. Por fim, 100 µl da suspensão foi separada por orifício em placa de cultura de 96 cavidades, sendo as

células mantidas a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> a 5%. Após 24 horas foram adicionados 100 µl de meio RPMI-HAT (Hipoxantina, aminopterina e timidina) (Sigma-Aldrich, Saint Louis) acrescido de 20% de SFB. Subsequentemente, a cada dois dias foi realizada a manutenção das culturas, descartando-se 100 µl/orifício e adicionando a mesma quantidade de meio RPMI-HAT (20% SFB). Após 15 dias, o HAT foi substituído por hipoxantina e timidina (HT) (Sigma-Aldrich, Saint Louis) e no 20º dia passou a ser utilizado somente o RPMI (20% SFB). Quando as células ocuparam 2/3 da cavidade da placa foram realizados os procedimentos de identificação dos anticorpos de interesse.

### **1.2.13.7 Triagem e clonagem de hibridomas para produção dos anticorpos monoclonais**

A fim de selecionar os hibridomas positivos contra as proteínas recombinantes (*TrTop2mt* e *TrTop2α*) foi utilizado o ensaio de ELISA, conforme descrito no item 1.3.13.3.

Os hibridomas positivos durante a triagem por ELISA foram quantificados em câmara de Neubauer e adicionados de meio RPMI (20% SBF, 2% PSA, 2% gentamicina), a fim de se obter uma solução final com 1 X 10<sup>2</sup> células/ml. Esta suspensão foi diluída 10 X em meio de cultura e utilizada para um procedimento de diluição limitante (1:1) em uma placa de 96 cavidades. Assim, na primeira coluna da placa, a estimativa foi de 10 células/poço e de aproximadamente 0,005 hibridomas/poço na última coluna.

Estas células foram mantidas até um crescimento de cerca de 2/3 da cavidade, sendo então os sobrenadantes testados novamente para a produção de anticorpos através de ELISA. As cavidades positivas foram então escolhidas para uma segunda diluição limitante, que garantiu a monoclonalidade dos hibridomas. As cavidades contendo hibridomas produtores de anticorpos com maior reatividade contra as proteínas recombinantes de *TrTop2mt* e *TrTop2α* foram expandidos em garrafas de cultura de 25cm<sup>2</sup>, sendo o sobrenadante coletado periodicamente e submetido a liofilização.

### **1.2.14 Estudo da expressão das DNA topoisomerasas II por *western blot***

#### **1.2.14.1 Eletroforese unidimensional sob condições desnaturantes**

Para os ensaios de *western blot* foram utilizados extratos de bactérias induzidos e não induzidos, as proteínas purificadas, além dos extratos protéicos de outras espécies da Ordem Kinetoplastida.

Extratos de *E. coli* expressando ou não as proteínas recombinantes e extratos protéicos totais de *T. rangeli* (formas epimastigotas e tripomastigotas), *T. cruzi*, e *L. amazonensis*, foram obtidos a partir da homogeneização das células em tampão de lise (1% triton X-100, 50 mM NaCl, 200 mM Tris-HCl pH 7,4) aquecido a 90°C. Após centrifugação a 12.000 x g por 20 minutos a 4°C o sobrenadante foi separado e a concentração de proteínas estimada através do ensaio de Bradford (BRADFORD, 1976). Aproximadamente 50 µg de cada amostra foram solubilizadas em tampão de amostra desnaturante (20% glicerol, 0,5% azul de bromofenol, 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 4,4% SDS, 2% β-mercaptoetanol), aquecidas a 95°C durante 5 minutos e resolvidas em eletroforese em géis SDS-PAGE 8% ou 12%. As amostras foram então transferidas para membranas de nitrocelulose *Hybond-ECL*<sup>®</sup> (GE Healthcare, Buckinghamshire) durante 12 horas a 25 V, conforme descrito por Towbin e colaboradores (1979). Após confirmação da transferência das proteínas pela coloração com Ponceau 1%, as membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5% diluído em tampão para “*blotting*” (25 mM Tris-HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl e 0,1% Tween 20) durante 1 hora a temperatura ambiente. Após a retirada do excesso do agente bloqueador foi adicionado as membranas uma solução contendo o anticorpo primário específico para cada situação (antissoros 1:500, 200 mg dos anticorpos monoclonais liofilizados e anti-HisTag 1:5.000), sendo este mantido por 1 hora e trinta minutos a temperatura ambiente sob agitação branda. A ligação do anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich, Saint Louis) procedeu-se após cinco lavagens das membranas, em uma diluição de 1:10.000, sendo as membranas lavadas e reveladas através da utilização do reagente ECL (GE Healthcare, Buckinghamshire) em filmes radiográficos utilizando o processador de filmes SRX-101A (Konica Minolta Medical & Graphic, INC - China).

#### **1.2.14.2 Eletroforese unidimensional sob condições não-desnaturantes**

Extratos protéicos totais de *T. rangeli* (formas epimastigotas) foram obtidos a partir da homogeneização das células em 40 mM Tris-HCl pH 8, seguido de cinco ciclos de sonicação de 30 segundos e 1

minuto de intervalo em gelo, a uma frequência de 40 Hz. Aproximadamente 50 µg do extrato obtido foi solubilizado em tampão de amostra não desnaturante (20% glicerol, 0,5% azul de bromofenol, 1 M Tris-HCl, pH 6,8) e resolvido em eletroforese em géis de poliacrilamida não desnaturantes a 8% e processados para realização de *western blot* como descrito no item 1.3.14.1.

#### **1.2.14.3 Eletroforese Bidimensional (2D)**

Os extratos protéicos foram preparados a partir de 200 ml de cultura de *T. rangeli* cepa Choachí (6,9 x 10<sup>7</sup> parasitos). Para tal, a cultura foi centrifugada a 2.500 x g por 10 minutos a temperatura ambiente e lavada duas vezes em PBS 1X. Os parasitos foram então lisados por sonicação em 2 ml de 40 mM Tris-HCl pH 8, em cinco ciclos de 30 segundos e 1 minuto de intervalo em gelo, utilizando uma frequência de 40 Hertz. Após a quantificação das proteínas, duas alíquotas do extrato total contendo aproximadamente 2 mg de proteína foram precipitadas com 1 ml de ácido tricloroacético 20% em acetona durante 16 horas a -20°C. As amostras precipitadas foram centrifugadas por 12 minutos a 12.000 x g a 4°C, e o sedimento foi lavado em acetona gelada 5 vezes (centrifugações de 4 minutos, a 12.000 x g a 4°C). As proteínas foram solubilizadas em 300 µl de tampão de solubilização (7 M Uréia, 2 M Tiouréia, 4% CHAPS, 1% ditiotreitol (DTT) e 2% de anfólitos pH 3-10 (GE Healthcare, Buckinghamshire) durante 1 hora a temperatura ambiente.

Dois tiras lineares de gradiente de pH imobilizado (pH 3-10) de 13 cm (GE Healthcare, Buckinghamshire) foram então reidratadas por 16 horas com os 300 µl do extrato solubilizado. Posteriormente, a focalização isoeétrica (IEF- do inglês Isoelectric *focusing*) foi realizada no aparelho *IPGPhor 3* (GE Healthcare, Buckinghamshire) com voltagem máxima de 10.000 V e 50 µA, acumulando-se um total de 50.000 Volts

Após a IEF, as tiras foram equilibradas por 20 minutos em tampão de equilíbrio I (30% glicerol, 6 M uréia, 1% DTT, 0,5% azul de bromofenol), seguido de outros 20 minutos em tampão de equilíbrio II (solução de equilíbrio I com o DTT substituído por 4% de iodacetamida). As tiras foram então aplicadas verticalmente em gel SDS-PAGE a 10% e as proteínas separados por eletroforese no sistema *SE 600 Ruby Standard Dual Cooled Vertical Unit*<sup>®</sup> (GE Healthcare, Buckinghamshire), a 15 V durante 16 horas. Um dos géis foi corado com azul de Coomassie R-250 e outro foi transferido para membrana de nitrocelulose em módulo de

transferência *TE 77 PWR Semi-Dry Transfer Unit*<sup>®</sup> (GE Healthcare, Buckinghamshire) para ensaios de *western blot*, como descritos anteriormente. Os géis e os filmes foram digitalizados em *Perfection 4990 Scanner*<sup>®</sup> (Epson, Suwa) e os spots analisados através do programa *ImageMaster*<sup>®</sup> *2D Platinum v7.0* (GE Healthcare, Buckinghamshire).

### **1.2.15 Imunolocalização por microscopia óptica**

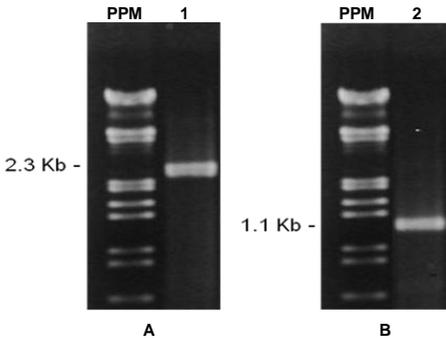
Ensaio de imunofluorescência foram realizados a partir de formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli* e *T. cruzi*. Os protozoários mantidos em meio LIT foram coletados por centrifugação a 3.000 x g por 10 minutos e lavados duas vezes em PBS 1X por centrifugação nas mesmas condições. A concentração de células foi ajustada para  $5 \times 10^6$  células/ml, e aproximadamente 100 µl da suspensão celular foi depositada em lamínula (22 x 22 cm) para subsequente fixação com paraformaldeído 4% diluído em PBS durante cinco minutos. Após três lavagens de cinco minutos com PBS 1X, foi feita a permeabilização dos parasitos com 0,5% Nonidet 40 (NP40) durante 5 minutos. Os sítios inespecíficos foram bloqueados em solução de bloqueio (5% leite desnatado diluído em PBS-Tween 0,1%) durante 16 horas a 4°C. Os diferentes anticorpos primários (antissoros 1:40 e 1:200) foram adicionados sobre as lamínulas permanecendo em contato com o antígeno durante uma hora a temperatura ambiente. Após novas lavagens, o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa-fluor 488 (Molecular Probes, Carlsbad) ou TRITC (Iso-Tiocianato de Tetrametil Rodamina) (Sigma-Aldrich, Saint Louis) foi diluído 1:1000 em tampão de bloqueio e mantido sobre as lamínulas por quinze minutos protegido da luz. Após três lavagens de cinco minutos em PBS-Tween 0,1% as lamínulas foram coradas com 1 µg/ml de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) por cinco minutos, lavadas novamente e montadas com o reagente *ProLong(r) Gold Antifade*<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad) sobre lâminas de vidro. As análises foram realizadas em microscópio Olympus – Bx40–FL (Olympus, Tóquio).

## 1.3 RESULTADOS

### 1.3.1 Obtenção das sequências gênicas

A partir de regiões conservadas dos genes das DNA topoisomerasas II de diversos tripanosomatídeos, incluindo *T. cruzi*, *T. brucei*, *C. fasciculata* e *L. major*, foram desenhados diversos iniciadores com o propósito de amplificar via PCR fragmentos dos genes correspondentes no *T. rangeli*. Para o gene *TrTop2mt* foram testadas diferentes combinações de 14 iniciadores cedidos pelo Prof. Dr. Stenio Perdigão Fragoso (ICC/Fiocruz). Apenas a reação contendo os iniciadores Bc7 e Bc14, resultou na amplificação de um fragmento de DNA específico com aproximadamente 2,3 Kb (figura 1.2 A).

Dos cinco iniciadores inicialmente desenhados para a amplificação do gene *TrTop2 $\alpha$* , duas combinações resultaram na amplificação de fragmentos de tamanho semelhante ao esperado teórico, TG1F/TG2R – 600 pb e TG3F/TG4R - 1,1 Kb (figura 1.2 B). Os três fragmentos obtidos foram clonados no vetor *pGEM T- easy* e após a transformação em *E. coli*, os clones recombinantes tiveram seu DNA plasmidial purificado e foram sequenciados, confirmando que os produtos clonados eram correspondentes a fragmentos dos genes *TrTop2mt* e *TrTop2 $\alpha$* .

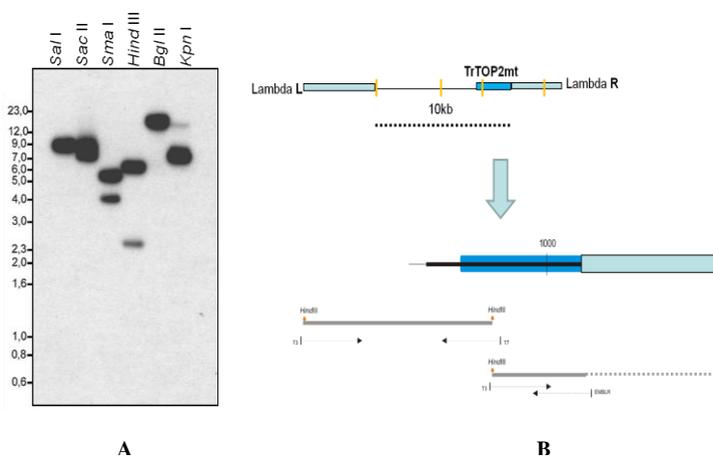


**Figura 1.2:** Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo revelando os produtos de amplificação de 2,3 Kb e 1,1 Kb dos fragmentos dos genes *TrTop2mt* (A) e *TrTop2 $\alpha$*  (B) de *Trypanosoma rangeli*, respectivamente. PPM-Padrão de Peso Molecular (Fago lambda/*HindIII*).

Os produtos Bc7-14 e TG3F/TG4R foram também utilizados como sondas para a varredura dos 36.000 clones resultantes da construção da biblioteca genômica de *T. rangeli* a fim de obter as regiões codificantes dos genes *TrTop2mt* e *TrTop2 $\alpha$* . A partir destes procedimentos foram

obtidos três clones correspondentes ao gene *TrTop2mt*, dos quais um teve o DNA purificado, e nenhum clone para o gene *TrTop2a*.

Para tentar compreender a organização do clone selecionado e subclonar fragmentos do gene *TrTop2mt* nele contidos, o DNA do fago foi digerido com várias enzimas de restrição e analisado por *Southern blot* utilizando a mesma sonda anterior Bc7-14. Dentre os vários fragmentos positivos (figura 1.3 A) somente os de ~6,4 Kb e ~2,5 Kb resultantes da restrição com a enzima *HindIII* foram purificados e subclonados no vetor pBluescript sK(+) previamente digerido com a mesma enzima. Os demais perfis de restrição embora apresentassem fragmentos positivos com a sonda correspondente não possuíam tamanho adequado para o sequenciamento.



**Figura 1.3:** Subclonagem do clone genômico de *Trypanosoma rangeli* positivo para o gene *TrTop2mt*. (A) *Southern blot* utilizando como sonda o produto de amplificação dos iniciadores Bc7-Bc14. (B) Representação esquemática do clone purificado, demonstrando a localização de uma porção do gene *TrTop2mt* na extremidade do braço direito do fago lambda, a estratégia de sub-clonagem (sítios para *HindIII* em amarelo) e as estratégias de sequenciamento dos clones resultantes correspondentes ao gene *TrTop2mt*.

A análise do sequenciamento destes subclones, utilizando os iniciadores universais T3 e T7, permitiu estabelecer que o clone genômico possuía um inserto de ~10 Kb e que somente uma porção do gene *TrTop2mt* estava localizado na extremidade próxima ao braço direito do fago (figura 1.3 B). O fragmento de ~2,5 Kb continha a porção 5' da ORF de *TrTop2mt* e a sua respectiva porção 5' não transcrita. Após

o sequenciamento de dois clones resultantes da ligação do fragmento de 6,4 Kb, observou-se que ambos não eram iguais, ou seja, a digestão com a enzima *HindIII* gerava dois fragmentos de mesmo tamanho, sendo que somente um era positivo para a sonda. O clone que continha o inserto positivo apresentou cerca de 900 pb correspondentes a ORF de *TrTop2mt*, sendo o restante condizente com a sequência do vetor. O segundo clone de 6,4 Kb teve suas extremidades sequenciadas, apresentando logo ao lado do braço esquerdo do fago a porção 5' da região codificante de um gene de transportador de cátion e na outra extremidade a porção 3' do gene da ubiquitina hidrolase e sua respectiva porção 3' não transcrita.

Uma vez que não foi possível obter a sequência completa dos genes através da varredura da biblioteca genômica, as tentativas de amplificação das demais porções gênicas via PCR foram retomadas em virtude da menor complexidade da metodologia. Assim, novos iniciadores foram desenhados para ambos os genes a fim de aumentar as possibilidades de sucesso. A partir da análise do alinhamento das sequências já obtidas para o gene *TrTop2mt*, considerando também a existência prévia de um fragmento de ~1 Kb obtido a partir da técnica de ORESTES no Projeto Transcriptoma do *T. rangeli*, estimou-se que apenas 330 pb correspondentes a porção 3' do gene faltavam para a obtenção da sequência completa. Para tal, foi desenhado o iniciador TopMF, o qual foi utilizado para a amplificação através de RT-PCR. Para esta finalidade, o RNA total de formas epimastigotas foi extraído e o cDNA foi resultante de uma reação de transcrição reversa (RT) utilizando o iniciador OligoDT-Anchor. A PCR com a combinação dos iniciadores Anchor e TopMF resultou em um fragmento de ~600 pb, que foi clonado, sequenciado, e apresentou similaridade com a porção 3' da ORF do gene homólogo em *T. cruzi*, contendo o códon referente a parada da tradução, assim como a região não transcrita até a cauda poli-A inerente ao mRNA.

Para o gene *TrTop2a* foram desenhados três novos iniciadores efetuando-se novas combinações com aqueles inicialmente utilizados. O iniciador TG2R foi novamente empregado para a amplificação da porção 5' do gene através de RT-PCR. Isto foi possível pelo fato de que os tripanosomatídeos passam por um processo único de maturação do mRNA, no qual existe a adição de uma pequena sequência conservada na extremidade 5' de todos os mRNA transcritos na célula. Denominada de mini-éxon ou *spliced leader*, essa região conservada permitiu a ligação de um iniciador de forma específica em uma região anterior ao início da região codificante do gene. Assim, a partir de um cDNA obtido por

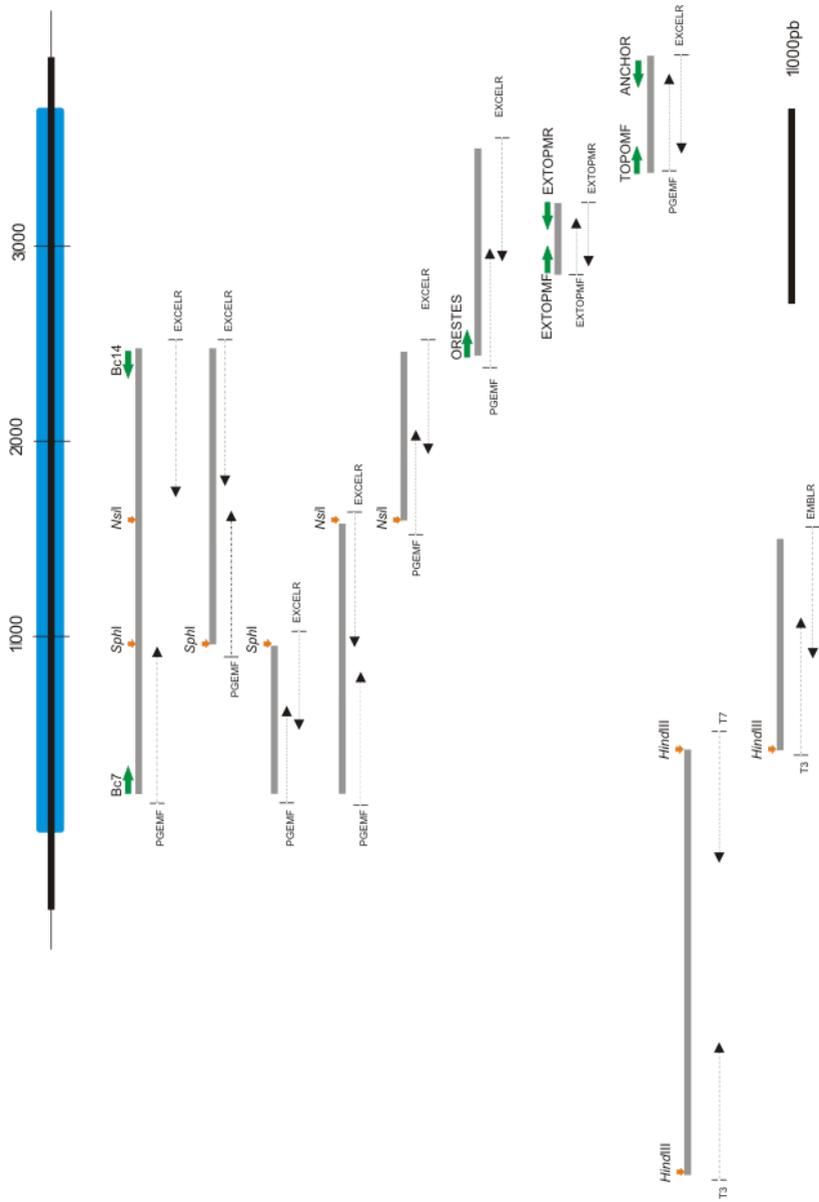
transcrição reversa com o próprio iniciador TG2R, foi possível amplificar um fragmento com cerca de 950 pb através da combinação dos iniciadores TG2R e ME-L. A partir do DNA genômico, um fragmento de 1.540 pb foi obtido com os iniciadores TG1F e EXTOPGR e outro de ~4 Kb, referente ao restante do gene, foi resultante da combinação dos iniciadores EXTOPGF e HPG. Este último foi desenhado a partir do alinhamento de sequências adjacentes pelo qual foi possível verificar a existência de um gene, logo após ao da DNA topoisomerase II que codifica para uma proteína hipotética, extremamente conservado em sua porção 5' e na sua organização genômica devido a alta sintonia existente neste grupo. Todos estes fragmentos também foram clonados e devidamente sequenciados.

Devido a limitações na técnica de sequenciamento foi necessária a obtenção de fragmentos menores de alguns dos produtos clonados, como por exemplo: o fragmento Bc7-Bc14 de 2,3 Kb e o fragmento EXTOPGF/HPG de 4 Kb. Para facilitar a determinação da sequência do fragmento Bc7-14, o plasmídeo do clone Bc7-14 foi digerido com diversas enzimas de restrição que possuem sítio único no vetor *pGEM T-easy*. As enzimas de restrição *SphI* e *NsiI* geraram perfis de restrição pouco complexos e complementares, com pesos moleculares razoáveis à clonagem e sequenciamento.

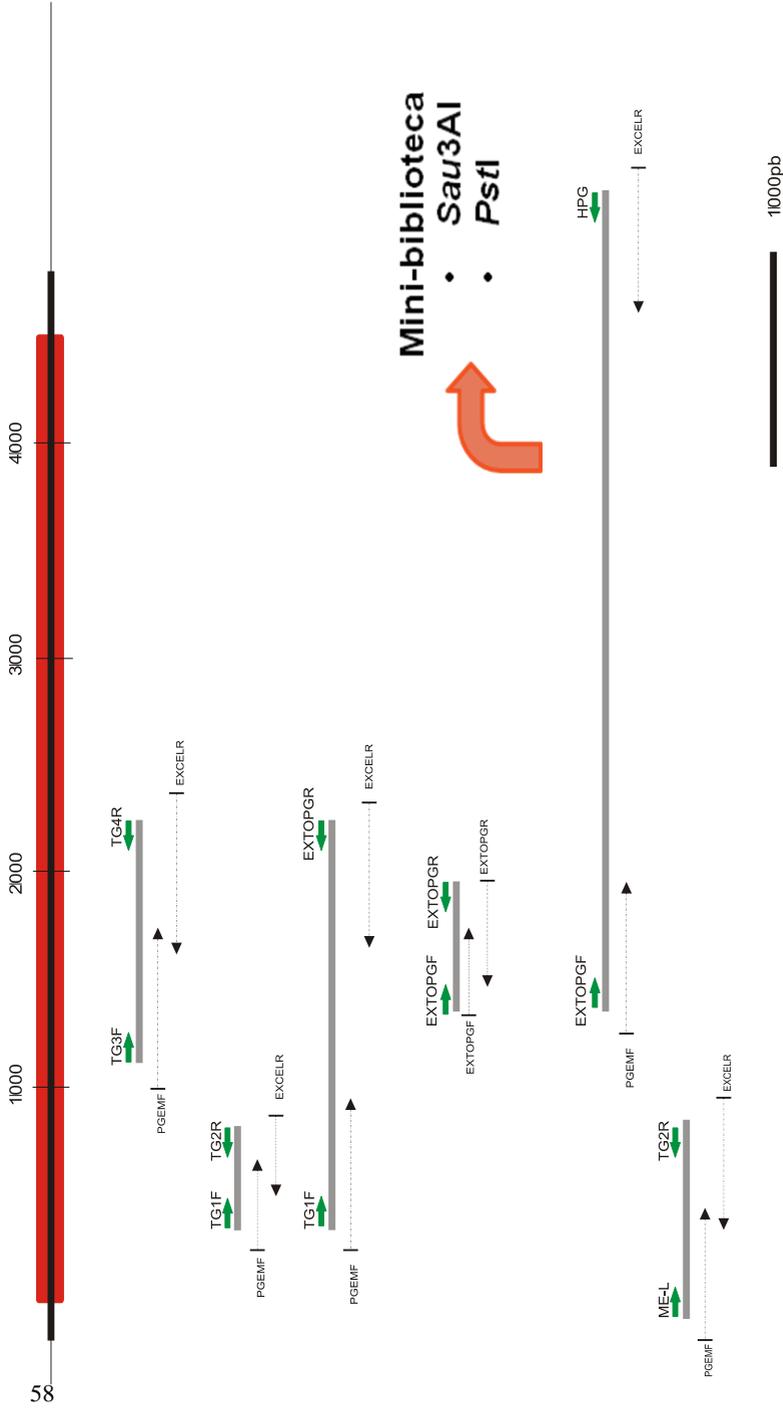
Para do fragmento EXTOPGF/HPG, de maior extensão que o anterior, foram utilizadas diferentes estratégias para sua determinação. Inicialmente, foram realizados testes com diferentes enzimas de restrição de sítio único no vetor, sendo que com as enzimas *SacI* e *NsiI* foi possível estabelecer alguns subclones. Entretanto, estes ainda eram de alto peso molecular e somente suas extremidades puderam ser sequenciadas. Visando obter fragmentos menores, duas minibibliotecas foram geradas, digerindo-se o fragmento de 4 Kb com as enzimas *Sau3AI* e *PstI* para subclonagem em vetor pUC18, visando não só a fragmentação mas também a sobreposição entre eles para o estabelecimento da sequência consenso por bioinformática. A partir das restrições com as duas enzimas foi possível obter 16 clones diferentes que foram sequenciados com os iniciadores universais M13F e M13R.

Todas as sequências obtidas para os genes *TrTop2mt* (figura 1.4) e *TrTop2a* (figura 1.5) foram submetidas separadamente a análise de qualidade e aquelas referentes a um mesmo gene foram agrupadas através do programa CAP3 para formação de suas sequências consenso.

Assim, após o agrupamento das sequências obtidas para o gene *TrTop2mt* (figura 1.6) foi possível encontrar uma fase de aberta de leitura de 3.696 pb, com conteúdo de C+G de 55%, codificando uma proteína com 1.232 aminoácidos e com uma massa molecular estimada de 138,8 kDa. Para o gene *TrTop2a* a fase aberta de leitura foi de 4.368 pb (figura 1.7), com conteúdo C+G de 56%, codificando uma proteína com 1.456 aminoácidos e com uma massa molecular estimada de 164,1 kDa.



**Figura 1.4:** Representação esquemática da estratégia de sequenciamento do gene *TrTop2mt*. A barra azul representa o quadro aberto de leitura do gene *TrTop2mt*. As setas verdes indicam os iniciadores utilizados para a obtenção do fragmento; as setas em laranja representam os sítios de restrição relacionados a subclonagem das seqüências e as setas pretas indicam as regiões sequenciadas nos respectivos clones.



**Figura 1.5:** Representação esquemática da estratégia de sequenciamento do gene *TrTop2a*. A barra vermelha representa o quadro aberto de leitura do gene *TrTop2a*. As setas verdes indicam os iniciadores utilizados para a obtenção do fragmento e as setas pretas indicam as regiões sequenciadas nos respectivos clones.

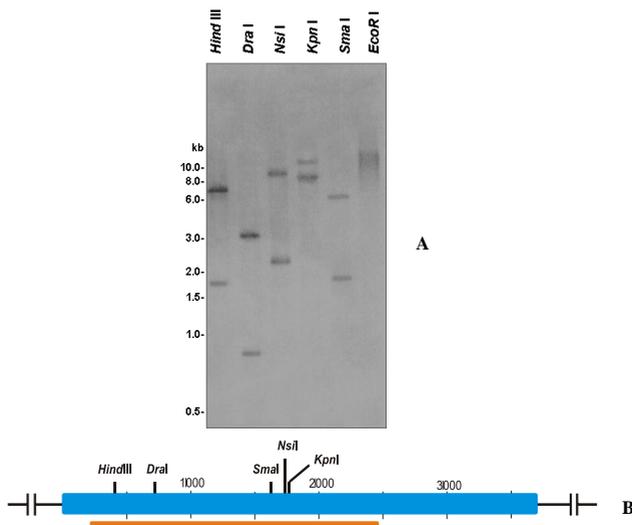
1 ATGCGGAGGCTGCAAGTACAGAAATCACCCCACTGCACATGTCCTGTCAGCGGCGAAATGACTCGGACGCTGGAGACGATCTACAGCGCATTTCTCTGCATCAGCAG  
H A E A A K V K L T P I D H V L V R P E M Y V G S V E T I S T A H F V P D H D  
121 AAGGGACAAATGGTGTGGACACATGAAGCTCAACCAAGCTCTGGAAGTGTGGACGAATCTCTCAACCGCTCGACACACTTGGAAACAAATGCTGCATAGACATCAAT  
K G R M V U D T V R K L N H G L L K V V D E I L L N A S D N L N A K S A R M T Y I  
241 CGCCTCCATCACGAETTCGGGGAAATCACTCAGAAACAGCGGCGGGCATCTCTATTTGGCGAGCAAGGACCAAGCTCCATCCCCGGAATGGVTTTGGCCACTTCTT  
R V H G I T E F G E I T I E N D G A G I P I V R S K E H K L K A E M G T F V F G H L L  
361 ACACGCTCAACTCAGCATGGAGTCACTGCACCGTGTGGGGACGGCAGGCTATGGTGGAGGTACAAATATTTGCTCCGACCGCTTCTCCGTTCTTCGCGGACGAGGGGGG  
T S S Y D D A S Q S T V A G R H G V G A K R L T N I L S H R V S V C R T K G R  
481 GAGTTCACATGACTTGGCAGATCACTGGCTGAGCGGCGGCTCGGCTGTGTCGACGGCAGTCCGAGGAGCAATGTTAAGCGGCTGTGAAGTTCGCGCATACGACGCTTC  
E F F H T U Q D H R K T A D R V S U W G D P K E K U V T R V K F P L D T V E R L  
601 GECTTCAAGAGAAACAAATTCATCAGTAAATGAACGGGTGCTTCAAGACGCTCATGATTTAGCCCACTGTCCCAAACTTGAATCTCACTAAATGGTTCCTGCTCCGCTT  
G L K E N K I S H D M K R V L H K R V H D L A A M F F N I E I S L N G V P F F G  
721 AAATCTTTCAGACTACGCTTCTGTACAGACCCCAATCGCAGTGGGGAAAGGCGCGGCGGCTTTGTGTGACGAAGTCGCAATGGCGCTATGCGTTTGTACCCCTTACT  
K S F H D Y A L L Y S T P I A G G E R P P A P F V Y E S R N G A I A F V P S L T  
841 GCGGCACTCCGTCGATCTTATGTGGTGAACGGCTCGTACGACAAATGGCGGAACCACTGCAACGGGGCAGGACATCTCACTCCCTGGATCGTGGAGGGGCGCTC  
A G I R R I F S V V N G V V T H N G G T H C N A A O D I L Q S S L E Y V E R L  
961 AAGAAAGAAACAAAGTGTGAACAAATCGTCTGCGGGCACTTACCACTCCGTTGCTTTCGCGAGTGGAGCGGAGTTGACTCGAGAAACAAAGCGGCTGTCCGTTCCGCT  
K K E A K V I D T N R V L R H F T I L V F L V Q V Q P F D S Q N R A R L V S A  
1081 CCAAGATCGCGGATGCCCAAGGAGGTCTGGAGTGTGCTGGGATGCGGATGTCGAGGACAGTGGAGGACATGACAGGCGAAGCTCGCGAGAGCGGAAAGACAT  
P T M D R V P S G E L T E F L L R M D Y L E A A V N T H T G O L A Q E L N K E I  
1201 GCGCGGGCAGCATGAGCAGGACTCCCTTATTTCACTCAACAAATATGATGACGCCACACACACTGGCGGGACGAAATGCTCCGCACTCATCTCAGBAGAGGAGC  
G A G R M S R S K B I S I T K L R V D A T T A C C R R D P K C V R T L I V T E G D  
1321 TCTCGAAGGCTCGCGCAGAACTCTTGAACAATGACCAAAACACTCAGCGGGTCTATCCGCTGGTGAATCTTTAAACGTACGAAATAAAACCTTAGACGCTTAAAAAC  
S A K A L A Q N S L T S D Q K R Y T C V Y P L R G K L L N R K N N L R R L K N  
1441 CGTAAAGTTCGAGGACTCTTCTGTGCGCTTGGACTTGGCTGGAGAGGCTCAACAGGGTCTGACGAACTGCGCTCAGGCGCTCCATGATGACCGACGAGGACGGGATGGA  
R K E L O E L F C A L G L E L E K A V Y K G A D E L R Y Q R L L M T D Q D A D G  
1561 TGGCATTAAGGGCTGTGCATCAAGCCTTTGACTGATGTGGCCTGCTGCTATCGCAACCGGGCTCATCTCATATTTTCAGCGCATTTGGAAGTGGCGTGAAGAC  
S I L K O L U I H A F E S L W D S L L I R P S L L I R P S F I S I S P S P V U K V K R R D  
1681 AAGTCAGTCACTCTTCTGATGAGTGTGACAGTGGCAGATGATGGAAGCACTGACAGCAAGTATGATAAAGTTCGGTACTTACGCGGGCAGGGG  
K S T H S F S L K E F H W O K M G N V P Y A K V Y K L G S T A A E S  
1801 AAGBAGTCTTAAAGCATGGAACAAACACACACTCGGCTTATCTGATGCAATGATCACAAGTCTGACAGGCTTTTGTACTCGAGBAGTGGATGGCTGATAGBATTGATG  
K E Y F K D M D K H T M R L M L D R N D H K L L D S V F D S Q V E U E V R K D W M  
1921 ACAAAGAAATGCCACCGGGAGGTGGAATGATCGCAGCAAAAGACACTCACCTTACGATTTGTTCACAAAGGATGTCATTTTCCCTTCCGGTAAAGCGGCGCC  
T K A N A Y T G E V D I D R S K K T L T L S D F V H K E M V H F A L A G N A R A  
2041 TTAGCAGCGGCTGGATGATTAAGCCTCAGCGGAAATTTGTGGCACTTGGCGTCAAGTATGAGGCTCAAAATGGVACAGCTCGGGTCTCGGATCTCAGAGGG  
L A H A V D G L K P S Q R K I L M A L L R R S S N E A A K V A O L S G Y T A C T C A G E G G  
2161 TCTGCTTCCAGCGGGAATGCTCTGGAAGACGATTTAAGATGGTCAAGATTTACTGCGGCAACAATTAACCTACTGTTCCGAGGGTCAATCGGTTCCGTCAG  
S A F H T G E H S L O E T I I K H A O H T T G G N H I L L V F E G O T G S R O  
2281 CAGATGGCAATGACCGACCTCGGCCACTTACAAACTTCTAGTTTTCAGCGAATTTCTCCCTAGCAGBAGTGGATCTCTGTGACTACGTTTGTGGAGAGGGGACG  
Q I G N D H A A A R Y I F T K L S S F A R I L F P S E D E S L L D V V E E G O  
2401 CAGTGGAGCAACACTGCTTCAATCTTCCGCTGCTGTCAAGCGGAGTGTGGTATGGVTTGGTTCGCGCTCAATATCCCGCTTCCACCACTTGAATTTGTGGCA  
Q V E P N H Y V I L P L L L C N G S V G I G F G A S N I P P F H P L D V S A  
2521 GCGCTGGCAGTATGATCAATGTTGAGATGCGCAAGTGTCTGCGGGCGCTTGGCTGGGCGCTGCGCTACGAGGTAATGCTCGAGTCCAGAGGGGAAATTTATCGGGCT  
A V R S M I N G E S A K V V V R R L V P W A V G Y Q G E I R R G G A E G E F I A A  
2641 GGAATTCATATGACTCGATGGCGGTGTGACGTGACGATTTGGCTGAGCGTGTAGTATGAGGCTTCGCGGGCACAQITCGACACTTGGCTGAGGAATGTGTGTCAGCGG  
G S I N T I G R V E V T S I E A A R G G I S I L A S K R D V Q C R  
2761 ATTCGCACTCTGGCGGACCACTGATGATGATGTGAGACTGACGGGGCGATAGCAGGTACGGAGTGGAGGATGGAGGCGATCTGTGGTGGAGTCTTACTACAT  
I A D D Y S N T H V D I D L E L T K S A I T Y Y E C E S E L H M L V Q R V Y I D  
2981 GGGACATCTCTCCAAAGGTTGTTCAACCCCTTGGAGGGTGACTTGGCCCTGTCTCGATGBCACTACGACGGCCTGATCTTTCAGAAAGAGCCAGCGCACTTG  
G T V F S P N G V L T P L E G D L A P V L Q W H Y D R R L D L Y K K R R O R N L  
3001 GGGCTTCTGAGGCGAATCGACGGGAGGCTCAACTTAATATTTGGAACACTTCCGAGTGGAAATATGACTTTGTCAACGCCAGGATGAACTCGTGGAGACCTTGTCC  
G L L E A E L A R E K S T L I F V N H F R S G K I D F V N A T D E S L V K T C S  
3121 AAGCTGGCATGGTGGCTGGAACGGCTGACACTATGTGCTGCGAAACCACTCACTTTTACAAAAAGCAGCTGGAGATTTAACCGCAAAATGCGGCAAAACGGAAGACCG  
K L G M V R V D D A Y D V V L T G V L R K P I T F Y T K T S L E N L N R K I G E T E K R  
3241 ATCGACAGCTCAGAGACCAACACTGTTGAGATGGTTCGAGCTGACGGCTCTCACCGGCTTTGAGGAGTCAAGAGACGGGCGTGGCGCACTTTAAGAGACGCGG  
I D K L K K T P V O R D L D E L D R F D R A F E H E K T V A R I L I E R  
3361 GTAAACCCCAACAGGATGTATGTGGACCTGCAACAGCGCGACTGACTTGGAGAGGTCAAACTCTCTCTCTGCGTGGAAAAGCGTCCAAACGGCTGAGGGTGGGAGG  
V N P P T S D V S R T L Q P R L E L E V K V S S G K G C V F P R V R V E K  
3481 TACGTGCCCGCACCAATGAAACGCTTGGGCGAGGTTGTGGTGGTGGTGGTGGCAGTGGAGGATGGCGGCTGGTGGATGATGAAAGCGGAAAGAAAG  
Y V P P P P S C P C N A T G S V G G G G G G G S V R S S A A A V V A H V K A E K K  
3601 GCGCGGAGGCAAGAGCATGCAAGATGTGTGATGTCCTTGCACGGCAAGTGGACGCTGCTCTCCAGCACTGGCTGGTTTCTTTGTA  
A A R A R S H Q K M L L D V V A R Q V A R V L P R L P U F L F \*

**Figura 1.6:** Sequência nucleotídica e aminoácídica completa do gene *TrTop2mt* de *Trypanosoma rangeli*.



### 1.4.2 Análise dos genes *TrTop2mt* e *TrTop2a* de *T. rangeli* por *Southern blot*

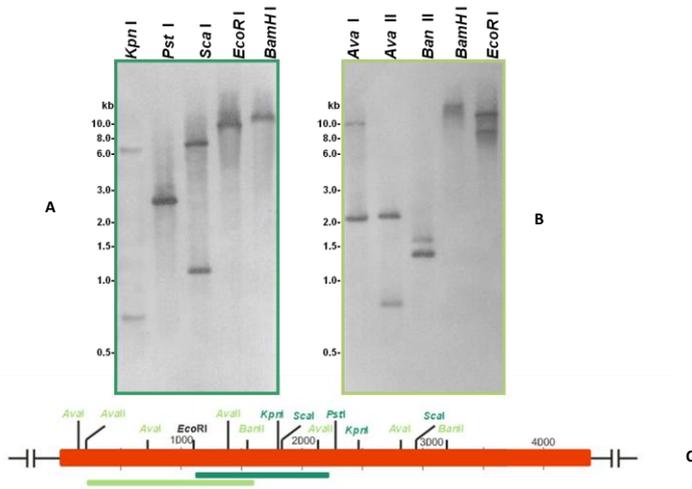
A análise do gene *TrTop2mt* por *Southern blot* (figura 1.8), revelou um padrão simples, utilizando-se como sonda o fragmento Bc7-14. Para a digestão com a enzima *EcoRI*, que não possui o sítio de clivagem dentro da sonda, foi observada uma única banda positiva. Enquanto que, para as digestões com as enzimas *HindIII*, *DraI*, *NsiI*, *KpnI* e *SmaI*, as quais possuem um sítio de clivagem dentro da sonda, foram observadas duas bandas para cada enzima.



**Figura 1.8:** (A) Análise da organização do gene *TrTop2mt* de *Trypanosoma rangeli* por *Southern blot*. Os números à esquerda da figura representam os tamanhos das bandas do marcador de peso molecular (DNA ladder 1 kb plus e DNA ladder 100 pb – New England Biolabs). (B) Mapa de restrição do gene *TrTop2mt* apontando os sítios de restrição das enzimas utilizadas. A barra azul representa o quadro aberto de leitura do gene *TrTop2mt* e a barra laranja representa a região condizente a sonda Bc7-14.

Para o gene *TrTop2a* foram realizados dois ensaios utilizando sondas diferentes (EXTOPGF/TG4R figura 1.9 A e TG1F/EXTOPGR figura 1.9 B). Ambos os experimentos apresentaram um padrão simples para análise, destacando-se as bandas únicas observadas quando o sítio de clivagem era inexistente dentro da sequência das sondas, como para as enzimas *PstI*, *EcoRI* e *BamHI* para a sonda EXTOPGF/TG4R e *BamHI* para TG1F/EXTOPGR. Para todas as demais enzimas utilizadas, as quais

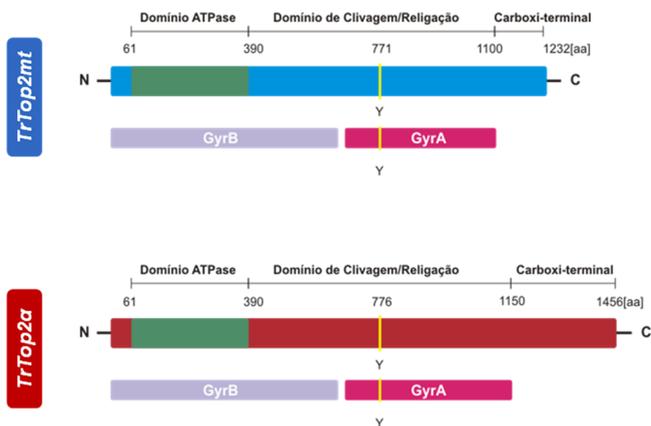
possuem sítio único de clivagem dentro das sequências das sondas, foram observadas duas bandas positivas para cada enzima.



**Figura 1.9:** Análise da organização do gene *TrTop2a* de *Trypanosoma rangeli* através de dois ensaios de *Southern blot*. Os números à esquerda da figura representam os tamanhos das bandas do marcador de peso molecular (DNA ladder 1 kb plus e DNA ladder 100 pb – New England Biolabs). (A) Análise da organização do gene *TrTop2a* por *Southern blot* utilizando a sonda EXTOPGF/TG4R. (B) Análise da organização do gene *TrTop2a* por *Southern blot* utilizando a sonda TG1F/EXTOPGR. (C). Mapa de restrição do gene *TrTop2mt* apontando os sítios de restrição das enzimas utilizadas. A barra vermelha representa o quadro aberto de leitura do gene *TrTop2a* e as barras em verde representam as regiões condizentes as sondas EXTOPGF/TG4R e TG1F/EXTOPGR.

### 1.3.3 Análise estrutural do genes *TrTop2mt* e *TrTop2a*.

A análise das sequências deduzidas de aminoácidos dos genes *TrTop2mt* e *TrTop2a* de *T. rangeli* utilizando o programa RPS-Blast visou a pesquisa no banco de dados *Conserved Domain Database* (CDD) do Genbank e apontou importantes domínios funcionais conservados entre as DNA topoisomerases do tipo II, sugeridos principalmente pela comparação com a DNA girase de *E. coli*, subunidades A e B (figuras 1.10 A e B) (SWANBERG; WANG, 1987).



**Figura 1.10:** Comparação das DNA topoisomerases II de *Trypanosoma rangeli* com as subunidades da DNA girase de *Escherichia coli*. (A) *TrTop2mt* e (B) *TrTop2α*.

A porção amino-terminal das duas enzimas é homóloga à subunidade B da DNA girase, que é responsável pela atividade ATPásica nesta enzima. A porção central apresenta homologia com a subunidade A da DNA girase, sendo possível verificar o alinhamento do resíduo de tirosina responsável pela ligação covalente que ocorre entre a molécula de DNA e a enzima, correspondendo aos resíduos Tyr<sup>771</sup> e Tyr<sup>776</sup> nas enzimas do *T. rangeli*.

As seqüências de aminoácidos dos genes *TrTop2mt* e *TrTop2α* de *T. rangeli* também foram analisadas em busca de sinais de endereçamento celular, principalmente para o núcleo e/ou mitocôndria. Através dos programas *SignalP* e *PsortII* foi possível encontrar na região correspondente a porção carboxi-terminal do gene *TrTop2mt* uma seqüência de endereçamento nuclear (993-KKRR), determinada a partir do subprograma *NUCDISC*. Já com relação ao gene *TrTop2α* várias seqüências de endereçamento nuclear puderam ser encontradas (1032-RRRK/ 1033-RRKR/ 1244-KRRR/ 1245-RRRK/ 1246-RRKR/ 1247- RKRR/ 1422-RKRR/ 1423-KRRR/ 547-PIVKARR/ 1191-PRRLRVL/ 1241-PAVKRRR/ 1418-PQVSRKR), dentre as quais três foram do tipo bipartidas (1180- RKKMEK TRPFDPRRLRV/ 1311-KRAPQKPRSAGAKRAKT/ 1409- KRAPARPKPQVSRKRR).

### 1.3.4 Análise comparativa das seqüências deduzidas de aminoácidos dos genes *TrTop2mt* e *TrTop2α* de *T. rangeli*.

As seqüências de aminoácidos dos genes *TrTop2mt* e *TrTop2α* foram confrontadas contra seqüências disponíveis no banco de dados nr

através do algoritmo *Blast*. Os resultados que apresentaram maior similaridade para cada gene podem ser observados na tabela 1.2. O gene *TrTop2mt* possui elevado grau de similaridade com seu correspondente no *T. cruzi* (96%) e *T. brucei* (88%), cerca de 80% com os demais tripanosomatídeos e de 50% com outras topoisomerases II eucarióticas. Já, o gene *TrTop2a* possui aproximadamente 85% de similaridade com os genes correspondentes em tripanosomatídeos e 60% com outras topoisomerases II eucarióticas. A comparação entre a sequência dos dois genes demonstrou que eles apresentam 36% dos aminoácidos idênticos e 56% de similaridade, relacionados basicamente aos domínios funcionais característicos das enzimas pertencentes a esta família.

**Tabela 1.2:** Porcentagens de identidade e similaridade dos genes *TrTop2mt* (A) e *TrTop2a* (B) de *Trypanosoma rangeli* com outras DNA topoisomerases II eucarióticas conforme resultados obtidos através do programa *Blastp*.

| <i>TrTop2mt</i>        | Número Acesso GenBank | Identidade/Similaridade |   |
|------------------------|-----------------------|-------------------------|---|
| <i>T. cruzi</i>        | XP_820295.1           | 91% / 96%               | A |
| <i>T. brucei</i>       | XP_803868.1           | 78% / 88%               |   |
| <i>B. culicis</i>      | AAO23340.1            | 68% / 81%               |   |
| <i>C. fasciculata</i>  | CAA42182.1            | 68% / 81%               |   |
| <i>L. braziliensis</i> | XP_001563570.1        | 68% / 81%               |   |
| <i>L. donovani</i>     | AF150876_1            | 67% / 81%               |   |
| <i>L. Infantum</i>     | AAF86355.1            | 67% / 81%               |   |
| <i>L. major</i>        | CAJ03357.1            | 67% / 81%               |   |
| <i>L. chagasi</i>      | AAC05295.2            | 66% / 80%               |   |
| <i>B. saltans</i>      | AAL99217.1            | 50% / 67%               |   |
| <i>S. cerevisiae</i>   | AF458979_3            | 32% / 51%               |   |
| <i>D. melanogaster</i> | NP_476760.1           | 36% / 53%               |   |
| <i>H. sapiens</i>      | EAW60661.1            | 32% / 51%               |   |
| <i>TrTop2a</i>         | Número Acesso GenBank | Identidade/Similaridade |   |
| <i>T. cruzi</i>        | XP_812644.1           | 85% / 89%               | B |
| <i>T. brucei alfa</i>  | ABC17641.1            | 72% / 83%               |   |
| <i>T. congolense</i>   | ABI96917.1            | 71% / 82%               |   |
| <i>T. brucei beta</i>  | ABC17642.1            | 75% / 86%               |   |
| <i>L. major</i>        | XP_001684512.1        | 69% / 82%               |   |
| <i>L. Infantum</i>     | XP_001470271.1        | 74% / 87%               |   |
| <i>L. braziliensis</i> | XP_001566276.1        | 66% / 79%               |   |
| <i>S. cerevisiae</i>   | AF458979_3            | 45% / 62%               |   |
| <i>D. melanogaster</i> | NP_476760.1           | 45% / 63%               |   |
| <i>H. sapiens</i>      | EAW60661.1            | 45% / 62%               |   |

A partir da sequência consenso de *TrTop2a* obtida a partir da cepa SC-58 de *T. rangeli*, foi desenhado um novo par de iniciadores (TopGF/TopGR) para a amplificação total da região codificante deste gene. Estes iniciadores foram então utilizados para a amplificação de *TrTop2a* na cepa Choachí de *T. rangeli*. Este produto foi então clonado e completamente sequenciado utilizando-se os iniciadores internos previamente desenhados para este gene. Para a cepa Choachí, o tamanho da região codificante foi 4.386 pb, codificando uma proteína com 1.462 aminoácidos e com massa molecular predita em 165 kDa, apresentando 98% de similaridade com a sequência obtida para a cepa SC-58, conforme alinhamento apresentado no apêndice 1.

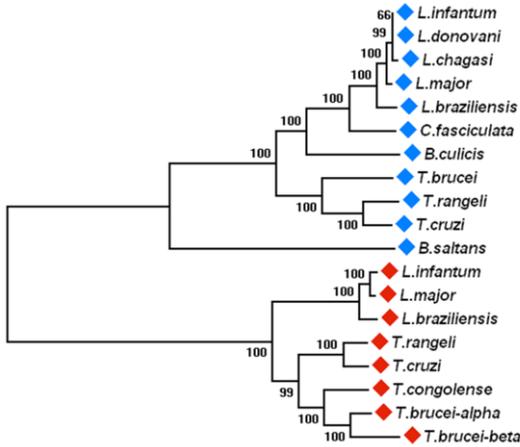
A similaridade entre as sequências de aminoácidos preditas para as duas DNA topoisomerasas II de *T. rangeli* e seus ortólogos está, em ambos os casos, dispersa por toda sequência e pode ser observada nos alinhamentos resultantes (apêndices 2 e 3), porém é menor na região carboxi-terminal dessas proteínas, sendo esta característica comum as duas DNA topoisomerasas do tipo II descritas.

A partir dos alinhamentos realizados, diferentes análises comparativas puderam ser realizadas. Inicialmente, a análise foi realizada utilizando os dois genes identificados para o *T. rangeli* e outras sequências, encontradas nos bancos de dados, referentes à DNA topoisomerasas II de membros da Ordem Kinetoplastida (figura 1.11). Esta árvore indica a separação dos dois grupos gênicos em clados distintos, cada um deles incluindo um dos genes do *T. rangeli*. Já, adicionando-se outras sequências de DNA topoisomerasas tipo II eucarióticas e procarióticas, incluindo grupos diversificados, observou-se uma maior aproximação do grupo de genes de membros da Ordem Kinetoplastida relacionado a *TrTop2a* com as demais topoisomerasas II eucarióticas, enquanto o grupo que continha o gene *TrTop2mt* mostrou proximidade com o ramo da DNA girase de *E. coli* (figura 1.12).

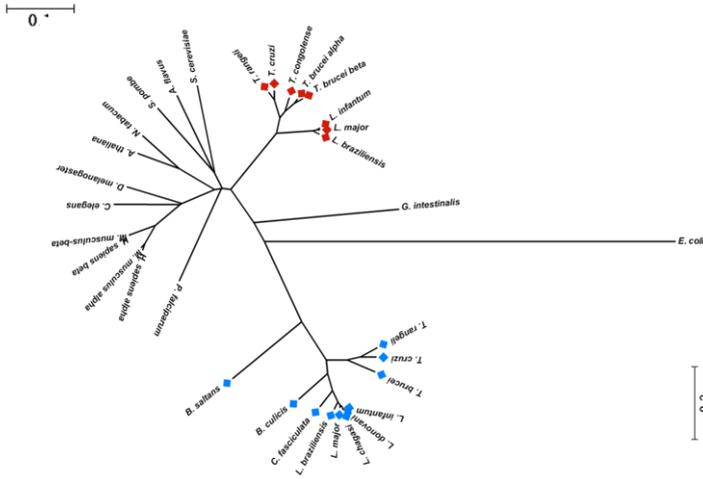
### **1.3.5 Expressão, purificação de fragmentos gênicos de *TrTop2mt* e *TrTop2a* e produção de anticorpos contra as DNA topoisomerasas II de *T. rangeli*.**

Inicialmente, com o propósito de produzir anticorpos contra as DNA topoisomerasas II de *T. rangeli* foram escolhidas para expressão heteróloga diferentes regiões correspondentes aos genes *TrTop2mt* e *TrTop2a* (figura 1.1) que codificam porções com diferentes graus de conservação entre as diferentes espécies de tripanosomatídeos, e entre as duas enzimas estudadas, buscando obter anticorpos capazes de reconhecer

as enzimas em diferentes espécies e/ou minimizar a ocorrência de uma possível reação cruzada entre as duas enzimas.



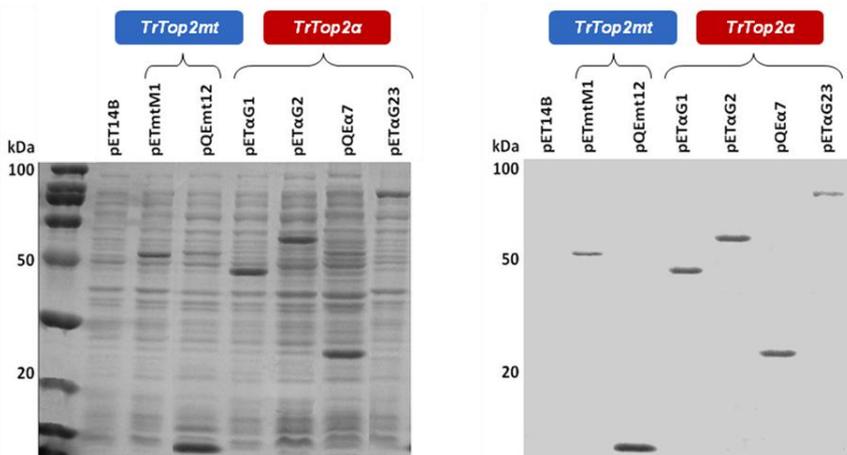
**Figura 1.11:** Árvore filogenética elaborada com as sequências de aminoácidos das DNA topoisomerases tipo II de membros da Ordem Kinetoplastida gerada através do programa MEGA 2.1 pelo método de *Neighbour-joining*. Os losangos em azul representam os genes do grupo *Top2mt* e os losangos em vermelho representam os genes do grupo *Top2a*.



**Figura 1.12:** Árvore filogenética elaborada com as sequências de aminoácidos das DNA topoisomerases tipo II de membros da Ordem Kinetoplastida gerada através do programa MEGA 2.1 pelo método *Minimum evolution*. Os losangos em azul representam os genes do grupo *Top2mt* e os losangos em vermelho representam os genes do grupo *Top2a*.

Os vetores pQE30 e pET14B propiciam a fusão dos fragmentos com uma cauda de seis histidinas e foram utilizados com o intuito de

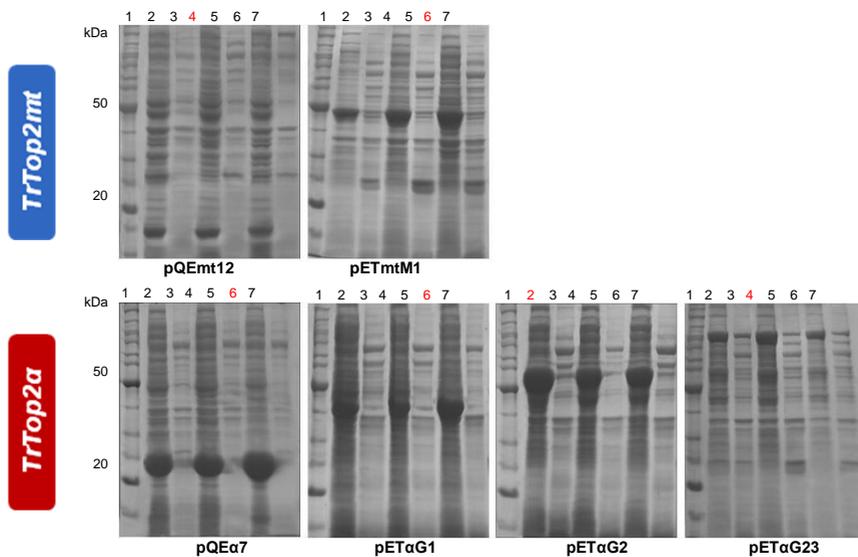
aumentar a estabilidade e facilitar a purificação das proteínas recombinantes em *E. coli*. No teste preliminar de expressão, os extratos dos clones induzidos com 1 mM de IPTG a 37°C foram analisados em SDS-PAGE, nos quais pode-se visualizar o aparecimento das bandas proeminentes correspondentes aos fragmentos protéicos de massa molecular de aproximadamente 12,1 kDa (pQE<sub>mt12</sub>) e 51,3 kDa (pET<sub>mtM1</sub>) para *TrTop2mt* e 22,7 kDa (pQE<sub>α7</sub>), 40 kDa (pET<sub>αG1</sub>), 55,3 kDa (pET<sub>αG2</sub>) e 85,3 kDa (pET<sub>αG23</sub>) para *TrTop2α* (figura 1.13 A), cujos tamanhos observados são compatíveis aos esperados teóricos e não estavam presentes nos extratos não induzidos. Estes mesmos extratos foram então analisados através de *western blot* utilizando anticorpo anti-HisTag, que confirmou a expressão de proteínas contendo uma região rica em histidinas, correspondente neste caso a cauda de histidinas de seis repetições conferida pelo vetor (figura 1.13 B).



**Figura 1.13:** Análise da expressão heteróloga das proteínas recombinantes através de gel SDS-PAGE 12% (A) e *western blot* (B), utilizando o anticorpo anti-HisTag. pET14B (Controle sem inserto), pETmtM1 (51,3 kDa), pQE<sub>mt12</sub> (12,1 kDa), pET<sub>αG1</sub> (40 kDa), pET<sub>αG2</sub> (55,3 kDa), pQE<sub>α7</sub> (22,7 kDa), e pET<sub>αG23</sub> (85,3 kDa).

Para otimizar as condições de obtenção de cada um dos fragmentos protéicos recombinantes, seus respectivos clones foram testados para a expressão proteica sob a indução em diferentes concentrações de IPTG e temperaturas de crescimento (figura 1.14). Pelo fato de que todas as proteínas foram produzidas em quantidade suficiente somente nas frações

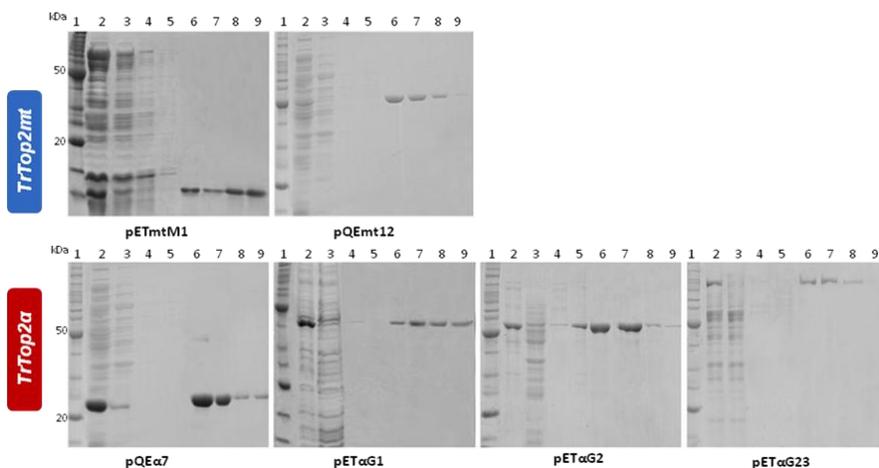
insolúveis dos extratos bacterianos, o critério utilizado para determinação da melhor temperatura a ser utilizada em cada caso foi baseada na maior expressão das proteínas recombinantes, o que foi determinado pela intensidade das bandas específicas em géis de SDS-PAGE. Para os fragmentos pETmtM1, pQE $\alpha$ 7 e pET $\alpha$ G1 a melhor temperatura para expressão foi de 37°C; para pQEmt12 e pET $\alpha$ G23 27°C e para pET $\alpha$ G2 15°C (figura 1.14).



**Figura 1.14:** Análise da expressão heteróloga sob diferentes temperaturas de indução das proteínas recombinantes através de gel SDS-PAGE 12%. 1. Padrão de peso molecular (*Benchmark protein ladder*, Invitrogen); 2. Fração insolúvel após 16 horas da indução a 15°C; 3. Fração solúvel após 16 horas da indução a 15°C; 4. Fração insolúvel após 4 horas da indução a 27°C; 5. Fração solúvel após 4 horas da indução a 27°C; 6. Fração insolúvel após 4 horas da indução a 37°C; 7. Fração solúvel após 4 horas da indução a 37°C. Em vermelho estão identificadas as melhores condições de expressão para cada proteína.

Todas as proteínas recombinantes foram purificadas (figura 1.15) em coluna agarose Ni-NTA sob condições desnaturantes, sendo a purificação bastante satisfatória em termos quantitativos para permitir a produção de anticorpos em camundongos, de acordo com uma avaliação subjetiva baseada na intensidade da coloração das bandas das proteínas expressas.

Utilizando 50 µg/dose de algumas das proteínas purificadas, foram imunizados diferentes grupos de camundongos, conforme demonstrado na tabela 1.3. Ao final do processo foram produzidos 3 antissoros e um anticorpo monoclonal com resposta específica em ensaios de *western blot* utilizando extratos protéicos totais do parasito.



**Figura 1.15:** Resultado da purificação dos fragmentos protéicos recombinantes dos genes *TrTop2mt* e *TrTop2a* em *Escherichia coli*. 1. Padrão de peso molecular (*Benchmarker protein ladder*, Invitrogen); 2. Extrato protéico bacteriano após lise celular; 3. Proteínas que não aderiram a resina; 4. Lavagem 1; 5. Lavagem 2; 6. Eluição 1; 7. Eluição 2; 8. Eluição 3; 9. Eluição 4.

**Tabela 1.3:** Relação dos diferentes anticorpos produzidos conforme o fragmento utilizado na imunização dos camundongos.

| Proteína        | Fragmento utilizado na imunização | Tipo de anticorpo produzido | Resultado |
|-----------------|-----------------------------------|-----------------------------|-----------|
| <b>TrTop2mt</b> | pQEmt12                           | Antissoro                   | Positivo  |
|                 | pQEmt12                           | Anticorpo                   | Negativo  |
|                 | pETmtM1                           | Monoclonal                  | Negativo  |
| <b>TrTop2a</b>  | pETαG1                            | Antissoro                   | Positivo  |
|                 | pQEα7                             | Antissoro                   | Positivo  |
|                 | pQEα7                             | Anticorpo                   | Positivo  |
|                 | pETαG1                            | Monoclonal                  | Positivo  |

### 1.3.6 Análise por espectrometria de massas das proteínas recombinantes

Os fragmentos protéicos recombinantes pQE<sub>mt12</sub>, pQE<sub>a7</sub> e pET<sub>αG1</sub> utilizados na imunização dos animais foram analisadas através de espectrometria de massas a fim de confirmar sua identidade como fragmentos de DNA topoisomerasas II. Os resultados obtidos estão sumarizados nas tabelas 1.4, 1.5 e 1.6 e identificaram diferentes peptídeos correspondentes a duas proteínas distintas nas três amostras pesquisadas sem ambiguidade, como sendo diferentes regiões de genes ortólogos aos genes tcr:509203.70 (KEGG) e tcr:508277.370 (KEGG) de *T. cruzi*, que codificam para duas DNA topoisomerasas II (EC 5.99.1.3).

**Tabela 1.4:** Identificação do fragmento pQE<sub>mt12</sub> correspondente a *TrTop2mt* de *Trypanosoma rangeli* por espectrometria de massas (Q4E0W1\_TRYCR, massa: 138.828 Da e escore: 131).

| Peptídeo <sup>a</sup> | Mr(expt) <sup>b</sup> | Mr(calc) <sup>c</sup> | Delta <sup>d</sup> | Escore <sup>e</sup> | Ranking <sup>f</sup> |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|---------------------|----------------------|
| R.IADYSGATHVDIDLELT.K | 1961.1764             | 1961.1565             | -0.0199            | 45                  | 1                    |
| K.GAITYAACESELMLVQ.R  | 2014.3172             | 2014.2960             | -0.0212            | 78                  | 1                    |
| K.GAITYAACESELMLVQ.R  | 2014.3106             | 2014.2960             | -0.0146            | (39)                | 1                    |
| K.GAITYAACESELMLVQ.R  | 2014.3092             | 2014.2960             | -0.0132            | (28)                | 1                    |

<sup>a</sup> Sequência de aminoácidos identificados pelo código de 1 letra; <sup>b</sup> Razão massa/carga experimental convertida em uma massa molecular relativa; <sup>c</sup> Massa molecular relativa calculada a partir do peptídeo encontrado; <sup>d</sup> Diferença (erro) entre as massas experimentais e as calculadas; <sup>e</sup> Escore de íons: Para resultados duplicados para o mesmo peptídeo, os escores mais baixos são mostrados entre parênteses. <sup>f</sup> Ranking dos íons encontrados (1 a 10, onde 1 é o melhor resultado).

**Tabela 1.5:** Identificação do fragmento pQE<sub>a7</sub> correspondente a *TrTop2a* de *Trypanosoma rangeli* por espectrometria de massas (Q4D8L4\_TRYCR, massa: 169.028 Da e escore: 159).

| Peptídeo <sup>a</sup> | Mr(expt) <sup>b</sup> | Mr(calc) <sup>c</sup> | Delta <sup>d</sup> | Escore <sup>e</sup> | Ranking <sup>f</sup> |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|---------------------|----------------------|
| K.GLGTSGAK.E          | 689,3678              | 689,3708              | -0,0030            | 28                  | 1                    |
| K.DRDYFGVFPLR.G       | 1383,6560             | 1383,6935             | -0,0375            | 53                  | 1                    |
| K.DRDYFGVFPLR.G       | 383,6726              | 1383,6935             | -0,0209            | (26)                | 1                    |
| K.DRDYFGVFPLR.G       | 1383,6742             | 1383,6935             | -0,0194            | (39)                | 1                    |
| K.DRDYFGVFPLR.G       | 1383,6838             | 1383,6935             | -0,0097            | (30)                | 1                    |
| R.AISFFSMPDYFEWK.N    | 1766,7538             | 1766,8014             | -0,0476            | 66                  | 1                    |
| R.AISFFSMPDYFEWK.N    | 1766,7754             | 1766,8014             | -0,0260            | (65)                | 1                    |
| R.AISFFSMPDYFEWK.N    | 1766,7788             | 1766,8014             | -0,0226            | (16)                | 1                    |

**Tabela 1.6:** Identificação do fragmento pET $\alpha$ G1 correspondente a *TrTop2 $\alpha$*  de *Trypanosoma rangeli* por espectrometria de massas (Q4D8L4\_TRYCR, massa: 169.028 Da e escore: 131).

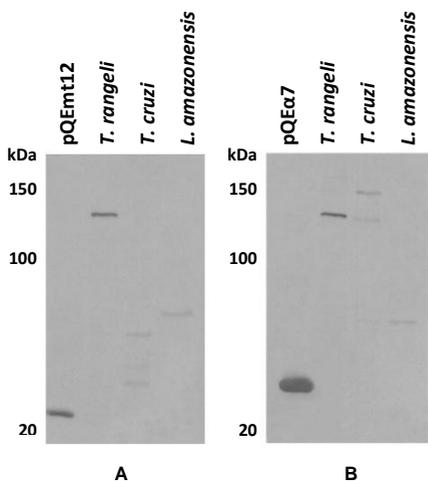
| Peptídeo <sup>a</sup>   | Mr(expt) <sup>b</sup> | Mr(calç) <sup>c</sup> | Delta <sup>d</sup> | Escore <sup>e</sup> | Ranking <sup>f</sup> |
|-------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|---------------------|----------------------|
| K.FNLQGFGEDMVHMMR.R     | 1810.7635             | 1810.7953             | -0.0318            | (14)                | 8                    |
| K.FNLQGFGEDMVHMMR.R     | 1810.7716             | 1810.7953             | -0.0237            | 45                  | 1                    |
| R.VSNIGFQQVSFVNSIATTR.G | 2067.0506             | 2067.0749             | -0.0243            | 88                  | 1                    |

### 1.3.7 Análise da expressão das DNA topoisomerases II de *T. rangeli* por western blot.

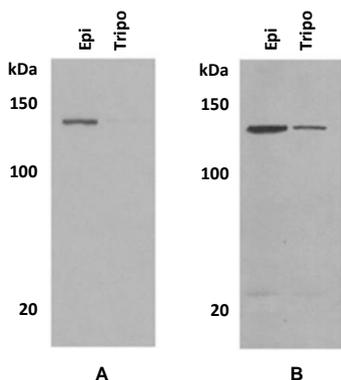
#### 1.3.7.1 Géis desnaturantes

Os antissoros e o anticorpo monoclonal obtido contra as DNA topoisomerases II de *T. rangeli* foram utilizados em ensaios de *western blot*, com o objetivo de detectar a expressão das enzimas e avaliar suas massas moleculares em extratos celulares de *T. rangeli*, bem como em extratos de outras espécies da Ordem Kinetoplastida. Inicialmente, foram obtidos e utilizados somente os antissoros produzidos contra os fragmentos pQE $\alpha$ mt12 (12,1 kDa) e pQE $\alpha$ 7 (22,7 kDa), correspondentes a *TrTop2mt* e *TrTop2 $\alpha$* , respectivamente. Estes fragmentos foram selecionados em razão de serem regiões pouco conservados entre as duas enzimas, apesar de manterem um alto grau de conservação entre as diferentes espécies da Ordem Kinetoplastida. O resultado da primeira análise mostrou que estes antissoros reconhecem especificamente polipeptídeos nos extratos protéicos totais de *T. rangeli* e de *E. coli* expressando as respectivas proteínas recombinantes (figura 1.16). Embora não reconheçam evidentemente uma proteína nos demais extratos, algumas bandas de alto peso molecular chamam a atenção sobretudo para *TrTop2 $\alpha$*  no extrato de *T. cruzi*. As proteínas reconhecidas em *T. rangeli* aparentemente são de mesmo peso molecular em aproximadamente 130 kDa, tamanho próximo ao esperado teórico para *TrTop2mt* (138 kDa) e menor que o esperado teórico para *TrTop2 $\alpha$*  (164,1 kDa).

Visando a análise da expressão diferencial destas proteínas ao longo do ciclo biológico do parasito, 50 $\mu$ g dos extratos protéicos totais de formas epimastigotas e tripomastigotas foram resolvidos por eletroforese conforme 1.3.14.1 e avaliados utilizando-se os mesmos antissoros anteriores. Assim, evidenciou-se que eles reconhecem, em ambos os casos, majoritariamente as proteínas em formas epimastigotas, sendo este efeito mais pronunciado para *TrTop2mt*, onde praticamente não há expressão da respectiva proteína nas formas infectantes (figura 1.17).

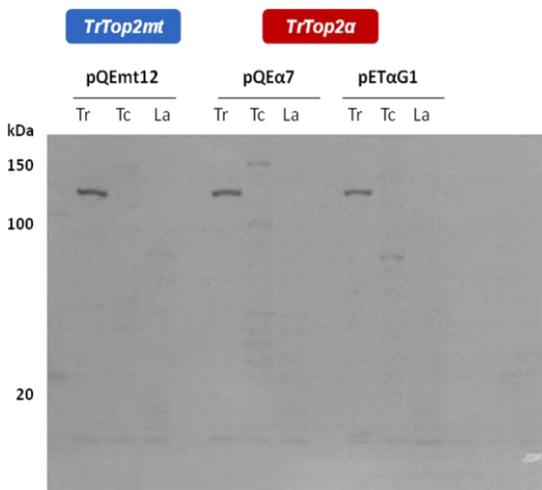


**Figura 1.16:** Análise da expressão de *TrTop2mt* (A) e *TrTop2α* (B) em extratos protéicos de diferentes espécies da Ordem Kinetoplastida e nas proteínas purificadas através de ensaios de *western blot* utilizando os anticorpos contra *TrTop2mt* (pQE<sub>mt</sub>12) e *TrTop2α* (pQE<sub>α</sub>7).



**Figura 1.17:** Análise da expressão de *TrTop2mt* (A) e *TrTop2α* (B) em extratos protéicos de formas epimastigotas (Epi) e tripomastigotas (Tripo) de *Trypanosoma rangeli* por *western blot* utilizando os anticorpos contra *TrTop2mt* (pQE<sub>mt</sub>12) e *TrTop2α* (pQE<sub>α</sub>7).

Pelo fato do reconhecimento ser aparentemente de proteínas de mesmo peso molecular para ambos os anticorpos, um novo anticorpo para a proteína *TrTop2α* foi produzido a partir do fragmento pET $\alpha$ G1 (40 kDa), que corresponde a uma região mais conservada da enzima entre as diferentes espécies. Entretanto, apesar da utilização deste diferente anticorpo, uma banda de mesmo tamanho das obtidas anteriormente utilizando os outros anticorpos foi detectada no extrato total de *T. rangeli*, e somente bandas com fraca intensidade nos extratos de *T. cruzi* e *L. amazonensis* (figura 1.18).

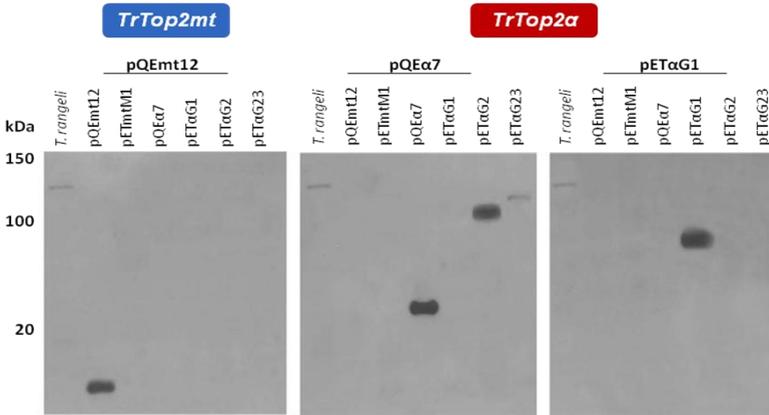


**Figura 1.18:** Análise da expressão de *TrTop2mt* e *TrTop2a* em extratos protéicos de diferentes espécies da Ordem Kinetoplastida por *western blot* utilizando os antissoros contra *TrTop2mt* (pQEmt12), *TrTop2a* (pQEa7) e *TrTop2a* (pETaG1). TR- Extrato protéico total de *Trypanosoma rangeli*; TC- Extrato protéico total de *Trypanosoma cruzi*; LB- Extrato protéico total de *Leishmania amazonensis*; Neg- Controle utilizando o soro dos camundongos antes da imunização.

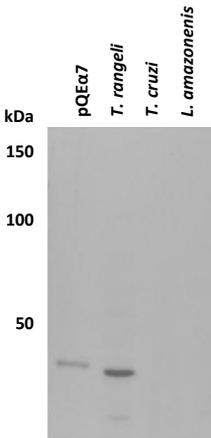
Para verificar se estaria acontecendo o reconhecimento de uma mesma proteína por todos os antissoros foi realizado um novo *western blot* contendo todos os diferentes fragmentos recombinantes produzidos para ambas as enzimas (figura 1.19), visando a possibilidade de reconhecimento dos mesmos fragmentos por todos os antissoros. Como resultado, não foi observado qualquer tipo de reconhecimento cruzado destes antissoros entre os fragmentos das diferentes enzimas e nem entre fragmentos de regiões sem similaridade na mesma enzima.

Posteriormente, anticorpos monoclonais contra as duas enzimas começaram a ser produzidos visando aumentar a especificidade e responder quanto a presença de uma ou duas proteínas distintas sendo reconhecidas no extrato protéico total de *T. rangeli*. Para tal, a combinação de dois fragmentos protéicos para cada enzima foram utilizados na imunização de dois grupos de camundongos e na triagem dos hibridomas obtidos. Após as primeiras triagens, que apresentavam vários grupos de células positivos para a produção de anticorpos contra ambas as enzimas, somente três clones, correspondentes a enzima *TrTop2a*, foram obtidos ao final de duas diluições limitantes. Estes anticorpos foram testados em ensaios de *western blot* e apresentaram resultados semelhantes, sendo somente o de maior título utilizado nos demais experimentos, denominado *TrTop2a10B*. Este anticorpo foi capaz de reconhecer especificamente a proteína recombinante pQEa7 (22,7

kDa) e uma proteína de aproximadamente 20 kDa no extrato protéico de *T. rangeli* (figura 1.20).



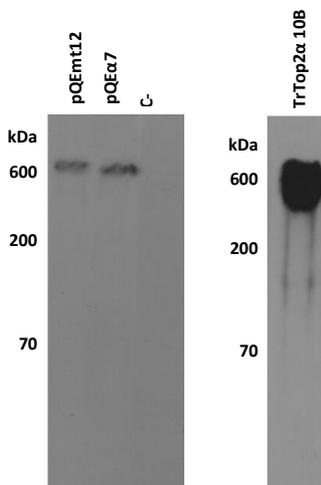
**Figura 1.19:** Análise da detecção dos antissoros contra *TrTop2mt* (pQEmt12), *TrTop2a* (pQEα7) e *TrTop2a* (pETαG1) frente a extratos protéicos totais do *Trypanosoma rangeli* e os fragmentos protéicos recombinantes purificados.



**Figura 1.20:** Análise da expressão de *TrTop2a* em extratos protéicos de diferentes espécies da Ordem Kinetoplastida e na proteína purificada por *western blot* utilizando o anticorpo monoclonal *TrTop2a*10B.

### 1.3.7.2 Géis não-desnaturantes

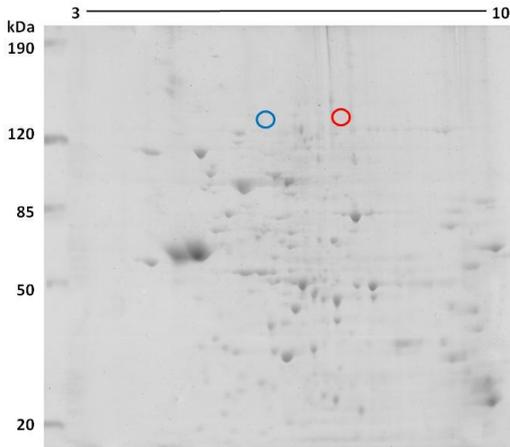
Os antissoros contra *TrTop2mt* (pQE $\alpha$ 12) e *TrTop2 $\alpha$*  (pQE $\alpha$ 7) e o anticorpo monoclonal também foram testados em *western blot* mantendo as condições nativas das proteínas, onde foi possível observar o reconhecimento de uma banda >600 kDa em todos os casos (figura 1.21).



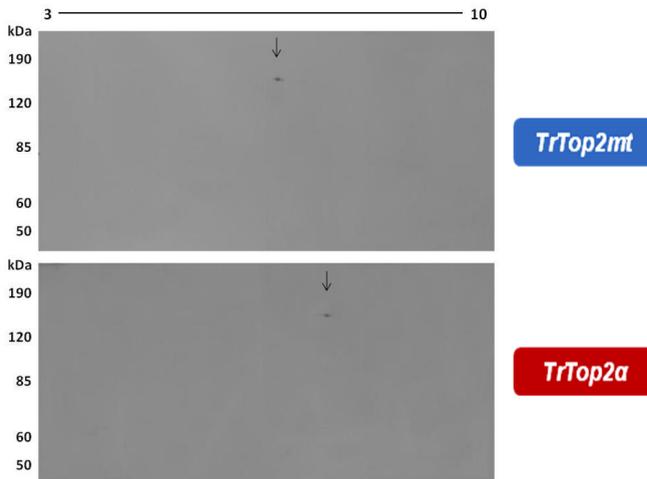
**Figura 1.21:** Análise da expressão de *TrTop2mt* e *TrTop2 $\alpha$*  em extrato protéico total de formas epimastigotas de *Trypanosoma rangeli* em através de *western blot*, utilizando os antissoros contra *TrTop2mt* (pQE $\alpha$ 12) e *TrTop2 $\alpha$*  (pQE $\alpha$ 7) e o anticorpo monoclonal *TrTop2 $\alpha$ 10B*, realizado a partir de eletroforese unidimensional em condições não desnaturantes.

### 1.3.7.2 Gel bidimensional

Através de eletroforese bidimensional do extrato protéico de formas epimastigotas de *T. rangeli* foi possível visualizar o perfil de proteínas expressas por este parasito, caracterizando-se uma maior concentração de proteínas numa faixa de pH entre 4,5-8,0 e tamanho entre 30 e 120 kDa (figura 1.22). Foi possível identificar através de *western blot* a localização no mapa protéico das proteínas identificadas pelos antissoros contra os fragmentos pQE $\alpha$ 12 e pQE $\alpha$ 7 (figura 1.22 e 1.23). Assim, a partir da sobreposição dos *spots*, foi possível identificar para *TrTop2mt* uma proteína de aproximadamente 132 kDa e ponto isoelétrico (pI) de 6,4 e para *TrTop2 $\alpha$*  uma proteína com cerca de 137 kDa e pI de 7,6. Conforme o programa *ProtParam* o ponto isoelétrico teórico para *TrTop2mt* seria de 9,52 e 7,35 para *TrTop2 $\alpha$* .



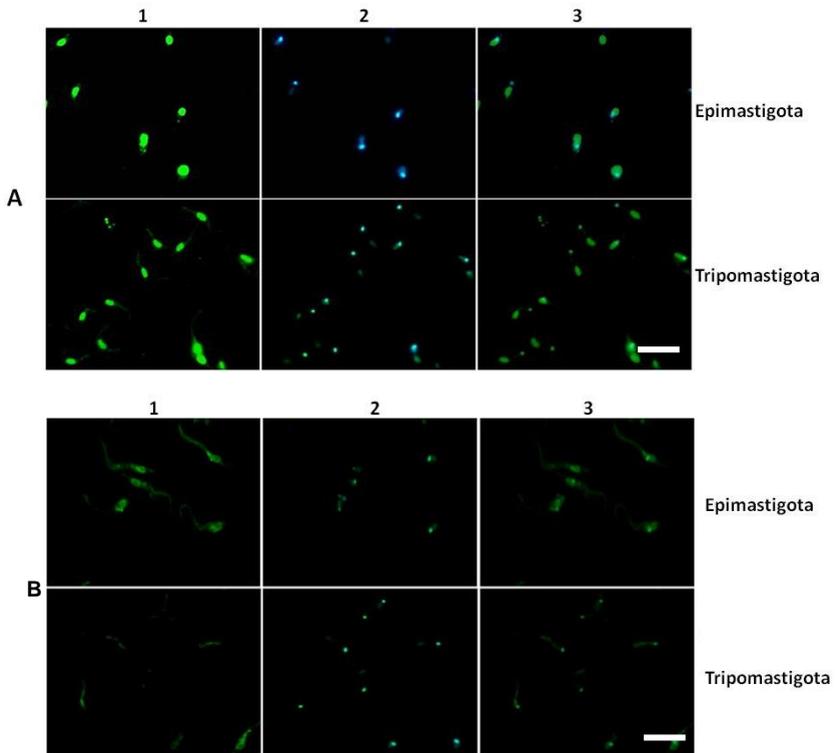
**Figura 1.22:** Eletroforese bidimensional de extrato protéico total de *Trypanosoma rangeli* corado com azul de coomassie R-250. A barra superior indica a faixa de pH (3-10) utilizada na separação das proteínas. Os círculos azul e vermelho correspondem ao local no gel onde as proteínas *TrTop2mt* e *TrTop2a* foram identificadas por *western blot*, respectivamente.

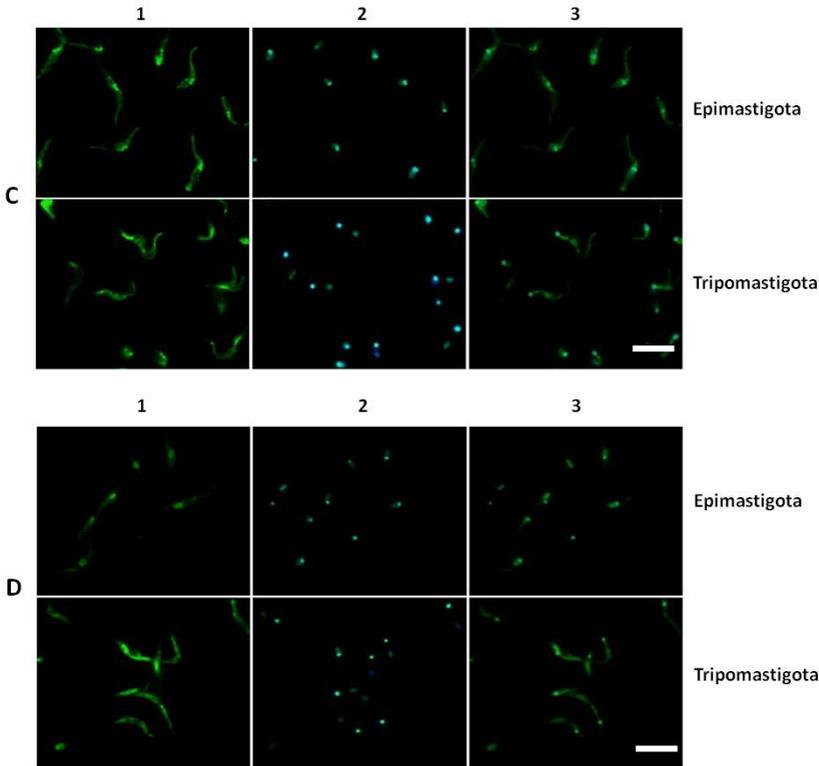


**Figura 1.23:** Análise da expressão de *TrTop2mt* e *TrTop2a* em extrato protéico total de formas epimastigotas de *Trypanosoma rangeli* em através de *western blot* realizado a partir de eletroforese bidimensional. As setas indicam os spots reconhecidos pelos respectivos anticorpos. A barra superior indica a faixa de pH (3-10) utilizada na separação das proteínas.

### 1.3.8 Localização celular das DNA topoisomerasas II de *T. rangeli*

Diferentes anticorpos foram utilizados em ensaios de imunofluorescência indireta, visando detectar o(s) sítio(s) de expressão preferencial e de atividade das DNA topoisomerasas II no parasito, bem como avaliar a expressão diferencial entre as distintas formas existentes no ciclo biológico de *T. rangeli* (figura 1.24). Além do anticorpo monoclonal *TrTop2 $\alpha$ 10B* e dos antissoros contra *TrTop2mt* (pQE $\alpha$ 12) e *TrTop2 $\alpha$*  (pQE $\alpha$ 7), o soro anti-*TcTop2mt* (gentilmente cedido pelo Prof. Stenio Perdigão Fragoso-ICC/FioCruz) também foi utilizado na investigação da localização celular de *TrTop2mt* em *T. rangeli*.



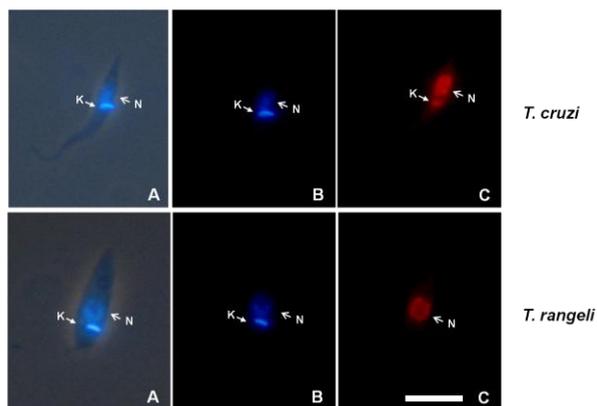


**Figura 1.24:** Imunolocalização de *TrTop2mt* e *TrTop2a* em formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma rangeli* através de ensaios de imunofluorescência. (A) Soro Anti-*TcTop2mt*; (B) Soro Anti-*TrTop2mt* (pQE $\alpha$ 12); (C) Soro Anti-*TrTop2a* (pQE $\alpha$ 7); (D) Anticorpo Monoclonal *TrTop2a*10B. As imagens representam microfotografias da expressão da proteína (1), núcleo e cinetoplasto corados com DAPI (2) e a sobreposição das imagens (3). As barras em branco representam 10 $\mu$ m.

Foi possível detectar para o soro anti*TcTop2mt* uma localização nuclear de mesma intensidade em ambas as formas do parasito. Para o antissoro contra *TrTop2mt* (pQE $\alpha$ 12) observa-se uma marcação mais evidente no núcleo e possivelmente no cinetoplasto em formas epimastigotas, e uma localização difusa não relacionada a presença destas organelas nas formas tripomastigotas. O antissoro contra *TrTop2a* (pQE $\alpha$ 7), apresentou em ambas as formas uma marcação difusa no citoplasma acompanhada por uma região com alta expressão bem definida bastante próxima ao cinetoplasto. O anticorpo monoclonal

*TrTop2a10B* foi capaz de reconhecer uma região provavelmente nuclear em formas epimastigotas e uma marcação difusa no citoplasma nas formas tripomastigotas.

O soro anti-*TcTop2mt* também foi utilizado para comparação da localização celular de *TrTop2mt* entre *T. rangeli* e *T. cruzi*. Este reconheceu um antígeno exclusivamente nuclear no *T. rangeli*, enquanto antígenos no núcleo e no cinetoplasto foram evidentes para o *T. cruzi* (figura 1.25).



**Figura 1.25:** Imunolocalização de *TrTop2mt* em *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi* por ensaio de imunofluorescência indireta, utilizando o soro anti-*TcTop2mt*. (A) e (B): Microfotografias mostrando a marcação do núcleo (N) e cinetoplasto (K) com DAPI e (C): Imunolocalização da expressão de *TrTop2mt*. A barra em branco representa 10 $\mu$ m.

Todos os resultados de imunofluorescência serão ainda reavaliados por microscopia confocal, utilizando-se conjuntamente outros marcadores celulares.

## 1.4 DISCUSSÃO

As DNA topoisomerases desempenham papéis fundamentais na manipulação da topologia da molécula de DNA, sendo essenciais nos processos de replicação, transcrição, recombinação e segregação dos cromossomos (CHAMPOUX, 2001). Nos protozoários da Ordem Kinetoplastida as DNA topoisomerases além de desempenharem seu papel no metabolismo do DNA nuclear são fundamentais no processo de replicação e na organização do kDNA (SHAPIRO; ENGLUND, 1995; WANG; ENGLUND, 2001). Tais enzimas liberam os minicírculos da rede de kDNA para que estes sofram replicação como moléculas livres, participam da segregação dos minicírculos recém sintetizados e religam os mesmos a periferia da rede. As DNA topoisomerases também participam no ancoramento do complexo à membrana mitocondrial e na segregação da rede de kDNA após a replicação (SHAPIRO; ENGLUND, 1995). Embora DNA topoisomerases II já tenham sido purificadas (DOUC-RASY et al., 1986b; CHAKRABORTY; MAJUMDER, 1987; MELENDY; RAY, 1989) e caracterizadas (STRAUSS; WANG, 1990; FRAGOSO; GOLDENBERG, 1992; PASION et al., 1992; DAS et al., 2001; GAZIOVA; LUKES, 2003; HANKE et al., 2003; KULIKOWICZ; SHAPIRO, 2006; LOURENCO et al., 2006) em diversos membros da Ordem Kinetoplastida muito pouco é conhecido a respeito das características destas proteínas.

As sequências de nucleotídeos obtidas para os genes *TrTop2mt* e *TrTop2a* e suas sequências deduzidas de aminoácidos revelaram poucas diferenças do descrito na literatura. O gene *TrTop2mt* apresenta um quadro aberto de leitura com 3.696 pb que codifica um polipeptídeo com 1.232 resíduos de aminoácidos (138,8 kDa), enquanto o gene *TrTop2a* possui uma ORF de 4.368 pb, codificando uma proteína com 1.456 aminoácidos (164,5 kDa). O tamanho dos genes é bastante similar ao observado em outros tripanosomatídeos, sendo a maior variação encontrada para os genes relacionados a *TrTop2a*. Esta variação também pode ser observada intraespecificamente na comparação entre as sequências completas obtidas para as cepas SC-58 e Choachí. Embora apresentem 98% de similaridade a nível de aminoácidos, a sequência do gene *TrTop2a* na cepa Choachí apresenta uma inserção de 6 aminoácidos na posição 1.442, correspondente a porção carboxi-terminal que também é extremamente variável em todos os ortólogos.

As sequências de ambos os genes provavelmente não são interrompidas por íntrons, como é observado para todos os genes de topoisomerases descritos para tripanosomatídeos, além de que esta é uma

das características deste grupo, onde grande parte dos genes transcritos não possui íntrons (PALENCHAR; BELLOFATTO, 2006).

Também de maneira similar a ortólogos descritos, o gene *TrTop2mt* possui cópia única no genoma do *T. rangeli*. Entretanto, diferentemente da duplicação observada em *T. brucei* (*TbrTop2α* e *TbrTop2β*) por KULIKOWICZ e SHAPIRO (2006), o gene *TrTop2α* também encontra-se como cópia única para o *T. rangeli*. A duplicação gênica no *T. brucei* é sequencial, ou seja, *TbTop2α* localiza-se anteriormente, estando separado de *TbTop2β* por uma região inter-gênica de ~1,7 Kb e, embora as duas cópias apresentem alta identidade, cerca de 74%, elas constituem um gene funcional e um pseudogene. Os mRNA correspondentes aos dois genes podem ser observados em ensaios de *northern blot*, mas somente uma enzima funcional pode ser detectada através de *western blot*. A avaliação da presença desta duplicação também foi averiguada por *Southern blot* em *T. brucei*, utilizando como sonda um fragmento correspondente a região de maior similaridade entre as duas cópias gênicas. Assim, utilizamos para hibridização duas sondas distintas sendo uma delas correspondente a mesma região no gene do *T. rangeli*, denominada “*linker*”. Este ensaio permitiu verificar, com ambas as sondas, um padrão sugestivo de cópia única.

Este resultado é contrário as especulações apontadas por KULIKOWICZ e SHAPIRO (2006) onde genes duplicados como vistos para *T. brucei* deveriam estar presentes nos outros membros deste gênero. A presença dos transcritos para os genes  $\alpha$  e  $\beta$  foi testada em outras cepas e espécies de tripanosomatídeos (*T. brucei brucei* cepa MiTAT 1.2, *T. brucei brucei* cepa TREU 927, *T. brucei brucei* cepa TATDK6-1, *T. brucei gambiense*, *T. equiperdum*, *L. donovani* e *C. fasciculata*). Entretanto, somente nas espécies do gênero *Trypanosoma* foi possível detectar os dois transcritos de tamanhos semelhantes, mas com diferenças quantitativas principalmente com relação ao gene  $\beta$ . Como a sonda de *T. brucei* não hibridizou com *L. donovani* e *C. fasciculata*, foi utilizada uma sonda relacionada ao gene de *L. major*, que permitiu detectar uma banda de 5,8 Kb em *L. donovani* e ~6 Kb em *C. fasciculata*.

Analisando as sequências genômicas na busca por ortólogos de *TbrTop2α* e *TbrTop2β*, para *L. major* somente uma sequência diferente do denominado mitocondrial já caracterizado foi encontrada. Em *T. cruzi*, também observou-se uma situação diferente do encontrado no *T. brucei* e embora dois genes ainda não caracterizados tenham sido encontrados, eles compartilham cerca de 98% de identidade a nível de aminoácidos e

parecem ser alelos do mesmo gene ao invés de isoformas  $\alpha$  e  $\beta$ . Além disso, comparando as sequências deduzidas de aminoácidos, o gene *Top2a* de *T. rangeli* apresenta 85% de similaridade com estes ortólogos encontrados no *T. cruzi*, contra 72% no *T. brucei*.

Ensaio de *northern blot* na tentativa de confirmar os dados obtidos para o *T. rangeli* no *Southern blot* foram realizados através da utilização do kit *ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System* (GE Healthcare, Buckinghamshire), entretanto apesar do RNA ser detectado no gel e na membrana, após a transferência, a falta de sensibilidade inerente a esta metodologia não permitiu a detecção de nenhuma banda após a revelação (dados não mostrados). Esta questão também pode ter sido agravada pelo fato de que a expressão de mRNA a partir dos genes que codificam as DNA topoisomerases começa antes da fase S do ciclo celular e seus níveis rapidamente declinam durante a fase S, sendo para *C. fasciculata* os níveis máximos de mRNA de topo II obtidos aproximadamente uma hora antes da síntese de DNA (HINES; RAY, 1997). Embora, o tamanho do transcrito de cada gene não tenha sido obtido, a presença de mRNA correspondentes a ambos os genes puderam ser evidenciados indiretamente através de RT-PCR, utilizando tanto na transcrição reversa quanto na amplificação posterior iniciadores específicos para cada gene. Na caracterização da DNA topoisomerase II mitocondrial de *B. saltans* após vários esforços para a detecção do mRNA por *northern blot* sem sucesso, a confirmação da transcrição do gene foi realizada via RT-PCR (GAZIOVA; LUKES, 2003), assim como para *Giardia lamblia* (HE et al., 2005).

As sequências deduzidas de aminoácidos dos dois genes obtidos para o *T. rangeli* foram analisadas para a busca de sinais de endereçamento celular (núcleo e/ou mitocôndria). Inicialmente, foi efetuada uma busca do sinal necessário para dirigir estas proteínas para a mitocôndria. Esse sinal é gerado por uma pequena sequência de aminoácidos, geralmente na região amino-terminal ou próxima desta, conhecida como pré-sequência. A pré-sequência para mitocôndria se caracteriza por: (1) serem regiões ricas em aminoácidos básicos e hidroxilados, (2) ausência de aminoácidos ácidos (3) serem regiões anfífilas (VERNER; SCHATZ, 1988; WIEDEMANN; FRAZIER; PFANNER, 2004). Essas pré-sequências são normalmente removidas por uma metaloprotease após a entrada da proteína na mitocôndria (EILERS et al., 1988). As análises das regiões amino terminais de ambos os genes de DNA topoisomerase II não evidenciaram tais características.

Assim como as proteínas mitocondriais, o transporte de proteínas nucleares é mediado por sequências sinais, conhecidas como sinais de localização celular ou NLS (do inglês *Nuclear Localization Signals*). Muitas NLS já foram identificadas, mas nenhum consenso emergiu entre elas, sugerindo que a forma e a carga dos aminoácidos e não sua sequência primária são importantes para o reconhecimento do sinal (DINGWALL; LASKEY, 1991; GARCIA-BUSTOS; HEITMAN; HALL, 1991). Contudo, as NLS possuem algumas características importantes (1) curtas sequências de aminoácidos básicos [lisina (K) ou arginina (R)], (2) expostos na superfície da proteína a fim de serem reconhecidos por receptores, (3) não removidos após a translocação da proteína e (4) simples ou múltiplas NLS em uma dada proteína, não localizados necessariamente em uma das extremidades. As NLS podem ser divididas em duas classes: (1) NLS do tipo encontrado no antígeno-T do vírus SV-40 constituídas por apenas uma pequena sequência de aminoácidos básicos (PKKKRKV) e (2) NLS bipartida constituída de dois domínios básicos independentes. O primeiro domínio (lado N-terminal da sequência) é composto de pelo menos dois resíduos básicos, seguidos de uma região espaçadora de tamanho e composição variáveis, que por sua vez é seguida pelo segundo domínio básico que contém pelo menos cinco resíduos dos quais três são básicos (ROBBINS et al., 1991). Esse tipo de sinal é encontrado em um grande número de proteínas nucleares, entre elas a nucleoplasmina, fatores de transcrição, polimerases, receptores para hormônios esteróides e topoisomerases (DINGWALL; LASKEY, 1991).

Sinais de localização nuclear foram detectados nas sequências dos dois genes das DNA topoisomerases II de *T. rangeli*, sendo que enquanto para o gene *TrTop2mt* somente uma sequência pequena de aminoácidos básicos foi encontrada, 12 pequenas sequências e três do tipo bipartidas foram detectadas para o gene *TrTop2a*. Estudos com a *Top2mt* de *L. donovani* (SENGUPTA et al., 2003) e *B. culicis* (LOURENCO et al., 2006) mostram NLS bipartidas similares as que ocorrem para a topoisomerase II de *S. cerevisiae*, sendo que a sequência localizada no carboxi-terminal da enzima é comprovadamente necessária para o seu transporte ao núcleo. A presença de NLS na porção carboxi-terminal da *TrTop2a* está de acordo com estudos realizados com topoisomerases II nucleares de *H. sapiens*, *D. melanogaster* e *S. cerevisiae* (CRENSHAW; HSIEH, 1993; CARON; WATT; WANG, 1994; JENSEN et al., 1996). Normalmente, as regiões carboxi-terminais de topoisomerases tipo II eucarióticas também contêm muitos elementos regulatórios, como sítios de fosforilação e domínios de

dimerização. A fosforilação de regiões que flanqueiam as sequências sinais é uma das formas de modular a velocidade de entrada da proteína no núcleo aumentando a velocidade do transporte (SENGUPTA et al., 2003).

Um número importante de características identificadas em *TrTop2mt* e *TrTop2a* são encontradas de forma bastante conservada em outras topoisomerases tipo II, tais como o resíduo de Glicina (Gly<sup>138</sup>-*TrTop2mt* e Gly<sup>142</sup>-*TrTop2a*) homólogo ao encontrado no domínio ATPase da subunidade B da DNA girase de *E. coli*, localizado no motivo típico conservado TEGSAKA, e o resíduo de tirosina (Tyr<sup>771</sup>-*TrTop2mt* e Tyr<sup>775</sup>-*TrTop2a*) correspondente ao resíduo do sítio ativo para a clivagem e religação do DNA.

De maneira geral, as sequências de aminoácidos deduzidas de *TrTop2mt* e *TrTop2a* apresentaram homologia significativa com as subunidades A e B da DNA girase de *E. coli* (HIGGINS et al., 1978). De fato, a região compreendendo os resíduos de aminoácidos 61 a 390, em ambas as proteínas do *T. rangeli*, é homóloga a subunidade B da DNA girase, responsável pela atividade ATPásica dessa enzima, enquanto que a homologia com a subunidade A da DNA girase, que é responsável pelas reações de quebra e religação das fitas do DNA, é restrita às respectivas porções centrais. Dentro desta porção o alinhamento do resíduo de tirosina responsável pela ligação covalente da girase (HOROWITZ; WANG, 1987) com os resíduos Y<sup>771</sup> e Y<sup>775</sup> em *TrTop2mt* e *TrTop2a* sugere que nas duas enzimas do *T. rangeli* esse resíduo possa ter a mesma função.

A homologia com as subunidades de *E. coli* é consistente com a observação de que inibidores de topoisomerases II bacterianas tais como a novobiocina e o ácido nalidíxico podem inibir a atividade de topoisomerases do tipo II de tripanosomatídeos. Este dado reforça a suposição de que a inibição de uma topoisomerase do tipo II por essas drogas pode levar ao bloqueio da proliferação celular e modificações ultra-estruturais no cinetoplasto dos tripanosomatídeos (GONZALES-PERDOMO et al., 1990; CAVALCANTI et al., 2004).

Quando sequências proteicas das DNA topoisomerases de protozoários são comparadas com seus homólogos humanos elas também parecem compartilhar muitas características, entretanto observações detalhadas revelam que muitas diferenças podem existir, sendo estas suficientes para o desenvolvimento de fármacos específicos contra elas. O alinhamento das sequências das topoisomerases tipo II eucarióticas tem revelado uma grande conservação na região amino-terminal destas enzimas, sendo que esta diminui à medida que se aproxima da região carboxi-terminal (SENGUPTA et al., 2003). Esta região somente apresenta

similaridade em espécies altamente relacionadas, como no caso do *T. rangeli* e *T. cruzi*. No alinhamento das sequências de DNA topoisomerases II encontradas para membros da ordem Kinetoplastida observa-se uma homologia alta nos primeiros  $\frac{3}{4}$  das sequências a partir do amino-terminal, diminuindo bruscamente no  $\frac{1}{4}$  restante das sequências que corresponde ao domínio carboxi-terminal das proteínas.

Uma análise filogenética foi realizada com base no alinhamento das sequências de DNA topoisomerases II encontradas para membros da Ordem Kinetoplastida, revelando a formação de dois clados distintos, nos quais é possível evidenciar uma distinção interespecífica, além da confirmação topológica da posição de *B. saltans* na base de um dos clados, reforçando sua antiga separação na Ordem Kinetoplastida. Neste grupo a posição taxonômica do *T. rangeli* tem sido bastante controversa. O *T. rangeli* atualmente está classificado dentro do grupo Stercoraria, que inclui os tripanossomas transmitidos através das fezes, apesar de que a inoculação é sua forma principal de transmissão, assim como os representantes do grupo Salivaria (GRISARD et al., 1999). Neste trabalho, a proximidade com o *T. cruzi* pertencente ao grupo Stercoraria é reforçada pelas análises dos dois genes estudados.

Como todos os genes de DNA topoisomerases II codificam para enzimas ubíquas e suas análises comparativas podem formar uma forte base para filogenia molecular (DAS et al., 2004) uma nova análise filogenética foi realizada incluindo outras sequências de aminoácidos de DNA topoisomerases II. Esta análise agrupou novamente, em um único clado, todas as sequências primariamente descritas como topoisomerases mitocondriais da Ordem Kinetoplastida, incluindo a *TrTop2mt*. Já, a *TrTop2a*, as duas DNA topoisomerases descritas para *T. brucei* e aquelas identificadas nos dados genômicos de *T. cruzi*, *T. congolense*, *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* foram agrupadas em outro clado fortemente associado com as enzimas eucarióticas e predominantemente nucleares. Notavelmente, a maioria destes genes nucleares radiam de uma região bastante aproximada, possivelmente implicando em uma origem ancestral comum. Em contraste, os genes identificados inicialmente nos tripanosomatídeos estão agrupados a uma distância significativa desta “região eucariótica” e posicionados próximos ao ramo da DNA girase, sugerindo uma maior relação com as enzimas tipo II procarióticas.

A maior compreensão destes diferentes grupos gênicos que codificam para DNA topoisomerases do tipo II nestes parasitos, incluindo suas análises filogenéticas, permite a exploração de importantes linhas de

informação. Estes dados podem, por exemplo, fornecer a fonte que estava faltando para uma atividade nuclear específica de uma das enzimas, o que era especulado, mas não compreendido para os estes parasitos.

Com o intuito de analisar a expressão das DNA topoisomerases II de *T. rangeli*, fragmentos protéicos recombinantes das duas enzimas foram produzidos e purificados para gerar posteriormente antissoros e anticorpos monoclonais contra as enzimas. O sistema bacteriano (*E. coli*) foi o escolhido para a produção das proteínas recombinantes devido às vantagens relacionadas a fácil manipulação, crescimento e taxas de produção elevadas. Apesar disto, este sistema apresenta algumas desvantagens em relação à incapacidade de realizar algumas modificações pós-traducionais e as proteínas são geralmente expressas na forma insolúvel em corpos de inclusão (BANEYX, 1999). Alguns estudos indicam que entre 30-60% das proteínas procarióticas não podem ser expressas em bactéria na forma solúvel utilizando caudas de histidinas (EDWARDS et al., 2000; STEVENS, 2000) e esse número é ainda maior para proteínas eucarióticas (BRAUN et al., 2002; HAMMARSTROM et al., 2002).

Vários trabalhos de caracterização de DNA topoisomerases utilizaram o sistema de *E. coli* para a expressão da subunidade completa da proteína, entretanto nenhum deles conseguiu purificar a proteína recombinante na sua forma nativa, principalmente devido a sua grande massa molecular. Nestes casos, as proteínas foram purificadas da fração insolúvel e posteriormente renaturadas, ou ainda em alguns trabalhos somente fragmentos representativos destas proteínas foram expressos para o estudo de domínios específicos ou produção de anticorpos (DAS et al., 2001).

Estudos utilizando a expressão recombinante de fragmentos específicos permitiram confirmar uma série de funções para estas enzimas. Na análise da região amino-terminal de 43 kDa em *L. donovani*, foi possível determinar que as proteínas resultantes formavam dímeros funcionais na ausência de DNA, sendo esta atividade inibida pelo etoposídeo e detalhada a partir de análises de modelagem computacionais (SENGUPTA et al., 2005). Resultados de atividade semelhantes foram obtidos na análise de um fragmento de 45 kDa de *P. vivax* (KHOR et al., 2005).

A estrutura funcional dos domínios das DNA topoisomerases II humana e de *S. cerevisiae* foi investigada através da utilização de enzimas mutantes com inserções de deleções quanto a sua capacidade de catalisar transições topológicas *in vitro* (JENSEN et al., 1996). Neste trabalho, vários pontos de extrema importância funcional foram determinados.

A grande maioria destes fragmentos que correspondem, de forma prática, a proteínas menores não estavam disponíveis na fração solúvel das bactérias. Desta forma, apesar de serem expressos fragmentos menores correspondentes a diferentes regiões das DNA topoisomerases II de *T. rangeli* a condição de expressão na fração insolúvel manteve-se em todos os casos. Uma primeira etapa de otimização das condições de expressão com o objetivo de obter uma maior quantidade das proteínas recombinantes estando elas preferencialmente na fração solúvel foi realizada. Uma das estratégias utilizadas para aumentar a solubilidade das proteínas recombinantes é baixar a temperatura de expressão para a síntese proteica ocorrer mais lentamente (BANEYX, 1999). Dessa forma, testes de expressão a 15°C, 27°C e 37°C foram realizados. Como não foi possível obter quantidades significativas das proteínas na fração solúvel, procedeu-se a purificação destas nas condições de maior expressão em cada caso, a partir da fração insolúvel, através de cromatografia de afinidade a metal em condições desnaturantes. As proteínas foram desligadas da matriz e renaturadas através de várias etapas de diálise para retirar gradualmente a uréia.

A expressão e purificação da DNA topoisomerase II mitocondrial completamente ativa de *C. fasciculata* só foi realizada recentemente em sistema de expressão por células de inseto infectadas com baculovírus. Neste sistema diferenciado de expressão, a proteína purificada foi obtida em condições nativas e pode ser analisada *in vitro* para todos os parâmetros funcionais, incluindo ensaios de decatenação e catenação (WANG et al., 2008).

A purificação das proteínas recombinantes foi quantitativamente e qualitativamente satisfatória, sendo estas identificadas corretamente por espectrometria de massas. Inicialmente, dois antissoros foram produzidos e utilizados para reagir com extratos protéicos de *T. rangeli* em ensaios do tipo *western blot*. A análise mostrou que ambos reconhecem um polipeptídeo aparentemente único de ~130 kDa, sendo compatível com a respectiva massa molecular deduzida para *TrTop2mt* (138 kDa) e menor que o esperado teórico para *TrTop2α* (164,5 kDa).

A massa molecular de *TrTop2mt* foi similar a encontrada para as enzimas correspondentes em *T. cruzi*, *T. brucei* e *C. fasciculata* (STRAUSS; WANG, 1990; PASION et al., 1992; FRAGOSO et al., 1998). Neste sentido, também foi testada a capacidade dos antissoros em reconhecer as enzimas correspondentes em extratos de *T. cruzi* e *L. amazonensis*. O soro anti- *TrTop2mt* (pQE<sub>mt</sub>12) não reconheceu o polipeptídeo de tamanho esperado em nenhuma das espécies, embora bandas

inespecíficas tenham ocorrido. Este resultado pode estar relacionado ao fato do antissoro ter sido produzido a partir de um fragmento da porção carboxi-terminal da proteína, que é a região menos conservada nas topoisomerasas do tipo II eucarióticas. O soro anti- *TrTop2α*(pQEα7) foi capaz de reconhecer fracamente um polipeptídeo de tamanho semelhante e um de tamanho superior (~160 kDa) ao encontrado para o *T. rangeli* no extrato de *T. cruzi*. O peso molecular desta banda é próximo ao tamanho teórico esperado para a proteína *Top2α* em *T. cruzi*. Embora este resultado possa ser real e explicado pela maior conservação interespecífica na região escolhida para a produção deste antissoro, um segundo antissoro produzido contra a região amino-terminal, *TrTop2α*(pETαG1), ainda mais conservada, não reconheceu estas mesmas bandas no extrato de *T. cruzi*.

Mesmo considerando a possibilidade de alterações pós-traducionais, na tentativa de elucidar se havia possibilidade de reconhecimento cruzado entre os diferentes anticorpos, estes foram avaliados para a capacidade de ligação aos distintos fragmentos protéicos purificados. Nenhum dos antissoros produzidos foi capaz de reconhecer fragmentos da outra enzima e nem mesmo fragmentos de regiões diferentes dentro da mesma subunidade. Este resultado reforçou a capacidade de reconhecimento diferencial de cada antissoro tanto para as proteínas purificadas quanto para o extrato total do parasito. Neste mesmo contexto, a produção de anticorpos monoclonais poderia aumentar a especificidade e a sensibilidade no reconhecimento destas proteínas diretamente sobre o extrato protéico do *T. rangeli*. Apesar de um grande número inicial de hibridomas positivos para a produção de anticorpos para ambas as proteínas, somente três anticorpos monoclonais para *TrTop2α* foram obtidos ao final do processo.

A utilização do anticorpo monoclonal para *TrTop2α* em ensaios de *western blot* somente identificou a proteína recombinante purificada e uma proteína de aproximadamente 25 kDa no extrato total de *T. rangeli*. Esta massa molecular é bastante inferior aos 164,5 kDa teóricos e descartaram o correto reconhecimento da proteína esperada. Devido ao fato de que a enzima funcionalmente encontra-se como um homodímero, a interação entre duas subunidades é extremamente esperada foi realizada a separação do extrato protéico total de *T. rangeli* em géis de poliacrilamida sobre condições não desnaturantes. Os resultados obtidos foram semelhantes para os antissoros *TrTop2α* (pQEα7), *TrTop2mt* (pQEmt12) e o anticorpo monoclonal *TrTop2α*10B, com o

reconhecimento de uma banda de alto peso molecular, acima de 500 kDa. Sob condições não desnaturantes, as proteínas são separadas de acordo com a carga, tamanho e forma das estruturas nativas. Devido ao fato de não serem usados agentes desnaturantes, a estrutura tridimensional, bem como interações em uma proteína multimérica são geralmente mantidas e informações podem ser obtidas a respeito de sua estrutura quaternária (COLIGAN, 2002). Neste caso, o alto peso molecular obtido indica fortemente uma interação entre diferentes moléculas. Este resultado foi mais intenso no caso do anticorpo monoclonal, fato este que pode ser explicado por associações da proteína de 25 kDa anteriormente detectada ou ainda que este anticorpo monoclonal reconheça somente um epítipo conformacional na *TrTop2a* presente apenas na proteína em sua conformação nativa (ZICKERMANN et al., 2009).

Na análise da expressão destas enzimas nas diferentes formas do parasito em ensaios de *western blot* observou-se que *TrTop2mt* e *TrTop2a* estão presentes principalmente em formas epimastigotas. Entretanto, para a primeira enzima o nível de expressão nas formas tripomastigotas foi muito baixo quando comparado ao que ocorre para *TrTop2a*. A baixa expressão de *TrTop2mt* no extrato de formas tripomastigotas, está de acordo com o observado por Fragoso e colaboradores (1998), sugerindo que durante o ciclo celular ocorre a regulação da sua expressão, em virtude da capacidade de replicação inerente a cada forma. Estes autores também observaram que, embora a proteína não possa ser detectada nesta fase do ciclo celular, o mRNA correspondente está presente em ambos os estágios, sendo detectado por *slot blot* em quantidades equivalentes. De maneira geral, não é surpreendente que a atividade desta enzima esteja suprimida nas formas tripomastigotas, visto que tem sido observado altos níveis enzimáticos em células em proliferação e sua diminuição em células diferenciadas (SCHNEIDER; HSIANG; LIU, 1990). O mesmo fato pode ser visto em *L. infantum* onde a expressão da proteína *Top2mt* foi evidente em formas promastigotas de fase exponencial de crescimento e ausente na fase estacionária infectante, ambos com altos níveis de expressão de mRNA (HANKE et al., 2003).

As proteínas *TrTop2mt* e *TrTop2a* também foram avaliadas por *western blot* a partir de gel bidimensional e, apesar da detecção de proteínas de igual massa molecular, diferentes pontos isoelétricos foram encontrados. Embora, os valores de pI sejam diferentes, em ambos os casos, do esperado teórico, este resultado confirma a detecção de proteínas distintas pelos antissoros obtidos para *TrTop2mt* e *TrTop2a*.

Apesar de inúmeros estudos, a distribuição das DNA topoisomerasas II em tripanosomatídeos é ainda discutida. Atualmente, ainda há uma considerável controvérsia sobre identidade da enzima presente no núcleo, em relação aquela presente na mitocôndria dos membros da Ordem Kinetoplastida, ou seja, não se sabe se a mesma enzima atua em ambos os compartimentos ou se há enzimas distintas e de atividade específica em uma dessas organelas. Imunofluorescências utilizando um anticorpo contra a DNA topoisomerase II mitocondrial de *C. fasciculata* exclusivamente reconheceu o cinetoplasto de *C. fasciculata* (MELENDY; RAY, 1989), de formas epimastigotas de *T. cruzi* (FRAGOSO et al., 1998) e de *B. culicis* (CAVALCANTI et al., 2004). Em contraste, o antissoro produzido contra uma fragmento recombinante da mesma enzima de *T. cruzi* localizou-a no núcleo de *T. cruzi* e *C. fasciculata* (FRAGOSO et al., 1998), assim como utilizando o antissoro produzido contra esta enzima em *B. culicis*. Em *L. donovani* e *B. saltans* anticorpos policlonais produzidos contra suas respectivas enzimas, identificaram proteínas tanto no cinetoplasto quanto no núcleo, sugerindo sua presença em ambos os compartimentos (DAS et al., 2001; GAZIOVA; LUKES, 2003).

A análise por imunofluorescência indireta utilizando diferentes anticorpos para as DNA topoisomerasas II de *T. rangeli* indicou que a localização celular destas enzimas ocorre de forma confusa semelhante ao apontado em outras espécies na literatura.

O antissoro contra *TrTop2 $\alpha$*  (pQE $\alpha$ 7) reconheceu uma região que parece iniciar no cinetoplasto e se estende para a região do corpo basal do flagelo tanto em formas epimastigotas quanto tripomastigotas. Este resultado pode estar baseado no fato de que o kDNA encontra-se sempre posicionado de forma muito próxima ao corpo basal do flagelo e perpendicular ao eixo do flagelo. Notavelmente, existem evidências para uma ligação física direta entre o corpo basal e a rede do kDNA, embora estas duas estruturas sejam separadas pela membrana dupla da mitocôndria (ROBINSON; GULL, 1991; MORRIS et al., 2001). Ogbadoyi e colaboradores (2003) demonstraram que o genoma mitocondrial em tripanosomas está fisicamente conectado ao corpo basal do flagelo por um sistema de filamentos transmembrana chamado de complexo de ligação tripartido (TAC). Estes filamentos ligam o corpo basal do flagelo a uma região na membrana mitocondrial diferenciada, e um grupo de filamentos intramitocondriais na face interna da zona da membrana diferenciada os liga ao cinetoplasto. O TAC e as conexões entre o flagelo e o DNA do cinetoplasto são mantidos através do ciclo celular, replicados

e remodelados durante a fase S. A arquitetura do TAC sugere que possa haver uma função relacionada ao seu papel estrutural e vetorial durante a replicação do kDNA, apresentando uma clara interação entre a mitocôndria e o citoesqueleto.

Experimentos de hibridização *in situ* revelaram que antes da replicação os minicírculos são liberados vetorialmente por uma DNA topoisomerase II da face da rede próxima ao flagelo. A replicação inicia então na região entre a face flagelar do disco do cinetoplasto e a membrana mitocondrial, região denominada de zona cinetoflagelar, que é exatamente a região que contém os filamentos relacionados a associação do citoesqueleto do corpo basal do flagelo com a rede de kDNA. Os minicírculos livres iniciam sua replicação nesta região e todas as moléculas filhas migram posteriormente desta zona para os sítios antipodais que flanqueiam a rede de kDNA (DREW; ENGLUND, 2001).

Apesar de que na literatura grande suporte se dá a localização e ao papel das DNA topoisomerases II na reintrodução dos minicírculos a rede crescente nos sítios antipodais marginais a rede do kDNA, esta enzima pode ocupar outros locais e possuir outras funções (WANG; ENGLUND, 2001). Se considerarmos toda a amplitude de atividades por elas desenvolvidas, bem como a complexidade inerente de todo este processo e bem provável que esta enzima ou ortólogos possam ser encontrados em outras regiões associadas ao processo de replicação (MORRIS et al., 2001).

Dentre estes aspectos e considerando primariamente os maxicírculos, a importância das DNA topoisomerases II é mais estrutural do que catalítica. Em células de mamíferos, estas enzimas são componentes da matriz proteica que ancora as voltas do DNA cromossomal. A região não codificante é rica em sequências análogas que se ligam a essa matriz em eucariotos superiores. Na mitocôndria de tripanosomas, a topoisomerase II pode ancorar os maxicírculos à membrana mitocondrial ou pode mediar a migração destes maxicírculos ao centro da rede em divisão. Este papel estrutural pode explicar o porque os maxicírculos são clivados em todos os estágios do ciclo celular, enquanto que os minicírculos são clivados uma única vez (SHAPIRO; SHOWALTER, 1994).

Além disso, a *TbTop2mt* é requerida para a resolução de dímeros de minicírculos interligados (intermediários na replicação), remoção de superenovelamentos positivos introduzidos durante sua replicação e a segregação das redes irmãs completamente replicadas. Recentemente, o reparo de espaços gerados pela liberação na região central da rede dos minicírculos foi demonstrado, e parece relacionar a presença desta

enzima por todo o cinetoplasto (LINDSAY et al., 2008). Neste mesmo trabalho foi proposto que esta enzima também supriria a falta de espaço para a expansão da rede duplicada devido a presença da membrana mitocondrial, sendo que esta enzima aumentaria o número de valências (por exemplo de três para seis) e tornaria a rede mais condensada.

Embora produzido para a mesmo alvo o anticorpo monoclonal *TrTop2 $\alpha$ 10B* apresentou um resultado diferente e foi capaz de reconhecer o núcleo em formas epimastigotas, embora esta marcação tenha sido dispersa em formas tripomastigotas. A presença de proteínas detectadas no citoplasma pode estar relacionada a diversos fatores incluindo um artefato da técnica, o baixo título dos anticorpos e ainda a possível detecção de grandes quantidades de proteínas após tradução citoplasmática que posteriormente serão direcionadas aos seus locais funcionais.

O antissoro contra *TrTop2mt*(pQE $\mu$ 12) também reconheceu preferencialmente a região nuclear em epimastigotas, mas nas formas infectantes somente uma fraca marcação foi observada. Este resultado está de acordo com os resultados observados no *western blot* e com diversos resultados presentes na literatura (FRAGOSO et al., 1998; HANKE et al., 2003).

Na tentativa de comparar diretamente os resultados obtidos com alguns dados da literatura também foi utilizado neste estudo o antissoro gerado contra um fragmento de 38 kDa correspondente ao domínio ATPase da proteína *TcTop2mt* produzido por Fragoso e colaboradores (1998), uma das regiões mais conservadas entre as diferentes topoisomerases II eucarióticas. Apesar da grande semelhança existente entre a *Top2mt* de *T. rangeli* e *T. cruzi*, não foi possível realizar a comparação por *western blot*, devido a falta de especificidade do anticorpo. Em *P. falciparum* dois antissoros contra a região amino terminal foram gerados e detectaram uma fraca banda de cerca de 160 kDa. Esta banda foi considerada a partir do esperado teórico para a proteína, entretanto nos ensaios de *western blot* o antissoro também detectou outras proteínas no extrato do parasito. Apesar disso, este antissoro foi utilizado em ensaios de imunofluorescência e sugeriu uma distribuição coincidente com as regiões coradas com DAPI, estando presente no núcleo do parasito em todos os estágios intraeritrocíticos (CHEESMAN et al., 1994).

O soro anti-*TcTop2mt* apontou que, no *T. rangeli* e no *T. cruzi*, o antígeno reconhecido está localizado de forma diferencial. Para o *T. rangeli* a imunolocalização da *TrTop2mt* é exclusivamente nuclear e está

presente de forma equitativa nas duas formas do parasito. Enquanto isso, para o *T. cruzi* tanto o núcleo quanto o cinetoplasto são reconhecidos. Os resultados de imunolocalização com esse antissoro são interessantes porque mesmo compartilhando uma identidade de 91% as enzimas correspondentes no *T. rangeli* e *T. cruzi* não são reconhecidas no mesmo local. Intrigantemente, nos ensaios de imunofluorescência com *T. cruzi* realizados originalmente por Fragoso e colaboradores (1998), utilizando o mesmo antissoro, apenas o núcleo foi marcado em formas epimastigotas de *T. cruzi*.

Dentre as possíveis explicações para as diferentes localizações celulares para as mesmas enzimas ou até mesmo no caso da mesma espécie, como no *T. cruzi* em que somente cepas diferentes foram utilizadas, relata-se que fatores como a concentração da enzima e/ou associações macromoleculares estejam mascarando epítomos da enzima em um dos compartimentos. Esta hipótese é reforçada pelo fato de que em *L. donovani* a mesma enzima também foi imunolocalizada no núcleo e no cinetoplasto do parasito (DAS et al., 2001), sendo que o soro utilizado foi produzido a partir da região correspondente a escolhida para gerar o soro anti- *TcTop2mt*.

Novamente, considerando que as DNA topoisomerases II são proteínas grandes, diméricas e passíveis de formar associações, sugere-se que epítomos que poderiam ser reconhecidos pelo anticorpos produzidos estariam mascarados nas regiões internas das estruturas tridimensionais e quaternárias ou ainda nas interações das topo II com outras proteínas. Principalmente, estas interações poderiam ocorrer facilmente com proteínas do cinetoplasto, explicando na maioria dos casos a falta de reconhecimento na mitocôndria.

De fato, proteínas associadas ao cinetoplasto (KAP) com características similares a histonas podem condensar a rede de kDNA *in vivo* e ajudar no mascaramento destas regiões (XU et al., 1996). São necessários mais estudos para caracterizar a ação das topoisomerases, KAP e outras proteínas na tentativa de entender seus papéis na organização e replicação da rede de kDNA (LOURENCO et al., 2006). No núcleo várias proteínas associadas a manutenção dos cromossomos, como as histonas e histonas deacetilases também podem ter um papel importante nestas interações (JOHNSON et al., 2001).

Outro resultado interessante obtido com o soro anti- *TcTop2mt* esta relacionado ao fato de que em tripomastigotas de *T. rangeli* uma intensa marcação nuclear foi evidenciada pelo anticorpo para *TcTop2mt*.

Entretanto, FRAGOSO e colaboradores (1998) não detectaram qualquer expressão desta enzima em formas tripomastigotas de *T. cruzi* através de microscopia confocal sugerindo que a atividade de *TcTop2mt* estaria reduzida nesta fase pela diminuição na quantidade de enzima. Células quiescentes também tem sido mostradas sendo mais resistentes a inibidores de topo II devido a ausência da enzima. GONZALES-PERDOMO, (1990) realmente apontaram que inibidores de topoisomerase II bacterianos são mais efetivos contra formas epimastigotas e amastigotas e não possuíam efeito sobre formas tripomastigotas. Entretanto, o resultado obtido para o *T. rangeli* é intrigante visto que se for considerada a relação de expressão diferencial associada a capacidade de replicação, este resultado poderia sugerir a capacidade de replicação desta forma tripomastigota no hospedeiro vertebrado. Como estes dados não puderam ser confirmados por *western blot* e divergem totalmente dos obtidos com o antissoro para *TrTop2mt* (pQE<sub>mt12</sub>) tanto na imunofluorescência quanto no *western blot*, ainda permanecem como incertos.

Considerando os resultados para todos os anticorpos ainda não se pode excluir a possibilidade de existência da atividade de uma enzima no cinetoplasto diferente da que está presente no núcleo, visto que ainda há a possibilidade de reconhecimento cruzado das enzimas devido a grande similaridade existente entre elas em algumas regiões, dentre as quais algumas das utilizadas na produção dos anticorpos. Segundo alguns trabalhos também não se pode excluir a existência de outras DNA topoisomerasas com atividade nestes locais e a atividade da mesma enzima em diferentes locais (GAZIOVA; LUKES, 2003; HANKE et al., 2003). Subunidades de 130-200 kDa são as comumente encontradas para estas enzimas nas mais diversas espécies desta ordem, entretanto uma subunidade de 60 kDa já foi descrita para *C. fasciculata*, além de enzimas do tipo II em *T. cruzi* com atividade independente de ATP de 200 kDa (DOUC-RASY et al., 1986a).

Funcionalmente, um dos exemplos desta complexidade é observado no fenótipo resultante da inibição de *TbTOP2mt* por RNAi, onde sua inibição parece não ter efeito sobre a liberação dos minicírculos para a replicação (WANG; ENGLUND, 2001). Visto que a atividade de *TbTOP2α* foi relatada somente no núcleo (KULIKOWICZ; SHAPIRO, 2006) é possível que uma nova atividade de decatenação no cinetoplasto seja responsável pela liberação destas moléculas. Se a *TbTOP2mt* é a única topo II mitocondrial, certamente esta enzima exerce múltiplas funções na replicação e segregação do kDNA, entretanto falhas funcionais inexplicáveis em alguns pontos reforçam a possibilidade de que outras

topo II tanto nucleares quanto mitocondriais, que possuam seqüência não canônicas ainda podem ser identificadas. Surpreendentemente, dentre as enzimas envolvidas nas mudanças topológicas relacionadas ao cinetoplasto, existem seis DNA polimerases e seis DNA helicases com funções diferentes na replicação e manutenção, sendo somente considerada uma única DNA topoisomerase II de atividade mitocondrial (LINDSAY et al., 2008).

A possibilidade de existência de novos genes que codificam para DNA topoisomerases é diminuta em virtude da existência de análises de genomas completos de várias espécies da Ordem Kinetoplastida. Entretanto, a ocorrência de falhas na montagem e anotação destas seqüências pode ocorrer como foi observado para os dois genes de DNA topoisomerases II descritos recentemente para *T. brucei* (KULIKOWICZ; SHAPIRO, 2006), e reforçam que a avaliação mais criteriosa destes bancos de dados devem ser feitas.

Algumas características mecânicas das DNA topoisomerases II dos membros da Ordem Kinetoplastida também não são bem estudadas apesar da sua importância como alvo para drogas. Embora, inúmeros estudos funcionais existam, atualmente nenhum dado cristalográfico de complexos entre DNA e topoisomerases II está disponível. Enquanto isso, numerosas estruturas do complexo proteína - DNA são encontradas para enzimas do tipo IB (RENE; FERMANDJIAN; MAUFFRET, 2007).

Outra dificuldade no estudo das DNA topoisomerases é a diferença entre as condições *in vitro* e *in vivo*. Os estudos *in vivo*, sem o uso de enzimas purificadas, enfrentam problemas tais como: a estrutura e topologia do DNA altamente afetada por histonas, enzimas que processam este DNA e outras macromoléculas (RENE; FERMANDJIAN; MAUFFRET, 2007).

O estudo das DNA topoisomerases de *T. rangeli* certamente traz inúmeras contribuições para o conhecimento deste organismo ainda pouco estudado, além da validação desta espécie como um modelo para as topoisomerases dos tripanosomatídeos em geral. Dentre as evidências finais de que estas seqüências estão corretamente identificadas incluem-se a superexpressão e a determinação da atividade *in vitro* das subunidades das DNA topoisomerases II completas e a identificação das proteínas nativas do parasito por espectrometria de massas.

Visto que as DNA topoisomerases II em tripanosomatídeos desempenham múltiplas funções reguladas, tanto espacialmente, quanto temporalmente, as avaliações relacionadas a possibilidade de modificações pós-traducionais ou interações entre proteínas abrem um

novo campo de estudos. Além disso, o importante passo que inclui a cristalização destas enzimas poderá identificar sítios importantes para a atividade enzimática que servirão de ponto de partida para o desenho racional de novas drogas contra tripanosomatídeos patogênicos.

## 1.6 CONCLUSÕES

- O *T. rangeli* possui dois genes que codificam para DNA topoisomerasas tipo II (*TrTop2mt* e *TrTop2a*).
- O gene *TrTop2mt* apresenta um quadro aberto de leitura com 3.696 pb que codifica um polipeptídeo com 1.232 resíduos de aminoácidos (138,8 kDa), enquanto o gene *TrTop2a* possui 4.368 pb, codificando uma proteína com 1.456 aminoácidos (164,5 kDa).
- A sequência do gene *TrTop2a* obtido para a cepa Choachí de *T. rangeli* apresenta uma inserção de 6 aminoácidos na posição 1.442, correspondente a porção carboxi-terminal e 98% de similaridade a nível de aminoácidos com a sequência da cepa SC-58.
- O gene *TrTop2mt* possui elevado grau de similaridade com seu correspondente no *T. cruzi* (96%), cerca de 80% com os demais tripanosomatídeos e de 50% com outras topoisomerasas II eucarióticas. Já, o gene *TrTop2a* possui aproximadamente 85% de similaridade com os genes correspondentes em tripanosomatídeos e 60% com outras topoisomerasas II eucarióticas.
- A comparação entre a sequência dos dois genes demonstrou que eles apresentam 36% dos aminoácidos idênticos e 56% de similaridade.
- A análise dos genes *TrTop2a* e *TrTop2mt* por *Southern blot* apontou um padrão simples de clivagem, sugestivo de cópia única em ambos os casos.
- A presença de mRNA correspondentes a ambos os genes pode ser evidenciada indiretamente através de RT-PCR, utilizando iniciadores específicos tanto na transcrição reversa quanto na amplificação posterior para cada gene.
- Dois fragmentos protéicos para *TrTop2mt* e quatro para *TrTop2a* foram expressos em *E. coli* e purificados com sucesso através de condições desnaturantes.
- Um anticorpo monoclonal e três antissoros policlonais foram produzidos e validados em ensaios de *western blot*.
- *TrTop2mt* e *TrTop2a* foram identificadas como proteínas de tamanho aproximado de 130 kDa e estão presentes principalmente em formas epimastigotas.

- Em ensaios de *western blot* utilizando géis não desnaturantes complexos protéicos de alto peso molecular foram identificados para *TrTop2mt* e *TrTop2α*, sugerindo a interação entre polipeptídeos e o reconhecimento de um epítoto conformacional pelo anticorpo monoclonal *TrTop2α10B*.
- O antissoro contra o fragmento pQE<sub>mt12</sub> de *TrTop2mt* e o anticorpo monoclonal *TrTop2α10B* reconheceram uma localização nuclear em formas epimastigotas, e difusa no citoplasma de formas tripomastigotas. O antissoro contra o fragmento pQE<sub>a7</sub>, apresentou em ambas as formas uma expressão bem definida próxima ao cinetoplasto. O soro anti-*TcTop2mt* reconheceu um antígeno exclusivamente nuclear no *T. rangeli* em ambas as formas do parasito, enquanto antígenos no núcleo e no cinetoplasto foram evidentes em epimastigotas de *T. cruzi*.
- A partir da análise por *western blot* de extratos totais de *T. rangeli* resolvidos por eletroforese bidimensional, foi possível identificar para *TrTop2mt* uma proteína de aproximadamente 132 kDa e ponto isoelétrico (pI) de 6,4 e para *TrTop2α* uma proteína com cerca de 137 kDa e pI de 7,6.

## **CAPÍTULO 2**

### **Estudo do papel das DNA topoisomerases II no crescimento e diferenciação do *Trypanosoma rangeli***

## 2.1 JUSTIFICATIVA

O *T. rangeli*, apesar de não patogênico para o hospedeiro vertebrado, possui um complexo ciclo de vida que envolve dois hospedeiros (triatomíneos e mamíferos) e dois estágios evolutivos básicos: o epimastigota, que é capaz de se replicar no inseto vetor e a forma não replicativa e infectante para mamíferos, o tripomastigota. A forma infectante tripomastigota também apresenta dois morfotipos distintos, o tripomastigota sanguíneo encontrado no sangue dos hospedeiros vertebrados e o tripomastigota metacíclico encontrado na glândula salivar do inseto vetor. A transformação da forma replicativa para a forma infectante envolve importantes mudanças morfo genéticas. Uma das modificações mais evidentes ocorre a nível da estrutura do cinetoplasto. O cinetoplasto é uma região da única mitocôndria de membros da Ordem Kinetoplastida que contém o DNA mitocondrial kDNA. Durante a proliferação celular, o kDNA deve se replicar, enquanto que na transformação de epimastigotas em tripomastigotas, o kDNA muda de uma forma compacta para uma forma mais relaxada. Isto sugere que as DNA topoisomerases possuem um papel importante tanto na proliferação quanto na diferenciação de todos os membros desta ordem.

Diversos inibidores de topoisomerases têm se mostrado eficazes em promover alterações no DNA nuclear e mitocondrial dos tripanosomatídeos, incluindo a ofloxacina, o ácido nalidíxico, a novobiocina e o etoposídeo (GONZALEZ-PERDOMO et al., 1990; SHAPIRO, SHOWALTER, 1994). Entretanto, estudos destes inibidores direcionados a formas infectantes e sobre o papel efetivo destes inibidores de DNA topoisomerases no processo de diferenciação celular ainda são poucos.

A novobiocina é um antibiótico do grupo das coumarinas produzido por *Streptomyces niveus*. Dentre este grupo de antibióticos estão incluídos alguns potentes inibidores da DNA girase bacteriana que atuam sobre a subunidade B desta enzima, como inibidores competitivos da reação catalisada pelo domínio ATPase. A novobiocina foi licenciada para uso clínico com o nome comercial de Albamycin® (Pharmacia e Upjohn) em 1964 e possui atividade principalmente em infecções causadas por *Staphylococcus* ssp. Conforme DRUSANO e colaboradores (1986), administrada por via oral na concentração de 500mg, a novobiocina apresenta concentração máxima no soro humano de  $62,5 \pm 13,4$  µg/ml que ocorre 2 horas pós-administração. Devido ao aparecimento de bactérias resistentes à novobiocina, atualmente sua

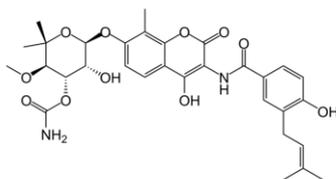
comercialização foi suspensa para uso humano, estando somente disponível para uso veterinário ([www.fda.gov](http://www.fda.gov)).

Neste estudo, devido a sua disponibilidade nós avaliamos o efeito da novobiocina como um inibidor de DNA topoisomerases tipo II, na proliferação e diferenciação celular do *T. rangeli*, buscando entender o possível papel destas enzimas nestes processos biológicos essenciais para o parasito.

## 2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.2.1 Avaliação do inibidor de topoisomerase novobiocina sobre formas epimastigotas de *T. rangeli*

Para os ensaios,  $2 \times 10^6$  parasitos da cepa Choachí de *T. rangeli* foram transferidos para tubos de 15 ml contendo 3 ml de meio LIT (10% SBF) a 27°C contendo diferentes concentrações de novobiocina (Sigma-Aldrich, Saint Louis) (50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml; 300 µg/ml e 500 µg/ml) (figura 2.1). A novobiocina foi dissolvida em água ultra-pura, sendo os controles mantidos apenas na presença do meio de cultura. As células foram contadas a cada 24 horas, durante oito dias, em câmara de Neubauer. Cada experimento foi realizado em duplicata e repetido três vezes.



**Figura 2.1:** Estrutura química do inibidor de DNA topoisomerase - Novobiocina.

Para tentar determinar modificações morfológicas, a cada 48 horas foram retiradas alíquotas para a realização de ensaios de imunofluorescência, *western blot* e preparação de lâminas coradas com Giemsa (Merck, Darmstadt). Para a preparação das lâminas e coloração com Giemsa, após secos, todos os esfregaços foram fixados com metanol durante um minuto, submetidos imediatamente a coloração por 20 minutos e posteriormente lavados em água destilada. As imagens foram digitalmente obtidas em aumento de 1.000 X em microscópio Olympus – Bx40-FL (Olympus, Tóquio).

### 2.2.2 Avaliação do inibidor de topoisomerase novobiocina sobre o processo de diferenciação celular do *T. rangeli*

A diferenciação celular foi realizada conforme descrito no item 1.3.2, sendo que formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento foram submetidas ao tratamento com diferentes concentrações de novobiocina (50 µg/ml, 150 µg/ml; 300 µg/ml) após a transferência para o meio DMEM pH 8,0.

Amostras correspondentes as diferentes fases do processo de diferenciação foram coletadas diariamente até o oitavo dia através da retirada de 1 ml de cultura. Após quantificação do número de parasitos em câmara de Neubauer, este material centrifugado e foi lavado em PBS 1X, sendo os parasitos posteriormente utilizados para os ensaios de imunofluorescência e *western blot*.

### 2.2.3 Western blot

Para os ensaios de *western blot* todas as amostras foram processadas em tampão de lise e a quantidade de proteínas foi avaliada pelo método de Bradford. Aproximadamente 10 µg de cada amostra foi aplicada por canaleta em géis SDS-PAGE 10%, sendo o processamento do gel e da membrana realizado conforme descrito em 1.3.14. Os anticorpos primários utilizados e sua respectiva diluição estão listados na tabela 2.1.

**Tabela 2.1:** Descrição dos anticorpos utilizados nos ensaios de imunofluorescência e *western blot*, considerando sua origem, tamanho da proteína reconhecida e diluições utilizadas nas diferentes metodologias.

| Anticorpo   | Tipo                         | Tamanho | Diluição<br><i>Western blot</i> | Diluição<br>RIFI |
|---|------------------------------|---------|---------------------------------|------------------|
| TAT-1 - Alfa Tubulina ( <i>T. brucei</i> )                      | Monoclonal<br>IgG-camundongo | 55 kDa  | 1:1.000                         | 1:300            |
| DHLADH-Dihidrolipoamida desidrogenase ( <i>T. cruzi</i> )       | Antissoro<br>IgG-coelho      | 55 kDa  | 1:4.000                         | 1:300            |
| mtHSP70 - HSP-70 mitocondrial ( <i>T. cruzi</i> )               | Antissoro<br>IgG-camundongo  | 70 kDa  | 1:2.000                         | 1:200            |
| Fe/S - Ferro Enxofre ( <i>T. cruzi</i> )                        | Antissoro<br>IgG-coelho      | 52 kDa  | 1:1.000                         | 1:150            |
| FCaBP - Proteína ligante de Cálcio flagelar ( <i>T. cruzi</i> ) | Antissoro<br>IgG-camundongo  | 24 kDa  | 1:1.000                         | 1:100            |
| Nuc-1 - Antígeno Nuclear ( <i>T. brucei</i> )                   | Monoclonal<br>IgG-camundongo | -       | -                               | 1:100            |
| <i>TrTop2mt</i> (pQE <sub>mt12</sub> )                          | Antissoro<br>IgG-camundongo  | 130 kDa | 1:500                           | 1:50             |
| DNA Topoisomerase II ( <i>T. rangeli</i> )                      | Antissoro<br>IgG-camundongo  | 130 kDa | 1:500                           | 1:50             |
| <i>TrTop2a</i> (pQE <sub>a7</sub> )                             | Antissoro<br>IgG-camundongo  | 130 kDa | 1:500                           | 1:50             |
| DNA Topoisomerase II ( <i>T. rangeli</i> )                      | Monoclonal<br>IgG-camundongo | -       | 1:2.000                         | 1:200            |
| <i>TrTop2a10B</i> - DNA Topoisomerase II ( <i>T. rangeli</i> )  | Antissoro/ coelho            | -       | -                               | 1:300            |
| <i>TcTop2mt</i> - DNA Topoisomerase II ( <i>T. cruzi</i> )      |                              |         |                                 |                  |

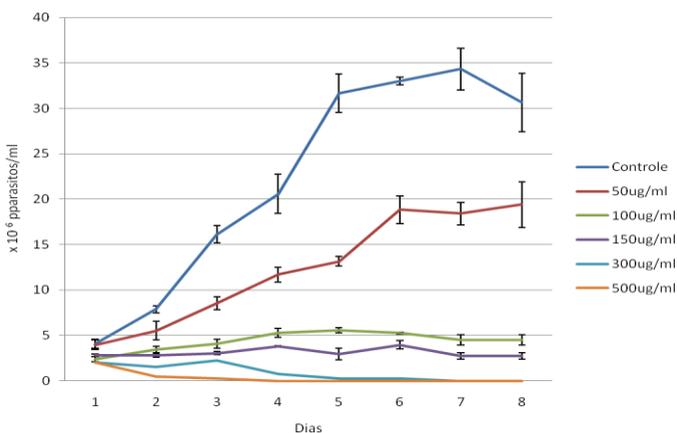
#### **2.2.4 Imunofluorescência**

Os ensaios de imunofluorescência foram realizados conforme o item 1.3.15, sendo utilizados diferentes anticorpos primários listados na tabela 2.1. A escolha destes anticorpos esteve associada a utilização dos mesmos em trabalhos prévios relacionados aos processos de diferenciação em *T. cruzi* e *T. brucei*, assim como à sua disponibilidade através do Dr. Kevin Tyler no Biomedical Reserch Centre (UEA).

## 2.4 RESULTADOS

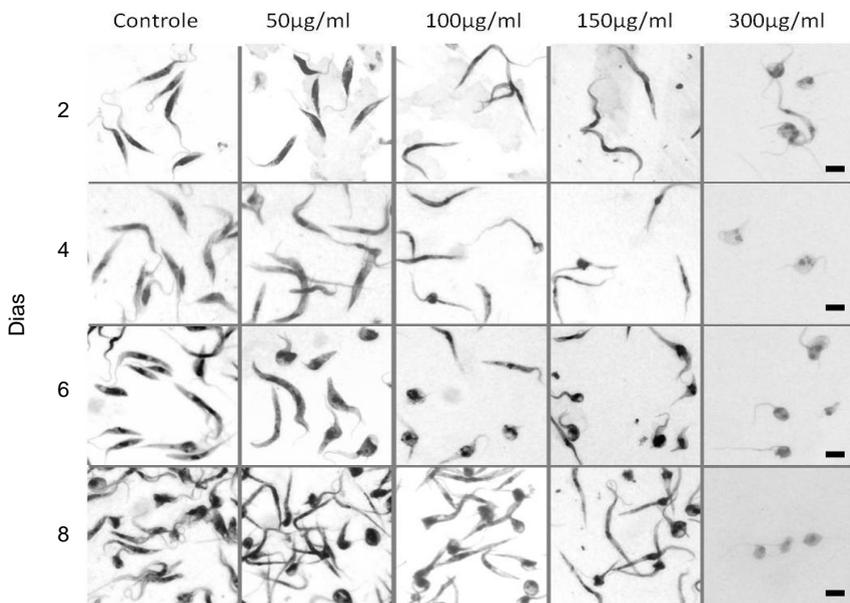
### 2.3.1 Avaliação da novobiocina sobre formas epimastigotas de *T. rangeli*

Formas epimastigotas de *T. rangeli* foram submetidas ao tratamento com novobiocina em meio LIT sob diferentes concentrações para avaliar seu efeito sobre a proliferação celular. Os resultados estão apresentados na figura 2.2 e apontam para um efeito de inibição do crescimento do *T. rangeli in vitro*. A dose de aproximadamente 55  $\mu\text{g/ml}$  resultou em 50% de inibição na proliferação de epimastigotas após 6 dias em cultura. O perfil da curva de crescimento foi alterado em concentrações acima de 100  $\mu\text{g/ml}$ , havendo uma estagnação do crescimento celular. Na concentração de 500  $\mu\text{g/ml}$ , já no quarto dia de tratamento nenhum parasito viável foi encontrado, indicando de lise celular.



**Figura 2.2:** Efeito da novobiocina sobre o crescimento de formas epimastigotas da cepa Choachí de *Trypanosoma rangeli* em meio LIT (10% SBF). Cada ponto representa a média de três experimentos independentes e as barras representam os desvios padrões.

Morfológicamente, este inibidor promoveu duas alterações significativas nas formas epimastigotas (figura 2.3). Primeiro, as células tornaram-se afiladas, sendo que com o passar dos dias, e principalmente nas maiores concentrações, ocorreu a transformação em formas arredondadas que ainda possuíam flagelo evidente. Entretanto, a presença destas formas esteve diretamente relacionada a diminuição no número de parasitos.

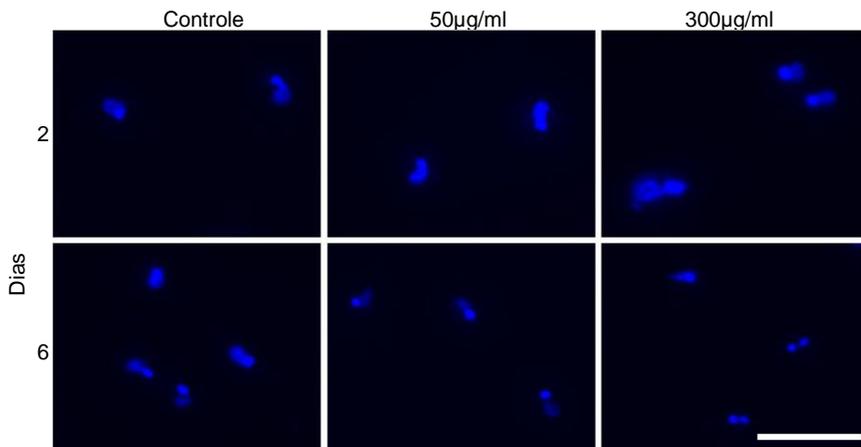


**Figura 2.3:** Efeito da novobiocina sobre a morfologia e crescimento de formas epimastigotas da cepa Choachí de *Trypanosoma rangeli* em meio LIT (10% SBF). As barras em preto representam 10µm.

Visando correlacionar as modificações estruturais observadas com a ação da novobiocina, os parasitos foram submetidos a coloração por DAPI e a ensaios de imunofluorescência com vários anticorpos em diferentes dias (dias 2 e 6) e sob o efeito de duas concentrações de novobiocina testadas (figuras 2.4 e 2.5). Alterações no núcleo e no cinetoplasto relacionadas a forma e tamanho puderam ser observadas nos tratamentos com novobiocina. Na concentração de 50 µg/ml pode ser observado no sexto dia de cultivo uma alteração principalmente com relação a forma e tamanho nuclear. Utilizando-se 300 µg/ml, esse efeito já pode ser observado nas primeiras 48 horas, sendo possível inicialmente considerar um aumento no tamanho do cinetoplasto evoluindo para sua diminuição e alteração morfológica acompanhada por possível desintegração nuclear.

Com os anticorpos para a detecção de alfa tubulina e de proteínas Fe/S, foi igualmente possível visualizar as alterações morfológicas relacionadas a efeito citotóxico. Diferentemente do que ocorre no controle, na concentração de 50 µg/ml é possível observar parasitos mais

alongados nos primeiros dias, bem como a presença de algumas formas arredondadas após seis dias de cultivo. Na concentração de 300  $\mu\text{g/ml}$  os parasitos já apresentaram morfologia completamente alterada após dois dias de tratamento e com formas pequenas e arredondadas após seis dias.

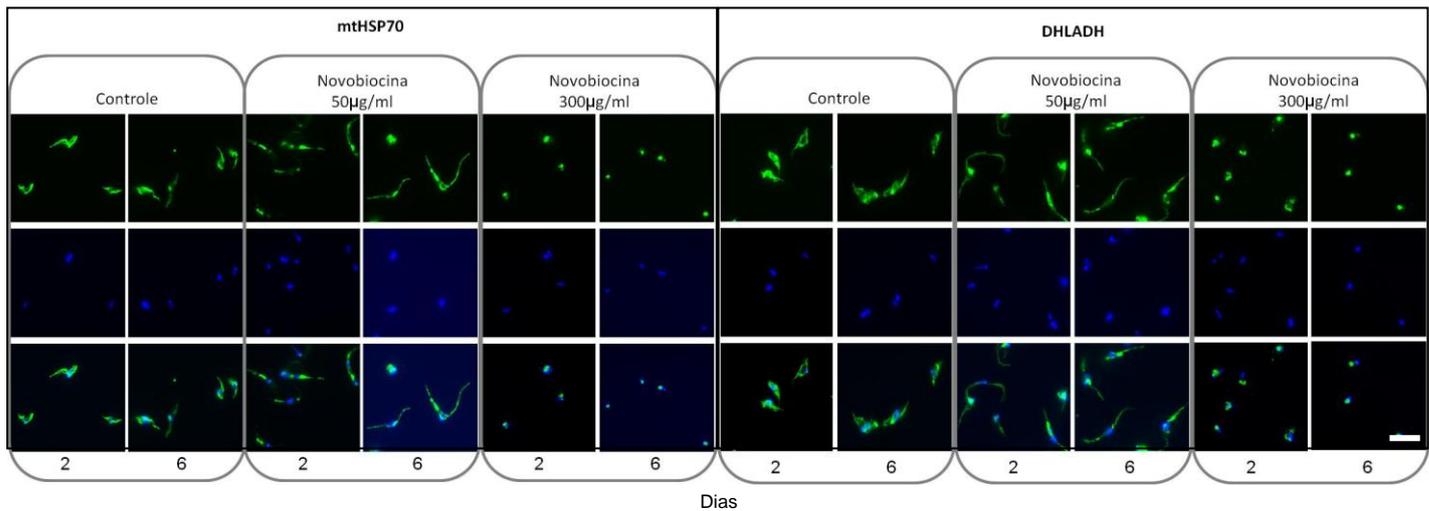
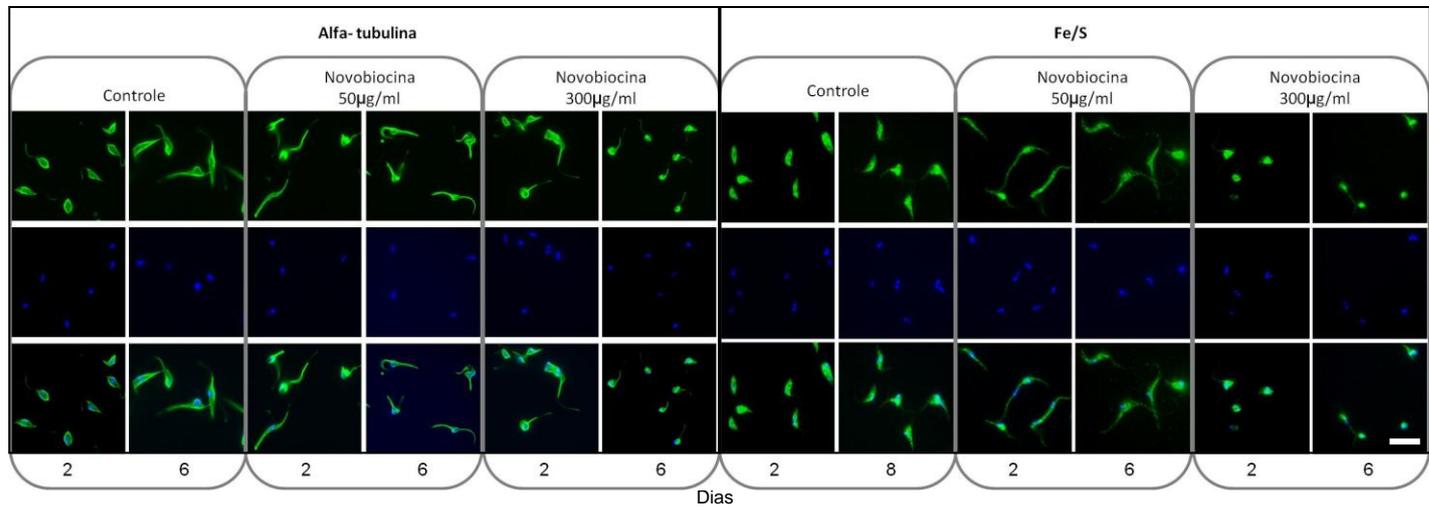


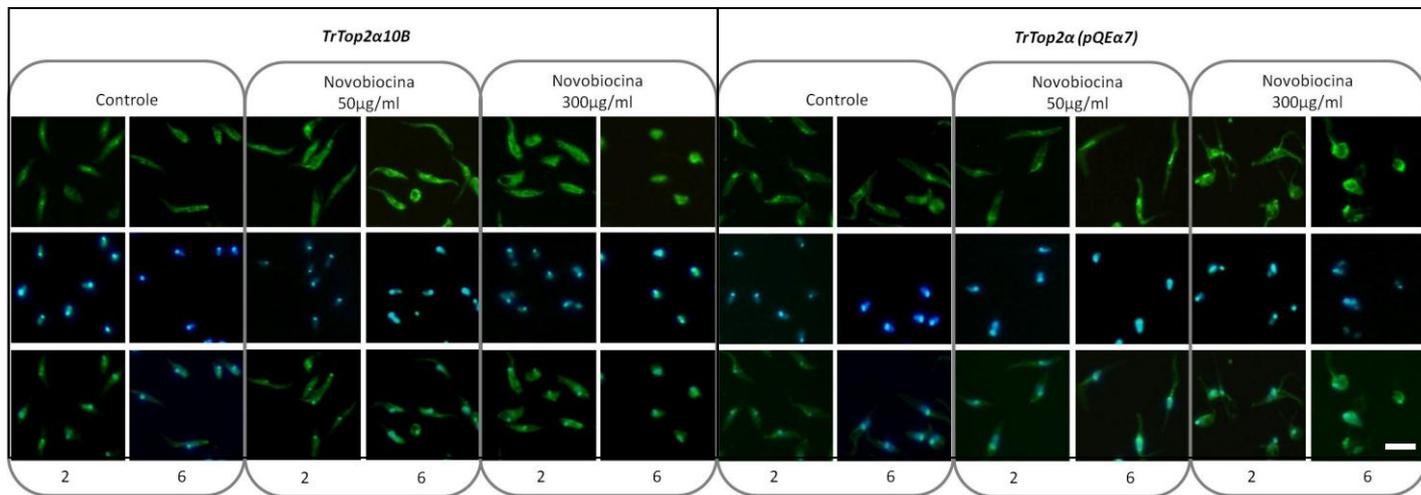
**Figura 2.4:** Efeito da novobiocina sobre o DNA do núcleo e do cinetoplasto de formas epimastigotas da cepa Choachí de *Trypanosoma rangeli* a partir da coloração com DAPI (1  $\mu\text{g/ml}$ ). A barra em branco representa 10 $\mu\text{m}$ .

Ao utilizar os anticorpos para detectar a expressão das proteínas DHLADH e mtHSP70 o objetivo foi analisar alterações na atividade e morfologia mitocondrial. Desta forma, para a enzima DHLADH, bem como para a mtHSP70, foi possível observar que no controle a mitocôndria ocupa um grande espaço no citoplasma celular evidenciado pela fluorescência. Na concentração de 50  $\mu\text{g/ml}$  de novobiocina não há diminuição visível na intensidade da fluorescência, entretanto existe uma alteração morfológica mitocondrial que acompanha a alteração celular, tornando-se esta afilada e alongada. Na concentração de 300  $\mu\text{g/ml}$ , embora ainda exista uma redução na intensidade da fluorescência associada a estes anticorpos, a possível região mitocondrial encontra-se arredondada e extremamente reduzida.

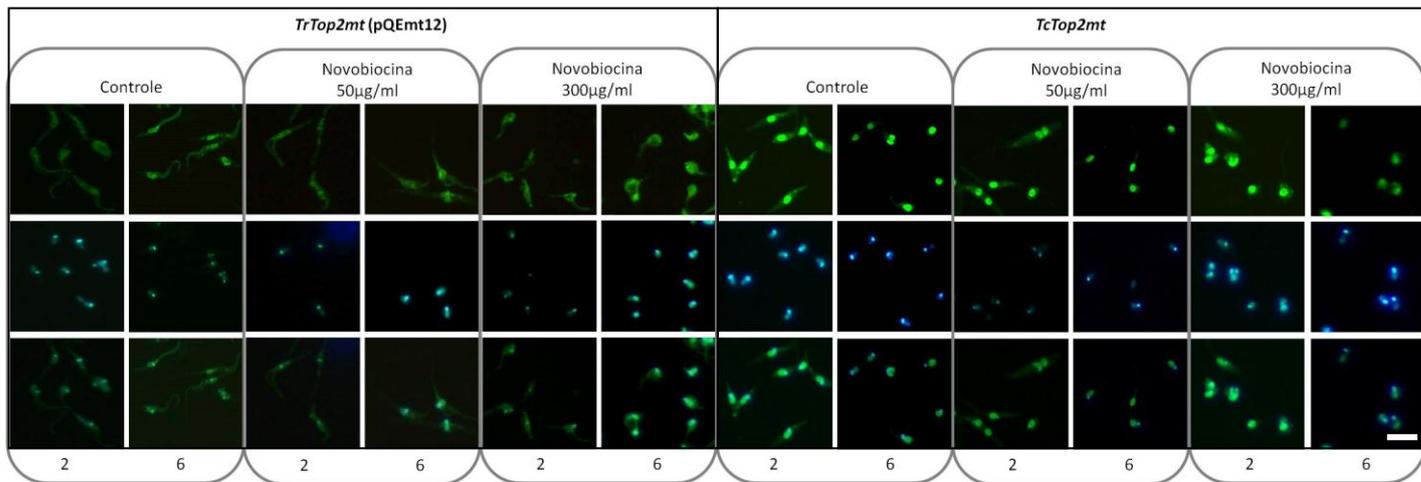
Com relação as DNA topoisomerases II, possíveis alvos da novobiocina, foram utilizados os anticorpos obtidos para as enzimas em *T. rangeli*. Com o anticorpo monoclonal *TrTop2 $\alpha$ 10B* há uma marcação nuclear pouco evidente no controle que ocorre somente nas primeiras 72 horas e passa para uma marcação dispersa no citoplasma nos

epimastigotas do sexto dia, de forma semelhante ao que ocorre nos tratamentos com diferentes concentrações. Para o antissoro obtido contra *TrTop2α* (pQEα7) embora exista uma fraca distribuição citoplasmática, ocorre uma marcação evidente numa região próxima ao cinetoplasto que se distribui na direção do flagelo e pode ser observada tanto no controle quanto no tratamento com a concentração de 50 µg/ml em ambos os dias analisados. Já, na concentração de 300 µg/ml esta distribuição só é observada nos primeiros dias e de forma muito menos evidente, tornando-se totalmente dispersa após seis dias de tratamento. Ao utilizar o antissoro contra *TrTop2mt* (pQE<sub>mt</sub>12) uma marcação na região nuclear foi mais evidente e estava presente no controle em ambos os dias e de forma menos intensa na concentração de 50 µg/ml. Para a concentração de 300 µg/ml a localização já não era definida, havendo fluorescência por todo citoplasma. Com o antissoro contra *TcTop2mt* houve uma marcação nuclear intensa tanto nos controles quanto nos tratamentos utilizando diferentes concentrações.





Dias



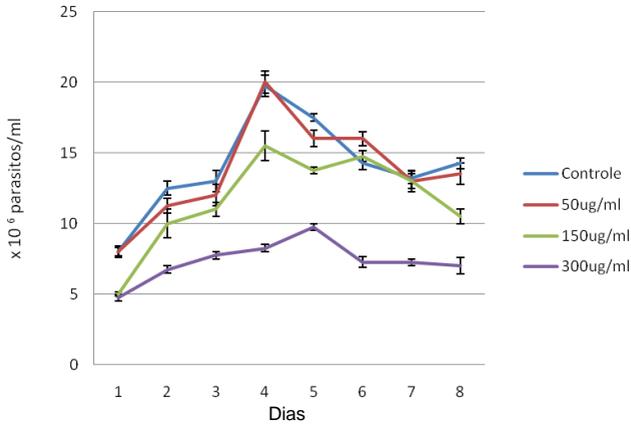
Dias

**Figura 2.5:** Ensaio de imunofluorescência indireta utilizando diferentes anticorpos realizado contra formas epimastigotas da cepa Choachí de *Trypanosoma rangeli* submetidas a distintas concentrações de novobiocina. As barras em branco representam 10µm.

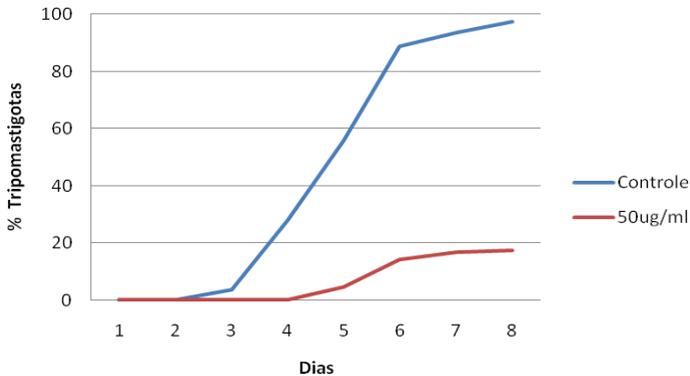
### **2.3.2 Avaliação da novobiocina sobre o processo de diferenciação celular do *T. rangeli***

Para avaliar o efeito do tratamento com novobiocina sobre o processo de diferenciação em formas infectantes, formas epimastigotas de *T. rangeli* foram transferidas para um novo meio de cultura (DMEM) e submetidas ao tratamento com diferentes concentrações de novobiocina. As alterações relacionadas aos tratamentos distintos foram primeiramente avaliadas conforme a capacidade de crescimento destes parasitos ao longo dos oito dias que perdura o processo *in vitro*. Como pode ser observado na figura 2.6, a multiplicação dos parasitos ocorreu numa fase inicial estendendo-se até o quarto dia, sendo este efeito visível tanto no controle quanto nos tratamentos com as concentrações de 50 µg/ml e 150 µg/ml. Após o quarto dia, observa-se uma morte celular gradativa, sendo igualmente observada nos demais tratamentos. A análise comparativa das curvas de crescimento revelou que o efeito da novobiocina foi também de inibição do crescimento. Além disso, os tratamentos realizados em meio LIT e em meio DMEM com a concentração de 300 µg/ml apresentaram diferenças na capacidade de inibição do crescimento do parasito. Embora o efeito inibitório não tenha sido tão pronunciado no tratamento no meio DMEM quanto no avaliado sob mesma concentração em meio LIT, nesta concentração de novobiocina ocorreu uma expressiva diminuição no número de parasitos.

Com relação a capacidade de diferenciação em formas tripomastigotas, apesar da utilização de diferentes concentrações de novobiocina, todos os tratamentos apresentaram efeitos sobre o processo de diferenciação celular. Nenhuma forma diferenciada pode ser observada nas concentrações de 150 µg/ml e 300 µg/ml. Na menor concentração de novobiocina (50 µg/ml), houve uma inibição parcial da diferenciação, encontrando-se apenas 18% de tripomastigotas após o oitavo dia. Enquanto isso, a porcentagem de formas tripomastigotas presentes no controle sem a novobiocina no mesmo período correspondeu a 97% dos parasitos (figura 2.7).



**Figura 2.6:** Efeito da novobiocina sobre o crescimento, durante o processo de diferenciação celular da cepa Choachí de *Trypanosoma rangeli* em meio DMEM (5% SBF). Cada ponto representa a média de três experimentos independentes e as barras representam os desvios padrões.

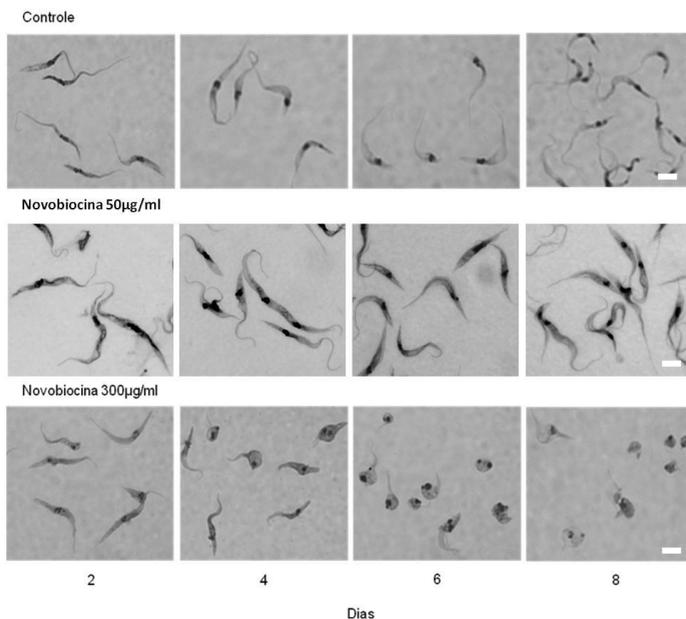


**Figura 2.7:** Porcentagem de formas tripomastigotas da cepa Choachí de *Trypanosoma rangeli* cultivadas em meio DMEM (pH 8) na presença (50 µg/ml) ou ausência de novobiocina.

A presença destas formas diferenciadas também pode ser observada na figura 2.8, sobretudo no oitavo dia de cultivo no controle, estando o cinetoplasto claramente posterior ao núcleo. Enquanto isso, poucas formas tripomastigotas puderam ser observadas no oitavo dia do

tratamento com 50  $\mu\text{g/ml}$  de novobiocina, sendo estas formas levemente diferentes pois não apresentam uma migração evidente do cinetoplasto em relação ao núcleo. Além disso, outras alterações fenotípicas também podem ser visualizadas. As células no tratamento com 50  $\mu\text{g/ml}$  são mais alongadas, e aquelas sob o tratamento com 300  $\mu\text{g/ml}$  tornaram-se disformes e arredondadas.

Alterações físicas, tal como a variação do pH nos meios de cultura após os oito dias de cultivo foram avaliadas, visando determinar se a alteração no pH seria um possível fator responsável pela inibição da diferenciação e também na proliferação celular. Após a retirada das células por centrifugação, o sobrenadante teve seu pH mensurado, sendo correspondente a: 7,75 para o grupo controle; 7,73 para o tratamento com 50  $\mu\text{g/ml}$  de novobiocina; 7,85 com 150  $\mu\text{g/ml}$  e 7,98 com 300  $\mu\text{g/ml}$ .



**Figura 2.8:** Efeito da novobiocina sobre o processo de diferenciação celular da cepa Choachí de *Trypanosoma rangeli* em meio DMEM (5% SBF), evidenciando as alterações morfológicas dos parasitos em esfregaços corados com Giemsa. As barras em branco representam 10 $\mu\text{m}$ .

Para estabelecer outras medidas de determinação de presença ou ausência de formas em diferenciação, vários anticorpos foram testados

com o objetivo de se criar um painel de marcadores celulares para o processo de diferenciação. Para tal, diferentes anticorpos foram utilizados em ensaios de imunofluorescência indireta e em *western blot*, considerando primariamente formas epimastigotas e tripomastigotas provenientes do grupo controle (sem a presença de novobiocina) em diferentes dias do processo de diferenciação (dias 2 e 8, respectivamente) (figura 2.9) e sob o efeito de duas concentrações de novobiocina no oitavo dia (figura 2.10).

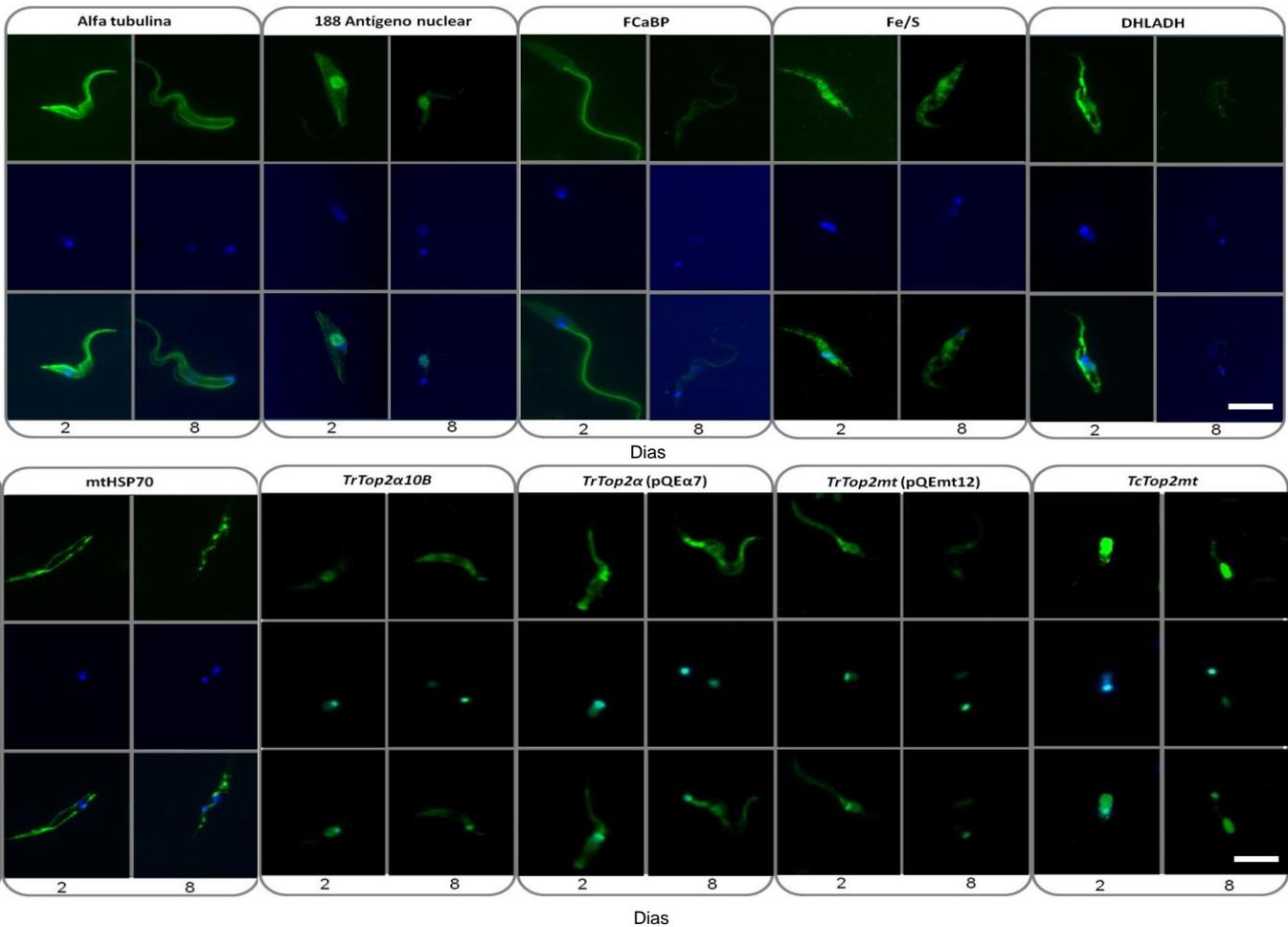
Dentre os marcadores utilizados na comparação inicial de formas epimastigotas e tripomastigotas (figura 2.9) o anticorpo contra alfa tubulina não apresentou diferenças substanciais na expressão desta proteína entre as diferentes formas, como já era esperado. Entretanto pode ser considerado um bom marcador morfológico, pois sua localização evidencia a forma celular e no caso das formas tripomastigotas evidencia a presença da membrana ondulante. Nas imagens relacionadas ao uso do anticorpo contra o antígeno nuclear nuc-1, o núcleo foi evidenciado em ambas as formas com pequena diferença de intensidade, entretanto este não foi considerado um bom marcador pelo fato de que não foi possível observar a marcação nuclear em todos os parasitos, sendo visível em cerca 80% das formas epimastigotas e 30% das formas tripomastigotas, podendo estar relacionado ao fato do anticorpo ter sido produzido para *T. cruzi*.

A proteína ligante de cálcio flagelar- FCaBP apresentou clara localização no flagelo, sendo sua marcação mais intensa nas formas epimastigotas. O anticorpo anti-Fe/S não detectou alteração na expressão desta proteína, sendo esta difusa no citoplasma celular e com intensidade semelhante em ambas as formas do parasito. Já, os anticorpos contra DHLADH e mtHSP70 foram ótimos marcadores para as alterações da morfologia mitocondrial que acontecem durante a diferenciação celular, sendo as intensidades das fluorescências claramente reduzidas nas formas tripomastigotas. Ao utilizar os anticorpos contra as DNA topoisomerases II de *T. rangeli*, uma marcação nuclear foi evidente em formas epimastigotas com os anticorpos *TrTop2α10B*, *TrTop2mt* (pQE<sub>mt</sub>12) e *TcTop2mt*. Entretanto, nas formas tripomastigotas, estes anticorpos revelaram diferentes padrões de expressão, nos quais para *TrTop2α10B* este passou a ser disperso pelo citoplasma. Para *TrTop2mt* (pQE<sub>mt</sub>12) houve uma marcante diminuição na intensidade com localização relacionada tanto ao núcleo quanto ao cinetoplasto. E, para *TcTop2mt* a marcação

permaneceu no mesmo local e com igual intensidade. Já, com o antissoro obtido contra *TrTop2 $\alpha$*  (pQE $\alpha$ 7) a região evidenciada é próxima ao cinetoplasto e se distribui na direção do flagelo crescente em ambas as formas do parasito.

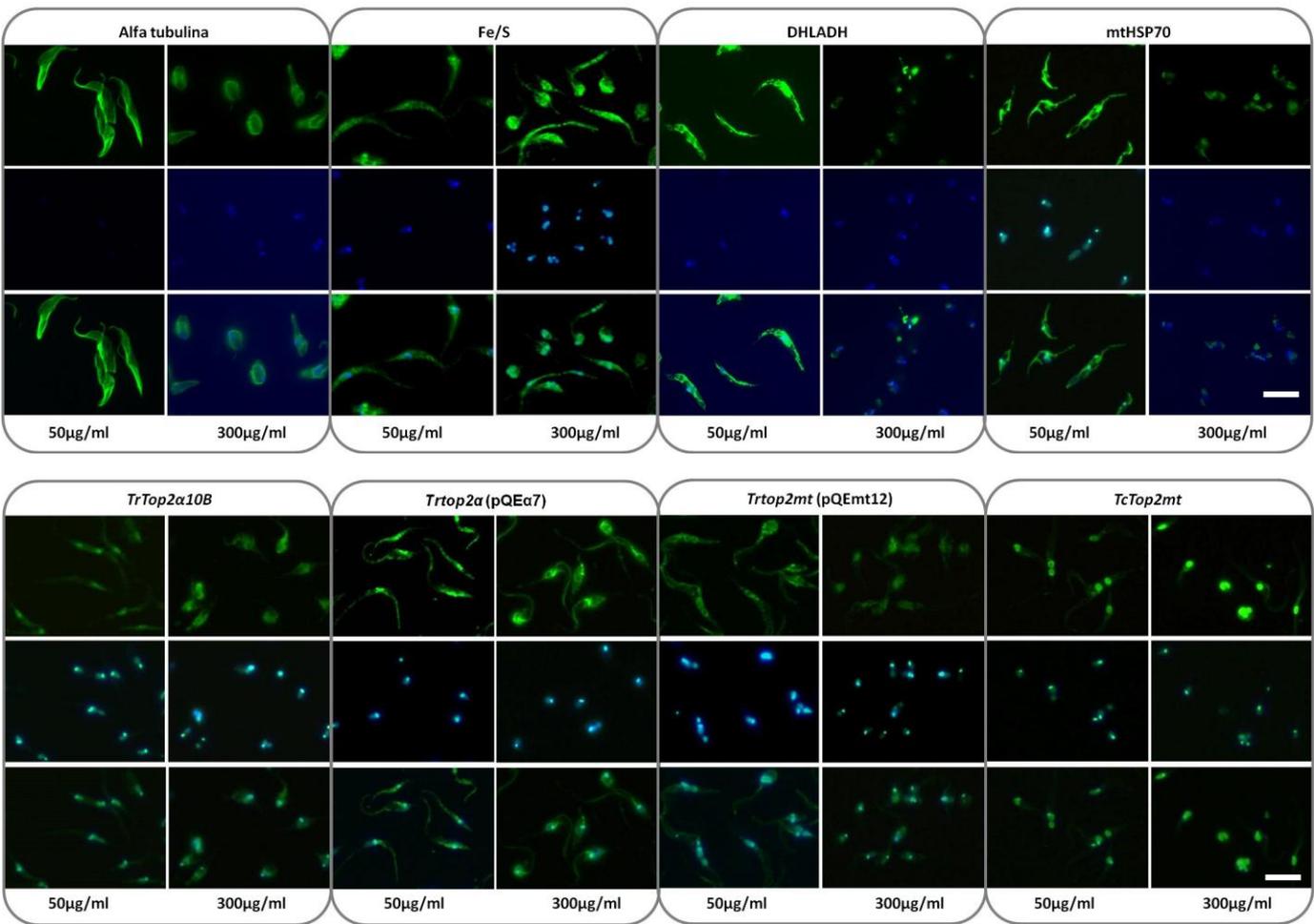
No oitavo dia de tratamento com 50  $\mu$ g/ml e 300  $\mu$ g/ml de novobiocina (figura 2.10), os anticorpos contra alfa tubulina e Fe/S evidenciaram o drástico efeito morfológico proporcionado pelo tratamento na maior concentração. Com os anticorpos para DHLADH e mtHSP70 foi possível observar que embora as condições fossem propícias para a diferenciação celular após oito dias de tratamento com 50  $\mu$ g/ml as formas encontradas eram correspondentes a formas tipicamente epimastigotas, com sua mitocôndria alongada e ocupando uma grande porção do citoplasma celular. No tratamento com 300  $\mu$ g/ml a situação foi bem diferente e neste grupo a mitocôndria parece estar completamente rompida. Para os anticorpos contra as DNA topoisomerases II, também pode ser observado que após oito dias de tratamento com 50  $\mu$ g/ml de novobiocina as formas encontradas possuíam padrão semelhante ao de epimastigotas do grupo controle, com alterações mais drásticas visíveis no tratamento com 300  $\mu$ g/ml, embora as alterações nucleares ainda não estejam tão pronunciadas quanto as mitocondriais.

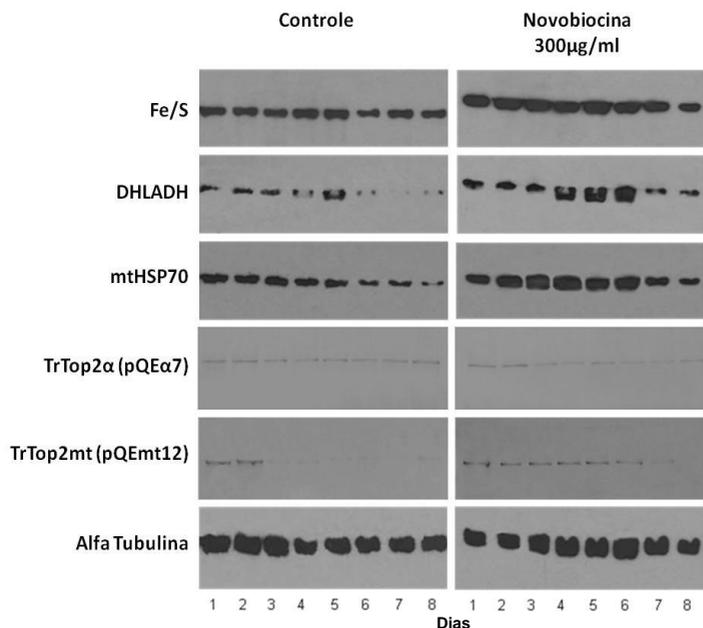
Alguns dos anticorpos foram também utilizados em ensaios de *western blot*, sendo que o nível de expressão avaliado está de acordo com os resultados observados na imunofluorescência (figura 2.11). Todas as amostras foram normalizadas quanto a quantidade de proteínas aplicadas no SDS-PAGE, sendo os níveis de expressão de alfa tubulina similares em todos os tempos avaliados. Da mesma forma, os níveis de expressão da proteína Fe/S praticamente não foram alterados durante o processo de diferenciação celular, nem mesmo durante o tratamento com 300  $\mu$ g/ml de novobiocina. Já, para os marcadores mitocondriais DHLADH e mtHSP70 houve uma redução nas suas expressões após o sexto dia de diferenciação e após o sétimo dia de tratamento com 300  $\mu$ g/ml de novobiocina. Para os antissoros contra as duas DNA topoisomerases II praticamente nenhum efeito foi observado para *TrTop2 $\alpha$*  (pQE $\alpha$ 7), tanto durante o controle de diferenciação quanto durante o tratamento. Entretanto, para *TrTop2mt* (pQE $\alpha$ 12) uma redução a partir do terceiro dia ocorreu durante o processo normal de diferenciação celular e uma redução a partir do sétimo dia com novobiocina.



**Figura 2.9:** Ensaio de imunofluorescência indireta utilizando diferentes anticorpos contra formas epimastigotas (dia 2) e tripomastigotas (dia 8) de *Trypanosoma rangeli*, sem a presença de novobiocina. As barras em branco representam 10µm.

**Figura 2.10:** Ensaio de imunofluorescência indireta utilizando diferentes anticorpos no oitavo dia do processo de metaciclização de *Trypanosoma rangeli* sob tratamento com diferentes concentrações de novobiocina (50 µg/ml e 300 µg/ml). As barras em branco representam 10µm.





**Figura 2.11:** *Western blot* utilizando diferentes anticorpos durante o processo de diferenciação celular padrão de *Trypanosoma rangeli* e sob tratamento com 300 µg/ml de novobiocina.

A partir do banco de sequências transcriptômicas do *T. rangeli* foi possível obter informações a respeito dos genes que codificam para alguns dos marcadores testados ainda não identificados para o *T. rangeli*, tais como as proteínas mtHSP70 e DHLADH. Através do algoritmo *Blastn* foi possível encontrar sequências com alta similaridade a determinadas porções dos genes descritos em outras espécies de tripanosomatídeos. Entretanto, somente um cluster foi identificado com similaridade aos os genes mtHSP70 e DHLADH. Basicamente, a maior similaridade foi encontrada para os ortólogos correspondentes em *T. cruzi*, sendo a identidade em todos os casos acima de 80% (tabela 2.2 e figura 2.12).

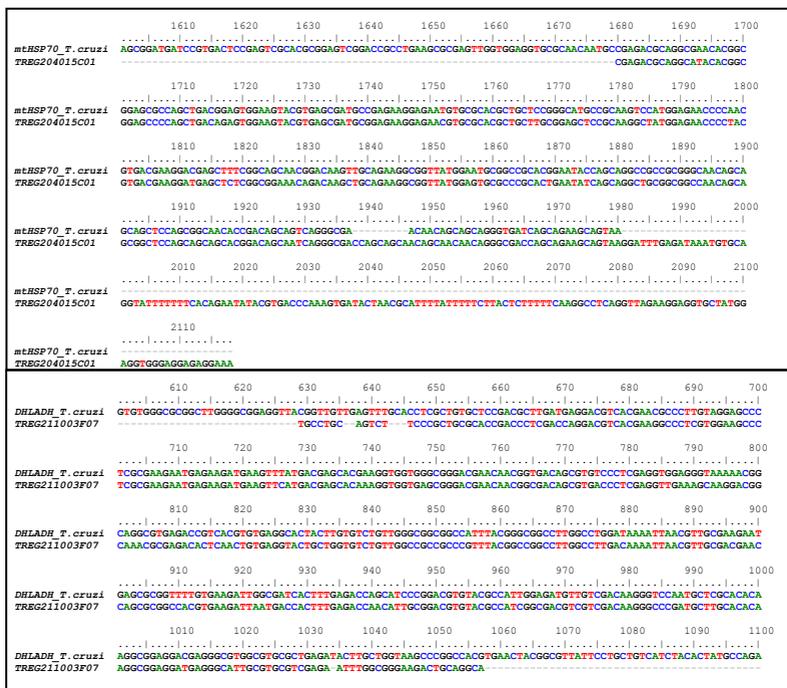
Embora, outros clusters apresentem regiões de domínios conservados correspondentes as proteínas de choque térmico de 70 kDa, somente uma sequência, obtida a partir de formas epimastigotas da cepa Choachí, pode ser definida como seu homólogo mitocondrial. Esta sequência apresenta 439 pb, e 86% dos 300 primeiros nucleotídeos são idênticos aos da região 3' do gene correspondente de *T. cruzi*. Esta

sequência possui uma inserção de nove nucleotídeos na posição 1.937 em relação a sequência do *T. cruzi* e 139 pb referentes a região 3' não traduzida.

Um único agrupamento de sequências também foi similar a DHLADH, apresentando 84% de identidade com a porção central do gene correspondente em *T. cruzi*. A sequência consenso de 423 pb foi obtida pelo agrupamento de sequências correspondentes a cinco transcritos de formas epimastigotas e uma de tripomastigota.

**Tabela 2.2:** Clusters identificados no banco de sequências transcriptômicas do *Trypanosoma rangeli* que possuem similaridade com as sequências gênicas da HSP70 mitocondrial e da Dihidrolipoamida desidrogenase.

| Descrição                      | Clusters      | Tam. (pb) | e-value | Identidade | Hit ID              | Tam. Hit (pb) | Região de similaridade |
|--------------------------------|---------------|-----------|---------|------------|---------------------|---------------|------------------------|
| HSP70 mitocondrial             | TREG204015C01 | 439       | 1e-64   | 86%        | gil162157:504-2474  | 1.965         | 1680-1980              |
| Dihidrolipoamida desidrogenase | TREG211003F07 | 423       | 1e-70   | 84%        | gil1854570:241-1674 | 1.431         | 649-1.047              |



**Figura 2.12:** Alinhamento parcial das sequências identificadas para o *Trypanosoma rangeli* com os seus ortólogos no *T. cruzi* correspondentes aos genes que codificam para mtHSP70 e DHLADH.

## 2.4 DISCUSSÃO

Vários fármacos comerciais disponíveis são conhecidos como inibidores de topoisomerases do tipo I e II. Pelo menos seis agentes antineoplásicos que possuem como alvo as DNA topoisomerases II são aprovados para o uso clínico nos Estados Unidos. De maneira geral, estes fármacos, particularmente a doxorubicina e o etoposídeo, fazem parte do tratamento de leucemias, linfomas e outros tipos de tumores, produzindo alguns efeitos tóxicos sobretudo em células de alta replicação (HANDE, 1998).

Inúmeros fármacos com atividade antibacteriana também possuem como alvo as DNA topoisomerases. As quinolonas e coumarinas inibem a DNA girase, uma topoisomerase II procariótica, essencial nas bactérias, mas ausente nos eucariotos. Esta enzima consiste de duas subunidades denominadas de GyrA e GyrB. GyrA está envolvida nas reações de clivagem e religação do DNA e determina a sensibilidade as quinolonas. GyrB catalisa a hidrólise de ATP e é sensível a atividade das coumarinas.

De maneira geral, estes inibidores de DNA topoisomerases do tipo II procarióticas e eucarióticas são capazes de bloquear, em certos níveis, a proliferação celular em tripanosomatídeos, causando em alguns casos danos estruturais principalmente a nível de cinetoplasto (GONZALES-PERDOMO et al., 1990; SHAPIRO; SHOWALTER, 1994; CAVALCANTI et al., 2004; DETERDING et al., 2005). Atualmente, pesquisas envolvendo compostos diferenciados como as fluoroquinolonas e alguns flavonóides em *L. panamensis* têm permitido estabelecer, com alvo nas DNA topoisomerases, uma alta seletividade antiparasitária quando comparada a citotoxicidade em macrófagos humanos (CORTAZAR; COOMBS; WALKER, 2007).

As coumarinas, como novobiocina e coumermicina, são produtos de *Streptomyces* sp. que atuam como inibidores da atividade ATPase, aparentemente competindo com o ATP pela ligação com a enzima (CAVALCANTI et al., 2004). Desta forma, no tratamento de formas epimastigotas de *T. rangeli* com novobiocina foi possível observar um efeito inibitório dose dependente na proliferação celular, sendo que nas concentrações de novobiocina acima de 100 µg/ml um efeito drástico no crescimento foi observado, indicando lise celular após quatro dias em 500 µg/ml e sete dias em 300 µg/ml.

A novobiocina não foi considerada um inibidor tão potente quanto o ácido nalidíxico no estudo envolvendo diferentes espécies da

Ordem Kinetoplastida, entretanto, um pequeno efeito sobre o crescimento em *B. culicis* e *C. fasciculata* foi observado, seguido de lise celular nas doses de 300 µg/ml e 500 µg/ml em formas epimastigotas de *T. cruzi* e promastigotas de *L. amazonensis* após dois ou três dias de cultura, respectivamente (CAVALCANTI et al., 2004), assim como pôde ser observado para o *T. rangeli*.

As diferenças nos resultados obtidos em relação a capacidade de crescimento e modificações estruturais resultantes do tratamento com inibidores de DNA topoisomerasas podem estar relacionadas nestes parasitos a fatores como: diferença na permeabilidade celular, no arranjo do kDNA, a sensibilidade de distintas topoisomerasas aos fármacos e também nas diferenças nas propriedades farmacocinéticas destes inibidores (CAVALCANTI et al., 2004).

Comparando os resultados obtidos com os dados de inibição de topoisomerasas em parasitos na literatura, WANG e ENGLUND (2001) demonstraram que através da inibição da DNA topoisomerasas II mitocondrial de *T. brucei* por RNA de interferência, as células foram capazes de se multiplicar até o sexto dia pós-indução. Então, gradativamente pararam de crescer e eventualmente morreram. Dentre diversos inibidores de topoisomerasas avaliados em outros estudos, o etoposídeo, que possui uma ampla atividade contra um grande número de tumores, exibiu somente uma atividade moderada contra formas sanguíneas de *T. brucei* (ED50= 1,36 µM) (DETERDING et al., 2005). No entanto, esta atividade tripanocida é comparável com a atividade citotóxica do etoposídeo contra diferentes linhagens tumorais (ED50= 0,87-9,95 µM) (GALVEZ et al., 2003). Já, frente a formas epimastigotas de outras diferentes espécies da Ordem Kinetoplastida, o etoposídeo não determinou qualquer redução no crescimento *in vitro* (CAVALCANTI et al., 2004).

Do ponto de vista morfológico, a novobiocina promoveu alterações em todas as concentrações testadas *in vitro* para o *T. rangeli*, havendo inicialmente um alongamento das formas epimastigotas e posteriormente o aparecimento de formas arredondadas. Com relação as estruturas celulares que contêm DNA, na concentração de 50 µg/ml pode ser observado a partir do sexto dia uma alteração principalmente com relação a forma e tamanho nuclear. Já, a 300 µg/ml esse efeito pode ser observado nas primeiras 48 horas de tratamento, onde um aumento no tamanho do cinetoplasto, evoluindo para sua diminuição é também acompanhada por possível desintegração nuclear.

Estes dados estão de acordo com estudos em que diversos inibidores de topoisomerases têm se mostrado eficazes em promover alterações no DNA nuclear e mitocondrial dos tripanosomatídeos. Fármacos como a ofloxacina, o ácido nalidíxico e também a novobiocina, inibiram a proliferação *in vitro* de diferentes espécies de tripanosomatídeos, além de promoverem alterações ultraestruturais no núcleo e no cinetoplasto destes protozoários (GONZALES-PERDOMO et al., 1990). Já o etoposídeo, um inibidor de topoisomerase II eucariótica, promoveu em *T. equiperdum* a linearização dos minicírculos assim como o acúmulo de pequenos catenados desses círculos (principalmente na forma de dímeros) (SHAPIRO; KLEIN; ENGLUND, 1989; SHAPIRO; SHOWALTER, 1994). A inibição da topoisomerase II com etoposídeo resulta ainda na liberação de praticamente todos os maxicírculos da rede de kDNA, além de promover a clivagem do DNA nuclear (SHAPIRO, 1993).

Além disso, o principal fenótipo relacionado a inibição da DNA topoisomerase II mitocondrial em *T. brucei* por RNAi foi a perda do kDNA, sendo que as células apresentavam o núcleo corado, mas sem cinetoplasto ou com um pequeno cinetoplasto remanescente após nove dias. Nestes casos, uma diminuição gradativa na intensidade da coloração já aparece nos primeiros três dias, indicando o efeito no kDNA (WANG; ENGLUND, 2001). Neste mesmo período também começam a aparecer espaços na rede que se torna mais fraca e eventualmente é convertida em pequenos fragmentos (LINDSAY et al., 2008). Os minicírculos replicados livres não podem formar uma nova rede, causando a gradativa perda e redução da rede de kDNA, levando eventualmente as células a morte. Na inibição da DNA topoisomerase II, redes assimétricas podem ser formadas gerando células filhas com quantidades desiguais de kDNA, o que pode explicar a diminuição do cinetoplasto em algumas células, quando o *T. rangeli* foi submetido a longa exposição em altas concentrações de novobiocina. O kDNA com tamanho reduzido pode então levar a falta dos RNA guias e conseqüentemente à morte celular (WANG et al., 2002).

Considerando os efeitos sobre o núcleo, no silenciamento por RNAi do gene *TbrTop2a* de *T. brucei* além do atraso e diminuição no crescimento populacional, sua inibição causou severos efeitos no núcleo (tamanho e forma) três dias após a indução, enquanto o DNA mitocondrial permaneceu inalterado. Neste experimento, de forma semelhante ao efeito da novobiocina no *T. rangeli*, logo nos primeiros

dias destacou-se para *T. brucei* o aparecimento de formas mais alongadas em relação ao controle (KULIKOWICZ; SHAPIRO, 2006).

Para investigar a coordenação destas alterações celulares e estruturais com a diminuição na capacidade replicativa do *T. rangeli* exposto a novobiocina, diferentes marcadores citológicos foram utilizados. Dentre oito testados, alguns resultados significativos de alterações foram observados com os anticorpos contra a chaperona mitocondrial de 70 kDa (mtHSP70), a enzima dihidrolipoamida desidrogenase (DHLADH), e os anticorpos contra DNA topoisomerases II de *T. rangeli*.

Os anticorpos contra DHLADH e mtHSP70 de *T. cruzi* foram utilizados com o objetivo de avaliar mudanças a nível mitocondrial como um todo. Assim, foi possível observar que enquanto no controle a mitocôndria ocupa um grande espaço no citoplasma celular, na concentração de 50 µg/ml de novobiocina não há diminuição visível na intensidade de fluorescência. Uma alteração morfológica mitocondrial que acompanha a alteração celular é visível, tornando-se esta mais afilada e alongada, semelhante a conformação observada para formas tripomastigotas. Na concentração de 300 µg/ml, embora ainda exista uma pequena marcação de ambas as proteínas, a possível região mitocondrial encontra-se arredondada e extremamente reduzida, compatível com indicativo de interferência metabólica e morte celular.

O anticorpo policlonal anti-mtHSP70 de *T. cruzi* possibilitou avaliar a mitocôndria do ponto de vista morfológico, apresentando-se evidenciada em distintas formas evolutivas de *T. brucei* e *T. cruzi* (ENGMAN; KIRCHHOFF; DONELSON, 1989; BANGS et al., 1993). As HSP70 atuam como chaperonas na síntese protéica e também estão envolvidas nos processos de tráfego de proteínas e controle de qualidade. As mtHSP70 são um subgrupo de proteínas localizadas especialmente na matriz e entre as membranas mitocondriais, que exercem funções similares as proteínas citoplasmáticas, mas são essenciais para o transporte de proteínas através das membranas mitocondriais (CAMPOS et al., 2008).

A enzima DHLADH, embora codificada por um gene nuclear é responsável pela atividade NAD diaforase mitocondrial, sendo bem caracterizada tanto para *T. brucei* quanto para *T. cruzi* (LOHRER; KRAUTH-SIEGEL, 1990; ELSE; HOUGH; DANSON, 1993). Em *T. brucei* um padrão de coloração similar foi obtido quando este anticorpo foi usado na imunofluorescência, localizando-se na mitocôndria da forma procíclica. A inibição enzimática por fenotiazinas, por exemplo, está

fortemente associada a um efeito tripanocida pela formação de radicais livres ou depleção de metabólitos (GUTIERREZ-CORREA, 2006). Assim, a diminuição no nível de expressão desta proteína, bem como da mtHSP70, pode ser secundária e decorrente de alterações metabólicas diretamente relacionadas a capacidade de replicação e transcrição, como as teoricamente resultantes no tratamento com novobiocina para o *T. rangeli*.

A imunofluorescência utilizando os anticorpos anti-DNA topoisomerasas II de *T. rangeli* foi realizada para verificar se a novobiocina promove a redistribuição celular das DNA topoisomerasas II. Com o antissoro obtido contra *TrTop2α* (pQEα7) uma marcação evidente numa região próxima ao cinetoplasto pode ser observada tanto no controle quanto no tratamento com 50 µg/ml. Já, na concentração de 300 µg/ml esta distribuição só foi observada nas primeiras 48 horas e de forma muito menos evidente, tornando-se totalmente dispersa após seis dias de tratamento. De forma semelhante, uma re-distribuição citoplasmática foi visível utilizando o antissoro contra *TrTop2mt* (pQE $\alpha$ 12), para o qual o controle revelava localização predominantemente nuclear. Finalmente com o antissoro contra *TcTop2mt* a localização nuclear esteve evidente tanto nos controle quanto nos tratamentos sob as diferentes concentrações, apenas com alteração na intensidade da fluorescência em 300 µg/ml de novobiocina após seis dias.

Estes resultados podem ser comparados com as diferenças na distribuição espacial também observadas em *B. culicis*, utilizando o anticorpo para a DNA topoisomerase II de *C. fasciculata* (MELENDY; RAY, 1989). No controle, dois pontos distintos foram localizados nos pólos opostos do kDNA. Entretanto, após o tratamento de 48 horas com 500 µg/ml de ácido nalidíxico, a distribuição enzimática passou a ser dispersa no disco do cinetoplasto (CAVALCANTI et al., 2004).

Apesar da atividade destes inibidores de topoisomerasas contra formas replicativas, não se pode esquecer que os tripanosomas são parasitos que apresentam um ciclo de vida heteroxênico e complexo, alternando entre insetos vetores e hospedeiros mamíferos. Devido as mudanças em cada um destes distintos ambientes, eles necessitam se adaptar às diferentes condições específicas. Estas mudanças também são acompanhadas pela extensiva modulação do tamanho e forma celular (VICKERMAN, 1985; MATTHEWS, 1999). Além dos eventos morfológicos extremos, mudanças no metabolismo, expressão de

novos marcadores de superfície, alterações na hidrofobicidade de membrana e a saída do ciclo replicativo devem ser consideradas, dentre outras.

Dentre as transformações relacionadas a diferenciação de formas replicativas em formas infectantes, uma das mudanças morfogênicas mais acentuadas ocorre a nível de cinetoplasto. Durante a proliferação celular, o kDNA deve ser replicado, enquanto na transformação de amastigotas e epimastigotas para tripomastigotas, o kDNA muda de uma forma compacta achatada para uma forma mais arredondada. De forma muito semelhante ao *T. cruzi*, no *T. rangeli* o cinetoplasto também apresenta-se como uma estrutura compacta e achatada na porção anterior de formas epimastigotas, e arredondada, pontual e subterminal na região posterior de formas tripomastigotas (MEIRELLES et al., 2005). Esta evidente alteração estrutural do kDNA é uma forte sugestão de que as DNA topoisomerases possuem um importante papel tanto na proliferação quanto na diferenciação de diferentes espécies da Ordem Kinetoplastida.

Para avaliar o papel do inibidor de DNA topoisomerases II no processo de diferenciação, inicialmente uma avaliação da capacidade de proliferação celular dos parasitos no meio específico para diferenciação foi realizada. O crescimento populacional destes parasitos foi observado até o quarto dia, tanto no controle quanto nos tratamentos com menores concentrações de novobiocina. Após o quarto dia, a diminuição no número de total parasitos ocorreu gradativamente. Novamente, o efeito da novobiocina foi de inibição do crescimento de forma dose dependente, com toxicidade menos pronunciada durante a diferenciação em comparação aos mesmos tratamentos realizados em meio LIT, devido a característica de menor proliferação celular deste parasito no meio DMEM.

O perfil da curva de crescimento obtida no trabalho de KOERICH e colaboradores (2002) é semelhante a observada para a diferenciação da cepa Choachí no presente estudo, apenas apresentando um atraso em relação ao número máximo de parasitos (sete dias) que pode ser explicado pela diminuição do pH do meio para 7,0 por estes autores. Entretanto, as modificações propostas no presente trabalho permitiram uma aumento de cerca de 15% na taxa de diferenciação em relação ao método anterior, possibilitando não só novos estudos do processo de diferenciação celular, mas condições qualitativas e quantitativas favoráveis para o teste de inibidores sobre a diferenciação de *T. rangeli*.

Todas as concentrações de novobiocina apresentaram efeitos inibitórios sobre o processo de diferenciação celular, sendo este efeito total nas concentrações de 150 µg/ml e 300 µg/ml e parcial na menor concentração (50 µg/ml), com apenas 18% de tripomastigotas após o oitavo dia de diferenciação, se comparado aos 97% de formas tripomastigotas observados no controle sem o fármaco. Coincidentemente, o aumento significativo no número de tripomastigotas no controle também ocorreu no quarto dia de diferenciação, sendo que pode-se especular uma correlação entre fatores associados a parada na multiplicação celular com a formação das formas diferenciadas.

GONZALES-PERDOMO e colaboradores (1990) também evidenciaram a atividade de inibidores de topoisomerases II bacterianas sobre a proliferação de epimastigotas e amastigotas, bem como a inibição do processo de diferenciação celular em *T. cruzi*. Os resultados por eles obtidos sugerem que as DNA topoisomerases II devem participar de um evento muito recente durante a metaciclogênese de *T. cruzi*, pois durante este processo há um aumento de cerca de três vezes a densidade da rede do kDNA sem o aumento correspondente na quantidade de DNA nuclear.

A diferenciação durante o ciclo celular em tripanosomas africanos também está vinculada a regulação desenvolvimental da atividade mitocondrial, requerendo a regulação do DNA nuclear bem como do cinetoplasto. Os resultados encontrados por TIMMS e colaboradores (2002), evidenciaram para o requerimento do DNA do cinetoplasto nas formas sanguíneas e para um controle dependente do cinetoplasto durante a diferenciação em formas procíclicas de *T. brucei*.

A observação de uma significativa, porém não explicada, alteração estrutural no DNA do cinetoplasto de formas tripomastigotas de *T. rangeli* pode indicar um mecanismo totalmente diferente para a regulação das proteínas codificadas pelo cinetoplasto, assim como previsto para o *T. cruzi*. Neste sentido, mudanças relacionadas ao grau de empacotamento e condensação levam a uma inibição generalizada da transcrição gênica no cinetoplasto quando este se adapta a uma nova configuração (TYLER; ENGMAN, 2001).

No intuito de tentar estabelecer outros parâmetros de avaliação morfofuncional do processo de diferenciação celular do parasito, um painel de anticorpos também foram testados quanto à sua potencialidade como marcadores.

Tanto nos ensaios de imunofluorescência quanto em *western blot* o anticorpo para a proteína Fe/S, bem como para a alfa tubulina não apresentaram diferenças quanto a intensidade de fluorescência entre as diferentes formas e tratamentos, embora o componente do citoesqueleto possa ser considerado um bom marcado morfológico.

A localização citoplasmática, bem como a manutenção da expressão nas diferentes formas e tratamentos pode ser explicada pelo fato de que as proteínas Fe/S são definidas como proteínas que carregam grupos ferro-enxofre. No transporte de elétrons mitocondrial, os complexos I e II da fosforilação oxidativa possuem múltiplos grupos ferro-enxofre, relacionados a proteínas envolvidas em reações de reações de oxidorredução (JOHNSON et al., 2005). Entretanto, estes grupos prostéticos também são comumente encontrados em várias metaloproteínas, sendo que esta amplitude de possibilidades protéicas como antígenos deve ser considerada no reconhecimento deste anticorpo e pode explicar o resultado de completa marcação citoplasmática em ambas as formas evolutivas do *T. rangeli*.

A alfa tubulina normalmente apresenta expressão constitutiva e é frequentemente utilizada como um controle para a normalização da quantidade protéica em diferentes organismos, assim como pode ser observado para o *T. rangeli*. Entretanto, em alguns casos sua expressão pode ser modificada, assim como o observado por TYLER e colaboradores (1997) onde uma redução na expressão desta proteína foi identificada nas formas curtas (“*stumpy*”) em relação as formas delgadas (“*slender*”) e procíclicas. Da mesma forma, não se pode descartar o fato de que a utilização deste anticorpo em microscopia confocal e/ou eletrônica podem revelar diferenças mais evidentes entre as formas evolutivas de *T. rangeli* a nível de organização do citoesqueleto.

A proteína ligante de cálcio flagelar- FCaBP apresentou clara localização no flagelo, sendo sua marcação mais intensa nas formas epimastigotas de *T. rangeli*. Este anticorpo também foi utilizado para *T. cruzi*, onde foi possível acompanhar a variação do tamanho do flagelo e utilizar este parâmetro como um marcador morfológico do processo de diferenciação e requerimento nutricional (TYLER; ENGMAN, 2000). Porcel e colaboradores, 1996 já haviam descrito o gene que codifica para esta proteína no *T. rangeli* como membro da família de proteínas ligantes de cálcio “EF-hand”. Além disso, nas comparações de homologia este gene apresentou grande similaridade com o homólogo de *T. cruzi* (82,8%) e de *T. brucei* (60,2%).

Os anticorpos para as proteínas mitocondriais DHLADH e mtHSP70 também revelaram ser ótimos marcadores para as alterações da morfologia mitocondrial que acontecem durante a diferenciação celular, sendo suas expressões claramente reduzidas e morfologicamente lineares nas formas tripomastigotas, com mtHSP70 praticamente inexistente neste estágio. Nos ensaios de *western blot* esta redução nos níveis de expressão foi evidente após o sexto dia de diferenciação no controle e após o sétimo dia no tratamento com 300 µg/ml de novobiocina.

Comparativamente, a enzima mitocondrial DHLADH é regulada diferencialmente em *T. brucei* (TYLER; MATTHEWS; GULL, 1997), mas considerada constitutivamente expressa em *T. cruzi* (SCHONECK et al., 1997). Desta forma, a morfologia do condrioma mitocondrial nos diferentes estágios do ciclo de vida em *T. cruzi* são bem similares ao que ocorre para o *T. rangeli*. O grau de desenvolvimento do condrioma tem relação com a expressão constitutiva estar completamente associada a ocorrência do ciclo de Krebs. Assim sendo, a complexidade da estrutura aumenta a partir de formas tripomastigotas onde é linear e afilada, para amastigotas, no qual é essencialmente uma estrutura compacta e posteriormente para epimastigota no qual o condrioma apresenta-se retorcido e morfologicamente mais complexo. Além disso, nos estágios proliferativos a estrutura também parece ter uma natureza dinâmica e varia com a densidade celular da população e com relação a posição celular ocupada (TYLER; ENGMAN, 2001).

Enquanto que componentes do ciclo de Krebs como a DHLADH são constitutivamente ativos durante o ciclo de vida de *T. cruzi*, alguns componentes nucleares da cadeia transportadora de elétrons e chaperonas mitocondriais, como a mtHSP70 avaliada em *T. rangeli*, são estágio reguladas, apresentando baixos níveis de expressão em tripomastigotas metacíclicos (TYLER; ENGMAN, 2001). Em *T. brucei* a expressão de mtHSP70 foi evidenciada na mitocôndria de formas intermediárias, formas sanguíneas tardias e procíclicas, com diferenças em algumas formas nas fases intermediárias destes estágios com expressão mais acentuada no cinetoplasto do que no resto da mitocôndria (TYLER; MATTHEWS; GULL, 1997).

A regulação desenvolvimental da atividade mitocondrial como um componente central do ciclo de vida nos tripanosomas pode refletir seus requerimentos metabólicos no sangue, nas células ou nos seus insetos vetores. Nos hospedeiros mamíferos, o ATP é gerado a partir da

glicose sanguínea na glicólise. Em *T. brucei*, por exemplo, quando o número de células aumenta durante a parasitemia os parasitos sanguíneos transformam-se da forma proliferativa delgada (“*slender*”) para a forma curta e não proliferativa (“*stumpy*”) (MATTHEWS, 1999). Nesta mudança ativa-se a expressão de alguns componentes mitocondriais, embora a via de respiração dependente de citocromo só aconteça após a transmissão para o inseto vetor. Esta adaptação metabólica é acompanhada por mudanças na morfologia celular, nos padrões de expressão gênica e na apresentação de antígenos de superfície, resultando na completa diferenciação em formas procíclicas que habitam o intestino do vetor (TIMMS et al., 2002).

Devido a falta de dados genômicos do *T. rangeli* a presença e identidade dos marcadores DHLADH e mtHSP70 também foi avaliada no transcriptoma desta espécie. Agrupamentos de sequências apresentaram alta similaridade (>80%) com regiões referentes nos genes ortólogos em *T. cruzi*, o que explica a alta reatividade dos anticorpos produzidos para proteínas do *T. cruzi* contra o *T. rangeli*. Interessantemente, os dados referentes ao número de transcritos para DHLADH encontrados nas diferentes formas do parasito também confirmam a maior expressão gênica em formas epimastigotas replicativas do que em tripomastigotas.

Para o *T. rangeli*, os anticorpos anti-DHLADH, mtHSP70 e DNA topoisomerasas II também permitiram observar que embora as condições relacionadas a proliferação celular fossem favoráveis para a diferenciação celular após oito dias de tratamento com 50 µg/ml, as formas encontradas eram na sua maioria correspondentes a epimastigotas típicos, apresentando uma mitocôndria alongada que ocupava uma grande porção do citoplasma celular. No tratamento com 300 µg/ml a situação foi bem diferente e neste grupo a mitocôndria parecia estar completamente rompida.

Durante o processo de diferenciação celular em *T. cruzi*, parasitos mantidos na presença do inibidor de topoisomerase ofloxacina, também apresentaram um padrão protéico característico de epimastigotas não diferenciados, enquanto aqueles que estavam na ausência dos inibidores exibiram um perfil característico de tripomastigotas metacíclicos, expressando antígenos na faixa de 85 e 90 kDa. Assim como para o *T. rangeli*, nos ensaios com novobiocina a morfologia de epimastigotas se manteve, entretanto os epimastigotas de *T. cruzi* eram capazes de expressar antígenos estágio-específicos de tripomastigotas (GONZALES-PERDOMO et al., 1990).

Uma das possíveis explicações pode estar relacionada ao fato de que a regulação desenvolvimental da atividade mitocondrial requer a completa coordenação entre o núcleo e o cinetoplasto. Isto pode ser exemplificado pelo complexo citocromo oxidase, que compreende 10 subunidades codificadas no núcleo e três codificadas no cinetoplasto (COX I, II e III), cuja regulação está fortemente relacionada ao estágio procíclico em *T. brucei*. O cinetoplasto não é necessário para a transição entre os estágios sanguíneos de forma delgada (“*slender*”) para as formas curtas (“*stumpy*”) ou em eventos recentes na diferenciação à formas procíclicas. Porém fortes evidências suportam que o cinetoplasto é requerido para a viabilidade das formas sanguíneas e para a progressão através de um ponto de controle operando durante a diferenciação a formas procíclicas (TIMMS et al., 2002).

Nos ensaios de *western blot* com os antissoros contra as duas DNA topoisomerasas II praticamente nenhum efeito foi observado para *TrTop2a*, tanto no controle quanto no tratamento com novobiocina. Entretanto, para *TrTop2mt* uma redução a partir do terceiro dia ocorre durante o processo normal de diferenciação celular e uma redução a partir do sétimo dia com a presença da novobiocina.

Dois dias após a inibição de DNA topoisomerase II mitocondrial de *T. brucei* por RNAi, a expressão desta enzima foi reduzida em cerca de 75%, e praticamente nenhuma expressão foi detectada após 3-4 dias da indução (WANG; ENGLUND, 2001). Dentre os possíveis danos que promovem a redução no tamanho do kDNA está a continua liberação de minicírculos sem a reintrodução das moléculas filhas a periferia da rede, a divisão assimétrica da rede e a fragmentação devido a ausência de reparo (LINDSAY et al., 2008). Entretanto, a inibição promovida pela novobiocina durante a diferenciação do *T. rangeli* pode não ser total como a observada com RNAi em *T. brucei*, sendo plausível que a inibição da expressão só ocorra ao longo de um maior período de interação. Já, no controle da diferenciação celular, a diminuição mais rápida na expressão pode ser devido a adaptações relacionadas a mudanças metabólicas que ocorrem anteriormente a passagem de uma fase replicativa para não replicativa, como sugerido na diferenciação em *T. brucei* por Tyler e colaboradores, 1997).

Alguns trabalhos têm sugerido que somente as DNA topoisomerasas de tipo I podem ser os possíveis alvos destes inibidores nas formas sanguíneas de *T. brucei*, pois já foi demonstrado experimentalmente que a DNA topoisomerase II não é essencial para o

estágio evolutivo existente no hospedeiro mamífero (TIMMS et al., 2002). No mesmo sentido, a novobiocina também não foi capaz de inibir totalmente a diferenciação celular em *T. cruzi* quando adicionada após o processo iniciar (GONZALES-PERDOMO et al., 1990). Assim, o modo de ação destes inibidores de DNA topoisomerasas II ainda precisam ser melhor investigados.

De qualquer forma, devido a grande complexidade na organização do kDNA, não é surpreendente que as DNA topoisomerasas II sejam essenciais na manutenção e também nos processos de diferenciação celular.

## 2.5 CONCLUSÕES

- A novobiocina apresentou um efeito inibitório dose dependente tanto na proliferação celular quanto no processo de diferenciação celular, sendo no primeiro caso o efeito mais pronunciado.
- Em meio LIT, nos tratamentos com doses acima de 300 µg/ml a diminuição no número de parasitos foi evidente, indicando lise celular posterior a alteração morfológica.
- Morfológicamente a novobiocina induziu um alongamento celular seguido pelo aparecimento de um grande número de células arredondadas, com alterações mitocondriais evidenciadas por imunofluorescência.
- O núcleo e o cinetoplasto apresentaram-se estruturalmente alterados nos tratamentos com novobiocina conforme coloração por DAPI.
- Concentrações acima de 150 µg/ml de novobiocina foram capazes de inibir completamente o processo de diferenciação celular *in vitro*, enquanto que para 50 µg/ml somente 18% de tripomastigotas foram encontrados em comparação aos 97% presentes no controle.
- Marcadores biológicos como as proteínas mtHSP70, DHLADH, FCaBP e a DNA topoisomerase II (*TrTop2mt*) tiveram sua expressão reduzida durante a diferenciação celular do *T. rangeli*.
- Durante a diferenciação celular, no tratamento com 50 µg/ml de novobiocina os anticorpos para DHLADH, mtHSP70 e as DNA topoisomerasas II permitiram observar que as formas encontradas eram na sua maioria correspondentes a epimastigotas típicos, apresentando uma mitocôndria alongada que ocupava uma grande porção do citoplasma celular.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora as DNA topoisomerases II estejam presentes nos mais diversos grupos que incluem desde Archaea até eucariotos superiores, elas ainda apresentam-se como alvos interessantes do ponto de vista terapêutico. Com relação as DNA topoisomerases de membros da Ordem Kinetoplastida, a ocorrência de regiões e atividades diferenciadas entre o parasito e o hospedeiro, associados a sua importância metabólica e a existência de inibidores justifica-se os estudos relacionados a sua utilização como alvo terapêutico.

Neste sentido, uma vez que as topoisomerases são altamente envolvidas na divisão celular dos parasitos, a caracterização destes genes em uma espécie não patogênica para mamíferos, assim como a utilização de anticorpos para determinar os níveis e sítios de expressão das topoisomerases, permitiu o estabelecimento de um modelo de estudo de alta relevância, incluindo diferentes estágios evolutivos do *T. rangeli*.

Além da caracterização molecular dos genes e da abordagem que permitiu identificar estas enzimas como fundamentais na proliferação e diferenciação celular do *T. rangeli*, este estudo possibilitou a obtenção de maiores informações a respeito desta espécie ainda pouco estudada e uma correlação com as DNA topoisomerases de outras espécies, sobretudo com o *T. cruzi* e o *T. brucei*. Embora, comparativamente, a maior proximidade biológica do *T. rangeli* ocorra com o *T. cruzi*, os resultados obtidos neste estudo, que incluem iniciadores específicos em reações de PCR bem como anticorpos monoclonais e policlonais permitiram a diferenciação entre estes dois organismos e podem ser utilizados como ferramentas para fins de diagnóstico diferencial.

Desta forma, através da utilização das DNA topoisomerases II do *T. rangeli* como modelo para a possível obtenção de uma estrutura tridimensional confiável novas perspectivas poderão ser abertas para a utilização destas enzimas como alvo terapêutico para a doença de Chagas e leishmanioses.

## REFERÊNCIAS

ABATE, T.; RINCON, M.; DIAZ-BELLO, Z.; SPENCER, L.; RODRIGUEZ-ACOSTA, A. A mucin like gene different from the previously reported members of the mucin like gene families is transcribed in *Trypanosoma cruzi* but not in *Trypanosoma rangeli*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.100, n.4, p.391-5, Jul. 2005.

ACOSTA, L.; ROMANHA, A. J.; COSENZA, H.; KRETTLI, A. U. Trypanosomatid isolates from Honduras: differentiation between *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **Am J Trop Med Hyg**, v.44, n.6, p.676-83, Jun. 1991.

ADACHI, N.; MIYAIKE, M.; KATO, S.; KANAMARU, R.; KOYAMA, H.; KIKUCHI, A. Cellular distribution of mammalian DNA topoisomerase II is determined by its catalytically dispensable C-terminal domain. **Nucleic Acids Res**, v.25, n.15, p.3135-42, Aug 1. 1997.

AFCHAIN, D.; LE RAY, D.; FRUIT, J.; CAPRON, A. Antigenic make-up of *Trypanosoma cruzi* culture forms: identification of a specific component. **J Parasitol**, v.65, n.4, p.507-14, Aug. 1979.

AKSOY, S.; SHAY, G. L.; VILLANUEVA, M. S.; BEARD, C. B.; RICHARDS, F. F. Spliced leader RNA sequences of *Trypanosoma rangeli* are organized within the 5S rRNA-encoding genes. **Gene**, v.113, n.2, p.239-43, Apr 15. 1992.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, v.25, n.17, p.3389-402, Sep 1. 1997.

AÑEZ-ROJAS, N.; GARCIA-LUGO, P.; CRISANTE, G.; ROJAS, A.; AÑEZ, N. Isolation, purification and characterization of GPI-anchored membrane proteins from *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. **Acta Trop**, v.97, n.2, p.140-5, Feb. 2006.

AÑEZ, N.; VELANDIA, J.; RODRIGUEZ, A. M. *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. VIII. Response to reinfections in 2 mammals. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.80, n.2, p.149-53, Apr-Jun. 1985.

ANTHONY, R. L.; CODY, T. S.; CONSTANTINE, N. T. Antigenic differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* by means of monoclonal-hybridoma antibodies. **Am J Trop Med Hyg**, v.30, n.6, p.1192-7, Nov. 1981.

ÁVILA, A. R.; DALLAGIOVANNA, B.; YAMADA-OGATTA, S. F.; MONTEIRO-GOES, V.; FRAGOSO, S. P.; KRIEGER, M. A.; GOLDENBERG, S. Stage-specific gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Genet Mol Res**, v.2, n.1, p.159-68, 2003.

ÁVILA, A. R.; YAMADA-OGATTA, S. F.; DA SILVA MONTEIRO, V.; KRIEGER, M. A.; NAKAMURA, C. V.; DE SOUZA, W.; GOLDENBERG, S. Cloning and characterization of the metacyclogenin gene, which is specifically expressed during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Mol Biochem Parasitol**, v.117, n.2, p.169-77, Oct. 2001.

BAKSHI, R. P.; SHAPIRO, T. A. DNA topoisomerases as targets for antiprotozoal therapy. **Mini Rev Med Chem**, v.3, n.6, p.597-608, Sep. 2003.

BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Curr Opin Biotechnol**, v.10, n.5, p.411-21, Oct. 1999.

BANGS, J. D.; UYETAKE, L.; BRICKMAN, M. J.; BALBER, A. E.; BOOTHROYD, J. C. Molecular cloning and cellular localization of a BiP homologue in *Trypanosoma brucei*. Divergent ER retention signals in a lower eukaryote. **J Cell Sci**, v.105 ( Pt 4), p.1101-13, Aug. 1993.

BARNABE, C.; BRISSE, S.; TIBAYRENC, M. Phylogenetic diversity of bat trypanosomes of subgenus *Schizotrypanum* based on multilocus enzyme electrophoresis, random amplified polymorphic DNA, and cytochrome b nucleotide sequence analyses. **Infect Genet Evol**, v.2, n.3, p.201-8, Feb. 2003.

BELTRAME-BOTELHO, I. T.; GASPAR-SILVA, D.; STEINDEL, M.; DÁVILA, A. M.; GRISARD, E. C. Internal transcribed spacers (ITS) of *Trypanosoma rangeli* ribosomal DNA (rDNA): a useful marker for inter-specific differentiation. **Infect Genet Evol**, v.5, n.1, p.17-28, Jan. 2005.

BENDTSEN, J. D.; NIELSEN, H.; VON HEIJNE, G.; BRUNAK, S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. **J Mol Biol**, v.340, n.4, p.783-95, Jul 16. 2004.

BENNETT, R. J.; WANG, J. C. Association of yeast DNA topoisomerase III and Sgs1 DNA helicase: studies of fusion proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.98, n.20, p.11108-13, Sep 25. 2001.

BERGER, J. M. Structure of DNA topoisomerases. **Biochim Biophys Acta**, v.1400, n.1-3, p.3-18, Oct 1. 1998.

BERGERAT, A.; DE MASSY, B.; GADELLE, D.; VAROUTAS, P. C.; NICOLAS, A.; FORTERRE, P. An atypical topoisomerase II from Archaea

with implications for meiotic recombination. **Nature**, v.386, n.6623, p.414-7, Mar 27. 1997.

BONALDO, M. C.; SOUTO-PADRON, T.; DE SOUZA, W.; GOLDENBERG, S. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. **J Cell Biol**, v.106, n.4, p.1349-58, Apr. 1988.

BONTEMPI, E. J.; GARCIA, G. A.; BUSCHIAZZO, A.; HENRIKSSON, J.; PRAVIA, C. A.; RUIZ, A. M.; PETTERSSON, U.; PSZENNY, V. The tyrosine aminotransferase from *Trypanosoma rangeli*: sequence and genomic characterization. **FEMS Microbiol Lett**, v.189, n.2, p.253-7, Aug 15. 2000.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v.72, p.248-54, May 7. 1976.

BRAUN, P.; HU, Y.; SHEN, B.; HALLECK, A.; KOUNDINYA, M.; HARLOW, E.; LABAER, J. Proteome-scale purification of human proteins from bacteria. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.99, n.5, p.2654-9, Mar 5. 2002.

BRILL, S. J.; DINARDO, S.; VOELKEL-MEIMAN, K.; STERNGLANZ, R. Need for DNA topoisomerase activity as a swivel for DNA replication for transcription of ribosomal RNA. **Nature**, v.326, n.6111, p.414-6, Mar 26-Apr 1. 1987.

BUSCHIAZZO, A.; CAMPETELLA, O.; FRASCH, A. C. *Trypanosoma rangeli* sialidase: cloning, expression and similarity to *T. cruzi* trans-sialidase. **Glycobiology**, v.7, n.8, p.1167-73, Dec. 1997.

BUSCHIAZZO, A.; CREMONA, M. L.; CAMPETELLA, O.; FRASCH, A. C.; SANCHEZ, D. O. Sequence of a *Trypanosoma rangeli* gene closely related to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **Mol Biochem Parasitol**, v.62, n.1, p.115-6, Nov. 1993.

CAMPOS, R. M.; NASCIMENTO, M.; FERRAZ, J. C.; PEREIRA, M. M.; ROCHA, P. O.; THOMPSON, G. M.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; FIGUEIREDO, R. C.; DE MELO NETO, O. P. Distinct mitochondrial HSP70 homologues conserved in various *Leishmania* species suggest novel biological functions. **Mol Biochem Parasitol**, v.160, n.2, p.157-62, Aug. 2008.

CARON, P. R.; WATT, P.; WANG, J. C. The C-terminal domain of *Saccharomyces cerevisiae* DNA topoisomerase II. **Mol Cell Biol**, v.14, n.5, p.3197-207, May. 1994.

- CAVALCANTI, D. P.; FRAGOSO, S. P.; GOLDENBERG, S.; DE SOUZA, W.; MOTTA, M. C. The effect of topoisomerase II inhibitors on the kinetoplast ultrastructure. **Parasitol Res**, v.94, n.6, p.439-48, Dec. 2004.
- CHAKRABORTY, A. K.; MAJUMDER, H. K. Decatenation of kinetoplast DNA by an ATP-dependent DNA topoisomerase from the kinetoplast hemoflagellate *Leishmania donovani*. **Mol Biochem Parasitol**, v.26, n.3, p.215-24, Dec. 1987.
- CHAMPOUX, J. J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. **Annu Rev Biochem**, v.70, p.369-413. 2001.
- CHAMPOUX, J. J. A first view of the structure of a type IA topoisomerase with bound DNA. **Trends Pharmacol Sci**, v.23, n.5, p.199-201, May. 2002.
- CHEESMAN, S.; MCALEESE, S.; GOMAN, M.; JOHNSON, D.; HORROCKS, P.; RIDLEY, R. G.; KILBEY, B. J. The gene encoding topoisomerase II from *Plasmodium falciparum*. **Nucleic Acids Res**, v.22, n.13, p.2547-51, Jul 11. 1994.
- CHEN, J.; ENGLUND, P. T.; COZZARELLI, N. R. Changes in network topology during the replication of kinetoplast DNA. **EMBO J**, v.14, n.24, p.6339-47, Dec 15. 1995.
- CHEN, J.; RAUCH, C. A.; WHITE, J. H.; ENGLUND, P. T.; COZZARELLI, N. R. The topology of the kinetoplast DNA network. **Cell**, v.80, n.1, p.61-9, Jan 13. 1995.
- COLIGAN, J. E. Electrophoresis. In: (Ed.). **Current Protocols in Protein Science** New York.: John Wiley and Sons, Inc. , 2002 Electrophoresis, p.10.0.1-10.4.36.
- COLLINS, I.; WEBER, A.; LEVENS, D. Transcriptional consequences of topoisomerase inhibition. **Mol Cell Biol**, v.21, n.24, p.8437-51, Dec. 2001.
- CONTRERAS, V. T.; SALLES, J. M.; THOMAS, N.; MOREL, C. M.; GOLDENBERG, S. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Mol Biochem Parasitol**, v.16, n.3, p.315-27, Sep. 1985.
- COOK, P. R. The organization of replication and transcription. **Science**, v.284, n.5421, p.1790-5, Jun 11. 1999.

CORTAZAR, T. M.; COOMBS, G. H.; WALKER, J. *Leishmania panamensis*: comparative inhibition of nuclear DNA topoisomerase II enzymes from promastigotes and human macrophages reveals anti-parasite selectivity of fluoroquinolones, flavonoids and pentamidine. **Exp Parasitol**, v.116, n.4, p.475-82, Aug. 2007.

COURA, J. R.; FERNANDES, O.; ARBOLEDA, M.; BARRETT, T. V.; CARRARA, N.; DEGRAVE, W.; CAMPBELL, D. A. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.90, n.3, p.278-9, May-Jun. 1996.

COZZARELLI, N. R. DNA gyrase and the supercoiling of DNA. **Science**, v.207, n.4434, p.953-60, Feb 29. 1980.

CRENSHAW, D. G.; HSIEH, T. Function of the hydrophilic carboxyl terminus of type II DNA topoisomerase from *Drosophila melanogaster*. I. In vitro studies. **J Biol Chem**, v.268, n.28, p.21328-34, Oct 5. 1993.

CUERVO, C.; LOPEZ, M. C.; PUERTA, C. The *Trypanosoma rangeli* histone H2A gene sequence serves as a differential marker for KP1 strains. **Infect Genet Evol**, v.6, n.5, p.401-9, Sep. 2006.

D'ALESSANDRO, A.; SARAVIA, N. G. *Trypanosoma rangeli*. In: HM, G. (Ed.). **In Protozoal Diseases**. London: Arnold 1999. *Trypanosoma rangeli*, p.398-412

D'ARPA, P.; BEARDMORE, C.; LIU, L. F. Involvement of nucleic acid synthesis in cell killing mechanisms of topoisomerase poisons. **Cancer Res**, v.50, n.21, p.6919-24, Nov 1. 1990.

D'ALESSANDRO-BACIGALUPO, A.; SARAVIA, N. G. *Trypanosoma rangeli*. In: KREIER, J. P. e BAKER, E. J. R. (Ed.). **Parasitic Protozoa**. London: Academic Press, 1992. *Trypanosoma rangeli*, p.1-54

D'ALESSANDRO, A. Biology of *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920. In: LUMSDEN, W. H. R. e EVANS, D. A. (Ed.). **Biology of Kinetoplastida**. London: Academic Press, v.1, 1976. Biology of *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920, p.328-403

DA SILVA, F. M.; NOYES, H.; CAMPANER, M.; JUNQUEIRA, A. C.; COURA, J. R.; AÑEZ, N.; SHAW, J. J.; STEVENS, J. R.; TEIXEIRA, M. M. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based

on SSU and ITS ribosomal sequences. **Parasitology**, v.129, n.Pt 5, p.549-61, Nov. 2004.

DALLAGIOVANNA, B.; PLAZANET-MENUT, C.; OGATTA, S. F.; ÁVILA, A. R.; KRIEGER, M. A.; GOLDENBERG, S. *Trypanosoma cruzi*: a gene family encoding chitin-binding-like proteins is posttranscriptionally regulated during metacyclogenesis. **Exp Parasitol**, v.99, n.1, p.7-16, Sep. 2001.

DAS, A.; DASGUPTA, A.; SENGUPTA, T.; MAJUMDER, H. K. Topoisomerases of kinetoplastid parasites as potential chemotherapeutic targets. **Trends Parasitol**, v.20, n.8, p.381-7, Aug. 2004.

DAS, A.; DASGUPTA, A.; SHARMA, S.; GHOSH, M.; SENGUPTA, T.; BANDOPADHYAY, S.; MAJUMDER, H. K. Characterisation of the gene encoding type II DNA topoisomerase from *Leishmania donovani*: a key molecular target in antileishmanial therapy. **Nucleic Acids Res**, v.29, n.9, p.1844-51, May 1. 2001.

DE LEON, J. R. Nota preliminar acerca de la enfermedad de Chagas em Guatemala. Casos encontrados em el Oriente de la Republica y probable existencia de un nuevo tripanosoma humano. **Rev Cruz Roja Guatemalteca**, n.9, p.2. 1942.

DE MORAES, M. H.; GUARNERI, A. A.; GIRARDI, F. P.; RODRIGUES, J. B.; EGER, I.; TYLER, K. M.; STEINDEL, M.; GRISARD, E. C. Different serological cross-reactivity of *Trypanosoma rangeli* forms in *Trypanosoma cruzi*-infected patients sera. **Parasit Vectors**, v.1, n.1, p.20. 2008.

DE OLIVEIRA, M. A.; DE SOUZA, W. An electron microscopic study of penetration by *Trypanosoma rangeli* into midgut cells of *Rhodnius prolixus*. **J Invertebr Pathol**, v.77, n.1, p.22-6, Jan. 2001.

DE SCORZA, C.; URDANETA-MORALES, S.; TEJERO, F. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: preliminary report on histopathology in experimentally infected mice. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.28, n.5, p.371-8, Sep-Oct. 1986.

DE SOUZA, W.; MOTTA, M. C. Endosymbiosis in protozoa of the Trypanosomatidae family. **FEMS Microbiol Lett**, v.173, n.1, p.1-8, Apr 1. 1999.

DE STEFANI MARQUEZ, D.; RODRIGUES-OTTAIANO, C.; MONICA OLIVEIRA, R.; PEDROSA, A. L.; CABRINE-SANTOS, M.; LAGES-SILVA, E.; RAMIREZ, L. E. Susceptibility of different triatomine species to

*Trypanosoma rangeli* experimental infection. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v.6, n.1, p.50-6, Spring. 2006.

DETERDING, A.; DUNGEY, F. A.; THOMPSON, K. A.; STEVERDING, D. Anti-Trypanosomal activities of DNA topoisomerase inhibitors. **Acta Trop**, v.93, n.3, p.311-6, Mar. 2005.

DINARDO, S.; VOELKEL, K. A.; STERNGLANZ, R.; REYNOLDS, A. E.; WRIGHT, A. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes. **Cell**, v.31, n.1, p.43-51, Nov. 1982.

DINGWALL, C.; LASKEY, R. A. Nuclear targeting sequences--a consensus? **Trends Biochem Sci**, v.16, n.12, p.478-81, Dec. 1991.

DOUC-RASY, S.; KAYSER, A.; RIOU, J. F.; RIOU, G. ATP-independent type II topoisomerase from trypanosomes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.83, n.19, p.7152-6, Oct. 1986a.

DOUC-RASY, S.; RIOU, J. F.; KAYSER, A.; RIOU, G. A DNA topoisomerase from trypanosomes able to catenate, decatenate and unknot DNA without ATP. **C R Acad Sci III**, v.302, n.8, p.283-6. 1986b.

DREW, M. E.; ENGLUND, P. T. Intramitochondrial location and dynamics of *Crithidia fasciculata* kinetoplast minicircle replication intermediates. **J Cell Biol**, v.153, n.4, p.735-44, May 14. 2001.

DRUSANO, G. L., TOWNSEND, R. J., WALSH, T. J., FORREST, A., ANTAL, E. J., STANDIFORD, H. C. Steady-state serum pharmacokinetics of novobiocin and rifampin alone and in combination. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 30, n 1, p. 42-45 July.1986.

DUTTA, R.; INOUE, M. GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. **Trends Biochem Sci**, v.25, n.1, p.24-8, Jan. 2000.

EDWARDS, A. M.; ARROWSMITH, C. H.; CHRISTENDAT, D.; DHARAMSI, A.; FRIESEN, J. D.; GREENBLATT, J. F.; VEDADI, M. Protein production: feeding the crystallographers and NMR spectroscopists. **Nat Struct Biol**, v.7 Suppl, p.970-2, Nov. 2000.

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

EILERS, M.; VERNER, K.; HWANG, S.; SCHATZ, G. Import of proteins into mitochondria. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v.319, n.1193, p.121-6, May 31. 1988.

EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BLANDIN, G.; BERRIMAN, M.; CRABTREE, J.; AGGARWAL, G.; CALER, E.; RENAULD, H.; WORTHEY, E. A.; HERTZ-FOWLER, C.; GHEDIN, E.; PEACOCK, C.; BARTHOLOMEU, D. C.; HAAS, B. J.; TRAN, A. N.; WORTMAN, J. R.; ALSMARK, U. C.; ANGIUOLI, S.; ANUPAMA, A.; BADGER, J.; BRINGAUD, F.; CADAG, E.; CARLTON, J. M.; CERQUEIRA, G. C.; CREASY, T.; DELCHER, A. L.; DJIKENG, A.; EMBLEY, T. M.; HAUSER, C.; IVENS, A. C.; KUMMERFELD, S. K.; PEREIRA-LEAL, J. B.; NILSSON, D.; PETERSON, J.; SALZBERG, S. L.; SHALLOM, J.; SILVA, J. C.; SUNDARAM, J.; WESTENBERGER, S.; WHITE, O.; MELVILLE, S. E.; DONELSON, J. E.; ANDERSSON, B.; STUART, K. D.; HALL, N. Comparative genomics of Trypanosomatid parasitic protozoa. **Science**, v.309, n.5733, p.404-9, Jul 15. 2005.

ELSE, A. J.; HOUGH, D. W.; DANSON, M. J. Cloning, sequencing, and expression of *Trypanosoma brucei* dihydroliipoamide dehydrogenase. **Eur J Biochem**, v.212, n.2, p.423-9, Mar 1. 1993.

EMMANUELLE-MACHADO, P.; KOERICH, L. B.; JOUKOSKI DDE, B.; CARVALHO-PINTO, C. J.; GRISARD, E. C.; STEINDEL, M. Biology of *Triatoma klugi* Carcavallo, Jurberg, Lent & Galvao 2001 (Heteroptera: Reduviidae) under laboratory conditions: effects of distinct blood sources and susceptibility to *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.97, n.4, p.583-7, Jun. 2002.

ENGLUND, P. T.; MARINI, J. C. The replication of kinetoplast DNA. **Am J Trop Med Hyg**, v.29, n.5 Suppl, p.1064-9, Sep. 1980.

ENGMAN, D. M.; KIRCHHOFF, L. V.; DONELSON, J. E. Molecular cloning of mtp70, a mitochondrial member of the hsp70 family. **Mol Cell Biol**, v.9, n.11, p.5163-8, Nov. 1989.

FAIRLAMB, A. H. Chemotherapy of human African trypanosomiasis: current and future prospects. **Trends Parasitol**, v.19, n.11, p.488-94, Nov. 2003.

FIGUEIREDO, R. C.; ROSA, D. S.; SOARES, M. J. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. **J Parasitol**, v.86, n.6, p.1213-8, Dec. 2000.

FRAGOSO, S. P.; GOLDENBERG, S. Cloning and characterization of the gene encoding *Trypanosoma cruzi* DNA topoisomerase II. **Mol Biochem Parasitol**, v.55, n.1-2, p.127-34, Oct. 1992.

FRAGOSO, S. P.; MATTEI, D.; HINES, J. C.; RAY, D.; GOLDENBERG, S. Expression and cellular localization of *Trypanosoma cruzi* type II DNA topoisomerase. **Mol Biochem Parasitol**, v.94, n.2, p.197-204, Aug 1. 1998.

FRAGOSO, S. P.; PLAZANET-MENUT, C.; CARREIRA, M. A.; MOTTA, M. C.; DALLAGIOVANA, B.; KRIEGER, M. A.; GOLDENBERG, S. Cloning and characterization of a gene encoding a putative protein associated with U3 small nucleolar ribonucleoprotein in *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, v.126, n.1, p.113-7, Jan. 2003.

FRAIDENRAICH, D.; PENA, C.; ISOLA, E. L.; LAMMEL, E. M.; COSO, O.; ANEL, A. D.; PONGOR, S.; BARALLE, F.; TORRES, H. N.; FLAWIA, M. M. Stimulation of *Trypanosoma cruzi* adenylyl cyclase by an alpha D-globin fragment from *Triatoma hindgut*: effect on differentiation of epimastigote to trypomastigote forms. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.90, n.21, p.10140-4, Nov 1. 1993.

FRICKE, W. M.; KALIRAMAN, V.; BRILL, S. J. Mapping the DNA topoisomerase III binding domain of the Sgs1 DNA helicase. **J Biol Chem**, v.276, n.12, p.8848-55, Mar 23. 2001.

GALVEZ, M.; MARTIN-CORDERO, C.; LOPEZ-LAZARO, M.; CORTES, F.; AYUSO, M. J. Cytotoxic effect of *Plantago* spp. on cancer cell lines. **J Ethnopharmacol**, v.88, n.2-3, p.125-30, Oct. 2003.

GARCIA-BUSTOS, J.; HEITMAN, J.; HALL, M. N. Nuclear protein localization. **Biochim Biophys Acta**, v.1071, n.1, p.83-101, Mar 7. 1991.

GAZIOVÁ, I.; LUKES, J. Mitochondrial and nuclear localization of topoisomerase II in the flagellate *Bodo saltans* (Kinetoplastida), a species with non-catenated kinetoplast DNA. **J Biol Chem**, v.278, n.13, p.10900-7, Mar 28. 2003.

GELLERT, M.; MIZUUCHI, K.; O'DEA, M. H.; NASH, H. A. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.73, n.11, p.3872-6, Nov. 1976.

GOLDENBERG, S.; SALLES, J. M.; CONTRERAS, V. T.; LIMA FRANCO, M. P.; KATZIN, A. M.; COLLI, W.; MOREL, C. M. Characterization of

messenger RNA from epimastigotes and metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **FEBS Lett**, v.180, n.2, p.265-70, Jan 28. 1985.

GONZALES-PERDOMO, M.; DE CASTRO, S. L.; MEIRELLES, M. N.; GOLDENBERG, S. *Trypanosoma cruzi* proliferation and differentiation are blocked by topoisomerase II inhibitors. **Antimicrob Agents Chemother**, v.34, n.9, p.1707-14, Sep. 1990.

GOODWIN, A.; WANG, S. W.; TODA, T.; NORBURY, C.; HICKSON, I. D. Topoisomerase III is essential for accurate nuclear division in *Schizosaccharomyces pombe*. **Nucleic Acids Res**, v.27, n.20, p.4050-8, Oct 15. 1999.

GRISARD, E. C.; CAMPBELL, D. A.; ROMANHA, A. J. Mini-exon gene sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. **Parasitology**, v.118 ( Pt 4), p.375-82, Apr. 1999.

GRISARD, E. C.; STEINDEL, M. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*. In: NEVES, D. P. (Ed.). **Parasitologia Humana**, 2004.

GRISARD, E. C.; STEINDEL, M.; GUARNERI, A. A.; EGER-MANGRICH, I.; CAMPBELL, D. A.; ROMANHA, A. J. Characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated in Central and South America: an overview. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.94, n.2, p.203-9, Mar-Apr. 1999.

GROOT, H. Estudios sobre los tripanosomas humanos (*T. rangeli* y *T. ariari*). **Ann Soc Biol Bog**, n.6, p.109-126. 1954.

GROOT, H.; RENJIFO, S.; URIBE, C. Nota preliminar sobre inoculación a un voluntario humano con *Trypanosoma* sp. (*ariari*). **Ann Soc Biol Bog**, n.4, p.99-103. 1950.

GUHL, F.; JARAMILLO, C.; CARRANZA, J. C.; VALLEJO, G. A. Molecular characterization and diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*. **Arch Med Res**, v.33, n.4, p.362-70, Jul-Aug. 2002.

GUHL, F.; VALLEJO, G. A. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: an updated review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.98, n.4, p.435-42, Jun. 2003.

GUTIERREZ-CORREA, J. *Trypanosoma cruzi* dihydroliipoamide dehydrogenase as target for phenothiazine cationic radicals. Effect of antioxidants. **Curr Drug Targets**, v.7, n.9, p.1155-79, Sep. 2006.

HAMMARSTROM, M.; HELLGREN, N.; VAN DEN BERG, S.; BERGLUND, H.; HARD, T. Rapid screening for improved solubility of small human proteins produced as fusion proteins in *Escherichia coli*. **Protein Sci**, v.11, n.2, p.313-21, Feb. 2002.

HANDE, K. R. Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. **Biochim Biophys Acta**, v.1400, n.1-3, p.173-84, Oct 1. 1998.

HANKE, T.; RAMIRO, M. J.; TRIGUEROS, S.; ROCA, J.; LARRAGA, V. Cloning, functional analysis and post-transcriptional regulation of a type II DNA topoisomerase from *Leishmania infantum*. A new potential target for anti-parasite drugs. **Nucleic Acids Res**, v.31, n.16, p.4917-28, Aug 15. 2003.

HE, D.; WEN, J. F.; CHEN, W. Q.; LU, S. Q.; XIN, D. D. Identification, characteristic and phylogenetic analysis of type II DNA topoisomerase gene in *Giardia lamblia*. **Cell Res**, v.15, n.6, p.474-82, Jun. 2005.

HECKER, H.; SCHWARZENBACH, M.; RUDIN, W. Development and interactions of *Trypanosoma rangeli* in and with the reduviid bug *Rhodnius prolixus*. **Parasitol Res**, v.76, n.4, p.311-8. 1990.

HERBIG-SANDREUTER, A. Experimental study of the life cycle of *Trypanosoma rangeli* Tejera 1920 in warm-blooded animals and in *Rhodnius prolixus*. **Acta Trop**, v.12, n.3, p.261-4. 1955.

HIGGINS, N. P.; PEEBLES, C. L.; SUGINO, A.; COZZARELLI, N. R. Purification of subunits of *Escherichia coli* DNA gyrase and reconstitution of enzymatic activity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.75, n.4, p.1773-7, Apr. 1978.

HINES, J. C.; RAY, D. S. Periodic synthesis of kinetoplast DNA topoisomerase II during the cell cycle. **Mol Biochem Parasitol**, v.88, n.1-2, p.249-52, Sep. 1997.

HOROWITZ, D. S.; WANG, J. C. Mapping the active site tyrosine of *Escherichia coli* DNA gyrase. **J Biol Chem**, v.262, n.11, p.5339-44, Apr 15. 1987.

IBORRA, F. J.; JACKSON, D. A.; COOK, P. R. Coupled transcription and translation within nuclei of mammalian cells. **Science**, v.293, n.5532, p.1139-42, Aug 10. 2001.

JENSEN, S.; ANDERSEN, A. H.; KJELDEN, E.; BIRSACK, H.; OLSEN, E. H.; ANDERSEN, T. B.; WESTERGAARD, O.; JAKOBSEN, B. K. Analysis

of functional domain organization in DNA topoisomerase II from humans and *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol**, v.16, n.7, p.3866-77, Jul. 1996.

JOHNSON, C. A.; PADGET, K.; AUSTIN, C. A.; TURNER, B. M. Deacetylase activity associates with topoisomerase II and is necessary for etoposide-induced apoptosis. **J Biol Chem**, v.276, n.7, p.4539-42, Feb 16. 2001.

JOHNSON, D. C.; DEAN, D. R.; SMITH, A. D.; JOHNSON, M. K. Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. **Annu Rev Biochem**, v.74, p.247-81. 2005.

KAYSER, K.; MURRAY, N. E. The use of phage  $\lambda$  replacement vectors in the construction of representative genomic DNA libraries. . In: GLOVER, D. M. (Ed.). **DNA cloning – practical approach**. Oxford: IRL Press, v.I 1985. The use of phage  $\lambda$  replacement vectors in the construction of representative genomic DNA libraries. , p.1-47

KEENEY, S. Mechanism and control of meiotic recombination initiation. **Curr Top Dev Biol**, v.52, p.1-53. 2001.

KEENEY, S.; GIROUX, C. N.; KLECKNER, N. Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. **Cell**, v.88, n.3, p.375-84, Feb 7. 1997.

KHOR, V.; YOWELL, C.; DAME, J. B.; ROWE, T. C. Expression and characterization of the ATP-binding domain of a malarial *Plasmodium vivax* gene homologous to the B-subunit of the bacterial topoisomerase DNA gyrase. **Mol Biochem Parasitol**, v.140, n.1, p.107-17, Mar. 2005.

KIM, R. A.; WANG, J. C. Function of DNA topoisomerases as replication swivels in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Mol Biol**, v.208, n.2, p.257-67, Jul 20. 1989.

KOERICH, L. B.; EMMANUELLE-MACHADO, P.; SANTOS, K.; GRISARD, E. C.; STEINDEL, M. Differentiation of *Trypanosoma rangeli*: high production of infective trypomastigote forms in vitro. **Parasitol Res**, v.88, n.1, p.21-5, Jan. 2002.

KOLLIEN, A. H.; SCHAUB, G. A. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. **Parasitol Today**, v.16, n.9, p.381-7, Sep. 2000.

KRAH, R.; KOZYAVKIN, S. A.; SLESAREV, A. I.; GELLERT, M. A two-subunit type I DNA topoisomerase (reverse gyrase) from an extreme hyperthermophile. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.93, n.1, p.106-10, Jan 9. 1996.

KULIKOWICZ, T.; SHAPIRO, T. A. Distinct genes encode type II Topoisomerases for the nucleus and mitochondrion in the protozoan parasite *Trypanosoma brucei*. **J Biol Chem**, v.281, n.6, p.3048-56, Feb 10. 2006.

LINDSAY, M. E.; GLUENZ, E.; GULL, K.; ENGLUND, P. T. A new function of *Trypanosoma brucei* mitochondrial topoisomerase II is to maintain kinetoplast DNA network topology. **Mol Microbiol**, v.70, n.6, p.1465-76, Dec. 2008.

LIU, L. F.; DEPEW, R. E.; WANG, J. C. Knotted single-stranded DNA rings: a novel topological isomer of circular single-stranded DNA formed by treatment with *Escherichia coli* omega protein. **J Mol Biol**, v.106, n.2, p.439-52, Sep 15. 1976.

LIU, L. F.; WANG, J. C. Supercoiling of the DNA template during transcription. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.84, n.20, p.7024-7, Oct. 1987.

LIU, S. Y.; HWANG, B. D.; LIU, Z. C.; CHENG, Y. C. Interaction of several nucleoside triphosphate analogues and 10-hydroxycamptothecin with human DNA topoisomerases. **Cancer Res**, v.49, n.6, p.1366-70, Mar 15. 1989.

LOHRER, H.; KRAUTH-SIEGEL, R. L. Purification and characterization of lipoamide dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. **Eur J Biochem**, v.194, n.3, p.863-9, Dec 27. 1990.

LOURENÇO, E. E.; CAVALCANTI, D. P.; ASSINE PICCHI, G. F.; SOUZA, W.; AURELIO KRIEGER, M.; MACHADO MOTTA, M. C.; GOLDENBERG, S.; PERDIGÃO FRAGOSO, S. Molecular characterization of type II topoisomerase in the endosymbiont-bearing Trypanosomatid *Blastocrithidia culicis*. **FEMS Microbiol Lett**, v.257, n.1, p.163-70, Apr. 2006.

LYNCH, A. S.; WANG, J. C. Anchoring of DNA to the bacterial cytoplasmic membrane through cotranscriptional synthesis of polypeptides encoding membrane proteins or proteins for export: a mechanism of plasmid hypernegative supercoiling in mutants deficient in DNA topoisomerase I. **J Bacteriol**, v.175, n.6, p.1645-55, Mar. 1993.

MACHADO, E. M.; ALVARENGA, N. J.; ROMANHA, A. J.; GRISARD, E. C. A simplified method for sample collection and DNA isolation for polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.95, n.6, p.863-6, Nov-Dec. 2000.

MACHADO, P. E.; EGER-MANGRICH, I.; ROSA, G.; KOERICH, L. B.; GRISARD, E. C.; STEINDEL, M. Differential susceptibility of triatomines of the genus *Rhodnius* to *Trypanosoma rangeli* strains from different geographical origins. **Int J Parasitol**, v.31, n.5-6, p.632-4, May 1. 2001.

MAFTAH, M.; HAN, C. S.; LANGSTON, L. D.; HOPE, J. C.; ZIGOURAS, N.; FREYER, G. A. The top3(+) gene is essential in *Schizosaccharomyces pombe* and the lethality associated with its loss is caused by Rad12 helicase activity. **Nucleic Acids Res**, v.27, n.24, p.4715-24, Dec 15. 1999.

MARCHLER-BAUER, A.; BRYANT, S. H. CD-Search: protein domain annotations on the fly. **Nucleic Acids Res**, v.32, n.Web Server issue, p.W327-31, Jul 1. 2004.

MATTHEWS, K. R. Developments in the differentiation of *Trypanosoma brucei*. **Parasitol Today**, v.15, n.2, p.76-80, Feb. 1999.

MEDINA-ACOSTA, E.; FRANCO, A. M.; JANSEN, A. M.; SAMPOL, M.; NEVES, N.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; GRIMALDI JUNIOR, G.; NUSSENZWEIG, V. Trans-sialidase and sialidase activities discriminate between morphologically indistinguishable Trypanosomatids. **Eur J Biochem**, v.225, n.1, p.333-9, Oct 1. 1994.

MEIRELLES, R. M.; HENRIQUES-PONS, A.; SOARES, M. J.; STEINDEL, M. Penetration of the salivary glands of *Rhodnius domesticus* Neiva & Pinto, 1923 (Hemiptera: Reduviidae) by *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 (Protozoa: Kinetoplastida). **Parasitol Res**, v.97, n.4, p.259-69, Oct. 2005.

MEJIA, J. S.; MORENO, F.; MUSKUS, C.; VELEZ, I. D.; TITUS, R. G. The surface-mosaic model in host-parasite relationships. **Trends Parasitol**, v.20, n.11, p.508-11, Nov. 2004.

MELENDY, T.; RAY, D. S. Novobiocin affinity purification of a mitochondrial type II topoisomerase from the Trypanosomatid *Crithidia fasciculata*. **J Biol Chem**, v.264, n.3, p.1870-6, Jan 25. 1989.

MILES, M. A.; ARIAS, J. R.; VALENTE, S. A.; NAIFF, R. D.; DE SOUZA, A. A.; POVOA, M. M.; LIMA, J. A.; CEDILLOS, R. A. Vertebrate hosts and vectors of *Trypanosoma rangeli* in the Amazon Basin of Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v.32, n.6, p.1251-9, Nov. 1983.

MILETTI, L. C.; KOERICH, L. B.; PACHECO, L. K.; STEINDEL, M.; STAMBUK, B. U. Characterization of D-glucose transport in *Trypanosoma rangeli*. **Parasitology**, v.133, n.Pt 6, p.721-7, Dec. 2006.

MIRSKI, S. E.; GERLACH, J. H.; COLE, S. P. Sequence determinants of nuclear localization in the alpha and beta isoforms of human topoisomerase II. **Exp Cell Res**, v.251, n.2, p.329-39, Sep 15. 1999.

MOLYNEUX, D. Division of the human trypanosome, *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*. **Ann Trop Med Parasitol**, v.67, n.3, p.371-2, Sep. 1973.

MONDAL, N.; PARVIN, J. D. DNA topoisomerase IIalpha is required for RNA polymerase II transcription on chromatin templates. **Nature**, v.413, n.6854, p.435-8, Sep 27. 2001.

MORRIS, J. C.; DREW, M. E.; KLINGBEIL, M. M.; MOTYKA, S. A.; SAXOWSKY, T. T.; WANG, Z.; ENGLUND, P. T. Replication of kinetoplast DNA: an update for the new millennium. **Int J Parasitol**, v.31, n.5-6, p.453-8, May 1. 2001.

MURTHY, V. K.; DIBBERN, K. M.; CAMPBELL, D. A. PCR amplification of mini-exon genes differentiates *Trypanosoma cruzi* from *Trypanosoma rangeli*. **Mol Cell Probes**, v.6, n.3, p.237-43, Jun. 1992.

NAKAI, K.; HORTON, P. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. **Trends Biochem Sci**, v.24, n.1, p.34-6, Jan. 1999.

NENORTAS, E. C.; BODLEY, A. L.; SHAPIRO, T. A. DNA topoisomerases: a new twist for antiparasitic chemotherapy? **Biochim Biophys Acta**, v.1400, n.1-3, p.349-54, Oct 1. 1998.

OGBADOYI, E. O.; ROBINSON, D. R.; GULL, K. A high-order trans-membrane structural linkage is responsible for mitochondrial genome positioning and segregation by flagellar basal bodies in trypanosomes. **Mol Biol Cell**, v.14, n.5, p.1769-79, May. 2003.

OSHEROFF, N.; SHELTON, E. R.; BRUTLAG, D. L. DNA topoisomerase II from *Drosophila melanogaster*. Relaxation of supercoiled DNA. **J Biol Chem**, v.258, n.15, p.9536-43, Aug 10. 1983.

OSORIO, Y.; TRAVI, B. L.; PALMA, G. I.; SARAVIA, N. G. Infectivity of *Trypanosoma rangeli* in a promonocytic mammalian cell line. **J Parasitol**, v.81, n.5, p.687-93, Oct. 1995.

PALENCHAR, J. B.; BELLOFATTO, V. Gene transcription in trypanosomes. **Mol Biochem Parasitol**, v.146, n.2, p.135-41, Apr. 2006.

- PAREDES, C. H.; PAREDES, R. Um caso de infecção humana por *Trypanosoma rangeli*. **Rev Fac Med Bog**, n.18, p.343-375. 1949.
- PASION, S. G.; HINES, J. C.; AEBERSOLD, R.; RAY, D. S. Molecular cloning and expression of the gene encoding the kinetoplast-associated type II DNA topoisomerase of *Crithidia fasciculata*. **Mol Biochem Parasitol**, v.50, n.1, p.57-67, Jan. 1992.
- PESTOV, D. G.; GLADKAYA, L. A.; MASLOV, D. A.; KOLESNIKOV, A. A. Characterization of kinetoplast minicircle DNA in the lower Trypanosomatid *Crithidia oncopelti*. **Mol Biochem Parasitol**, v.41, n.1, p.135-45, Jun. 1990.
- PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; TOMLINSON, S.; NUSSENZWEIG, V. *Trypanosoma rangeli* sialidase lacks trans-sialidase activity. **Mol Biochem Parasitol**, v.62, n.1, p.19-25, Nov. 1993.
- PORCEL, B. M.; BONTEMPI, E. J.; HENRIKSSON, J.; RYDAKER, M.; ASLUND, L.; SEGURA, E. L.; PETTERSSON, U.; RUIZ, A. M. *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*: molecular characterization of genes encoding putative calcium-binding proteins, highly conserved in Trypanosomatids. **Exp Parasitol**, v.84, n.3, p.387-99, Dec. 1996.
- POSTOW, L.; CRISONA, N. J.; PETER, B. J.; HARDY, C. D.; COZZARELLI, N. R. Topological challenges to DNA replication: conformations at the fork. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.98, n.15, p.8219-26, Jul 17. 2001.
- PUERTA, C.; CUERVO, P.; THOMAS, M. C.; LOPEZ, M. C. Molecular characterization of the histone H2A gene from the parasite *Trypanosoma rangeli*. **Parasitol Res**, v.86, n.11, p.916-22, Nov. 2000.
- PUERTA, C. J.; SINCERO, T. C.; STOCO, P. H.; CUERVO, C.; GRISARD, E. C. Comparative Analysis of *Trypanosoma rangeli* Histone H2A Gene Intergenic Region with Distinct Intraspecific Lineage Markers. **Vector Borne Zoonotic Dis**, Mar 13. 2009.
- RENE, B.; FERMANDJIAN, S.; MAUFFRET, O. Does topoisomerase II specifically recognize and cleave hairpins, cruciforms and crossovers of DNA? **Biochimie**, v.89, n.4, p.508-15, Apr. 2007.
- RIGBY, P. W.; DIECKMANN, M.; RHODES, C.; BERG, P. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. **J Mol Biol**, v.113, n.1, p.237-51, Jun 15. 1977.

ROBBINS, J.; DILWORTH, S. M.; LASKEY, R. A.; DINGWALL, C. Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. **Cell**, v.64, n.3, p.615-23, Feb 8. 1991.

ROBINSON, D. R.; GULL, K. Basal body movements as a mechanism for mitochondrial genome segregation in the trypanosome cell cycle. **Nature**, v.352, n.6337, p.731-3, Aug 22. 1991.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. . New York: Cold Spring Harbor. 2001

SCHMIDT, J.; KLEFMAN, T.; KOLLIEN, A.; SCHAUB, G. A. Further studies on hydrophobic attachment of *T. cruzi* epimastigotas. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.92, n.78. 1997.

SCHNEIDER, E.; HSIANG, Y. H.; LIU, L. F. DNA topoisomerases as anticancer drug targets. **Adv Pharmacol**, v.21, p.149-83. 1990.

SCHNEIDER, R.; TRAVERS, A.; MUSKHELISHVILI, G. The expression of the *Escherichia coli* fis gene is strongly dependent on the superhelical density of DNA. **Mol Microbiol**, v.38, n.1, p.167-75, Oct. 2000.

SCHONECK, R.; BILLAUT-MULOT, O.; NUMRICH, P.; OUAISSI, M. A.; KRAUTH-SIEGEL, R. L. Cloning, sequencing and functional expression of dihydrolipoamide dehydrogenase from the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. **Eur J Biochem**, v.243, n.3, p.739-47, Feb 1. 1997.

SCHOTTELIUS, J. Neuraminidase fluorescence test for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **Trop Med Parasitol**, v.38, n.4, p.323-7, Dec. 1987.

SCHOTTELIUS, J.; MARINKELLE, C. J.; GOMEZ-LEIVA, M. A. Comparative investigations of Latin American trypanosomes with lectins and complement lysis test. **Trop Med Parasitol**, v.37, n.1, p.54-8, Mar. 1986.

SENGUPTA, T.; MUKHERJEE, M.; DAS, A.; MANDAL, C.; DAS, R.; MUKHERJEE, T.; MAJUMDER, H. K. Characterization of the ATPase activity of topoisomerase II from *Leishmania donovani* and identification of residues conferring resistance to etoposide. **Biochem J**, v.390, n.Pt 2, p.419-26, Sep 1. 2005.

SENGUPTA, T.; MUKHERJEE, M.; MANDAL, C.; DAS, A.; MAJUMDER, H. K. Functional dissection of the C-terminal domain of type II DNA

topoisomerase from the kinetoplastid hemoflagellate *Leishmania donovani*. **Nucleic Acids Res**, v.31, n.18, p.5305-16, Sep 15. 2003.

SHAIU, W. L.; HU, T.; HSIEH, T. S. The hydrophilic, protease-sensitive terminal domains of eucaryotic DNA topoisomerases have essential intracellular functions. **Pac Symp Biocomput**, p.578-89. 1999.

SHAPIRO, T. A. Kinetoplast DNA maxicircles: networks within networks. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.90, n.16, p.7809-13, Aug 15. 1993.

SHAPIRO, T. A.; ENGLUND, P. T. The structure and replication of kinetoplast DNA. **Annu Rev Microbiol**, v.49, p.117-43. 1995.

SHAPIRO, T. A.; KLEIN, V. A.; ENGLUND, P. T. Drug-promoted cleavage of kinetoplast DNA minicircles. Evidence for type II topoisomerase activity in trypanosome mitochondria. **J Biol Chem**, v.264, n.7, p.4173-8, Mar 5. 1989.

SHAPIRO, T. A.; SHOWALTER, A. F. In vivo inhibition of trypanosome mitochondrial topoisomerase II: effects on kinetoplast DNA maxicircles. **Mol Cell Biol**, v.14, n.9, p.5891-7, Sep. 1994.

SHLOMAI, J. The assembly of kinetoplast DNA. **Parasitol Today**, v.10, n.9, p.341-6, Sep. 1994.

SILVA, E. D.; PEREIRA, V. R.; GOMES, J. A.; LORENA, V. M.; CANCADO, J. R.; FERREIRA, A. G.; KRIEGER, M. A.; GOLDENBERG, S.; CORREA-OLIVEIRA, R.; GOMES, Y. M. Use of the EIE-recombinant-Chagas-biomanguinhos kit to monitor cure of human Chagas' disease. **J Clin Lab Anal**, v.16, n.3, p.132-6. 2002.

SIMPSON, L.; THIEMANN, O. H.; SAVILL, N. J.; ALFONZO, J. D.; MASLOV, D. A. Evolution of RNA editing in trypanosome mitochondria. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.97, n.13, p.6986-93, Jun 20. 2000.

SNOEIJER, C. Q.; PICCHI, G. F.; DAMBROS, B. P.; STEINDEL, M.; GOLDENBERG, S.; FRAGOSO, S. P.; LORENZINI, D. M.; GRISARD, E. C. *Trypanosoma rangeli* Transcriptome Project: Generation and analysis of expressed sequence tags. **Kinetoplastid Biol Dis**, v.3, n.1, p.1, May 13. 2004.

SOARES, M. J.; SOUTO-PADRON, T.; BONALDO, M. C.; GOLDENBERG, S.; DE SOUZA, W. A stereological study of the differentiation process in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol Res**, v.75, n.7, p.522-7. 1989.

SOARES, M. J. The reservosome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: an organelle of the endocytic pathway with a role on metacyclogenesis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.94 Suppl 1, p.139-41. 1999.

SOUSA, O. E.; LOMBARDO, M.; SALDAÑA, A. *Trypanosoma rangeli* sialidase: lack of activity in stocks from Panama and other regions. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.100, n.3, p.241-3, May. 2005.

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J Mol Biol**, v.98, n.3, p.503-17, Nov 5. 1975.

STEINDEL, M. Presence of *Trypanosoma cruzi* - *Trypanosoma rangeli* mixed infection in naturally infected *Panstrongylus megistus* from Florianópolis, State of Santa Catarina. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.87, n.99. 1992.

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

STEINDEL, M.; DIAS NETO, E.; PINTO, C. J.; GRISARD, E. C.; MENEZES, C. L.; MURTA, S. M.; SIMPSON, A. J.; ROMANHA, A. J. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and isoenzyme analysis of *Trypanosoma rangeli* strains. **J Eukaryot Microbiol**, v.41, n.3, p.261-7, May-Jun. 1994.

STEINDEL, M.; PINTO, J. C.; TOMA, H. K.; MANGIA, R. H.; RIBEIRO-RODRIGUES, R.; ROMANHA, A. J. *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920) isolated from a sylvatic rodent (*Echimys dasythrix*) in Santa Catarina Island, Santa Catarina State: first report of this trypanosome in southern Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.86, n.1, p.73-9, Jan-Mar. 1991.

STEVENS, J. R.; NOYES, H. A.; SCHOFIELD, C. J.; GIBSON, W. The molecular evolution of Trypanosomatidae. **Adv Parasitol**, v.48, p.1-56. 2001.

STEVENS, J. R.; TEIXEIRA, M. M.; BINGLE, L. E.; GIBSON, W. C. The taxonomic position and evolutionary relationships of *Trypanosoma rangeli*. **Int J Parasitol**, v.29, n.5, p.749-57, May. 1999.

STEVENS, R. C. Design of high-throughput methods of protein production for structural biology. **Structure**, v.8, n.9, p.R177-85, Sep 15. 2000.

STRAUSS, P. R.; WANG, J. C. The TOP2 gene of *Trypanosoma brucei*: a single-copy gene that shares extensive homology with other TOP2 genes

encoding eukaryotic DNA topoisomerase II. **Mol Biochem Parasitol**, v.38, n.1, p.141-50, Jan 1. 1990.

STURM, N. R.; DEGRAVE, W.; MOREL, C.; SIMPSON, L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. **Mol Biochem Parasitol**, v.33, n.3, p.205-14, Mar 15. 1989.

SWANBERG, S. L.; WANG, J. C. Cloning and sequencing of the *Escherichia coli* gyrA gene coding for the A subunit of DNA gyrase. **J Mol Biol**, v.197, n.4, p.729-36, Oct 20. 1987.

TANOURA, K.; YANAGI, T.; DE GARCIA, V. M.; KANBARA, H. *Trypanosoma rangeli*-in vitro metacyclogenesis and fate of metacyclic trypomastigotes after infection to mice and fibroblast cultures. **J Eukaryot Microbiol**, v.46, n.1, p.43-8, Jan-Feb. 1999.

TIMMS, M. W.; VAN DEURSEN, F. J.; HENDRIKS, E. F.; MATTHEWS, K. R. Mitochondrial development during life cycle differentiation of African trypanosomes: evidence for a kinetoplast-dependent differentiation control point. **Mol Biol Cell**, v.13, n.10, p.3747-59, Oct. 2002.

TOALDO, C. B.; STEINDEL, M.; SOUSA, M. A.; TAVARES, C. C. Molecular karyotype and chromosomal localization of genes encoding beta-tubulin, cysteine proteinase, hsp 70 and actin in *Trypanosoma rangeli*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.96, n.1, p.113-21, Jan. 2001.

TOPCU, Z. DNA topoisomerases as targets for anticancer drugs. **J Clin Pharm Ther**, v.26, n.6, p.405-16, Dec. 2001.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.76, n.9, p.4350-4, Sep. 1979.

TSE, Y.; WANG, J. C. *E. coli* and *M. luteus* DNA topoisomerase I can catalyze catenation of decatenation of double-stranded DNA rings. **Cell**, v.22, n.1 Pt 1, p.269-76, Nov. 1980.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. Flagellar elongation induced by glucose limitation is preadaptive for *Trypanosoma cruzi* differentiation. **Cell Motil Cytoskeleton**, v.46, n.4, p.269-78, Aug. 2000.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **Int J Parasitol**, v.31, n.5-6, p.472-81, May 1. 2001.

TYLER, K. M.; MATTHEWS, K. R.; GULL, K. The bloodstream differentiation-division of *Trypanosoma brucei* studied using mitochondrial markers. **Proc Biol Sci**, v.264, n.1387, p.1481-90, Oct 22. 1997.

UEMURA, T.; YANAGIDA, M. Isolation of type I and II DNA topoisomerase mutants from fission yeast: single and double mutants show different phenotypes in cell growth and chromatin organization. **EMBO J**, v.3, n.8, p.1737-44, Aug. 1984.

UMEZAWA, E. S.; BASTOS, S. F.; CAMARGO, M. E.; YAMAUCHI, L. M.; SANTOS, M. R.; GONZALEZ, A.; ZINGALES, B.; LEVIN, M. J.; SOUSA, O.; RANGEL-ALDAO, R.; DA SILVEIRA, J. F. Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. **J Clin Microbiol**, v.37, n.5, p.1554-60, May. 1999.

URBINA, J. A. Intermediary metabolism of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol Today**, v.10, n.3, p.107-10, Mar. 1994.

URDANETA-MORALES, S.; TEJERO, F. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: mouse model for high, sustained parasitemia. **J Parasitol**, v.71, n.4, p.409-14, Aug. 1985.

URDANETA-MORALES, S.; TEJERO, F. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920. Intracellular amastigote stages of reproduction in white mice. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.28, n.3, p.166-9, May-Jun. 1986.

URREA, D. A.; CARRANZA, J. C.; CUBA, C. A.; GURGEL-GONÇALVES, R.; GUHL, F.; SCHOFIELD, C. J.; TRIANA, O.; VALLEJO, G. A. Molecular characterisation of *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius ecuadoriensis* in Peru, *R. colombiensis* in Colombia and *R. pallescens* in Panama, supports a co-evolutionary association between parasites and vectors. **Infect Genet Evol**, v.5, n.2, p.123-9, Mar. 2005.

URUENA, C.; SANTANDER, P.; DIEZ, H.; MONTILLA, M.; ZARANTE, I.; THOMAS MDEL, C.; LOPEZ, M. C.; PUERTA, C. Chromosomal localization of the KMP-11 genes in the KP1(+) and KP1(-) strains of *Trypanosoma rangeli*. **Biomedica**, v.24, n.2, p.200-3, Jun. 2004.

VALLEJO, G. A.; GUHL, F.; CARRANZA, J. C.; LOZANO, L. E.; SANCHEZ, J. L.; JARAMILLO, J. C.; GUALTERO, D.; CASTANEDA, N.; SILVA, J. C.; STEINDEL, M. kDNA markers define two major *Trypanosoma rangeli* lineages in Latin-America. **Acta Trop**, v.81, n.1, p.77-82, Jan. 2002.

VALLEJO, G. A.; GUHL, F.; CHIARI, E.; MACEDO, A. M. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. **Acta Trop**, v.72, n.2, p.203-12, Mar 15. 1999.

VALLEJO, G. A.; GUHL, F.; SCHAUB, G. A. Triatominae-*Trypanosoma cruzi*/*T. rangeli*: Vector-parasite interactions. **Acta Trop**, v.110, n.2-3, p.137-47, May-Jun. 2009.

VALLEJO, G. A.; MACEDO, A. M.; CHIARI, E.; PENA, S. D. Kinetoplast DNA from *Trypanosoma rangeli* contains two distinct classes of minicircles with different size and molecular organization. **Mol Biochem Parasitol**, v.67, n.2, p.245-53, Oct. 1994.

VALLEJO, G. A.; MARINKELLE, C. J.; GUHL, F.; DE SANCHEZ, N. Behavior of the infection and morphologic differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the intestine of the vector *Rhodnius prolixus*. **Rev Bras Biol**, v.48, n.3, p.577-87, Aug. 1988.

VARGAS, N.; SOUTO, R. P.; CARRANZA, J. C.; VALLEJO, G. A.; ZINGALES, B. Amplification of a specific repetitive DNA sequence for *Trypanosoma rangeli* identification and its potential application in epidemiological investigations. **Exp Parasitol**, v.96, n.3, p.147-59, Nov. 2000.

VERNER, K.; SCHATZ, G. Protein translocation across membranes. **Science**, v.241, n.4871, p.1307-13, Sep 9. 1988.

VICKERMAN, K. Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. **Br Med Bull**, v.41, n.2, p.105-14, Apr. 1985.

VOSBERG, H. P. DNA topoisomerases: enzymes that control DNA conformation. **Curr Top Microbiol Immunol**, v.114, p.19-102. 1985.

WALLIS, J. W.; CHREBET, G.; BRODSKY, G.; ROLFE, M.; ROTHSTEIN, R. A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. **Cell**, v.58, n.2, p.409-19, Jul 28. 1989.

WANG, J. C. DNA topoisomerases. **Annu Rev Biochem**, v.65, p.635-92. 1996.

WANG, J. C. Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine. **Q Rev Biophys**, v.31, n.2, p.107-44, May. 1998.

WANG, J. C. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.3, n.6, p.430-40, Jun. 2002.

WANG, Y.; TSAI, Y. C.; URENA-RIVERA, E.; CHEN, J. Expression, purification and characterization of recombinant mitochondrial topoisomerase II of kinetoplastid *Crithidia fasciculata* in High-five insect cells. **Protein Expr Purif**, v.58, n.1, p.122-31, Mar. 2008.

WANG, Z.; DREW, M. E.; MORRIS, J. C.; ENGLUND, P. T. Asymmetrical division of the kinetoplast DNA network of the trypanosome. **EMBO J**, v.21, n.18, p.4998-5005, Sep 16. 2002.

WANG, Z.; ENGLUND, P. T. RNA interference of a trypanosome topoisomerase II causes progressive loss of mitochondrial DNA. **EMBO J**, v.20, n.17, p.4674-83, Sep 3. 2001.

WIEDEMANN, N.; FRAZIER, A. E.; PFANNER, N. The protein import machinery of mitochondria. **J Biol Chem**, v.279, n.15, p.14473-6, Apr 9. 2004.

WU, L.; HICKSON, I. D. Molecular biology. DNA ends ReQ-uire attention. **Science**, v.292, n.5515, p.229-30, Apr 13. 2001.

XU, C. W.; HINES, J. C.; ENGEL, M. L.; RUSSELL, D. G.; RAY, D. S. Nucleus-encoded histone H1-like proteins are associated with kinetoplast DNA in the Trypanosomatid *Crithidia fasciculata*. **Mol Cell Biol**, v.16, n.2, p.564-76, Feb. 1996.

ZHANG, C. X.; CHEN, A. D.; GETTEL, N. J.; HSIEH, T. S. Essential functions of DNA topoisomerase I in *Drosophila melanogaster*. **Dev Biol**, v.222, n.1, p.27-40, Jun 1. 2000.

ZHANG, H.; D'ARPA, P.; LIU, L. F. A model for tumor cell killing by topoisomerase poisons. **Cancer Cells**, v.2, n.1, p.23-7, Jan. 1990.

ZHU, Q.; PONGPECH, P.; DIGATE, R. J. Type I topoisomerase activity is required for proper chromosomal segregation in *Escherichia coli*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.98, n.17, p.9766-71, Aug 14. 2001.

ZICKERMANN, V.; WUMAIER, Z.; WRZESNIEWSKA, B.; HUNTE, C.; SCHAGGER, H. Native immunoblotting of blue native gels to identify conformation-specific antibodies **Proteomics**, v.10, p.159-163. 2009.

ZUNIGA, C.; PALAU, T.; PENIN, P.; GAMALLO, C.; DE DIEGO, J. A. Characterization of a *Trypanosoma rangeli* strain of Colombian origin. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.92, n.4, p.523-30, Jul-Aug. 1997.

## **APÊNDICE**

# Apêndice 1

|         |   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|---------|---|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|         | 10  | 20   | 30   | 40   | 50   | 60   | 70   | 80   | 90   | 100  |
| SC-58   | MANRVTVEE IYQKKTQHEH LLARPDMY IGT IEPVTEDMWVYDEAENIMKVRKCTWT PGLYKI FDE LLVNAADNKVRDPLGQVIAKVR IDAERGMARVYNNCG  |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| Choachi | MANRVTVEE IYQKKTQHEH LLARPDMY IGT IEPVTEDMWVYDEAENIMKVRKCTWT PGLYKI FDE LLVNAADNKVRDPLGQVIAKVR IDAERGMARVYNNCG  |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|         | 110   | 120  | 130  | 140  | 150  | 160  | 170  | 180  | 190  | 200  |
| SC-58   | EGIPVQRHREINLWVPEM I FGYLL TSSNYDDTEAKV TGGRNFGAKL TNVFSRFEVEITV SRSRKKF FMRGRNNMIESEEPVITPCGDGYITVITFFYP   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| Choachi | EGIPVQRHREINLWVPEM I FGYLL TSSNYDDTEAKV TGGRNFGAKL TNVFSRFEVEITV SRSRKKF FMRGRNNMIESEEPVITPCGDGYITVITFFYP   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|         | 210   | 220  | 230  | 240  | 250  | 260  | 270  | 280  | 290  | 300  |
| SC-58   | FAKFNLQFGEDMVHMRRRVYDVAGCTDKSLRCLYNDTKIACSTFLEVDVLY PMMGEERGAAS YARVNGRWEVCVRSNIG QQVFSVNS IATTRGGTH  |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| Choachi | FAKFNLQFGEDMVHMRRRVYDVAGCTDKSLRCLYNDTKIACSTFLEVDVLY PMMGEERGAAS YARVNGRWEVCVRSNIG QQVFSVNS IATTRGGTH  |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|         | 310   | 320  | 330  | 340  | 350  | 360  | 370  | 380  | 390  | 400  |
| SC-58   | VRYITDQVIAKVTQAKRKSKEVKEP M I RPHLFVFINCLVENPGFDSQTKELNTPKARFGSICB PPSMTIDCILKSSVVERAVEMANSKLTREIASHT   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| Choachi | VRYITDQVIAKVTQAKRKSKEVKEP M I RPHLFVFINCLVENPGFDSQTKELNTPKARFGSICB PPSMTIDCILKSSVVERAVEMANSKLTREIASHT   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|         | 410   | 420  | 430  | 440  | 450  | 460  | 470  | 480  | 490  | 500  |
| SC-58   | RNADRRQILGTPR PDANEAAGGKHGRC T L I L TEGDSAKALCTAGLAVKDRDYFGVPELRGKPLNVRDAALKKVMACAEFOAISKIMGLDISKQKGTVEG   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| Choachi | RNADRRQILGTPR PDANEAAGGKHGRC T L I L TEGDSAKALCTAGLAVKDRDYFGVPELRGKPLNVRDAALKKVMACAEFOAISKIMGLDISKQKGTVEG   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|         | 510   | 520  | 530  | 540  | 550  | 560  | 570  | 580  | 590  | 600  |
| SC-58   | LRYGHLIMISQDDHGS H I RGLITNM IHHYWPDL I R A P G F L Q Q F I T P I V K A R R K G R G D G D D R A I S F S M P D Y F E W K N A I G D G I R N Y E I R Y Y K G L G T S G A R                       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| Choachi | LRYGHLIMISQDDHGS H I RGLITNM IHHYWPDL I R A P G F L Q Q F I T P I V K A R R K G R G D G D D R A I S F S M P D Y F E W K N A I G D G I R N Y E I R Y Y K G L G T S G A R                       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|         | 610   | 620  | 630  | 640  | 650  | 660  | 670  | 680  | 690  | 700  |
| SC-58   | EGREYFENIDRHRLDVFRDASDEAR I VMAFARDVKEERKHWI TQFRANTNVNESMNYN I TVRYSEFVDRH I L L F S V A D C E R S I P S M I D G L C P G Q R K T I   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| Choachi | EGREYFENIDRHRLDVFRDASDEAR I VMAFARDVKEERKHWI TQFRANTNVNESMNYN I TVRYSEFVDRH I L L F S V A D C E R S I P S M I D G L C P G Q R K T I   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|         | 710   | 720  | 730  | 740  | 750  | 760  | 770  | 780  | 790  | 800  |
| SC-58   | E S F K R N L T R S I K V V Q S G Y S E H A A H H G E Q S I V Q T I V G L A Q D F V G A N N V P L L Q D G Q F G T R L Q G G A H A G R Y I F T R L T L A R Y I H A S D D F V Y D K V           |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| Choachi | E S F K R N L T R S I K V V Q S G Y S E H A A H H G E Q S I V Q T I V G L A Q D F V G A N N V P L L Q D G Q F G T R L Q G G A H A G R Y I F T R L T L A R Y I H A S D D F V Y D K V           |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|         | 810   | 820  | 830  | 840  | 850  | 860  | 870  | 880  | 890  | 900  |
| SC-58   | D D G L S V E P P F V P V I P M V L V A N G T S G I G T G F A T N I P N Y S L D V I D M L M R L L R G E V Q P M K P Y F P G E T H I E R K E K G K F V S V C A T V R D G I V H I T E L E V G   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| Choachi | D D G L S V E P P F V P V I P M V L V A N G T S G I G T G F A T N I P N Y S L D V I D M L M R L L R G E V Q P M K P Y F P G E T H I E R K E K G K F V S V C A T V R D G I V H I T E L E V G   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|         | 910   | 920  | 930  | 940  | 950  | 960  | 970  | 980  | 990  | 1000 |
| SC-58   | W T Q T Y K F L E E L R E K E V W I T R I H N T D V I T I D E V I V H P E V L Q Q W A Q C V S E K L Q L R E Y I H A T N I I A F D R E G G I T R Y L D A V L K A F I V R L E Y Y K R R R       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| Choachi | W T Q T Y K F L E E L R E K E V W I T R I H N T D V I T I D E V I V H P E V L Q Q W A Q C V S E K L Q L R E Y I H A T N I I A F D R E G G I T R Y L D A V L K A F I V R L E Y Y K R R R       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|         | 1010  | 1020 | 1030 | 1040 | 1050 | 1060 | 1070 | 1080 | 1090 | 1100 |
| SC-58   | F L I G D L R S V A S K L E N M R V P T F E V D G H I V T R R R K R E L L E E L R O R G Y T F P P H Q K M S S T T I Q E E D E A V E A D A A N T E E V E L T L I C A V D A A C D A D S G E     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| Choachi | F L I G D L R S V A S K L E N M R V P T F E V D G H I V T R R R K R E L L E E L R O R G Y T F P P H Q K M S S T T I Q E E D E A V E A D A A N T E E V E L T L I C A V D A A C D A D S G E     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|         | 1110  | 1120 | 1130 | 1140 | 1150 | 1160 | 1170 | 1180 | 1190 | 1200 |
| SC-58   | A P E V Q Q A A R D Y D Y L L G R L W N L T A E M I A R L Q A Q L Q A R D E L A T I Q R T P K D L W A A D I N Q L A P R I E K E F F E G R V E I A S V O R K M E K T R P P P R R L R V P L L S |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| Choachi | A P E V Q Q A A R D Y D Y L L G R L W N L T A E M I A R L Q A Q L Q A R D E L A T I Q R T P K D L W A A D I N Q L A P R I E K E F F E G R V E I A S V O R K M E K T R P P P R R L R V P L L S |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|         | 1210  | 1220 | 1230 | 1240 | 1250 | 1260 | 1270 | 1280 | 1290 | 1300 |
| SC-58   | D K A R Q A L A K E L V K S E K V G R V E C V D C N A G D A T N T S A G R P A V K R R R K R R S D D D D S D D V G E G D S I S D T S D D W R F C G G S A D A V L D D D D P G N K A N G C A     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| Choachi | D K A R Q A L A K E L V K S E K V G R V E C V D C N A G D A T N T S A G R P A V K R R R K R R S D D D D S D D V G E G D S I S D T S D D W R F C G G S A D A V L D D D D P G N K A N G C A     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|         | 1310  | 1320 | 1330 | 1340 | 1350 | 1360 | 1370 | 1380 | 1390 | 1400 |
| SC-58   | K K P L P K R P A A K R A P Q P R S A G A K E K T E T T P K T L V D D D F I D M F G I E A L T R T A A R P T D V A S A A A T A A A V T V A P R R A V I E D A D D D I V L I G I S V G Q K       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| Choachi | K K P L P K R P A A K R A P Q P R S A G A K E K T E T T P K T L V D D D F I D M F G I E A L T R T A A R P T D V A S A A A T A A A V T V A P R R A V I E D A D D D I V L I G I S V G Q K       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|         | 1410  | 1420 | 1430 | 1440 | 1450 | 1460 |      |      |      |      |
| SC-58   | K S P P A I A T K R A P A R P O K P O V S R K R R R S S S D E D S F S D E D E I D E A S G S S S Y D F S I   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| Choachi | K S P P A I A T K R A P A R P O K P O V S R K R R R S S S D E D S F S D E D E I D E A S G S S S Y D F S I   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |

**Apêndice 1:** Alinhamento das seqüências de aminoácidos deduzidas a partir das seqüências do gene *Top2a* das cepas SC-58 e Choachí de *Trypanosoma rangeli*, através do programa CLUSTAL W. As regiões em preto representam total identidade e em cinza aminoácidos conservados.

# Apêndice 2

```
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
T. rangeli MAEAKRQKRLFDHVLIREFEMVYGSIEITPTMYIFPEKGRMVEEMRNVQGLLKVDFELNNAADNLSA--KSRAMRVRVHTTEA--GTFVNDG
T. cruzi MAEASRQKRLFDHVLIREFEMVYGSVDTSSSSFVPEKGRMVEEMRNVQGLLKVDFELNNAADNLSA--KGRRMVRVHTTEA--GTFVNDG
T. brucei MAEAKRQKRLFDHVLIREFEMVYGSIDTATTMYIFPEQGHMVEEMRNVQGLLKVDFELNNAADNLSA--RSARMRVRVHTTDT--GTFVNDG
L. infantum MTDASRQKRLFDHVLIREFEMVYGSIEITPTMYIFPEKGRMVEEMRNVQGLLKVDFELNNAADNLSA--SKGSRVQVYVSIHESBT--GTFVNDG
L. donovani MTDASRQKRLFDHVLIREFEMVYGSIEITPTMYIFPEKGRMVEEMRNVQGLLKVDFELNNAADNLSA--SKGSRVQVYVSIHESBT--GTFVNDG
L. chagasi MTYASRQKRLFDHVLIREFEMVYGSIEITPTMYIFPEKGRMVEEMRNVQGLLKVDFELNNAADNLSA--SKGSRVQVYVSIHESBT--GTFVNDG
L. major MTDASRQKRLFDHVLIREFEMVYGSIEITPTMYIFPEKGRMVEEMRNVQGLLKVDFELNNAADNLSA--SKGSRVQVYVSIHESBT--GTFVNDG
L. braziliensis MTDASRQKRLFDHVLIREFEMVYGSIEITPTMYIFPEKGRMVEEMRNVQGLLKVDFELNNAADNLSA--SKGSRVQVYVSIHESBT--GTFVNDG
C. fasciculata MTDASRQKRLFDHVLIREFEMVYGSIEITQSPMFVPEAKGKVMESMGNVQGLLKVDFELNNAADNLSA--VARGRMMVYVSIKESB--GTFVNDG
B. culicis MTFPSRQKRLFDHVLIREFEMVYGSIEITQVSMFVPEVAKCAKMAESMGNVQGLLKVDFELNNAADNLSA--VARGRMMVYVSIKESB--GTFVNDG
B. saltans --MAHRQKRLFDHVLIREFEMVYGSVSEPIQLFLIDQHSKVEITADNHLQGLLKVDFELNNAADNLSA--KSRNEMVIVNVTDETT--GTFVNDG
110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
T. rangeli GFIVRSRHRHMYPEMVFCHLLTSSNNDDASQSTVAGRHGYGAKLITLDSHRSVCRCKRGRFHMSSGDMHMTATAPPNWRVDPPEKKNVVRKVLDPD
T. cruzi GFIVRSRHRHMYPEMVFCHLLTSSNNDDTSQNAVAGRHGYGAKLITLDSHRSVCCRKGRGFHMSSGDMHMTATAPPNWRVDPPEKKNVVRKVLDPD
T. brucei GFIVRSRHRHMYPEMVFCHLLTSSNNDDNQNAVAGRHGYGAKLITLDSLSVCCRNGKGFHMSSGDMHMTATAPPNWRVDPPEKKNVVRKVLDPD
L. infantum GFIVRSRHRHMYPEMVFCHLLTSSNNDDSTSTTAGRHGYGAKLITLDSFKSVCCRDRGRFHMSSGDMHMTATAPPNWRVDPPEKKNVVRKVLDPD
L. donovani GFIVRSRHRHMYPEMVFCHLLTSSNNDDSTSTTAGRHGYGAKLITLDSFKSVCCRDRGRFHMSSGDMHMTATAPPNWRVDPPEKKNVVRKVLDPD
L. chagasi GFIVRSRHRHMYPEMVFCHLLTSSNNDDSTSTTAGRHGYGAKLITLDSFKSVCCRDRGRFHMSSGDMHMTATAPPNWRVDPPEKKNVVRKVLDPD
L. major GFIVRSRHRHMYPEMVFCHLLTSSNNDDSTSTTAGRHGYGAKLITLDSFKSVCCRDRGRFHMSSGDMHMTATAPPNWRVDPPEKKNVVRKVLDPD
L. braziliensis GFIVRSRHRHMYPEMVFCHLLTSSNNDDSTSTTAGRHGYGAKLITLDSFKSVCCRDRGRFHMSSGDMHMTATAPPNWRVDPPEKKNVVRKVLDPD
C. fasciculata GFIVRSRHRHMYPEMVFCHLLTSSNNDDSTSTTAGRHGYGAKLITLDSFKSVCCRDRGRFHMSSGDMHMTATAPPNWRVDPPEKKNVVRKVLDPD
B. culicis GFIVRSRHRHMYPEMVFCHLLTSSNNDDSTSTTAGRHGYGAKLITLDSFKSVCCRDRGRFHMSSGDMHMTATAPPNWRVDPPEKKNVVRKVLDPD
B. saltans GFIVRSRHRHMYPEMVFCHLLTSSNNDDPDSMAGRHGYGAKLITLDSFKSVCCRDRGRFHMSSGDMHMTATAPPNWRVDPPEKKNVVRKVLDPD
210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
T. rangeli ERFGLEKNEKISHDMLVLRHRMDIYANMPSIEISLGVFPFGKSHIDALVSTPI-----ACGRER-----AFVYVSRNGALVYFBSLT
T. cruzi ERFLDANKISHDMLVLRHRMDIYANMPSIEISLGVFPFAFKSLDAMAYSSPT-----SSCGER-----AFVYVSRNGALVYFBSLT
T. brucei ERFGMKEKISHDMLVLRHRMDIYANMPSIEIQITLNGSSFGFKSKIDATVYSAMT-----PCKGKPF-----PFVYVSGGCVAFYBSV
L. infantum AHGCFPNASISLDMKVLHRHRMDIYANMPSKIEVRLNNVVFGRFTDIDARVYSLPG-----LDCSMFP-----PEFVYTPNGSVYAVBOLT
L. donovani AHGCFPNASISLDMKVLHRHRMDIYANMPSKIEVRLNNVVFGRFTDIDARVYSLPG-----LDCSMFP-----PEFVYTPNGSVYAVBOLT
L. chagasi AHGCFPNASISLDMKVLHRHRMDIYANMPSKIEVRLNNVVFGRFTDIDARVYSLPG-----LDCSMFP-----PEFVYTPNGSVYAVBOLT
L. major AHGCFPSASISLDMKVLHRHRMDIYANMPSKIEVRLNNVVFGRFTDIDAGVYSLPG-----LDCSMFP-----PEFVYTPNGSVYAVBOLT
L. braziliensis AHGCFPNASISLDMKVLHRHRMDIYANMPSKIEVRLNNVVFGRFTDIDARVYSLPG-----PNSGTFP-----PEFVYTPNGSVYAVBOLT
C. fasciculata AHGCFPTAISLDMKVLHRHRMDIYANMPSKIEVRLNNVVFGRFTDIDARVYSLPG-----ADGAMFP-----PEFVHTGNGSIVYFVOLT
B. culicis AHGCFKNNISLDMKVLHRHRMDIYANMPSIQVSLGVFPFAFKSLDAMAYSSPT-----SDGLFPE-----KGVFNHSRNGSIVYFVOLT
B. saltans SVFEGVT--KLLKMDVRLVLRHRMDIYANMPSVTFSENGTALDVGSASVWVKEEAPASLFSAPTAPVAVDGAAPPAEALNRELFVFKHLRLVLEFVDPQC
310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
T. rangeli AGI--RRIFFVNGVWVTHNGTFCNNAQDILQSSLEYVERALRKNKVIDLNRVLRPFIIVVFLVQVQFRPDSQCARLAVSPTMPPVRCQSEITFELRMP
T. cruzi AGT--RRIFFVNGVWVTHNGTFCNNAQEMVQSSLENVEKALRKNKVIDLNRVLRPFIIVVFLVQVQFRPDSQCARLAVSPTMPPVRCQSEIMDFLRMP
T. brucei PGV--RRIFFVNGVWVTHNGTFCNNAQDITGCLLQVERELRKNKVIDLNRVLRPFIIVVFLVQVQFRPDSQCARLAVSPTMPPVRCQSEIVDWMKYLKMP
L. infantum QSP--RRIFFVNGVWVTHNGTFCNNAAMDIDLSCLBSLSKRNFRNGKVVDTIRVGFVFLVFLVQVQFRPDSQCARLAVSPTMPPVRCQSEIVKTEIKYERMP
L. donovani QSP--RRIFFVNGVWVTHNGTFCNNAAMDIDLSCLBSLSKRNFRNGKVVDTIRVGFVFLVFLVQVQFRPDSQCARLAVSPTMPPVRCQSEIVKTEIKYERMP
L. chagasi QSP--RRIFFVNGVWVTHNGTFCNNAAMDIDLSCLBSLSKRNFRNGKVVDTIRVGFVFLVFLVQVQFRPDSQCARLAVSPTMPPVRCQSEIVKTEIKYERMP
L. major QSP--RRIFFVNGVWVTHNGTFCNNAAMDIDLSCLBSLSKRNFRNGKVVDTIRVGFVFLVFLVQVQFRPDSQCARLAVSPTMPPVRCQSEIVKTEIKYERMP
L. braziliensis QSP--RRIFFVNGVWVTHNGTFCNNAIDIDLSCLBSLSKRNFRNGKVVDTIRVGFVFLVFLVQVQFRPDSQCARLAVSPTMPPVRCQSEIVKTEIKYERMP
C. fasciculata QSP--RRIFFVNGVWVTHNGTFCNNAIDIDLSCLBSLSKRNFRNGKVVDTIRVGFVFLVFLVQVQFRPDSQCARLAVSPTMPPVRCQSEIVKTEIKYERMP
B. culicis AGA--RRIFFVNGVWVTHNGTFCNNAQDITGTLBALSRLLDQKVVDAIRVMPFIIVVFLVQVQFRPDSQCARLAVSPTMPPVRCQSEIVKTEIKYERMP
B. saltans ASVSRFTFPAVNGVWVTHNGTFCNNAQDITDAMDALVAGKHEGIIIVNFFLVEVFLVETTTQFRPDSQCARLAVSPTMPPVRCQSEIVKTEIKYERMP
410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
T. rangeli IEAHVNTMITQGLAQLNKEIIGAGRRMSKSLISISIKLVDATITRRDPKCRVRLIVPEGDSAKALANSLSDCKRKYGVFPRGKGLLVRRNNIKRLK
T. cruzi IEAHVNTVITQGLAQLNKEIIGAGRRMSKSLISISIKLVDATITRRDRPFRVRLIVPEGDSAKALANSLSDCKRKYGVFPRGKGLLVRRNNIKRLK
T. brucei IEAHVSTVITQGLAQLNKEIIGTGRMSKSLISISIKLVDATITRRDPKCRVRLIVPEGDSAKALANSLSDCKRKYGVFPRGKGLLVRRNNIKRLK
L. infantum IEAHVNSMDQLAQLNKEIIGAGRRLSKSLISISIKLVDATSTRDPDGNIRLIVPEGDSAKALANSLSDCKRKYGVFPRGKGLLVRRNNIKRLK
L. donovani IEAHVNSMDQLAQLNKEIIGAGRRLSKSLISISIKLVDATSTRDPDGNIRLIVPEGDSAKALANSLSDCKRKYGVFPRGKGLLVRRNNIKRLK
L. chagasi IEAHVNSMDQLAQLNKEIIGAGRRLSKSLISISIKLVDATSTRDPDGNIRLIVPEGDSAKALANSLSDCKRKYGVFPRGKGLLVRRNNIKRLK
L. major IEAHVNSMDQLAQLNKEIIGAGRRLSKSLISISIKLVDATSTRDPDGNIRLIVPEGDSAKALANSLSDCKRKYGVFPRGKGLLVRRNNIKRLK
L. braziliensis IEAHVNSMDQLAQLNKEIIGAGRRLSKSLISISIKLVDATSTRDPDGNIRLIVPEGDSAKALANSLSDCKRKYGVFPRGKGLLVRRNNIKRLK
C. fasciculata IEAHVNSMDQLAQLNKEIIGTGRLLSKSLISISIKLVDATSTRSDKGNIRLIVPEGDSAKALANSLSDCKRKYGVFPRGKGLLVRRNNIKRLK
B. culicis IEAHVNSMDQLAQLNKEIIGAGRRLSKSLISISIKLVDATSNKSDGNIRLIVPEGDSAKALANSLSDCKRKYGVFPRGKGLLVRRNNIKRLK
B. saltans IESDASKGQMDVNRNLEALQVSGR--RMIISTIKLVDATAGAGSSGSEIRLIVPEGDSAKALANSLSDCKRKYGVFPRGKGLLVRRNNIKRLK
510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
T. rangeli NRELEQTECALQCEHEKVRGADERYVRLVMTDQDADGSHIKGLNINAFPELWVSDIINRNGHISLSTPFIIVHVLKRDKS--THEFSLKEVHKHOK
T. cruzi NCELEQTECALQCEHEKVRGADERYVRLVMTDQDADGSHIKGLNINAFPELWVSDIINRNGHISLSTPFIIVHVLKRDKS--THEFSLKEVHKHOK
T. brucei NCELEQTECALQCEHEKVRGADERYVRLVMTDQDADGSHIKGLNINAFPELWVSDIINRNGHISLSTPFIIVHVLKRDKS--THEFSLKEVHKHOK
L. infantum TCHEQLDILALGHEKRETSFAPEYRVLVMTDQDADGSHIKGLNINAFPELWVSDIINRNGHISLSTPFIIVHVLKRDKS--THEFSLKEVHKHOK
L. donovani TCHEQLDILALGHEKRETSFAPEYRVLVMTDQDADGSHIKGLNINAFPELWVSDIINRNGHISLSTPFIIVHVLKRDKS--THEFSLKEVHKHOK
L. chagasi TCHEQLDILALGHEKRETSFAPEYRVLVMTDQDADGSHIKGLNINAFPELWVSDIINRNGHISLSTPFIIVHVLKRDKS--THEFSLKEVHKHOK
L. major TCHEQLDILALGHEKRETSFAPEYRVLVMTDQDADGSHIKGLNINAFPELWVSDIINRNGHISLSTPFIIVHVLKRDKS--THEFSLKEVHKHOK
L. braziliensis MCEQLDILALGHEKRETSFAPEYRVLVMTDQDADGSHIKGLNINAFPELWVSDIINRNGHISLSTPFIIVHVLKRDKS--THEFSLKEVHKHOK
C. fasciculata TCHEQLDILALGHEKRETSFAPEYRVLVMTDQDADGSHIKGLNINAFPELWVSDIINRNGHISLSTPFIIVHVLKRDKS--THEFSLKEVHKHOK
B. culicis NCELEQTECALQCEHEKRETSFAPEYRVLVMTDQDADGSHIKGLNINAFPELWVSDIINRNGHISLSTPFIIVHVLKRDKS--THEFSLKEVHKHOK
B. saltans KCHEQLDILALGHEKRETSFAPEYRVLVMTDQDADGSHIKGLNINAFPELWVSDIINRNGHISLSTPFIIVHVLKRDKS--THEFSLKEVHKHOK
610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
T. rangeli MHG--NVPYTKVYKGLGTSTTBEGKEVREKDKDHTIRVMDRNLHKLISVDFSGEVNRRDMDTKNNYTGVEVDIDSKDTITSDVYFKEMVHFALA
T. cruzi THG--NVSYTKVYKGLGTSTTBEGKEVREKDKDHTIRVMDRNLHKLISVDFSGEVNRRDMDTKNNYTGVEVDIDSKDTITSDVYFKEMVHFALA
T. brucei SNA--NTPYTKVYKGLGTSTTBEGKEVREKDKDHTIRVMDRNLHKLISVDFSGEVNRRDMDTKNNYTGVEVDIDSKDTITSDVYFKEMVHFALV
L. infantum AHP--SARYTKVYKGLGTSTTBEGKEVREKDKDHTIRVMDRNLHKLISVDFSGEVNRRDMDTKNNYTGVEVDIDSKDTITSDVYFKEMVHFALV
```

*L. donovani* AHP--SARYTAAYYKGLGTSITTEKGYEYADMEKNIWITVDARHQLLLSVFDAAEVRKRREMTKNAFCQGEVIDLDSKRIITIPPEVHHEVHFALV  
*L. chagasi* AHP--SARYTAAYYKGLGTSITTEKGYEYADMEKNIWITVDARHQLLLSVFDAAEVRKRREMTKNAFCQGEVIDLDSKRIITIPPEVHHEVHFALV  
*L. major* AHP--SARYTAAYYKGLGTSITTEKGYEYADMEKNIWITVDARHQLLLSVFDAAEVRKRREMTKNAFCQGEVIDLDSKRIITIPPEVHHEVHFALV  
*L. braziliensis* AHP--TARYTAAYYKGLGTSITTEKGYEYADMEKNIWITVDARHQLLLSVFDAAEVRKRREMTKNAFCQGEVIDLDSKRIITIPPEVHHEVHFALV  
*C. fasciculata* ANP--NARYSARYYKGLGTSITTEKGYEYADMEKNIWITVPEKHLRLLSVFDAAEVRKRREMTKNAFCQGEVIDLDSKRIITIGDFVHHEVHFALV  
*B. culicis* AHP--NVNVTAYYKGLGTSITTEKGYEYADMEKNIWITVDPKHLKLLSVFDSCQVWRKRREMTKNAFCQGEVIDLDSKRIITIPPEVHHEVHFALA  
*B. saltans* DNARLASECFYKYKGLGTSITTEKGYEYADMEKNIWITVPSVQLLVFDSDVQWRKRREMTKNAFCQGEVIDLDSKRIITIPPEVHHEVHFANA

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800

*T. rangeli* GNRARLHAHVDGLKPSQRKTLWMLLR--SSNSAAKVAAGSYISBASAFFHGGBSLQETVMQMANNTTGNINLLVPEQFGQSRQLQGDHAAARFYITF  
*T. cruzi* GNRARLHAHVDGLKPSQRKTLWMLMR--SGNSAAKVAAGSYISBASAFFHGGBSLQETVMQMANNTTGNINLLVPEQFGQSRQLQGDHAAARFYITF  
*T. brucei* GNRARLHAHVDGLKPSQRKTLWMLRR--SGNSAAKVAAGSYISBASAFFHGGBSLQETVMQMANNTTGNINLLVPEQFGQSRQLQGDHAAARFYITF  
*L. infantum* GNRARLPHCVDGLKPSQRKTLWMLLR--HNSASAKVAAGSYISBASAFFHGGBSLQETVMQMANNTTGNINLLVPEQFGQSRQLQGDHAAARFYITF  
*L. donovani* GNRARLPHCVDGLKPSQRKTLWMLRR--HNSASAKVAAGSYISBASAFFHGGBSLQETVMQMANNTTGNINLLVPEQFGQSRQLQGDHAAARFYITF  
*L. chagasi* GNRARLPHCVDGLKPSQRKTLWMLLR--HNSASAKVAAGSYISBASAFFHGGBSLQETVMQMANNTTGNINLLVPEQFGQSRQLQGDHAAARFYITF  
*L. major* GNRARLPHCVDGLKPSQRKTLWMLRR--HNSASAKVAAGSYISBASAFFHGGBSLQETVMQMANNTTGNINLLVPEQFGQSRQLQGDHAAARFYITF  
*L. braziliensis* GNRARLPHCVDGLKPSQRKTLWMLLR--HNSASAKVAAGSYISBASAFFHGGBSLQETVMQMANNTTGNINLLVPEQFGQSRQLQGDHAAARFYITF  
*C. fasciculata* GNRARLPHCVDGLKPSQRKTLWMLRR--HNSASAKVAAGSYISBASAFFHGGBSLQETVMQMANNTTGNINLLVPEQFGQSRQLQGDHAAARFYITF  
*B. culicis* GNRARLHAHVDGLKPSQRKTLWMLRR--SGNSAAKVAAGSYISBASAFFHGGBSLQETVMQMANNTTGNINLLVPEQFGQSRQLQGDHAAARFYITF  
*B. saltans* GNRARLHAHVDGLKPSQRKTLWMLRR--SGNSAAKVAAGSYISBASAFFHGGBSLQETVMQMANNTTGNINLLVPEQFGQSRQLQGDHAAARFYITF

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900

*T. rangeli* KLSRFARLDFEEDDFLLDYMDEETVFPVHHVVPVHMLLNCNGAVGIGFGFATIPSPHPLDVAASAFAWNGESAKQVQRNVFWAVGFCQCTVRGPE  
*T. cruzi* KLSRLARLDFEEDDFLLDYMDEETVFPVHHVVPVHMLLNCNGAVGIGFGFATIPSPHPLDVAASAFAWNGEAKRVWRNVFWAVGFCQCTVRGPE  
*T. brucei* KLSRFARLDFEEDDFLLDYMDEETVFPVHHVVPVHMLLNCNGAVGIGFGFATIPSPHPLDVAASAFAWNGEAKRVWRNVFWAVGFCQCTVRGPE  
*L. infantum* KLSRFARLDFEEDDFLLDYMDEETVFPVHHVVPVHMLLNCNGAVGIGFGFATIPSPHPLDVAASAFAWNGESAKQVQRNVFWAVGFCQCTVRGPE  
*L. donovani* KLSRFARLDFEEDDFLLDYMDEETVFPVHHVVPVHMLLNCNGAVGIGFGFATIPSPHPLDVAASAFAWNGESAKQVQRNVFWAVGFCQCTVRGPE  
*L. chagasi* KLSRFARLDFEEDDFLLDYMDEETVFPVHHVVPVHMLLNCNGAVGIGFGFATIPSPHPLDVAASAFAWNGESAKQVQRNVFWAVGFCQCTVRGPE  
*L. major* KLSRFARLDFEEDDFLLDYMDEETVFPVHHVVPVHMLLNCNGAVGIGFGFATIPSPHPLDVAASAFAWNGESAKQVQRNVFWAVGFCQCTVRGPE  
*L. braziliensis* KLSRFARLDFEEDDFLLDYMDEETVFPVHHVVPVHMLLNCNGAVGIGFGFATIPSPHPLDVAASAFAWNGESAKQVQRNVFWAVGFCQCTVRGPE  
*C. fasciculata* KLSRFARLDFEEDDFLLDYMDEETVFPVHHVVPVHMLLNCNGAVGIGFGFATIPSPHPLDVAASAFAWNGESAKQVQRNVFWAVGFCQCTVRGPE  
*B. culicis* KLSRFARVDFEEDDFLLDYMDEETVFPVHHVVPVHMLLNCNGAVGIGFGFATIPSPHPLDVAASAFAWNGEAKRVWRNVFWAVGFCQCTVRGPE  
*B. saltans* KLSRLARLDFEEDDFLLDYMDEETVFPVHHVVPVHMLLNCNGAVGIGFGFATIPSPHPLDVAASAFAWNGEAKRVWRNVFWAVGFCQCTVRGPTT

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000

*T. rangeli* GE-----PFAASNYNYLDG---RVVHVFPTLSTLFAFGRHSHLSASKDVIQRADYSGANHIDLLITLTKGATITTAAGCSELMLVQRVYING  
*T. cruzi* GE-----PFAASNYQYYVDG---RVVHVFPTLSTLFAFDRHSHLSASKDVIQRADYSGANHIDLLITLTKGATITTAAGCSELMLVQRVYING  
*T. brucei* GE-----PFAVATYTYCGGG---RVVHVFPTLSTLFAFDEHSHLSASKDVIQRADYSGANHIDLLITLTKGATITTAAGCSELMLVQRVYING  
*L. infantum* NE-----PFAVAKTIAHNG---RFLHSHVPTMSTFAFLHSHLSASADVIQRADYSGANHIDLLIVRQGSLLITWAAGCETDLAAQRVYING  
*L. donovani* NE-----PFAVAKTIAHNG---RFLHSHVPTMSTFAFLHSHLSASADVIQRADYSGANHIDLLIVRQGSLLITWAAGCETDLAAQRVYING  
*L. chagasi* NE-----PFAVAKTIAHNG---RFLHSHVPTMSTFAFLHSHLSASADVIQRADYSGANHIDLLIVRQGSLLITWAAGCETDLAAQRVYING  
*L. major* NE-----PFAVAKTIAHNG---RFLHSHVPTMSTFAFLHSHLSASADVIQRADYSGANHIDLLIVRQGSLLITWAAGCETDLAAQRVYING  
*L. braziliensis* KE-----YFVAKTIAHNG---RFLHSHVPTMSTFAFLHSHLSASADVIQRADYSGANHIDLLIVRQGSLLITWAAGCETDLAAQRVYING  
*C. fasciculata* KE-----YFVAKTIAHNG---RFLHSHVPTMSTFAFLHSHLSASADVIQRADYSGANHIDLLIVRQGSLLITWAAGCETDLAAQRVYING  
*B. culicis* GE-----PFAVAKSAYKNN---YHVSHTLPTLSTLFAFGRHSHLSANMDVIQRADYSGANHIDLLIVRQGSLLITWAAGCETDLAAQRVYING  
*B. saltans* VDEEGRREVSTTHMFRPTTRKVGKGFVVRVPLDRAQLGRWAKLAEESKIDLLADYSGANHIDLLIVRQGSLLITWAAGCETDLAAQRVYING

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100

*T. rangeli* TVFSSNGVTLHEGDLAPLWVHYDRLLDLKRRRTKIGMEMDARLQSTRRKVEHFRQGIIFLNATDD--THTGTGKVLGRVDESEFDYLKRLKII  
*T. cruzi* TVFSSGTVLHEGDLAPLWVHYDRLLDLKRRRTKIGMEMDARLQSTRRKVEHFRQGIIFLNATDD--THTGTGKVLGRVDESEFDYLKRLKII  
*T. brucei* TVFSSGTVLHEGDLAPLWVHYDRLLDLKRRRTKIGMEMDARLQSTRRKVEHFRQGIIFLNATDD--THTGTGKVLGRVDESEFDYLKRLKII  
*L. infantum* TVFSSGTVLHEGDLAPLWVHYDRLLDLKRRRTKIGMEMDARLQSTRRKVEHFRQGIIFLNATDD--THTGTGKVLGRVDESEFDYLKRLKII  
*L. donovani* TVFSSGTVLHEGDLAPLWVHYDRLLDLKRRRTKIGMEMDARLQSTRRKVEHFRQGIIFLNATDD--THTGTGKVLGRVDESEFDYLKRLKII  
*L. chagasi* TVFSSGTVLHEGDLAPLWVHYDRLLDLKRRRTKIGMEMDARLQSTRRKVEHFRQGIIFLNATDD--THTGTGKVLGRVDESEFDYLKRLKII  
*L. major* TVFSSGTVLHEGDLAPLWVHYDRLLDLKRRRTKIGMEMDARLQSTRRKVEHFRQGIIFLNATDD--THTGTGKVLGRVDESEFDYLKRLKII  
*L. braziliensis* TVFSSGTVLHEGDLAPLWVHYDRLLDLKRRRTKIGMEMDARLQSTRRKVEHFRQGIIFLNATDD--THTGTGKVLGRVDESEFDYLKRLKII  
*C. fasciculata* TVFSSGTVLHEGDLAPLWVHYDRLLDLKRRRTKIGMEMDARLQSTRRKVEHFRQGIIFLNATDD--THTGTGKVLGRVDESEFDYLKRLKII  
*B. culicis* TVFSSGTVLHEGDLAPLWVHYDRLLDLKRRRTKIGMEMDARLQSTRRKVEHFRQGIIFLNATDD--THTGTGKVLGRVDESEFDYLKRLKII  
*B. saltans* AYVNVEMVLSHGESVESLWVHYDRLLDLKRRRTKIGMEMDARLQSTRRKVEHFRQGIIFLNATDD--THTGTGKVLGRVDESEFDYLKRLKII

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200

*T. rangeli* FVFKNSLELNRKGEIEKRFDKLKKITPVKMLTLDKDKDPTQEMVRLVINSQKQKSSSTIGVVELPALRQ---LMLLEASAKGAT--AYRVHAC  
*T. cruzi* FVFKNSLELNRKGEIEKRFDKLKKITPVKMLTLDKDKDPTQEMVRLVINSQKQKSSSTIGVVELPALRQ---LMLLEASAKGAT--AYRVHAC  
*T. brucei* FVFKNSLELNRKGEIEKRFDKLKKITPVKMLTLDKDKDPTQEMVRLVINSQKQKSSSTIGVVELPALRQ---LMLLEASAKGAT--AYRVHAC  
*L. infantum* FVFKNSLELNRKGEIEKRFDKLKKITPVKMLTLDKDKDPTQEMVRLVINSQKQKSSSTIGVVELPALRQ---LMLLEASAKGAT--AYRVHAC  
*L. donovani* FVFKNSLELNRKGEIEKRFDKLKKITPVKMLTLDKDKDPTQEMVRLVINSQKQKSSSTIGVVELPALRQ---LMLLEASAKGAT--AYRVHAC  
*L. chagasi* FVFKNSLELNRKGEIEKRFDKLKKITPVKMLTLDKDKDPTQEMVRLVINSQKQKSSSTIGVVELPALRQ---LMLLEASAKGAT--AYRVHAC  
*L. major* FVFKNSLELNRKGEIEKRFDKLKKITPVKMLTLDKDKDPTQEMVRLVINSQKQKSSSTIGVVELPALRQ---LMLLEASAKGAT--AYRVHAC  
*L. braziliensis* FVFKNSLELNRKGEIEKRFDKLKKITPVKMLTLDKDKDPTQEMVRLVINSQKQKSSSTIGVVELPALRQ---LMLLEASAKGAT--AYRVHAC  
*C. fasciculata* FVFKNSLELNRKGEIEKRFDKLKKITPVKMLTLDKDKDPTQEMVRLVINSQKQKSSSTIGVVELPALRQ---LMLLEASAKGAT--AYRVHAC  
*B. culicis* FVFKNSLELNRKGEIEKRFDKLKKITPVKMLTLDKDKDPTQEMVRLVINSQKQKSSSTIGVVELPALRQ---LMLLEASAKGAT--AYRVHAC  
*B. saltans* YFNNNVKLRKQIEKSSLSKLSKSELEMETDAAEKAETAFHEDALLLRPADR-----PVFTAT-----EVDNLSQQRNSKQKWFRR

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280

*T. rangeli* KYVPPPPSKRPNVGGSGGGGGSVRSSAAAVAHVHKAEEKAAARSMK-----MLLDVVARQVAVLPRLFWLFL  
*T. cruzi* KYVPPPPSKRPNVGGSGGGGGSVRSSAAAVAHVHKAEEKAAARSMK-----MLLDVVARQVAVLPRLFWLFL  
*T. brucei* KYVPPPP--TKRGAAGRSRGGG--ATAAGAAAAGVGRGKGGPKGRAGVRR-----MVLDAQAKVRLTRLPRLLFL  
*L. infantum* KYQKPPSKRPRGSEVGCARPSSDAARTVGRKLVGRSFRVFNKPKMRSKNNVKSLSLTVRAQFAGALQGLRPL--HVLV  
*L. donovani* KYQKPPSKRPRGSEVGCARPSSDAARTVGRKLVGRSFRVFNKPKMRSKNNVKSLSLTVRAQFAGALQGLRPL--HVLV  
*L. chagasi* KYQKPPSKRPRGSEVGCARPSSDAARTVGRKLVGRSFRVFNKPKMRSKNNVKSLSLTVRAQFAGALQGLRPL--HVLV  
*L. major* KYQKPPSKRPRGSEVGCARPSSDAARTVGRKLVGRSFRVFNKPKMRSKNNVKSLSLTVRAQFAGALQGLRPL--HVLV  
*L. braziliensis* QHETPPSKRPRGSEVGCARPSSDAARTVGRKLVGRSFRVFNKPKMRSKNNVKSLSLTVRAQFAGALQGLRPLPHFLFL  
*C. fasciculata* EYEEPPSKRPRGSEVGCARPSSDAARTVGRKLVGRSFRVFNKPKMRSKNNVKSLSLTVRAQFAGALQGLRPLPHFLFL  
*B. culicis* QHVPFPPSKRPRGSEVGCARPSSDAARTVGRKLVGRSFRVFNKPKMRSKNNVKSLSLTVRAQFAGALQGLRPLPHFLFL  
*B. saltans* KFGGSSSSSGGAGGGGEMVVRVFPPLPNQPPAAAAGAQAQAQAVAFVGG-----GVLWAVLQKVVGGVRLLIH-

**Apêndice 2:** Alinhamento das seqüências de aminoácidos deduzidas a partir do gene Top2mt de *Trypanosoma rangeli*, *T. cruzi*, *T. brucei*, *Leishmania braziliensis*, *L. infantum*, *L. donovani*, *L. major*, *L. chagasi*, *Blastocrithidia culicis*, *Crithidia fasciculata* e *Bodo saltans* através do programa CLUSTAL W. As regiões em azul representam total identidade e em cinza aminoácidos conservados.

# Apêndice 3

|                        | 10                 | 20    | 30    | 40        | 50    | 60     | 70    | 80    | 90    | 100      |     |          |                      |    |      |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|------------------------|--------------------|-------|-------|-----------|-------|--------|-------|-------|-------|----------|-----|----------|----------------------|----|------|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| <i>T. rangeli</i>      | .....              | ..... | ..... | .....     | ..... | .....  | ..... | ..... | ..... | .....    |     |          |                      |    |      |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| <i>T. cruzi</i>        | -----              | ----- | ----- | -----     | ----- | -----  | ----- | ----- | ----- | -----    |     |          |                      |    |      |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| <i>T. brucei_a</i>     | -----              | ----- | ----- | -----     | ----- | -----  | ----- | ----- | ----- | -----    |     |          |                      |    |      |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| <i>T. brucei_b</i>     | -----              | ----- | ----- | -----     | ----- | -----  | ----- | ----- | ----- | -----    |     |          |                      |    |      |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| <i>T. congolense</i>   | -----              | ----- | ----- | -----     | ----- | -----  | ----- | ----- | ----- | -----    |     |          |                      |    |      |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| <i>L. infantum</i>     | -----              | ----- | ----- | -----     | ----- | -----  | ----- | ----- | ----- | -----    |     |          |                      |    |      |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| <i>L. major</i>        | -----              | ----- | ----- | -----     | ----- | -----  | ----- | ----- | ----- | -----    |     |          |                      |    |      |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| <i>L. braziliensis</i> | -----              | ----- | ----- | -----     | ----- | -----  | ----- | ----- | ----- | -----    |     |          |                      |    |      |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|                        | 110                | 120   | 130   | 140       | 150   | 160    | 170   | 180   | 190   | 200      |     |          |                      |    |      |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| <i>T. rangeli</i>      | KIFDELLVNAADNKVRDI | LCOPT | RWVLD | DAERGMAR  | VYNN  | NGEGIV | VR    | HR    | HEHL  | LWVPEMIF | YGL | LLTSSNYD | TEAKVTGGNGFGAKLINVFS | SR | REVE |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| <i>T. cruzi</i>        | KIFDELLVNAADNKVRDI | LCOPT | RWVLD | DAERGMAR  | VYNN  | NGEGIV | VR    | HR    | HEHL  | LWVPEMIF | YGL | LLTSSNYD | TEAKVTGGNGFGAKLINVFS | TR | REVE |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| <i>T. brucei_a</i>     | KIFDELLVNAADNKVRDI | HCOPT | RWVWD | DAARGLVRY | NN    | NGEGIV | VR    | HR    | HEHL  | LWVPEMIF | YGL | LLTSSNYD | TEAKVTGGNGFGAKLINVFS | TR | REVE |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| <i>T. brucei_b</i>     | KIFDELLVNAADNKVRDI | HCOPT | RWVWD | DAARGLVRY | NN    | NGEGIV | VR    | HR    | HEHL  | LWVPEMIF | YGL | LLTSSNYD | TEAKVTGGNGFGAKLINVFS | TR | REVE |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| <i>T. congolense</i>   | KIFDELLVNAADNKVRDI | HCOPT | RWVLD | DAERGMAR  | VYNN  | NGEGIV | VR    | HR    | HEHL  | LWVPEMIF | YGL | LLTSSNYD | TEAKVTGGNGFGAKLINVFS | TR | REVE |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| <i>L. infantum</i>     | KIFDELLVNAADNKVRDI | LCOPT | RWVMT | EN--YVR   | YNN   | NGEGIV | VR    | HR    | HEHL  | LWVPEMIF | YGL | LLTSSNYD | TEAKVTGGNGFGAKLINVFS | TR | REVE |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| <i>L. major</i>        | KIFDELLVNAADNKVRDI | LCOPT | RWVMT | EN--YVR   | YNN   | NGEGIV | VR    | HR    | HEHL  | LWVPEMIF | YGL | LLTSSNYD | TEAKVTGGNGFGAKLINVFS | TR | REVE |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| <i>L. braziliensis</i> | KIFDELLVNAADNKVRDI | LCOPT | RWVMT | EN--YVR   | YNN   | NGEGIV | VR    | HR    | HEHL  | LWVPEMIF | YGL | LLTSSNYD | TEAKVTGGNGFGAKLINVFS | TR | REVE |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|                        | 210                | 220   | 230   | 240       | 250   | 260    | 270   | 280   | 290   | 300      |     |          |                      |    |      |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| <i>T. rangeli</i>      | VHSRSKKFK          | MKR   | RNNMI | ESE       | EV    | TP     | CGD   | GY    | V     | TF       | YP  | FD       | AK                   | N  | Q    | GF | G | V | M | H | M | R | R | V | V | A | G | C | T | R | S | R | V | I | N | D | T | K | A | S | T | L | B | V | D | L | V | M | G | M | G | E |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| <i>T. cruzi</i>        | VHSRSKKFK          | MKR   | RNNMI | ESE       | EV    | TP     | CGD   | GY    | V     | TF       | YP  | FD       | AK                   | N  | Q    | GF | G | V | M | H | M | R | R | V | V | A | G | C | T | R | S | R | V | I | N | D | T | K | A | S | T | L | B | V | D | L | V | M | G | M | G | E |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| <i>T. brucei_a</i>     | VHSRSKKFK          | MKR   | RNNMI | E         | N     | E      | E     | A     | V     | T        | P   | C        | G                    | D  | Y    | V  | T | F | P | D | E | K | N | L | E | G | T | D | N | V | L | I | K | R | R | V | I | A | G | C | T | R | S | R | V | I | N | D | T | K | A | S | T | L | B | V | D | L | V | M | G | M | G | E |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| <i>T. brucei_b</i>     | VHSRSKKFK          | MKR   | RNNMI | E         | N     | E      | E     | A     | V     | T        | P   | C        | G                    | D  | Y    | V  | T | F | P | D | E | K | N | L | E | G | T | D | N | V | L | I | K | R | R | V | I | A | G | C | T | R | S | R | V | I | N | D | T | K | A | S | T | L | B | V | D | L | V | M | G | M | G | E |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| <i>T. congolense</i>   | VHSRSKKFK          | MKR   | RNNMI | E         | S     | E      | E     | V     | T     | P        | C   | G        | D                    | Y  | V    | T  | F | P | D | E | A | K | N | L | E | G | L | S | D | N | V | L | I | K | R | R | V | I | A | G | C | T | R | S | R | V | I | N | D | T | K | A | S | T | L | B | V | D | L | V | M | G | M | G | E |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| <i>L. infantum</i>     | VHSRSKKFK          | MKR   | RNNMI | H         | D     | D      | D     | V     | T     | P        | C   | D        | S                    | A  | D    | V  | T | F | P | D | F | A | L | H | D | K | F | S | D | N | V | L | I | K | R | R | V | I | A | G | C | T | R | S | R | V | I | N | D | T | K | A | S | T | L | B | V | D | L | V | M | G | M | G | E |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| <i>L. major</i>        | VHSRSKKFK          | MKR   | RNNMI | H         | D     | D      | D     | V     | T     | P        | C   | D        | S                    | A  | D    | V  | T | F | P | D | F | A | L | H | D | K | F | S | D | N | V | L | I | K | R | R | V | I | A | G | C | T | R | S | R | V | I | N | D | T | K | A | S | T | L | B | V | D | L | V | M | G | M | G | E |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| <i>L. braziliensis</i> | VHSRSKKFK          | MKR   | RNNMI | H         | D     | D      | D     | V     | T     | P        | C   | D        | S                    | A  | D    | V  | T | F | P | D | F | A | L | H | D | K | F | S | D | N | V | L | I | K | R | R | V | I | A | G | C | T | R | S | R | V | I | N | D | T | K | A | S | T | L | B | V | D | L | V | M | G | M | G | E |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|                        | 310                | 320   | 330   | 340       | 350   | 360    | 370   | 380   | 390   | 400      |     |          |                      |    |      |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| <i>T. rangeli</i>      | R                  | A     | A     | S         | V     | A      | R     | V     | R     | G        | R   | V        | C                    | V  | R    | V  | N | I | L | Q | V | S | V | N | S | A | T | T | R | G | G | T | H | V | R | I | T | O | V | I | A | R | W | E | D | A | R | R | S | K | T | V | A | P | M | I | R | P | H | E | L | V | I | N | C | H | V | N | G | F | D | S | O | T | R | E | T | L | N | L | V | S |
| <i>T. cruzi</i>        | R                  | A     | A     | S         | V     | A      | R     | V     | R     | G        | R   | V        | C                    | V  | R    | V  | N | I | L | Q | V | S | V | N | S | A | T | T | R | G | G | T | H | V | R | I | T | O | V | I | A | R | W | E | D | A | R | R | S | K | T | V | A | P | M | I | R | P | H | E | L | V | I | N | C | H | V | N | G | F | D | S | O | T | R | E | T | L | N | L | V | S |
| <i>T. brucei_a</i>     | R                  | P     | S     | S         | V     | A      | R     | V     | R     | G        | R   | V        | C                    | V  | R    | V  | N | I | L | Q | V | S | V | N | S | A | T | T | R | G | G | T | H | V | R | I | T | O | V | I | A | R | W | E | D | A | R | R | S | K | T | V | A | P | M | I | R | P | H | E | L | V | I | N | C | H | V | N | G | F | D | S | O | T | R | E | T | L | N | L | V | S |
| <i>T. brucei_b</i>     | R                  | P     | S     | S         | V     | A      | R     | V     | R     | G        | R   | V        | C                    | V  | R    | V  | N | I | L | Q | V | S | V | N | S | A | T | T | R | G | G | T | H | V | R | I | T | O | V | I | A | R | W | E | D | A | R | R | S | K | T | V | A | P | M | I | R | P | H | E | L | V | I | N | C | H | V | N | G | F | D | S | O | T | R | E | T | L | N | L | V | S |
| <i>T. congolense</i>   | R                  | P     | S     | S         | V     | A      | R     | V     | R     | G        | R   | V        | C                    | V  | R    | V  | N | I | L | Q | V | S | V | N | S | A | T | T | R | G | G | T | H | V | R | I | T | O | V | I | A | R | W | E | D | A | R | R | S | K | T | V | A | P | M | I | R | P | H | E | L | V | I | N | C | H | V | N | G | F | D | S | O | T | R | E | T | L | N | L | V | S |
| <i>L. infantum</i>     | R                  | A     | A     | S         | V     | A      | R     | V     | R     | G        | R   | V        | C                    | V  | R    | V  | N | I | L | Q | V | S | V | N | S | A | T | T | R | G | G | T | H | V | R | I | T | O | V | I | A | R | W | E | D | A | R | R | S | K | T | V | A | P | M | I | R | P | H | E | L | V | I | N | C | H | V | N | G | F | D | S | O | T | R | E | T | L | N | L | V | S |
| <i>L. major</i>        | R                  | A     | A     | S         | V     | A      | R     | V     | R     | G        | R   | V        | C                    | V  | R    | V  | N | I | L | Q | V | S | V | N | S | A | T | T | R | G | G | T | H | V | R | I | T | O | V | I | A | R | W | E | D | A | R | R | S | K | T | V | A | P | M | I | R | P | H | E | L | V | I | N | C | H | V | N | G | F | D | S | O | T | R | E | T | L | N | L | V | S |
| <i>L. braziliensis</i> | R                  | A     | A     | S         | V     | A      | R     | V     | R     | G        | R   | V        | C                    | V  | R    | V  | N | I | L | Q | V | S | V | N | S | A | T | T | R | G | G | T | H | V | R | I | T | O | V | I | A | R | W | E | D | A | R | R | S | K | T | V | A | P | M | I | R | P | H | E | L | V | I | N | C | H | V | N | G | F | D | S | O | T | R | E | T | L | N | L | V | S |
|                        | 410                | 420   | 430   | 440       | 450   | 460    | 470   | 480   | 490   | 500      |     |          |                      |    |      |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| <i>T. rangeli</i>      | R                  | P     | G     | T         | L     | L      | N     | S     | V     | I        | M   | S        | C                    | H  | V    | E  | R | S | V | E | M | A | N | K | I | A | E | M | S | K | I | S | S | R | K | I | L | P | K | L | D | N | A | E | A | G | G | H | S | R | C | T | I | L | T | E | G | S | A | L | C | T | A | G | A | K | D | R | Y | F | G | V | E |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| <i>T. cruzi</i>        | R                  | P     | G     | T         | L     | L      | N     | S     | V     | I        | M   | S        | C                    | H  | V    | E  | R | S | V | E | M | A | N | K | I | A | E | M | S | K | I | S | S | R | K | I | L | P | K | L | D | N | A | E | A | G | G | H | S | R | C | T | I | L | T | E | G | S | A | L | C | T | A | G | A | K | D | R | Y | F | G | V | E |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| <i>T. brucei_a</i>     | R                  | P     | G     | T         | L     | L      | N     | S     | V     | I        | M   | S        | C                    | H  | V    | E  | R | S | V | E | M | A | N | K | I | A | E | M | S | K | I | S | S | R | K | I | L | P | K | L | D | N | A | E | A | G | G | H | S | R | C | T | I | L | T | E | G | S | A | L | C | T | A | G | A | K | D | R | Y | F | G | V | E |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| <i>T. brucei_b</i>     | R                  | P     | G     | T         | L     | L      | N     | S     | V     | I        | M   | S        | C                    | H  | V    | E  | R | S | V | E | M | A | N | K | I | A | E | M | S | K | I | S | S | R | K | I | L | P | K | L | D | N | A | E | A | G | G | H | S | R | C | T | I | L | T | E | G | S | A | L | C | T | A | G | A | K | D | R | Y | F | G | V | E |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| <i>T. congolense</i>   | R                  | P     | G     | T         | L     | L      | N     | S     | V     | I        | M   | S        | C                    | H  | V    | E  | R | S | V | E | M | A | N | K | I | A | E | M | S | K | I | S | S | R | K | I | L | P | K | L | D | N | A | E | A | G | G | H | S | R | C | T | I | L | T | E | G | S | A | L | C | T | A | G | A | K | D | R | Y | F | G | V | E |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| <i>L. infantum</i>     | R                  | P     | G     | T         | L     | L      | N     | S     | V     | I        | M   | S        | C                    | H  | V    | E  | R | S | V | E | M | A | N |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |

```

T. congolense FGTRLGGKGAAGRYITRLNIAARRVHPSDDFVVDKDDGGLSVBFFVYVPIVMVLVNGTIGTGTGANNINPNVPLDVLNLRRLTSSDGLRPMK
L. infantum FGTRLGGKGAAGRYITRLMQVARRHFFADDFVVEKDDGGLSVBFFVYVPIVMVLVNGTIGTGTGANNINPNVPLDVLNLRRLMRGEEVHKMK
L. major FGTRLGGKGAAGRYITRLMQVARRHFFADDFVVEKDDGGLSVBFFVYVPIVMVLVNGTIGTGTGANNINPNVPLDVLNLRRLMRGEEVHKMK
L. braziliensis FGTRLGGKGAAGRYITRLMHVARRHFFADDFVVEKDDGGLSVBFFVYVPIVMVLVNGTIGTGTGANNINPNVPLDVLNLRRLMRGEEVHKMK
          910      920      930      940      950      960      970      980      990      1000

T. rangeli PWYFGTGTLETRERKGRKGVSSCATVRFDDGVIHTELLEFGQWQYKRFLEDRRREVVYQYREINDDVIVDFEVEVHFFVQCVAWGCVCFBKQDLREK
T. cruzi PWYFGHATLETRERKGRKGVSSCATVRFDDGVIHTELLEFGQWQYKRFLEDRRREVVYQYREINDDVIVDFEVEVHFFVQCVAWGCVCFBKQDLREK
T. brucei_a PWYFGTGTLETRERKGRKGVSSCATVRFDDGVIHTELLEFGQWQYKRFLEDRRREVVYQYREINDDVIVDFEVEVHFFVQCVAWGCVCFBKQDLREK
T. brucei_b PWYFGTGTLETRERKGRKGVSSCATVRFDDGVIHTELLEFGQWQYKRFLEDRRREVVYQYREINDDVIVDFEVEVHFFVQCVAWGCVCFBKQDLREK
T. congolense PWYFGTGTLETRERKGRKGVSSCATVRFDDGVIHTELLEFGQWQYKRFLEDRRREVVYQYREINDDVIVDFEVEVHFFVQCVAWGCVCFBKQDLREK
L. infantum PWYFGTGTLETRERKGRKGVSSCATVRFDDGVIHTELLEFGQWQYKRFLEDRRREVVYQYREINDDVIVDFEVEVHFFVQCVAWGCVCFBKQDLREK
L. major PWYFGTGTLETRERKGRKGVSSCATVRFDDGVIHTELLEFGQWQYKRFLEDRRREVVYQYREINDDVIVDFEVEVHFFVQCVAWGCVCFBKQDLREK
L. braziliensis PWYFGTGTLETRERKGRKGVSSCATVRFDDGVIHTELLEFGQWQYKRFLEDRRREVVYQYREINDDVIVDFEVEVHFFVQCVAWGCVCFBKQDLREK
          1010     1020     1030     1040     1050     1060     1070     1080     1090     1100

T. rangeli VHAANTIAFDREGITPKYLDASVSLVKEFVILVRIDVVAARREFLEEQVRAALKLENMVRFRNEVIDCFPIVWPKMKDVKDQKQKGFPPPQQCKKKKMS
T. cruzi VHAANTIAFDREGITPKYLDASVSLVKEFVILVRIDVVAARREFLEEQVRAALKLENMVRFRNEVIDCFPIVWPKMKDVKDQKQKGFPPPQQCKKKKMS
T. brucei_a VHAANTIAFDREGITPKYLDASVSLVKEFVILVRIDVVAARREFLEEQVRAALKLENMVRFRNEVIDCFPIVWPKMKDVKDQKQKGFPPPQQCKKKKMS
T. brucei_b VHAANTIAFDREGITPKYLDASVSLVKEFVILVRIDVVAARREFLEEQVRAALKLENMVRFRNEVIDCFPIVWPKMKDVKDQKQKGFPPPQQCKKKKMS
T. congolense VHAANTIAFDREGITPKYLDASVSLVKEFVILVRIDVVAARREFLEEQVRAALKLENMVRFRNEVIDCFPIVWPKMKDVKDQKQKGFPPPQQCKKKKMS
L. infantum VHAANTIAFDREGITPKYLDASVSLVKEFVILVRIDVVAARREFLEEQVRAALKLENMVRFRNEVIDCFPIVWPKMKDVKDQKQKGFPPPQQCKKKKMS
L. major VHAANTIAFDREGITPKYLDASVSLVKEFVILVRIDVVAARREFLEEQVRAALKLENMVRFRNEVIDCFPIVWPKMKDVKDQKQKGFPPPQQCKKKKMS
L. braziliensis VHAANTIAFDREGITPKYLDASVSLVKEFVILVRIDVVAARREFLEEQVRAALKLENMVRFRNEVIDCFPIVWPKMKDVKDQKQKGFPPPQQCKKKKMS
          1110     1120     1130     1140     1150     1160     1170     1180     1190     1200

T. rangeli STVTEEGDEEAVEGAANAMT-----EEVFEIQLQSAVDAA--EDADSGEAPVEVQQAARDNYLLIGRLWNLTABVITARLQAQLQKARELAITLQKQTPRDM
T. cruzi STVTEEGDEEAAADATHATA-----EDVFEIQLQSAVDAA--EDADSGEAPVEVQQAARDNYLLIGRLWNLTABVITARLQAQLQKARELAALAKRTPRDM
T. brucei_a STVTEVDE--EPEETERRNTAATSADAEAEVIQPDELIGPQGGGAQEPE--VKQNAARDNYLLIGRLWNLTABVITARLQAQLQKARELAALAKRTPRDM
T. brucei_b STVTEVDE--EEDNDGAKLIDPVFEFESVFG--EQVIGKMLCTAPEEIMMKGVLVEDNYLLIGRLWNLTABVITARLQAQLQKARELAALAKRTPRDM
T. congolense STVINDGEE--EAERRHAANSADAEAEVIQPDELIMGSSEGEQ--EAPALKRSADNYLLIGRLWNLTABVITARLQAQLQKARELAALAKRTPRDM
L. infantum STVTEEGDDGAPDAQNSEED-----VGMGNAADGG--ADGGAPEPEVRRATRDNYLLIGRLWNLTABVITARLQAQLQKARELAALAKRTPRDM
L. major STVTEEGDDGAPDAQNSEED-----VGMGNAADGG--ADGGAPEPEVRRATRDNYLLIGRLWNLTABVITARLQAQLQKARELAALAKRTPRDM
L. braziliensis STVTEEGDEEAETPNQNSEED-----VGMGNAADGG--VDDGDAETPEVRRATRDNYLLIGRLWNLTABVITARLQAQLQKARELAALAKRTPRDM
          1210     1220     1230     1240     1250     1260     1270     1280     1290     1300

T. rangeli AADINDIAPRRIKFFEGVKEIASVGRKMEKTRFPFPRRLRVPLISDRARQALAKELVKEKPKGRVCEVDGNAG-----DATKNTS-----AGREPAV
T. cruzi AADINDIAPRRIKFFEGVKEIASVGRKMEKTRFPFPRRLRVPLISDRARQALAKELVKEKPKGRVCEVDGNAG-----GDRKNIS-----VGRKFAA
T. brucei_a REDIIDLRFDPVQKLEFDERRRKIASIQKREKRRFPFASRLRVPLISDAARKALLRETIKEEKKVRGDTSTRGG-----GPSAGDGKPKRGVKTAS
T. brucei_b REDIIDLRFSDQKLEFDERRRKIASIQKREKRRFPFASRLRVPLISDAARKADRSALRLQS--NCKREMS SKCAS--ESFA-----LIVL
T. congolense REDIIDLRFQPMQKLEFDERRRKIASIQKREKRRFPFASRLRVPLISDRAREVLRREVVKEEKSKRGDASVKNIS-----GSATGAG-----RGAGNS
L. infantum MEDIKVRLTKLGSFYADREVDIATIQRRK--VKKFPFARLRVPLISDRARSLQKEAEKALKANGVGGRRVGGDDDALAGGAASAVEGARPKPKKAA
L. major MEDIKVRLTKLGSFYADREVDIATIQRRK--VKKFPFARLRVPLISDRARSLQKEAEKALKANGVGGRRVGGDDTLAGGAASAVEGARPKPKKAA
L. braziliensis MEDIKVRLTKLGSFYADREVDIATIQRRK--VKKFPFARLRVPLISDRARSLQKEAEKALKANSAGGRIRGGDDAMLGEASAGVEARPKPKKAA
          1310     1320     1330     1340     1350     1360     1370     1380     1390     1400

T. rangeli KRRKRRSDDDDDSDVGEGDSLSDTS-----DWRP--AGGGASDAVLDLDDDDPGNKANGGAKPLPKRPAAKRAPO-----KPRSAG-----
T. cruzi KRRKRRSDDDSDIDADDLDFMSDASGGGGGRWRPGDEEGDGGSDGVVLDDDG--PGNAGGGATKFPQKFRTPAKRAAPR-----KPEEG-----
T. brucei_a SGRKRRKSDSDDDDFDFTGFSDDG-----DYPFDDSDNGGATAASGGSTAKVRAFAKQAPKQAAVFRPSGR-----
T. brucei_b AGVSRKRRKSDSDSD-----VSLGTEG-----STCIDNEARKRVIHGSVAGGKRLVRHDEVSRKGRVSSCGDGRHVS-----
T. congolense GTAKRRKRRKSSDDGDEDFEFGES-----DDINDFEGGMDATFAPVKTSAK--AFAQPRAPFKVGEKQTRAPO-----
L. infantum AKRRAKRRKRRKSDSDSDSDDEEMFDS-----DNDDEGENIVGMDAGAPVPEPARVCCGSKPKRPAAPKRHAASKPKRVKNSDDDDSDG--E
L. major AKRRAKRRKRRKSDSDSDSDDEEMFDS-----DNDDEGENIVGMDAGAPVPEPARVCCGSKPKRPAAPKRHAASKPKRVKNSDDDDSDGNSDC
L. braziliensis VKRRAKRRKRRKSDSDSDSDDEEMFDS-----DNDDEGENIVGMDAGAPVPEPARVCCGSKPKRPAAPKRHAASKPKRVKNSDDDDSDGNSDC
          1410     1420     1430     1440     1450     1460     1470     1480     1490     1500

T. rangeli -----AKRAKTEETPKLVTDDPDIINDFGIEALTRTAARPTDVATSAATAATAAAVTPA-----BRAVLEEDADDLLVLIIGSVGRK
T. cruzi -----LKRVKKEAEKVVVVTDDEDFIDFEGIEALTRTAPKCNKNTTITAKATTAFTFPQGSTVASVIDTDDDDLLIGISVSDVK
T. brucei_a -----AKTLKKEETELKGLASDLDLDFGIEALTGSLQKTTSSSKLPSPTSGFAEDE-----EALLLIIGISVSAQG
T. brucei_b -----LSDGSDTDCSIIGAPVSPPDALT--PATQSRKISDSSYFGGIEVEDI FFED-----TVGDEPSEPATC
T. congolense -----VKELKSEQDG--KGAI DVEDFLDFGIEALTGTVSEHKNTTTPRPLISGTQSK-----KKTGVPVTSAPK
L. infantum -----
L. major NSNGSSKPVRRRPKKA--ISAATAATKTAALDLDLDFGFLDALASASAVSAAPKAMTAAFPNSNGGAAR-----STKPTADADD--LLLGLVKAETE
L. braziliensis NHNGSSKPVRRRLRKEATLISATAAATKTAALDLDLDFGFLDALSSASVSAAPKTTVTAASPNSGAAR-----ARKPNADADDLILLGLGKAKAE
          1510     1520     1530     1540     1550     1560     1570

T. rangeli KSPALATKR---APARPO-----KPQVSRKRRKRSRSD--EDSFS--EDDEDEASSGSSSYDFSD
T. cruzi TLAPFPKPKR---SPQRPKSQPKKSGSKRRKRSRSD--EDSFDDEDDDDDEASSGSSSYDFSD
T. brucei_a PTPSRVAKSG--RVKRSKGPSTQAKVPKRRRGGSS--DVSDEENIVDDDDDDDDSDSDFSD
L. infantum INIVRSKES--PVLDSAEAYATEPKSRKRPKRSIKDN--DENTCFYVDVVEDEVEYDSCIGFDACVF
T. congolense APPRSQAQA---PAR-----STGKAPKRRRRRAGSE-----DVSFVDDSEDEDDDDDDSD--SNFSD
L. infantum -----
L. major TAPPAATAASKRATAASRAKPAKPAARRRRHSGSSDSDSDDESDTASASSESSSASSDSDSYDFSD
L. braziliensis ANRPTTANSKRDATAATAPAKPRPKPAARRRRHSGSSDSDSDSDGSDTDESVSPSESSSASSDSDSYDFSD
          1580     1590     1600

```

**Apêndice 3:** Alinhamento das sequências de aminoácidos deduzidas a partir do gene *Top2α* de *Trypanosoma rangeli*, *T. cruzi*, *T. brucei* alfa e beta, *T. congolense*, *Leishmania braziliensis*, *L. infantum* e *L. major*, através do programa CLUSTAL W. As regiões em vermelho representam total identidade e em cinza aminoácidos conservados.

