

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

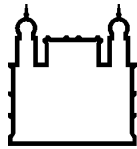
Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Avaliação do metabolismo oxidativo e energético de  
*Strigomonas culicis* e suas implicações na interação com o  
hospedeiro

**ANA CRISTINA SOUZA BOMBAÇA**

Rio de Janeiro

Outubro/2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

#### ***ANA CRISTINA SOUZA BOMBAÇA***

Avaliação do metabolismo oxidativo e energético de *Strigomonas culicis* e suas implicações na interação com o hospedeiro

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

**Orientador (es):** Dr. Rubem Figueiredo Sadok Menna-Barreto  
Dra. Claudia Masini d'Avila Levy

**RIO DE JANEIRO**

Outubro/2016

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

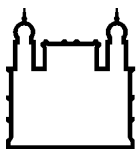
B695 Bombaça, Ana Cristina Souza

Avaliação do metabolismo oxidativo e energético de *Strigomonas culicis* e suas implicações na interação com o hospedeiro / Ana Cristina Souza Bombaça. – Rio de Janeiro, 2016.  
xvii, 119 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2016.  
Bibliografia: f. 93-119

1. *Strigomonas culicis*. 2. ROS. 3. Metabolismo oxidativo. 4. *Aedes aegypti*. I. Título.

CDD 577.857



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**AUTOR: ANA CRISTINA SOUZA BOMBAÇA**

**Avaliação do metabolismo oxidativo e energéticos de *Strigomonas culicis* e suas implicações na interação com o hospedeiro**

**ORIENTADOR (ES): Dr. Rubem Figueiredo Sadok Menna-Barreto  
Dra. Claudia Masini d'Avila Levy**

**Aprovada em: 14/10/2016**

### **EXAMINADORES:**

**Dr. Flávio Alves Lara (IOC/FIOCRUZ) - Presidente**

**Dra. Patricia Maria Lourenço Dutra (DMIP/UERJ)**

**Dra. Maria Cristina Machado Motta (IBCCF/UFRJ)**

**Dr. Eduardo Caio Torres-Santos (IOC/FIOCRUZ) - Suplente**

**Dr. Marcos Henrique Ferreira Sorgine (IBqM/UFRJ) - Suplente/revisor**

Rio de Janeiro, 14 de Outubro de 2016

## AGRADECIMENTOS

À Deus pelas inúmeras vezes que me fez forte nos momentos em que me senti fraca para continuar, obrigada por não me deixar desistir, sempre me mostrando que as coisas poderiam dar certo mesmo nos momentos em que eu não acreditava.

À minha mãe Fátima e à minha irmã Luciana por sempre acreditarem em mim, mesmo nos momentos mais difíceis, me dando apoio e força pra continuar. Eu não teria conseguido nada sem vocês, que fazem o impossível por mim. Amo muito vocês!

Ao meu orientador Rubem por acreditar em mim quando nem eu mesma acreditava e por me permitir participar desse projeto tão maravilhoso. Você foi mais do que um orientador pra mim nesses dois anos e eu serei eternamente grata por todas as conversas, ensinamentos, carinho e amizade. Não estaria aqui se não fosse seu apoio e incentivo.

À minha orientadora Claudia por sempre deixar as portas de seu laboratório abertas pra mim e por estar sempre disposta a me ajudar com suas ideias, mesmo antes de eu ser oficialmente sua aluna. Nossas discussões científicas contribuíram enormemente para a minha formação e para o bom andamento do trabalho.

Aos meus companheiros de mestrado Renan e Marcelle por fazerem tão mais fácil e divertida essa caminhada, não sei o que eu faria sem vocês em todas as disciplinas e seminários. Obrigada pelas risadas, conversas da vida, almoços no Burger King e, principalmente, por me entenderem melhor do que eu mesma. Juliana não precisa ficar com ciúmes! Muito obrigada por alegrar meu dia com seu jeito gracinha de ser, por todas as risadas e por toda ajuda. Ainda vamos fazer muitas fofquinhas no fluxo.

À todos os membros da sala 70 pelas trocas científicas, conversas e amizade, dentro e fora do laboratório. Um obrigada especial à Kelly e à Sol, por todo os ensinamentos, disponibilidade e carinho, vocês foram essenciais na minha formação.

À todos os membros do Laboratório de Biologia Celular, em especial à Dra. Maria de Nazaré Soeiro, por abrir as portas de seu laboratório e permitir o desenvolvimento desse projeto.

Ao Vitor pelo auxílio com os experimentos de PCR tempo real e por ter tanta paciência comigo, muito obrigada por sempre estar disponível para me ajudar e

discutir tantos protocolos comigo.

Aos membros do Laboratório de Estudos Integrados em Protozoologia e à Coleção de Protozoários da Fiocruz, especialmente Sheila, Bianca e Rhagner, por me receberem tão bem em seu laboratório e sempre me auxiliarem quando precisei. Muitos dos experimentos não teriam ocorrido sem a ajuda de vocês.

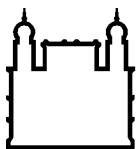
À Dra. Aline Garcia pelas discussões científicas e pela ajuda para a escolha e padronização dos alvos do PCR tempo real.

À todos os membros do Laboratório de Bioquímica de Insetos Hematófagos – UFRJ por me receberem tão bem e por estarem sempre tão disponíveis a ajudar. Um obrigada especial ao Dr. Marcos Henrique Ferreira Sorgine e ao Dr. Felipe Dias por não desistirem de mim, sempre insistindo e me ajudando a completar um dos experimentos mais importantes e difíceis do meu mestrado. Vocês foram incríveis e eu sou muito grata por todos os ensinamentos que vocês me passaram nesses dois anos.

À todos os membros do Laboratório de Bioquímica de Resposta ao Estresse – UFRJ por me receberem em seu laboratório e por me auxiliarem quando foi preciso.

Ao Dr. Marcos Henrique Ferreira Sorgine por aceitar ser o revisor dessa dissertação, contribuindo mais uma vez com esse trabalho.

**“Toda a nossa ciência,  
comparada com a realidade,  
é primitiva e infantil – e, no entanto,  
é a coisa mais preciosa que temos”.**  
**(Albert Einstein)**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Avaliação do metabolismo oxidativo e energéticos de *Strigomonas culicis* e suas implicações na interação com o hospedeiro

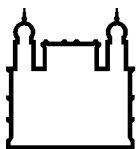
### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Ana Cristina Souza Bombaça**

*Strigomonas culicis* é um protozoário monoxênico encontrado no intestino médio de vários mosquitos, apresentando um ciclo de vida restrito à forma epimastigota. Dentre as suas peculiaridades, existe a presença de uma bactéria endossimbiótica, cujo papel biológico envolve a captação de heme e ferro para o protozoário, moléculas envolvidas no metabolismo energético e oxidativo. Apesar da colonização do intestino de insetos hematófagos, ambiente rico em espécies reativas de oxigênio, uma avaliação detalhada dos mecanismos antioxidantes desses protozoários ainda não foi realizada. Neste trabalho, avaliamos o metabolismo oxidativo e energético de *S. culicis* comparando três diferentes cepas: selvagem (WT), apossimbiótica (Apo) e selvagem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-resistente (WTR). Apo foi mais susceptível ao estresse oxidativo, apresentando uma maior captação de glicose e fosforilação oxidativa reduzida, além de apresentar atividade antioxidante menos eficiente e expressão gênica aumentada de três isoformas da triparedoxina. Por outro lado, WT apresentou maior resistência ao estresse oxidativo, especialmente a altos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, além de uma dependência maior da mitocôndria para a obtenção de energia. WTR apresentou uma maior resistência ao desafio oxidativo e maior dependência da fosforilação oxidativa, demonstrado através do maior consumo de oxigênio e do potencial de membrana mitocondrial, do aumento da atividade dos complexos II-III e IV além da alta produção de ATP, sendo ainda observado um aumento da expressão gênica do complexo II. Esta cepa ainda produziu níveis reduzidos de ROS e de peroxidação lipídica em relação às demais, com o aumento na expressão gênica de uma das isoformas de triparedoxina. Apesar das alterações fisiológicas, não foram encontradas alterações ultraestruturais na WTR, inclusive na mitocôndria. A indução de resistência também levou a uma maior colonização do intestino médio de *Aedes aegypti* *ex vivo* e *in vivo*, o que reforça a hipótese de que o ambiente pro-oxidante no intestino do mosquito regula a população de *S. culicis*, dado corroborado pelo aumento da colonização do intestino pelas três cepas do protozoário após a alimentação de *A. aegypti* com ascorbato *ad libitum*. WTR ainda apresentou um aumento na adesão a macrófagos peritoneais murinos, demonstrando a influência da resistência ao estresse oxidativo também na interação com células de mamíferos. Desta forma, as estratégias metabólicas e antioxidantes de *S. culicis* começaram a ser descritas bem como o papel do endossimbionte no processo, o que contribui para a compreensão dos mecanismos de resistência e persistência do protozoário em mamíferos, incluindo o homem.





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Evaluation of oxidative and energy metabolism of *Strigomonas culicis* and its implications during protozoa-host interactions

### ABSTRACT

### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Ana Cristina Souza Bombaça

*Strigomonas culicis* is a monoxenic protozoan found in the midgut of several mosquitoes, presenting a life cycle restricted to the epimastigote form. Among its peculiarities, there is the presence of an endosymbiotic bacterium, which biological role involves the supply of heme and iron, key molecules in energy and oxidative metabolisms. Despite the colonization of hematophagous insects' midgut, a reactive oxygen species (ROS)-enriched environment, a detailed evaluation of this protozoa antioxidant mechanisms was not performed yet. In this work, we analyzed *S. culicis* oxidative and energy metabolisms, comparing three different strains: wild type (WT), aposymbiotic (Apo) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-resistant wild type (WTR). Apo was more susceptible to oxidative stress, being more glycolysis-dependent, with higher glucose uptake and impaired oxidative phosphorylation, as well as the presence of less efficient antioxidant pool and an increased gene expression of three isoforms of trypanothione. WT showed higher resistance to oxidative stress, especially H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels, suggesting a mitochondrial dependence. WTR showed a greater resistance to the oxidative challenge and more dependence on oxidative phosphorylation, demonstrating higher oxygen consumption and mitochondrial membrane potential, an increase in complexes II-III and IV activities and high ATP production, with increased complex II gene expression. Furthermore, this strain produces reduced ROS levels and shows lower lipid peroxidation and an increase in gene expression of trypanothione isoform. Despite physiological changes, no ultrastructural alterations were detected in WTR, even in the mitochondrion. The resistance induction also led to a greater colonization of *Aedes aegypti* midgut *ex vivo* and *in vivo*, reinforcing the hypothesis that the prooxidant environment in the mosquito gut regulates *S. culicis* population, data reinforced by the increase in the three strains gut colonization after *A. aegypti* feeding with ascorbate *ad libitum*. WTR showed an increase in the adhesion to murine peritoneal macrophages, demonstrating the influence of the oxidative stress resistance also in the interaction with mammalian cells. Thus, *S. culicis* metabolic and antioxidant strategies are starting to be described as well as the role of endosymbiotic bacterium in this process, contributing for the comprehension of the protozoa resistance and persistence mechanisms in mammals, including the man.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. Família Trypanosomatidae .....	2
1.1.1. <i>Ultraestrutura e biologia celular</i> .....	2
1.1.2. <i>Trypanosomatídeos dixênicos x monoxênicos</i> .....	5
1.1.3. <i>Infecções acidentais por tripanosomatídeos monoxênicos</i> .....	8
1.1.4. <i>Trypanosomatídeos que albergam endossimbiontes (TAEs)</i> .....	10
1.1.4.1. <i>Aspectos morfológicos</i> .....	11
1.1.4.2. <i>Aspectos bioquímicos</i> .....	13
1.1.4.3. <i>S. culicis</i> .....	15
1.2. Estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio (ROS) .....	18
1.2.1. <i>A mitocôndria e seu papel na geração de ROS</i> .....	19
1.2.2. <i>Moléculas pró-oxidantes</i> .....	23
1.3. Geração de ROS no hospedeiro invertebrado .....	23
1.3.1. <i>Produção de espécies reativas no intestino do inseto</i> .....	24
1.3.2. <i>A hematofagia e o papel pró-oxidante do heme</i> .....	26
1.4. Mecanismos antioxidantes de tripanosomatídeos .....	28
1.4.1. <i>Tripanotiona</i> .....	29
1.4.2. <i>Peroxidasas</i> .....	31
1.4.3. <i>SOD</i> .....	32
1.5. Justificativa .....	33
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
2.1. Objetivo geral .....	35
2.2. Objetivos específicos .....	35
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
3.1. Reagentes .....	37
3.2. Manutenção das cepas de <i>S. culicis</i> e indução de resistência a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	37
3.3. Análise do efeito direto dos inibidores e antioxidantes nas cepas de <i>S. culicis</i> .....	37
3.4. Análise por MET das cepas de <i>S. culicis</i> .....	38
3.5. Análise do consumo de O <sub>2</sub> por oxigrafia de alta resolução das cepas de <i>S. culicis</i> .....	38
3.6. Análise das atividades das enzimas mitocondriais das cepas de <i>S. culicis</i> .....	39

3.7. Análise da produção de ATP nas cepas de <i>S. culicis</i> .....	40
3.8. Análise do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) nas cepas de <i>S. culicis</i> .....	40
3.9. Análise da captação de glicose nas cepas de <i>S. culicis</i> .....	41
3.10. Análise da resposta de <i>S. culicis</i> aos antioxidantes .....	41
3.11. Análise da produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> nas cepas de <i>S. culicis</i> .....	41
3.12. Análise da peroxidação lipídica nas cepas de <i>S. culicis</i> .....	42
3.13. Análise da expressão de genes do metabolismo energético e oxidativo nas cepas de <i>S. culicis</i> .....	43
3.14. Análise da adesão <i>ex vivo</i> ao intestino de <i>A. aegypti</i> pelas cepas de <i>S. culicis</i> .....	44
3.15. Análise da infecção <i>in vivo</i> em <i>A. aegypti</i> pelas cepas de <i>S. culicis</i> .....	44
3.16. Análise da infecção <i>in vitro</i> de macrófagos peritoneais pelas cepas de <i>S. culicis</i> .....	45
3.17. Análises estatísticas .....	46
3.18. Aspectos éticos .....	46
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>47</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>76</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>91</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>93</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Representação esquemática da forma epimastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	2
Figura 1.2: Via de biossíntese do heme em TAEs .....	14
Figura 1.3: Vias metabólicas relacionadas ao tripanosomatídeo e ao endossimbionte .....	15
Figura 1.4: Ultraestrutura de <i>S. culicis</i> .....	16
Figura 1.5: Representação esquemática da fisiologia e produção de ROS na mitocôndria de tripanosomatídeos .....	24
Figura 1.6: Mecanismos pró-oxidantes do heme e ferro .....	27
Figura 4.1: Efeito dos inibidores da glicólise sobre as cepas WT e Apo de <i>S. culicis</i> ..	49
Figura 4.2: Efeito dos pró-oxidantes sobre as cepas WT e WTR de <i>S. culicis</i> .....	51
Figura 4.3: Efeito dos inibidores da CTE e da glicólise sobre as cepas WT e WTR de <i>S. culicis</i> .....	52
Figura 4.4: Análise por MET da cepa WT de <i>S. culicis</i> .....	53
Figura 4.5: Análise por MET da cepa Apo de <i>S. culicis</i> .....	54
Figura 4.6: Análise por MET da cepa WTR de <i>S. culicis</i> .....	55
Figura 4.7: Análise do consumo de O <sub>2</sub> nas cepas de <i>S. culicis</i> , nas condições de rotina e após a adição de AA .....	56
Figura 4.8: Análise da atividade das enzimas mitocondriais nas cepas WT, WTR e Apo de <i>S. culicis</i> .....	57
Figura 4.9: Análise da produção de ATP nas cepas WT, WTR e Apo de <i>S. culicis</i> .....	58
Figura 4.10: Análise do percentual de protozoários de <i>S. culicis</i> 2-NBDG+ nas temperaturas de 28°C e 4°C .....	60
Figura 4.11: Análise do consumo de O <sub>2</sub> nas cepas de <i>S. culicis</i> , nas condições de rotina e após a adição de AA .....	61
Figura 4.12: Efeito do pré-tratamento com antioxidantes e subsequente desafio com os pró-oxidantes na cepa WT de <i>S. culicis</i> .....	63
Figura 4.13: Efeito do pré-tratamento com antioxidantes e subsequente desafio com os pró-oxidantes na cepa WTR de <i>S. culicis</i> .....	64
Figura 4.14: Efeito do pré-tratamento com antioxidantes e subsequente desafio com os pró-oxidantes na cepa WTR de <i>S. culicis</i> .....	65
Figura 4.15: Efeito do pré-tratamento com antioxidantes e subsequente desafio com os pró-oxidantes na cepa Apo de <i>S. culicis</i> .....	66

Figura 4.16: Análise da produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> nas cepas WT, WTR e Apo de <i>S. culicis</i> após o pré-tratamento com os antioxidantes, seguido do desafio com AA .....	68
Figura 4.17: Análise da produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> nas cepas WT, WTR e Apo de <i>S. culicis</i> após o pré-tratamento com os antioxidantes, seguido do desafio com AA .....	69
Figura 4.18: Análise da peroxidação lipídica nas cepas WT, WTR e Apo de <i>S. culicis</i> .....	69
Figura 4.19: Curvas de <i>melting</i> dos iniciadores sintetizados para a avaliação da expressão gênica de <i>S. culicis</i> .....	70
Figura 4.20: Análise da expressão gênica nas cepas WTR e Apo de <i>S. culicis</i> .....	71
Figura 4.21: Análise da adesão <i>ex vivo</i> das cepas WT, WTR e Apo de <i>S. culicis</i> em intestinos de <i>A. aegypti</i> .....	72
Figura 4.22: Análise da infecção <i>in vivo</i> das cepas de <i>S. culicis</i> em <i>A. aegypti</i> .....	74
Figura 4.23: Curvas sobrevivência de <i>A. aegypti</i> infectados com as cepas WT, WTR e Apo de <i>S. culicis</i> .....	75
Figura 4.24: Análise da interação das cepas WT, WTR e Apo de <i>S. culicis</i> com macrófagos peritoneais .....	75
Figura 6.1: Esquema mostrando as conclusões obtidas pelo trabalho .....	92

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Sequências dos iniciadores <i>forward</i> e <i>reverse</i> dos alvos selecionados em <i>S. culicis</i> .....	43
Tabela 4.1: Efeito dos agentes pró-oxidantes (IC <sub>50</sub> /2h) sobre as cepas WT e Apo de <i>S. culicis</i> (μM) .....	48
Tabela 4.2: Efeito dos inibidores da CTE (IC <sub>50</sub> /2h) sobre as cepas WT e Apo de <i>S. culicis</i> (μM) .....	49
Tabela 4.3: Análise do ΔΨ <sub>m</sub> das cepas de <i>S. culicis</i> a partir da marcação com Rod 123 .....	58
Tabela 4.4: Análise da captação de glicose pelas cepas de <i>S. culicis</i> a partir da marcação com 2-NBDG .....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>2-NBDG</b>	2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amino]-2-deoxi-d-glicose (análogo de glicose fluorescente)
<b>2-cis-PRX</b>	2-cis-peroxiredoxinas
<b>2-DOG</b>	2-desoxi-D-glicose
<b>AA</b>	Antimicina A
<b><i>ad libitum</i></b>	Expressão latina que significa "à vontade", "a bel-prazer".
<b>ADP</b>	Adenosina difosfato
<b>ALAD</b>	Ácido aminolevulínico deaminase
<b>AOX</b>	Oxidase alternativa
<b>Apo</b>	Cepa apossimbiótica de <i>S. culicis</i>
<b>APx</b>	Ascorbato peroxidase
<b>Asc</b>	Ascorbato
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética em Experimentação Animal
<b>cit C</b>	Citocromo C
<b>CoA</b>	Coenzima A
<b>COBEA</b>	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
<b>CPOX</b>	Coproporfirinogênio III oxidase
<b>CTE</b>	Cadeia transportadora de elétrons
<b>CVC</b>	Complexo do vacúolo contrátil
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DTNB</b>	Ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)
<b>DUOX</b>	Dual oxidase
<b>EIM</b>	Espaço intermembranar
<b>FAD</b>	Flavina adenina dinucleotídeo
<b>FADH<sub>2</sub></b>	Flavina adenina dinucleotídeo reduzida
<b>FAZ</b>	Zonas de adesão flagelar
<b>FCCP</b>	Carbonil cianeto 4-(trifluorometoxi)fenilhidrazona
<b>FeSO<sub>4</sub></b>	Sulfato ferroso
<b>Gltx</b>	Glutamil-tRNA sintetase
<b>Gp63</b>	Glicoproteína de 63 KDa
<b>gRNA</b>	RNAs guias

<b>GSA</b>	Glutamato-1-semialdeído 2,1-aminomutase
<b>GSH</b>	Glutationa
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>hemA</b>	Glutamil-tRNA redutase
<b>hemN</b>	Coproporfirinogênio III oxidase independente de oxigênio
<b>HO</b>	Heme oxigenase
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração dos compostos que causam 50% de lise nos protozoários.
<b>IV</b>	Índice de variação utilizado para o calculo para representação das citometrias.
<b>KCN</b>	Cianeto de potássio
<b>KDNA</b>	DNA mitocondrial de kinetoplastidas
<b>LIT</b>	Meio de cultivo de infusão de fígado e triptose
<b>MET</b>	Microscopia eletrônica de transmissão
<b>MMI</b>	Membrana mitocondrial interna
<b>MOI</b>	Índice multiplicidade de infecção
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>NAC</b>	N-acetilcisteína
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
<b>NO<sup>-</sup></b>	Óxido nítrico
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintase
<b>NOX</b>	Família NADPH oxidases (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 e DUOX2)
<b>nsGPx</b>	Glutationa peroxidase independente de selenocisteína
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Radical superóxido
<b>OH<sup>-</sup></b>	Radical hidroxila
<b>PBGD</b>	Porfobilinogênio deaminase
<b>PBS</b>	Tampão fosfato de sódio
<b>PCR</b>	Reação em cadeia de polimerase
<b>Pi</b>	Fosfato inorgânico
<b>PPOX</b>	Protoporfirinogênio oxidase
<b>R<sup>-</sup></b>	Radicais alquil
<b>rDNA</b>	DNA ribossomal



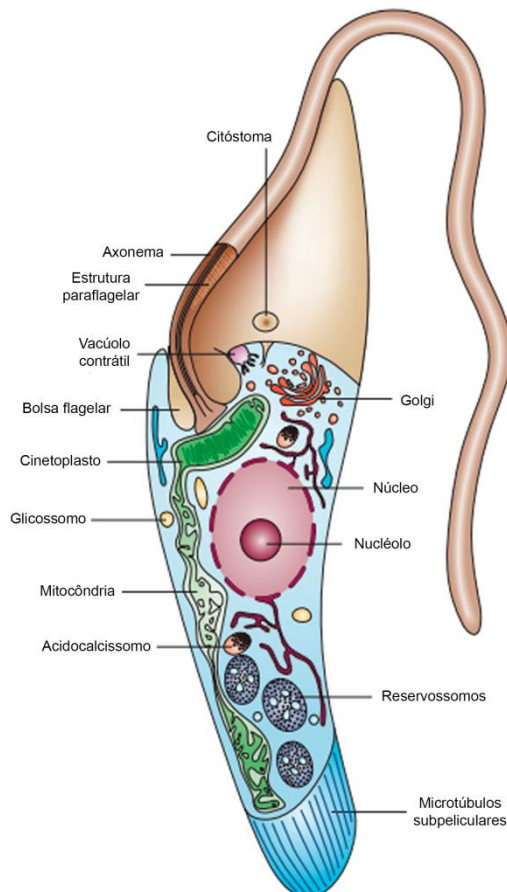
<b>RH</b>	Ácidos graxos insaturados
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNS</b>	Espécies reativas de nitrogênio
<b>RO<sup>-</sup></b>	Radicais alcoxil
<b>Rod 123</b>	Rodamina 123
<b>ROO<sup>-</sup></b>	Radicais peroxil
<b>ROOH</b>	Hidroperóxidos
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>rRNA</b>	RNAs ribossomal
<b>RS<sup>-</sup></b>	Radicais tiil
<b>RSOH</b>	Ácidos sulfênicos
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>SHAM</b>	Ácido salicilhidroxâmico
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>Spd</b>	Espermidina
<b>T(SH)<sub>2</sub></b>	Dihidrotriptanotiona (forma reduzida da tripanotiona)
<b>TAEs</b>	Tripanosomatídeos que albergam endossimbiontes
<b>TBA</b>	Ácido tiobarbitúrico
<b>TR</b>	Tripanotiona redutase
<b>Tripanotiona</b>	N <sub>1</sub> -N <sub>8</sub> -bis(glutationil)espermidina
<b>TS<sub>2</sub></b>	Tripanotiona dissulfeto (forma oxidada da tripanotiona).
<b>TXN</b>	Triparedoxina
<b>TXNPx</b>	Triparedoxina peroxidase
<b>UQ</b>	Ubiquinona
<b>UQ<sup>-</sup></b>	Ubiquinona no estado parcialmente reduzido (semiquinona)
<b>UQH<sub>2</sub></b>	Ubiquinona no estado totalmente reduzido
<b>UROD</b>	Uroporfirinogênio III descarboxilase
<b>UROS</b>	Uroporfirinogênio III sintase
<b>WT</b>	Cepa selvagem de <i>S. culicis</i>
<b>WTR</b>	Cepa selvagem H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -resistente (1 mM) de <i>S. culicis</i>
<b>WTR<sup>+</sup></b>	Cepa selvagem H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -resistente (1,5 mM) de <i>S. culicis</i>
<b>ΔΨ<sub>m</sub></b>	Potencial de membrana mitocondrial

## **1. INTRODUÇÃO**

## 1.1. Família Trypanosomatidae

### 1.1.1. Ultraestrutura e biologia celular

Os protozoários pertencentes à família Trypanosomatidae (Euglenozoa: Kinetoplastea) representam um diverso e importante grupo de organismos, possuindo uma estrutura típica, o cinetoplasto, que dá nome ao grupo. Em linhas gerais, tripanosomatídeos possuem organelas que são comuns a maioria dos organismos eucariotos, como a mitocôndria, Golgi, retículo endoplasmático e outras. Entretanto, várias organelas presentes nesses protozoários são únicas da família e serão discutidas a seguir (**Figura 1.1**).



**Figura 1.1:** Representação esquemática da forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi* (Adaptado de Docampo *et al.*, 2005).

No cinetoplasto encontra-se o material genético mitocondrial (kDNA) organizado em uma estrutura em forma de disco, posicionada na matriz mitocondrial, próxima ao corpúsculo basal e o flagelo. Esta rede de kDNA é formada

por duas estruturas distintas: maxicirculos e minicirculos. Nos maxicirculos, assim como no DNA mitocondrial de eucariotos superiores, se encontram genes que codificam algumas subunidades dos complexos mitocondriais e RNAs ribossomais (rRNA). Já nos minicirculos, são codificados RNAs guias (gRNA), responsáveis pela edição dos RNAs. Desta forma, a transcrição do kDNA é cooperativa, dependendo dos maxicirculos e minicirculos (De Souza *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2005).

Além da presença característica do cinetoplasto, os tripanosomatídeos possuem uma mitocôndria única e ramificada apresentando cristas escassas, próxima aos microtúbulos subpeliculares e distribuída ao longo de todo corpo celular, diferente do encontrado em mamíferos. Dependendo da espécie de tripanosomatídeo e dos nutrientes disponíveis, a mitocôndria pode representar mais de 12% do volume celular (De Souza *et al.*, 2009; Fidalgo e Gille, 2011). Uma vez que essa organela é um dos principais objetos de estudo desse trabalho, iremos discutir seu metabolismo mais a fundo nos próximos tópicos.

Os glicossomos são organelas semelhantes a peroxissomos em outros eucariotos, sendo caracterizados por conter a maioria das enzimas da via glicolítica compartimentalizadas: da hexokinase até a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase ou fosfoglicerato kinase (primeiras 6 ou 7 enzimas da via), dependendo do tripanosomatídeo. Já as demais enzimas da via: da fosfoglicerato mutase até a piruvato kinase, são encontradas no citoplasma, assim como ocorre nos mamíferos (Haanstra *et al.*, 2014). Apesar de não serem considerados peroxissomos típicos, uma vez que essa organela, em outros eucariotos, não possui as enzimas da via glicolítica e possui enzimas antioxidantes, como é o caso da catalase, os glicossomos são considerados semelhantes aos peroxissomos por terem a biogênese dependente de peroxinas. As peroxinas presentes em tripanosomatídeos apresentam baixa similaridade com as encontradas em outros eucariotos, entretanto suas funções são similares, sendo responsáveis pela importação do conteúdo dos glicossomos (Haanstra *et al.*, 2016).

A compartimentalização de uma parte do metabolismo glicolítico nessas organelas gera um importante fluxo de substratos, produtos e intermediários metabólicos através da membrana glicossomal. Assim como nos peroxissomos, a membrana do glicossomo contém moléculas que formam poros membranares que permitem a passagem de compostos pequenos, como metabolitos. As moléculas maiores, tais como co-fatores, ATP e ADP necessitam de transportadores específicos (Quiñones *et al.*, 2015; Haanstra *et al.*, 2016). Apesar do conhecimento

sobre o metabolismo do glicosomo, muito ainda se discute sobre as vantagens da compartimentalização da via glicolítica nessas organelas. Dentre as hipóteses mais aceitas, se acredita que a compartimentalização regula a atividade de enzimas glicolíticas, tais como a hexokinase e a fosfofrutokinase (Bakker *et al.*, 2000), além de fornecer uma maior flexibilidade metabólica para os protozoários, aumentando a capacidade adaptativa dos protozoários a diferentes condições ambientais (Szöör *et al.*, 2014).

Os acidocalcissomos foram primeiramente descritos em tripanosomatídeos e são organelas ácidas densas com uma alta concentração de fósforo, na forma de pirofosfato e polifosfato, complexados com moléculas de cálcio e outros íons (Docampo e Moreno, 1999). Inicialmente, acreditava-se que era uma estrutura típica de tripanosomatídeos, entretanto, já foi encontrada em diversos organismos, com sua morfologia variando de acordo com a espécie e com o meio de cultivo. Em tripanosomatídeos, normalmente são encontrados como estruturas esféricas distribuídas por todo corpo celular, mas preferencialmente localizadas na porção central ou próximos a bolsa flagelar. O número de acidocalcissomos também irá variar de acordo com a espécie e forma evolutiva (Docampo *et al.*, 2005).

Uma das funções do acidocalcissomo é a osmoregulação. Esta função é essencial para a adaptação das espécies de tripanosomatídeos aos diferentes hospedeiros. Para que essa função ocorra, é necessária a participação do complexo do vacúolo contrátil (CVC), uma organela característica de tripanosomatídeos. Esse complexo é formado por dois compartimentos: uma rede de túbulos e vesículas chamada espongioma e um vacúolo maior, conhecido como vacúolo central e que se encontra próximo à bolsa flagelar. Acredita-se que, em situações de estresse hiperosmótico, ocorra a fusão do vacúolo central com o acidocalcissomo, liberando seu conteúdo, o que aumentaria a pressão osmótica no vacúolo, levando a um aumento na captação de água ( $H_2O$ ) proveniente do citoplasma e do espongioma. Uma vez completada esta etapa, o vacúolo central se funde à bolsa flagelar, excretando a  $H_2O$  em excesso e possivelmente outros componentes como íons e polifosfato no meio extracelular (Do campo *et al.*, 2005; Lander *et al.*, 2016).

Um dos aspectos característicos dos protozoários da família Trypanosomatidae é a presença de microtúbulos localizados abaixo da membrana plasmática, denominados microtúbulos subpeliculares. Estudos demonstraram que esses microtúbulos estão ligados uns aos outros e a membrana plasmática por filamentos curtos, sendo essa associação responsável pela resistência da

membrana de tripanosomatídeos. Seções transversais da membrana desses protozoários mostraram que os microtúbulos estão espaçados regularmente e que eles são formados por 13 protofilamentos (De Souza, 2002; Rodrigues *et al.*, 2014).

Outra característica importante destes protozoários é a presença de um flagelo único. Esta estrutura está intimamente relacionada com a motilidade celular, entretanto, apresenta outras funções, como a adesão dos protozoários ao epitélio de seus hospedeiros, tanto vertebrados quanto invertebrados (Landfear e Ignatushchenko, 2001). O flagelo é formado por um feixe de microtúbulos, denominado axonema, formado por nove pares de microtúbulos periféricos e um par central, além de proteínas associadas, ambos envolvidos por uma membrana flagelar (De Souza *et al.*, 2011). Dentro do flagelo, próximo ao axonema, existe uma rede de filamentos chamada de estrutura paraflagelar, composta por filamentos de diferentes espessuras conectados ao axonema, cuja função vem sendo associada a motilidade dos protozoários (Gull, 1999). A depender da forma evolutiva do tripanosomatídeo, as zonas de adesão flagelar (FAZ) variam de extensão, sendo regiões estas nas quais o flagelo encontra-se aderido a membrana plasmática do corpo celular através de proteínas transmembrana (Ruiz-Moreno *et al.*, 1995).

O flagelo emerge de uma depressão da membrana plasmática denominada bolsa flagelar, que pode se localizar nas regiões anterior, medial ou posterior da célula. Esta região é altamente especializada, uma vez que sua membrana é rica em proteínas transmembranares, sendo a única em que não há a presença de microtúbulos subpeliculares, e por onde ocorre a atividade endocítica (De Souza *et al.*, 2009). A rigidez da membrana de tripanosomatídeos, causada pela presença dos microtúbulos subpeliculares, impede que a endocitose ocorra em todo corpo celular do protozoário (De Souza, 2002). Vale ressaltar que a atividade endocítica varia entre as espécies e formas evolutivas, ficando restrita a região da bolsa flagelar na maioria dos tripanosomatídeos.

### **1.1.2. Tripanosomatídeos heteroxênicos x monoxênicos**

Os tripanosomatídeos apresentam grande diversidade, sendo divididos em dois grandes grupos de acordo com seus ciclos de vida. Os protozoários heteroxênicos habitam dois hospedeiros, podendo ser invertebrados, vertebrados (incluindo o homem) e plantas. Um desses hospedeiros, usualmente o invertebrado,

é o vetor, que irá transmitir os protozoários para os outros hospedeiros. Já os monoxênicos habitam apenas um hospedeiro, estando restritos aos invertebrados (Votýpka *et al.*, 2015). Acredita-se que as espécies dixênicas surgiram a partir de ancestrais monoxênicos, entretanto, a forma como este processo ocorreu ainda é bastante discutida (Lukeš *et al.*, 2014). Os tripanosomatídeos heteroxênicos são representados pelos gêneros *Trypanosoma*, *Leishmania* e *Phytomonas*, sendo patogênicos para seus hospedeiros e transmitidos por invertebrados, possuindo grande importância médica e socioeconômica (d'Avila-Levy *et al.*, 2015).

Dentre as espécies do gênero *Trypanosoma*, encontramos o *T. cruzi* e o *Trypanosoma brucei*, agentes etiológicos das doenças de Chagas e do sono, respectivamente. A doença de Chagas é endêmica na América Latina, afetando milhões de pessoas, sendo recentemente observado um aumento no número de casos em áreas não-endêmicas devido a imigração de indivíduos infectados (Schmunis e Yadon, 2010). Já a doença do sono é endêmica no continente Africano e, sem o tratamento adequado, pode ser fatal, com o parasito causando danos ao sistema nervoso central do hospedeiro (Stoppini *et al.*, 2000). Diversas espécies do gênero *Leishmania* são capazes de causar a leishmaniose, sendo endêmicas em áreas tropicais e sub-tropicais (Akhoundi *et al.*, 2016). A leishmaniose pode apresentar diversas manifestações clínicas, sendo divididas em viscerais, cutâneas, mucosas e disseminadas, dependendo da espécie que irá causar a infecção e de aspectos fisiológicos do hospedeiro vertebrado (Desjeux, 2004). Diferentemente das espécies citadas até agora, que irão causar danos a mamíferos, as espécies do gênero *Phytomonas* são patogênicas apenas para algumas espécies de plantas (Jaskowska *et al.*, 2015).

A primeira espécie de tripanosomatídeo monoxênico foi documentada em 1851 por Burnett (Burnett, 1851) e, apenas 30 anos depois, esta espécie foi classificada por Kent no gênero *Herpetomonas* (Kent, 1880), embora atualmente esse gênero compreenda espécies diferentes (Maslov *et al.*, 2013). Após esse período houve uma explosão de publicações descrevendo novas espécies de tripanosomatídeos em insetos e, em 1990, foi publicado o primeiro catálogo de espécies de tripanosomatídeos, listando 350 espécies de monoxênicos (Podlipaev, 1990). Atualmente os tripanosomatídeos exclusivos de insetos formam a maior parte da família Trypanosomatidae, com o número de espécies descritas se aproximando de 400 (Maslov *et al.*, 2013) e sendo divididas em 16 gêneros: *Leptomonas*, *Crithidia*, *Lotmaria*, *Strigomonas*, *Angomonas*, *Kentomonas*, *Blechomonas*,

*Herpetomonas*, *Sergeia*, *Blastocrithidia*, *Wallacemonas*, *Rhynchoidomonas*, *Lafontella*, *Novymonas*, *Jaenimonas* e *Paratrypanosoma* (Wallace, 1966; Svobodová *et al.*, 2007; Jirků *et al.*, 2012; Borghesan *et al.*, 2013; Votýpka *et al.*, 2013; Kostygov *et al.*, 2014; Votýpka *et al.*, 2014; Schwarz *et al.*, 2015; Votýpka *et al.*, 2015; d'Avila-Levy *et al.* 2015; Hamilton *et al.*, 2015; Yurchenko *et al.*, 2015; Kostygov *et al.*, 2016).

Os tripanosomatídeos monoxênicos colonizam diversas espécies de insetos, entretanto sua distribuição não é uniforme, com as ordens Hemiptera e Diptera sendo as hospedeiras de 80% delas (Wallace, 1966), ocorrendo sua transmissão entre os hospedeiros invertebrados exclusivamente pela ingestão. Hábitos de coprofagia e necrofagia, bem como predação, são comuns nesses grupos de insetos e contribuem para a transmissão dos protozoários (Teixeira *et al.*, 2011; Maslov *et al.*, 2013). Estes tripanosomatídeos desenvolvem-se em diversos órgãos dos insetos e, na maioria dos casos, não são patogênicos para seus hospedeiros, havendo algumas exceções, como é o caso da *Blastocrithidia triatoma* (Podlipaev, 2001; Schaub, 1990). Infecções com *B. triatoma* causam retardo do desenvolvimento e aumento da taxa de mortalidade da ninfa do inseto, além da diminuição da expectativa de vida e taxa de reprodução de adultos do *Triatoma infestans*, seu hospedeiro. Além disso, co-infecções de *B. triatoma* e *T. cruzi* diminuem a replicação do protozoário patogênico devido a uma competição por locais de adesão ao intestino do vetor (Schaub, 1990).

Apesar do *Trypanosoma rangeli* ser um protozoário heteroxênico, ele é considerado inofensivo para o hospedeiro vertebrado, sendo patogênico apenas para o hospedeiro invertebrado. O *Rhodnius prolixus* é o principal hospedeiro invertebrado de *T. rangeli*, sendo esse protozoário encontrado, durante seu ciclo de vida, em diferentes regiões do inseto vetor: intestino, hemolinfa e glândula salivar (Garcia *et al.*, 2012). A infecção de *T. rangeli* em *R. prolixus* leva ao aumento na mortalidade do inseto, uma vez que durante a infecção o protozoário causa lesões mecânicas durante a penetração nas células, levando a perda do citoplasma das células epiteliais do intestino e também do músculo das glândulas salivares. Além disso, tem sido relatado que as glândulas salivares infectadas apresentam uma redução na atividade de enzimas e do óxido nítrico que compõe a saliva e ajudam o inseto a encontrar o vaso sanguíneo durante a fase de sondagem para iniciar a alimentação no vertebrado. Isso leva a uma maior dificuldade de alimentação para o inseto, já tendo sido mostrado que os triatomíneos infectados perfuram mais a pele



do vertebrado, entretanto com menor sucesso na extração de sangue (Garcia *et al.*, 1994, Azambuja e Garcia, 2005).

Estes achados ressaltaram a importância dos estudos com tripanosomatídeos monoxênicos atuando como parasitos de insetos e apresentando potencial para estratégias de controle biológico de vetores (Correa-Da-Silva *et al.*, 2006).

### **1.1.3. Infecções oportunistas por tripanosomatídeos monoxênicos**

Embora tripanosomatídeos monoxênicos sejam usualmente encontrados apenas em insetos e não sejam considerados capazes de causar doenças em vertebrados (Wallace, 1966), recentemente a hipótese de que monoxênicos podem explorar novos nichos, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, vem sendo confirmada. Esta hipótese surgiu da observação de alguns casos de infecções oportunistas em pacientes HIV-positivos causadas por protozoários monoxênicos (Dedet *et al.*, 1995; Jimenez *et al.*, 1996; Pacheco *et al.*, 1998; Chicarro *et al.*, 2003; Morio *et al.*, 2008). Essas infecções foram causadas por diferentes espécies de tripanosomatídeos monoxênicos e em todos os casos, os pacientes apresentaram lesões similares às encontradas na leishmaniose cutânea ou visceral (Dedet e Pratlong, 2000; Morio *et al.*, 2008).

Uma dessas infecções aconteceu no Brasil, no Estado do Rio de Janeiro, onde um indivíduo foi admitido no hospital com sintomas pouco específicos. Uma vez que testes de hepatite e sífilis foram realizados e apresentaram resultados negativos, testes para outras infecções foram feitos. Tendo em vista que o paciente morava em área endêmica para leishmaniose cutânea, foram realizados exames para a identificação do parasito, mesmo o paciente não apresentando nenhuma lesão. A partir dos resultados dos testes acreditou-se que houve uma visceralização da leishmaniose, o que explicaria a ausência de lesões cutâneas características da espécie endêmica na região. O tratamento padrão com antimoniato de N-metil-glucamina (Glucantime®) (20 mg/kg por dia) foi aplicado, havendo reversão da infecção e não-recorrência por um período de 2 anos. Estudos posteriores realizados com amostras do paciente demonstraram que o parasito presente no tecido era *Leptomonas pulexsimulantis*, um tripanosomatídeo monoxênico usualmente encontrado em pulgas caninas da espécie *Pulex simulans*, diferentemente do que se acreditava inicialmente (Pacheco *et al.*, 1998).

Posteriormente, esta espécie foi realocada em novo gênero *Blechomonas pullexsimulantis* (Votýpka *et al.*, 2013).

A imunodeficiência resultante da infecção pelo HIV permite a ocorrência de infecções oportunistas causadas por diversos organismos. Uma vez que durante os estágios avançados da infecção pelo HIV há um enorme déficit na resposta imune do hospedeiro, a infecção por organismos geralmente considerados não-patogênicos se torna possível. Atualmente, os aspectos das infecções humanas causados por esses protozoários permanecem obscuros, entretanto a capacidade de muitos desses organismos sobreviverem a 37°C reforça a possibilidade de ocorrência dessas infecções oportunistas (McGhee e Cosgrove, 1980). Até o momento as vias de transmissão de protozoários monoxênicos para os seres humanos permanecem desconhecidas. Entretanto, muito provavelmente, os humanos podem ser infectados através do contato com as fezes de insetos infectados, como ocorre com o *T. cruzi*. Outra hipótese é a da contaminação através da seiva de plantas, uma vez que muitos protozoários monoxênicos vêm sendo isoladas de plantas, como é o caso de *Herpetomonas* spp.. Corroborando essa hipótese, *Herpetomonas samuelpeessoai* foi isolada de um paciente imunossuprimido que trabalhava em uma floricultura, também causando uma síndrome similar a leishmaniose (Marín *et al.*, 2007; Morio *et al.*, 2008).

Diferentemente do descrito até o momento, foi encontrado um caso de infecção oportunista em um paciente imunocompetente por um tripanosomatídeo monoxênico ainda não identificado. Este caso ocorreu na Martinica (sendo o segundo caso de infecção com monoxênicos identificado na região) com o paciente apresentando lesões similares as encontradas em casos de leishmaniose cutânea (Boisseau-Garsaud *et al.*, 2000).

Além das infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos, tripanosomatídeos monoxênicos já foram encontrados co-infectando pacientes com leishmaniose (Kraeva *et al.*, 2015; Selvapandiyan *et al.*, 2015). Relatos recentes demonstraram que até 17% dos casos de leishmaniose visceral e leishmaniose cutânea, causados por *Leishmania donovani* na Índia, apresentaram co-infecção por *Leptomonas* spp. (Srivastava *et al.* 2010; Ghosh *et al.* 2012). Apesar do percentual alto de co-infecção por *Leptomonas* spp. ainda não se sabe as implicações da presença desses tripanosomatídeos na severidade da doença, no diagnóstico e na mortalidade dos pacientes. Bhattarai *et al.* (2009) demonstrou que os flebotomíneos, vetores da leishmaniose, são capazes de carrear tanto espécies de *Leishmania*

quanto de *Leptomonas*, embora esse cenário não tenha sido encontrado na natureza. Assim, não se sabe se a infecção por *Leptomonas* spp. é primária ou secundária em relação a infecção por *Leishmania* spp., ou ainda se essa infecção ocorre simultaneamente. Relatos como este vêm se tornando cada vez mais comuns e oferecem novas perspectivas para o estudo da interação desses tripanosomatídeos monoxênicos com hospedeiros mamíferos.

#### **1.1.4. Tripanosomatídeos que albergam endossimbiontes (TAEs)**

No citoplasma de algumas espécies de tripanosomatídeos monoxênicos dos gêneros *Strigomonas*, *Angomonas* e *Kentomonas*, foi descrita a presença de uma bactéria simbiote (Motta *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2011; Votýpka *et al.*, 2014). Inicialmente, esses endossimbiontes foram descritos como diplossomos em *Strigomonas culicis* (Novey *et al.*, 1907) e, mais tarde, descritos como corpos bipolares em *Strigomonas oncopelti* (Newton e Horne, 1957). Somente em 1963, Marmur *et al.* mostraram que esses corpos continham DNA similar ao encontrado em bactérias. Essa hipótese foi confirmada com o desaparecimento dos diplossomos após tratamento das células com cloranfenicol (Bruesk, 1967), gerando uma cepa apossimbiótica. Os endossimbiontes de tripanosomatídeos são  $\beta$ -proteobactérias citoplasmáticas obrigatórias, que apresentam sequências de DNA ribossomal (rDNA) similares a *Bordetella bronchiseptica*, sendo normalmente encontrada apenas uma bactéria por protozoário, com o simbiote e a célula hospedeira dividindo sincronicamente (Du *et al.*, 1994a,b; Motta *et al.*, 2010; Catta-Preta *et al.*, 2015).

A origem dos simbiotes de tripanosomatídeos é monofilética, sendo aceito que a relação de simbiose ocorreu a partir de um evento único entre uma bactéria e um hospedeiro ancestrais, com esse evento de aquisição ocorrendo cerca 40-120 milhões de anos atrás, no período Cretáceo. Sendo assim, divergências genéticas entre as espécies do protozoário e da bactéria ocorreram após o evento de simbiose. Corroborando a hipótese de origem monofilética, análises de sequências de SSU rDNA dos simbiotes de *S. culicis* e *Angomonas deanei* são filogeneticamente relacionados. Além disso, as taxas evolutivas dos endossimbiontes são menores do que as encontradas entre os hospedeiros (Du *et al.*, 1994a).

O uso de tripanosomatídeos que albergam endossimbiontes (TAEs) tem despertado o interesse de diversos grupos de pesquisa por representarem um interessante modelo de evolução de organelas (De Souza e Motta, 1999). Além disso, a comparação entre cepas selvagem e apossimbiótica permite determinar a contribuição do endossimbionte em diferentes aspectos da biologia do protozoário, sendo um excelente modelo de estudo (Fampa *et al.*, 2003). Em 2013, Motta *et al.* abriram novas perspectivas para o estudo de *S. culicis*, *A. deanei* e seus respectivos endossimbiontes, *Candidatus Kinetoplastibacterium blastocrithidii* e *Candidatus Kinetoplastibacterium crithidii*, através da publicação do genoma desses organismos. Esse conhecimento, juntamente com o proteoma de *S. culicis* (Garcia, 2014) e do genoma dos endossimbiontes (Alves *et al.*, 2013) irá facilitar o estudo de TAEs e de suas relações simbióticas.

A presença do endossimbionte altera a morfologia e ultraestrutura dos protozoários hospedeiros e também fornece moléculas essenciais, como o heme, nucleotídeos e aminoácidos essenciais (Motta *et al.*, 1997; de Souza e Motta, 1999; Alves *et al.*, 2011). Em contrapartida, o endossimbionte obtém um ambiente estável e nutrientes. A longa relação simbiótica levou a mudanças consideráveis no genoma do endossimbionte, dentre elas a perda de genes e, conseqüentemente, a redução do tamanho do genoma (Alves *et al.*, 2013). Sendo assim, apesar de ser possível manter o protozoário sem o endossimbionte, a manutenção da bactéria em cultura só é possível por curtos períodos de tempo (de Souza e Motta, 1999).

#### **1.1.4.1. Aspectos morfológicos de TAEs**

Análises comparativas entre cepas de TAEs e cepas tratadas com cloranfenicol para a eliminação da bactéria simbiótica demonstraram diferenças morfológicas e bioquímicas significativas (Freytmuller e Camargo, 1981; De Souza e Motta, 1999; Motta, 2010), embora a remoção do endossimbionte pelo tratamento com antibiótico não tenha sido capaz de reverter todas essas alterações (Freytmuller e Camargo, 1981).

Análises morfológicas e ultraestruturais por microscopia óptica e eletrônica desses tripanosomatídeos mostraram que o simbiote está usualmente localizado próximo ao núcleo do protozoário hospedeiro, envolvido por duas membranas que estão separadas por um espaço intermembranar, existindo alguns pontos de contato entre elas (Chang, 1974; Mundim e Roitman, 1977; Soares e De Souza, 1988; De

Souza e Motta, 1999; Motta, 2010). Os padrões de distribuição de proteínas entre as membranas interna e externa, além de porinas encontradas na membrana externa dos simbiontes de *S. culicis* e *Angomonas* spp. foram similares aos observados em bactérias gram-negativas, como *Escherichia coli* (Van Gool e Nanninga, 1971; Verkleij *et al.*, 1976; Van Alphen *et al.*, 1978; Soares e De Souza, 1988; Motta *et al.*, 1991; Andrade *et al.*, 2011). Embora diversas tentativas tenham sido feitas para isolar o endossimbionte, a manutenção destes em cultura não é possível, o que sugere uma forte relação de interdependência entre o simbionte e o protozoário (De Souza e Motta, 1999; Motta, 2010).

TAEs podem possuir uma ou duas bactérias, dependendo do estágio de divisão celular, havendo primeiramente a duplicação do endossimbionte e a posterior duplicação do cinetoplasto, núcleo e flagelo. Entretanto a divisão completa ocorrerá de maneira sincrônica, ficando apenas um endossimbionte na célula-filha (Motta *et al.*, 2010; Brum *et al.*, 2014; Catta-Preta *et al.*, 2015). Reconstruções tridimensionais de *A. deanei* mostraram que os glicosomos do protozoário estão intimamente associados com o endossimbionte nos TAEs, podendo ser um indicativo da participação da bactéria nas vias energéticas do protozoário (Motta *et al.*, 1997; De Souza e Motta, 1999).

Uma das características de tripanosomatídeos é a presença da estrutura paraflagelar localizada no flagelo desses protozoários (Farina *et al.*, 1986; De Souza e Motta, 1999; Motta, 2010). Essa estrutura está reduzida em TAEs, sugerindo que a presença do endossimbionte pode inibir a expressão de genes que codificam as proteínas dessa estrutura, não sendo imprescindível para a motilidade e adesão desses protozoários (Freymuller e Camargo, 1981; De Souza e Motta, 1999; Motta, 2010).

Além disso, já foi descrito o papel do endossimbionte na distribuição espacial de microtúbulos subpeliculares, sendo essa estrutura ausente em algumas regiões da superfície celular interna e permitindo um contato da mitocôndria com a membrana plasmática nesses pontos. Em TAEs também ocorre o remodelamento das fibras do kDNA, que passam de um estado de organização compacto em tripanosomatídeos para um estado mais disperso em TAEs (Motta, 2010).

#### 1.1.4.2. Aspectos bioquímicos de TAEs

Além das alterações ultraestruturais citadas, modificações metabólicas também são relatadas em TAEs, com o endossimbionte interferindo em diversas vias do tripanosomatídeo. Lwoff (1937) demonstrou que *S. oncopelti* poderia ser facilmente cultivado em meio contendo diferentes nutrientes e na ausência de heme, diferentemente de outros tripanosomatídeos. Da mesma forma, Newton (1957) analisou em maiores detalhes os requisitos nutricionais de *S. oncopelti*, estabelecendo um meio de crescimento extremamente rico, mas sem a porfirina, e testando também o crescimento da cepa apossimbiótica, concluindo que as células que contém o endossimbionte são capazes de crescer em meio sem heme. Este fenômeno também foi observado para *A. deanei* cultivado em meio sem adição de heme, sendo possível concluir que TAEs possuem enzimas e precursores que participam da via metabólica de biossíntese de heme de forma mais abundante que os protozoários da cepa apossimbiótica (Mundim *et al.*, 1974). Tripanosomatídeos não são capazes de sintetizar heme e necessitam captar esta porfirina sob a forma do próprio heme, hematina ou hemoglobina do meio de cultivo. A biossíntese de heme dos TAEs está relacionada com a capacidade de síntese de sete enzimas dessa via pelo endossimbionte e das três enzimas restantes pelo protozoário, assim havendo uma integração dessas enzimas para que haja a síntese de heme por esses organismos (Chang *et al.*, 1975; Salzman *et al.*, 1985; Motta, 2010; Alves *et al.*, 2011) (**Figura 1.2**).

A presença do endossimbionte também tem sido relacionada com o metabolismo de poliaminas, uma vez que os TAEs não requerem ornitina, arginina e citrulina no meio de cultivo. O endossimbionte possui a enzima acetilornitina, envolvida na formação da ornitina a partir de acetilornitina. A ornitina transcarbamilase, responsável pela transformação da ornitina em citrulina, também foi localizada no endossimbionte (De Souza e Motta, 1999; Motta *et al.*, 2013). Além disso, a via de biossíntese de isoleucina também está presente nas células que possuem endossimbionte, não sendo necessária a adição desse aminoácido, bem como de valina e leucina no meio de cultivo (Camargo e Freymuller, 1977; Galinari e Camargo, 1978; Alfieri e Camargo, 1982). Essas observações sugerem a importância do endossimbionte para diferentes vias metabólicas desses protozoários, corroborando a verdadeira relação simbiótica entre protozoário-endossimbionte (**Figura 1.3**).

Como mencionado anteriormente, a bactéria simbiote não sobrevive quando isolada do tripanosomatídeo, sugerindo que o endossimbionte utiliza nutrientes e precursores metabólicos do protozoário. A membrana do endossimbionte de *A. deanei* é rica em fosfatidilcolina, um fosfolípido comum em bactérias que vivem em associação com eucariotos. O simbiote é capaz de sintetizar fosfolípidos por até 3h após sua purificação, mas nesse caso, o fosfolípido mais produzido é a fosfatidiletanolamina. Assim, acredita-se que o protozoário possui grande importância no fornecimento de parte da fosfatidilcolina ou precursores das vias de síntese deste fosfolípido para o simbiote (Lopez-Lara e Geiger, 2001; Palmié-Peixoto *et al.*, 2006 Azevedo-Martins *et al.*, 2007; Motta, 2010; Motta *et al.*, 2013). Outros estudos apontam para a utilização de rotas energéticas do protozoário pelo endossimbionte, obtidas, principalmente, a partir do glicossomo. Essa hipótese é fortalecida pela baixa fosforilação oxidativa do simbiote e também pela presença de ecto-ATP sintases em sua membrana (Motta, 2010; Motta *et al.*, 2013).



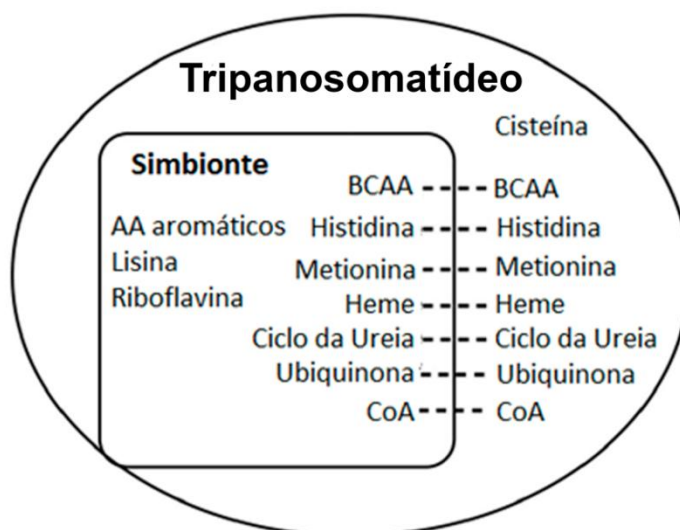
	gltX	hemA	GSA	ALAD	PBGD	UROS	UROD	CPOX	hemN	PPOX	FeCH
<i>C. K. blastocrithidii</i> *	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
<i>C. K. crithidii</i> *	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. K. galatii</i> *	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
<i>C. K. oncopeltii</i> *	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
<i>Angomonas deanei</i> **	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
<i>Strigomonas culicis</i> **	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
<i>S. galati</i> **	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
<i>S. oncopelti</i> **	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
<i>Crithidia acanthocephali</i> #	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
<i>C. fasciculata</i> #	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+

**Figura 1.2: Via de biossíntese do heme em TAEs.** Enzimas: GltX – Glutamil-tRNA sintetase; hemA – Glutamil-tRNA redutase; GSA – Glutamato-1-semialdeído 2,1-aminomutase; ALAD – ácido aminolevulínico deaminase; PBGD – porfobilinogênio deaminase; UROS – uroporfirinogênio III sintase; UROD – uroporfirinogênio III descarboxilase; CPOX – coproporfirinogênio III oxidase; hemN, coproporfirinogênio III oxidase independente de oxigênio; PPOX – protoporfirinogênio oxidase. Compostos intermediários: 1 - L-glutamato; 2 - L-glutamil-tRNA; 3 - glutamato-1-semialdeído; 4 - ácido aminolevulínico; 5 – porfobilinogênio; 6 - hidroximetilbilano; 7 - uroporfirinogênio III; 8 – coproporfirinogênio III; 9 - protoporphirinogênio IX; 10 - protoporfirina IX; H - heme. \* Endossimbionte; \*\* Tripanosomatídeos que albergam endossimbiontes; # Tripanosomatídeos regulares (Adaptado de Alves *et al.*, 2011).

### 1.1.4.3. *S. culicis*

*S. culicis*, anteriormente nomeada *Blastocrithidia culicis* (Teixeira *et al.*, 2011), é um tripanosomatídeo monoxênico, descrito colonizando o intestino médio de diferentes mosquitos como *Aedes vexans*, *Aedes aegypti*, *Culex pipiens*, *Mansonia richardii* e *Anopheles maculipennis* (Wallace, 1966; Corrêa-da-Silva *et al.*, 2006).

Embora o ciclo biológico de *S. culicis* não tenha sido descrito, em cultura laboratorial foi encontrada apenas formas epimastigotas, que proliferariam colonizando o inseto (De Souza e Motta, 1999). Morfologicamente, estes epimastigotas medem cerca de 10 – 50 µm de comprimento e 5 – 12 µm de flagelo, podendo ser facilmente cultivados *in vitro*. Como citado anteriormente, a característica mais marcante na biologia celular desses protozoários é a presença de uma bactéria endossimbiótica em seu citoplasma (Freymüller, 1981), responsável pela biossíntese de heme, vitaminas e/ou aminoácidos para o tripanosomatídeo (Motta, 2010). O tratamento de protozoários da cepa selvagem de *S. culicis* com cloranfenicol permitiu a obtenção de uma cepa apossimbiótica (**Figura 1.4**).

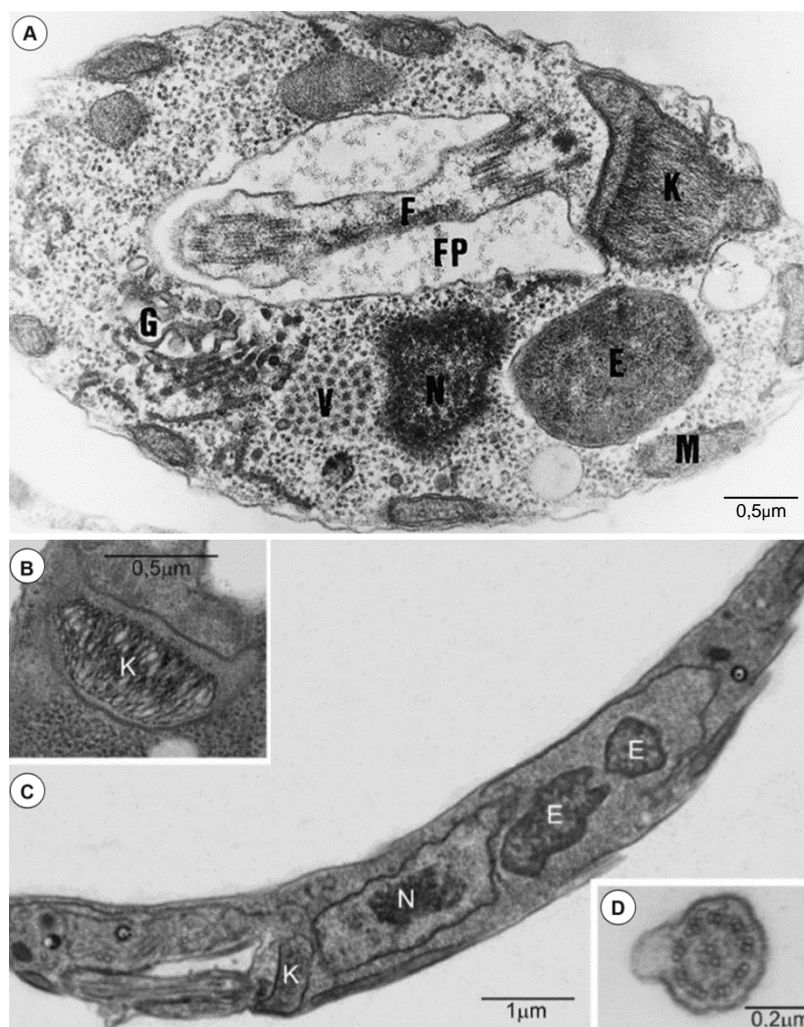


**Figura 1.3: Vias metabólicas relacionadas ao tripanosomatídeo e ao endossimbionte.** AA - aminoácidos; CoA - Coenzima A; BCAA - aminoácidos de cadeia ramificada (Adaptado de Motta *et al.*, 2013).

Infecções experimentais com *S. culicis* demonstram que esse protozoário é capaz de colonizar o intestino e atravessar o epitélio intestinal de *A. aegypti*, alcançando a hemocele desses mosquitos (Corrêa-da-Silva *et al.*, 2006). Dados da



literatura também demonstram que *S. culicis* consegue sobreviver na hemolinfa e é capaz de aderir nas glândulas salivares desses mosquitos *in vitro* e *in vivo* (Nascimento *et al.*, 2010). Foi constatado inclusive que este tripanosomatídeo pode sobreviver e colonizar o intestino médio de *A. aegypti* por até 38 dias pós-infecção, havendo uma diminuição inicial no número de protozoários/intestino, provavelmente refletindo a resposta imune do mosquito que controla parcialmente a sua proliferação. Entretanto, após curto período de tempo, o número de protozoários se estabiliza, demonstrando que *S. culicis* é capaz de colonizar o intestino desses mosquitos por longos períodos de tempo (Corrêa-da-Silva *et al.*, 2006).



**Figura 1.4: Ultraestrutura de *S. culicis*.** (A) Corte transversal de *S. culicis*, mostrando o endossimbionte (E) próximo ao cinetoplasto (K), a mitocôndria (M) e ao núcleo (N). (B) Detalhe do cinetoplasto formando uma rede mais frouxa de fibras de kDNA. (C) Corte longitudinal de *S. culicis*. (D) Organização do axonema, com seus 9 pares de microtúbulos circulares e um par central e a estrutura paraflagelar desorganizada. F – flagelo; FP – bolsa flagelar (Adaptado de De Souza e Motta, 1999; Teixeira *et al.*, 2011).

Estudos preliminares apontaram que a adesão *in vitro* de *S. culicis* nas células intestinais de *A. aegypti* ocorre pelo flagelo ou pelo corpo do protozoário, havendo rompimento da lâmina basal. Esse rompimento pode ocorrer pela ação enzimática de metaloproteases, como a gp63, e/ou pela ação mecânica do flagelo do tripanosomatídeo (Santos *et al.*, 2001; d'Avila-Levy *et al.*, 2005). Vários estudos têm demonstrado a participação de carboidratos na interação entre protozoários/hospedeiro invertebrado, podendo pequenas diferenças nesses glicoconjugados afetar a adesão (Pimenta *et al.*, 1992; Kamhawi *et al.*, 2004; d'Avila-Levy *et al.*, 2005). A adesão de *S. culicis* ao intestino de *A. aegypti* é mediada, em parte, por carboidratos de superfície. Dados da literatura sugerem que a presença do endossimbionte altera a expressão de proteínas de superfície dos tripanosomatídeos, tais como proteases, sendo a composição proteica da membrana plasmática de extrema importância na resposta e reconhecimento celulares (Dwyer, 1976; McLaughlin, 1985; d'Avila Levy *et al.*, 2005). Estudos preliminares comparativos entre as cepas selvagem e apossimbiótica revelaram que a bactéria simbiote induz a expressão diferencial de carboidratos na membrana plasmática do protozoário, promovendo a redução da carga de superfície (Dwyer e Chang, 1976; Esteves *et al.*, 1982; Oda *et al.*, 1984). Isso pode estar acontecendo através do aumento na expressão de glicoconjugados ricos em ácido siálico pela cepa apossimbiótica, enquanto a cepa selvagem de *S. culicis* aumentaria a expressão de manose em sua superfície (d'Avila-Levy *et al.*, 2005). Segundo Fampa *et al.* (2003), infecções experimentais *in vitro* com a cepa apossimbiótica de *S. culicis* em *Anopheles gambiae*, *Lutzomyia longipalpis* e *A. aegypti* foram significativamente menores do que quando comparadas com interações inseto/cepa selvagem. A proliferação dos protozoários da cepa selvagem ocorreu no intestino do mosquito mesmo após 72h, enquanto os protozoários apossimbióticos não foram detectados após 24h de interação. Estas diferenças foram relacionadas às variações na expressão de moléculas de superfície das duas cepas, uma vez que o aumento da expressão de glicoconjugados ricos em ácido siálico pela cepa sem o endossimbionte aumentaria a carga negativa da membrana plasmática desses protozoários, causando uma repulsão entre o tripanosomatídeo e o epitélio intestinal do inseto (Dwyer, 1976; Esteves *et al.*, 1982; Oda *et al.*, 1984; d'Avila-Levy *et al.*, 2005). *S. culicis* selvagem ainda foi mais resistente à degradação após fagocitose por macrófagos peritoneais de ratos do que a cepa apossimbiótica, sendo a

internalização dos protozoários dependente da expressão de moléculas nas membranas plasmáticas das cepas (Rozental *et al.*, 1987). Além disso, já foi demonstrado *in vitro* que *S. culicis* sobrevive em macrófagos peritoneais humanos quando a atividade microbicida do fagócito está regulada negativamente pela infecção com HIV-1 (Morio *et al.*, 2008; Barreto-de-Souza *et al.*, 2008).

## **1.2. Estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio (ROS)**

O estresse oxidativo é definido por um desequilíbrio entre a ocorrência de espécies reativas, incluindo ROS ou outras, como, por exemplo, as espécies reativas de nitrogênio (RNS), e a capacidade do organismo de neutralizá-las através de seu sistema antioxidante (Pisoschi e Pop, 2015). Esse desequilíbrio poderá surgir a partir do aumento da geração de espécies reativas no organismo, porém, muitas vezes, o desbalanço decorre da diminuição da habilidade protetora dos antioxidantes (Xing *et al.*, 2015). Assim o estresse oxidativo é caracterizado como um distúrbio no balanço entre pró-oxidantes e antioxidantes em favor das espécies oxidativas e com potencial capacidade de gerar danos no organismo (Sies, 1991).

As razões para que ocorra um desbalanço nas concentrações de espécies reativas e antioxidantes são muitas, dentre as quais destacam-se: **(a)** o aumento nos níveis endógeno e exógeno de compostos que promovem auto-oxidação na presença de ROS; **(b)** diminuição nas reservas de antioxidantes de baixo peso molecular; **(c)** inativação de enzimas antioxidantes; **(d)** diminuição da produção de enzimas antioxidantes e de antioxidantes de baixo peso molecular; e/ou **(e)** combinações entre duas ou mais dessas razões. Independente da razão desse desequilíbrio, um distúrbio entre geração e eliminação de espécies reativas pode afetar muitos, se não todos, os processos biológicos (Lushchak, 2014).

Em condições normais, os níveis de espécies reativas flutuam em uma faixa definida pela habilidade de geração e eliminação dessas moléculas pelos organismos. Se, após um estímulo pro-oxidante, a defesa antioxidante for capaz de combater as espécies reativas aumentadas, as células tendem a voltar para o seu estado normal. Entretanto, se essas defesas falham, e o aumento na concentração de espécies reativas se mantém por um longo tempo, se inicia o estresse oxidativo. As consequências disso irão depender, principalmente, da concentração de espécies reativas e do local em que foram geradas, da eficiência do sistema

antioxidante, da plasticidade do organismo e dos alvos que sofreram oxidação (Sies *et al.*, 1985).

Os radicais livres foram primeiramente descritos por Moses Gomberg há mais de um século (Gomberg, 1900), não sendo considerados, por um longo tempo, presentes nos sistemas biológicos, devido a sua alta reatividade e consequente baixo tempo de vida. Apenas 50 anos depois, os radicais livres foram descritos nos processos biológicos e, imediatamente, tiveram seu envolvimento relacionado com diversos processos patológicos e com o envelhecimento (Harman, 2009). Muitos anos se passaram até o entendimento de que radicais livres possuem funções benéficas, e não apenas deletérias, nos organismos. A primeira delas foi a participação de radicais livres no combate a agentes infecciosos através do sistema imune (Babior *et al.*, 1973; Rossi *et al.*, 1985). Também foi atribuída a essas moléculas função sinalizadora, funcionando como reguladores de diversos processos metabólicos (Shaikhali *et al.*, 2008). Assim, com o passar dos anos, o conhecimento sobre radicais livres se expandiu enormemente e mais funções dessas moléculas foram descobertas. Atualmente, está absolutamente claro que os radicais livres são participantes ativos em diversos processos biológicos, não mais podendo ser considerados somente como agentes tóxicos para os organismos.

Os radicais livres são moléculas que possuem um elétron desemparelhado em seu orbital, característica que confere uma maior instabilidade e reatividade para esses compostos (Riley, 1994, Poljsak *et al.*, 2013). Muitas ROS são radicais livres, entretanto, alguns não possuem esse elétron desemparelhado, sendo considerados apenas como espécies reativas (Sies, 2015), essa característica confere à molécula menos instabilidade e reatividade quando comparamos com os radicais livres. As espécies reativas podem ser geradas por diversos processos celulares, entretanto, uma vez que o objeto de estudo desse trabalho é a mitocôndria, iremos focar na geração de ROS mitocondrial, gerado a partir da cadeia transportadora de elétrons (CTE).

### **1.2.1. A mitocôndria e seu papel na geração de ROS**

As mitocôndrias são organelas presentes na maioria dos eucariotos, estando envolvidas em vias catabólicas e anabólicas, tais como a  $\beta$ -oxidação, a gliconeogênese, o catabolismo de aminoácidos e a biossíntese de heme (Galluzzi *et al.*, 2012). Essas organelas são constituídas por duas membranas, sendo as dobras

da membrana interna responsáveis por formarem as cristas mitocondriais que, por sua vez, delimitam a matriz da organela. São responsáveis não só pela geração de grande parte do ATP utilizado pela célula, como também desempenham importante papel na regulação do equilíbrio redox, sendo importantes fontes de ROS nas células (Bayir, 2005; Rigoulet *et al.*, 2011; Menna-Barreto e De Castro, 2014). Como dito anteriormente, a mitocôndria de tripanosomatídeos possui algumas diferenças morfológicas para as mitocôndrias de mamíferos. Esses protozoários possuem uma mitocôndria única, alongada e ramificada ao longo de todo corpo celular, próxima à membrana plasmática. Além disso, há a presença do kDNA, uma organização característica do DNA mitocondrial dos protozoários da ordem Kinetoplastida (De Souza *et al.*, 2009).

A síntese de ATP se dá essencialmente por meio da fosforilação oxidativa associada ao transporte de elétrons pela CTE (complexos I-IV) presentes nas cristas mitocondriais. A oxidação de substratos energéticos no citoplasma da célula e na matriz mitocondrial gera moléculas reduzidas como o NADH e o FADH<sub>2</sub>. Essas moléculas são oxidadas pelas enzimas NADH desidrogenase (complexo I) e succinato desidrogenase (complexo II), respectivamente, e ambos os complexos transferem os elétrons para a ubiquinona (coenzima Q) por meio de uma série de centros Fe-S. A coenzima Q, por sua vez, os transfere para a ubiquinona-citocromo C oxidoredutase (complexo III), e subsequentemente para a citocromo C oxidase (complexo IV). No complexo IV, ocorre a transferência de um par de elétrons para o oxigênio (O<sub>2</sub>) que finalmente é reduzido à H<sub>2</sub>O. Esse fenômeno está associado ao bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar, através dos complexos mitocondriais, gerando um gradiente eletroquímico. Este gradiente gera a força eletromotriz responsável pela síntese de ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico (Pi) pela F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP sintase (ATP sintase) através do retorno desses prótons para a matriz pela ação da enzima (Leloup *et al.*, 2011).

Embora a fisiologia mitocondrial seja muito similar entre mamíferos e tripanosomatídeos, algumas diferenças existem e são de grande importância para a funcionalidade desta organela. A principal delas é a funcionalidade parcial do complexo I. Em mamíferos, esse complexo é capaz de oxidar o NADH em NAD<sup>+</sup> e transportar 4H<sup>+</sup> da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar, contribuindo para a formação do gradiente eletroquímico e a consequente geração de ATP (Brandt, 2006). Em tripanosomatídeos, o complexo I parece não ser essencial, possuindo uma atividade limitada. No entanto, as subunidades desse complexo

estão presentes na maioria do tripanosomatídeos, principalmente as que irão formar os centros redox responsáveis pela redução da ubiquinona. Apesar disso, é consensual que esse complexo possui baixa atividade, pelo menos durante alguns estágios do ciclo de vida dos protozoários (Santhamma e Bhaduri, 1995; Opperdoes e Michels, 2008; Acestor et al., 2011; Verner *et al.*, 2011; Surve *et al.*, 2012; Tomás e Castro, 2013). Além disso, não há evidência direta da capacidade do complexo I de tripanosomatídeos em transportar prótons através da membrana mitocondrial interna, não tendo contribuição direta para a formação do gradiente eletroquímico. A única exceção a isso é encontrada em *Phytomonas* spp., que apresentou uma diminuição no gradiente eletroquímico a partir da inibição do complexo I pela rotenona, um inibidor específico desse complexo (Moysés e Barrabin 2004; Duarte e Tomás, 2014).

Uma vez que o complexo I é parcialmente funcional, a respiração em tripanosomatídeos é dependente do complexo II e, conseqüentemente, do seu substrato succinato. A oxidação deste substrato e a transferência de elétrons por esse complexo funciona de maneira semelhante à de mamíferos (Vercesi *et al.*, 1991; Denicola-Seoane *et al.*, 1992; Tielens e van Hellemond, 2009). Outra diferença na CTE de tripanosomatídeos é a presença de uma oxidase alternativa (AOX). Essa enzima foi descrita em *T. brucei* e é responsável por catalisar a redução do O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O a partir da ubiquinona (Shiba *et al.*, 2013). A presença dessa enzima foi comprovada com a inibição total do consumo de O<sub>2</sub> através da inibição do complexo IV pelo cianeto de potássio (KCN) e da AOX pelo ácido salicilhidroxâmico (SHAM). Estudos anteriores sugeriram a presença de uma AOX em outros tripanosomatídeos além do *T. brucei*, uma vez que a inibição pelo KCN não foi capaz de parar totalmente o consumo de O<sub>2</sub> nesses protozoários. Apesar disso, o SHAM também não foi capaz de diminuir esse consumo, sugerindo que, se houver uma AOX, esta enzima seria diferente da encontrada em *T. brucei* (Santhamma e Bhaduri, 1995; Chaudhuri *et al.*, 2006; Gonçalves *et al.*, 2011; Menna-Barreto e De Castro, 2014).

Em organismos aeróbicos, mais de 90% do O<sub>2</sub> consumido é reduzido diretamente à H<sub>2</sub>O pelo complexo IV, presente na CTE (Ott *et al.*, 2007). Essa redução total ocorre através da transferência de quatro elétrons para o O<sub>2</sub>. Grande parte das ROS geradas na célula será formada a partir da redução parcial do O<sub>2</sub> por elétrons que escaparam da CTE, levando a mitocôndria a ser a principal organela formadora dessas espécies reativas (Skulachev, 2012). Durante a transferência de elétrons entre os complexos da CTE, alguns deles escapam, principalmente da

ubiquinona, e reduzem o  $O_2$ , formando as espécies reativas. A quantidade de elétrons que escapam dos complexos mitocondriais varia amplamente e depende, principalmente, do estado fisiológico da célula (Sies, 2015). Após sua formação, as ROS podem sair da mitocôndria e agir em outras partes da célula, uma das características que permite que essas espécies reativas atuem como sinalizadoras. Esse processo ocorre pela passagem das ROS através da membrana mitocondrial e de canais iônicos dependentes de voltagem (Han *et al.*, 2003).

Como mencionado anteriormente, a ubiquinona é a maior produtora de ROS mitocondrial. Essa molécula existe em três diferentes estados redox na mitocôndria: o estado oxidado (UQ), o estado parcialmente reduzido ( $UQ\cdot^-$ ) e o estado totalmente reduzido ( $UQH_2$ ). A habilidade dessa molécula de alternar entre os três estados redox é a base da sua funcionalidade como carreadora de elétrons na CTE. Durante a atividade da CTE, a ubiquinona é reduzida pelos complexos I e II, carreando esses elétrons para o complexo III. Para que haja a transferência de elétrons da ubiquinona para o complexo III, esta molécula precisa estar em seu estado totalmente reduzido. Essa redução total ocorre em duas etapas: primeiro há a transferência de apenas um elétron dos complexos para a ubiquinona e, conseqüentemente, a transição dessa molécula do estado oxidado para o estado parcialmente reduzido, levando a formação de uma semiquinona. O segundo passo é a transferência de outro elétron proveniente dos complexos, que irá reduzir a semiquinona ao estado totalmente reduzido da ubiquinona (Wang e Hekimi, 2016). A redução prematura da ubiquinona por um único elétron, formando a semiquinona, faz com que esta molécula assumira sua forma mais instável, necessitando da segunda redução para retomar sua estabilidade. Quando essa segunda redução não ocorre, a semiquinona pode reduzir diversas moléculas, dentre as quais o  $O_2$ , abundante na mitocôndria, e gerar ROS (Boveris, 1977; Murphy, 2009) (**Figura 1.5**).

Com exceção das formas sanguíneas de *T. brucei*, a CTE é uma das maiores fontes de ROS em tripanosomatídeos (Bringaud *et al.*, 2006). A AOX presente na CTE de *T. brucei* parece possuir um papel antioxidante, uma vez que a inibição dessa enzima pelo SHAM leva a um aumento na produção de ROS mitocondrial na forma procíclica. Esses dados sugerem que a AOX pode oxidar o excesso de equivalentes redutores através da transferência de elétrons diretamente para o  $O_2$ , sem formar a semiquinona, o que poderia diminuir a produção de ROS (Fang e Beattie, 2003). Em outros tripanosomatídeos, o complexo III representa a maior fonte de ROS (Fang e Beattie, 2002; Mehta e Shaha, 2004; Tomás e Castro, 2013).

Diferentemente do observado em mamíferos, o complexo I de tripanosomatídeos apresenta baixa produção de espécies reativas, o que pode ser explicado pela baixa funcionalidade desse complexo, descrita anteriormente (Fang & Beattie, 2002; Mehta & Shaha, 2004; Carranza et al., 2009, Tomas & Castro, 2013). Tanto o complexo II quanto o complexo IV apresentam baixa geração de ROS, embora a inibição desses complexos possa levar a um aumento na produção de espécies reativas. A inibição específica do complexo II foi capaz de levar a um aumento da geração de ROS, enquanto a inibição do complexo IV alterou o fluxo de elétrons mitocondrial, aumentando o escape de elétrons da CTE por outros complexos (Mehta e Shaha, 2004; Gonçalves *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011; Tomás e Castro, 2013).

### **1.2.2. Moléculas pró-oxidantes**

Quando ocorre o escape de elétrons na CTE, a primeira espécie reativa a ser formada é o radical superóxido ( $O_2^-$ ), produzido a partir da redução do  $O_2$  por apenas um elétron. Esse radical livre é bastante instável e, em condições celulares normais, é encontrado em baixas concentrações, uma vez que possui enzimas antioxidantes específicas para sua detoxificação, como é o caso da superóxido dismutase (SOD) (Murphy, 2009; Pisoschi e Pop, 2015). De maneira natural ou por ação enzimática, através de mais uma elétron redução e da aceitação concomitante de dois prótons, o radical superóxido é transformado em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). O  $H_2O_2$  não é considerado um radical livre, uma vez que não possui nenhum elétron desemparelhado, sendo mais estável e menos reativo que o  $O_2^-$ , entretanto ainda é considerado uma ROS, pois é mais reativo que o  $O_2$ . O  $H_2O_2$  pode ser tornar ainda mais tóxico na presença de íons metálicos, uma vez que irá produzir espécies reativas mais agressivas, através da reação de Fenton (Gutteridge, 1994). Assim como o  $O_2^-$ , o  $H_2O_2$  também possui enzimas antioxidantes específicas, como é o caso das catalases e das peroxidases (Pisoschi e Pop, 2015). A molécula de  $H_2O_2$  poderá sofrer uma nova redução, gerando o radical hidroxila ( $OH^-$ ) e, finalmente, esse radical poderá interagir com mais elétrons e prótons, levando a geração de  $H_2O$ . O  $OH^-$  é o radical livre mais agressivo, causando danos em diversas biomoléculas, sendo a espécie reativa de menor tempo de vida e com sua geração ocorrendo de maneira controlada (Gutteridge e Halliwell, 1992, Kohen e Nyska,

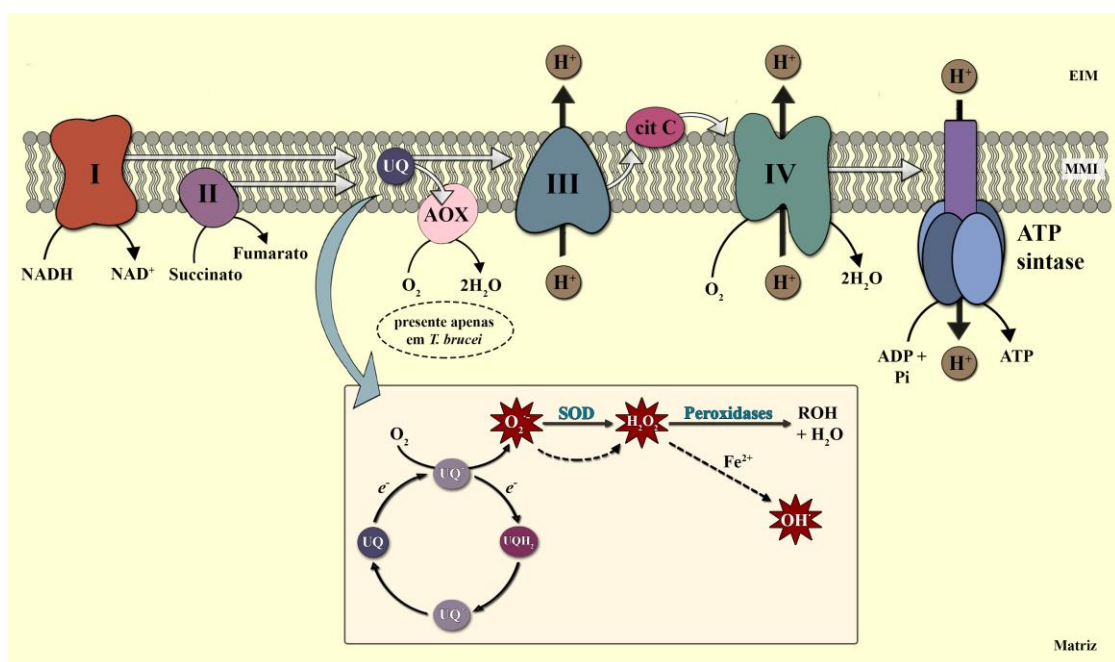


2002; Pisoschi e Pop, 2015). Esta espécie reativa pode ser gerada a partir da reação de Fenton (Gutteridge, 1994) (**Figura 1.5**).

### 1.3. Geração de ROS no hospedeiro invertebrado

#### 1.3.1. Produção de espécies reativas no intestino do inseto

O sistema imunológico de invertebrados não possui uma resposta adaptativa aos patógenos, como a produção de anticorpos e células de memória que ocorre no sistema imune de mamíferos, compreendendo apenas o sistema imune celular e humoral (Iwanaga e Lee, 2005). As respostas do sistema imune celular estão relacionadas com a atividade dos hemócitos (células de defesa presentes na hemolinfa do inseto), enquanto o sistema imune humoral consiste em respostas baseadas na síntese de moléculas que atuam de forma tóxica sobre o microrganismo invasor. Neste contexto, ROS e RNS possuem um importante papel na defesa desses organismos (Machado-Silva *et al.*, 2016).



**Figura 1.5: Representação esquemática da fisiologia e produção de ROS na mitocôndria de tripanosomatídeos.** Equivalentes reduzidos produzidos durante vias catabólicas entram na CTE através dos complexos I e II, reduzindo a ubiquinona (UB) na membrana mitocondrial interna (MMI). Elétrons provenientes da UB são transportados até o complexo III e em seguida se deslocam até o complexo IV, através do citocromo C (cit C), onde reduzem o oxigênio ( $O_2$ ) a água ( $H_2O$ ). A

transferência de elétrons pelos complexos III e IV é acoplada com a transferência de prótons ( $H^+$ ) da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar (EIM). Esse processo induz a formação de um gradiente eletroquímico, que é utilizado para a síntese de ATP, a partir de ADP e fosfato inorgânico (Pi), pela ATP sintase. A CTE de *T. brucei* possui uma oxidase alternativa (AOX), que irá reduzir o  $O_2$  a  $H_2O$  a partir da UB. A transferência de apenas um elétron dos complexos para a UB irá parcialmente reduzir essa molécula, levando a formação da semiquinona ( $UQ\cdot^-$ ), a transferência de um segundo elétron irá reduzir a  $UQ\cdot^-$  para seu estado totalmente reduzido ( $UQH_2$ ). A  $UQ\cdot^-$  é uma molécula instável e necessita da segunda redução para se estabilizar. Na ausência desta segunda redução, a  $UQ\cdot^-$  poderá atacar diversas moléculas na célula, dentre elas o  $O_2$  abundante na mitocôndria, gerando o radical superóxido ( $O_2\cdot^-$ ). Esse radical é muito instável e é encontrado em baixas concentrações, uma vez que possui enzimas específicas na sua detoxificação, como a superóxido dismutase (SOD). Naturalmente (linhas tracejadas) ou através da ação da SOD,  $O_2\cdot^-$  pode ser transformado em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). O  $H_2O_2$  pode ser reduzido pela ação de peroxidases ou pode reagir com ions metálicos, como o  $Fe^{2+}$  (através da reação de Fenton), produzindo radicais hidroxila ( $HO\cdot^-$ ) (Adaptado de Bombaça e Menna-Barreto, 2016, submetido).

O epitélio intestinal de vertebrados e invertebrados está em contato direto com uma ampla gama de microrganismos, podendo, muitas vezes, existir uma relação mutualística, como ocorre com a microbiota presente nesse órgão. Entretanto, por ser um o local da digestão do alimento, que muitas vezes pode ocorrer contaminação por patógenos, as células dessa região necessitam de um sistema imune eficiente, para evitar e combater as infecções (Leulier e Royet, 2009). Diversas enzimas da família NADPH oxidases (NOX) já foram descritas em células não-fagocíticas de mamíferos, como as células do epitélio intestinal, e também em invertebrados (Bedard *et al.*, 2007; Sumimoto, 2008).

As NOX são enzimas de membrana produtoras de ROS bastante conservadas, sendo descritos sete genes dessa família [NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, dual oxidase (DUOX)1 e DUOX2] em mamíferos (Bánfi *et al.*, 2001; Bedard *et al.*, 2012). Durante a atividade dessas enzimas, os elétrons são transferidos do NADPH para o FAD, em seguida, para os domínios da enzima que contêm heme e, finalmente, para o  $O_2$ , formando  $O_2\cdot^-$ . A única exceção a isso é a DUOX, que produz  $H_2O_2$ . Kawahara *et al.* (2007) mostraram que os insetos possuem apenas a NOX5 e a DUOX, que são as únicas entre essas oxidases que são ativadas por cálcio intracelular. A NOX5 foi a última isoforma descoberta e é considerada a mais próxima da NOX ancestral. Existem poucos trabalhos sobre NOX5 em insetos, sendo a caracterização da DUOX mais explorada. Em *A. gambiae*, a NOX5 participa, junto de uma peroxidase, da nitração de proteínas do

epitélio intestinal do inseto, o que dificulta a invasão dos oocistos de *P. falciparum* (Oliveira *et al.*, 2012). Além disso, Ha *et al.* (2005) demonstrou que DUOX tem um importante papel na manutenção da microbiota de *Drosophila melanogaster*, além de ser importante para a manutenção da viabilidade dos insetos.

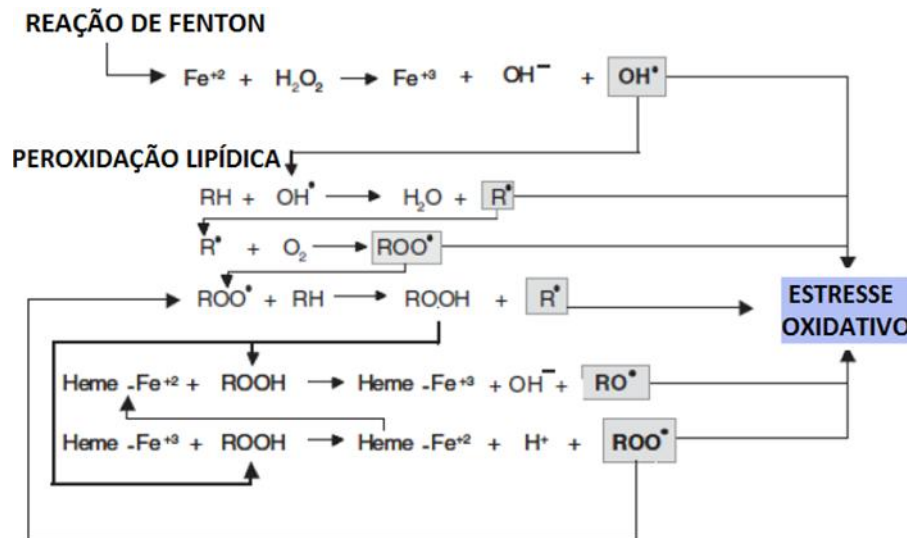
Ursic-Bedoya e Löwenberger (2007) especularam que células do intestino médio de organismos invertebrados são capazes de produzir óxido nítrico (NO<sup>-</sup>) em resposta a infecção por *T. cruzi*. Esta hipótese foi apoiada por Whitten *et al.* (2007), que demonstraram que há uma modulação dos níveis de expressão da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e de NO<sup>-</sup> no estômago, intestino médio e no corpo gorduroso de *R. prolixus* infectados com *T. cruzi* ou *T. rangeli*. A produção de NO<sup>-</sup> já foi demonstrada em diferentes invertebrados, como *Anopheles* spp. em resposta a infecção por diferentes espécies de *Plasmodium* (Dimopoulos *et al.*, 1998; Luckhart *et al.*, 1998; Herrera-Ortiz *et al.*, 2004).

### **1.3.2. A hematofagia e o papel pró-oxidante do heme**

A molécula de heme, também conhecida como ferroprotoporfirina-IX, faz parte do grupo das metaloporfirinas (Milgrom, 1997). A maioria dos organismos é capaz de sintetizar o heme, com exceção de algumas bactérias, protozoários como o *T. cruzi* e outros tripanosomatídeos, além de alguns eucariotos superiores (Lwoff, 1951; Braz *et al.*, 1999; Olczak *et al.*, 2005; Rao *et al.*, 2005; Nogueira *et al.*, 2011). Desta forma, a maior parte do ferro absorvido pelas células é utilizado para a síntese de heme e hemeproteínas, sendo a demanda de ferro extremamente variável. O heme é uma molécula de vital importância a todos os organismos aeróbicos e anaeróbicos, sendo fundamental para manter diversas funções celulares (Ponka, 1999). No entanto, apesar da sua importância nesses processos fisiológicos, o heme e o ferro, quando não estão associados a outras biomoléculas, que permitiriam a regulação de sua atividade redox, possuem efeitos biológicos citotóxicos (**Figura 1.6**).

Durante a evolução animal, a hematofagia surgiu diversas vezes, de forma independente, devido a utilização do sangue como alimento ser extremamente vantajosa nutricionalmente (Lukashevich e Mostovski, 2003). O alto valor nutricional do sangue é devido, principalmente, a grande concentração de proteínas (90% do peso seco), lipídios, vitaminas e alguns carboidratos (Lehane, 1991). A alimentação hematófaga resulta na digestão da hemoglobina, principal proteína do sangue, podendo atingir concentrações de até 150 mg/mL no homem (aproximadamente

60% do conteúdo total de proteínas). A degradação da hemoglobina resulta na liberação de quatro moléculas de heme, grupo prostético dessa proteína, liberando em torno de 10 mM desse grupamento.



**Figura 1.6: Mecanismos pró-oxidantes do heme e ferro.** O ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) liberado da degradação do heme pode reagir com o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) produzido pela CTE e por outros processos celulares, gerando radical hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ). Esse radical irá gerar danos oxidativos na célula e iniciando a peroxidação lipídica, através da oxidação de ácidos graxos insaturados (RH), gerando radicais alquil ( $\text{R}^\bullet$ ). O heme irá funcionar como potencializador do estresse oxidativo, uma vez que irá transformar hidroperóxidos (ROOH), que são espécies com baixa reatividade, em moléculas de alta reatividade, como é o caso de radicais alcóxil ( $\text{RO}^\bullet$ ) e peróxil ( $\text{ROO}^\bullet$ ) (Adaptado de Graça-Souza *et al.*, 2006).

Uma vez que o ferro e o heme livre possuem sérios efeitos deletérios, estratégias para controlar esses danos são essenciais para todos os organismos que dependem dessas moléculas (Atamna e Hagai, 1995), sendo ainda mais importantes em organismos hematófagos, que podem ingerir várias vezes o seu próprio peso em sangue e digeri-lo em peptídeos, aminoácidos e heme livre. Assim, organismos que se alimentam de sangue enfrentam uma condição de estresse oxidativo intenso durante a sua digestão (Slater *et al.*, 1991, Atamna e Ginsburg, 1995, Dansa-Petretski *et al.*, 1995). Essas estratégias são encontradas tanto nos organismos hematófagos, quanto nos protozoários que irão colonizar esses organismos.

Os efeitos deletérios do heme nos protozoários podem ser comprovados pela ação da cloroquina, principal droga antimalárica, que atua impedindo a formação de

crystalos de hemozoína, conseqüentemente deixando as moléculas de heme livres, causando danos ao microrganismo (Goldberg *et al.*, 1990; Graça-Souza *et al.*, 2006). Esses crystalos de hemozoína já foram encontrados em outros organismos hematófagos, como o *R. prolixus*, sendo considerada uma primeira linha de defesa contra o heme livre proveniente da digestão da hemoglobina (Oliveira *et al.*, 1999). O sequestro de heme em uma forma insolúvel levaria a sua eliminação nas fezes do inseto. Caso contrário, na ausência de formação da hemozoína, grandes quantidades de heme poderiam atravessar a parede do intestino médio, resultando em potenciais danos oxidativos nos tecidos.

Uma vez que a formação da hemozoína não é completamente eficiente, deixando heme livre que pode gerar dano, outras estratégias antioxidantes são encontradas nesses organismos, tais como a degradação do heme, pela enzima heme oxigenase (HO), a expressão de enzimas antioxidantes e de proteínas de ligação a porfirina (Oliveira *et al.*, 1995; Paes *et al.*, 2001; Paiva-Silva *et al.*, 2006, Citelli *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2007). Um desses casos foi observado em *R. prolixus*, em que há a expressão de uma proteína antioxidante de ligação ao heme, além do aumento dos níveis do antioxidante urato na hemolinfa (Graça-Souza *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 1999; Oliveira e Oliveira, 2002).

#### **1.4. Mecanismos antioxidantes de tripanosomatídeos**

Como dito anteriormente, organismos aeróbicos produzem derivados tóxicos de  $O_2$  durante seu metabolismo, sendo, os mais comuns, o  $O_2^-$ , o  $H_2O_2$  e o  $OH^\cdot$ . Embora algumas flutuações nos níveis basais de ROS possam ocorrer em resposta a certos estímulos, sendo cruciais para a fisiologia celular, altas concentrações de espécies reativas podem gerar um estresse oxidativo e necessitam ser combatidas para prevenir danos celulares (Brigelius-Flohé e Flohé, 2011). O combate às espécies reativas não é feito somente controlando sua produção, mas também controlando sua eliminação. Assim, os organismos vivos possuem elaborados mecanismos antioxidantes que são responsáveis por minimizar os efeitos deletérios dos produtos tóxicos provenientes do metabolismo do  $O_2$ .

O conceito biológico de antioxidante refere-se a qualquer composto que, quando presente em menor concentração quando comparado a de um substrato oxidável, é capaz de atrasar ou evitar a oxidação desse substrato (Scandalios,

2005). As funções antioxidantes irão diminuir o estresse oxidativo, prevenir mutações no DNA e evitar danos a proteínas e lipídeos, bem como outros danos celulares. Existem duas diferentes frentes de defesa aos danos oxidativos nas células. A primeira delas é caracterizada pelo combate e prevenção de danos oxidativos (podendo ou não ser enzimática) e são aquelas que impedem a ocorrência de ROS e bloqueiam e/ou capturam os radicais formados. A segunda frente de defesa é representada pelos processos de reparo dos danos, que irá remover as biomoléculas oxidadas, evitando alterações no metabolismo (Babior *et al.*, 1975; Griffith, 1980).

Os antioxidantes podem ser classificados de diferentes formas, sendo a principal delas pelo seu peso molecular. Assim, de acordo com esse sistema de classificação, os antioxidantes são divididos em dois grupos: os antioxidantes com baixo peso molecular ( $\leq 1\text{KDa}$ ) e os antioxidantes com alto peso molecular ( $\geq 10\text{KDa}$ ). Os antioxidantes de baixo peso molecular são compostos quimicamente diferentes, tais como o ácido ascórbico (vitamina C) e tocoferol (vitamina E), carotenoides, antocianinas, polifenóis e o ácido úrico (urato) (Babior *et al.*, 1975; Lushchak, 2014). Já os antioxidantes com alto peso molecular são principalmente enzimas antioxidantes e algumas proteínas, tais como a ferritina, transferrina e a albumina, que irão se ligar a moléculas com alto poder oxidante, como íons metais, impedindo sua ação tóxica (Lushchak, 2014).

Estudos prévios sobre as defesas antioxidantes de tripanosomatídeos sugeriram que esses parasitos eram mais sensíveis ao estresse oxidativo, uma vez que as defesas antioxidantes clássicas, tais como catalase e glutathione peroxidase, estavam ausentes (Turrens, 2004). Entretanto, nos anos subsequentes, esse cenário se mostrou incorreto, uma vez que diversas enzimas detoxificantes foram caracterizadas, estando distribuídas entre os diferentes compartimentos celulares e sendo ativas contra uma gama de agentes pró-oxidantes (Irigoín *et al.*, 2008).

#### **1.4.1. *Tripanotiona***

Tripanosomatídeos diferem de outros organismos procariotos e eucariotos por possuírem um sistema antioxidante específico. Esse sistema é baseado na presença de tripanotiona/tripantion redutase (TR) que, nesses protozoários, substitui o sistema da glutathione/glutathione redutase, presente em quase todos os eucariotos

(Fairlamb *et al.*, 1985). A tripanotiona ( $N_1-N_8$ -bis(glutationil)espermidina) é formada a partir da ligação de duas moléculas de glutatona (GSH) e uma molécula de espermidina (spd) e já foi caracterizada em diversas espécies de tripanosomatídeos, dentre as quais, *Crithidia fasciculata* (Shames *et al.*, 1986), *T. cruzi* (Krauth-Siegel *et al.*, 1987; Sullivan e Walsh, 1991), *T. brucei* (Aboagye-Kwarteng *et al.*, 1992) e em diferentes espécies de *Leishmania* (Manta *et al.*, 2013). A conjugação de moléculas de GSH é frequente em eucariotos, entretanto, a combinação de GSH com poliaminas, como é o caso da spd, só é observada em alguns organismos, como ocorre em algumas enterobactérias e euglenozoários. Os tripanosomatídeos patogênicos são os únicos parasitos de humanos que possuem esta característica, sendo sua principal diferença em relação a outros parasitos (Manta *et al.*, 2013).

A tripanotiona é encontrada no tripanosomatídeo em duas formas, como dihidrotripanotiona  $[T(SH)_2]$ , sua forma reduzida, e como tripanotiona dissulfeto ( $TS_2$ ), sua forma oxidada. A  $T(SH)_2$  é mais reativa que a GSH, uma propriedade que pode ser explicada por algumas características desta molécula, tais como, um pKa próximo ao valor de pH do meio intracelular e o fato dela ser um ditiol, o que favorece a redução de dissulfetos (Gilbert, 1990; Fraser-L'Hostis *et al.*, 1997). O níveis de  $T(SH)_2$  são mantidos pela atividade da TR, uma flavoenzima NADPH-dependente. A enzima TR possui uma identidade de 35% com a glutatona redutase de mamíferos e compartilha varias características físicas e químicas com essa enzima. A principal diferença entre essas enzimas é a especificidade da TR por dissulfetos (Ariyanayagam *et al.*, 2001). A TR tem sido mostrada como essencial para a infectividade de *T. brucei* e importante para a proliferação de *Leishmania donovani* e *Leishmania major* no interior de macrófagos ativados (Krieger *et al.*, 2000; Dumas *et al.*, 1997; Tovar *et al.*, 1998).

Moléculas como a tripanotiona, que possuem o grupamento tiol, podem sofrer uma ou duas elétron-oxidações, levando a formação de radicais tiil ( $RS^\cdot$ ) e ácidos sulfênicos (RSOH), respectivamente. A quantidade de oxidações sofridas pela tripanotiona irá depender da espécie reativa relacionada, por exemplo, os  $OH^\cdot$  e peroxila, o dióxido de nitrogênio e outros serão capazes de realizar uma elétron-oxidação. Já o  $H_2O_2$ , os peroxinitritos e outros serão capazes de realizar duas elétron-oxidações (Manta *et al.*, 2013). A  $T(SH)_2$  irá funcionar como doadora de elétrons em diversas vias, podendo, através de uma serie de reações redox, neutralizar diversas espécies reativas, além de fornecer equivalentes redutores para

moléculas intermediárias, que, em seus estados reduzidos, podem transferir seus elétrons para peroxidases (Irigoín *et al.*, 2008).

Dentre os tripanosomatídeos, o nível de tripanotiona irá variar de acordo com a espécie e com a forma evolutiva avaliada. Em *T. cruzi*, por exemplo, os níveis irão variar dentro do ciclo de vida do parasito, sendo a maior concentração encontrada na forma epimastigota (1,5 - 2,1 mM) e as menores em tripomastigota (0,5 mM) e amastigota (0,12 mM), respectivamente (Piacenza *et al.*, 2007; Ariyanayagam e Fairlamb, 2001, Ariyanayagam *et al.*, 2003). Esta variação depende do estresse sofrido pela forma evolutiva e espécie do protozoário, além da via em que a tripanotiona irá atuar.

#### 1.4.2. Peroxidases

Tripanosomatídeos são capazes de tolerar apenas baixas concentrações de hidroperóxidos (Boveris *et al.*, 1980), provavelmente devido a ausência de enzimas como catalase e glutathione peroxidase. Em estudos anteriores, a capacidade de tripanosomatídeos em eliminar baixas concentrações de  $H_2O_2$  foi atribuída à redução dessa espécie reativa pela tripanotiona (Penketh *et al.*, 1987; Carnieri *et al.*, 1993). Entretanto, estudos recentes demonstraram a existência de três diferentes classes de peroxidases nesses protozoários: triparedoxina (TXN)/triparedoxina peroxidase (TXNPx), glutathione peroxidase independente de selenocisteína (nsGPx) e ascorbato peroxidase (APx). Apesar disso, a tripanotiona permanece sendo essencial para a eliminação de hidroperóxidos, uma vez que irá atuar como doadora de elétrons para as reações de redução catalisadas por estas enzimas. Isso foi demonstrado na forma sanguínea de *T. brucei*, onde uma diminuição de 10% na ação da TR levou a um aumento na sensibilidade do parasito ao  $H_2O_2$  (Krieger *et al.*, 2000).

O termo TXNPx é designado para todas as peroxidases que irão utilizar a TXN como uma fonte de elétrons durante a redução de peróxidos. Estas enzimas são responsáveis pela detoxificação de hidroperóxidos e de peroxinitrito e irão utilizar resíduos de cisteínas para reduzir seus substratos. Pelo fato das TXNPx de tripanosomatídeos possuírem dois resíduos de cisteína, são chamadas de 2-cis-peroxiredoxinas (2-cis-PRX). A superexpressão dessa enzima em *Leishmania* spp. e *T. cruzi* tornou esses parasitos mais resistentes a ação de hidroperóxidos e peroxinitritos (Barr e Gedamu, 2003; Castro *et al.*, 2002).



A enzima nsGPx possui duas isoformas, nsGPx-A e a ns-GPx-B, sendo semelhantes a glutathione peroxidase de mamíferos, porém tiveram o resíduo de selenocisteína em seus sítios ativo substituídos por cisteína (Wilkinson *et al.*, 2000). Uma das particularidades das nsGPx diz respeito a sua afinidade pela GSH. Nestas enzimas, os resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação da enzima com a GSH sofreram mutação ou foram depletados, levando a uma diminuição da afinidade da nsGPx por esta molécula (Herbette *et al.*, 2007). Assim, em tripanosomatídeos, as nsGPx apresentam uma atividade muito baixa quando dependem desta molécula (Wilkinson *et al.*, 2002). Enquanto a nsGPx-A utiliza a TXN como fonte de equivalentes redutores (Hillebrand *et al.*, 2003; Wilkinson *et al.*, 2002), a nsGPx-B não aceita esta molécula como fonte redutora, continuando a utilizar a GSH como molécula redutora, mesmo com sua baixa afinidade (Castro e Tomás, 2008).

O ácido ascórbico (ascorbato) funciona como um cofator para uma gama de enzimas envolvidas em diversos processos metabólicos. Entretanto, sua função mais importante é como poderoso antioxidante, reduzindo radicais livres, sequestrando espécies reativas e atuando em diversas outras funções que diminuem o estresse oxidativo. Uma de suas funções é atuar com doador de elétrons para a enzima APx (Halliwell, 2001). As APx são heme-proteínas que irão catalisar a redução de  $H_2O_2$  de maneira dependente de ascorbato em organismos fotossintéticos (Herbette *et al.*, 2007). Esta enzima já foi descrita em *T. cruzi* e *Leishmania* spp. (Adak e Datta, 2005), entretanto ainda não há relatos de sua existência em *T. brucei*. Existem algumas diferenças estruturais entre as APx de plantas e tripanosomatídeos, entretanto a principal diferença entre elas é a ausência de um resíduo de arginina, responsável pela ligação e oxidação do ascorbato. Esta ausência pode explicar o fato da enzima de tripanosomatídeos possuir uma utilização menor desta molécula (Castro e Tomás, 2008).

### 1.4.3. SOD

A eliminação do  $O_2^-$  é uma das formas mais adequadas de regular a formação de outras espécies reativas. Como dito anteriormente, essa formação pode ocorrer a partir da dismutação do  $O_2^-$  em  $H_2O_2$  e  $O_2$ , pela ação da enzima SOD (McCord e Fridovich, 1969). Essa enzima é dependente de um cofator metálico, que nos mamíferos pode ser Cu/ZnSOD e/ou MnSOD. Estudos *in silico* em tripanosomatídeos encontraram 4 isoformas de SOD, todas utilizando o FeSOD

como cofator. Uma vez que o  $O_2^-$  possui capacidade limitada de se difundir através de membranas biológicas, FeSOD é encontrada em diferentes organelas, para que haja a dismutação dessa espécie reativa no seu local de origem. O papel da FeSOD como antioxidante em tripanosomatídeos tem sido demonstrado em diferentes situações. Em *Leishmania* spp., a superexpressão da isoforma FeSOD-A protegeu estes parasitos de radicais livres gerados por agentes como o paraquat e a antimicina A (AA) (Paramchuk *et al.*, 1997, Getachew e Gedamu, 2012), enquanto a diminuição nos níveis desta enzima levaram a uma maior sensibilidade a menadiona, conhecida molécula geradora de  $O_2^-$ .

## 1.5. Justificativa

*S. culicis* é encontrada bem adaptada no intestino de insetos hematófagos, um ambiente rico em grupamento heme (produto da digestão do sangue), e conhecidamente tóxico quando em altas concentrações, devido ao seu potencial oxidativo gerador de ROS, principalmente  $H_2O_2$ . Por colonizarem o intestino desses insetos, *S. culicis* também está sujeito ao estresse oxidativo decorrente do sistema imune desses organismos. Devido ao seu caráter altamente oxidativo, este ambiente representa uma fonte de pressão constante para o protozoário, sendo um dos fatores seletivos para o sucesso da colonização no inseto. Apesar disso, mecanismos antioxidantes de *S. culicis* e de outros TAEs ainda não foram completamente elucidados. Tripanosomatídeos monoxênicos tem ganhado cada vez mais destaque em estudos de infecções acidentais de pacientes imunocomprometidos, já tendo sido comprovada a influência do endossimbionte nos processos de adesão e internalização em hospedeiros vertebrados e invertebrados, uma vez que a eliminação do endossimbionte faz com que o protozoário perca sua capacidade de aderir e colonizar seus hospedeiros. Propomos avaliar o papel do endossimbionte no metabolismo oxidativo, e a sua contribuição para os fenótipos observados em *S. culicis*, acreditando que o conhecimento da maquinaria regulatória envolvida poderá ser de grande valia para a compreensão dos mecanismos de resistência e persistência do protozoário em mamíferos, incluindo o homem.

## **2. OBJETIVOS**

## 2.1. Objetivo geral

Caracterizar o metabolismo energético e oxidativo de *S. culicis*.

## 2.2. Objetivos específicos

- ✓ Induzir resistência *in vitro* a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na cepa selvagem;
- ✓ Analisar a susceptibilidade das cepas selvagem, selvagem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-resistente e apossimbiótica a diferentes inibidores do metabolismo energético e oxidativo por microscopia óptica;
- ✓ Analisar a morfologia das cepas selvagem, selvagem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-resistente e apossimbiótica por microscopia eletrônica de transmissão (MET);
- ✓ Analisar a atividade glicolítica e mitocondrial nas cepas selvagem, selvagem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-resistente e apossimbiótica por fluorimetria, luminometria, oxigrafia de alta resolução, citometria de fluxo e dosagens bioquímicas;
- ✓ Analisar o dano oxidativo e a resposta a diferentes antioxidantes nas cepas selvagem, selvagem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-resistente e apossimbiótica por microscopia óptica, fluorimetria e espectrofotometria;
- ✓ Analisar a expressão de genes do metabolismo energético e oxidativo nas cepas selvagem, selvagem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-resistente e apossimbiótica por PCR quantitativo;
- ✓ Analisar a capacidade infectiva das cepas selvagem, selvagem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-resistente e apossimbiótica em *A. aegypti* *ex vivo* e *in vivo* por microscopia óptica;
- ✓ Analisar a capacidade infectiva das cepas selvagem, selvagem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-resistente e apossimbiótica em macrófagos peritoneais *in vitro*.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1. Reagentes**

Foram utilizados os reagentes menadiona, paraquat,  $\alpha$ -tocoferol, urato, N-acetilcisteína (NAC), ascorbato, rotenona, AA, oligomicina, SHAM, 2-desoxi-D-glicose (2-DOG) e iodoacetamida, todos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Foram utilizados também  $H_2O_2$  e KCN da Merck (Darmstadt, Alemanha), hemina adquirida da Frontier Scientific (Logan, EUA) e sulfato ferroso ( $FeSO_4$ ) da Vetec (Duque de Caxias, Brasil).

### **3.2. Manutenção das cepas de *S. culicis* e indução de resistência a $H_2O_2$**

Os protozoários das cepas de *S. culicis* foram mantidos em meio de cultivo de infusão de fígado e triptose (LIT, pH 7,4) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil) à 28°C. Os ensaios foram realizados com as cepas selvagem (WT), selvagem  $H_2O_2$ -resistente (WTR) e apossimbiótica (Apo) na fase exponencial de crescimento. Os repiques das três cepas foram realizados a cada 4 dias, sendo utilizada a concentração de  $2 \times 10^6$  protozoários/mL para as cepas WT, WTR e WTR<sup>+</sup> e a concentração de  $3 \times 10^6$  protozoários/mL para a cepa Apo. Para a indução de resistência, foram adicionadas concentrações gradativas de  $H_2O_2$  a cepa WT (100  $\mu$ M  $H_2O_2$  a cada três repiques), sendo a dose aumentada até a concentração final de 1 mM para a cepa WTR e até 1,5 mM para a cepa WTR<sup>+</sup>. Após esse período, a concentração final de  $H_2O_2$  foi mantida em todos os repiques subsequentes das cepas resistentes.

### **3.3. Análise do efeito direto dos inibidores e antioxidantes nas cepas de *S. culicis***

Os protozoários das cepas WT, WTR e Apo foram ressuspensos na concentração de  $10^7$  protozoários/mL em LIT. Essa suspensão (100 $\mu$ L) foi adicionada ao mesmo volume dos reagentes (citados no item 3.1) previamente preparados no dobro da concentração final desejada e incubados por 2h e 24h à 28°C. Para a preparação dos reagentes, foi feita uma diluição seriada 1:2 dos

reagentes previamente diluídos (stock: 100mM), sendo utilizada a faixa de 20 mM - 10µM para a realização do experimento. A quantificação dos protozoários foi realizada em câmaras de Neubauer, e a atividade dos compostos expressa em IC<sub>50</sub>, correspondendo à concentração do composto que causa lise de 50% dos protozoários. Foram calculadas as razões entre os valores IC<sub>50</sub>/2h obtidos para as cepas WT/Apo e WTR/WT, para possibilitar a comparação da atividade dos diferentes compostos.

### **3.4. Análise por MET das cepas de *S. culicis***

Os protozoários das cepas WT, WTR e Apo ( $5 \times 10^7$  protozoários) foram centrifugados a 600 g, lavados 3x com tampão fosfato de sódio (PBS, 1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 5 M NaCl) 1x e fixados em 2,5% glutaraldeído (Sigma-Aldrich) por no mínimo 30 min à temperatura ambiente. A pós-fixação foi realizada em solução de 1% de tetróxido de ósmio contendo 0,8% ferricianeto de potássio e 2,5 mM cloreto de cálcio por 30 min à temperatura ambiente. Após as etapas de fixação e pós-fixação foram realizadas lavagens com tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2). Em seguida foi realizada a desidratação das amostras, com uma série crescente de acetona (50%, 70%, 90%, 100% e 100%). Após esse processo, as amostras foram emblocadas em resina PolyBed 812 (Polysciences, Warrington, Estados Unidos), sendo realizados cortes ultrafinos que foram contrastados em solução de 5% acetato de uranila e citrato de chumbo (Menna-Barreto *et al.*, 2009). As amostras foram analisadas em microscópio Jeol JEM1011 (Tóquio, Japão) na Plataforma de Microscopia Eletrônica, IOC, FIOCRUZ.

### **3.5. Análise do consumo de O<sub>2</sub> por oxigrafia de alta resolução das cepas de *S. culicis***

Os protozoários das cepas WT, WTR e Apo foram centrifugados a 600 g e ressuspensos na concentração de  $2,5 \times 10^7$  protozoários/mL, num volume final de 2,1 mL, em tampão de respiração contendo sacarose ou glicose e/ou L-prolina. O tampão de respiração com sacarose consistiu em 125 mM sacarose, 65 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,2), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM fosfato de potássio e 5 mM de succinato e o tampão de respiração com glicose e/ou L-prolina, foi composto por 20 mM

glicose e/ou 10 mM L-prolina, 65 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,2), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM fosfato de potássio e 5 mM de succinato. Os experimentos foram realizados em oxígrafo de alta resolução (Oroboros Instruments, modelo 2k, Innsbruck, Áustria), à 28°C, sendo adicionado 2 µM de AA como controle do consumo de O<sub>2</sub> mitocondrial após a avaliação do consumo de O<sub>2</sub> por, no mínimo, 20 minutos (Gonçalves *et al.*, 2011).

### **3.6. Análise das atividades das enzimas mitocondriais das cepas de *S. culicis***

Os protozoários das cepas WT, WTR e Apo foram centrifugados a 600 g, congelados na concentração de 10<sup>8</sup> protozoários/mL em PBS 1x, lisados por sonicação e incubados com os substratos das enzimas mitocondriais para determinação de sua atividade em espectrofotômetro (Shimadzu Scientific Instruments, modelo 2450, Tóquio, Japão). Para as dosagens da atividade de citrato sintase, 10<sup>7</sup> protozoários foram incubados em 1 mL de tampão Tris-HCL 75 mM (pH 8) contendo 30 µM acetil-CoA, 250 µM ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB) e 500 µM oxaloacetato. A atividade da enzima foi medida através da redução do DTNB, sendo a reação iniciada a partir da adição dos substratos, seguida da adição da amostra e a leitura foi realizada a 412 nm. Para as dosagens de atividade dos complexos II-III e IV, 2x10<sup>7</sup> protozoários foram incubados em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,4) (complexo II-III) e tampão hipotônico (25 mM fosfato de potássio e 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,2) (complexo IV), sendo realizadas leituras a 550 nm, correspondente à redução do citocromo C. Para o complexo II-III foi avaliado o aumento na redução do citocromo C, sendo a reação iniciada com a adição de 1 mM KCN, 150 µM citocromo C oxidado, 3 mM succinato, seguida da adição da amostra e de 2 µM AA para parar a reação. Já para a atividade do complexo IV, foi avaliada a diminuição na redução do citocromo C, sendo primeiramente adicionado 50 µM de citocromo C reduzido, seguida da amostra e de 1 mM KCN, novamente para parar a reação (Pon e Schon, 2001).



### **3.7. Análise da produção de ATP nas cepas de *S. culicis***

Os protozoários das cepas WT, WTR e Apo foram centrifugados a 600 g e ressuspensos na concentração de  $10^8$  protozoários/mL em PBS 1x, sendo plaqueados 100  $\mu$ L/poço (microplaca de poliestireno com 96 poços, branca com fundo plano, F-Lumitrac 200, Greiner Bio-one, Frickenhausen, Alemanha) e, após isso, adicionados o mesmo volume do reagente luminescente (CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay, Promega, Wisconsin, EUA). As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 15 min, sendo realizada a leitura do sinal de luminescência, com um tempo de integração de 5 s por poço, em luminômetro (Promega, modelo GloMax-Multi Detection System). Foi feita uma curva padrão de ATP para determinação da concentração dessa molécula na amostra. Para a preparação da curva padrão, foi feita uma diluição seriada 1:2 do ATP previamente diluído (stock: 1mM), sendo utilizada a faixa de 10 $\mu$ M – 12,5nM.

### **3.8. Análise do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) nas cepas de *S. culicis***

Os protozoários das cepas WT, WTR e Apo foram centrifugados a 600 g e ressuspensos na concentração de  $5 \times 10^6$  protozoários/mL em PBS 1x, sendo então incubados 10  $\mu$ M de carbonil cianeto 4-(trifluorometoxi)fenilhidrazona (FCCP, Sigma-Aldrich) por 30 min à 28°C. Após esse período foi adicionado 5  $\mu$ g/mL de rodamina 123 (Rod 123, Sigma-Aldrich), sendo novamente incubado por mais 15 min na mesma temperatura. O FCCP foi utilizado como um controle da dissipação do  $\Delta\Psi_m$ . As amostras foram lidas em citômetro Cytex DXP Multi-Color Upgrades (Cytex, Fremont, EUA), sendo adquiridos 10.000 eventos em canal de fluorescência FL1, e todas as análises realizadas no software Summit 6.1 (Beckman Coulter, Brea, EUA). Como parâmetro de análise das alterações na fluorescência da Rod 123, foi utilizado um índice de variação (IV), calculado usando a razão das medianas de WTR/WT e Apo/WT. O IV utilizado para as condições em que houve a adição de FCCP foi calculado pela razão das medianas de WT + FCCP/ WT, WTR + FCCP/WTR e Apo + FCCP/Apo.

### **3.9. Análise da captação de glicose nas cepas de *S. culicis***

Os protozoários das cepas WT, WTR e Apo foram centrifugados a 600 g e ressuspensos na concentração de  $5 \times 10^6$  protozoários/mL em PBS 1x, sendo então incubados com 200  $\mu$ M 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amino]-2-deoxi-d-glicose (2-NBDG, Molecular Probes, Massachusetts, EUA) por 30 min à 28°C. As amostras foram lavadas 3x em PBS 1x e ressuspensas em 500  $\mu$ L desse tampão, sendo esse processo realizado em gelo. Foi realizado um controle da marcação, em que os protozoários foram incubados com o 2-NBDG em gelo por 30 min, para que não houvesse a captação do reagente. As amostras foram lidas em citômetro Cytek DXP Multi-Color Upgrades (Cytek, Fremont, EUA), sendo adquiridos 10.000 eventos em canal de fluorescência FL1, e todas as análises realizadas no software Summit 6.1 (Beckman Coulter, Brea, EUA). Alterações na fluorescência do 2-NBDG foram analisadas calculando a razão WTR/WT e Apo/WT. Como parâmetro de análise das alterações na fluorescência da 2-NBDG, foi utilizado um índice de variação (IV), calculado usando a razão das medianas de WTR/WT e Apo/WT

### **3.10. Análise da resposta de *S. culicis* aos antioxidantes**

As cepas WT, WTR e Apo foram ressuspensas na concentração de  $10^7$  protozoários/mL em LIT. Essa suspensão (100 $\mu$ L) foi adicionada ao mesmo volume de meio contendo os antioxidantes  $\alpha$ -tocoferol, urato, NAC ou ascorbato previamente preparados no dobro da concentração final desejada ( $\alpha$ -tocoferol: 160 - 40  $\mu$ M; urato: 100 - 25  $\mu$ M; ascorbato: 5 - 1,25 mM; NAC: 1 - 0,25 mM), seguido de incubação por 30 min à 28°C. Após esse período foi adicionada a concentração do IC<sub>50</sub>/2h dos pró-oxidantes AA e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e os protozoários foram incubados por mais 2h na mesma temperatura. A quantificação dos protozoários viáveis foi realizada em câmara de Neubauer.

### **3.11. Análise da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas cepas de *S. culicis***

Para a avaliação da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, protozoários das cepas WT, WTR e Apo foram centrifugados a 600 g e ressuspensos na concentração de  $5 \times 10^8$  protozoários/ml nos tampões de respiração contendo sacarose e glicose e L-prolina,

sendo plaqueados 200  $\mu\text{L}$ /poço (microplaca de poliestireno com 96 poços, preta com fundo plano, F-Lumitrac 200, Greiner). O tampão de respiração com sacarose consistiu em 125 mM sacarose, 65 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,2), 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2,5 mM fosfato de potássio e 5 mM de succinato e o tampão de respiração com glicose e/ou L-prolina, foi composto por 20 mM glicose e/ou 10 mM L-prolina, 65 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,2), 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2,5 mM fosfato de potássio e 5 mM de succinato. Os protozoários foram então pré-tratados com os antioxidantes  $\alpha$ -tocoferol (160  $\mu\text{M}$ ) e NAC (1 mM) por 30 min à 28°C. Após esse período foi adicionada AA na concentração final de 64  $\mu\text{M}$  nas cepas WT e WTR e 25  $\mu\text{M}$  na cepa Apo, correspondendo à metade do valor de  $\text{IC}_{50}/2\text{h}$  das cepas WT e Apo, respectivamente, e sendo realizado um controle positivo da geração ROS com a AA na mesma concentração. Foi realizada uma nova incubação por mais 2h na mesma temperatura, sendo adicionados 5  $\mu\text{M}$  de Amplex Red (Molecular Probes) e 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de peroxidase (Sigma-Aldrich) após esse período de tempo. Foram realizadas leituras sequenciais por um período mínimo de 40 min (excitação: 530 nm/emissão: 590 nm) em fluorímetro SpectraMax M3 (Molecular Devices, Sunnyvale, EUA). Para determinação da concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  produzido nas amostras, foi feita uma curva padrão com essa espécie reativa. Para isso foi feita uma solução stock 1mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sendo adicionadas concentrações crescentes dessa espécie reativa a 200  $\mu\text{L}$  dos dois diferentes tampões de respiração e a 5  $\mu\text{M}$  de Amplex Red e 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de peroxidase. Foram utilizadas concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na faixa de 50 nM – 1  $\mu\text{M}$ , sendo realizadas adições gradativas de 50 nM da espécie reativa, seguidas de leituras sequenciais por 10 min nas mesmas condições experimentais.

### **3.12. Análise da peroxidação lipídica nas cepas de *S. culicis***

Os protozoários das cepas WT, WTR e Apo foram centrifugados a 600 g e ressuspensos na concentração de  $5 \times 10^9$  protozoários/mL em PBS 1x. Em 20  $\mu\text{L}$  dessa suspensão foram adicionados 8 mg/mL de ácido tiobarbitúrico (TBA, Sigma-Aldrich), para a obtenção de uma solução final com o volume de 60  $\mu\text{L}$ . As amostras foram incubadas à 98°C por 30 min, seguida da adição de 200  $\mu\text{L}$  de PBS 1x, sendo centrifugadas a 2400 g por mais 5 min. Após isso foram retirados 200  $\mu\text{L}$  da amostra, nos quais foi realizada leitura em espectrofotômetro (Molecular Devices, modelo SpectraMax Plus 384) a 532 nm. O controle positivo foi realizado através da

incubação das amostras com 64  $\mu\text{M}$  de AA nas cepas WT e WTR e 25  $\mu\text{M}$  na cepa Apo, respectivamente, por 2h à 28°C antes do início da reação.

### 3.13. Análise da expressão de genes do metabolismo energético e oxidativo nas cepas de *S. culicis*

Os protozoários das cepas WT, WTR e Apo foram centrifugados a 600 g e ressuspensos na concentração de  $10^8$  protozoários/mL no reagente Trizol (Invitrogen, Massachusetts, EUA), método selecionado para a extração de RNA das amostras e que foi realizado conforme especificado pelo fabricante. O RNA foi dosado em NanoDrop (ThermoFisher, Massachusetts, EUA) e o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado pelo kit *SuperScript Vilo* (Invitrogen). Foram selecionados genes do metabolismo oxidativo e energético, além de dois genes de expressão constitutiva (actina e estrutura paraflagelar), para que seja realizada a análise da expressão gênica. Para isso, foram selecionadas sequências de oligonucleotídeos iniciadores a partir do genoma de *S. culicis* depositado no GenBank e designado como PRJNA170971 (Motta *et al.*, 2013) (**Tabela 3.1**). Posteriormente, os cDNAs foram diluídos e utilizados na reação de PCR quantitativo, de acordo com as instruções do fabricante, utilizando-se o kit *Go-Taq PCR Master Mix* (Promega). As reações em tempo real foram realizadas em um sistema *ABI Prism 7500 FAST* (Applied Biosystem, Foster City, EUA), disponível na plataforma de PCR em Tempo Real PDTIS/FIOCRUZ (Pitaluga *et al.*, 2009). Para a determinação da eficiência dos iniciadores, foi realizada uma diluição 1:5 do cDNA e realizado o PCR quantitativo como descrito anteriormente.

**Tabela 3.1:** Sequências dos iniciadores *forward* e *reverse* dos alvos selecionados em *S. culicis*.

Alvo	Iniciador <i>forward</i> Iniciador <i>reverse</i>	Eficiência (%)	Fragmento (pb)
Enolase	5' CACCATCTCCGAGTCCATCG 3' 5' GTACGTGTCCTCCGTCTCAC 3'	93,3	97
Citrato sintase	5' ACCCGTACCTCTCCTTCTCC 3' 5' TCCACGTGTAATTGGTGAGC 3'	102,2	174
Piruvato desidrogenase	5' CCGCTTCGCTCCTTCTCTC 3' 5' TCGTCGAGGGCGAGGTT 3'	108,4	96
Complexo II	5' ATTGTGACGCCGTGGAAGCTT 3' 5' CACATCGAAGCTGTCCGTGA 3'	100,7	173

<b>Complexo III</b>	5' CTACAAGAAGGACCGCTGGG 3' 5' ATCTTGAGCTTGTCCGGTCCG 3'	82,4	114
<b>Complexo IV</b>	5' CGTCAAGAAGGAGTACGCGA 3' 5' CTTCTTGATCTCCTCCGCCG 3'	94,3	127
<b>ATP sintase</b>	5' CTTTGTGGCGCTCTTCAACC 3' 5' GAACTTGGCGTAGCTGACCT 3'	88	115
<b>NADPH-citocromo p450 redutase</b>	5' GTGCTCTTCATTAGCGCGAC 3' 5' CTGAAGCTGGTTCCACGTCT 3'	97,7	75
<b>Triparedoxina citosólica I</b>	5' TTCCCCTCCCTGAACTACCC 3' 5' AGAAGAGCACGACCCACTTG 3'	100,5	115
<b>Triparedoxina citosólica II</b>	5' CGCTAAGCTTAACCACCCCG 3' 5' TCTTCTTGAAGGTGCCGTCC 3'	88,5	109
<b>Triparedoxina mitocondrial</b>	5' TGTGTGCCCGACCGAAATTA 3' 5' CGCCAAGTGTGAATACTGCG 3'	105,8	71
<b>Actina</b>	5' TGCCATTCAACTGTTCGTCC 3' 5' GTATGGGTTTCGCCGTCCA 3'	93	76
<b>Estrutura paraflagelar</b>	5' CGGGAGAACGTGGAGCGACA 3' 5' TTCGATGCGGCGCTTGACCT 3'	273	111

### **3.14. Análise da adesão *ex vivo* ao intestino de *A. aegypti* pelas cepas de *S. culicis***

Protozoários das cepas de WT, WTR e Apo foram centrifugados a 600 g e ressuspensos na concentração de  $10^7$  protozoários/mL em PBS 1x. Essa suspensão (200  $\mu$ L) foi adicionada a 5 intestinos de *A. aegypti* por 1h à temperatura ambiente. Antes da incubação, os intestinos foram explantados de mosquitos fêmeas e abertos longitudinalmente para a exposição do ambiente interno. Após esse período, foram realizadas 10 lavagens com PBS 1x para a retirada dos protozoários não aderidos, sendo então realizada a maceração do intestino em 20  $\mu$ L de PBS 1x e a quantificação dos protozoários aderidos em câmara de Neubauer (d'Avila-Levy *et al.*, 2005).

### **3.15. Análise da infecção *in vivo* em *A. aegypti* pelas cepas de *S. culicis***

Os protozoários das cepas WT, WTR e Apo foram centrifugados a 600 g por 5 min e ressuspensos na concentração de  $10^8$  protozoários/ml em solução com 10% de sacarose e 1 mM de ATP. Para todas as análises da infecção *in vivo*, mosquitos fêmeas de *A. aegypti* foram alimentados com essa suspensão, por um período de

até 1h à 37°C (alimentadores artificiais), sendo em seguida separados os mosquitos alimentados, através da observação do abdômen dilatado. Os mosquitos utilizados foram mantidos antes e após a alimentação com uma solução contendo 10% de sacarose *ad libitum*, sendo essa alimentação retirada por um período de 4h antes da alimentação com os protozoários. Para os experimentos em que foi utilizado o ascorbato (5 mM), os mosquitos foram mantidos com a sacarose (em pó) e a solução do antioxidante *ad libitum* (antes e após a alimentação com os protozoários), não sendo disponibilizada durante o período da alimentação. Em ambos os casos, os mosquitos infectados foram mantidos à 28°C. Para os experimentos de contagem, foi realizada a alimentação dos mosquitos, como descrito acima, e nos tempos estabelecidos de 1, 5 e 11 dias após a alimentação foram explantados os intestinos de 10 mosquitos/tempo. Os intestinos foram macerados em 20 µL de PBS 1x e foi feita a quantificação dos protozoários em câmara de Neubauer. Para os experimentos de viabilidade dos mosquitos, foi realizada a alimentação dos mosquitos da maneira descrita acima, sendo feita a quantificação dos mosquitos vivos durante todos os dias, por um período de até 30 dias após a alimentação. Para todos os experimentos de contagem da infecção e viabilidade dos insetos foi realizado controle com os mosquitos alimentados somente com a solução com 10% de sacarose ou com 10% de sacarose + 5 mM de ascorbato. Além disso, foi realizado experimento com os protozoários aquecidos à 95°C por 30 min antes da alimentação, para a avaliação da participação da infecção na manutenção da viabilidade dos insetos.

### **3.16. Análise da infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais pelas cepas de *S. culicis***

Para avaliar o percentual de infecção das cepas WT, WTR, WTR<sup>+</sup> e Apo de *S. culicis* em células de mamíferos, macrófagos peritoneais foram obtidos por lavado peritoneal de camundongos *Swiss*, sendo as células ressuspensas em meio RPMI suplementado com 10% SFB, 4 mM L-glutamina (Gibco, Auckland, Nova Zelândia), 1000U/ml penicilina e 50µg/mL estreptomicina (Gibco), quantificadas e plaqueadas na concentração de 4x10<sup>5</sup> protozoários/mL em lamínulas de 12 mm por 24h a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> para adesão. Após lavagens com PBS 1x, os protozoários das cepas foram incubadas com os macrófagos nas proporções (MOI - multiplicidade de

infecção) de 1:3, 1:5 e 1:10 por 2h, sendo realizadas novas lavagens com PBS 1x para retirada dos protozoários não aderidos, sendo feita em seguida a coloração das lamínulas pelo método de panótico rápido (Laborclin, Paraná, Brasil). Nesse experimento foi utilizada a cepa WTR<sup>+</sup>, em que a resistência à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi aumentada até 1,5 mM, para a potencialização dos resultados, sendo os experimentos com essa cepa realizados apenas na proporção de 1:10.

### **3.17. Análises estatísticas**

Todos os dados numéricos obtidos estão apresentados na forma de média ± desvio padrão ou média ± erro padrão (o erro padrão foi utilizado apenas nos experimentos de PCR quantitativo). O teste de Mann-Whitney, utilizado para a comparação de duas amostras independentes não-paramétricas, foi aplicado em todos os experimentos, sendo comparados os grupos: WT x WTR e WT x Apo, com nível de significância de  $p \leq 0,05$ . O teste Log-Rank foi utilizado para os experimentos de viabilidade de *A. aegypti*, em que foram comparadas as curvas de sobrevivência dos mosquitos infectados e controle. Novamente foi considerado o nível de significância de  $p \leq 0,05$ .

### **3.18. Aspectos éticos**

Os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com as condições de biossegurança adequadas para execução do trabalho, sendo que os referidos experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Fiocruz (licença LW-16/13).

## **4. RESULTADOS**



Todos os pró-oxidantes testados sobre as cepas WT e Apo de *S. culicis* apresentaram valores de IC<sub>50</sub>/2h maiores na cepa WT em relação à Apo (**Tabela 4.1**). A cepa Apo foi no mínimo 1,5 vezes mais sensível à ação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, heme e FeSO<sub>4</sub>. Já a menadiona foi altamente ativa sobre as duas cepas, apresentando valor de IC<sub>50</sub>/2h de 37,1 ± 3,5 µM, cerca de cinco vezes maior do que o encontrado para a cepa sem o endossimbionte. Embora tenha apresentado diferença significativa entre as duas cepas, o paraquat apresentou baixa atividade pró-oxidante em *S. culicis*, com valores de IC<sub>50</sub>/2h na faixa de milimolar. Também foi avaliada a toxicidade dos antioxidantes α-tocoferol, urato, NAC e ascorbato, não sendo observada perda de viabilidade dos protozoários em concentrações até 1 mM para os 3 primeiros e até 5 mM para o ascorbato, nas duas cepas. Não foi observada diferença significativa nos valores de IC<sub>50</sub> obtidos para o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, quando comparado os tempos de 2 e 24h, tendo sido encontradas concentrações na faixa de 570,7 ± 31,7 µM e 360,2 ± 26,9 µM no maior tempo para as cepas WT e Apo, respectivamente.

**Tabela 4.1:** Efeito dos agentes pró-oxidantes (IC<sub>50</sub>/2h) sobre as cepas WT e Apo de *S. culicis* (µM)

	WT	Apo	IC <sub>50</sub> WT/ IC <sub>50</sub> Apo <sup>a</sup>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	543,9 <sup>b</sup> (± 32,3)	352,0 (± 33,5)*	1,5
<b>Heme</b>	636,9(± 126,3)	348,4 (± 31,4)*	1,8
<b>FeSO<sub>4</sub></b>	3448,6 (± 856,9)	1900,4 (± 214,3)*	1,8
<b>Menadiona</b>	37,1 (± 3,5)	7,7 (± 0,6)*	4,8
<b>Paraquat</b>	17816,1 (± 503,7)	12192,5 (± 643,7)**	1,5

<sup>a</sup>Razão IC<sub>50</sub>/2h WT/Apo. <sup>b</sup>Médias e desvios padrão de no mínimo 3 experimentos em duplicata. Teste de Mann-Whitney, sendo comparados os grupos WT x Apo, com nível de significância de p ≤ 0,05. \* Diferenças significativas em relação à WT (\*P ≤ 0,01; \*\*P ≤ 0,02)

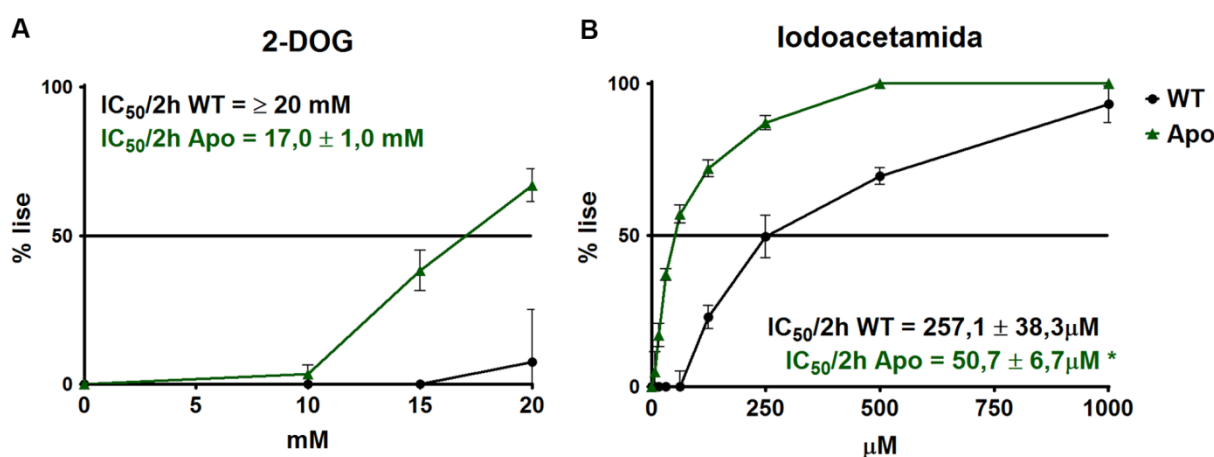
Os inibidores dos complexos da CTE mitocondrial também apresentaram IC<sub>50</sub>/2h maiores na cepa WT, sendo esta cepa três vezes mais resistente aos danos provocados pela AA (inibidor do complexo III), KCN e oligomicina (inibidor da ATP sintase) do que a cepa Apo. Já a rotenona e SHAM apresentaram as maiores diferenças entre as duas cepas, sendo a cepa Apo 35 e 4 vezes mais susceptível a esses compostos, respectivamente (**Tabela 4.2**).

**Tabela 4.2:** Efeito dos inibidores da CTE ( $IC_{50}/2h$ ) sobre as cepas WT e Apo de *S. culicis* ( $\mu M$ )

	WT	Apo	$IC_{50} \text{ WT} / IC_{50} \text{ Apo}^a$
<b>Rotenona</b>	13063,5 <sup>b</sup> ( $\pm 932,8$ )	374,6 ( $\pm 14,8$ )**	35
<b>AA</b>	122,8 ( $\pm 11,3$ )	49,7 ( $\pm 3,5$ )*	2,5
<b>KCN</b>	17883,3 ( $\pm 475,5$ )	6362,9 ( $\pm 339,6$ )*	2,7
<b>Oligomicina</b>	1154,9 ( $\pm 114,7$ )	545,7 ( $\pm 55,6$ )*	2,1
<b>SHAM</b>	13824,8 ( $\pm 1264,2$ )	3673,6 ( $\pm 279,1$ )*	4

<sup>a</sup>Razão  $IC_{50}/2h$  WT/Apo. <sup>b</sup>Médias e desvios padrão de no mínimo 3 experimentos em duplicata. . Teste de Mann-Whitney, sendo comparados os grupos WT x WTR, com nível de significância de  $p \leq 0,05$ . \* Diferenças significativas em relação à WT (\* $P \leq 0,01$ ; \*\* $P \leq 0,02$ ).

Foram testados também dois inibidores da glicólise, a 2-DOG e iodoacetamida (**Figuras 4.1A,B**). A cepa Apo se mostrou mais sensível à ação desses agentes, apresentando valores de  $IC_{50}/2h$  menores quando comparados a WT, sendo a iodoacetamida cinco vezes mais ativa sobre Apo. Por outro lado, as concentrações de 2-DOG foram extremamente altas, na faixa de milimolar, não sendo possível determinar com precisão o valor para a cepa WT.



**Figura 4.1:** Efeito dos inibidores da glicólise sobre as cepas WT e Apo de *S. culicis*. (A) 2-DOG. (B) Iodoacetamida. Os gráficos mostram os valores de média e desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. Foi utilizado o teste de Mann-Whitney, sendo comparados os grupos WT x Apo, com nível de significância de  $p \leq 0,05$ . Diferença significativa em relação à WT (\* $P \leq 0,01$ ).

Após a determinação dos valores de  $IC_{50}/2h$ , foi induzida a resistência da cepa WT à  $H_2O_2$ , através da adição gradativa desta ROS, gerando a cepa WTR.

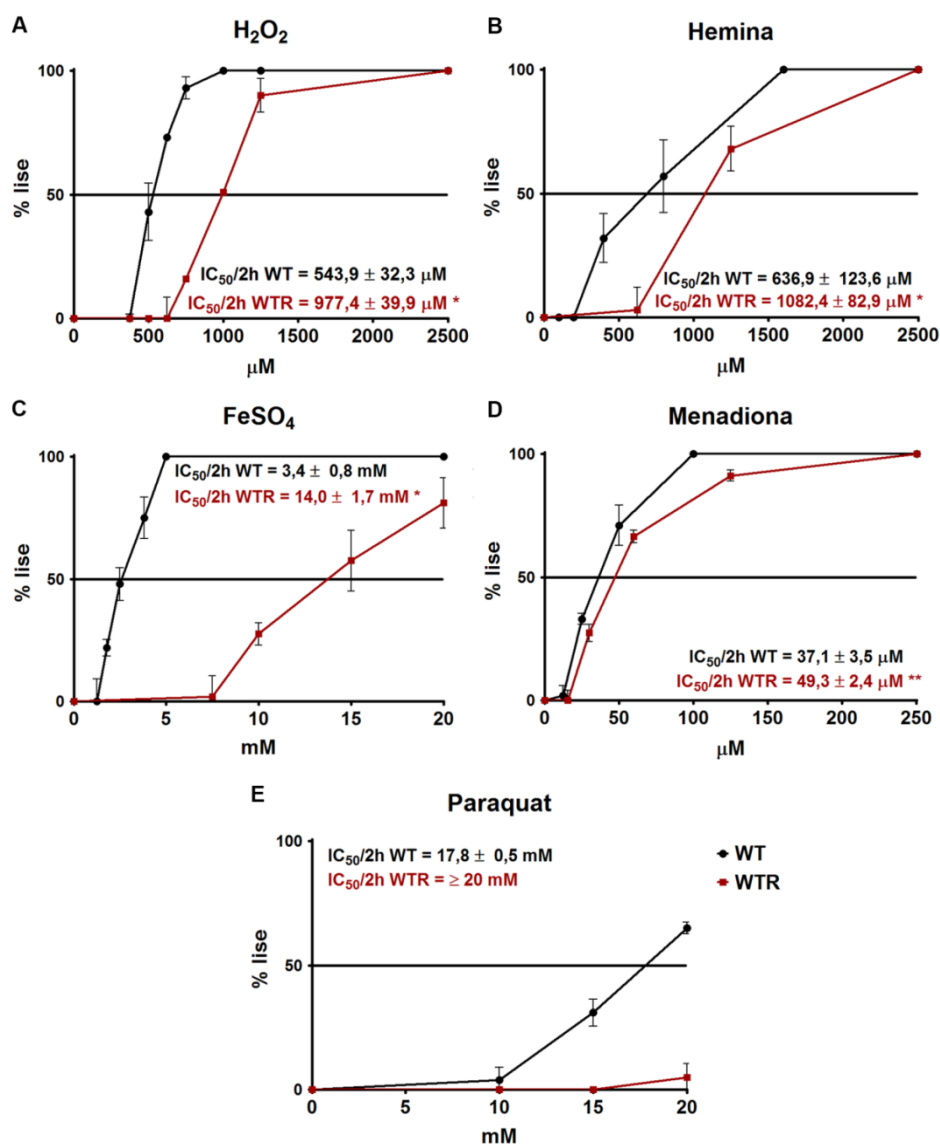
Nessa cepa foram então testados os mesmos agentes pró-oxidantes, inibidores de CTE e da glicólise. Nesse contexto, todos os pró-oxidantes empregados apresentaram valores de  $IC_{50}/2h$  mais altos na cepa WTR quando comparados com a cepa WT. A cepa WTR foi no mínimo duas vezes mais resistente à ação do  $H_2O_2$  e heme, e cerca de quatro vezes no caso de  $FeSO_4$ . Além disso, os valores de  $IC_{50}/2h$  para menadiona e paraquat também foram maiores nestes epimastigotas, sendo o aumento mais discreto no caso da menadiona. Devido ao grande aumento na concentração de paraquat suportada pela cepa WTR, não foi possível o cálculo do valor de  $IC_{50}/2h$ , uma vez que na maior concentração testada não houve 50% de lise celular (**Figura 4.2**). A toxicidade dos antioxidantes foi novamente testada, sendo os valores de  $IC_{50}/2h$  na faixa de 2,5 mM para o  $\alpha$ -tocoferol, urato e NAC, e acima de 5 mM para o ascorbato.

Em relação aos inibidores da CTE, WTR foi 23 vezes mais resistente aos danos gerados pela ação da AA do que a cepa não-resistente, entretanto, não houve alterações na viabilidade do protozoário após o tratamento com os demais inibidores rotenona, oligomicina e SHAM. Embora seja possível observar uma diminuição na ação do KCN após a indução de resistência, não foi possível calcular com exatidão o valor de  $IC_{50}/2h$  (**Figura 4.3**).

Por fim, assim como o observado para a cepa WT, a inibição da glicólise pela ação da 2-DOG também não teve efeito significativo na proliferação de epimastigotas da cepa WTR, diferentemente do observado após a incubação com a iodoacetamida, em que ocorreu um aumento de duas vezes no valor de  $IC_{50}/2h$  para a cepa resistente (**Figura 4.3F**).

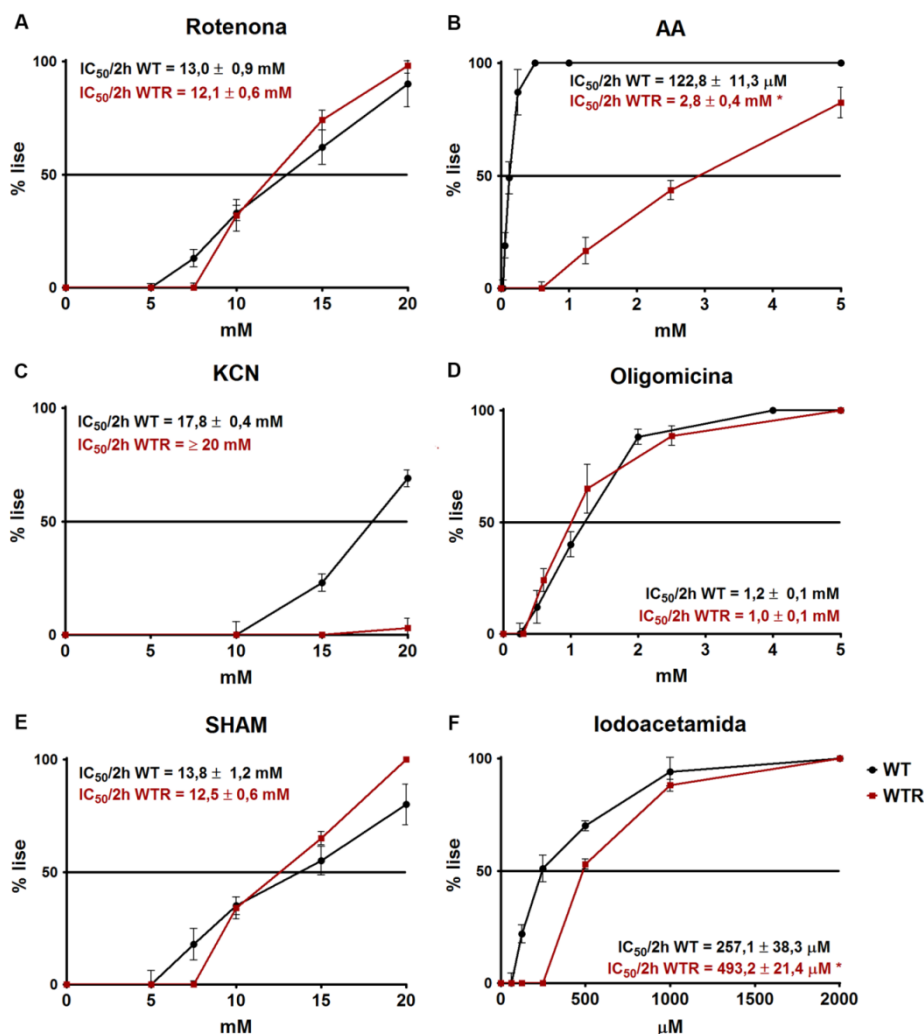
Para analisar se a ausência do endossimbionte e a indução de resistência à  $H_2O_2$  geraram algum dano ou modificação estrutural, as cepas de *S. culicis* foram processadas para MET. Como pode ser observado na **Figura 4.4**, a cepa WT apresenta morfologia típica, com a forma fusiforme alongada característica de epimastigotas, apresentando núcleo central e cinetoplasto localizado anteriormente ao núcleo e próximo à bolsa flagelar, de onde emerge o flagelo. Esse cinetoplasto apresenta uma rede de fibras mais frouxas, característico de tripanosomatídeos que possuem endossimbionte. Os protozoários também apresentam Golgi característico e uma mitocôndria única e ramificada ao longo do corpo celular. A mitocôndria, por sua vez, encontra-se próxima à membrana plasmática, e o endossimbionte se localiza próximo ao núcleo.

Na **Figura 4.5**, podemos observar que a cepa apossimbiótica apresenta algumas organelas típicas, como é o caso do núcleo, do retículo endoplasmático e dos glicosossomos. Essa cepa apresenta um perfil mitocondrial diferenciado, com uma mitocôndria alongada e próxima à membrana plasmática, semelhante ao encontrado na cepa WT, entretanto esta organela apresenta alguns pontos de inchaço mitocondrial, como pode ser observado nas **Figuras 4.5B,C**. Além disso, é possível identificar um maior número de cristas mitocondriais, inclusive algumas delas alargadas, como é possível observar na **Figura 4.5A**. Apesar disso, a eletrodensidade da mitocôndria e o cinetoplasto da cepa Apo permanecem semelhantes ao encontrado na cepa WT.



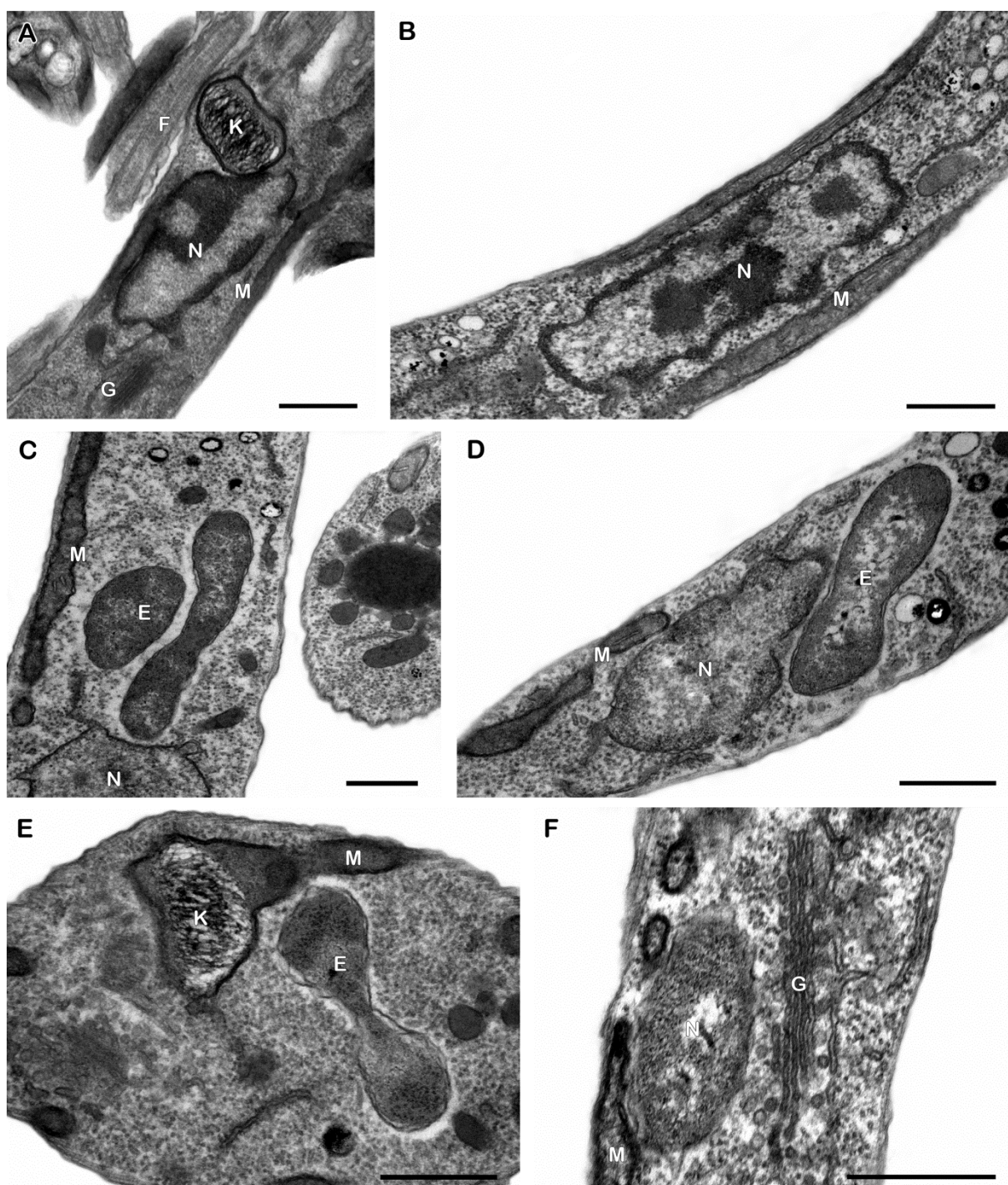
**Figura 4.2:** Efeito dos pró-oxidantes sobre as cepas WT e WTR de *S. culicis*. (A) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (B) Hemina. (C) FeSO<sub>4</sub>. (D) Menadiona. (E) Paraquat. Os gráficos mostram médias e desvios padrão de

peelo menos três experimentos independentes. Foi utilizado o teste de Mann-Whitney, sendo comparados os grupos WT x WTR, com nível de significância de  $p \leq 0,05$ . Diferenças significativas em relação à WT (\* $P \leq 0,01$ ; \*\* $P \leq 0,02$ ).

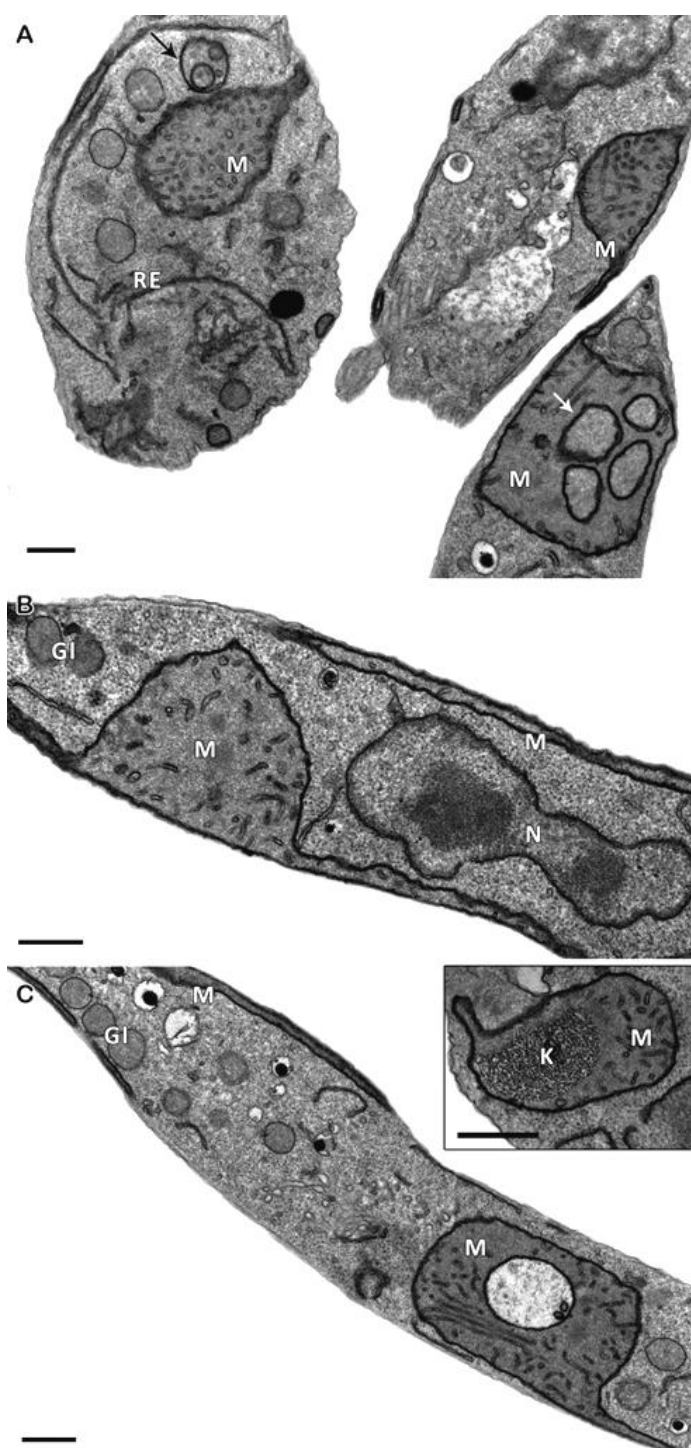


**Figura 4.3: Efeito dos inibidores da CTE e da glicólise sobre as cepas WT e WTR de *S. culicis*.** (A) Rotenona. (B) AA. (C) KCN. (D) Oligomicina. (E) SHAM (F) Iodoacetamida. Os gráficos mostram médias e desvios padrão de pelo menos três experimentos independentes. Foi utilizado o teste de Mann-Whitney, sendo comparados os grupos WT x WTR, com nível de significância de  $p \leq 0,05$ . Diferença significativa em relação à WT (\* $P \leq 0,01$ ).

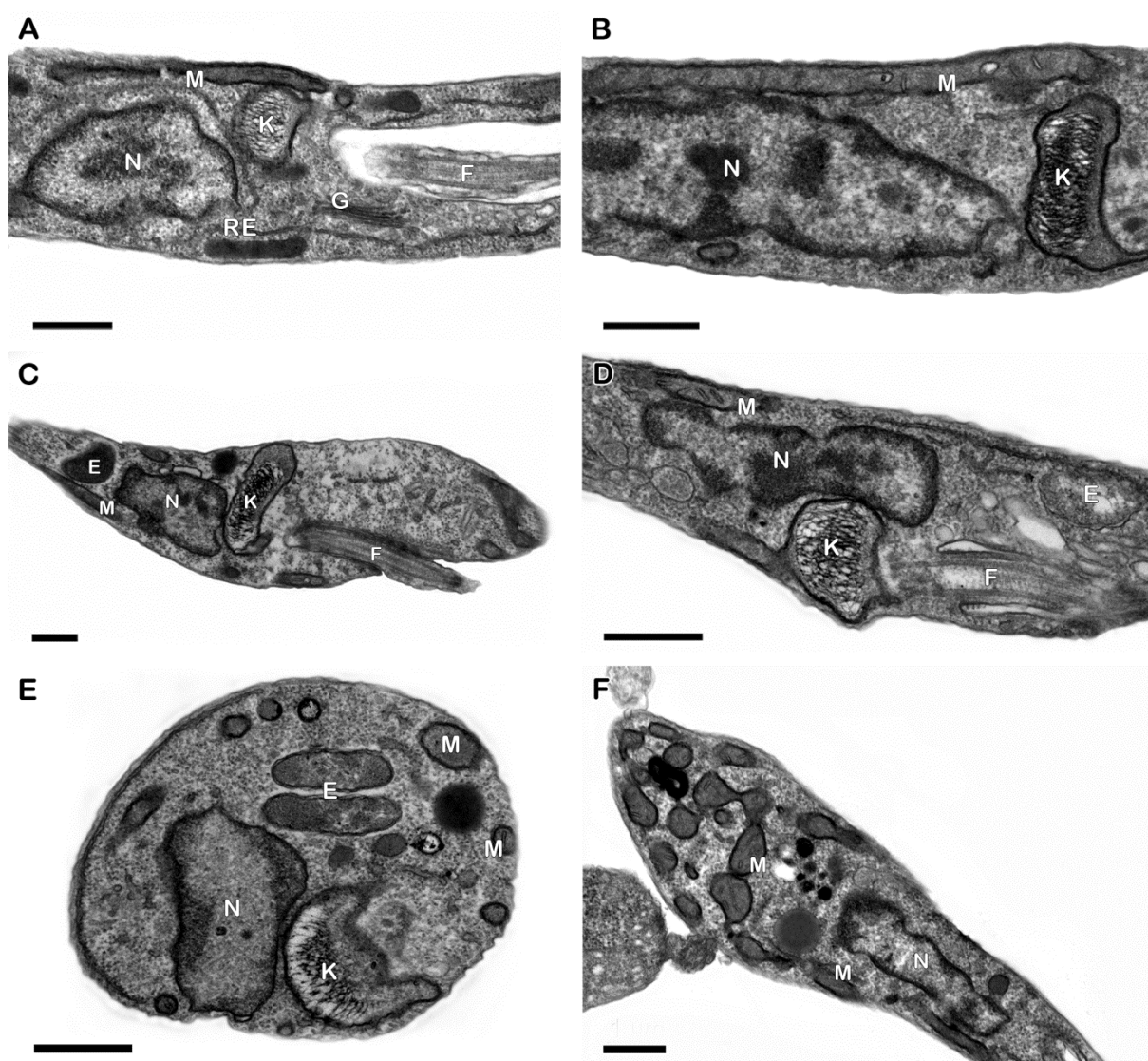
Na **Figura 4.6** observamos que a cepa resistente também apresentou morfologia típica semelhante à cepa WT, apresentando organelas como Golgi, retículo endoplasmático, núcleo e cinetoplasto com suas estruturas características. Na **Figura 4.6F**, pode-se observar uma mitocôndria amplamente ramificada, sugestivo de um aumento do volume mitocondrial. Novamente, o endossimbionte se localizou próximo ao núcleo do protozoário.



**Figura 4.4: Análise por MET da cepa WT de *S. culicis*.** (A,B) Protozoário apresentando morfologia típica da mitocôndria, cinetoplasto e núcleo. (C-E) Endossimbionte próximo ao núcleo e mitocôndria do protozoário. (F) Mitocôndria em contato com a membrana plasmática do tripanosomatídeo e Golgi característico. F - flagelo; K - cinetoplasto; N - núcleo; M - mitocôndria; G - Golgi; E - endossimbionte. Barras = 500 $\mu$ m.



**Figura 4.5: Análise por MET da cepa Apo de *S. culicis*.** (A) Protozoário apresentando mitocôndria com pontos de inchaço. (B) Morfologia típica de núcleo e glicossomos, mostrando a mitocôndria próxima à membrana plasmática do tripanosomatídeo e novamente o inchaço dessa organela em uma área específica. (C) Morfologia típica do protozoário, com a mitocôndria inchada. Detalhe do cinetoplasto com morfologia característica de tripanosomatídeos. K - cinetoplasto; N - núcleo; M - mitocôndria; RE - retículo endoplasmático; G - Golgi; Gl - glicossomo. Seta preta – estruturas membranares concêntricas; seta branca – cristas mitocondriais dilatadas. Barras = 200 $\mu$ m.

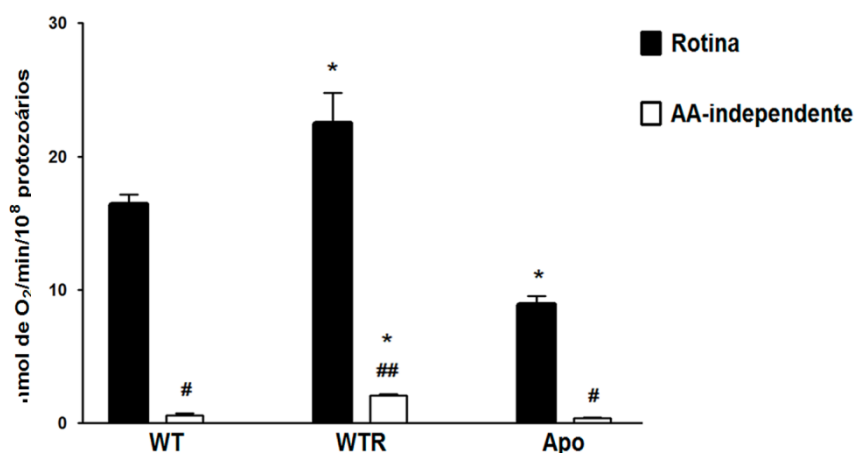


**Figura 4.6: Análise por MET da cepa WTR de *S. culicis*.** (A-C) Protozoários apresentando morfologia típica, com mitocôndria, núcleo e cinetoplasto característicos. (D-E) Endossimbionte próximo à mitocôndria e núcleo do protozoário. (F) Aumento da ramificação da mitocôndria de tripanosomatídeos da cepa WTR. F - flagelo; K - cinetoplasto; N - núcleo; M - mitocôndria; G - Golgi; E - endossimbionte; RE - retículo endoplasmático. Barras = 500µm.

Para a análise da fisiologia mitocondrial, avaliamos o consumo de  $O_2$  através de oxigrafia de alta resolução em tampão de respiração contendo sacarose como substrato. Quando comparamos a cepa WT com a Apo, percebemos uma diminuição no consumo de  $O_2$  de aproximadamente duas vezes, não havendo diferença significativa no consumo de  $O_2$  independente de AA. Além disso, esta análise apontou para um aumento de cerca de 50% no consumo de  $O_2$  da cepa WTR em relação a WT na rotina. Vimos também um aumento de 3,5 vezes no consumo de  $O_2$  AA-independente quando comparamos a cepa resistente com a não-



resistente. Nas três cepas vemos uma diminuição de mais de 90% no consumo após a adição da AA (**Figura 4.7**).

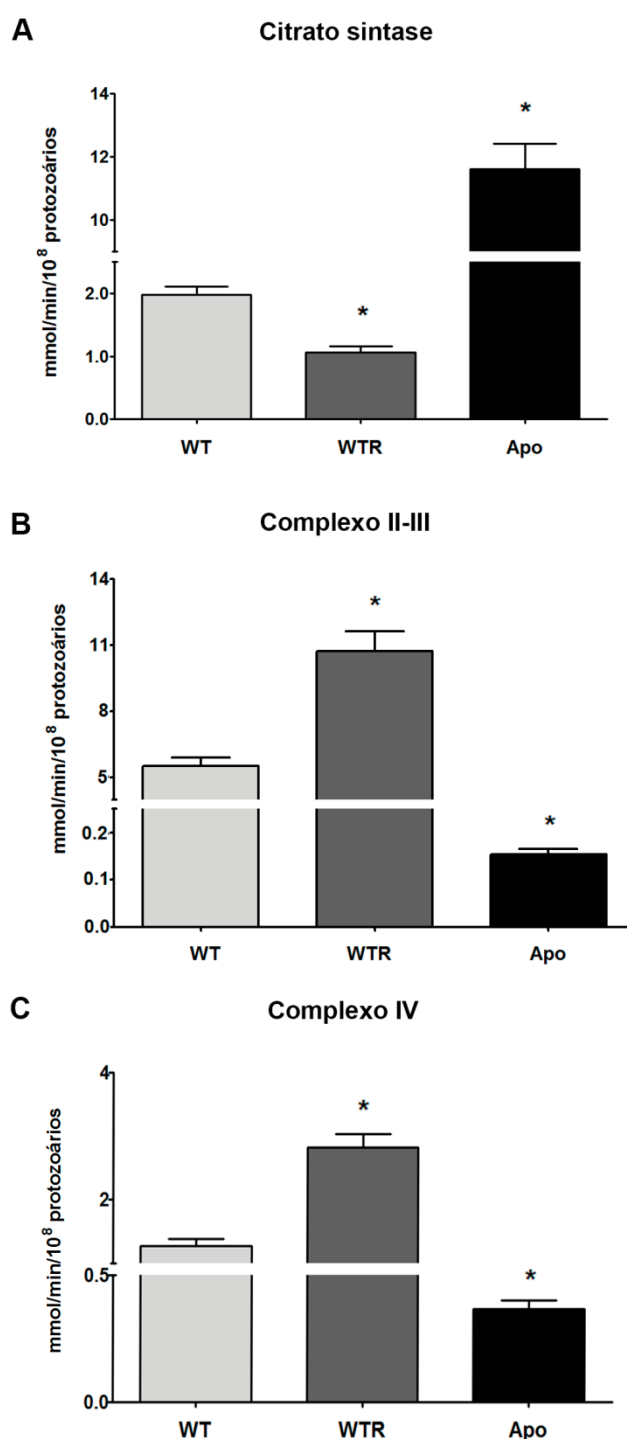


**Figura 4.7: Análise do consumo de O<sub>2</sub> nas cepas de *S. culicis*, nas condições de rotina e após a adição de AA.** Experimento realizado com o tampão de respiração contendo sacarose. O gráfico mostra médias e desvios padrão de pelo menos três experimentos independentes. Foi utilizado o teste de Mann-Whitney, sendo comparados os grupos: WT x WTR e WT x Apo, com nível de significância de  $p \leq 0,05$ . Diferenças significativas em comparação com a cepa WT nas condições de rotina e AA-independente ( $*P \leq 0,05$ ). Diferenças significativas em relação à condição de rotina das cepas ( $#P \leq 0,05$ ;  $##P \leq 0,01$ ).

Além disso, foram avaliadas as atividades da citrato sintase, do complexo II-III e do complexo IV da CTE. Na **Figura 4.8A**, pode ser observada uma diminuição de 50% na atividade da citrato sintase na cepa resistente em relação a não-resistente. Surpreendentemente, nota-se um aumento de seis vezes na atividade da enzima na cepa sem o endossimbionte, quando comparado com a cepa WT. Quando comparamos a atividade dos complexos mitocondriais entre as cepas, vemos que os protozoários resistentes apresentam atividade dos complexos II-III e IV duas vezes maior quando comparamos com a cepa WT. Já a eliminação do endossimbionte levou a uma diminuição de três vezes na atividade de ambos os complexos (**Figura 4.8B,C**).

Foi realizada a análise do  $\Delta\Psi_m$ , através da marcação com o composto fluorescente Rod 123, sendo calculado um IV que irá corresponder ao aumento/diminuição na fluorescência em relação à cepa WT. Foi possível observar que não houve diferença no  $\Delta\Psi_m$  da cepa sem o endossimbionte e da cepa selvagem, enquanto a cepa resistente teve um aumento de 45% (**Tabela 4.3**). Foi calculada a fluorescência das amostras incubadas com FCCP, um ionóforo que irá

dissipar o  $\Delta\Psi_m$ . Nesse caso, observamos que a incubação com esta molécula levou a uma diminuição de, no mínimo, 40% na marcação com Rod123.



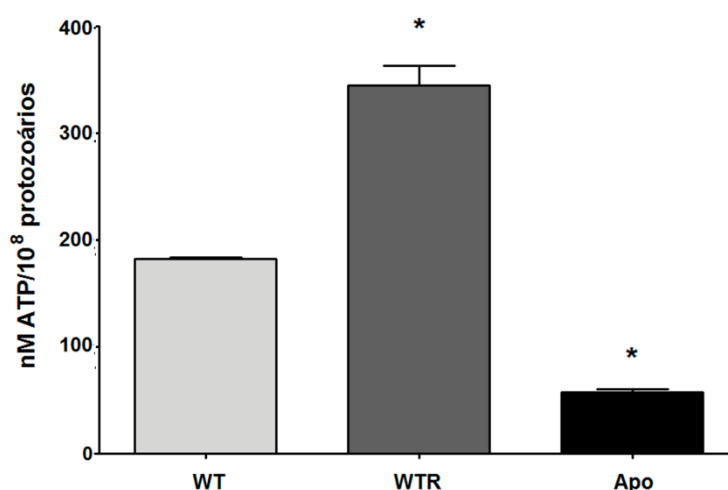
**Figura 4.8: Análise da atividade das enzimas mitocondriais nas cepas WT, WTR e Apo de *S. culicis*. (A) Citrato sintase. (B) Complexo II-III. (C) Complexo IV.** Os gráficos mostram médias e desvios padrão de pelo menos três experimentos independentes. Foi utilizado o teste de Mann-Whitney, sendo comparados os grupos: WT x WTR e WT x Apo, com nível de significância de  $p \leq 0,05$ . Diferenças significativas em relação à cepa WT (\* $P \leq 0,05$ ).

**Tabela 4.3:** Análise do  $\Delta\Psi_m$  das cepas de *S. culicis* a partir da marcação com Rod 123.

	Mediana	IV <sup>a</sup>
WT	1169,3 <sup>b</sup> ( $\pm 184,9$ )	1
WT + FCCP	576,9 ( $\pm 29,5$ ) <sup>#</sup>	0,42
WTR	1700,1 ( $\pm 230,3$ ) <sup>*</sup>	1,45
WTR + FCCP	799,0 ( $\pm 49,0$ ) <sup>*#</sup>	0,49
Apo	1159,0 ( $\pm 227,9$ )	0,99
Apo + FCCP	495,8 ( $\pm 217,9$ ) <sup>#</sup>	0,46

<sup>a</sup>IV calculado a partir da mediana de fluorescência da Rod 123. O IV foi calculado pela razão WTR/WT e Apo/WT nas condições sem o FCCP. Nas condições em que foi adicionado o FCCP, o IV foi calculado pela razão WT + FCCP/ WT, WTR + FCCP/ WTR e Apo + FCCP/Apo. <sup>b</sup>Médias e desvios padrão de no mínimo 3 experimentos. Teste de Mann-Whitney, sendo comparados os grupos: WT/WT + FCCP x WTR, WT/WT + FCCP x Apo, com nível de significância de  $p \leq 0,05$ . <sup>\*</sup>Diferenças significativas em relação à WT e WT + FCCP ( $*P \leq 0,05$ ). <sup>#</sup> Diferença significativa em relação à condição em que não houve adição de FCCP ( $#P \leq 0,05$ ).

Ainda avaliando a fisiologia mitocondrial, analisamos a produção de ATP nas cepas. Podemos observar que a eliminação do endossimbionte levou a uma diminuição de quase três vezes na produção de ATP nos protozoários em relação à WT. Por outro lado, após a indução de resistência, os protozoários passaram a produzir quase duas vezes mais ATP que a cepa selvagem (**Figura 4.9**).



**Figura 4.9:** Análise da produção de ATP nas cepas WT, WTR e Apo de *S. culicis*. O gráfico mostra médias e desvios padrão de pelo menos três experimentos independentes. Foi utilizado o teste de Mann-Whitney, sendo comparados os grupos: WT x WTR e WT x Apo, com nível de significância de  $p \leq 0,05$ . Diferenças significativas em relação à cepa WT ( $*P \leq 0,05$ ).

Para avaliar se a ausência do endossimbionte ou se a indução de resistência poderia levar a uma mudança metabólica nos protozoários, avaliamos a captação de glicose pela incubação com 2-NBDG, um análogo de glicose fluorescente. Como é possível observar na **Tabela 4.4**, a indução de resistência diminuiu a captação deste carboidrato em 30%, enquanto a cepa Apo apresentou um aumento de quase quatro vezes na captação dessa molécula, quando comparamos com a cepa WT. Foi feito um controle negativo à 4°C, onde é possível observar que a diminuição na temperatura diminui a captação de glicose pelos protozoários numa faixa de 30 – 60% (dados não mostrados). Também foi avaliado o percentual de protozoários marcados com o análogo fluorescente. Na cepa Apo foi observado um aumento de 30% no número de protozoários marcados com esta molécula em relação à WT, enquanto a resistência à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levou a uma diminuição de 60%. Além disso, a incubação à 4°C levou a uma diminuição de, no mínimo, 50% na quantidade de protozoários marcados quando comparamos a marcação das cepas na temperatura fisiológica, sendo mais evidente na cepa WTR, em que esse percentual chegou a 90% (**Figura 4.10**).

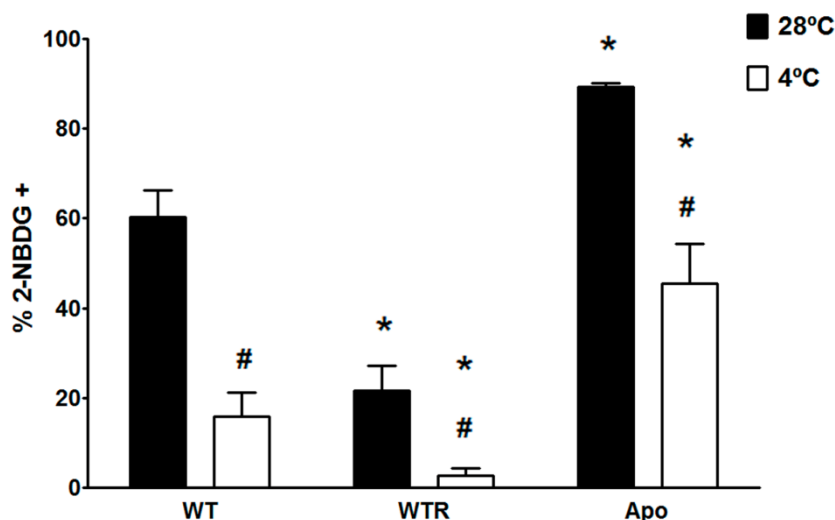
**Tabela 4.4:** Análise da captação de glicose pelas cepas de *S. culicis* a partir da marcação com 2-NBDG.

	Mediana	IV <sup>a</sup> 28°C
WT	10,8 <sup>b</sup> (±3,2)	1
WTR	7,6 (±2,7)*	0,7
Apo	41,5 (±19,4)*	3,8

<sup>a</sup>IV calculado a partir da mediana de fluorescência da 2-NBDG. O IV foi calculado pela razão da mediana de WTR/WT ou Apo/WT. <sup>b</sup>Médias e desvios padrão de no mínimo 3 experimentos. Teste de Mann-Whitney, sendo comparados os grupos: WT x WTR e WT x Apo, com nível de significância de  $p \leq 0,05$ . \*Diferenças significativas em relação à WT ( $*P \leq 0,05$ ).

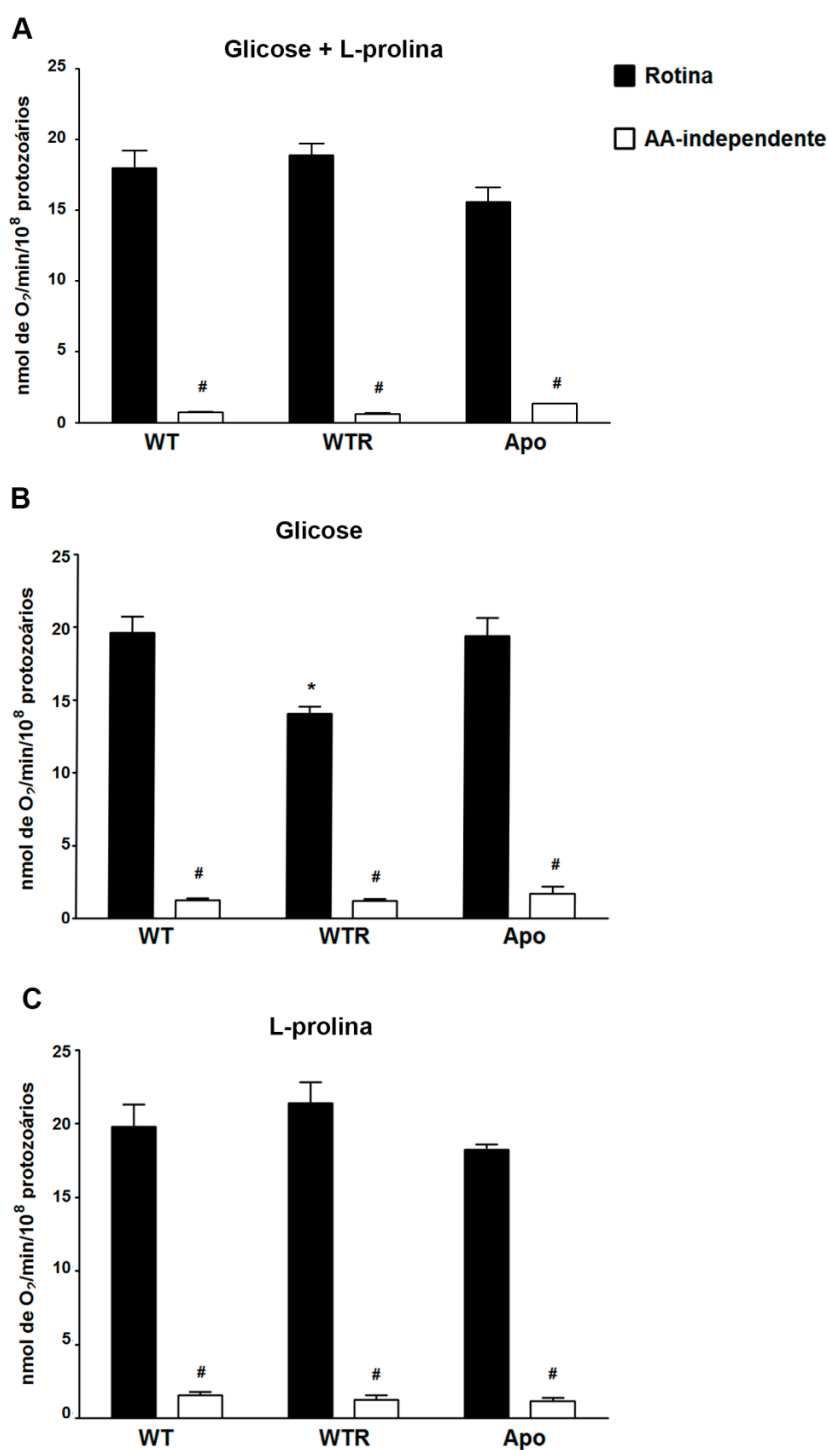
Para avaliar a dependência do metabolismo glicolítico, analisamos o perfil de consumo de O<sub>2</sub> testando um segundo tampão de respiração que possui como principais substratos a glicose e a L-prolina. Na **Figura 4.11A**, nota-se que no tampão com glicose e L-prolina não há diferença no consumo de O<sub>2</sub> entre as cepas WT e WTR. Também não havendo diferença no consumo de O<sub>2</sub> AA-independente nessas duas cepas. Os resultados demonstram que a cepa apossimbiótica, passou a consumir a mesma quantidade de O<sub>2</sub> que a cepa WT, quando os substratos fornecidos foram a glicose e a L-prolina. Apesar das diferenças observadas com a

troca dos tampões de respiração, as cepas WT e WTR não apresentaram perda na viabilidade durante a incubação com ambos os tampões contendo sacarose ou glicose e L-prolina. Essas análises foram feitas com até 4 h de incubação (dados não mostrados).



**Figura 4.10: Análise do percentual de protozoários de *S. culicis* 2-NBDG+ nas temperaturas de 28°C e 4°C.** O gráfico mostra médias e desvios padrão de no mínimo três experimentos independentes. Foi utilizado o teste de Mann-Whitney, sendo comparados os grupos: WT x WTR, WT x Apo e 28°C x 4°C, com nível de significância de  $p \leq 0,05$ . Diferenças significativas em comparação com a cepa WT nas temperaturas de 28°C e 4°C (\* $P \leq 0,05$ ). Diferenças significativas entre as temperaturas de 28°C e 4°C nas cepas ( $\#P \leq 0,05$ ).

Para analisarmos qual substrato estaria alterando o perfil de consumo das cepas, foi realizada a incubação dos protozoários com tampões de respiração somente com a glicose ou a L-prolina. Na **Figura 4.11B,C** podemos observar que não houve diferença no consumo de  $O_2$  entre as cepas selvagem e aposimbótica quando utilizado ambos os tampões. Também não havendo diferença no consumo das cepas quando comparamos com o tampão que possui os dois substratos. Resultado semelhante foi encontrado para a cepa WTR no tampão com L-prolina, entretanto, esta cepa consumiu menos  $O_2$  no tampão que possui somente a glicose como substrato, novamente quando comparamos com a cepa WT nas mesmas condições. Essa diferença permaneceu quando comparamos o consumo da cepa resistente com os tampão contendo glicose e glicose e L-prolina.



**Figura 4.11: Análise do consumo de O<sub>2</sub> nas cepas de *S. culicis*, nas condições de rotina e após a adição de AA.** Experimentos realizados com diferentes tampões. **(A)** Tampão de respiração contendo glicose + L-prolina. **(B)** Tampão de respiração contendo glicose. **(C)** Tampão de respiração contendo L-prolina. Os gráficos mostram médias e desvios padrão de pelo menos três experimentos independentes. Foi utilizado o teste de Mann-Whitney, sendo comparados os grupos: WT x WTR e WT x Apo, com nível de significância de  $p \leq 0,05$ . Diferenças significativas em comparação com a cepa WT nas condições de rotina e AA-independente ( $*P \leq 0,05$ ). Diferenças significativas em relação à condição de rotina das cepas ( $^{\#}P \leq 0,05$ ).

Adicionalmente, o pré-tratamento com os antioxidantes  $\alpha$ -tocoferol, urato, ascorbato e NAC, seguido pelo desafio com  $H_2O_2$  ou AA (valor de  $IC_{50}/2h$ ) foi realizado. Na **Figura 4.12**, observa-se que os antioxidantes restauraram o número de células da cepa WT de forma dose-dependente após os dois estímulos oxidativos empregados. Por outro lado, como esperado, os pró-oxidantes não apresentaram efeito deletério quando incubados com a cepa resistente nas concentrações de  $IC_{50}/2h$  da cepa WT, não sendo observado efeito protetor dos antioxidantes (**Figura 4.13**). Visando confirmar a resistência observada, um novo desafio foi realizado na cepa WTR com  $H_2O_2$  ou AA em concentração mais elevada ( $H_2O_2$ : 950  $\mu M$  e AA: 2,5 mM). Podemos observar que os antioxidantes foram capazes de restaurar a viabilidade celular, de forma semelhante ao observado na cepa WT (**Figura 4.14**). Foi avaliado também o efeito do pré-tratamento com os quatro antioxidantes na cepa Apo de *S. culicis* seguido do desafio com  $H_2O_2$  ou AA ( $IC_{50}/2h$ ). Podemos observar na **Figura 4.15** que os antioxidantes, embora não tenham sido capazes de preservar totalmente a viabilidade celular, como ocorreu com as outras cepas, diminuíram o efeito deletério do  $H_2O_2$  e AA.

Subsequentemente, a geração de ROS nas cepas WT, WTR e Apo, no tampão com sacarose, foi avaliada. Podemos observar que o desafio com 64  $\mu M$  de AA ( $1/2 IC_{50}/2h$ ) aumentou a geração de ROS em, aproximadamente, 40% para a cepa WT e em 110% para a cepa resistente. Nas condições em que houve o pré-tratamento com os antioxidantes, as concentrações de ROS diminuíram aos níveis basais nas duas cepas, quando comparado com a condição controle. Além disso, foi possível notar que, mesmo na ausência do desafio com AA, os protozoários da cepa WTR incubados apenas com os antioxidantes conseguiram diminuir as concentrações de espécies reativas abaixo dos níveis do controle sem antioxidantes. Comparando as cepas WT e WTR, nota-se que os epimastigotas resistentes geraram menores níveis de ROS em todas as condições testadas. A incubação da cepa Apo com 25  $\mu M$  ( $1/2 IC_{50}/2h$ ) aumentou a produção de ROS em 300%, além disso, essa cepa apresentou uma geração de espécies reativas no mínimo duas vezes maior que a cepa WT em todas as condições testadas. Diferentemente do encontrado para as outras cepas, apenas o NAC foi capaz de reverter parcialmente a produção de ROS (**Figura 4.16**).

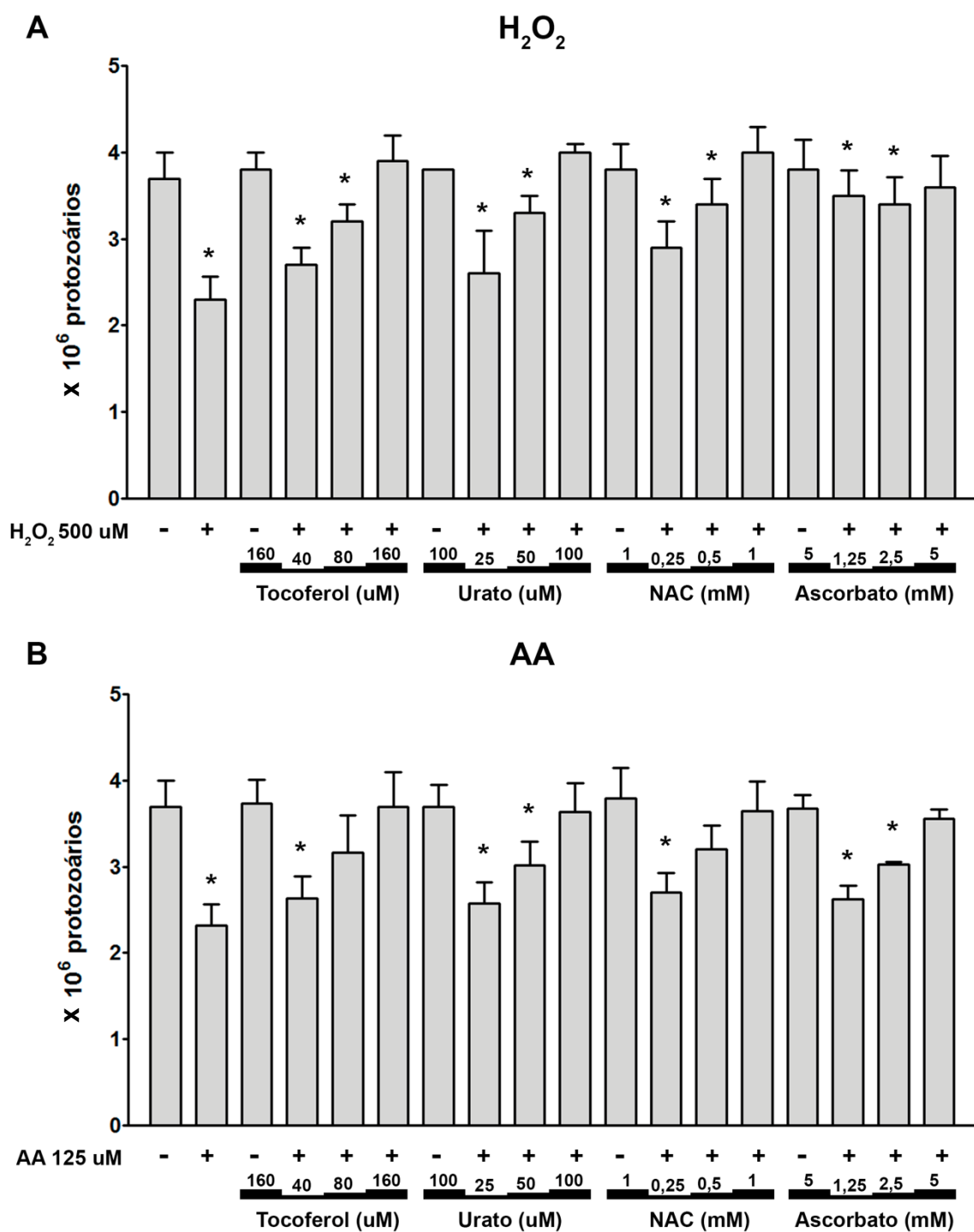


Figura 4.12: Efeito do pré-tratamento com antioxidantes e subsequente desafio com os pró-oxidantes na cepa WT de *S. culicis*. (A)  $H_2O_2$  (500  $\mu$ M). (B) AA (125  $\mu$ M). Os gráficos mostram médias e desvios padrão de pelo menos quatro experimentos independentes. Foi utilizado o teste de Mann-Whitney, com nível de significância de  $p \leq 0,05$ . Diferenças significativas em relação aos controles ou incubados apenas com antioxidantes na maior concentração. (\*  $P \leq 0,05$ ).



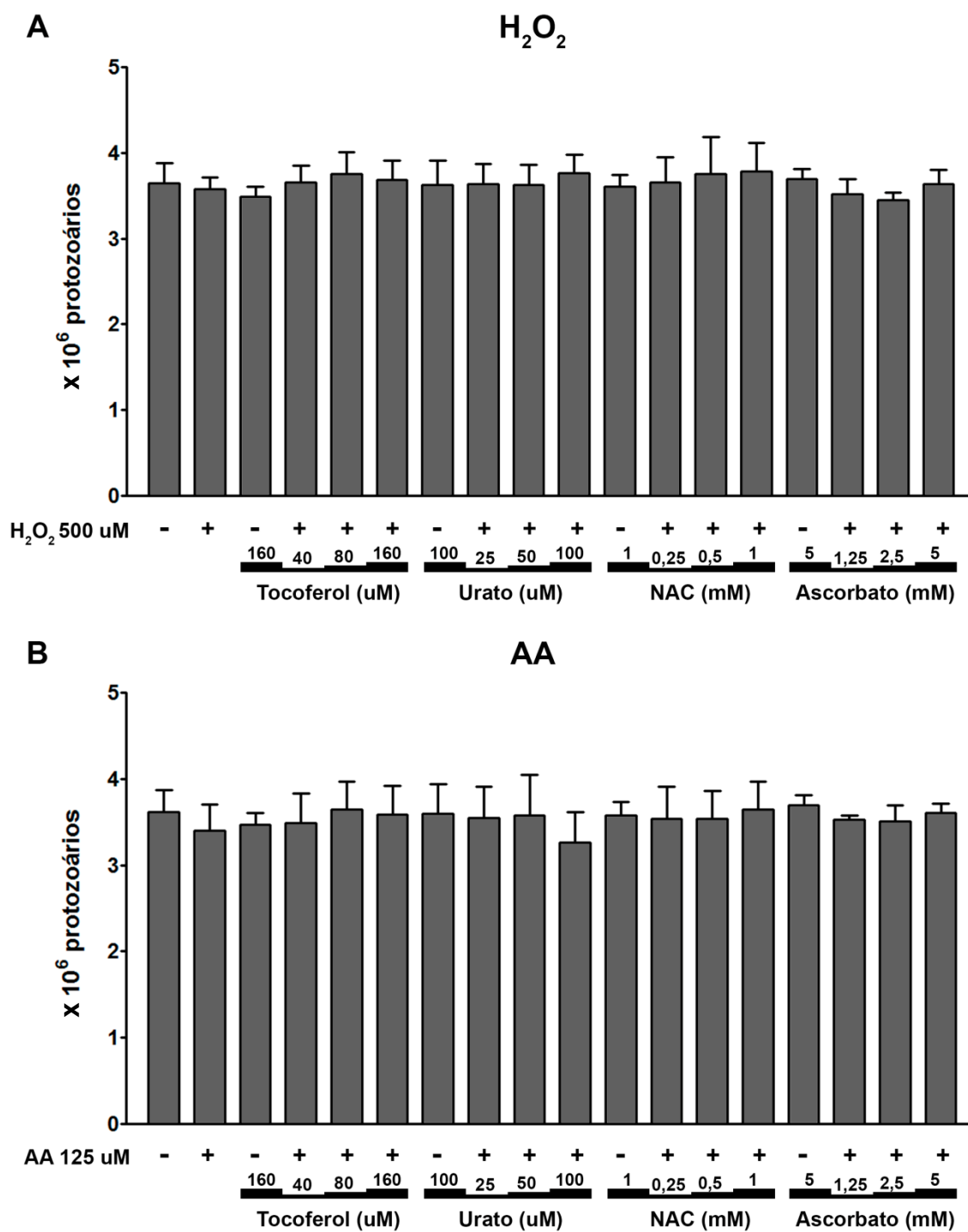


Figura 4.13: Efeito do pré-tratamento com antioxidantes e subsequente desafio com os pró-oxidantes na cepa WTR de *S. culicis*. (A)  $H_2O_2$  (500  $\mu$ M). (B) AA (125  $\mu$ M). Os gráficos mostram médias e desvios padrão de pelo menos três experimentos independentes.

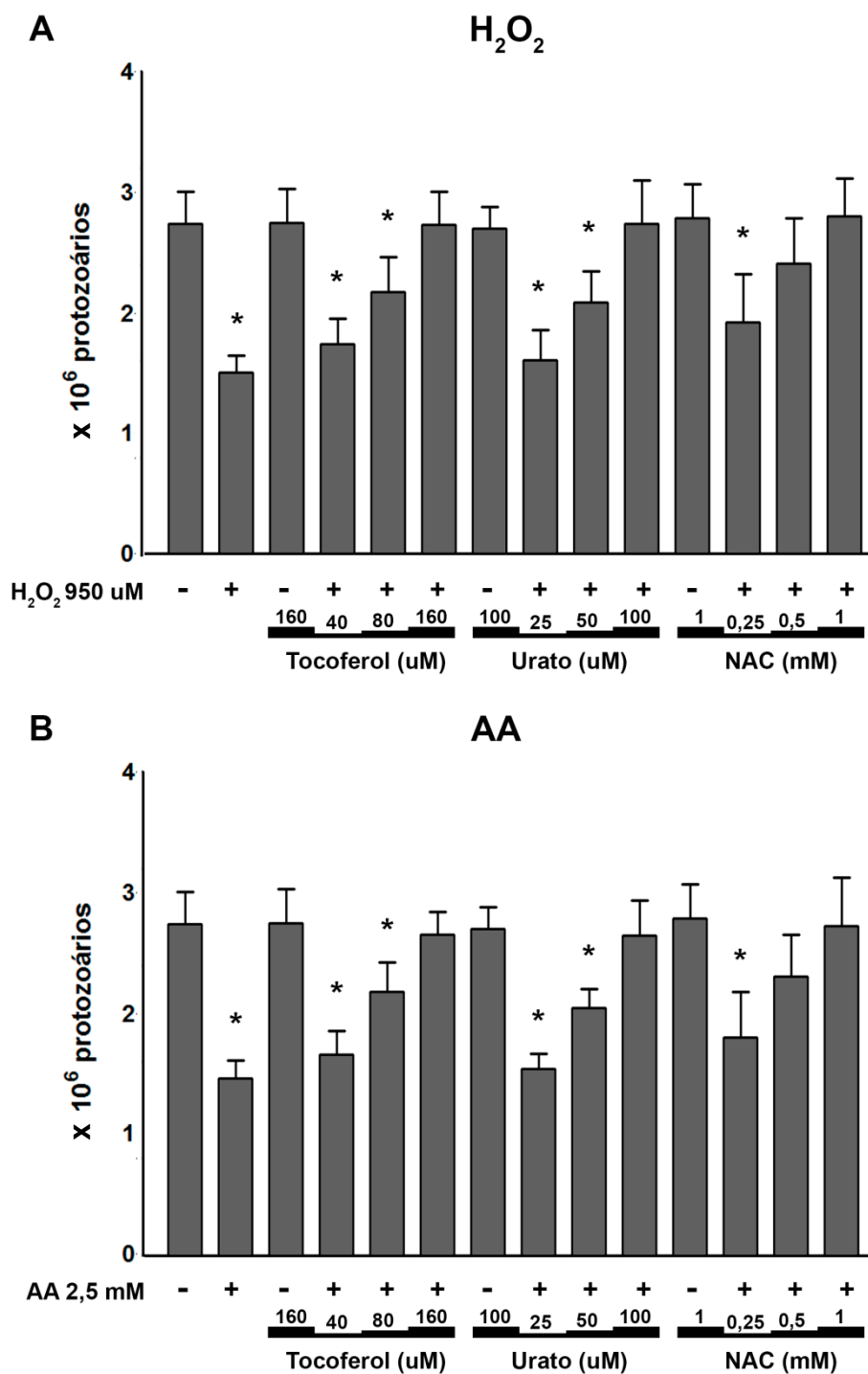


Figura 4.14: Efeito do pré-tratamento com antioxidantes e subsequente desafio com os pró-oxidantes na cepa WTR de *S. culicis* (A)  $H_2O_2$  (950  $\mu$ M). (B) AA (2,5 mM). Os gráficos mostram médias e desvios padrão de pelo menos três experimentos independentes. Foi utilizado o teste de Mann-Whitney, com nível de significância de  $p \leq 0,05$ . Diferenças significativas em relação aos controles ou incubados apenas com antioxidantes na maior concentração. (\* $P \leq 0,05$ ).

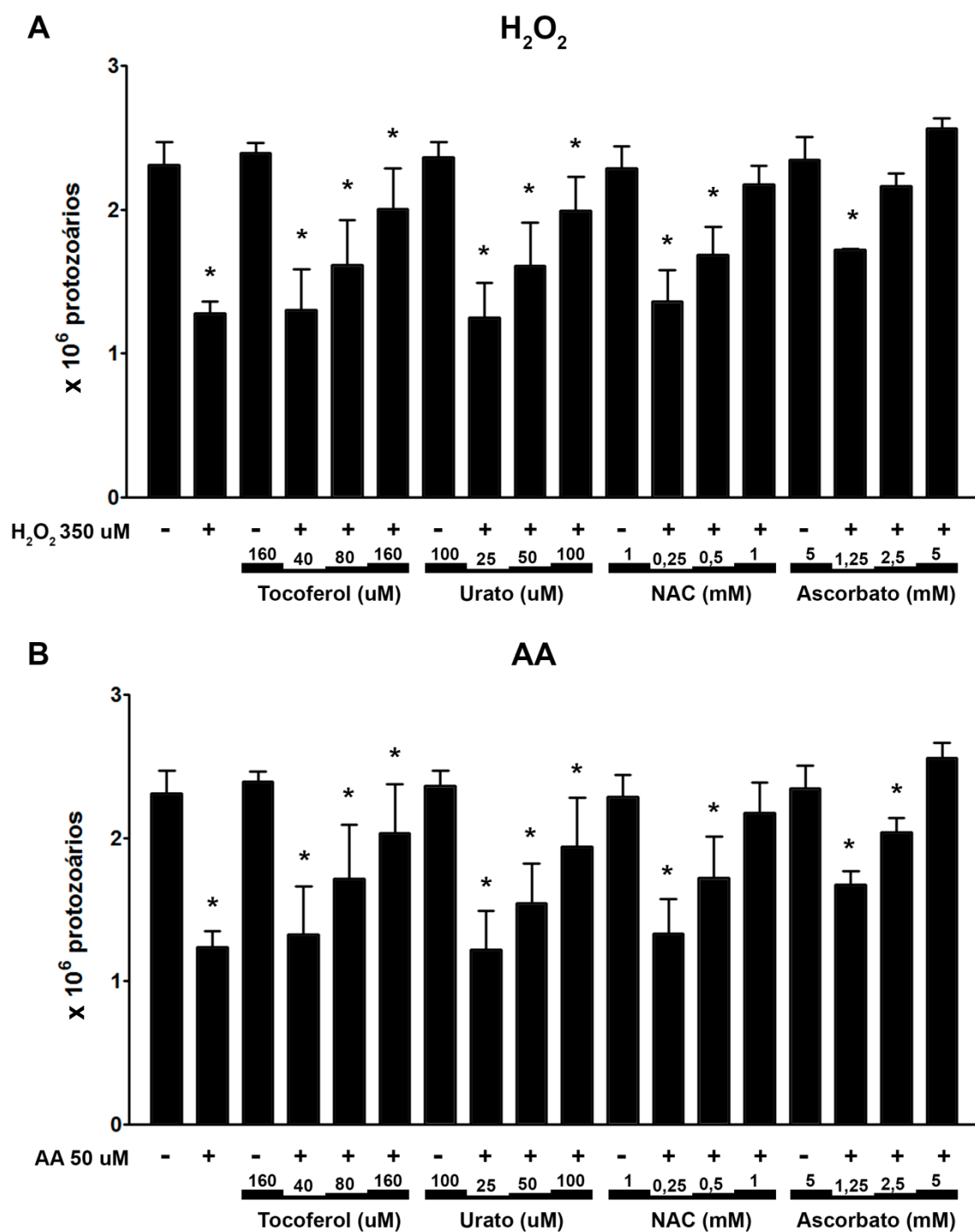


Figura 4.15: Efeito do pré-tratamento com antioxidantes e subsequente desafio com os pró-oxidantes na cepa Apo de *S. culicis* (A)  $H_2O_2$  (350  $\mu$ M). (B) AA (50  $\mu$ M). Os gráficos mostram médias e desvios padrão de pelo menos três experimentos independentes. Foi utilizado o teste de Mann-Whitney, com nível de significância de  $p \leq 0,05$ . Diferenças significativas em relação aos controles ou incubados apenas com antioxidantes na maior concentração. (\* $P \leq 0,05$ ).

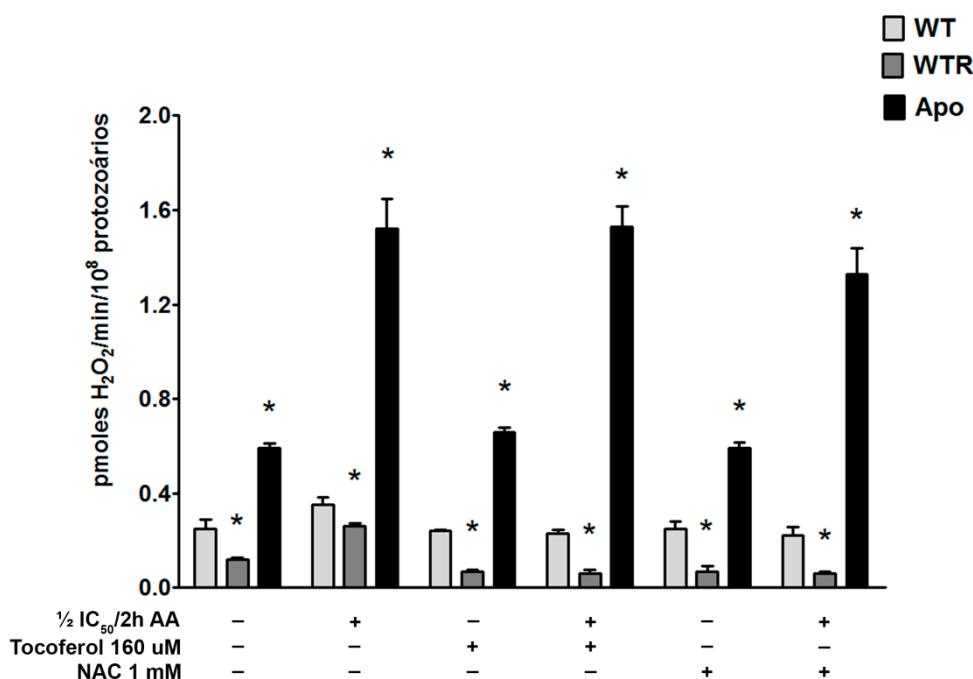
Novas dosagens de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram realizadas com o tampão contendo glicose e L-prolina. Na cepa WT, podemos notar um aumento na produção de ROS na presença de 64 µM de AA, entretanto, embora os níveis de ROS não sejam restaurados ao controle, as concentrações da espécie reativa diminuem na presença de α-tocoferol e NAC em cerca de 20 e 40%, respectivamente. Já na cepa WTR, apenas o NAC é capaz de diminuir as concentrações de ROS após o desafio com AA, sendo essa diminuição de 40%. Além disso, quando utilizamos o tampão com glicose e L-prolina não foram observadas diferenças entre a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas cepas selvagem e resistente. Já quando comparamos a cepa WT e Apo, vemos um aumento na produção de ROS em todas as condições testadas, sendo este aumento de cerca de vinte vezes. Tanto o α-tocoferol quanto o NAC conseguiram diminuir a produção de espécies reativas, entretanto, nenhum deles foi capaz de restaurar a produção aos níveis basais da cepa sem o endossimbionte (**Figura 4.17**). Quando comparamos a geração de ROS entre os tampões, vemos que o fornecimento de glicose e L-prolina aumenta a produção nas três cepas, em no mínimo duas vezes, em todas as condições testadas.

Para analisar o dano oxidativo sofrido pelas cepas de *S. culicis*, avaliamos a peroxidação lipídica nos protozoários. Como é possível observar na **Figura 4.18**, a indução com AA, na concentração de  $1/2$  IC<sub>50</sub>/2h das cepas WT e Apo, foi capaz de aumentar em 50% o dano oxidativo nas três cepas. Quando comparamos a cepa WT e Apo não vemos diferença na peroxidação lipídica tanto nas condições controle quanto após a adição de AA. Já quando comparamos a cepa selvagem e resistente, vemos que a última apresenta três vezes menos dano oxidativo na condição controle. Já após a incubação com AA, WTR apresentou duas vezes mais danos (**Figura 4.18**).

Fomos então avaliar a expressão diferencial de genes relacionados ao metabolismo oxidativo e energético. Para isso, foram desenhados 13 pares de iniciadores, sendo 11 alvos do metabolismo e 2 alvos de genes constitutivos, que foram utilizados para a normalização dos dados. Para garantir que os iniciadores estavam funcionando de maneira correta e amplificando apenas o gene para o qual foram desenhados, observamos as curvas de *melting*, em que foi possível observar apenas um pico na temperatura de dissociação, garantindo a presença de um único produto proveniente da reação (**Figura 4.19**).

Assim, avaliamos a expressão relativa dos genes em comparação com a expressão encontrada na cepa WT. Foi possível observar que grande parte dos

genes avaliados apresentou expressão relativa similar a de WT, tanto na cepa resistente quanto na cepa aposimbótica. Na cepa WTR, as únicas exceções a isso foram uma das subunidades do complexo II da CTE e a molécula antioxidante triparedoxina, encontrada no citoplasma. Ambas as enzimas tiveram sua expressão aumentada, sendo quatro e duas vezes mais expressas após a indução de resistência. Quando observamos a expressão relativa dos genes da cepa Apo, observamos que as enzimas citrato sintase e uma das subunidades da piruvato desidrogenase tiveram uma diminuição de expressão de 50% na cepa aposimbótica. Já a molécula antioxidante triparedoxina, tanto as duas isoformas citosólicas quanto a isoforma mitocondrial, teve sua expressão aumentada, mais de três vezes para a isoforma citoplasmática e 2,5 vezes para a mitocondrial (**Figura 4.20**).



**Figura 4.16:** Análise da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas cepas WT, WTR e Apo de *S. culicis* após o pré-tratamento com os antioxidantes  $\alpha$ -tocoferol (160  $\mu$ M) e NAC (1 mM), seguido do desafio com 1/2 IC<sub>50</sub>/2h de AA da cepa WT (64  $\mu$ M) ou da cepa Apo (25  $\mu$ M). Experimento realizado como tampão de respiração contendo sacarose. O gráfico mostra médias e desvios padrão de pelo menos três experimentos independentes. Foi utilizado o teste de Mann-Whitney, com nível de significância de  $p \leq 0,05$ . Diferenças significativas em comparação com a cepa WT nas condições testadas (\* $P \leq 0,05$ ).

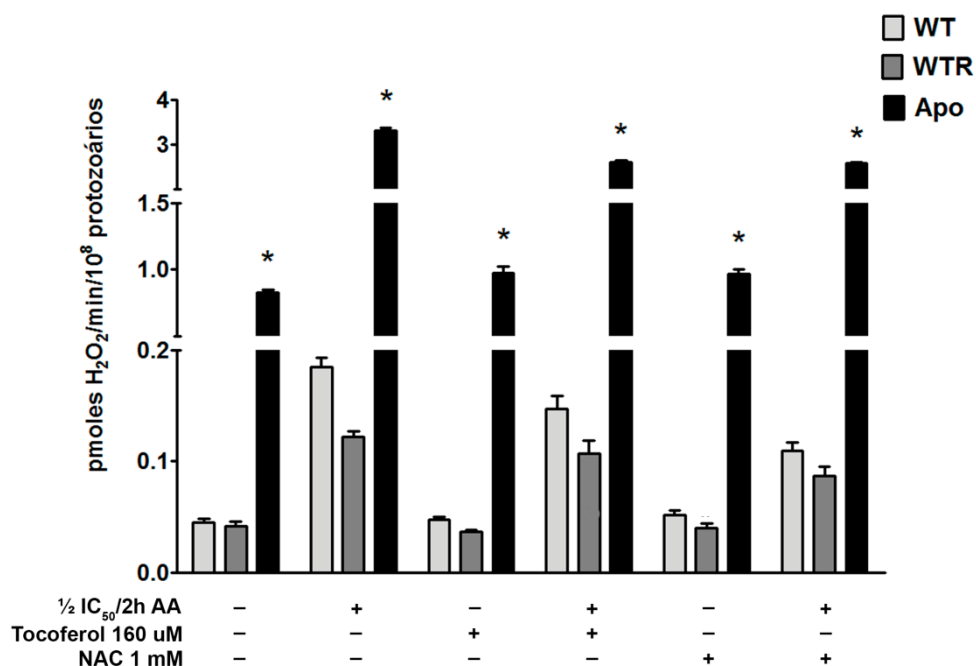


Figura 4.17: Análise da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas cepas WT, WTR e Apo de *S. culicis* após o pré-tratamento com os antioxidantes  $\alpha$ -tocoferol (160  $\mu$ M) e NAC (1 mM), seguido do desafio com 1/2 IC<sub>50</sub>/2h de AA da cepa WT (64  $\mu$ M) ou da cepa Apo (25  $\mu$ M). Experimento realizado como tampão de respiração contendo glicose e L-prolina. O gráfico mostra médias e desvios padrão de pelo menos três experimentos independentes. Foi utilizado o teste de Mann-Whitney, com nível de significância de  $p \leq 0,05$ . Diferenças significativas em comparação com a cepa WT nas condições testadas (\* $P \leq 0,05$ ).

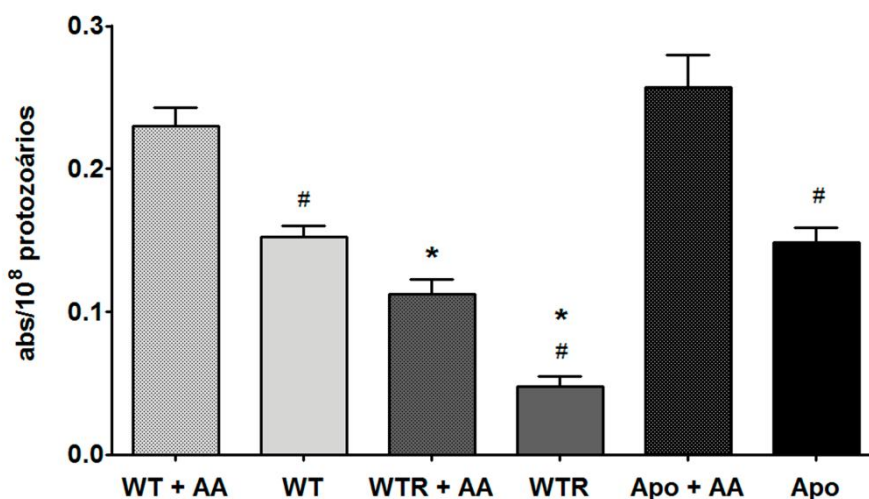
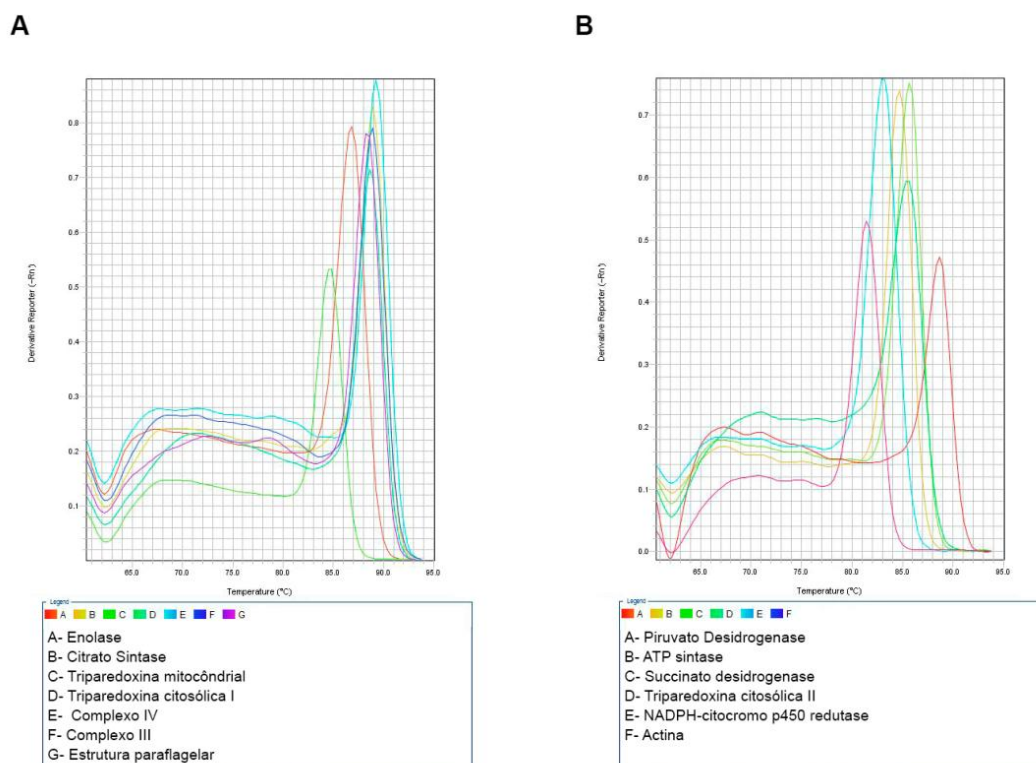


Figura 4.18: Análise da peroxidação lipídica nas cepas WT, WTR e Apo de *S. culicis*. Foi adicionada a concentração de 1/2 IC<sub>50</sub>/2h de AA da cepa WT (64  $\mu$ M) ou da cepa Apo (25  $\mu$ M). O gráfico mostra médias e desvios padrão de pelo menos três experimentos independentes. Foi utilizado o teste de Mann-Whitney, sendo comparados os grupos: WT x WTR e WT x Apo, com nível de significância de  $p \leq 0,05$ . Diferenças significativas em comparação com a cepa WT nas condições testadas (\* $P \leq 0,05$ ). Diferenças significativas em comparação com a condição em que foi adicionada

AA nas cepas ( $\#P \leq 0,05$ ).

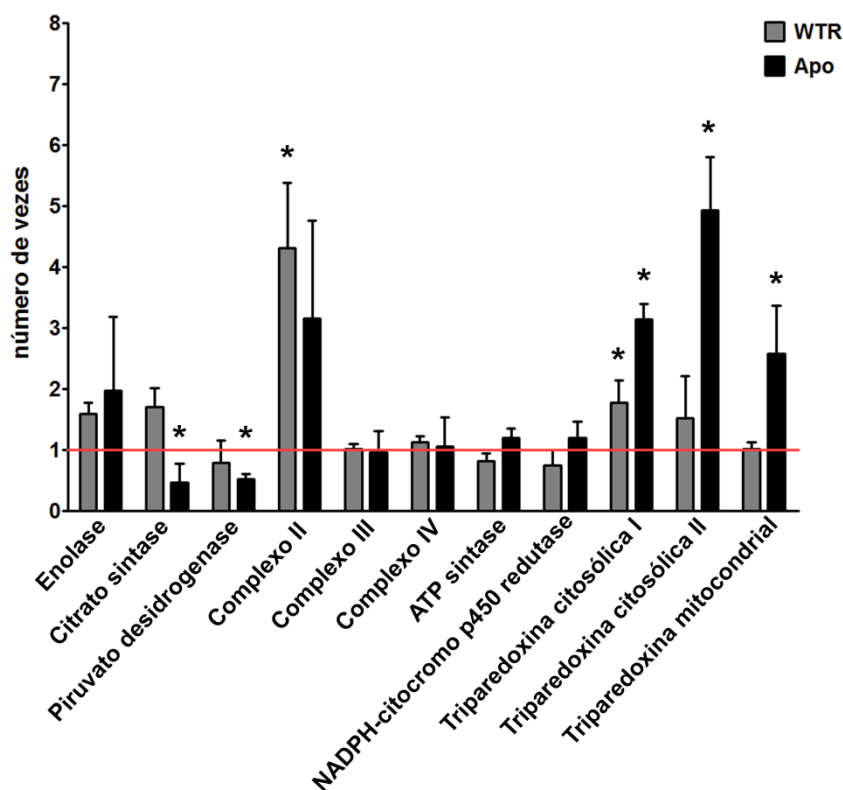


**Figura 4.19: Curvas de *melting* dos iniciadores sintetizados para a avaliação da expressão gênica de *S. culicis*. (A) Iniciadores testados para os alvos: enolase, citrato sintase, triparedoxina mitocondrial, triparedoxina citosólica I, complexo IV, complexo III e estrutura paraflagelar. (B) Iniciadores testados para os alvos: piruvato desidrogenase, ATP sintase, succinato desidrogenase, triparedoxina citosólica II, NADPH-citocromo p450 redutase e actina.**

Para analisar se a resistência ao estresse oxidativo alteraria o perfil de adesão de *S. culicis* ao intestino do seu hospedeiro *A. aegypti*, foram realizados ensaios *ex vivo* para avaliar a adesão do protozoário ao órgão do inseto. Na **Figura 4.21** podemos observar que protozoários da cepa WTR aderiram mais ao intestino do mosquito, sendo encontrado cerca de 70% mais epimastigotas quando comparado com a cepa WT. Já a cepa Apo apresentou cerca de cinco vezes menos protozoários aderidos.

Para analisarmos se os resultados obtidos no experimento *ex vivo* representavam o que aconteceria no mosquito, fizemos a infecção *in vivo* de mosquitos fêmeas de *A. aegypti* através da alimentação, sendo avaliado o número de protozoários em diferentes dias de infecção. Os mosquitos infectados foram mantidos somente com solução de 10% sacarose ou na presença de sacarose + 5 mM de ascorbato, para avaliarmos se as ROS presentes no intestino do mosquito

poderiam alterar os padrões de infecção. Como é possível observar na **Figura 4.22A**, a resistência ao  $H_2O_2$  aumenta em 50% o número de protozoários aderidos ao intestino dos mosquitos após 1 dia de infecção, quando comparado com a infecção de WT. Por sua vez, a adição do antioxidante dobrou o número de protozoários da cepa selvagem e aumentou 50% vezes o número de WTR no intestino dos mosquitos. Quando observamos a cepa Apo, vemos que no tempo de 1 dia a cepa sem o endossimbionte infecta três vezes menos os mosquitos, sendo esse fenótipo revertido pela adição do ascorbato, com a infecção desta cepa aumentando em três vezes e ficando muito similar ao perfil apresentado pela cepa WT antes da adição do antioxidante.

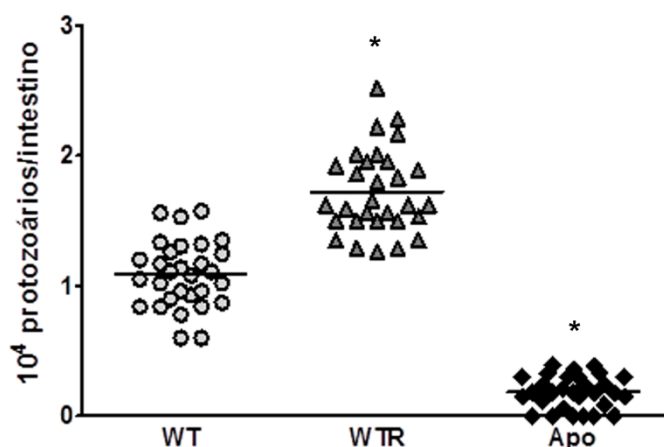


**Figura 4.20: Análise da expressão gênica nas cepas WTR e Apo de *S. culicis*.** O gráfico mostra médias e desvios padrão de pelo menos três experimentos independentes. A linha vermelha representa a expressão gênica da cepa WT. As barras correspondem a razão da diferença da expressão das cepas WTR e Apo em relação à cepa WT. Foi utilizado o teste de Mann-Whitney, sendo comparados os grupos: WT x WTR e WT x Apo, com nível de significância de  $p \leq 0,05$ . Diferenças significativas em comparação com a expressão gênica da cepa WT ( $P \leq 0,05$ ).

Já no 5<sup>o</sup> dia pós-infecção, observamos uma diminuição no número de protozoários de todas as cepas, tanto na presença de 10% de sacarose quanto na



presença de sacarose + ascorbato (**Figura 4.22B**). Na cepa Apo foram observados 10 vezes menos protozoários aderidos, quando comparamos com a cepa WT. Entretanto, este número aumenta em oito vezes após a adição do antioxidante, novamente se aproximando da infecção causada pela cepa selvagem na ausência do ascorbato. Um aumento mais discreto, de duas vezes, é observado na cepa WT após a adição do antioxidante. Embora a cepa WTR tenha uma infecção duas vezes maior que a WT na condição de 10% sacarose, a adição do antioxidante não foi capaz de aumentar a quantidade de protozoários no intestino dos mosquitos.



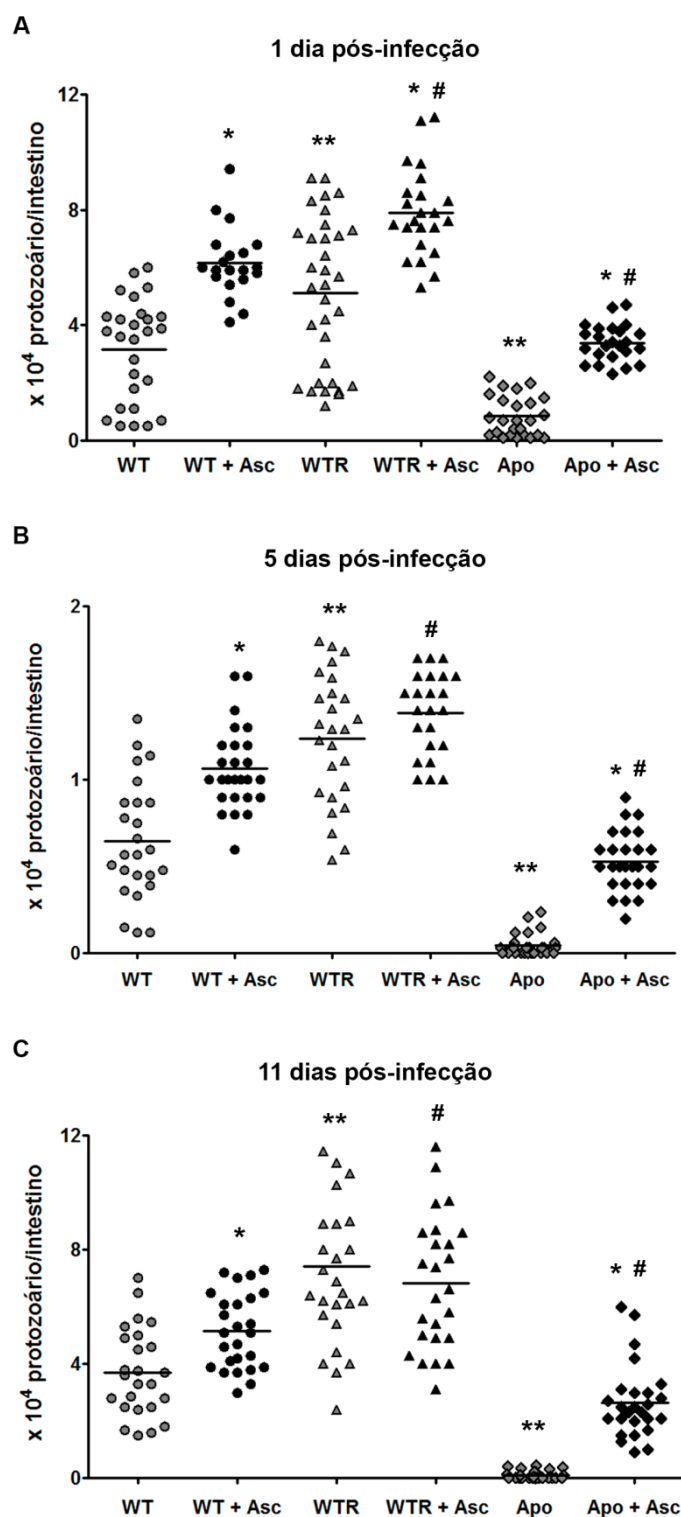
**Figura 4.21: Análise da adesão *ex vivo* das cepas WT, WTR e Apo de *S. culicis* em intestinos de *A. aegypti*.** O gráfico mostra as médias de pelo menos três experimentos independentes. Foi utilizado o teste de Mann-Whitney, sendo comparados os grupos: WT x WTR e WT x Apo, com nível de significância de  $p \leq 0,05$ . Diferenças significativas em comparação entre WTxWTR e WTxApo (\* $P \leq 0,05$ ).

No 11<sup>o</sup> dia pós-infecção, a colonização de *A. aegypti* manteve um perfil similar ao encontrada no dia 5. A cepa aposimbótica teve uma infecção mais de 10 vezes menor que a WT, entretanto essa cepa aumentou, na mesma proporção, a infecção após a adição do antioxidante. A cepa WT teve um aumento discreto na infecção dos mosquitos mantidos com o antioxidante, entretanto esse aumento foi significativo. Já a cepa WTR novamente apresentou o dobro da infecção de WT sem o ascorbato, continuando sem aumentar mesmo após a adição deste. Como é possível observar, a quantidade de protozoários aderidos aos intestinos retornou aos valores encontrados no 1<sup>o</sup> dia em todas as condições, sendo ainda maiores nas infecções dos mosquitos alimentados com o ascorbato (**Figura 4.22C**).

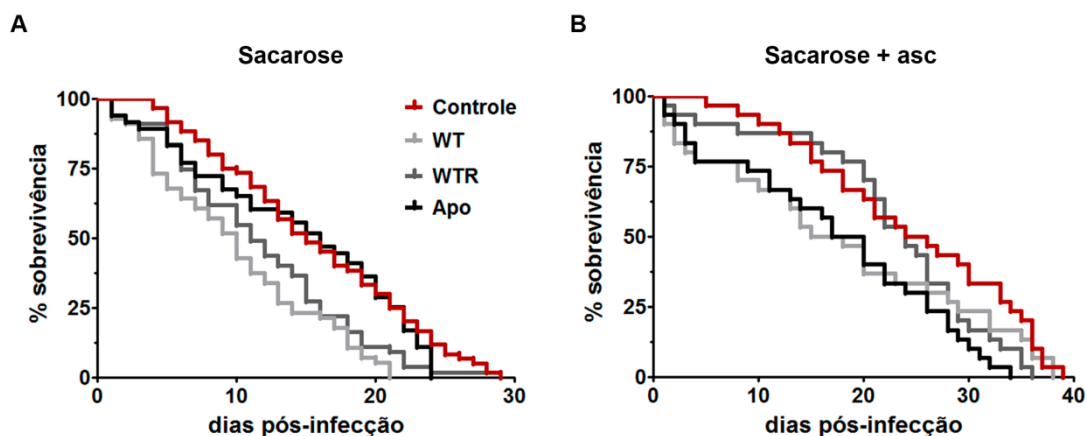
Avaliamos se o aumento na infecção causado pela indução de resistência e pela alimentação com o antioxidante iria aumentar a mortalidade de *A.*

*aegypti*. Como é possível observar nas curvas de sobrevivência na **Figura 4.23**, a infecção alterou discretamente a viabilidade dos mosquitos, nas condições com e sem ascorbato. Na curva com o antioxidante, vemos que a alimentação com essa molécula pode ter aumentado o tempo de vida dos insetos, normalmente de 30 dias (**Figura 4.23B**). Em experimento com os protozoários aquecidos a 95°C, foi possível inferir que as alterações nas curvas de sobrevivência são decorrentes da infecção com os protozoários de *S. culicis* (dados não mostrados).

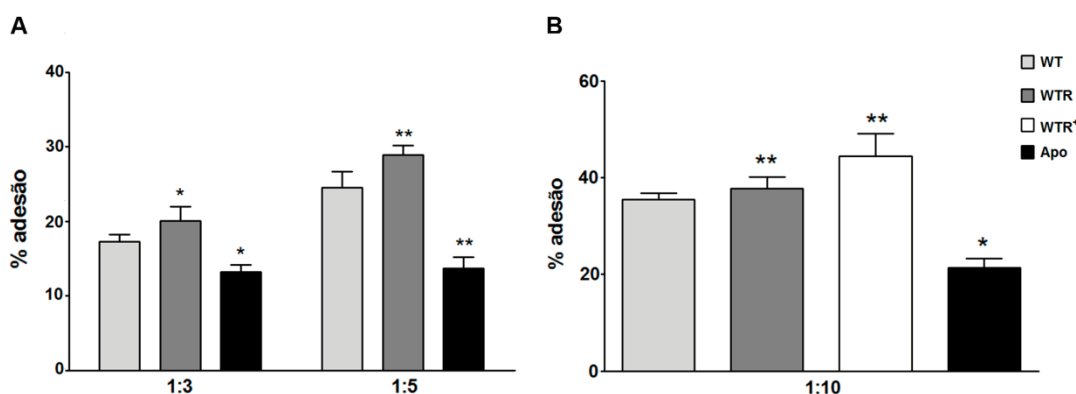
Por fim, avaliamos ainda o perfil de adesão e internalização de *S. culicis* em células de mamíferos, sendo realizados ensaios de interação dos protozoários das três cepas com macrófagos peritoneais murinos (**Figura 4.24**). A cepa Apo apresentou aproximadamente 50% menos protozoários aderidos às células de mamíferos dependendo do MOI utilizado, sendo a maior porcentagem de adesão encontrada na proporção de 10 protozoários/macrófago. Quando comparadas as cepas WT e WTR, observa-se um aumento de cerca de 20% no número de protozoários aderidos, sendo esse aumento detectado nos MOI de 1:3 e 1:5 (**Figura 4.24A**). Na **Figura 4.24B**, podemos observar que no MOI de 1:10 a cepa WTR não apresentou um aumento significativo no número de protozoários aderidos aos macrófagos. Para exacerbar o fenótipo, foi induzido um aumento de três vezes na resistência a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,5 mM), sendo a cepa denominada WTR+ incubada com três vezes o valor de IC<sub>50</sub>/2h. Esta cepa apresentou um acréscimo de, aproximadamente, 15% no número de protozoários aderidos quando comparado com a cepa WT.



**Figura 4.22: Análise da infecção *in vivo* das cepas de *S. culicis* em *A. aegypti*.** Os experimentos foram feitos com os mosquitos infectados sendo mantidos em solução com 10% sacarose ou sacarose + 5 mM ascorbato (Asc). Os gráficos mostram as médias de pelo menos três experimentos independentes. Foi utilizado o teste de Mann-Whitney, com nível de significância de  $p \leq 0,05$ . Diferenças significativas em comparações com a cepa WT sem asc (\*\* $p < 0,03$ ). Diferenças significativas em comparações com a cepa WT com asc (<sup>#</sup> $p < 0,01$ ). Diferenças significativas entre as condições com e sem asc nas cepas de *S. culicis* (\* $P \leq 0,01$ ).



**Figura 4.23: Curvas sobrevivência de *A. aegypti* infectados com as cepas WT, WTR e Apo de *S. culicis*.** As curvas foram comparadas com mosquitos controle alimentados com 10% sacarose (A) ou com sacarose e 5 mM ascorbato (asc) (B). Os experimentos foram realizados no mínimo três vezes, sendo escolhida uma curva representativa de cada condição. Foi utilizado o teste de Log-Rank, com nível de significância de  $p \leq 0,05$ . Diferença significativa na sobrevivência dos mosquitos infectados com as três cepas e mantidas com 10% de sacarose ( $P \leq 0,01$ ), e com sacarose + asc ( $P \leq 0,04$ ).



**Figura 4.24: Análise da interação das cepas WT, WTR e Apo de *S. culicis* com macrófagos peritoneais.** (A) MOIs de 1:3 e 1:5. (B) Interação das cepas e da cepa WTR<sup>+</sup> no MOI de 1:10 com macrófagos peritoneais. Os gráficos mostram médias e desvios padrão de pelo menos três experimentos independentes. Foi utilizado o teste de Mann-Whitney, sendo comparados os grupos: WT x WTR, WT x Apo e WT x WTR<sup>+</sup>, com nível de significância de  $p \leq 0,05$ . Diferenças significativas em relação à WT (\* $P \leq 0,01$ ; \*\* $P \leq 0,05$ ).

## **5. DISCUSSÃO**

Procariotos e eucariotos coevoluem há, pelo menos, 1,5 bilhões de anos, criando inúmeros casos de associações simbióticas. Um dos maiores exemplos da importância dessas relações é a própria origem dos eucariotos e da vida que conhecemos atualmente, uma vez que esta seria impossível sem a aquisição da bactéria endossimbiótica, que se tornaria a mitocôndria (Gray, 2012). As associações simbióticas podem ser de vários tipos, sendo as relações de mutualismo capazes de favorecer ambos os organismos, proporcionando para o simbionte um ambiente seguro e rico em nutrientes, ao mesmo tempo em que geram alterações metabólicas no hospedeiro, potencialmente permitindo a colonização de novos nichos ecológicos (Catta-Preta *et al.*, 2015). Dentre os protozoários que possuem endossimbiontes, os tripanosomatídeos são um dos mais bem estudados. Nesta família, esta relação simbiótica acontece em três gêneros, sendo *S. culicis* uma das espécies que possuem a bactéria simbiótica em seu citoplasma (Teixeira *et al.*, 2011; Votýpka *et al.*, 2014). A presença do endossimbionte influencia diversos processos metabólicos desses protozoários, alterando inclusive sua capacidade de infecção no hospedeiro invertebrado. A eliminação do endossimbionte torna *S. culicis* incapaz de colonizar o intestino de diversos mosquitos, tornando possível apenas sua manutenção *in vitro* (Correa-da-Silva *et al.*, 2006). Desta forma, para o sucesso da colonização do intestino de diversos invertebrados por *S. culicis*, é necessária a adaptação do protozoário a diversas pressões seletivas nas quais é submetido. Uma destas condições de estresse é a geração de ROS pelo inseto, sendo as espécies reativas de oxigênio uma das principais moléculas efetoras que irão participar da resposta imune, tanto em vertebrados quanto em invertebrados (Iwanaga e Lee, 2005). A produção de ROS através da via de NOX/DUOX já foi descrita em *D. melanogaster* e *A. gambiae* após o desafio com *T. brucei* e *Plasmodium* spp. (Kumar *et al.*, 2004; Ha *et al.*, 2005a). Também já foi demonstrado que *A. gambiae* foi mais resistente à infecção por *Plasmodium* spp. em situações de estresse oxidativo (Kumar *et al.*, 2003; Molina-Cruz *et al.*, 2008). Reforçando a importância da geração de ROS no controle da infecção por esses parasitos, dietas ricas em antioxidantes aumentaram a infecção nos insetos (Peterson *et al.*, 2007).

Outro fato importante a ser considerado é a capacidade de *S. culicis* de colonizar o intestino de insetos hematófagos, que são capazes de consumir mais de 10 vezes o seu peso em sangue (Friend *et al.*, 1965). A hematofagia é extremamente vantajosa para o inseto, uma vez que o sangue possui alto valor nutricional, devido às altas concentrações de proteínas e outros nutrientes (Lehane,

1991; Lukashevich e Mostovski, 2003). A digestão da hemoglobina resulta na liberação de cerca de 10 mM de heme. Esta molécula possui características pró-oxidantes, sendo capaz de induzir a formação de ROS através da decomposição de peróxidos orgânicos. Além dos efeitos gerados diretamente pelo heme, a degradação desta molécula libera  $\text{Fe}^{2+}$ , que também pode gerar espécies reativas através da reação de Fenton (Walling, 1975). Os efeitos deletérios do heme já foram demonstrados em *Plasmodium* spp., em que altas concentrações de ROS inibem o crescimento do parasito (Friedman *et al.*, 1979).

Nesse cenário, organismos monoxênicos como *S. culicis* precisam estar extremamente bem adaptados a ambientes ricos em ROS e, conseqüentemente, aos seus efeitos deletérios. Uma vez que apenas a cepa que alberga o endossimbionte é capaz de colonizar o intestino de invertebrados, acreditamos que a bactéria está intimamente relacionada com o aumento das defesas antioxidantes do protozoário, conferindo a cepa WT uma grande vantagem evolutiva.

Dessa forma, a toxicidade do  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi avaliada nas cepas WT e Apo de *S. culicis* com o objetivo de caracterizar a sua susceptibilidade a presença de ROS. Dentre as principais espécies reativas, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é a mais estável, por não possuir um elétron desemparelhado, sendo formado através da degradação do heme e podendo levar a peroxidação lipídica (Cornelis *et al.*, 2011; Pisoschi e Pop, 2015). Como esperado, Apo foi mais susceptível a esta espécie reativa que a cepa WT após 2h de incubação (**Tabela 4.1**). Vale ressaltar ainda que não foi observada diferença significativa entre os valores de  $\text{IC}_{50}/2\text{h}$  e  $\text{IC}_{50}/24\text{h}$  para  $\text{H}_2\text{O}_2$ , justificando a escolha apenas do tempo mais curto para a realização dos ensaios subsequentes. A cepa WT também apresentou maior resistência à incubação com outros pró-oxidantes que também estão presentes no intestino do inseto, como o próprio heme e  $\text{FeSO}_4$  (**Tabela 4.1**). Esta diferença de susceptibilidade pode estar relacionada à capacidade diferenciada das duas cepas de colonizar o intestino do mosquito (Correa-da-Silva *et al.* 2006), local em que o protozoário entraria em contato com grandes concentrações de heme e seus derivados.

Para corroborar esta hipótese, dois outros agentes pró-oxidantes, de mecanismos de ação distintos, foram utilizados: o paraquat e a menadiona, inibidores do complexo I e III, respectivamente (**Tabela 4.1**). Novamente uma maior susceptibilidade de Apo foi detectada. Uma vez que a menadiona apresentou toxicidade em baixas concentrações para as duas cepas, podemos sugerir que há uma maior susceptibilidade de *S. culicis* a radicais superóxido, gerados pela inibição

desse complexo (Mitra *et al.*, 2013). Este fato pode estar associado a uma maior resistência aos agentes pró-oxidantes que geram  $H_2O_2$  no protozoário, tais como heme e ferro. Motta *et al.* (2013) descreveram um maior número de cópias de genes que codificam enzimas de vias de detoxificação de  $H_2O_2$  na cepa WT, tais como glutaciona peroxidase e ascorbato peroxidase, número esse maior que o encontrado em *L. major*. Diferentemente dos outros pró-oxidantes, menadiona foi cerca de cinco vezes mais ativa na cepa Apo, sugerindo a participação do endossimbionte nas vias de detoxificação de *S. culicis*.

A bioenergética de tripanosomatídeos apresenta diferenças marcantes quando comparada com células de mamíferos. Devido ao ciclo de vida desses protozoários, o metabolismo energético pode variar entre as espécies e entre formas evolutivas da mesma espécie, como ocorre com *T. brucei* e *T. cruzi*, em que as formas sanguíneas apresentam um metabolismo estritamente glicolítico, devido à disponibilidade de glicose no ambiente em que vivem, enquanto as formas presentes no intestino do inseto vetor possuem uma mitocôndria mais funcional (Priest e Hajduk, 1994; Clayton e Michels, 1996; Gonçalves *et al.*, 2011; Menna-Barreto e De Castro, 2014). A CTE mitocondrial é uma das principais fontes de ROS na maioria dos tipos celulares, incluindo os tripanosomatídeos (Kowaltowski *et al.*, 2009). Para avaliar se a ausência do endossimbionte poderia alterar a bioenergética e/ou o funcionamento da CTE de *S. culicis*, foram selecionados diferentes inibidores desses processos.

Inicialmente, o efeito de dois inibidores da glicólise foi avaliado (**Figura 4.1**). O primeiro testado, 2-DOG, não apresentou atividade, demonstrado através dos altos valores de  $IC_{50}/2h$  obtidos. Entretanto, a iodoacetamida, um inibidor da glicólise mais específico que o 2-DOG, que age impedindo a formação do 1,3-bifosfoglicerato a partir da inibição da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Schmidt e Dringen, 2009), conseguiu inibir o crescimento das duas cepas. Como foi demonstrado por Brand e Hermfisse (1997), a degradação de glicose a lactato, ao invés da degradação oxidativa, leva a uma produção menor de espécies reativas pelas células. Assim, a utilização dessa via seria mais vantajosa para os protozoários sensíveis a geração de espécies reativas. Esse fenômeno pode ser observado para a cepa Apo, uma vez que ela foi cerca de cinco vezes mais susceptível à inibição da glicólise que a WT. Confirmando essa hipótese, em análises proteômicas realizadas por Garcia (2014), a cepa apossimbiótica apresentou uma maior expressão de proteínas do metabolismo glicolítico.



Dentre os inibidores da CTE testados, todos foram mais ativos na cepa Apo (**Tabela 4.2**). Na cepa WT, a rotenona apresentou alto valor de IC<sub>50</sub>/2h, reforçando mais uma vez a hipótese da não-funcionalidade do complexo I (Hill, 1976; Hernandez e Turrens, 1998; Carranza *et al.*, 2009; Menna-Barreto e De Castro, 2014). Como mencionado anteriormente, nem todos os elétrons que entram na CTE chegam ao complexo IV, para reduzir o oxigênio à água. Parte desses elétrons escapa dos complexos, principalmente entre os complexos I e III, reduzindo parcialmente o O<sub>2</sub> e gerando ROS (Kowaltowski *et al.*, 2009). Como o complexo I está parcialmente inativo em tripanosomatídeos, uma das maiores fontes de geração de ROS mitocondrial é o complexo III desses protozoários. A inibição específica do complexo III pela AA gera grandes concentrações de espécies reativas, sobretudo de radicais O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Skulachev, 1996; Murphy, 2009; Quinlan *et al.*, 2011; Tomás e Castro, 2013; Alves-Bezerra *et al.*, 2014). A maior resistência da cepa WT à inibição do complexo III pode estar relacionada com a já mencionada capacidade desses protozoários de sobreviverem em ambientes ricos em ROS (**Figura 4.2**).

A inibição do complexo IV pelo KCN nas cepas WT e Apo (**Figura 4.2**) ocorreu apenas em altas concentrações, na faixa milimolar. Em linhas gerais, os complexos mitocondriais são hemeoproteínas, isto é, necessitam do heme captado ou sintetizado pela célula, para compor suas estruturas e exercer suas funções. O complexo IV é uma das principais hemeoproteínas mitocondriais (Hüttemann *et al.*, 2012), sendo possível que a ineficiência na síntese de heme devido à ausência do endossimbionte (Alves *et al.*, 2011; Tripodi *et al.*, 2011; Motta *et al.*, 2013) impacte na menor disponibilidade da porfirina e diminua a funcionalidade do complexo, explicando assim a atividade três vezes menor do KCN na cepa Apo. Além disso, o mau funcionamento do complexo IV pode, indiretamente, aumentar a produção de ROS (Way, 1984; Chen *et al.*, 2003), afetando mais profundamente as cepas sensíveis a essa molécula.

Por outro lado, também foi avaliado o impacto da inibição da AOX nas duas cepas através do tratamento com o inibidor SHAM (**Tabela 4.2**). Na literatura foi relatada a respiração KCN-insensível em *T. brucei*, (Clarkson *et al.*, 1989) *T. cruzi* (Chaudhuri *et al.*, 2006) e *L. donovani* (Santhamma e Bhaduri, 1995), sugerindo a presença de uma AOX. Esta oxidase é uma proteína localizada na membrana interna mitocondrial, capaz de reduzir o O<sub>2</sub> a água pela ação do ubiquinol. Em tripanosomatídeos, foi descrita apenas em *T. brucei*, como sendo uma oxidase independente de citocromo (Chaudhuri *et al.*, 2006; Shiba *et al.*, 2013). Assim como

para o KCN, os valores de IC<sub>50</sub>/2h de SHAM também estão na faixa de milimolar, o que sugere que *S.culicis* possui uma isoforma diferente da descrita em *T. brucei* (Menna-Barreto e De Castro, 2014).

Após os experimentos iniciais e visando corroborar a hipótese central proposta, foi induzida resistência à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na cepa WT, através do crescimento desses protozoários na presença de concentrações progressivas desta espécie reativa. Esta resistência foi induzida até a concentração de 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o dobro do IC<sub>50</sub>/2h encontrado para a cepa WT. Após alcançar esta concentração, os protozoários dessa cepa foram mantidos com 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em todas as passagens subsequentes, visando a manutenção da resistência. Como esperado, a cepa WTR foi mais resistente aos agentes pró-oxidantes testados, apresentando diferença significativa quando comparado aos valores de IC<sub>50</sub>/2h obtidos para a cepa WT (**Figura 4.2**). Este fenótipo observado na cepa WTR aponta para a seleção dos protozoários mais adaptados a um ambiente rico em ROS, como é o caso do intestino do mosquito (Oliveira e Oliveira, 2002). Interessantemente, a resistência induzida levou a uma perda expressiva de cerca de quatro vezes na atividade inibitória de FeSO<sub>4</sub> e 1,7 vezes de heme, ambos derivados da digestão do sangue no intestino do inseto e que levariam a formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Graça-Souza *et al.*, 2006).

A cepa resistente foi aproximadamente duas vezes mais resistente ao efeito da iodoacetamida (**Figura 4.3F**), demonstrando que há uma ligação entre a resistência ao estresse oxidativo e a utilização da glicólise. Os inibidores da CTE rotenona, KCN e oligomicina não apresentaram diferença significativa em relação à WT (**Figura 4.3**). A não-funcionalidade do complexo I pode, novamente, ser a explicação para a ausência de resposta frente ao tratamento com rotenona. Já a ausência de reversão do efeito deletério de KCN e oligomicina pode decorrer da não geração de ROS diretamente pelo complexo IV e ATP sintase (Tomás e Castro, 2013), o que não alteraria o perfil de inibição desses complexos. Confirmando essa hipótese, a AA foi 23 vezes menos ativa na cepa WTR quando comparado com a cepa WT (**Figura 4.3B**), demonstrando que a indução de resistência levou a uma maior resistência ao ROS gerado por essa via, uma vez que essa molécula irá inibir o principal complexo gerador de espécies reativas em tripanosomatídeos (Menna-Barreto e De Castro, 2014).

Após a indução de resistência a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, os protozoários foram analisados por microscopia eletrônica de transmissão, visando detectar alterações morfológicas derivadas da indução de resistência e da eliminação do endossimbionte. Em

semelhança a cepa WT, a cepa resistente apresentou morfologia típica (Freytmüller e Camargo, 1981), sem possíveis danos decorrentes do tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A mitocôndria da cepa resistente se manteve íntegra, única e ramificada (**Figura 4.6**). Rossignol *et al.* (2004) demonstrou que células de mamíferos mais dependentes da fosforilação oxidativa apresentam um aumento na massa e volume mitocondrial, além do aumento no número de cristas. Assim, não podemos descartar a hipótese de que uma cepa resistente à ROS e mais dependente do metabolismo oxidativo teria uma mitocôndria mais ramificada, o que estaria associado a sua maior funcionalidade. Entretanto esta hipótese necessita de confirmação por técnica de tomografia eletrônica, em que poderíamos avaliar o volume mitocondrial e sua estrutura tridimensional (Brum *et al.*, 2014).

Quando avaliamos a morfologia da cepa Apo (**Figura 4.5**), percebemos, principalmente, um inchaço em regiões específicas da mitocôndria. Esse inchaço parece ser pontual, uma vez que podemos observar apenas algumas porções dilatadas da mitocôndria. Além disso, as análises ultraestruturais sugerem que a mitocôndria desses protozoários possui mais cristas, algumas delas estando inchadas. Acreditamos que esse fenótipo pode ser decorrente da tentativa do protozoário em aumentar a superfície mitocondrial e, conseqüentemente, a quantidade relativa de complexos mitocondriais, uma vez que sabemos que as cristas mitocondriais são os locais onde os complexos da CTE estão localizados (Gilkerson *et al.*, 2003). Além disso, acreditamos que esse inchaço pode ser decorrente de danos causados pela grande geração de ROS mitocondrial, que poderia ser decorrente da má-funcionalidade dos complexos. Corroborando essa hipótese, epimastigotas de *T. cruzi* tratados com drogas que levam à geração de ROS mitocondrial apresentaram inchaço proeminente desta organela (Menna-Barreto *et al.*, 2009).

Visando avaliar a funcionalidade mitocondrial e confirmar os resultados anteriores de que essa organela estaria danificada na cepa apossimbiótica de *S. culicis*, foram realizados ensaios para medir o consumo de O<sub>2</sub> e o  $\Delta\Psi_m$ , além de dosagens bioquímicas da atividade das enzimas mitocondriais e da produção de ATP. Nos ensaios de oxigrafia (**Figura 4.7**), podemos observar que após a adição de AA, as três cepas apresentaram uma diminuição de 90% no consumo de O<sub>2</sub>, garantindo que este consumo de oxigênio é mitocondrial. O menor consumo de O<sub>2</sub> pela cepa Apo indica uma mitocôndria menos ativa nesses protozoários. Azevedo-Martins *et al.* (2014) demonstrou que a presença do endossimbionte em *A. deanei*

leva a um maior consumo de  $O_2$ , resultado semelhante ao encontrado por nosso grupo para *S. culicis*. Ainda foi possível observar que, embora não tenham sido observadas diferenças significativas no  $\Delta\Psi_m$  entre as cepas WT e Apo, a cepa WTR apresentou  $\Delta\Psi_m$  45% maior (**Tabela 4.3**). Em *T. cruzi*, foi possível observar que epimastigotas, forma evolutiva mais dependente da mitocôndria, possui um maior  $\Delta\Psi_m$ , quando comparado com a forma tripomastigota, que seria mais glicolítica (Gonçalves *et al.*, 2011). Isso corrobora a hipótese de que a resistência às espécies reativas diminuiria a dependência da via glicolítica e aumentaria a funcionalidade mitocondrial dos protozoários.

Interessantemente, foi observada uma maior atividade da citrato sintase na cepa Apo (**Figura 4.8A**). Resultados semelhantes foram encontrados por Adroher *et al.* (1988), em que tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* apresentaram atividade de citrato sintase maior quando comparado com as formas epimastigotas. Como dito anteriormente, já foi demonstrado que as formas sanguíneas desses protozoários são mais glicolíticas que as formas epimastigotas (Gonçalves *et al.*, 2011). Outro indicador que corrobora a hipótese de que uma maior atividade da citrato sintase estaria relacionada a um aumento na via glicolítica é a menor atividade da citrato sintase constatada na cepa WTR.

Diferentemente do encontrado para a citrato sintase, os complexos II-III e IV da CTE apresentaram uma atividade maior na cepa resistente (**Figura 4.8B e C**). A cepa Apo, por outro lado, apresentou uma menor atividade dessas enzimas, confirmando os dados de oxigrafia de que a CTE estaria menos ativa. Os complexos estudados possuem moléculas redutoras, como o ferro e o heme (Nelson e Cox, 2011), assim a maior capacidade da cepa com o endossimbionte em captar e/ou sintetizar estas moléculas (Alves *et al.*, 2011) pode regular a funcionalidade destes complexos, corroborando a hipótese anteriormente levantada de que a mitocôndria da cepa Apo seria deficiente. Também foi observado que a cepa Apo produz menos ATP que a WT (**Figura 4.9**). A mitocôndria é a principal organela geradora dessa molécula através da ação da CTE (Pfeiffer *et al.*, 2001) e a baixa produção dessa molécula corrobora os resultados anteriormente encontrados.

Visando estabelecer se esses fenótipos teriam associação ao substrato fornecido, como ocorre em *T. brucei* (Cristidero *et al.*, 2010; Menna-Barreto e De Castro, 2014), o experimento de oxigrafia foi repetido com tampões ricos em glicose e L-prolina, dois substratos importantes para a manutenção das formas sanguíneas (mais glicolíticas) e replicativas (encontradas no invertebrado e mais oxidativas),

respectivamente (Bringaud *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2009) (**Figura 4.11**). Os resultados de oxigrafia com os novos tampões de respiração mostraram um aumento no consumo de O<sub>2</sub> da cepa Apo, tanto quando foi fornecido glicose quanto L-prolina para os protozoários. A L-prolina fornece substrato pra CTE, através do ciclo de Krebs (Bringaud *et al.*, 2006), sendo o principal nutriente para *A. deanei*, uma das espécies TAE (Galvez Rojas *et al.*, 2008). Isso pode justificar o aumento no consumo de O<sub>2</sub> encontrado quando foi fornecido esse substrato, tanto na cepa WT quanto na cepa Apo, uma vez que já foi demonstrado que o endossimbionte não tem participação na captação desse nutriente (Galvez Rojas *et al.*, 2008). O aumento no consumo de O<sub>2</sub> mediante a adição de glicose pode ter levado os protozoários a ativar a via glicolítica, uma vez que, como demonstrado em *T. brucei*, embora a glicose não seja o principal nutriente para as formas procíclicas (encontradas no invertebrado), esses protozoários utilizam preferencialmente, *in vitro*, este carboidrato mesmo quando a L-prolina está presente (Lamour *et al.*, 2005; Coustou *et al.*, 2008). Além dos ensaios com diferentes substratos, foram realizados experimentos de captação de glicose, através da incubação com 2-NBDG (TeSlaa e Teitell, 2014). Esses experimentos confirmaram a maior dependência da via glicolítica na cepa Apo, com uma captação 90% maior que a encontrada na WT (**Tabela 4.4**).

O pré-tratamento com diferentes antioxidantes nas cepas WT, WTR e Apo foi realizado com objetivo de reverter à morte dos protozoários desafiados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e AA, para comprovar que a lise desses protozoários era consequência da geração de ROS exacerbada. Foram utilizadas as concentrações de IC<sub>50</sub>/2h desses dois pró-oxidantes e selecionadas concentrações dos antioxidantes que não são tóxicas para as cepas de *S. culicis* (**Figuras 4.12, 4.14 e 4.15**). O efeito diferenciado entre os quatro antioxidantes testados está intimamente ligado ao mecanismo de ação de cada um deles e a espécie reativa gerada pelo desafio, explicando parcialmente os resultados obtidos. O  $\alpha$ -tocoferol e o urato agem preferencialmente em radicais peroxila e OH<sup>-</sup>, evitando a peroxidação lipídica. Dessa forma, esses dois antioxidantes previnem a toxicidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e AA através da manutenção da fluidez da membrana plasmática, evitando seu rompimento e a lise celular (Tappel, 1955; Gutteridge e Smith, 1988; Schmitt *et al.*, 1993). Já a ação do NAC pode estar relacionada ao aumento dos níveis de GSH, que terá um importante papel nas defesas antioxidantes, principalmente na formação da tripanotiona, uma das moléculas antioxidantes mais importantes para os tripanosomatídeos (Irigoín *et al.*,

2008). O ascorbato funciona como um cofator para a enzima APx, que irá neutralizar principalmente o  $H_2O_2$  (Kerksick e Willoughby, 2005; Barreiros e David, 2006; Castro e Tomás, 2008; Tomás e Castro, 2013). Embora o  $\alpha$ -tocoferol e o urato tenham funcionado para a cepa WT, não foram capazes de reverter o dano causado na cepa Apo, tanto para o desafio com  $H_2O_2$  quanto para a AA. Este resultado sugere que a cepa sem o endossimbionte necessita de uma defesa antioxidante mais enzimática e que a diminuição da peroxidação lipídica não evitaria a lise celular.

Como esperado, o desafio da cepa WTR com  $H_2O_2$  e AA (mesmas concentrações utilizadas para WT) não causou a perda da viabilidade dos epimastigotas, confirmando a eficiência da resistência induzida (**Figura 4.13**). O pré-tratamento da cepa com os antioxidantes e posterior desafio com  $H_2O_2$  e AA no seu valor real de  $IC_{50}/2h$  manteve o padrão observado na cepa WT (**Figura 4.14**). Este resultado, juntamente com a análise ultraestrutural (**Figura 4.6**), confirma que a cepa resistente não sofreu danos após a indução de resistência, apresentando padrões de respostas semelhantes aos encontrados para a cepa WT. Apesar dos diferentes desafios, *S. culicis* respondeu de maneira semelhante ao estresse causado pelo  $H_2O_2$  e pela AA. Isso prova que tanto a espécie reativa quanto o inibidor do complexo III atuaram de maneira semelhante nas células, desencadeando respostas celulares parecidas, demonstrando que, apesar da cepa WTR ser resistente à  $H_2O_2$ , outras moléculas capazes de gerar estresse oxidativo na célula terão seus efeitos diminuídos nos protozoários, sugerindo que os epimastigotas que desenvolveram resistência desencadearam respostas celulares amplas e que podem responder a diversos estímulos.

Em relação à produção de  $H_2O_2$  na presença do tampão de respiração com sacarose (**Figura 4.16**), a cepa WT produziu mais ROS em todas as concentrações testadas do que a cepa resistente, mesmo apresentando um aumento na produção frente ao desafio com AA. Isso pode estar ocorrendo uma vez que a indução de resistência fortaleceu as defesas antioxidantes desses protozoários, tornando-os mais eficientes no combate a um aumento na produção de espécies tóxicas. Corroborando essa hipótese, estudos anteriores mostraram um aumento na expressão de enzimas antioxidantes nas formas evolutivas de *T. cruzi* que entram em contato com grandes concentrações de ROS, tanto por um mau funcionamento mitocondrial, quanto pela capacidade de infecção em células fagocíticas (Atwood *et al.*, 2005; Piacenza *et al.*, 2008; Gonçalves *et al.*, 2011). As concentrações de  $H_2O_2$  produzidas na cepa Apo foram maiores em todas as situações testadas quando

comparamos com a cepa WT, sugerindo uma mitocôndria menos eficiente, além de uma resposta antioxidante mais lenta. Uma geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> maior também foi encontrada em tripomastigotas de *T. cruzi*, que possuem uma CTE deficiente, quando comparado com a forma epimastigota, mais eficiente na fosforilação oxidativa (Gonçalves *et al.*, 2011). Isso pode estar demonstrando que o endossimbionte confere uma maior resistência à geração ROS através de um aumento nas defesas antioxidantes.

A produção basal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com o tampão de respiração contendo glicose e L-prolina foi menor quando comparada com a produção obtida com o tampão de respiração contendo sacarose (**Figura 4.17**). Isso pode ser parcialmente explicado pelo aumento no consumo de O<sub>2</sub>, principalmente na cepa WT, uma vez que uma CTE mais ativa produziria menos ROS (Murphy, 2009; Nelson e Cox, 2011). Além disso, não houve diferença significativa na produção de ROS entre as cepas WT e WTR, confirmando os resultados obtidos na respirometria.

Fomos então avaliar a peroxidação lipídica nas cepas de *S. culicis* (**Figura 4.18**). Corroborando os resultados dos antioxidantes e da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foi observada uma menor peroxidação lipídica nas cepas resistentes, confirmando uma defesa antioxidante mais robusta nesses protozoários, mesmo quando desafiados com AA. Como observado por Azevedo Neto *et al.* (2005) para células vegetais, a exposição das células a concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que não são tóxicas, pode levar a um aumento nas enzimas antioxidantes, aumentando a resistência ao estresse oxidativo e diminuindo a peroxidação lipídica.

Foi avaliada a expressão de 11 genes do metabolismo energético e oxidativo de *S. culicis* (**Figura 4.20**), sendo esses alvos escolhidos a partir da expressão diferencial de suas proteínas entre as cepas WT e Apo (Garcia, 2014). Foi possível observar que apenas o complexo II e a isoforma I da triparedoxina citosólica foram mais expressas em WTR quando comparamos com a cepa não-resistente. A maior expressão do complexo II corrobora os resultados anteriormente obtidos de que esse complexo está mais funcional nos protozoários resistentes. A triparedoxina é uma das principais moléculas antioxidantes de tripanosomatídeos e o aumento em sua expressão confirma os resultados de que a indução de resistência poderia aumentar as defesas antioxidantes desses protozoários. Uma vez que tripanosomatídeos possuem uma gama de enzimas antioxidantes, como a tripanotiona e outras peroxidases (Irigoín *et al.*, 2008), acreditamos que a defesa antioxidante desses protozoários possa estar ocorrendo por outra via, além da

triparedoxina, sendo necessário aumentar o número de genes antioxidantes investigados.

Uma das principais características do genoma de tripanosomatídeos é a organização dos genes em unidades policistrônicas, sendo semelhantes às encontradas em procariotos, com a única exceção de que os genes que estão juntos nessas unidades não possuem, obrigatoriamente, funções em comum (Ivens *et al.*, 2005; De Gaudenzi *et al.*, 2001). Assim, esses genes são transcritos em RNAs policistrônicos, que serão posteriormente separados em RNAs mensageiros (mRNA) através de *trans-splicing* e poliadenilação (Liang *et al.*, 2003). Assim, em tripanosomatídeos não há regulação transcricional, sendo feita uma regulação pós-transcricional, através do processamento, estabilização e meia-vida do mRNA (Requena, 2011). Dessa forma, a regulação da tradução do mRNA e da síntese de proteínas são os principais mecanismos de modulação da expressão gênica desses protozoários, permitindo uma resposta rápida a alterações nas condições fisiológicas (Gebauer e Hentze, 2004; Holcik e Sonenberg, 2005). Isso explicaria os resultados conflitantes obtidos entre as análises da expressão gênica realizadas e os resultados de proteômica obtidos por Garcia (2014), como é o caso da expressão aumentada do mRNA codificante da citrato sintase na cepa Apo.

Dentre os alvos avaliados, a grande maioria deles (nove na cepa WTR e seis na cepa Apo) não apresentou diferença significativa quando foram comparados com a cepa selvagem (**Figura 4.20**). Estudos anteriores de expressão gênica em *Leishmania* spp., demonstraram que apenas 0,2 a 5% dos genes desse protozoário são diferencialmente expressos quando comparados os transcritos das formas promastigotas e amastigotas, reforçando a hipótese de que a maior parte do genoma de tripanosomatídeos é constitutivamente expressa (Akopyants *et al.*, 2004; Leifso *et al.*, 2007). Adicionalmente, análises proteômicas demonstraram que 18% das proteínas de *Leishmania* spp. são diferencialmente expressas entre as duas formas anteriormente avaliadas, existindo uma baixa relação da expressão diferencial do mRNA e das proteínas que estão sendo diferencialmente expressas (El Fakhry *et al.*, 2002; McNicoll *et al.*, 2006; Leifso *et al.*, 2007).

Embora seja cultivada *in vitro*, a cepa Apo apresenta fenótipos diferentes da cepa selvagem. Dentre esses fenótipos, destacam-se a baixa adesão ao epitélio intestinal bem como sua capacidade de colonizar o intestino do mosquito (Fampa *et al.*, 2003; d'Avila Levy *et al.*, 2005; Corrêa-da-Silva *et al.*, 2006). Além disso, há a modulação de moléculas de superfície que podem ser correlacionadas com este



fenótipo (d'Avila Levy *et al.*, 2005; d'Avila-Levy *et al.* 2008). Para avaliar se a resistência à ROS poderia também estar relacionada ao padrão de adesão de *S. culicis*, foram realizados ensaios *ex vivo* de interação do protozoário com o órgão do mosquito (**Figura 4.21**). Como já descrito na literatura por Fampa *et al.*, (2003), foi encontrada diferença na adesão entre as cepas WT e Apo, sendo a adesão dos protozoários da cepa sem o endossimbionte menor em relação à cepa WT. Confirmando nossa hipótese principal, foi observado um aumento significativo do número de protozoários resistentes aderidos ao intestino do mosquito, sugerindo que protozoários mais resistentes ao ambiente rico em ROS seriam mais eficientes na colonização do inseto, sendo esta resistência essencial para o sucesso da espécie na natureza.

Corrêa-da-Silva *et al.* (2006) demonstraram que *S. culicis* é capaz de colonizar o intestino de fêmeas de *A. aegypti* por longos períodos de tempo, havendo um equilíbrio na quantidade de protozoários aderidos ao longo de todo período de infecção. Nossos resultados (**Figura 4.22**) confirmam esses dados da literatura com exceção em 5 dias, em que vemos uma diminuição no número de protozoários. Esse fenômeno também foi descrito por Corrêa-da-Silva *et al.* (2006) e pode ser explicado por uma resposta do sistema imune do inseto à infecção. Como foi observado no mesmo estudo, também foi possível observar uma menor infecção dos mosquitos causada pela cepa apossimbiótica. Além disso, a infecção de *A. aegypti* pela cepa WTR foi maior em todos os dias avaliados, o que pode ser decorrente da maior resistência ao estresse oxidativo presente no intestino do mosquito, uma vez que, como dito anteriormente, uma das principais respostas do inseto à infecção é a produção de ROS pelas células do sistema imune do hospedeiro (Rada e Leto, 2008).

Corroborando essa hipótese, observamos que a alimentação dos insetos com o ascorbato, antioxidante previamente descrito como sendo capaz de diminuir a quantidade de ROS no intestino *A. aegypti in vivo* (Oliveira *et al.*, 2011), foi capaz de aumentar o número de protozoários das três cepas durante todos os tempos de infecção analisados (**Figura 4.22**). Esse resultado confirma a hipótese de que o estresse oxidativo gerado na luz do intestino do mosquito estaria selecionando os protozoários que possuem o endossimbionte, consequentemente impedindo a cepa apossimbiótica de colonizar esse ambiente. Novamente esse fenótipo sugere que o simbionte aumenta as defesas antioxidantes dos protozoários. Resultado similar já foi demonstrado em *Glossina* spp., principal hospedeiro do *T. brucei*, em que a

adição de antioxidantes ao sangue, durante a alimentação das moscas, levou a um aumento na sua infecção (MacLeod *et al.*, 2007).

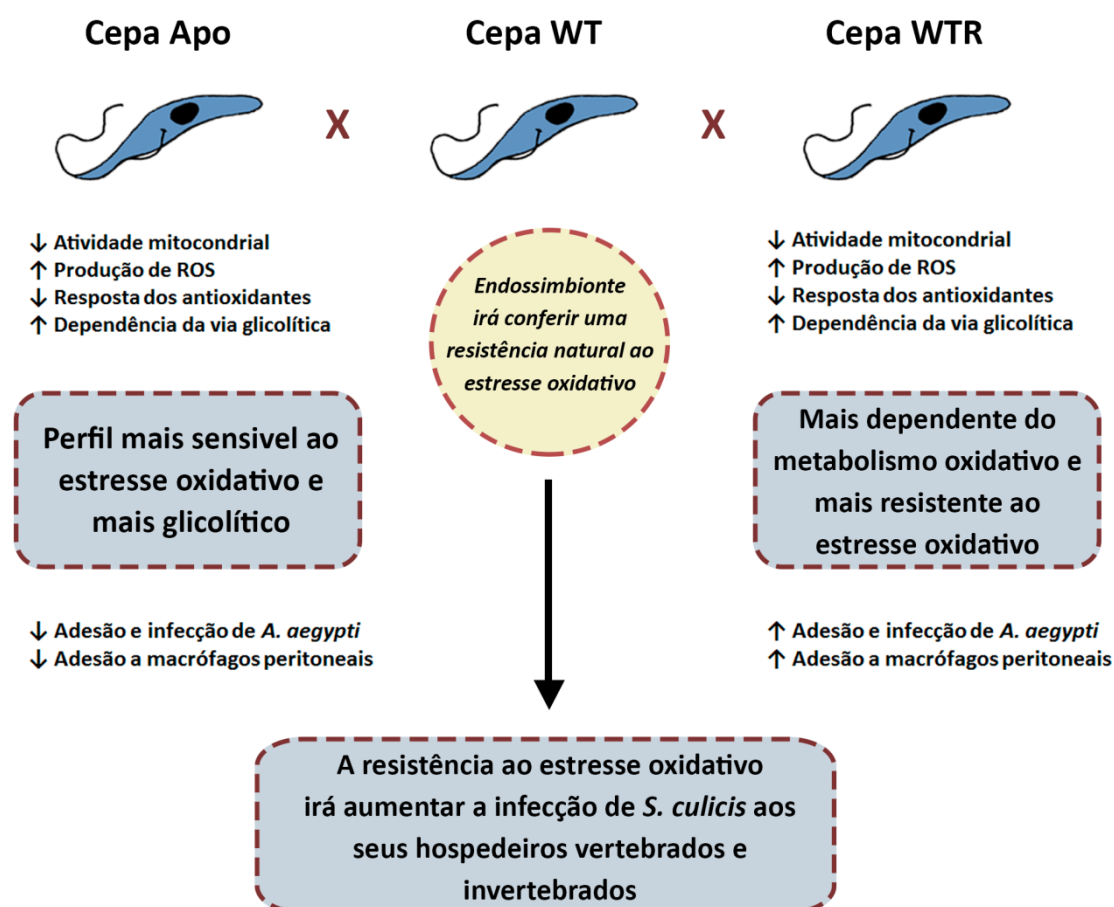
Apesar do aumento no número de protozoários da cepa WTR, não houve perda da viabilidade de *A. aegypti* (**Figura 4.23**). Para espécies que dependem de insetos vetores para sobreviverem é importante haver um equilíbrio na quantidade de protozoários capazes de colonizar um mesmo inseto sem causar dano ao invertebrado (Koella e Boëte, 2003). Desta forma, acreditamos que ocorreu uma estabilização na quantidade de protozoários da cepa resistente para que a infecção se mantivesse. A alimentação dos mosquitos com o ascorbato levou a um aumento na viabilidade dos mosquitos, isso pode ter sido causado por uma diminuição do estresse oxidativo, proveniente da resposta imune contra os protozoários nesses insetos. Resultados semelhantes foram encontrados por Molina-Cruz *et al.* (2008), em que a alimentação de *A. gambiae* infectados com *Plasmodium berghei*, juntamente com a alimentação com urato aumentaram a sobrevivência dos mosquitos.

Levando em consideração relatos da literatura que descrevem infecções acidentais com tripanosomatídeos monoxênicos (Pacheco *et al.*, 1998; Chicarro, 2003; Barreto-de-Souza *et al.* 2008; Morio *et al.*, 2008), também foi avaliada a capacidade de adesão das três cepas de *S. culicis* a macrófagos peritoneais (**Figura 4.24**). De forma semelhante ao encontrado durante a interação com *A. aegypti*, a cepa Apo apresentou percentuais de adesão significativamente menores aos encontrados para a cepa WT em todas as condições experimentais testadas. Estes resultados foram semelhantes aos previamente descritos em macrófagos co-infectados com HIV (Barreto-de-Souza *et al.* 2008). Foi encontrada diferença significativa no número de protozoários da cepa WTR aderidos aos macrófagos em relação aos protozoários não-resistentes, apontando para a hipótese levantada para a interação com o inseto. d'Avila-Levy *et al.* (2005) demonstrou que a cepa perdeu o simbionte secreta mais endopeptidase que a cepa WT, provavelmente indicando uma adaptação para a perda do suplemento de aminoácidos fornecido pelo endossimbionte. d'Avila Levy *et al.* (2008) também demonstraram a participação da gp63 na adesão de *A. deanei* em intestino de *A. aegypti*, através do pré-bloqueio desta glicoproteína e da diminuição da adesão das cepas WT e Apo. Motta *et al.* (2013) encontrou 9 genes da família da gp63 em *S. culicis* codificando sequências homólogas as encontradas em *Leishmania* sp. Em *A. deanei*, foram encontradas 37 sequências codificantes para endopeptidases dessa família, sendo encontradas

duas vezes mais na cepa que alberga o endossimbionte. A gp63 é uma metalopeptidase dependente de zinco localizada na membrana plasmática de diferentes espécies de *Leishmania*, principalmente na forma promastigota, estando relacionada com a interação, adesão, internalização e sobrevivência desses parasitos em macrófagos durante a infecção, sendo de grande importância para a virulência da espécie (Olivier *et al.*, 2012). Resultados semelhantes também foram encontrados por Matteoli *et al.* (2009), sendo possível correlacionar a infecção e o número de protozoários internalizados de *A. deanei* em macrófagos peritoneais à molécula gp63, em que, a partir do bloqueio da metalopeptidase, houve uma diminuição da capacidade de infecção e do número de protozoários internalizados para as duas cepas do tripanosomatídeo. Neste contexto, como relatos da literatura apontam para o papel do endossimbionte durante a adesão do protozoário ao intestino do mosquito e/ou macrófagos de mamíferos, juntamente com o fato de que, dentre as moléculas envolvidas, gp63 apresenta grande importância, é possível que a resistência ao estresse oxidativo esteja levando a um aumento da expressão dessa peptidase. Entretanto, experimentos precisam ser realizados para caracterizar a participação desta e de outras moléculas envolvidas no processo.

## **6. CONCLUSÕES**

- ✓ A cepa Apo, quando comparada com a cepa WT, apresentou um perfil mais sensível ao estresse oxidativo, sendo mais dependente do metabolismo fermentativo. Já a cepa WTR foi mais dependente do metabolismo oxidativo para a obtenção de energia, além de ser mais resistente ao estresse oxidativo (Figura 6.1);
- ✓ A resistência ao estresse oxidativo, obtida naturalmente pela presença do endossimbionte ou artificialmente induzida, conferem a *S. culicis* uma maior capacidade de infecção aos seus hospedeiros vertebrados e invertebrados (Figura 6.1).



**Figura 6.1: Esquema mostrando as conclusões obtidas pelo trabalho.** Esquema mostrando os resultados obtidos nas comparações entre as cepas WT X Apo e WT X WTR e as conclusões encontradas (dentro das linhas pontilhadas).

## **7. REFERÊNCIAS**

- Aboagye-Kwarteng T, Smith K, Fairlamb AH. Molecular characterization of the trypanothione reductase gene from *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma brucei*: comparison with other flavoprotein disulphide oxidoreductases with respect to substrate specificity and catalytic mechanism. *Molecular Microbiology*, 6 (21): 3089-3099, 1992.
- Acestor N, Zíková A, Dalley RA, Anupama A, Panigrahi AK, Stuart KD. *Trypanosoma brucei* mitochondrial respiratome: Composition and organization in procyclic form. *Molecular & Cellular Proteomics*, 10: M110.006908, 2011.
- Adak S, Datta AK. *Leishmania major* encodes an unusual peroxidase that is a close homologue of plant ascorbate peroxidase: a novel role of the transmembrane domain. *Biochemical Journal*, 390 (Pt 2): 465-474, 2005.
- Adroher FJ, Osuna A, Lupianez JA. Differential energetic metabolism during *Trypanosoma cruzi* differentiation. I. Citrate synthase, NADP-isocitrate dehydrogenase, and succinate dehydrogenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 267(1): 252–261, 1988.
- Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, Sereno D. Historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10 (3): e0004349, 2016.
- Akopyants, NS, Matlib RS, Bukanova EN, Smeds MR, Brownstein BH, Stormo GD, Beverley SM. Expression profiling using random genomic DNA microarrays identifies differentially expressed genes associated with three major developmental stages of the protozoan parasite *Leishmania major*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 136, 71-86, 2004.
- Alfieri SC, Camargo EP. Trypanosomatidae: isoleucine requirement and threonine deaminase in species with and without endosymbionts. *Experimental Parasitology*, 53 (3): 371-380, 1982.
- Alves JM, Serrano MG, Maia da Silva F, Voegtly LJ, Matveyev AV, Teixeira MM, Camargo EP, Buck GA. Genome evolution and phylogenomic analysis of *Candidatus* Kinetoplastibacterium, the betaproteobacterial endosymbionts of *Strigomonas* and *Angomonas*. *Genome Biology and Evolution*, 5 (2): 338-350, 2013.
- Alves JM, Voegtly L, Matveyev AV, Lara AM, da Silva FM, Serrano MG, Buck GA, Teixeira MM, Camargo EP. Identification and phylogenetic analysis of heme synthesis genes in trypanosomatids and their bacterial endosymbionts. *PLOS One*, 6(8): e23518, 2011.
- Alves-Bezerra M, Cosentino-Gomes D, Vieira LP, Rocco-Machado N, Gondim KC, Meyer-Fernandes JR. Identification of uncoupling protein 4 from the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus* and its possible role on protection against oxidative stress. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 50: 24-33, 2014.

- Andrade Ida S, Vianez-Júnior JL, Goulart CL, Homblé F, Ruyschaert JM, Almeida von Krüger WM, Bisch PM, de Souza W, Mohana-Borges R, Motta MC. Characterization of a porin channel in the endosymbiont of the trypanosomatid protozoan *Crithidia deanei*. *Microbiology*, 157 (Pt 10): 2818-2830, 2011.
- Ariyanayagam MR, Fairlamb AH. Ovolithol and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 115 (2): 189-198, 2001.
- Ariyanayagam MR, Oza SL, Mehlert A, Fairlamb AH. Bis(glutathionyl)spermine and other novel trypanothione analogues in *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (30): 27612-27619, 2003.
- Atamna H, Ginsburg H. Heme degradation in the presence of glutathione. A proposed mechanism to account for the high levels of non-heme iron found in the membranes of hemoglobinopathic red blood cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 (42): 24876-24883, 1995.
- Atamna H, Ginsburg H. Heme Degradation in the Presence of Glutathione a proposed mechanism to account for the high levels of non-heme iron found in the membranes of hemoglobinopathic red blood cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 24876-24883, 1995.
- Attardi G, Schatz G. Biogenesis of mitochondria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 4:289-333, 1988.
- Atwood JA 3rd, Weatherly DB, Minning TA, Bundy B, Cavola C, Opperdoes FR, Orlando R, Tarleton RL. The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science* 309(5733):473–476, 2005.
- Azambuja P, Garcia ES. *Trypanosoma rangeli* interactions within the vector *Rhodnius prolixus*: a mini review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100 (5): 567-572, 2005.
- Azevedo Neto AD, Prisco JT, Enéas-Filho J, Medeiros JV, Gomes-Filho E. Hydrogen peroxide pre-treatment induces salt-stress acclimation in maize plants. *Journal Plant Physiology*, 162 (10): 1114-1122, 2005.
- Azevedo-Martins AC, Frossard ML, de Souza W, Einicker-Lamas M, Motta MC. Phosphatidylcholine synthesis in *Crithidia deanei*: the influence of the endosymbiont. *FEMS Microbiology Letters*, 275: 229–236, 2007.
- Azevedo-Martins AC, Machado AC, Klein CC, Ciapina L, Gonzaga L, Vasconcelos AT, Sagot MF, DE Souza W, Einicker-Lamas M, Galina A, Motta MC. Mitochondrial respiration and genomic analysis provide insight into the influence of the symbiotic bacterium on host trypanosomatid oxygen consumption. *Parasitology*, 142 (2): 352-362, 2014.



- Babior BM, Curnutte JT, Kipnes RS. Biological defense mechanisms. Evidence for the participation of superoxide in bacterial killing by xanthine oxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 85 (2) 235-244, 1975.
- Babior BM, Kipnes RS & Curnutte JT. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *Journal of Clinical Investigation*, 52 (3): 741-744, 1973.
- Bakker BM, Mensonides FI, Teusink B, van Hoek P, Michels PA, Westerhoff HV. Compartmentation protects trypanosomes from the dangerous design of glycolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (5): 2087-92, 2000.
- Bánfi B, Molnár G, Maturana A, Steger K, Hegedus B, Demaurex N, Krause KH. A Ca-activated NADPH Oxidase in Testis, Spleen, and Lymph Nodes. *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (40), 37594–37601, 2001.
- Barr SD, Gedamu L. Role of peroxidoxins in *Leishmania chagasi* survival. Evidence of an enzymatic defense against nitrosative stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (12): 10816-10823, 2003.
- Barreiros ALBS, David JM. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quimica Nova*, 29 (1): 113-123, 2006.
- Barreto-de-Souza V, Medeiros XT, Motta MC, Bou-Habib DC, Saraiva EM. HIV-1 infection and HIV-1 Tat protein permit the survival and replication of a non-pathogenic trypanosomatid in macrophages through TGF-beta1 production. *Microbes and Infection*, 10(6): 642-649, 2008.
- Bayir H. Reactive oxygen species. *Critical Care Medicine*, 33 (12), 2005.
- Bedard K, Jacquet V, Krause KH. NOX5 from basic biology to signaling and disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 52 (4): 725-34, 2012.
- Bedard K, Lardy B, Krause KH. NOX family NADPH oxidases: not just in mammals. *Biochimie*, 89: 1107–1112, 2007.
- Bhattarai NR, Das ML, Rijal S, van der Auwera G, Picado A, Khanal B, Roy L, Speybroeck N, Berkvens D, Davies CR, Coosemans M, Boelaert M, Dujardin JC. Natural infection of *Phlebotomus argentipes* with *Leishmania* and other trypanosomatids in a visceral leishmaniasis endemic region of Nepal. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103 (11): 1087-1092, 2009.
- Boisseau-Garsaud AM, Cales-Quist D, Desbois N, Jouannelle J, Jouannelle A, Pratlong F, Dedet JP. A new case of cutaneous infection by a presumed monoxenous trypanosomatid in the island of Martinique (French West Indies). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94 (1): 51-52, 2000.

- Borghesan TC, Ferreira RC, Takata CS, Campaner M, Borda CC, Paiva F, Milder RV, Teixeira MM, Camargo EP. Molecular phylogenetic redefinition of *Herpetomonas* (Kinetoplastea, Trypanosomatidae), a genus of insect parasites associated with flies. *Protist*, 164 (1): 129-152, 2013.
- Boveris A, Sies H, Martino EE, Docampo R, Turrens JF, Stoppani AO. Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical Journal*, 188 (3): 643-648, 1980.
- Boveris A, Stoppani AOM. Hydrogen peroxide generation in *Trypanosoma cruzi*, *Experientia*, 33 (10): 1306-1308, 1977.
- Brand KA, Hermfisse U. Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species. *FASEB Journal*, 11 (5):388-395, 1997.
- Brandt U. Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I). *Annual Review of Biochemistry*, 75:69–92, 2006.
- Braz GR, Coelho HS, Masuda H, Oliveira PL. A missing metabolic pathway in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Current Biology*, 9: 703-706, 1999.
- Brigelius-Flohé R, Flohé L. Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors. *Antioxidants & Redox Signaling*. 15 (8): 2335-2381, 2011.
- Bringaud F, Riviere L, Coustou V, Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 149: 1–9, 2006.
- Bruesk WA. The diplosome of *Blastocrithidia culicis* (Novy, McNeal and Torry, 1907) PhD dissertation, University of Minnesota, Minneapolis, MN, 73-401, 1967.
- Brum FL, Catta-Preta CM, de Souza W, Schenkman S, Elias MC, Motta MC. Structural characterization of the cell division cycle in *Strigomonas culicis*, an endosymbiont-bearing trypanosomatid. *Microscopy and Microanalysis*, 20(1): 228-237, 2014.
- Burnett WJ. The organic relations of some of the Infusoria, including investigations concerning the structure and nature of the genus Bodo (Ehr.). *Proceedings of the Boston Society of Natural History*, 4:124–125, 1851.
- Camargo EP, Freymuller E. Endosymbiont as supplier of ornithine carbamoyltransferase in a trypanosomatid. *Nature*, 270 (5632): 52-53, 1967.
- Carnieri EG, Moreno SN, Docampo R. Trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi* different stages. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 61 (1): 79-86, 1993.
- Carranza JC, Kowaltowski AJ, Mendonça MA, de Oliveira TC, Gadelha FR, Zingales B. Mitochondrial bioenergetics and redox state are unaltered in *Trypanosoma*

- cruzi* isolates with compromised mitochondrial complex I subunit genes. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 41 (3): 299-308, 2009.
- Castello PR, Drechsel DA, Patel M. Mitochondria are a major source of paraquat-induced reactive oxygen species production in the brain. *The Journal of Biological Chemistry*, 282 (19): 14186-14193, 2007.
- Castro H, Budde H, Flohé L, Hofmann B, Lünsdorf H, Wissing J, Tomás AM. Specificity and kinetics of a mitochondrial peroxiredoxin of *Leishmania infantum*. *Free Radical Biology and Medicine*, 33 (11): 1563-1574, 2002.
- Castro H, Tomás AM. Peroxidases of trypanosomatids. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10 (9): 1593-1606, 2008.
- Catta-Preta CM, Brum FL, da Silva CC, Zuma AA, Elias MC, de Souza W, Schenkman S, Motta MC. Endosymbiosis in trypanosomatid protozoa: the bacterium division is controlled during the host cell cycle. *Frontiers in Microbiology*, 6: 520, 2015.
- Cazzulo JJ, Franke de Cazzulo BM, Engel JC, Cannata JJ. End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in trypanosomatids. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 16 (3):329-343, 1985.
- Chang KP, Chang CS, Sassa S. Heme biosynthesis in bacterium-protozoan symbioses: enzymic defects in host hemoflagellates and complementary role of their intracellular symbiotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72: 2979 – 2983, 1975.
- Chang KP, Trager W. Nutritional significance of symbiotic bacteria in two species of hemoflagellates. *Science*, 183: 531- 532, 1974.
- Chaudhuri M, Ott RD, Hill GC. Trypanosome alternative oxidase: from molecule to function. *Trends in Parasitology*, 22 (10): 484-91, 2006.
- Chen Q, Vasquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 36027–36031, 2003.
- Chicarro C, Alvar J. Lower trypanosomatids in HIV/AIDS patients. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* , 97: 75–80, 2003.
- Citelli M, Lara FA, da Silva VI, Jr., Oliveira PL. Oxidative stress impairs heme detoxification in the midgut of the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Molecular and Biochemical Parasitology* , 151: 81–88, 2007.
- Clarkson AB Jr, Bienen EJ, Pollakis G, Grady RW. Respiration of bloodstream forms of the parasite *Trypanosoma brucei brucei* is dependent on a plant-like alternative oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 264 (30): 17770-17776, 1989

- Clayton CE, Michels P. Metabolic compartmentation in African trypanosomes. *Parasitology Today*, 12 (12): 465-471, 1996.
- Cornelis P, Wei Q, Andrews SC, Vinckx T. Iron homeostasis and management of oxidative stress response in bacteria. *Metallomics*, 3 (6): 540-549, 2011.
- Correa-da-Silva MS, Fampa P, Lessa LP, Silva ER, Mallet JRS, Saraiva BEM. Colonization of *Aedes aegypti* midgut by the endosymbiont-bearing trypanosomatid *Blastocrithidia culicis*. *Parasitology Research*, 99 (4): 384–391, 2006.
- Coustou V, Biran M, Breton M, Guegan F, Rivière L, Plazolles N, Nolan D, Barrett MP, Franconi JM, Bringaud F. Glucose-induced remodeling of intermediary and energy metabolism in procyclic *Trypanosoma brucei*. *The Journal of Biological Chemistry*, 283 (24): 16342-16354, 2008.
- Cristodero M, Seebeck T, Schneider A. Mitochondrial translation is essential in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Molecular Microbiology*, 78 (3): 757-769, 2010.
- d'Avila-Levy CM, Araújo FM, Vermelho AB, Soares RMA, Santos ALS, Branquinha MH. Proteolytic expression in *Blastocrithidia culicis*: influence of the endosymbiont and similarities with virulence factors of pathogenic Trypanosomatids. *Parasitology*, 130: 413–420, 2005.
- Dansa-Petretski M, Ribeiro JM, Atella GC, Masuda H, Oliveira PL. Antioxidant role of *Rhodnius prolixus* heme-binding protein. Protection against heme-induced lipid peroxidation. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 (18): 10893-10896, 1995.
- d'Avila-Levy CM, Boucinha C, Kostygov A, Santos HL, Morelli KA, Grybchuk-Ieremenko A, Duval L, Votýpka J, Yurchenko V, Grellier P, Lukeš J. Exploring the environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the high-throughput DNA sequencing era. *Memorias de Instituto Oswaldo Cruz*, 110 (8): 956-965, 2015.
- d'Avila-Levy CM, Santos LO, Marinho FA, Matteoli FP, Lopes AH, Motta MC, Santos AL, Branquinha MH. *Crithidia deanei*: influence of parasite gp63 homologue on the interaction of endosymbiont-harboring and aposymbiotic strains with *Aedes aegypti* midgut. *Experimental Parasitology*, 118 (3): 345-353, 2008.
- d'Avila-Levy CM, Silva BA, Hayashi EA, Vermelho AB, Alviano CS, Saraiva EM, Branquinha MH, Santos AL. Influence of the endosymbiont of *Blastocrithidia culicis* and *Crithidia deanei* on the glycoconjugate expression and on *Aedes aegypti* interaction. *FEMS Microbiology Letters*, 252 (2): 279-286, 2005.
- De Gaudenzi JG, Noé G, Campo VA, Frasch AC, Cassola A. Gene expression. regulation in trypanosomatids. *Essays in Biochemistry*, 51: 31-46, 2011.

- De Souza W, Attias M, Rodrigues JC. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41 (10): 2069-2080, 2009.
- De Souza W, Motta MC. Endosymbiosis in protozoa of the Trypanosomatidae family. *FEMS Microbiology Letters*, 173 (1): 1-8, 1999.
- De Souza W, Rocha GM, Miranda K, Bisch PM, Weissmuller G. Atomic force microscopy as a tool for the study of the ultrastructure of trypanosomatid parasites. *Methods in Molecular Biology*, 736: 211- 221, 2011.
- De Souza W. Special organelles of some pathogenic protozoa. *Parasitology Research*, 88 (12): 1013-1025, 2002.
- Dedet JP, Pratlong F. Leishmania, Trypanosoma and monoxenous trypanosomatids as emerging opportunistic agents. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 47 (1): 37-39, 2000.
- Dedet JP, Roche B, Pratlong F, Cales-Quist D, Jouannelle J, Benichou JC, Huerre M. Diffuse cutaneous infection caused by a presumed monoxenous trypanosomatid in a patient infected with HIV. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 89 (6): 644-646, 1995.
- Denicola-Seoane A, Rubbo H, Prodanov E, Turrens JF. Succinate-dependent metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 54 (1): 43-50, 1992.
- Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 27 (5): 305-318, 2004.
- Dimopoulos G, Seeley D, Wolf A, Kafatos FC. Malaria infection of the mosquito *Anopheles gambiae* activates immune-responsive genes during critical transition stages of the parasite life cycle. *The EMBO Journal*, 6115– 6123, 1998.
- Docampo R, de Souza W, Miranda K, Rohloff P, Moreno SN. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nature Reviews Microbiology*, 3 (3): 251-261, 2005.
- Docampo R, Moreno SN. Acidocalcisome: A novel  $Ca^{2+}$  storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites. *Parasitology Today*, 15 (11): 443-448, 1999.
- Du Y, Maslov DA, Chang KP. Monophyletic origin of beta-division proteobacterial endosymbionts and their coevolution with insect trypanosomatid protozoa *Blastocrithidia culicis* and *Crithidia* spp. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91 (18): 8437-8441, 1994a.
- Du Y, McLaughlin G, Chang KP. 16S ribosomal DNA sequence identities of beta-proteobacterial endosymbionts in three *Crithidia* species. *Journal of Bacteriology*, 176 (10): 3081-3084, 1994b.

- Duarte M, Tomás AM. The mitochondrial complex I of trypanosomatids--an overview of current knowledge. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 46 (4): 299-311, 2014.
- Dumas C, Ouellette M, Tovar J, Cunningham ML, Fairlamb AH, Tamar S, Olivier M, Papadopoulou B. Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. *The EMBO Journal*, 16 (10): 2590-2598, 1997.
- Dwyer DM, Chang KP. Surface membrane carbohydrates alterations of a flagellated protozoan mediated by bacterial endosymbiotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73: 852–856, 1976.
- El Fakhry, Y, Ouellette M, Papadopoulou B. A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in *Leishmania infantum*. *Proteomics*, 2, 1007-17, 2002.
- Esteves MJG, Andrade AFB, Angluster J, De Souza W, Mundim MH, Roitman I, Pereira MEA. Cell surface carbohydrates in *Crithidia deanei*: influence of the endosymbiont. *European Journal of Cell Biology*, 26: 244 – 248, 1982.
- Fairlamb AH, Blackburn P, Ulrich P, Chait BT, Cerami A. Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science*, 227 (4693): 1485-1487, 1985.
- Fampa P, Corrêa-da-Silva MS, Lima DC, Oliveira SMP, Motta MCM, Saraiva EMB. Interaction of insect trypanosomatids with mosquitoes, sand fly and the respective insect cell lines. *International Journal for Parasitology*, 33: 1019-1026, 2003.
- Fang J, Beattie DS. Alternative oxidase present in procyclic *Trypanosoma brucei* may act to lower the mitochondrial production of superoxide”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 414 (2): 294–302, 2003.
- Fang J, Beattie DS. Rotenone-insensitive NADH dehydrogenase is a potential source of superoxide in procyclic *Trypanosoma brucei* mitochondria. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 123 (2): 135-42, 2002.
- Farina M, Attias M, Souto-Padrón T, De Souza W. Further studies on the organization of the paraxial rod on trypanosomatids. *Journal of Protozoology*, 33: 552-557, 1986.
- Fidalgo LM, Gille L. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. *Pharmaceutical Research*, 28 (11): 2758-2770, 2011.
- Fraser-L'Hostis C, Defrise-Quertain F, Coral D, Deshusses J. Regulation of the intracellular pH in the protozoan parasite *Trypanosoma brucei brucei*. *Biological Chemistry*, 378 (9): 1039-1046, 1997.

- Freytmüller E, Camargo EP. Ultrastructural differences between species of trypanosomatids with and without endosymbionts. *Journal of Protozoology*, 28: 175-182, 1981.
- Friedman MJ, Roth EF, Nagel RL, Trager W. *Plasmodium falciparum*: physiological interactions with the human sickle cell. *Experimental Parasitology*. 47 (1): 73-80, 1979.
- Friend WG, Choy CT, Cartwright E. The effect of nutrient intake on the development and the egg production of *Rhodnius prolixus* Stahl (Hemiptera: Reduviidae). *Canadian Journal of Zoology*. 43, 891–904, 1965.
- Galinari S, Camargo EP. Trypanosomatid protozoa: survey of acetylornithinase and ornithine acetyltransferase. *Experimental Parasitology*, 46 (2): 277-282, 1978.
- Galluzzi L, Kepp O, Trojel-Hansen C, Kroemer G. Mitochondrial control of cellular life, stress, and death. *Circulation Research*, 111 (9): 1198-1207, 2012.
- Galvez Rojas RL, Frossard ML, Machado Motta MC, Silber AM. L-Proline uptake in *Crithidia deanei* is influenced by its endosymbiont bacterium. *FEMS Microbiology Letters*, 283 (1): 15-22, 2008.
- Garcia, AS. Análise do perfil proteômico de *Strigomonas culcis* selvagem e apossimbiótica. Rio de Janeiro, 2014. Tese doutorado – Pós-graduação de Biologia Celular e Molecular, Fundação Oswaldo Cruz, 2014
- Garcia ES, Castro DP, Figueiredo MB, Azambuja P. Parasite-mediated interactions within the insect vector: *Trypanosoma rangeli* strategies. *Parasites & Vectors*, 30 (5): 105, 2012.
- Garcia ES, Mello CB, Azambuja P, Ribeiro JM. *Rhodnius prolixus*: salivary antihemostatic components decrease with *Trypanosoma rangeli* infection. *Experimental Parasitology*. 78 (3): 287-293, 1994.
- Gebauer F, Hentze MW. Molecular mechanisms of translational control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5, 827-35, 2004.
- Getachew F, Gedamu L. *Leishmania donovani* mitochondrial iron superoxide dismutase A is released into the cytosol during miltefosine induced programmed cell death. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 183 (1): 42-51, 2012.
- Ghosh S, Banerjee P, Sarkar A, Datta S, Chatterjee M. Coinfection of *Leptomonas seymouri* and *Leishmania donovani* in Indian leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 50 (8): 2774-8, 2012.
- Gilbert HF. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 63: 69-172, 1990.
- Gilkerson RW, Selker JM, Capaldi RA. The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS Letters*, 546: 355–358, 2003.

- Goldberg DE, Slater AF, Cerami A, Henderson GB. Hemoglobin degradation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: an ordered process in a unique organelle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87 (8): 2931-2935, 1990.
- Gomberg M. An instance of trivalent carbon: triphenylmethyl. *Journal of the American Chemical Society*, 22 (11): 757-771, 1900.
- Gonçalves RL, Barreto RF, Polycarpo CR, Gadelha FR, Castro SL, Oliveira MF. A comparative assessment of mitochondrial function in epimastigotes and bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 43 (6): 651-661, 2011.
- Graça-Souza AV, Silva-Neto MA, Oliveira PL. Urate synthesis in the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. Stimulation by hemin is mediated by protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 274 (14): 9673-9676, 1999.
- Graça-Souza AV, Maya-Monteiro C, Paiva-Silva GO, Braz GR, Paes MC, Sorgine MH, Oliveira MF, Oliveira PL. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36 (4): 322-335, 2006.
- Gray MW. Mitochondrial evolution. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4: a011403, 2012.
- Griffith OW. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry*, 106 (1): 207-212, 1980.
- Gull K. The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. *Annual Review of Microbiology*, 53: 629-655, 1999.
- Gutteridge JM, Halliwell B. Comments on review of Free Radicals in Biology and Medicine, 2<sup>nd</sup> edition. *Free Radical Biology & Medicine*, 12 (1): 93-95, 1992.
- Gutteridge JM. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chemico-Biological Interactions*, 91 (2-3): 133-140, 1994.
- Gutteridge JMC, Smith A. Antioxidant protection by haemopexin of haem-stimulated lipid peroxidation. *Biochemical Journal*, 256: 861-865, 1988.
- Ha EM, Lee KA, Seo YY, Kim SH, Lim JH, Oh BH, Kim J, Lee WJ. Coordination of multiple dual oxidase-regulatory pathways in responses to commensal and infectious microbes in drosophila gut. *Nature Immunology* 10: 949–957, 2009.
- Ha EM, Oh CT, Bae YS, Lee WJ. A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science* 310:847–850, 2005.
- Ha EM, Oh CT, Ryu JH, Bae YS, Kang SW, Jang IH, Brey PT, Lee WJ. An antioxidant system required for host protection against gut infection in *Drosophila*. *Developmental Cell* 8: 125–132, 2005.



- Haanstra JR, Bakker BM, Michels PA. In or out? On the tightness of glycosomal compartmentalization of metabolites and enzymes in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 198 (1): 18-28, 2014.
- Haanstra JR, González-Marcano EB, Gualdrón-López M, Michels PA. Biogenesis, maintenance and dynamics of glycosomes in trypanosomatid parasites. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1863 (5): 1038-1048, 2016.
- Halliwell B. Vitamin C and genomic stability. *Mutation Research*, 475 (1-2): 29-35, 2001.
- Hamilton PT, Votýpka J, Dostálová A, Yurchenko V, Bird NH, Lukeš J, Lemaitre B, Perlman SJ. Infection Dynamics and Immune Response in a Newly Described Drosophila-Trypanosomatid Association. *MBio*, 6 (5): e01356-15, 2015.
- Han D, Antunes F, Canali R, Rettori D, Cadenas E. Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (8): 5557-5563, 2003.
- Harman D. Origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history, 1954–2009. *Biogerontology*, 10 (6): 773-781, 2009.
- Herbette S, Roeckel-Drevet P, Drevet JR. Seleno-independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers. *The FEBS Journal*, 274 (9): 2163-2180, 2007.
- Hernandez FR, Turrens JF. Rotenone at high concentrations inhibits NADH-fumarate reductase and the mitochondrial respiratory chain of *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 93 (1): 135-137, 1998.
- Herrera-Ortíz A, Lanz-Mendoza H, Martínez-Barnetche J, Hernández-Martínez S, Villarreal-Treviño C, Aguilar-Marcelino L, Rodríguez MH. *Plasmodium berghei* ookinetes induce nitric oxide production in *Anopheles pseudopunctipennis* midguts cultured *in vitro*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34: 893–901, 2004.
- Hillebrand H, Schmidt A, Krauth-Siegel RL. A second class of peroxidases linked to the trypanothione metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (9): 6809-6815, 2003.
- Holcik M, Sonenberg N. Translational control in stress and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6, 318-327, 2005.
- Hüttemann M, Lee I, Grossman LI, Doan JW, Sanderson TH. Phosphorylation of mammalian cytochrome c and cytochrome c oxidase in the regulation of cell destiny: respiration, apoptosis, and human disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 748: 237-264, 2012.
- Irigoín F, Cibils L, Comini MA, Wilkinson SR, Flohé L, Radi R. Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. *Free Radical Biology and Medicine*, 45 (6): 733-742, 2008.

- Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E, Rajandream MA, Adlem E, Aert R, Anupama A, Apostolou Z, Attipoe P, Bason N, Bauser C, Beck A, Beverley SM, Bianchetti G, Borzym K, Bothe G, Bruschi CV, Collins M, Cadag E, Ciarloni L, Clayton C, Coulson RM, Cronin A, Cruz AK, Davies RM, De Gaudenzi J, Dobson DE, Duesterhoeft A, Fazelina G, Fosker N, Frasch AC, Fraser A, Fuchs M, Gabel C, Goble A, Goffeau A, Harris D, Hertz-Fowler C, Hilbert H, Horn D, Huang Y, Klages S, Knights A, Kube M, Larke N, Litvin L, Lord A, Louie T, Marra M, Masuy D, Matthews K, Michaeli S, Mottram JC, Müller-Auer S, Munden H, Nelson S, Norbertczak H, Oliver K, O'neil S, Pentony M, Pohl TM, Price C, Purnelle B, Quail MA, Rabinowitsch E, Reinhardt R, Rieger M, Rinta J, Robben J, Robertson L, Ruiz JC, Rutter S, Saunders D, Schäfer M, Schein J, Schwartz DC, Seeger K, Seyler A, Sharp S, Shin H, Sivam D, Squares R, Squares S, Tosato V, Vogt C, Volckaert G, Wambutt R, Warren T, Wedler H, Woodward J, Zhou S, Zimmermann W, Smith DF, Blackwell JM, Stuart KD, Barrell B, Myler PJ. The genome of the Kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*, 309, 436-42, 2005.
- Iwanaga S, Lee BL. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *Journal of biochemistry and molecular biology*, 38 (2): 128-150, 2005.
- Jaskowska E, Butler C, Preston G, Kelly S. Phytomonas: trypanosomatids adapted to plant environments. *PLOS Pathogens*, 11 (1): e1004484, 2015.
- Jiménez MI, López-Vélez R, Molina R, Cañavate C, Alvar J. HIV co-infection with a currently non-pathogenic flagellate. *Lancet*. 347 (8996): 264-265, 1996.
- Jirků M, Yurchenko VY, Lukeš J, Maslov DA. New species of insect trypanosomatids from Costa Rica and the proposal for a new subfamily within the Trypanosomatidae. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59 (6): 537-547, 2012.
- Kamhawi S, Ramalho-Ortigao M, Pham VM, Kumar S, Lawyer PG, Turco SJ, Barillas-Mury C, Sacks DL, Valenzuela JG. A role for insect galectins in parasite survival. *Cell*, 119 (3): 329-341, 2004.
- Kawahara T, Quinn MT, Lambeth JD. Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Duox) family of enzymes. *BMC Evolutionary Biology*, 7:109, 2007.
- Kent WS. A Manual of the Infusoria: including a description of all known flagellate, ciliate and tentaculiferous protozoa, British and foreign, and an account of the organization and affinities of sponges (Vol. I), David Bogue, London, 243–244, 1880 – 1881.
- Kerksick C, Willoughby D. The antioxidant role of glutathione and N-acetyl-cysteine supplements and exercise-induced oxidative stress. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 9 (2): 38-44, 2005.

- Koella JC, Boëte C. A model for the coevolution of immunity and immune evasion in vector-borne diseases with implications for the epidemiology of malaria. *The American Naturalist*, 161 (5): 698-707, 2003.
- Kohen R, Nyska. Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology*, 30: 620-650, 2002.
- Kostygov AY, Dobáková E, Grybchuk-Ieremenko A, Váhala D, Maslov DA, Votýpka J, Lukeš J, Yurchenko V. Novel Trypanosomatid-Bacterium Association: Evolution of Endosymbiosis in Action. *MBio*, 7 (2): e01985, 2016.
- Kostygov AY, Grybchuk-Ieremenko A, Malysheva MN, Frolov AO, Yurchenko V. Molecular revision of the genus *Wallaceina*. *Protist*, 165 (5): 594-604, 2014.
- Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology & Medicine*, 47: 333–343, 2009.
- Kraeva N, Butenko A, Hlaváčová J, Kostygov A, Myšková J, Grybchuk D, Leštinová T, Votýpka J, Volf P, Opperdoes F, Flegontov P, Lukeš J, Yurchenko V. *Leptomonas seymouri*: Adaptations to the dixenous life cycle analyzed by genome sequencing, transcriptome profiling and co-infection with *Leishmania donovani*. *PLOS Pathogens*, 11 (8): e1005127, 2015.
- Krauth-Siegel RL, Enders B, Henderson GB, Fairlamb AH, Schirmer RH. Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. Purification and characterization of the crystalline enzyme. *European Journal of Biochemistry*, 164(1): 123-128, 1987.
- Krieger S, Schwarz W, Ariyanayagam MR, Fairlamb AH, Krauth-Siegel RL, Clayton C. Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. *Molecular Microbiology*, 35 (3): 542-552, 2000.
- Kumar S, Christophides GK, Cantera R, Charles B, Han YS, Meister S, Dimopoulos G, Kafatos FC, Barillas-Mury C. The role of reactive oxygen species on *Plasmodium melanotic* encapsulation in *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100:14139–14144, 2003.
- Kumar S, Gupta L, Han YS, Barillas-Mury C. Inducible peroxidases mediate nitration of anopheles midgut cells undergoing apoptosis in response to *Plasmodium* invasion. *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 53475–53482, 2004.
- Lamour N, Rivière L, Coustou V, Coombs GH, Barrett MP, Bringaud F. Proline metabolism in procyclic *Trypanosoma brucei* is down-regulated in the presence of glucose. *The Journal of Biological Chemistry*, 280 (12): 11902-11910, 2005.
- Lander N, Cordeiro C, Huang G, Docampo R. Polyphosphate and acidocalcisomes. *Biochemical Society Transactions*, 44 (1): 1-6, 2016.

- Landfear SM, Ignatushchenko M. The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 115 (1): 1-17, 2001.
- Lehane ML. Biology of blood-sucking insect. 2<sup>nd</sup> edition. Nova York: Cambridge, 1991.
- Leifso K, Cohen-Freue G, Dogra N, Murray A, McMaster WR. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania promastigote* and amastigote life stages: the Leishmania genome is constitutively expressed. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 152, 35-46, 2007.
- Leloup C, Casteilla L, Carrie A, Galinier A, Benani A, Carneiro L, Penicaud L. Balancing mitochondrial redox signaling a key point in metabolic regulation. *Antioxidants & Redox Signaling* 14(3), 2011.
- Leulier F, Royet J. Maintaining immune homeostasis in fly gut. *Nature Immunology*, 10 (9): 936-938, 2009.
- Liang XH, Haritan A, Uliel S, Michaeli S. Trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryot Cell*, 2, 830-40, 2003.
- Liu B, Liu Y, Motyka SA, Agbo EE, Englund PT. Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. *Trends in Parasitology*, 21 (8): 363-369, 2005.
- López-Lara IM, Geiger O. Novel pathway for phosphatidylcholine biosynthesis in bacteria associated with eukaryotes. *Journal of Biotechnology*, 91 (2-3): 211-221, 2001.
- Luckhart S, Vodovotz Y, Cui L, Rosenberg R. The mosquito *Anopheles stephensi* limits malaria parasite development with inducible synthesis of nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 5700–5705, 1998.
- Lukashevich ED, Mostovski MB. Hematophagous insects in the fossil record. *Journal of Paleontology*, 37: 153–161, 2003.
- Lukeš J, Skalický T, Týč J, Votýpka J, Yurchenko V. Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 195 (2): 115-122, 2014.
- Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224C: 164-175, 2014.
- Lwoff M. Aneurin as a growth factor for the trypanosomatid flagellate *Strigomonas oncopelti*. *Société de Biologie*, 126: 771-773, 1937.
- Lwoff M. The nutrition of parasitic flagellates (trypanosomidae, Trichomonadinae). *Biochemistry and Physiology of Protozoa*, 131:182, 1951.
- Machado-Silva A, Cerqueira PG, Grazielle-Silva V, Gadelha FR, Peloso E de F, Teixeira SM, Machado CR. How *Trypanosoma cruzi* deals with oxidative stress: Antioxidant defence and DNA repair pathways. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 767: 8-22, 2016.

- MacLeod ET, Maudlin I, Darby AC, Welburn SC. Antioxidants promote establishment of trypanosome infections in tsetse. *Parasitology*, 134 (Pt 6): 827-831, 2007.
- Manta B, Comini M, Medeiros A, Hugo M, Trujillo M, Radi R.. Trypanothione: a unique bis-glutathionyl derivative in trypanosomatids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830 (5): 3199-3216, 2013.
- Marín C, Fabre S, Sánchez-Moreno M, Dollet M. Herpetomonas spp. isolated from tomato fruits (*Lycopersicon esculentum*) in southern Spain. *Experimental Parasitology*, 116 (1): 88-90, 2007.
- Marmur J, Cahoon ME, Shimura Y, Vogel H. DNA type attributable to a bacterial endosymbiont in the protozoon, *Crithidia (Strigomonas) oncopelti*. *Nature*, 196: 1228-1229, 1963.
- Martins RM, Covarrubias C, Rojas RG, Silber AM, Yoshida N. Use of L-proline and ATP production by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms as requirements for host cell invasion. *Infection and Immunity*, 77 (7): 3023-3032, 2009. doi: 10.1128/IAI.00138-09.
- Maslov DA, Votýpka J, Yurchenko V, Lukeš J. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed. *Trends in Parasitology*, 29 (1): 43-52, 2013.
- Matteoli FP, d'Avila-Levy CM, Santos LO, Barbosa GM, Holandino C, Branquinha MH, Santos AL. Roles of the endosymbiont and leishmanolysin-like molecules expressed by *Crithidia deanei* in the interaction with mammalian fibroblasts. *Experimental Parasitology*, 121 (3):246-253, 2009.
- McCord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *The Journal of Biological Chemistry*, 244 (22): 6056-6063, 1969.
- McGhee RB, Cosgrove WB. Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae. *Microbiology Reviews*, 44 (1): 140-173, 1980.
- McLaughlin GL, Cain GD. Cell surface proteins of symbiotic and aposymbiotic strains of *Crithidia oncopelti* and *Blastocrithidia culicis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 82B: 469-477, 1985.
- McNicoll F, Drummel-Smith J, Muller M, Madore E, Boilard N, Ouellette M, Papadopoulou B. A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in *Leishmania infantum*. *Proteomics*, 6, 3567-81, 2006.
- Mehta A, Shaha C. Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (12): 11798-11813, 2004.

- Menna-Barreto RF, De Castro SL. The double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: the pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. *BioMed Research International*, 614014, 2014.
- Menna-Barreto RF, Goncalves RL, Costa EM, Silva RS, Pinto AV, Oliveira MF, de Castro SL. The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction. *Free Radical Biology and Medicine*, 47 (5): 644-653, 2009.
- Mitra B, Cortez M, Haydock A, Ramasamy G, Myler PJ, Andrews NW. Iron uptake controls the generation of Leishmania infective forms through regulation of ROS levels. *The Journal of Experimental Medicine*; 210(2): 401-416, 2013.
- Molina-Cruz A, DeJong RJ, Charles B, Gupta L, Kumar S, Jaramillo-Gutierrez G, Barillas-Mury C. Reactive oxygen species modulate *Anopheles gambiae* immunity against bacteria and Plasmodium. *The Journal of Biological Chemistry*, 283 (6): 3217-3223, 2008.
- Morio F, Reynes J, Dollet M, Pratlong F, Dedet JP, Ravel CI. Isolation of a protozoan parasite genetically related to the insect trypanosomatid *Herpetomonas samuelpessoai* from a human immunodeficiency virus-positive patient. *Journal of Clinical Microbiology*, 46 (11): 3845-3847, 2008.
- Motta MC, Catta-Preta CM, Schenkman S, de Azevedo Martins AC, Miranda K, de Souza W, Elias MC. The bacterium endosymbiont of *Crithidia deanei* undergoes coordinated division with the host cell nucleus. *PLOS One*, 5 (8): e12415, 2010.
- Motta MC, Martins AC, de Souza SS, Catta-Preta CM, Silva R, Klein CC, de Almeida LG, de Lima Cunha O, Ciapina LP, Brocchi M, Colabardini AC, de Araujo Lima B, Machado CR, de Almeida Soares CM, Probst CM, de Menezes CB, Thompson CE, Bartholomeu DC, Gradia DF, Pavoni DP, Grisard EC, Fantinatti-Garboggini F, Marchini FK, Rodrigues-Luiz GF, Wagner G, Goldman GH, Fietto JL, Elias MC, Goldman MH, Sagot MF, Pereira M, Stoco PH, de Mendonça-Neto RP, Teixeira SM, Maciel TE, de Oliveira Mendes TA, Ürményi TP, de Souza W, Schenkman S, de Vasconcelos AT. Predicting the proteins of *Angomonas deanei*, *Strigomonas culicis* and their respective endosymbionts reveals new aspects of the trypanosomatidae family. *PLOS One*, 8 (4): e60209, 2013.
- Motta MC, Soares MJ, Attias M, Morgado J, Lemos AP, Saad-Nehme J, Meyer-Fernandes JR, De Souza W. Ultrastructural and biochemical analysis of the relationship of *Crithidia deanei* with its endosymbiont. *European Journal of Cell Biology*, 72 (4): 370-377, 1997.
- Motta MC. Endosymbiosis in trypanosomatids as a model to study cell evolution - review. *The Open Parasitology Journal*, 4: 139-147, 2010.

- Moyses DN, Barrabin H. Rotenone-sensitive mitochondrial potential in *Phytomonas serpens*: electrophoretic  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1656 (2–3): 96–103, 2004.
- Mundim MH, Roitman I, Hermans MA, Kitajima EW. Simple nutrition of *Crithidia deanei*, a reduviid trypanosomatid with an endosymbiont. *The Journal of Protozoology*, 21 (4): 518-521, 1974.
- Mundim MH, Roitman I. Extra nutritional requirements of artificially aposymbiotic *Crithidia deanei*. *Journal of Protozoology*, 24: 329-331, 1977.
- Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417 (1): 1-13, 2009.
- Nascimento MT, Garcia MC, da Silva KP, Pinto-da-Silva LH, Atella GC, Motta MC, Saraiva EM. Interaction of the monoxenic trypanosomatid *Blastocrithidia culicis* with the *Aedes aegypti* salivary gland. *Acta Tropica*, 113 (3): 269-278, 2010.
- Ncokazi, KK e Egan, TJ. A colorimetric high-throughput beta-hematin inhibition screening assay for use in the search for antimalarial compounds. *Analytical Biochemistry*, 338, 306-319, 2005.
- Nelson DL, Cox MM. Lehninger, Principios de Bioquímica. 5ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- Newton BA, Horne RW. Intracellular structures in *Strigomonas oncopelti*. Cytoplasmic structures containing ribonucleoprotein. *Experimental Cell Research*, 13: 563-574, 1957.
- Nogueira NP, de Souza CF, Saraiva FM, Sultano PE, Dalmau SR, Bruno RE, Gonçalves Rde L, Laranja GA, Leal LH, Coelho MG, Masuda CA, Oliveira MF, Paes MC. Heme-induced ROS in *Trypanosoma cruzi* activates CaMKII-like that triggers epimastigote proliferation. One helpful effect of ROS. *PLoS One*, 6 (10): e25935, 2011.
- Novey FG, McNeal WJ, Torrey HN. The trypanosomes of mosquitoes and other insects. *The Journal of Infectious Diseases*, 4: 223-276, 1907.
- O'Neil RG, Wu L, Mullani N. Uptake of a fluorescent deoxyglucose analog (2-NBDG) in tumor cells. *Molecular Imaging and Biology*, 7 (6): 388–392, 2005.
- Oda LM, Alviano CS, Silva-Filho FC, Angluster J, Roitman I, De Souza W. Surface anionic groups in symbiote-bearing and symbiote-free strains of *Crithidia deanei*. *Journal of Protozoology*, 31: 131-134, 1984.
- Olczak T, Simpson W, Liu X, Genco CA. Iron and heme utilization in *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiology Letters*, 29: 119-44, 2005.
- Oliveira GA, Lieberman J, Barillas-Mury C. Epithelial Nitration by a Peroxidase/NOX5 System Mediates Mosquito Antiplasmodial Immunity. *Science*, 335, 856, 2012.

- Oliveira JH, Gonçalves RL, Lara FA, Dias FA, Gandara AC, Menna-Barreto RF, Edwards MC, Laurindo FR, Silva-Neto MA, Sorgine MH, Oliveira PL. Blood meal-derived heme decreases ROS levels in the midgut of *Aedes aegypti* and allows proliferation of intestinal microbiota. *PLOS Pathogens*, 7 (3): e1001320, 2011.
- Oliveira MF, Silva JR, Dansa-Petretski M, de Souza W, Lins U, Braga CM, Masuda H, Oliveira PL. Haem detoxification by an insect. *Nature*, 400 (6744): 517-518, 1999.
- Oliveira MF, Timm BL, Machado EA, Miranda K, Attias M, Silva JR, Dansa-Petretski M, de Oliveira MA, De Souza W, Pinhal NM, Sousa JJ, Vugman NV, Oliveira PL. On the pro-oxidant effects of haemozoin. *FEBS Letters*, 512: 139-144, 2002.
- Oliveira PL, Kawooya JK, Ribeiro JMC, Meyer T, Poorman R, Alves EW, Walker FA, Machado EA, Nussenzveig RH, Padovan GJ, Masuda H. A heme-binding protein from hemolymph and oocytes of the blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus*. Isolation and characterization. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 10897–10901, 1995.
- Oliveira PL, Oliveira MF. Vampires, Pasteur and reactive oxygen species. Is the switch from aerobic to anaerobic metabolism a preventive antioxidant defence in blood-feeding parasites? *FEBS Letter*, 525 (1-3): 3-6, 2002.
- Olivier M, Atayde VD, Isnard A, Hassani K, Shio MT. *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. *Microbes and Infection*, 14 (15): 1377-1389, 2012.
- Opperdoes FR, Michels PA. Complex I of Trypanosomatidae: Does it exist? *Trends in Parasitology*, 24: 310–317, 2008.
- Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, 12 (5): 913-322, 2007.
- Pacheco RS, Marzochi MC, Pires MQ, Brito CM, Madeira M de F, Barbosa-Santos EG. Parasite genotypically related to a monoxenous trypanosomatid of dog's flea causing opportunistic infection in an HIV positive patient. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93 (4): 531-537 1998.
- Paes MC, Oliveira MB, Oliveira PL. Hydrogen peroxide detoxification in the midgut of the blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 48: 63–71, 2001.
- Paiva-Silva GO, Cruz-Oliveira C, Nakayasu ES, Maya-Monteiro CM, Dunkov BC, Masuda H, Almeida IC, Oliveira PL. A heme-degradation pathway in a blood-sucking insect. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103: 8030–8035, 2006.



- Palmié-Peixoto IV, Rocha MR, Urbina JA, de Souza W, Einicker-Lamas M, Motta MC. Effects of sterol biosynthesis inhibitors on endosymbiont-bearing trypanosomatids. *FEMS Microbiology Letters*, 255 (1): 33-42, 2006.
- Paramchuk WJ, Ismail SO, Bhatia A, Gedamu L. Cloning, characterization and overexpression of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Leishmania chagasi*: role in pathogenesis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 90 (1): 203-221, 1997.
- Penketh PG, Kennedy WP, Patton CL, Sartorelli AC. Trypanosomatid hydrogen peroxide [corrected] metabolism. *FEBS Letter*, 221 (2): 427-431, 1987.
- Pereira LO, Oliveira PL, Almeida IC, Paiva-Silva GO Biglutaminybiliverdin IX alpha as a heme degradation product in the dengue fever insectvector *Aedes aegypti*. *Biochemistry*, 46: 6822–6829, 2007.
- Peterson TM, Gow AJ, Luckhart S. Nitric oxide metabolites induced in *Anopheles stephensi* control malaria parasite infection. *Free Radical Biology & Medicine*, 42 (1): 132-142, 2007.
- Pfeiffer T, Schuster S, Bonhoeffer S. Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science*, 292 (5516): 504–507, 2001.
- Piacenza L, Irigoín F, Alvarez MN, Peluffo G, Taylor MC, Kelly JM, Wilkinson SR, Radi R. Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression. *Biochemical Journal*, 403 (2): 323-334, 2007.
- Piacenza L, Peluffo G, Alvarez MN, Kelly JM, Wilkinson SR, Radi R. Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage-and endogenously-derived peroxynitrite. *Biochemical Journal*, 410(2):359–368, 2008.
- Pimenta PF, Turco SJ, McConville MJ, Lawyer PG, Perkins PV, Sacks DL. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science*, 26: 1812-1815, 1992.
- Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97: 55-74, 2015.
- Podlipaev SA. Catalogue of world fauna of Trypanosomatidae (Protozoa). *Proceedings of the Zoological Institute Leningrad*, 144: 1-178, 1990.
- Podlipaev SA. Insect trypanosomatids: the need to know more. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95 (4): 517-522, 2000.
- Podlipaev SA. The more insect trypanosomatids under study-the more diverse Trypanosomatidae appears. *International Journal for Parasitology*, 31 (5-6): 648-652, 2001.

- Poljsak B, Šuput D, Milisav I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 956792, 2013.
- Pon LA, Schon EA. Mitochondria. In: *Methods in Cell Biology*. 2<sup>nd</sup> edition. San Diego: Academic Press. 2007; 944 p.
- Ponka P. Cell biology of haem. *The American Journal of the Medical Sciences*, 318: 241-256, 1999.
- Priest JW, Hajduk SL. Developmental regulation of *Trypanosoma brucei* cytochrome c reductase during bloodstream to procyclic differentiation. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 65 (2): 291-304, 1994.
- Quinlan CL, Gerencser AA, Treberg JR, Brand MD. The mechanism of superoxide production by the antimycin-inhibited mitochondrial Q-cycle. *The Journal of Biological Chemistry*, 286 (36): 31361-31372, 2011.
- Quiñones W, Cáceres AJ, Ruiz MT, Concepción JL. Glycosomal membrane proteins and lipids from *Leishmania mexicana*. *Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 182: 27-36, 2015.
- Rada B, Leto TL. Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases. *Contributions to Microbiology*, 15: 164-187, 2008.
- Rao AU, Carta LK, Lesuisse E, Hamza I. Lack of heme synthesis in a freeliving eukaryote. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102: 4270-4275, 2005.
- Requena JM. Lights and shadows on gene organization and regulation of gene expression in *Leishmania*. *Frontiers in Bioscience (Landmark Ed)*, 16: 2069-2085, 2011. Review. PubMed PMID: 21622163.
- Rigoulet M, Yoboue ED, Devin A. Mitochondrial ROS Generation and Its Regulation: Mechanisms Involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*, 14(3), 2011.
- Riley PA. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *International Journal of Radiation Biology*, 65 (1): 27-33, 1994.
- Rodrigues JC, Godinho JL, de Souza W. Biology of human pathogenic trypanosomatids: epidemiology, lifecycle and ultrastructure. *Subcellular Biochemistry*, 74: 1-42, 2014
- Rossi F, Della Bianca V, de Togni P. Mechanisms and functions of the oxygen radicals producing respiration of phagocytes. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 8 (2): 187-204, 1985.
- Rossignol R, Gilkerson R, Aggeler R, Yamagata K, Remington SJ, Capaldi RA. Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Research*, 64 (3): 985-993, 2004.

- Rozental S, Carvalho TU, De Souza W. Influence of the endosymbiont on the interaction of *Crithidia deanei* with macrophages. *Microsc Electron Biol Celular* 1987; 11: 167-179.
- Ruiz-Moreno L, Bijovsky AT, Pudles J, Alves MJ, Colli W. *Trypanosoma cruzi*: monoclonal antibody to cytoskeleton recognizes giant proteins of the flagellar attachment zone. *Experimental Parasitology*, 80 (4): 605-615, 1995.
- Salzman TA, Batlle AM, Angluster J, de Souza W. Heme synthesis in *Crithidia deanei*: influence of the endosymbiote. *The International Journal of Biochemistry*, 17: 1343–1347, 1985.
- Santhamma KR, Bhaduri A. Characterization of the respiratory chain of *Leishmania donovani* promastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 75 (1): 43-53, 1995.
- Santos AL, Abreu CM, Batista LM, Alviano CS, de Araújo Soares RM. Cell-associated and extracellular proteinases in *Blastocrithidia culicis*: influence of growth conditions. *Current Microbiology*, 43 (2): 100-106, 2001.
- Scandalios, JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal Of Medical and Biological Research*, 38 (7): 995-1014, 2005.
- Schaub GA. The effect of *Blastocrithidia triatoma* (Trypanosomatidae) on the reduviid bug *Triatoma infestans*: influence of group size. *Journal of Invertebrate Pathology*, 56 (2): 249-257, 1990.
- Schmidt MM, Dringen R. Differential effects of iodoacetamide and iodoacetate on glycolysis and glutathione metabolism of cultured astrocytes. *Frontiers in Neuroenergetics*, 1: 1, 2009.
- Schmitt TH, Frezzatti WAJ, Schereier S. Heme-induced lipid membrane disorder and increased permeability: a molecular model for the mechanism of cells lysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 307: 96–103, 1993.
- Schmunis G, Yadon ZE. Chagas disease: a latin american health problem becoming a world health problem. *Acta Tropica*, 115 (1-2): 14-21, 2010.
- Schwarz RS, Bauchan GR, Murphy CA, Ravoet J, de Graaf DC, Evans JD. Characterization of two species of Trypanosomatidae from the honey bee *Apis mellifera*: *Crithidia mellificae* Langridge and McGhee, and *Lotmaria passim* n. gen., n. sp. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62 (5): 567-583, 2015.
- Selvapandiyam A, Ahuja K, Puri N, Krishnan A. Implications of co-infection of *Leptomonas* in visceral leishmaniasis in India. *Parasitology*, 142 (14): 1657-62, 2015.

- Selvapandiyan A, Ahuja K, Puri N, Krishnan A. Implications of co-infection of *Leptomonas* in visceral leishmaniasis in India. *Parasitology*, 142 (14): 1657-1662, 2015.
- Shaikhali J, Heiber I, Seidel T, Ströher E, Hiltcher H, Birkmann S, Dietz KJ, Baier M. The redox-sensitive transcription factor Rap2.4a controls nuclear expression of 2-Cys peroxiredoxin A and other chloroplast antioxidant enzymes. *BMC Plant Biology*, 8: 48, 2008.
- Shames SL, Fairlamb AH, Cerami A, Walsh CT. Purification and characterization of trypanothione reductase from *Crithidia fasciculata*, a newly discovered member of the family of disulfide-containing flavoprotein reductases. *Biochemistry*, 25 (12): 3519-3526, 1986.
- Shiba T, Kido Y, Sakamoto K, Inaoka DK, Tsuge C, Tatsumi R, Takahashi G, Balogun EO, Nara T, Aoki T, Honma T, Tanaka A, Inoue M, Matsuoka S, Saimoto H, Moore AL, Harada S, Kita K. Structure of the trypanosome cyanide-insensitive alternative oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110 (12): 4580-4585, 2013.
- Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, 4: 180-183, 2015.
- Sies H. Oxidants And Antioxidants: Pathophysiologic Determinants and Therapeutic agents. Oxidative stress: From basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine*, 91 (3): S31-S38, 1991.
- Sies H. Role of reactive oxygen species in biological processes. *Wiener klinische Wochenschrift*, 69 (21-23): 965-968, 1991.
- Sies, H. Oxidative stress, Introductory remarks, In: Oxidative Stress. H. Sies edition. Londres: Academic Press, 1985.
- Silva TM, Peloso EF, Vitor SC, Ribeiro LH, Gadelha FR. O<sub>2</sub> consumption rates along the growth curve: new insights into *Trypanosoma cruzi* mitochondrial respiratory chain. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 43 (4): 409-417, 2011.
- Skulachev VP. Mitochondria-targeted antioxidants as promising drugs for treatment of age-related brain diseases. *Journal of Alzheimer's Disease*, 28 (2): 283-289, 2012.
- Skulachev VP. Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 29(2): 169-202, 1996.
- Slater AF, Swiggard WJ, Orton BR, Flitter WD, Goldberg DE, Cerami A, Henderson GB. An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88 (2): 325-329, 1991.
- Soares MJ, De Souza W. Freeze-fracture study of the endosymbiont of *Blastocrithidia culicis*. *Journal of Protozoology*, 35: 370-374, 1988.

- Srivastava P, Prajapati VK, Vanaerschot M, Van der Auwera G, Dujardin JC, Sundar S. Detection of *Leptomonas* sp. parasites in clinical isolates of Kala-azar patients from India. *Infection, Genetics and Evolution*, 10 (7): 1145-1150, 2010.
- Stoppini L, Buchs PA, Brun R, Muller D, Duport S, Parisi L, Seebeck T. Infection of organotypic slice cultures from rat central nervous tissue with *Trypanosoma brucei brucei*. *International Journal of Medical Microbiology*, 290 (1): 105-113, 2000.
- Sullivan FX, Walsh CT. Cloning, sequencing, overproduction and purification of trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 44 (1): 145-147, 1991.
- Sumimoto H. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *The FEBS Journal*, 275:3249–3277, 2008.
- Surve S, Heestand M, Panicucci B, Schnauffer A, Parsons M. Enigmatic presence of mitochondrial complex I in *Trypanosoma brucei* bloodstream forms. *Eukaryotic Cell*, 11 (2): 183-193, 2012.
- Svobodová M, Zídková L, Cepicka I, Oborník M, Lukes J, Votýpka J. *Sergeia podlipaevi* gen. nov., sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57 (Pt 2): 423-432, 2007.
- Szöör B, Haanstra JR, Gualdrón-López M, Michels PA. Evolution, dynamics and specialized functions of glycosomes in metabolism and development of trypanosomatids. *Current Opinion in Microbiology*, 22: 79-87, 2014.
- Tappel AL. Unsaturated lipid oxidation catalyzed by hemein compounds. *The Journal of Biological Chemistry*, 217: 721-733, 1955.
- Teixeira MM, Borghesan TC, Ferreira RC, Santos MA, Takata CS, Campaner M, Nunes VL, Milder RV, de Souza W, Camargo EP. Phylogenetic validation of the genera *Angomonas* and *Strigomonas* of trypanosomatids harboring bacterial endosymbionts with the description of new species of trypanosomatids and of proteobacterial symbionts. *Protist*, 162 (3): 503-524, 2011.
- TeSlaa T, Teitell MA. Techniques to monitor glycolysis. *Methods in Enzymology*. 542: 91-114, 2014.
- Tielens AG, Van Hellemond JJ. Surprising variety in energy metabolism within Trypanosomatidae. *Trends in Parasitology*, 25 (10): 482-490, 2009.
- Tomás AM, Castro H. Redox metabolism in mitochondria of trypanosomatids. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19 (7): 696-707, 2013.
- Tovar J, Cunningham ML, Smith AC, Croft SL, Fairlamb AH. Down-regulation of *Leishmania donovani* trypanothione reductase by heterologous expression of a trans-dominant mutant homologue: effect on parasite intracellular survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 95 (9): 5311-6, 1998.

- Tripodi KE, Menendez Bravo SM, Cricco JA. Role of heme and heme-proteins in trypanosomatid essential metabolic pathways. *Enzyme Research*, 2011:873230, 2011.
- Turrens F. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Molecular Aspects of Medicine*, 25 (1-2): 211-220, 2004.
- Ursic-Bedoya RJ, Lowenberger CA. *Rhodnius prolixus*: identification of immune-related genes up-regulated in response to pathogens and parasites using suppressive subtractive hybridization. *Developmental & Comparative Immunology*, 31, 109–120, 2007.
- Van Alphen L, Verkleij A, Leunissen-Bijvelt J, Lugtenberg B. Architecture of the outer membrane of *Escherichia coli*. III. Protein-lipopolysaccharide complexes in intramembraneous particles. *Journal of Bacteriology*, 134(3):1089-1098, 1978.
- Van Gool AP, Nanninga N. Fracture faces in the cell envelope of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 108(1): 474-481, 1971.
- Vercesi AE, Bernardes CF, Hoffmann ME, Gadelha FR, Docampo R. Digitonin permeabilization does not affect mitochondrial function and allows the determination of the mitochondrial membrane potential of *Trypanosoma cruzi* *in situ*. *Journal of Biological Chemistry*, 266 (22) 14431-14444, 1991.
- Verkleij AJ, Lugtenberg EJ, Ververgaert PH. Freeze etch morphology of outer membrane mutants of *Escherichia coli* K12. *Biochimica et Biophysica Acta*, 426(3): 581-586, 1976.
- Verner Z, Cermáková P, Skodová I, Kriegová E, Horváth A, Lukes J. Complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) is active in but non-essential for procyclic *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 175: 196–200, 2011.
- Votýpka J, d'Avila-Levy CM, Grellier P, Maslov DA, Lukeš J, Yurchenko V. New Approaches to Systematics of Trypanosomatidae: Criteria for Taxonomic (Re)description. *Trends in Parasitology*, 31 (10): 460-469, 2015.
- Votýpka J, Kostygov AY, Kraeva N, Grybchuk-Ieremenko A, Tesařová M, Grybchuk D, Lukeš J, Yurchenko V. Kentomonas gen. n., a new genus of endosymbiont-containing trypanosomatids of Strigomonadinae subfam. n. *Protist*, 165 (6): 825-838, 2014.
- Votýpka J, Suková E, Kraeva N, Ishemgulova A, Duží I, Lukeš J, Yurchenko V. Diversity of trypanosomatids (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) parasitizing fleas (Insecta: Siphonaptera) and description of a new genus Blechomonas gen. n. *Protist*, 164 (6): 763-781, 2013.

- Votýpka J, Suková E, Kraeva N, Ishemgulova A, Duží I, Lukeš J, Yurchenko V. Diversity of trypanosomatids (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) parasitizing fleas (Insecta: Siphonaptera) and description of a new genus *Blechomonas* gen. n. *Protist*, 164 (6): 763-781, 2013.
- Wallace FG. The trypanosomatids parasites of insects and arachnids. *Experimental Parasitology*, 18: 124-193, 1966.
- Walling C. Fenton's reagent revisited. *Accounts of Chemical Research*, 8 (4), 125-131, 1975.
- Wang Y, Hekimi S. Understanding Ubiquinone. *Trends in Cell Biology*, 26 (5): 367-378, 2016.
- Way JL. Cyanide intoxication and its mechanism of antagonism. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 24, 451–481, 1984
- Whitten M, Sun F, Tew I, Schaub G, Soukou C, Nappi A, Ratcliffe N, Differential modulation of *Rhodnius prolixus* nitric oxide activities following challenge with *Trypanosoma rangeli*, *T. cruzi* and bacterial cell wall components. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* , 37, 440–452, 2007.
- Wilkinson SR, Meyer DJ & Kelly JM. Biochemical characterization of a trypanosome enzyme with glutathione-dependent peroxidase activity. *Biochemical Journal*, 352 (3): 755-61, 2000b.
- Wilkinson SR, Meyer DJ, Taylor MC, Bromley EV, Miles MA, Kelly JM. The *Trypanosoma cruzi* enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin. *The Journal of Biological Chemistry*, 277 (19): 17062-17071, 2002.
- Wilkinson SR, Obado SO, Mauricio IL, Kelly JM. *Trypanosoma cruzi* expresses a plant-like ascorbate-dependent hemoperoxidase localized to the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99 (21): 13453-13458, 2002c.
- Wilkinson SR, Taylor MC, Touitha S, Mauricio IL, Meyer DJ, Kelly JM. TcGPXII, a glutathione-dependent *Trypanosoma cruzi* peroxidase with substrate specificity restricted to fatty acid and phospholipid hydroperoxides, is localized to the endoplasmic reticulum. *Biochemical Journal*, 364 (3): 787-794, 2002.
- Wilkinson SR, Temperton NJ, Mondragon A, Kelly JM. Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (11): 8220-8225, 2000.
- Xing J, Wang G, Zhang Q, Liu X, Gu Z, Zhang H, Chen YQ, Chen W. Determining antioxidant activities of lactobacilli cell-free supernatants by cellular antioxidant assay: a comparison with traditional methods. *PLoS One*, 10 (3): e0119058, 2015.

Yurchenko V, Kostygov A, Havlová J, Grybchuk-Ieremenko A, Ševčíková T, Lukeš J, Ševčík J, Votýpka J. Diversity of Trypanosomatids in Cockroaches and the Description of *Herpetomonas tarakana* sp. n. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 63 (2): 198-209, 2016.